

# TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Max-Planck-Institut für Biochemie

## Globale und quantitative Analysen Lysophosphatidsäure-induzierter Signaltransduktion

Thiemo Benjamin Schreiber

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

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Michael Groll

Prüfer der Dissertation: 1. Priv.-Doz. Dr. Henrik Daub

2. Univ.-Prof. Dr. Johannes Buchner

Die Dissertation wurde am 14.04.2010 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 05.07.2010 angenommen.

**Meinen Eltern.**

# Vorbemerkungen

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom Mai 2007 bis zum April 2010 am Max-Planck-Institut für Biochemie unter der Leitung von PD Dr. Henrik Daub angefertigt. Die praktischen Arbeiten zur Untersuchung der zeitabhängigen, LPA-induzierten Phosphorylierungsnetzwerke in SCC-9 Zellen wurden aus Gründen des messtechnischen Aufwands zu gleichen Teilen zwischen Nina Mäusbacher und mir aufgeteilt.

Teile dieser Arbeit wurden in international anerkannten Fachzeitschriften veröffentlicht.

# INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung.....	1
1.1	Zelluläre Regulationsmechanismen .....	1
1.2	Proteinphosphorylierung in zellulären Signalwegen.....	2
1.3	EGF-Rezeptor Signaltransduktion .....	4
1.4	Metalloproteasen .....	6
1.4.1	Matrix-Metalloproteasen.....	7
1.4.2	Disintegrin Metalloproteasen.....	8
1.5	Lysophosphatidsäure (LPA).....	9
1.5.1	LPA Metabolismus .....	9
1.5.2	LPA Rezeptoren.....	11
1.5.3	G-Protein vermittelte Signalkaskaden .....	11
1.5.4	EGFR Transaktivierung.....	13
1.6	Technologische Aspekte .....	14
1.6.1	Analyse von Phosphorylierungsereignissen .....	15
1.7	Massenspektrometrie von Peptiden.....	16
1.7.1	Ionisationsmethoden .....	16
1.7.2	Masseanalysatoren .....	18
1.7.3	(Phospho-) Peptididentifikation.....	22
1.7.4	Grundlagen der quantitativen Massenspektrometrie .....	26
1.7.5	Fraktionierung.....	31
1.8	Phosphoproteomische Studien .....	34
1.9	Aufgabenstellung .....	38
2	Material und Methoden.....	39
2.1	Materialien .....	39
2.1.1	Geräte.....	39
2.1.2	Chemikalien und Reagenzien .....	40

2.1.3	Verbrauchsgüter .....	43
2.1.4	Software .....	44
2.1.5	Zellkulturmedien:.....	44
2.1.6	Lysepuffer .....	45
2.2	Methoden.....	45
2.2.1	Zellkultur.....	45
2.2.2	Stimulation und Zellyse für phosphoproteomische Experimente.....	46
2.2.3	siRNA Transfektion .....	47
2.2.4	RNA Präparation.....	47
2.2.5	Quantitative Reverse-Transkriptions PCR.....	47
2.2.6	Zellmigration.....	48
2.2.7	Inhibitor Kopplung.....	48
2.2.8	Marimastat Inhibitorprofilierung .....	49
2.2.9	Semiquantitativer Vergleich immobilisierter Kinaseinhibitoren.....	50
2.2.10	Quantitativer Vergleich von Säulenaffinitätschromatographie und in vitro Assoziation zur Kinaseanreicherung.....	51
2.2.11	Kinase Anreicherung .....	52
2.2.12	Gelverdau.....	53
2.2.13	Lösungsverdau .....	54
2.2.14	Phosphopeptidanreicherung.....	54
2.2.15	Peptid-Entsalzung .....	55
2.2.16	SCX Chromatographie.....	55
2.2.17	Massenspektrometrische Analyse.....	56
2.2.18	Datenprozessierung.....	57
3	Ergebnisse .....	63
3.1	Semiquantitativer Vergleich von Kinase-Affinitätsmatrices .....	63
3.2	Vergleichende Betrachtungen zweier Proteinkinase Anreicherungsverfahren .....	68

3.3	Integrierte Analyse zellulärer Phosphorylierungsnetzwerke in A498 Zellen .....	75
3.3.1	Experimentelles Design .....	76
3.3.2	Phosphoproteomische Analyse von A498 Zellen .....	77
3.3.3	LPA-abhängige Dephosphorylierung .....	82
3.3.4	Vergleich LPA- und HB-EGF-induzierter Phosphorylierungsregulation.....	85
3.3.5	Bioinformatische Analyse regulierter Phosphorylierungen in A498-Zellen .....	86
3.3.6	Aktivierungsschleifen-Phosphorylierung .....	94
3.3.7	Funktionelle Bedeutung der Tyrosinkinase TEC.....	95
3.4	Zeitreihen-Analyse LPA-abhängiger Phosphorylierungen in SCC9 Zellen .....	98
3.4.1	Experimenteller Ansatz.....	98
3.4.2	Protein Interaktionsnetzwerk .....	100
3.4.3	Zeitlicher Verlauf zellulärer Phosphorylierungsereignisse.....	103
3.4.4	Zeitreihen-Cluster .....	107
3.4.5	Phosphorylierte Sequenzmotive.....	109
3.5	Quantitative Charakterisierung zellulärer Marimastat Interaktoren.....	114
3.5.1	Immobilisierung des Metalloproteaseinhibitors .....	115
3.5.2	Methode zur quantitativen Proteaseinhibitorprofilierung.....	116
3.5.3	Spezifische Interaktoren des immobilisierten Derivates.....	119
3.5.4	Charakterisierung von Marimastat Interaktoren .....	121
4	Diskussion.....	124
4.1	LPA- und HB-EGF-induzierte Phosphorylierung in A498 Zellen.....	124
4.2	Vergleich der LPA-abhängigen Phosphoregulation in A498 und SCC-9 Zellen.....	127
4.3	Ausblick .....	133
5	Zusammenfassung.....	135
6	Literaturverzeichnis .....	136
7	Abkürzungen.....	152
7.1	Zuordnung verwendeter Gen- und Proteinnamen .....	153

8	Publikationen .....	155
9	Danksagung.....	156

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 ZELLULÄRE REGULATIONSMECHANISMEN

Eine Vielzahl von Proteinen unterschiedlicher Klassen und Funktionen interagieren im zellulären System um komplexe biologische Prozesse, wie Proliferation, Migration oder Differentiation zu koordinieren. Aus der kombinatorischen Vielzahl möglicher Wechselwirkungen und der gegenseitigen, funktionalen Abhängigkeit der einzelnen Komponenten ergibt sich eine enorme Komplexität des Gesamtsystems. Zelluläre Signaltransduktionsnetzwerke übernehmen die koordinierte Weiterleitung, Verteilung, Integration und Amplifikation von extra- und intrazellulären Signalen und steuern dadurch das zelluläre Verhalten. Aufgrund der unterschiedlichen zeitlichen Anforderungen zellulärer biologischer Prozesse werden diese auf unterschiedlichen Ebenen kontrolliert. So können z.B. langsame Prozesse durch die Modulation der zur Verfügung stehenden Proteinmenge als Funktion der Synthese- und Degradations-Raten gesteuert werden. Diese Regulation kann dabei sowohl spezifisch für ein Element (Gen, Protein), eine Gruppe von Elementen oder auch globaler Natur, z.B. im Falle einer allgemeinen Transkriptionsrepression durch Chromatinkondensation, sein. Für schnelle biologische Antworten ist ein solcher Mechanismus jedoch zu langsam. In diesen Fällen ermöglicht die induzierte, post-translationale Modifikation (PTM) bereits bestehender Proteinpopulationen eine wesentlich schnellere Reaktion des Systems. Die im zellulären System auftretenden, induzierbaren post-translationalen Modifikationen sind strukturell und funktional äußerst divers und umfassen unter anderem die kovalente Modifikation von Proteinen mit Methyl-, Acetyl- und Phosphatgruppen, kleinen Proteinen (Ubiquitynylierungen, Sumoylierungen) oder ADP-Ribose Einheiten. Im Vergleich zur funktionalen Charakterisierung von Proteinen ist über die Bedeutung und Relevanz induzierbarer PTMs sehr wenig bekannt. So ist die regulatorische Funktion einer PTM von der Funktion des Proteins, der Art und Position der Modifikation und dem zellulären Kontext abhängig. Während z.B. Ubiquitynylierungen in der Regel die proteasomale Degradation des Zielproteins induzieren, können Phosphorylierungen mannigfaltige Effekte haben. Diese reichen von der Protein-Stabilisierung über die -Lokalisation und -Komplexbildung bis hin zur Regulation der enzymatischen Aktivität. Aus der Vielzahl potentieller Modifikationen jedes Proteins und ihrer gegenseitigen funktionellen Beeinflussung ergibt sich somit eine erweiterte regulatorische Komplexitätsebene. Die

möglichst umfassende Kenntnis der Gesamtheit dieser Regulationsvorgänge, ihrer gegenseitigen Abhängigkeiten und biologischen Effekte ist gerade für die systemisch orientierte biologische Forschung von besonderem Interesse.

### **1.2 PROTEINPHOSPHORYLIERUNG IN ZELLULÄREN SIGNALWEGEN**

Unter der Vielzahl induzierbarer PTMs kommt der Proteinphosphorylierung eine herausgehobene Bedeutung zu. Die Übertragung des  $\gamma$  - Phosphats von Adenosintriphosphat (ATP) auf Serin-, Threonin- oder Tyrosinseitenketten wird durch die Mitglieder einer der größten Proteinfamilien des humanen Genoms katalysiert. Die insgesamt mehr als 500 humanen Proteinkinasen haben durch spezifische und reversible Phosphorylierungen direkten Einfluss auf die Lokalisierung, Protein-Protein Interaktionen, Stabilität und Aktivität von mehr als einem Drittel aller exprimierten Proteine (Blume-Jensen and Hunter, 2001; Manning, Whyte *et al.*, 2002). Im Kontext der Signalvermittlung ist die Reversibilität der Phosphorylierung von besonderer Bedeutung, da sie der Zelle die schnelle und effektive Modulation der Signalintensität und letztlich auch die Termination der Signalproliferation durch Proteinphosphatasen ermöglicht. Proteinphosphatasen katalysieren die Hydrolyse des Phosphorsäureesters zwischen Protein und Phosphat und fungieren somit als funktionale Gegenspieler der Proteinkinasen. In Anbetracht von über 700.000 potentiell phosphorylierbaren Aminosäuren im humanen Proteom zeigt sich die erstaunliche Spezifität einzelner Proteinkinasen für jeweils nur einige bis einige hundert tatsächlich erkannter Phosphorylierungsstellen. Diese Spezifität, die eine notwendige Bedingung für die selektive Aktivierung diskreter Signalwege ist, scheint durch mehrere, voneinander unabhängig wirkende Mechanismen kontrolliert zu werden. Neben der dreidimensionalen Struktur des katalytischen Zentrums und der Substratbindungsstelle spielen auch systemabhängige Effekte wie Substratkompetition, Kolo-kalisation und Komplexbildung, auch unter Mitwirkung von Adapterproteinen, eine entscheidende Rolle bei der Substratselektion (Ubersax and Ferrell, 2007). Gerade diese systemischen Parameter erschweren eine verlässliche *in silico* Simulation von Kinase-Substrat Netzwerken anhand von Sequenzmotiven oder *in vitro* Daten und machen eine Analyse von Phosphorylierungsnetzwerken im zellulären System unerlässlich. Entsprechend ihrer Abundanz wirken induzierte Phosphorylierungen als Regulatoren von kooperierenden und intermodulierenden Signalkaskaden in einer Vielzahl fundamentaler, zellulärer Prozesse wie der Zellteilung, Apoptose, Differenzierung und

## Einleitung

Migration. Durch die grundlegende Bedeutung der genannten Prozesse für die Zelle, aber auch den gesamten Organismus, können Störungen dieser Phosphorylierungsnetzwerke, z.B. durch konstitutive Aktivierung von Proteinkinasen, fatale pathologische Zustände wie Krebs oder Diabetes zur Folge haben, oder deren Progression negativ beeinflussen (Blume-Jensen and Hunter, 2001; De Meyts and Whittaker, 2002). Daraus folgt, dass eine genaue Kenntnis der Struktur und Funktion von *in vivo* Phosphorylierungsnetzwerken über die reine mechanistische Erkenntnis hinaus auch praktische Implikationen z. B. für die zielgerichtete, individualisierte Therapie oder die Entwicklung neuartiger Kinaseinhibitoren hat (Fischer, Streit *et al.*, 2003; Hynes and Lane, 2005; Quintas-Cardama, Kantarjian *et al.*, 2007).

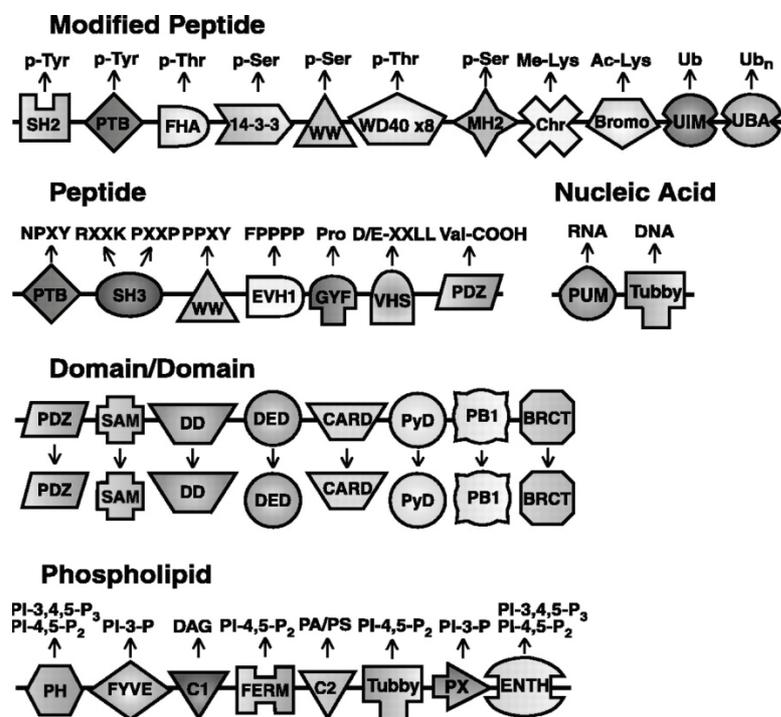


Abbildung 1.2-1 Interaktionsdomänen. Illustration ausgewählter Interaktionsdomänen mit Affinitäten für Peptide, modifizierte Peptide, andere Proteindomänen oder Phospholipide. Abbildung aus Pawson und Nash, 2003.

Die Interaktionen einzelner Komponenten der Phosphorylierungsnetzwerke wird häufig durch modulare Proteindomänen vermittelt, als deren Bindungspartner wiederum andere Protein-Domänen, aber auch modifizierte Peptides oder Phospholipide fungieren können (Pawson and Nash, 2003).

Von besonderem Interesse für Phosphorylierungsnetzwerke sind in diesem Kontext verständlicherweise solche Domänen, die phosphorylierte Aminosäuren binden und dadurch eine durch Phosphorylierungsereignisse gesteuerte Assemblierung komplexer Signalplattformen ermöglichen.

So binden einige Interaktionsdomänen phosphoryliertes Serin (14-3-3, WW), Threonin (WD40, FHA) oder dienen der Lokalisation von Signalnetzwerkkomponenten durch Bindung von Phosphatidylinositoltrisphosphat (PIP<sub>3</sub>), welches stimulationsabhängig durch die PI-3 Kinase gebildet wird, an die Plasmamembran (PH) (Abbildung 1.2-1). Darüber hinaus verfügen eine Vielzahl von Proteintyrosinkinasen (SRC, TEC) und Adapterproteine (GAB2, GRB2, IRS2) über SH2- oder PTB-Domänen durch die sie u.a. mit Tyrosin-phosphorylierten Rezeptortyrosinkinasen (RTKs) wie dem EGF-Rezeptor assoziieren (Schlessinger, 2000; Schlessinger and Lemmon, 2003) und ihrerseits zum Substrat für die RTKs werden können.

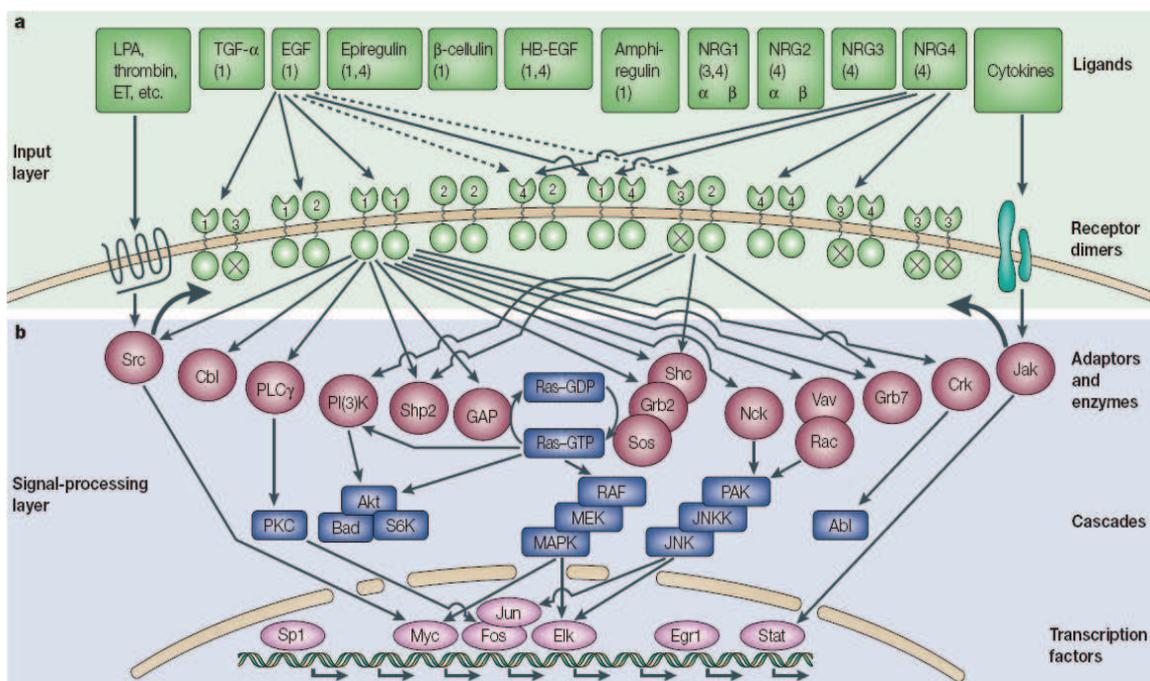
### 1.3 EGF-REZEPTOR SIGNALTRANSDUKTION

Rezeptor-Tyrosinkinasen spielen eine wichtige Rolle bei der Liganden-induzierten Aktivierung zellulärer Phosphorylierungskaskaden. Die ErbB Familie umfasst die vier Mitglieder EGFR, HER2/neu, HER3 und HER4 denen der Aufbau aus vier extrazellulären Domänen, einer Transmembrandomäne und der zytoplasmatischen Tyrosinkinasedomäne gemeinsam ist. Trotz der ähnlichen Struktur zeichnen sich die vier ErbB Mitglieder durch teils sehr unterschiedliche molekulare Eigenschaften aus. EGFR und HER4 verfügen sowohl über messbare Affinität für bekannte ErbB Liganden (*Epidermal growth factor*, *Heparin-binding epidermal growth factor*, Amphiregulin, *Transforming growth factor alpha*, Betacellulin, Cripto, Epiregulin, Epigen und Neureguline), als auch über funktionale Kinasedomänen. HER2 bindet in Homodimeren zwar keinen der bekannten Liganden, trägt jedoch insbesondere in HER2/3 Heterodimeren zur Heregulin-abhängigen Aktivierung bei (Wallasch, Weiss *et al.*, 1995). Obwohl in der Kinasedomäne von HER3 einige für die katalytische Aktivität notwendige konservierte Aminosäuren (wie z. B. die katalytische Base) fehlen, fungiert HER3 als potenter allosterischer Aktivator des jeweiligen Dimerisationspartners durch Bildung eines asymmetrischen Kinasedomänen-Dimers (Jura, Shan *et al.*, 2009).

Aus den möglichen Dimerisationskombinationen ergeben sich eine Vielzahl unterschiedlicher Rezeptoren mit jeweils distinkten Eigenschaften bezüglich der Ligandenbindung- und Substratphosphorylierungseigenschaften. Die Aktivierung der ErbB Rezeptoren erfolgt, im normalen physiologischen Kontext, durch Bindung extrazellulärer Liganden und wird somit durch die lokale Ligandenverfügbarkeit reguliert. Diese wiederum ergibt aus den Summeneffekten der Ligandensekretion und Proteasen-abhängigen Spaltung membrangebundener ErbB-Proliganden, der Bindung

## Einleitung

aktiver Liganden an die extrazelluläre Matrix oder modifizierter Zelloberflächenproteine und der Degradation im extrazellulären Raum bzw. nach Internalisierung der Liganden-Rezeptor Komplexe. Die Ligandenbindung verursacht konformationelle Änderungen der monomeren EGF/HER3-Rezeptoren durch die ein *Dimerisationloop* exponiert und so die Assoziation von ErbB Homo-/ Heterodimeren eingeleitet wird (Ogiso, Ishitani *et al.*, 2002; Ferguson, Berger *et al.*, 2003). Zudem wird die Rezeptor-Liganden-Interaktion durch die erhöhte Affinität der Rezeptordimere, verglichen mit den Monomeren, verstärkt (Warren and Landgraf, 2006). Die intrinsische Tyrosinkinaseaktivität (ausgenommen HER3) führt, in Abhängigkeit des Liganden und der Zusammensetzung des Rezeptordimers (Olayioye, Graus-Porta *et al.*, 1998), zur Autophosphorylierung dedizierter Tyrosinseitenketten in der zytoplasmatischen Domäne, welche daraufhin als Bindungsstellen für Signalmediatoren und Adapterproteine dienen (Abbildung 1.3-1). Im Gegensatz zu vielen anderen Proteintyrosinkinase, bei denen der sogenannte *activation loop* den Zugang von Substrat und ATP zum katalytischen Zentrum erst nach erfolgter Tyrosinphosphorylierung ermöglicht, scheint die Autophosphorylierung der ErbB Rezeptoren eine untergeordnete Rolle bei der Regulation der Kinaseaktivität zu spielen (Gotoh, Tojo *et al.*, 1992).



**Abbildung 1.3-1 Illustration wichtiger ErbB initiierte Signalwege.** ERBB Homo- und Heterodimere binden unterschiedliche Liganden und initiieren eine Vielzahl zellulärer Signalkaskaden. Abbildung aus Yarden and Sliwkowski, 2001.

Durch ErbB Rezeptoren werden unter anderem mitogene und anti-apoptische Signalwege wie die *Mitogen-activated protein kinase* Kaskaden (MAPK), der

## Einleitung

Phospholipase C $\gamma$  - Protein Kinase C Signalweg, sowie der IP<sub>3</sub>-Kinase – Akt Signalweg aktiviert. Diese führen ultimativ zur transkriptionellen Genregulation durch Proto-onkogene wie JUN, FOS und MYC aber auch durch Zinkfinger Transkriptionsfaktoren wie SP1 oder Mitglieder der ETS-Familie. Es ist daher nicht verwunderlich, dass ErbB-Rezeptoren oder deren Liganden an der Entstehung und Progression einer Vielzahl von Krebsarten beteiligt sind und potentielle therapeutische Interventionsmöglichkeiten auf allen Ebenen der Signaltransduktion bestehen.

Eine zeitliche Modulation der Signalintensität erfolgt unter anderem durch Proteintyrosinphosphatasen (Reynolds, Tischer *et al.*, 2003) und die Rezeptor-spezifische Internalisation mittels Clathrin-vermittelter Endozytose. Während die Dissoziation der Liganden-Rezeptor-Komplexe in den frühen Endosomen bei leicht saurem pH im Falle von HER2 oder HER3 Dimeren zu einem Rezeptor-Recycling führt (Waterman, Sabanai *et al.*, 1998), hat die andauernde Tyrosinphosphorylierung des EGFR die c-CBL vermittelte Ubiquitinylierung und den anschließendem lysosomalen Abbau des Rezeptors zur Folge (Levkowitz, Waterman *et al.*, 1998).

Wie Eingangs erwähnt werden einige ErbB-Liganden als inaktive, in die Plasmamembran integrierte Pro-Liganden translatiert und entfalten ihre para- oder autokrine Wirkung erst nach der proteolytischen Prozessierung durch Metalloproteasen.

### 1.4 METALLOPROTEASEN

Metalloproteasen katalysieren die hydrolytische Spaltung von Peptidbindungen, wobei für die enzymatische Aktivität, je nach Typ Zink-, Mangan- oder Kobalt-Ionen essentiell sind. Matrix-Metalloproteasen (MMPs) und Disintegrin-Metalloproteasen (ADAMs) gehören zur Superfamilie der Metzicin-Zinkproteasen (Abbildung 1.4-1), die über ein gemeinsames, katalytisches

HEXXHXXGXXH-Motiv verfügen

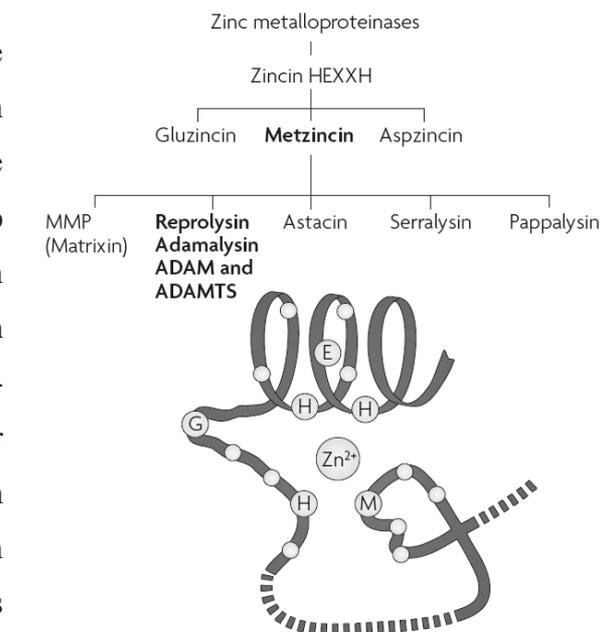


Abbildung 1.4-1 Schematische Darstellung des katalytischen Zentrums der Metzicine. Abbildung aus Murphy, 2008.

Zn<sup>2+</sup>-Ion dient im Wesentlichen der koordinativen Bindung des zur Hydrolyse der

Peptidbindung benötigten Wassermoleküls. Durch das konservierte Glutamat wird das Wassermolekül polarisiert und kann als Nukleophil den Carbonyl-Kohlenstoff der Substratpeptidbindung angreifen.

### 1.4.1 Matrix-Metalloproteasen

Die 23 Mitglieder der Matrix-Metalloproteasen (MMPs) oder Matrixin-Superfamilie werden entsprechend ihrer Struktur in fünf Klassen mit sekretierten und drei Klassen mit membrangebundenen MMPs eingeteilt (Nagase and Woessner, 1999). Matrix-Metalloproteasen werden als Prä-Pro-Enzyme synthetisiert und in den meisten Fällen erst im extrazellulären Raum durch bereits aktive MMPs oder andere Proteasen wie dem Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator durch Abspaltung der Prodomäne in die aktive Form überführt (Carmeliet, Moons *et al.*, 1997). Dabei wird ihre Aktivität durch endogene Inhibitoren wie die *Tissue inhibitors of metalloproteases* (TIMPs) und  $\alpha_2$ -Makroglobulin reguliert (Gomez, Alonso *et al.*, 1997). Die Matrix-Metalloproteasen medieren durch die Prozessierung ihrer Substrate wie Kollagen, Elastin, Gelatin und Fibronectin primär die proteolytische Degradation der extrazellulären Matrix (ECM) (Shapiro, 1998) und spielen dadurch eine wichtige Rolle bei morphologischen Prozessen wie der Organogenese, Angiogenese aber auch der Migration und Invasion von Krebszellen, was sie zu potentiellen Zielen pharmakologischer Intervention macht (Konstantinopoulos, Karamouzis *et al.*, 2008). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass sie ähnlich den ADAM Proteasen auch an der Transaktivierung von EGF-Rezeptoren und damit an der Tumorzellproliferation beteiligt sind (Yu, Woessner *et al.*, 2002; Roelle, Grosse *et al.*, 2003).

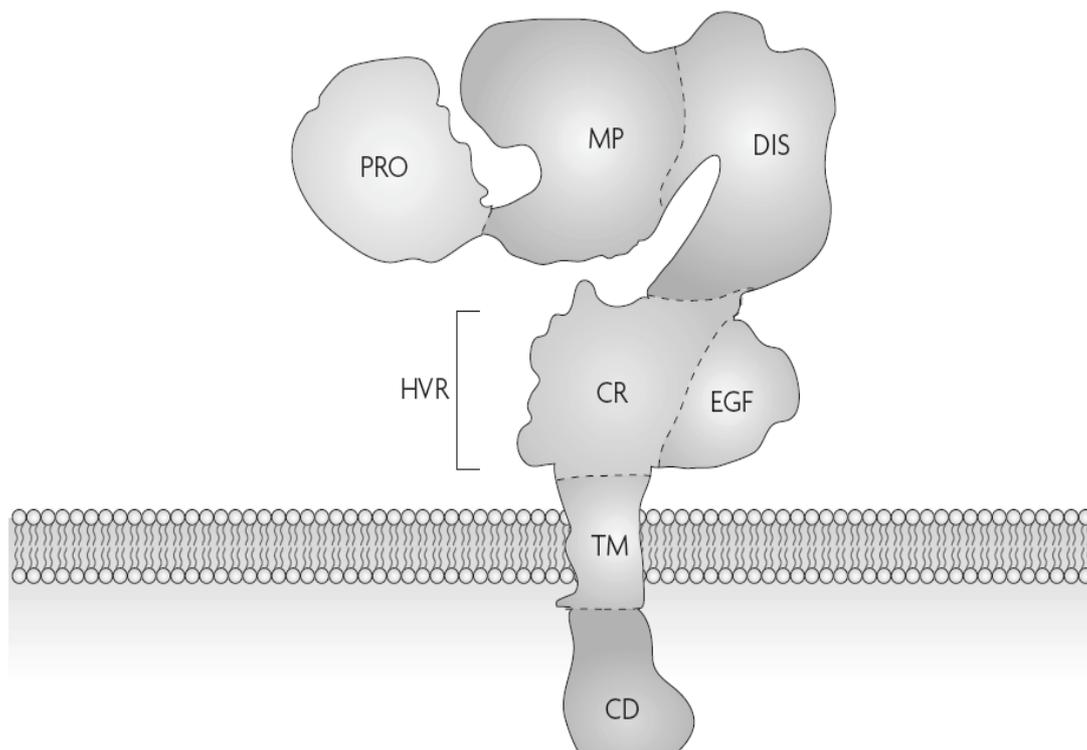
Die Erfahrungen aus klinischen Studien mit unspezifischen, Hydroxamat-basierten MMP-Inhibitoren, führten jedoch zu einer differenzierteren Sicht auf die Rolle der MMPs bei der Tumorprogression (Cuniasse, Devel *et al.*, 2005). So offenbarten anschließende Untersuchungen die tumorprotektiven Eigenschaften von MMP-8, -12 und -26. Eine mögliche Erklärungsbasis für diese Effekte ist die Beteiligung der, hauptsächlich durch Neutrophile gebildeten, Protease MMP-8 an der Regulation der gegen den Tumor gerichteten Immunreaktion (Montel, Kleeman *et al.*, 2004), der Angiogenese-Inhibition durch MMP-12 (Gorrin-Rivas, Arii *et al.*, 2000) oder die proteolytischen Spaltung des Östrogenrezeptor  $\beta$  durch MMP-26 (Savinov, Remacle *et al.*, 2006). Andere Metalloproteasen wiederum spielen im Rahmen der Tumorprogression ambivalente Rollen. So konnten für die, ursprünglich ausschließlich

als Tumorpromotoren charakterisierten Metalloproteasen MMP-3, -9, -11 und -19 (Egeblad and Werb, 2002) in Abhängigkeit des untersuchten Systems mitunter auch protektive Eigenschaften nachgewiesen werden (Lopez-Otin and Matrisian, 2007).

### 1.4.2 Disintegrin Metalloproteasen

Von den 21 derzeit bekannten, humanen ADAM Proteasen besitzen 13 Vertreter eine aktive Metalloproteasedomäne. Bis auf die löslichen Splicevarianten von ADAM 12 (Gilpin, Loechel *et al.*, 1998) und ADAM 33 (Powell, Wicks *et al.*, 2004) handelt es sich bei allen Mitgliedern der ADAM Familie um Typ I Membranproteine. ADAM-Proteasen werden häufig als Proenzyme synthetisiert, deren katalytisches Zentrum durch ein Cystein in der Prodomäne inhibiert sind, (Loechel, Overgaard *et al.*, 1999).

Die Aktivierung erfolgt in der Regel im trans-Golgi Netzwerk durch proteolytische



**Abbildung 1.4-2 Schematische Illustration der Domänenstruktur von ADAM Metalloproteasen.** Die inhibitorische N-terminale Prodomäne (PRO) scheint in vielen Fällen auch nach der proteolytischen Prozessierung im Golgi-Netzwerk in der katalytischen Furche gebunden zu bleiben. An die katalytische Metalloprotease-Domäne (MP) schließt sich C-terminal an die Disintegrin-Domäne (DIS) an. Die mit der DIS-Domäne über Disulfidbrücken verbundene Cystein-reiche Domäne (CR) enthält in vielen Fällen auch EGF-ähnliche Sequenzwiederholungen. Transmembrandomäne (TM), Intrazelluläre Domäne (CD). Abbildung aus Murphy, 2008.

Abspaltung der Prodomäne unter Beteiligung von Furin, Furin-ähnlichen Serin-Proteasen oder durch autokatalytische Mechanismen (Anders, Gilbert *et al.*, 2001; Kang, Park *et al.*, 2002). Extrazellulär werden sie, wie auch die MPPs, durch TIMPs inhibiert (Amour, Slocombe *et al.*, 1998).

ADAMs sind in der Lage eine Vielzahl unterschiedlicher Transmembranproteine wie Zelladhäsionsproteine (Cadherine, CD44), EGFR-Liganden (pro-HB-EGF, pro-Amphiregulin), Zytokine (*Tumor necrosis factor alpha*), Chemokine (CX3CL1) und Rezeptoren (*Tumor necrosis factor receptor*, *Nerve growth factor receptor*, *Low-density lipoprotein receptor*) proteolytisch zu spalten und damit sowohl die lokale Verfügbarkeit löslicher Liganden als auch die Menge funktioneller Rezeptoren zu modulieren (Murphy, 2008). Aus der großen Substratvariabilität erklärt sich ihre Beteiligung an diversen biologischen Prozessen wie der Zellproliferation, Differentiation und Migration, sowohl während der Morphogenese höherer Organismen, als auch bei der Entwicklung und Progression pathologischer Zustände wie Entzündungen (Garton, Gough *et al.*, 2006), Alzheimer (Deuss, Reiss *et al.*, 2008) und Krebs (Mochizuki and Okada, 2007). Obwohl ADAM Proteasen in vielen Krebszellen verstärkt expremiert werden, spricht die schnelle Initiation der Ligandenprozessierung für eine maßgebliche Regulation auf Ebene der post-translationalen Modifizierung. So wird beispielsweise ADAM 17 durch die *Extra-cellular signal regulated kinase* (ERK) am Threonin 735 in der zytosolischen Domäne stimulationsabhängig phosphoryliert (Diaz-Rodriguez, Montero *et al.*, 2002) und die Koexpression der Protein Tyrosin Phosphatase PHPT1 inhibiert darüber hinaus die ADAM-abhängige Ligandenprozessierung (Zheng, Schlondorff *et al.*, 2002). Aufgrund ihrer prominenten Rolle bei der autologen Freisetzung von EGFR-Liganden und dem unter schnellen Auftreten von Resistenzen gegenüber Rezeptor Tyrosinkinaseinhibitor- (Gefitinib, Erlotinib) oder Antikörperbasierten (Cetuximab, Trastuzumab) Strategien, werden zunehmend experimentelle therapeutische Ansätze zur spezifischen Hemmung von ADAM Proteasen entwickelt (Fridman, Caulder *et al.*, 2007).

## 1.5 LYSOPHOSPHATIDSÄURE (LPA)

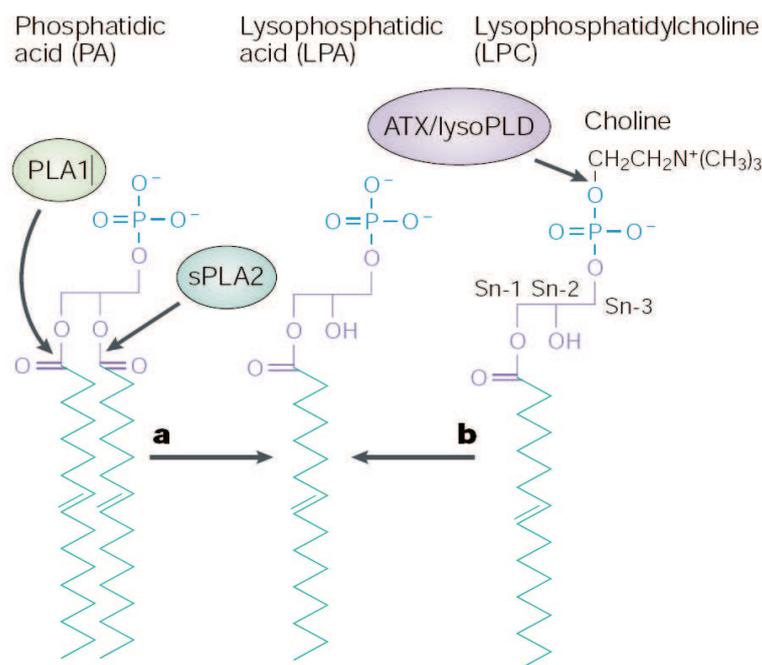
### 1.5.1 LPA Metabolismus

Lysophosphatidsäure (1- oder 2-Acyl-sn-glycerol-3-phosphat, LPA) ist ein strukturell einfaches, wasserlösliches und bioaktives Phospholipid, dass über G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) Wachstumsfaktor-ähnliche, biologische Effekte wie Zellproliferation und Migration vermittelt (van Corven, Groenink *et al.*, 1989; Radeff-Huang, Seasholtz *et al.*, 2004). LPA kommt in Körperflüssigkeiten in vergleichsweise hohen Konzentrationen (1-5  $\mu\text{M}$ ) vor und stellt eine der biologisch aktiven Hauptbestandteile des Serums dar. Die physiologische LPA-Synthese kann auf

## Einleitung

unterschiedlichen Wegen erfolgen (Abbildung 1.5-1). Die Phospholipasen PLA1 und sPLA2 sind in der Lage Phosphatidsäure durch Hydrolyse der Fettsäureesterbindung an der Position *sn*-1 oder *sn*-2 direkt in LPA-Isomere zu überführen (Fourcade, Simon *et al.*, 1995). Der überwiegende Anteil scheint jedoch nicht intrazellulär gebildet zu werden, sondern entsteht im extrazellulären Milieu durch Hydrolyse von Phospholipiden aus den Membranen aktivierter oder apoptotischer Zellen durch die sekretierte sPLA2 (Ginestra, Miceli *et al.*, 1999; Andre, Schartz *et al.*, 2002; Neidlinger, Larkin *et al.*, 2006).

Alternativ kann LPA im extrazellulären Raum durch die, von der löslichen Phosphodiesterase Lysophospholipase D / Autotaxin katalysierten Spaltung von Phosphatidylcholin synthetisiert werden (Umez-Goto, Kishi *et al.*, 2002). Enzymatisch aktives ATX wird hierfür durch proteolytische Spaltung des membrangebundenen Proenzym in den extrazellulären Raum freigesetzt.



**Abbildung 1.5-1 Biosynthese von LPA.** Darstellung möglicher Synthesewege von LPA im zellulären System. Abbildung aus Mills and Moolenaar, 2003.

Dieser Syntheseweg scheint besonders im Kontext der pathobiologischen Effekte von LPA im Rahmen der Tumorigenese von Bedeutung. Zum einen wird der LPA Vorläufer Phosphatidylcholin von einer Vielzahl unterschiedlicher Krebszelllinien sekretiert (Umez-Goto, Kishi *et al.*, 2002) und zum anderen ist das konvertierende Enzym ATX häufig überexprimiert und trägt zur parakrinen, LPA-vermittelten Zellmigration und Invasion bei (Nam, Clair *et al.*, 2000; Kishi, Okudaira *et al.*, 2006; Masuda, Nakamura *et al.*, 2008). Der extrazellulären Akkumulation von LPA wirken membrangebundene

Lipidphosphatasen (Sciorra and Morris, 2002) und lösliche Phosphatasen (Tanaka, Kishi *et al.*, 2004) entgegen, indem sie LPA dephosphorylieren und damit inaktivieren.

### 1.5.2 LPA Rezeptoren

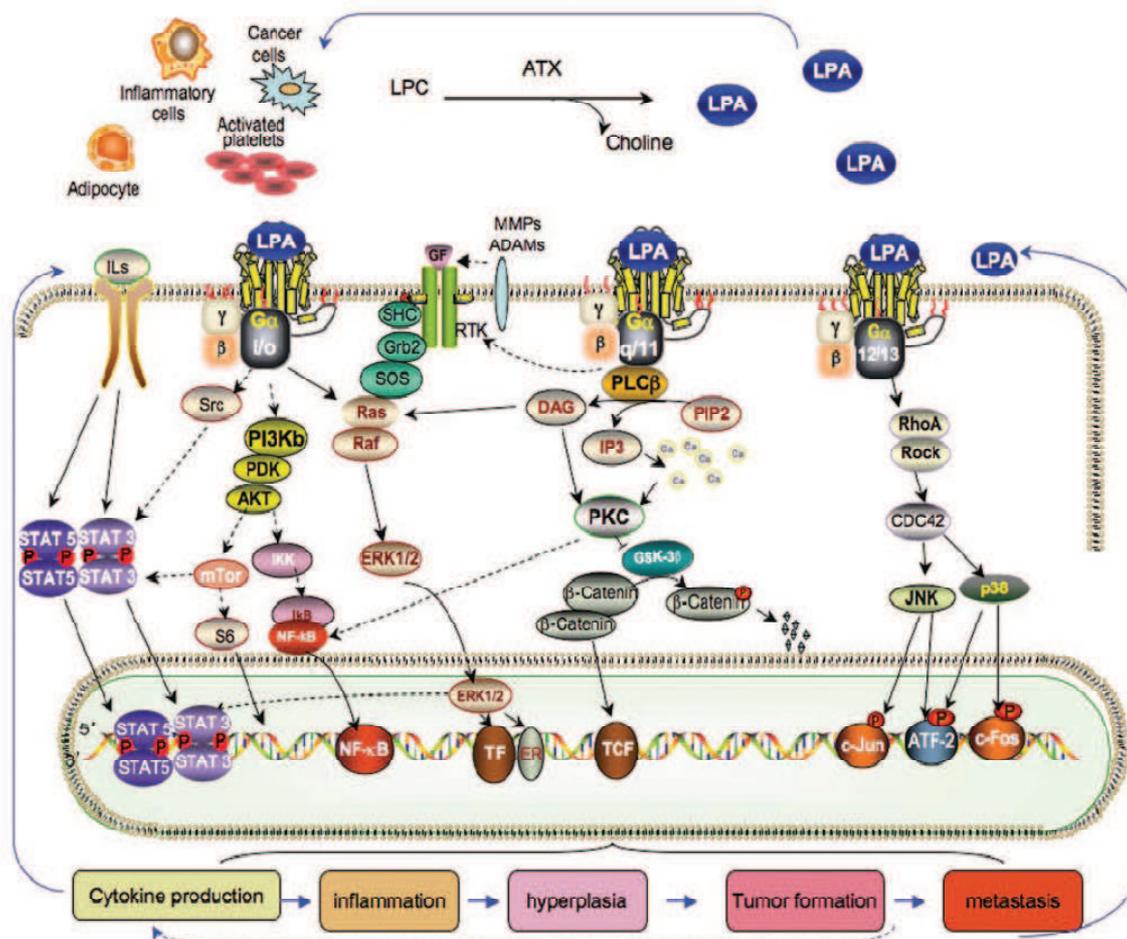
LPA-abhängige biologische Effekte werden hauptsächlich durch Bindung an heptahelikale G-Protein gekoppelte Rezeptoren vermittelt. Zum jetzigen Zeitpunkt sind insgesamt sechs *bona fide* Rezeptoren für LPA (LPA1-LPA6) bekannt (Hecht, Weiner *et al.*, 1996; An, Bleu *et al.*, 1998; Bandoh, Aoki *et al.*, 1999; Noguchi, Ishii *et al.*, 2003; Lee, Rivera *et al.*, 2006; Yanagida, Masago *et al.*, 2009). Darüber hinaus konnten jedoch noch weitere Rezeptoren wie GPR87 (Tabata, Baba *et al.*, 2007), P2Y (Murakami, Shiraishi *et al.*, 2008) und der intrazelluläre *Peroxisome proliferator-activated receptor*  $\gamma$  (PPAR $\gamma$  (McIntyre, Pontsler *et al.*, 2003)) als LPA-Rezeptoren identifiziert werden. Schon die Vielzahl unterschiedlicher Rezeptoren mit jeweils zellspezifischen Expressionsmustern und differentiellen Bindungseigenschaften für *sn-1/sn-2* mit verschiedenen Acylresten substituierten LPA-Isomeren (Bandoh, Aoki *et al.*, 2000) ermöglicht eine außerordentliche Komplexität und Variabilität der durch LPA initiierten Signalnetzwerke und der daraus resultierenden biologischen Effekte. Trotz der differentiellen Expressionsmuster von LPA1-LPA3 scheinen die drei bestcharakterisierten LPA Rezeptoren in weitgehend allen humanen Geweben expremiert zu werden und somit kooperativ an der Signaltransduktion beteiligt zu sein (Anliker and Chun, 2004). Insbesondere LPA2 und LPA3 werden jedoch außergewöhnlich stark in Krebszellen expremiert und scheinen in diesem Zusammenhang von besonderer Bedeutung (Mills and Moolenaar, 2003).

### 1.5.3 G-Protein vermittelte Signalkaskaden

Die Bindung von LPA an die zur GPCR-Familie gehörenden Rezeptoren führt zur intrazellulären Aktivierung multipler Signalkaskaden durch mindestens drei distinkte  $\alpha$ - und  $\beta\gamma$ -Untereinheitenfamilien der heterotrimeren G-Proteine ( $G_q$ ,  $G_i$  und  $G_{12/13}$ ). Die heterotrimeren G-Proteine zerfallen nach der durch den Rezeptor vermittelten Bindung von Adenosintriphosphat (ATP) in ihre aktiven  $\alpha$ - und  $\beta\gamma$ -Untereinheiten, die wiederum mit anderen zellulären Proteinen interagieren und deren Aktivität modulieren können. Nach der Hydrolyse des gebundenen ATP durch die intrinsische GTPase-Aktivität löst sich der  $G\alpha$ -GDP Komplex und es kommt zur Reassoziaton der  $G\alpha$ - und  $G\beta\gamma$ -Untereinheiten. Entsprechend dieses Aktivierungs-Inaktivierungszyklus wird die Aktivität der G-Proteine durch Guanosin-Nukleotid Austauschfaktoren (GEFs), GTPase-

aktivierende Proteine (GAPs), GDP Dissoziations-Inhibitoren (GDIs) und GPCRs reguliert. Die aktiven, GTP-gebundenen  $\alpha$ -Untereinheiten können unterschiedliche zelluläre Signalkaskaden initiieren.

So vermittelt  $G_q$  die Aktivierung von Phospholipase C, so dass es nach der Hydrolyse von Phosphatidylinositolbisphosphat ( $PIP_2$ ) zur Bildung der intrazellulären *second messenger* Inositoltrisphosphat ( $IP_3$ ) und Diacylglycerol (DAG) kommt.  $IP_3$  bewirkt eine Erhöhung der zytosolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration durch den Ausstrom von  $Ca^{2+}$ -Ionen aus intrazellulären Speichern und kooperiert dadurch mit DAG bei der Aktivierung der Proteinkinase-C Kaskade und der ERK1/2-Kaskade.



**Abbildung 1.5-2 Schematische Illustration der durch LPA initiierten Phosphorylierungskaskaden.** LPA initiiert über G-Protein gekoppelte Rezeptoren ein Reihe intrazellulärer Signalkaskaden, die ultimativ zu der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren führen. Abbildung aus Liu, Murph *et al.*, 2009.

Dahingegen bewirkt  $G_{12/13}$  die Aktivierung von RhoGEFs wie z.B. p115RHOGEF (Hart, Jiang *et al.*, 1998) oder LARG (Fukuhara, Chikumi *et al.*, 2000), sowie nachfolgend der Effektor GTPase RhoA, durch die morphologische Veränderungen des Zytoskeletts gesteuert werden. Die  $G_{12/13}$   $\alpha$ -Untereinheiten interagieren darüber hinaus mit einer Vielzahl weiterer Proteine wie Cadherin, HSP90 und die Tyrosinkinasen Btk und PYK2

(Jiang, Ma *et al.*, 1998; Shi, Sinnarajah *et al.*, 2000; Meigs, Fields *et al.*, 2001; Niu, Vaiskunaite *et al.*, 2001). Die genauen funktionellen Zusammenhänge sind dabei allerdings nur unzureichend geklärt. Zudem bewirken sie eine Aktivierung von Effektoren wie Phospholipasen, p38 und JNK MAP-Kinasen oder Transkriptionsfaktoren wie dem *Nuclear factor kappa B* (NF $\kappa$ B) ohne dass eine direkte physische Interaktion nachgewiesen werden konnte (Kelly, Casey *et al.*, 2007). Zusammengefasst steuern diese Signalwege eine Reihe (patho-) physiologischer Prozesse wie die Zelltransformation (Voyno-Yasenetskaya, Pace *et al.*, 1994), Cadherin-abhängige Zelladhäsion (Meigs, Fedor-Chaikin *et al.*, 2002), die zielgerichtete Migration (Goulimari, Kitzing *et al.*, 2005), sowie die *in vivo* Invasion (Kelly, Moeller *et al.*, 2006).

Die ebenfalls durch LPA Rezeptoren aktivierten G<sub>i</sub> Proteine inhibieren zum einen die Adenylat-Zyklase und reduzieren so die intrazelluläre cAMP Konzentration. Zum anderen aktivieren G<sub>i</sub>-Proteine sowohl die mitogen wirkende ERK1/2-Kaskade, als auch die Phosphatidylinositol-3 Kinase (PI3-K) und damit die Protein Kinase B (Akt) samt ihrer Effektoren (Abbildung 1.5-2). Weiterhin kann es durch die G<sub>i</sub>-vermittelte Aktivierung von SRC Tyrosinkinasen (Ma, Huang *et al.*, 2000) zur aktivierenden Phosphorylierung von STAT Transkriptionsfaktoren (Cao, Tay *et al.*, 1996) kommen.

### 1.5.4 EGFR Transaktivierung

Neben den G-Protein abhängigen Signalwegen, ist die GPCR-vermittelte Transaktivierung von Mitgliedern des Epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptors (EGFR) ein essentieller Aspekt der LPA-induzierten Signaltransduktion. Bei dem erstmals von Daub *et al.* (Daub, Weiss *et al.*, 1996) beschriebenen Prozess kommt es zu einer GPCR-abhängigen Aktivierung von Mitgliedern der EGFR-Familie. Die mechanistische Grundlage der EGFR-Transaktivierung war Gegenstand intensiver Forschung und konnte bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht abschließend beantwortet werden. Die ersten mechanistischen Erkenntnisse ergaben sich aus differentiellen Effekten von Pertussis-Toxin (PTX) auf die LPA- und Thrombin-induzierte EGFR-Transaktivierung in COS-7 Zellen. Diese Experimente ließen auf eine Agonisten-abhängige Beteiligung PTX-sensitiver G $\alpha_{i/o}$  und PTX-insensitiver G $\alpha$ -Untereinheiten schließen (Daub, Wallasch *et al.*, 1997). Initial wurde aufgrund der schnellen Transaktivierungskinetik eine ausschließlich intrazelluläre Signalübertragung vom GPCR zum EGFR vorgeschlagen. Aus Studien mit chimären Fusionskonstrukten, bestehend aus der extrazellulären

Domäne des EGFR, der intrazellulären Domäne des *Platelet-derived growth factor receptor* (PDGFR) und Metalloproteaseinhibitoren (Batimastat) ergab sich jedoch die Erkenntnis, dass der Transaktivierungsprozess abhängig von der parakrinen Wirkung extrazellulärer EGFR Liganden und deren proteolytischer Prozessierung durch Matrix-Metalloproteasen ist (Prenzel, Zwick *et al.*, 1999). Es wurde daraufhin das Konzept des *Triple Membrane Passing Signal* (TMPS) entwickelt. Dieses Modell geht von der GPCR-abhängigen Aktivierung membrangebundener Metalloproteasen der ADAM Familie aus. Diese spalten ebenfalls membrangebundene Pro-Formen von EGFR-Liganden wie HB-EGF, Amphiregulin (Gschwind, Hart *et al.*, 2003) oder TGF- $\alpha$  (Pai, Soreghan *et al.*, 2002), woraufhin diese freigesetzt werden und parakrin oder autokrin EGF-Rezeptoren aktivieren. Je nach zellulärem Modellsystem können dabei verschiedene Mitglieder der ADAM-Familie an der Prozessierung unterschiedlicher EGFR-Liganden beteiligt sein (Schafer, Gschwind *et al.*, 2004). So spaltet beispielsweise ADAM15 im Rahmen der Transaktivierung in TccSup Blasenkarzinomzellen TGF- $\alpha$  und ADAM17 in A498 Nierenkarzinomzellen Pro-HB-EGF, während in SCC-9 Zellen präferentiell Amphiregulin als ADAM17 Substrat dient (Gschwind, Hart *et al.*, 2003). Auf diesem Weg stimulieren GPCR Agonisten pathologisch relevante Prozesse wie Zellproliferation (Schafer, Marg *et al.*, 2004), Migration und Invasion (Schafer, Gschwind *et al.*, 2004) unter Einbeziehung von Metalloproteasen und EGF-Rezeptoren. Darüber hinaus konnten Untersuchungen zeigen, dass das Konzept des TMPS nicht allein auf den EGFR beschränkt ist. So konnte ebenfalls die Transaktivierung anderer Rezeptor Tyrosinkinasen, wie dem PDGFR (Herrlich, Daub *et al.*, 1998) und dem *Vascular endothelial cell growth factor receptor* (VEGFR) (Endo, Nagashima *et al.*, 2002), nachgewiesen werden. Zusätzlich zu dem oben beschriebenen, Proteasen-abhängigen Mechanismus kann es nach Agonistenstimulation von G<sub>i</sub>-gekoppelten Rezeptoren auch zu einer, von  $\beta\gamma$ -Untereinheiten abhängigen, und durch SRC-Kinasen mediierten Tyrosinphosphorylierung des EGFR kommen (Luttrell, Della Rocca *et al.*, 1997), deren Bedeutung für den Transaktivierungsprozess jedoch nicht abschließend geklärt ist.

### 1.6 TECHNOLOGISCHE ASPEKTE

Während für umfassende Analysen der Genexpression auf mRNA-Ebene etablierte und Hochdurchsatz-fähige Arraytechnologien zur Verfügung stehen, werden für Untersuchungen auf Protein- und insbesondere Proteinmodifikationsebene technisch aufwendige und häufig noch in der Entwicklung begriffene Technologien benötigt.

Grundsätzlich lassen sich zwei technologisch unterschiedliche Ansätze voneinander abgrenzen. Zum einen klassische, Antikörper-basierte Technologien, wie das *Western-Blotting* und Proteinarray- oder ELISA-Technologien für die (semi-)quantitative und durch *a priori* Kenntnis gestützte Analyse einer begrenzten Anzahl an (modifizierten) Proteinen mit sehr hohen Sensitivitäten. Zum anderen die massenspektrometrischen Methoden, die je nach Implementierung eine Hypothesen-freie, quantitative und parallele Analyse großer Teile des (Phospho-) Proteoms ermöglichen.

### 1.6.1 Analyse von Phosphorylierungsereignissen

Zur Identifikation von Phosphorylierungsstellen wurden in der Vergangenheit in der Regel arbeitsaufwändige, und dadurch in ihrem Probendurchsatz stark limitierte Techniken angewandt. Nach einer *in vitro* oder *in vivo* Phosphorylierung von Proteinen in Gegenwart von radioaktiv ( $^{32}\text{P}$ ) markiertem Adenosintriphosphat (ATP) konnten die phosphorylierten Proteine durch Peptide-Mapping analysiert und die Primärsequenz phosphorylierter Peptide mittels Edman-Abbau ermittelt werden. Zur experimentellen Validierung und genauen Lokalisation der Phosphorylierungsstelle wurden dann die in Frage kommenden Aminosäuren durch *site-directed* Mutagenese gegen nicht phosphorylierbare Aminosäuren ausgetauscht (van der Geer and Hunter, 1994; Johnson and Hunter, 2005).

Durch die Entwicklung von, auf Phosphoepitop-spezifischen Antikörpern basierenden, Technologien konnte die Identifikation von Phosphorylierungsereignissen in Zell- oder Gewebeextrakten parallelisiert, automatisiert und damit Hochdurchsatz-fähig gemacht werden (Chan, Ermann *et al.*, 2004). Nachteilig bei diesen Ansätzen ist jedoch, dass stets ein dezidiertes *a priori* Wissen über die zu untersuchenden Signalwege erforderlich ist und dadurch die Aufdeckung unerwarteter Zusammenhänge oder unbekannter Phosphorylierungsstellen unwahrscheinlich ist. Zudem ist die Technologie durch die Verfügbarkeit und erforderliche Spezifität der verwendeten Antikörper auf wenige Phosphorylierungsstellen / Signalkomponenten (in der zitierten Studie 62) limitiert. Dahingegen haben die erst seit wenigen Jahren verfügbaren technischen und methodischen Entwicklungen im Bereich der Massenspektrometrie und Bioinformatik die routinemäßige und simultane Identifikation von mehreren hundert bis tausend Phosphorylierungsstellen aus biologischen Proben ermöglicht und damit das schnell expandierende Forschungsgebiet der zellulären Phosphoproteomik eröffnet. Durch stetige und andauernde Prozessoptimierung sowie durch die Umsetzung methodischer

und instrumenteller Innovationen scheint das Potential der massenspektrometrischen Phosphorylierungsanalyse zum jetzigen Zeitpunkt bei weitem noch nicht ausgeschöpft.

### **1.7 MASSENSPEKTROMETRIE VON PEPTIDEN**

Massenspektrometer dienen der schnellen und genauen Bestimmung der Masse zu Ladungsverhältnisse ( $m/z$ ) von Gasphase-Ionen. Für eine Analyse müssen die Analyten daher zunächst in die Gasphase überführt und ionisiert werden. Je nach Instrumententyp werden die Ionen anschließend im Vakuum durch elektrische Felder entsprechend ihrer  $m/z$ -Werte aufgetrennt und sukzessive detektiert (Ionenfallen, Flugzeit-Massenspektrometer) oder die  $m/z$ -Werte aller Ionen parallel durch Fouriertransformation ihrer Oszillationsfrequenzen in elektrischen oder magnetischen Feldern analysiert (*Fourier-Transformation Ion Cyclotron Resonance*, Orbitrap).

#### **1.7.1 Ionisationsmethoden**

Die klassischen Ionisationsmethoden, wie z. B. die chemische Ionisation, sind auf Analyten in der Gasphase angewiesen. Da es sich bei großen Biomolekülen wie Proteinen, Nukleinsäuren oder Peptiden um nicht-flüchtige Substanzen handelt, die bei Erhitzung zum Zerfall oder chemischen Umlagerungen neigen, wurden sogenannte „weiche“ Ionisationsmethoden entwickelt, die eine massenspektrometrische Analyse von großen Biomolekülen ermöglichen. Grundlage vieler Methoden zur zerstörungswarmen Ionisation ist die Zuführung der Ionisationsenergie binnen eines kurzen Zeitraumes, so dass Zerfalls- oder Umlagerungsereignisse kinetisch limitiert werden. Dieses Prinzip liegt unter anderem dem *Fast Ion / Atom Bombardement* (FIB / FAB) und der Laser-Desorption zugrunde (LD / MALDI).

##### **1.7.1.1 Laser Desorption**

Laser sind aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften hervorragend geeignet um eine definierte Ionisationsenergie in kurzer Zeit auf die Probe zu übertragen. Bei der Laser Desorption wird die Probe im Vakuum durch Laserpulse verdampft und gleichzeitig ionisiert. In einer Weiterentwicklung dieser Technik, der *Matrix Assisted Laser Dissociation And Ionisation* (MALDI) wird dieser Prozess durch die Einbettung der Analyten in eine geeignete Matrix (z. B. aus 2,5-Dihydroxybenzoesäure) mittels Kokristallisation unterstützt. Diese Ionisationsmethode erzeugt vornehmlich einfach geladene Ionen und ist aufgrund der gepulsten Arbeitsweise besonders für die Kombination mit zeitbasierten Masseanalysatoren wie z.B. Flugzeit-Massenspektrometern geeignet. Da jedoch im Gegensatz zu kontinuierlichen Verfahren

keine direkte Kopplung an Chromatographiesysteme möglich ist, müssen komplexe Proben in der Regel zunächst in einem separaten Arbeitsschritt fraktioniert werden.

Eine interessante Anwendung der MALDI Technologie im Bereich der Proteomik ergibt sich aus der Möglichkeit zweidimensional strukturierte Proben, wie z. B. Gewebeschnitte, mit dem Laser gezielt abzutasten und so die massenspektrometrischen Daten mit örtlichen Informationen zu komplettieren. Aus diesen verknüpften Daten lässt sich z.B. die Proteinverteilungen in Geweben zweidimensional kartieren (Stoeckli, Chaurand *et al.*, 2001).

### **1.7.1.2 Elektrospray Ionisation**

Das Prinzip der Elektrospray-Ionisation geht auf Arbeiten von M. Dole *et al.* zur Bestimmung von Makromolekülmassen zurück (Clegg and Dole, 1971). Es beruht auf der zunehmenden Desolvatisierung von geladenen Lösungsmitteltropfen in einem äußeren elektrischen Feld. Der in einem Lösungsmittel vorliegende Analyt wird, bezogen auf den Einlass des Massenspektrometers, auf ein elektrisches Potential von einigen tausend Volt gebracht und direkt vor diesem durch eine Kapillare oder Nadel freigesetzt. Durch das elektrische Feld kommt es an der Spitze der Kapillare zur Ausbildung eines sog. Taylor-Kegels, aus dem ein feiner Strahl aus dem Lösungsmittel austritt und unmittelbar danach in ein Aerosol zerfällt. Die geladenen Tropfen werden durch elektrostatische Felder beschleunigt und durch eine, mitunter beheizte, Kapillare in die erste Vakuumkammer des Massenspektrometers geleitet. Durch das Verdampfen von Teilen des Lösungsmittels erhöht sich die Ladungsdichte in jedem Aerosoltropfen, bis die Coulomb-Abstoßung der Oberflächenspannung des Tropfens entspricht (Raleigh Kriterium) und es zum Zerreißen der Tropfen kommt, wobei das Verhältnis von Masseverlust zu Ladungsverlust stark vom verwendeten Lösungsmittel abhängig ist (Dequiedt, Van Lint *et al.*, 2005). Dieser Prozess wiederholt sich nach dem Ionen-Evaporationsmodell (*Ion Evaporation Model*) von Iribarne und Thomson bis zur Desorption von solvatisierten Analytionen (*quasi-molekulare Ionen*), die entsprechend ihrer Ladung durch elektrische Felder beschleunigt und in das Massenspektrometer geleitet werden. Im Gegensatz hierzu schlug M. Dole das Modell des geladenen Rückstands (*Charged Residue Model*) vor, welches die Entstehung von Gasphasen-Ionen durch fortschreitende Lösungsmittelvevaporation und Zerreißen der Lösungsmitteltropfen, bis schließlich im Mittel nur noch ein Analytmolekül pro Tropfen enthalten ist, beschreibt. Nach der Desolvatisierung blieben nach dieser Theorie die ursprünglich im Tropfen verteilten Ladungen auf dem Analytion zurück (Dole, Mach *et*

*al.*, 1968). Obwohl der Prozess bis heute nicht abschließend aufgeklärt ist, bestätigen neuere Untersuchungen das Ionen Evaporationsmodell (Nguyen and Fenn, 2007).

Im Gegensatz zu den vorangehend angeführten Ionisationsmethoden wie LD / MALDI oder FAB handelt es sich bei der Elektrospray Ionisation um eine kontinuierliche Methode zur Erzeugung von Gasphasen-Ionen. Für die Analyse von komplexen Phosphopeptidgemischen (wie sie in globalen, zellulären Phosphorylierungsstudien vorkommen) hat sich die kontinuierlich Ionisation durch ESI durchgesetzt, da sie die direkte Kopplung einer performanten Umkehrphasen-Flüssigkeitschromatographie im Nanoliter-Maßstab an das Massenspektrometer ermöglicht und darüber hinaus vorwiegend, für die Peptidfragmentierung in MS/MS-Experimenten vorteilhafte, mehrfach geladene Peptide entstehen. (Fenn, Mann *et al.*, 1989)

### 1.7.2 Masseanalytoren

Die Masse/Ladungs-Verhältnisse der ionisierten und in Gasphase vorliegenden Ionen können über verschiedene Messgrößen ermittelt werden. So nutzen Sektorfeldinstrumente die Flugbahnablenkung geladener Teilchen im magnetischen oder elektrischen Feld und berechnen  $m/z$ -Verhältnisse aus der Ortsinformation des Auftreffens der Ionen während andere Methoden auf der Messung der Geschwindigkeit, Flugbahnstabilität oder Umlauffrequenz beruhen. Im Folgenden sollen die für Proteomikanwendungen gebräuchlichsten drei Methoden kurz erläutert werden. Gemeinsam ist allen Ansätzen, dass die eigentliche Messgröße nicht die Ionenmasse, sondern das Masse zu Ladungsverhältnis ( $m/z$ ) ist. Aus diesem kann, bei Kenntnis des Ladungszustandes, z.B. durch Bestimmung der  $m/z$ -Differenz zu bekannten Isotopensignalen, die Ionenmasse berechnet werden.

