

Aus der medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen
Abteilung: Innere Medizin II
(Schwerpunkt: Hämatologie, Onkologie, klinische Immunologie, Rheumatologie)

Die Rolle von PDK1 / PDPK1 in Akuten Leukämien

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Haug, Natalie Desirée

2019

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. M. Schittenhelm

2. Berichterstatter: Professor Dr. M. Heni

Tag der Disputation: 28.11.2019

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VI
Einheiten	IX
1. Einleitung	1
1.1 Die Entstehung von Leukämien	1
1.2 Stand der Forschung.....	4
1.3 Ziel der Arbeit.....	10
2. Material und Methoden	11
2.1 Zelllinien	11
2.1.1 Die Zelllinie Jurkat	11
2.1.2 Die Zelllinie Molm 14	11
2.1.3 Die Zelllinie K562.....	11
2.1.4 Die Zelllinie HL-60	11
2.2 Geräte und Materialien.....	12
2.3 Transduktion der Zelllinien	17
2.4 Selektion und Transduktionskontrolle.....	18
2.5 Zellkultur.....	18
2.6 Proliferation (XTT, Auszählen)	19
2.6.1 Auszählen.....	19
2.6.2 XTT-Färbung	19
2.7 SDS-PAGE und Western-Blot	21
2.7.1 Zellyse und Proteinextraktion.....	21
2.7.2 SDS-Page.....	23
2.7.3 Western-Blot.....	23

2.8	Apoptoseanalyse mittels Durchflusszytometrie	24
2.8.1	Behandlung der Zellen.....	25
2.8.2	Messung des Apoptoseverhaltens.....	26
2.8.3	Auswertung der Messergebnisse.....	26
2.9	Statistische Analyse	27
2.10	Phosphoproteomanalyse	28
2.10.1	Zellkultur und SILAC labeling	28
2.10.2	Proteinextraktion	28
2.10.3	Phosphopeptid-Anreicherung	29
2.10.4	Nano liquid chromatography–mass spectrometry (LC-MS/MS).....	29
2.10.5	Datenverarbeitung und Analyse	30
2.11	Zellzyklusanalyse.....	31
3.	Ergebnisse.....	33
3.1	Etablierung eines PDK1 knock-out Zellmodells.....	33
3.2	Phosphorylierungsstatus von AKT	34
3.3	Proliferation der nativen Zellen.....	35
3.4	Proliferation unter Behandlung mit Daunorubicin	38
3.5	Zellzyklus	41
3.6	Proliferation unter Behandlung mit Tyrosinkinaseinhibitoren.....	46
3.7	Apoptose unter Behandlung mit Daunorubicin	48
3.8	Apoptose unter Behandlung mit spezifischen Inhibitoren.....	53
3.9	Phosphoproteomanalyse.....	55
3.9.1	Alterationen des Phosphoproteoms bei PDK1 k.o.....	55
3.9.2	Stringanalyse	62
3.9.3	Verifikation Phosphoproteomanalyse mittels pRB1-Nachweis	63
4.	Diskussion.....	64

5. Zusammenfassung	70
6. Danksagung.....	72
7. Tabellenverzeichnis	73
8. Abbildungsverzeichnis	74
9. Literaturverzeichnis	76
10. Selbstständigkeitserklärung	86

Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
Ak	Antikörper
AKT	Proteinkinase B
ALL	Akute Lymphatische Leukämie
AML	Akute Myeloische Leukämie
BB	Binding Buffer
BCR-ABL1	Fusionsprotein durch Translokation t(9;22)(q34;q11)
BSA	bovines Serum-Albumin
C	Chromatide
CML	Chronisch myeloische Leukämie
CR	complete remission
DMEM	Ducbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DPBS	Dulbecco's phosphate-buffered saline
EBV	Epstein-Barr-Virus
ECR	electron coupling reagent
EV	empty vector
FACS	Fluorescence-activated cell sorting (Durchflusszytometrie)
FBS	Fetal bovine serum (Fetales Kälberserum)
FDR	false discovery rate
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FLT3	FMS-like Tyrosinkinase 3
GFP	grün fluoreszierendes Protein
Gr.	Granulozyten
GSK3	Glykogensynthase-Kinase 3
HCD MS/MS	Higher-energy collisional dissociation Tandem mass spectrometry
HTLV-1	Human T-cell lymphotropic virus type 1
IGF-R/IGF1-R	insulin-like growth factor 1 receptor

IR	Insulinrezeptor
ITD	internal tandem duplication
k.o.	knock-out
KIT	Gen für CD117
LC-MS/MS	Liquid chromatography–mass spectrometry
li	links
LL	lower left (linker unterer Quadrant)
LTQ	linear trap quadrupole
MDR	minimal residual disease
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MLL-AF4	Fusionsprotein durch Translokation t(4;11)(q21,q23.3)
mTOR	mammalian Target of Rapamycin
mTORC1/2	mammalian Target of Rapamycin Complex 1/2
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
pAKT	phospho-Proteinkinase B
PCT	Proteomic Center Tübingen
PDGF	Platelet-derived growth factor
PDGF-R	Platelet-derived growth factor-receptor
PDK1 / PDPK1	phosphoinositide-dependent kinase 1
PI	Propium Iodide
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIK3CA	Katalytische Untereinheit der phosphoinositide-3-Kinase
PML/RAR α	Fusionsprotein durch Translokation t(15;17)(q22;q12)
pRB	phospho-Retinoblastom
PTEN	Phosphatase und Tensin homolog
RAS	rat sarcoma-Protein
RB1	Retinoblastomprotein 1
re	rechts
RNA	Ribonucleinsäure
RPMI	Kulturmedium
SDS	Natriumdodecylsulfat

Ser473	Serin 473
SHIP	Src homology 2 (SH2) domain-containing <i>inositol-5-phosphatase</i>
shRNA	Small-hairpin Ribonukleinsäure
SILAC	stable isotope labeling with amino acids in cell culture
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TFA	Trifluoressigsäure
Thr308	Threonin 308
TKI	Tyrosinkinaseinhibitor
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
Vol	Volumen
WHO	World Health Organization
XTT	2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid
ZNS	Zentrales Nervensystem

Einheiten

Symbol	Einheit	Beschreibung
C	-	Chromatide
c	mol/m ⁻³	Stoffmengenkonzentration 1 mol/ m ⁻³ = 1 M
f _{rot}	rpm	Rotationsgeschwindigkeit [Umdrehungen pro Minute]
L	m	Länge [Meter]
m	kg	Masse [Kilogramm] atomare Masseneinheit 1 Da = 1u = 1,6605 x 10 ⁻²⁷ kg
p	%	Prozent ppm = parts per million
pH	-	Maß für den sauren oder basischen Charakter einer Lösung
T	K	Temperatur [Kelvin]
t	s	Zeit [Sekunde]
Th	u/e	Masse-Ladungs-Verhältnis [Thomson]
U	V	Elektrische Spannung [Volt]
V	m ³	Volumen; 1 Liter (l) = 0,001 m ³

Präfixe

k	Kilo (10 ³)
c	Centi (10 ⁻²)
m	Milli (10 ⁻³)
μ	Mikro (10 ⁻⁶)
n	Nano (10 ⁻⁹)

1. Einleitung

1.1 Die Entstehung von Leukämien

Die Blutbildung des Menschen findet ausgehend von sich selbst erneuernden pluripotenten Stammzellen im Knochenmark statt, in welchem ein optimales Milieu für das Wachstum und die weitere Differenzierung der Stammzellen in lymphatische und myeloische Vorläuferzellen herrscht [1].

Die myeloische Zellreihe stellt den Hauptanteil der Hämatopoese dar. Aus ihr gehen Erythrozyten, Thrombozyten, Monozyten und Granulozyten hervor, wie Abbildung 1.1 zeigt:

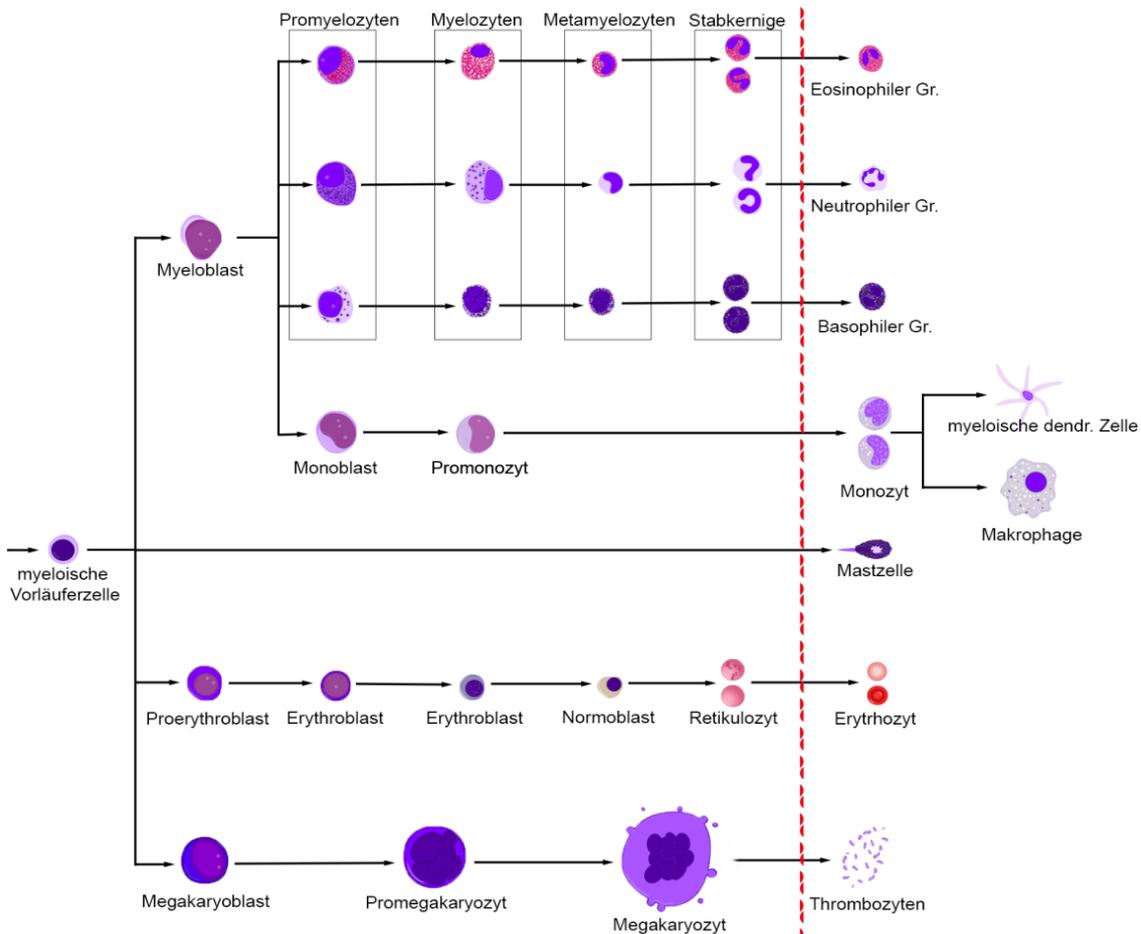


Abbildung 1.1: Myeloischer Teil der Hämatopoese (vereinfachte Darstellung, nach [2])

1. Einleitung

Bei der Lymphopoese (Abbildung 1.2) dagegen entstehen aus einer lymphatischen Vorläuferzelle über mehrere Differenzierungsschritte antigen-präsentierende dendritische Zellen, natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und Lymphozyten, die im Thymus zu T-Lymphozyten oder im Lymphknoten zu B-Lymphozyten heranreifen. B-Lymphozyten wiederum können zu antikörperproduzierenden Plasmazellen ausdifferenzieren. Die Aufgabe der Lymphozyten liegt in der humoralen und (in Zusammenspiel mit den Granulozyten der myelischen Reihe) der zellulären Immunabwehr [1].

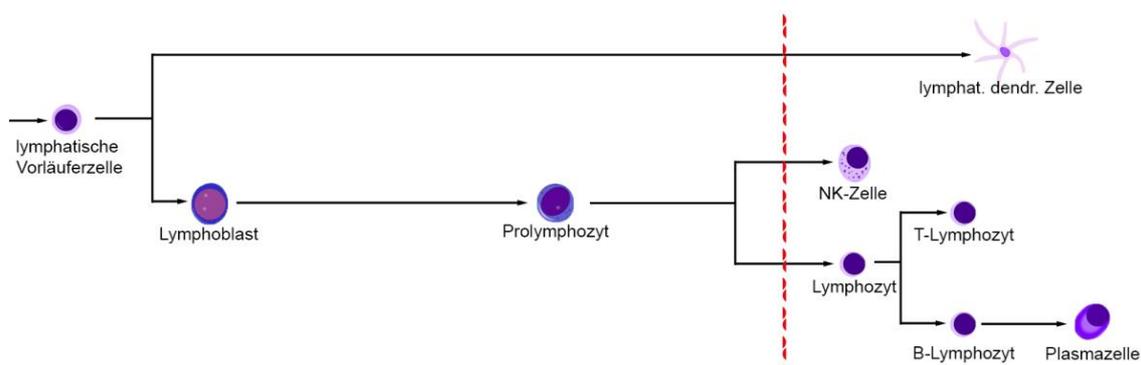


Abbildung 1.2: Lymphopoese des Menschen (Vereinfachte Darstellung, nach [2])

Es wird angenommen, dass die Grundlage für die Entstehung einer Leukämie die Ausbildung einer durch Akkumulation mehrerer Mutationen maligne veränderte hämatopoetische Stammzelle im Knochenmark ist. Diese leukämische Stammzelle proliferiert unkontrolliert und die aus ihr hervorgehenden leukämischen Blasten vermehren sich im Knochenmark [3].

Durch die Verdrängung des gesunden, blutbildenden Knochenmarks kommt es zur globalen hämatopoetischen Insuffizienz und der daraus folgenden Symptomatik des Patienten resultierend aus Anämie, Thrombozytopenie und Neutropenie [1].

Verlieren die malignen Blasten ihre Knochenmarksadhärenz, werden sie in das periphere Blut ausgeschwemmt. Eine hohe Blastenzahl im peripheren Blut kann durch Leukostase zu weiteren Komplikationen wie pulmonalen und zerebralen Durchblutungsstörungen führen [4].

1. Einleitung

Bei der akuten myeloischen Leukämie (AML) ist eine der frühen myeloischen Vorläuferzellen von der Differenzierungsstörung betroffen [1].

Die Einteilung der akuten myeloischen Leukämien erfolgt nach der WHO-Klassifikation der Tumoren des hämatopoetischen und lymphatischen Gewebes [5].

Die Prognose des Patienten hängt vor allem von den vorliegenden genetischen Aberrationen, insbesondere den Driver-Mutationen ab. Beispielsweise gehen Mutationen von p53 mit einer deutlich schlechteren Prognose einher als das PML-RARA-Fusionsprotein der Promyelozytenleukämie [6].

Bei der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) kommt es zur Entartung einer unreifen lymphatischen Vorläuferzelle im Knochenmark, Thymus oder im lymphatischen Gewebe. Ebenso sind Organ- und ZNS-Infiltrationen möglich. Während die ALL im Kindesalter die häufigste Leukämie darstellt, sind nur etwa 20 % aller Leukämien im Erwachsenenalter akute lymphatische Leukämien [1]. Die Einteilung der ALL erfolgt ebenfalls nach den o. g. WHO-Kriterien anhand der vorliegenden molekulargenetischen Veränderungen der Neoplasie [5].

Risikofaktoren für die Entwicklung einer akuten Leukämie stellen unter anderem genetische Aberrationen wie Trisomie 21, Stammzellschädigungen durch ionisierende Strahlung und Zytostatika, sowie die Exposition gegenüber Benzolen dar [1].

Die Daten des „Surveillance, Epidemiology and End-Results Program“ des National Cancer Institutes zeigen, dass im Durchschnitt nur 27,4% der Patienten mit einer AML 5 Jahre nach Diagnosestellung überleben (gemittelt über alle Altersgruppen von <20 Jahre bis über >84 Jahre). Das mittlere Erkrankungsalter liegt im Schnitt bei 68 Jahren, mit steigendem Alter zeigt sich eine deutlich sinkende Prognose (5-Jahres-Überlebensrate von 7,1% bei Patienten älter als 65 Jahre).

Die ALL wird größtenteils bei jungen Patienten diagnostiziert und zeigt hier 5-Jahres-Überlebensraten von 80% (bei Patienten unter 45 Jahren), mit steigendem Alter bei Erstdiagnose jedoch zeigt sich ein deutlich herabgesetztes Überleben von nur 16,5% bei über 65-Jährigen [7]. Diese niedrigen Überlebensraten

1. Einleitung

lassen sich dadurch erklären, dass viele Patienten innerhalb weniger Jahre ein Rezidiv erleiden [1].

Aufgrund dieser Problematik ist die suffiziente Therapie von akuten Leukämien noch immer ein wichtiger Forschungsschwerpunkt und wird oftmals im Rahmen von klinischen Studien durchgeführt.

Zur genaueren Risikostratifikation werden Leukämiepatienten heutzutage vor allem anhand ihrer genetischen Mutationen und chromosomaler Aberrationen in Risikoprofile eingeteilt, aufgrund derer die weitere Therapie geplant wird [8].

1.2 Stand der Forschung

Die Therapie der akuten myeloischen Leukämie beginnt nach der initialen Einschätzung der Patientenmorbidity und der Entnahme von Blut und Knochenmark zur genetischen Analyse mit der Induktionstherapie. Diese setzt sich in der Regel aus 3 Tagen Anthrazyklin- und 7 Tagen Cytarabintherapie zusammen. Bei Patienten, die klinisch nicht für diese intensive Induktionstherapie geeignet sind, kommen individuell angepasste Therapieschemata oder eine Reduktion der Dosis zum Einsatz. Zusätzlich zur konventionellen Induktionstherapie werden in Studien alternative Medikamente mit teilweise spezifischen Targets getestet. Beispiele hierfür sind Gemtuzumab-Ozogamicin (anti-CD33-AK), Tyrosinkinaseinhibitoren und Purinanaloga [8].

Bei der Induktionstherapie der akuten myeloischen Leukämie kann je nach Altersgruppe in 40-80 % der Fälle eine Blastenclearance und damit eine komplette Remission (CR) in Blut und Knochenmark erreicht werden. Hierbei muss jedoch prognostisch zwischen einer CR ohne Minimal Residual Disease (MRD) und einer CR mit MRD unterschieden werden. Von einer CR spricht man bei einem Blastenanteil im Knochenmark von $< 5\%$ und einer suffizienten Hämatopoese. Unter MRD versteht man den Nachweis einer leukämischen Zellpopulation anhand immunhistochemischer Marker, Polymerase-Kettenreaktion und Next-Generation-Sequencing trotz Erfüllung der Kriterien einer kompletten hämatologischen Remission. [8].

An die Induktionstherapie schließt sich bei Erreichen der Remission die Konsolidierungstherapie an, die bei der AML in der Regel mit bis zu vier Zyklen Cytarabin durchgeführt wird. Bei Patienten mit einem erhöhten Rezidivrisiko (intermediate- und high-risk-Gruppe, therapierefraktäre Leukämie, positiver MRD-Status) kann abhängig vom Gesundheitszustand und bei Vorhandensein eines geeigneten Donors ein myeloablatives Therapieregime mit anschließender allogener Stammzelltransplantation in Betracht gezogen werden [8].

Im Verlauf kommt es trotz der immer individueller angepassten und spezifischen Therapiemöglichkeiten häufig zu einem Rezidiv. Dies legt die Hypothese nahe, dass auch bei Patienten mit CR ohne nachweisbare MRD leukämische Blasten oder maligne veränderte Stammzellen unter Therapie persistieren, die zum Rezidiv der Erkrankung führen können.

Ding et al [9] zeigten für mehrere AML-Patienten, dass sich bei einem Leukämie rezidiv die genetischen Eigenschaften der malignen Zellen ändern bzw. zusätzliche Mutationen im Vergleich zum ursprünglichen Klon hinzugekommen können. Somit können Therapieoptionen und Resistenzen im Rezidiv von denen bei Erstdiagnose abweichen. Durch genetische Analysen zu verschiedenen Zeitpunkten während der Leukämogenese und in Remission konnte nachgewiesen werden, dass für diese genetische Evolution mindestens zwei Varianten möglich sind. Einerseits konnte gezeigt werden, dass der ursprüngliche leukämische Klon weitere Mutationen erhalten kann, die zu einer Therapieresistenz und damit zu einer Persistenz von malignen Zellen unter Therapie führen können. Andererseits können bei der Erstdiagnose einer Leukämie mehrere verschiedene Subklone mit teilweise unterschiedlichen Mutationen vorliegen.

Einer der malignen oder prä-malignen Subklone des krankheitsauslösenden Klons überlebt nun die initiale Therapie und entwickelt sich durch weitere genetische Aberrationen zu einem malignen Klon, welcher ein Rezidiv mit anderen, therapeutisch relevanten genetischen Eigenschaften auslösen kann [10]. Denkbar ist auch, dass die Substanzen, die zur Therapie einer Leukämie eingesetzt werden und teilweise selbst mutagene Eigenschaften haben, zum Mutations-

bzw. Selektionsdruck des überlebenden Klons beitragen und deshalb Therapieoptionen mit nicht-mutagenen Substanzen sinnvoll wären [9].

Die Mutationen, die zur Leukämogenese führen, können anhand ihrer Funktion bzw. der ursprünglichen Funktion des Gens in verschiedene Kategorien eingeteilt werden. Dabei handelt es sich unter anderem um Fusionsgene, Tumorsuppressorgene, Splicisomenbestandteile, Transkriptionsfaktoren, DNA-Methylierungs-Regulatoren oder Gene, deren Proteine in Signalkaskaden interagieren [8].

Beispiele hierfür sind PML-RARA, KIT, FLT3, BCR-ABL1, IDH1/2 und andere, welche einzeln und in Kombination die Prognose des Patienten entscheidend beeinflussen [11]. Bei der Sequenzierung des Genoms von 200 AML-Patienten zeigte sich, dass FLT-3 die am häufigsten vorliegende Mutation (28%) war, gefolgt von NPM1 (27%) und DNMT3A (26%). Zusätzlich lagen in mehr als der Hälfte der Proben neben dem Hauptklon noch ein bis drei unabhängige Subklone vor. Auffallend war, dass in 59% der Proben Mutationen von Genen vorlagen, die für Signalproteine kodieren, darunter Tyrosinkinase wie FLT3, KIT, Serin-Threonin-Kinasen und RAS-Proteine [11].

Veränderungen der intrazellulären Signalkaskaden, welche die Proliferation steigern, Apoptose hemmen oder anderweitig zu einem Überlebensvorteil der betroffenen Zelle führen, stellen somit einen bedeutenden Mechanismus in der Entstehung einer Leukämie dar.

Die Ergebnisse solcher genetischen Analysen werden genutzt, um Medikamente zu entwickeln, deren Targets jeweils spezifische Mutationen oder Mutationsklassen darstellen. Dies hat zum Ziel, jedem Patienten nach der zytogenetischen Analyse abhängig von seinem Risikoprofil und den vorliegenden genetischen Aberrationen die effektivste Therapie zu ermöglichen.

Für die Therapie der akuten Leukämien werden deshalb im Rahmen von klinischen Studien Tyrosinkinaseinhibitoren wie FLT3-, KIT- und ABL-Inhibitoren erprobt. Beispiele hierfür sind die FLT3-Inhibitoren *Midostaurin* (PKC412, Phase III-Studie) und *Sunitinib* (SU11248, Phase I). Diese sind in der Lage, in vivo durch Inhibition des aktivierten FLT3-Moleküls eine Reduktion des Blastenklons, besonders im peripheren Blut, zu bewirken [12, 13], welche durch Additi-

1. Einleitung

on des Tyrosinkinaseinhibitors zur Standardchemotherapie noch gesteigert werden konnte [14].

Die häufig kurze Dauer der erlangten Remission auch unter Anwendung spezifischer Inhibitoren legt die Vermutung nahe, dass in vivo leukämische Blasten oder präleukämische Zellen persistieren, die nicht eradiziert werden und von denen das Rezidiv ausgeht. Denkbar wäre, dass diese Zellen durch bisher unbekannte, protektive Faktoren geschützt werden, was das Therapieansprechen beeinflusst.

Der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)/AKT-Signalweg ist ein komplexer Regulationsmechanismus, der Prozesse wie Zellproliferation, Apoptose, Proteinsynthese und Tumorgenese beeinflusst und durch multiple Umgebungsfaktoren und –mechanismen aktiviert werden kann [15]:

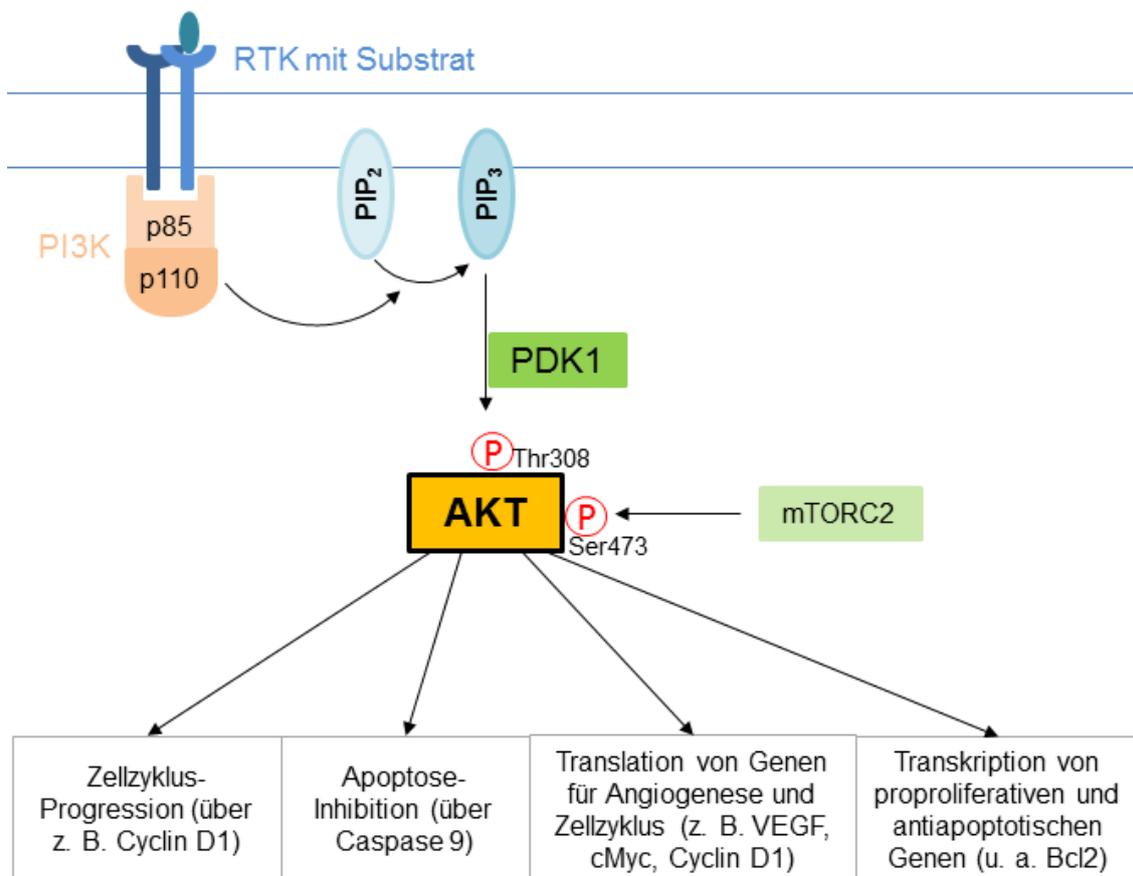


Abbildung 1.3: PI3K/AKT-Signalweg (stark vereinfachte Darstellung nach [16])

1. Einleitung

Bei vielen Tumoren wurde eine Dysregulation des PI3K/AKT-Signalwegs im Rahmen der Onkogenese festgestellt. Bei soliden Tumoren liegt die Ursache dieser Dysregulation häufig in genomischen Mutationen von AKT oder PIK3CA [17]. Im Gegensatz dazu findet man bei akuten Leukämien oftmals eine Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs mit verstärkter Phosphorylierung von AKT [18], z. B. durch Tyrosinkinase Mutationen wie FLT3 oder KIT [19].

