



**LASP1 – ein neuer, phosphorylierungs-abhängiger  
Bindungspartner von CrkL in CML**

**LASP1 – a new, phosphorylation-dependent  
binding partner of CrkL in CML**

Dissertation zur Erlangung des medizinischen  
Doktorgrades  
der Graduate School of Life Sciences,  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Biomedizin

Vorgelegt von

**Carolin Kastner**  
aus Weiden i.d. OPf.  
Würzburg, 2018



**Eingereicht am:.....**

Bürostempel

**Mitglieder des Promotionskomitees:**

**Vorsitzender: Prof. Dr. med. A. Beilhack**

**1. Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. E. Butt**

**2. Betreuer: Prof. Dr. med. M. Kuhn**

**3. Betreuer: Dr. rer. nat. E. Henke**

**Tag des Promotionskolloquiums:.....**

**Doktorurkunde ausgehändigt am:.....**



# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	IV
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis .....	VIII
1 Einleitung .....	1
1.1 Gesellschaftliche Relevanz maligner Erkrankungen .....	1
1.2 LIM und SH3 Protein 1 –LASP1.....	2
1.3 Chronische myeloische Leukämie (CML) .....	10
1.3.1 Definition und Epidemiologie .....	10
1.3.2 Klinisches Bild und Verlauf.....	11
1.3.3 Pathophysiologische Aspekte.....	14
1.4 CT10 Regulator of Kinase Like Protein - CrkL .....	19
1.4.1 Struktur und Bindungspartner.....	19
1.4.2 Funktion.....	21
1.5 Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKIs).....	24
1.6 Zielsetzung und Arbeitshypothese .....	25
2 Material und Methoden .....	29
2.1 Materialien .....	29
2.1.1 Reagenzien und Peptide .....	29
2.1.2 Puffer und Lösungen .....	34
2.1.3 Verwendete Kits .....	41
2.1.4 Antikörper .....	41
2.1.4.1 Erstantikörper für Western Blots.....	41
2.1.4.2 Zweitantikörper für Western Blots .....	43
2.1.4.3 Erstantikörper für Immunfluoreszenz....	43
2.1.4.4 Zweitantikörper für Immunfluoreszenz ..	43
2.1.5 Enzyme .....	44
2.1.6 Primer.....	45
2.1.7 Vektoren.....	47
2.1.8 Bakterien .....	47
2.1.9 Zelllinien .....	47

2.1.10 Zellkulturmaterialien .....	48
2.1.11 Verbrauchsmaterialien .....	48
2.1.12 Geräte .....	49
2.1.13 Software und Websites .....	53
2.2 Methoden .....	54
2.2.1 Molekular- und mikrobiologische Methoden.	54
2.2.1.1 Primer-Gestaltung und Polymerase- Ketten-Reaktion (PCR) .....	54
2.2.1.2 Agarose-Gelelektrophorese.....	57
2.2.1.3 Restriktionsenzym-Verdau .....	58
2.2.1.4 Gelextraktion .....	60
2.2.1.5 Vektordephosphorylierung .....	61
2.2.1.6 Ligation.....	62
2.2.1.7 Transformation .....	63
2.2.1.8 Kolonie-PCR .....	65
2.2.1.9 Präparation des rekombinanten Plasmids .....	67
2.2.1.10 Generierung der Mutante CrkL R39K .	68
2.2.1.11 Kryokonservierung von Bakterien .....	70
2.2.2 Proteinbiochemische Methoden .....	71
2.2.2.1 Expression und Reinigung rekombinanter Proteine.....	71
2.2.2.2 Elution der GST-Proteine mittels GSH- Elutionpuffer .....	73
2.2.2.3 Abspaltung des GST-Tags unter Ver- wendung von Thrombin .....	75
2.2.2.4 Konzentration des His <sub>6</sub> -LASP1-Eluats...75	
2.2.2.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.76	
2.2.2.6 Western Blot.....	78
2.2.2.7 Bestimmung von Proteinkonzentrationen .....	79
2.2.2.8 Phosphorylierung .....	81

2.2.3 Interaktionsassays.....	83
2.2.3.1 Ex-vivo-Pulldown-Assay.....	83
2.2.3.2 In-vitro-Pulldown-Assay.....	85
2.2.3.3 Overlay.....	87
2.2.4 Immunofluoreszenz.....	88
2.2.5 Zellkultur-Methoden.....	90
2.2.5.1 Kultivierung von Zellen.....	90
2.2.5.2 Kryokonservierung und Rekultivierung von Zellen.....	91
3 Ergebnisteil.....	92
3.1 In vitro – Versuche – Analyse der Interaktionsbasis von LASP1 und CrkL.....	92
3.1.1 Gewinnung Tag-tragender Fusionsproteine..	92
3.1.1.1 Von der Vektorenwahl zum rekombinanten Bakterienklon.....	92
3.1.1.2 Generierung der CrkL-Mutante R39K...	99
3.1.1.3 Vom rekombinanten Bakterienklon zum isolierten Fusionsprotein.....	103
3.1.2 Phosphorylierungsassay.....	117
3.1.3 In-vitro Pulldown-Assay.....	120
3.1.4 Overlay (Far Western Blot).....	122
3.2 Ex vivo und in vivo Versuche.....	130
3.2.1 Ex-vivo-Pulldown-Assay.....	130
3.2.2 Immunfluoreszenz.....	134
4 Diskussion.....	136
5 Zusammenfassung.....	147
5.1 Deutsche Version.....	147
5.2 Englische Version.....	149
6 Literaturverzeichnis.....	151
Danksagung.....	
Lebenslauf.....	
Affidavit/Eidesstattliche Erklärung.....	