### 1.7.2.1 *Flugzeit-Massenspektrometrie*

Grundlage der Bestimmung des  $m/z$ -Verhältnis ist die Umwandlung der potentiellen Energie der Ionen im elektrischen Feld

$$E_p = Q * z$$

( $E_p$  potentielle Energie,  $Q$  Potential des elektrischen Feldes,  $z$  Ladung des Ions)

in kinetische Energie.

$$E_k = \frac{mv^2}{2}$$

( $E_k$  kinetisch Energie,  $m$  Masse des Ions,  $v$  Geschwindigkeit des Ions)

Daraus ergibt sich für die Messgröße:

$$m/z = \frac{2Q}{v^2}$$

Die Ionen werden in einem elektrischen Feld mit bekanntem Potential beschleunigt und durchfliegen dann eine potentialfreie, evakuierte Strecke zum Detektor (in der Regel einem Sekundärelektronenvervielfacher). Durch einfache Flugzeitmessung kann das  $m/z$  Verhältnis der Ionen bestimmt werden. Da die Verdampfung der Matrix/Analyt-Mischung bei MALDI-Ionisation explosionsartig verläuft und die Ionen dementsprechend unterschiedliche Anfangsenergien aufweisen, wird das Beschleunigungsfeld häufig erst nach Ablauf einer Verzögerungszeit nach dem Laserpuls aktiviert. Die Auflösung der Instrumente kann darüber hinaus auch durch den Einsatz eines Ionenreflektors erhöht werden. Dadurch werden Unterschiede im Energiegehalt der Ionen besser ausgeglichen und zudem die Flugstrecke verlängert. Die Genauigkeit moderner Instrumente liegt im Bereich von  $\sim 5$  ppm und der analysierbare Massenbereich ist theoretisch nicht begrenzt (Williams, Flanagan *et al.*, 2003). Im Vergleich zu Ionenfallen-Massenspektrometern ist die benötigte Akquisitionszeit für den gesamten  $m/z$ -Bereich sehr kurz. Auch wenn klassischerweise gepulste Ionenquellen mit der Flugzeit-Massenspektrometrie kombiniert wurden, so lassen sich bei Nutzung der orthogonalen Beschleunigung ebenso kontinuierlichen Ionisationsmethoden wie ESI einsetzen.

### 1.7.2.2 *Quadrupol Massenfilter*

Quadrupole bestehen aus vier parallelen, im Abstand von  $r$  rotationssymmetrisch um eine Zentralachse angeordneten, Elektroden. Durch das Anlegen einer, mit einer hochfrequenten Wechselspannung überlagerten, Gleichspannung an die beiden jeweils gegenüberliegenden Elektroden entsteht ein alternierendes elektrisches Feld in dem

## Einleitung

Ionen eines definierten  $m/z$ -Bereichs oszillieren, ohne auf die Elektroden zu treffen. Die Stabilität von Ionen im Quadrupol kann mit der Mathieu Differentialgleichung beschrieben werden.

Die beiden dimensionslosen Parameter  $a$  und  $q$ , mit

$$a = \frac{4Uze}{mr^2\omega^2} \text{ und } q = \frac{2Aze}{mr^2\omega^2}$$

( $U$  Amplitude der Gleichspannung,  $A$  Amplitude der Wechselspannung,  $\omega$  Wechselspannungsfrequenz)

bestimmen, unter welchen Bedingungen sich die Ionen eines gegebenen  $m/z$ -Bereiches auf stabilen Trajektorien (Flugbahnen) durch den Quadrupol bewegen und zum Detektor gelangen können (Abbildung 1.7-1). In vielen Hybrid-Massenspektrometern dienen Quadrupole der Fokussierung des Ionenstrahls oder bei erhöhtem Gasdruck auch als Kollisionszellen zur Fragmentierung selektierter Ionen im Rahmen von Tandem-MS Analysen.

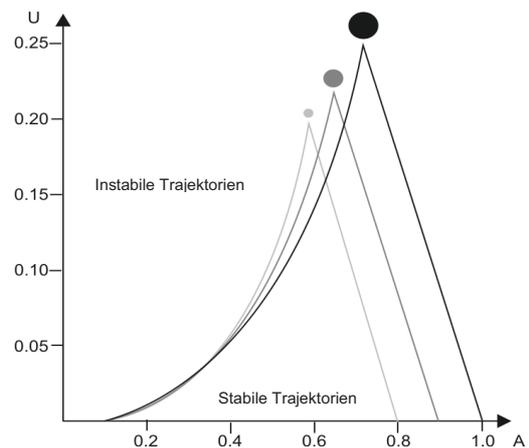


Abbildung 1.7-1 Ionen-Stabilitätsdiagramm von Quadrupol-Massenfiltern.

### 1.7.2.3 Ionenfallen

Mit Hilfe von Ionenfallen lassen sich, im Gegensatz zu Quadrupolen, Populationen von Analytionen speichern, manipulieren und selektiv entsprechend der  $m/z$ -Verhältnisse zur Detektion ausgeben. Im einfachsten Fall können Ionenfallen natürlich auch als  $m/z$  Filter geschaltet werden. Es lassen sich im Wesentlichen drei Typen voneinander unterscheiden:

Quadrupol-3D-Ionenfallen bestehen aus einer ringförmigen Elektrode und zwei Endkappenelektroden. Durch die Beschaltung der Elektroden mit einem Gleichspannungs- und Wechselspannungsanteil entsteht ein dreidimensionales elektrisches Feld in dem nur Ionen eines  $m/z$ -Bereichs eingefangen werden. Durch die Variation der Gleich und Wechselspannungsanteile können Ionen bestimmter  $m/z$ -Verhältnisse in der dreidimensionalen Falle gehalten, oder selektiv ausgestoßen werden. Lineare Quadrupol-Ionenfallen ähneln in ihrem Aufbau den Quadrupol Massenfiltern mit zwei zusätzlichen Potentialsperrern am Ein- und Ausgang.

Im Unterschied zu den 3-D Ionenfallen ist das elektrische Feld zweidimensional, wodurch die Ionen axial auf der ganzen Länge der Falle verteilt werden. Dadurch können größere Speicherkapazitäten und gesteigerte Sensitivitäten erzielt werden. Zudem lassen sich gleichzeitig Raumladungseffekte durch die gegenseitige

## Einleitung

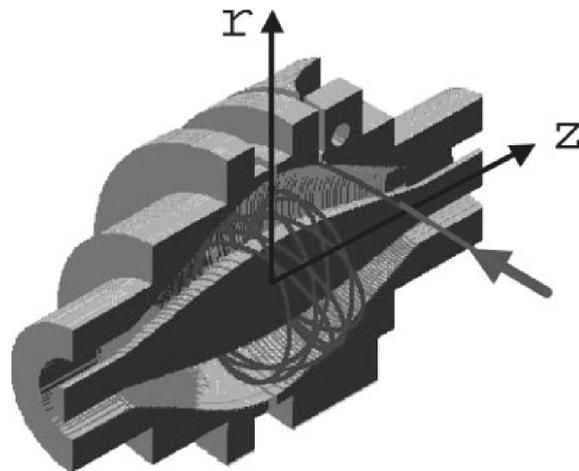
Beeinflussung räumlich dicht gedrängter Ionen, wie sie in 3-D Ionenfallen häufig auftreten, reduzieren. Die Ionen können sowohl axial, als auch radial in zwei Richtungen aus der Falle entlassen werden. Zur Detektion werden in der Regel zwei Sekundärionenvervielfacher (SEM), einer auf jeder Seite der Ionenfalle, verwendet.

Ein gänzlich anderes Detektionsprinzip liegt den Fouriertransformations-Ionenzyklotron Massenspektrometern zugrunde. Bei diesen Instrumenten werden die Ionen in einer Penningfalle mittels statischer, elektrischer Felder und einem starken und homogenen, axialen Magnetfeld auf Kreisbahnen gezwungen (Marshall, Hendrickson *et al.*, 1998). Im idealisierten Fall ist die Umlauffrequenz (Zyklotronfrequenz) eines Ions eine Funktion der Magnetfeldstärke und des  $m/z$ -Verhältnisses.

$$f = \frac{zB_0}{2\pi m}$$

( $B_0$  Magnetfeldstärke,  $f$  Umlauffrequenz)

In der Praxis wird die Zyklotronfrequenz jedoch durch die kreisförmige Bewegung der Ionen um das Zentrum der Penningfalle mit der Magnetronfrequenz überlagert. Darüber hinaus oszillieren die Ionen auch in axialer Richtung zwischen den beiden gleichgeladenen Endkappen der Ionenfalle. Durch Anlegen eines oszillierenden elektrischen Feldes werden Ionen für die die Resonanzbedingungen erfüllt sind angeregt und zu räumlich kohärenten



**Abbildung 1.7-2** Dreidimensionaler Konstruktionsaufriß der Orbitrap. Exemplarische Ionentrajektorien sind als Pfeile dargestellt. Abbildung aus Hu, Noll *et al.*, 2005.

Ionenpaketen gebündelt. Um eine gleichmäßige Anregung von Ionen eines  $m/z$ -Bereichs zu erreichen, wird üblicherweise ein Anregungspuls in Form eines invers-fouriertransformierten Breitbandsignals verwendet. Die durch die Anregung gebildeten Ionenpakete induzieren Ströme in den Detektorplatten (ICR Signal). Die Umlauffrequenzen und damit auch die  $m/z$ -Verhältnisse erhält man durch Überführung des in der Zeitdomäne gemessenen ICR Signals in die Frequenzdomäne mittels Fouriertransformation. FT-ICR Spektrometer liefern enorme Auflösungen bis zu 2.000.000 und sehr gute Massengenauigkeiten im sub-ppm Bereich. Allerdings ist die Detektionssensitivität im Vergleich zu Ionenfallen oder Flugzeit-Massenspektrometern

gering. Zudem ist der Betrieb der benötigten kontinuierlichen Heliumkühlung für die supraleitenden Elektromagneten technisch aufwendig und steht einer weiten allgemeinen Verbreitung entgegen. Dieser Nachteil wird durch die neuste Entwicklung auf dem Gebiet der Massenspektrometer umgangen, indem elektrische statt magnetische Felder eingesetzt werden (Makarov, 2000; Hu, Noll et al., 2005). Orbitrap Instrumente verfügen über eine Fass-förmige Ionenfalle in der sich die tangential eingeleiteten Ionenpakete auf spindelförmigen Bahnen um eine zentrale, axiale Elektrode bewegen (Abbildung 1.7-2). Die Bewegung resultiert aus der radialen Rotation der Ionen um und ihrer harmonischen, axialen Oszillation entlang der Zentralelektrode. Dabei wird die elektrostatische Anziehung zwischen den Ionen und der Zentralelektrode durch die Zentrifugalkraft ausgeglichen. Entsprechend den FT-ICR Geräten werden die Massenspektren durch schnelle Fouriertransformation der in den Detektorplatten induzierten Stromtransienten in der Zeitdomäne berechnet (Senko, Canterbury *et al.*, 1996). Die hervorragende Massengenauigkeit (sub-ppm) und eine mit 8 Tesla FT-ICR Geräten vergleichbare Auflösung in Kombination mit dem unproblematischen Betrieb und der kompakten Bauform haben zur großen Verbreitung der Orbitrap Instrumente beigetragen.

### 1.7.3 (Phospho-) Peptididentifikation

Zur verlässlichen Identifikation eines Peptids ist die genaue Bestimmung der Peptidmasse nicht hinreichend. Selbst bei einer relativ hohen Messgenauigkeit von 5 ppm kommen bei einfachen Organismen mit kleinen Proteomen, wie z. B. *Escherichia coli*, im Durchschnitt noch etwa sieben Peptide für einen bestimmten

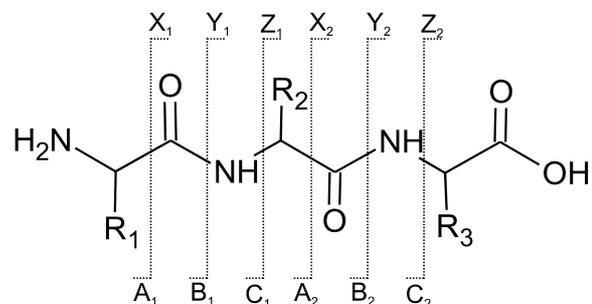


Abbildung 1.7-3 Darstellung möglicher Peptidfragmentierungen.

Messwert in Frage (Silva, Denny *et al.*, 2005). Aus diesem Umstand lässt sich ableiten, dass für komplexer strukturierte Organismen wie *Homo sapiens* oder *Mus musculus* auch eine Messgenauigkeit im sub-ppm Bereich für die sichere Identifikation eines tryptischen Peptids in den meisten Fällen nicht ausreichend ist. Um die Informationsdichte über ein Peptid zu erhöhen und darüber hinaus auch post-translationale Modifikationen innerhalb des Peptids lokalisieren zu können, bedient man sich daher unterschiedlicher Fragmentierungstechniken. Bei der in der Proteomik

gebräuchlichsten Technik, der Kollisions-aktivierten Dissoziation (CAD), werden selektierte Vorläuferionen im angeregten Zustand durch Kollisionsereignisse mit Gasmolekülen (typischerweise Stickstoff, Helium oder Argon) fragmentiert. Die Kollisionsenergie führt in den meisten Fällen zur Auftrennung von Peptidbindungen, so dass zwei Reihen unterschiedlicher Fragmentationen (b- und y-Ionen, Abbildung 1.7-3) entstehen (Roepstorff and Fohlman, 1984). Da die Fragmentierung entlang der Peptidrückrats erfolgt, unterscheiden sich die theoretischen Fragmente durch die Masse einer Aminosäure. Im Idealfall lässt sich also durch den Nachweis durchgängiger Fragmentationenreihen eine *de novo* Sequenzierung von Peptiden und eine Zuordnung phosphorylierter Aminosäuren durch die Bestimmung der Massendifferenzen durchführen. Unter praktischen Bedingungen tritt dieser Fall jedoch nur selten ein, da die Fragmentierungsmuster bei CAD-basierten Methoden von der Aminosäuresequenz und post-translationalen Modifikationen abhängig sind, so dass zur Peptididentifikation statistische Methoden, wie der Abgleich der Tandem MS Spektren mit *in silico* generierten Peptidatenbanken, angewendet werden. Indem der jeweils verwendeten Datenbank invertierte Sequenzen eines jeden theoretischen tryptischen Peptids hinzugefügt werden, wird die Abschätzung des Anteils falsch positiv identifizierter Peptide (*false-discovery rate*, FDR) über den gesamten Datensatz ermöglicht. Durch die anschließende Anwendung geeigneter Filterkriterien, wie z. B. der Masseabweichung oder dem Suchpunktwert (*search score*), wird die zulässige FDR auf typischerweise auf einen Wert von 1% begrenzt (Elias, Haas *et al.*, 2005; Olsen, Blagoev *et al.*, 2006; Elias and Gygi, 2007). Aus der präferentiell auftretenden  $\beta$ -Eliminierung von Phosphorsäure aus Serin- oder Threonin-phosphorylierten Peptiden unter CAD Bedingungen ergibt sich jedoch eine Problematik für die Anwendung dieser Technik zur Phosphopeptidanalyse. Dem damit einhergehenden Informationsverlust auf MS<sup>2</sup> Ebene kann durch eine weitere MS<sup>3</sup> Fragmentierung des Eliminierungsproduktes oder pseudo-MS<sup>3</sup> ohne vorherige Ionenisolation durch sogenannte *multistage activation* begegnet werden (Olsen and Mann, 2004; Schroeder, Shabanowitz *et al.*, 2004). Durch den Abgleich der so generierten Fragmentationen mit den, aus dem Zerfall putativer Vorläuferionen erwarteten Ionenmassen, kann die Wahrscheinlichkeit einer nicht-zufälligen Beobachtung berechnet werden.

Die  $\beta$ -Eliminierung kann darüber hinaus durch den Einsatz alternativer Fragmentierungstechniken wie der *Electron Capture Dissociation* (ECD) oder *Electron Transfer Dissociation* (ETD) umgangen werden. Bei beiden Methoden werden

Elektronen auf mehrfach positiv geladene Gasphasenionen übertragen. Die entstehenden Radikalkationen zerfallen daraufhin unter weitgehendem Erhalt labiler post-translationaler Modifikationen, wobei häufig durchgängige C- und Z-Ionenreihen mit jedoch, im Verhältnis zu CAD, reduzierten Intensitäten (Mikesh, Ueberheide *et al.*, 2006) gebildet werden. Während bei ECD der Einsatz freier, niederenergetischer Elektronen die Anwendung auf FT-ICR Instrumente beschränkt (Zubarev, Horn *et al.*, 2000), werden bei ETD Radikalanionen als Elektronenquelle genutzt. Dadurch kann diese Technik auch auf Ionenfallen-Instrumenten implementiert werden und eröffnet somit ein weites Anwendungsgebiet (Syka, Coon *et al.*, 2004). Eine Kombination aus ETD und CAD wurde kürzlich implementiert und nutzt synergistische Effekte beider Fragmentierungstechniken. Während ETD gut zur Fragmentierung vielfach geladener, langer Peptide geeignet ist, wurde konventionelle CAD zur effizienten Fragmentierung kürzerer, zweifach geladener Peptide genutzt (Swaney, McAlister *et al.*, 2007; Wu, Huhmer *et al.*, 2007).

Die umfassende massenspektrometrische Identifikation von Phosphopeptiden aus biologischen Proben und mehr noch die statistisch verlässliche Lokalisation der Phosphatgruppe(n) innerhalb der Peptide wurde erst in den letzten Jahren durch die Entwicklung und kommerzielle Verfügbarkeit von Hybrid-Massenspektrometern ermöglicht. Bei diesen Geräten werden in der Regel zwei unterschiedliche Massenspektrometer so kombiniert, dass sich aus ihren spezifischen technischen Eigenschaften möglichst große Synergien ergeben. In kommerziellen Geräten werden (je nach Konzept und Hersteller) z. B. drei seriell angeordnete, lineare Ionenfallen (Triple-Quadrupole QSTAR, Applied Biosystems), Quadrupol-Ionenfallen mit Flugzeit-Massenanalytoren (Q-TOF, Waters), oder eine lineare Ionenfallen mit einem FT-ICR bzw. Orbitrap-Massenanalytator (Thermo Scientific) kombiniert. Basierend auf diesen gerätetechnischen Konzepten wurden spezifische Methoden zur (Phospho-) Peptidanalyse entwickelt. So eignen sich die genannten Triple-Quadrupol Spektrometer durch ihre *neutral loss scanning* Fähigkeit gut für Hypothesen-freie Phosphopeptid-Analysen. Mit dieser Methode werden phosphorylierte Peptide durch den ladungsneutralen Verlust von Phosphorsäure (98 g/mol) detektiert. Im Gegensatz hierzu ermöglichen *multiple-reaction monitoring* (MRM) Methoden den hochsensitiven und reproduzierbaren Nachweis von Phosphopeptiden mit bekannten MRM-Übergängen (Unwin, Griffiths *et al.*, 2005). Die höhere Massengenauigkeit von Q-TOF Geräten wird von MS<sup>c</sup>-Methoden für die Analyse von Vorläufer- und Fragmenten genutzt, wobei

## Einleitung

---

die Vorläuferionen zur Verringerung der Zyklusdauer ohne vorherige Isolation fragmentiert werden. Die einzelnen Fragmentionen können anschließend durch Dekonvolution der Ionenintensitätsprofile den im MS-Modus gemessenen Vorläuferionen zugeordnet werden (Silva, Denny et al., 2005; Silva, Gorenstein *et al.*, 2006). Die letztgenannten FT-ICR / Orbitrap-Hybridinstrumente ermöglichen eine partiell parallelisierte Akquisition von MS-Übersichtsspektren in der Orbitrap und MS/MS-Fragmentierungsspektren selektierter Ionen in der linearen Ionenfalle. Durch diese Vorgehensweise lassen sich, auf Kosten geringerer Fragmentionen-Massengenauigkeit wesentlich höhere Sensitivitäten und kürzere Arbeitszyklen realisieren (Olsen, Blagoev et al., 2006). Hiervon profitieren wiederum hochauflösende nano-LC-MS Anwendungen, da auch schnell nacheinander eluierende Peptide separat analysiert werden können, bzw. die erhöhte Abtastfrequenz bei quantitativen SILAC Anwendungen eine verbesserte Peptidquantifizierung ermöglicht. Bei kurzen Zykluszeiten, wie sie von den oben genannten Instrumenten erreicht werden, ist zudem der Einsatz dynamischer Ausschlusslisten hilfreich, um eine wiederholte Fragmentierung gleicher Ionen zu vermeiden. Hierbei werden vom Spektrometer fragmentierte Ionen für eine definierte Zeit, oder bis zum Unterschreiten einer Intensitätsschwelle, von einer erneuten Fragmentierung ausgeschlossen. Dadurch kann die Identifikation niedrigabundanter (Phospho-) Peptide substantiell verbessert werden. Ein Nachteil bei der Verwendung von Ionenfallen und CAD zur Akquisition von MS<sup>2</sup> Spektren liegt in der geringen Stabilität von Ionen mit kleinen m/z-Verhältnissen und der daraus resultierenden Einschränkung bei der Detektion von kleinen, schwach geladenen Fragmentionen parallel zu großen Peptidionen (1/3 m/z-Regel). Diese Limitation betrifft weniger die kleinen N-, oder C-terminalen Peptide einer Serie, da die fehlende Information durch die hochmolekularen Fragmente der jeweils anderen Serie komplementiert werden können, als vielmehr den Nachweis von niedermolekularen Reporterionen wie z.B. den ITRAQ-Labels zur Peptidquantifizierung, den Nachweis von Phospho-Immoniumionen bei m/z 216,043 als Indikator für Tyrosin-phosphorylierte Peptide, oder die aus der  $\beta$ -Eliminierung von Phosphorsäure resultierenden PO<sub>3</sub><sup>-</sup> Ionen bei m/z 79 (Steen, Kuster *et al.*, 2001; Steen, Kuster *et al.*, 2001; Steen, Fernandez *et al.*, 2003; Collins, Yu *et al.*, 2005). Um diese Ionen dennoch in Ionenfallen detektieren zu können bietet sich die Fragmentierung mittels *Pulsed-Q Dissociation* an. Bei dieser Technik wird der Q-Wert im Verlauf der Resonanzaktivierung und daran anschließenden Fragmentierung variiert (Griffin, Xie *et al.*, 2007). Alternativ kann die

Dissoziation bei Orbitrap Geräten auch in der C-Trap oder einer optionalen Oktopol-Kollisionszelle durchgeführt und die MS<sup>2</sup> Spektren über den gesamten interessierenden Massenbereich in der Orbitrap aufgenommen werden (Olsen, Macek *et al.*, 2007).

Ein, insbesondere für die datenbankgestützte Phosphopeptididentifikation nicht zu vernachlässigender, Faktor ist die Massengenauigkeit der MS-Übersichtspektren, da sich durch die Berücksichtigung von phosphorylierten Serin-, Threonin- und Tyrosinresten der zu durchsuchende Datenraum etwa um das 15-fache vergrößert. Mit erhöhter Genauigkeit bestimmte Vorläuferionenmassen schränken die Population in Frage kommender Kandidatenpeptide ein und wirken so der Vergrößerung des Datenraums entgegen. Die geräteabhängige Massengenauigkeit lässt sich in der Praxis u.a. durch gezielte Koinjektion von Ionen bekannter Massen aus der Umgebungsluft als interne Massenstandards bis in den sub-ppm Bereich verbessern (Olsen, de Godoy *et al.*, 2005).

### 1.7.4 Grundlagen der quantitativen Massenspektrometrie

Auch wenn durch die technologischen Fortschritte groß angelegte Phosphoproteomstudien mit mehreren tausend detektierten Phosphorylierungsstellen möglich wurden, so waren viele Studien der letzten Jahre qualitativer Art und damit von begrenzter Aussagekraft. Die Anwendbarkeit der, in diesen Studien üblicherweise eingesetzten, Elektrospray Ionisation für quantitative Untersuchungen unterliegt gewissen Einschränkungen die unter dem Begriff der Ionisierungsunterdrückung (*Ion Suppression*) zusammengefasst werden. Unter bestimmten Umständen ist die gemessene Signalintensität von der tatsächlichen Analytkonzentration entkoppelt, so dass letztere nicht direkt aus der beobachteten Messgröße abgeleitet werden kann (Matuszewski, Constanzer *et al.*, 2003). Das Problem der Ionisierungsunterdrückung liegt in der Abhängigkeit der Ionisationseffizienz von der Analytkonzentration, den chemischen Eigenschaften des Analyten und eventuellen Wechselwirkungen mit koeluiierenden Spezies. Die Vielzahl der Einflussgrößen erschwert zudem eine quantitative Abschätzung dieses Effektes bei komplexen Proben. Es wurden zwar mittlerweile Konzepte entwickelt um den netto Suppressionseffekt während der Analyse mit Hilfe eines synthetischen Indikatorpeptids zu bestimmen (Hirabayashi, Furukawa *et al.*, 2009), jedoch ist dieser Ansatz eher zur Methodenoptimierung und nicht zur Bestimmung der individuellen Ionisationssuppression geeignet. Dessen ungeachtet wurden und werden semi-quantitative Ansätze basierend auf der Integration der extrahierten Peptidionenintensitäten (XIC) (Cutillas, Geering *et al.*, 2005; Steen,

## Einleitung

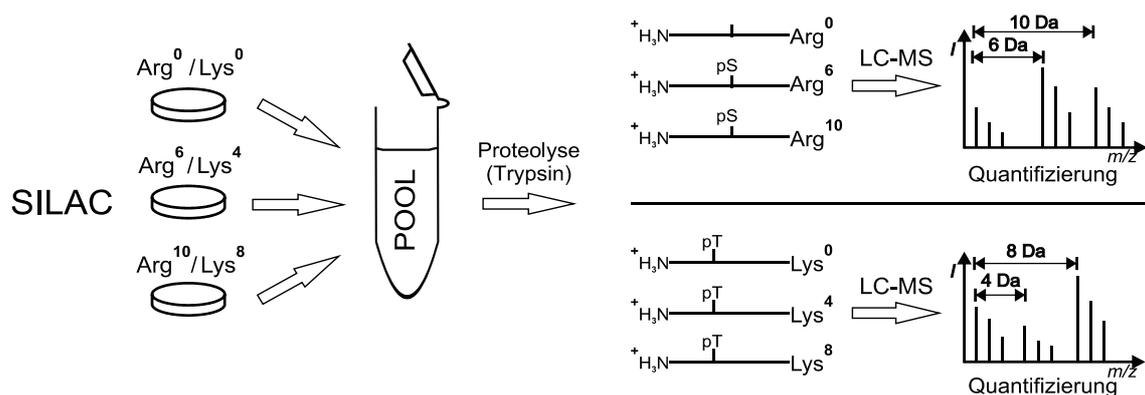
---

Jebanathirajah *et al.*, 2005; Hoffert, Pisitkun *et al.*, 2006; Cao, Yu *et al.*, 2007) oder der Anzahl der zu einem Protein gehörenden MS<sup>2</sup>-Spektren entwickelt und angewandt.

Es stehen mittlerweile jedoch zahlreiche Methoden zur quantitativen, massenspektrometrischen Analyse zu Verfügung. Diese Techniken basieren in der Regel auf der Markierung der zu analysierenden Peptide mit stabilen Isotopen, die sich entsprechend ihrer chemischen Eigenschaften bei der Probenaufbereitung gleich verhalten und in der Umkehrphasenchromatographie, mit Einschränkungen beim Einsatz deuterierter Aminosäuren, zeitgleich eluieren. Dadurch wird eine, von Suppressionseffekten unabhängige, relative Quantifizierung der markierten Peptide auf Basis der jeweiligen Intensitäten in den MS oder MS<sup>2</sup> Spektren möglich. Im Gegensatz zur MS-gestützten Proteinquantifizierung, bei der in der Regel für jedes identifizierte Protein mehrere Peptide quantifiziert und die Ergebnisse gemittelt werden, stellen phosphorylierungsstellenspezifische Untersuchungen besondere Anforderungen an die Genauigkeit und Robustheit der Quantifizierung, da diese in der Regel auf Einzelpeptidmessungen beruht. Darüber hinaus führen die komplexen Fraktionierungsprotokolle phosphoproteomischer Proben zu einer erhöhten Variabilität zwischen einzelnen Proben. Eine besonders geeignete und genaue Methode besteht daher in der quasi-vollständigen Markierung der zellulären Proteine mit stabilen Isotopen. Auf diese Weise können die zu vergleichenden Proben frühestmöglich, im Idealfall unmittelbar nach der Zellyse, vereinigt und gemeinsam prozessiert werden. Klassische Verfahren nutzen hierfür eine differentielle Markierung durch die Stickstoffisotope <sup>14</sup>N und <sup>15</sup>N (Oda, Huang *et al.*, 1999). Bei einfachen Organismen können die zellulären Proteine zum Beispiel durch Zufuhr isotonenreicherter Ammoniumsalze markiert werden. Die massenspektrometrische Quantifizierung wird bei diesen Ansätzen jedoch durch die enorm gesteigerte Probenkomplexität, die nicht einheitlichen Massenabstände zwischen <sup>14</sup>N- und <sup>15</sup>N-markierten Peptiden und unterschiedliche Isotopenverteilungen im Fall von nicht-vollständiger Markierung erschwert (Beynon and Pratt, 2005). Ein neuerer Ansatz umgeht das Problem variabler Massendifferenzen durch die Inkorporation Isotopen-markierter Aminosäuren auf Ebene der *in vivo* Proteinbiosynthese (*Stable Isotope Labeling In Cell Culture*, SILAC) (Ong, Blagoev *et al.*, 2002; Olsen, Blagoev *et al.*, 2006; Ong and Mann, 2006). Je nach experimenteller Ausrichtung wurden zur Markierung unterschiedliche Aminosäuren wie Leucin (Foster, De Hoog *et al.*, 2003), Methionin (Ong, Mittler *et al.*, 2004) oder Tyrosin (Ibarrola, Molina *et al.*, 2004) verwendet. Die metabolische Inkorporation von

## Einleitung

Isotopen-markiertem Lysin und Arginin über mehr als fünf Zellteilungen in Kombination mit einem tryptischen Verdau der Proteine stellt sicher, dass nahezu jedes Peptid, mit Ausnahme der karboxyterminalen Peptide, markiert ist (Ong and Mann, 2006). Mit einer Variante dieser Methode können durch die Verwendung von Isotopenvarianten bis zur drei Proben differentiell mit Lysin (L-Lysin, L-Lysin- $^2\text{H}_4$ , L-Lysin-U- $^{13}\text{C}_6$ - $^{15}\text{N}_2$ ) und Arginin (L-Arginin, L-Arginin-U- $^{13}\text{C}_6$   $^{14}\text{N}_4$ , L-arginine-U- $^{13}\text{C}_6$ - $^{15}\text{N}_4$ ) markiert, parallel prozessiert und analysiert werden (Abbildung 1.7-4). Die Beschränkung auf drei differentielle Markierungen kann zudem durch die Verknüpfung mehrerer separater Experimente mittels einer gemeinsamen Referenzprobe umgangen werden (Blagoev, Ong *et al.*, 2004). Dieses Vorgehen lässt sich theoretisch zum Vergleich einer beliebigen Anzahl an Proben anwenden, erfordert jedoch eine besonders genaue Arbeitsweise, da systemische Fehler zwischen den gekoppelten Experimenten nicht mehr kompensiert werden.



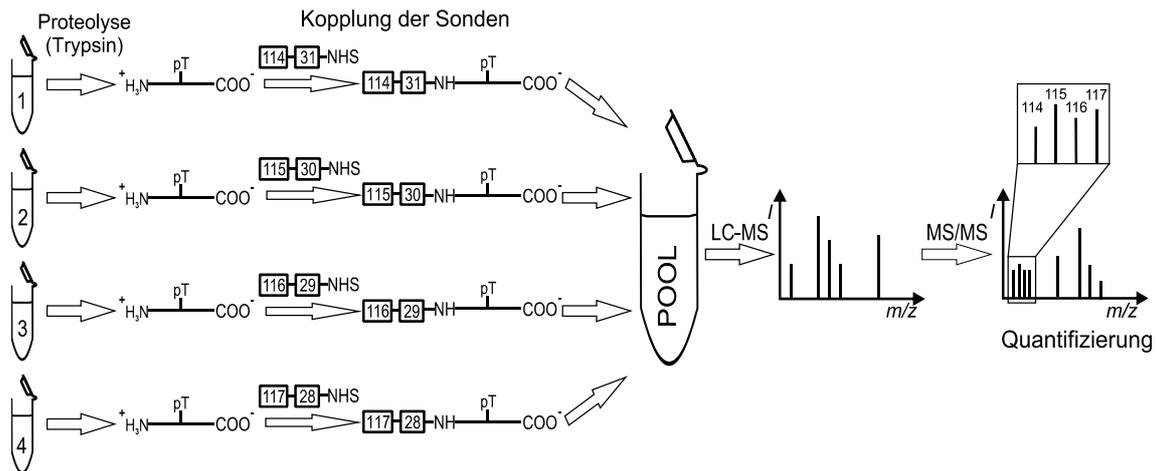
**Abbildung 1.7-4 Schematischer Ablauf quantitativer SILAC-Analysen.** Die Proteine der komparativ zu analysierenden Zellpopulationen werden durch metabolische Inkorporation isotopenmarkierter Aminosäuren nahezu vollständig markiert. Unmittelbar nach dem Zellaufschluss werden die Proben zu gleichen Proteinmengen vereinigt und proteolytisch verdaut. Die resultierenden Peptide sind N-terminal entweder durch Lysin oder Arginin markiert und können durch die distinkten Massendifferenzen im MS-Spektrum relativ zueinander quantifiziert werden (Schreiber, Mausbacher *et al.*, 2008).

Durch die metabolische Markierung erscheinen die Peptide im MS-Spektrum als charakteristische *Doublets* oder *Triplets* mit definierten Massendifferenzen von 4 Da oder mehr, wodurch deren Separierbarkeit für tryptische Peptide durchschnittlicher Länge sichergestellt ist. Die Separierbarkeit besonders langer Peptide, mit entsprechend verbreiterten Isotopenverteilung, ist nur selten problematisch, da diese zumeist durch unvollständigen tryptischen Verdau entstehen und dementsprechend durch mehrfache Lysin- oder Arginin-Inkorporation einen vergrößerten Massenabstand aufweisen. Die Quantifizierung der Peptide kann entweder durch Mittelung der Intensitätsverhältnisse der Monoisotopensignale über aufeinander folgende MS Spektren oder durch Integration der extrahierten Ionenintensität der markierten Peptide (XIC) über die Elutionszeit

erfolgen. Die MS-basierte Quantifizierung erfordert auf der einen Seite eine hohe Auflösung der MS-Spektren (Olsen, de Godoy et al., 2005), bildet aber durch die mehrfache Detektion den Verlauf des Elutionsprofile präzise ab und ermöglicht so eine, im Vergleich zu MS<sup>2</sup>-basierten Methoden, besonders robuste und parallele Quantifizierung detektierter Peptid-*Doublets* / *-Triplets*. Durch die metabolische Markierung wird jedoch die Anzahl physikalisch distinkter aber chemisch uniformer Peptidspezies, und damit auch die vom Massenspektrometer zu verarbeitende Probenkomplexität, um den Faktor zwei (bei einfachen SILAC Experimenten) oder drei (im Falle metabolischer Dreifachmarkierungen) erhöht. Daher ist gerade bei phosphoproteomischen Untersuchungen mit SILAC-basierten Methoden eine konsequente Fraktionierungsstrategie auf Protein- und / oder (Phospho-)Peptidebene erforderlich. Während SILAC Methoden in der ursprünglichen Form nur eine relative Quantifizierung der Peptidabundanzen zwischen zwei oder drei Proben erlauben, können durch Verwendung markierter, synthetischer Peptide als interner Standard, ausgewählte (Phospho-)Peptide in biologischen Proben auch absolut quantifiziert werden (Gerber, Rush et al., 2003; Kirkpatrick, Gerber et al., 2005). Bei diesem Verfahren sollte jedoch nicht außeracht gelassen werden, dass die Proben erst nach der Proteinextraktion mit dem Standard vereinigt werden können und Rückschlüsse auf den absoluten Protein-/ (Phospho-) Peptidgehalt der untersuchten Zellen nur unter Berücksichtigung der, zumeist unbekannt, Proteinextraktionseffizienz möglich sind.

Dieser elegante, aber ursprünglich auf die Säugetierzellkultur beschränkte Ansatz, konnte durch die Erzeugung für Arginin und Lysin auxotropher Stämme auch auf Hefezellen (Gruhler, Olsen et al., 2005) und unter beträchtlichem Aufwand sogar auf das Tiermodell erweitert werden (Kruger, Moser et al., 2008). Da das für die Zellkultur verwendete Serum durch Dialyse von Lysin und Arginin befreit werden muss, kann es jedoch zu Schwierigkeiten bei der Kultur von Zellen kommen, deren Proliferation von niedermolekularen Wachstumsfaktoren abhängig ist (Ong and Mann, 2005; Ong and Mann, 2006). Darüber hinaus kann die Quantifizierungsgenauigkeit Prolin-haltiger Peptide durch die zelllinienabhängige Umwandlung von markiertem Arginin in Prolin beeinträchtigt werden. Die Arginin-Prolin-Konversion kann jedoch in der Regel durch eine Reduktion der Argininkonzentration im Wachstumsmedium unterdrückt werden und / oder die systematischen Messfehler durch mathematische Verfahren korrigiert werden (Gruhler, Olsen et al., 2005; Van Hoof, Pinkse et al., 2007).

Auch wenn die Anwendbarkeit der metabolischen Markierung kürzlich auf komplexe Säugetiere erweitert wurde, so wird dieses Beispiel aufgrund der immensen Kosten vermutlich ein exemplarischer Einzelfall bleiben. Für pathologische Proben humanen Ursprungs und das wachsende Gebiet der Biomarker-Forschung ist eine metabolische Markierung zudem auch theoretisch ausgeschlossen. Hierfür eignet sich die nachträgliche chemische Modifikation der Peptide mit isopenmarkierten Sonden wie z.B. die Veresterung von Karboxylatgruppen mit deuteriertem Methanol (Ficarro, Chertihin *et al.*, 2003; Salomon, Ficarro *et al.*, 2003; Tao, Wollscheid *et al.*, 2005; Zheng, Hu *et al.*, 2005) oder die Kopplung deuterierter  $\gamma$ -Aminobuttersäure über den zugehörigen N-hydroxysuccinimidester an N-terminale und  $\epsilon$ -Aminogruppen (*N-Isotag*) (Smolka, Albuquerque *et al.*, 2005; Smolka, Albuquerque *et al.*, 2007). Bei diesen Sonden basiert die Isopenmarkierung auf Deuterium, welches sich bei der Umkehrphasenchromatographie in seinem Retentionsverhalten von dem leichten Isotop  $^1\text{H}$  unterscheidet. Da die deuterierten und leichteren  $^1\text{H}$ -markierten Peptide nicht streng koeluierten ist man für eine robuste Quantifizierung von deuterierten Peptiden auf die XIC-basierte Quantifizierung angewiesen. Solche Isopen-Effekte treten beim enzymatischen Austausch der Sauerstoffatome von C-terminalen Karboxylatgruppen gegen  $^{18}\text{O}$  nicht auf (Smith, Olivier *et al.*, 2007; Wang, Ding *et al.*, 2007). Insbesondere für den Vergleich mehrerer Proben eignen sich die oben genannten Methoden jedoch nicht. Für komplexe Multiplex-Experimente mit bis zu acht parallel zu analysierenden Proben steht seit kurzem die von der Kopplungschemie mit dem *N-Isotag* verwandte iTRAQ Technologie zur Verfügung (Pierce, Unwin *et al.*, 2007). Die iTRAQ Sonden bestehen aus Reportergruppen distinkter Massen und entsprechend gewählten Ausgleichgruppen, so dass die einzelnen Sonden zueinander isobar sind und sich differentiell markierte Peptide, bis auf wenige Ausnahmen die sich aus Nebenreaktionen der Kopplungsreaktion ergeben, in der ersten Stufe der Tandem-MS Analyse gleich verhalten (Abbildung 1.7-5). Dadurch wird die Komplexität der MS Spektren durch die Einführung der Markierung im Vergleich zu rein qualitativen Analysen nicht erhöht.



**Abbildung 1.7-5 Schematischer Ablauf der quantitativen iTRAQ-Analysen.** Die komparativ zu analysierenden Proteinproben werden separat voneinander Verdaut und anschließend mit spezifischen, isobaren iTRAQ-Sonden gekoppelt und vereinigt. Die differentiell markierten Peptide erscheinen im MS-Spektrum als uniforme Entität und die Quantifizierung erfolgt auf Basis der durch Fragmentierung freigesetzten und im MS<sup>2</sup> detektierten Reporterionen.

Die eigentliche Quantifizierung erfolgt erst auf MS<sup>2</sup>-Ebene auf Basis der Intensitäten der, durch die Fragmentierung freigesetzten, Reporterionen im niederen m/z-Bereich (113,1 – 121,1). Aufgrund der kleinen m/z-Werte ist diese Art der Quantifizierung mit Ionenfalleninstrumenten nur unter Anwendung spezieller Fragmentierungsmethoden (PQD oder HCD) möglich (Griffin, Xie et al., 2007; Olsen, Macek et al., 2007; Bantscheff, Boesche *et al.*, 2008). Im Vergleich zu SILAC erfolgt die Quantifizierung in den meisten Fällen nur ein einziges Mal und durch den gerätetechnisch bedingten Isolationsbereich von einigen m/z Einheiten kann es zu Quantifizierungsfehlern durch Überlagerung der Reporterionen unterschiedlicher Peptide innerhalb dieses Bereiches kommen.

## 1.7.5 Fraktionierung

Die anteilmäßig geringe Abundanz phosphorylierter Peptide in komplexen Gesamtzelllysaten und der limitierte dynamische Bereich vieler Massenspektrometer, 5000 bei Orbitrap-Instrumenten (Makarov, Denisov *et al.*, 2006), machen bei den meisten experimentellen Strategien die Anreicherung phosphorylierter Spezies auf Protein- oder Peptidebene erforderlich. Obwohl Theorien über eine Ionisierungssuppression phosphorylierter Peptide in Gegenwart unphosphorylierter Spezies nicht bestätigt werden konnten (Steen, Jebanathirajah *et al.*, 2006), werden unphosphorylierte Peptide entsprechend ihrer höheren Abundanz und der daraus resultierenden höheren Ionenintensitäten von den datenabhängigen Akquisitionsmethoden moderner Massenspektrometer präferentiell zur Fragmentierung selektiert und so die Identifikationsraten phosphorylierter Spezies reduziert. Zwischen

den zellulär beobachteten Phosphorylierungen an Serin- (~90%), Threonin- (~10%) und Tyrosinseitenketten (~0,05%) bestehen große quantitative Unterschiede (Hunter and Sefton, 1980), wobei trotz ihres relativ kleinen Anteils phosphorylierter Tyrosine eine grundlegende regulatorische Bedeutung für die zelluläre Signaltransduktion (Blumenjensen and Hunter, 2001) zuzumessen ist. Diese Tatsache wird weiterhin durch die Beobachtung gestützt, dass es sich bei etwa 20% aller im humanen Genom kodierten Proteinkinasen um Tyrosinkinase handelt, von denen einige direkt an der Entstehung oder Progression pathologischer Zustände wie Krebs beteiligt und teilweise Ziel erfolgreicher pharmakologischer Intervention sind (Fischer, Streit *et al.*, 2003; Keri, Orfi *et al.*, 2006; Faivre, Demetri *et al.*, 2007). Da phosphoryliertes Tyrosin durch seine Größe immunogener ist als phosphoryliertes Serin oder Threonin, stehen bereits seit längerer Zeit Phosphotyrosin-spezifische Antikörper zur Verfügung. Mit diesen konnten technisch robuste Methoden auf Grundlage der Immunpräzipitation (IP) von Tyrosin-phosphorylierten Spezies entwickelt werden. Die hohe Affinität der Antikörper kompensiert bei diesen Methoden die geringe Abundanz des Antigens, so dass auf einfache Weise Phosphotyrosin-angereicherte Proben mittlerer Komplexität aus zellulären Lysaten gewonnen werden können. Die Antikörper eignen sich sowohl zur Präzipitation intakter Proteine, als auch zur Anreicherung auf Peptidebene. Im ersteren Fall werden die Proteine nach der IP entsprechend ihrer Molekulargewichte mittels gelelektrophoretischer Verfahren aufgetrennt, tryptisch verdaut und mittels nanoLC-MS/MS identifiziert / quantifiziert (Hinsby, Olsen *et al.*, 2004; Ibarrola, Molina *et al.*, 2004; Kratchmarova, Blagoev *et al.*, 2005; Petti, Thelemann *et al.*, 2005; Bose, Molina *et al.*, 2006; Zhang, Spellman *et al.*, 2006). Durch die proteinbasierte Identifikation / Quantifizierung stellt diese Vorgehensweise geringere Anforderungen an die massenspektrometrische Analyse, ist jedoch auf die Quantifizierung von Summeneffekten beschränkt und eignet sich nicht für Phosphorylierungsspezifische Untersuchungen. Diese wiederum werden durch die Immunpräzipitation Phosphotyrosin-haltiger Peptide im Anschluss an den Verdau der Proteine ermöglicht (Goss, Lee *et al.*, 2006). Trotz der unbestrittenen Bedeutung der Tyrosinphosphorylierung für die Regulation diverser biologischer Prozesse, machen die oben genannten, fokussierten Ansätze nur einen sehr kleinen Anteil der gesamten zellulären Phosphorylierungsereignisse einer Analyse zugänglich. Die umfassende Quantifizierung von Phosphorylierungsereignissen an allen phosphorylierbaren Aminosäuren eröffnet hingegen große neue Informationsbestände die zum Verständnis

komplexer biologischer Prozesse beitragen können, birgt jedoch auch eine Reihe technischer Herausforderungen in Bezug auf die, durch Vergrößerung des zu analysierenden Datenraums, dramatisch gestiegene Probenkomplexität. Diese lässt sich trotz genauer und schnell arbeitender Massenspektrometer messtechnisch nur durch Anwendung ausgereifter Fraktionierungsstrategien, in Kombination mit selektiver Phosphopeptidanreicherung erfassen. Wie schon bei den Phosphotyrosin-spezifischen Methoden kann eine Fraktionierung komplexer Proben sowohl auf Protein-, als auch auf Peptidebene erfolgen. Zur Fraktionierung zellulärer Proteine wurden bislang hauptsächlich gelelektrophoretische Methoden (Nousiainen, Sillje *et al.*, 2006) oder die Fraktionierung nach zellulären Kompartimenten (Nousiainen, Sillje *et al.*, 2006; Wang, Ding *et al.*, 2007) verwendet. Eine besondere Bedeutung für die Analyse von Phosphorylierungsnetzwerken kommt zudem affinitätschromatographischen Verfahren zur klassenspezifischen Anreicherung schwach exprimierter Proteinkinasen zu (Bantscheff, Eberhard *et al.*, 2007; Wissing, Jansch *et al.*, 2007). Immunpräzipitationen mit Phosphoserin-/ Phosphothreonin-spezifischen Antikörpern (Gronborg, Kristiansen *et al.*, 2002) können äquivalent zu den beschriebenen Phosphotyrosin Antikörpern eingesetzt werden. Auf Peptidebene wird eine Fraktionierung üblicherweise durch starke Kationenaustauschchromatographie (SCX) (Villen, Beausoleil *et al.*, 2007), isoelektrische Fokussierung (IEF) (Cantin, Venable *et al.*, 2006), oder durch Frei-Fluss-Elektrophorese (Bodenmiller, Malmstrom *et al.*, 2007) erreicht. Da diese Fraktionierungsmethoden den relativen Phosphopeptidanteil nicht oder nur geringfügig erhöhen, werden sie in der Regel mit Phosphopeptid-spezifischen Verfahren, die auf der Bindung von Phosphat an immobilisierte Metallionen (IMAC: Fe<sup>3+</sup>, Ga<sup>3+</sup>, Zr<sup>4+</sup>) (Posewitz and Tempst, 1999; Feng, Ye *et al.*, 2007; Sykora, Hoffmann *et al.*, 2007) oder partikulären Metalloxiden (TiO<sub>2</sub>, ZrO<sub>2</sub>) (Pinkse, Uitto *et al.*, 2004; Larsen, Thingholm *et al.*, 2005; Kweon and Hakansson, 2006) basieren, kombiniert. Die unzureichende Selektivität der Metalloxide, welche eine hohe Affinität zu sauren Aminosäuren aufweisen, konnte durch Einsatz desensitivierender Zusätze wie 2,5-Dihydroxybenzoesäure oder Milchsäure gesteigert werden (Thingholm, Jorgensen *et al.*, 2006; Bodenmiller, Mueller *et al.*, 2007; Jensen and Larsen, 2007; Sugiyama, Masuda *et al.*, 2007). Alternativ können Phosphopeptide auch durch Phosphoamidat-Chemie (PAC) kovalent immobilisiert und dadurch angereichert werden (Tao, Wollscheid *et al.*, 2005). Interessanterweise zeigte ein Vergleich von IMAC, PAC und TiO<sub>2</sub>, dass die drei distinkten Ansätze genutzt werden können um partiell komplementäre

Phosphopeptidpopulationen zu isolieren. So konnten durch Kombination der drei Methoden mehr als 10.000 Phosphorylierungsstellen aus *Drosophila melanogaster* Zellen identifiziert werden (Bodenmiller, Malmstrom et al., 2007; Bodenmiller, Mueller et al., 2007). Im Kontext der immer umfangreicher werdenden Studien lässt sich feststellen, dass mit Zunahme des Analyseumfangs schlecht skalierbare und nicht-automatisierbare Methoden wie die Polyacrylamid-Gelelektrophorese zunehmend durch Flüssigphasen-basierte Fraktionierungsmethoden abgelöst werden. Diese lassen sich teilweise direkt seriell koppeln und gewährleisten so eine automatisierte, schnelle und verlustarme Fraktionierung (Pinkse, Mohammed et al., 2007).

### 1.8 PHOSPHOPROTEOMISCHE STUDIEN

Der Einsatz dieser fortgeschrittenen Fraktionierungsmethoden ermöglichte sowohl umfassende, als auch detaillierte Analysen zellulärer Phosphorylierungen in unterschiedlichen biologischen Prozessen. Bei der Mehrzahl dieser Studien handelt es sich um qualitative Untersuchungen deren primärer Erkenntniswert in der Identifikation neuer Phosphorylierungsstellen als potentieller Regulationsstellen liegt (Ficarro, McClelland et al., 2002; Ballif, Villen et al., 2004; Beausoleil, Jedrychowski et al., 2004; Collins, Yu et al., 2005; Moser and White, 2006; Trinidad, Specht et al., 2006; Lee, Xu et al., 2007; Molina, Horn et al., 2007; Wissing, Jansch et al., 2007). Grundlegende qualitative Studien von bemerkenswertem Umfang ermöglichten die Identifikation von 5635 Phosphorylierungsstellen aus Mäuseleber (Villen, Beausoleil et al., 2007) und 2288 Phosphorylierungsstellen aus *Saccharomyces cerevisiae* (Li, Gerber et al., 2007), wobei entweder eine Fraktionierung der Peptide mittels SCX oder der Proteine mittels Gelelektrophorese und eine anschließende IMAC-basierte Phosphopeptidanreicherung angewandt wurde. In beiden Studien kam zudem ein interessanter Algorithmus (Motif-X) zur Identifikation unbekannter, statistisch überrepräsentierter Phosphorylierungsmotive (Schwartz and Gygi, 2005) zum Einsatz.

Durch die Einführung quantitativer Methoden konnte der Informationsgehalt und die Aussagekraft umfassender phosphoproteomischer Untersuchungen nachhaltig gesteigert werden. Die praktische Umsetzbarkeit dieses Ansatzes für umfassende Analysen wurde erstmals von Gruhler et al. mit SILAC-basierten Untersuchungen zu Pheromon-induzierten Phosphorylierungen in *Saccharomyces cerevisiae* demonstriert (Gruhler, Olsen et al., 2005). Von den 700 in dieser Studie quantifizierten Phosphopeptiden, wurde die Abundanz von 139 um mehr als das Zweifache in Abhängigkeit vom  $\alpha$ -Faktor

## Einleitung

---

moduliert. Die regulierten Phosphoproteine beeinflussen wiederum eine Vielzahl zellulärer Prozesse wie die Aktin Reorganisation, die transkriptionelle Regulation oder die Kontrolle des Zellzyklus.

Zusätzlich zu den Momentaufnahmen des Phosphorylierungsstatus wurden auch komplexe quantitative Zeitreihenanalysen durchgeführt. So konnte der dynamische Verlauf von EGF-abhängigen Phosphorylierungsereignissen in HeLa Zellen analysiert werden (Olsen, Blagoev et al., 2006). Diese enorme Datendichte ist vor allem auf die konsequente Fraktionierungsstrategie zurückzuführen. Durch Separation nukleärer und zytosolischer Lysate mittels SCX und anschließender Phosphopeptidanreicherung durch TiO<sub>2</sub> Partikel konnten mehr als 6600 Phosphorylierungsstellen an 2244 Phosphoproteinen quantitativ erfasst werden. Die Kombination zweier separater Experimente mit jeweils dreifacher SILAC-Markierung ermöglichte zudem die Quantifizierung der Phosphopeptidabundanzen zu fünf diskreten Zeitpunkten. Insgesamt beeinflusste EGF die Abundanz von etwa 14% aller quantifizierten Phosphorylierungsstellen um mehr als das Zweifache. Die Gruppierung ähnlicher Zeitprofile offenbarte darüber hinaus die Anreicherung distinkter Signalkomponenten in unterschiedlichen Phasen der Signalweiterleitung / -integration.

Mit einem ähnlichen experimentellen Ansatz konnten durch verbesserte Fraktionierungsmethoden dynamische Änderungen an mehr als 20.000 Phosphorylierungsstellen im Verlauf des Zellzyklus analysiert werden (Olsen, Vermeulen *et al.*, 2010). Indem die quantitativen Daten der phosphorylierten Peptide, als auch ihrer nicht phosphorylierten Gegenstücke und Änderungen der Proteinabundanz berücksichtigt wurden, war es zudem möglich die stöchiometrischen Änderungen an über 5000 Phosphorylierungsstellen zu bestimmen. Diese Vorgehensweise führte zu der Erkenntnis, dass die Substrate der Cyclin-abhängigen Proteinkinasen 1 und 2 (CDK1, CDK2) während der Mitose beinahe vollständig phosphoryliert sind.

Da viele der regulierten Phosphoproteine über mehrere mitunter differentiell regulierte Phosphorylierungsstellen verfügen, ist eine Phosphorylierungsstellen-spezifische Analyse unerlässlich. Durch die schlichte Quantifizierung der Proteinabundanz nach einer entsprechenden Phosphoproteinanreicherung, wie in einer Studie von Tang *et al.* (Tang, Deng *et al.*, 2007), konnten zwar bekannte und neue Komponenten der Wnt-Signaltransduktion identifiziert werden, jedoch waren keine Aussagen zur differentiellen Signalintegration innerhalb einzelner Proteine möglich.

## Einleitung

---

Die Notwendigkeit hochauflösender Massenspektrometer (wie z.B. LTQ-FT-ICR oder LTQ-Orbitrap Instrumente) für umfassende quantitative Analysen wird vor allem aus der Gegenüberstellung von Studien mit konventionellen und hochauflösenden Instrumenten ersichtlich. Beispielsweise konnten in einer Studie der TNF- $\alpha$  Signaltransduktion mit einer linearen Ionenfalle lediglich 223 von 701 Phosphopeptiden mit hoher Konfidenz quantifiziert werden (Cantin, Venable et al., 2006).

Arbeiten von Benschop *et al.* zeigten, dass quantitative Methoden auf Basis von metabolischer Markierung auch für Pflanzensysteme anwendbar sind. Durch differentielle  $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$  Markierung gelang es Phosphorylierungsänderungen in Plasmamembranfraktionen von *Arabidopsis thaliana* nach kurzzeitiger Inkubation mit bakteriellen oder von Pilzen synthetisierten Immunstimulatoren zu quantifizieren (Benschop, Mohammed *et al.*, 2007). Die Stimulanzen bewirkten die Phosphoregulation einer, an der Erzeugung reaktiver Sauerstoffspezies im Kontext der Pathogenabwehr beteiligten, NADPH Oxidase. Darüber hinaus konnten regulierte Phosphorylierungen von Komponenten der Proteintranslokation und der Vesikeltransportmaschinerie nachgewiesen werden. Die Aktivierung der pflanzlichen NADPH Oxidase wurde auch in einer iTRAQ-basierten Zeitreihenanalyse von Nühse *et al.* bestätigt (Nuhse, Bottrill *et al.*, 2007).

Insbesondere bei komparativen Phosphorylierungsanalysen unterschiedlicher Gewebe, Zelltypen, zellulären Kompartimenten oder bei langen Stimulationszeiten müssen eventuelle Unterschiede in der Proteinexpression / -degradation berücksichtigt werden. Sowohl chemische (iTRAQ), als auch metabolische Markierungen ( $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ ) wurden zur quantitativen Bestimmung von Phosphopeptiden, sowie der relativen Proteinexpression in unterschiedlichen Hirnbereichen oder zum Vergleich der phosphoproteomischen Ausstattung von ruhenden Zellkörpern mit den zugehörigen Pseudopodien verwendet (Trinidad, Thalhammer *et al.*, 2007; Wang, Ding et al., 2007). Durch die Normalisierung der Phosphopeptidänderungen auf die entsprechenden Proteinlevel lässt sich zwischen wirklichen (De-) Phosphorylierungsereignissen und Änderungen der Phosphopeptidabundanzen aufgrund von Proteinbiosynthese / -degradation oder (sub-) zellulären Transportprozessen unterscheiden.

Trotz der unverkennbaren technologischen Fortschritte sind Phosphorylierungen an den Schlüsselenzymen der Phosphorylierungskaskaden, aufgrund ihrer geringen zellulären Abundanz in Gegenwart einer überwältigenden Menge ihrer Substrate, nur schwer zu

analysieren und dementsprechend in den meisten Studien unterrepräsentiert. Da die Aktivität vieler Proteinkinasen wiederum durch spezifische Phosphorylierungen reguliert wird, besteht in der fokussierten Analyse von Kinase-Phosphopeptiden eine effektive Methode zur Identifikation aktivierter Proteinkinasen. Um die Detektionssensitivität von Proteinkinasen im Vergleich zu Gesamtzelllysaten zu erhöhen, wurden effiziente und klassenselektive Anreicherungsverfahren entwickelt. Diese basieren auf unterschiedlichen Kombinationen immobilisierter Kinaseinhibitoren mit Affinität für eine Vielzahl zellulärer Proteinkinasen (Bantscheff, Eberhard et al., 2007; Wissing, Jansch et al., 2007). Die erhöhte Detektionssensitivität durch diese Methoden ermöglicht detaillierte komparative Analysen zellulärer Kinome; vor allem aber ist diese Technologie auch für die Phosphorylierungsanalyse der betreffenden Sub-Proteome hilfreich. Die konsequente methodische Weiterentwicklung ermöglichte beispielsweise die Bestimmung der Expression von über 170 Proteinkinasen in drei Krebszelllinien, sowie die Identifikation von mehr als 1200 Kinase-spezifischen Phosphorylierungsstellen (Oppermann, Gnad *et al.*, 2009). Allen oben genannten Methoden ist gemein, dass die eingesetzten Inhibitoren an festen Phasen immobilisiert werden. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit einer genauen Abstimmung der Position und Längen der zu verwendenden Linkergruppen um die Affinität und sterische Zugänglichkeit der Inhibitoren möglichst nicht negativ zu beeinflussen. Ein anderer Ansatz geht von löslichen, trifunktionalen Molekülen aus, die über eine Kinaseinhibitor-Funktionalität (Capture Group), einen photoreaktiven Crosslinker, sowie eine Affinitätsgruppe (z.B. Biotin) für die anschließende Aufreinigung verfügen. Aufgrund der lichtinduzierten, kovalenten Bindung und der höheren sterischen Zugänglichkeit sollten sich mittels dieser komplexen Konstrukte auch sehr niedrigabundante Kinasen aus kleinen Probenmengen, wie z.B. Biopsieproben, isolieren lassen (Fischer, Graebner Baessler *et al.*, 2010).

Die vorgestellten Inhibitor-basierten Verfahren sind prinzipiell nicht auf Proteinkinasen beschränkt, sondern auch für die gezielte Analyse anderer interessanter Enzymklassen, wie beispielsweise Proteasen, anwendbar.

### **1.9 AUFGABENSTELLUNG**

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit sollten die komplexen, LPA-induzierten, zellulären Phosphorylierungsnetzwerke in humanen Nierenkarzinom- (A498) und Plattenepithelkarzinomzellen (SCC-9) untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden Methoden der quantitativen Massenspektrometrie zur phosphorylierungsstellen-spezifischen Analyse der LPA-abhängigen, globalen Substratphosphorylierung angewandt. Darüber hinaus sollte eine detaillierte Analyse der Regulation niedrigabundanter Proteinkinasen durch Weiterentwicklung und praktische Anwendung von Inhibitor-basierten und Proteinklassen-selektiven Anreicherungsverfahren durchgeführt werden. Durch die direkt vergleichende Analyse von GPCR- und EGFR-medierte Phosphorylierungsereignissen, in einem Szenario ausgeglichener EGF-Rezeptor Aktivierung, sollten zudem Erkenntnisse über Art und Umfang EGFR (un-) abhängiger Signaltransduktion, sowie über die Interkonnektivität der aktivierten Phosphorylierungsnetzwerke gewonnen werden. Die relevanten Netzwerke sollten weiterhin durch umfangreiche und zeitaufgelöste Phosphorylierungsstudien einer detaillierteren Charakterisierung unterzogen werden.