Zur vollständigen Aktivierung von AKT ist die Phosphorylierung an Codon Ser473 (Serin-473) und Thr308 (Threonin-308) nötig. Ser473 wird durch den Mammalian Target of Rapamycin-Complex 2 (mTORC2) phosphoryliert, Thr308 durch die Phosphoinositide-dependent-Kinase-1 (PDK1 alias PDPK1) [15].

Unsere Arbeitsgruppe konnte nun zeigen, dass in Tyrosinkinase-abhängigen Zellmodellen unter dem Einfluss von Tyrosinkinaseinhibitoren die PDK1-vermittelte Phosphorylierung von AKT an Threonin-308 nur insuffizient inhibiert wird, wodurch AKT eine Restaktivität behält (siehe Abbildung 1.4) [20].

Damit wird die Signalkaskade nicht ausreichend inaktiviert und „downstream“ gelegene Bestandteile dieses Signalwegs bleiben aktiviert [20]:

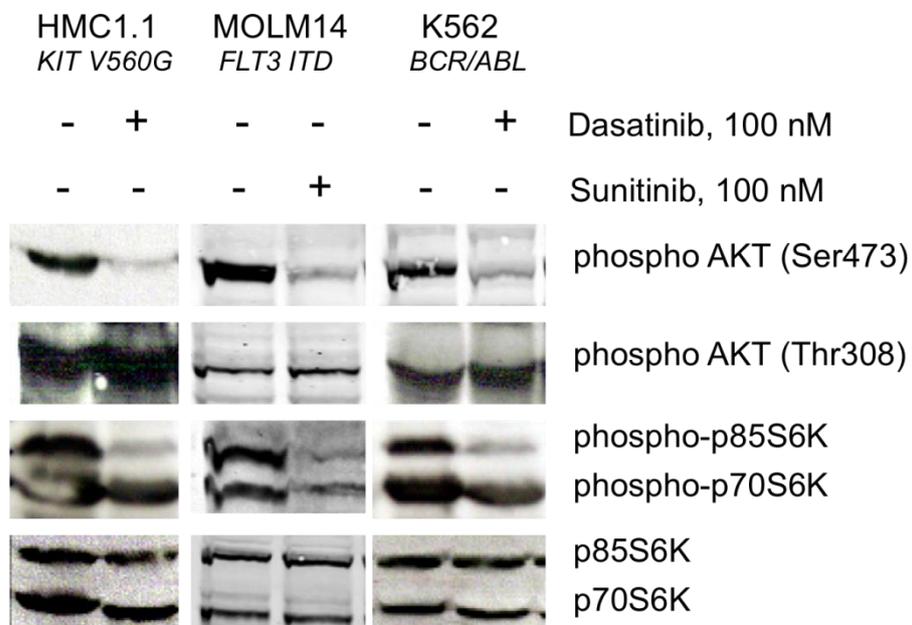


Abbildung 1.4: Phosphorylierung von AKT Thr308 und Ser473 unter dem Einfluss von Tyrosinkinaseinhibitoren

1. Einleitung

Eine Studie mit AML-Patienten hat zudem gezeigt, dass bei einer Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs regelhaft die Phosphorylierung von AKT an Ser473 gesteigert ist. Jedoch ist besonders die Phosphorylierung an Thr308 mit dem Vorliegen einer Hochrisiko-AML und einer schlechten Prognose des Patienten assoziiert [21].

Die Inhibition des PI3K/AKT-Pathways stellt somit einen möglichen Ansatzpunkt in der Therapie der akuten Leukämien dar.

Für die Therapie des fortgeschrittenen Nierenzellkarzinoms wurde der mTOR-Inhibitor Rapamycin entwickelt. AKT phosphoryliert den Mammalian Target of Rapamycin-Complex 1 (mTORC1), welcher die Proteintranslation initiiert. Die Inhibition des PI3K/AKT-Signalwegs mittels Rapamycin auf Ebene von mTORC1 führt in der klinischen Anwendung zwar zu einer Verlängerung des progressionsfreien Überlebens um im Schnitt 3 Monate, jedoch kam es bei allen Patienten im Verlauf zum Progress der Erkrankung unter Therapie [22]. Ursache hierfür könnte ein negativer Feedbackmechanismus sein, der zu einer verstärkten Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs führt [23].

Inhibitoren, die in der Signalkaskade oberhalb von mTORC1 ansetzen, könnten bei Unterbindung des Feedbackmechanismus zu einer persistierenden Supprimierung der PI3K/AKT-Aktivierung und somit zu einem verbesserten Therapieansprechen führen.

Versuche zur Hemmung der PI3K/AKT-Signalkaskade in vitro mit spezifischen AKT-Inhibitoren (Akti 1/2, Perifosine, Tricribine) zeigten in den ersten vier Stunden nach Exposition eine Verminderung der Phosphorylierung von AKT an Ser473 und Thr308, jedoch trat nach 24 Stunden eine paradoxe, verstärkte Phosphorylierung trotz AKT-Inhibitor auf. Zusätzlich konnte eine verstärkte Expression und Autophosphorylierung von Insulinrezeptoren (IR), Insulin-like-growth-factor-Rezeptoren (IGF-R) und Platelet-derived-growth-factor-Rezeptoren (PDGF-R) nachgewiesen werden. Diese aktivieren bei Ligandbindung den PI3K/AKT-Pathway, was einen denkbaren Resistenzmechanismus gegenüber AKT-Inhibitoren darstellt [18].

Im Rahmen der Leukämitherapie werden deshalb auch Substanzen erprobt, die diese Rezeptoren inhibieren und zum Ziel haben, die downstream gelegenen Signalkaskaden zu unterbinden. Beispiele hierfür sind die Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI) Sunitinib und Imatinib, welche unter anderem am PDGF-Rezeptor binden [24, 25].

1.3 Ziel der Arbeit

Zusammengefasst zeigt sich, dass eine persistierende PI3K/AKT-Aktivierung sowohl zur Entstehung einer Leukämie, zur Prognose des Patienten als auch zur Therapierefraktärität bzw. Rezidivwahrscheinlichkeit beitragen kann. Ein zentraler Regulationsmechanismus dieses Signalwegs stellt AKT dar, welches für seine maximale Aktivität an Ser473 und Thr308 phosphoryliert sein muss.

PDK1 phosphoryliert AKT an Thr308, weshalb eine verstärkte PDK1-Aktivität ursächlich für die persistierende Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs, auch unter Therapie mit Tyrosinkinaseinhibitoren, sein könnte.

Im Rahmen dieser Arbeit soll deshalb untersucht werden, welchen Einfluss PDK1 auf die Ausbildung und Erhaltung einer akuten Leukämie hat. Zusätzlich wird der mögliche additive Effekt einer PDK1-Inhibition auf das Therapieansprechen mit etablierten Leukämitherapeutika überprüft.

Hierzu werden leukämische Zellmodelle genutzt, die mittels Transfektion PDK1-supprimiert wurden und im Vergleich zu ihrer jeweiligen empty-vector-Kontrolle hinsichtlich Apoptose- und Proliferationsverhalten sowie Zellzyklusunterschieden untersucht. Ziel dieser Arbeit ist es, die Rolle von PDK1 in der Entstehung und Unterhaltung einer akuten Leukämie zu bestimmen sowie den Einfluss einer PDK1-Inhibition auf Proliferation und Therapieansprechen zu untersuchen.

2. Material und Methoden

2.1 Zelllinien

2.1.1 Die Zelllinie Jurkat

Bei den Zellen der Jurkat-Zelllinie handelt es sich um die Lymphoblasten von T-Lymphozyten mit einer Verdopplungszeit von etwa 48 Stunden, die zur Interleukin-2-Produktion angeregt werden können und in Kultur meist traubenförmig wachsen.

Die Jurkat-Zelllinie wurde in den späten 1970er Jahren aus dem peripheren Blut eines an akuter T-Zell-Leukämie erkrankten Jungen gewonnen [26].

2.1.2 Die Zelllinie Molm 14

Die Molm 14-Zellen sind menschlichen Monoblasten, die bei einer Verdopplungszeit von ca. 3 Tagen als Einzelzellsuspension vorliegen [27].

Sie entstammen dem peripheren Blut eines 20-jährigen männlichen Patienten, der aus einem myelodysplastischen Syndrom eine sekundäre akute Monozytenleukämie (FAB M5a) entwickelte und wurden während eines Rückfalls der AML 1995 entnommen [27]. Die genetische Analyse der Molm 14-Zelllinie zeigt eine FLT3-ITD-Mutation [28].

2.1.3 Die Zelllinie K562

Diese Zelllinie wurde im Jahre 1970 aus dem Pleuraerguss einer 53-jährigen Patientin während der Blastenkrise im Rahmen einer seit 4 Jahren bestehenden chronisch myeloischen Leukämie gewonnen. K562-Zellen enthalten das BCR-ABL1-Fusionsprotein.

In der Kulturflasche liegen sie als Einzelzellsuspension vor [29].

2.1.4 Die Zelllinie HL-60

Die Zelllinie HL-60 wurde 1977 mittels Leukapherese aus dem peripheren Blut einer 36-jährigen Patientin mit akuter myeloischer Leukämie isoliert. Es handelt

2. Material und Methoden

sich hauptsächlich um Promyeloblasten mit deutlich verschobener Kern-Plasma-Relation. Die Promyeloblasten zeigen zu einem geringen Teil eine spontane Ausdifferenzierung und lassen sich ebenfalls zur Ausdifferenzierung anregen [30, 31].

In Zellkultur wachsen sie teiladhärent mit einer Verdopplungszeit von etwa 36-48 Stunden [32]

2.2 Geräte und Materialien

Tabelle 2.1: Geräte

Geräte	Hersteller
Sterile Werkbank Hera Safe	Heraeus Instruments
Brutschrank HERAcell	Heraeus Instruments
Zentrifugen - Varifuge 3.0 ORS - Centrifuge 5415R	Heraeus Instruments Eppendorf
Kühlschrank 6°C	Liebherr
Gefrierschrank - - 20°C - - 86°C	Liebherr Sanyo
Eismaschine	Scotsman
Beheizbares Wasserbad	Köttermann
Vortexer - Reax top - Vortex Genie 2	Heidolph Scientific industries
Pipettiergeräte - Pipettboy acu	IBS Integra Biosciences
Pipetten - Research Plus Einkanalpipette 10 µl, 200µl, 1000 µl - 8-Kanalpipette 300 µl	Eppendorf Eppendorf

2. Material und Methoden

- Multipipette 1µl-10ml	Eppendorf
Schüttler	GFL
FACS Calibur	Becton Dickinson
- angeschlossene Hardware	Apple
- Auswertungssoftware Cell Quest	Becton Dickinson
Fluorescence Absorbance Microplate Reader	BioTek Instruments
Licor Odyssey	Li-Cor
PowerPac Basic	BioRad
Criterion Western-Kammer	BioRad
Criterion Blotter (Blotting-Kammer)	BioRad
XTT ELISA: Dynatech MR7000	Dynatech Laboratories
- angeschlossene Hardware	Compaq
- Auswertungssoftware BioLinx	Dynatech Laboratories
Mikroskop Wilovert S	Will
Neubauer Zählkammer	Assistent Germany
Deckglas 22 x 22 mm	Menzel
Absaugsystem Vacusafe	Integra

Tabelle 2.2: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Pipettenspitzen steril - 10µl, 20 µl, 200µl, 1000µl	Eppendorf
Combitips Advanced - 0,5 ml, 2,5 ml, 5 ml	Eppendorf
Glaspipettenspitzen steril - 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	Falcon - Corning
Pasteurpipette für Absaugsystem	WU Mainz
Falcon-Röhrchen - 15 ml, 50 ml	Falcon - Corning
Zellkulturflaschen belüftet - 25 ml, 70 ml, 275 ml	Falcon – Corning

2. Material und Methoden

Safe Lock Tubes - 0,5 ml, 1,5 ml	Eppendorf
Einfrierröhrchen CryoTube Vials, steril, 1,8 ml	Thermo scientific
Handschuhe nitril	Kimberly-Clark
Einfrierbox Cool Cell	biocision
Multiwellplatten - 6 Well, 96 Well - 12 Well	Falcon – Corning Greiner bio one
FACS-Röhrchen Rundboden 5 ml	Falcon – Corning
Criterion XT Precast Gel 10%, 12% Bis-Tris	BioRad
Criterion Filterpapier	BioRad
Nitrozellulose Blotting-Membran 0,2 µm	GE Healthcare

Tabelle 2.3: Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
<u>Kulturmedium</u> 450 ml RPMI 1640 Glutamax + 50 ml Fetales bovines Serum (FBS) + 5 ml Natriumpyruvat 100 mM + 5 ml Penicillin (10.000 U/ml) / Streptomycin (10.000 µg/ml) + 5 ml NEAA 100x (Nicht-essentielle Aminosäuren)	Gibco Gibco Gibco Biochrom Gibco
Puromycin (#3812)	Gibco
Dulbecco's Phosphate buffered saline (DPBS) - 1x - 10x	Sigma Biochrom
<u>Freezing Medium</u> 25 ml RPMI 1640 Glutamax + 20 ml FBS	Gibco Gibco

2. Material und Methoden

+ 5 ml DMSO	Sigma
Lysepuffer:	
- Ripa Buffer	Sigma
- PP1	Sigma
- Phosphatase Inhibitor Cocktail 2	Sigma
- NaF (0,5 M)	Sigma
- Natriumorthovanadat (0,2 M)	Sigma
- Pefabloc SC	Roche
- Pepstatin	Roche
- Leupeptin	Roche
- Aprotinin	Roche
- Protease Inhibitor Cocktail for use	Sigma
- Glycerophosphat	Universitätsapotheke
Protein Assay	BioRad
XT Sample Buffer 4x	BioRad
XT Reducing Agent	BioRad
XT MOPS (Running Buffer)	BioRad
Transferpuffer	
- Glycin	BioFroxx
- Trizma base 99,9%	Sigma
- Methanol	VWR Chemicals
Akt Control Cell Extracts (#9273)	Cell Signaling
Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific
Stripping Buffer	Thermo Scientific
Albumin Fraktion V	Roth
Daunorubicin	Pfizer
Imatinib (STI571)	Novartis
Sunitinib (SU11248)	Sugen
10x Annexin V Binding Buffer	BD Biosciences
PI (propium iodide)	Life Technologies
FITC Annexin V	BD Biosciences

2. Material und Methoden

FACS-Flow	BD Biosciences
XTT Sodium Salt	AppliChem
Phenazine methosulfate (ECR)	Sigma
Transduktionsmaterialien	
- Set of 3 SMARTvector Human Lentiviral PDPK1 shRNA	Dharmacon
- SMARTvector Empty Vector Control	Dharmacon
Ethanol	Merck
RNAse (R-4875)	Sigma
Trypsin	Biochrom

Tabelle 2.4: Zelllinien

Zelllinien	Bezugsquelle
Jurkat E6.1	DSMZ
Molm 14	Prof. Dr. M. Heinrich, MD (Department of Hematology and Oncology, OHSU, Portland, USA)
K 562	Prof. Charles Lopez, MDPHD (Department of Hematology and Oncology, OHSU, Portland, USA)
HL-60	DSMZ

Tabelle 2.5: Antikörper

Antikörper	Hersteller
PDK1 Antibody (#3062)	Cell Signaling
Phospho-Akt (Thr308) Antibody (#9275)	Cell Signaling
Phospho-Akt (Ser473) Antibody (#9271)	Cell Signaling
Phospho-Rb 1(Ser807/811) Antibody (#9308)	Cell Signaling

2. Material und Methoden

Cyclin D1 Antibody	Cell Signaling
α -Tubulin Mouse mAb (#3873)	Cell Signaling
Sekundär-Antikörper: <ul style="list-style-type: none"> - IRDye 680RD Goat anti-Rabbit IgG - IRDye 800CW Goat anti-Rabbit IgG - IRDye 680RD Goat anti-Mouse IgG 	Li-Cor Li-Cor Li-Cor
FACS AK <ul style="list-style-type: none"> - pAKT1/2/3 (Thr308) sc-16646-R 	Santa Cruz

2.3 Transduktion der Zelllinien

Die Transduktion der Zelllinien für das knock-out von PDK1 sowie die der empty-vector-Kontrolle wurden von Frau Dr. med. Kerstin Kampa-Schittenhelm durchgeführt. Grundlage hierfür stellen die Materialien und das dazugehörige SMARTvector Lentiviral shRNA-Protokoll der Firma Dharmacon dar.

Für die Transduktion wurde ein Set aus drei SMARTvector Human Lentiviral PDPK1 (entspricht PDK1) shRNAs sowie Empty-vector shRNA als Kontrolle verwendet, welche zur besseren Detektierbarkeit GFP (grün fluoreszierendes Protein)-markiert sind und zur Selektion erfolgreich transduzierter Zellen ein Puromycin-Resistenzgen enthalten.

Die zu transduzierenden Zelllinien wurden in einer 96-Well-Platte mit 50 μ l Transduktionsmedium pro Well für 12 h bei 37°C kultiviert. Das Transduktionsmedium setzte sich aus RPMI und der Lentiviral shRNA zusammen. Nach Ablauf dieser Inkubationszeit wurde die Zellsuspension je Well mit 100 μ l antibiotikafreiem Zellkulturmedium (siehe Tabelle 2.3) versetzt und für weitere 24 h bei 37°C inkubiert.

2.4 Selektion und Transduktionskontrolle

Zur Selektion wurden die transduzierten Zellen für 5 Tage in puromycinhaltiges Selektionsmedium (0,2-0,4 µl Puromycin/ml Kulturmedium) eingebracht, um gegebenenfalls untransduzierte Zellen aus der Kultur zu eliminieren.

Die niedrigste Puromycin-Konzentration, bei der nach 3-5 Tagen keine untransduzierten Zellen der jeweiligen Zelllinie mehr leben, wurde zuvor anhand einer Verdünnungsreihe bestimmt. Erfolgreich transduzierte Zellen bleiben von dieser Konzentration aufgrund der integrierten Puromycinresistenz unbeeinträchtigt.

Zur Kontrolle der Transduktion wurden die Fluoreszenzeigenschaften des in die RNA integrierten GFPs genutzt. Das GFP fluoresziert nach Anregung durch Licht einer Wellenlänge von 395 nm und lässt sich in der Durchflusszytometrie (Kapitel 2.8) auf dem FITC-Kanal detektieren [33]. Bei einem Shift der ganzen Zellpopulation in der FL1-Achse, verglichen mit untransduzierten Zellen, war von einer erfolgreichen Aufnahme des Plasmids auszugehen.

Zum Nachweis der erfolgten Suppression des Zielproteins PDK1 und der Selektion wurden anschließend Westernblots (siehe Kapitel 2.7) der transduzierten Empty vector (EV)- und PDK1-knock-out-(PDK1 k.o.) Zellen durchgeführt.

Diese Selektions- und Transduktionskontrollen wurden nach jedem Auftauen eingefrorener Zellen wiederholt.

2.5 Zellkultur

Die transduzierten Zelllinien wurden nach der Kontrolle der erfolgreichen Suppression des Zielproteins in RPMI-Medium kulturiert, welches mit 10 % FBS, 1 % Nicht-essentiellen Aminosäuren, 1 % Natriumpyruvat und 1 % Penicillin/Streptomycin versetzt wurde und in belüfteten Zellkulturflaschen in einem Wärmeschrank bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt gehalten. Nach 2-3 Tagen wurden die Zellkulturen in Abhängigkeit ihrer Verdopplungszeit und Dichte gesplittet.

Adhärente Zellen wurden hierfür mit 3ml Trypsin bis zur Ablösung inkubiert und das verwendete Trypsin anschließend abzentrifugiert.

Nicht benötigte Zellen wurden mit Freezing Medium versetzt und bei -80°C mit Hilfe von CoolCell-Boxen eingefroren und gelagert.

2.6 Proliferation (XTT, Auszählen)

Zur Beurteilung der Proliferation der PDK1-k.o.- und den entsprechenden EV-Zellen wurden Proliferationsmessungen sowohl von unbehandelten Zellen als auch behandelten Zellen durchgeführt. Die Behandlung erfolgte dabei mit dem Anthrazyklin Daunorubicin oder einem der Tyrosinkinaseinhibitoren Imatinib und Sunitinib.

Die Färbemethode XTT wurde für die Proliferationsmessung behandelter Proben verwendet, das Auszählverfahren für unbehandelte Proben.

2.6.1 Auszählen

Um das Proliferationsverhalten von unbehandelten Zellen über einen längeren Zeitraum zu untersuchen, wurden die Zellen in einer Konzentration von 50.000 Zellen/3 ml Kulturmedium über insgesamt 72h kulturiert und zu definierten Zeitpunkten ausgezählt. Für jeden auszuzählenden Zeitpunkt wurde eine eigene Kulturflasche vorbereitet. Nach 24, 48 und 72 Stunden wurde mittels der Neubauer-Zählkammer die absolute Zellzahl in der Zellkultur bestimmt. Für die Zeitpunkte 48 und 72 Stunden wurden den Zellsuspensionen weitere 3 ml des Kulturmediums hinzugefügt um eine Abnahme der Proliferation durch zu dichtes Wachstum zu vermeiden.

Je Zelllinie wurde dieser Versuch drei Mal durchgeführt und aus den erhaltenen Ergebnissen die Mittelwerte gebildet.

2.6.2 XTT-Färbung

Die XTT-Färbung wird durchgeführt, um die Abnahme der Proliferation unter Behandlung zu quantifizieren.

Grundlage der XTT-Färbung ist die Reduktion des wasserlöslichen, gelben Farbstoffes XTT sodium salt (2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide) in orangefarbenes, wasserlösliches Formazan [34] unter Zuhilfenahme von Phenacine Methosulfate als Elektronendonator (ECR) [35]. Diese Reaktion ist umso stärker, je höher die Proliferationsrate ist. Um den Farbumschlag zu quantifizieren, wird die Extinktion der Proben bei 490 nm zu definierten Zeitpunkten photometrisch bestimmt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde für die Durchführung des XTT-Assays Zellsuspension mit einer Konzentration von 50.000 – 70.000 Zellen/ml mit definierten Konzentrationen an Daunorubicin oder eines Tyrosinkinaseinhibitors versetzt. Je 6x 100 µl wurden in eine 96-Well-Platte transferiert und anschließend bei 37°C inkubiert.

Das XTT sodium salt wurde in einer Konzentration von 1 mg/ml in DPBS gelöst. Nach 44 Stunden Inkubationszeit wurde jede Probe mit 49 µl dieser XTT-Lösung und 1 µl ECR gefärbt und für weitere 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Innerhalb dieser Inkubationszeit kann abhängig von der Proliferation ein Farbumschlag der Lösung von hellgelb bis hin zu tieforange beobachtet werden.

Nach Ablauf der Färbezeit wurde nun mit dem ELISA-Reader die Extinktion bestimmt und aus den jeweils sechs Proben mittels der Analysesoftware BioLinX (Version 2.0) der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet, sowie die Extinktion des Mediums herausgerechnet.

Aus den sich daraus ergebenden Werten kann die Proliferationsrate beziehungsweise –Abnahme bei steigender Konzentration der verwendeten Substanz ermittelt werden.

2.7 SDS-PAGE und Western-Blot

Um einzelne Proteine oder ihre Phosphorylierung zu analysieren, wurden von den beschriebenen Zelllinien Western-Blots durchgeführt. Voraussetzung für den Western-Blot ist die Lyse der Zellen und die Auftrennung der enthaltenen Proteine in einem Polyacrylamid-Gel mittels der Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) anhand der Proteingröße und ihrer Ladung.

Bei der weiterentwickelten Form der Gelelektrophorese, der SDS-PAGE, wird dem Proteinlysate klassischerweise Natriumdodecylsulfat (SDS) und β -Mercaptoethanol hinzugefügt und die Probe mittels Hitze denaturiert. Das SDS bewirkt eine stark negative Ladung der Proteine, sodass diese unabhängig von ihrer natürlichen Ladung ausschließlich nach ihrer Größe aufgetrennt werden können. [36, 37]. β -Mercaptoethanol dient der Reduktion inter- und intramolekularer Disulfidbrücken, jedoch wird es aufgrund der besseren Stabilität heutzutage häufig durch TCEP (Tris-2-carboxy-phosphine) ersetzt [38].

Unter der an das Elektrophoresegegel angelegten Spannung wandern die Proteine im Gel nach unten. Je größer die Molekülmasse eines Proteins ist, desto langsamer erfolgt die Durchwanderung der gitterartigen Gelstruktur [37].

Nach erfolgter Elektrophorese werden die Proteinbanden nun mittels Western-Blot vom Gel auf eine Nitrozellulosemembran geblottet und mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt, die nach Anregung Licht im Infrarotbereich emittieren. Die Analyse der antikörpergefärbten Proteinbanden auf der Membran findet mit dem LiCor Odyssey statt, welcher den antikörpergebundenen Farbstoff mittels eines Lasers anregt, der daraufhin Infrarotlicht von 800 nm bzw. 680 nm (abhängig vom gewählten Antikörper) emittiert. Dieses Licht wird von den Detektoren des LiCor-Gerätes erfasst und in eine Grafik umgewandelt [39]

2.7.1 Zellyse und Proteinextraktion

Das Protokoll für die Zellyse und die Extraktion der Proteine entspricht im Labor etablierten Standardprotokollen, welche auch Bestandteil bisheriger Veröffentlichungen waren [40].

2. Material und Methoden

Für die Zelllyse wurde ein Lysepuffer bestehend aus Ripa-Buffer, PP I, Phosphatase-Inhibitor-cocktail, 0,5 M Natriumfluorid, 0,2 M Natriumorthovanadat, Perfabloc, Pepstatin, Leupeptin und Aprotinin, sowie Protease Inhibitor Cocktail for use (Sigma / Roche) und Glycerolphosphat verwendet.

Die Zellsuspensionen wurden bei 2300 rpm jeweils 5 min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet in 50-100 µl Lysepuffer gelöst. Das entstandene Lysat wurde in ein SafeLock-Tube transferiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Dabei wurde das Lysat alle 5 min mittels eines Vortexgeräts vermischt und anschließend 15 min bei 4°C mit 13 200 rpm 15 min zentrifugiert.

Der Vortexmischer gewährleistet durch seine Vibration und die dadurch entstehende Strudelbildung eine gründliche Durchmischung und führt damit zu einer möglichst effektiven Zelllyse.

Zur Bestimmung des Proteingehalts im Lysat wurde mittels des Bradford-Assays eine photometrische, quantitative Proteinbestimmung durchgeführt.

Hierfür wurden in die Vertiefungen einer 96-Well-Platte je 50 µl Aqua dest. vorgelegt, 150 µl des Bradford-Reagenz (BioRad Protein Assay und Aqua dest 1:3) und 1 µl des Lysats hinzugefügt. Als Referenz wurde eine Verdünnungsreihe aus bovinem Serum-Albumin (BSA) verwendet.

Das Bradford-Reagenz enthält den Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250. Bindet dieser Farbstoff an Protein, verschiebt sich sein Absorptionsmaximum von 465 nm zu 595 nm [41]. Diese Veränderung des Absorptionsverhaltens steht in linearem Verhältnis zur Proteinkonzentration, weshalb aus der Absorptionsänderung der Proteingehalt im Lysat quantifiziert werden kann.

Mittels des Fluorescence Absorbance Microplate Readers wurde das Absorptionsmaximum der jeweiligen Proben in Relation zum Standard gemessen und daraus der Proteingehalt in µg/µl errechnet.

Für die anschließende SDS-PAGE wurde abhängig vom gesuchten Protein eine Proteinkonzentration von 80 – 100 µg Protein bei einem Volumen von 35 µl pro Geltasche angestrebt. Hierfür wurde die entsprechende Menge des Lysats mit

2. Material und Methoden

10 µl Laemmli-Reagenz [42] vermischt, das fehlende Volumen mit Aqua dest. aufgefüllt und das Gemisch anschließend bei 95°C für 5 min denaturiert.