Im Kontext der Metalloprotease-abhängigen Transaktivierung des EGFR, sollten weiterhin Massenspektrometrie-basierte Methoden zur quantitativen Profilierung zellulärer Interaktionspartner des Metalloproteaseinhibitors Marimastat entwickelt und angewendet werden.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 MATERIALIEN

#### 2.1.1 Geräte

LTQ-Orbitrap MS 2.2	Thermo
Proxeon Easy-nLC VI 2.0	Proxeon
Vacuum Concentrator 5301	Eppendorf
Thermomixer comfort	Eppendorf
Quantitative PCR Step One Plus	Applied Biosystems
Schüttler Polymax 1040	Hydolph

#### **Chromatographie:**

ÄKTA Explorer	GE Healthcare
PVA-SIL 150*2.1mm PEEK	YMC
Polysulfoethyl A 250*9.4mm 5µm 200Å	PolyLC
Ressource S 1 ml	GE Healthcare

#### **Spektrophotometer:**

Nanodrop ND-1000	Thermo
ELISA Reader	MWG Biotech

#### **Elektrophorese:**

Stromquelle EV261	Peqlab
Laufkammer XCell Surelock	Invitrogen
Filmentwickler Optimax	Protec

#### **Zellkultur:**

Sterilwerkbank Bioguard Hood	The Baker Company
Inkubator Hera Cell 150	Thermo
Z1 Partikelzähler	Beckman Coulter

#### **Mikroskopie:**

Axiovert 135	Zeiss
Observer A1	Zeiss
Digitalkamera Visitron System	Visitron Systems

#### **Zentrifugen // Rotoren:**

Universalzentrifuge	Hettich
---------------------	---------

Zentrifuge 5415 R	Eppendorf
Sorvall RC 26 Plus // SS 34	Sorvall

### 2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Triton X-100	Roth
Gelatine	Sigma-Aldrich
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich
NaCl	Sigma-Aldrich
KCl	Sigma-Aldrich
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck
Ethyleneglykoltetraessigsäure (EGTA)	Sigma-Aldrich
Acrylamid/Bisacrylamid 37.5:1	Serva
TEMED	Serva
APS	Merck
DMSO	Merck
Dharmafect 1, 4	Dharmacon
Oligofect	Invitrogen
RNAiMax	Invitrogen
NeoFX	Ambion
Hiperfect	Qiagen
Harnstoff p.a.	Merck
Thioharnstoff	Invitrogen
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich
Iodoacetamid	Sigma-Aldrich
Lysyl Endopeptidase	Wako
Trypsin modified, sequencing grade	Promega
2,5-Dihydroxybenzoesäure	Sigma-Aldrich
Titandioxid 10µm Partikel	GL Science Japan
phosSelect Iron Affinity Gel	Sigma-Aldrich
<b>Inhibitoren</b>	
Purvalanol B	Tocris
Bisindolylmaleimide X (Bis X)	Alexis Biochemical
Dasatinib	LC Laboratories
AX14596	Vichem

## Material und Methoden

---

SU6668	Vichem
VII6741	Vichem
VII6743	Vichem
VII6745	Vichem
VII6832	Vichem
<b>Liganden</b>	
Heparin-binding EGF (HB-EGF)	Sigma-Aldrich
Lysophosphatidic acid	Sigma-Aldrich, Biomol
<b>Antikörper</b>	
$\alpha$ -Tyr(P) 1173 EGFR	Cell Signaling
$\alpha$ -EGFR	Cell Signaling
$\alpha$ -Lamin A/C	Santa Cruz
$\alpha$ -Tubulin	Sigma
$\alpha$ -rabbit HRP	Dianova
$\alpha$ -mouse HRP	Sigma-Aldrich
<b>Oligonuklotide</b>	
TEC fwd 5`-TCG AGG CAA CCG ACT CTA-3`	MWG
TEC rev 5`-GCC ACT GGT CAC ACA TCA CTT-3`	MWG
ALAS1 fwd 5`-CTG CAA AGA TCT GAC CCC TC-3	MWG
ALAS1 rev 5`-CCT CAT CCA CGA AGG TGA TT-3	MWG
<b>siRNA</b>	
Silencer Select TEC 13970	Ambion
Silencer Select TEC 13971	Ambion
Negativ Kontrolle	Ambion
siGlow Lamin A/C	Dharmacon
<b>Zellkultur</b>	
DMEM	Gibco
DMEM ohne Arginin, Lysin	Gibco
Ham's F12	Gibco
Ham's F12 ohne Arginin, Lysin	Gibco
FBS	Gibco
FBS (dialysiert)	SAFC Biosciences
L-Glutamin	Gibco
Nicht-essentielle Aminosäuren	Gibco

## Material und Methoden

---

Natriumpyruvat	Gibco
Hydrocortisol	Sigma-Aldrich
Phosphatase Inhibitor Cocktail 1 + 2	Sigma-Aldrich
Phenylmethanesulfonylfluorid	Sigma-Aldrich
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich
Natriumfluorid p.a.	Merck
Calyculin A	Alexis Biochemicals
Aprotinin	Alexis Biochemicals
Leupeptin	Alexis Biochemicals

### Isotopenmarkierte Aminosäuren

L-Arginin (Arg-0)	Sigma Isotec
L-Arginin-U- <sup>13</sup> C <sub>6</sub> <sup>14</sup> N <sub>4</sub> (Arg-6)	Sigma Isotec
L-arginine-U- <sup>13</sup> C <sub>6</sub> - <sup>15</sup> N <sub>4</sub> (Arg-10)	Sigma Isotec
L-Lysin (Lys-0)	Sigma Isotec
L-lysine- <sup>2</sup> H <sub>4</sub> (Lys-4)	Sigma Isotec
L-lysine-U- <sup>13</sup> C <sub>6</sub> - <sup>15</sup> N <sub>2</sub> (Lys-8)	Sigma Isotec

### Biochemische und molekularbiologische Kits

BCA Assay	Pierce
Bradford Assay	Pierce
RNAeasy	Invitrogen

### Puffer

Ammoniumbikarbonat	Sigma-Aldrich
HEPES	Roth
Trizma (Tris)	Sigma-Aldrich
PBS	Sigma-Aldrich
Ethanolaminhydrochlorid	Sigma-Aldrich
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Roth
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Roth

### Lösungsmittel

Acetonitril LiChrosolv	Merck
Methanol p.a.	Fisher Chemical
Ethanol p.a.	Riedel
Dimethylformamid	Merck

### Säuren und Basen

## Material und Methoden

---

Ameisensäure	Fluka
Ammoniaklösung 32% reinst	Merck
Essigsäure acs	Fluka
Natronlauge 1 M	Merck
Salzsäure 1 M	VWR
Trifluoressigsäure	Fluka

### 2.1.3 Verbrauchsgüter

Thermo-Fast 96 PCR Platte	Thermo
Silikonabdeckung für Thermo-Fast	Nerbe
Epoxy-aktivierte Sepharose 6B	GE Healthcare
EAH Sepharose 4B	GE Healthcare
ECH Sepharose 4B	GE Healthcare
NHS Sepharose FastFlow	GE Healthcare
Sep-Pak Vac tC18 Kartuschen 100 mg, 500 mg	Waters
Empore Disk C18 47 mm	3M
Empore Disk C8 47 mm	3M

### Elektrophorese

NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris Gel 1 mm	Invitrogen
NuPAGE Antioxidant	Invitrogen
NuPAGE LDS Probenpuffer	Invitrogen
NuPAGE MOPS SDS Laufpuffer	Invitrogen
Collodial Blue Staining Kit	Invitrogen
Gel Loading Tips	Invitrogen
Western Lightning	Perkin Elmer
Protran Nitrozellulosemembran	Whatman
Nunc Maxisorb 96	Thermo Fisher Scientific

### Zellkultur

Costar Platten	Corning
100*20 mm	Corning
150*25 mm	Corning
150*25 mm	Falcon
Transwell Einsätze 8 µm	Falcon

## Material und Methoden

---

Stripette 5 ml, 10 ml, 25 ml	Corning
Pipettenspitzen 1000 µl, 200 µl, 10 µl	Eppendorf
Zellschaber 24c m	TPP
Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml	TPP
Cryotube	Nunc
Stericup	Millipore
Millex-HA 0,45 µm	Millipore

### 2.1.4 Software

XCalibur 2.0	Thermo
Unicorn 5.1	Thermo
Step One Software 2.0	Applied Biosystems
Primer Express 3.0	Applied Biosystems
MaxQuant Suite	MPI Biochemie Abt. Mann
R 2.8	<a href="http://www.r-project.org">www.r-project.org</a>
MeV 4.1	<a href="http://www.tm4.org/mev/">www.tm4.org/mev/</a>
Sigmaplot 10	Systat Software
Excel 2007	Microsoft
<b>Onlinetools</b>	
DAVID	<a href="http://www.david.abcc.ncifcrf.gov">www.david.abcc.ncifcrf.gov</a>
Phosphosite	<a href="http://www.phosphosite.org">www.phosphosite.org</a>
String	<a href="http://www.string.embl.de">www.string.embl.de</a>
Uniprot	<a href="http://www.uniprot.org">www.uniprot.org</a>

### 2.1.5 Zellkulturmedien:

#### **DMEM Wachstumsmedium:**

Dulbecco's modified Eagle's medium + 10% (v/v) FBS, 2 mM L-Glutamin, nicht-essentiellen Aminosäuren und 1 mM Natrium-Pyruvat

#### **DMEM serumfreies Medium:**

Dulbecco's modified Eagle's medium + 2 mM L-Glutamin, nicht-essentiellen Aminosäuren und 1 mM Natrium-Pyruvat

#### **DMEM/F12 Wachstumsmedium:**

DMEM / F12 1:1 (v/v) + 10% (v/v) FBS, 2 mM L-Glutamin, 1mM Natrium-Pyruvat, 0.4 mg/l Hydrocortisol

### **DMEM/F12 serumfreies Medium:**

DMEM / F12 1:1 (v/v) + 2 mM L-Glutamin, 1 mM Natrium-Pyruvat, 0.4 mg/l Hydrocortisol

### **Einfriermedium:**

FBS / DMSO 10:1 (v/v)

## **2.1.6 Lysepuffer**

### **Triton X-100:**

50 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5% (v/v) Triton X-100, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 10 µg/ml Aprotinin, 10 µg/ml Leupeptin, 1 mM PMSF, 10 mM NaF, 2.5 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 50 ng/ml Calyculin A, 1% *Phosphatase Inhibitor Cocktail 1* und 1% *Phosphatase Inhibitor Cocktail 2*.

### **Harnstoff-Lysepuffer:**

8M Harnstoff, 75mM NaCl, 50mM TRIS pH8.2, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 10 µg/ml Aprotinin, 10 µg/ml Leupeptin, 1 mM PMSF, 10 mM NaF, 2.5 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 50 ng/ml Calyculin A, 1% *Phosphatase Inhibitor Cocktail 1* und 1% *Phosphatase Inhibitor Cocktail 2*.

## **2.2 METHODEN**

### **2.2.1 Zellkultur**

#### **2.2.1.1 A498**

A498 Zellen wurden in 25ml DMEM Vollmedium auf Falcon 150\*25mm Zellkulturschalen kultiviert und alle 72h mittels Trypsin/EDTA abgelöst und im Verhältnis 1:3 – 1:4 neu ausgesät. Für Stimulationsexperimente wurden die Zellen in DMEM Vollmedium auf Zellkulturschalen (Corning) ausgesät. Zwei Tage vor der Stimulation wurden die Zellen mit PBS gewaschen und das Wachstumsmedium mit FBS gegen ein serumfreies Medium ausgetauscht. Ein erneuter Medienwechsel wurde 12h vor der Stimulation durchgeführt um im evtl. Medium angereicherte autologe Wachstumsfaktoren zu entfernen. Für die SILAC Experimente wurden die A498 Zellen für acht Tage in DMEM mit 42 mg/l normalem L-Arginin (Arg-0) und 71 mg/l L-Lysin (Lys-0) oder equimolaren Mengen L-Arginin-U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub><sup>14</sup>N<sub>4</sub> (Arg-6) und L-lysine-<sup>2</sup>H<sub>4</sub> (Lys-4) bzw. L-arginine-U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>-<sup>15</sup>N<sub>4</sub> (Arg-10) und L-lysine-U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>-<sup>15</sup>N<sub>2</sub> (Lys-6) (Sigma Isotec oder Cambridge Isotope Laboratories) in Gegenwart von dialysiertem FBS kultiviert.

### 2.2.1.2 SCC-9

SCC-9 Zellen wurden in 25ml DMEM/F11 Medium auf Falcon 150\*25mm Zellkulturschalen kultiviert und alle 72h mittels Trypsin/EDTA abgelöst und im Verhältnis 1:3 – 1:4 neu ausgesät. Für die SILAC Experimente wurden die SCC-9 Zellen für acht Tage in DMEM/F11 (1:1) mit 42 mg/l normalem L-Arginin (Arg-0) und 71 mg/l L-Lysin (Lys-0) oder equimolaren Mengen L-Arginin-U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub><sup>14</sup>N<sub>4</sub> (Arg-6) und L-lysine-<sup>2</sup>H<sub>4</sub> (Lys-4) bzw. L-arginine-U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>-<sup>15</sup>N<sub>4</sub> (Arg-10) und L-lysine-U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>-<sup>15</sup>N<sub>2</sub> (Lys-6) (Sigma Isotec oder Cambridge Isotope Laboratories) kultiviert. Zwei Tage vor der Stimulation wurden die Zellen mit PBS gewaschen und das Wachstumsmedium mit dialysiertem FBS gegen serumfreies Medium ausgetauscht. Ein erneuter Medienwechsel wurde 12h vor der Stimulation durchgeführt um im evtl. Medium angereicherte autologe Wachstumsfaktoren zu entfernen.

### 2.2.2 Stimulation und Zellyse für phosphoproteomische Experimente

Die Zellen wurden für die angegebene Zeit (drei Minuten im Fall der integrierten Analyse und 3, 10, 30 und 90 Minuten im Fall der Zeitreihenanalyse) mit 10 µM LPA (Ausgangskonzentration: 5 mM LPA, 1% BSA), bzw. 0.5 ng/ml HB-EGF, stimuliert. Unmittelbar nach Ablauf der Stimulationszeit wurde das Wachstumsmedium abgesaugt und die Zellen auf Eis mit dem jeweiligen Lysepuffer aufgeschlossen. Für die Experimente mit anschließender Kinaseanreicherung wurde ein nicht-denaturierender Triton X-100 basierter Lysepuffer verwendet, wohingegen die Zellyse für die Zeitreihenanalysen mittels chaotropem, harnstoffbasiertem Puffer durchgeführt wurden. Die Lysate wurden zur Sedimentation von Zelldebris für 30 Minuten bei 16,500 g und 4°C zentrifugiert und anschließend durch eine PVDF-Membran mit 0,45 µm Porendurchmesser filtriert. Zur Stimulationskontrolle wurde jeweils ein Aliquot der Lysate mittels Gelelektrophorese auf einem 7,5%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch Elektroblothing auf eine Nitrocellulose Membran übertragen. Die Aktivierung des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR) wurde durch Immunfärbung und Chemolumineszenz-Detektion mit einem, für das Phosphoepitop Tyr(P)-1173 spezifischen, Antikörper nachgewiesen. Als Ladekontrolle diente die Detektion der EGFR-Gesamtmenge. Nach der Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Assay (Tritonlyse) bzw. Bradford-Assay (Harnstofflyse), wurden die zu einem Experiment gehörenden Lysate zu gleichen Teilen vereinigt. Für die integrierte Analyse in A498 Zellen wurde ein Aliquot entsprechend 15 mg Protein lyophilisiert, die

Proteine nach Wessel-Flügge präzipitiert und In-Lösung verdaut. Das übrige, vereinigte Lysat (etwa 240 mg im ersten Experiment, 405 mg im zweiten Experiment) wurde direkt zur Inhibitor-basierten Kinaseanreicherung verwendet.

Für die Zeitreihenanalyse in SCC-9 Zellen wurden jeweils 5 mg Protein pro Bedingung (entsprechend 15 mg pro Experiment) für den Lösungsverdau eingesetzt.

### 2.2.3 siRNA Transfektion

Es wurden sechs unterschiedliche Transfektionsreagenzien mit anti-Lamin A/C siRNA oder Kontroll-siRNA auf ihre Transfektionseffizienz in A498 Zellen überprüft. Hierfür wurden jeweils 80.000 Zellen mit 100nM siRNA und 5 µl Oligofect, 6 µl Hiperfect, 5 µl RNAiMax, 5 µl NeoFX, 4 µl Dharmafect1 oder 4 µl Dharmafect 4 entsprechend der Herstellerprotokolle transfiziert, nach 72h lysiert und mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Immunfluoreszenzdetektion die Expressionslevel von Lamin A/C und Tubulin verglichen.

Für die Migrationsassays wurden jeweils  $6 \cdot 10^5$  Zellen in 6 ml DMEM auf 100\*20mm Zellkulturschalen (Falcon) ausgesät und in Suspension mit 24 µl Dharmafect 1 und 30 µl siRNA [20µM] (Negativkontrolle oder anti-TEC) transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und für 24 h in serumfreiem DMEM kultiviert.

### 2.2.4 RNA Präparation

Die Präparation zellulärer RNA zur Kontrolle der Effektivität des siRNA Transfektion erfolgte mittels des molekularbiologischen RNAeasy Kits (Qiagen) entsprechend den Anweisungen des Herstellers. 72h nach der Transfektion wurden etwa 50.000 Zellen mit 350 µl RLT-Puffer lysiert. Zur Fragmentierung der DNA wurde das Lysat auf QIAshredder Zentrifugationssäulen gegeben und für 2 Minuten bei 8.000 g zentrifugiert. Die Proben wurden mit 350 µl 70% (v/v) Ethanol versetzt, auf die RNAeasy Zentrifugationssäule aufgetragen und für 15 Sekunden bei 8.000 g zentrifugiert. Die Säulen wurden dann erst mit 700 µl RW1-Puffer und dann mit 500µl RPE-Puffer gewaschen. Die RNA wurde anschließend mit 30 µl RNAase-freiem H<sub>2</sub>O eluiert und die Konzentration spektrophotometrisch bei 260 nm bestimmt.

### 2.2.5 Quantitative Reverse-Transkriptions PCR

Für die quantitative Reverse-Transkriptions PCR wurden jeweils 10ng RNA und 70nM Vorwärtsprimer und 70nM Rückwärtsprimer (TEC bzw. ALAS1) auf 25 µl Reaktionsvolumen mit dem Verso OneStep PCR-Kit (Thermo) entsprechend den

## Material und Methoden

Herstellerangaben eingesetzt. Die quantitative PCR erfolgte auf einem StepOne PCR-Gerät (Applied Biosystems) nach der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode mit folgendem Programm (Tabelle 2.2-1). Die Quantifizierung erfolgte während der Amplifikationsphase jedes Zyklus. Als passives Referenzfluorophor wurde ein ROX Farbstoff eingesetzt. Zur Kontrolle auf eventuelle Primerdimerisierung wurde im Anschluss an die qPCR stets eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt.

Tabelle 2.2-1 Programmablauf der quantitativen Reverse-Transkriptions PCR

Phase	Temperatur	Dauer
<b>Reverse Transkription</b>	50 °C	15'
<b>Initiales Denaturieren</b>	95 °C	15'
<b>40* Zyklus:</b>	95 °C	15''
- Denaturierung		
-Primer-DNA Komplexierung	TEC Primer: 62,3 °C ALAS1 Primer: 60 °C	30''
- Amplifikation	72 °C	30''
<b>Denaturierung</b>	95 °C	15''
<b>Komplexbildung</b>	60 °C	1'
<b>Schmelzkurve</b>	95 °C	0,3 °C / min

### 2.2.6 Zellmigration

Die trypsinisierten Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und je  $5 \cdot 10^4$  Zellen in 500  $\mu$ l serumfreiem DMEM in Transwell-Einsätze mit 8  $\mu$ m Porendurchmesser überführt. Die untere Kammer wurde mit 700  $\mu$ l serumfreiem DMEM (negativ Kontrolle) bzw. 10  $\mu$ M LPA oder 40 ng/ml HB-EGF (positiv Kontrolle) gefüllt. Die Zellen wurden für 24 h bei 37°C und 7% (v/v) CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 0.5% (m/v) Kristallviolett in 20% (v/v) Methanol fixiert und angefärbt. Nicht transmigrierte Zellen wurden mechanisch entfernt. Die Auswertung der Duplikate erfolgte durch die mikroskopische Bestimmung der von den migrierten Zellen belegten Fläche.

### 2.2.7 Inhibitor Kopplung

Die in den Experimenten zur Proteinklassen-selektiven Affinitätsanreicherung eingesetzten Kinase- und Proteaseinhibitoren wurden wie folgt immobilisiert.

#### 2.2.7.1 Marimastatderivat

Es wurde entsprechend den Literaturangaben ein immobilisierbares Marimastatderivat synthetisiert (Jenssen, Sewald *et al.*, 2004). Ein Teil NHS-aktivierte Sepharosematrix wurde mit 1mM HCl aktiviert, mit H<sub>2</sub>O gewaschen und für 4 Stunden bei 4°C mit einem

Teil des Kopplungsansatzes (20mM Marimastatderivat, 500mM NaCl, 200mM NaHCO<sub>3</sub> pH 8,4) inkubiert. Zur Kontrolle unspezifischer Bindung wurde eine Inkubation mit nicht-funktionalisierter Sepharose Cl4B durchgeführt. Zur Bestimmung der Kopplungseffizienz wurden die Überstände nach der Inkubation abgenommen und die verbliebene Marimastat Konzentration in Duplikaten mittels HPLC bestimmt. Hierzu wurde eine Eichkurve mit 0,1mM, 0,2mM, 0,5mM, 1mM, 2mM, 3mM und 5mM Marimastat in Kupplungspuffer erstellt und durch Integration der Elutionsprofile eine Standardkurve erstellt. Zudem wurde die Kinetik der Kupplung durch Probenentnahme 30min, 60min, 120min, 240min und 12h nach Reaktionsbeginn mittels HPLC verfolgt. Die Auftrennung der Kupplungsansätze erfolgte auf einer 125/4 Nucleosil 100-5 C8 Säule mittels 13 minütigen Gradienten von 100% Puffer A (95% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (2%), 5% Acetonitril) zu 100% Puffer B (10% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (2%), 90% Acetonitril). Die Matrix wurde nach der Kupplung für 4h mit 100mM TRIS pH 8,8 bei Raumtemperatur inaktiviert und abschließend viermal im Wechsel mit 100mM Natriumacetat, 500mM NaCl pH 6 und 100mM TRIS pH 8,8 gewaschen. Die Inhibitormatrix wurde in 20% Ethanol bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

### 2.2.7.2 Kinaseinhibitoren

Die Kinaseinhibitoren AX14596, VI16832 und SU6668 wurden entsprechend den Literaturangaben synthetisiert (Laird, Vajkoczy *et al.*, 2000; Brehmer, Greff *et al.*, 2005; Daub, Olsen *et al.*, 2008). Die Synthese von VI16741 erfolgte analog zur Synthese von VI16832 mit dem Unterschied, dass als Ausgangsmaterial 8-Ethyl-2-methanesulfonyl-8H-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one verwendet wurde. Bisindolylmaleamide X (Alexis Biochemical), Purvalanol B (Tocris) und Dasatinib (LC Laboratories) waren kommerziell erhältlich. Zur Immobilisierung wurden 2 Teile 5 mM Bisindolylmaleamide X, 10 mM AX14596, 1,5 mM VI16832, 5 mM VI16741 oder 5 mM Dasatinib mit einem Teil Epoxy-aktivierter Sepharose 6B (GE Healthcare) entsprechend eines publizierten Protokolls inkubiert (Brehmer, Greff *et al.*, 2005). Für die Immobilisierung von Purvalanol B und SU6668 wurden zwei Teile der 10mM Inhibitorlösungen in 50% DMF, 50% Ethanol mittels Karbodiimid-Kopplung an einem Teil EAH-Sepharose 4B (GE Healthcare) immobilisiert (Wissing, Jansch *et al.*, 2007).

### 2.2.8 Marimastat Inhibitorprofilierung

Für die metabolische dreifach Markierung wurden A498 Zellen für sieben Tage in DMEM mit 10% dialysiertem FBS und entweder 42 mg/l unmarkiertem L-Arginin

## Material und Methoden

(Arg<sup>0</sup>) und 71 mg/l L-Lysin (Lys<sup>0</sup>) oder equimolaren Mengen der isotopenmarkierten Varianten L-Arginin-U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub> (Arg<sup>6</sup>), L-Lysin-<sup>2</sup>H<sub>4</sub> (Lys<sup>4</sup>) oder L-Arginin-U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>-<sup>14</sup>N<sub>4</sub> (Arg<sup>10</sup>) und L-Lysin-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>-<sup>15</sup>N<sub>2</sub> (Lys<sup>8</sup>) kultiviert. Für die *in vitro* Assoziation mit der Marimastat Affinitätsmatrix wurden die Zellen in Detergenz-haltigem Puffer (1% Triton X-100, 50mM HEPES pH 7.5, 150mM NaCl) lysiert und je 600 µl der filtrierten Lysate mit 15µl Affinitätsmatrix oder Sepharose Cl4B als Kontrollmatrix für 4h bei 4°C inkubiert. Zur Bestimmung der Bindung an die Affinitätsmatrix wurde der Überstand aus einer ersten Inkubation erneut für 4 h mit frischer Affinitätsmatrix inkubiert. Die Einstellung eines Gleichgewichtes nach 4 h wurde durch Inkubation differentiell markierter Lysate für 2 h, 4 h und 8 h überprüft. Darüber hinaus wurde durch Inkubation mit 1:3 verdünntem Lysat überprüft, ob die immobilisierten Liganden im Verhältnis zum Substrat im Überschuss vorliegen (Tabelle 2.2-2). Nach den Inkubationen wurden die Matrices dreimal mit Lysepuffer und zweimal mit 50mM Hepes, 150mM NaCl pH 7,5 gewaschen und anschließend dreimal für mit 30 µL 7M Harnstoff, 2M Thioharnstoff, 50mM Hepes bei 37 °C eluiert.

**Tabelle 2.2-2 Metabolisches Markierungsschema für die Marimastat-Profilierung.**

Replikat	Label	Kompetition Teil 1	Kompetition Teil 2	K <sub>D</sub> [h]	Kontrolle Kinetik	Kontrolle Liganden-überschuss
A	0/0	10nM Marimastat	1000nM Marimastat	1.Inkubation	2	unverdünntes Lysat
	6/4	1nM Marimastat	100nM Marimastat	Kontrollmatrix	4	1:3 verdünntes Lysat
	10/8	0nM Marimastat	0nM Marimastat	2.Inkubation	8	unverdünntes Lysat
B	0/0	10nM Marimastat	1000nM Marimastat	2.Inkubation	8	1:3 verdünntes Lysat
	6/4	1nM Marimastat	100nM Marimastat	Kontrollmatrix	4	unverdünntes Lysat
	10/8	0nM Marimastat	0nM Marimastat	1.Inkubation	2	1:3 verdünntes Lysat

### 2.2.9 Semiquantitativer Vergleich immobilisierter Kinaseinhibitoren

Es wurde eine semiquantitativer Vergleich neun verschiedener, immobilisierter Kinaseinhibitoren (SU6668, AX16749, Bisindolylmaleimid X (BisX), Purvalanol B, Dasatinib, AX14598, VI16741, VI16743, VI16745 und VI16832) durchgeführt. Hierzu wurden jeweils  $\sim 8 \cdot 10^8$  HeLaS3 Zellen in Triton-X Lysepuffer lysiert, auf 1M NaCl eingestellt, die Lysate für 20 min bei 13.000 g zentrifugiert und anschließend durch Filter mit einer Porengröße von 45µm filtriert. Die Lysate wurden in Duplikaten mit einem Fluss von 50 µl/min, bei einer Temperatur von 4 °C auf, mit 250 µl Inhibitormatrix, gefüllten Säulen geladen. Anschließend wurden die Säulen bis zur

Equilibration mit Hochsalzpuffer (0,25% Triton X-100, 20 mM Hepes pH 7,5, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 M NaCl), Niedrigsalzpuffer (0,25% Triton X-100, 20 mM Hepes pH 7,5, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 150 mM NaCl) und 20 mM Hepes pH 7,5 gewaschen. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte mit 2% SDS bei Raumtemperatur. Die Proteine wurden dann durch Präzipitation nach Wessel-Flügge ausgefällt und durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese entsprechend ihrer Molekulargewichte aufgetrennt. Jede Probe wurde in vier Molekulargewichtsbereiche fraktioniert und einem tryptischen In-Gel-Verdau unterzogen. Die resultierenden Peptide wurden über Stage-Tips entsalzt und massenspektrometrisch analysiert. Die semi-quantitative Proteinquantifizierung erfolgte markierungsfrei durch Integration der aus dem XIC extrahierten Ionenelektrophoreseprofile auf Basis der eindeutig zuordbaren Peptide mit MaxQuant (V. 1.0.11.5). Zur Verbesserung der Peptididentifikation wurden, aufgrund der untereinander vergleichbaren Proben, die Elutionsprofile der einzelnen Läufe miteinander korreliert (*match between runs*). Für die weitere Auswertung wurden zudem die Proteinquantifizierungen aus den beiden biologischen Replikaten gemittelt und logarithmiert. Es wurden weiterhin die Proteinkinasen gemäß Manning *et al.* (Manning, Whyte *et al.*, 2002) extrahiert und mit Hilfe des Programms MeV hierarchisch nach der geringsten euklidischen Distanz gruppiert.

### **2.2.10 Quantitativer Vergleich von Säulenaffinitätschromatographie und in vitro Assoziation zur Kinaseanreicherung**

Für den quantitativen Vergleich zweier Kinaseanreicherungsmethoden wurden HeLaS3 Zellen metabolisch mit L-Arginin ( $\text{Arg}^0$ ) und 71 mg/l L-Lysin ( $\text{Lys}^0$ ) oder equimolaren Mengen der isotope markierten Varianten L-Arginin- $\text{U-}^{13}\text{C}_6\text{-}^{14}\text{N}_4$  ( $\text{Arg}^{10}$ ) und L-Lysin- $\text{U-}^{13}\text{C}_6\text{-}^{15}\text{N}_2$  ( $\text{Lys}^8$ ) markiert. Die Zellen wurden in Triton-X Lysepuffer lysiert, auf 1M NaCl eingestellt, die Lysate für 20 min bei 13.000 g zentrifugiert und anschließend durch Filter mit einer Porengröße von 45  $\mu\text{m}$  filtriert. Das  $0/0$  markierte Lysat (entsprechend 110 mg Protein) wurde dann säulenaffinitätschromatographisch mit immobilisierten Kinaseinhibitoren angereichert, während das  $10/8$  markierte Lysat (entsprechend 110 mg Protein) mit einer Batchprozedur angereichert wurde.

#### **2.2.10.1 Säulenaffinitätschromatographie**

Für die Säulenaffinitätschromatographie wurden aus den Affinitätsmatrices 500  $\mu\text{l}$  5 mM 16832, 250  $\mu\text{l}$  5 mM Dasatinib und V116741, 250  $\mu\text{l}$  5mM AX14596 und BisX, sowie 500  $\mu\text{l}$  10 mM Purvalanol B in der angegebenen Reihenfolge vier Chromatographiesäulen

gepackt und bei einem Fluss von 50  $\mu\text{l}/\text{min}$  und einer Temperatur von  $4^{\circ}\text{C}$  mit dem Lysat ( $\sim 22$  ml) beladen. Anschließend wurden die Säulen bis zur Equilibration mit Hochsalzpuffer (0,25% Triton X-100, 20 mM Hepes pH 7,5, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 M NaCl), Niedrigsalzpuffer (0,25% Triton X-100, 20 mM Hepes pH 7,5, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 150 mM NaCl) und 20 mM Hepes pH 7,5 gewaschen. Die Elution erfolgte für die Purvalanol B Säule spezifisch mit Niedrigsalzpuffer + 20 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM ADP, 10 mM AMP-PNP, 10 mM Purvalanol B. Die anderen Säulen wurden bei Raumtemperatur mit 2% SDS eluiert.

### **2.2.10.2 Batchprozedur**

Für die Batchprozedur wurde das auf 1 M NaCl eingestellte Lysat für drei Stunden bei  $4^{\circ}\text{C}$  mit den gemischten Kinaseinhibitormatrices (s.o.) inkubiert und diese anschließend zweimal mit dem zehnfachen Matrixvolumen Hochsalzpuffer, einmal mit Niedrigsalzpuffer und abschließend mit 20 mM Hepes pH 7,5 gewaschen. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte durch fünfmalige Inkubation mit dem zweifachen Matrixvolumen 0,5% SDS, 5 mM DTT für 10 Minuten bei  $50^{\circ}\text{C}$ .

Für den Methodenvergleich wurden die Eluate aus der Batch- bzw. säulenchromatographischen Methode vereinigt. Zudem wurden für die Analyse der Anreicherungsfaktoren durch die Batchmethode 1,8 % des Batcheluates (entsprechen 2mg Protein im Lysat) mit 200 $\mu\text{g}$  Protein aus 0/0 markiertem Lysat vereinigt und separat analysiert. Zur Normalisierung der Messwerte wurde darüber hinaus eine sogenannte Pooling-Kontrollprobe (bestehend aus gleichen Teilen 0/0- und 10/8-markiertem Lysat) analysiert. Die Proben wurden per Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt, entsprechend der Proteinmengenverteilung in 14 Molekulargewichtsbereiche geteilt und im Gel tryptisch verdaut.

### **2.2.11 Kinase Anreicherung**

Zur Anreicherung der interessierenden Proteinkinasen wurde das Lysat auf 1M NaCl eingestellt um ionische Wechselwirkungen zu verringern und die Spezifität der Anreicherung zu erhöhen. Das Lysat (entsprechend 270mg und 405mg Protein in den biologischen Replikaten) wurde dann für drei Stunden bei  $4^{\circ}\text{C}$  mit einem Gemisch aus sieben, an Sepharosepartikel gekoppelten, Kinaseinhibitoren (Affinitätsmatrix) inkubiert (Tabelle 2.2-3).

## Material und Methoden

Tabelle 2.2-3 Kinaseaffinitätsmatrices für die Kinase-Anreicherung im Batch-Verfahren

Inhibitor	16832	Purvalanol B	16741	Dasatinib	AX14596	Bis X	SU 6668
Kupplungs- konzentration [mM]	1.5	10	5	5	10	5	10
Menge [ $\mu$ l]	500	500	300	300	300	300	300

Anschließend wurde die Affinitätsmatrix zweimal mit Lysepuffer mit 1 M NaCl, einmal mit Lysepuffer mit 150 mM NaCl und einmal mit 50mM Hepes pH 7,5 gewaschen. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte durch fünfmalige Inkubation für 10 Minuten mit 2 ml 0,5% SDS, 5 mM Dithiothreitol (DTT) bei 60°C. Die fünf Elutionsfraktionen wurden vereinigt, lyophilisiert, in 1ml H<sub>2</sub>O gelöst und die enthaltenen Proteine durch Chloroform/Methanol Extraktion nach Wessel-Flügge präzipitiert.

### 2.2.12 Gelperverdau

70% des Präzipitats aus der Kinaseanreicherung wurde in 1,5x LDS Puffer gelöst und mittels Elektrophorese auf einem 4-12% Gradienten-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Proteine wurden mit kolloidalem Coomassie angefärbt und das Gel entsprechend der Molekulargewichtsverteilung in 14 Bereiche zerschnitten um die enthaltenen Proteine tryptisch im Gel zu verdauen. Hierzu wurde jeder ausgeschnittene Gelbereich zunächst in ca. 1mm<sup>2</sup> große Kuben zerteilt, in 50% Acetonitril (ACN), 25 mM Ammoniumbikarbonat (ABC) entfärbt und mit 100% Ethanol dehydriert. Die Disulfidbrücken der Proteine wurden dann mit 10 mM DTT, 50 mM ABC für 60 Minuten bei 56°C reduziert und anschließend mit 55 mM Iodacteamid (IAA) unter Lichtausschluss für 45 Minuten alkyliert. Nach zwei Wasch- und Dehydrierungsschritten mit 50 mM ABC-Puffer und 100% Ethanol wurden die Proteine mit 12,5 ng/ $\mu$ l Trypsin in 50 mM ABC-Puffer für 18 Stunden bei 37°C verdaut. Nach der Inaktivierung des Trypsins durch Ansäuern mit 1% Trifluoressigsäure (TFA) wurden die entstandenen tryptischen Peptide mit 30% ACN, 3% TFA zweimalig extrahiert und die Gelstücke mit 100% ACN dehydriert. Alle drei Elutionsfraktionen wurden kombiniert und die flüchtigen Komponenten im Vakuum entfernt. 90% der erhaltenen Peptidlösungen wurden zur Phosphopeptidanreicherung mittels TiO<sub>2</sub> verwendet, während 10% zur Bestimmung der Proteinmengenverhältnisse direkt mit C-18 Material entsalzt und im Massenspektrometer analysiert wurden.

### 2.2.13 Lösungsverdau

Die Proteine wurden in einem chaotropen Puffer aus 7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 20 mM Hepes pH 7,5 gelöst, mit 1 mM DTT für 45 Minuten reduziert und anschließend mit 5,5 mM IAA für 30 Minuten alkyliert. Der tryptische Verdau wurde in zwei konsekutiven Schritten zunächst mit Endo-Lysylpeptidase C für 4 Stunden und nach Reduktion der Harnstoffkonzentration auf  $< 2$  M mit Trypsin für 18 Stunden durchgeführt. Nach dem Abstoppen des Verdaus mit 0,5% TFA wurden die Phosphopeptide entweder direkt mit  $\text{TiO}_2$  Partikeln angereichert oder zunächst mittels SCX fraktioniert und anschließend mit  $\text{TiO}_2$  oder IMAC angereichert.

### 2.2.14 Phosphopeptidanreicherung

#### 2.2.14.1 $\text{TiO}_2$

Zur Anreicherung der Phosphopeptide mittels  $\text{TiO}_2$  wurden pro Probe 5mg  $\text{TiO}_2$  Partikel (10 $\mu\text{m}$ ) zunächst mit 20% ACN, pH  $> 10,5$  gewaschen, mit 50% ACN, 0,1% TFA equilibriert und mit 5 g/l 2,5-Dihydrobenzoesäure in 80% ACN desensitiviert. Die auf 30% ACN und 2 M Harnstoff eingestellte Probe wurde dann für 30 Minuten mit den  $\text{TiO}_2$  Partikeln auf einem Drehrad bei Raumtemperatur inkubiert. Nicht gebundene Peptide wurden durch viermaliges waschen mit 50% ACN, 0,1% TFA entfernt. Die  $\text{TiO}_2$  Partikel wurden auf, mit C-8 Material gepackte, Stage-Tips überführt und die gebundenen Phosphopeptide durch Anheben des pH-Wertes mit zunächst 20% ACN, pH  $> 10,5$  und dann 40% ACN, pH  $> 10,5$  eluiert. Zur Vermeidung alkalischer Hydrolyse der Phosphorsäureesterbindungen wurden die Eluate mit 1% TFA angesäuert und massenspektrometrisch analysiert.

#### 2.2.14.2 IMAC

Die entsalzten und lyophilisierten SCX Fraktionen wurden in je 200  $\mu\text{l}$  IMAC Bindungspuffer (40% Acetonitril, 25mM Ameisensäure) gelöst und für eine Stunde unter Schütteln mit 5  $\mu\text{l}$  equilibriertem *PhosSelect Iron Affinity* Gel inkubiert. Die Proben wurden anschließen auf C-18 Stage-Tips geladen, zweimal mit je 70  $\mu\text{l}$  IMAC Bindungspuffer gewaschen und anschließend einmal mit 70  $\mu\text{l}$  1% (v/v) Ameisensäure equilibriert. Die gebundenen Peptide wurden dann dreimal mit je 70  $\mu\text{l}$  500 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , pH 7 von dem IMAC Gel eluiert und an das C-18 Material gebunden. Nach Entfernung der Salze durch zweimaliges Waschen mit 1% (v/v) Ameisensäure wurden die Peptide mit 50% (v/v) ACN, 0,5% (v/v) Essigsäure von dem C-18 Material eluiert.

### 2.2.15 Peptid-Entsalzung

#### 2.2.15.1 C-18 Kartuschen

Zur Entfernung interferierender Salze wurden die Peptidproben durch Bindung an hydrophobem C-18 Material entsalzt. Die SepPack C-18 Kartuschen wurden zunächst mit Acetonitril und Elutionspuffer (50% (v/v) Acetonitril, 0,5% (v/v) Essigsäure) gewaschen, mit Waschpuffer 1 (0,1% (v/v) Trifluoressigsäure) equilibriert und dann die Proben geladen. Nach dem Waschen mit Waschpuffer 1 und 2 (0,5% (v/v) Essigsäure) wurden die Proben dann mit Elutionspuffer eluiert und lyophilisiert.

#### 2.2.15.2 Stage-Tips

Die Entsalzung kleinster Probenmengen (~2 µg), unmittelbar vor der massenspektrometrischen Analyse, wurde mit selbstgefertigten Stage-Tips durchgeführt. Hierzu wurden aus Empore C-8 oder C-18 Material Scheiben von ca. 2 mm Durchmesser ausgestanzt und damit 200 µl Pipettenspitzen zweilagig gestopft. Die Stage-Tips wurden mit 100 µl Elutionspuffer (80% (v/v) Acetonitril, 0,5% (v/v) Essigsäure) gewaschen, mit 200 µl 0,1% TFA equilibriert und die mit 1% TFA angesäuerten Proben geladen. Anschließend wurden die Stage-Tips mit 200 µl 0,5% (v/v) Essigsäure gewaschen und die Peptide zweimal mit 20 µl Elutionspuffer eluiert. Vor der massenspektrometrischen Analyse wurde das Eluat im Vakuum auf ein Volumen von etwa 5 µl reduziert und auf 2% (v/v) ACN, 0,1% TFA eingestellt.

### 2.2.16 SCX Chromatographie

#### 2.2.16.1 integrierte Analyse der LPA/HB-EGF induzierten Phosphorylierungsnetzwerke

Etwa 7,5 mg Peptid wurden nach dem Lösungsverdau mit SCX Puffer A (30% (v/v) Acetonitril, 5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,01% (v/v) TFA) verdünnt um die Leitfähigkeit auf einen Wert von weniger als 5 mS einzustellen und mit einem Fluss von 1 ml/min auf eine Ressource S 1 ml SCX Säule geladen. Die Elution erfolgte bei einem Fluss von 1 ml/min durch einen Gradienten von 0-30% SCX Puffer (30% (v/v) Acetonitril, 5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 350 mM KCl, 0,01% (v/v) TFA) in SCX Puffer A. Anschließend wurden der Durchfluss und die erhaltenen Fraktionen entsprechend der UV Absorption bei 215 nm vereinigt. Die Phosphopeptide wurden dann mit TiO<sub>2</sub> Partikeln angereichert.

#### 2.2.16.2 Zeitreihenanalyse des LPA induzierten Phosphorylierungsnetzwerks

Für die Zeitreihenanalyse wurden etwa 10 mg Peptid nach dem Lösungsverdau entsalzt und in 500 µl SCX Puffer A\* (30% (v/v) Acetonitril, 7 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 2.65 mit Ameisensäure) bei einem Fluss von 3 ml/min auf eine 250 mm\*15 mm PolyLC SCX

Säule geladen und durch einen Gradienten von 0-30% SCX Puffer B\* (30% (v/v) Acetonitril, 7 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 350mM KCl, pH 2.65 mit Ameisensäure) binnen 33 Minuten eluiert. Anschließend wurden der Durchfluss und die erhaltenen Fraktionen entsprechend der UV Absorption bei 215 nm vereinigt. Die 14 Elutionsfraktionen jedes experimentellen Teils wurden lyophilisiert, entsalzt und anschließend mit IMAC die Phosphopeptide angereichert.

### 2.2.17 Massenspektrometrische Analyse

Die entsalzten Proben wurden vor der Analyse auf 2% ACN und 0,1% TFA eingestellt. Pro Lauf wurden jeweils 5 µl der Peptidmischung mittels, direkt an das Elektrospray-Tandem-Massenspektrometer (ESI-MS/MS) gekoppelter, Reverse-Phase-Flüssigkeitschromatographie (nanoLC) aufgetrennt. Die Proben wurden auf eine 15 cm lange, mit 3 µm ReproSil-Pur C18-AQ gepackte Quarzglas Kapillarsäule mit einem Innendurchmesser von 75 µm geladen. Zur Verbesserung der Reproduzierbarkeit der Elutionszeiten, sowie zur Minimierung von Rückstandsablagerungen wurde die Kapillarsäule auf 31°C temperiert. Die Proben wurden in einem Volumen von 5 µl mit einem Fluss von 500 nl/min auf die Säule geladen und anschließend bei einem Fluss von 250 nl/min über einen Gradienten von 5% bis 100% Puffer B (80% Acetonitril, 0,5% Essigsäure) binnen 123 Minuten eluiert (Tabelle 2.2-4) und mittels nano-Elektrospray Ionenquelle mit einer Spannung von 2,2 kV ionisiert. Zur Vermeidung von Probenverschleppungen wurde die 10 µl Probenschleife der HPLC zwischen den Läufen entsprechend Tabelle 2.2-5).

**Tabelle 2.2-4 Nano HPLC Elutionsgradient.**

<b>Anteil an Elutionspuffer [%]</b>	<b>Zeit [min]</b>	<b>Fluß [nl/min]</b>
<b>5</b>	0	250
<b>10</b>	5	250
<b>35</b>	90	250
<b>60</b>	107	250
<b>80</b>	109	250
<b>100</b>	111	500
<b>100</b>	116	500
<b>5</b>	117	250
<b>5</b>	118	500
<b>5</b>	123	500

## Material und Methoden

Tabelle 2.2-5 Nano HPLC Probenschleifen Waschprogramm.

Wiederholungen	Puffer	Volumen
1x	80% Acetonitril, 20% Trifluoressigsäure	20µl
2x	80% Acetonitril, 0,5% Essigsäure	20µl
4x	0,5% Essigsäure	20µl

Das Massenspektrometer wurde im positiven Ionenmodus, mit datenabhängiger Akquisition durch die Xcalibur 2.0 Software, betrieben. Das Spektrometer wurde durch die Koinjektion interner Standardionen ( $m/z$  429.08875) aus der Umgebungsluft in die C-Trap in Echtzeit rekaliert (*Lock Mass Option*) (Schroeder, Shabanowitz et al., 2004; Olsen, de Godoy et al., 2005). MS-Übersichtsspektren, von  $m/z$  350 - 1750, wurden nach der Akkumulation von  $1 \cdot 10^6$  Ionen in der Orbitrap mit einer Auflösung von 60.000 bei  $m/z$  400 akquiriert und die fünf bzw. zehn (Zeitreihenanalyse) abundantesten Ionen mit einer Ladung von  $\geq 2$  und einer Abundanz von über 1000 Ionen, nacheinander isoliert, mit einem Q-Wert von 0,25 für 30ms aktiviert, fragmentiert und die resultierenden Fragmentionen in der linearen Ionenfalle (LTQ) analysiert. Durch Verwendung einer dynamischen Ausschlussliste wurde die wiederholte Sequenzierung gleicher Peptide unterdrückt. Die *muti-stage activation* mit einer normalisierten Kollisionsenergie von 35% für 30 ms wurde im Fall der Detektion eine *neutral loss events*, durch den Nachweis von Fragmentionen bei 97,97, 48,99, oder 32.66  $m/z$  unter dem Vorläuferion, aktiviert (pseudo-MS<sup>3</sup>) (Cox and Mann, 2008).

### 2.2.18 Datenprozessierung

Die Rohdaten der massenspektrometrischen Analysen wurden mit der hauseigenen Software MaxQuant prozessiert (Elias, Haas et al., 2005). Die Peaklisten der MS Spektren wurden gegen eine hauseigene *Decoy*-Datenbank mit 69.316 Einträgen aus dem International Protein Index (IPI), sowie 69.316 invertieren Proteinsequenzen zur Bestimmung und Begrenzung des Erwartungswertes für falsch positiv identifizierten Peptide/Proteine (*false discovery rate*, FDR), gesucht. Zudem wurden 175 bekannte Proteinkontaminationen (wie z.B. humane Keratine, Trypsin oder die Endoproteinase Lys-C) in der Datenbank annotiert und im Verlauf der späteren Analyse aus dem Datensatz entfernt. Die maximal zulässigen Massenabweichungen betragen 7 ppm für MS-Spektren und 0,5 Da für MS/MS-Spektren. Als mögliche Modifikationen wurden Carbamidomethylcytein (*fixed*), sowie oxidiertes Methionin, Protein *N*-Acetylierung und Phosphorylierung von Serin, Threonin und Tyrosin (*variable*) eingestellt. Aufgrund des

gewählten SILAC Ansatzes wurden auch die verwendeten Aminosäureisotopen Lys-4, Lys-8, Arg-6 und Arg-10 als variable Modifikationen bei der Datenbanksuche berücksichtigt. Als Bedingung wurde weiterhin tryptische Spezifität der identifizierten Peptide gefordert und maximal drei ausgelassene Schnittstellen (Arginin oder Lysin) zugelassen. Für jedes Peptid wurde die Wahrscheinlichkeit einer falsch-positiven Identifikation (*posterior error probability*, PEP), auf Basis des individuellen Mascot-Score und der Peptidlängen-abhängigen Histogrammverteilung für jede Peptidzuordnung zu invertierten und nicht-invertierten Datenbankeinträgen unter Anwendung von Bayes' Theorem, bestimmt. Die PEP auf Proteinebene wurde entsprechend durch Multiplikation aller zu einer Proteingruppe gehörenden Peptid-PEPs berechnet. Der zu erwartende Anteil falsch-positiver Identifikationen des gesamten Datensatzes (*false discovery rate*, FDR) wurde sowohl auf Protein-, als auch auf Peptidebene, berechnet auf 1% begrenzt (Olsen, Blagoev et al., 2006). Die identifizierten Peptide wurden Proteingruppen zugeordnet, durch die Proteine mit überschneidenden und nicht-einzigartigen Peptiden zusammengefasst wurden. Das anführende Protein (*leading protein*) jeder Gruppe musste durch mindestens zwei Peptide, von denen mindestens eins diesem Protein eindeutig zuordbar (*unique*) sein musste, identifiziert sein. Die identifizierten Peptide wurden automatisch quantifiziert und eventuelle Phosphorylierungsstellen durch die in MaxQuant implementierte *post-translational modification* (PTM) *score-based localisation* zugeordnet. Für spätere Analysen wurden nur Phosphorylierungsstellen mit einer Lokalisationswahrscheinlichkeit von mehr  $p \geq 0,75$  (Klasse I Phosphorylierungsstellen) berücksichtigt. Um Ungenauigkeiten bei der Vereinigung der einzelnen, differentiell markierten Lysate auszugleichen, wurden die gemessenen quantitativen Daten jedes Peptids / Proteins auf die Gesamtheit aller gemessenen Peptide / Proteine normalisiert. Für den semiquantitativen Vergleich der Kinaseaffinitätsmatrices und der LPA-Zeitreihen Studie wurde zudem die *match between runs* Funktion von MaxQuant genutzt. Hierdurch wurde bewirkt, dass die Identifikation eines Peptides einer Probe mit den zum gleichen Zeitpunkt eluierenden Peptiden gleicher Masse in einer anderen Probe korreliert wird. Dadurch kann insbesondere bei vergleichenden Analysen oder gekoppelten Experimenten, bei denen die Zusammensetzung vergleichbar ist, die konsistente Quantifizierung der Phosphopeptide / Proteine sichergestellt werden.

### **2.2.18.1 integrierte Analyse der LPA/HB-EGF induzierten Phosphorylierungsnetzwerke**

Um eine eventuelle differenzielle Regulation mehrfach phosphorylierter Peptide erfassen zu können, wurden zudem die Messwerte für die Phosphorylierungsstellen separat für einfach, doppelt oder mehrfach phosphorylierte Peptide bestimmt. Die in den biologischen Replikaten signifikant regulierten Phosphorylierungsstellen wurden auf Basis des Ratio-über-Ratio Ansatzes identifiziert. Hierzu wurde aus den zwei Einzelmesswerten jedes Peptids ein Ratio-über-Ratio errechnet,  $\log_2$  transformiert und als Histogramm dargestellt. Durch eine Gaus'sche Regressionsanalyse wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen der interexperimentellen Verteilungen für jedes Isotopenverhältnis über den gesamten Datensatz berechnet. Die so erhaltenen Mittelwerte und Standardabweichungen dienten der Festlegung der Regulationsschwellen von mindestens  $\pm 2,5 \sigma$ . Die als reguliert betrachteten Phosphorylierungsstellen mussten in ihrem Mittelwert mindestens  $\pm 2,5 \sigma$  vom Mittelwert der Gesamtverteilung des Datensatzes entfernt und zudem in beiden biologischen Replikaten konsistent reguliert sein.

Die in den Datensätzen überrepräsentierten Gene Ontology (GO) Kategorien wurden mit dem DAVID Genklassifizierungstool identifiziert (Huang da, Sherman *et al.*, 2007). Als Signifikanzkriterium wurde ein EASE Score von  $p \leq 0.05$  verwendet. Die Kinaseangereicherten Fraktionen wurden auf Basis ihrer molekularen Funktion (GO-MF) gegen ein Hintergrund, bestehend aus dem gesamten humanen Proteom, analysiert, während die regulierten Phosphoproteine auf Basis ihrer Beteiligung an biologischen Prozessen (GO-BP) gegen einen Hintergrund aus allen identifizierten Phosphoproteinen analysiert wurden.

Aus allen Proteinen mit, durch LPA-regulierten, Phosphorylierungsstellen wurde darüber hinaus mit Hilfe der STRING Protein-Interaktionsdatenbank (Jensen, Kuhn *et al.*, 2009) ein Proteininteraktionsnetzwerk auf Basis experimenteller und Datenbank-annotierter Protein-Protein Interaktionen generiert und mit Hilfe des Programms Cytoscape visualisiert.

### **2.2.18.2 Zeitreihenanalyse der LPA-induzierten Phosphorylierungsnetzwerke**

Für die Zeitreihenanalyse der LPA-induzierten Phosphorylierungsereignisse wurden zwei SILAC Dreifachmarkierungsexperimente über eine gemeinsame Bedingung gekoppelt und so der zeitabhängige Phosphorylierungsstatus für jede quantifizierte Phosphorylierungsstelle zu den Zeitpunkten 0 min, 3 min, 10 min, 30 min und 90 min

bestimmt. Die Experimente wurden zudem als biologische Triplikate mit alternierender Isotopenmarkierung durchgeführt.

Die Daten wurden mit MaxQuant (V. 1.0.13.12) prozessiert, die Phosphorylierungsstellen identifiziert und jeweils auf Basis der Phosphopeptide mit den wenigsten Modifikationen quantifiziert. Die sich aus der Quantifizierung ergebenden Phosphorylierungsverhältnisse wurden für jedes einzelne Replikat entsprechend des Isotopen-Markierungsschemas invertiert. Zudem wurden die der invertierten Datenbank zugeordneten Proteinkontaminationen (wie BSA oder Trypsin) entfernt. Für die weitere Analyse wurden ausschließlich Phosphorylierungsstellen beibehalten, die zu jedem Zeitpunkt in mindesten zwei biologischen Replikaten auf Basis von Klasse I Phosphopeptiden (Lokalisierungswahrscheinlichkeit  $p \geq 0,75$ ) quantifiziert werden konnten. Die Messwerte aus den Replikaten wurden gemittelt und für jeden Zeitpunkt der Variationskoeffizient berechnet. Anschließend wurden die zwei Experimente über den gemeinsamen 10 Minuten Zeitpunkt verknüpft. Phosphorylierungsstellen mit einer Veränderung der Abundanz um einen Faktor von  $\geq 2$  oder  $\leq 0,5$  zu einem beliebigen Zeitpunkt wurden als reguliert angesehen, wenn der Variationskoeffizient eines regulierten Zeitpunktes kleiner als 0,3 war.

Die Zeitprofile aller regulierten Phosphorylierungsstellen wurden mittels „fuzzy-c means clustering“ (Olsen, Blagoev et al., 2006) acht Clustern zugeordnet. Die Arbeitsparameter (c, m) des Algorithmus wurden empirisch optimiert und  $c = 8$  und  $m = 2$  verwendet. Vor dem Clustering wurden die Phosphorylierungsprofile logarithmiert und normalisiert (*z-score*), so dass der Mittelwert jeder Zeitreihe einen Wert von null und die Standardabweichung einen Wert von eins annahm.

Die funktionale Bedeutung der in den Zeitprofilcluster zusammengefassten Phosphoproteine wurde auf Grundlage der statistisch überrepräsentierten *Gene Ontology biological process* (GO-BP) Annotationen ermittelt. Als Signifikanzkriterium wurde ein EASE Score von  $p \leq 0.05$  und als Hintergrunddatensatz alle identifizierten, phosphorylierten Proteine verwendet.

Für alle regulierten Phosphorylierungsstellen wurde die umgebende Aminosäuresequenz von Position -6 bis +6 extrahiert. Aus den reguliert phosphorylierten Sequenzen wurden mit Hilfe des Motiv-X Algorithmus statistisch signifikante Konsensusmotive extrahiert. Die Analyse erfolgte gegen einen Hintergrund bestehend aus allen nicht-regulierten, phosphorylierten Sequenzen. Als Signifikanzkriterien wurden ein *p-score* von  $1 \cdot 10^{-6}$

und eine minimale Motivhäufigkeit von 20, unter den regulierten Sequenzen, verwendet. Anschließend wurde die Verteilung der signifikanten Motive in den Zeitprofilclustern analysiert.

Aus allen Proteinen mit, durch LPA-regulierten, Phosphorylierungsstellen wurde mit Hilfe der STRING Protein-Interaktionsdatenbank ein Proteininteraktionsnetzwerk auf Basis experimenteller und Datenbank-annotierter Protein-Protein Interaktionen mit einem Signifikanzniveau von  $p \geq 0,7$  generiert und mit Hilfe des Programms Cytoscape visualisiert. Die Netzwerke wurden mit Hilfe von Cytoscape unter Berücksichtigung der GO-MF und GO-BP Annotationen wichtiger Proteingruppen visualisiert.

### **2.2.18.3 Quantitative Charakterisierung von zellulären Marimastat Interaktoren**

Die Rohdaten wurden mit MaxQuant (V. 1.0.12.0) prozessiert, und die Proteine auf Grundlage eindeutig zuordbarer Peptide quantifiziert. Im ersten Schritt wurden alle gemessenen Proteinverhältnisse auf die initial eingesetzten Proteinmengen normalisiert. Diese Proteinmengenverhältnisse wurden durch separate Messung einer zu gleichen Teilen aus den Lysaten zusammengesetzten Pooling-Kontrollprobe bestimmt. Die quantifizierten Proteine wurden dann nach den, über die Duplikate gemittelten, Verhältnissen zwischen ihrer Bindung an Kontrollmatrix und Inhibitormatrix (Bindungsspezifität) sortiert und nur Proteine mit einer Bindungsspezifität von  $\leq 0,2$  (Hintergrund *versus* Inhibitorbindung) für die weitere Analyse berücksichtigt. Anschließend wurden die Dissoziationskonstanten für die Protein-Inhibitor Komplexe auf Grundlage der, über die Replikate gemittelten, Verhältnisse zwischen der Proteinbindung in der ersten Inkubation und zweiten Inkubation mit der Affinitätsmatrix berechnet. Da die metabolische Markierung zwischen den Replikaten getauscht wurde, konnten kontaminierende Proteine durch ihre invertierten Verhältnisse in den Replikaten identifiziert und aus dem Datensatz entfernt werden. Wenn mit  $r$  das Verhältnis zwischen der Proteinbindung in der zweiten und ersten Inkubation bezeichnet wird, so ergibt sich für die Dissoziationskonstante  $K_i$  (Inhibitor<sub>immob</sub>) eines bestimmten, mit der Affinitätsmatrix interagierenden Proteins:

$$K_{I(\text{Inhibitor immob.})} = \frac{c[\text{Inhibitor}_{\text{immob}}] * r}{(1 - r)}$$

$c[\text{Inhibitor}_{\text{immob}}]$  Konzentration des immobilisierten Inhibitors im Gesamtvolumen des Bindungsassay

Die Einstellung eines Bindungsgleichgewichtes, unter den für die *in vitro* Assoziations-Experimente gewählten Bedingungen, wurde durch die Berechnung der

## Material und Methoden

---

Proteinbindungsverhältnisse nach acht Stunden und zwei Stunden (Bindungskinetik), sowie durch den Vergleich der Proteinbindung aus unverdünntem und 1:3 verdünntem Zelllysat (Liandenüberschuss) überwacht.

Aus den Proteinbindungsdaten der gekoppelten Konkurrenzexperimente mit Marimastat-Affinitätsmatrix und unterschiedlichen Konzentrationen an freiem Marimastat wurden auf Grundlage des 1:1 Bindungsmodells von Sigmaplot (Version 10.0, Systat Software, Inc.)  $IC_{50}$  Werte für die halbmaximale Inhibition von Proteinen berechnet, für die zu jeder eingesetzten Konzentration freien Inhibitors Proteinquantifizierungsdaten und  $K_i$  Werte bestimmt werden konnten. Aus den  $K_i$  Werten für den immobilisierten Inhibitor und den  $IC_{50}$  Werten für den freien Inhibitor wurde mittels der Cheng-Prusoff Gleichung die Dissoziationskonstante des freien Inhibitors berechnet:

$$K_{I(\text{Inhibitor frei})} = \frac{K_{I(\text{Inhibitor immob.})}}{c[\text{Inhibitor}_{(\text{immob.})} + K_{I(\text{Inhibitor immob.})} * IC_{50(\text{Inhibitor frei})}]}$$

Für Fälle, in denen trotz spezifischer Bindung, für r Werte von etwas über eins gemessen wurden, konnte davon ausgegangen werden, dass  $K_i(\text{Inhibitor}_{\text{immob.}})$  weit größer ist als die Konzentration des immobilisierten Inhibitors und daher  $K_i(\text{Inhibitor}_{\text{frei}})$  in etwa der halbmaximalen Inhibitorkonzentration  $IC_{50}(\text{Inhibitor}_{\text{frei}})$  entspricht.

## 3 ERGEBNISSE

### 3.1 SEMIQUANTITATIVER VERGLEICH VON KINASE-AFFINITÄTSMATRICES

Für die experimentelle Zielsetzung, der Analyse zellulärer Phosphorylierungsnetzwerke, ist die Beobachtung regulierter Phosphorylierungsereignisse an Proteinkinasen von besonderer Bedeutung. Um die, zumeist schwach exprimierten und darüber hinaus nur selten in stöchiometrischen Anteilen phosphorylierten Schlüsselenzyme der Phosphorylierungskaskaden in komplexen Proteingemischen einer Analyse zugänglich zu machen, wurden ein Proteinklassen-selektives Anreicherungsverfahren weiterentwickelt. Zunächst wurden neun Proteinkinase-Inhibitoren (Abbildung 3.1-1) an funktionalisierte Sepharosematrices immobilisiert. Die Matrices wurden zur säulenaffinitätschromatographischen Anreicherung interagierender Proteine aus HeLaS3 Zellysat verwendet. Basierend auf der semi-quantitativen Analyse der Bindungsprofile wurde die Zusammensetzung der Affinitätsmatrix für die weiteren Experimente optimiert.

## Ergebnisse

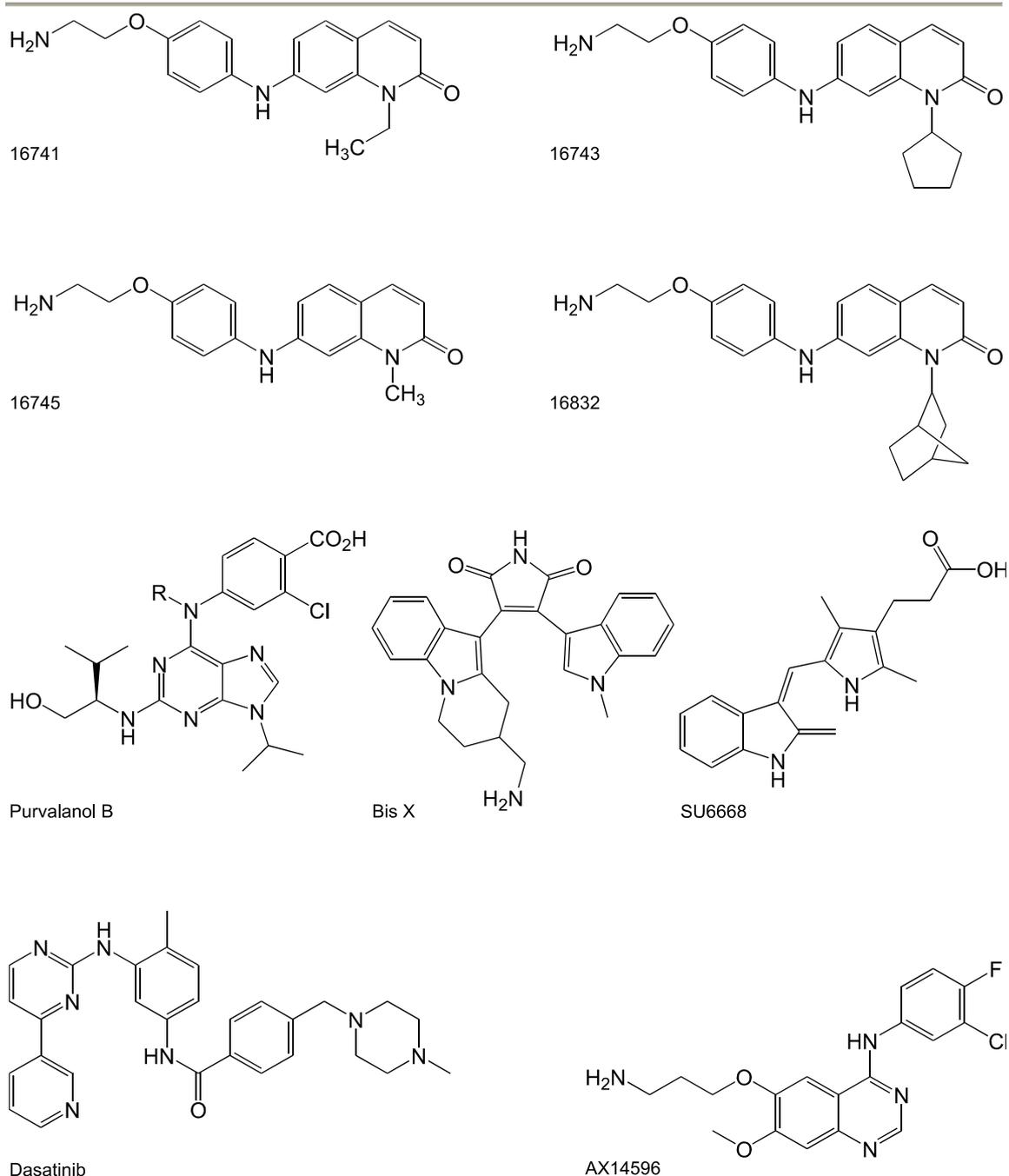
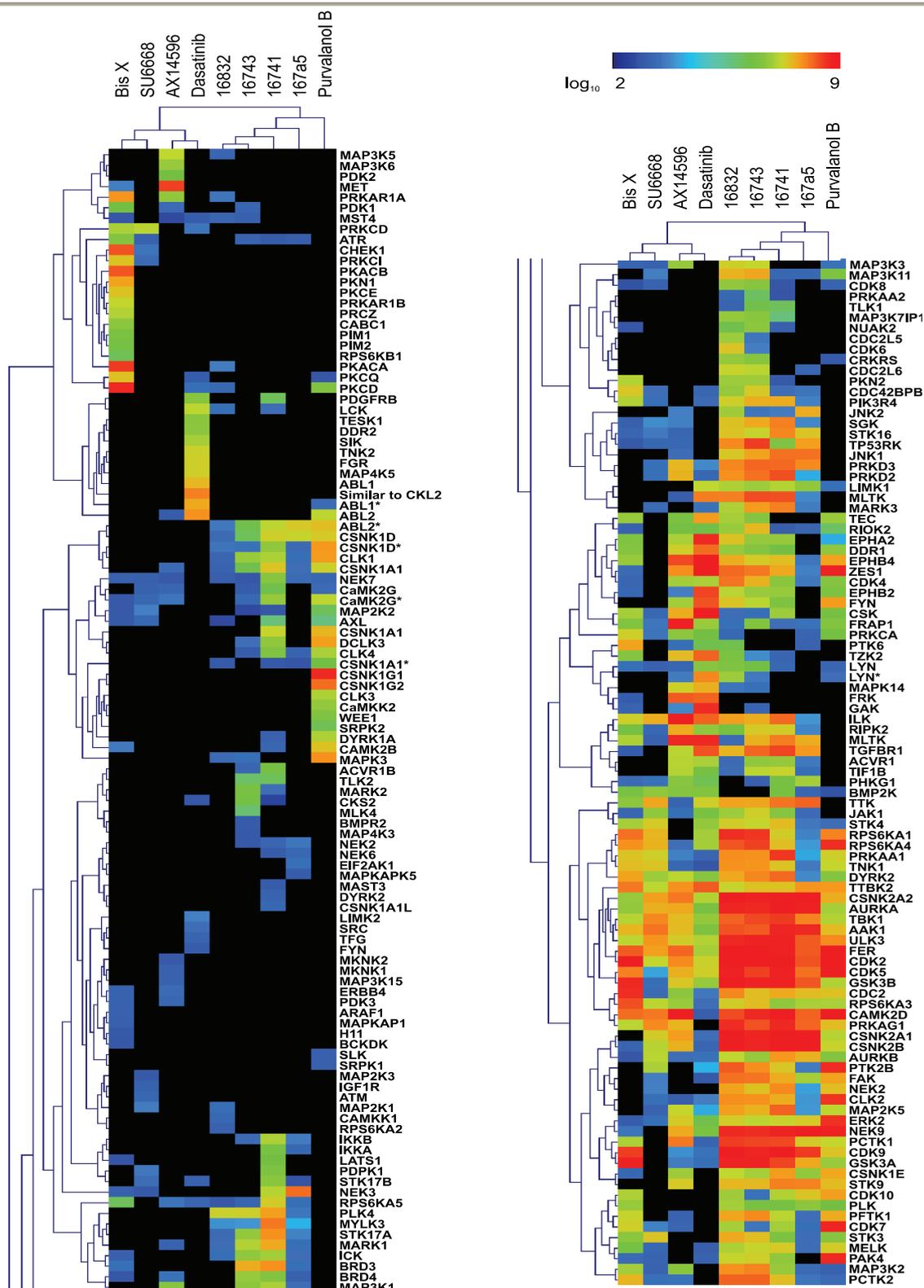


Abbildung 3.1-1 Strukturen der zur Affinitätsanreicherung verwendeten Kinaseinhibitoren.