Das Laemmli-Reagenz setzt sich aus XT-Reducing Agent und XT Sample Buffer 4x im Verhältnis 5:25 zusammen. Das XT-Reducing Agent enthält das für die Reduktion der Disulfidbrücken benötigte TCEP (anstelle des klassischerweise im Laemmli-Reagenz verwendeten 2-Mercaptoethanol), während das Dodecylsulfat, welches für die einheitlich negative Proteinladung verantwortlich ist, im XT Sample-Buffer enthalten ist.

2.7.2 SDS-Page

Für die SDS-Page wurden vorgefertigte 10 % Bis-Tris-Gele der Firma BioRad genutzt, welche mit dem verwendeten XT MOPS Running-Buffer (1:20 mit Aqua dest.) für eine Proteinseparation von 14-220 kDa geeignet sind.

Als Größenreferenz wurden 10 µl des Markers PageRuler Plus verwendet, welcher Banden definierter Größe aufweist [43], ebenso jeweils 10 µl der verwendeten Kontrollen.

Von den Lysaten wurden je 35 µl in eine Geltasche eingebracht und die Gelelektrophorese für 40-60 min bei 200 V durchgeführt.

2.7.3 Western-Blot

Um die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine weiter zu analysieren, wurden sie mittels des Tank-Blot-Verfahrens [44] auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Hierfür wurde das Gel auf die Membran transferiert und zwischen Filtern und Schwämmen in einer Kompressionskassette in den mit kaltem Transferpuffer (bestehend aus Aqua dest., Trizma-base, Glycin und Methanol) befüllten Blotting-Tank eingebracht.

Innerhalb 30 min wurden nun bei 100 V und 6°C die Banden des Gels auf die Membran übertragen.

Albuminbasierter Blockingpuffer (BSA : Aqua dest. = 1:10 über 1 h) wurde genutzt, um überschüssige Proteinbindungsstellen zu blocken.

2. Material und Methoden

Anschließend wurde die Membran mit dem Primärantikörper (1:500 bis 1:1.000 in Albumin-Blockingpuffer) über Nacht bei 6°C inkubiert.

Nach gründlichem Waschen der Nitrozellulosemembran mit Waschpuffer wurde der membrangebundene Primärantikörper nun über 1 Stunde im Dunkeln mit einem fluoreszenzmarkierten, im Infrarot-Bereich leuchtenden Sekundär-Antikörper (1:10.000 in Waschpuffer) gekoppelt. Hierfür wurde abhängig vom verwendeten Primärantikörper ein anti-mouse- oder anti-rabbit-AK verwendet. Nach erneutem mehrmaligem Waschen konnte der Western-Blot nun mit dem LiCor Odyssey Near-Infrared Imaging System gescannt und so die fluoreszierenden Banden sichtbar gemacht werden.

Um mehrere Proteine bzw. Phosphostellen nacheinander auf einer Membran analysieren zu können, wurden die gebundenen Antikörper mit auf 37°C erwärmtem Stripping Buffer (Thermo Scientific) innerhalb 15 min Inkubationszeit von der Membran gelöst. Nach dem anschließenden Blocken der Membran mit Albuminlösung konnte nun eine erneute Färbung mit einem Primärantikörper stattfinden.

Zur Ladekontrolle der einzelnen Proteinbanden wurde ein Tubulin-AK verwendet.

2.8 Apoptoseanalyse mittels Durchflusszytometrie

Das Verfahren des fluorescence-activated cell sortings (FACS) wird in der Durchflusszytometrie verwendet, um Einzelzellsuspensionen zu analysieren und aufzutrennen [45].

Hierfür wird die unterschiedliche Größe, Form und Granularität der Zellen genutzt. Zur Detektion intra- oder extrazellulärer Antigene können fluoreszenzgekoppelte Antikörper verwendet werden [46]. Darüber hinaus lassen sich mittels FITC (Fluorescein)-markiertem Annexin V, welches an im Rahmen des kontrollierten Zelltods externalisiertes Phosphatidylserin bindet, apoptotische Zellen erkennen. Propidium Iodide (PI), das mit doppelsträngigen Nukleinsäuren interka-

liert, jedoch nicht die Membran vitaler Zellen durchdringen kann, findet Anwendung in der Detektion toter Zellen sowie in der Bestimmung von Zellzyklusphasen anhand des DNA-Gehalts (Kapitel 2.11) [47].

Die zu analysierenden Zellen werden bei der Durchflusszytometrie aus dem FACS-Röhrchen über eine Kapillare in das FACS-Gerät gesaugt. Durch den geringen Innendurchmesser der Kapillare entsteht ein laminarer Probenstrom, der durch die Durchflusszelle fließt. In der Durchflusszelle wird der Lichtstrahl eines Argon-Ionen-Lasers auf die Zellen gelenkt und über drei Detektoren sowohl die Fluoreszenzen von verwendeten Farbstoffen oder fluoreszenzmarkierten Antikörpern als auch die Lichtstreuung erfasst. Die Messergebnisse werden daraufhin mittels einer Analysesoftware grafisch dargestellt und analysiert [46, 48].

2.8.1 Behandlung der Zellen

Zur Untersuchung des Einflusses von PDK1 auf das Apoptoseverhalten wurden die transduzierten Zelllinien Jurkat, Molm 14 und K562 mit Daunorubicin bzw. einem Tyrosinkinaseinhibitor (TKI) über 48 h behandelt und anschließend mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Verwendet wurden Daunorubicin (alle Zelllinien) und Sunitinib (Molm 14) in den Konzentrationen 6,25 nM, 12,5 nM, 25 nM, 50 nM, 100 nM, 200 nM und 400 nM. Darüber hinaus wurde die Zelllinie K562 mit dem BCR-ABL-Inhibitor Imatinib in 62,5 nM, 125 nM, 250 nM, 500 nM, 1000 nM und 2000 nM behandelt.

Hierfür wurden unter sterilen Bedingungen in einer 12-Well-Platte in jedem Well 2 ml Kulturmedium abzüglich der benötigten Substanzmenge mit 50.000 Zellen vorgelegt und anschließend die jeweilige Substanz in der gewünschten Konzentration hinzugefügt. Als Kontrolle diente jeweils eine unbehandelte Probe. Anschließend wurde die Kulturplatte für 48 Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

2.8.2 Messung des Apoptoseverhaltens

Nach 48 h Inkubationszeit wurde die mit einer definierten Konzentration an Daunorubicin oder einem TKI behandelte Zellsuspension aus dem Well in ein FACS-Röhrchen pipettiert, adhärente Zellen mit 1 ml Trypsin gelöst, das Well mit DPBS gespült und anschließend das Medium 5 min bei 2500 rpm abzentrifugiert.

Das Pellet aus den behandelten Zellen wurde nun je Probe mit 100 µl 1x Binding Buffer (1x BB), bestehend aus 10x Binding Buffer, 1:10 verdünnt mit Aqua dest., sowie 5 µl PI und 2 µl Annexin V gefärbt, anschließend mit Hilfe des Vortexmischers in der Färbelösung gelöst und für 15 min im Dunkeln auf Eis inkubiert.

Nach Ende der Inkubationszeit wurden der Zellsuspension 150-300 µl des 1x BB hinzugefügt und die Proben mit Hilfe des FACS Calibur analysiert.

Standardmäßig wurde jede Probe bis zur Erfassung von 30.000 Zellen im FACS gemessen. Hierbei wurden die Verstärkerspannungen von SSC-H und FSC-H so gewählt, dass die Kontrollprobe im SSC vs. FSC-Diagramm im Gate lag. Die Kanäle FL1-H (FITC, x-Achse) und FL3-H (PI, y-Achse) wurden so kalibriert, dass sich im dazugehörigen Dotplot die höchste Zelldichte im linken unteren Quadranten bei einem FL1-H-Wert von etwa 10^1 befand [48].

2.8.3 Auswertung der Messergebnisse

Nach Fertigstellung der Messreihe erfolgte die anschließende Auswertung mit Hilfe der Analysesoftware CellQuest.

Hier wurde wiederum ein Gate um die Zielpopulation gelegt, um ein Verfälschen der Messung durch Zelldetritus zu vermeiden. In einem Dotplot mit dem Kanal FL1-H auf der x-Achse und FL3-H auf der y-Achse kommt nun die gewünschte Population zur Darstellung. Dieses Punktediagramm ist in vier Quadranten aufgeteilt. Die Zellen der Kontrollprobe kommen im linken unteren Quadranten zur Darstellung. Zellen, die FITC-gefärbt sind, liegen auf der FL1-H-Achse weiter rechts bzw. im rechten unteren Quadranten. Die PI-gefärbten Zellen schieben

2. Material und Methoden

sich auf der y-Achse nach oben und sind im linken oberen Quadranten zu sehen. Im rechten oberen Quadranten zeigen sich die mit PI und FITC doppeltgefärbten Zellen. CellQuest ist in der Lage, für die einzelnen Quadranten die absoluten und relativen Häufigkeiten angeben.

Die verwendete FITC-Annexin V-Färbung färbt die Zellen, welche in Apoptose gehen, indem es an Phosphatidylserin bindet, welches in der Frühphase der Apoptose von den Zellen externalisiert wird. PI bindet an doppelsträngige DNA und ist nicht in der Lage, die Zellmembran vitaler Zellen zu penetrieren und somit ein geeigneter Marker für Zellen in der Spätphase der Apoptose.

Tote Zellen binden folglich sowohl FITC-Annexin als auch PI, kommen damit im FL1 vs FL3-Diagramm im rechten oberen Quadranten zu liegen und können von vitalen Zellen (keine Färbung), Zellen während der Apoptose (FITC positiv) und toten Zellen (FITC und PI positiv) differenziert werden [49, 50].

Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen kann jedoch keine Unterscheidung in Früh- und Spätapoptose getroffen werden, da im transduzierten Plasmid GFP integriert ist. Dieses emittiert nach Anregung Licht derselben Wellenlänge wie FITC-Annexin, was die Beurteilbarkeit der Annexinfärbung einschränkt. Im linken oberen Quadranten kommt zusätzlich Zelldetritus zur Darstellung, welcher aufgrund der unterschiedlichen Genese (z. B. mechanische Schädigung durch Zentrifugation) bei der Beurteilung der Apoptose nicht berücksichtigt wird.

2.9 Statistische Analyse

Zur Bewertung der statistischen Signifikanz der Proliferations- und Apoptoseuntersuchungen wurde der zweiseitige t-Test für unabhängige Stichproben angewandt. Hierbei wurde von einer Normalverteilung der gemessenen Werte jeder Messgruppe ausgegangen [51]. Zur Berechnung wurde die T-Test-Funktion von Microsoft Office Excel 2010 verwendet unter der Angabe der Zweiseitigkeit und des Typs „2“ (entspricht zwei Stichproben, gleiche Varianz, homoskedastisch). Die zugrunde liegenden Formeln werden an dieser Stelle nicht erläutert und sind in statistischen Lehrbüchern zu finden.

Das Ergebnis des t-Tests entspricht der statistischen Signifikanz p , welche in wissenschaftlichen Publikationen im Allgemeinen bei $p < 0,05$ als signifikant angesehen werden [52].

2.10 Phosphoproteomanalyse

Die Phosphoproteomanalyse wurde vom Proteomic Center Tübingen (PCT) unter der Leitung von Frau Dr. Ana Velic durchgeführt. Das PCT stellte das verwendete SILAC Medium sowie die hier aufgeführte Methodik bereit. Die Vorbereitungen für die Phosphoproteomanalyse wie die Zellkultur, das Markieren mit SILAC-Medium und die Herstellung der Lysate wurden in Eigenarbeit durchgeführt und die fertigen Lysate daraufhin an Frau Dr. Velic für die weitere Anreicherung und Analyse übergeben.

2.10.1 Zellkultur und SILAC labeling

Für die Proteomanalyse wurden Molm 14 EV- und Molm 14 PDK1 k.o-Zellen verwendet. Diese wurden für 10 Tage in speziell angefertigtem SILAC DMEM Medium kultiviert. Die Molm 14 PDK1 k.o wurden mit SILAC heavy label (Lys8Arg10)-Medium markiert, die Molm 14 EV mit SILAC light label (Lys0Arg0). Mehr als 97 % der Zellen hatten im Incorporation-Check das SILAC label aufgenommen.

2.10.2 Proteinextraktion

Um die SILAC-markierten Proteine aus der Zellkultur zu extrahieren, wurden die Zellen zweimal mit 5 ml DPBS gewaschen und auf Eis gestellt, um einen Proteinzerfall während des folgenden Denaturierungsschrittes mit einem Puffer bestehend aus 6 M Urea, 2 M Thiourea und 10 mM Tris-Base, zu vermeiden. Anschließend wurden Protease-(complete Mini EDTA-free Proteinase Inhibitor-Cocktail) und Phosphatase-Inhibitoren (Glycerol-2-phosphat, Natriumfluorid, Natriumorthovanadat) hinzugefügt.

Durch die Zugabe von 1 μ l Benzonase und einer Inkubation von 10 min bei Raumtemperatur erfolgte der Verdau von DNA und RNA. Daraufhin wurden die

2. Material und Methoden

Proben bei 2800 x g (4000 rpm, 10°C) 25 min zentrifugiert. Das DNA- und RNA-haltige Präzipitat wurde anschließend entfernt. Die extrahierten Proteine jeder Zelllinie wurden 1:1 („light“ zu „heavy“; entsprechend Bradford-Assay) gemischt. Das Proteingemisch wurde mit Trypsin verdaut wie in dem von Macek et al [53] publizierten Protokoll angegeben. Für die Proteomanalyse wurden 20 µg des verdauten Proteins verwendet.

2.10.3 Phosphopeptid-Anreicherung

4,4 mg der Probe wurden mit Trifluoressigsäure (TFA) auf eine Konzentration von 0,1 Vol% angesäuert und für die Phosphopeptid-Anreicherung verwendet. Anschließend wurde die Extraktion der festen Phase durchgeführt und die Proben auf Sep-Pak Vac 1cc C18-Patronen geladen. Vor dem Beladen wurden die Säulen mit Methanol aktiviert und mit Lösung A* (2 % Acetonitril (ACN) / 1 % TFA) äquilibriert. Nach dem Laden der Proben wurden die Säulen mit Lösung A (0,5 % Essigsäure) gewaschen und die Peptide mit 80 % ACN / 6 % TFA ausgewaschen. Anschließend wurden die Peptide mit TiO₂ beads für 10 min inkubiert (1:2, bead to protein ratio). Die Beads wurden mit Lösung B gewaschen und die Peptide mit 5 % NH₄OH, pH 11.0 in 50 % Methansäure gelöst, gefolgt von einem Waschprozess mit 80 % ACN in 1 % Methansäure. Die Proben wurden bis auf 50 µl im SpeedVac (Eppendorf) verdampft und mit StageTips gereinigt. Anschließend wurden zehn Anreicherungsdurchgänge durchgeführt um einen Anstieg der eindeutig identifizierbaren Phosphopeptide zu erreichen.

2.10.4 Nano liquid chromatography–mass spectrometry (LC-MS/MS)

Die LC-MS/MS-Analyse wurde mit einem EasyLC Nano-Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographen (EasyLC-HPLC) von Proxeon Biosystems, angeschlossen an ein 2D-Ionenfallen-Massenspektrometer (LTQ Orbitrap Elite) von Thermo Scientific durchgeführt. Die Separation des Peptidgemisches fand auf einem 15 cm Siliziumemitter mit 75 µm Innendurchmesser (Proxeon Biosystems) statt, gepackt mit einem phasenumgekehrten ReproSil-Pur C8-AQ 3 µm Harz (Dr. Maisch GmbH). Mittels der Lösung A wurden die Peptide bei einer Flussrate von 500 nl/min injiziert und bei 200 nl/min aufgetrennt. Für die Peptidseparation wurde ein linearer Gradient von 5-33 % und Lösung B (80 % ACN

in 0,5 % Essigsäure) für 230 min für die Proteomanalyse und 130 min für die Phosphoproteomanalyse verwendet. Der LTQ Orbitrap Elite wurde im Positiven-Modus verwendet. Im Massenbereich von m/z 300 bis 2000 wurden im Orbitrap Massenanalysator Vorläuferionen bei einer Auflösung von 120 000 gemessen, gefolgt von einer MS/MS Spektralerfassung. Die 15 intensivsten Vorläuferionen aus dem Scan wurden nacheinander fragmentiert. Hochauflösende höherenergetische kollisionsinduzierte Dissoziations- (HCD) MS/MS-Spektren mit einer Auflösung von 15 000 und einem Zielwert von 40 000 wurden erfasst. Die normalisierte Kollisionsenergie wurde auf 35 gesetzt, die Aktivierungszeit auf 0,1 ms und die erste Masse auf 120 Th. Fragmentierte Massen wurden für 60 s nach MS/MS ausgeschlossen. Für den MS Scan im Orbitrap war der Zielwert 10^6 Lasten, bei dem MS/MS-Scan 5000 Lasten bei einer maximalen Füllzeit von 100 ms und 150 ms.

2.10.5 Datenverarbeitung und Analyse

Die Daten wurden mittels MaxQuant suite 1.5.2.8 (Cox und Mann, 2008; Olsen et al., 2005) analysiert, die Spektren wurden mit der integrierten Andromeda-Suchmaschine [54] mit der Human Database von Uniprot taxonomy ID 9606 verglichen, welche 88 692 Proteineinträge und 247 häufig auftretende Laborkontaminierungen enthält.

Die Endoprotease Trypsin wurde als Protease mit maximal zwei erlaubten Spaltungen gesetzt. Carbamidomethylierung wurde als fixierte Modifikation gesetzt, wogegen Oxidation, Acetylierung am N-Terminus und Phosphorylierungen an Serin, Threonin und Tyrosin als variable Modifikationen festgelegt wurden. Die maximale Massentoleranz für das Vorläuferion wurde auf 4,5 ppm gesetzt und für fragmentierte Ionen auf 20 ppm.

Um Proteine zu quantifizieren, mussten mindestens zwei Peptide mit je sieben Aminosäuren detektiert werden. Die False discovery rate (FDR) lag bei 1 % und wurde auf Peptid- und Proteinebene angewandt. Die Anzahl wurde auf 2 gesetzt, sowie Lys0, Arg0 für „Light“ und Lys8, Arg10 für „heavy“.

Für die Berechnung der Pearson-Korrelation wurde Perseus V 1.5.0.15 verwendet und ein zweiseitiger „Significance B“-Test angewandt.

Die Werte wurden nicht gerundet. Basierend auf Benjamini-Hochberg [55] ergaben sich korrigierte p-Werte mit einem Grenzwert von 0,01.

2.11 Zellzyklusanalyse

Eine somatische Zelle enthält einen diploiden Chromosomensatz. Jedes dieser Chromosomen besteht abhängig von der Zellzyklusphase aus einem oder zwei Chromatiden. n gibt die Anzahl an Chromosomen an, was bei einem diploiden Genom zu einem Chromosomensatz von $2n$ führt. Jedes dieser Chromosomen besteht aus einem Chromatid (C), womit sich für eine sich nicht teilende Zelle ein DNA-Gehalt von $2C$ ergibt [56].

Der Lebenszyklus einer Zelle lässt sich in insgesamt fünf Phasen einteilen. Die G1-Phase (Gap 1-Phase) bildet den Beginn der Replikationsphase der Zelle. In ihr liegt eine DNA-Menge von $2C$ vor und die Zelle bildet die für die Replikation nötigen Proteine und Replikationsenzyme. Teilt sich die Zelle nicht mehr, so geht sie von der G1-Phase in die G0-Phase über, in der Zellstoffwechsel und -Funktion, jedoch keine Teilung stattfinden. Dieser Ruhezustand ist reversibel und die Zelle kann im Zellzyklusverlauf in die S-Phase übertreten [56].

Die S-Phase (Synthese-Phase) schließt sich in der Regel an die G1-Phase an. In dieser findet die Verdopplung der DNA auf einen Chromatingehalt von $4C$ statt.

Die folgende G2-Phase der Zelle ($4C$) wird für die Synthese der zellteilungsspezifischen Proteine und für morphologische Veränderungen der Zelle benötigt. An die G2-Phase schließt sich die M-Phase (Mitose) an, in der schließlich die ganze Zelle und mit ihr die Zellorganellen, sowie die Chromosomen teilen. Nach der Zellteilung liegen im Zellkern nun wieder Chromosomen mit einem Chromatid vor ($2C$) [56].

2. Material und Methoden

Der unterschiedliche Chromatingehalt lässt sich für die Analyse der verschiedenen Zellzyklusphase nutzen. Propidium Iodid (PI) interkaliert mit doppelsträngigen Nukleinsäuresequenzen und eignet sich somit zur Quantifizierung des DNA-Gehalts einer Zelle.

Um die Zellmembran für PI durchgängig zu machen, wurden die zu analysierenden Zellen mindestens 12 Stunden bei 4°C in 70 % Ethanol fixiert. Anschließend wurde die Zellsuspension pelletiert und das Pellet mit DPBS gewaschen. Die Resuspension erfolgte in 100 µl DPBS, 2 µl PI und 2 µl RNase, gefolgt von 30 min Inkubation bei 37°C.

Die RNase wird für die Zellzyklusanalyse benötigt, da PI unspezifisch mit doppelsträngigen Nukleinsäuren und somit auch mit doppelsträngiger RNA interkaliert. Durch die Inkubation mit RNase wird die RNA der Zelle verdaut und eine PI-Bindung an RNA verhindert.

Die Analyse der fixierten und gefärbten Zellen erfolgt nun mittels Durchflusszytometrie, wobei PI auf dem FL3-H-Kanal zur Abbildung kommt. Im FL3-Histogramm zeigt sich nun ein bimodales Verteilungsmuster, in welchem die verschiedenen Zellzyklusphasen voneinander abgegrenzt werden können. Der erste Peak des Histogramms stellt die G0/G1-Phase mit einem DNA-Gehalt von 2C dar, gefolgt von der S-Phase mit 2C-4C. Die G2-Phase zeigt sich im zweiten Peak des Histogramms. Auf der FL3-Achse liegt links der G0/G1-Phase Sub-G0/G1, was avitalen Zellen entspricht [57].

3. Ergebnisse

3.1 Etablierung eines PDK1 knock-out Zellmodells

Für die Untersuchung der Rolle von PDK1 in akuten Leukämien wurden mittels lentiviraler Transduktion (siehe Kapitel 2.3) PDK1-supprimierte (PDK1 k.o.) und zur Kontrolle jeweils empty-vector (EV)-Zellmodelle etabliert. Als Grundlage hierfür dienten analog unserer o.g. Daten die Zelllinien Molm 14 und K562.

Der Nachweis des PDK1-knock-outs erfolgte mittels Western-Blot-Analyse. Hierfür wurde ein PDK1-Antikörper von Thermo Scientific (58-68 kDa) verwendet. Zur Ladekontrolle diente der Tubulin-Nachweis (55 kDa) mit einem Tubulin-Antikörper, als Größenreferenz der Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder (beides Thermo Scientific).

Für die weitere vergleichende Analyse wurden zudem zwei weitere Zellmodelle ohne bekannte aktivierende Tyrosinkinase Mutation (HL60) bzw. mit bekannter PTEN/SHIP-Defizienz und daraus resultierendem autoaktiviertem PI3K/AKT-Signalweg (Jurkat) [58] etabliert.

Abbildung 3.1 und Abbildung 3.2 zeigen, dass durch die Transduktion ein ausreichendes knock-out von PDK1 in den verwendeten Zelllinien erzielt wurde, während die EV-Kontrollen weiterhin PDK1 exprimieren.

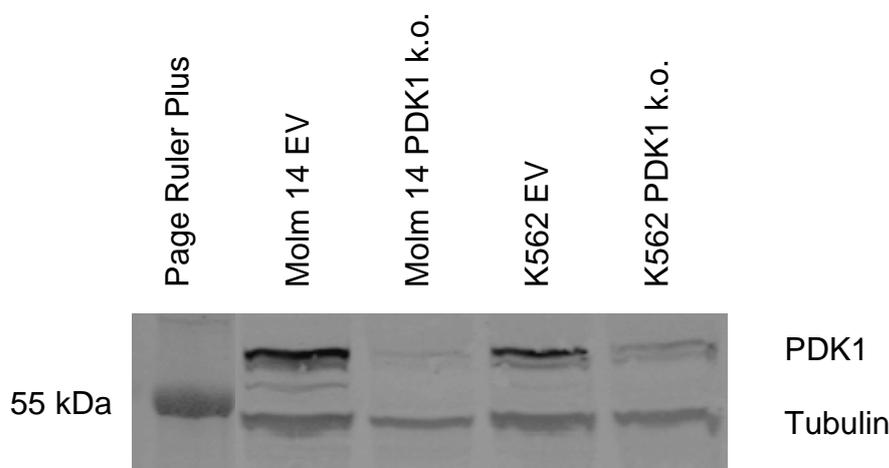


Abbildung 3.1: Nachweis des PDK1 knock-outs der Zelllinien Molm 14 und K562

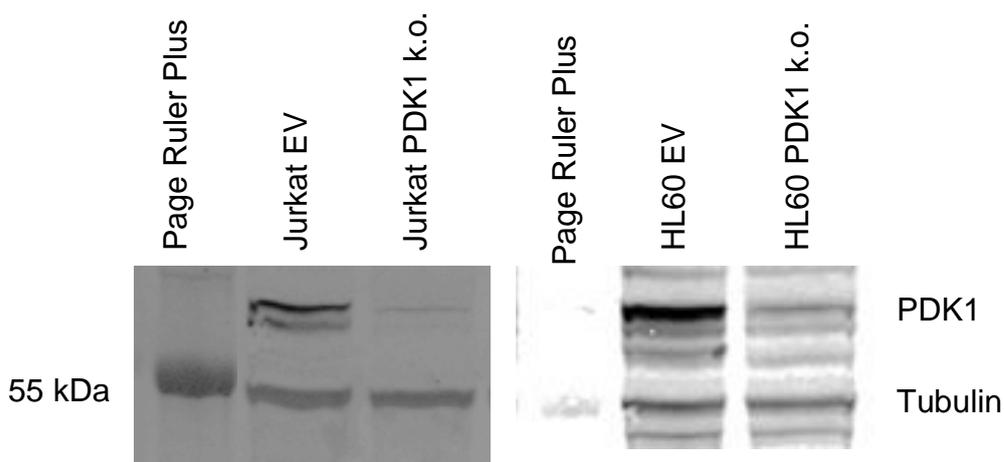


Abbildung 3.2: Nachweis des PDK1 knock-outs der Zelllinien Jurkat und HL60

3.2 Phosphorylierungsstatus von AKT

Da PDK1 über den in Kapitel 1.2 erläuterten Mechanismus den AKT-Signalweg beeinflusst, wurde die Phosphorylierung von AKT an den Stellen Thr308 und Ser473 im Western-Blot untersucht. Hier zeigte sich (Abbildung 3.3), dass durch die Suppression von PDK1 eine konsekutive Inhibition von AKT Thr308 und sukzessive AKT Ser473 in den verwendeten Zelllinien erzielt wurde. Als Ausnahme hiervon zeigte sich die Jurkat-Linie, welche aufgrund der o.g. PTEN/SHIP-Defizienz eine Autoaktivierung von AKT besitzt [58], weshalb sich die Suppression von PDK1 nicht der AKT-Analyse widerspiegelt.