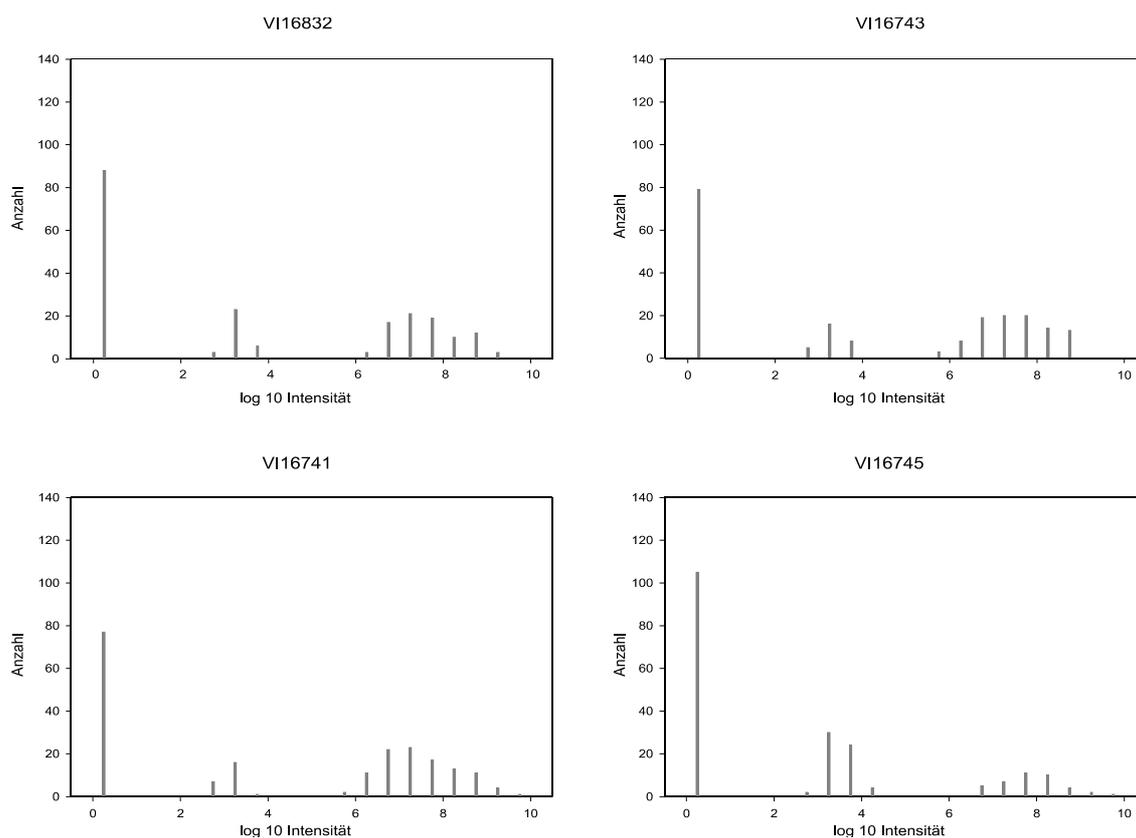
Die so erhaltenen Proteinproben wurden gelelektrophoretisch in vier Molekulargewichtsbereiche aufgetrennt, tryptisch verdaut und massenspektrometrisch analysiert, wobei die Proteinquantifizierung semiquantitativ ohne metabolische Markierung auf Basis der extrahierten Peptid-Elutionsprofile erfolgte. Die über jeweils zwei biologische Replikate gemittelten Proteinkinaseintensitäten wurden logarithmiert und sowohl die gebundenen Proteinkinasen, als auch die Inhibitoren gemäß des geringsten euklidischen Abstands hierarchisch gruppiert (Abbildung 3.1-2).



**Abbildung 3.1-2 Semiquantitiver Vergleich verschiedener Kinase-Affinitätsmatrices.** Heatmap der logarithmierten und über zwei Replikate gemittelten Proteinkinase-Intensitäten für die säulenaффinitätschromatische Anreicherung von HeLaS3-Zelllysat mit neun verschiedenen, immobilisierte Kinaseinhibitoren (BisX, SU6668, AX14596, Dasatinib, 16832, 16743, 16741, 167a5 und, Purvalanol B). Sowohl die Proteinkinasen, als auch die Affinitäts-Matrices wurden hierarchisch nach der geringsten euklidischen Distanz gruppiert. Die Annotation der Proteinkinasen erfolgte nach den offiziell empfohlenen Gennamen entsprechend Uniprot. Distinkte Splicevarianten die anhand des Gennamens nicht differenziert werden konnten sind durch \* gekennzeichnet.

## Ergebnisse

Da dieses Experiment vorwiegend der Methodenentwicklung diene, schien eine semiquantitative Analyse angemessen, insbesondere weil die quantitative Analyse von neun Proben mittels SILAC einen immensen technischen Mehraufwand bedeutet hätte. Die mit dieser Analyse ermittelten Kinase-Bindungsprofile entsprachen grundsätzlich den strukturellen Verwandtschaften zwischen den Inhibitoren. So wiesen die beiden Pyrido-[2,3-*d*]-pyrimidin-basierten Inhibitoren mit der größten Profilhologie (VI16832 und VI16743) raumfüllende N8-(Norboryl- bzw. Zyklopentanyl-)Substituenten auf. Das N8-Ethyl-substituierte VI16741 war in seinem Kinaspektrum wiederum ähnlicher zu VI16832 und VI16743 als das N8-Methyl-substituierte VI16745. Zudem ließ sich für das Pyrido-[2,3-*d*]-pyrimidin Derivat mit dem sterisch kleinsten N8-Substituenten (VI16745) im Vergleich zu den anderen Derivaten eine zahlenmäßige Zunahme an Proteinkinasen mit niedriger und-intermediärer Intensität, bei gleichzeitiger Reduktion stark interagierender oder sehr abundanter Kinasen feststellen (Abbildung 3.1-3).



**Abbildung 3.1-3** Histogramm der Intensitäten der durch VI16832, VI16741, VI16743 und VI16745 gebundenen Proteinkinasen. Die von den vier Inhibitoren gebundenen Proteinkinasen lassen sich in drei distinkte Gruppen aufteilen. Schwach interagierende oder niedrig exprimierte Kinasen mit Intensitäten um  $10^1$ , Kinasen mit intermediären mit Intensitäten um  $10^3$  und stark bindende oder sehr abundante Kinasen mit Intensitäten um  $10^7$ .

BisX wies ein distinktes Bindungsprofil für eine Reihe von Serin/Threonin-Kinasen auf. So wurden die Protein Kinase C Epsilon (PKCE) oder die *Protein-kinase C-related*

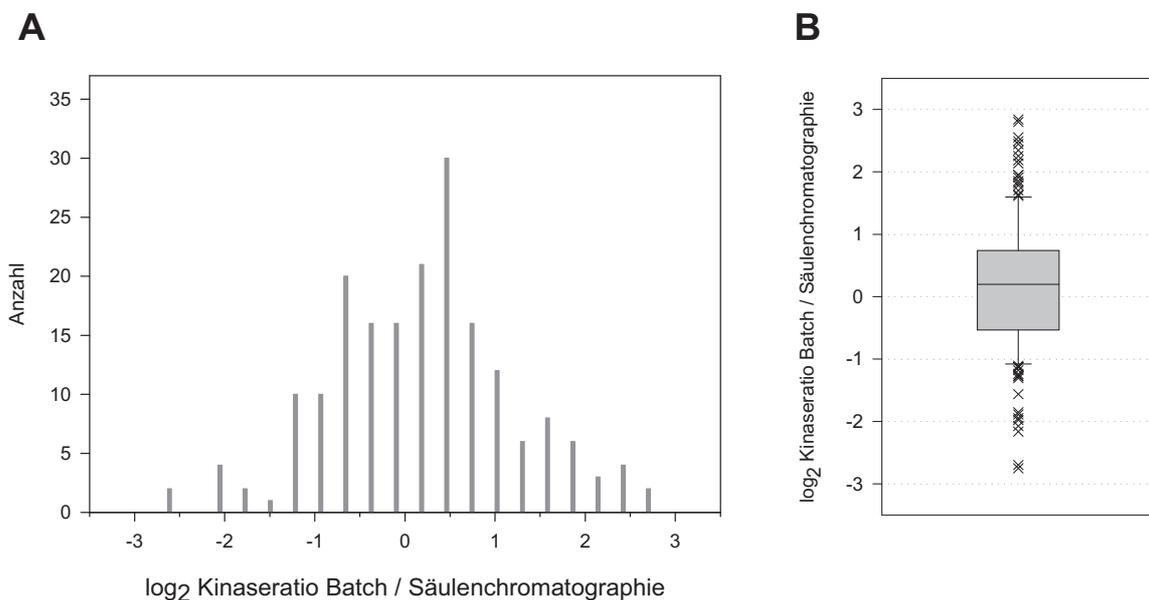
*kinase 1* (PKN1) ausschließlich nach Anreicherung mit BisX und mit hohen Intensitäten detektiert. Die Kinasen *Serine/threonine-protein kinase Chk1* (CHEK1), *Protein-tyrosine kinase 6* (PTK6) und die *cAMP-dependent protein kinase type I-alpha regulatory subunit* (PRKAR1A) wurden zudem von BisX im Vergleich zu den anderen Inhibitoren am besten gebunden. Das ATP-kompetitive Gefitinib-Analogon AX14596 wies hingegen gute Bindungseigenschaften für die Rezeptor-Tyrosinkinase MET auf. Für den klinisch eingesetzten BCR-ABL Inhibitor Dasatinib konnte ein sehr breites Substratspektrum mit besonderer Affinität für onkogene Tyrosinkinasen wie LCK, YES und FGR, Serin/Threonin Kinasen wie ABL und SIK, sowie mehrere Ephrinrezeptor-Isoformen beobachtet werden. Im Gegensatz zum erst kürzlich als Dasatinib Substrat identifizierten und durch fast alle Inhibitormatrices (mit Ausnahme von SU6668 und VI16745) angereicherten, *Discoidin domain receptor 1* (DDR1) (Bantscheff, Eberhard et al., 2007) wird DDR2 in dieser Analyse ausschließlich durch die Dasatinib-Affinitätsmatrix angereichert. Die vier homologen Pyrido-[2,3-*d*]-pyrimidin Derivate (VI16832, VI16741, VI16743, VI16745) verhielten sich in Bezug auf ihr Kinaseprofil erwartungsgemäß ähnlich, wobei sterisch große und hydrophobe N8-Substituenten (VI16832, VI16743), sowohl die Anzahl gebundener Kinasen (verringerte Selektivität), als auch die Affinität im Vergleich zu Inhibitoren mit kleinen Substituenten (VI16745) erhöhen.

Darüber hinaus ermöglichte von allen profilierten Kinaseinhibitoren nur Purvalanol B die Detektion der Proteinkinasen WEE1 und CLK3, sowie der Serin/Threonin Kinase SRPK2 mit mittleren Intensitäten und der Casein Kinase 1 Isoformen G1 und G2 mit hohen Intensitäten.

Um eine möglichst breite Abdeckung zellulärer Proteinkinasen zu erzielen wurden auf Grundlage dieser Ergebnisse sieben Inhibitoren (SU6668, VI16832, VI16741, Purvalanol B, BisX, AX14596 und Dasatinib) für die Kinaseanreicherung in der folgenden Phosphorylierungsstudie selektiert und ihr Anteil an der Gesamtaffinitätsmatrix entsprechend den Bindungseigenschaften gewichtet (Tabelle 2.2-3). Zusätzlich zum sehr breitbandigen VI16832 wurde trotz erheblicher Substratüberschneidungen und generell geringerer Intensität ein zweiter Pyrido-[2,3-*d*]-pyrimidin Inhibitor (VI16741) eingesetzt, da dieser als einziger Inhibitor die Kinasen DYRK2, MAST3 und IKKA/B zu binden vermochte.

## 3.2 VERGLEICHENDE BETRACHTUNGEN ZWEIER PROTEINKINASE ANREICHERUNGSMETHODEN

Parallel zur Optimierung der Affinitätsmatrix wurde die säulenaffinitätschromatographische Anreicherung von Proteinkinasen mit dem technisch einfacheren und wesentlich zeitsparenderen Batch-Verfahren verglichen. Hierfür wurde eine Mischung aus sechs Proteinkinaseinhibitormatrices (VI16832, VI16741, AX14596, Dasatinib, BisX und Purvalanol B) verwendet. Aufgrund der erwarteten geringfügigen Unterschiede zwischen den beiden Methoden wurde die Analyse quantitativ mittels SILAC markierten HeLaS3-Zellysaten durchgeführt. Zunächst wurde das Bindungsverhalten der anzureichernden Proteinkinasen in beiden Verfahren verglichen. Hierzu wurden die für Proteinkinasen beobachteten Verhältnisse zwischen Batch und Säulenchromatographie in 20 Gruppen (Bins) eingeteilt und deren Häufigkeitsverteilung analysiert. Wie aus dem Histogramm (Abbildung 3.2-1, A) ersichtlich wird, handelt es sich nicht um eine normale Verteilung. Daher wurde für eine robuste Identifikation der präferentiell gebundenen Proteinkinasen eine Boxplot Darstellung (Abbildung 3.2-1, B) verwendet.



**Abbildung 3.2-1 Quantitativer Vergleich des Bindungsverhaltens von Proteinkinasen bei Batch- und säulenchromatographischer Anreicherung.** Die Häufigkeitsverteilung der logarithmierten SILAC-Verhältnisse aller quantifizierten Proteinkinasen (A) und der zur Verteilung gehörende Boxplot (B).

Der häufigste Wert liegt im linearen Zahlenraum bei  $\sim 1,5$ , während der Median bei  $\sim 1,15$  liegt und damit einen leichten Vorteil zugunsten der Batch-Methode indiziert. Während mittels Säulenaffinitätschromatographie acht Proteinkinasen (PKCA, PKCD,

## Ergebnisse

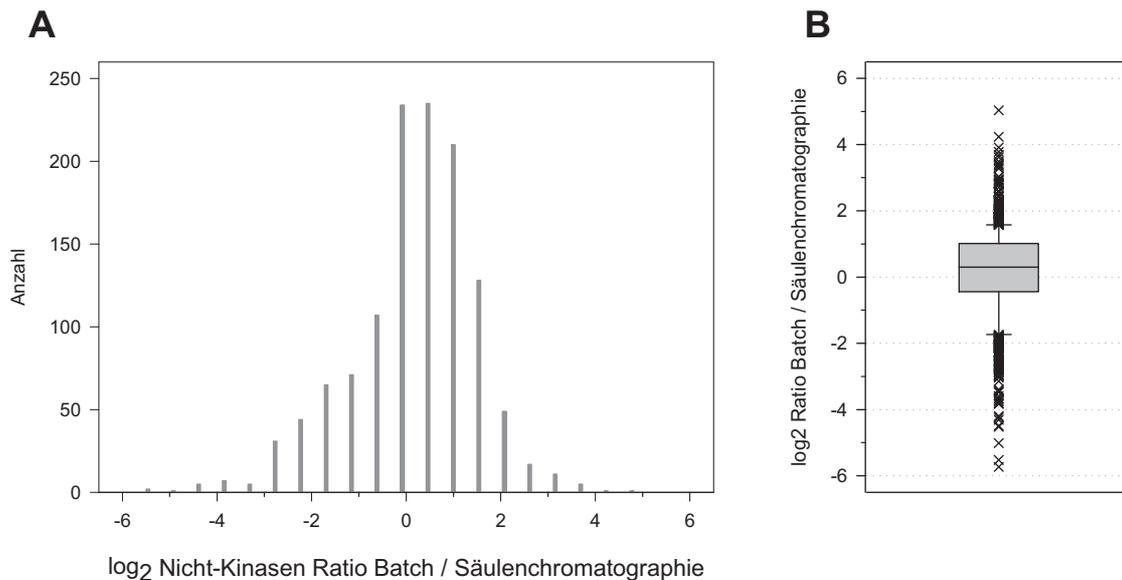
*Mitogen-activated protein kinase 9 (JNK2), Cyclin-dependent kinase-like 5 (CDKL5), Cell division protein kinase 17 (PCTAIRE2), AP2-associated protein kinase 1 (AAK1), Cell division protein kinase 9 (CDK9) und NUA family SNF1-like kinase 2 (NUAK2)) präferentiell angereichert wurden, überwiegt bei der Batch-Methode die Bindung von 33 Proteinkinasen (Tyrosine-protein kinase receptor UFO (AXL), Bromodomain-containing protein 2 (BRD2), Bromodomain-containing protein 4 (BRD4), Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type 1D/2D/2G (CAMK1D, CAMK2D, CAMK2G), Casein kinase I isoform gamma-1/3 (CK1G1, CK1G3), Serine/threonine-protein kinase 35 (CLIK1), Serine/threonine-protein kinase MRCK gamma (DMPK2), Dual serine/threonine and tyrosine protein kinase (DSTYK), Eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 4 (GCN2), G protein-coupled receptor kinase 5 (GPRK5), Insulin-like growth factor 1 receptor (IGF1R), Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta (IKKB), Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 1 (MAP2K1), Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5/6/7 (MAP3K5, MAP3K6, MAP3K7), Serine/threonine-protein kinase MRCK alpha (MRCKA), Serine/threonine-protein kinase MST3/4 (MST3, MST4), Serine/threonine-protein kinase Nek6/Nek9 (NEK6, NEK9), Serine/threonine-protein kinase 38 (NDR1), Serine/threonine-protein kinase OSR1 (OSR1), Macrophage-stimulating protein receptor (RON), 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1), PKN1, PKN2, PKN3, Non-receptor tyrosine-protein kinase TNK1 (TNK1), Non-receptor tyrosine-protein kinase TYK2 (TYK2).*

Eine Erklärung für die präferentielle Anreicherung einiger Proteinkinasen mit der Batch-Methode könnte mit langsamen Bindungskinetiken (kleine  $K_{on}$ -Raten) oder hohen Dissoziationsraten ( $K_{off}$ ) erklärt werden, da das Protokoll der Batchmethode, im Vergleich zur Säulenchromatographie, lange Inkubationszeiten für die Substratbindung und verhältnismäßig kurze Waschkubationen vorsieht.

Da eine geringe Probenkomplexität für die massenspektrometrische Analyse von Vorteil und somit eine Bindung von Nicht-Proteinkinasen unerwünscht ist, wurden die beiden Verfahren ebenfalls in Hinblick auf ihre Spezifität (die Bindung von Nicht-Proteinkinasen) untersucht (Abbildung 3.2-2). Der Median der Intensitätsverteilung lag für die Nicht-Proteinkinasen ebenfalls bei 1,15, der häufigste Wert bei ~1,36. Die Verteilung der Nicht-Proteinkinasen war jedoch wesentlich breiter als die der Proteinkinasen. Insgesamt lagen 315 Proteine außerhalb der Whisker des Boxplots, von

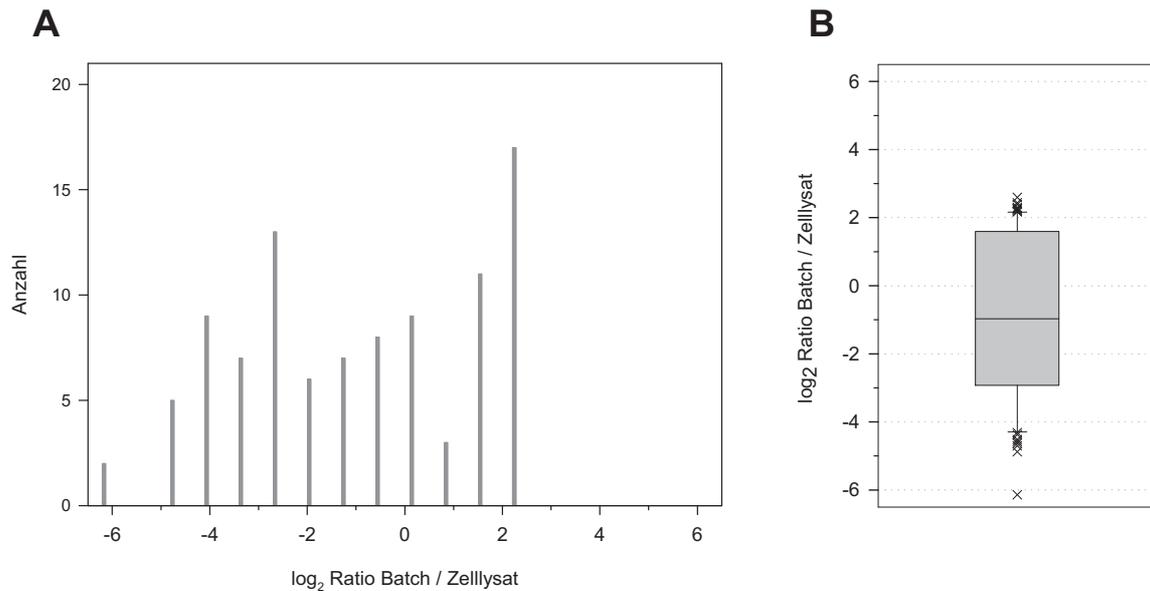
## Ergebnisse

denen 194 präferentiell durch die Säulenchromatographie und 121 durch die Batch-Methode gebunden wurden. Darüber hinaus lagen die gemessenen Verhältnisse für die präferentiell bei der Säulenchromatographie gebundenen Nicht-Proteinkinasen höher, als bei der Batch-Methode. Zusammengenommen ergab sich aus den höheren gemessenen Intensitäten für Proteinkinasen und der kleineren Anzahl und den geringeren Intensitäten gebundener Nicht-Proteinkinasen ein leichter Vorteil zugunsten der Batch-Methode, welche für die nachfolgenden Untersuchungen standardmäßig verwendet wurde.



**Abbildung 3.2-2 Quantitativer Vergleich des Bindungsverhaltens von Nicht-Proteinkinasen bei Batch- und säulenchromatographischer Anreicherung.** Häufigkeitsverteilung der logarithmierten SILAC-Verhältnisse aller quantifizierten Nicht-Proteinkinasen (A) und der zur Verteilung gehörende Boxplot (B).

Um den tatsächlich durch die Batch-Anreicherung gebunden Anteil der Proteinkinasen im Zelllysate zu bestimmen, wurde zudem Arg-0 / Lys-0 markiertes Gesamtzelllysate mit dem Eluat aus der Batch-Anreicherung der zehnfachen Proteinmenge Arg-10 / Lys-8 markierten Lysates vereinigt und massenspektrometrisch analysiert. Von den 137 identifizierten Proteinkinasen konnten in diesem Experiment insgesamt 95 Proteinkinasen quantifiziert werden (Tabelle 3.2-1). Unter der Annahme quantitativer Elution ergab sich aus den gemessenen SILAC-Verhältnissen der durch die Affinitätsmatrices gebundene Anteil der Proteinkinasen. Die Verteilung der Kinasebindung erstreckte sich entsprechend der Whisker-Abstände in der Box-Plot Darstellung über einen Bereich von 0,5% iger bis 44% iger Bindung (Abbildung 3.2-3, B), wobei die Häufigkeitsverteilung (Histogramm) keinen deutlichen Schwerpunkt erkennen ließ (Abbildung 3.2-3, A).



**Abbildung 3.2-3 Anteil der durch Batch-Anreicherung gebundenen Proteinkinasen.** Häufigkeitsverteilung der logarithmierten SILAC-Ratios aller quantifizierten Proteinkinasen (A) und der zur Verteilung gehörende Boxplot (B). SILAC markiertes Zelllysate wurde mit dem Eluat aus der Batch-Anreicherung der zehnfachen Lysatmenge vereinigt und massenspektrometrisch analysiert. Für eine 100%ige Bindung und Elution ergibt sich ein Verhältnis von  $\log_2=3,32$ , für eine 10 %ige Bindung ein Verhältnis von  $\log_2=0$  und für eine 1%ige Bindung ein Verhältnis von  $\log_2=-3,32$ .

Die Proteinkinasen *Cell division protein kinase 7* (CDK7), *Serine/threonine-protein kinase PAK 4* (PAK4), *Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit gamma* (CAMK2G), *Serine/threonine-protein kinase ULK3* (ULK3), *Serine/threonine-protein kinase Nek9* (NEK9), *Tyrosine-protein kinase CSK* (CSK), *Mitogen-activated protein kinase 1* (ERK2), *Ribosomal protein S6 kinase alpha-1* (RPS6KA1) und *Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit delta* (CAMK2D) wurden mit besonders hoher Effizienz von 44% - 68% gebunden, wohingegen die Proteinkinasen *Serine/threonine-protein kinase LMTK2* (LMTK2), *Interferon-induced, double-stranded RNA-activated protein kinase* (PKR), *Serine/threonine-protein kinase PAK 2* (PAK2), *DNA-dependent protein kinase catalytic subunit* (PRKDC), *Serine/threonine-protein kinase OSR1* (OSR1), *Cell division protein kinase 11B* (CDC2L1) und *Lymphokine-activated killer T-cell-originated protein kinase* (PBK) nur zu sehr geringen Anteilen von < 0,47% aus dem Gesamtzelllysate extrahiert werden konnten (Tabelle 3.2-1). Eine Abhängigkeit der Bindungseffizienz von den strukturellen Eigenschaften der Proteinkinasen, wie z. B. ihrem Domänenaufbau oder der Zugehörigkeit zu definierten Kinasefamilien, konnte nicht abgeleitet werden.

## Ergebnisse

**Tabelle 3.2-1 Prozentuale Bindung zellulärer Proteinkinasen bei der Batch-Anreicherung.** Für die SILAC-Analysen wurde das Eluat der Batch-Anreicherung von 2 mg 10/8-markiertem Gesamtprotein mit 200 µg 0/0-markiertem Gesamtprotein vereinigt. Die Anzahl detektierter Peptide bezieht sich auf eindeutige Kombinationen von Sequenz und eventueller Modifikation. FPR: Wahrscheinlichkeit falsch-positiver Proteinidentifikation.

Proteinname	IPI Nummer	Peptide)	FPR	log <sub>2</sub> Batcheluat / Gesamtzelllysats	Prozent Bindung
Nuclear receptor-binding protein	IPI00604756	3	3,50E-12	-6,5193524	0,11%
Lemur tyrosine kinase 2	IPI00217391	2	6,14E-53	-6,14097421	0,14%
Interferon-induced, double-stranded RNA-activated protein kinasen	IPI00019463	8	8,73E-61	-4,87731956	0,34%
Serine/threonine-protein kinase PAK 2	IPI00419979	19	1,21E-228	-4,70063081	0,38%
DNA-dependent protein kinase catalytic subunit	IPI00296337	169	0	-4,62924118	0,40%
Oxidative stress-responsive 1 protein	IPI00010080	12	5,20E-125	-4,57709398	0,42%
PITSLRE serine/threonine-protein kinase CDC2L1	IPI00215999	2	0,019933	-4,51761888	0,44%
Lymphokine-activated killer T-cell-originated protein kinase	IPI00306708	7	8,68E-99	-4,37273189	0,48%
I-kappa-B-kinase beta	IPI00024709	2	1,65E-37	-4,19121155	0,55%
Serine/threonine-protein kinase MRCK alpha	IPI00640957	2	9,48E-50	-4,07447627	0,59%
Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit alpha	IPI00005104	2	9,75E-37	-4,03668001	0,61%
A-Raf proto-oncogene serine/threonine-protein kinase	IPI00020578	6	4,95E-36	-3,99295522	0,63%
Protein tyrosine kinase 9	IPI00183508	6	1,23E-147	-3,8331896	0,70%
Transcription intermediary factor 1-beta	IPI00438229	33	0	-3,7886631	0,72%
Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 4	IPI00789335	4	2,34E-89	-3,33371962	0,99%
Serine/threonine-protein kinase Nek7	IPI00152658	3	6,89E-14	-3,29825822	1,02%
Teratoma-associated tyrosine kinase	IPI00102059	5	1,20E-97	-3,24936232	1,05%
Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 6	IPI00003814	3	1,00E-24	-3,21146011	1,08%
Protein kinase C iota type	IPI00016639	3	4,64E-11	-3,18005589	1,10%
Serine/threonine-protein kinase WNK1	IPI00004472	9	3,18E-88	-3,15214906	1,12%
Serine/threonine-protein kinase SMG1	IPI00556369	7	2,08E-123	-3,06988942	1,19%
MAP kinase-activated protein kinase 3	IPI00005777	3	6,06E-16	-2,96018096	1,28%
Serine/threonine-protein kinase N2	IPI00002804	5	1,97E-23	-2,90031731	1,34%
Mixed lineage kinase domain-like protein	IPI00180781	7	2,36E-64	-2,8829613	1,36%
cAMP-dependent protein kinase, alpha-catalytic subunit	IPI00396630	3	6,47E-50	-2,85834429	1,38%
Rho-associated protein kinase 1	IPI00022542	3	1,50E-37	-2,76907407	1,47%
STE20-like kinase MST3	IPI00872754	9	8,66E-120	-2,72590159	1,51%
Transformation/transcription domain-associated protein	IPI00069084	14	2,37E-142	-2,69296519	1,55%
Phosphoinositide 3-kinase regulatory subunit 4	IPI00024006	2	5,12E-09	-2,61151875	1,64%
SCY1-like protein 2	IPI00396218	4	1,17E-41	-2,5235122	1,74%
Calcium/calmodulin-dependent protein kinase 1 alpha	IPI00028296	2	3,07E-06	-2,44457034	1,84%
Rho-associated protein kinase 2	IPI00307155	6	2,56E-63	-2,42146092	1,87%
Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 3;	IPI00218858	5	2,30E-48	-2,40302571	1,89%
Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 1	IPI00219604	9	6,64E-80	-2,34959985	1,96%
Serine/threonine-protein kinase MST4	IPI00292827	7	2,88E-83	-2,27554854	2,07%
Serine/threonine-protein kinase SRPK1	IPI00290439	4	1,70E-46	-2,24314848	2,11%
Serine/threonine-protein kinase tousled-like 1	IPI00333559	3	7,36E-09	-2,10873222	2,32%
FKBP12-rapamycin complex-associated protein	IPI00031410	27	0	-2,10727352	2,32%
Cell division cycle 2-like protein kinase 5	IPI00456970	4	2,73E-13	-2,05076257	2,41%
Serine/threonine-protein kinase MRCK beta	IPI00477763	9	9,91E-76	-1,71952917	3,04%
Cell division cycle 2-related protein kinase 7	IPI00021175	6	4,51E-37	-1,45675699	3,64%
cAMP-dependent protein kinase, beta-catalytic subunit	IPI00376119	3	3,84E-55	-1,42498399	3,72%

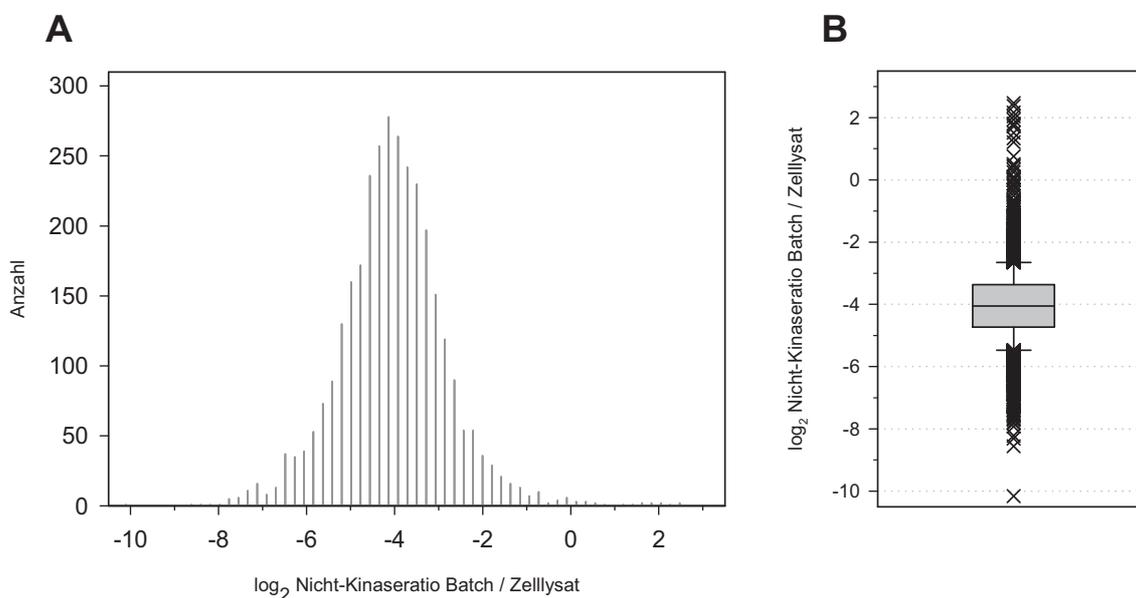
## Ergebnisse

Hepatocyte growth factor receptor precursor	IPI00294528	4	9,78E-18	-1,31521612	4,02%
Protein kinase C delta type;	IPI00329236	2	0,002194	-1,20025715	4,35%
Integrin-linked protein kinase	IPI00013219	4	2,95E-35	-1,12900563	4,57%
Bromodomain-containing protein 4	IPI00440727	2	5,52E-48	-0,98196064	5,06%
Beta-adrenergic receptor kinase 1	IPI00012497	2	5,59E-57	-0,96729281	5,11%
Ribosomal protein S6 kinase alpha-5	IPI00335101	2	3,34E-11	-0,86605103	5,49%
Cell division protein kinase 4	IPI00007811	4	2,51E-48	-0,83749397	5,60%
Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 2	IPI00003783	8	5,42E-84	-0,74125801	5,98%
Epidermal growth factor receptor precursor	IPI00018274	11	6,13E-108	-0,61697261	6,52%
Transcription intermediary factor 1-gamma	IPI00010252	3	7,35E-51	-0,58924826	6,65%
Phosphorylase b kinase gamma catalytic chain	IPI00012891	7	1,12E-36	-0,54281025	6,86%
Lymphocyte-oriented kinase	IPI00304742	2	3,12E-69	-0,42242091	7,46%
TRAF2 and NCK-interacting protein kinase	IPI00514275	2	4,36E-23	-0,28594595	8,20%
Cell division protein kinase 9	IPI00552413	5	7,59E-37	0,04025657	10,28%
Cyclin G-associated kinase	IPI00787531	2	4,63E-27	0,04896002	10,35%
Myosin light chain kinase 2	IPI00304648	1	0,0053723	0,14482773	11,06%
STE20-like serine/threonine-protein kinase	IPI00022827	14	2,44E-237	0,26120206	11,98%
Mitogen-activated protein kinase kinase kinase MLT	IPI00329638	2	8,33E-14	0,27203943	12,08%
Mitogen-activated protein kinase p38 alpha	IPI00002857	8	4,95E-113	0,31499276	12,44%
Protein kinase, AMP-activated, alpha 1 catalytic subunit	IPI00410287	6	7,62E-36	0,37758348	12,99%
Cell division control protein 2	IPI00026689	19	8,30E-243	0,37911475	13,01%
Bromodomain-containing protein 3	IPI00014266	2	0,0054681	0,45843607	13,74%
Serine/threonine-protein kinase PCTAIRE 1	IPI00549858	5	3,42E-35	0,53579344	14,50%
Serine/threonine-protein kinase N3	IPI00413780	1	5,84E-05	0,58399351	14,99%
p53-related protein kinase	IPI00290305	8	9,44E-98	1,09629429	21,38%
Aurora kinase A	IPI00298940	2	2,49E-23	1,32745087	25,10%
Serine/threonine-protein kinase TBK1	IPI00293613	7	8,37E-76	1,48848314	28,06%
Cell division protein kinase 2	IPI00031681	10	1,01E-121	1,497323	28,23%
Ephrin type-A receptor 2 precursor	IPI00021267	15	2,68E-128	1,58644791	30,03%
Casein kinase II subunit alpha	IPI00016613	16	3,01E-177	1,59549968	30,22%
Focal adhesion kinase 1	IPI00413961	15	1,04E-137	1,69990986	32,49%
Ribosomal protein S6 kinase alpha-3	IPI00020898	27	2,28E-234	1,70021616	32,49%
Extracellular signal-regulated kinase 1	IPI00018195	9	3,41E-106	1,80998556	35,06%
STE20-like kinase MST1	IPI00011488	9	4,92E-89	1,82803711	35,51%
Glycogen synthase kinase-3 beta	IPI00216190	5	3,22E-30	1,85601807	36,20%
Protein tyrosine kinase 2 beta	IPI00029702	7	1,53E-21	1,88044247	36,82%
Glycogen synthase kinase-3 alpha	IPI00292228	4	6,99E-17	1,93767664	38,31%
Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Yes	IPI00013981	5	5,33E-25	1,93814418	38,32%
Ephrin type-B receptor 4 precursor	IPI00289342	5	5,64E-69	2,08028654	42,29%
Casein kinase I isoform alpha	IPI00183400	14	1,01E-92	2,0958753	42,75%
Tyrosine-protein kinase ABL2	IPI00329488	3	3,61E-21	2,1311528	43,81%
Proto-oncogene tyrosine-protein kinase FER	IPI00029263	2	0,0008468	2,13269681	43,85%
Cell division protein kinase 5	IPI00023530	11	1,30E-127	2,13876598	44,04%
Casein kinase II subunit alpha	IPI00020602	16	1,65E-204	2,15824942	44,64%
Cell division protein kinase 7	IPI00000685	7	5,89E-133	2,17050432	45,02%
Serine/threonine-protein kinase PAK 4	IPI00014068	10	5,62E-101	2,18353259	45,43%
Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II gamma chain	IPI00334344	9	4,52E-76	2,22128589	46,63%

## Ergebnisse

Serine/threonine-protein kinase ULK3	IPI00411818	9	1,56E-71	2,25982294	47,89%
Serine/threonine-protein kinase Nek9	IPI00301609	14	2,71E-175	2,26364136	48,02%
Tyrosine-protein kinase CSK	IPI00013212	13	2,93E-91	2,29662828	49,13%
Extracellular signal-regulated kinase 2	IPI00003479	19	7,79E-203	2,3869599	52,31%
Ribosomal protein S6 kinase alpha-1	IPI00477982	30	2,36E-266	2,43438591	54,05%
Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II delta chain	IPI00828081	4	1,83E-48	2,59740849	60,52%

Im Gegensatz zu der klassenselektiven Bindung der Proteinkinasen ergab sich für die 3.192 quantifizierten Nicht-Proteinkinasen eine Normalverteilung nach dem Kolmogorov-Smirnov Test ( $p \leq 0,0001$ ) (Abbildung 3.2-4, A). Im Mittel wurden die Nicht-Proteinkinasen nur zu etwa 0,625% gebunden und damit gerade zu einem Anteil, der mit den am schwächsten gebundenen Proteinkinasen vergleichbar ist. Die relative Anreicherung der Proteinkinasen durch die Affinitätschromatographie war von der größtenteils unspezifischen, normalverteilten Abreicherung der Nicht-Proteinkinasen und der spezifischen Kinaseretention abhängig. Der Boxplot (Abbildung 3.2-4, B) zeigt eine leichte, rechtsschiefe Asymmetrie der Ausreißerverteilung zugunsten geringerer Abreicherungsfaktoren. Diese ist auf spezifische Interaktionen Nukleotid-bindender Proteine mit den immobilisierten Proteinkinaseinhibitoren zurückzuführen. So wurden beispielsweise 43% der Ribosyldihydrionicotinamid-Dehydrogenase durch die Affinitätsmatrix gebunden.



**Abbildung 3.2-4 Anteil der durch Batch-Anreicherung gebundenen Nicht-Proteinkinasen.** Häufigkeitsverteilung der logarithmierten SILAC-Verhältnis aller quantifizierten Nicht-Proteinkinasen (A) und der zur Verteilung gehörende Boxplot (B). SILAC-markiertes Zellysate wurde mit dem Eluat aus der Batch-Anreicherung der zehnfachen Lysatmenge vereinigt und massenspektrometrisch analysiert. Für eine 100%ige Bindung und Elution ergibt sich ein Verhältnis von  $\log_2 = 3,32$ , für eine 10 %ige Bindung ein Verhältnis von  $\log_2 = 0$  und für eine 1% ige Bindung ein Verhältnis von  $\log_2 = -3,32$ .

### 3.3 INTEGRIERTE ANALYSE ZELLULÄRER PHOSPHORYLIERUNGSNETZWERKE IN A498 ZELLEN

Lysophosphatidsäure (LPA) induziert in Säugerzellen die Phosphorylierung einer Vielzahl von Komponenten zellulärer Signalnetzwerke. In diesem Teil der Arbeit werden diese Vorgänge am Beispiel des A498 Nierenzellkarzinomzellsystems quantitativ und proteomweit erfasst und darüber hinaus der Beitrag der EGFR-Transaktivierung zum LPA-abhängigen Phosphorylierungsnetzwerk analysiert. Zur methodischen Umsetzung wurde auf die Ergebnisse des ersten Teils der Arbeit zurückgegriffen. Da die EGFR-Transaktivierung in dem verwendeten Zellsystem durch proteolytische Prozessierung von membrangebundenem HB-EGF vermittelt wird (Schafer, Gschwind et al., 2004), wurden im experimentellen Szenario durch geeignete Stimulationsbedingungen eine vergleichbare EGFR-Aktivierung in Folge von direkter HB-EGF Stimulation und indirekter Aktivierung durch LPA-induzierte Transaktivierung erreicht. Zur Bestimmung dieser experimentellen Bedingungen wurde zunächst die Zeit- und Dosis-abhängige Autophosphorylierung des EGFR nach Stimulation mit exogenen HB-EGF und LPA mittels Elektroblothing und Phosphoepitop-spezifischer Immunofluoreszenz untersucht (Abbildung 3.3-1).

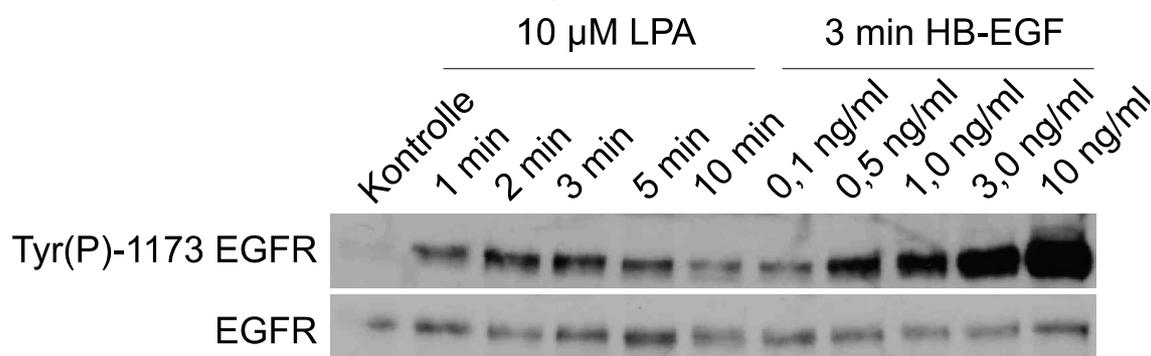
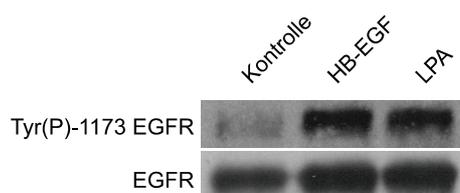


Abbildung 3.3-1 Zeit- und Dosis-abhängige Phosphorylierung von Tyr-1173 des EGF-Rezeptors.

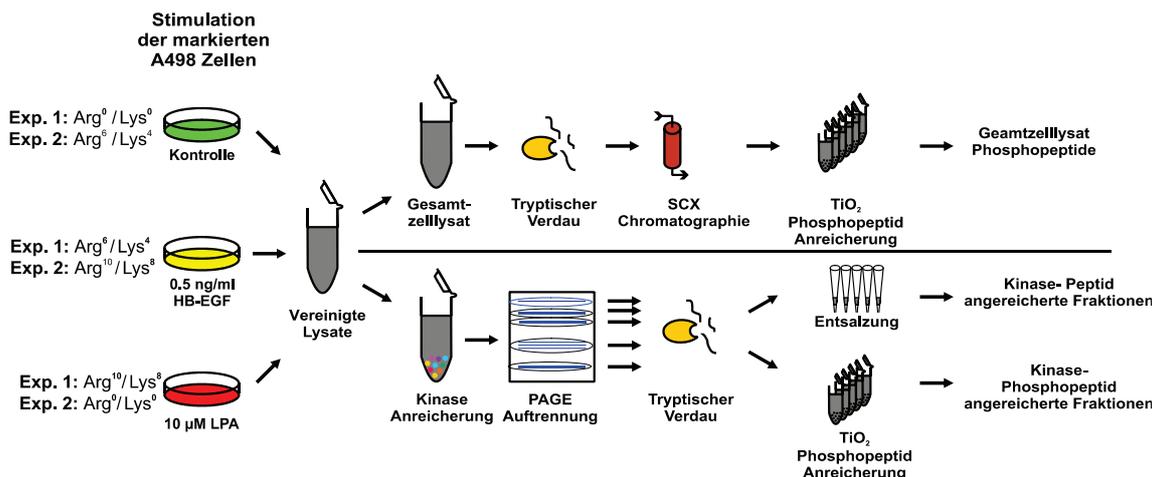
Die Autophosphorylierung des EGFRs im Zuge des Transaktivierungsprozesses war bereits eine Minute nach LPA-Stimulation nachweisbar und erreichte nach drei Minuten das maximale Niveau. Bereits nach 5 Minuten war eine Gegenregulation durch kompensatorische Mechanismen zu verzeichnen. Zum Zeitpunkt der maximal ausgeprägten Transaktivierung durch 10 µM LPA konnte eine vergleichbare Tyr-1173 Phosphorylierung des EGFR durch Stimulation mit 0,5 ng/ml HB-EGF erreicht werden. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurden die Zellen in den nachfolgenden massenspektrometrischen Untersuchungen für 3 Minuten mit 10 µM LPA bzw. 0,5 ng/ml HB-EGF stimuliert. (Abbildung 3.3-2, A).

### 3.3.1 Experimentelles Design

A



B



**Abbildung 3.3-2 Stimulationsbedingungen und experimenteller Ablauf der quantitativen Analyse.** A, LPA- und HB-EGF-induzierte Tyrosin-Phosphorylierung des EGFR in SILAC-markierten A498 Zellen. Immunoblotanalyse von Gesamtzelllysaten mit Phosphoepitop-spezifischem Antikörper gegen Tyr(P)-1173 des EGFR zeigte eine vergleichbare Stimulation durch 0.5 ng/ml HB-EGF bzw. 10µM LPA. Zur Kontrolle der EGFR-Proteinmengen wurde ein Immunoblot mit anti-EGFR Antikörper durchgeführt. B, schematische Illustration des integrierten proteomischen Ansatzes zur quantitativen Phosphorylierungsanalyse von Gesamtzelllysate und Kinase-angereicherten Fraktionen.

Um drei experimentelle Bedingungen quantitativ vergleichen zu können wurden A498-Zellen in Gegenwart von drei unterschiedlichen Kombinationen aus Isotopenvarianten von Lysin und Arginin (Lys-0 / Arg-0, Lys-4 / Arg-6 und Lys-8 / Arg-10) bis zur quasi-vollständigen Inkorporation kultiviert (Abbildung 3.3-2, B). Nach fünf Zellteilungen wurden die Zellen für zwei Tage in Abwesenheit von Serum kultiviert, anschließend mit Wachstumsfaktoren (LPA bzw. HB-EGF) stimuliert, lysiert und gleiche Proteinmengen der Zelllysate vereinigt. Die Validität und biologische Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wurde zudem durch Wiederholung des Experiments mit invertierten SILAC-Markierungen sichergestellt. Die vereinten Gesamtzelllysate wurden mit Trypsin verdaut und die resultierende Peptidmischung durch SCX-Chromatographie in acht Fraktionen aufgetrennt. Anschließend wurden die Phosphopeptide jeder Fraktion durch Bindung an  $\text{TiO}_2$ -Partikel angereichert. Um eine möglichst hohe Ausbeute niedrig-affiner Phosphopeptide in Gegenwart von mehrfach phosphorylierten, affinen Spezies sicherzustellen, wurde der Durchfluss der Phosphopeptidanreicherung mehrfach konsekutiv mit  $\text{TiO}_2$ -Partikeln inkubiert. Um die Klassen-selektive

Detektionssensitivität zu steigern, wurden aus einem Teil der Lysate Proteinkinasen angereichert. Da Proteinkinasen in den untersuchten Phosphorylierungsnetzwerken Schlüsselpositionen einnehmen, ermöglicht die Kenntnis regulatorischer Phosphorylierungen an diesen Enzymen tiefere Einsichten in den Aufbau und die regulatorischen Abhängigkeiten Phosphorylierungs-basierter Signalnetzwerke, als dies durch Analyse auf Substratebene alleine möglich wäre. Proteinkinasen entziehen sich jedoch in der Regel, aufgrund ihrer niedrigen Expressionslevel, in Gegenwart hochabundanter Substrate der Detektion. Zur selektiven Kinaseanreicherung wurde ein Teil des Gesamtzelllysates mit einer in separaten Experimenten (Abschnitt 3.1 und 3.2) optimierten Mischung aus sieben immobilisierten Kinaseinhibitoren mit distinkten Bindungsprofilen inkubiert. Nach stringenten Waschschrritten wurden 70% der Kinaseangereicherten Fraktion mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt, in der Gelmatrix tryptisch verdaut und die resultierenden Phosphopeptide anschließend angereichert. Um eventuelle Änderungen auf Proteinebene in den Kinaseangereicherten Fraktionen zu detektieren wurden zudem aus jedem Molekulargewichtsbereich Gesamtpeptidproben analysiert. Als komplementäre Strategie wurden 30% des Eluats der Kinaseanreicherung direkt in Lösung verdaut und die Phosphopeptide mittels  $\text{TiO}_2$ -Partikeln angereichert. Die erhaltenen Phosphopeptid-Proben wurden dann mittels nano-LC-MS auf einem Orbitrap Massenspektrometer analysiert und die Rohdaten mit dem Softwarepaket MaxQuant prozessiert.

### **3.3.2 Phosphoproteomische Analyse von A498 Zellen**

Die kombinierte Analyse der Kinaseangereicherten Proben und des fraktionierten Gesamtzelllysates ermöglichte die Identifikation von 3.914 bzw. 5.869 distinkten Phosphopeptiden in den beiden biologischen Replikatexperimenten (Tabelle 3.3-1). Etwa 25% aller identifizierten Phosphopeptide konnten in beiden Experimenten nachgewiesen werden. Die detektierten Phosphopeptide gehören zu 2.115 distinkten Proteinen und ermöglichten die Bestimmung von 5.332 Phosphorylierungsstellen mit hoher Lokalisationswahrscheinlichkeit ( $p \geq 0,75$ ).

Aus der, verglichen mit der interexperimentellen Überlappung, kleinen Schnittmenge auf Phosphopeptid-Ebene zwischen Kinaseangereicherten Proben und dem Gesamtzelllysate, lässt sich auf eine hohe Komplementarität des experimentellen Ansatzes schließen.

## Ergebnisse

**Tabelle 3.3-1 Vergleich der biologischen Replikate**

Experiment	Einzigartig modifizierte Phosphopeptide	Phosphorylierte Proteine	Phosphorylierte Proteinkinasen
Ausschließlich in Experiment 1	1.947	242	25
Schnittmenge	1.967	1.081	168
Ausschließlich in Experiment 2	3.902	746	26

Von den 2.414 distinkten Phosphopeptiden, die in den Kinase-angereicherten Proben detektiert wurden, waren nur 516 durch die Analyse des Gesamtzelllysates zugänglich (Tabelle 3.3-2). Dies entspricht einem Anteil von etwa 8% aller im Gesamtzelllysate detektierten Phosphopeptide. Erwartungsgemäß setzt sich diese Beobachtung auf Ebene der Proteinkinasen fort. Von den 219, in phosphoryliertem Zustand detektierten, Proteinkinasen konnten 73 ausschließlich durch die Klassen-selektive Anreicherung nachgewiesen werden (Tabelle 3.3-2). Diese Beobachtung unterstreicht die methodische Überlegenheit der hybriden Analyse gegenüber einfachen Gesamtzelllysate-Analysen.

**Tabelle 3.3-2 Vergleich von Kinaseanreicherung und Gesamtzelllysate-Analyse**

Fraktion	Einzigartig modifizierte Phosphopeptide	Phosphorylierte Proteine	Phosphorylierte Proteinkinasen
Ausschließlich durch Kinaseanreicherung	1.898	273	73
Schnittmenge	516	445	107
Ausschließlich durch Gesamtzelllysate	5.402	1.351	39

Da 107 der 146 phosphorylierten Proteinkinasen aus der Gesamtzelllysate-Analyse auch in den Kinase-angereicherten Proben gefunden wurden liegt die Abdeckung des zellspezifisch exprimierten Kinoms durch die Klassen-selektive Anreicherung bei etwa 70%. Zusätzlich zu den phosphorylierten Proteinkinasen, konnten aus den Gesamtpeptid-Proben der Kinaseanreicherung noch 43 weitere, nicht-phosphorylierte Proteinkinasen detektiert werden. Damit liegt die Zahl der insgesamt nachgewiesenen Proteinkinasen gemäß der Nomenklatur von Manning *et al.* (Manning, Whyte *et al.*, 2002) bei 262. Dies ist, nach unserem Wissen zum jetzigen Zeitpunkt, die größte Zahl

## Ergebnisse

---

dieser regulatorischen Enzyme, die aus einer einzelnen biologischen Quelle nachgewiesen werden konnten.

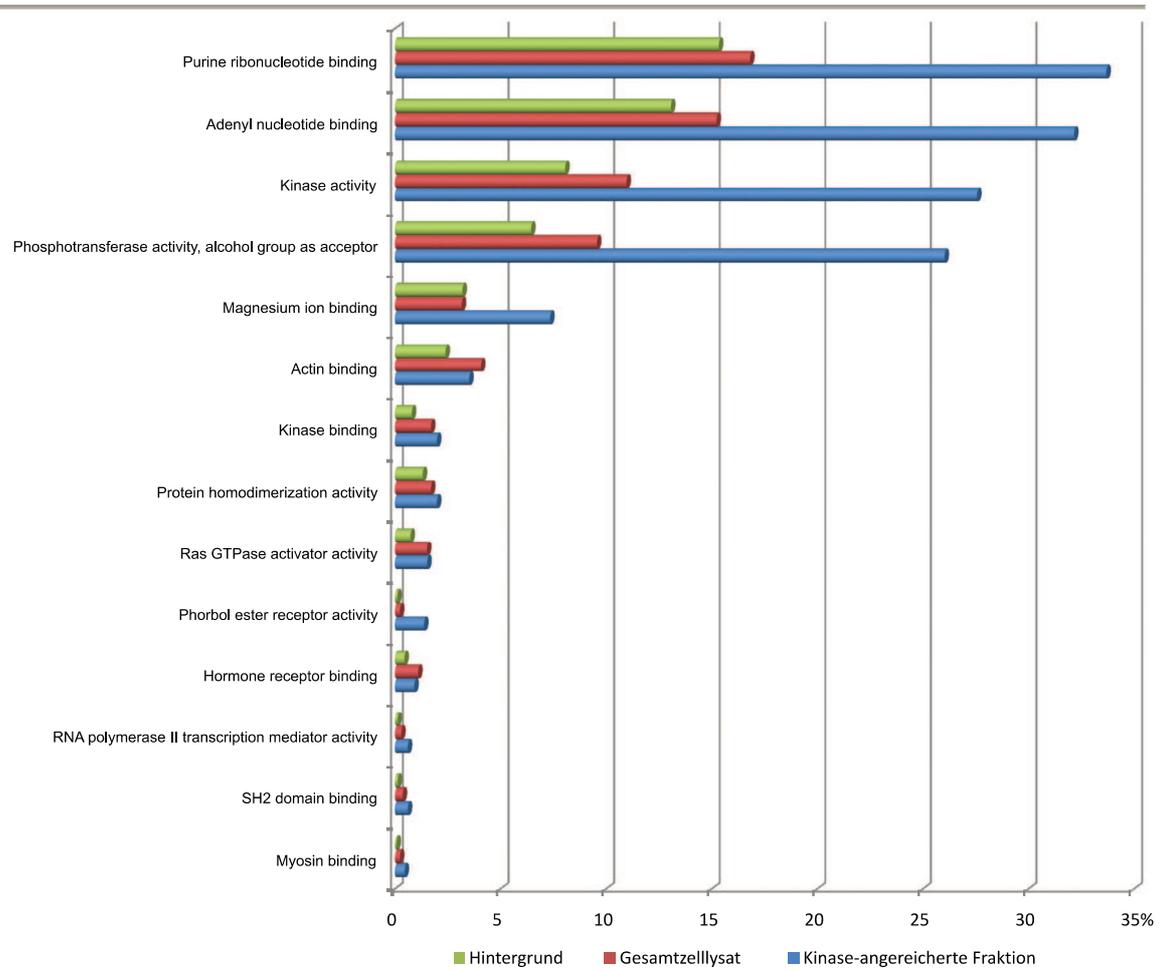
Insgesamt wurden 88,9% der Phosphorylierungen an Serinresten beobachtet, wohingegen Phosphothreonin mit 10,3% einen wesentlich geringeren Anteil der phosphorylierten Gesamtpopulation ausmachte. Der geringste Phosphorylierungsanteil entfiel auf Tyrosinreste mit 0,8%. Im Gegensatz dazu lag die Verteilung phosphorylierter Aminosäuren in den Kinase-angereicherten Fraktionen bei 69,2% Ser(P), 22,1% Thr(P) und 8,7% Tyr(P). Der um den Faktor zehn höhere Anteil phosphorylierter Tyrosine in den angereicherten Proben steht im Einklang mit Publikationen, die über eine erhöhte Prävalenz von Tyr(P) in Proteinkinasen berichteten (Daub, Olsen et al., 2008).

Die erfolgreiche Anreicherung von Kinasen und anderen ATP-bindenden Proteinen in diesen Fraktionen konnte durch die statistische Analyse überrepräsentierter *Gene Ontology* (GO) Kategorien ( $p \leq 0,05$ ) nachgewiesen werden (Abbildung 3.3-3). Während etwa 27% der in den angereicherten Fraktionen identifizierten Phosphoproteine über eine Kinaseaktivität verfügten, lag deren Anteil an der Gesamtproteom-Analyse mit etwa 10% nahe am Hintergrund (dem gesamten humanen Proteom) dieser Kategorie (8%). Die Anreicherung Purinnukleotid- oder Magnesium-bindender Proteine ergab sich aus der auf ATP-Analoga basierten Anreicherungsmethode.

Insgesamt wurden in dieser Studie mehr als 29.000 einzigartig modifizierte Peptide identifiziert und davon etwa 97% massenspektrometrisch quantifiziert. Daraus konnten nach LPA-Stimulation 5.155 und nach HB-EGF Stimulation 5.169 distinkte Phosphorylierungsstellen mit hoher Lokalisationswahrscheinlichkeit ( $p \geq 0,75$ ) quantitativ bestimmt werden.

Im Zuge der statistischen Auswertung wurden die gemessenen Verhältnisse  $\log_2$  transformiert und auf alle gemessenen Peptid-Verhältnisse normalisiert. Die inter-experimentelle Varianz wurde durch einen *Ratio vs. Ratio*-Verfahren ermittelt.

## Ergebnisse

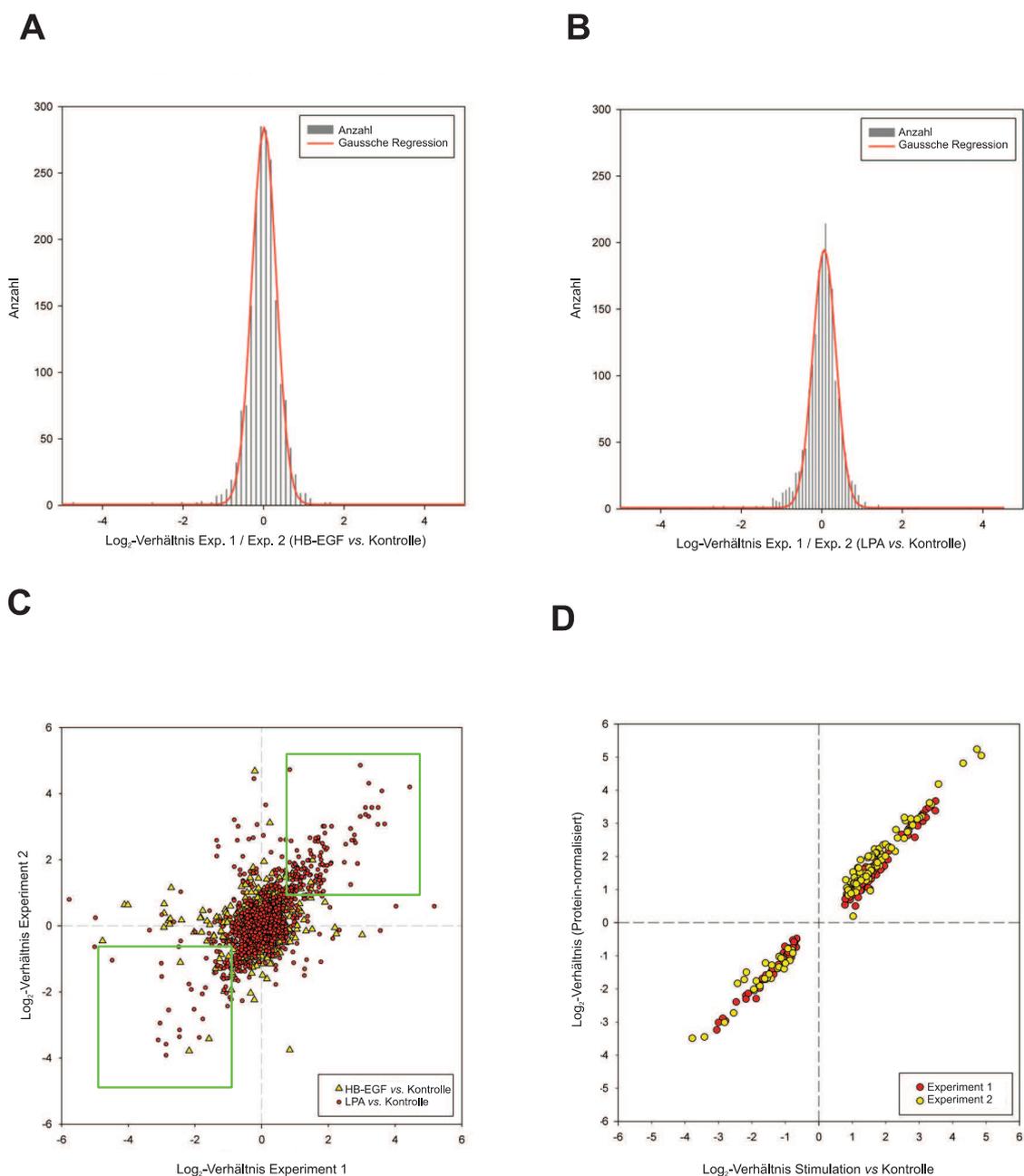


**Abbildung 3.3-3 Verteilung der detektierten Phosphoproteine auf GO-MF Kategorien.** Die Abbildung zeigt den Anteil der detektierten Phosphoproteine an allen in den Kinase-angereicherten Fraktion bzw. der Gesamtproteom-Analyse detektierten und GO-annotierten Phosphoproteinen. Die angegebenen *GO molecular function* Kategorien sind in den Kinase-angereicherten Fraktionen nach dem *EASE* Algorithmus signifikant überrepräsentiert ( $p \leq 0,05$ ). Als Hintergrund diente das gesamte humane Proteom.

Hierbei wurden die zum gleichen Phosphopeptid gehörenden Verhältnisse beider biologischer Replikate durcheinander geteilt. Die so erhaltenen *Ratio vs. Ratio* Werte wurden in einem Histogramm visualisiert und mittels Gaußscher Regression vierter Ordnung die Mittelwerte und Standardabweichungen der Verteilung berechnet (Abbildung 3.3-4 A, B). Basierend auf dieser Analyse wurden stringente Filterkriterien für den Datensatz definiert. Für die weitere Betrachtung wurden ausschließlich in beiden biologischen Replikaten konsistent positiv- oder negativ-regulierte Phosphorylierungsstellen berücksichtigt, deren Verhältnis in beiden Experimenten um mehr als  $2,5 \sigma$  vom Mittelwert der *Ratio vs. Ratio*-Verteilung abwich (Abbildung 3.3-4 C, grüne Markierung). Da die Zellen vor der Lyse für nur drei Minuten stimuliert wurden, waren Änderungen der Proteinlevel, z. B. durch Modulation der Synthese- oder Degradationsrate, nicht zu erwarten. Aus diesem Grund wurden aus dem Gesamtzelllysat nur Phosphopeptid-angereicherte Fraktionen analysiert. Im Gegensatz

## Ergebnisse

hierzu konnte eine Änderung der Inhibitor-Bindung von Proteinkinasen, aufgrund schnell induzierter post-translationaler Modifikationen, formell nicht ausgeschlossen werden. Daher wurden aus den Kinase-angereicherten Fraktionen sowohl Phosphopeptid-angereicherte als auch Gesamtpeptid-Proben untersucht.