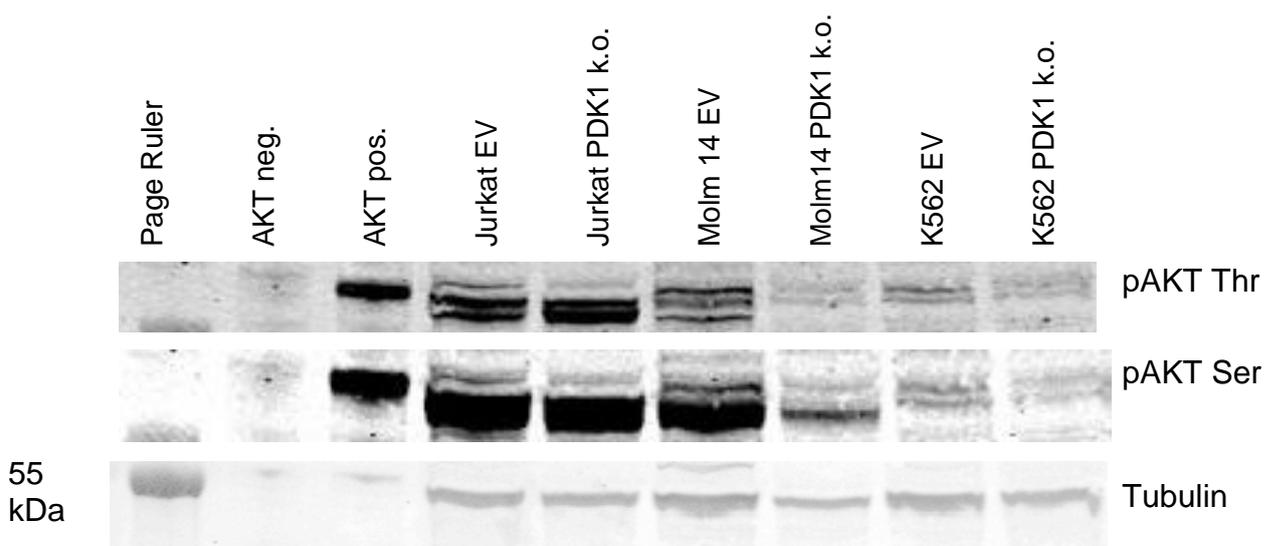


Abbildung 3.3: Nachweis von pAKT Thr308, pAKT Ser 473 in Jurkat, Molm 14 und K562

3.3 Proliferation der nativen Zellen

In der Zellkultur war eine verminderte Proliferationsrate der jeweiligen knock-out-Zellen gegenüber ihrer EV-Kontrolle zu beobachten. Um diese zu quantifizieren, wurden 50.000 Zellen in 3 ml Kulturmedium eingebracht und bei 37°C inkubiert. Die Proliferationsrate wurde anschließend alle 24 Stunden ermittelt, indem durch erneutes Auszählen die Gesamtzellzahl bestimmt wurde.

Hierbei zeigte sich in allen Zelllinien bei exponentiellem Wachstum über 72 h eine um den Faktor 1,7 (K562, HL60) bzw. 2,1 (Jurkat, Molm 14) verringerte Proliferationsrate der k.o.-Zellen im Vergleich zur EV-Linie. Grundlage dieses Vergleichs war die Berechnung der Wachstumsraten der einzelnen Zelllinien (siehe Tabelle 3.1), welche zueinander in Relation gesetzt wurden.

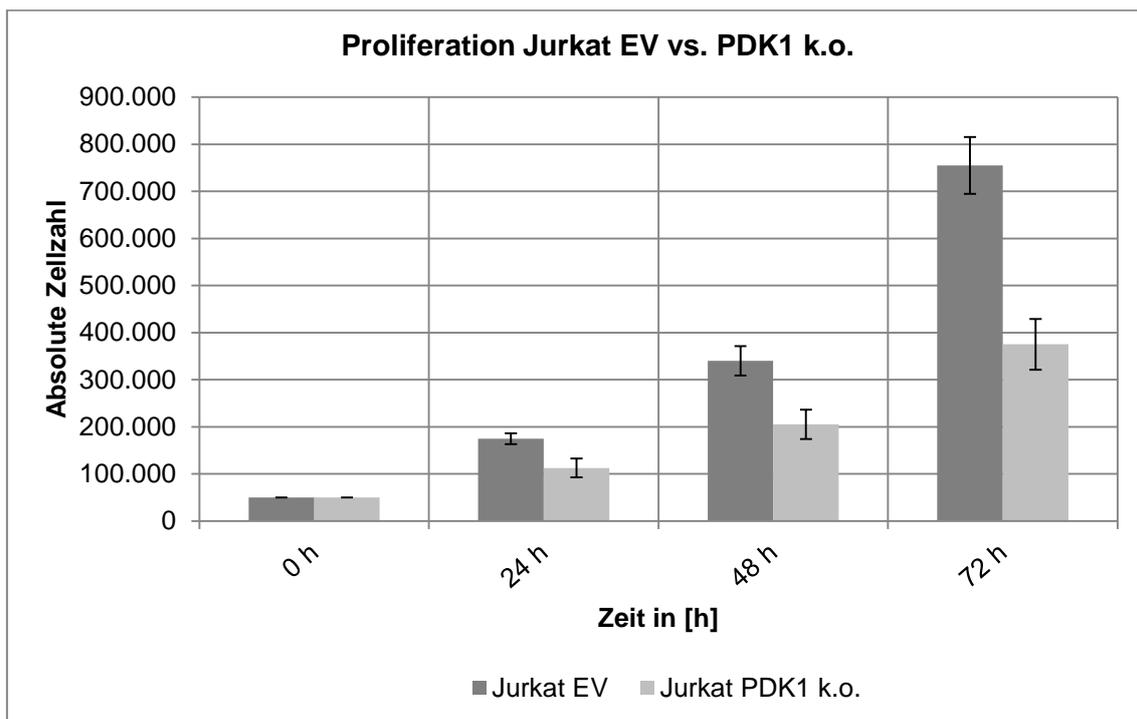


Abbildung 3.4: Proliferation Jurkat EV vs. PDK1 k.o

3. Ergebnisse

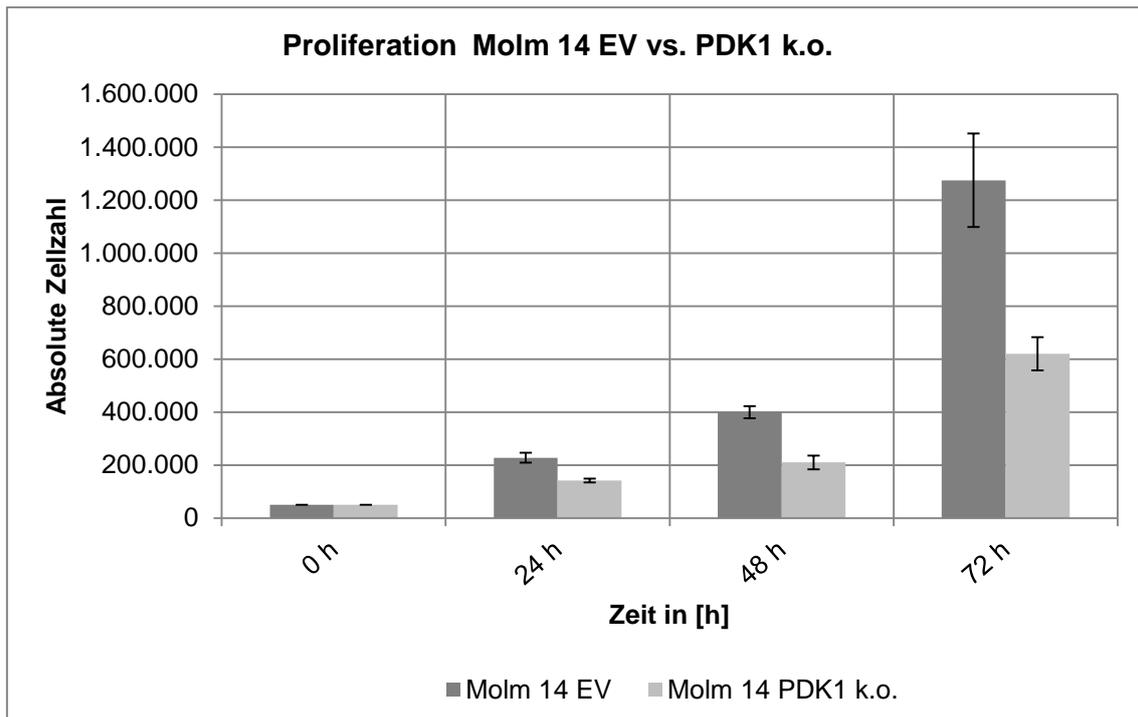


Abbildung 3.5: Proliferation Molm 14 EV vs. PDK1 k.o

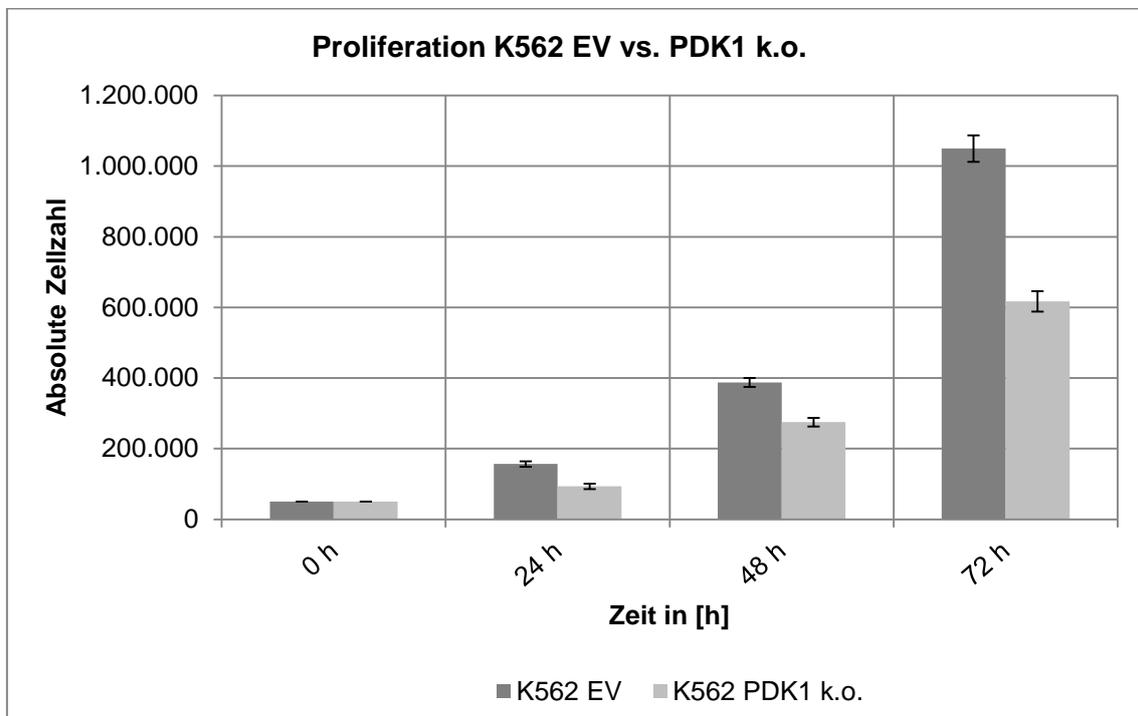


Abbildung 3.6: Proliferation K562 EV vs. PDK1 k.o

3. Ergebnisse

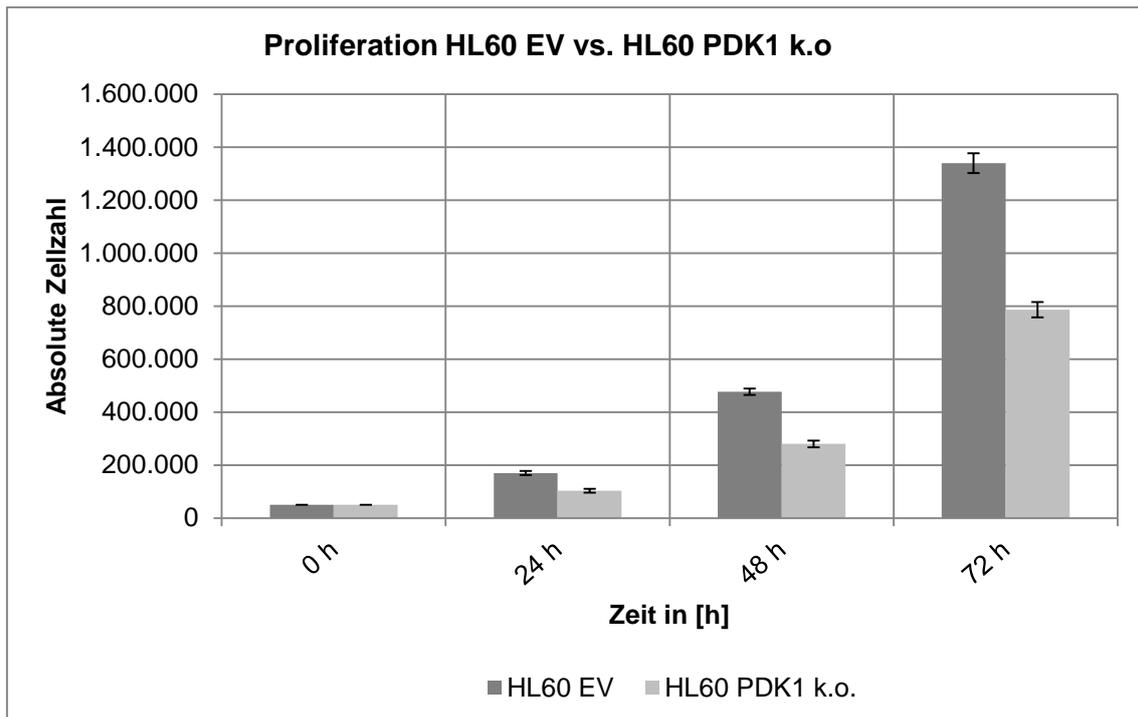


Abbildung 3.7: Proliferation HL60 EV vs. PDK1 k.o.

Tabelle 3.1: Zellzahlen und Wachstumsraten nach 0 und 72 Stunden

	Zellzahl _{0h}	Zellzahl _{72h}	Wachstumsrate $\frac{\text{Zellzahl}_{72h} - \text{Zellzahl}_{0h}}{\text{Zellzahl}_{0h}}$ [59]
Jurkat EV	50.000	755.000	14
Jurkat PDK1 k.o	50.000	375.000	6,5
Molm 14 EV	50.000	1.275.000	24,5
Molm 14 PDK1 k.o	50.000	620.000	11,4
K562 EV	50.000	1.050.000	20
K562 PDK1 k.o	50.000	616.667	11,3
HL60 EV	50.000	1.340.000	25,8
HL60 PDK1 k.o	50.000	786.667	14,7

In Tabelle 3.1 werden die durchschnittlichen Wachstumsraten der PDK1 knock-out- und der EV-Zelllinien über 72 h zusammengefasst. Die Proliferationsanalyse der nativen Zelllinien zeigt, dass die Suppression von PDK1 eine verzögerte zelluläre Proliferation zur Folge hat.

3.4 Proliferation unter Behandlung mit Daunorubicin

Zur Untersuchung des Wachstumsverhaltens der Zelllinien unter Behandlung mit dem Anthrazyklin Daunorubicin als einem der wichtigsten Substanzen in der Leukämie-therapie wurden XTT-Assays mit 48-stündiger Inkubationszeit durchgeführt.

Die Extinktionswerte der photometrischen Messung des Farbumschlags sind linear zur Proliferationsrate der Zellen. Als Referenzwert wurde die Extinktion der unbehandelten Probe auf 100% gesetzt und die Messergebnisse der behandelten Proben in Relation dazu angegeben.

Um eine Verfälschung der Ergebnisse durch etwaige Pipettierfehler zu verhindern, wurde von jeder Konzentration der Mittelwert eines sechsfach-Ansatzes errechnet und dieser als prozentualer Anteil des Ausgangswerts in den Abbildungen Abbildung 3.8 -Abbildung 3.11 dargestellt.

Hierbei zeigte sich unter der Behandlung mit dem Anthrazyklin Daunorubicin eine stärkere Abnahme metabolisch aktiver proliferierender Zellen bei den knock-out-Zelllinien im Vergleich zu ihrer empty-vector-Kontrolle. Bei den Jurkat zeigte sich eine Differenz von maximal 10 %, bei Molm 14 von höchstens 13 %, während bei der Zelllinie HL60 ein Unterschied von bis zu 25 % und bei K562 von 33 % zu erkennen war.

Somit zeigt sich, dass eine PDK1-Defizienz zu einer erhöhten Suszeptibilität gegenüber dem Anthrazyklin Daunorubicin führt.

3. Ergebnisse

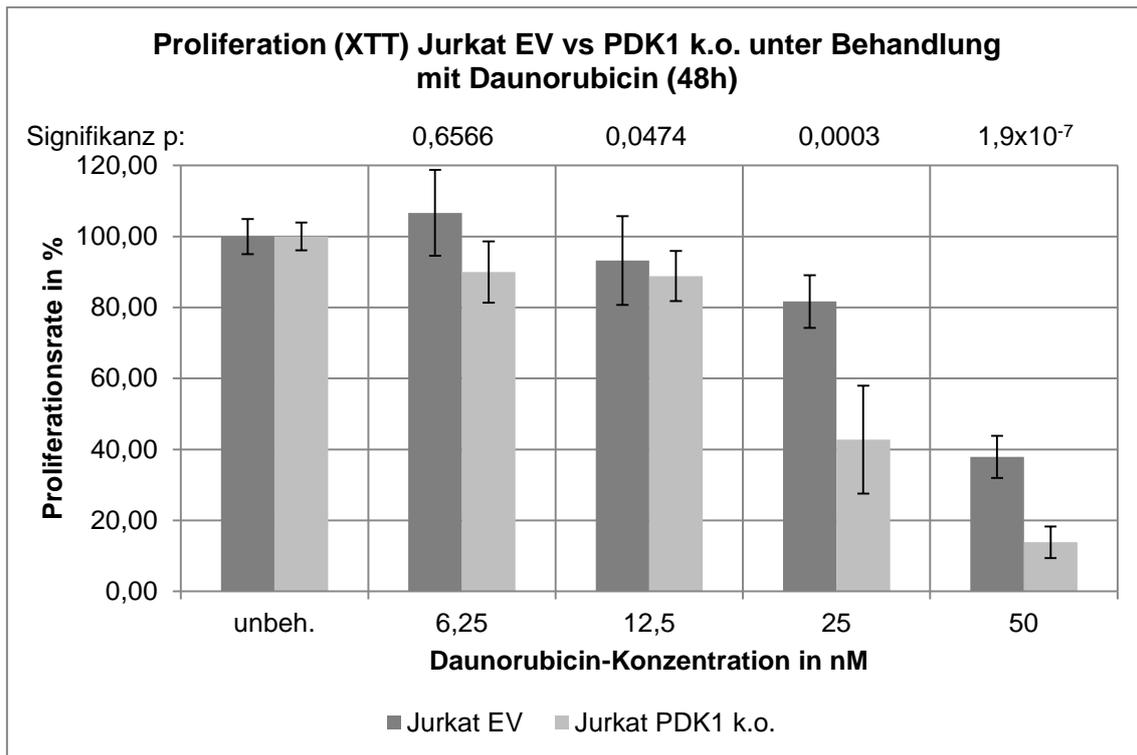


Abbildung 3.8: Proliferation (XTT) Jurkat EV vs PDK1 k.o unter Behandlung mit Daunorubicin (48h)

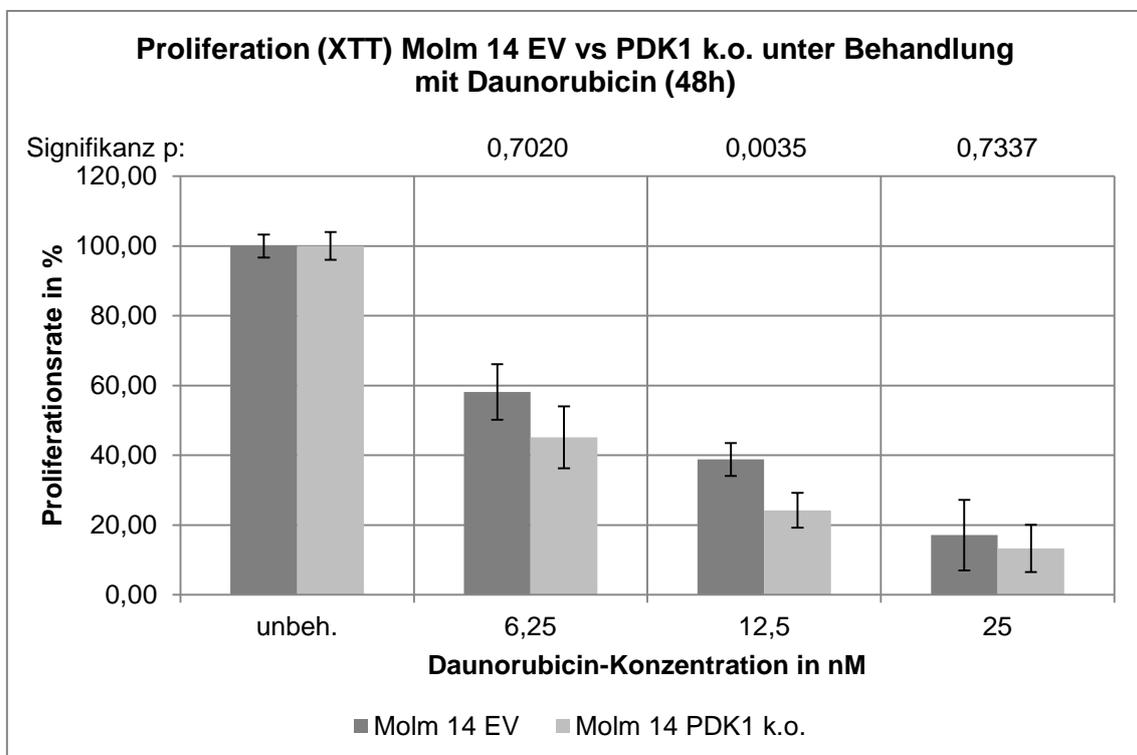


Abbildung 3.9: Proliferation (XTT) Molm 14 EV vs PDK1 k.o unter Behandlung mit Daunorubicin (48h)

3. Ergebnisse

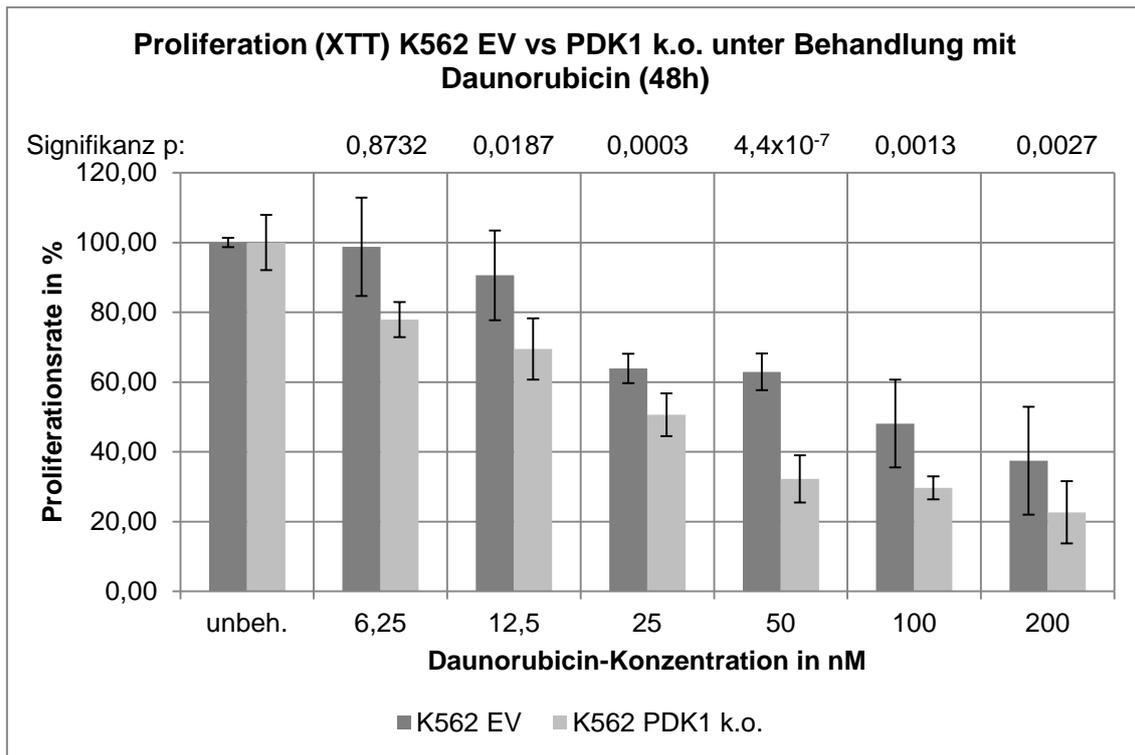


Abbildung 3.10: Proliferation (XTT) K562 EV vs. PDK k.o. unter Behandlung mit Daunorubicin (48h)

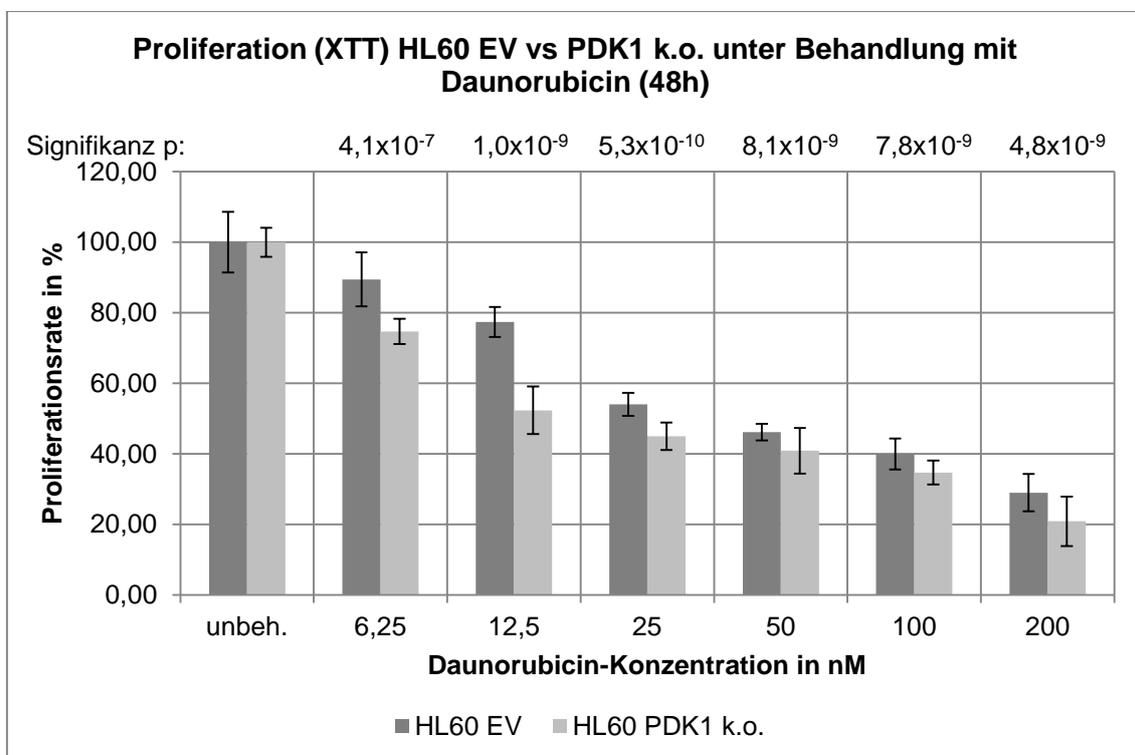


Abbildung 3.11: Proliferation (XTT) HL60 EV vs PDK1 k.o. unter Behandlung mit Daunorubicin (48h)

3.5 Zellzyklus

Um die Proliferationsunterschiede der PDK1 k.o.-Zellen im Vergleich zur EV-Kontrolle unter Anthrazyklintherapie weiter zu untersuchen, wurde eine Zellzyklusanalyse durchgeführt. Anhand dieser lassen sich einzelne Zellen mittels ihres DNA-Gehalts einer Zellzyklusphase zuordnen. Der erste Peak der sich in der FACS-Analyse (Kapitel 2.11) ergebenden bimodalen Kurve (x-Achse) stellt die G0/G1-Phase dar, rechts davon folgt die S-Phase und anschließend die G2-Phase in Form des zweiten Peaks. Links von G0/G1 kommen apoptotische Zellen zu liegen. Die y-Achse gibt die Anzahl der gezählten Zellen wieder. Die Verteilung der Zellzyklusphasen wird in Abbildung 3.12 exemplarisch dargestellt.

Die Ausgangsprobe (0 h) repräsentiert die Verteilung der unbehandelten Zellen im exponentiellen Wachstum und ihre Verteilung über die Zellzyklusphasen. Anschließend wurden die Zellsuspensionen mit 50 nM Daunorubicin versetzt und Veränderungen in der Zellzyklusprogression über 72 h analysiert.

Zusammenfassend zeigt sich unter dem Einfluss von Daunorubicin unabhängig der PDK1-Expression eine Akkumulation der Zellen in G2 (Abbildung 3.12 - Abbildung 3.15). Weiterhin bestätigten sich die Untersuchungen des XTT-Assays mit erhöhter Suszeptibilität der PDK1-defizienten Zelllinien gegenüber der Anthrazyklin-Behandlung bei gesteigerter Akkumulation avitaler Zellen in der sub-G1-Kohorte.

3. Ergebnisse

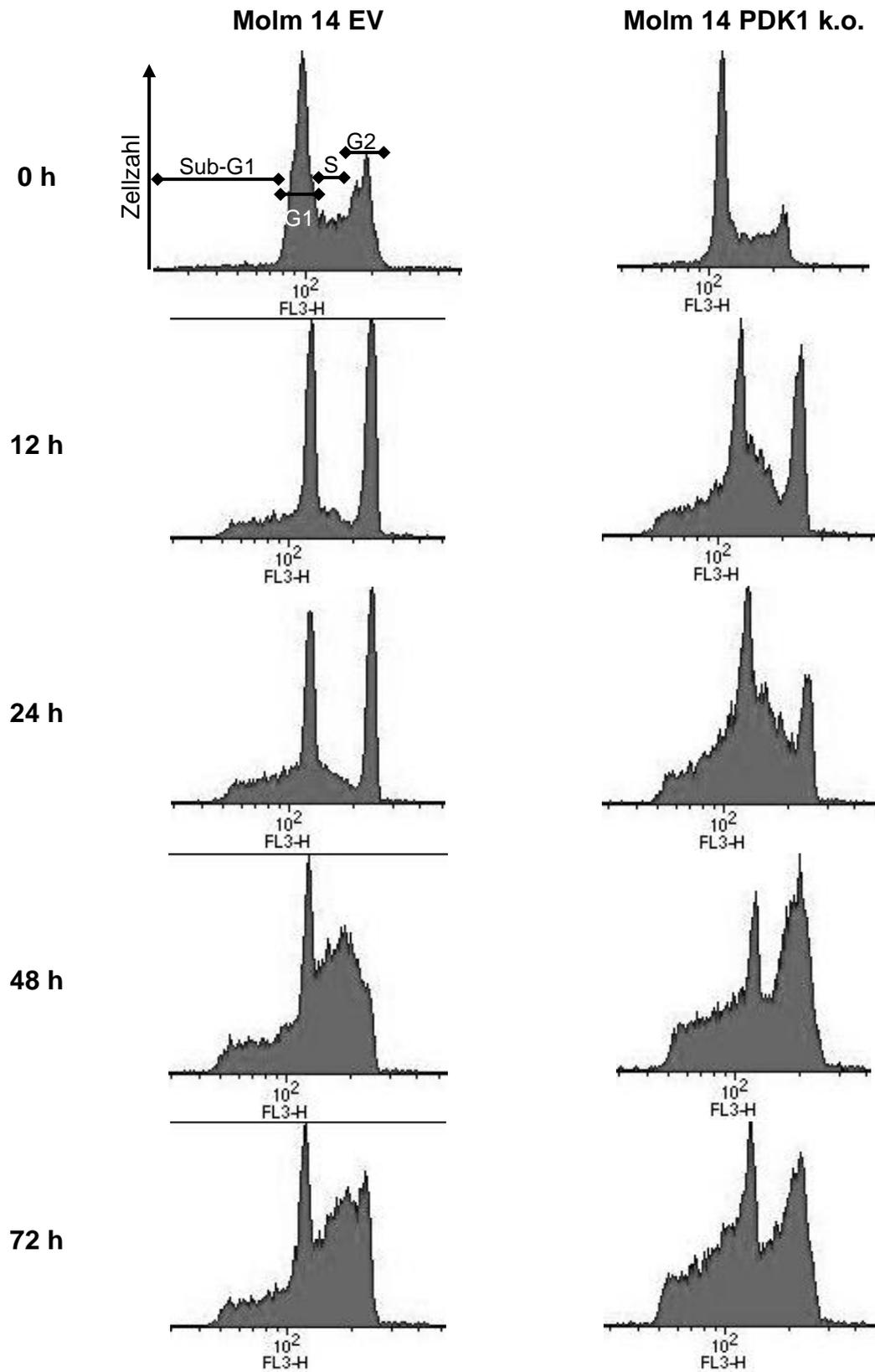


Abbildung 3.12: Zellzyklusanalyse Molm 14 EV und PDK1 k.o. unter Behandlung mit 50 nM Daunorubicin

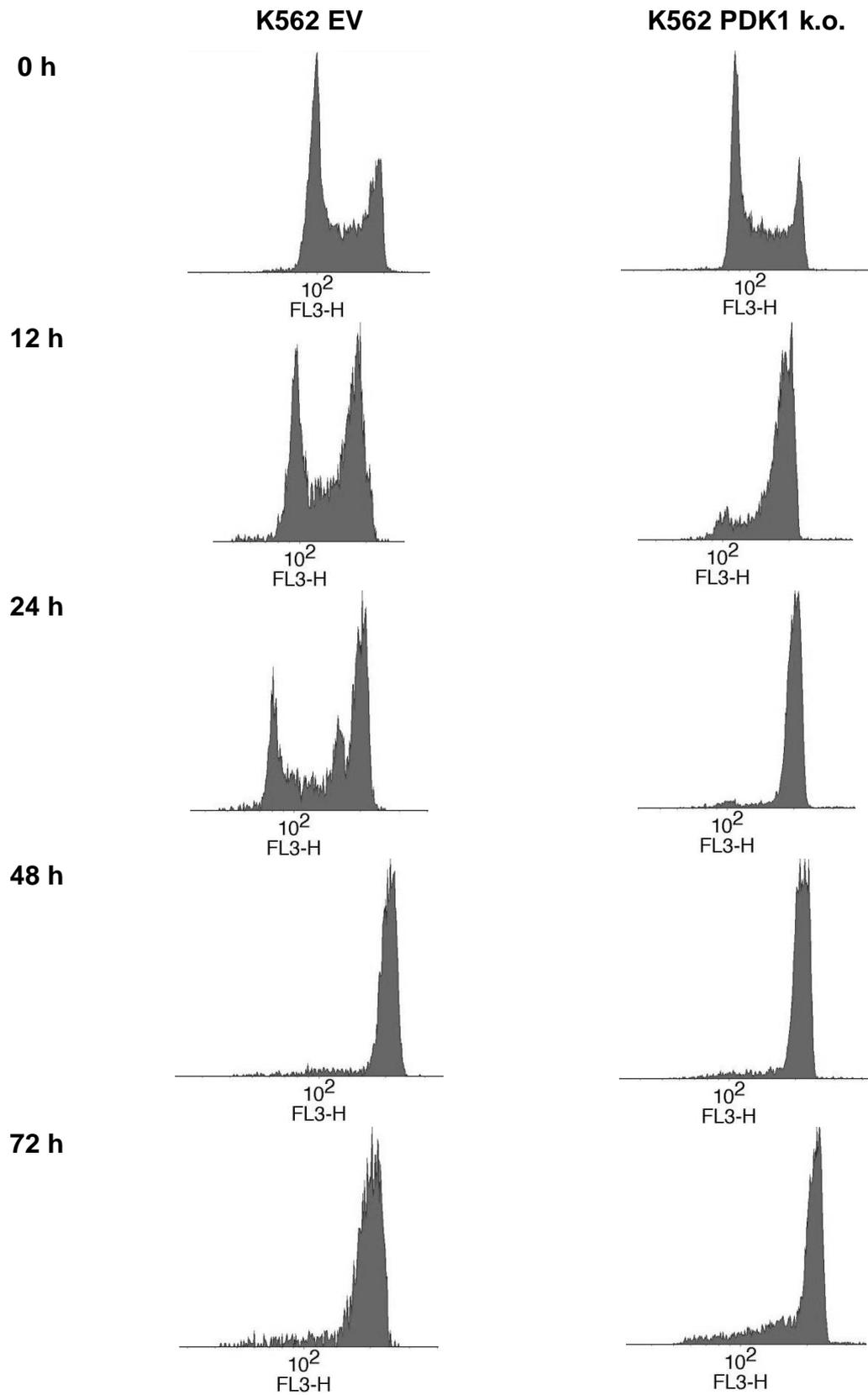


Abbildung 3.13: Zellzyklusanalyse K562 EV und PDK1 k.o. unter Behandlung mit 50 nM Daunorubicin

3. Ergebnisse

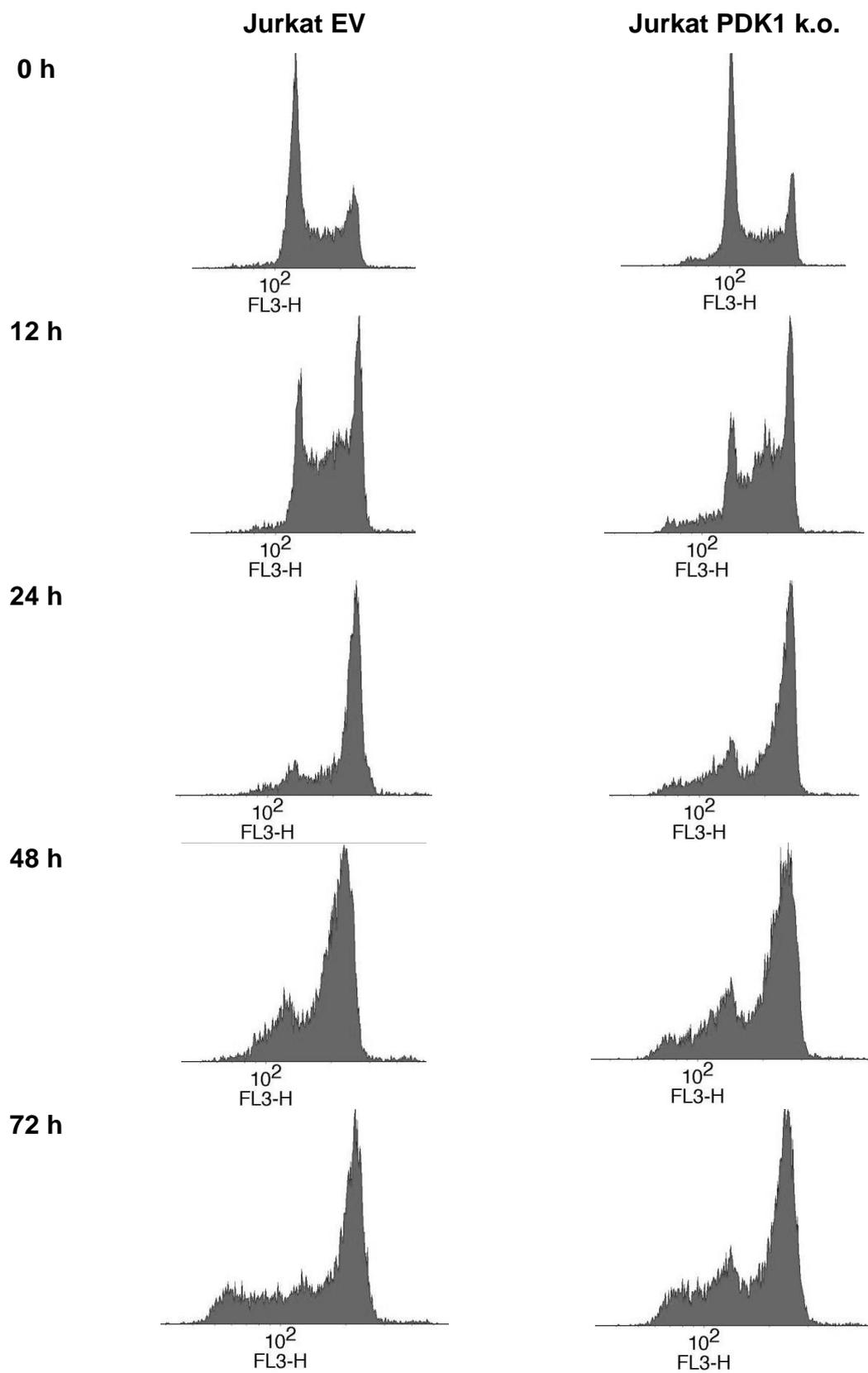


Abbildung 3.14: Zellzyklusanalyse Jurkat EV und PDK1 k.o. unter Behandlung mit 50 nM Daunorubicin

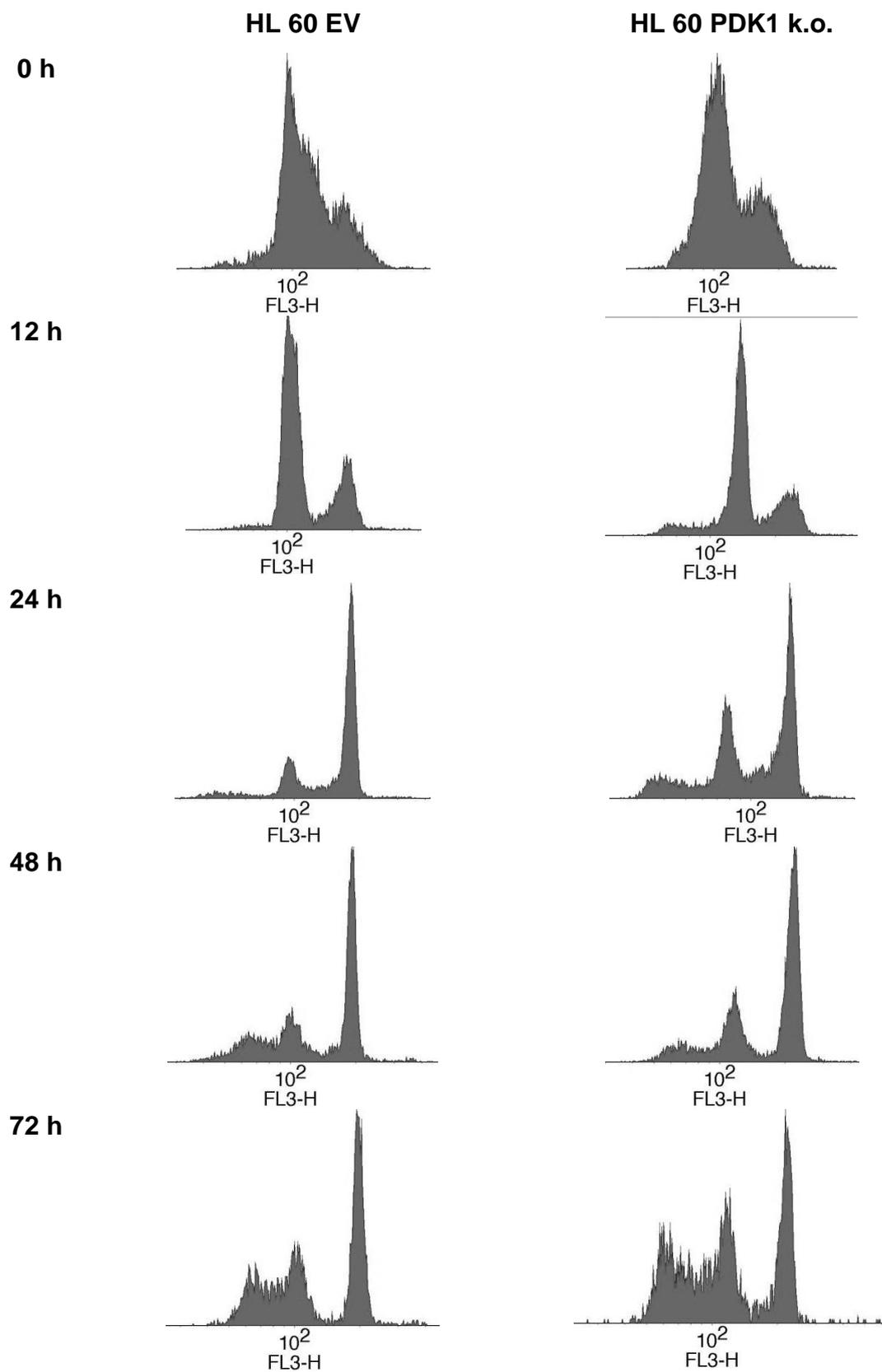


Abbildung 3.15: Zellzyklusanalyse HL 60 EV und PDK1 k.o. unter Behandlung mit 50 nM Daunorubicin

3.6 Proliferation unter Behandlung mit Tyrosinkinaseinhibitoren

Im Rahmen der gezielten, mutationsabhängigen Therapieansätze gewinnen Tyrosinkinaseinhibitoren in der Leukämiebehandlung immer mehr an Einfluss. Zur Untersuchung des Einflusses von PDK1 auf das Proliferationsverhalten leukämischer Zellen unter Therapie mit verschiedenen Tyrosinkinaseinhibitoren wurden die o. g. knock-out Zellmodelle mit autoaktivierter Tyrosinkinaseaktivität (Molm14, K562) deshalb im XTT-Proliferationsassay untersucht.

Sunitinib ist ein Multikinase-Inhibitor und hemmt unter anderem die Rezeptoren von VEGF (vascular endothelial growth factor), PDGF (platelet-derived growth factor), KIT und FLT3 [60]. Imatinib wird als potenter BCR-ABL-Inhibitor besonders in der Therapie der CML eingesetzt. Für die Untersuchung der FLT3-ITD-tragenden Molm 14-Linie wurde Sunitinib, für die BCR-ABL-tragende Zelllinie K562 Imatinib verwendet.

In Abbildung 3.16 und Abbildung 3.17 sind die Unterschiede im Ansprechverhalten zwischen k.o.- und EV-Zelllinie dargestellt. Bei den Molm 14-Zellen war eine Differenz von bis zu 17,54 % (bei 6,25 nM) nachweisbar, bei der K562-Linie von maximal 12,03 % (bei 125 nM). Somit zeigt sich eine nur tendenziell gesteigerte Sensitivität der PDK1 k.o.-Zellen gegenüber Tyrosinkinaseinhibitoren.

Aus dieser Beobachtung erschließt sich als Hypothese, dass die PDK1-vermittelte Signaltransduktion zur zellulären Proliferationssteigerung und damit Aggressivität der Leukämiezellen beiträgt, jedoch die Leukämogenese an sich nicht triggert oder maßgeblich unterhält.

3. Ergebnisse

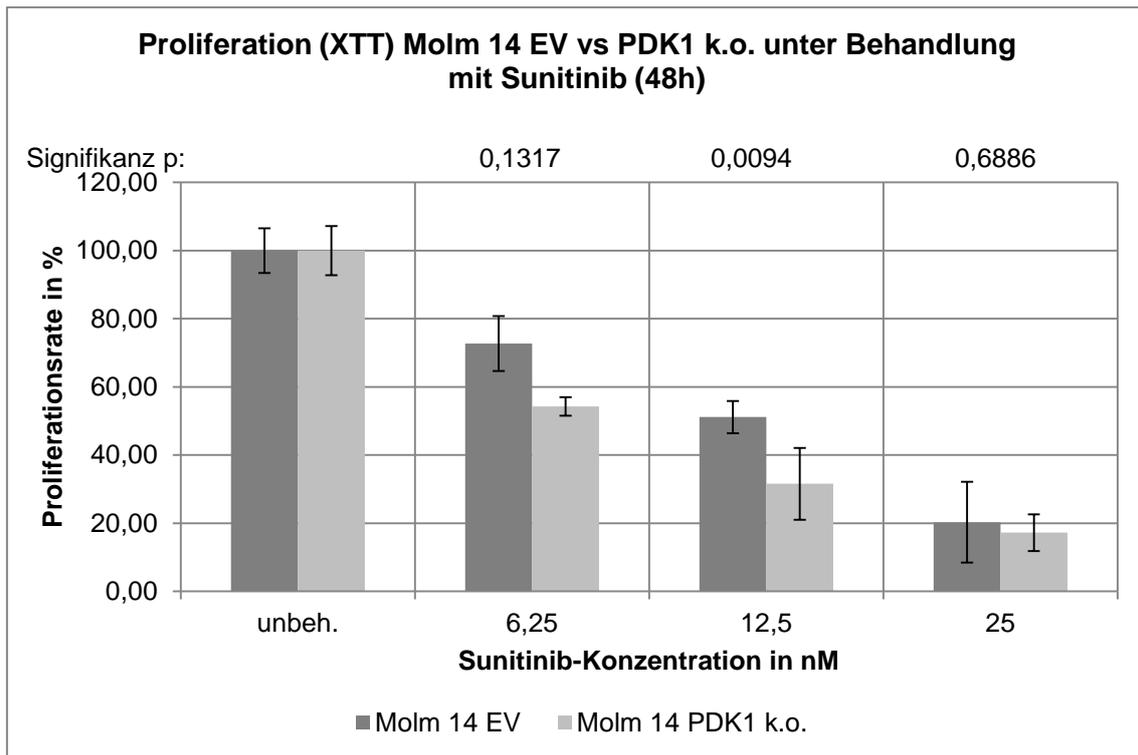


Abbildung 3.16: Proliferation (XTT) Molm 14 EV vs. PDK1 k.o. unter Behandlung mit Sunitinib (48h)

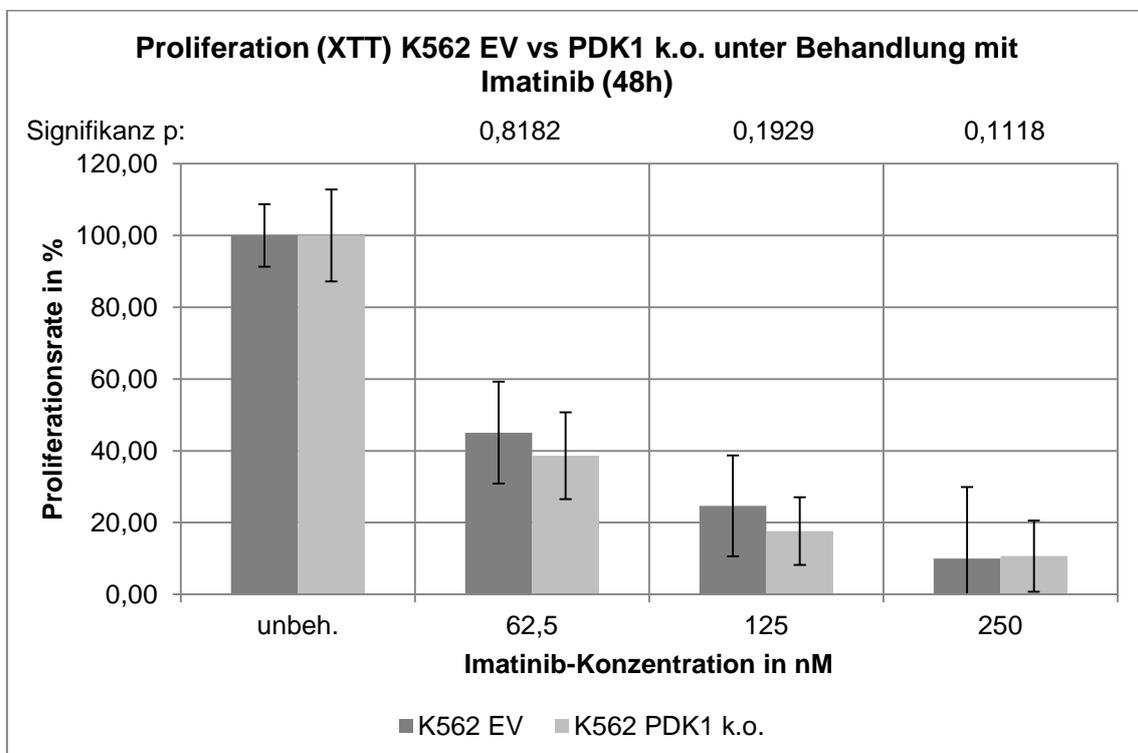


Abbildung 3.17: Proliferation (XTT) K562 EV vs PDK1 k.o. unter Behandlung mit Imatinib (48h)

3.7 Apoptose unter Behandlung mit Daunorubicin

Für die Untersuchung des Apoptoseverhaltens der PDK1-knock-out-Zelllinien im Vergleich zu ihrer jeweiligen EV-Kontrolle wurden die Proben für 48 h mit der gewünschten Konzentration des Anthrazyklins Daunorubicin versetzt. Nach dem Ende der Inkubationszeit wurden mittels der PI-/Annexinfärbung und der Analyse im FACS die Anteile der vitalen und apoptotischen Zellen aus einer gemessenen Probe von 30.000 Zellen ermittelt. Alle Versuche zur Apoptoseinduktion wurden als dreifach-Ansatz durchgeführt und die sich ergebenden Standardabweichungen als Fehlerbalken im Diagramm dargestellt.

Im klinischen Setting werden Daunorubicinspiegel im Serum von bis zu 1 $\mu\text{mol/l}$ [61] erreicht, womit die verwendeten Daunorubicinkonzentrationen von 6,25 nM bis 400 nM im therapeutischen Bereich liegen.

Beispielhaft für die Apoptoseanalyse ist hier das FL3-H-Histogramm der Jurkat EV und PDK1 k.o. nach 48-stündiger Inkubation mit 25 nM Daunorubicin gezeigt. Links im Diagramm befinden sich die vitalen Zellen, apoptotische Zellen zeigen aufgrund der PI-Färbung einen Shift nach rechts. Eine Unterscheidung zwischen früh- und spätapoptotischen Zellen ist für die transduzierten Zellmodelle nicht möglich. Ursache hierfür liegt in dem im Plasmid integrierten GFP, welches nach Anregung Licht der selben Wellenlänge wie Annexin emittiert, welches für die Detektion der Frühapoptose genutzt wird.

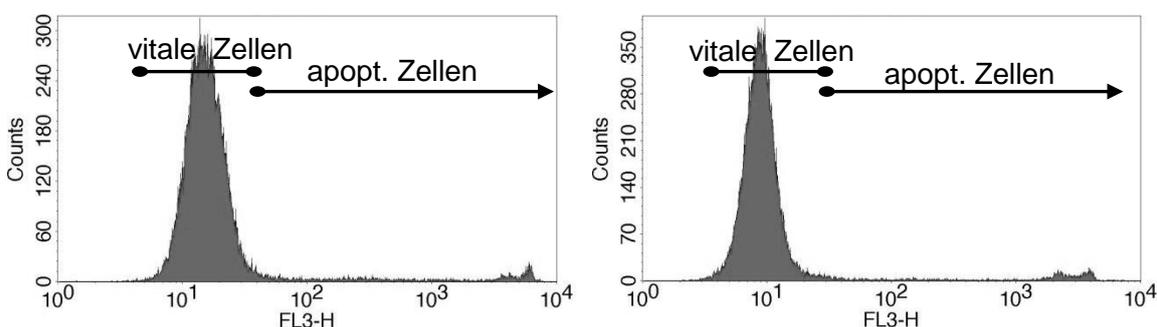


Abbildung 3.18: FL3-Histogramm der Jurkat EV (links) und PDK1 k.o (rechts), unbehandelt

3. Ergebnisse

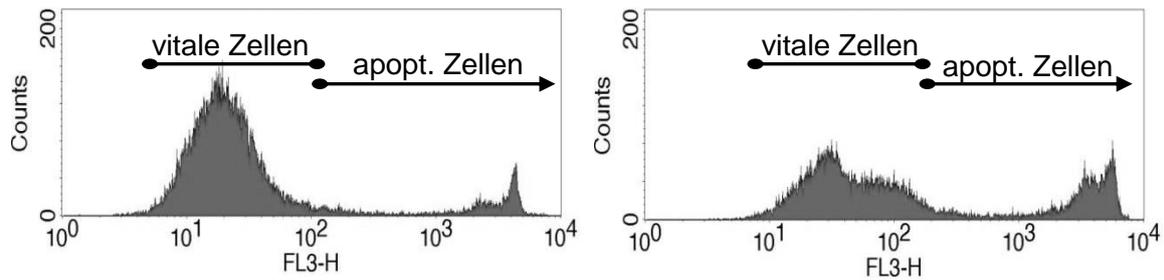


Abbildung 3.19: FL3-Histogramm der Jurkat EV (links) und PDK1 k.o (rechts), 25 nM Daunorubicin (48 h)

Unter den verwendeten Konzentrationen zeigten sich in der FACS-Analyse für die Jurkat-, K562- und die HL60-Zelllinie höhere Ansprechraten der knock-out-Zelllinie gegenüber der EV-Zelllinie. Besonders deutlich waren diese Unterschiede im Bereich von 12,5 – 50 nM.