**Abbildung 3.3-4 Statistische und vergleichende Analyse quantitativer MS-Daten.** Histogramm der quantifizierten Phosphopeptide entsprechend der  $\log_2$  transformierten Messwerte für LPA (A) und HB-EGF (B) Stimulation vs. Kontrolle in beiden biologischen Replikatexperimenten. C, Korrelation der Phosphorylierungsstellen-spezifischen Verhältnisse nach HB-EGF- und LPA-Stimulation zwischen den biologischen Replikaten. Konsistent regulierte Phosphorylierungsstellen (innerhalb der grünen Markierung) wurden für die weitere Analyse berücksichtigt. D, Streudiagramm regulierter Phosphorylierungsstellen aus Kinase-angereicherten Fraktionen mit oder ohne Normalisierung auf das jeweilige Proteinverhältnis.

Auf diese Weise konnte die stimulationsabhängige Veränderung der Bindung phosphorylierter Proteine an die Affinitätsmatrices ausgeschlossen werden.

Dementsprechend wiesen die regulierten Phosphorylierungsstellen-spezifischen Messwerte in beiden Replikatexperimenten eine starke, lineare Korrelation mit den, auf das Proteinlevel normalisierten, Messwerten auf (Abbildung 3.3-4 D). Da die relative Proteinabundanz nur aus nicht-phosphorylierten Peptiden genau berechnet werden kann, wäre eine Normalisierung auf die jeweiligen Proteinlevel nur für einen Teil der quantifizierten Phosphorylierungsstellen möglich gewesen. Im Sinne einer möglichst großen Datenbasis wurde, in Anbetracht der nachgewiesenen Unabhängigkeit des Bindungsverhaltens, für die weitere Prozessierung auf eine Protein-Normalisierung der Messwerte verzichtet. Durch dieses Vorgehen konnte zudem die Datenkonsistenz zwischen Kinase-angereicherten Fraktionen und der Gesamtproteom-Analyse sichergestellt werden. Diese war insbesondere für die gemeinsame Prozessierung und die anschließenden, vergleichenden bioinformatischen Analyse erforderlich.

Insgesamt wurden durch die kurzzeitige Wachstumsfaktor-Stimulation etwa 5% aller quantifizierten Phosphorylierungsstellen signifikant und reproduzierbar reguliert. Während LPA 150 Phosphorylierungsstellen induzierte und die relative Phosphorylierung an 74 Positionen binnen drei Minuten verringerte, wurden durch HB-EGF nur 23 Phosphorylierungsstellen verstärkt phosphoryliert und 21 Phosphorylierungsstellen in ihrer Abundanz reduziert. Dieser Vergleich verdeutlicht zum einen den, im Vergleich zu LPA, geringeren Einfluss von HB-EGF auf die Regulation zellulärer Phosphoproteine nach kurzer Stimulation und zum anderen den kleineren Anteil induzierter Phosphorylierungsereignisse (ca. 50%) bezogen auf die Gesamtheit der HB-EGF abhängigen Phosphoregulation. Darüber hinaus wurden 43 der als reguliert gefundenen Phosphorylierungsstellen entsprechend der Phosphorylierungsdatenbank PhosphoSitePlus<sup>®</sup> im Rahmen dieser Studie zum ersten Mal identifiziert.

### **3.3.3 LPA-abhängige Dephosphorylierung**

Obwohl die Mehrzahl der regulierten Phosphorylierungsstellen durch den Stimulus induziert wurden, konnte für LPA in etwa 30% der Fälle eine relative Abnahme der Abundanz festgestellt werden. Aus dieser Beobachtung folgte die Frage, ob es sich bei diesen Ereignissen tatsächlich um schnelle, LPA-vermittelte Dephosphorylierungen handelte. Prinzipiell müsste die Abundanz der nicht-phosphorylierten Peptidspezies in diesem Fall entsprechend dem stöchiometrischen Anteil der Dephosphorylierung zunehmen. In der Tat konnte eine solche Zunahme nicht-phosphorylierter Peptide in

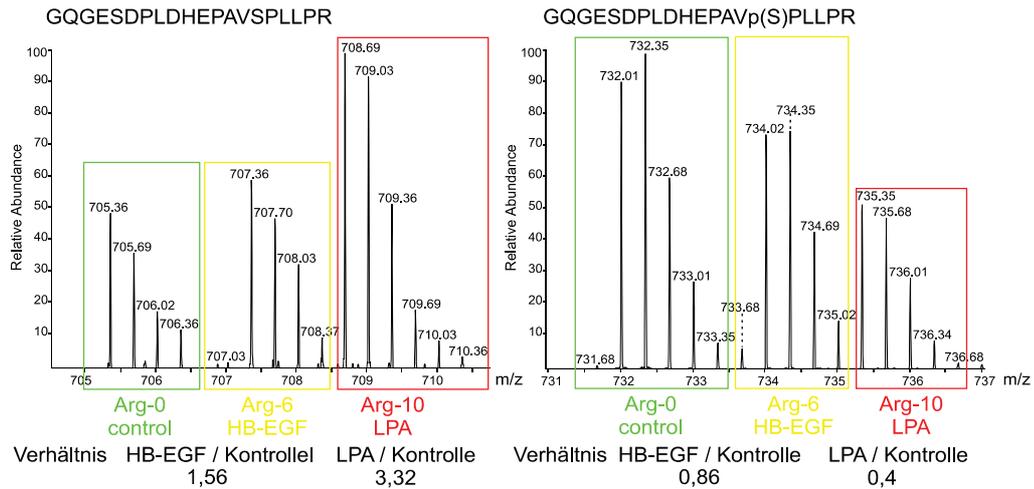
## Ergebnisse

---

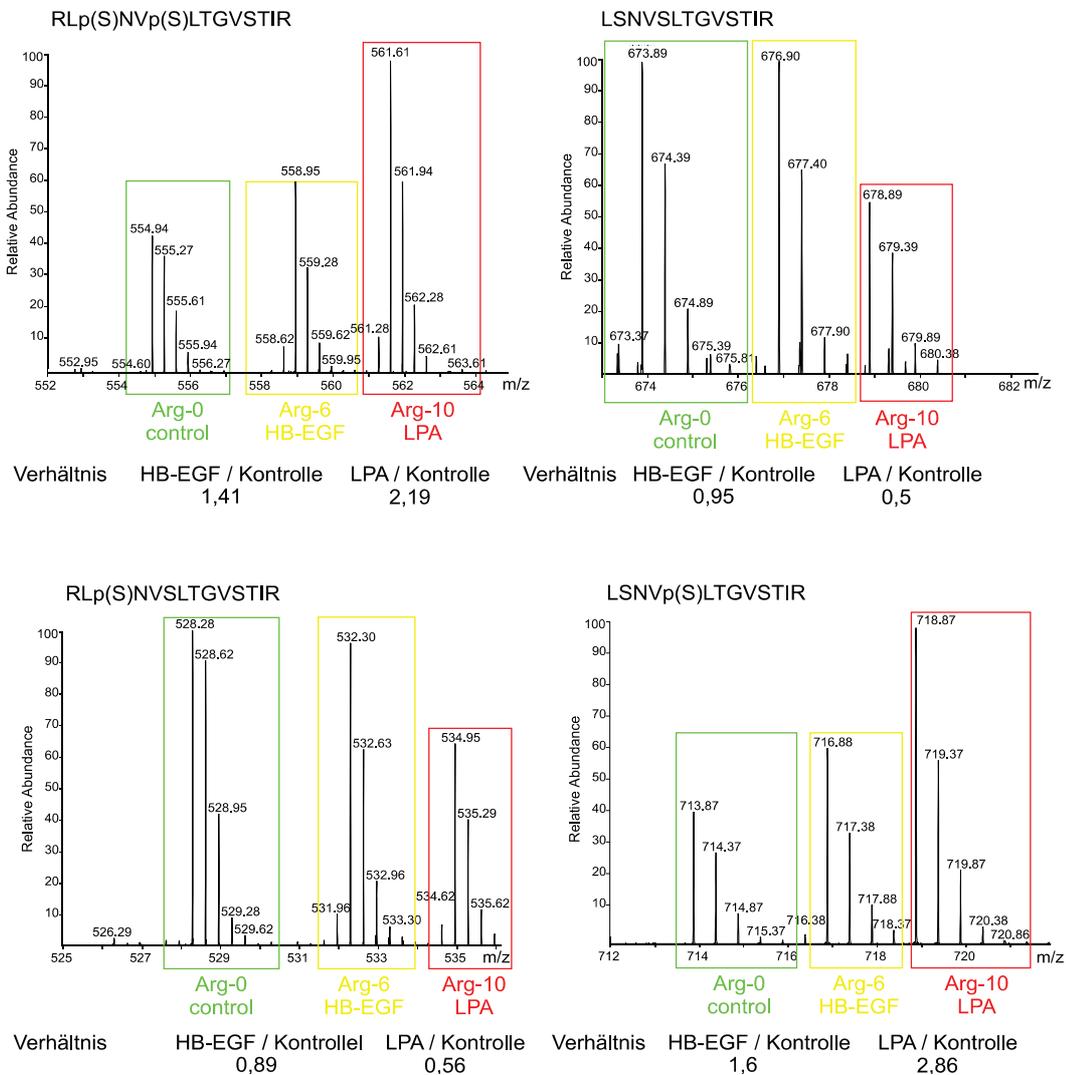
einigen Fällen nachgewiesen werden. So nahm die Abundanz eines Phosphopeptids der Protein Tyrosinkinase Abl ( $^{574}\text{GQGESDPLDHEPAVpSPLLPR}^{593}$ ) mit der Phosphorylierungsstelle Ser(P)-588 bereits drei Minuten nach LPA-Stimulation um den Faktor 2,5 ab. Parallel wurde die Zunahme des nicht-phosphorylierten, sequenzidentischen Peptids um mehr als das Dreifache beobachtet (Abbildung 3.3-5 A). Eine ähnliche Regulation wurde für ein mehrfach phosphoryliertes Peptid der AP2-assoziierten Proteinkinase (AAK1) mit den Phosphorylierungsstellen Ser(P)-676 und Ser(P)-678 beobachtet. In diesem Fall ging mit der Abnahme der Abundanz phosphorylierter Spezies eine vierfache Zunahme des nicht-phosphorylierten Peptids einher. Unserer Kenntnis nach sind diese Ergebnisse die ersten publizierten Hinweise auf eine schnelle, LPA-abhängige Dephosphorylierung in zellulären Signalsystemen.

Mitunter kann es jedoch auch zu einer Reduktion einfach-phosphorylierter Peptidspezies kommen, ohne dass es sich um eine tatsächliche Dephosphorylierung handelt. Dieser Fall konnte zum Beispiel anhand eines Peptidsets der Serin/Threonin Kinase D1 (PKD1) mit den Phosphorylierungsstellen Ser(P)-205 und Ser(P)-208 detailliert verfolgt werden (Abbildung 3.3-5 B). Wie aus den MS-Spektren hervorgeht, nahm die Abundanz des einfach an Ser-205 und des nicht-phosphorylierten Peptids nach LPA-Stimulation etwa um den Faktor zwei ab, wohingegen die Abundanz der entsprechenden Ser-208 phosphorylierten Spezies reziprok reguliert war. Regulatorische Ereignisse an mehrfach phosphorylierten Peptiden konnten somit erst durch eine detaillierte und unabhängige Analyse auf Basis der distinkten (Phospho-) Peptidspezies untersucht werden. Aus dem genannten Beispiel ließ sich, nach Kenntnis der relativen Regulation der vier differentiell phosphorylierten Peptide, auf die LPA-induzierte Phosphorylierung von Ser-208 schließen. Zusätzlich konnte ein modulatorischer Einfluss des Phosphorylierungsstatus von Ser-205 auf den Phosphorylgruppentransfer auf die benachbarte Ser-208 Position ausgeschlossen werden. Interessanterweise waren sowohl Ser(P)-205, als auch Ser(P)-208 an der molekularen Interaktion zwischen PKD1 und 14-3-3- $\beta$ , im Rahmen der Reaktion auf oxidativen Stress, beteiligt (Zhang, Zheng *et al.*, 2005). Die nachgewiesenen Phosphorylierungen könnten daher im Kontext der LPA-vermittelten Signaltransduktion eine ähnliche funktionelle Rolle einnehmen.

**A**



**B**

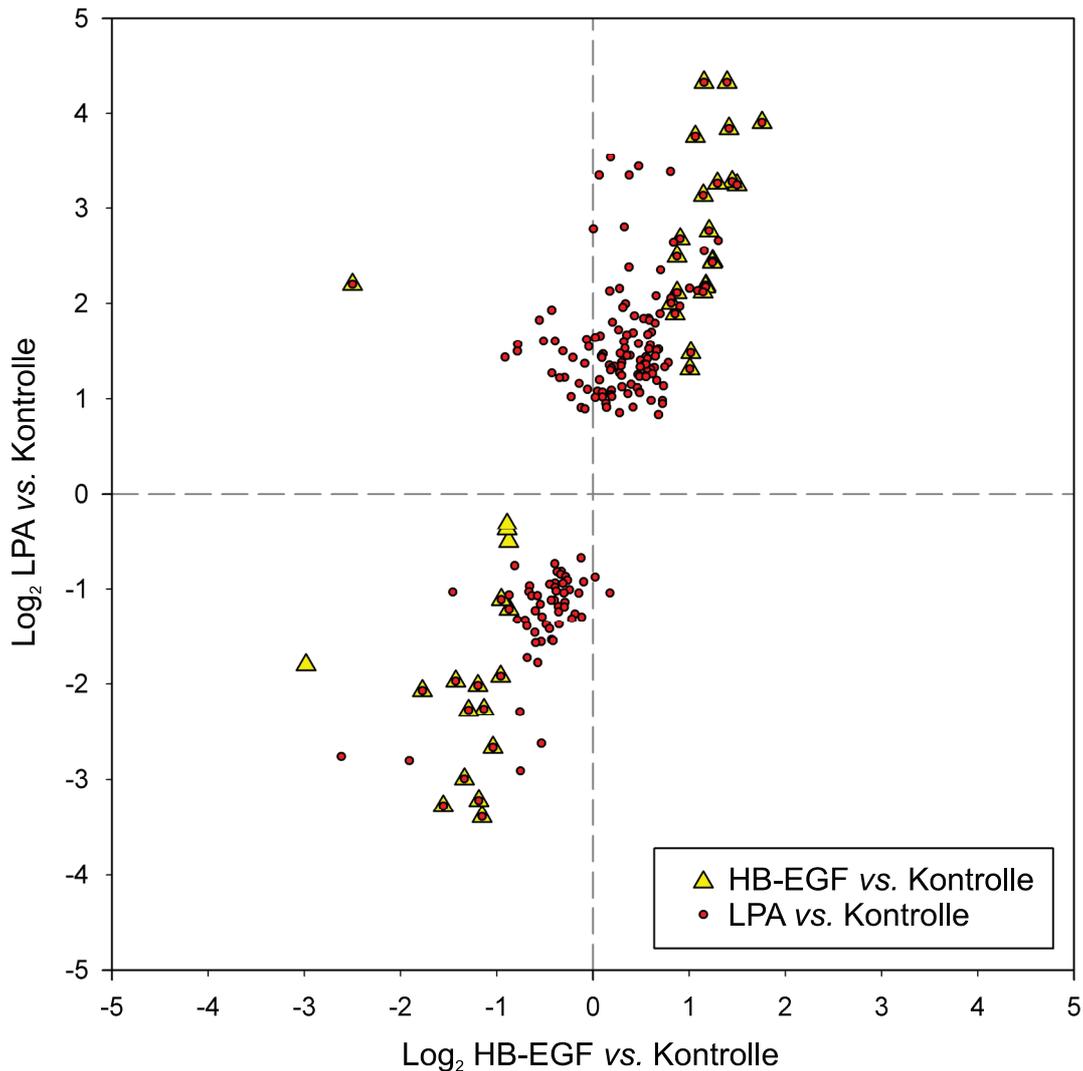


**Abbildung 3.3-5 MS Spektren ausgewählter SILAC markierter Peptide.** *A*, MS-Spektren der Protein Tyrosin Kinase ABL. Das Peptid mit der Aminosäuresequenz GQGESDPLDHEPAVSPLLPR wurde sowohl in der nicht-phosphorylierten, als auch in der an Ser-588 phosphorylierten Form quantifiziert. *B*, MS-Spektren von Peptiden der Serin/Threonin Kinase PKD1. Die Peptide mit den Phosphorylierungsstellen Ser-205 und Ser-208 wurden sowohl in der nicht-phosphorylierten, als auch in der einfach- und zweifach-phosphorylierten Form quantifiziert. Die m/z-Differenzen der Isotopenvarianten der dargestellten Peptide entsprechen den verwendeten SILAC-Markierungen.

### 3.3.4 Vergleich LPA- und HB-EGF-induzierter Phosphorylierungsregulation

Um LPA- und HB-EGF-abhängige Signalnetzwerke vergleichen zu können wurde die Stimulationsbedingungen in Vorexperimenten optimiert, mit dem Ziel eine ähnliche Aktivierung des EGFR, messtechnisch durch Immunofluoreszenz-Detektion der Autophosphorylierung an Tyr-1173 erfasst, zu erzielen. Der erfolgreiche Abgleich beider Liganden auf Basis der EGFR-Aktivierung konnte ebenfalls durch die massenspektrometrischen Daten bestätigt werden. So konnte die Tyrosin-Phosphorylierung des EGFR an Tyr-1110 zumindest in einem der beiden Experimente quantifiziert werden. Die Phosphorylierung an Tyr-1110 wurde durch LPA 1,9-fach und durch HB-EGF 2,5-fach induziert. Im Rahmen der Messgenauigkeit dieser Einzelbeobachtung konnte also von einer vergleichbaren Aktivierung der EGFR-abhängigen Signalkomponenten durch LPA und HB-EGF ausgegangen werden.

Durch direkte Stimulation mit HB-EGF wurden im Vergleich zur LPA-medierten GPCR-Stimulation weitaus weniger Phosphorylierungsstellen reguliert (Abbildung 3.3-6), da eine Vielzahl von Signalkomponenten, wie z.B. Rho-GTPasen, LPA-selektiv aktiviert werden und nicht Teil der EGFR-Kaskade sind. Darüber hinaus konnte das Konzept der GPCR-abhängigen EGFR-Transaktivierung insofern bestätigt werden, als dass fast alle HB-EGF-regulierten Phosphorylierungsstellen ebenfalls durch LPA reguliert wurden. Die HB-EGF-abhängigen Phosphorylierungsänderungen bilden somit eine Teilmenge der GPCR-vermittelten Phosphorylierungsnetzwerks. Die einzigen Ausnahmen bildeten Ser(P)-548 an PKD1 und Ser(P) 4476, 4485 und 4489 an Plectin-1. Während Ser(P)-548 durch LPA 4,6-fach induziert wurde, bewirkte HB-EGF eine Reduktion der um den Faktor 5,7. Für die Plectin-1 Phosphorylierungsstellen konnte ebenfalls eine negative Regulation durch HB-EGF nachgewiesen werden, wohingegen LPA keine signifikanten Änderungen hervorrief. Im Gegensatz zu diesen Ausnahmen wurden alle anderen HB-EGF-regulierten Phosphorylierungsstellen trotz vergleichbarer EGFR-Aktivierung wesentlich stärker durch LPA als durch HB-EGF reguliert.

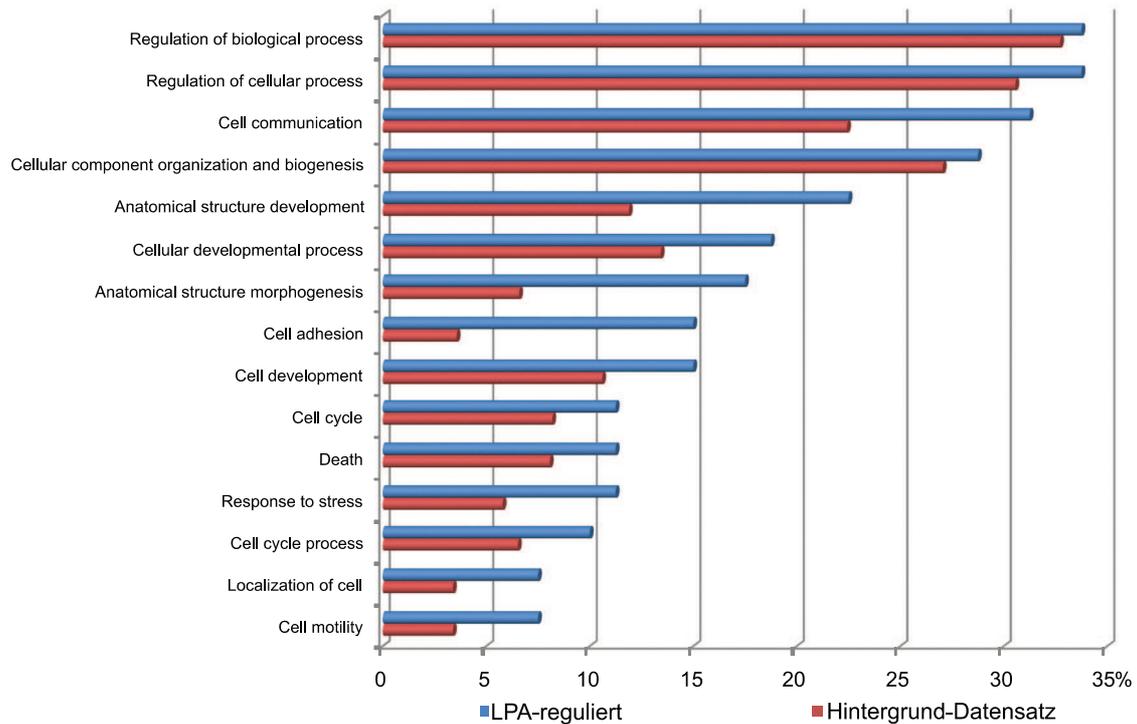


**Abbildung 3.3-6 Differentielle Phosphorylierungsänderungen nach LPA und HB-EGF Stimulation.** Streudiagramm der signifikant und reproduzierbar durch LPA (●) bzw. HB-EGF (▲) regulierten Phosphorylierungsstellen. Auf der Ordinate (Abszisse) sind die entsprechenden log<sub>2</sub>-transformierten, mittleren Phosphorylierungsänderungen durch LPA (HB-EGF) aufgetragen.

### 3.3.5 Bioinformatische Analyse regulierter Phosphorylierungen in A498-Zellen

LPA modulierte in A498 Zellen Phosphorylierungen an einer Vielzahl unterschiedlicher Proteine. Für die Identifikation signifikant durch LPA beeinflusster biologischer Prozesse wurden Anreicherungsanalysen LPA-regulierter Proteine auf Basis der *GO-biological process* Annotation durchgeführt. Für die Signifikanz-Berechnung wurde aus der Gesamtheit aller identifizierten Phosphoproteine ein Hintergrund-Datensatz generiert.

## Ergebnisse



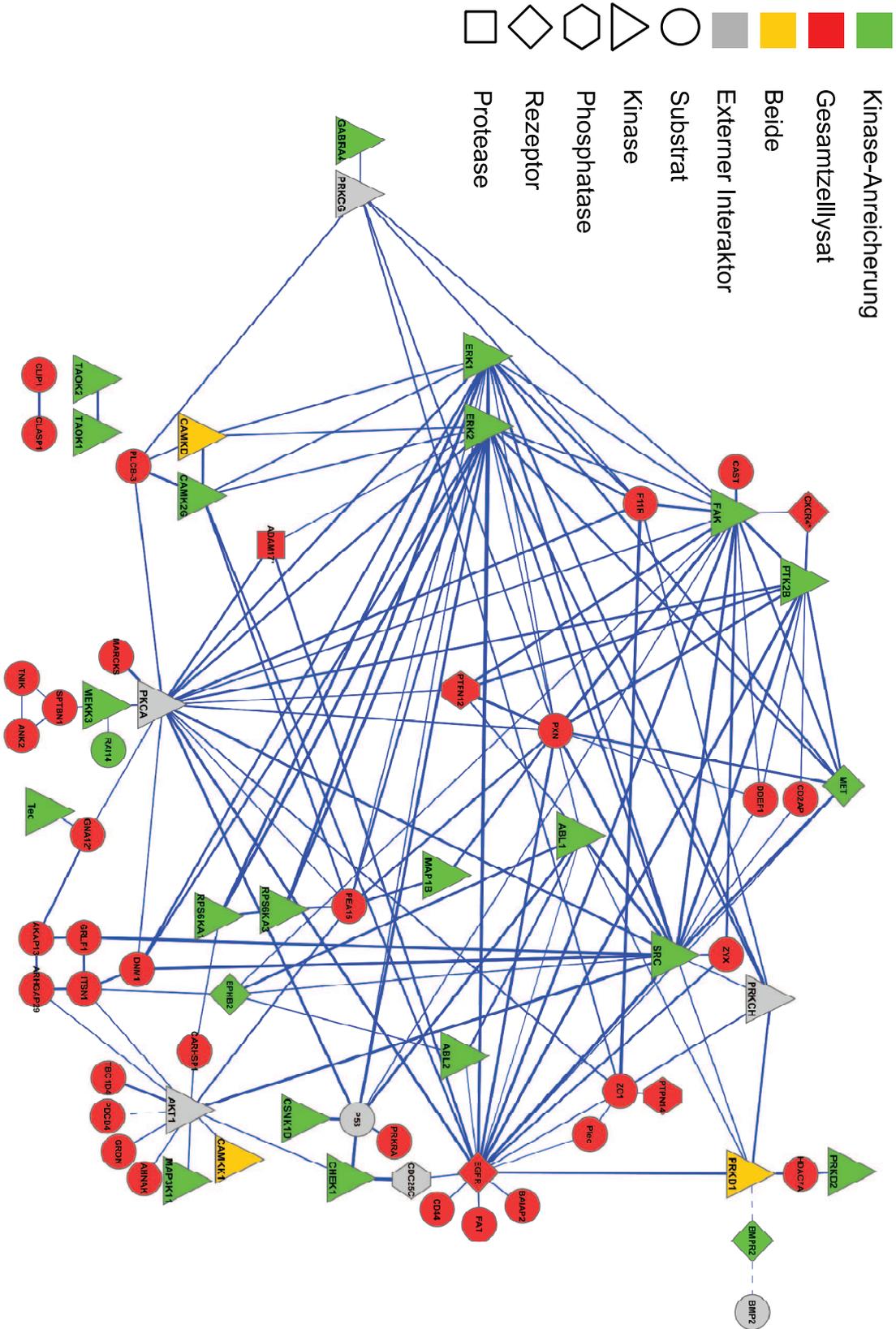
**Abbildung 3.3-7 Überrepräsentierte GO biological process (GO-BP) Kategorien LPA-regulierter Proteine.** LPA-regulierte Proteine aus dem Gesamtzelllysat wurden mit allen identifizierten Phosphoproteinen verglichen und signifikant ( $p \leq 0,05$ ) überrepräsentierte Kategorien dargestellt. Die Prozentangaben beziehen sich auf den Anteil zu der jeweiligen Kategorie gehörender Proteine an allen LPA-regulierten bzw. allen phosphorylierten Proteinen (Hintergrund).

Durch Verwendung des experimentell bestimmten Hintergrunds konnten statistische Verzerrungen vermieden werden. Diese Analyse offenbarte eine signifikante ( $p \leq 0,05$ ) Anreicherung von Proteinen der Zellzykluskontrolle, der zellulären Stressantwort und der Zellmotilität. Die größten Anreicherungsfaktoren wurden für Proteine mit Implikation in der Entwicklung anatomischer Strukturen und vor allem der Zelladhäsion gefunden (Abbildung 3.3-7). So waren etwa 15% aller LPA-regulierten Proteine an der Zelladhäsion beteiligt, wohingegen nur etwa 3% aller detektierten Phosphoproteine zu dieser Kategorie gehörten.

Um die funktionellen Beziehungen zwischen den LPA-regulierten Signalkomponenten zu untersuchen, wurde mit Hilfe von Informationen aus der STRING-Datenbank ein Protein-Protein Interaktionsnetzwerk der regulierten Phosphoproteine erstellt (

Abbildung 3.3-8). Dieses Netzwerk basiert auf Interaktionsdaten aus experimentellen Untersuchungen. Für eine höhere Netzwerkkonnektivität wurden einige zusätzliche externe (nicht in der Studie identifizierte Proteine) zugelassen.

# Ergebnisse



**Abbildung 3.3-8 Interaktionsnetzwerk LPA-regulierter Phosphoproteine.** Die Abbildung zeigt physische und funktionelle Interaktionen zwischen LPA-regulierten Phosphoproteinen. Die Liniendicke ist proportional zur rechnerischen Konfidenz der jeweiligen Interaktion gemäß der STRING Datenbank. Unterbrochene Linien stehen für manuell eingefügte und durch Literatur belegte Interaktionen.

Die Netzwerkanalyse offenbarte vielfache Interaktionen zwischen den zentralen Phosphorylierungsmediatoren der LPA-abhängigen Signaltransduktion wie dem EGF-Rezeptor, der *Focal adhesion kinase* (FAK) und ERK 1/2 MAP-Kinasen, sowie LPA-regulierten Phosphoproteinen mit funktioneller Relevanz für die Zellmigration und -adhäsion wie CD44, Paxillin, dem PKC-Substrat MARCKS, dem F11-Rezeptor und der Protein Tyrosin Phosphatase PTPN12. Tyrosin-Phosphorylierungen an FAK und Paxillin sind bekannte regulatorische Mechanismen *downstream* der LPA-vermittelten Aktivierung der GTPase Rho. Darüber hinaus zeigte das regulatorische Netzwerk noch vielfältige Interaktionen zwischen Rho-Regulatoren und Effektoren wie den GTPase-aktivierenden Proteinen (GAPs) *Glucocorticoid receptor DNA-binding factor 1* (GRLF1) und *Rho GTPase-activating protein 29* (ARHGAP29), sowie dem Guaninnukleotid-Austauschfaktor (GEF) *A-kinase anchor protein 13* (AKAP13), welcher direkt und funktionell durch die G-Protein Untereinheit  $G\alpha_{12}$  aktiviert wird (Dutt, Nguyen *et al.*, 2004). Zudem wurden auch LPA-regulierte Phosphorylierungen an dem GEF Solo und dem *CDC42 effector protein 4* gefunden. Die Aktivierung der LPA<sub>1/2</sub>-Rezeptoren führt über die heterotrimere G-Protein Untereinheit  $G\alpha_{12}$  unter anderem zu einer Aktivierung von Rho. Interessanterweise konnte in einem Experiment eine LPA-induzierte Phosphorylierungsstelle an  $G\alpha_{12}$  detektiert werden. Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse eine Modulation der Rho GTPase-abhängigen Signaltransduktion auf mehreren Ebenen durch LPA-induzierte Proteinkinasen. Das Netzwerk verdeutlicht zudem die komplexe Signalintegration auf molekularer Ebene anstelle von linearen Signalkaskaden.

Darüber hinaus konnten Interaktionen zwischen den LPA-modulierten Phosphoproteinen GRLF1 und ARHGAP29 und den Endozytose-Regulatoren Intersectin 1 (ITSN1) und Dynamin 1 (DNM1) identifiziert werden. Zusätzlich zu den Rho-assoziierten Signalkomponenten konnten auch LPA-reguliertere Proteine mit funktioneller Bedeutung für Ras-, Rab- und Arf-GTPase mediierte Prozesse identifiziert werden. In diese Kategorie fielen z. B. der *Development and differentiation enhancing factor 1*, Neurofibromin und *TBC1 domain family member 4*.

Eine der wesentlichen LPA-bedingten Phosphorylierungen bewirkt die Aktivierung der Proteinkinase AKT (PKB) (Fischer, Hart *et al.*, 2003). Da diese Kinase nicht an die verwendeten Affinitätsmatrices bindet und dementsprechend in der Analyse nicht detektiert werden konnte, wurde sie dem Netzwerk als externer Knoten hinzugefügt. Dadurch konnte eine Verbindung zwischen den bekannten AKT-Substraten

*Phosphoprotein enriched in astrocytes 15* (PEA15) und der Protein Kinase Chk1 geschlossen werden. Interessanterweise induzierte LPA den Phosphorylgruppentransfer auf die bekannten AKT-Phosphorylierungsstellen beider Substrate. Die Ser-116 Phosphorylierung von PEA15 stabilisiert das Protein und wirkt dadurch anti-apoptotisch (Trencia, Perfetti *et al.*, 2003; Perfetti, Oriente *et al.*, 2007). Somit zeigt die Identifikation dieser LPA-induzierten Phosphorylierungsstelle einen möglichen Mechanismus der anti-apoptotischen Effekte dieses GPCR-Liganden. Im Gegensatz dazu ist die Serin-/Threonin-Proteinkinase Chk1 an der Kontrolle der S-Phase und G<sub>2</sub>/M-Phase Checkpunkte während des Zellzyklus beteiligt und wird durch DNA-Schädigungen aktiviert. Die LPA-induzierte Phosphorylierung an Ser-280 durch Akt verhindert eine solche Aktivierung und deutet auf einen potentiellen Mechanismus zur GPCR-abhängigen Modulation der zellulären Antwort auf eine DNA-Schädigung hin (King, Skeen *et al.*, 2004).

Erstaunlicherweise deuten die Ergebnisse der massenspektrometrischen Quantifizierung auf eine schnelle Regulation der Aktivität von Transkriptionsfaktoren durch LPA hin. Diese Beobachtung ist insofern ungewöhnlich, als das die Transkriptionsregulation in der klassischen Betrachtung ein langsamer, am Ende der Signaltransduktions-/Integrationskaskaden stehender Prozess ist. Beispielsweise wurde der Tumorsuppressor *Programmed cell death protein 4* (PDCD4) an einer bekannten AKT-Substrat-Phosphorylierungsstelle (Ser-457) nach drei Minuten induziert (Tabelle 3.3-3). Diese spezifische Phosphorylierungsstelle reguliert die Repression der c-Jun-abhängigen Transaktivierung von AP-1 responsiven Elementen (Palamarchuk, Efanov *et al.*, 2005). Zusätzlich induzierte LPA auch die Phosphorylierung der Histon Deacetylase 7 (HDAC7), mutmaßlich durch die Protein Kinase D2 (PKD2) die vor kurzem als zelluläre HDAC7-Kinase identifiziert werden konnte (Dequiedt, Van Lint *et al.*, 2005). Bemerkenswerterweise wurde PKD2 LPA-abhängig im *activation-loop* phosphoryliert und dadurch aktiviert. Zelluläres HDAC7 transloziert zwischen Zellkern und Zytosol und kann im Nukleus durch den Transkriptionsfaktor MEF2D an die Promotoren der Zielgene rekrutiert werden. Dort katalysiert es die Deacetylierung von Lysin-Seitenketten der Histone H2A, H2B, H3 und H4, wodurch es zu einer epigenetischen Repression der Zielgene kommt. Die hier beobachtete PKD2-medierte Phosphorylierung von Ser-486 deutet hingegen auf die Akkumulation von HDAC7 im Zytosol und die Derepression MEF2D/HDAC7 regulierter Gene (Dequiedt, Kasler *et al.*, 2003; Dequiedt, Van Lint *et al.*, 2005; Parra, Kasler *et al.*, 2005; Ishdorj, Graham *et al.*,

2008). Funktionell ist die Phosphorylierung von Ser-486 für die T-Zell-Rezeptor medierte Transkriptionsregulation durch HDAC7 von Bedeutung und könnte im Rahmen der GPCR-vermittelten Genregulation eine ähnliche Rolle einnehmen. Zusätzlich zu PKD2 ist auch die eng verwandte und ebenfalls durch LPA aktivierte Serin/Threonin Proteinkinase PKD1 an der Regulation von HDAC7 beteiligt. Die Aktivierung von PKD1 kann unter anderem durch den *Bone morphogenic receptor 2* (BMP2) erfolgen (Jensen, Gopalakrishnan *et al.*, 2009). Ein geeigneter Indikator der BMP2-Aktivität ist der Status der Autophosphorylierungsstelle Ser(P)-757. Diese wurde LPA-abhängig um den Faktor 2,6 induziert, woraus sich eine bisher unbekannt Vernetzung GPCR-vermittelter Signaltransduktion mit einem Transmembran-Rezeptor mit Serin-/Threonin-Proteinkinase-Aktivität als potentiellen Mediator der Transkriptionsregulation durch PKD und HDAC7 ergab.

LPA-induzierte Phosphorylierungen waren zudem an einer Reihe von Elementen der Proteinbiosynthese zu verzeichnen. Unter anderem wurden Transkriptionsfaktoren wie der *Nuclear factor 1 X-type* (NFIX1) und der *Transcription elongation factor B Polypeptide 3* (TCEB3) als auch Komponenten der Translationsmaschinerie wie der *Eukaryotic translation initiation factor 4H* (EIF4H) und das *Gem-associated protein 5* (GEMIN5) phosphoryliert.

Das Interaktionsnetzwerk verdeutlicht den bemerkenswerten Informationsgewinn der sich aus der Kombination der Phosphorylierungsdaten aus der Gesamtzellysat- und Kinase-angereicherten Analyse ergibt. So wies das Interaktionsnetzwerk der kombinierten Analyse, im Vergleich zu separaten Einzelnetzwerken für Substrat- und Kinase-Phosphorylierungen, eine wesentlich erhöhte Netzwerkkonnektivität auf. Die Datensätze beider Analysen wiesen ein hohes Maß an Komplementarität auf. Von allen Netzwerkknoten wurden nur die Proteinkinasen PKD1, Calcium-/Calmodulin-abhängige Proteinkinase Typ II delta (CAMK2D) und Calcium-/Calmodulin-abhängige Proteinkinase Kinase 1 (CAMK1) durch beide analytischen Strategien identifiziert, wohingegen die Mehrzahl LPA-phosphorylierter Proteinkinasen ausschließlich durch die Affinitäts-Anreicherung erfasst wurde. Die meisten dieser Proteinkinasen sind den MAPK-Kaskaden (*TRAF2 and NCK interacting kinase*, TAO Kinase 1/2, ERK 1/2, *Ribosomal protein S6 kinase alpha 1/3*) der Calcium-abhängigen Signaltransduktion (Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinasen Typ II, PKDs) oder der Protein Tyrosinkinase-vermittelten Signaltransduktion (SRC, YES, FAK, PYK2, ABL1/2) zuzuordnen. Interessanterweise wurden mehrere Vertreter der Rezeptor-Tyrosinkinasen,

## Ergebnisse

wie beispielsweise MET, EGFR und EPHB2 nach LPA Stimulation an Serin-Seitenketten phosphoryliert. Diese Phosphorylierungen könnten die Aktivitäten und zellulären Signaleigenschaften der Rezeptoren z.B. auf Ebene der Lokalisation beeinflussen. Eine solche Regulation durch LPA scheint insbesondere vor dem Hintergrund wahrscheinlich, dass LPA ebenfalls Phosphorylierungen an einer Vielzahl von Proteinen, die an endozytotischen Prozessen beteiligt sind, induzierte. Darunter fielen unter anderem die Proteine AAK1, *AP2 complex subunit  $\beta$ 1*, *GTPase activating and VSP9 domain containing protein 1* und Dynamin 1.

**Tabelle 3.3-3 Ausgewählte LPA-regulierte Phosphorylierungsstellen**

Protein	IPI	Position	Sequenz	Mittleres Ratio HB-EGF/Kontrolle	Mittleres Ratio LPA/Kontrolle	Anmerkungen
<b>Rezeptoren</b>						
Bone morphogenetic protein receptor type-2	IPI00783156	757	LPKRPT <u>S</u> LPLNK	1.32	2.60	
Epidermal growth factor receptor	IPI00018274	1166	KGSHQ <u>S</u> LDNPDY	1.13	1.86	
Epidermal growth factor receptor	IPI00018274	1110	SVQNPV <u>Y</u> HNQPLN	3.12*	1.95*	Autophosphorylierungsstelle
Ephrin type-B receptor 2	IPI00252979	586	KLQHYT <u>S</u> GHMTPG	2.83	10.33	
Hepatocyte growth factor receptor	IPI00029273	977	YDARVH <u>T</u> PHLDRL	0.63	0.44	
<b>Proteinkinasen / -phosphatasen</b>						
Proto-oncogene tyrosine-protein kinase ABL1	IPI00221171	16	GDQRRP <u>S</u> LPALHF	0.96	2.14	Neue Phosphorylierungsstelle
Proto-oncogene tyrosine-protein kinase ABL1	IPI00221171	588	DHEPAV <u>S</u> PLLPRK	0.86	0.40	
Tyrosine-protein kinase ABL2	IPI00329488	820	RTVSTS <u>S</u> QPEENV	1.14	2.50	
Focal adhesion kinase 1	IPI00413961	386	EKQGM <u>R</u> THAVSVS	1.40	2.64	Aktivierungsschleife
Focal adhesion kinase 1	IPI00413961	577	MEDST <u>Y</u> KASKGK	1.40	2.08	
Serine/threonine-protein kinase D3	IPI00015538	731	RIIGE <u>K</u> FRRSVV	2.08	13.55	Aktivierungsschleife
Serine/threonine-protein kinase D3	IPI00015538	735	EKSFR <u>R</u> SVVGTPA	2.31	6.77	Aktivierungsschleife
Protein tyrosine kinase 2 beta	IPI00029702	579	YIEDED <u>Y</u> KASVT	3.39	15.03	Aktivierungsschleife
Protein tyrosine kinase 2 beta	IPI00029702	580	IEDED <u>Y</u> KASVTR	2.22	8.75	Aktivierungsschleife
Protein tyrosine kinase 2 beta	IPI00029702	583	ED <u>Y</u> YKASVTRLPI	2.45	9.58	Aktivierungsschleife
Ribosomal protein S6 kinase alpha-1	IPI00017305	573	ENGLLM <u>T</u> PCYTAN	1.25	3.03	Aktivierungsschleife
Tyrosine-protein kinase Tec	IPI00000878	519	YVLDDQ <u>Y</u> TSSSGA	1.63	6.99	Aktiviert das Enzym (Aoki, Ueno <i>et al.</i> , 2004)
Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Yes	IPI00013981	425	LIEDNE <u>Y</u> TARQGA	1.21	1.84	Aktivierungsschleife
Cyclin-dependent kinase-like 5	IPI00746301	407	NIPHLL <u>S</u> PKEAKS	1.58	2.91	
Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 12	IPI00289082	435	KLERNL <u>S</u> FEIKKV	2.02	2.89	
Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 12	IPI00018914	578	RPRPAT <u>S</u> TPDLAS	0.82	0.49	
<b>Zellzyklus / Apoptose</b>						
Serine/threonine-protein kinase Chk1	IPI00023664	280	KRPRVT <u>S</u> GGVSES	1.52	2.09	Zellzyklus G <sub>2</sub> /M Übergang
Astrocytic phosphoprotein PEA-15	IPI00643342	116	DIIRQP <u>S</u> EEIIK	1.17	2.03	Anti-apoptotischer Effekt (Trenca, Perfetti <i>et al.</i> , 2003; Perfetti, Oriente <i>et al.</i> , 2007)

## Ergebnisse

STE20-like serine/threonine-protein kinase	IPI00247439	340	PASKRASSDLSIA	1.10	2.17	Reguliert Apoptose (Sabourin, Tamai <i>et al.</i> , 2000)
Serine/threonine-protein kinase 17B	IPI00014934	10	RRFDCRSISGLLT	1.58	5.89	Reguliert Apoptose
<b>Endo- / Exozytose</b>						
AP2-associated protein kinase 1	IPI00479760	620	QKVGSLTPSPSPK	1.54	2.86	Endozytose
AP2-associated protein kinase 1	IPI00479760	623	GSLTPPSSPKTQR	1.23	3.50	Endozytose
AP2-associated protein kinase 1	IPI00479760	624	SLTPPSSPKTQRA	1.51	2.80	Endozytose
AP2-associated protein kinase 1	IPI00479760	637	GHRRILSDVTHSA	0.68	0.43	Endozytose
AP2-associated protein kinase 1	IPI00479760	676	SATTPSGSPRTS	0.49	0.17	Endozytose
AP2-associated protein kinase 1	IPI00479760	731	PEKLGGSAESLIP	0.92	0.33	Endozytose
AP-2 complex subunit beta-1	IPI00784366	4	___MTDSKYFTTN	2.73	8.40	Endozytose
GTPase-activating protein and VPS9 domain-containing protein 1	IPI00292753	929	RLVRSRSSDIVSS	1.23	1.90	Endozytose
Dynamin-1	IPI00413140	774	VPAGRRSPTSSPT	1.38	2.55	Endozytose, EGFR (Pierce, Tohgo <i>et al.</i> , 2001)
Dynamin-1	IPI00413140	776	AGRRSPISSTPTQ	1.47	2.47	Endozytose, EGFR
Exocyst complex component 1	IPI00215762	486	MGNMSASDLVDAD	0.55	0.58	Endozytose, CDC42-Interaktor (Zhang, Orlando <i>et al.</i> , 2008)
Kinesin-like protein KIF21A	IPI00425409	855	TRKLSSSDAPAQD	0.58	3.74	Intrazellulärer Transport
Intersectin-1	IPI00304740	904	ATGSSSPVVLGQG	0.29	0.46	Endozytose, Rho-signaling
<b>G-Protein Signaltransduktion</b>						
Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-12	IPI00328744	40	REARRRSRDIDAL	0.88*	3.13*	Heterotrimeres G protein $\alpha$ Untereinheit
Glucocorticoid receptor DNA-binding factor 1	IPI00334715	589	DRNQKNSLSDPNI	1.68	2.75	Rho GAP, reprimiert den Glucocortikoid Rezeptor
A-kinase anchor protein 13	IPI00065931	1899	IFANRRSQQSVSL	1.62	3.55	Rho GEF, koppelt $G_{\alpha 12/13}$ mit Rho, verankert PKA
Rho GTPase-activating protein 29	IPI00152011	499	GFGPANSLSDVVR	0.96	2.61	Ras/Rho GAP, Rho/CDC42 Regulation
Rho GTPase-activating protein 29	IPI00152011	552	GSSESRLSDSESI	1.26	2.44	Ras/Rho GAP, Rho/CDC42 Regulation
Cdc42 effector protein 4	IPI00015894	174	GAAGPHSPDPLLD	0.53	3.71	Effektor von CDC42, Pseudopodium Ausbildung
Development and differentiation-enhancing factor 1	IPI00376976	1044	AIQKQASDSDNDL	1.08	2.54	Reguliert die Ras/Arf GTPase Aktivität
Ras-related protein Rab-13	IPI00016373	178	KSGGRRSGNGNKP	1.34	3.25	GTPase
TBC1 domain family member 4	IPI00220901	588	MRGRLGSDVDSFER	1.22	2.80	Ras/Rab GTPase
Neurofibromin	IPI00299512	2543	LLGTRKSFDDLIS	1.49	3.56	Ras GTPase Aktivator
Neurofibromin	IPI00299512	2515	PTVGQTSFRARKS	0.67	0.27	Ras GTPase Aktivator
Rab GTPase-binding effector protein 1	IPI00293009	407	GLRRAQSTDSLGT	0.74	0.40	Rab Effektor, GTPase Aktivator
Protein SOLO	IPI00748767	961	HLGEEASPRGYRR	1.02	0.52	Rho GEF, GTPase Regulator
MICAL-like protein 1	IPI00174962	484	PAPRAPASPLAL	0.34	0.09	Rab 13 Interaktor
<b>Transkription / Translation / Degradation</b>						
Programmed cell death protein 4	IPI00290110	457	GRKRFVSEGDGGR	1.60	1.83	Phosphorylierung deprimiert AP-1 Elemente (Palamarchuk, Efanov <i>et al.</i> , 2005)
Transcription elongation factor B polypeptide 3	IPI00018404	137	KKHRKLSLELPH	1.44	3.64	Elongationsfaktor
Nuclear factor 1 X-type	IPI00218260	265	VTLGRRSITSPPS	1.57	3.25	Transkriptionsfaktor

## Ergebnisse

Histone deacetylase 7	IPI00418482	486	PLSRAQSSPAAPA	1.45	1.97	Phosphorylierung induziert nukleären Export
Histone deacetylase 7	IPI00418482	444	RLRQIPSAEDLET	0.81*	3.42*	
Gem-associated protein 5	IPI00291783	757	TPVKLESIDGNEE	1.30	3.69	EIF4H Interaktor (Fierro-Monti, Mohammed <i>et al.</i> , 2006)
Eukaryotic translation initiation factor 4H	IPI00014263	21	FGGGRGSRGSAG G	1.21	2.22	Translations-Initiationsfaktor
Ubiquitin conjugation factor E4 B	IPI00005715	103	SQSLRSRQSMDDID	1.14	1.90	Protein Degradation
Ubiquitin-associated protein 2-like	IPI00514856	454	APPPPSPLPSKS	0.81	0.49	Protein Degradation
Ubiquitin-associated protein 2-like	IPI00514856	609	PSSISSPQKDLT	0.93	0.48	Protein Degradation
<b>DNA Schädigung</b>						
Interferon-inducible double stranded RNA-dependent protein kinase activator A	IPI00021167	18	PLEREDSGTFSLG	1.76	4.66	Protein aktiviert PKR
<b>Adhesion / Motilität</b>						
CD44 antigen	IPI00305064	697	VEDRKPGLNGEA	1.31	3.03	Phosphorylierung reguliert Motilität(Tzircotis, Zelladhäsion
Platelet F11 receptor	IPI00001754	284	VIYSQPARSEGE	2.47	5.69	Zelladhäsion
Tight junction protein ZO-1	IPI00216219	1366	SYFDRRSEFNKPP	1.39	2.86	
Plakophilin-3	IPI00335634	88	QSSSPVYGSSAKT	1.65	2.20	Zelladhäsion
Plakophilin-3	IPI00026952	314	TLQRLSGDFDID	2.62	18.39	Zelladhäsion
Liprin-beta-1	IPI00179172	532	NLDRKRASAPTL	1.87	3.67	Zelladhäsion
Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	IPI00219301	120	AEPGSPAAEAGEA	0.85	2.23	Phosphorylierung inhibiert die Bindung von F-Aktin
<b>Andere Proteine</b>						
ADAM 9	IPI00288894	791	SSTAAKSFEDLTD	0.81*	0.53*	Liganden Prozessierung
ADAM 17	IPI00440932	752	PSRQPGSVPRHVS	2.05*	3.72*	Liganden Prozessierung
C-X-C chemokine receptor type 4	IPI00216445	328	TSVSRGSSLKILS	0.76*	3.43*	Rezeptor für <i>Stromal derived factor-1</i>
7-dehydrocholesterol reductase	IPI00294501	14	NIPKAKSLDGVTN	1.25	7.70	Cholesterolsynthese, aktiviert durch Phosphorylierung (Shefer, Salen <i>et al.</i> , 1998)
Oxysterol-binding protein-related protein 11	IPI00032970	189	ISQRRPQNAISF	1.10	1.95	Steroltransport / -bindung (Yan and Olkkonen, 2008)
1-phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase beta-3	IPI00010400	537	SLEPQKSLGDEGL	2.68	14.32	Phospholipase

### 3.3.6 Aktivierungsschleifen-Phosphorylierung

Wie aus der obigen Auflistung ersichtlich, ist die genaue funktionelle Bedeutung spezifischer Phosphorylierungsstellen, bezogen auf die Gesamtheit der detektierbaren Phosphorylierungsstellen, nur in wenigen Fällen bekannt. Viele Proteinkinasen verfügen jedoch über eine konservierte Region, die entscheidenden Einfluss auf die Kinaseaktivität ausübt. Die Übertragung von Phosphorylgruppen auf Aminosäuren innerhalb dieser Aktivierungsschleifen (*activation-loops*) stabilisiert die enzymatisch aktive Konformation und kann daher als Maß für die zelluläre Aktivität der Kinase betrachtet werden. Da Proteinkinasen Schlüsselpositionen in zellulären Phosphorylierungsnetzwerken einnehmen, kommt der Analyse der Aktivitätsregulation besondere Bedeutung zu. In dieser Studie konnten LPA-induzierte Phosphorylierungen

innerhalb der Aktivierungsschleifen von 11 Proteinkinasen (ERK1/2, FAK, PYK2, *Ribosomal protein S6 kinase alpha 1*, PKD1/2/3, YES/SRC und TEC) detektiert werden. Daraus kann abgeleitet werden, dass die Aktivierung dieser Proteinkinasen bereits 3 Minuten nach LPA Stimulation erfolgte. Die schnelle und starke Aktivierung der bislang nur unzureichend charakterisierten Protein-Tyrosinkinase TEC ist hierbei von besonderem Interesse.

### 3.3.7 Funktionelle Bedeutung der Tyrosinkinase TEC

TEC spielt eine wichtige Rolle in diversen biologischen Prozessen, insbesondere der T-Zell Rezeptor-vermittelten Signaltransduktion, der Aktin-Reorganisation und der Zelladhäsion (Takesono, Horai *et al.*, 2004). Die Funktion dieser Kinase wurde bislang jedoch hauptsächlich in Zellen des Immunsystems im Kontext der Antigenrezeptor-vermittelten Signaltransduktion untersucht. TEC konnte experimentell durch Expression von  $G\alpha_{12/13}$  und Src Kinasen aktiviert werden (Mao, Xie *et al.*, 1998). Die Beobachtung einer Aktivierung durch Stimulation mit exogenem GPCR Agonisten (LPA) im nativen zellulären System ist jedoch erstmals in dieser Studie gelungen. Die funktionelle Bedeutung der Tyrosinkinase TEC in Jurkat T-Zellen und die promigratorischen Effekte von LPA im untersuchten Zellsystem legten eine Beteiligung an der LPA-induzierten Zellmigration nahe. Um diese Hypothese zu überprüfen wurde die Expression von TEC transient mittels siRNA reduziert und anschließend die Zellmigration nach LPA-Stimulation bestimmt. In Ermangelung der Verfügbarkeit spezifischer Antikörper gegen TEC wurde die Effizienz des siRNA-*knockdown* durch quantitative *reverse-transcription PCR* überprüft. Zur Validierung der Ergebnisse wurden zwei distinkte, kommerziell erhältliche siRNA Sequenzen eingesetzt. 48 Stunden nach der Transfektion waren, je nach siRNA, noch 10-20% der ursprünglichen TEC-mRNA nachweisbar (Abbildung 3.3-9 B). Nach 72 Stunden stieg die Abundanz des Transkripts wieder auf etwa 25% des Kontrollwertes an. Die Migrations-Experimente wurden 72 Stunden nach der Transfektion durchgeführt. Hierzu wurde die Wachstumsfaktor-abhängige Migration von A498 Zellen durch eine poröse Membran in biologischen Duplikaten bestimmt. 10  $\mu$ M LPA induzierten die Zellmigration der mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen um den Faktor 4, wohingegen 20 nM HB-EGF die Migration etwa um den Faktor 2,5 erhöhten (Abbildung 3.3-9 A). Beide verwendeten anti-TEC siRNAs reduzierten zudem die LPA-induzierte Migration signifikant ( $p \leq 0,05$ ) auf das 2,5 - 2,8-fache der unstimulierten Kontrollen. Bemerkenswerterweise entspricht diese LPA-induzierte und

## Ergebnisse

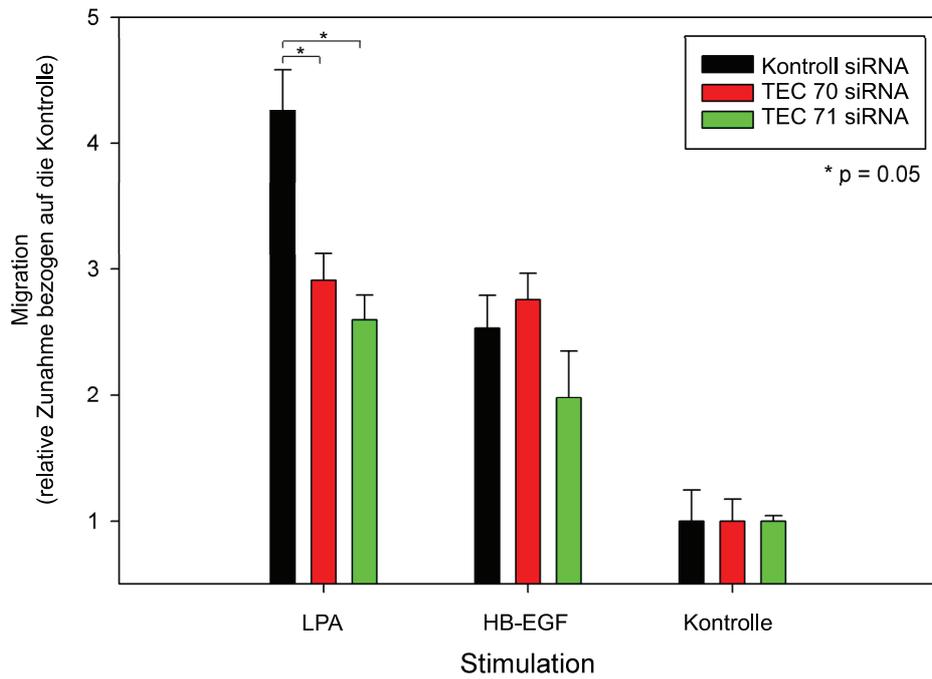
---

TEC-unabhängige Migration recht genau dem pro-migratorischen Effekt durch direkte EGFR-Stimulation mit HB-EGF. Die siRNA-vermittelte Reduktion der TEC-Expression hatte zudem keinen signifikanten Einfluss auf die HB-EGF induzierte Migration.

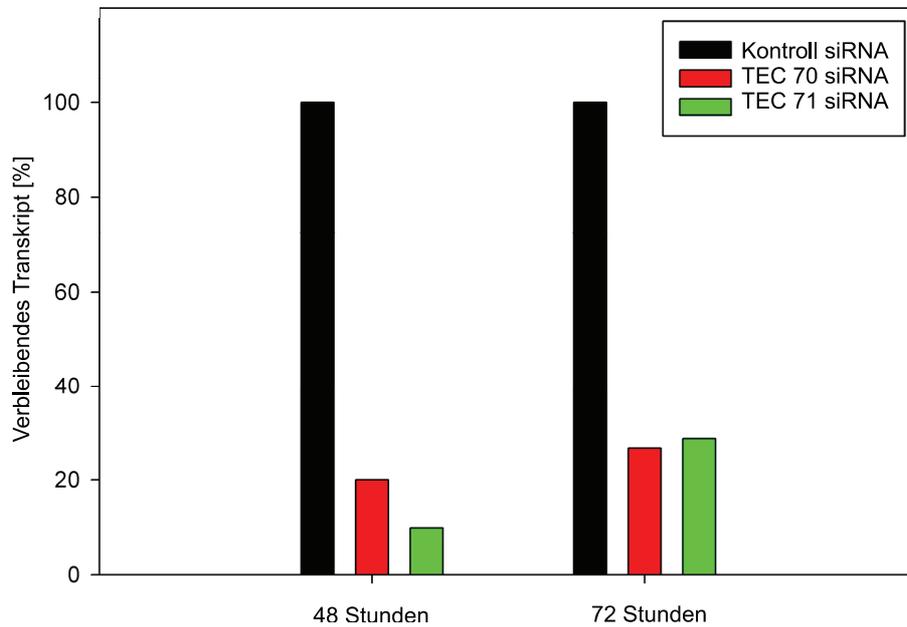
Zusammengenommen legen diese Ergebnisse nahe, dass die durch LPA aktivierte Protein Tyrosinkinase TEC funktionell und spezifisch an der positiven Regulation der LPA- aber nicht HB-EGF-abhängigen Migration von A498 Zellen beteiligt ist.

## Ergebnisse

A



B



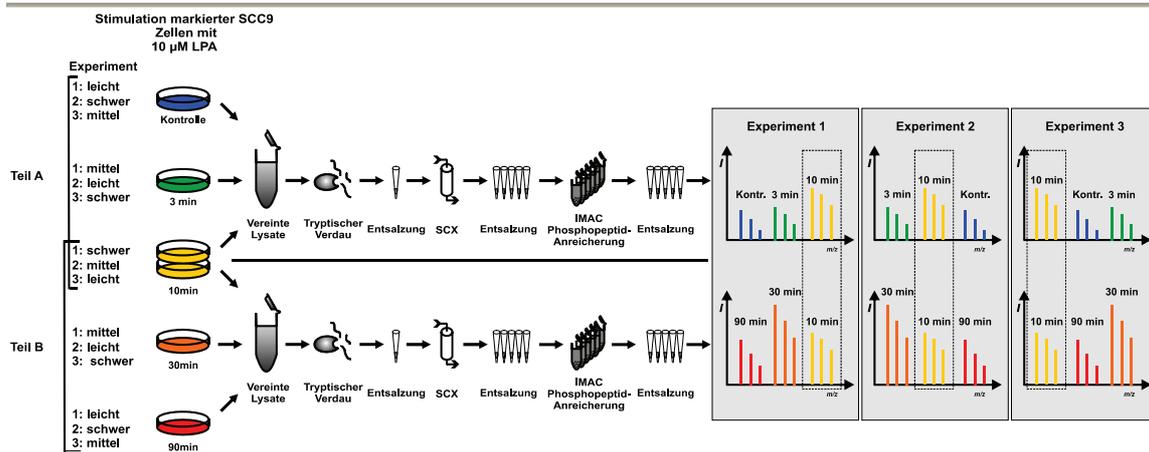
**Abbildung 3.3-9 Einfluss der Tyrosinkinase TEC auf die LPA-induzierte Zellmigration.** A, relative Zellmigration durch eine poröse Membran (Porendurchmesser 8  $\mu\text{m}$ ) in einem *Boyden-Chamber Assay*. A498 Zellen wurden mit Kontroll-siRNA oder siRNAs gegen TEC transfiziert, und nach 72 Stunden die LPA- bzw. HB-EGF-anhängige Migration bestimmt. B, siRNA-abhängige Reduktion des TEC Transkripts 48 bzw. 72 Stunden nach der Transfektion mit Kontroll-siRNA bzw. TEC-siRNAs.

## **3.4 ZEITREIHEN-ANALYSE LPA-ABHÄNGIGER PHOSPHORYLIERUNGEN IN SCC9 ZELLEN**

### **3.4.1 Experimenteller Ansatz**

Da Agonisten-induzierte Phosphorylierungsnetzwerke während der Signalinitiation, Weiterleitung, Integration und der Modulation terminaler Effektoren zeitabhängige Veränderungen durchlaufen, liefert eine Momentaufnahme dieser Netzwerke nur ein unvollständiges Bild der regulatorischen Vorgänge. Um die Dynamik des komplexen LPA-induzierten Phosphorylierungsnetzwerks zu erfassen wurde in Zusammenarbeit mit Nina Mäusbacher eine umfangreiche quantitative Zeitreihenanalyse in Plattenepithelkarzinomzellen (SCC-9) durchgeführt. Dieses zelluläre System ist im Hinblick auf die LPA-induzierten zellulären Effekte mit dem, im vorangegangenen Teil betrachteten, Nierenzellkarzinomsystem (A498) vergleichbar, wobei sich die für die EGFR-Transaktivierung verantwortlichen Liganden unterscheiden. Während ADAM 17 in A498 Zellen HB-EGF prozessiert, kommt es in Folge der LPA-Stimulation in SCC-9 Zellen zur Spaltung membrangebundenen Amphiregulins.

Da für quantitative Untersuchungen mittels SILAC nur drei differentielle Isotopenmarkierungen zur Verfügung stehen, wurden zwei unabhängige SILAC-Experimente über eine gemeinsame Referenzprobe verknüpft (Abbildung 3.4-1 Teil A und B). Auf diese Weise wurden die dynamischen Prozesse der gesamtzellulären Phosphorylierung während der ersten 90 Minuten nach LPA-Stimulation quantitativ zu fünf Zeitpunkten erfasst. Die Zeitabstände der Momentaufnahmen wurden quasi-exponentiell vergrößert, um sowohl schnell regulierte als auch langsame Prozesse abbilden zu können. Die beiden Telexperimente wurden über den Zeitpunkt  $t = 10\text{min}$  verknüpft, da die zu erwartende Variabilität aufgrund technischer (Reproduzierbarkeit der Stimulations- und Lysedauer) und biologischer Faktoren (ausgeprägte und robuste Phosphorylierung) für diesen Zeitpunkt mutmaßlich am kleinsten war. Die Validität der Daten wurde durch drei biologische Replikate mit jeweils alternierenden SILAC-Markierungen sichergestellt. Aufgrund des messtechnischen Aufwands, wurde die praktische Arbeit dieses Projektes zu gleichen Teilen zwischen Nina Mäusbacher und mir aufgeteilt.



**Abbildung 3.4-1 Experimentelles Design der Zeitreihen-Analyse\*.** SCC-9 Zellen wurden durch metabolische Inkorporation von SILAC Aminosäuren markiert und für unterschiedliche Zeiträume (Kontrolle, 3 min, 10 min, 30 min, 90 min) mit 10 µM LPA stimuliert. Anschließend wurden die Lysate von drei Stimulationsbedingungen (Teil A: Kontrolle, 3 min, 10 min; Teil B: 10 min, 30 min, 90 min) zu gleichen Teilen (Proteinmengen) vereinigt, tryptisch in Lösung verdaut und die resultierenden Peptide mittels SCX fraktioniert. Nach der Entsalzung der Fraktionen wurden die Phosphopeptide durch Bindung an immobilisierte Metallionen (IMAC) angereichert und massenspektrometrisch analysiert. Beide Telexperimente wurden anschließend durch die gemeinsame Referenzbedingung (10 min) zusammengeführt. Die SILAC Markierungen wurden in den drei biologischen Replikatexperimenten jeweils invertiert. \*In Zusammenarbeit mit Nina Mäusbacher.

Methodisch basierte die Analyse auf der Peptid-Fraktionierung mittels hochauflösender SCX und der anschließenden Anreicherung phosphorylierter Peptide durch immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC). SILAC markierte SCC-9 Zellen wurden für die angegebenen Zeiten mit 10 µM LPA stimuliert und anschließend die Gesamtzelllysate der Kontrolle, 3 und 10 min Stimulation (Teil A), sowie Lysate der 10, 30 und 90 min Stimulation (Teil B) zu gleichen Proteinanteilen vereint. Die nachfolgende Proben-Prozessierung bestand aus tryptischem Verdau, SCX-Fraktionierung, Entsalzung, IMAC Phosphopeptid-Anreicherung und MS-Analyse. Beide experimentellen Teile und die drei biologischen Replikate wurden jeweils separat analysiert. Im Anschluss an die datenbankgestützte Peptididentifikation wurden die quantifizierten (Phospho-) Peptide distinkten Proteinen und Phosphorylierungsstellen zugeordnet. Zeitaufgelöste Profile der zuverlässig lokalisierten Phosphorylierungsstellen ( $p \geq 0,75$ ) wurden daraufhin aus den, über mindestens zwei Replikate gemittelten, Messwerten beider experimenteller Teile generiert.

Durch diese Vorgehensweise konnten in SCC-9 Zellen 3.840 distinkte Phosphoproteine und 17.190 Phosphorylierungsstellen identifiziert werden. Von diesen Phosphorylierungsstellen wurden über 95% zumindest in einem Experiment quantifiziert. Die drei biologischen Replikate zeichneten sich durch eine große interexperimentelle Überschneidung aus; so konnten 7.587 Phosphorylierungsstellen in allen drei biologischen Replikaten zumindest zu einem Zeitpunkt quantifiziert werden. Weitere 3.700 Phosphorylierungsstellen wurden in zwei biologischen Replikaten

## Ergebnisse

quantifiziert (Abbildung 3.4-2 A). Eine ähnliche Schnittmengenverteilung ergab sich auch für die identifizierten Phosphopeptide (Abbildung 3.4-2 B). Insgesamt konnten 6741 Phosphorylierungsstellen zu jedem Zeitpunkt in mindestens zwei Replikaten quantifiziert werden. Erstaunlicherweise wiesen 2.095 dieser Phosphorylierungsstellen eine mehr als zweifache Regulation zu einem Zeitpunkt mit einem Variationskoeffizienten  $\leq 0,3$  auf. Für die weiteren bioinformatischen Analysen wurden ausschließlich diese verlässlich regulierten Phosphorylierungsstellen herangezogen.

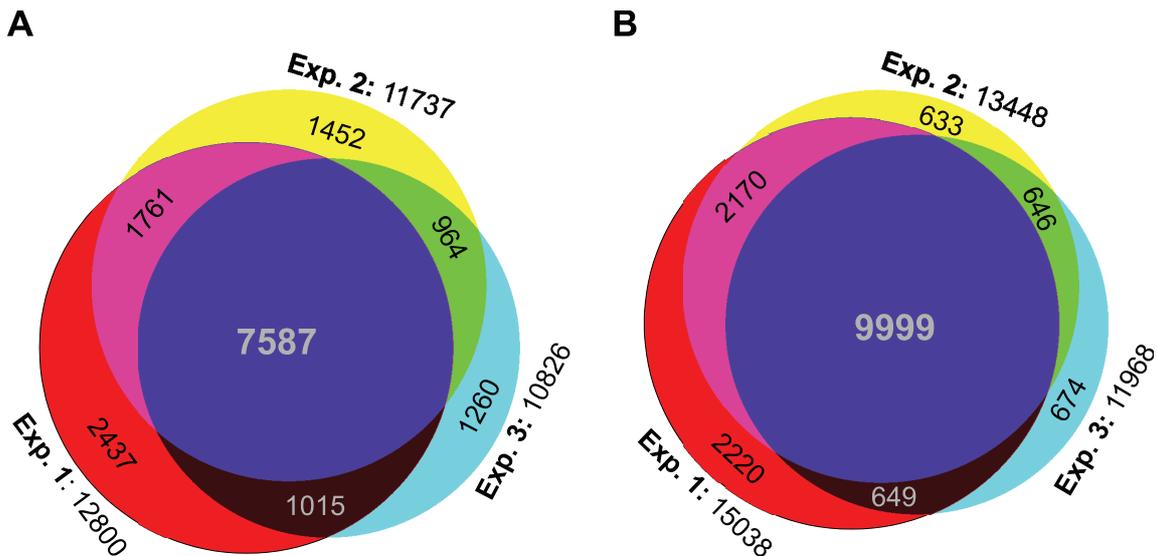


Abbildung 3.4-2 Schnittmengen der biologischen Replikate. Maßstabsgetreue Darstellung der Anzahl quantifizierter Phosphorylierungsstellen (A) bzw. identifizierter Phosphopeptide (B) in den Schnittmengen der biologischen Replikate.

### 3.4.2 Protein Interaktionsnetzwerk

Komplexe Signalnetzwerke basieren unter anderem auf der direkten, molekularen Interaktion der beteiligten Proteine. Die aus der Komplexbildung resultierende räumliche Nähe der Komponenten ermöglicht eine schnelle und strikte Regulation unterschiedlicher biologischer Prozesse. Um diese funktionellen Module und ihre Interkonnektivität im Rahmen der LPA-induzierten Signalverarbeitung besser zu verstehen wurde ein Phosphoprotein-Interaktionsnetzwerk erstellt. Hierfür wurden die experimentell bestätigten Interaktionen ( $p \geq 0,7$ ) aller, in SCC-9 Zellen durch LPA-regulierten, Phosphoproteine mit Hilfe der STRING Interaktionsdatenbank berechnet. Aus diesen Daten wurde ein Interaktionsnetzwerk generiert, welches durch die Farb- / Form-kodierten biologischen Prozesse / molekularen Funktionen der Proteine gemäß *Gene Ontology* komplementiert wurde (Abbildung 3.4-3). Das resultierende, hochgradig strukturierte Netzwerk umfasst ein heterogenes, engmaschiges Hauptnetzwerk aus Phosphoproteinen, welche an unterschiedlichen biologischen Prozessen, wie z.B. der

Zelladhäsion, Transkription oder der Signaltransduktion beteiligt sind. In diesem nimmt der durch LPA transaktivierte und an Tyr-1197 phosphorylierte EGF-Rezeptor (Tabelle 3.4-1) eine zentrale Position ein. Er interagiert direkt mit einer Reihe LPA-regulierter Proteine, die an der Zelladhäsion beteiligt sind. Darunter fallen z.B. Zelladhäsionsmoleküle der sog. *tight junctions* (*Junctional adhesion molecule A* (F11R), *Tight junction protein ZO-1/2* (TJP1, TJP2)), *adherens junctions* (*Catenin Alpha-1* (CTNNA), *Catenin Beta-1* (CTNNB1), *Catenin Delta-1* (CTNND1)), Hemidesmosomen (*Integrin Beta-4* (ITGB4)) und *focal adhesions* (*Paxillin* (PXN), *Alpha-Parvin* (PARVA)). Von diesen interagierenden Phosphoproteinen konnten für *Catenin Beta 1* und den F11-Rezeptor (*Junctional adhesion molecule A*) funktionell charakterisierte Phosphorylierungsstellen detektiert werden. So moduliert die LPA-induzierte Phosphorylierung von Ser-552 an *Catenin-beta* die Zellmotilität und reguliert zudem die transkriptionelle Aktivität. Zusätzlich zu *Catenin-beta* wurden einige weitere, an funktionell charakterisierten Phosphorylierungsstellen durch LPA-regulierte Transkriptionsfaktoren, wie das *Myc proto-oncogene protein* (MYC), das *Forkhead box protein O3* (FOXO3A), den Transkriptionsfaktor AP-1 (JUN), den *Nuclear receptor coactivator 3* (NCOA3), den *Signal transducer and transcription activator 1/3* (STAT 1/3) und das *Retinoblastoma-assoziierte Protein 1* (RB1) identifiziert. Gemeinsam mit weiteren Transkriptionsfaktoren (*Nuclear receptor corepressor 1* (NCOR1), *Transcriptional repressor p66-beta* (GATAD2B), *Butyrate response factor* (ZFP36L)) und Chromatin-modifizierenden Enzymen wie dem *Retinoblastoma-like protein 1* (RBL1) und dem *BHC corepressor complex subunit* ist RB1 einer der direkten Interaktoren der *Histon Deacetylase 1* (HDAC1), die eine zentrale Position im Interaktionsnetzwerk einnimmt. Interessanterweise interagieren die Chromatin-modifizierenden Enzyme präferentiell mit Transkriptionsfaktoren und bilden so ein funktionelles Subnetzwerk der Genregulatoren. Zusätzlich zu diesen Regulatoren finden sich im Hauptnetzwerk eine Vielzahl regulierter MAP-Kinase Aktivatoren die zur Phosphorylierung und Aktivierung der Effektor MAP-Kinasen ERK 1/2, JNK und p38 beitragen. Die aktiven MAP-Kinasen sind durch Protein Interaktionen über die aktivierte Ribosomale S6 Kinase (RPS6K), das *Regulatory-associated protein of mTOR* (RAPTOR) und den mTOR Komplex 1 (AKTS1) mit einem separaten Submodul hoher Konnektivität verknüpft. Dieses besteht vornehmlich aus LPA-regulierten Translationsfaktoren und ribosomalen Proteinen. LPA induzierte in diesem Kontext die Phosphorylierung des Translationsrepressors EIF4EBP1 an Ser-65 und Thr-70. Beide

Phosphorylierungen bewirken die Dissoziation vom Translations-Initiationskomplex und damit eine De-Repression der Translation. Ein weiteres Submodul aus Splicing-Faktoren und RNA-bindenden Proteinen ist mit dem Translationsmodul über Interaktionen zwischen dem *Nuclear cap-binding protein subunit 1* (NCBP1) bzw. *Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein 1* (PTBP1) und dem *Eukaryotic translation initiation factor 4 G1* (EIF4G1) verbunden. Die Phosphorylierung eines dieser RNA-bindenden Proteine (*Polypyrimidine tract-binding protein 1* (PTBP1)) hat zudem direkte Auswirkungen auf die seine intrazelluläre Lokalisation. Durch die LPA-induzierte Phosphorylierung an Ser-16 (Tabelle 3.4-1) kommt es zum nukleären Export von PTBP1 (Xie, Lee *et al.*, 2003) und damit zur Anreicherung des Proteins im Zytosol. Während nukleäres PTBP1 als Repressor bestimmter Splicing-Stellen fungiert (Valcarcel and Gebauer, 1997), liegt seine zytosolische Funktion in der Regulation der mRNA Lokalisation (Cote, Gautreau *et al.*, 1999).

Die LPA-Stimulation regulierte jedoch nicht nur die Phosphorylierung von Splicing-Faktoren, sondern hatte ebenfalls Auswirkungen auf den Phosphorylierungsstatus nukleärer Porenproteine, welche die Translokation von RNA und Proteinen über die Kernmembran vermitteln. Diese bilden, zusammen mit nukleären Strukturproteinen wie dem *Inner centromere protein* (INCENP) oder NEDD1, ein weiteres eigenständiges Submodul des LPA-Interaktionsnetzwerks. Die LPA-induzierte Phosphorylierung von NEDD1 wird vermutlich durch die *Polo-like kinase* (PLK) vermittelt und ist essentiell für die Lokalisierung des *Gamma-tubulin ring complex* an das Zentrosom (Zhang, Chen *et al.*, 2009).

Das größte und prägnanteste Sub-Modul besteht jedoch aus insgesamt 23 G-Protein regulatorischen Komponenten, wie GTPase-aktivierenden Proteinen (GAPs), Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEFs) und GDP-Dissoziationsinhibitoren (GDIs). Trotz des Mangels an charakterisierten Phosphorylierungsstellen legt die regulierte Phosphorylierung einer solchen Vielzahl von interagierenden, regulatorischen Proteinen eine funktionelle Relevanz im Kontext der GPCR-abhängigen Signaltransduktion nahe.

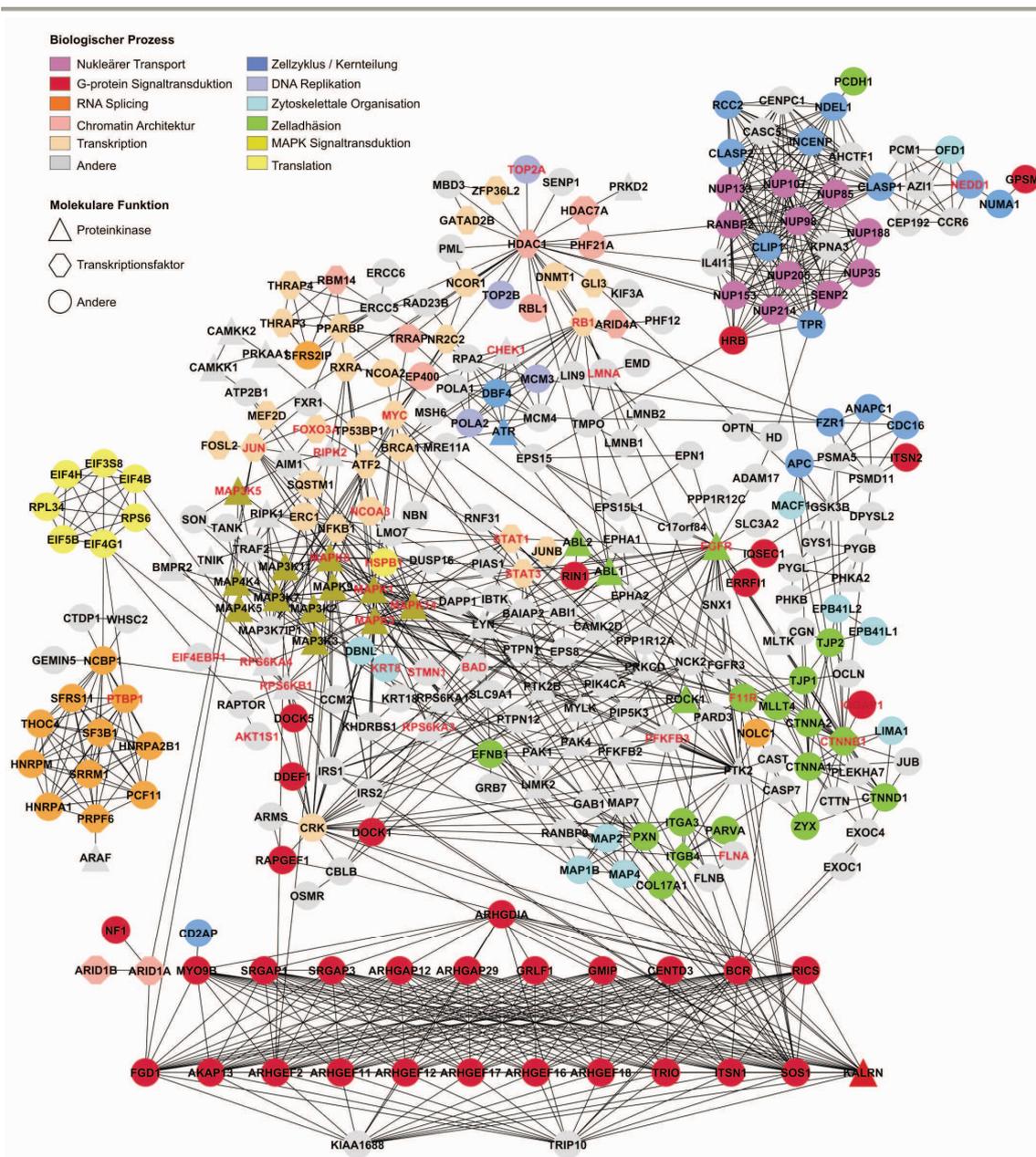


Abbildung 3.4-3 Protein Interaktionsnetzwerk LPA-regulierter Phosphoproteine in SCC-9 Zellen.\* Das Netzwerk zeigt Interaktionen hoher Konfidenz ( $p \geq 0,7$ ) zwischen LPA-regulierten Phosphoproteinen gemäß STRING Algorithmus. Die molekulare Funktion und die Beteiligung der Phosphoproteine an biologischen Prozessen sind durch die Form bzw. Farbe der Netzwerkknoten kodiert. Phosphoproteine mit funktionell charakterisierten Phosphorylierungsstellen sind durch rote Beschriftung gekennzeichnet. \* In Zusammenarbeit mit Nina Mäusbacher.

### 3.4.3 Zeitlicher Verlauf zellulärer Phosphorylierungsereignisse

Die Netzwerkanalyse offenbarte die koordinierte Regulation interagierender Proteine und darüber hinaus die besonders ausgeprägte Konnektivität einiger Proteingruppen wie z.B. der G-Protein Regulatoren. Eine Vielzahl dieser Phosphoproteinen enthalten jedoch mehrere und teilweise differentiell durch LPA regulierte Phosphorylierungsstellen. Um diese zeitlichen und Phosphorylierungsstellen-spezifischen Effekte abzubilden wurden zeitaufgelöste *Heatmaps* ausgewählter Proteingruppen (Abbildung 3.4-4) erstellt.

## Ergebnisse

---

LPA induzierte ~80% der regulierten Phosphorylierungsstellen an G-Protein Regulatoren im Verlauf der Analyseperiode. Die hierarchische Gruppierung dieser zeitlichen Profile offenbarte zudem Phosphorylierungsmuster, die auf unterschiedliche Regulationsmechanismen hindeuten und evtl. eine Rolle bei der zeitlichen Koordination der distinkten Phasen der Signaltransduktion (Initiation, Integration / Transduktion, Effektor-Regulation) eine Rolle spielen. Die Phosphorylierungsmuster waren durch die Intensität der relativen Phosphorylierung, der Verzögerung bis zum Einsetzen der Phosphorylierung und den weiteren zeitlichen Verlauf des Signals (kontinuierliche Zunahme, Stagnation oder Abnahme durch Gegenregulation) gekennzeichnet. Eine besonders starke, schnell einsetzende und andauernde Induktion, um mehr als das 10-fache, wurde an Ser-1443 des Cdc42-Effektors *Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1* (IQGAP1) beobachtet. Diese spezifische Phosphorylierung moduliert die Interaktion zwischen IQGAP1 und Cdc42 und induziert die zytoskelettale Reorganisation (Grohmanova, Schlaepfer *et al.*, 2004; Li, McNulty *et al.*, 2005). Ähnliche Phosphorylierungsprofile wiesen die G-Protein Regulatoren *Rho guanine nucleotide exchange factor 7/16* (ARHGEF7/16), *TBC1 domain family member 15* (TBC1B15) und *G-protein-signaling modulator 2* (GPSM2) auf. Im Gegensatz zu diesen nachhaltig induzierten Phosphorylierungsstellen war am Ser-448 des Rho GTPase-Inhibitors Rhotekin (RTKB) eine schnelle Gegenregulation zu verzeichnen. Bereits 3 Minuten nach der Stimulation erreichte die Phosphorylierung ihre maximale Ausprägung, um nach 10 Minuten wieder auf das Ausgangsniveau zurückzukehren. Mit einer Verzögerung von 10 Minuten wurden z.B. Adapterproteine wie *Son of sevenless* (SOS) an Ser-1134 und Effektoren wie der *Glucocorticoid receptor DNA-binding factor 1* (GRLF1) an Ser-589 phosphoryliert.

Zusätzlich wurde auch eine Reihe G-Protein gekoppelter Rezeptoren in Folge der LPA-Stimulation phosphoryliert. Als Initiatoren der G-Protein-abhängigen Signaltransduktion sind diese Phosphorylierungsereignisse von besonderem Interesse. Die Profile der GPCRs lassen sich in drei Cluster einteilen. Während der GPCR GPR56 und der Histidin Rezeptor H1 (HRH1) an Ser-680, Ser-689 bzw. Ser-380 unmittelbar nach der Stimulation (zum Zeitpunkt  $t = 3$  min) stark phosphoryliert waren, erfolgt die verstärkte Phosphorylierung des Chemokinrezeptors CXCR7 an Ser-347 erst 10 Minuten nach der Zugabe von LPA. Im Gegensatz hierzu wurden die vier quantifizierten Phosphorylierungsstellen des Niacinrezeptors (NIACR) differentiell reguliert. LPA stimulierte an diesem GPCR die Phosphorylierung von Ser-354 und Ser-362 mit einer

## Ergebnisse

---

maximalen Induktion nach 10 Minuten, wohingegen die relative Phosphorylierung der benachbarten Serine 327 und 328 nach 30 Minuten zunehmend reduziert wurde. Für diese zeitlich synchrone Reduktion der Abundanz einfach phosphorylierter Peptide könnten die Aktivierung von Proteinphosphatasen nach 30 Minuten, oder die Mehrfach-Phosphorylierung der entsprechenden Peptide verantwortlich sein. Interessanterweise sind einige dieser GPCRs und G-Protein Regulatoren, wie GPR56, CD97 und Neurofibromin (NF1) direkt an der Regulation der Zelladhäsion beteiligt.

Eine starke Induktion konnte ebenfalls für Proteinkinasen beobachtet werden. Über 90% der 66, auf der Grundlage einfach phosphorylierter Peptide quantifizierten, Phosphorylierungsstellen wurden durch LPA-induziert. Von diesen wurden die Calmodulin-abhängige Proteinkinase (CAMKK1, Ser(P)-74), MAP-Kinase p38 (MAPK14, Ser(P)-180) und Proteinkinase D2 (PRKD2, Ser(P)-706) LPA-abhängig aktiviert. Darüber hinaus spricht das transiente Phosphorylierungsprofil der Serin Threonin Proteinkinase 10 (STK10, Thr(P)-14) für eine strikte zeitliche Regulation dieser Schlüsselenzyme zellulärer Phosphorylierungskaskaden. Die späte und starke Phosphorylierung der Protein Kinase SIK1 (Ser(P)-578), mit einer maximalen Phosphorylierung nach 90 Minuten, steht stellvertretend für die, durch Effektor-Modulation gekennzeichnete, späte Phase der Signaltransduktion. SIK1 ist an der Regulation der transkriptionellen Aktivität des *Cyclic AMP-responsive element-binding protein 1* (CREB), durch Phosphorylierung und Inhibition der Co-Aktivatoren *CREB-regulated transcription coactivator 1-3* (CRTC1-3), und des G<sub>2</sub>/M-Übergangs beteiligt (Katoh, Takemori *et al.*, 2006).

Die hierarchische Gruppierung der Phosphorylierungsprofile weiterer Transkriptions-(Co-)Faktoren offenbarte eine teils sehr ähnliche Regulation räumlich benachbarter Phosphorylierungsstellen. So folgte die Phosphorylierung der Aminosäuren Ser-90 und Ser-92 des *Butyrate response factors* (ZFP36L1) dem gleichen kinetischen Profil und könnte daher ein Hinweis auf die konzertierte Regulation direkt benachbarter Phosphorylierungsstellen sein. Der gleiche Effekt konnte auch für die Abnahme der Abundanz einfach phosphorylierter Peptide des *Tripartite motif-containing protein 29* (TRIM29) beobachtet werden. Die nahezu identischen Profile der Phosphorylierungsstellen Ser(P)-104 und Tyr(P)-106 könnten unter anderem durch die Aktivierung einer Proteinphosphatase mit zweifacher Spezifität erklärt werden. Besonders interessant ist auch die prominente Phosphorylierung des Retinsäurerezeptors

(RXRA) an Ser-21 nach 30 Minuten. Diese Beobachtung könnte auf eine bislang nicht beschriebene Verbindung zwischen LPA-induzierten und nukleären Lipidrezeptor-vermittelten Signalnetzwerken hindeuten.

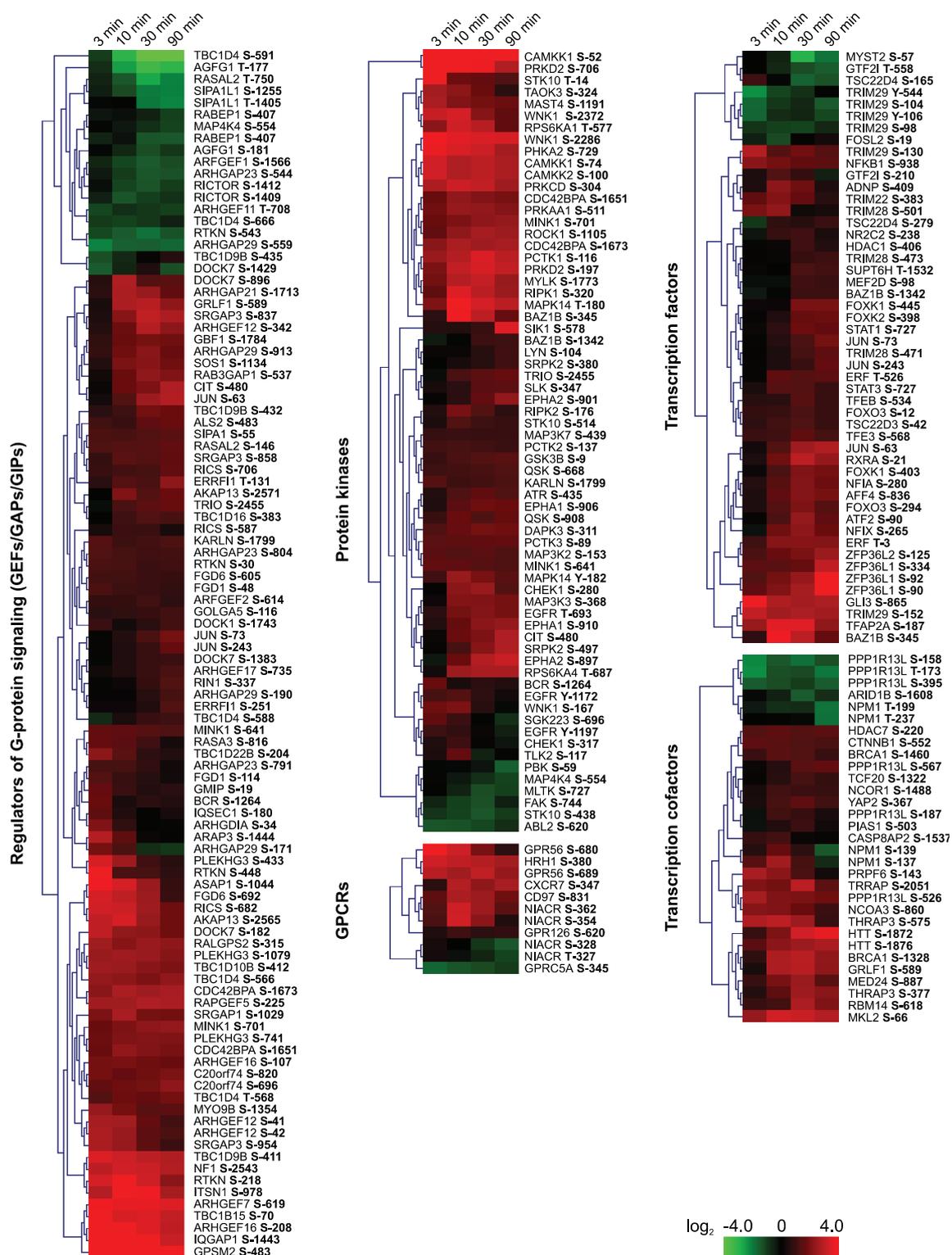


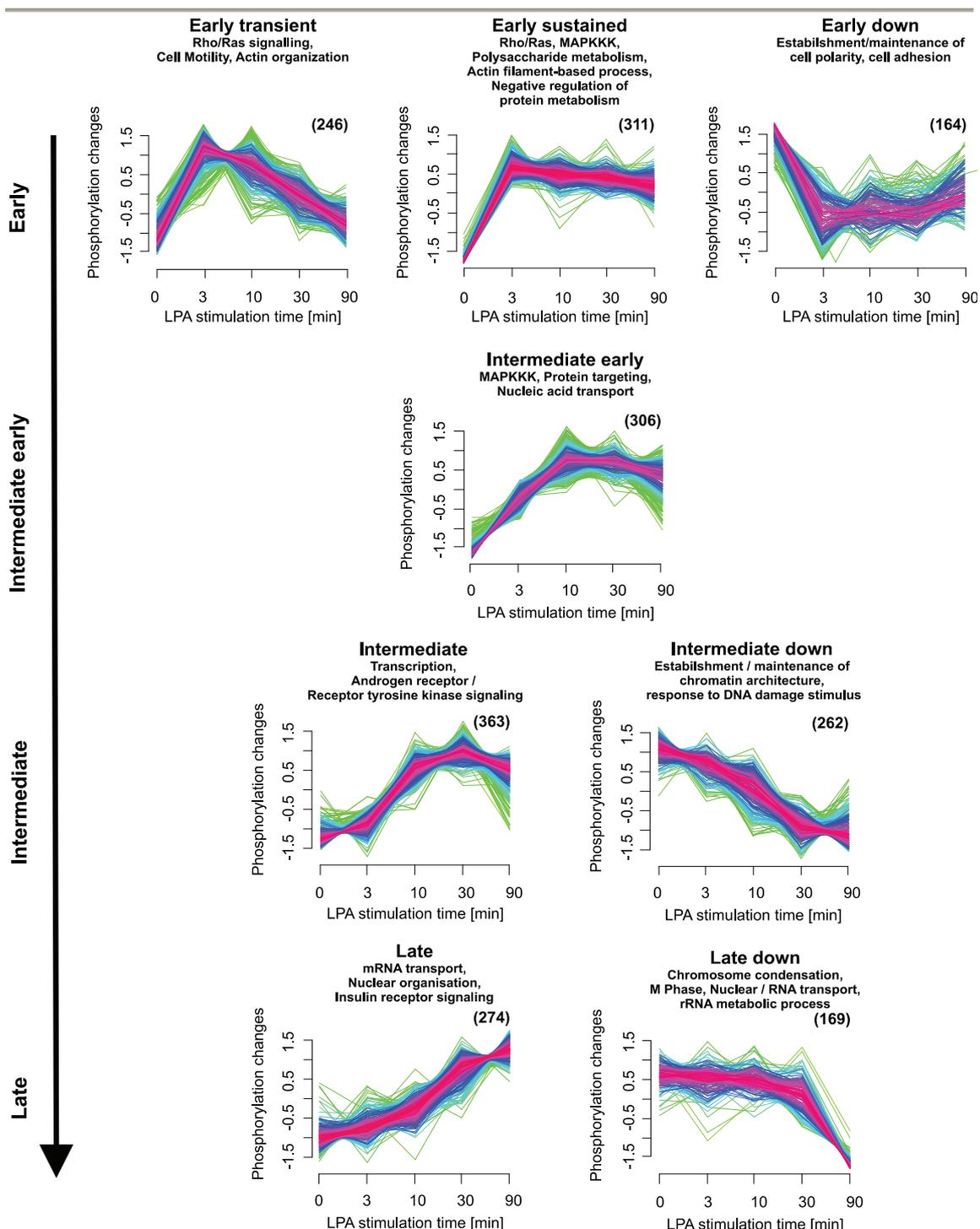
Abbildung 3.4-4 Zeitaufgelöste Phosphorylierungsprofile ausgewählter Proteine. Die Abbildung zeigt die hierarchisch gruppierten, zeitlichen Phosphorylierungsprofile von Transkriptions-(Co-)Faktoren, Proteinkinasen, G-Protein gekoppelten Rezeptoren und G-Protein gekoppelten Regulatoren im logarithmischen Maßstab. Die dargestellten Phosphorylierungsstellen wurden ausschließlich auf Grundlage einfach phosphorylierter Peptide quantifiziert.

### 3.4.4 Zeitreihen-Cluster

Für die umfassende Analyse der durch LPA-induzierten Phosphorylierungskinetiken wurden alle regulierten Phosphorylierungsstellen mit Hilfe des von Olsen *et al.* (Olsen, Blagoev *et al.*, 2006) beschriebenen *fuzzy-c means* Algorithmus gruppiert. Hierfür wurden die zeitlichen Profile jeder Phosphorylierungsstelle zunächst in den logarithmischen Zahlenraum überführt und anschließend auf einen Mittelwert von 0 und eine Standardabweichung von 1 normalisiert. Dieses Normalisierungsverfahren stellt die Vergleichbarkeit individueller Profile sicher. Die Eingabeparameter ( $m$ ,  $c$ ) des *fuzzy-c means clustering* wurden iterativ optimiert und führten zu einer Gruppierung der Profile in acht Cluster. Die 1.500 induzierten Phosphorylierungsstellen wurden durch den unbeaufsichtigten Algorithmus fünf Clustern mit Populationen von 246 bis 363 Phosphorylierungsstellen zugeordnet (Abbildung 3.4-5). Die etwa 500 negativ regulierten Phosphorylierungsstellen wurden hingegen auf drei Cluster mit jeweils nur 162 bis 262 Profilen aufgeteilt. Bemerkenswerterweise bildeten die mit diesem nicht zielgerichteten Algorithmus generierten Konsensusprofile die zeitlichen Phasen biologischer Signalprozessierung, von der Initiation bis zur Modulation terminaler Effektoren, sehr gut ab. Diesen Eindruck bestätigte auch die statistische Anreicherungsanalyse für biologische Prozesse entsprechend der *Gene Ontology* Annotation. Für jedes Cluster wurden die signifikant ( $p \leq 0,05$ ) überrepräsentierten Kategorien, bezogen auf die Gesamtheit der detektierten Phosphoproteine, identifiziert. So fanden sich beispielsweise Proteine des Rho/Ras-Signaling vor allem in schnell responsiven, positiv modulierten Clustern.

Eine interessante Beobachtung ergibt sich auch für die Regulation migratorischer Proteine. Während die Phosphorylierung von Proteinen mit funktioneller Bedeutung für die Zellmotilität einem transienten Zeitverlauf, mit maximaler Induktion nach 3-10 Minuten folgte, wurde die relative Phosphorylierung von Adhäsionsproteinen schnell reduziert. Die Initiatoren der MAP-Kinasen Kaskaden (MAPKKK) waren sowohl im *early-sustained*, als auch im *intermediate-early* Cluster überrepräsentiert. Diese Beobachtung verdeutlicht die Bedeutung dieses, schnell und nachhaltig induzierten Signalweges für die zelluläre LPA-Antwort. Zusätzlich zur Regulation von Signaltransduktionskomponenten waren auch die zu zielgerichteten Transportprozessen gehörende Phosphoproteine im *intermediate-early* Cluster angereichert.

## Ergebnisse



**Abbildung 3.4-5 Gruppierung regulierter Phosphorylierungsprofile.\*** Die regulierten Phosphorylierungsprofile wurden auf einen Mittelwert von 0 und eine Standardabweichung von 1 normalisiert und mittels des *fuzzy c-means* Algorithmus in acht Cluster gruppiert. Die Cluster wurden nach ihrem zeitlichen Verlauf und der relativen Veränderung der Phosphorylierungsabundanz sortiert. Anschließend wurden für jedes Cluster die signifikant überrepräsentierten *Gene Ontology - biological process* Kategorien, bezogen auf alle detektierten Phosphoproteine, bestimmt. Die Anzahl der zugeordneten Phosphorylierungsstellen ist für jedes Cluster in Klammern angegeben. \* In Zusammenarbeit mit Nina Mäusbacher.

Proteine von Effektor-Prozessen, wie beispielsweise dem Androgenrezeptor-Signaling oder der Transkriptionsregulation, wurden gemäß einem verzögerten Zeitprofil (*intermediate*) phosphoryliert. Dieses ist durch geringe Phosphorylierungsänderung nach 3 Minuten und einem Phosphorylierungsmaximum nach 30 Minuten gekennzeichnet.

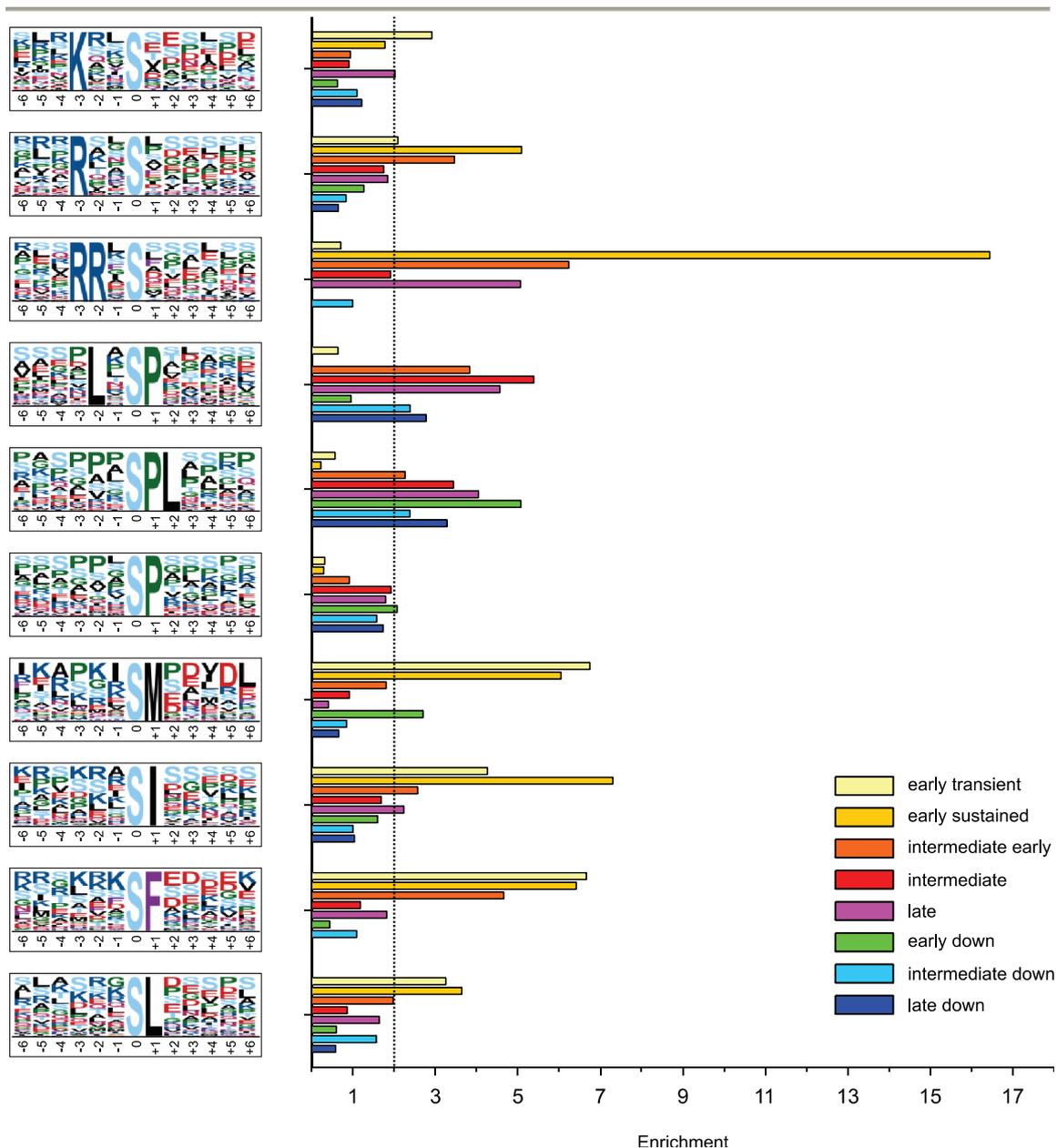
Interessanterweise gehörten die Mediatoren der mRNA-Transportprozesse und Kernorganisation zu den spät phosphorylierten Proteinen. Die ebenfalls späte Phosphorylierung von Komponenten des Insulinrezeptor-Signaling, wie dem Insulinrezeptor Substrat 2 (IRS2) oder dem Insulinrezeptor Substrat p53/p58, könnte auf eine LPA-abhängige Modulation dieses Signalweges hindeuten.

Im Gegensatz hierzu wurde die Phosphorylierung von Proteinen, die an der Chromosomenkondensation, der M-Phase und dem rRNA-Metabolismus beteiligt sind, gemäß eines späten Zeitprofils verringert.

### 3.4.5 Phosphorylierte Sequenzmotive

Proteinkinase-medierte Phosphorylierungsereignisse werden, wie auch Dephosphorylierungen durch Proteinphosphatasen, häufig durch kurze Substratsequenzmotive dirigiert. Aus diesem Grund kann die Kenntnis präferentiell phosphorylierter Motive mitunter bei der Identifikation potentiell für die beobachteten Substratphosphorylierungsmuster verantwortlicher Proteinkinasen helfen. In dieser Analyse wurde der Motif-X Algorithmus (Schwartz and Gygi, 2005) genutzt, um aus den LPA-regulierten Phosphorylierungsstellen statistisch signifikante Sequenzmotive, bezogen auf die Gesamtheit aller Phosphorylierungsstellen, zu extrahieren. Auf diese Weise konnten zehn LPA-abhängige, Serin-phosphorylierte Konsensus-Motive ermittelt werden, wohingegen die separate Analyse der Threonin- und Tyrosin-phosphorylierten Sequenzen keine zusätzlichen Motive ergab (Abbildung 3.4-6 linke Seite). Unter diesen überrepräsentierten Motiven fanden sich, durch basische Aminosäuren in Position -3 charakterisierte, bekannte Substratmotive der Proteinkinasen A und C (KXXpS, RXXpS, RRXpS). Ebenfalls konnten, durch ERK1/2, Glykogensynthase Kinase 3 (GSK3) und die *Cell division protein kinase 5* (CDK5) erkannte, Prolin-dirigierte Phosphorylierungsmotive (pSP, pSPL, LXpSP) identifiziert werden. Zusätzlich waren, bislang nicht beschriebene Motive mit apolaren, hydrophoben Aminosäuren in der Position +1 (pSM, pSI, pSF, pSL) unter den LPA-regulierten Phosphorylierungsstellen überrepräsentiert. Interessanterweise traten die Motive mit unterschiedlicher Häufigkeit in den Konsensus-Zeitprofilen auf (Abbildung 3.4-6 rechte Seite).

## Ergebnisse



**Abbildung 3.4-6 LPA-regulierte Phosphorylierungsmotive in SCC-9 Zellen.** Sequenzabschnitte von 13 Aminosäuren um LPA-regulierte Phosphorylierungsstellen wurden mittels Motif-X Algorithmus auf signifikante ( $p \leq 0,000001$ ) Motive untersucht (links). Zusätzlich ist die Anreicherung der phosphorylierten Motive in den jeweiligen Clustern dargestellt (rechts). Als Hintergrund für die statistische Analyse dienten alle identifizierten Phosphorylierungsstellen. Die Größe der Buchstaben gibt die relative Häufigkeit der entsprechenden Aminosäure an der jeweiligen Position an.

Die hydrophoben Motive waren sowohl in dem *transient early*, als auch in dem *early sustained* Cluster, drei- bis siebenfach angereichert. Das **pSF**-Motif, mit der sterisch voluminösen, aromatischen Seitenkette, war darüber hinaus auch im *intermediate early* Cluster fünfmal angereichert. Die Arginin/Lysin-gerichtete Serin-Phosphorylierung war in allen Phasen der LPA-abhängigen Signaltransduktion präsent, wobei die stärkste Anreicherung in den induzierten Clustern für das spezifischere **RRXpS**-Motif zu beobachten war. Im Gegensatz dazu waren Prolin-dirigierte Phosphorylierungen in den frühen Clustern unterrepräsentiert und verstärkt in intermediären bis späten Clustern zu

## Ergebnisse

finden. In Übereinstimmung mit den basischen Motiven fiel auch in diesem Fall der Anreicherungsfaktor für die spezifischeren Motive (pSPL, LXpSP) größer aus. Erstaunlicherweise waren diese Motive jedoch als Einzige auch in negativ regulierten Clustern angereichert, woraus sich auf eine eventuelle Phosphatase-Spezifität für diese Motive schließen lässt.

**Tabelle 3.4-1 Ausgewählte, LPA-regulierte Phosphorylierungsstellen in SCC-9 Zellen**

Proteinname	IPI	Position	Sequenz	3 min	10 min	30 min	90 min	Effekt*
40S ribosomal protein S6	IPI00021840	236	KRRRLSSLRASTS	1.35	2.01	0.51	0.16	Induziert Interaktion mit RNA, Translations Pre-initiationskomplex (Roux, Shahbazian <i>et al.</i> , 2007)
6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3	IPI00645153	461	PLMRRNSVTPLAS	2.29	6.23	8.35	5.33	Enzymatische Aktivierung (Bando, Atsumi <i>et al.</i> , 2005)
6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 2	IPI00305589	483	RRPRNYSVGSRPL	2.23	2.46	3.49	2.55	Induziert 14-3-3 Interaktion, stimuliert die Glykolyse (Pozuelo Rubio, Peggie <i>et al.</i> , 2003)
Adenomatous polyposis coli protein	IPI00012391	1360	FSSGAKSPSKSGA	0.91	0.60	0.47	0.69	Phosphorylierung durch Cyclin A/cdk2, Zellzyklusregulation, Verankerung der mitotischen Spindel am Zellcortex (Beamish, de Boer <i>et al.</i> , 2009)
Bcl2 antagonist of cell death	IPI00024291	118	RELRRMSDEFVDS	1.86	3.07	9.93	15.12	anti-apoptotisch (Sastry, Karpova <i>et al.</i> , 2006)
Butyrate response factor 1	IPI00016635	92	FRDRSFSEGGERL	2.64	3.77	5.16	18.37	Reguliert die Assoziation mit 14-3-3 beta (Benjamin, Schmidlin <i>et al.</i> , 2006), erhöht die RNA-Stabilität (Maitra, Chou <i>et al.</i> , 2008)
CAD protein	IPI00301263	1406	AGGRRLSSFVTKG	7.99	8.06	13.13	12.19	Inhibiert Phosphorylierung an Thr-456 und Aktivierung durch MAP-Kinasen (Kotsis, Masko <i>et al.</i> , 2007)
Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 1	IPI00792960	74	LSARKLSLQERPA	9.75	6.96	7.90	6.58	Enzymatische Aktivierung (Kitani, Okuno <i>et al.</i> , 2001)
Caldesmon	IPI00333771	528	SVDKVTSPTKV__	1.05	0.98	1.36	2.11	Zytoskeletale Reorganization (Auflösung von Aktin-Stressfasern, postmitotische Ausbreitung) (Kordowska, Hetrick <i>et al.</i> , 2006), beeinflusst die zelluläre Lokalisation
Catenin beta-1	IPI00017292	552	DTQRRTSMGGTQQ	2.95	2.79	2.55	2.42	Beeinflusst die zelluläre Lokalisation, reguliert Transkription und Zellmotilität
CD44 antigen	IPI00305064	706	NGEASKSQEMVHL	0.89	0.70	0.48	0.54	Reguliert die molekulare Assoziation mit MMP9 und Zellmigration auf Hyaluron-Substrat (Peck and Isacke, 1998; Lewis, Townsend <i>et al.</i> , 2001; Desai, Ma <i>et al.</i> , 2009)
Neural cell expressed, developmentally down-regulated gene 1 (NEDD1)	IPI00791509	404	KNQDFSSFDDTGK	6.34	3.47	0.99	0.81	Reguliert die Zellteilung: Lokalisation des <i>gamma-tubulin ring complex</i> an das Zentrosom (Zhang, Chen <i>et al.</i> , 2009)
Desmoplakin	IPI00013933	2849	SGSRRGSFDATGN	2.11	1.78	1.51	1.68	Inhibiert die molekulare Assoziation mit intermediären Keratinfilamenten (Stappenbeck, Lamb <i>et al.</i> , 1994)
DNA topoisomerase 2-alpha	IPI00178667	1297	MAEVLPSPRGQRV	1.16	0.92	0.95	0.42	Beeinflusst die intrazelluläre Lokalisation
Endosulfine alpha	IPI00410177	125	LPQRKSSLVTSKL	12.90	6.73	9.54	7.72	Beeinflusst die Konformation und reguliert die molekulare Assoziation (Boettcher, Hartman <i>et al.</i> , 2008)
Epidermal growth factor receptor	IPI00018274	1197	TAENAEYLRVAPQ	2.13	1.79	1.13	0.73	Enzymatische Aktivierung, Rezeptor Internalisierung, reguliert die molekulare Assoziation und das Zellwachstum (Sorkin, Waters <i>et al.</i> , 1991)
Epidermal growth factor receptor	IPI00018274	1172	SLDNPDYQQDFFP	2.34	2.65	1.74	1.28	Enzymatische Aktivierung, Rezeptor Internalisierung,

## Ergebnisse

Epidermal growth factor receptor	IPI00018274	693	ELVEPLTPSGEAP	1.65	3.74	4.29	3.79	reguliert die molekulare Assoziation und das Zellwachstum Rezeptor Internalisierung, reguliert die molekulare Assoziation (Winograd-Katz and Levitzki, 2006)
ETS domain-containing transcription factor ERF	IPI00032936	526	EAGGPLTPRRVSS	1.08	3.05	2.67	2.95	Inhibiert die transkriptionelle Repression (Sgouras, Athanasiou <i>et al.</i> , 1995), essentiell für G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> Transition (Le Gallic, Sgouras <i>et al.</i> , 1999)
Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1	IPI00002569	70	NSPVTKTPPRDLP	1.09	1.12	1.79	2.07	Dissoziation des Repressors vom eIF4E Komplex, Initiation der Translation (Lekmine, Sassano <i>et al.</i> , 2004)
Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1	IPI00002569	65	LMECRNSPVTKTP	1.28	2.07	2.32	1.87	Dissoziation des Repressors vom eIF4E Komplex, Initiation der Translation (Heesom, Gampel <i>et al.</i> , 2001)
Filamin-A	IPI00333541	2152	RRRRAPSVANVGS	1.96	2.74	3.72	3.76	Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts (Woo, Ohta <i>et al.</i> , 2004)
Forkhead box protein O3	IPI00012856	294	LSKWPGSPTSRS	1.44	2.69	4.02	2.71	Induziert die Interaktion mit und die Degradation durch MDM2, reguliert das Zellwachstum (Yang, Zong <i>et al.</i> , 2008)
Glycogen synthase kinase-3 beta	IPI00216190	9	GRPRTTFAESCK	1.97	2.44	2.63	2.76	Enzymatische Inhibition (Stambolic and Woodgett, 1994), Proteindegradation, zytoskelettale Reorganisation, reguliert Transkription, Zellwachstum und Apoptose
GRB2-associated-binding protein 1	IPI00410383	657	GDKQVEYLDLDD	11.84	9.45	2.53	2.59	Reguliert molekulare Assoziation und den Zellzyklus
Heat shock protein beta-1	IPI00025512	78	AYSRALSRLSSG	3.79	8.60	8.53	5.25	Aktivierung; reguliert die Sumolierung von HSF1, Transkription, Zellwachstum, Zellzyklus und Apoptose
Heat shock protein beta-1	IPI00025512	15	SLLRGPWDPPFRD	2.53	5.56	7.40	5.31	Reguliert die Sumolierung von HSF1, Transkription, Zellwachstum, Zellzyklus und Apoptose
Heat shock protein beta-1	IPI00025512	82	ALSRLSSGVSEI	3.58	5.89	5.62	4.67	Enzymatische Aktivierung, reguliert die molekulare Assoziation, Sumolierung, Ubiquitinierung, zytoskelettale Reorganisation, Transkription, Zellwachstum und Apoptose
Histone acetyltransferase MYST2	IPI00180764	57	QSSQDSSPVRNLQ	0.99	0.71	0.13	0.28	Reguliert den Zellzyklus
Insulin receptor substrate 1	IPI00019471	636	GDYMPMSPKSVSA	2.22	5.95	6.57	6.38	Beeinflusst die intrazelluläre Lokalisation
Insulin receptor substrate 1	IPI00019471	629	PSGRKSGDYMPM	4.18	6.55	8.50	5.77	Reguliert die molekulare Assoziation
Junctional adhesion molecule A	IPI00001754	284	VIYSQPSARSEGE	3.53	1.59	1.44	1.01	Beeinflusst die intrazelluläre Lokalisation
Keratin, type II cytoskeletal 8	IPI00554648	432	AYGGLTSPGLSYS	1.03	1.48	1.92	2.19	Beeinflusst die intrazelluläre Lokalisation, zytoskelettale Reorganisation, reguliert die Zellmotilität
Lamin-A/C	IPI00021405	652	YLLGNSSPRTQSP	1.30	2.39	3.44	3.56	Aktivierung des nukleären Lamin- Abbaus
Lamin-A/C	IPI00021405	404	SRGRASSHSSQTQ	1.19	1.22	2.06	2.95	Beeinflusst die intrazelluläre Lokalisation
Mitogen-activated protein kinase 14	IPI00002857	182	DDEMTGYVATR	2.21	5.31	3.84	2.79	Enzymatische Aktivierung, induziert Interaktion mit p38-alpha, reguliert Zelladhäsion, Motilität, Zellzyklus und Apoptose
Mitogen-activated protein kinase 14	IPI00002857	180	HTDDEMTGYVATR	4.10	16.03	10.16	7.87	Enzymatische Aktivierung, induziert Interaktion mit FYN, NCK 1 und p38-alpha, reguliert Zelladhäsion, Motilität, Zellzyklus und Apoptose
Myelin protein zero-like protein 1	IPI00022558	263	KSESVVYADIRKN	1.27	1.50	2.03	1.90	Induziert Interaktion mit SHP 2 und reguliert Zelladhäsion
Nuclear receptor coactivator 3	IPI00748532	860	PYNRAVSLDSPVS	4.42	4.16	3.30	2.05	Inhibiert Interaktion mit ER-alpha
Nucleophosmin	IPI00549248	237	QEKTPTKPKGPSS	1.02	0.97	0.94	0.29	Inhibiert Interaction mit RNA, reguliert den Zellzyklus
Nucleophosmin	IPI00549248	199	KKSIRDTPAKNAQ	0.80	0.59	0.62	0.28	Inhibition, reguliert molekulare Assoziation und Transkription

## Ergebnisse

PEA15 protein	IPI00643342	137	DIIRQPSEEEIHK	3.79	3.36	2.62	1.35	Proteinstabilisation, reguliert Apoptose
Plastin-2	IPI00010471	5	_MARGSVSDEEM	3.87	12.41	24.13	14.15	Reguliert Zelladhäsion und molekulare Assoziation
Polypyrimidine tract binding protein 1	IPI00183626	16	VGTKRGSDELST	1.00	1.18	1.71	2.63	Induziert Translokation ins Zytosol (Xie, Lee et al., 2003)
Programmed cell death protein 4	IPI00290110	67	RRLRNKSSRDSGR	3.09	9.82	14.45	5.60	Induziert molekulare Assoziation mit BTRC, reguliert Zellzyklus, Zellwachstum, Translation und Proteindegradation
Proline-rich AKT1 substrate 1	IPI00306195	266	PRPRLNTSDFQKL	1.46	2.01	2.09	2.05	Verringert den inhibitorischen Effekt auf mTORC1, induziert Assoziation mit 14-3-3- beta
Proline-rich AKT1 substrate 1	IPI00306195	203	TQQYAKSLPVSVP	1.33	1.83	2.02	1.98	Reguliert molekulare Assoziation
Protein FAM59A	IPI00171499	453	GKSELPEEELWLE	0.65	2.56	3.98	1.58	Induziert Assoziation und enzymatische Aktivierung von GRB 2 und SHP 2, reguliert das Zellwachstum
Putative uncharacterized protein DKFZp686P03159	IPI00418169	30	EILCKLSLEGDHS	2.20	2.25	2.13	1.50	Beeinflusst intrazelluläre Lokalisation und molekulare Assoziation
Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial	IPI00306301	270	RYMGTSVERAAA	0.18	0.37	0.58	0.76	Inhibition
Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1	IPI00009342	1443	KMKKSKSVKEDSN	23.32	22.64	15.97	8.95	Beeinflusst die Konformation, reguliert die molekulare Assoziation und zytoskelettale Reorganisation
Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 2	IPI00021917	176	WRMMSLSQSRSSK	1.50	3.86	2.61	1.71	Enzymatische Aktivierung
Ribosomal protein S6 kinase alpha-4	IPI00022536	687	SSPLRTPDVLES	1.27	5.61	6.35	6.56	Enzymatische Aktivierung
Serine/threonine-protein kinase Chk1	IPI00023664	317	NVKYSSSQPEPRT	1.44	2.16	1.08	0.84	Enzymatische Aktivierung, reguliert molekulare Assoziation und Zellzyklus
Serine/threonine-protein kinase Chk1	IPI00023664	280	KRPRVTSGGVSES	0.98	4.60	5.31	2.60	Enzymatische Inhibition, beeinflusst die intrazelluläre Lokalisation und reguliert den Zellzyklus
Serine/threonine-protein kinase D2	IPI00009334	706	RIIGKSFRRSVV	34.17	30.76	13.41	7.06	Enzymatische Aktivierung
Serine/threonine-protein kinase TAO3	IPI00410485	324	NGPLNESQEDEED	6.12	4.72	3.28	1.61	Aktivierung, reguliert den Zellzyklus
Signal transducer and activator of transcription 1-alpha/beta	IPI00030781	727	DNLLPMSPEEFDE	1.18	1.71	3.47	3.13	Aktivierung, induziert die Interaktion mit PIAS1, reguliert Transkription, Sumoylierung, Zellwachstum und Apoptose
Signal transducer and activator of transcription 3	IPI00784414	727	TIDLPMSPRTLDS	1.36	2.70	2.67	1.99	Aktivierung, induziert die Interaktion mit der DNA und p300, reguliert Transkription, Differenzierung und Zellwachstum
Sodium/hydrogen exchanger 1	IPI00020060	703	SRARIGSDPLAYE	2.28	5.47	5.69	5.05	Aktivierung, reguliert Transkription
Sodium/hydrogen exchanger 1	IPI00020060	796	RIQRCLSDPGPHP	4.41	7.12	6.67	4.18	Beeinflusst die molekulare Assoziation
Solute carrier family 12 member 2	IPI00022649	217	RTFGHNTMDAVPR	2.29	2.43	1.45	0.94	Aktivierung
Stathmin	IPI00479997	25	AFELILSPRSKES	2.41	8.48	8.09	4.49	Inhibition, reguliert die zytoskelettale Reorganisation, molekulare Assoziation und den Zellzyklus
STE20-like serine/threonine-protein kinase	IPI00022827	347	SDLSIASSEEDKL	1.32	1.65	2.89	2.85	Enzymatische Inhibition
Transcription factor AP-1	IPI00008965	63	NSDLLTSPDVGLL	1.28	2.61	5.74	7.16	Aktivierung, Proteinstabilisierung, reguliert Transkription, molekulare Assoziation, Zellwachstum und Apoptose
Transcription factor AP-1	IPI00008965	73	GLLKLASPELERL	1.07	1.52	2.45	3.79	Aktivierung, Proteinstabilisierung, reguliert Transkription, molekulare Assoziation und Zellwachstum
Transcription factor AP-1	IPI00008965	243	GETPPLSPIDMES	1.11	1.44	1.99	3.18	Inhibition, reguliert Transkription, molekulare Assoziation

\* Funktionelle Effekte nach PhosphoSitePlus®

### 3.5 QUANTITATIVE CHARAKTERISIERUNG ZELLULÄRER MARIMASTAT INTERAKTOREN

Bei der LPA-vermittelten Signaltransduktion in den untersuchten Zellsystemen (A498, SCC-9) kommt den Metalloproteasen der ADAM-Familie eine herausgehobene Bedeutung zu. Wie eingangs erwähnt katalysieren diese Proteasen die stimulationsabhängige Spaltung membrangebundener Pro-Wachstumsfaktoren (HB-EGF, Amphiregulin) und vermitteln somit die Transaktivierung des EGF-Rezeptors.

Der Metalloproteaseinhibitor Marimastat (Abbildung 3.5-1 A) wurde nach den negativen Ergebnissen der klinischen Studien zur pharmakologischen Verwendbarkeit in der zellulären Signaltransduktionsforschung, insbesondere zur Analyse des EGFR Transaktivierungsprozesses, eingesetzt. Trotz der breiten Verwendung zu Forschungszwecken standen bislang keine Substratbindungsdaten für diesen Inhibitor im zellulären Milieu zur Verfügung. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher eine massenspektrometrische Methode zur quantitativen Charakterisierung von Marimastat-Interaktoren in Zellextrakten etabliert. Diese stellt eine Erweiterung des in unserer Arbeitsgruppe für die Substratprofilierung von Proteinkinaseinhibitoren entwickelten Verfahrens dar (Sharma, Weber *et al.*, 2009). Durch dieses Verfahren wird die Messung der Bindungskonstanten erstmals anhand von nativen, endogen exprimierten Proteinkonzentrationen durchgeführt. Somit können auch eventuelle zellspezifische post-translationale Modifikationen und Protein-Protein Interaktionen miterfasst werden.

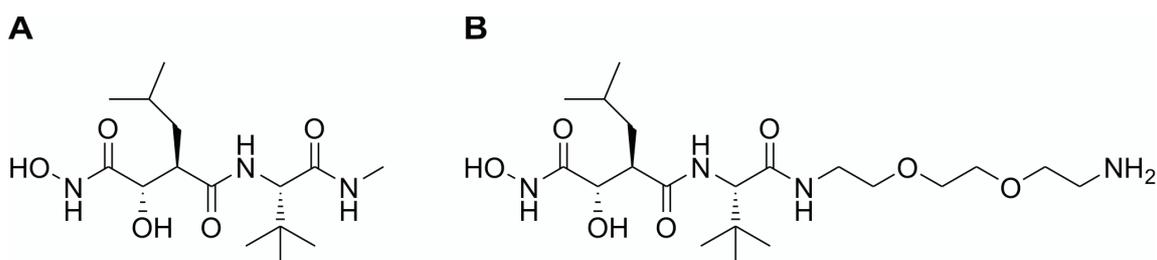


Abbildung 3.5-1 Stereochemische Strukturen des Metalloproteaseinhibitors Marimastat (A) und des immobilisierbaren Derivats (B).

Es wurde ein von, mit einer Linkergruppe versehenes, Marimastat-Derivat (Ma-Der.) (Abbildung 3.5-1 B) synthetisiert, welches über ein vergleichbares Substrat-Bindungsverhalten verfügt (Jenssen, Sewald *et al.*, 2004). Dieses Derivat wurde mittels aktiviertem N-hydroxy-succinimids (NHS) an eine Sepharosematrix gekoppelt.

### 3.5.1 Immobilisierung des Metalloproteaseinhibitors

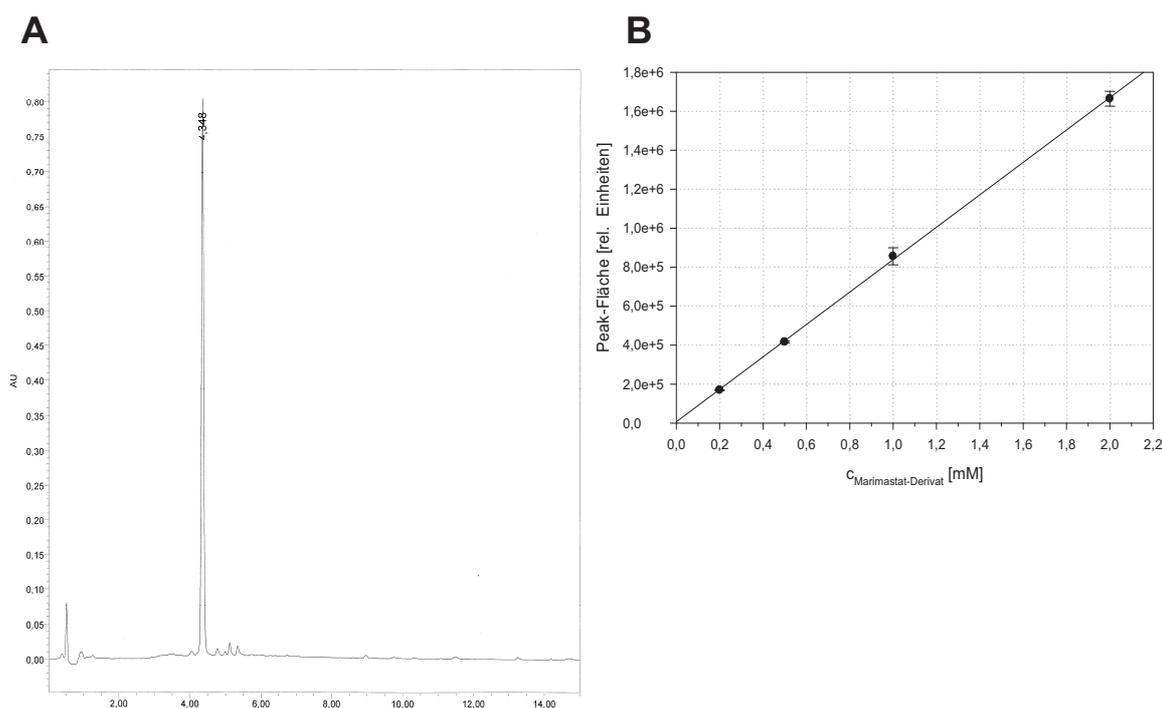


Abbildung 3.5-2 HPLC Chromatogramm eines 2 mM Marimastat-Derivat Kupplungsansatzes (links) und einer Marimastat-Derivat Konzentrationsreihe (rechts).

Die erzielte Immobilisierungsdichte wurde durch flüssigkeitschromatografische Bestimmung der nicht-immobilisierten, löslichen Ma-Der.-Konzentration im Kupplungsansatz nach Ablauf der Kopplungsreaktion bestimmt. Die Auftrennung der Kupplungsansätze erfolgte auf einer 125/4 Nucleosil 100-5 C8 Säule mittels eines 13-minütigen Gradienten. Abbildung 3.5-2 (A) zeigt ein exemplarisches HPLC-Chromatogramm für einen wässrigen Kupplungsansatz mit einer Ma.-Der.-Konzentration von 2 mM. Zur Bestimmung der freien Ma.-Der.-Konzentration wurde eine Konzentrationsreihe aus vier Replikatmessungen erstellt und durch lineare Regression interpoliert (Abbildung 3.5-2, B). Die Regressionsgerade mit einem Bestimmtheitsmaß von  $r^2 = 0,998$  folgt der Funktion:  $y = 832021x + 6842$ . Aus der, nach 240-minütiger Inkubation im Überstand verbliebenen, Ma.-Der.-Konzentration von  $3,77 \text{ mM} \pm 0,23 \text{ mM}$  ergibt sich bei einem 10 mM Kupplungsansatz bestehend aus 1 ml NHS-aktivierter Sepharosematrix und 1ml Ma.-Der.-Lösung eine Immobilisierungsdichte von  $12,47 \text{ mM}$ . Zur Bestimmung des unspezifisch gebundenen Anteils wurde eine Kontrollinkubation mit nicht-funktionalisierter Sepharosematrix durchgeführt. Für die unspezifische Adsorption von Ma.-Der. an Sepharose ergab sich eine Immobilisierungsdichte von  $3,72 \text{ mM}$ . Damit beträgt die Immobilisierungsdichte aufgrund kovalenter Kopplung des Ma.-Der. an NHS-aktivierte Sepharosematrix

8,75 mM. Dieser Wert wurde für die nachfolgenden Berechnungen der Substratbindungskonstanten verwendet.