Die Jurkat PDK1 k.o.-Zelllinie reagierte unter steigenden Daunorubicin-Konzentrationen sensibler und folglich mit einer stärkeren Apoptoseinduktion (81,29 % bei 25 nM) als die EV-Kontrolle (42,07 % bei 25 nM). Dieses unterschiedliche Ansprechverhalten zeigte sich nicht nur bei 25 nM, sondern war, wie in Abbildung 3.20 dargestellt, über das gesamte verwendete Konzentrationspektrum in unterschiedlichem Ausmaß beobachtbar. Die größte Differenz (39,22 %) war bei 25 nM Daunorubicin zu erkennen, während sich die Apoptosezahlen in Richtung der Randbereiche unbehandelt bzw. 200 nM wieder aneinander annäherten.

Diese Beobachtungen bestätigten sich ebenfalls für die Zelllinien K562 (siehe Abbildung 3.21) und HL60 (Abbildung 3.22). Die maximal erreichbaren Unterschiede im Anteil der apoptotischen Zellen an der analysierten Gesamtzellzahl lagen für die K562 bei 29,51 % bei 50 nM Daunorubicin (PDK1 80,95 % vs. EV 51,44 %) und für die Zelllinie HL60 bei 34,67 % bei 25 nM (PDK1 60,61 % vs. EV 25,94 %).

3. Ergebnisse

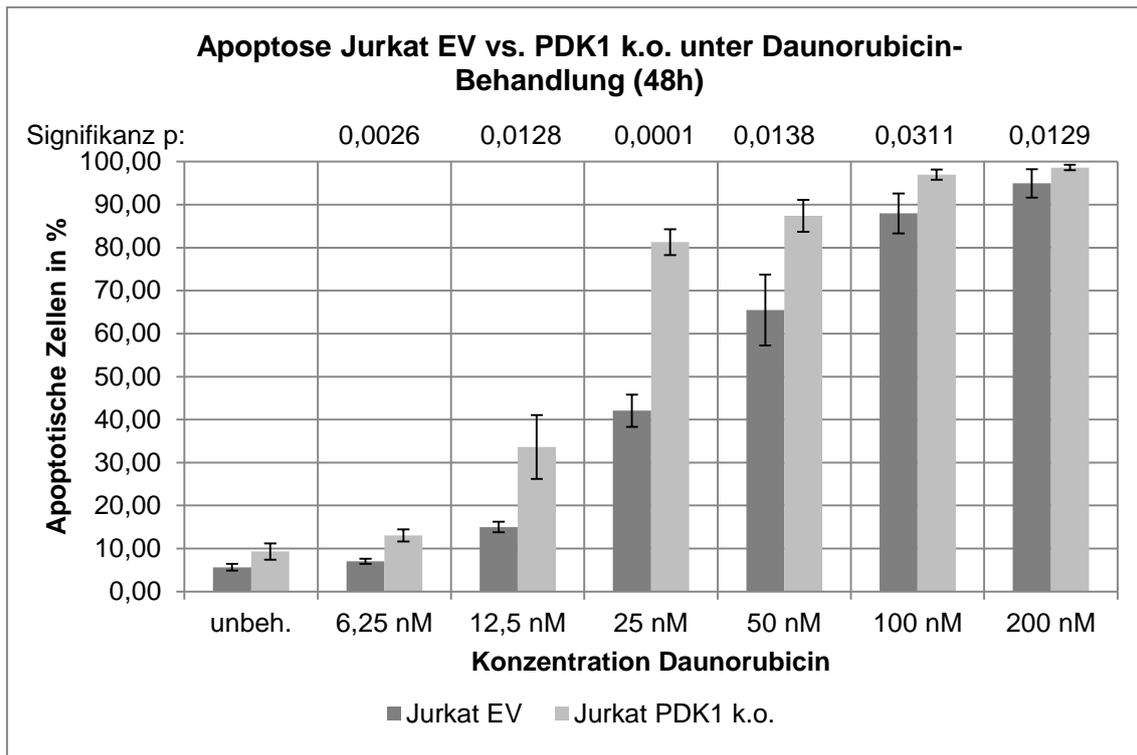


Abbildung 3.20: Apoptose Jurkat EV vs. PDK1 k.o. unter Daunorubicinbehandlung (48h)

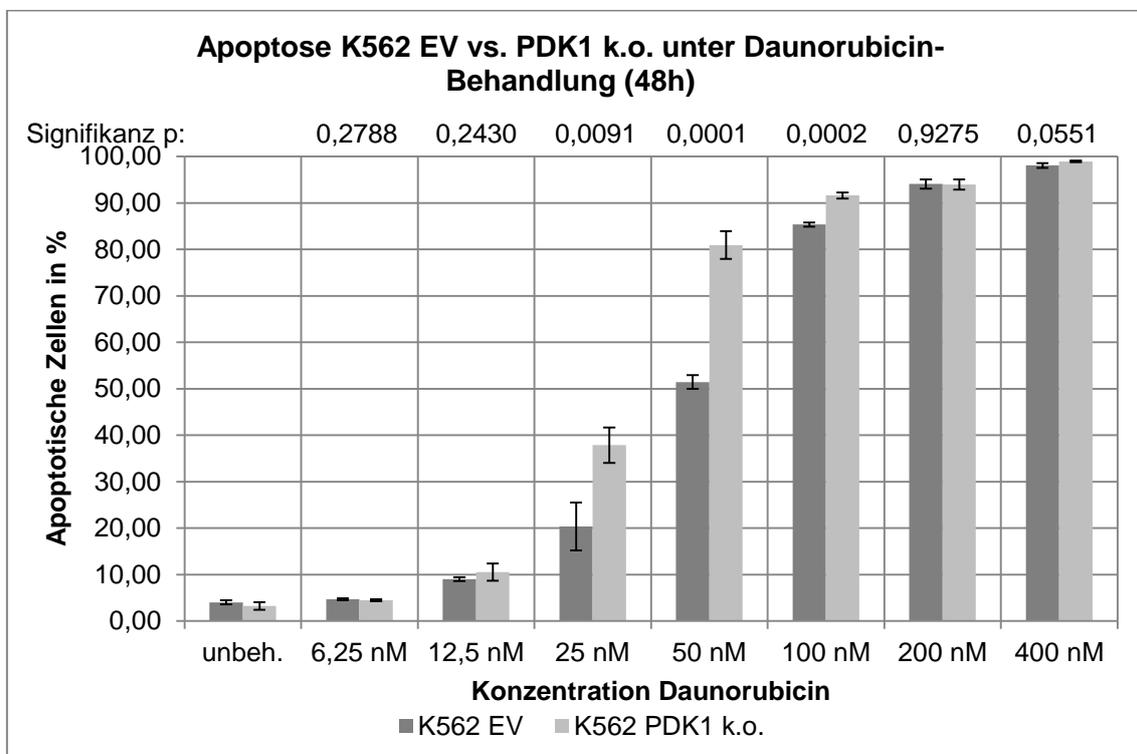


Abbildung 3.21: Apoptose K562 EV vs. PDK1 k.o. unter Daunorubicinbehandlung (48h)

3. Ergebnisse

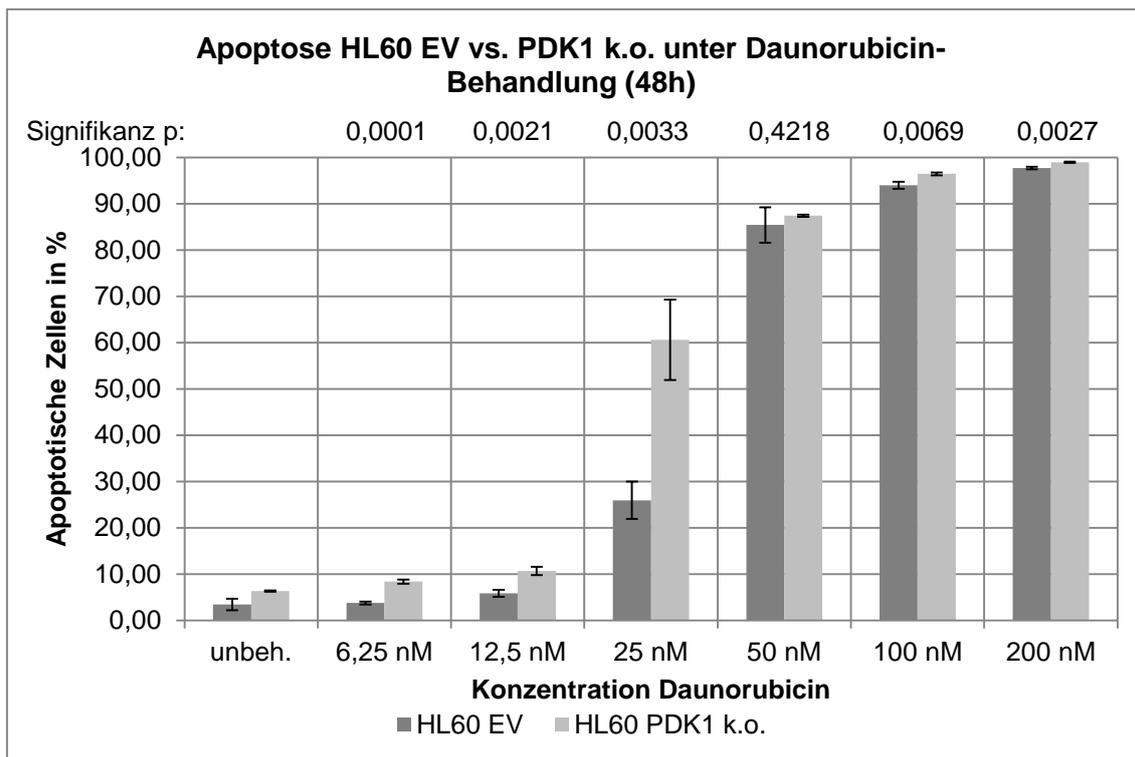


Abbildung 3.22: Apoptose HL 60 EV vs. PDK1 k.o. unter Daunorubicinbehandlung (48h)

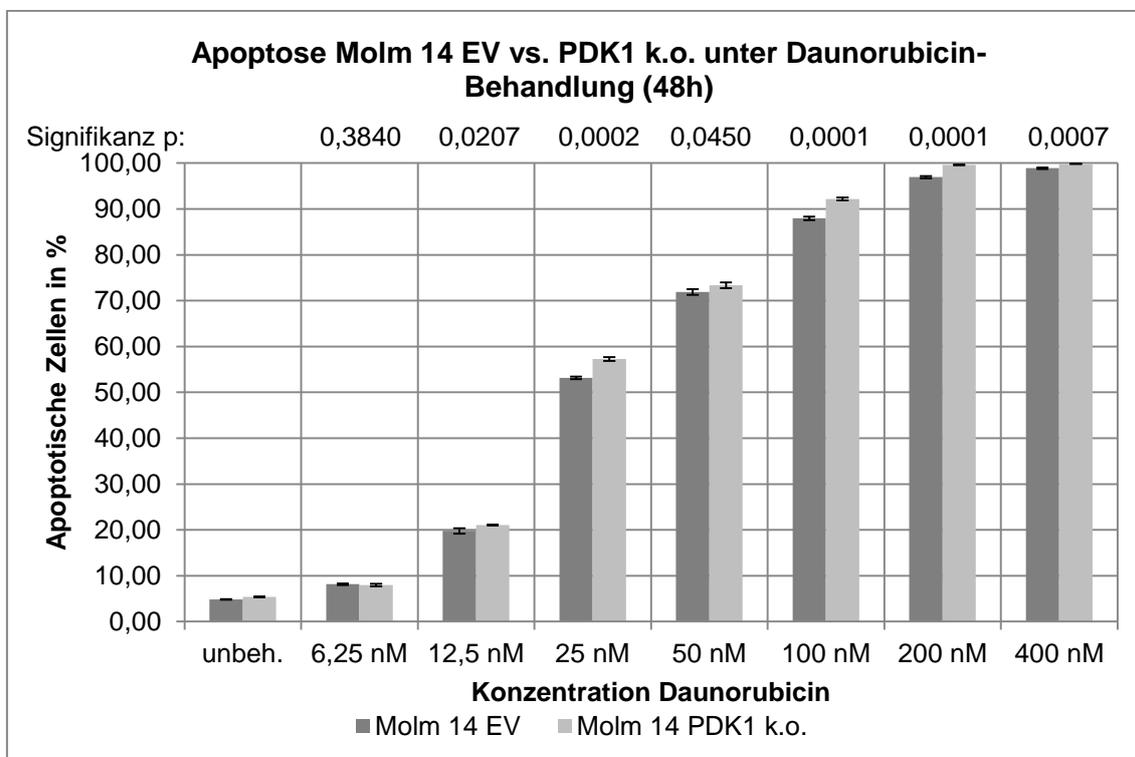


Abbildung 3.23: Apoptose Molm 14 EV vs PDK1 k.o. unter Daunorubicinbehandlung (48h)

3. Ergebnisse

Im Gegensatz dazu zeigte die Molm 14 PDK1 k.o-Zelllinie nur ein gering verstärkte Vulnerabilität gegenüber Daunorubicin mit einer maximalen Differenz von 4,2 % bei 25 nM im Vergleich zu ihrer empty-vector-Kontrolle (siehe Abbildung 3.23). Der Einfluss des PDK1 knock-outs auf das Apoptoseverhalten ist bei den Molm 14 geringer ausgeprägt als bei der Proliferationsanalyse unter denselben Daunorubicinkonzentrationen (Abbildung 3.9, Seite 39).

Die folgende Tabelle gibt nochmals einen Überblick über die Differenzen des Anteils apoptotischer Zellen bei den Daunorubicinkonzentrationen 12,5 nM, 25 nM und 50 nM:

Tabelle 3.2: Übersicht MW-Differenz PDK1 k.o und EV

Zelllinie	Differenz MW PDK1 k.o - MW EV		
	12,5 nM Daunorubicin	25 nM Daunorubicin	50 nM Daunorubicin
Jurkat	18,5 %	39,2 %	21,9 %
K562	1,5 %	17,5 %	29,5 %
HL 60	4,8 %	34,7 %	2,0 %
Molm 14	1,3 %	4,1 %	1,5 %

Die gewonnenen Ergebnisse zeigen somit, dass die PDK1 knock-out-Zellmodelle sensitiver auf eine Apoptoseinduktion durch Daunorubicin reagieren, jedoch abhängig von der Zelllinie in unterschiedlichem Ausmaß.

3.8 Apoptose unter Behandlung mit spezifischen Inhibitoren

Um die Unterschiede im Apoptoseverhalten der Zelllinien weiter zu spezifizieren, wurde die Apoptoseinduktion unter Behandlung mit Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI) untersucht.

Der TKI Sunitinib zeigte auf die Zelllinie Molm 14 einen deutlichen proapoptotischen Effekt (siehe Abbildung 3.24), jedoch waren zwischen der k.o.-Zelllinie und ihrer Kontrolle wie auch zuvor unter Daunorubicinbehandlung nur sehr geringe Unterschiede nachzuweisen, welche größtenteils im Rahmen des möglichen Fehlers lagen.

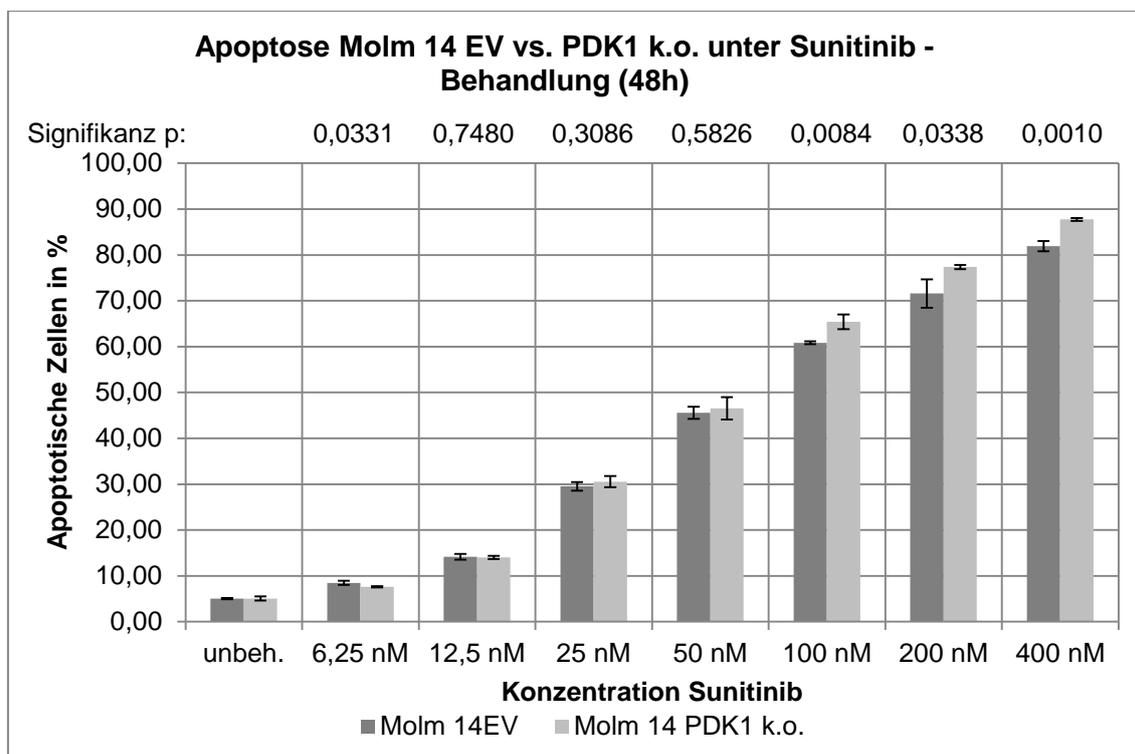


Abbildung 3.24: Apoptose Molm 14 EV vs PDK1 k.o unter Sunitinib-Behandlung (48 h)

Aufgrund der BCR-ABL-Mutation der K562-Zellen wurde für die Behandlung dieser Zelllinie der spezifische BCR-ABL-Inhibitor Imatinib gewählt.

3. Ergebnisse

Hier zeigten sich ebenfalls tendenzielle Proliferationsunterschiede zwischen K562 PDK1 k.o. und K562 EV von bis zu 15,6 % bei einer Konzentration von 1 μM .

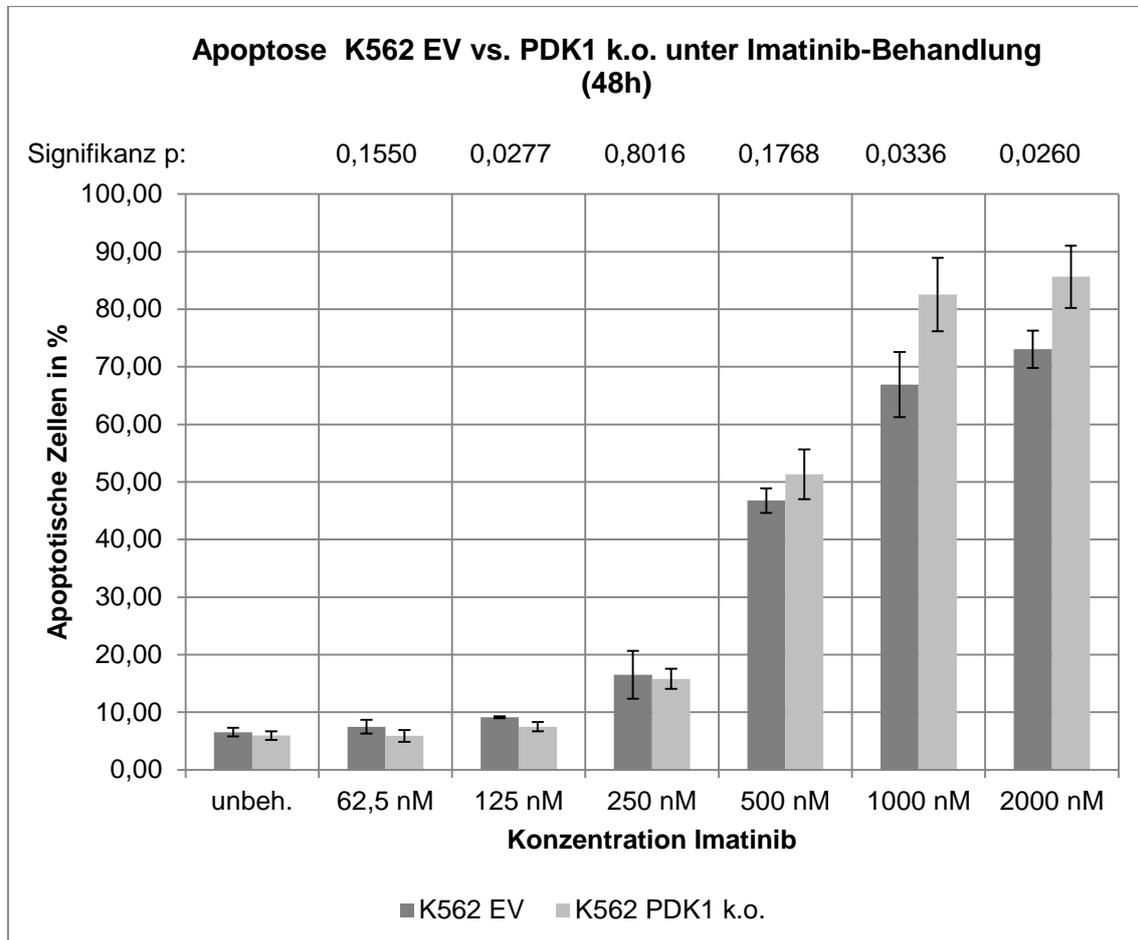


Abbildung 3.25: Apoptose K562 EV vs PDK1 k.o. unter Imatinib-Behandlung (48 h)

Zusammenfassend ist, wie für die Antiproliferation in Kapitel 3.5 gezeigt, auch der proapoptotische Effekt der TKI offensichtlich nur additiv von PDK1 abhängig.

3.9 Phosphoproteomanalyse

Um den Einfluss des PDK1-knock-outs auf die globale PDK1-Signaltransduktion zu evaluieren, wurde eine Phosphoproteomanalyse am Molm 14 EV- und PDK1 k.o.-Zellmodell durchgeführt.

Dabei wurden 4711 unterschiedlich phosphorylierte Proteine detektiert, wovon 378 bei einem p-Wert von $< 0,05$ statistisch signifikant waren. In der folgenden Tabelle sind ausschließlich diejenigen Proteine aufgeführt, deren Phosphorylierung in der Molm 14 PDK1 k.o.-Linie herunterreguliert war.

Bei der anschließenden Stringanalyse (Abbildung 3.26) zeigte sich eine gehäufte Dysregulation von Proteinen, welche an Prozessen wie Zellzyklusregulation (z. B. RB1), Transkription und Translation beteiligt sind.

3.9.1 Alterationen des Phosphoproteoms bei PDK1 k.o

Tabelle 3.3: Downregulation der Phosphorylierung bei Molm 14 PDK1 k.o. im Vergleich zu Molm 14 EV

Signifikanzniveau (p-Wert)	Protein	Gen
1,51E-95	Trifunctional purine biosynthetic protein adenosine-3;Phosphoribosylamine--glycine ligase;Phosphoribosylformylglycinamide cyclo-ligase;Phosphoribosylglycinamide formyltransferase	GART
4,39E-27	Volume-regulated anion channel subunit LRRC8B	LRRC8B
1,51E-15	DNA primase;DNA primase small subunit	PRIM1
2,30E-18	AT-rich interactive domain-containing protein 1A	ARID1A
6,58E-15	Scaffold attachment factor B2	SAFB2
7,64E-12	Protein aurora borealis	BORA
7,64E-12	Protein aurora borealis	BORA
1,21E-10	Zinc finger Ran-binding domain-containing protein 2	ZRANB2
6,37E-07	Oxysterol-binding protein-related protein 11	OSBPL11
4,19E-08	A-kinase anchor protein 11	AKAP11
8,77E-07	Nuclear factor 1 C-type	NFIC
4,09E-07	Transcriptional repressor p66-alpha	GATAD2A

3. Ergebnisse

Signifikanzniveau (p-Wert)	Protein	Gen
0,000135324	TBC1 domain family member 4	TBC1D4
1,47E-05	Chromosome alignment-maintaining phosphoprotein 1	CHAMP1
1,04E-05	Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK	AHNAK
8,16E-06	Calcium-regulated heat stable protein 1	CARHSP1
2,81E-05	Heat shock protein beta-1	HSPB1
0,00017578	Clathrin light chain A	CLTA
4,77E-05	BTB/POZ domain-containing protein KCTD12	KCTD12
0,000144407	Ubiquitin-associated protein 2-like	UBAP2L
6,16E-05	GEM-interacting protein	GMIP
0,002102902	TBC1 domain family member 4	TBC1D4
0,000151135	Nuclear ubiquitous casein and cyclin-dependent kinase substrate 1	NUCKS1
0,000160418	Retinoblastoma-associated protein	RB1
0,002544787	Formin-like protein 1	FMNL1
0,000291087	Protein lunapark	LNP
0,002590976	BTB/POZ domain-containing protein KCTD12	KCTD12
0,000390827	Drebrin-like protein	DBNL
0,000164687	Fos-related antigen 2	FOSL2
0,000291982	Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK	AHNAK
0,000280562	Mast cell-expressed membrane protein 1	MCEMP1
0,000535493	La-related protein 7	LARP7
0,004920085	Small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein alpha	SGTA
0,004920085	Small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein alpha	SGTA
0,005635931	Serine/arginine repetitive matrix protein 2	SRRM2
0,000476616	mRNA-decapping enzyme 1A	DCP1A
0,000476616	mRNA-decapping enzyme 1A	DCP1A
0,001186863	N-arachidonyl glycine receptor	GPR18
0,001186863	N-arachidonyl glycine receptor	GPR18
0,00118959	Uncharacterized protein C11orf84	C11orf84
0,000624344	Single-stranded DNA-binding protein 3	SSBP3
0,007255629	Ankyrin repeat domain-containing protein 17	ANKRD17
0,000736171	Nuclear pore complex protein Nup214	NUP214
0,001168953	Negative elongation factor B	NELFB
0,001011526	E3 ubiquitin-protein ligase MYCBP2	MYCBP2

3. Ergebnisse

Signifikanzniveau (p-Wert)	Protein	Gen
0,001011526	E3 ubiquitin-protein ligase MYCBP2	MYCBP2
0,004157943	Chromosome alignment-maintaining phosphoprotein 1	CHAMP1
0,011190465	Structural maintenance of chromosomes protein 4;Structural maintenance of chromosomes protein	SMC4
0,004663353	Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK	AHNAK
0,002528879	Inner centromere protein	INCENP
0,003152249	Palmitoyltransferase ZDHHC5;Palmitoyltransferase	ZDHHC5
0,003152249	Palmitoyltransferase ZDHHC5;Palmitoyltransferase	ZDHHC5
0,00157403	Ankyrin repeat domain-containing protein 17	ANKRD17
0,002912424	Ankyrin repeat domain-containing protein 17	ANKRD17
0,003366665	G patch domain-containing protein 8	GPATCH8
0,003099825	KAT8 regulatory NSL complex subunit 3	KANSL3
0,001698888	PML-RARA-regulated adapter molecule 1	PRAM1
0,003326457	Minor histocompatibility protein HA-1;Minor histocompatibility antigen HA-1	HMHA1
0,002219936	Serine/arginine repetitive matrix protein 2	SRRM2
0,00291809	Nuclear receptor corepressor 2	NCOR2
0,00291809	Nuclear receptor corepressor 2	NCOR2
0,015896538	Serine/arginine repetitive matrix protein 1	SRRM1
0,003086455	Transcription factor ETV6	ETV6
0,018163033	Transcription factor ETV6	ETV6
0,018243237	Cyclin-dependent kinase 12	CDK12
0,018243237	Cyclin-dependent kinase 12	CDK12
0,01709285	TBC1 domain family member 4	TBC1D4
0,003944443	Serine/arginine repetitive matrix protein 1	SRRM1
0,0045861	La-related protein 7	LARP7
0,004023121	Transcription factor ETV6	ETV6
0,010423979	WD repeat and HMG-box DNA-binding protein 1	WDHD1
0,007476119	Gephyrin;Molybdopterin adenylyltransferase;Molybdopterin molybdenumtransferase	GPHN
0,007476119	Gephyrin;Molybdopterin adenylyltransferase;Molybdopterin molybdenumtransferase	GPHN

3. Ergebnisse

Signifikanzniveau (p-Wert)	Protein	Gen
0,004641082	KAT8 regulatory NSL complex subunit 3	KANSL3
0,00777961	G patch domain-containing protein 8	GPATCH8
0,005783404	Serine/arginine repetitive matrix protein 1	SRRM1
0,025363827	Protein ELYS	AHCTF1
0,005301424	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 12	PTPN12
0,026836721	Tensin-3	TNS3
0,007335407	Serine/arginine repetitive matrix protein 1	SRRM1
0,032521891	Nuclear pore complex protein Nup214	NUP214
0,017266207	Formin-like protein 1	FMNL1
0,006602134	DIS3-like exonuclease 2	DIS3L2
0,010125487	Ran-binding protein 10	RANBP10
0,01785935	Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK	AHNAK
0,010393123	Small integral membrane protein 1	SMIM1
0,010393123	Small integral membrane protein 1	SMIM1
0,008886059	Chromosome alignment-maintaining phosphoprotein 1	CHAMP1
0,018497568	Hematopoietic lineage cell-specific protein	HCLS1
0,010791619	Nuclear-interacting partner of ALK	ZC3HC1
0,010791619	Nuclear-interacting partner of ALK	ZC3HC1
0,012450696	E3 ubiquitin-protein ligase HUWE1	HUWE1
0,012510886	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1	EIF4G1
0,008784765	Rho GTPase-activating protein 17	ARHGAP17
0,03225644	Ras GTPase-activating protein nGAP	RASAL2
0,03225644	Ras GTPase-activating protein nGAP	RASAL2
0,012953678	EH domain-binding protein 1	EHBP1
0,020648354	Enhancer of mRNA-decapping protein 4	EDC4
0,011590576	Chromosome alignment-maintaining phosphoprotein 1	CHAMP1
0,013954068	Atherin	SAMD1
0,012308796	Zinc finger protein ubi-d4	DPF2
0,011958453	Zinc finger CCCH domain-containing protein 13	ZC3H13
0,011958453	Zinc finger CCCH domain-containing protein 13	ZC3H13
0,010593136	DNA polymerase alpha subunit B	POLA2
0,016768865	Glucocorticoid-induced transcript 1 protein	GLCCI1
0,040527374	CLIP-associating protein 1	CLASP1

3. Ergebnisse

Signifikanzniveau (p-Wert)	Protein	Gen
0,014016622	TBC1 domain family member 4	TBC1D4
0,041351252	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 8	CHD8
0,041351252	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 8	CHD8
0,042067272	Syntaxin-7	STX7
0,042067272	Syntaxin-7	STX7
0,015260946	Splicing factor, arginine/serine-rich 15	SCAF4
0,017063882	Uncharacterized protein C11orf84	C11orf84
0,017063882	Uncharacterized protein C11orf84	C11orf84
0,016006618	Splicing factor 1	SF1
0,016006618	Splicing factor 1	SF1
0,034559498	G-protein-signaling modulator 3	GPSM3
0,034559498	G-protein-signaling modulator 3	GPSM3
0,048241448	Splicing factor, arginine/serine-rich 19	SCAF1
0,017021218	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 1	MED1
0,049533418	Lymphoid-restricted membrane protein;Processed lymphoid-restricted membrane protein	LRMP
0,018916332	Chromosome alignment-maintaining phosphoprotein 1	CHAMP1
0,017581369	Serine/arginine repetitive matrix protein 1	SRRM1
0,023503545	Protein NDRG1	NDRG1
0,017582782	EH domain-binding protein 1	EHBP1
0,017582782	EH domain-binding protein 1	EHBP1
0,018527942	Histone deacetylase 7	HDAC7
0,041647206	Structural maintenance of chromosomes protein 4;Structural maintenance of chromosomes protein	SMC4
0,041647206	Structural maintenance of chromosomes protein 4;Structural maintenance of chromosomes protein	SMC4
0,022452458	Rab-like protein 6	RABL6
0,022452458	Rab-like protein 6	RABL6
0,025788137	Sodium/hydrogen exchanger;Sodium/hydrogen exchanger 1	SLC9A1
0,043099593	Ubiquitin-associated protein 2-like	UBAP2L
0,026618416	MKL/myocardin-like protein 1	MKL1
0,026999377	RNA-binding motif protein, X chromosome;RNA-binding motif protein, X chromosome, N-terminally processed	RBMX

3. Ergebnisse

Signifikanzniveau (p-Wert)	Protein	Gen
0,045850977	Protein PML	PML
0,045850977	Protein PML	PML
0,024062708	CapZ-interacting protein	RCSD1
0,026209038	Splicing factor, arginine/serine-rich 19	SCAF1
0,026209038	Splicing factor, arginine/serine-rich 19	SCAF1
0,029662558	Headcase protein homolog	HECA
0,029662558	Headcase protein homolog	HECA
0,029662558	Headcase protein homolog	HECA
0,028287051	TBC1 domain family member 4	TBC1D4
0,024180095	Intersectin-2	ITSN2
0,024180095	Intersectin-2	ITSN2
0,034578861	MOB kinase activator 1A;MOB kinase activator 1B	MOB1A;MOB1B
0,035195506	ETS translocation variant 3	ETV3
0,02811648	Serine/arginine repetitive matrix protein 2	SRRM2
0,03255358	Gamma-adducin	ADD3
0,032341102	Calcium homeostasis endoplasmic reticulum protein	CHERP
0,033345485	Calcium homeostasis endoplasmic reticulum protein	CHERP
0,033345485	Calcium homeostasis endoplasmic reticulum protein	CHERP
0,033345485	Calcium homeostasis endoplasmic reticulum protein	CHERP
0,035244362	La-related protein 1	LARP1
0,030687528	MAP/microtubule affinity-regulating kinase 3	MARK3
0,036841752	La-related protein 4B	LARP4B
0,032352114	Putative 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 2;3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1	PDPK1;PDPK2, PDK1
0,043224917	Uncharacterized protein C7orf50	C7orf50
0,037174015	Sin3 histone deacetylase corepressor complex component SDS3	SUDS3
0,042490762	Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK	AHNAK
0,041159269	ATP-binding cassette sub-family F member 1	ABCF1
0,048265847	Myocyte-specific enhancer factor 2D	MEF2D
0,046763718	Exportin-6	XPO6
0,046427236	Chromosome alignment-maintaining phosphoprotein 1	CHAMP1

3. Ergebnisse

Signifikanzniveau (p-Wert)	Protein	Gen
0,046427236	Chromosome alignment-maintaining phosphoprotein 1	CHAMP1
0,043420697	ATPase family AAA domain-containing protein 5	ATAD5
0,048339779	Histone deacetylase 1	HDAC1
0,049429844	SNW domain-containing protein 1	SNW1
0,049429844	SNW domain-containing protein 1	SNW1
0,046193742	Mini-chromosome maintenance complex-binding protein	MCMBP

3. Ergebnisse

3.9.2 Stringanalyse

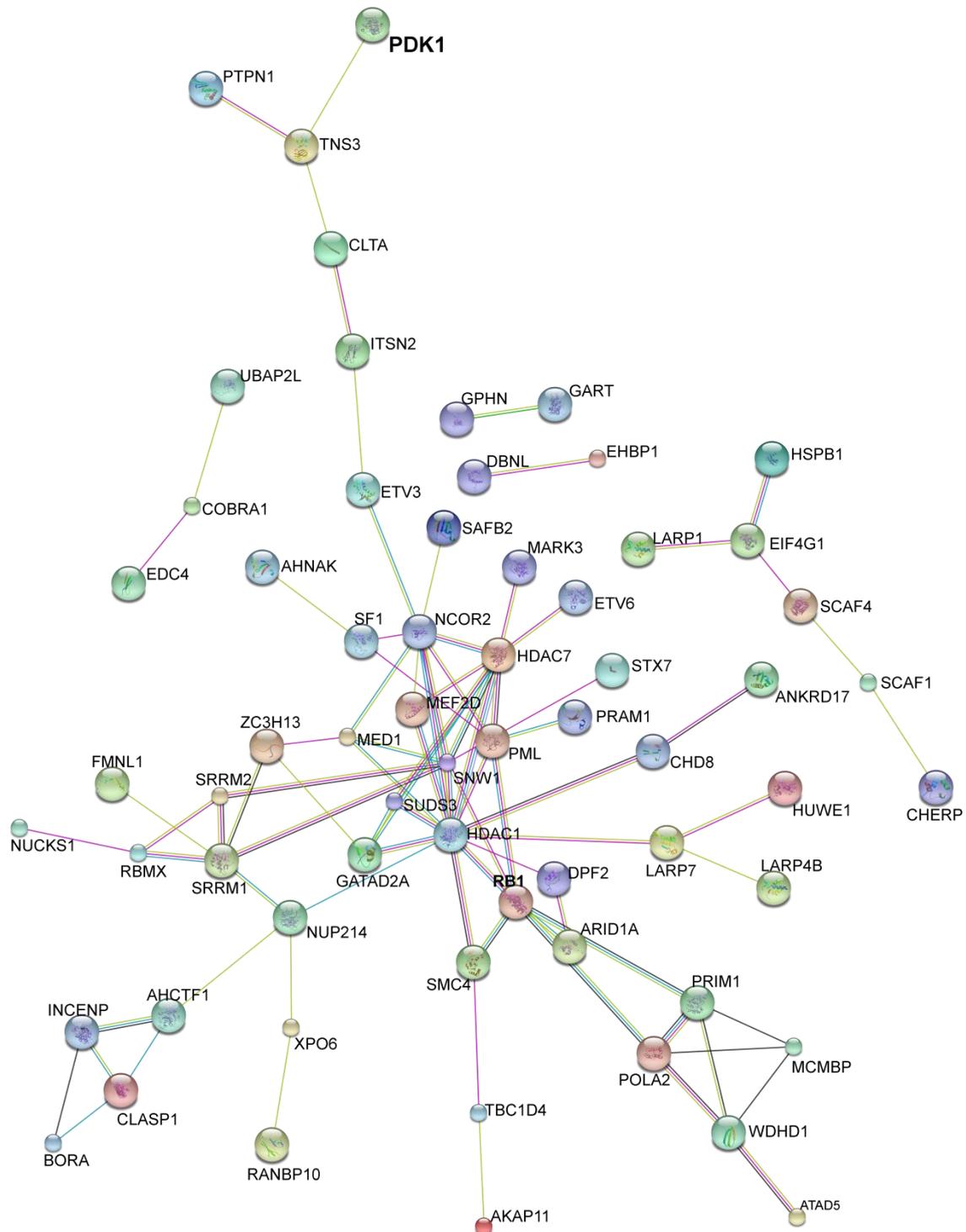


Abbildung 3.26: Stringanalyse der bei Molm 14 PDK1 k.o. herunterregulierten Proteinphosphorylierung (Software von *string-db.org*)

Anm. zu Abbildung 3.26: Die Farbe der einzelnen Punkte ist ohne Bedeutung. Große Punkte repräsentieren Proteine bekannter 3D-Struktur, kleine Punkte Proteine mit bisher unbekannter 3D-Struktur

3.9.3 Verifikation Phosphoproteomanalyse mittels pRB1-Nachweis

Die Phosphoproteomanalyse der Zelllinie Molm 14 (Kapitel 3.9) hatte unter anderem nach PDK1 knock-out eine reduzierte Phosphorylierung des Retinoblastom-Proteins (RB1) ergeben. Um dieses Ergebnis zu verifizieren und die Übertragbarkeit auf andere leukämische Zellen zu überprüfen, wurde ein Westernblot (Abbildung 3.27) mittels eines phospho-RB-Antikörpers durchgeführt. Hierbei zeigte sich für Molm 14 EV eine supprimierte Phosphorylierung an RB1 im Gegensatz zur empty-vector-Kontrolle, was die Ergebnisse der Phosphoproteomanalyse bestätigt. Dies ließ sich für die Zelllinie K562 reproduzieren (Abbildung 3.27).

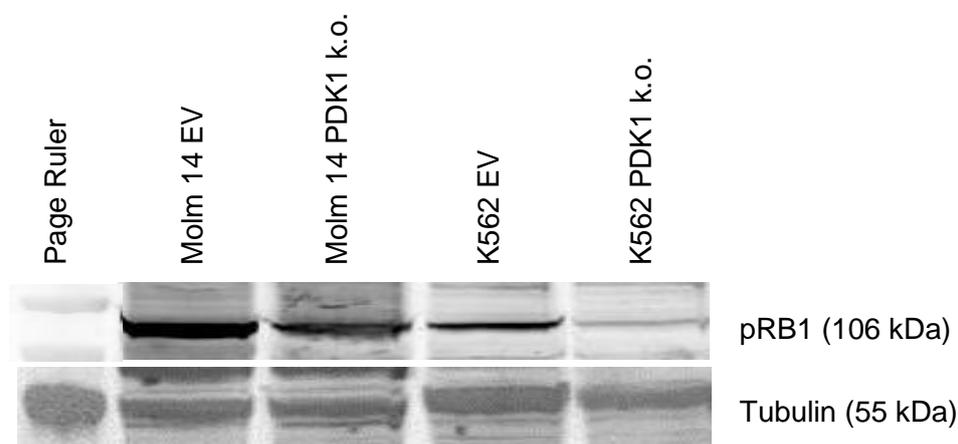


Abbildung 3.27: Analyse des RB-Phosphorylierungsstatus in Molm 14 und K562

Die Ergebnisse der Westernblots bestätigen die Phosphoproteomanalyse. Die Vielzahl der unterschiedlich regulierten Phosphosites bei Supprimierung von PDK1 zeigt die Komplexität der downstream liegenden Signalwege und stellt die Grundlage für weiterführende Analysen dar.

4. Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Untersuchung des Einflusses von PDK1 auf akute Leukämien sowohl vom Proliferationsverhalten als auch in der Analyse des Potentials einer PDK1-Suppression im Rahmen der Therapie. Hierfür wurden mittels lentiviraler Transduktion die leukämische Zelllinien Jurkat, K562, Molm 14 und HL60 PDK1-supprimiert und in den durchgeführten Versuchen mit ihrer jeweiligen empty-vector-Kontrolle verglichen.

Die Proliferationsanalyse der unbehandelten PDK1 k.o.- und EV-Zelllinien zeigte über 72 h eine Reduktion der Proliferation im Falle einer Suppression von PDK1 um den Faktor 1,7 – 2,1 im Vergleich zur Kontrolle (Kapitel 3.3). PDK1 scheint somit zur Proliferation von leukämischen Zellen beizutragen. Dies deckt sich mit Beobachtungen an anderen Tumorentitäten wie beispielsweise dem Mamma-Karzinom [62] oder dem Colon-Karzinom [63].

Zudem konnte eine Assoziation zwischen einer hohen (PDK1-vermittelten) pAKT Thr308-Phosphorylierung mit dem Vorliegen einer Hochrisiko-AML gezeigt werden, wobei keine genomischen Mutationen von beispielsweise AKT1 oder PTEN gefunden werden konnten, welche hierfür ursächlich sein könnten. Ebenfalls konnte keine Alteration der Phosphorylierung von PDK1 festgestellt werden, jedoch wurden Veränderungen der Expression von PDK1 nicht untersucht [21].

Bei der Analyse des Zellzyklus (Kapitel 3.5) anhand der Bestimmung des Chromatingehalts mittels Durchflusszytometrie zeigten sich besonders nach 12 und 24 h Unterschiede im Zellzyklusverlauf zwischen PDK k.o. und EV, jedoch ließ sich keine allen Zelllinien gemeinsame Veränderung nachweisen.

Der Einfluss der PDK1-Expression auf die Proliferation war auch unter definierten Konzentrationen von Daunorubicin erkennbar. Die PDK1-defizienten Zellen sprachen sensitiver auf das Anthrazyklin an als die EV-Zelllinie, was sich in geringeren Wachstumsraten äußerte (Kapitel 3.4).

Wachstumsfaktoren wie beispielsweise IGF1, FL3-Ligand oder PDGF aktivieren über die entsprechenden Tyrosinkinasen den PI3K/AKT-Signalweg und führen so zu einer Phosphorylierung und damit Aktivierung von AKT. Dies wiederum hat eine Steigerung der Transkription proliferationssteigernder und antiapoptotischer Gene zur Folge. Mutationen dieser Tyrosinkinasen, wie z. B. FLT3, welche zu einer erhöhten Aktivität oder einer Autoaktivität führen, sind ein häufiges Phänomen bei akuten Leukämien [11]. Sie stellen das Target spezifischer Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI) dar mit dem Ziel, die downstream gelegenen Signalwege zu unterbrechen.

Zur Klärung der Frage, ob die Suppression von PDK1 einen additiven Effekt auf die Therapie mit TKI ausübt, wurden die transduzierten Zelllinien mit Sunitinib oder Imatinib behandelt und auf Unterschiede im Proliferationsverhalten hin untersucht. Wie in Kapitel 1.2 erläutert, konnte gezeigt werden, dass durch Tyrosinkinaseinhibitoren besonders die Phosphorylierung an Ser473 von AKT vermindert wird, die PDK1-vermittelte Phosphorylierung an Thr308 bestehen und AKT somit aktiviert bleibt [20]. Durch das PDK1 knock-out und die gleichzeitige Behandlung mit TKI sollte es somit zu einer vollständigen Inaktivierung des AKT-Signalwegs mit konsekutiver Proliferationshemmung kommen.

Überraschenderweise ließ sich nur eine geringe Reduktion der Proliferation von PDK1-supprimierten Zelllinien unter der Behandlung mit Tyrosinkinaseinhibitoren feststellen, welche in Abhängigkeit der vorliegenden Mutationen gewählt wurden. Hierbei zeigte sich für die PDK1 knock-out-Zellen eine verminderte Proliferationsrate von maximal 11,15 – 17,54 % in Abhängigkeit von der Zelllinie (Kapitel 3.5).

Zur weiteren Spezifizierung der Rolle von PDK1 in leukämischen Zellen wurde der Einfluss des PDK1-knock-outs auf die Apoptose analysiert.

Die Untersuchung des Apoptoseverhaltens mit denselben Daunorubicinkonzentrationen wie bei den Proliferationsversuchen zeigte, dass PDK1 in vitro einen antiproliferativen Effekt ausübt.

Unter 48-stündiger Behandlung mit Daunorubicin wiesen die PDK1 k.o.-Zellen signifikant höhere Apoptoseraten auf als die entsprechende EV-Kontrolle. Als Ausnahme stellte sich die Zelllinie Molm 14 heraus, welche nur geringe Unterschiede im Ansprechen der knock-out- und empty-vector-Zellen zeigte.

Die erhobenen Daten weisen folglich *in vitro* für PDK1 sowohl einen proproliferativen als auch einen antiapoptotischen Effekt in leukämischen Zellen nach.

Zur Klärung der Fragestellung, ob eine Inhibition von PDK1 über den PI3K-AKT-Signalweg zu den beobachteten Proliferations- und Apoptosedifferenzen (verglichen mit der PDK1-exprimierenden Kontrolle) führt, wurde mittels Western-Blot der Phosphorylierungsstatus von AKT an den Stellen Ser473 und Thr308 untersucht. Hierbei zeigte sich für die EV-Zelllinie eine Phosphorylierung von AKT sowohl an Ser473 als auch an Thr308 und somit eine Aktivierung des downstream von AKT gelegenen Signalwegs, welcher multiple Prozesse wie Proliferation und Zellzyklus steuert. Folglich scheint eine verstärkte Expression von PDK1 zu einer persistierenden Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs zu führen. Dies wiederum würde die erhöhte Resistenz der PDK1-exprimierenden Zellen gegenüber Zytostatika und die gesteigerte Proliferationsfähigkeit erklären.

Hypothetisch kann vermutet werden, dass im wachstumsfaktorreichen Milieu des Knochenmarks die unter anderem durch Zytokine getriggerte AKT-Signalkaskade selbst unter zytotoxischer Therapie nicht vollständig inaktiviert wird und so zu der (im Knochenmark typischerweise besonders ausgeprägten) Leukämieresistenz beiträgt. Dies muss in künftigen Untersuchungen adressiert werden.

Die insgesamt erhöhte Suszeptibilität der PDK1-defizienten Zellen auf Zytostatika legt den Schluss nahe, dass umgekehrt eine verstärkte Expression von PDK1 zu einer Abschwächung der therapeutischen Wirkung des Anthrazyklins Daunorubicin führen und damit einen möglichen Resistenzmechanismus besonders gegenüber Zytostatika wie Danorubicin darstellen kann.

Die Suppression des zytoprotektiven Effekts von PDK1 stellt somit einen möglichen Ansatz zur Verbesserung des Therapieansprechens bei Patienten mit einer akuten Leukämie dar. Gestützt wird diese Hypothese durch die Arbeit von Zabkiewicz et al. [64], in der gezeigt werden konnte, dass die Kombination des PDK1-Inhibitors BX-795 mit Cytarabin einen synergistischen Effekt auf die Apoptoseinduktion leukämischer, PDK1-überexprimierender Zellen aufweist.

Die Ursache für den im Vergleich zu den anderen Zelllinien reduzierten Einfluss von PDK1 auf die Apoptoseinduktion der Molm 14-Zellen ist noch unklar und bedarf weiterer Forschung, um eventuelle Resistenzmechanismen gegen eine Inhibition von PDK1 zu identifizieren. Auch ein Verlust der PDK1-Defizienz im Verlauf ist als Grund für den fehlenden Einfluss von PDK1 auf das Apoptoseverhalten dieser Zelllinie nicht sicher auszuschließen.

Der zwischen den einzelnen Zelllinien stark variierende Einfluss des PDK1-knock-outs sowie der gezeigte Nachweis einer erhöhten Suszeptibilität der Zelllinie Jurkat nach PDK1-knock-out gegenüber Zytostatika trotz fehlender Suppression von AKT bei PDK1-Defizienz im Western-Blot (siehe Abbildung 3.3) lässt vermuten, dass es alternative PDK1-vermittelte Signalwege gibt. PDK1 scheint nicht nur auf die Leukämie-unterhaltenden, durch mutierte TK getriggerte AKT-Signaltransduktion Einfluss zu nehmen, sondern auch einen zusätzlichen Trigger durch unabhängige Faktoren wie andere Wachstumsfaktoren auf die AKT-Signalkaskade darzustellen und so Proliferationsverhalten und Aggressivität der Leukämie zu beeinflussen.

Zur Untersuchung des Einflusses einer PDK1-Suppression in Bezug auf das gesamte Proteom auch unabhängig von AKT, wie dies die Ergebnisse der Jurkat-Zelllinie nahelegen, wurde eine Phosphoproteomanalyse der Zelllinie Molm 14 durchgeführt. Verifiziert wurden die Ergebnisse der Phosphoproteomanalyse mittels Western-Blot.

Die Ergebnisse der Phosphoproteomanalyse (siehe Kapitel 3.9) zeigten 378 statistisch signifikante Phosphorylierungsunterschiede zwischen Molm 14 PDK

k.o. und EV, darunter der bekannte Tumorsuppressor Retinoblastom-Protein (RB1) sowie eine gehäufte Dysregulation von Zellzyklusregulatoren.

Das Retinoblastom-Protein supprimiert die DNA-Replikation der Zelle, indem es über die Bindung an den Transkriptionsfaktor E2F die Progression aus der G1-Phase in die S-Phase des Zellzyklus verhindert. Somit übt RB1 einen anti-proliferativen Effekt auf die Zelle aus.

RB wird durch Phosphorylierung bzw. Hyperphosphorylierung inaktiviert und ist in dieser Konfiguration nicht in der Lage, an den Transkriptionsfaktor E2F zu binden, wodurch die Zelle aus der G1-Phase in die S-Phase eintreten und sich schlussendlich teilen kann. In den langsamer proliferierenden PDK1 k.o.-Zelllinien war pRB1 im Western-Blot (Kapitel 3.9.3) in geringerem Ausmaß nachweisbar, was die Ergebnisse der Phosphoproteomanalyse verifiziert und die Schlussfolgerung nahelegt, dass PDK1 zu einer verstärkten Phosphorylierung und damit Inaktivierung von RB1 und konsekutiv zu einer Proliferationssteigerung führt. Dies könnte erklären, wieso der Effekt von Zytostatika wie Daunorubicin in größerem Ausmaß von PDK1 abhängt als im Vergleich zu den getesteten Tyrosinkinaseinhibitoren.

Zusammengefasst zeigt sich, dass die PDK1-Expression in leukämischen Zellen proliferationssteigernd wirkt und der Zelle auch unter Therapie mit Daunorubicin und tendenziell auch unter Einsatz von Tyrosinkinaseinhibitoren einen Überlebensvorteil verschafft. Die effektive Suppression von PDK1 scheint durch einen komplexen Mechanismus zu einer Reduktion der Proliferationsfähigkeit und zur Verbesserung des Therapieansprechens, besonders unter Daunorubicin zu führen. Es konnte gezeigt werden, dass bei fehlender Expression von PDK1 die Phosphorylierung von Thr308 an AKT und konsekutiv die Aktivität des downstream gelegenen Pathways supprimiert wird, eine Behandlung mit Tyrosinkinaseinhibitoren jedoch nicht in jedem Fall zu der erwarteten Steigerung der Apoptoseinduktion führt.

Die Phosphoproteomanalyse zeigte, dass ein PDK1-knock-out zu einer weitaus komplexeren Alteration des Phosphoproteoms als durch direkte Interaktion mit AKT führt. Hier sind künftig detaillierte Untersuchungen notwendig.

Im klinischen Setting bietet sich die Möglichkeit zu untersuchen, ob bei einer Kombination von PDK1-Inhibitoren mit den klassischen Therapieoptionen das Therapieansprechen verbessert werden oder die Dosis von Substanzen wie Daunorubicin reduziert werden kann. Dies könnte zu einer Verbesserung der Therapieverträglichkeit und einer Risikoreduktion sekundärer maligner Erkrankungen (durch mutagene Chemotherapeutika) beitragen. Ein weiterer Forschungsansatz liegt in der Untersuchung, welche Rolle Tyrosinkinasemutationen und ihre Inhibitoren auf den Effekt einer PDK1-Suppression ausüben und in welcher Form dies in vivo die Addition einer PDK1-Inhibition zu etablierten Therapieregimen beeinflussen kann.

5. Zusammenfassung

Die akute Leukämie ist auch heute noch eine Erkrankung, bei der trotz vielfältiger Therapieoptionen die Prognose der Patienten deutlich eingeschränkt ist. Auch bei initial meist gutem Ansprechverhalten kommt es im Verlauf auch unter individuell angepassten und spezifischen Therapiemöglichkeiten häufig zum Rezidiv der Leukämie. Die oftmals kurze Dauer der Remission legt die Vermutung nahe, dass unter Therapie Blasten persistieren, von denen das Rezidiv aufgeht.