### 3.5.2 Methode zur quantitativen Proteaseinhibitorprofilierung

Zur Identifikation spezifischer Marimastat-Interaktoren wurden A498 Zellen entsprechend der SILAC-Methode metabolisch mit drei Kombinationen von Arginin/Lysin-Isotopenvarianten markiert und gleiche Mengen der Zellysate mit Marimastat-Affinitätsmatrix oder Kontrollmatrix inkubiert (Abbildung 3.5-3, A). Nach den entsprechenden Waschschrritten wurden die gebundenen Proteine eluiert und die Eluate vereinigt. Die spezifisch bindenden Proteine wurden aus einer Scatterplot Analyse der relativen Bindung zwischen der Bindung an die Affinitätsmatrix und die Kontrollmatrix (Spezifität) in biologischen Replikaten mit invertierten SILAC-Markierungen ermittelt (Abbildung 3.5-4), wobei eine Spezifität der Interaktion von  $> 4$  in beiden Experimenten gefordert wurde. Um die scheinbaren (apparenten) Dissoziationskonstanten ( $K_d$ -Werte) der Protein-Inhibitor Komplexe zu bestimmen, wurde der Überstand aus der ersten Inkubation des 0/0-markierten Lysates, welcher die ungebundene Proteinfraction enthält, anschließend einer zweiten Inkubation mit der gleichen Menge neuer Affinitätsmatrix unterzogen.

Das Verhältnis ( $r$ ) zwischen der in der ersten und der in der zweiten Inkubation gebundenen Proteinmenge ist eine direkte Messgröße für den freien, nicht gebundenen Anteil des jeweilig betrachteten, interagierenden Proteins. Reziprok ist der gebundene Anteil durch  $1 - r$  definiert.

Mittels Kompetitionsexperimenten wurden dann die erforderlichen Marimastat-Konzentrationen für halbmaximale Bindung ( $EC_{50}$ ) bestimmt (Abbildung 3.5-3, B). Hierzu wurden zwei SILAC-Experimente über eine gemeinsame Referenzbedingung (0 mM Marimastat) miteinander gekoppelt, so dass Bindungskurven für vier Inhibitorkonzentrationen berechnet werden konnten. Da die eingesetzte Konzentration des immobilisierten Marimastat-Derivates durch HPLC-Analyse der Kupplungsreaktion bekannt war, konnten zudem die komplexspezifischen Dissoziationskonstanten ( $K_i$ ) für Marimastat-Interaktoren unter physiologischen Bedingungen berechnet werden (Abbildung 3.5-3, A).

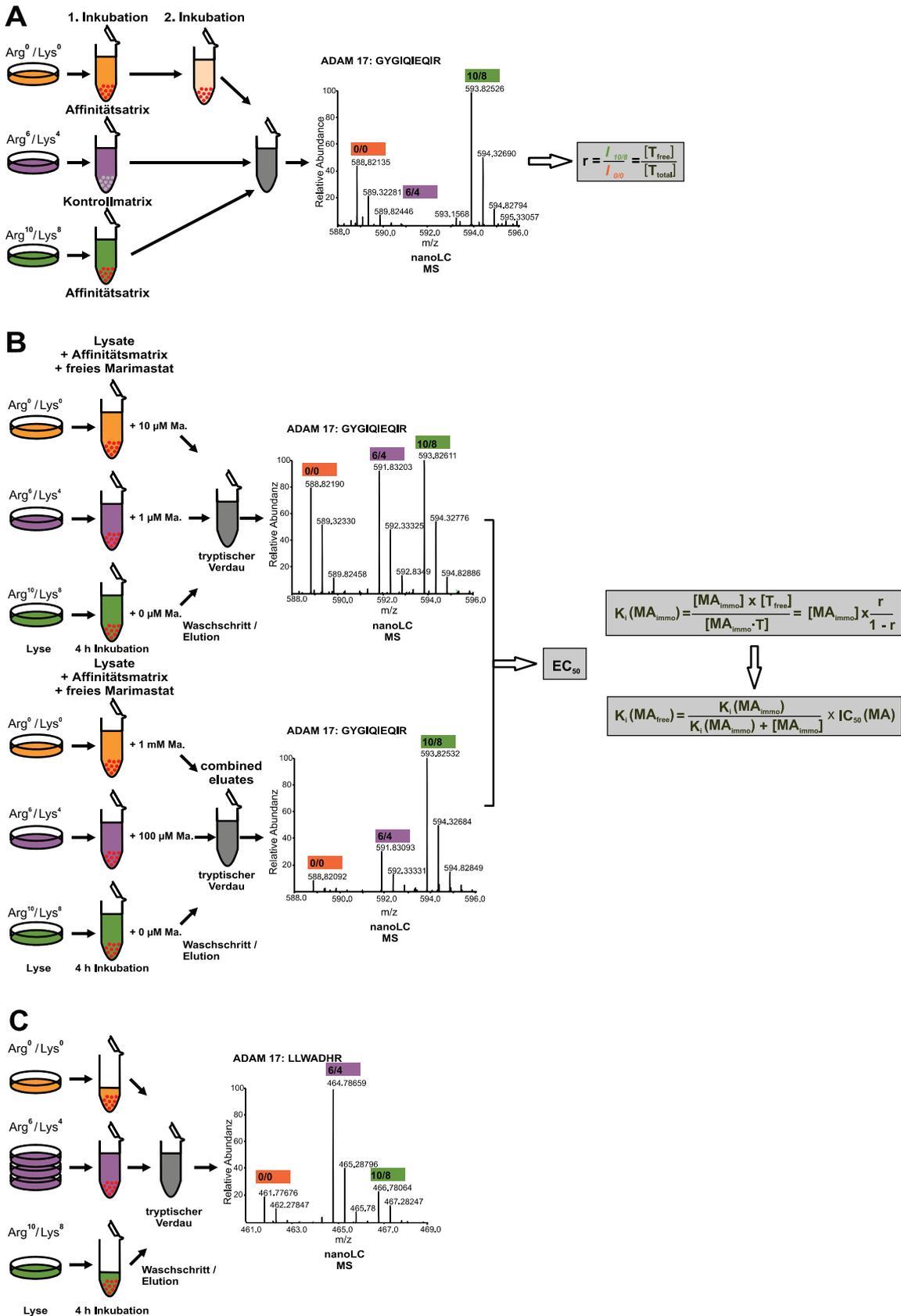
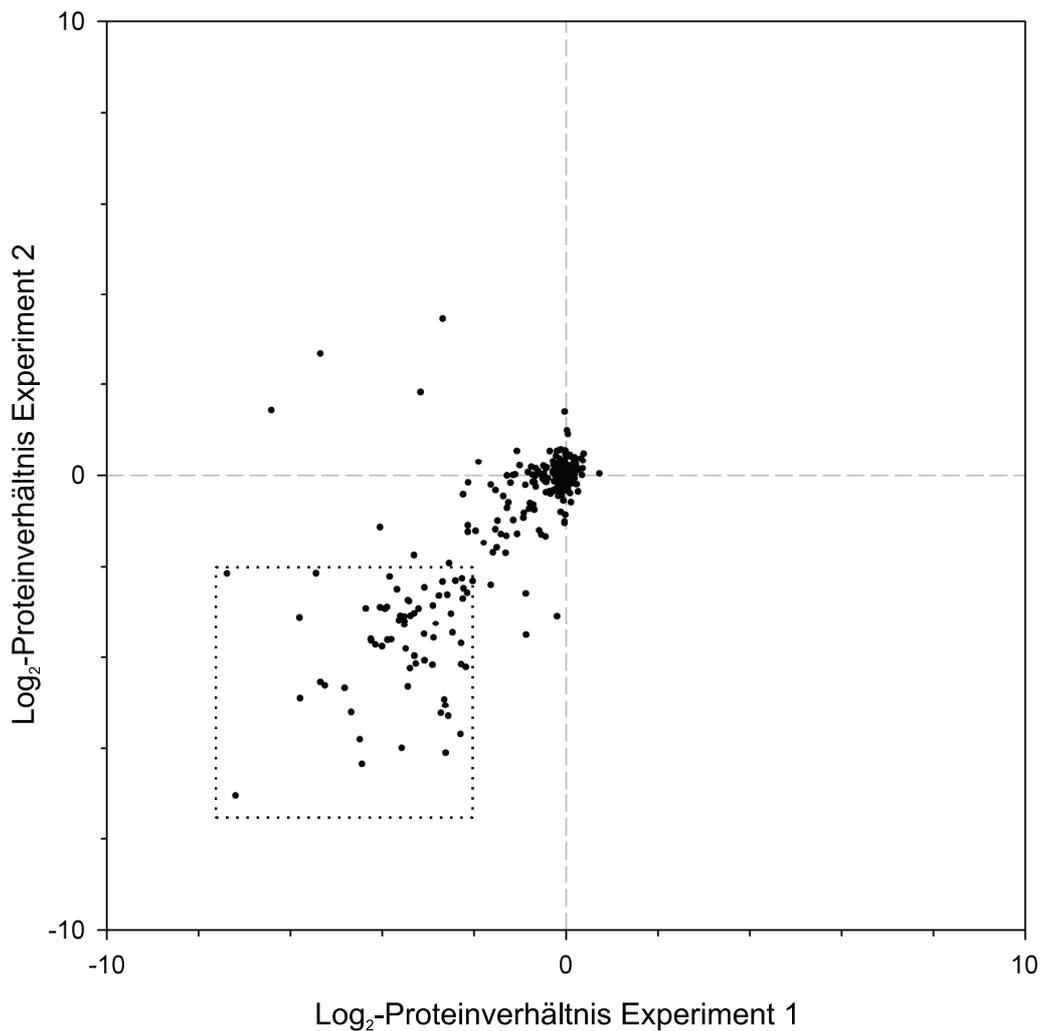


Abbildung 3.5-3 Schematische Darstellung des experimentellen Ablaufs der quantitativen Marimastat Profilierung. A, Bestimmung der relativen Bindung (r) von Marimastat-Interaktoren. Differenziell markierte Lysate wurden mit Marimastat-Derivat- oder Kontroll-Matrix inkubiert. Der Überstand mit der ungebundenen Proteinfraction der ersten Inkubation wurde erneut mit neuer Affinitätsmatrix inkubiert. B, Konkurrenzexperimente mit freiem Marimastat. Zur Bestimmung der EC<sub>50</sub>-Werte wurde die *in vitro* Assoziationen in Gegenwart unterschiedlicher

## Ergebnisse

Konzentrationen freien Inhibitors (1, 10, 100, 1000  $\mu\text{M}$ ) durchgeführt. C, Kontrollexperiment zur Überprüfung des Inhibitor-Überschusses und der experimentellen Reproduzierbarkeit.



**Abbildung 3.5-4** Scatterplot der relativen Protein-Bindung an Affinitätsmatrix *versus* Kontrollmatrix aus zwei biologischen Replikatexperimenten mit invertierter SILAC-Markierung. Die gemessenen Verhältnisse wurden auf das, in einer separaten Messung bestimmte, initial eingesetzte Proteinverhältnis der differentiell markierten Zellysate normalisiert. Die für die weitere Analyse berücksichtigten, spezifischen Interaktoren liegen innerhalb der Markierung. Die gemessenen Bindungsverhältnisse des *reverse*-Experiments wurden zwecks verständlicherer Darstellung invertiert.

Da die zur Berechnung eingesetzte Cheng-Prusoff Gleichung nur für den Gleichgewichtszustand gültig ist, wurde die Einstellung eines Bindungsgleichgewichtes nach der Inkubationszeit von 4 Stunden durch separate Kinetikexperimente über einen Zeitraum von 2, 4 und 8 Stunden überprüft. Zudem wurde sichergestellt, dass es unter den experimentellen Bedingungen nicht zu einer Sättigung der Inhibitor matrix mit zellulären Substraten kommen konnte, indem das Bindungsverhältnis zwischen der Inkubation mit unverdünntem und 1/3 verdünntem Lysat bestimmt wurde (Abbildung 3.5-3, C). Darüber hinaus wurden die Experimente mit invertierten SILAC-

## Ergebnisse

Markierungen wiederholt, um potentielle Artefakte aufgrund von Probenkontaminationen oder eventuellen Isotopeneffekten auszuschließen.

### 3.5.3 Spezifische Interaktoren des immobilisierten Derivates

Von den 563 in diesen Experimenten identifizierten Proteinen konnten die apparenten  $K_{i(\text{immob.})}$ -Werte von 192 Proteinen bestimmt werden. Von diesen Proteinen wurden zwecks Validierung nur die spezifischen Interaktoren (entsprechend den oben angeführten Kriterien) mit hoher Reproduzierbarkeit über zwei biologische Replikate beibehalten. Die apparenten Gleichgewichtskonstanten der Komplexe aus validierten Interaktoren und Affinitätsmatrix liegen in der Regel im dreistelligen mikromolaren Bereich. Unter den spezifischen, zellulären Interaktoren mit den höchsten apparenten Affinitäten für das immobilisierte Marimastat-Derivat (Tabelle 3.5-1) konnten in A498 Zellen eine Reihe von Metalloproteasen (den prototypischen Marimastat-Targets), darunter drei Vertreter aus der ADAM Proteinfamilie (ADAM 9, ADAM 10, ADAM 17) sowie MMP 14, identifiziert werden.

**Tabelle 3.5-1 Ausgewählte spezifische Marimastat-Interaktoren A498 Zellen**

Proteinname	spezifische Peptide	Spezifität <sup>[a]</sup>	Gleichgewichtseinstellung		$K_{i(\text{immob.})}$ [ $\mu\text{M}$ ] <sup>[b]</sup>	$K_{i(\text{free})}$ [nM] <sup>[c]</sup>	EC <sub>50</sub> [nM]
			4 h / 2 h	8 h / 4 h			
ADAM 10	16	0,165	1,196	1,712	337,70	12,62	20,54
ADAM 17	17	0,065	0,858	1,126	204,51	23,85	48,55
ADAM 9	5	0,048	0,963	2,355	957,31		
Cathepsin A	27	0,069	1,036	1,016	65,83		
Cathepsin L1	4	0,135	1,021	0,748	248,64		
F-box only protein 22	17	0,049	0,949	0,990	189,74		
Histon deacetylase 10	16	0,162	0,787	1,3186	60,21		
Histon deacetylase 6	14	0,023	0,716	3,960	163,29		
Matrix Metalloproteinase 14	3	0,12	-	-	478,8		
Tropomyosin alpha-3 chain	4	0,007	1,337	1,099	271,21		

[a] Bindungsverhältnis Kontrollmatrix vs. Marimastat Affinitätsmatrix [b]

Die Selektivität des Inhibitors war jedoch nicht auf Metalloproteasen beschränkt. Ebenso wurden auch Serin- und Cysteinproteasen (Cathepsin A bzw. Cathepsin L1) gebunden. Im Fall von Cathepsin A liegt die apparente Affinität von  $\sim 65 \mu\text{M}$  sogar

## Ergebnisse

---

noch über der für die originären Ziele (MMPs, ADAMs). Cathepsin L1 (CTSL) ist u.a. an der Kontrolle des intrazellulären Recycling, endozytotisch aufgenommener EGF-Rezeptoren beteiligt. So konnten knock-out Studien im Mausmodell zeigen, dass primäre Keratinozyten ohne funktionales CTSL eine erhöhte EGFR Recyclingrate und vermehrtes, Liganden-abhängiges Wachstum aufweisen (Reinheckel, Hagemann *et al.*, 2005). Somit ist die Beobachtung der spezifischen Interaktion zwischen CTSL und dem immobilisierten Marimastat-Derivat von besonderer Relevanz für die Verwendung von Marimastat als Instrument der zellulären Signaltransduktionsforschung. Neben diesen zellulären Proteasen ist auch eine beachtenswerte Bindungsaffinität für Histon-modifizierende Enzyme zu verzeichnen. So wurde die höchste Affinität ( $K_{i(\text{immob.})} \sim 60 \mu\text{M}$ ) zum immobilisierten Marimastat-Derivat für die Histon Deacetylase 10 gemessen. Die ebenfalls zur Subfamilie 2 gehörende Histon Deacetylase 6 (HDAC 6) wurde hingegen mit einer etwas geringeren apparenten Affinität von  $K_{i(\text{immob.})} \sim 163 \mu\text{M}$  gebunden. Darüber hinaus interagierte die eingesetzte Affinitätsmatrix mit dem *F-box only protein 22* und Tropomyosin alpha-3. Die Interaktion zwischen Marimastat und dem u.a. im Muskel expremierten Tropomyosin alpha-3 liefert eine Hypothese für die in klinischen Studien zur Anwendung von Marimastat häufig beobachtete Nebenwirkung des Skelettmuskelschmerzes (Rosemurgy, Harris *et al.*, 1999).

Für die oben genannten spezifischen Interaktoren konnten keine Daten aus den Konkurrenzexperimenten gewonnen werden. Somit ist die Aussagekraft dieser Beobachtungen beschränkt, da die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf freies, natives Marimastat spekulativ ist. Diese Unvollständigkeit der Konkurrenzdaten könnte auf besonders hohe Affinitäten für immobilisiertes Marimastat zurückzuführen sein. In diesem Fall könnte, bei den gewählten Konzentrationen, evtl. die Menge an gebundenem Substrat unter der Nachweisgrenze liegen und so mit der Quantifikation der Zielproteine interferieren. Weitere Einschränkungen der vorgestellten Technologie ergeben sich, im Hinblick auf die Analyse von Proteasen, durch eine eventuelle (auto-) proteolytische Spaltung der bindenden Proteine während der Inkubationszeit. Hinweise auf eine tatsächliche Proteolyse ergeben sich z.B. aus der 30%igen Abnahme der Menge an gebundenem Cathepsin A nach 8 stündiger Inkubation im Vergleich zur 4 stündigen Inkubation. Darüber hinaus ist zu beachten, dass sich in Abhängigkeit der Proteingröße zum Teil erst nach langen Inkubationszeiten ein Diffusions-Gleichgewicht zwischen dem Lysat und der porösen Sepharosematrix einstellt. Dieser Effekt könnte z.B. für verhältnismäßig große Proteine wie ADAM9 (90 kDa) und HDAC6 (130 kDa) eine

Rolle spielen. Für diese Proteine wurde eine Zunahme der Bindung um bis zu 400% (im Fall von HDAC6) nach 8 Stunden im Vergleich zur 4 stündigen Inkubation beobachtet. Dahingegen erfolgte bei kleineren Proteinen wie Tropomyosin 3 alpha (33 kDa) in der Regel keine Zunahme der Bindung nach 8 Stunden. Bei Einhaltung konstanter Inkubationsbedingungen hat dieser Effekt zwar keinen nennenswerten Einfluss auf die Bestimmung der Bindungskonstanten, jedoch wäre zukünftig die Verwendung nicht-poröser Matrices vorzuziehen.

### 3.5.4 Charakterisierung von Marimastat Interaktoren

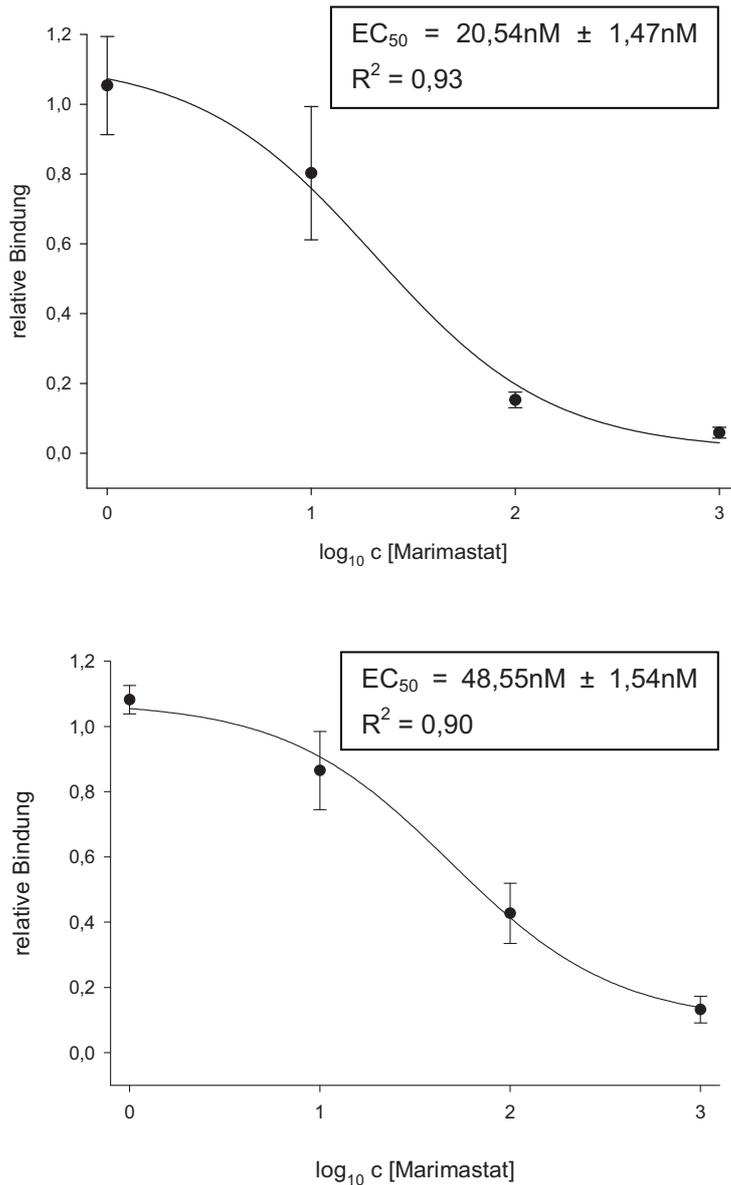
Die oben angeführten Ergebnisse beziehen sich nur auf das Marimastat Derivat, welches zudem noch an eine feste Phase immobilisiert wurde. Dementsprechend sind sie kein direktes Maß für die Charakterisierung von Inhibitor-Enzym Komplexen aus nativem, gelöstem Marimastat. Zur Bestimmung der Bindungskonstanten für natives Marimastat wurde daher zusätzliche Konkurrenzexperimente mit freiem, unmodifiziertem Inhibitor durchgeführt.

Die beiden zellulären Marimastat-Targets ADAM10 und ADAM17 konnten für jede Bedingung der Konkurrenzexperimente in beiden biologischen Replikaten quantifiziert werden. Aus diesen Daten wurden unter Annahme eines *one-site* Bindungsmodells die jeweiligen  $EC_{50}$ -Werte durch Regressionsrechnung bestimmt (Abbildung 3.5-5). Diese wiederum waren zusammen mit der substratspezifischen  $K_i$  (immob.) für das immobilisierte Derivat Grundlage der Berechnung der tatsächlichen  $K_i$  (frei) für den freien, nativen Inhibitor.

Die Gleichgewichtskonstante für den Komplex von ADAM10 und Marimastat liegt nach dieser Methode unter physiologischen Bedingungen bei einem Wert von 12,62 nM, während für den Komplex aus ADAM17 und Marimastat eine Konstante von 23,85 nM berechnet wurde (Tabelle 3.5-1).

In Anbetracht der geringen Daten-Ausbeute der Konkurrenzexperimente ist eine Bewertung der Ergebnisse schwierig. Dennoch konnte die Validität der Methode durch die Identifikation der beiden bekannten Interaktoren ADAM10 und 17 nachgewiesen werden.

## Ergebnisse



**Abbildung 3.5-5 Bindungskurven.** Relative Bindung von ADAM10 (A) und ADAM17 (B) an immobilisiertes Marimastat in Gegenwart unterschiedlicher Konzentration (1, 10, 100, 1000  $\mu$ M) freien Inhibitors. Die Ergebnisse stellen Mittelwerte aus zwei biologischen Replikaten dar.

Die mit dieser neuartigen Methode gemessenen Bindungskonstanten für ADAM17 stimmen mit den Ergebnissen anderer, auf *in vitro* Fluoreszenzmethoden basierender Studien, sehr gut überein. So wurde von Roghani *et al.* für die Gleichgewichtskonstante des Komplexes aus Marimastat und ADAM17 ein Wert von 22 nM ermittelt (Roghani, Becherer *et al.*, 1999) und die Methode somit prinzipiell validiert. Im konkreten Fall von ADAM17 sprechen die Ergebnisse für eine ausreichende Modellierung des zellulären Systems bei der zitierten fluoreszenzbasierten *in vitro*-Untersuchung. Aus diesem Umstand ergibt sich jedoch keinesfalls eine generelle Übertragbarkeit von *in vitro* Ergebnissen auf die tatsächlichen Zustände im

zellulären Milieu, da Protein-spezifische und vom Zellsystem abhängige Faktoren, wie z. B. die Bildung von Proteinkomplexen und post-translationale Modifikationen, die Interaktion zwischen Inhibitor und Enzym modulieren können und nach derzeitigem Stand der Technik nicht wirklichkeitsgetreu *in vitro* abgebildet werden können. Die hier für die Charakterisierung von Proteaseinhibitoren vorgestellte Methode umgeht diese Prinzip-bedingten Unzulänglichkeiten klassischer Verfahren, indem native zelluläre Lysate verwendet werden. Alternative *in vivo* Verfahren wie die Fluoreszenz-Korrelationspektrometrie (FCS) sind zudem auf die Fluorophor-Markierung der zu untersuchenden Proteine angewiesen und erfordern somit eine besonders sorgfältige experimentelle Planung um eventuelle Einflüsse des Fluorophors auf das Bindungsverhalten des Proteins auszuschließen. Darüber hinaus handelt es sich bei FCS um eine serielle Methode bei der pro Experiment jeweils nur ein Protein der Untersuchung zugänglich ist, während durch das vorgestellte massenspektrometrische Verfahren prinzipiell alle Interaktoren parallel charakterisiert werden können. Dadurch verringert sich der, zur Analyse aller relevanten, potentiellen Targets, notwendige experimentelle Aufwand und es wird erstmals eine Hypothesen-freie Herangehensweise ermöglicht.

Niedermolekulare, chemische Inhibitoren (sog. *small molecules*) werden sowohl in der Forschung als auch in der Medizin zur Modulation zellulärer Signalwege und Beeinflussung zellulären Verhaltens eingesetzt (Alaimo, Shogren-Knaak *et al.*, 2001). Im Gegensatz zu alternativen Technologien der Signaltransduktionsforschung, wie siRNA oder genetische Modifikation, ermöglichen *small molecules* eine schnell einsetzende, dosisabhängige und zumeist reversible Intervention. Die Verwendung dieser Moleküle wird jedoch durch die Tatsache erschwert, dass in der Regel eine Vielzahl zellulärer Substrate mit unterschiedlichen Affinitäten inhibiert werden. Für eine zielgerichtete pharmakologische Therapie, wie auch für die rationale Aufklärung von Signaltransduktionsmechanismen, ist daher eine möglichst genaue Inhibitorprofilierung in Hinblick auf das Substratspektrum und die jeweiligen Bindungskonstanten unter Versuchsbedingungen mit endogener Proteinexpression erstrebenswert. Potentielle Nebenwirkungen durch hohe *off-target*-Affinitäten oder erwünschte synergistische Effekte durch sog. *multi-mode* Wirkung könnten durch eine quantitative Profilierung besser verstanden werden.

---

## 4 DISKUSSION

### 4.1 LPA- UND HB-EGF-INDUZIERTE PHOSPHORYLIERUNG IN A498 ZELLEN

In diesem Teil der Arbeit wurden die frühen Phosphorylierungsereignisse nach der Stimulation mit dem GPCR-Liganden LPA mit den Phosphorylierungen durch direkte EGFR-Stimulation mit HB-EGF komparativ analysiert. Durch die Optimierung der Stimulationsbedingungen konnte eine vergleichbare Tyrosinphosphorylierung / Aktivierung des EGF-Rezeptors durch die direkte HB-EGF-Stimulation und die indirekte, LPA-induzierte Transaktivierung erreicht werden. Die Einstellung der balancierten Signalintensität war die unbedingte Voraussetzung für den quantitativen Vergleich beider Signalnetzwerke. Durch diesen experimentellen Ansatz konnte die Signalintegration und -modulation zellulärer Effektoren zwischen LPA- und HB-EGF-initiierten Phosphorylierungskaskaden untersucht werden. Trotz der ausgeglichenen EGFR Aktivierung wurden nahezu alle durch HB-EGF induzierten Phosphorylierungsstellen nach LPA-Stimulation im größeren Umfang phosphoryliert. So wurden die MAP-Kinasen ERK1 und ERK2 durch Phosphorylierungen innerhalb der Aktivierungsschleife sowohl nach HB-EGF, als auch durch LPA aktiviert. Die Stimulation dieser Phosphorylierungsstellen durch LPA entsprach jedoch etwa dem Doppelten des EGFR-abhängigen Anteils. Eine solche Signalverstärkung an regulatorischen Phosphorylierungsstellen deutet auf eine synergistische Signalintegration zwischen der EGFR-Transaktivierung und anderen GPCR-abhängigen, mitogenen Signalwegen hin. Auch wenn die zugrundeliegenden Mechanismen derzeit noch nicht aufgeklärt sind, könnten die beobachteten Verstärkungsprozesse eine mechanistische Ähnlichkeit zur Insulin-potenzierten mitogenen Signaltransduktion durch EGF aufweisen (Borisov, Aksamitiene *et al.*, 2009). Ein anderes Erklärungsmodell für die beobachteten Effekte ist die LPA-vermittelte Modulation der effektiven zellulären Aktivität des EGFR. Die detektierten, LPA-induzierten Serin-/Threonin-Phosphorylierungen des EGFR könnten die katalytische Aktivität direkt oder indirekt durch Bildung Phosphorylierungs-spezifischer Bindungsstellen für zelluläre Interaktionspartner beeinflussen. Da aktivierte EGF-Rezeptoren einem komplexen Zyklus aus Internalisation, Recycling und Degradation unterworfen sind, könnte die Intermodulation der EGFR-abhängigen Signaltransduktion auch auf Ebene der endozytotischen Maschinerie erfolgen. In der Tat konnte eine Vielzahl von LPA-

## Diskussion

---

induzierten Phosphorylierungsstellen an Proteinen detektiert werden, welche auf unterschiedlichen Ebenen an endozytotischen Prozessen beteiligt sind. Darunter fallen insbesondere die *AP2-associated protein kinase 1* (AAK1), Intersektin, Dynamin 1, *AP-2 complex subunit beta* (AP2B1) und des *GTPase-activating protein and VPS9 domain-containing protein 1* (GAPVD1). Bemerkenswerterweise wurden diese spezifischen Phosphorylierungsstellen nicht durch die Stimulation mit HB-EGF reguliert, so dass hier eine Stimulus-spezifischen Intermodulation wahrscheinlich ist. Auch wenn diese Phosphorylierungsstellen noch nicht funktionell charakterisiert sind, bestätigt der Nachweis selektiv regulierter Phosphorylierungen an den genannten Proteinen die generelle Nützlichkeit der quantitativen Phosphoproteomik zur Identifikation neuer Mechanismen der Signalintegration in Wachstumsfaktor-abhängigen Phosphorylierungsnetzwerken. Da der Transaktivierungsmachanismus integraler Bestandteil der GPCR-medierten Signaltransduktion ist, müsste dieser selektiv (z.B. durch Metalloproteaseinhibitoren oder inhibitorische  $\alpha$ -EGFR Antikörper) entkoppelt werden, um die gegenseitige Signalverstärkung quantitativ erfassen und den beteiligten Signalwegen zuordnen zu können.

Eine weitere interessante Entdeckung ist die starke, spezifisch durch LPA siebenfach induzierte Phosphorylierung der Dehydrocholesterol-Reduktase 7 (DHCR7) an Serin 14. Dieses metabolische Enzym katalysiert die NADPH-abhängige Reduktion von Cholesta-5,7-dien-3-beta-ol zu Cholesterol. Obwohl keine Informationen über die Phosphorylierungsstellen-spezifische Funktion vorliegen, ist bekannt, dass die Enzymaktivität der DHCR7 durch Phosphorylierung positiv moduliert wird (Shefer, Salen et al., 1998). Weiterhin zeigten Cholesterol-Depletionsversuche, dass die Metalloprotease-abhängige Prozessierung von Transmembranproteinen durch den Cholesterolanteil der Plasmamembran beeinflusst wird. So beschleunigte die chemische Abreicherung zellulären Cholesterols und die pharmakologische Inhibition der Cholesterolsynthese die Spaltung von CD30 durch ADAM17 (von Tresckow, Kallen *et al.*, 2004). Diese Effekte lassen sich mit den, vom Cholesterolanteil abhängigen, physikalischen Eigenschaften der Plasmamembran und darin eingebetteter Mikrostrukturen wie z.B. sogenannter *lipid rafts* erklären. Im Kontext der LPA-vermittelten Transaktivierung durch proteolytische Spaltung membrangebundener Pro-Wachstumsfaktoren ergibt sich daraus ein neuer, hypothetischer Mechanismus der negativen Langzeitregulation. Die LPA-induzierte Phosphorylierung von DHCR7 könnte zu einer verstärkten Cholesterolsynthese führen und so den Cholesterolgehalt der

## Diskussion

---

Plasmamembran / der *lipid rafts* erhöhen. Dadurch würde die proteolytische Spaltung von HB-EGF verlangsamt und zudem die Internalisierung der EGF-Rezeptoren beeinflusst (Lambert, Ameels *et al.*, 2008).

Darüber hinaus könnte die hypothetische Aktivierung der DHCR7 auch der Cholesterolsynthese im Rahmen der LPA-induzierten Zellproliferation dienen.

Die phosphoproteomischen Analysen der Gesamtzelllysate und Kinase-angereicherten Fraktionen lieferten hochgradig komplementäre Daten zu den zellulären Phosphoproteinen und deren Regulation. Insgesamt wurden in dieser Studie zehnmal mehr Phosphopeptide identifiziert, als in einer vorhergehenden Untersuchung der LPA-induzierten Signaltransduktion (Ding, Wang *et al.*, 2008). Über diese qualitative Verbesserung hinaus zeigte sich, dass die Kombination quantitativer Daten zu Kinase- und Substratphosphorylierungen für die Erstellung von Interaktionsnetzwerken LPA-regulierter Phosphoproteine essentiell ist. Die Netzwerkkonnektivität konnte durch dieses Vorgehen dramatisch erhöht werden. Im Umkehrschluss war die Konnektivität separater Netzwerke auf Substrat- und Kinase-Ebene stark beeinträchtigt. Der hier verwendete Ansatz, allgemeine Phosphorylierungsänderungen auf Substratebene durch gezielte Detektion der Proteinkinase-Regulation zu ergänzen, erwies sich somit als besonders nützlich für die Analyse systemweiter Signalnetzwerke, welche zelluläre Prozesse wie beispielsweise die LPA-regulierte Adhäsion und Zellmigration koordinieren. Die Visualisierung des Interaktionsnetzwerkes offenbarte eine Vielzahl von Interaktionen zwischen LPA-regulierten Phosphoproteinen aus dem Gesamtzelllysat (wie z.B. F11R, Paxillin und die Protein Tyrosin Phosphatase PTPN12) und Proteinkinasen aus den angereicherten Fraktionen (wie z.B. FAK, PYK2, SRC und ERK MAP-Kinasen).

Zusätzlich zu diesen interagierenden und an der Regulation der Adhäsion und Zellmigration beteiligten Proteinen, wurde die dreifache Induktion der Phosphorylierungsstellen Ser(P)-697 und Ser(P)-704 des Typ-I Transmembran-Glykoproteins CD44 durch LPA nachgewiesen. Die Stimulation mit HB-EGF führte dagegen zu keiner Änderung der Abundanz entsprechender Phosphopeptide. CD44 vermittelt die Zelladhäsion an extrazellulärer Hyaluronsäure und wird, analog zu membranverankerten Pro-Wachstumsfaktoren, durch ADAM10 und 17 stimulationsabhängig gespalten (Nagano, Murakami *et al.*, 2004). Die induzierte Prozessierung ist dabei nicht auf die Plasmamembran beschränkt, sondern kann bereits

in Exosomen stattfinden (Stoeck, Keller *et al.*, 2006). Die Phosphorylierungsstelle Ser(P)-697 ist funktionell für die Phorbolster-induzierte Zellmotilität von Bedeutung (Tzircotis, Thorne *et al.*, 2006). Darüber hinaus kolokalisiert CD44 in metastasierenden Brustkrebszellen mit dem EGF-Rezeptor und konnte im Komplex mit diesem immunpräzipitiert werden (Wobus, Rangwala *et al.*, 2002). Der EGF-Rezeptor wiederum ist selbst an der LPA-induzierten Zellmigration und Invasion von A498-Zellen beteiligt (Schafer, Gschwind *et al.*, 2004). Daraus ergibt sich die Hypothese einer funktionellen Kooperation zwischen CD44 und EGFR zur Koordination der LPA-induzierten Zellmigration. Diese könnte insbesondere auch durch die Bindung und Präsentation von aktivem HB-EGF durch CD44 erfolgen. So wird eine Splicevariante von CD44 mit Heparansulfat modifiziert, so dass dieses extrazelluläres HB-EGF binden und dem EGF-Rezeptor präsentieren kann (Bennett, Jackson *et al.*, 1995). Die an Heparansulfat gebundenen Wachstumsfaktoren sind zudem besser vor der Degradation geschützt und verfügen somit über eine verlängerte Halbwertszeit (Saksela, Moscatelli *et al.*, 1988). Darüber hinaus könnte CD44 auch durch Komplexbildung die proteolytische Prozessierung von HB-EGF durch Metalloproteasen und damit die Transaktivierung des EGFR beeinflussen. Eine solche Komplexbildung wurde z.B. zwischen CD44, MMP7, HB-EGF und ErbB4 beobachtet und sowohl im zellulären System, als auch im Mausmodell (*CD44<sup>-/-</sup>*) bestätigt (Yu, Woessner *et al.*, 2002).

Im Zusammenhang mit den Literaturangaben sprechen die phosphoproteomischen Untersuchungen für eine multifaktorielle Signaltransduktion und Integration innerhalb komplexer Signalnetzwerke zur Koordination zellulärer Prozesse wie der LPA-induzierten Zellmigration. Die genaue Kenntnis dieser gegenseitigen Abhängigkeiten ist im Rahmen pathophysiologischer Vorgänge wie z.B. der Krebszellmigration und -invasion von besonderem Interesse. Zukünftige effektive therapeutische Konzepte könnten auf diesem Wissen aufbauen und durch beabsichtigte Mehrfachwirkung (*multi-mode action*) kompensatorische Mechanismen krankheitsrelevanter Signalnetzwerke außer Kraft zu setzen.

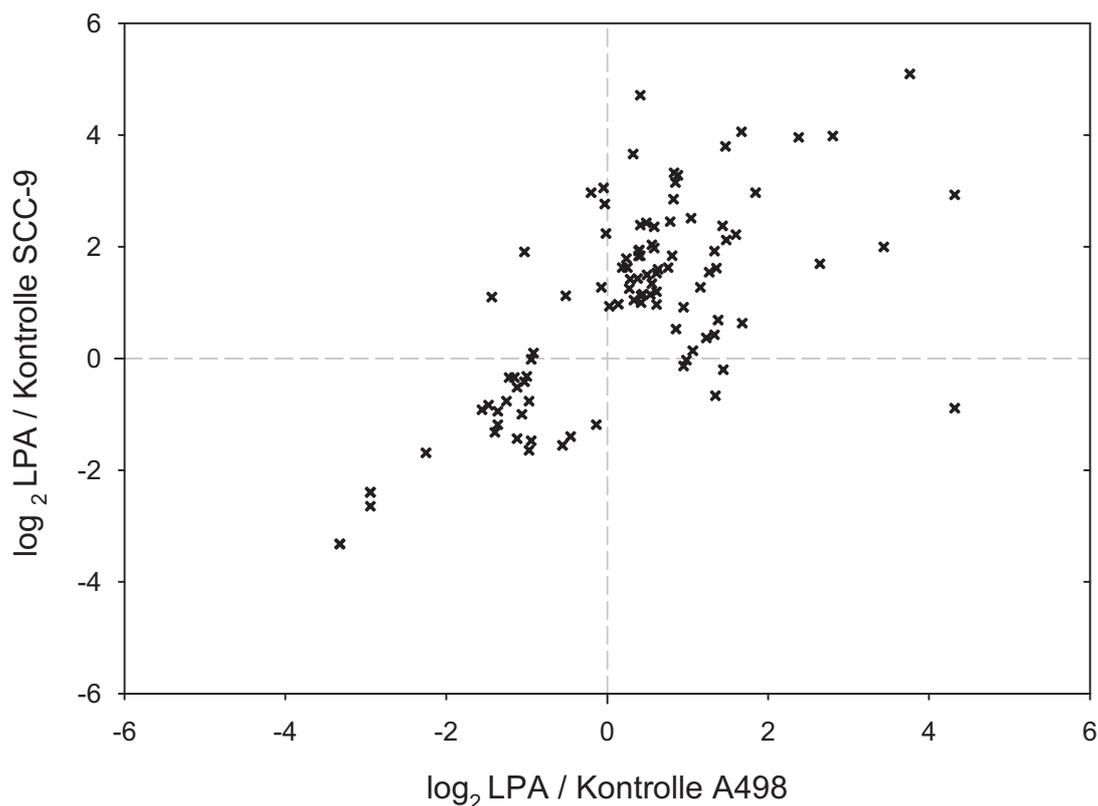
## **4.2 VERGLEICH DER LPA-ABHÄNGIGEN PHOSPHOREGULATION IN A498 UND SCC-9 ZELLEN**

In dieser Arbeit wurden LPA-abhängige Phosphorylierungsereignisse in zwei unterschiedlichen Zellsystemen (A498, SCC-9) betrachtet. Der Schwerpunkt der ersten Untersuchung lag dabei auf den differentiellen, frühen Effekten von LPA und HB-EGF

## Diskussion

---

mit besonderem Fokus auf regulatorische Phosphorylierungen an Proteinkinasen, wohingegen im zweiten Teil die zeitabhängige LPA-Antwort über einen längeren Zeitraum mit optimierten Fraktionierungsverfahren in SCC-9 Zellen analysiert wurde. Aufgrund der optimierten Fraktionierungsmethoden und der aufwendigen experimentellen Strategie konnten die zeitabhängigen, LPA-induzierten Phosphorylierungsereignisse in SCC-9 Zellen in einem bislang nicht erreichten Umfang analysiert werden. Obwohl sich die beiden Zellsysteme in Herkunft, Morphologie und den von ihnen genutzten Signaltransduktionswegen (z.B. durch die im Zuge der Transaktivierung prozessierten EGFR-Liganden) unterscheiden und unterschiedliche Methoden (Kinaseanreicherung bzw. hochauflösende SCX) zum Einsatz kamen, zeigte sich in der direkten Gegenüberstellung der, in beiden Experimenten quantifizierten und nach 3-minütiger LPA-Stimulation regulierten, Phosphorylierungsstellen eine erstaunliche Kongruenz. Die überwiegende Mehrheit der Phosphorylierungsstellen wurde in beiden Zelllinien auf vergleichbare Weise und in ähnlicher Intensität durch LPA reguliert. So befinden sich etwa 85% der mehr als 100 in beiden Zelllinien als reguliert identifizierte Phosphorylierungsstellen in den positiv korrelierten Quadranten (rechts oben, links unten) des Punktwolkendiagramms (Abbildung 4.2-1). Die gleich regulierten Proteine gehören zu diversen funktionellen Gruppen und decken eine Vielzahl biologischer Prozesse ab. Hierzu gehören z.B. die Aktivierung der Proteinkinase D2 durch Phosphorylierung an Ser-706, die analoge Induktion der Phosphorylierung der nicht-Rezeptor Protein Tyrosinphosphatase (PTPN12) an Ser-435, die LPA-abhängige Phosphorylierung des eukaryontischen Translations-Initiationsfaktors 4H an Ser-21 oder metabolischer Enzyme, wie der Dehydrocholesterol-Reduktase 7 (DHCR7) an Ser-14 (Tabelle 4.2-1). Die ebenfalls in beiden Zelllinien zu beobachtende Stabilisierung des anti-apoptotischen Proteins PEA15 (Ser(P)-137) deutet zudem auf die Aktivierung zumindest partiell homologer anti-apoptotischer Signalwege hin.



**Abbildung 4.2-1 LPA-regulierte Phosphorylierungsstellen in A498 und SCC-9 Zellen.** Gegenüberstellung der nach 3 minütiger LPA-Stimulation regulierten Phosphorylierungsstellen in A498 und SCC-9 Zellen.

Unter der Prämisse der grundsätzlichen Vergleichbarkeit der Datensätze ist die differentielle Regulation einzelner Phosphorylierungsstellen in A498 und SCC-9 Zellen von besonderem Interesse. Generell ließ sich in SCC-9 Zellen eine größere Anzahl induzierter Phosphorylierungen nach 3-minütiger Stimulation beobachten. Zudem waren fast alle in A498 Zellen regulierten Phosphorylierungsstellen im SCC-9-Zellsystem ebenfalls reguliert. Herausstechendes Beispiel für differentielle Phosphorylierungen ist die Aktivierung der MAP-Kinase p38 alpha (MAPK-14) in SCC-9, aber nicht A498 Zellen durch Phosphorylierungen an Thr-280 und Tyr-282. Diese Unterschiede könnten ihre Ursache in der differentiellen Expression verschiedener LPA-Rezeptoren und deren Kopplung an unterschiedliche heterotrimere G-Proteine haben. So wurde die LPA-induzierte Zellmigration in verschiedenen Zelllinien (wie PC3 Prostatakarzinomzellen oder Gliomzellen) auf die LPA<sub>1</sub> / G<sub>i</sub>-abhängige Aktivierung von p38 alpha zurückgeführt (Malchinkhuu, Sato *et al.*, 2005; Hao, Tan *et al.*, 2007).

Weitere SCC-9 spezifische Phosphorylierungen betrafen die MAP-Kinase-Kinasen 2 und 7, die 5'-AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK1), die *Cell division protein kinases* (PCTAIRE 1-3) das Hitzeschockprotein beta 1, sowie das *A-kinase anchor protein 10* (AKAP10). Darüber hinaus ist die differentielle Regulation mehrerer

## Diskussion

---

Phosphorylierungsstellen (Ser(P)-348, Thr(P)-352 und Ser(P)-562) des Insulinrezeptor-Substrat 2 (IRS2) und die starke Induktion des Thyroidhormon Rezeptor-assoziierten Proteins 3 zu erwähnen.

Im Kontext der Zelladhäsion scheinen die differentielle Tyrosinphosphorylierung von Tensin 3 und die ebenfalls differentielle Aktivierung der *Focal adhesion kinase 1* (FAK1), durch Induktion von Tyr(P)-577 in A498 Zellen von Bedeutung. Tensin 3 ist in ruhenden Zellen zusammen mit Integrinen, Paxillin, FAK und weiteren Proteinen Bestandteil der *focal adhesion* Komplexe, wo es Integrine mit dem Aktin-Zytoskelett verknüpft (Geiger, Bershadsky *et al.*, 2001). Nach Stimulation mit EGF kommt es durch verschiedene Mechanismen (wie der Reduktion der Tensin 3 Expression und dem Austausch Integrin-gebundenen Tensins gegen CTEN), zur Dissoziation der Integrin-Tensin 3-F-Aktin Komplexe und damit zum Zerfall des *Aktin stress fiber* Netzwerks (Katz, Amit *et al.*, 2007). Eine wichtige Rolle spielt dabei auch die durch EGF induzierte Tyrosin-Phosphorylierung von Tensin 3 (Cui, Liao *et al.*, 2004). Desweiteren ist bekannt, dass die EGF-vermittelte Zellmigration unter anderem von einer Tyrosin-Dephosphorylierung / Inaktivierung der *focal adhesion kinase* (FAK) abhängig ist (Lu, Jiang *et al.*, 2001). Zusammengenommen ergibt sich also ein Bild antagonistischer Regulation der *focal adhesion* Komplexe in A498 und SCC-9 Zellen. Während LPA in A498 Zellen FAK aktivierte und Tensin 3 unbeeinflusst blieb, bewirkte der gleiche Stimulus in SCC-9 Zellen die Tyrosin Phosphorylierung von Tensin 3 ohne die FAK zu aktivieren. Eine mögliche Erklärung ergibt sich, in Übereinstimmung mit der EGF-Abhängigkeit dieser Prozesse, aus der in beiden Zellsystemen unterschiedlich stark ausgeprägten EGFR Transaktivierung oder möglicherweise differentieller Effekte der verantwortlichen Liganden HB-EGF und Amphiregulin.

Besonders drastische Unterschiede im Phosphorylierungsmuster zeigten sich für Proteine mit funktioneller Relevanz für den intrazellulären Transport. So wurde die Phosphorylierung des Motorproteins Myosin IXb und des an der Endozytose beteiligten Endophilin ausschließlich in SCC-9 Zellen fünffach, Intersectin 1 siebenfach, das Aktin-bindende Adapterprotein *Drebrin-like Protein* zehnfach und der Synaptosom-assoziierte Proteinrezeptor Sec22b 26-fach induziert.

Im Gegensatz zur Vielzahl der SCC-9-spezifischen Effekte gilt umgekehrt jedoch, dass nur eine verschwindende Minorität von Proteinen exklusiv in A498 Zellen

## Diskussion

phosphoryliert wurde. In diese Kategorie fiel das an Ser-85 phosphorylierte Paxillin, sowie der in A498 Zellen an Ser-588 phosphorylierte *TBC domain family member 4*.

**Tabelle 4.2-1 Ausgewählte LPA-regulierte Phosphorylierungsstellen in A498 und SCC9 Zellen.**

Protein	Proteinname	Position	Sequenz	Anzahl der Phosphatgruppen	A498 3min	SCC9 3min	SCC9 10min	SCC9 30min	SCC9 90min
IPI00376976	130 kDa phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-dependent ARF1 GTPase-activating protein	1044	AIQKQA S EDSNDL	1	2.77	13.91	10.39	5.42	1.86
IPI00410287	5'-AMP-activated protein kinase catalytic subunit alpha-1	511	TPQRS G S VSNYRS	1	1.33	3.58	5.25	5.03	4.38
IPI00645153	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphata se 3	467	SVTPLA S PEPTKK	2	1.53	1.95	7.78	18.36	6.05
IPI00645153	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphata se 3	461	PLMRRN S VTPLAS	1	1.53	2.29	6.23	8.35	5.33
IPI00305589	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 2	466	VRMRRN S FTPLSS	1	0.95	2.42	2.40	2.37	2.33
IPI00294501	7-dehydrocholesterol reductase	14	NIPKAK S LDGVTN	1	6.98	15.79	13.91	4.58	1.73
IPI00306265	A kinase anchor protein 10, mitochondrial	187	SLAEPV S PSKKHE	1	0.87	7.83	4.91	5.09	5.17
IPI00294840	Absent in melanoma 1 protein	19	RRGSQK S TDSPGA	1	2.60	1.61	4.13	3.85	3.48
IPI00759546	Afadin	1811	ERQRLF S QGQDVS	1	1.30	2.70	4.51	3.49	3.51
IPI00253323	Ankyrin repeat domain-containing protein 57	213	DLVMGS S PQLKRS	1	0.39	0.44	0.33	0.33	0.47
IPI00479760	AP2-associated protein kinase 1	637	GHRRIL S DVTHSA	1	0.45	0.79	0.87	0.98	1.12
IPI00186808	Apoptosis-stimulating of p53 protein 2	486	TLRKNQ S SEDILR	1	0.73	0.38	0.21	0.19	0.22
IPI00641582	BAG family molecular chaperone regulator 3	285	SPARSS T PLHSPS	2	0.13	0.19	0.44	0.32	0.37
IPI00641582	BAG family molecular chaperone regulator 3	289	SSTPLH S PSPIRV	2	0.13	0.19	0.44	0.33	0.38
IPI00299088	Brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2	454	QQGKSS S TGNLLD	1	0.21	0.31	0.25	0.30	0.37
IPI00299088	Brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2	366	TLPRSS S MAAGLE	1	0.43	0.79	0.79	0.75	0.84
IPI00179326	Brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2-like protein 1	248	MIEEIK T PASTPV	2	0.52	0.36	0.25	0.18	0.24
IPI00179326	Brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2-like protein 1	257	STPVSG T PQASPM	2	0.51	0.32	0.55	0.44	0.64
IPI00304409	Calcium-regulated heat stable protein 1	41	RGNVVP S PLPTRR	1	0.49	3.75	2.01	2.05	1.25
IPI00409607	Calmodulin-regulated spectrin-associated protein 1-like protein 1	464	GITRSI S NEGLTL	1	1.34	2.18	2.45	1.93	1.76
IPI00761160	Calpastatin isoform a variant	11	GQKPAA S PRPRRA	1	0.36	0.56	0.89	0.77	0.90
IPI00872533	CD2-associated protein	458	LPLRPK S VDFDSL	1	0.46	0.37	0.11	0.16	0.21
IPI00015894	Cdc42 effector protein 4	174	GAAGPH S PDPLLD	1	2.70	5.18	9.71	9.01	6.09
IPI00396279	CLIP-associating protein 1	646	IRTRRQ S SGSATN	1	2.06	5.70	4.42	4.67	4.30
IPI00513791	Dedicator of cytokinesis protein 7	182	LKRRSM S IDDTPR	1	0.97	8.30	5.02	4.73	3.54
IPI00456925	Drebrin-like protein	269	QKERAM S TTSISS	1	1.78	10.02	3.28	2.86	1.27
IPI00019169	Endophilin-A2	288	KIAASS S FRSSDK	1	1.50	5.12	5.46	4.92	4.70
IPI00014263	Eukaryotic translation initiation factor 4H	21	FGGGRG S RGSAGG	1	2.41	2.92	2.10	1.59	1.06
IPI00215762	Exocyst complex component 1	486	MGNMSA S DLDVAD	1	0.48	0.50	0.40	0.46	0.45
IPI00333541	Filamin-A	2152	RRRRAP S VANVGS	1	1.10	1.96	2.74	3.72	3.76
IPI00019904	Gamma-adducin	679	SPEGSP S KSPSKK	1	0.91	0.44	0.25	0.30	0.31
IPI00291783	Gem-associated protein 5	757	TPVKLE S IDGNEE	1	5.20	15.56	11.28	3.15	1.16
IPI00334715	Glucocorticoid receptor DNA-binding factor 1	589	DRNQKN S LSDPNI	1	2.52	1.34	6.75	7.57	4.89
IPI00025512	Heat shock protein beta-1	15*	SLLRGP S WDPFRD	1	1.47	2.53	5.56	7.40	5.31
IPI00025512	Heat shock protein beta-1	82*	ALSRQL S SGVSEI	1	1.75	3.58	5.89	5.62	4.67
IPI00464978	Insulin receptor substrate 2	348	RRSRTD S LAATPP	2	1.31	3.57	4.15	6.33	5.67
IPI00464978	Insulin receptor substrate 2	352	TDSLAA T PPAACK	2	1.31	3.80	3.90	5.90	5.15
IPI00464978	Insulin receptor substrate 2	562	RSYRRV S GDAAQD	1	0.99	4.71	4.64	5.05	5.82

## Diskussion

IPI00304740	Intersectin-1	978	PIRKST S MDSGSS	1	1.77	7.21	25.87	13.89	6.32
IPI00179172	Liprin-beta-1	630	SRDLGQ S NSDLDM	1	0.51	0.59	0.68	0.57	0.68
IPI00174962	MICAL-like protein 1	484	PAPRAP S ASPLAL	2	0.10	0.10	0.08	0.07	0.12
IPI00174962	MICAL-like protein 1	486	PRAPSA S PLALHA	2	0.10	0.10	0.08	0.07	0.12
IPI00008868	Microtubule-associated protein 1B	1788	SDISPL T PRESSP	2	0.68	0.34	0.40	0.50	0.51
IPI00166680	Misshapen-like kinase 1	641	AVIRQN S DPTSEG	1	1.19	3.09	2.97	2.72	2.50
IPI00002857	Mitogen-activated protein kinase 14	182*	DDEMTG Y VATRWY	1	1.45	2.21	5.31	3.84	2.79
IPI00002857	Mitogen-activated protein kinase 14	180*	HTDDEM T GYVATR	1	1.47	4.10	16.03	10.16	7.87
IPI00513803	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 2	153	ERKKRL S IIGPTS	1	1.53	2.88	2.58	2.84	2.52
IPI00295738	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7	439	GQPRRR S IQDLTV	1	1.02	1.91	2.01	1.95	1.92
IPI00336047	Myosin-IXb	1354	TEERRT S FSTSDV	1	1.33	5.23	3.72	2.78	2.87
IPI00219301	Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	118	EAAEPG S PTAAEG	1	2.23	2.42	8.39	17.41	15.51
IPI00021812	Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK	5857	SGVSLA S KKSRLS	1	3.18	16.66	3.44	2.03	1.72
IPI00021812	Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK	5739	EASISG S KGDLKS	1	0.52	0.99	0.31	0.18	0.14
IPI00021812	Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK	212	IRLPSG S GAASPT	1	6.25	3.24	3.74	3.06	3.30
IPI00021812	Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK	93	HRKGDR S PEPGQT	1	0.50	0.80	0.88	0.95	1.13
IPI00021812	Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK	5752	SKASLG S LEGEAE	1	0.37	2.14	2.22	1.10	0.99
IPI00299512	Neurofibromin	2543	LLGTRK S FDHLIS	1	3.59	7.82	9.78	9.20	7.19
IPI00218260	Nuclear factor 1 X-type	265	VTLGRR S ITSPPS	1	2.72	0.87	3.62	4.78	3.41
IPI00023555	Oxysterol-binding protein-related protein 3	304	PVRLHS S NPNLST	1	0.49	0.75	0.92	0.86	0.90
IPI00335634	Paxillin	85	QQPQSS S PVYGSS	1	1.93	0.91	0.88	1.04	1.35
IPI00643342	PEA15 protein	137*	DIIRQP S EEEIHK	1	2.52	3.79	3.36	2.62	1.35
IPI00026952	Plakophilin-3	314	TLQRLS S GFDDID	1	19.96	7.62	7.38	5.46	3.93
IPI00398779	Plectin-1	21	GRKRTS S EDNLYL	1	0.42	0.59	0.85	0.79	1.00
IPI00398779	Plectin-1	4245	NAGGFR S RSSSVG	1	1.26	2.06	1.55	1.65	1.52
IPI00792422	Protein FAM21C	288	KRSRPT S FADELA	1	3.20	1.55	4.61	3.74	2.29
IPI00394829	Protein FAM83H	1003	ESPRRL S LGQGDS	1	1.14	3.09	3.29	2.60	2.22
IPI00425566	Protein LAP4	1532	RAARMK S LEQDAL	1	1.18	3.45	2.46	1.69	1.72
IPI00022078	Protein NDRG1	328	RLMRSR T ASGSSV	1	1.21	2.38	2.59	3.08	2.66
IPI00328350	Protein Niban	602	SPARRA S AILPGV	1	0.70	2.18	2.42	2.44	2.43
IPI00221171	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase ABL1	824	KDIMES S PGSSPP	2	1.34	2.00	1.76	1.49	1.40
IPI00328867	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Yes	426	LIEDNE Y TARQGA	1	1.81	1.44	1.06	1.48	1.42
IPI00413961	Focal adhesion kinase 1	577*	MEDSTY Y KASKGK	1	2.09	1.10	1.03	0.89	0.93
IPI00293009	Rab GTPase-binding effector protein 1	407	GLRRAQ S TDSLGT	1	0.46	0.70	0.86	0.39	0.39
IPI00433499	Rhomboid family member 2	90	AYLKSV S LQEPRS	1	1.72	5.46	3.77	2.93	1.86
IPI00017305	Ribosomal protein S6 kinase alpha-1	577	ENGLLM T PCYTAN	1	3.03	4.65	9.62	7.67	3.02
IPI00784614	Septin-9	30	GPALKR S FEVEEV	1	1.25	12.65	10.57	4.06	1.10
IPI00023664	Serine/threonine-protein kinase Chk1	280	KRPRVT S GGVSES	1	1.98	0.98	4.60	5.31	2.60
IPI00009334	Serine/threonine-protein kinase D2	706*	RIIGEK S FRRSVV	1	13.56	34.17	30.76	13.41	7.06
IPI00009334	Serine/threonine-protein kinase D2	197	ARKRRL S STSLAS	1	10.84	3.99	8.57	10.42	8.57
IPI00549858	Serine/threonine-protein kinase PCTAIRE-1	116	HPPRKI S TEDINK	1	1.40	5.38	7.39	10.86	7.82
IPI00376955	Serine/threonine-protein kinase PCTAIRE-2	137	RIHRRR S MEDLNK	1	1.36	2.22	2.32	2.25	2.04
IPI00394661	Serine/threonine-protein kinase PCTAIRE-3	89	QNQRFF S MEDVSK	1	1.41	2.82	2.93	3.06	3.11
IPI00871279	Sodium-coupled neutral amino acid transporter 1	52	DRESRR S LTNSHL	1	1.50	3.94	3.08	3.31	2.94
IPI00291032	Sperm antigen with calponin homology	131	PSNPRK S VSSPTS	1	1.80	8.88	9.04	11.10	7.28

## Diskussion

and coiled-coil domains 1									
IPI00247439	STE20-like serine/threonine-protein kinase	340	PASKRA S SDLSIA	1	1.93	1.89	1.78	1.79	1.93
IPI00018370	Supervillin	313	FREMEK S FDEQNV	1	1.32	3.84	2.22	1.28	0.82
IPI00855787	Tankyrase 1 binding protein 1, 182kDa	836	QLGTQR S QEADVQ	1	1.84	9.70	8.70	5.98	3.70
IPI00220901	TBC1 domain family member 4	588	MRGRLG S VDSFER	1	2.54	0.63	1.38	1.99	2.13
IPI00658152	Tensin-3	776	GRLRKL S LGQYDN	1	1.55	3.02	2.89	2.78	3.01
IPI00658152	Tensin-3	780	KLSLGQ Y DNDAGG	1	1.69	3.09	2.82	2.83	2.99
IPI00104050	Thyroid hormone receptor-associated protein 3	575	VNVRMD S FDEDLA	1	0.98	6.80	7.94	5.58	1.90
IPI00010544	Tight junction-associated protein 1	545	HLHRKD S LTQAQE	1	1.22	2.67	2.28	2.42	2.48
IPI00329488	Tyrosine-protein kinase ABL2	620	AQASSG S PALPRK	1	0.38	0.40	0.41	0.46	0.62
IPI00289082	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 12	435	KLERNL S FEIKKV	1	2.79	4.35	3.02	1.70	1.58
IPI00514856	Ubiquitin-associated protein 2-like	609	PSSISS S PQKDLT	1	0.53	1.07	0.90	0.88	0.77
IPI00001632	Uncharacterized protein KIAA1522	545	LAGPPA S PGKAQP	1	0.34	0.53	0.44	0.37	0.50
IPI00006865	Vesicle-trafficking protein SEC22b	137	ARRNLG S INTELQ	1	1.33	26.20	13.81	11.39	8.54
IPI00444371	WD repeat-containing protein 44	262	PPRKRK S ELEFET	1	2.56	3.07	2.64	2.11	1.90
IPI00099131	Zinc finger CCCH domain-containing protein 7B	233	YVDPRG S PALLPS	2	2.35	1.29	2.69	3.88	3.25
IPI00410067	Zinc finger CCCH-type antiviral protein 1	335	RFLENG S QEDLLH	1	0.39	0.52	0.23	0.21	0.25
IPI00020513	Zyxin	259	RGPPAS S PAPAAPK	1	0.13	0.16	0.34	0.27	0.38

### 4.3 AUSBLICK

Anhand des bereits vergleichsweise gut untersuchten Modells der LPA-induzierten Signaltransduktion konnte das enorme Potential hochauflösender, quantitativer Massenspektrometrie zur globalen Analyse komplexer zellulärer Signalwege dargestellt werden. Die vorliegenden Untersuchungen sind derzeit die umfassendste zusammenhängende Ressource für LPA-abhängige Phosphorylierungsereignisse in humanen Zellen. Diese hypothesenfreien Analysen wiesen auf die Beteiligung einer Vielzahl bislang nicht oder nur mittelbar mit der LPA-abhängigen Signaltransduktion in Verbindung gebrachter zellulärer Komponenten hin.

Die in dieser Arbeit eingesetzten massenspektrometrischen Methoden bergen insbesondere in Kombination mit geeigneten Fraktionierungs- und Anreicherungsmethoden enormes Potential für die Erforschung weiterer zellulärer Signalsysteme und somit für das grundlegende Verständnis der koordinierten Regulation physiologischer wie auch pathophysiologischer Vorgänge. Die selektive Anreicherung interessierender Proteinklassen, wie z. B. Proteinkinasen mittels Affinitäsmatrices, ist insbesondere für gezielte Phosphorylierungsanalysen hilfreich. Mittels quantitativer Bindungsstudien und Kompetitionsexperimenten können zudem die zellulären Interaktoren immobilisierter *small molecule* Enzym-Inhibitoren bestimmt werden. Diese Anwendung könnte in Zukunft die pharmakologische Charakterisierung neuer, wie auch bereits bekannter Inhibitoren vereinfachen und gegebenenfalls zur Identifikation

erweiterter Anwendungsgebiete oder Vorhersage potentieller Nebenwirkungen beitragen.

Technologische Fortschritte auf dem Gebiet der Massenspektrometrie dürften in Zukunft zu kürzeren cycletimes und damit schnelleren Analysen beitragen. Vor diesem Hintergrund dürfte gerade auch der erfolgreichen Weiterentwicklung schneller chromatographischer Trennverfahren wie der *Ultra High Pressure Liquid Chromatography* (uHPLC) oder alternativer Flüssigphasen-basierter Methoden wie der *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography* (HILIC) eine entscheidende Rolle zukommen. Mit der Einführung standardisierter Prozesse und sinkenden Investitionskosten für die instrumentelle Ausstattung ist von einer Zunahme massenspektrometrischer Methoden auch im klinischen Umfeld auszugehen. Als Folge sind quasi-routinemäßige (Phospho-)Proteom Untersuchungen klinischer Proben zum Zweck der Tumorprofilierung oder Biomarkeridentifikation, aber auch zur experimentellen Therapieverfolgung (*Monitoring*) denkbar. (Phospho-) Proteomweite Analysen im Rahmen von groß angelegten Früherkennungsuntersuchungen scheinen zum jetzigen Zeitpunkt weder sinnvoll noch durchführbar. Aufgrund der im Vergleich zu immunologischen Methoden geringeren Detektionssensitivität, der benötigten, technisch aufwändigen Infrastruktur und dem verhältnismäßig geringen Probendurchsatz wird die praktische Anwendung MS-basierter Methoden voraussichtlich auf die Forschung und Entwicklung beschränkt bleiben. In diesem Feld dürfte der (Phospho-) Proteomik jedoch eine wachsende Bedeutung zukommen. Es bleibt letztendlich abzuwarten ob und in welchem Umfang das Potential der beschriebenen Technologie in der Praxis zur Identifikation robuster Biomarker oder neuer Ansatzpunkte für die (individualisierte) pharmakologische / biologische Intervention mit pathologischen Prozessen führt.

# 5 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst mit Hilfe quantitativer und semi-quantitativer massenspektrometrischer Verfahren optimierte Methoden zur Klassen-selektiven Anreicherung von Proteinkinasen entwickelt. Die etablierte Anreicherungsmethode wurde anschließend für die quantitative Analyse zellulärer Phosphorylierungsnetzwerke in einem Nierenkarzinom-Zellsystem (A498) verwendet. Der Schwerpunkt dieser Untersuchung lag auf der Komplettierung systemweiter Substrat-Phosphorylierungsdaten mit Informationen zur phosphorylierungsabhängigen Regulation von Proteinkinasen. Diese Analyse diente der differentiellen Untersuchung LPA- und HB-EGF-vermittelter Phosphorylierungsnetzwerke in einem Modell ausgeglichener EGFR-Aktivierung. LPA induzierte in diesem System vor allem die Phosphorylierung von Komponenten der Zellmigration und –adhäsion. Die differentiell durch LPA, aber nicht durch HB-EGF, aktivierte Protein Tyrosinkinase TEC konnte als Element der LPA-abhängigen Zellmigration identifiziert und validiert werden. Anschließend wurden die LPA-induzierten Phosphorylierungsereignisse umfassend auf globaler Ebene und mit zeitlicher Auflösung in Plattenepithel-Karzinomzellen (SCC-9) untersucht. In diesen Analysen konnte das zelluläre Phosphoproteom durch verbesserte Phosphopeptid-Fraktionierung und –anreicherung mit einer bislang unübertroffenen Abdeckung erfasst werden. In diesem System wurde ein komplex reguliertes Phosphorylierungsnetzwerk aus G-Protein-Regulatoren, Transkriptionsfaktoren, Modulatoren der Chromatin Architektur und Elementen der Splicing- und Translationsmaschinerie beobachtet. Darüber hinaus wurden Zeitprofil-spezifische Phosphorylierungsmotive identifiziert. Aus der komparativen Gegenüberstellung der Datensätze ergaben sich bemerkenswerte Homologien, aber auch punktuelle Differenzen der frühen LPA-Signaltransduktion in zwei Zellsystemen unterschiedlichen Ursprungs.

Umfassende quantitative und hypothesenfreie Phosphoproteom-Analysen bergen das Potential zur Identifikation bislang unbekannter Schlüsselkomponenten in komplexen Signalsystemen mit Implikationen in pathophysiologischen Prozessen und könnten dadurch maßgeblich zur Entwicklung neuer pharmakologischer oder biologischer Interventionsstrategien beitragen.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

- Alaimo, P. J., M. A. Shogren-Knaak, et al. (2001). "Chemical genetic approaches for the elucidation of signaling pathways." *Curr Opin Chem Biol* **5**(4): 360-367.
- Amour, A., P. M. Slocombe, et al. (1998). "TNF-alpha converting enzyme (TACE) is inhibited by TIMP-3." *FEBS Lett* **435**(1): 39-44.
- An, S., T. Bleu, et al. (1998). "Characterization of a novel subtype of human G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid." *J Biol Chem* **273**(14): 7906-7910.
- Anders, A., S. Gilbert, et al. (2001). "Regulation of the alpha-secretase ADAM10 by its prodomain and proprotein convertases." *Faseb J* **15**(10): 1837-1839.
- Andre, F., N. E. Scharz, et al. (2002). "Malignant effusions and immunogenic tumour-derived exosomes." *Lancet* **360**(9329): 295-305.
- Anliker, B. and J. Chun (2004). "Lysophospholipid G protein-coupled receptors." *J Biol Chem* **279**(20): 20555-20558.
- Aoki, N., S. Ueno, et al. (2004). "Mutual regulation of protein-tyrosine phosphatase 20 and protein-tyrosine kinase Tec activities by tyrosine phosphorylation and dephosphorylation." *J Biol Chem* **279**(11): 10765-10775.
- Ballif, B. A., J. Villen, et al. (2004). "Phosphoproteomic analysis of the developing mouse brain." *Mol Cell Proteomics* **3**(11): 1093-1101.
- Bando, H., T. Atsumi, et al. (2005). "Phosphorylation of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase/PFKFB3 family of glycolytic regulators in human cancer." *Clin Cancer Res* **11**(16): 5784-5792.
- Bandoh, K., J. Aoki, et al. (1999). "Molecular cloning and characterization of a novel human G-protein-coupled receptor, EDG7, for lysophosphatidic acid." *J Biol Chem* **274**(39): 27776-27785.
- Bandoh, K., J. Aoki, et al. (2000). "Lysophosphatidic acid (LPA) receptors of the EDG family are differentially activated by LPA species. Structure-activity relationship of cloned LPA receptors." *FEBS Lett* **478**(1-2): 159-165.
- Bantscheff, M., M. Boesche, et al. (2008). "Robust and sensitive iTRAQ quantification on an LTQ Orbitrap mass spectrometer." *Mol Cell Proteomics* **7**(9): 1702-1713.
- Bantscheff, M., D. Eberhard, et al. (2007). "Quantitative chemical proteomics reveals mechanisms of action of clinical ABL kinase inhibitors." *Nat Biotechnol* **25**(9): 1035-1044.
- Beamish, H., L. de Boer, et al. (2009). "Cyclin A/cdk2 regulates adenomatous polyposis coli-dependent mitotic spindle anchoring." *J Biol Chem* **284**(42): 29015-29023.
- Beausoleil, S. A., M. Jedrychowski, et al. (2004). "Large-scale characterization of HeLa cell nuclear phosphoproteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(33): 12130-12135.
- Benjamin, D., M. Schmidlin, et al. (2006). "BRF1 protein turnover and mRNA decay activity are regulated by protein kinase B at the same phosphorylation sites." *Mol Cell Biol* **26**(24): 9497-9507.
- Bennett, K. L., D. G. Jackson, et al. (1995). "CD44 isoforms containing exon V3 are responsible for the presentation of heparin-binding growth factor." *J Cell Biol* **128**(4): 687-698.
- Benschop, J. J., S. Mohammed, et al. (2007). "Quantitative phosphoproteomics of early elicitor signaling in Arabidopsis." *Mol Cell Proteomics* **6**(7): 1198-1214.
- Beynon, R. J. and J. M. Pratt (2005). "Metabolic labeling of proteins for proteomics." *Mol Cell Proteomics* **4**(7): 857-872.
- Blagoev, B., S. E. Ong, et al. (2004). "Temporal analysis of phosphotyrosine-dependent signaling networks by quantitative proteomics." *Nat Biotechnol* **22**(9): 1139-1145.

- Blume-Jensen, P. and T. Hunter (2001). "Oncogenic kinase signalling." Nature **411**(6835): 355-365.
- Bodenmiller, B., J. Malmstrom, et al. (2007). "PhosphoPep--a phosphoproteome resource for systems biology research in Drosophila Kc167 cells." Mol Syst Biol **3**: 139.
- Bodenmiller, B., L. N. Mueller, et al. (2007). "Reproducible isolation of distinct, overlapping segments of the phosphoproteome." Nat Methods **4**(3): 231-237.
- Boettcher, J. M., K. L. Hartman, et al. (2008). "Membrane-induced folding of the cAMP-regulated phosphoprotein endosulfine- $\alpha$ ." Biochemistry **47**(47): 12357-12364.
- Borisov, N., E. Aksamitiene, et al. (2009). "Systems-level interactions between insulin-EGF networks amplify mitogenic signaling." Mol Syst Biol **5**: 256.
- Bose, R., H. Molina, et al. (2006). "Phosphoproteomic analysis of Her2/neu signaling and inhibition." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(26): 9773-9778.
- Brehmer, D., Z. Greff, et al. (2005). "Cellular targets of gefitinib." Cancer Res **65**(2): 379-382.
- Cantin, G. T., J. D. Venable, et al. (2006). "Quantitative phosphoproteomic analysis of the tumor necrosis factor pathway." J Proteome Res **5**(1): 127-134.
- Cao, L., K. Yu, et al. (2007). "Quantitative time-resolved phosphoproteomic analysis of mast cell signaling." J Immunol **179**(9): 5864-5876.
- Cao, X., A. Tay, et al. (1996). "Activation and association of Stat3 with Src in v-Src-transformed cell lines." Mol Cell Biol **16**(4): 1595-1603.
- Carmeliet, P., L. Moons, et al. (1997). "Urokinase-generated plasmin activates matrix metalloproteinases during aneurysm formation." Nat Genet **17**(4): 439-444.
- Chan, S. M., J. Ermann, et al. (2004). "Protein microarrays for multiplex analysis of signal transduction pathways." Nat Med **10**(12): 1390-1396.
- Clegg, G. A. and M. Dole (1971). "Molecular beams of macroions. 3. Zein and polyvinylpyrrolidone." Biopolymers **10**(5): 821-826.
- Collins, M. O., L. Yu, et al. (2005). "Proteomic analysis of in vivo phosphorylated synaptic proteins." J Biol Chem **280**(7): 5972-5982.
- Cote, C. A., D. Gautreau, et al. (1999). "A Xenopus protein related to hnRNP I has a role in cytoplasmic RNA localization." Mol Cell **4**(3): 431-437.
- Cox, J. and M. Mann (2008). "MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification." Nat Biotechnol.
- Cui, Y., Y. C. Liao, et al. (2004). "Epidermal growth factor modulates tyrosine phosphorylation of a novel tensin family member, tensin3." Mol Cancer Res **2**(4): 225-232.
- Cuniasse, P., L. Devel, et al. (2005). "Future challenges facing the development of specific active-site-directed synthetic inhibitors of MMPs." Biochimie **87**(3-4): 393-402.
- Cutillas, P. R., B. Geering, et al. (2005). "Quantification of gel-separated proteins and their phosphorylation sites by LC-MS using unlabeled internal standards: analysis of phosphoprotein dynamics in a B cell lymphoma cell line." Mol Cell Proteomics **4**(8): 1038-1051.
- Daub, H., J. V. Olsen, et al. (2008). "Kinase-selective enrichment enables quantitative phosphoproteomics of the kinome across the cell cycle." Mol Cell **31**(3): 438-448.
- Daub, H., C. Wallasch, et al. (1997). "Signal characteristics of G protein-transactivated EGF receptor." Embo J **16**(23): 7032-7044.

- Daub, H., F. U. Weiss, et al. (1996). "Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors." *Nature* **379**(6565): 557-560.
- De Meyts, P. and J. Whittaker (2002). "Structural biology of insulin and IGF1 receptors: implications for drug design." *Nat Rev Drug Discov* **1**(10): 769-783.
- Dequiedt, F., H. Kasler, et al. (2003). "HDAC7, a thymus-specific class II histone deacetylase, regulates Nur77 transcription and TCR-mediated apoptosis." *Immunity* **18**(5): 687-698.
- Dequiedt, F., J. Van Lint, et al. (2005). "Phosphorylation of histone deacetylase 7 by protein kinase D mediates T cell receptor-induced Nur77 expression and apoptosis." *J Exp Med* **201**(5): 793-804.
- Desai, B., T. Ma, et al. (2009). "Characterization of the expression of variant and standard CD44 in prostate cancer cells: identification of the possible molecular mechanism of CD44/MMP9 complex formation on the cell surface." *J Cell Biochem* **108**(1): 272-284.
- Deuss, M., K. Reiss, et al. (2008). "Part-time alpha-secretases: the functional biology of ADAM 9, 10 and 17." *Curr Alzheimer Res* **5**(2): 187-201.
- Diaz-Rodriguez, E., J. C. Montero, et al. (2002). "Extracellular signal-regulated kinase phosphorylates tumor necrosis factor alpha-converting enzyme at threonine 735: a potential role in regulated shedding." *Mol Biol Cell* **13**(6): 2031-2044.
- Ding, S. J., Y. Wang, et al. (2008). "Quantitative phosphoproteome analysis of lysophosphatidic acid induced chemotaxis applying dual-step (18)O labeling coupled with immobilized metal-ion affinity chromatography." *J Proteome Res* **7**(10): 4215-4224.
- Dole, M., L. L. Mach, et al. (1968). *Chem. Phys.* **49**(2240).
- Dutt, P., N. Nguyen, et al. (2004). "Role of Lbc RhoGEF in Galpha12/13-induced signals to Rho GTPase." *Cell Signal* **16**(2): 201-209.
- Egeblad, M. and Z. Werb (2002). "New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression." *Nat Rev Cancer* **2**(3): 161-174.
- Elias, J. E. and S. P. Gygi (2007). "Target-decoy search strategy for increased confidence in large-scale protein identifications by mass spectrometry." *Nat Methods* **4**(3): 207-214.
- Elias, J. E., W. Haas, et al. (2005). "Comparative evaluation of mass spectrometry platforms used in large-scale proteomics investigations." *Nat Methods* **2**(9): 667-675.
- Endo, A., K. Nagashima, et al. (2002). "Sphingosine 1-phosphate induces membrane ruffling and increases motility of human umbilical vein endothelial cells via vascular endothelial growth factor receptor and CrkII." *J Biol Chem* **277**(26): 23747-23754.
- Faivre, S., G. Demetri, et al. (2007). "Molecular basis for sunitinib efficacy and future clinical development." *Nat Rev Drug Discov* **6**(9): 734-745.
- Feng, S., M. Ye, et al. (2007). "Immobilized zirconium ion affinity chromatography for specific enrichment of phosphopeptides in phosphoproteome analysis." *Mol Cell Proteomics* **6**(9): 1656-1665.
- Fenn, J. B., M. Mann, et al. (1989). "Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules." *Science* **246**(4926): 64-71.
- Ferguson, K. M., M. B. Berger, et al. (2003). "EGF activates its receptor by removing interactions that autoinhibit ectodomain dimerization." *Mol Cell* **11**(2): 507-517.
- Ficarro, S., O. Chertihin, et al. (2003). "Phosphoproteome analysis of capacitated human sperm. Evidence of tyrosine phosphorylation of a kinase-anchoring protein 3 and valosin-containing protein/p97 during capacitation." *J Biol Chem* **278**(13): 11579-11589.

- Ficarro, S. B., M. L. McClelland, et al. (2002). "Phosphoproteome analysis by mass spectrometry and its application to *Saccharomyces cerevisiae*." Nat Biotechnol **20**(3): 301-305.
- Fierro-Monti, I., S. Mohammed, et al. (2006). "Quantitative proteomics identifies Gemin5, a scaffolding protein involved in ribonucleoprotein assembly, as a novel partner for eukaryotic initiation factor 4E." J Proteome Res **5**(6): 1367-1378.
- Fischer, J. J., O. Y. Graebner Baessler, et al. (2010). "Comprehensive identification of staurosporine-binding kinases in the hepatocyte cell line HepG2 using Capture Compound Mass Spectrometry (CCMS)." J Proteome Res **9**(2): 806-817.
- Fischer, O. M., S. Hart, et al. (2003). "EGFR signal transactivation in cancer cells." Biochem Soc Trans **31**(Pt 6): 1203-1208.
- Fischer, O. M., S. Streit, et al. (2003). "Beyond Herceptin and Gleevec." Curr Opin Chem Biol **7**(4): 490-495.
- Foster, L. J., C. L. De Hoog, et al. (2003). "Unbiased quantitative proteomics of lipid rafts reveals high specificity for signaling factors." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(10): 5813-5818.
- Fourcade, O., M. F. Simon, et al. (1995). "Secretory phospholipase A2 generates the novel lipid mediator lysophosphatidic acid in membrane microvesicles shed from activated cells." Cell **80**(6): 919-927.
- Fridman, J. S., E. Caulder, et al. (2007). "Selective inhibition of ADAM metalloproteases as a novel approach for modulating ErbB pathways in cancer." Clin Cancer Res **13**(6): 1892-1902.
- Fukuhara, S., H. Chikumi, et al. (2000). "Leukemia-associated Rho guanine nucleotide exchange factor (LARG) links heterotrimeric G proteins of the G(12) family to Rho." FEBS Lett **485**(2-3): 183-188.
- Garton, K. J., P. J. Gough, et al. (2006). "Emerging roles for ectodomain shedding in the regulation of inflammatory responses." J Leukoc Biol **79**(6): 1105-1116.
- Geiger, B., A. Bershadsky, et al. (2001). "Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix--cytoskeleton crosstalk." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(11): 793-805.
- Gerber, S. A., J. Rush, et al. (2003). "Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(12): 6940-6945.
- Gilpin, B. J., F. Loechel, et al. (1998). "A novel, secreted form of human ADAM 12 (meltrin alpha) provokes myogenesis in vivo." J Biol Chem **273**(1): 157-166.
- Ginestra, A., D. Miceli, et al. (1999). "Membrane vesicles in ovarian cancer fluids: a new potential marker." Anticancer Res **19**(4C): 3439-3445.
- Gomez, D. E., D. F. Alonso, et al. (1997). "Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions." Eur J Cell Biol **74**(2): 111-122.
- Gorrin-Rivas, M. J., S. Arii, et al. (2000). "Mouse macrophage metalloelastase gene transfer into a murine melanoma suppresses primary tumor growth by halting angiogenesis." Clin Cancer Res **6**(5): 1647-1654.
- Goss, V. L., K. A. Lee, et al. (2006). "A common phosphotyrosine signature for the Bcr-Abl kinase." Blood **107**(12): 4888-4897.
- Gotoh, N., A. Tojo, et al. (1992). "A highly conserved tyrosine residue at codon 845 within the kinase domain is not required for the transforming activity of human epidermal growth factor receptor." Biochem Biophys Res Commun **186**(2): 768-774.
- Goulimari, P., T. M. Kitzing, et al. (2005). "Galpha12/13 is essential for directed cell migration and localized Rho-Dial function." J Biol Chem **280**(51): 42242-42251.

- Griffin, T. J., H. Xie, et al. (2007). "iTRAQ reagent-based quantitative proteomic analysis on a linear ion trap mass spectrometer." *J Proteome Res* **6**(11): 4200-4209.
- Grohmanova, K., D. Schlaepfer, et al. (2004). "Phosphorylation of IQGAP1 modulates its binding to Cdc42, revealing a new type of rho-GTPase regulator." *J Biol Chem* **279**(47): 48495-48504.
- Gronborg, M., T. Z. Kristiansen, et al. (2002). "A mass spectrometry-based proteomic approach for identification of serine/threonine-phosphorylated proteins by enrichment with phospho-specific antibodies: identification of a novel protein, Frigg, as a protein kinase A substrate." *Mol Cell Proteomics* **1**(7): 517-527.
- Gruhler, A., J. V. Olsen, et al. (2005). "Quantitative phosphoproteomics applied to the yeast pheromone signaling pathway." *Mol Cell Proteomics* **4**(3): 310-327.
- Gschwind, A., S. Hart, et al. (2003). "TACE cleavage of proamphiregulin regulates GPCR-induced proliferation and motility of cancer cells." *Embo J* **22**(10): 2411-2421.
- Hao, F., M. Tan, et al. (2007). "Lysophosphatidic acid induces prostate cancer PC3 cell migration via activation of LPA(1), p42 and p38alpha." *Biochim Biophys Acta* **1771**(7): 883-892.
- Hart, M. J., X. Jiang, et al. (1998). "Direct stimulation of the guanine nucleotide exchange activity of p115 RhoGEF by Galpha13." *Science* **280**(5372): 2112-2114.
- Hecht, J. H., J. A. Weiner, et al. (1996). "Ventricular zone gene-1 (vzg-1) encodes a lysophosphatidic acid receptor expressed in neurogenic regions of the developing cerebral cortex." *J Cell Biol* **135**(4): 1071-1083.
- Heesom, K. J., A. Gampel, et al. (2001). "Cell cycle-dependent phosphorylation of the translational repressor eIF-4E binding protein-1 (4E-BP1)." *Curr Biol* **11**(17): 1374-1379.
- Herrlich, A., H. Daub, et al. (1998). "Ligand-independent activation of platelet-derived growth factor receptor is a necessary intermediate in lysophosphatidic, acid-stimulated mitogenic activity in L cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(15): 8985-8990.
- Hinsby, A. M., J. V. Olsen, et al. (2004). "Tyrosine phosphoproteomics of fibroblast growth factor signaling: a role for insulin receptor substrate-4." *J Biol Chem* **279**(45): 46438-46447.
- Hirabayashi, A., M. Furukawa, et al. (2009). "Probe for label-free quantitative analysis in liquid chromatography/mass spectrometry." *Anal Sci* **25**(1): 67-71.
- Hoffert, J. D., T. Pisitkun, et al. (2006). "Quantitative phosphoproteomics of vasopressin-sensitive renal cells: regulation of aquaporin-2 phosphorylation at two sites." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(18): 7159-7164.
- Hu, Q., R. J. Noll, et al. (2005). "The Orbitrap: a new mass spectrometer." *J Mass Spectrom* **40**(4): 430-443.
- Huang da, W., B. T. Sherman, et al. (2007). "The DAVID Gene Functional Classification Tool: a novel biological module-centric algorithm to functionally analyze large gene lists." *Genome Biol* **8**(9): R183.
- Hunter, T. and B. M. Sefton (1980). "Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine." *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**(3): 1311-1315.
- Hynes, N. E. and H. A. Lane (2005). "ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors." *Nat Rev Cancer* **5**(5): 341-354.
- Ibarrola, N., H. Molina, et al. (2004). "A novel proteomic approach for specific identification of tyrosine kinase substrates using [<sup>13</sup>C]tyrosine." *J Biol Chem* **279**(16): 15805-15813.

- Ishdorj, G., B. A. Graham, et al. (2008). "Lysophosphatidic acid protects cancer cells from histone deacetylase (HDAC) inhibitor-induced apoptosis through activation of HDAC." *J Biol Chem* **283**(24): 16818-16829.
- Jensen, E. D., R. Gopalakrishnan, et al. (2009). "Bone morphogenic protein 2 activates protein kinase D to regulate histone deacetylase 7 localization and repression of Runx2." *J Biol Chem* **284**(4): 2225-2234.
- Jensen, L. J., M. Kuhn, et al. (2009). "STRING 8--a global view on proteins and their functional interactions in 630 organisms." *Nucleic Acids Res* **37**(Database issue): D412-416.
- Jensen, S. S. and M. R. Larsen (2007). "Evaluation of the impact of some experimental procedures on different phosphopeptide enrichment techniques." *Rapid Commun Mass Spectrom* **21**(22): 3635-3645.
- Jenssen, K., K. Sewald, et al. (2004). "Synthesis of marimastat and a marimastat conjugate for affinity chromatography and surface plasmon resonance studies." *Bioconj Chem* **15**(3): 594-600.
- Jiang, Y., W. Ma, et al. (1998). "The G protein G alpha12 stimulates Bruton's tyrosine kinase and a rasGAP through a conserved PH/BM domain." *Nature* **395**(6704): 808-813.
- Johnson, S. A. and T. Hunter (2005). "Kinomics: methods for deciphering the kinome." *Nat Methods* **2**(1): 17-25.
- Jura, N., Y. Shan, et al. (2009). "Structural analysis of the catalytically inactive kinase domain of the human EGF receptor 3." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(51): 21608-21613.
- Kang, T., H. I. Park, et al. (2002). "Autolytic processing at Glu586-Ser587 within the cysteine-rich domain of human adamalysin 19/disintegrin-metalloproteinase 19 is necessary for its proteolytic activity." *J Biol Chem* **277**(50): 48514-48522.
- Katoh, Y., H. Takemori, et al. (2006). "Silencing the constitutive active transcription factor CREB by the LKB1-SIK signaling cascade." *FEBS J* **273**(12): 2730-2748.
- Katz, M., I. Amit, et al. (2007). "A reciprocal tensin-3-cten switch mediates EGF-driven mammary cell migration." *Nat Cell Biol* **9**(8): 961-969.
- Kelly, P., P. J. Casey, et al. (2007). "Biologic functions of the G12 subfamily of heterotrimeric G proteins: growth, migration, and metastasis." *Biochemistry* **46**(23): 6677-6687.
- Kelly, P., B. J. Moeller, et al. (2006). "The G12 family of heterotrimeric G proteins promotes breast cancer invasion and metastasis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(21): 8173-8178.
- Keri, G., L. Orfi, et al. (2006). "Signal transduction therapy with rationally designed kinase inhibitors." *Current Signal Transduction Therapy* **1**(1): 67-95.
- King, F. W., J. Skeen, et al. (2004). "Inhibition of Chk1 by activated PKB/Akt." *Cell Cycle* **3**(5): 634-637.
- Kirkpatrick, D. S., S. A. Gerber, et al. (2005). "The absolute quantification strategy: a general procedure for the quantification of proteins and post-translational modifications." *Methods* **35**(3): 265-273.
- Kishi, Y., S. Okudaira, et al. (2006). "Autotaxin is overexpressed in glioblastoma multiforme and contributes to cell motility of glioblastoma by converting lysophosphatidylcholine to lysophosphatidic acid." *J Biol Chem* **281**(25): 17492-17500.
- Kitani, T., S. Okuno, et al. (2001). "Regulation of Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase kinase alpha by cAMP-dependent protein kinase: II. Mutational analysis." *J Biochem* **130**(4): 515-525.

- Konstantinopoulos, P. A., M. V. Karamouzis, et al. (2008). "Matrix metalloproteinase inhibitors as anticancer agents." *Int J Biochem Cell Biol* **40**(6-7): 1156-1168.
- Kordowska, J., T. Hetrick, et al. (2006). "Phosphorylated I-caldesmon is involved in disassembly of actin stress fibers and postmitotic spreading." *Exp Cell Res* **312**(2): 95-110.
- Kotsis, D. H., E. M. Masko, et al. (2007). "Protein kinase A phosphorylation of the multifunctional protein CAD antagonizes activation by the MAP kinase cascade." *Mol Cell Biochem* **301**(1-2): 69-81.
- Kratchmarova, I., B. Blagoev, et al. (2005). "Mechanism of divergent growth factor effects in mesenchymal stem cell differentiation." *Science* **308**(5727): 1472-1477.
- Kruger, M., M. Moser, et al. (2008). "SILAC mouse for quantitative proteomics uncovers kindlin-3 as an essential factor for red blood cell function." *Cell* **134**(2): 353-364.
- Kweon, H. K. and K. Hakansson (2006). "Selective zirconium dioxide-based enrichment of phosphorylated peptides for mass spectrometric analysis." *Anal Chem* **78**(6): 1743-1749.
- Laird, A. D., P. Vajkoczy, et al. (2000). "SU6668 is a potent antiangiogenic and antitumor agent that induces regression of established tumors." *Cancer Res* **60**(15): 4152-4160.
- Lambert, S., H. Ameels, et al. (2008). "Internalization of EGF receptor following lipid rafts disruption in keratinocytes is delayed and dependent on p38 MAPK activation." *J Cell Physiol* **217**(3): 834-845.
- Larsen, M. R., T. E. Thingholm, et al. (2005). "Highly selective enrichment of phosphorylated peptides from peptide mixtures using titanium dioxide microcolumns." *Mol Cell Proteomics* **4**(7): 873-886.
- Le Gallic, L., D. Sgouras, et al. (1999). "Transcriptional repressor ERF is a Ras/mitogen-activated protein kinase target that regulates cellular proliferation." *Mol Cell Biol* **19**(6): 4121-4133.
- Lee, C. W., R. Rivera, et al. (2006). "GPR92 as a new G12/13- and Gq-coupled lysophosphatidic acid receptor that increases cAMP, LPA5." *J Biol Chem* **281**(33): 23589-23597.
- Lee, J., Y. Xu, et al. (2007). "Mitochondrial phosphoproteome revealed by an improved IMAC method and MS/MS/MS." *Mol Cell Proteomics* **6**(4): 669-676.
- Lekmine, F., A. Sassano, et al. (2004). "Interferon-gamma engages the p70 S6 kinase to regulate phosphorylation of the 40S S6 ribosomal protein." *Exp Cell Res* **295**(1): 173-182.
- Levkowitz, G., H. Waterman, et al. (1998). "c-Cbl/Sli-1 regulates endocytic sorting and ubiquitination of the epidermal growth factor receptor." *Genes Dev* **12**(23): 3663-3674.
- Lewis, C. A., P. A. Townsend, et al. (2001). "Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase mediates the phosphorylation of CD44 required for cell migration on hyaluronan." *Biochem J* **357**(Pt 3): 843-850.
- Li, X., S. A. Gerber, et al. (2007). "Large-scale phosphorylation analysis of alpha-factor-arrested *Saccharomyces cerevisiae*." *J Proteome Res* **6**(3): 1190-1197.
- Li, Z., D. E. McNulty, et al. (2005). "IQGAP1 promotes neurite outgrowth in a phosphorylation-dependent manner." *J Biol Chem* **280**(14): 13871-13878.
- Liu, S., M. Murph, et al. (2009). "ATX-LPA receptor axis in inflammation and cancer." *Cell Cycle* **8**(22): 3695-3701.

- Loechel, F., M. T. Overgaard, et al. (1999). "Regulation of human ADAM 12 protease by the prodomain. Evidence for a functional cysteine switch." J Biol Chem **274**(19): 13427-13433.
- Lopez-Otin, C. and L. M. Matrisian (2007). "Emerging roles of proteases in tumour suppression." Nat Rev Cancer **7**(10): 800-808.
- Lu, Z., G. Jiang, et al. (2001). "Epidermal growth factor-induced tumor cell invasion and metastasis initiated by dephosphorylation and downregulation of focal adhesion kinase." Mol Cell Biol **21**(12): 4016-4031.
- Luttrell, L. M., G. J. Della Rocca, et al. (1997). "Gbetagamma subunits mediate Src-dependent phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. A scaffold for G protein-coupled receptor-mediated Ras activation." J Biol Chem **272**(7): 4637-4644.
- Ma, Y. C., J. Huang, et al. (2000). "Src tyrosine kinase is a novel direct effector of G proteins." Cell **102**(5): 635-646.
- Maitra, S., C. F. Chou, et al. (2008). "The AU-rich element mRNA decay-promoting activity of BRF1 is regulated by mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2." RNA **14**(5): 950-959.
- Makarov, A. (2000). "Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis." Anal Chem **72**(6): 1156-1162.
- Makarov, A., E. Denisov, et al. (2006). "Dynamic range of mass accuracy in LTQ Orbitrap hybrid mass spectrometer." J Am Soc Mass Spectrom **17**(7): 977-982.
- Malchinkhuu, E., K. Sato, et al. (2005). "Role of p38 mitogen-activated kinase and c-Jun terminal kinase in migration response to lysophosphatidic acid and sphingosine-1-phosphate in glioma cells." Oncogene **24**(44): 6676-6688.
- Manning, G., D. B. Whyte, et al. (2002). "The protein kinase complement of the human genome." Science **298**(5600): 1912-1934.
- Mao, J., W. Xie, et al. (1998). "Tec/Bmx non-receptor tyrosine kinases are involved in regulation of Rho and serum response factor by Galpha12/13." Embo J **17**(19): 5638-5646.
- Marshall, A. G., C. L. Hendrickson, et al. (1998). "Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: a primer." Mass Spectrom Rev **17**(1): 1-35.
- Masuda, A., K. Nakamura, et al. (2008). "Serum autotaxin measurement in haematological malignancies: a promising marker for follicular lymphoma." Br J Haematol **143**(1): 60-70.
- Matuszewski, B. K., M. L. Constanzer, et al. (2003). "Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS." Anal Chem **75**(13): 3019-3030.
- McIntyre, T. M., A. V. Pontsler, et al. (2003). "Identification of an intracellular receptor for lysophosphatidic acid (LPA): LPA is a transcellular PPARgamma agonist." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(1): 131-136.
- Meigs, T. E., M. Fedor-Chaiken, et al. (2002). "Galpha12 and Galpha13 negatively regulate the adhesive functions of cadherin." J Biol Chem **277**(27): 24594-24600.
- Meigs, T. E., T. A. Fields, et al. (2001). "Interaction of Galpha 12 and Galpha 13 with the cytoplasmic domain of cadherin provides a mechanism for beta -catenin release." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(2): 519-524.
- Mikesh, L. M., B. Ueberheide, et al. (2006). "The utility of ETD mass spectrometry in proteomic analysis." Biochim Biophys Acta **1764**(12): 1811-1822.
- Mills, G. B. and W. H. Moolenaar (2003). "The emerging role of lysophosphatidic acid in cancer." Nat Rev Cancer **3**(8): 582-591.
- Mochizuki, S. and Y. Okada (2007). "ADAMs in cancer cell proliferation and progression." Cancer Sci **98**(5): 621-628.

- Molina, H., D. M. Horn, et al. (2007). "Global proteomic profiling of phosphopeptides using electron transfer dissociation tandem mass spectrometry." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(7): 2199-2204.
- Montel, V., J. Kleeman, et al. (2004). "Altered metastatic behavior of human breast cancer cells after experimental manipulation of matrix metalloproteinase 8 gene expression." Cancer Res **64**(5): 1687-1694.
- Moser, K. and F. M. White (2006). "Phosphoproteomic analysis of rat liver by high capacity IMAC and LC-MS/MS." J Proteome Res **5**(1): 98-104.
- Murakami, M., A. Shiraishi, et al. (2008). "Identification of the orphan GPCR, P2Y(10) receptor as the sphingosine-1-phosphate and lysophosphatidic acid receptor." Biochem Biophys Res Commun **371**(4): 707-712.
- Murphy, G. (2008). "The ADAMs: signalling scissors in the tumour microenvironment." Nat Rev Cancer **8**(12): 929-941.
- Nagano, O., D. Murakami, et al. (2004). "Cell-matrix interaction via CD44 is independently regulated by different metalloproteinases activated in response to extracellular Ca(2+) influx and PKC activation." J Cell Biol **165**(6): 893-902.
- Nagase, H. and J. F. Woessner, Jr. (1999). "Matrix metalloproteinases." J Biol Chem **274**(31): 21491-21494.
- Nam, S. W., T. Clair, et al. (2000). "Autotaxin (ATX), a potent tumor motogen, augments invasive and metastatic potential of ras-transformed cells." Oncogene **19**(2): 241-247.
- Neidlinger, N. A., S. K. Larkin, et al. (2006). "Hydrolysis of phosphatidylserine-exposing red blood cells by secretory phospholipase A2 generates lysophosphatidic acid and results in vascular dysfunction." J Biol Chem **281**(2): 775-781.
- Nguyen, S. and J. B. Fenn (2007). "Gas-phase ions of solute species from charged droplets of solutions." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(4): 1111-1117.
- Niu, J., R. Vaiskunaite, et al. (2001). "Interaction of heterotrimeric G13 protein with an A-kinase-anchoring protein 110 (AKAP110) mediates cAMP-independent PKA activation." Curr Biol **11**(21): 1686-1690.
- Noguchi, K., S. Ishii, et al. (2003). "Identification of p2y9/GPR23 as a novel G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid, structurally distant from the Edg family." J Biol Chem **278**(28): 25600-25606.
- Nousiainen, M., H. H. Sillje, et al. (2006). "Phosphoproteome analysis of the human mitotic spindle." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(14): 5391-5396.
- Nuhse, T. S., A. R. Bottrill, et al. (2007). "Quantitative phosphoproteomic analysis of plasma membrane proteins reveals regulatory mechanisms of plant innate immune responses." Plant J **51**(5): 931-940.
- Oda, Y., K. Huang, et al. (1999). "Accurate quantitation of protein expression and site-specific phosphorylation." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(12): 6591-6596.
- Ogiso, H., R. Ishitani, et al. (2002). "Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains." Cell **110**(6): 775-787.
- Olayioye, M. A., D. Graus-Porta, et al. (1998). "ErbB-1 and ErbB-2 acquire distinct signaling properties dependent upon their dimerization partner." Mol Cell Biol **18**(9): 5042-5051.
- Olsen, J. V., B. Blagoev, et al. (2006). "Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks." Cell **127**(3): 635-648.
- Olsen, J. V., L. M. de Godoy, et al. (2005). "Parts per million mass accuracy on an Orbitrap mass spectrometer via lock mass injection into a C-trap." Mol Cell Proteomics **4**(12): 2010-2021.

- Olsen, J. V., B. Macek, et al. (2007). "Higher-energy C-trap dissociation for peptide modification analysis." *Nat Methods* **4**(9): 709-712.
- Olsen, J. V. and M. Mann (2004). "Improved peptide identification in proteomics by two consecutive stages of mass spectrometric fragmentation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(37): 13417-13422.
- Olsen, J. V., M. Vermeulen, et al. (2010). "Quantitative phosphoproteomics reveals widespread full phosphorylation site occupancy during mitosis." *Sci Signal* **3**(104): ra3.
- Ong, S. E., B. Blagoev, et al. (2002). "Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics." *Mol Cell Proteomics* **1**(5): 376-386.
- Ong, S. E. and M. Mann (2005). "Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative." *Nat Chem Biol* **1**(5): 252-262.
- Ong, S. E. and M. Mann (2006). "A practical recipe for stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC)." *Nat Protoc* **1**(6): 2650-2660.
- Ong, S. E., G. Mittler, et al. (2004). "Identifying and quantifying in vivo methylation sites by heavy methyl SILAC." *Nat Methods* **1**(2): 119-126.
- Oppermann, F. S., F. Gnad, et al. (2009). "Large-scale proteomics analysis of the human kinome." *Mol Cell Proteomics* **8**(7): 1751-1764.
- Pai, R., B. Soreghan, et al. (2002). "Prostaglandin E2 transactivates EGF receptor: a novel mechanism for promoting colon cancer growth and gastrointestinal hypertrophy." *Nat Med* **8**(3): 289-293.
- Palamarchuk, A., A. Efanov, et al. (2005). "Akt phosphorylates and regulates Pcd4 tumor suppressor protein." *Cancer Res* **65**(24): 11282-11286.
- Parra, M., H. Kasler, et al. (2005). "Protein kinase D1 phosphorylates HDAC7 and induces its nuclear export after T-cell receptor activation." *J Biol Chem* **280**(14): 13762-13770.
- Pawson, T. and P. Nash (2003). "Assembly of cell regulatory systems through protein interaction domains." *Science* **300**(5618): 445-452.
- Peck, D. and C. M. Isacke (1998). "Hyaluronan-dependent cell migration can be blocked by a CD44 cytoplasmic domain peptide containing a phosphoserine at position 325." *J Cell Sci* **111** ( Pt 11): 1595-1601.
- Perfetti, A., F. Oriente, et al. (2007). "Phorbol esters induce intracellular accumulation of the anti-apoptotic protein PED/PEA-15 by preventing ubiquitinylation and proteasomal degradation." *J Biol Chem* **282**(12): 8648-8657.
- Petti, F., A. Thelemann, et al. (2005). "Temporal quantitation of mutant Kit tyrosine kinase signaling attenuated by a novel thiophene kinase inhibitor OSI-930." *Mol Cancer Ther* **4**(8): 1186-1197.
- Pierce, A., R. D. Unwin, et al. (2007). "Eight-channel iTRAQ enables comparison of the activity of 6 leukaemogenic tyrosine kinases." *Mol Cell Proteomics*.
- Pierce, K. L., A. Tohgo, et al. (2001). "Epidermal growth factor (EGF) receptor-dependent ERK activation by G protein-coupled receptors: a co-culture system for identifying intermediates upstream and downstream of heparin-binding EGF shedding." *J Biol Chem* **276**(25): 23155-23160.
- Pinkse, M. W., S. Mohammed, et al. (2007). "Highly Robust, Automated, and Sensitive Online TiO<sub>2</sub>-Based Phosphoproteomics Applied To Study Endogenous Phosphorylation in *Drosophila melanogaster*." *J Proteome Res*.
- Pinkse, M. W., P. M. Uitto, et al. (2004). "Selective isolation at the femtomole level of phosphopeptides from proteolytic digests using 2D-NanoLC-ESI-MS/MS and titanium oxide precolumns." *Anal Chem* **76**(14): 3935-3943.

- Posewitz, M. C. and P. Tempst (1999). "Immobilized gallium(III) affinity chromatography of phosphopeptides." Anal Chem **71**(14): 2883-2892.
- Powell, R. M., J. Wicks, et al. (2004). "The splicing and fate of ADAM33 transcripts in primary human airways fibroblasts." Am J Respir Cell Mol Biol **31**(1): 13-21.
- Pozuelo Rubio, M., M. Peggie, et al. (2003). "14-3-3s regulate fructose-2,6-bisphosphate levels by binding to PKB-phosphorylated cardiac fructose-2,6-bisphosphate kinase/phosphatase." Embo J **22**(14): 3514-3523.
- Prenzel, N., E. Zwick, et al. (1999). "EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF." Nature **402**(6764): 884-888.
- Quintas-Cardama, A., H. Kantarjian, et al. (2007). "Flying under the radar: the new wave of BCR-ABL inhibitors." Nat Rev Drug Discov **6**(10): 834-848.
- Radeff-Huang, J., T. M. Seasholtz, et al. (2004). "G protein mediated signaling pathways in lysophospholipid induced cell proliferation and survival." J Cell Biochem **92**(5): 949-966.
- Reinheckel, T., S. Hagemann, et al. (2005). "The lysosomal cysteine protease cathepsin L regulates keratinocyte proliferation by control of growth factor recycling." J Cell Sci **118**(Pt 15): 3387-3395.
- Reynolds, A. R., C. Tischer, et al. (2003). "EGFR activation coupled to inhibition of tyrosine phosphatases causes lateral signal propagation." Nat Cell Biol **5**(5): 447-453.
- Roelle, S., R. Grosse, et al. (2003). "Matrix metalloproteinases 2 and 9 mediate epidermal growth factor receptor transactivation by gonadotropin-releasing hormone." J Biol Chem **278**(47): 47307-47318.
- Roepstorff, P. and J. Fohlman (1984). "Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides." Biomed Mass Spectrom **11**(11): 601.
- Roghani, M., J. D. Becherer, et al. (1999). "Metalloprotease-disintegrin MDC9: intracellular maturation and catalytic activity." J Biol Chem **274**(6): 3531-3540.
- Rosemurgy, A., J. Harris, et al. (1999). "Marimastat in patients with advanced pancreatic cancer: a dose-finding study." Am J Clin Oncol **22**(3): 247-252.
- Roux, P. P., D. Shahbazian, et al. (2007). "RAS/ERK signaling promotes site-specific ribosomal protein S6 phosphorylation via RSK and stimulates cap-dependent translation." J Biol Chem **282**(19): 14056-14064.
- Sabourin, L. A., K. Tamai, et al. (2000). "Caspase 3 cleavage of the Ste20-related kinase SLK releases and activates an apoptosis-inducing kinase domain and an actin-disassembling region." Mol Cell Biol **20**(2): 684-696.
- Saksela, O., D. Moscatelli, et al. (1988). "Endothelial cell-derived heparan sulfate binds basic fibroblast growth factor and protects it from proteolytic degradation." J Cell Biol **107**(2): 743-751.
- Salomon, A. R., S. B. Ficarro, et al. (2003). "Profiling of tyrosine phosphorylation pathways in human cells using mass spectrometry." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(2): 443-448.
- Sastry, K. S., Y. Karpova, et al. (2006). "Epidermal growth factor protects prostate cancer cells from apoptosis by inducing BAD phosphorylation via redundant signaling pathways." J Biol Chem **281**(37): 27367-27377.
- Savinov, A. Y., A. G. Remacle, et al. (2006). "Matrix metalloproteinase 26 proteolysis of the NH2-terminal domain of the estrogen receptor beta correlates with the survival of breast cancer patients." Cancer Res **66**(5): 2716-2724.
- Schafer, B., A. Gschwind, et al. (2004). "Multiple G-protein-coupled receptor signals converge on the epidermal growth factor receptor to promote migration and invasion." Oncogene **23**(4): 991-999.

- Schafer, B., B. Marg, et al. (2004). "Distinct ADAM metalloproteinases regulate G protein-coupled receptor-induced cell proliferation and survival." J Biol Chem **279**(46): 47929-47938.
- Schlessinger, J. (2000). "Cell signaling by receptor tyrosine kinases." Cell **103**(2): 211-225.
- Schlessinger, J. and M. A. Lemmon (2003). "SH2 and PTB domains in tyrosine kinase signaling." Sci STKE **2003**(191): RE12.
- Schreiber, T. B., N. Mausbacher, et al. (2008). "Quantitative phosphoproteomics--an emerging key technology in signal-transduction research." Proteomics **8**(21): 4416-4432.
- Schroeder, M. J., J. Shabanowitz, et al. (2004). "A neutral loss activation method for improved phosphopeptide sequence analysis by quadrupole ion trap mass spectrometry." Anal Chem **76**(13): 3590-3598.
- Schwartz, D. and S. P. Gygi (2005). "An iterative statistical approach to the identification of protein phosphorylation motifs from large-scale data sets." Nat Biotechnol **23**(11): 1391-1398.
- Sciorra, V. A. and A. J. Morris (2002). "Roles for lipid phosphate phosphatases in regulation of cellular signaling." Biochim Biophys Acta **1582**(1-3): 45-51.
- Senko, M. W., J. D. Canterbury, et al. (1996). "A high-performance modular data system for Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry." Rapid Commun Mass Spectrom **10**(14): 1839-1844.
- Sgouras, D. N., M. A. Athanasiou, et al. (1995). "ERF: an ETS domain protein with strong transcriptional repressor activity, can suppress ets-associated tumorigenesis and is regulated by phosphorylation during cell cycle and mitogenic stimulation." Embo J **14**(19): 4781-4793.
- Shapiro, S. D. (1998). "Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: biological consequences." Curr Opin Cell Biol **10**(5): 602-608.
- Sharma, K., C. Weber, et al. (2009). "Proteomics strategy for quantitative protein interaction profiling in cell extracts." Nat Methods **6**(10): 741-744.
- Shefer, S., G. Salen, et al. (1998). "Regulation of rat hepatic 3beta-hydroxysterol delta7-reductase: substrate specificity, competitive and non-competitive inhibition, and phosphorylation/dephosphorylation." J Lipid Res **39**(12): 2471-2476.
- Shi, C. S., S. Sinnarajah, et al. (2000). "G13alpha-mediated PYK2 activation. PYK2 is a mediator of G13alpha -induced serum response element-dependent transcription." J Biol Chem **275**(32): 24470-24476.
- Silva, J. C., R. Denny, et al. (2005). "Quantitative proteomic analysis by accurate mass retention time pairs." Anal Chem **77**(7): 2187-2200.
- Silva, J. C., M. V. Gorenstein, et al. (2006). "Absolute quantification of proteins by LCMSE: a virtue of parallel MS acquisition." Mol Cell Proteomics **5**(1): 144-156.
- Smith, J. R., M. Olivier, et al. (2007). "Relative quantification of peptide phosphorylation in a complex mixture using 18O labeling." Physiol Genomics **31**(2): 357-363.
- Smolka, M. B., C. P. Albuquerque, et al. (2005). "Dynamic changes in protein-protein interaction and protein phosphorylation probed with amine-reactive isotope tag." Mol Cell Proteomics **4**(9): 1358-1369.
- Smolka, M. B., C. P. Albuquerque, et al. (2007). "Proteome-wide identification of in vivo targets of DNA damage checkpoint kinases." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(25): 10364-10369.

- Sorkin, A., C. Waters, et al. (1991). "Multiple autophosphorylation site mutations of the epidermal growth factor receptor. Analysis of kinase activity and endocytosis." J Biol Chem **266**(13): 8355-8362.
- Stambolic, V. and J. R. Woodgett (1994). "Mitogen inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta in intact cells via serine 9 phosphorylation." Biochem J **303** ( Pt 3): 701-704.
- Stappenbeck, T. S., J. A. Lamb, et al. (1994). "Phosphorylation of the desmoplakin COOH terminus negatively regulates its interaction with keratin intermediate filament networks." J Biol Chem **269**(47): 29351-29354.
- Steen, H., M. Fernandez, et al. (2003). "Phosphotyrosine mapping in Bcr/Abl oncoprotein using phosphotyrosine-specific immonium ion scanning." Mol Cell Proteomics **2**(3): 138-145.
- Steen, H., J. A. Jebanathirajah, et al. (2006). "Phosphorylation analysis by mass spectrometry: myths, facts, and the consequences for qualitative and quantitative measurements." Mol Cell Proteomics **5**(1): 172-181.
- Steen, H., J. A. Jebanathirajah, et al. (2005). "Stable isotope-free relative and absolute quantitation of protein phosphorylation stoichiometry by MS." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(11): 3948-3953.
- Steen, H., B. Kuster, et al. (2001). "Detection of tyrosine phosphorylated peptides by precursor ion scanning quadrupole TOF mass spectrometry in positive ion mode." Anal Chem **73**(7): 1440-1448.
- Steen, H., B. Kuster, et al. (2001). "Quadrupole time-of-flight versus triple-quadrupole mass spectrometry for the determination of phosphopeptides by precursor ion scanning." J Mass Spectrom **36**(7): 782-790.
- Stocker, W. and W. Bode (1995). "Structural features of a superfamily of zinc-endopeptidases: the metzincins." Curr Opin Struct Biol **5**(3): 383-390.
- Stoeck, A., S. Keller, et al. (2006). "A role for exosomes in the constitutive and stimulus-induced ectodomain cleavage of L1 and CD44." Biochem J **393**(Pt 3): 609-618.
- Stoeckli, M., P. Chaurand, et al. (2001). "Imaging mass spectrometry: a new technology for the analysis of protein expression in mammalian tissues." Nat Med **7**(4): 493-496.
- Sugiyama, N., T. Masuda, et al. (2007). "Phosphopeptide enrichment by aliphatic hydroxy acid-modified metal oxide chromatography for nano-LC-MS/MS in proteomics applications." Mol Cell Proteomics **6**(6): 1103-1109.
- Swaney, D. L., G. C. McAlister, et al. (2007). "Supplemental activation method for high-efficiency electron-transfer dissociation of doubly protonated peptide precursors." Anal Chem **79**(2): 477-485.
- Syka, J. E., J. J. Coon, et al. (2004). "Peptide and protein sequence analysis by electron transfer dissociation mass spectrometry." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(26): 9528-9533.
- Sykora, C., R. Hoffmann, et al. (2007). "Enrichment of multiphosphorylated peptides by immobilized metal affinity chromatography using Ga(III)- and Fe(III)-complexes." Protein Pept Lett **14**(5): 489-496.
- Tabata, K., K. Baba, et al. (2007). "The orphan GPCR GPR87 was deorphanized and shown to be a lysophosphatidic acid receptor." Biochem Biophys Res Commun **363**(3): 861-866.
- Takesono, A., R. Horai, et al. (2004). "Requirement for Tec kinases in chemokine-induced migration and activation of Cdc42 and Rac." Curr Biol **14**(10): 917-922.
- Tanaka, M., Y. Kishi, et al. (2004). "Prostatic acid phosphatase degrades lysophosphatidic acid in seminal plasma." FEBS Lett **571**(1-3): 197-204.

- Tang, L. Y., N. Deng, et al. (2007). "Quantitative Phosphoproteome Profiling of Wnt3a-mediated Signaling Network: Indicating the Involvement of Ribonucleoside-diphosphate Reductase M2 Subunit Phosphorylation at Residue Serine 20 in Canonical Wnt Signal Transduction." Mol Cell Proteomics **6**(11): 1952-1967.
- Tao, W. A., B. Wollscheid, et al. (2005). "Quantitative phosphoproteome analysis using a dendrimer conjugation chemistry and tandem mass spectrometry." Nat Methods **2**(8): 591-598.
- Thingholm, T. E., T. J. Jorgensen, et al. (2006). "Highly selective enrichment of phosphorylated peptides using titanium dioxide." Nat Protoc **1**(4): 1929-1935.
- Trencia, A., A. Perfetti, et al. (2003). "Protein kinase B/Akt binds and phosphorylates PED/PEA-15, stabilizing its antiapoptotic action." Mol Cell Biol **23**(13): 4511-4521.
- Trinidad, J. C., C. G. Specht, et al. (2006). "Comprehensive identification of phosphorylation sites in postsynaptic density preparations." Mol Cell Proteomics **5**(5): 914-922.
- Trinidad, J. C., A. Thalhammer, et al. (2007). "Quantitative analysis of synaptic phosphorylation and protein expression." Mol Cell Proteomics.
- Tzircotis, G., R. F. Thorne, et al. (2006). "Directional sensing of a phorbol ester gradient requires CD44 and is regulated by CD44 phosphorylation." Oncogene **25**(56): 7401-7410.
- Ubersax, J. A. and J. E. Ferrell, Jr. (2007). "Mechanisms of specificity in protein phosphorylation." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(7): 530-541.
- Umezū-Goto, M., Y. Kishi, et al. (2002). "Autotaxin has lysophospholipase D activity leading to tumor cell growth and motility by lysophosphatidic acid production." J Cell Biol **158**(2): 227-233.
- Unwin, R. D., J. R. Griffiths, et al. (2005). "Multiple reaction monitoring to identify sites of protein phosphorylation with high sensitivity." Mol Cell Proteomics **4**(8): 1134-1144.
- Valcarcel, J. and F. Gebauer (1997). "Post-transcriptional regulation: the dawn of PTB." Curr Biol **7**(11): R705-708.
- van Corven, E. J., A. Groenink, et al. (1989). "Lysophosphatidate-induced cell proliferation: identification and dissection of signaling pathways mediated by G proteins." Cell **59**(1): 45-54.
- van der Geer, P. and T. Hunter (1994). "Phosphopeptide mapping and phosphoamino acid analysis by electrophoresis and chromatography on thin-layer cellulose plates." Electrophoresis **15**(3-4): 544-554.
- Van Hoof, D., M. W. Pinkse, et al. (2007). "An experimental correction for arginine-to-proline conversion artifacts in SILAC-based quantitative proteomics." Nat Methods **4**(9): 677-678.
- Villen, J., S. A. Beausoleil, et al. (2007). "Large-scale phosphorylation analysis of mouse liver." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(5): 1488-1493.
- von Tresckow, B., K. J. Kallen, et al. (2004). "Depletion of cellular cholesterol and lipid rafts increases shedding of CD30." J Immunol **172**(7): 4324-4331.
- Voyno-Yasenetskaya, T. A., A. M. Pace, et al. (1994). "Mutant alpha subunits of G12 and G13 proteins induce neoplastic transformation of Rat-1 fibroblasts." Oncogene **9**(9): 2559-2565.
- Wallasch, C., F. U. Weiss, et al. (1995). "Heregulin-dependent regulation of HER2/neu oncogenic signaling by heterodimerization with HER3." Embo J **14**(17): 4267-4275.
- Wang, Y., S. J. Ding, et al. (2007). "Profiling signaling polarity in chemotactic cells." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(20): 8328-8333.

- Warren, C. M. and R. Landgraf (2006). "Signaling through ERBB receptors: multiple layers of diversity and control." Cell Signal **18**(7): 923-933.
- Waterman, H., I. Sabanai, et al. (1998). "Alternative intracellular routing of ErbB receptors may determine signaling potency." J Biol Chem **273**(22): 13819-13827.
- Williams, J. D., M. Flanagan, et al. (2003). "Using accurate mass electrospray ionization-time-of-flight mass spectrometry with in-source collision-induced dissociation to sequence peptide mixtures." J Chromatogr A **1020**(1): 11-26.
- Winograd-Katz, S. E. and A. Levitzki (2006). "Cisplatin induces PKB/Akt activation and p38(MAPK) phosphorylation of the EGF receptor." Oncogene **25**(56): 7381-7390.
- Wissing, J., L. Jansch, et al. (2007). "Proteomics analysis of protein kinases by target class-selective prefractionation and tandem mass spectrometry." Mol Cell Proteomics **6**(3): 537-547.
- Wobus, M., R. Rangwala, et al. (2002). "CD44 associates with EGFR and erbB2 in metastasizing mammary carcinoma cells." Appl Immunohistochem Mol Morphol **10**(1): 34-39.
- Woo, M. S., Y. Ohta, et al. (2004). "Ribosomal S6 kinase (RSK) regulates phosphorylation of filamin A on an important regulatory site." Mol Cell Biol **24**(7): 3025-3035.
- Wu, S. L., A. F. Huhmer, et al. (2007). "On-line LC-MS approach combining collision-induced dissociation (CID), electron-transfer dissociation (ETD), and CID of an isolated charge-reduced species for the trace-level characterization of proteins with post-translational modifications." J Proteome Res **6**(11): 4230-4244.
- Xie, J., J. A. Lee, et al. (2003). "Protein kinase A phosphorylation modulates transport of the polypyrimidine tract-binding protein." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(15): 8776-8781.
- Yan, D. and V. M. Olkkonen (2008). "Characteristics of oxysterol binding proteins." Int Rev Cytol **265**: 253-285.
- Yanagida, K., K. Masago, et al. (2009). "Identification and characterization of a novel lysophosphatidic acid receptor, p2y5/LPA6." J Biol Chem **284**(26): 17731-17741.
- Yang, J. Y., C. S. Zong, et al. (2008). "ERK promotes tumorigenesis by inhibiting FOXO3a via MDM2-mediated degradation." Nat Cell Biol **10**(2): 138-148.
- Yarden, Y. and M. X. Sliwkowski (2001). "Untangling the ErbB signalling network." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(2): 127-137.
- Yu, W. H., J. F. Woessner, Jr., et al. (2002). "CD44 anchors the assembly of matrilysin/MMP-7 with heparin-binding epidermal growth factor precursor and ErbB4 and regulates female reproductive organ remodeling." Genes Dev **16**(3): 307-323.
- Zhang, G., D. S. Spellman, et al. (2006). "Quantitative phosphotyrosine proteomics of EphB2 signaling by stable isotope labeling with amino acids in cell culture (SILAC)." J Proteome Res **5**(3): 581-588.
- Zhang, W., S. Zheng, et al. (2005). "Protein kinase D specifically mediates apoptosis signal-regulating kinase 1-JNK signaling induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> but not tumor necrosis factor." J Biol Chem **280**(19): 19036-19044.
- Zhang, X., Q. Chen, et al. (2009). "Sequential phosphorylation of Nedd1 by Cdk1 and Plk1 is required for targeting of the gammaTuRC to the centrosome." J Cell Sci **122**(Pt 13): 2240-2251.
- Zhang, X., K. Orlando, et al. (2008). "Membrane association and functional regulation of Sec3 by phospholipids and Cdc42." J Cell Biol **180**(1): 145-158.

## Literaturverzeichnis

---

- Zheng, H., P. Hu, et al. (2005). "Phosphotyrosine proteomic study of interferon alpha signaling pathway using a combination of immunoprecipitation and immobilized metal affinity chromatography." Mol Cell Proteomics **4**(6): 721-730.
- Zheng, Y., J. Schlondorff, et al. (2002). "Evidence for regulation of the tumor necrosis factor alpha-converter (TACE) by protein-tyrosine phosphatase PTPH1." J Biol Chem **277**(45): 42463-42470.
- Zubarev, R. A., D. M. Horn, et al. (2000). "Electron capture dissociation for structural characterization of multiply charged protein cations." Anal Chem **72**(3): 563-573.

## 7 ABKÜRZUNGEN

PBS	Phosphate Buffered Saline
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
SILAC	Stable Isotope Labeling in Cell Culture
MS	Massenspektrometrie
MS/M S	Tandem Massenspektrometrie
LC	Liquid Chromatographie
Ser(P)	Phosphoserin
Thr(P)	Phosphothreonin
Tyr(P)	Phosphotyrosin
SCX	Strong Cation Exchange Chromatography
APS	Ammoniumpersulfat
TEMED	Tetramethylethyldiamin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
DMEM	Dulbecco Modified Eagle's Minimal Essential Medium
FBS	Fötales bovines Serum
BSA	Bovines Serumalbumin
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
DMSO	Dimethylsulfoxid

### 7.1 ZUORDNUNG VERWENDETER GEN- UND PROTEINNAMEN

ABL1, proto-oncogene tyrosine-protein kinase ABL1; ABL2, tyrosine-protein kinase ABL2; AHNAK, neuroblast differentiation-associated protein AHNAK; AKAP13, A-kinase anchor protein 13; ANK2, Ankyrin-2; ARHGAP29, Rho GTPase-activating protein 29; BAIAP2, brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2; BMP, bone morphogenetic protein 1; BMPR2, bone morphogenetic protein receptor type-2; CAMKK1, calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 1; CARHSP1, calcium-regulated heat stable protein 1; CAST, calcium-binding protein CAST; CAMKD, calcium/calmodulin-dependent protein kinase II delta; CAMK2G, calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II gamma chain; CDC25C, M-phase inducer phosphatase 3, CD2AP, CD2-associated protein, CD44, CD44 antigen, CHEK1, serine/threonine-protein kinase Chk1; CLASP1, CLIP-associating protein 1; CLIP1, CAP-Gly domain-containing linker protein 1; CSNK1D, casein kinase I isoform delta; CXCR4, C-X-C chemokine receptor type 4; DDEF1, 130 kDa phosphatidylinositol 4;5-biphosphate-dependent ARF1 GTPase-activating protein; DNMI, dynamin-1; EGFR, epidermal growth factor receptor; EPHB2, ephrin type-B receptor 2; ERK1, mitogen-activated protein kinase 3; ERK2, mitogen-activated protein kinase 1; FAK, focal adhesion kinase 1; FAT, protocadherin FAT-1; F11R, junctional adhesion molecule A; GABRA4, gamma-aminobutyric acid receptor subunit alpha-4; GNA12, guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-12; GRDN, girdin; GRLF1, glucocorticoid receptor DNA-binding factor 1; HDAC7, histone deacetylase 7; ITSNI, intersectin-1; MAPK11, mitogen-activated protein kinase 11; MAP1B, microtubule-associated protein 1B; MARCKS, myristoylated alanine-rich C-kinase substrate; MET, hepatocyte growth factor receptor; MEKK3, mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3; PEA, astrocytic phosphoprotein PEA-15; PLC3B, 1-phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase beta-3, PLEC, plectin-1, PRKD1, serine/threonine-protein kinase D1, PRKCG, protein kinase C gamma type, PRKCH, protein kinase C eta type; PRKRA, interferon-inducible double stranded RNA-dependent protein kinase activator A; TK2B, protein tyrosine kinase 2 beta; PTPN12, tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 12; PTPN14, tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 14; PXN, paxillin; RAI14, ankyrin; RPS6KA1/3, ribosomal protein S6 kinase alpha-1/3; SPTBN1, spectrin beta chain; brain 1; SRC, proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src; TAOK1/2, serine/threonine-protein kinase TAO-1/2; TBC1D4, TBC1 domain family member 4;

## Abkürzungen

---

TEC, tyrosine-protein kinase TEC; TNIK, TRAF2 and NCK-interacting protein kinase;  
ZO1, tight junction protein ZO-1; ZYX, zyxin.

## 8 PUBLIKATIONEN

- 1) Thiemo B. Schreiber, Nina Mäusbacher, Susanne B. Breitkopf, Kathrin M. Schiller und Henrik Daub, *Quantitative phosphoproteomics – an emerging key technology in signal transduction research*. **Proteomics**, 2008 Nov; 8(21):4416-32.
  
- 2) Thiemo B. Schreiber, Nina Mäusbacher, György Kéri, Jürgen Cox und Henrik Daub, *An integrated phosphoproteomics workflow reveals extensive network regulation in early lysophosphatidic acid signaling*. **Molecular and Cellular Proteomics**, 2010 Jan; e-publication ahead of print.

# 9 DANKSAGUNG

Ich danke insbesondere meinem Betreuer und Doktorvater Herrn PD Dr. Henrik Daub für die allzeit freundliche Unterstützung und Förderung meiner Arbeit mit zahlreichen Ideen. Prof. Dr. Axel Ullrich danke ich für die großzügige Unterstützung und die Bereitstellung bester Arbeitsbedingungen in seiner Abteilung am Max-Planck-Institut für Biochemie. Desweiteren danke ich meinem Zweitprüfer Prof. Dr. Johannes Buchner für die Begutachtung dieser Arbeit und Prof. Dr. Michael Groll für seine Arbeit als Vorsitzender der Prüfungskommission.

Prof. Dr. Mathias Mann und seinen Mitarbeitern möchte ich für die gute Kooperation und die technische Unterstützung beim Betrieb der Massenspektrometer danken. Dr. Jürgen Cox danke ich für die Entwicklung der in dieser Arbeit genutzten Software MaxQuant, Prof. Dr. György Kéri für die Synthese der nicht-kommerziell erhältlichen Proteinkinase-Inhibitoren, Prof. Dr. Norbert Seewald und seinen Mitarbeitern für die Synthese des verwendeten Marimastat-Derivates und Dr. Stefan Übel für die Unterstützung bei der HPLC Analytik von Marimastat. Darüber hinaus möchte ich mich bei Nina Mäusbacher für die hervorragende Zusammenarbeit bedanken. Renate Hornberger gilt der Dank für die Unterstützung bei der Durchführung aufwändiger Zellkulturarbeiten. Explizit möchte ich mich auch bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Signaltransduktion und der gesamten Abteilung Molekularbiologie des Max-Planck-Instituts für Biochemie für das freundschaftliche Arbeitsklima und zahlreiche interessante Diskussionen bedanken.

Die vorliegende Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgesellschaft gefördert.

Abschließend bedanke ich mich bei Heike und meiner Familie für die liebevolle Unterstützung.