Ein möglicher protektiver Mechanismus gegenüber den zur Therapie genutzten Substanzen stellt der PI3K/AKT-Signalweg dar, der Prozesse wie Zellproliferation, Apoptose und Tumorgenese beeinflusst. Es zeigt sich gehäuft eine verstärkte Aktivierung von AKT, welche unter anderem durch PDK1 vermittelt wird, jedoch ohne die entsprechenden somatischen Mutationen.

Zur Untersuchung der Rolle von PDK1 in akuten Leukämien im Rahmen dieser Arbeit wurden leukämische Zellmodelle (Molm 14, Jurkat, K562 und HL60) genutzt, welche mittels lentiviraler Transfektion PDK1-supprimiert und mit ihrer empty-vector-Kontrolle (EV) verglichen wurden.

Bei der Analyse des downstream gelegenen Phosphorylierungsstatus von AKT zeigte sich eine konsekutive Inhibition von pAKT Thr 308 und pAKT Ser473 und somit eine Inhibition von AKT, welches für die volle Aktivität an den genannten Phosphosites phosphoryliert sein muss.

Die Untersuchung des Einflusses eines PDK1-knock-outs auf die Proliferationsfähigkeit der leukämischen Zellmodelle zeigte eine reduzierte zelluläre Proliferationsrate der k.o.-Zellen im Vergleich zur Kontrolle.

Unter Behandlung mit Daunorubicin wiesen die PDK1 k.o. eine geringere Proliferationsrate und damit eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber Daunorubicin auf. Dies ließ sich in geringerem Ausmaß auch die Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI) Imatinib und Sunitinib zeigen.

Die PDK1-vermittelte Signaltransduktion scheint somit zur zellulären Proliferationssteigerung und damit Aggressivität der Leukämiezellen beizutragen.

PDK1-defiziente Zellen reagierten ebenfalls sensitiver auf eine Apoptoseinduktion durch Daunorubicin, der proapoptotische Effekt etablierter Tyrosinkinaseinhibitoren wie Imatinib und Sunitinib war jedoch nicht wesentlich von PDK1 abhängig.

Eine Analyse des Phosphoproteoms zeigte eine gehäufte Dysregulation von Proteinen, welche an Zellzyklusregulation (z. B. RB1), Transkription und Translation beteiligt sind. Die Vielzahl der unterschiedlich regulierten Phosphosites bei einer Alteration der PDK1-Expression zeigt die Komplexität der downstream liegenden Signalwege.

Zusammenfassend kann die Hypothese aufgestellt werden, dass PDK1 weniger auf die Leukämie-unterhaltenden, durch mutierte TK getriggerte AKT-Signaltransduktion Einfluss nimmt, als eher einen zusätzlichen Trigger durch unabhängige Faktoren wie andere Wachstumsfaktoren auf die AKT-Signalkaskade darstellt und so Proliferationsverhalten und Aggressivität der Leukämie steigert.

Darüber hinaus kann vermutet werden, dass im wachstumsfaktorreichen Milieu des Knochenmarks die PDK1-vermittelte AKT-Aktivierung selbst unter zytotoxischer Therapie nicht vollständig inaktiviert wird und so zu der besonders im Knochenmark ausgeprägten Leukämieresistenz beiträgt. Dies muss in zukünftigen Untersuchungen adressiert werden.

Eine Suppression des zytoprotektiven Effekts von PDK1 stellt im Hinblick auf die Übertragung in das klinische Setting einen möglichen Ansatz zur Verbesserung der Therapieoptionen einer akuten Leukämie dar. Es sollte untersucht werden, ob die Addition einer PDK1-Inhibition zu etablierten Therapieregimen auch in vivo zu einer Verbesserung des Therapieansprechens, der Verträglichkeit und einer Risikoreduktion sekundärer maligner Erkrankungen beitragen kann.

6. Danksagung

Bei der Anfertigung dieser Arbeit haben mich in den letzten Jahren viele Menschen begleitet und unterstützt.

Deshalb möchte ich mich hiermit bei meinem Doktorvater Herrn PD Dr. med. Marcus Schittenhelm und meiner Betreuerin Frau Dr. med. Kerstin Kampa-Schittenhelm für Ihre Unterstützung, konstruktiven Vorschläge und Ihre Anregungen bedanken. Außerdem gilt mein Dank Frau Dr. rer. nat. Barbara Illing und Frau Figen Akmut für Ihre Geduld und Ihre Ratschläge beim Erlernen der benötigten Methoden.

Mein Dank gilt auch Frau Dr. rer. nat. Ana Velic und Frau Silke Wahl vom Proteomic Center Tübingen für die Durchführung der Phosphoproteomanalyse.

Ohne meine Familie und meinen Freund Dominik hätte ich diese Arbeit niemals fertig stellen können. Vielen Dank für eure unermüdliche Unterstützung in den Hoch- und Tiefphasen, euer Verständnis und die aufbauenden Gespräche!

Natalie Haug

Korb, den 21.10.2018

7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Geräte.....	12
Tabelle 2.2: Verbrauchsmaterialien.....	13
Tabelle 2.3: Chemikalien.....	14
Tabelle 2.4: Zelllinien.....	16
Tabelle 2.5: Antikörper.....	16
Tabelle 3.1: Zellzahlen und Wachstumsraten nach 0 und 72 Stunden.....	37
Tabelle 3.2: Übersicht MW-Differenz PDK1 k.o und EV.....	52
Tabelle 3.3: Downregulation der Phosphorylierung bei Molm 14 PDK1 k.o. im Vergleich zu Molm 14 EV.....	55

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Myeloischer Teil der Hämatopoese (vereinfachte Darstellung, nach [2])	1
Abbildung 1.2: Lymphopoese des Menschen (Vereinfachte Darstellung, nach [2])	2
Abbildung 1.3: PI3K/AKT-Signalweg (stark vereinfachte Darstellung nach [16])	7
Abbildung 3.1: Nachweis des PDK1 knock-outs der Zelllinien Molm 14 und K562.....	33
Abbildung 3.2: Nachweis des PDK1 knock-outs der Zelllinien Jurkat und HL60.....	34
Abbildung 3.3: Nachweis von pAKT Thr308, pAKT Ser 473 in Jurkat, Molm 14 und K562	34
Abbildung 3.4: Proliferation Jurkat EV vs. PDK1 k.o	35
Abbildung 3.5: Proliferation Molm 14 EV vs. PDK1 k.o	36
Abbildung 3.6: Proliferation K562 EV vs. PDK1 k.o.....	36
Abbildung 3.7: Proliferation HL60 EV vs. PDK1 k.o.	37
Abbildung 3.8: Zellzyklusanalyse Molm 14 EV und PDK1 k.o. unter Behandlung mit 50 nM Daunorubicin	42
Abbildung 3.9: Zellzyklusanalyse K562 EV und PDK1 k.o. unter Behandlung mit 50 nM Daunorubicin	43
Abbildung 3.10: Zellzyklusanalyse Jurkat EV und PDK1 k.o. unter Behandlung mit 50 nM Daunorubicin	44
Abbildung 3.11: Zellzyklusanalyse HL 60 EV und PDK1 k.o. unter Behandlung mit 50 nM Daunorubicin	45
Abbildung 3.12: Proliferation (XTT) Jurkat EV vs PDK1 k.o unter Behandlung mit Daunorubicin (48h).....	39
Abbildung 3.13: Proliferation (XTT) Molm 14 EV vs PDK1 k.o unter Behandlung mit Daunorubicin (48h).....	39
Abbildung 3.14: Proliferation (XTT) K562 EV vs. PDK k.o. unter Behandlung mit Daunorubicin (48h).....	40

Abbildung 3.15: Proliferation (XTT) HL60 EV vs PDK1 k.o. unter Behandlung mit Daunorubicin (48h)	40
Abbildung 3.16: Proliferation (XTT) Molm 14 EV vs. PDK1 k.o unter Behandlung mit Sunitinib (48h)	47
Abbildung 3.17: Proliferation (XTT) K562 EV vs PDK1 k.o unter Behandlung mit Imatinib (48h).....	47
Abbildung 3.18: FL3-Histogramm der Jurkat EV (links) und PDK1 k.o (rechts), unbehandelt	48
Abbildung 3.19: FL3-Histogramm der Jurkat EV (links) und PDK1 k.o (rechts), 25 nM Daunorubicin (48 h).....	49
Abbildung 3.20: Apoptose Jurkat EV vs. PDK1 k.o. unter Daunorubicinbehandlung (48h)	50
Abbildung 3.21: Apoptose K562 EV vs. PDK1 k.o. unter Daunorubicinbehandlung (48h)	50
Abbildung 3.22: Apoptose HL 60 EV vs. PDK1 k.o. unter Daunorubicinbehandlung (48h)	51
Abbildung 3.23: Apoptose Molm 14 EV vs PDK1 k.o. unter Daunorubicinbehandlung (48h)	51
Abbildung 3.24: Apoptose Molm 14 EV vs PDK1 k.o unter Sunitinib-Behandlung (48 h).....	53
Abbildung 3.25: Apoptose K562 EV vs PDK1 k.o unter Imatinib-Behandlung (48 h).....	54
Abbildung 3.26: Stringanalyse der bei Molm 14 PDK1 k.o. herunterregulierten Proteinphosphorylierung (Software von <i>string-db.org</i>).....	62
Abbildung 3.27: Analyse des RB-Phosphorylierungsstatus in Molm 14 und K562.....	63

9. Literaturverzeichnis

- [1] W. Dempke, „Lehrbuch Hämato-Onkologie,“ München, Verlag Hans Huber, Hogrefe AG, Bern, 2006.
- [2] A. Rad, *Hematopoiesis_(human)_diagramm en.svg*, Wikimedia commons, 2015.
- [3] Gilliland DG, Jordan CT, Felix CA, „The Molekular Basis of Leukemia,“ *Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2004 (1)*, pp. 80-97, 2004.
- [4] Lowenberg B, Downing JR, Burnett A, „Acute Myeloid Leukemia,“ *N Engl J Med 341(14)*, pp. 1051-1062, 1999.
- [5] Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, Bloomfield CD, Cazzola M, Vardiman JW, „The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia,“ *Blood 127(20)*, pp. 2391-2405, 2016.
- [6] Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, Gaidzik VI, Paschka P, Roberts ND, Potter NE, Heuser M, Thol F, Bolli N, Gundem G, Van Loo P, Martincorena I, Ganly P, Mudie L, McLaren S, O'Meara S, Raine K, Jones DR, Teague JW, Butler AP, Greaves MF et al, „Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia,“ *N Engl J Med. 374 (23)*, pp. 2209-2221, 09 Juni 2016.
- [7] Noone AM, Howlader N, Krapcho M, Miller D, Brest A, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA, „SEER Cancer Statistics Review,“ National Cancer Institute, Bethesda, MD, 1975-2015.
- [8] Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T,

- Dombret H, Ebert BL, Fenaux P, Larson RA, Levine RL, Lo-Coco F, Naoe T, Niederwieser D, Ossenkoppele GJ, Sanz M, Sierra J, Tallman MS, Tien HF, Wei AH, Löwenberg B, Bloomfield CD, „Diagnosis and Management of AML in Adults: 2017 ELN Recommendations from an International Expert Panel,“ *Blood* 129(4), pp. 424-447, 2017.
- [9] Ding L, Ley TJ, Larson DE, Miller CA, Koboldt DC, Welch JS, Ritchey JK, Young MA, Lamprecht T, McLellan MD, McMichael JF, Wallis JW, Lu C, Shen D, Harris CC, Dooling DJ, Fulton RS, Fulton LL, Chen K, Schmidt H, Kalicki-Veizer J, Magrini VJ, Cook L et al, „Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing,“ *Nature* 481(7382), pp. 506-510, 2012.
- [10] Shlush LI, Zandi S, Mitchell A, Chen WC, Brandwein JM, Gupta V, Kennedy JA, Schimmer AD, Schuh AC, Yee KW, McLeod JL, Doedens M, Medeiros JJ, Marke R, Kim HJ, Lee K, McPherson JD, Hudson TJ; HALT Pan-Leukemia Gene Panel Consortium, Brown AM et al, „Identification of pre-leukaemic haematopoietic stem cells in acute leukaemia,“ *Nature* 506(7488), pp. 328-333, 2014.
- [11] The Cancer Genome Atlas Research Network, Ley TJ, Miller C, Ding L, Raphael BJ, Mungall AJ, Robertson A, Hoadley K, Triche TJ Jr, Laird PW, Baty JD, Fulton LL, Fulton R, Heath SE, Kalicki-Veizer J, Kandoth C, Klco JM, Koboldt DC, Kanchi KL et al, „Genomic and Epigenomic Landscapes of Adult De Novo Acute Myeloid Leukemia,“ *N Engl J Med.* 368(22), pp. 2059-2074, 2013.
- [12] Stone RM, Mandrekar S, Sanford BLd, Geyer S, Bloomfield CD, Dohner K, Thiede C, Marcucci G, Lo-Coco F, Klisovic RB, Wei A, Sierra J, Sanz MA, Brandwein JM, de Witte T, Niederwieser D, Appelbaum FR, Medeiros BC, Tallman MS, Krauter J, Schlenk RF et al, „The Multi-Kinase Inhibitor Midostaurin Prolongs Survival Compared with Placebo in Combination with Daunorubicin /Cytarabine Induction, High-Dose C Consolidation, and

As Maintenance Therapy in Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukemia (AML),“ *Blood* 126 (23), p. 6, 2015.

- [13] Fiedler W, Serve H, Döhner H, Schwittay M, Ottmann OG, O'Farrell AM, Bello CL, Allred R, Manning WC, Cherrington JM, Louie SG, Hong W, Brega NM, Massimini G, Scigalla P, Berdel WE, Hossfeld DK., „A phase 1 study of SU11248 in the treatment of patients with refractory or resistant acute myeloid leukemia (AML) or not amenable to conventional therapy for the disease,“ *Blood* 105(3), pp. 983-993, 2005.
- [14] Fiedler W, Kayser S, Kebenko M, Janning M, Krauter J, Schittenhelm M, Götze K, Weber D, Göhring G, Teleanu V, Thol F, Heuser M, Döhner K, Ganser A, Döhner H, Schlenk RF, „A phase I/II study of sunitinib and intensive chemotherapy in patients over 60 years of age with acute myeloid leukaemia and activating FLT3 mutations,“ *Br J Haematol* 169(5), pp. 694-700, 2015.
- [15] Jiang BH, Liu LZ, „PI3K/PTEN signaling in tumorigenesis and angiogenesis,“ *Biochim Biophys Acta*. 1784 (1), pp. 150-158, 2008.
- [16] Leary A, Auclin E, Pautier P, Lhomme C, „The PI3K/Akt/mTOR Pathway in Ovarian Cancer: Biological Rationale and Therapeutic Opportunities, Ovarian Cancer - A Clinical and Translational Update,“ 2013. [Online]. Available: DOI: 10.5772/54170. [Zugriff am 29. 06. 2017].
- [17] Kandoth C, McLellan MD, Vandin F, Ye K, Niu B, Lu C, Xie M, Zhang Q, McMichael JF, Wyczalkowski MA, Leiserson MD, Miller CA, Welch JS, Walter MJ, Wendl MC, Ley TJ, Wilson RK, Raphael BJ, Ding L, „Mutational landscape and significance across 12 major cancer types,“ *Nature* 502 (7471), pp. 333-339, 2013.
- [18] Bertacchini J, Guida M, Accordi B, Mediani L, Martelli AM, Barozzi P, Petricoin E 3rd, Liotta L, Milani G, Giordan M, Luppi M, Forghieri F, De Pol A, Cocco L, Basso G, Marmioli S, „Feedbacks and adaptive capabilities

- of the PI3K/Akt/mTOR axis in acute myeloid leukemia revealed by pathway selective inhibition and phosphoproteome analysis," *Leukemia* 28(11), pp. 2197-2205, 2014.
- [19] Martelli AM, Nyåkern M, Tabellini G, Bortul R, Tazzari PL, Evangelisti C, Cocco L, „Phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway and its therapeutical implications for human acute myeloid leukemia," *Leukemia* 20 (6), pp. 911-928, 2006.
- [20] Kampa KM, Kopp HG, Schittenhelm MM, „Abstract 2238: Role of phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) in leukemogenesis of acute leukemia," *Cancer Res* 72 (8), p. 2238, 2012.
- [21] Gallay N, Dos Santos C, Cuzin L, Bousquet M, Simmonet Gouy V, Chaussade C, Attal M, Payrastre B, Demur C, Récher C, „The level of AKT phosphorylation on threonine 308 but not on serine 473 is associated with high-risk cytogenetics and predicts poor overall survival in acute myeloid leukaemia," *Leukemia* 23 (6), pp. 1029-1038, 2009.
- [22] Battelli C, Cho DC, „mTOR inhibitors in renal cell carcinoma," *Therapy* 8 (4), pp. 359-367, 2011.
- [23] Tamburini J, Chapuis N, Bardet V, Park S, Sujobert P, Willems L, Ifrah N, Dreyfus F, Mayeux P, Lacombe C, Bouscary D, „Mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibition activates phosphatidylinositol 3-kinase/Akt by up-regulating insulin-like growth factor-1 receptor signaling in acute myeloid leukemia: rationale for therapeutic inhibition of both pathways.," *Blood* 111 (1), pp. 379-382, 2008.
- [24] Chow LQ, Eckhardt SG, „Sunitinib: from rational design to clinical efficacy.," *J Clin Oncol.* 25 (7), pp. 884-896, 2007.
- [25] Buchdunger E, Cioffi CL, Law N, Stover D, Ohno-Jones S, Druker BJ, Lydon NB, „Abl protein-tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits in vitro

signal transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors.," *J Pharmacol Exp Ther* 295(1), pp. 139-145, 2000.

- [26] „DSMZ,“ [Online]. Available: <https://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/ACC-282.html>. [Zugriff am 12. März 2017].
- [27] Matsuo Y, MacLeod RA, Uphoff CC, Drexler HG, Nishizaki C, Katayama Y, Kimura G, Fujii N, Omoto E, Harada M, Orita K, "Two acute monocytic leukemia (AML-M5a) cell lines (MOLM-13 and MOLM-14) with interclonal phenotypic heterogeneity showing MLL-AF9 fusion resulting from an occult chromosome insertion, ins(11;9)(q23;p22p23)," *Leukemia* 11(9), pp. 1469-1477, 1997.
- [28] Quentmeier H, Reinhardt J, Zaborski M, Drexler HG, „FLT3 mutations in acute myeloid leukemia cell lines,“ *Leukemia* 17(1), pp. 120-124, 2003.
- [29] Lozzio CB, Lozzio BB, „Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome,“ *Blood* 45(3), pp. 321-334, 1975.
- [30] „DSMZ,“ [Online]. Available: <https://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/ACC-3.html>. [Zugriff am 12 Juni 2017].
- [31] „ATCC,“ [Online]. Available: https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CCL-240.aspx?geo_country=de. [Zugriff am 12 Juni 2017].
- [32] Collins SJ, „The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression,“ *Blood* 70 (5), pp. 1233-1244, 1987.
- [33] „John Innes Centre - Microscopy,“ [Online]. Available: https://www.jic.ac.uk/microscopy/more/T5_9.htm. [Zugriff am 14 März

2017].

- [34] „Thermo Scientific XTT sodium salt,“ [Online]. Available: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/X6493>. [Zugriff am 14. Dezember 2015].
- [35] „MP Biomedicals Phenacine Methosulfate (ECR),“ [Online]. Available: <http://www.mpbio.com/product.php?pid=02194595&country=81>. [Zugriff am 14. Dezember 2015].
- [36] Laemmli Sample Buffer, „Sigma Aldrich,“ [Online]. Available: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/s3401?lang=de®ion=DE>. [Zugriff am 26. November 2015].
- [37] Biochemie Uni Freiburg, „Universität Freiburg,“ [Online]. Available: <http://www.biochemie.uni-freiburg.de/nat-w/protein-fa.htm>. [Zugriff am 26. November 2015].
- [38] MicroCal, LLC, „University of Illinois in Chicago, VP-DSC MicroCalorimeter User's manual, Seite 88-89,“ [Online]. Available: https://www.uic.edu/orgs/ctrstbio/manuals/vpdsc_manual.pdf. [Zugriff am 26. November 2015].
- [39] „Li-Cor,“ [Online]. Available: https://www.licor.com/bio/products/imaging_systems/odyssey/how_it_works.html. [Zugriff am 14 März 2016].
- [40] Kampa-Schittenhelm KM, Salitzky O, Akmut F, Illing B, Kanz L, Salih HR, Schittenhelm MM, „Dronabinol has preferential antileukemic activity in acute lymphoblastic and myeloid leukemia with lymphoid differentiation patterns,“ *BMC Cancer* 16(25), 2016.
- [41] Bradford MM, „A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye

Binding,“ *Anal Biochem* 72, pp. 248-254, 1976.

- [42] Laemmli UK, „Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4,“ *Nature* 227(5259), pp. 680 - 685, 1970.
- [43] ThermoScientific PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, [Online]. Available: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/26619>. [Zugriff am 26. November 2015].
- [44] „Bio-Rad Protein Blotting Guide,“ [Online]. Available: http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_2895.pdf. [Zugriff am 15 März 2017].
- [45] „Genomforschung HHU,“ [Online]. Available: <http://www.genomforschung.hhu.de/facs-facility/facs-infos-und-%20links.html>. [Zugriff am 03. November 2015].
- [46] „Antikörper online,“ [Online]. Available: <http://www.antikoerper-online.de/resources/17/1247/Durchflusszytometrie+FACS+Messprinzip++Aufbau/>. [Zugriff am 15. November 2015].
- [47] „FITC Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit with FITC annexin V and PI,“ [Online]. Available: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/mp13242.pdf>. [Zugriff am 15. März 2017].
- [48] BD Biosciences, „BD Biosciences,“ [Online]. Available: https://www.bdbiosciences.com/documents/BD_FACSCalibur_instructions.pdf. [Zugriff am 22. November 2015].
- [49] Thermo Scientific Annexin V, [Online]. Available: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/cell-analysis/cell-viability-and-regulation/apoptosis/annexin-v-staining.html>. [Zugriff am 22. November 2015].

- [50] Thermo Scientific PI, [Online]. Available: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/R37108>. [Zugriff am 22. November 2015].
- [51] Universität Zürich, „Methodenberatung - t-Test für unabhängige Stichproben,“ [Online]. Available: <http://www.methodenberatung.uzh.ch/de/datenanalyse/unterschiede/zentral/ttestunabh.html#7>. [Zugriff am 22 08 2017].
- [52] Körner C, „Hinweise zum wissenschaftlichen Publizieren (Universität Basel),“ 2008. [Online]. Available: https://plantecology.unibas.ch/pdf/wissenschaftliches_publizieren.pdf. [Zugriff am 22 08 2017].
- [53] Macek B, Mijakovic I, Olsen JV, Gnad F, Kumar C, Jensen PR, Mann M, „The serine/threonine/tyrosine phosphoproteome of the model bacterium *Bacillus subtilis*.“, *Mol Cell Proteomics* 6(4), pp. 697-707, 2007.
- [54] Cox J, Neuhauser N, Michalski A, Scheltema RA, Olsen JV, Mann M, „Andromeda: a peptide search engine integrated into the MaxQuant environment.“, *J Proteome Res* 10(4), pp. 1794-1805, 2011.
- [55] Benjamini Y, Hochberg Y, „Controlling the False Discovery Rate - a Practical and Powerful Approach to Multiple Testing,“ *J Roy Stat Soc B Met* 57(1), pp. 289-300, 1995.
- [56] Hirsch-Kauffmann M, Schweiger M, Schweiger MR, „Biologie und molekulare Medizin, 7. Auflage,“ Stuttgart, Georg Thieme Verlag, 2009, pp. 51-57.
- [57] Crissman HA, Steinkamp JA, „Rapid, simultaneous measurement of DNA, protein, and cell volume in single cells from large mammalian cell populations,“ *J Cell Biol.* 59 (3), pp. 766-771, 1973.

- [58] Gioia L, Siddique A, Head SR, Salomon DR, Su AI, „A Genome-wide Survey of Mutations in the Jurkat Cell Line,“ 18 03 2017. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1101/118117>. [Zugriff am 29 04 2018].
- [59] „Universität Bochum - Wachstumsraten,“ [Online]. Available: <http://www.ruhr-uni-bochum.de/wista/download/Beilagen/Wachstumsraten.pdf>. [Zugriff am 24 März 2017].
- [60] European Medicines Agency, „Produktinformation Sutent (EMA/H/C/000687 -II/0038),“ [Online]. [Zugriff am 18. Mai 2016].
- [61] Sawyer DB, Fukazawa R, Arstall MA, Kelly RA, „Daunorubicin-induced Apoptosis in Rat Cardiac Myocytes Is Inhibited by Dexrazoxane,“ *Circ Res* 84(3), pp. 257-265, 1999.
- [62] Jansen VM, Bholra NE, Bauer JA, Formisano L, Lee KM, Hutchinson KE, Witkiewicz AK, Moore PD, Estrada MV, Sánchez V, Ericsson PG, Sanders ME, Pohlmann PR, Pishvaian MJ, Riddle DA, Dugger TC, Wei W, Knudsen ES, Arteaga CL, „Kinome-wide RNA interference screen reveals a role for PDK1 in acquired resistance to CDK4/6 inhibition in ER-positive breast cancer.,“ *Cancer Res* 77(9), pp. 2488-2499, 2017.
- [63] Lu Z, Cox-Hipkin MA, Windsor WT, Boyapati A, „3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 regulates proliferation and survival of cancer cells with an activated mitogen-activated protein kinase pathway.,“ *Mol Cancer Res* 8(3), pp. 421-432, 2010.
- [64] Zabkiewicz J, Pearn L, Hills RK, Morgan RG, Tonks A, Burnett AK, Darley RL, „The PDK1 master kinase is over-expressed in acute myeloid leukemia and promotes PKC-mediated survival of leukemic blasts,“ *Haematologica* 99 (5), pp. 858-864, 2014.
- [65] Robert-Koch-Institut, „Zentrum für Krebsregisterdaten,“ Robert-Koch-

Institut, [Online]. Available: www.krebsdaten.de. [Zugriff am 23. Februar 2016].

- [66] García-Echeverría C, Pearson MA, Marti A, Meyer T, Mestan J, Zimmermann J, Gao J, Brueggen J, Capraro HG, Cozens R, Evans DB, Fabbro D, Furet P, Porta DG, Liebetanz J, Martiny-Baron G, Ruetz S, Hofmann F, „In vivo antitumor activity of NVP-AEW541-A novel, potent, and selective inhibitor of the IGF-IR kinase.,“ *Cancer Cell* 5(3), pp. 231-239, 2004.

10. Selbstständigkeitserklärung

Die vorliegende Dissertation wurde in der Universitätsklinik Tübingen in der Abteilung Medizinische Klinik II unter der Leitung und Betreuung von Herrn PD Dr. med. Marcus Schittenhelm und Frau Dr. med. Kerstin Kampa-Schittenhelm durchgeführt.

Sämtliche Versuche wurden, soweit nicht anders gekennzeichnet, nach Einarbeitung durch Frau Dr. med. Kampa-Schittenhelm, Frau Dr. rer. net. Barbara Illing und Frau Figen Akmut von mir eigenständig durchgeführt.

Die Phosphoproteomanalyse wurde in Zusammenarbeit mit dem Proteomic Center Tübingen unter der Leitung von Frau Dr. rer. nat. Ana Velic durchgeführt. Die vom PCT übernommenen Versuche wurden entsprechend gekennzeichnet.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig in Absprache mit meiner zuständigen Betreuerin Frau Dr. med. Kampa-Schittenhelm sowie in Zusammenhang mit der o.g. Phosphoproteomanalyse mit Frau Dr. rer. nat. Velic.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Teile der Arbeit wurden von mir im Oktober 2016 im Rahmen des DGHO-Kongresses in Leipzig in Form einer Posterpräsentation veröffentlicht.

Korb, den 21.10.2018

Natalie Haug