## Abkürzungsverzeichnis

ABL	Abelson murine leukemia virus
A	Ampère
AKT	Proteinkinase B
AP	Akzelerierte Phase
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BC	Blastenkrise
BCA	Bicinchoninsäure
BCR	Break point cluster region
bp	Basenpaar
BSA	Bovine Serum Albumin
°C	Grad Celsius
C3G	Crk SH3-domain-binding guanine-nucleotide releasing factor
(p130)CAS	CRK associated substrate
CBL	Casitas B-lineage lymphoma
CML	Chronisch myeloische Leukämie
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CP	Chronische Phase
CrkL	CT-10 Regulator kinase like pCrkL: phosphoryliertes CrkL

CXCR	CXC chemokine receptor
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure cDNA: complementary DNA
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DOCK180	Dedicator of cytokinesis 180
ECL	Enhanced chemiluminescence
E. coli	Escherichia coli Bakterien
EDTA	Ethyldiamintetraacetat
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EMT	Epithelial-mesenchymal transition
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
GAB2	GRB2-associated binding protein 2
GRB2	Growth factor receptor bound protein 2
GST	Gluthation-S-Transferase
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HEK-Zellen	Human Embryonic Kidney Zellen
Her2neu	Human epidermal growth factor receptor 2
His <sub>6</sub>	Abfolge von 6 Histidinen als Protein-Tag
HSC	Hematopoetic stem cells
kDa	Kilodalton
kHz	Kilohertz

KM	Knochenmark
k-RAS	Kirsten Rat Sarcoma
LASP1	LIM und SH3 domain protein 1 pLASP1: phosphoryliertes LASP1
LIM-Domäne	Benannt nach den Proteinen, in deren Sequenz diese Domäne erstmalig beschrieben wurde: Lin11, Isl-1 & Mec-3
LPP	Lipoma preferred partner
LSC	Leukemic stem cells
M	Molarität
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MMP	Matrixmetalloprotease
MRD	Minimal residual disease
mTOR	Mammalian target of rapamycin
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
Pro	Prolin
PTEN	Phosphatase und Tensin Homolog

RNA	Ribonukleinsäure mRNA: messenger RNA
RT	Raumtemperatur
SDF-1	Stromal cell derived factor 1; auch CXCL12
SDS	Natriumdodecylsulfat
SH2-/SH3- Domäne	Src-homology 2-/3-Domäne abgelei- tet von c-Src-Kinase, in deren Sequenz zum ersten mal entsprechende Domänen beschrieben wurden
Shh	Sonic Hedgehog
SOS	Son of Sevenless
SRC	Sarcoma
TBS	Tris buffered saline
TKI	Tyrosin-Kinase-Inhibitor
Tyr	Tyrosin-Kinase pTyr: phosphoryliertes Tyrosin
UV	Ultraviolett
V	Volt
VE-Wasser	Vollentsalztes Wasser
WB	Western Blot
wp	Washed platelets
wt	Wild type
ZO-2	Zonula occludens 2

# Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

## Abbildungen

- Abbildung 1:** Strukturelle Gliederung von LASP1 in die unterschiedlichen funktionellen Einheiten .....4
- Abbildung 2:** Microarray-Daten zur Überexpression von LASP1 in Zellen von CML-Patienten..... 9  
*Modifiziert nach:* Frietsch JJ et al., LASP1 is a novel BCR-ABL substrate and a phosphorylation-dependent binding partner of CRKL in chronic myeloid leukemia, *Oncotarget*, 2014; 5(14):5257-5271
- Abbildung 3:** Reziproke Translokation (9;22), die Basis für die Entstehung des Philadelphia- Chromosoms ..... 15  
*Quelle:*  
[www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/philadelphia-chromosome](http://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/philadelphia-chromosome) (abgerufen am 10.01.2018)  
For the National Cancer Institute © 2007 Terese Winslow LLC, U.S. Govt. has certain rights
- Abbildung 4:** Zusammenschau molekularer Interaktionsprozesse, ausgehend von der BCR-ABL-Kinase..... 18  
*Quelle:* Calabretta B et al., The biology of CML blast crisis, *Blood*, 2004; 103(11): 4010-4022
- Abbildung 5:** Strukturelle Gliederung von CrkL in seine verschiedenen Domänen .....20
- Abbildung 6a:** pLASP1 Interaktion mit CrkL .....28
- Abbildung 6b:** Intramolekulare Wechselwirkungen im

pCrkL-Protein .....	29
<i>Abbildung 7:</i> Agarose-Gel nach Kolonie-PCR zum Nachweis der Aufnahme des pGEX4T-1-CrkL-Konstrukts in entsprechende Bakterienkolonien .....	98
<i>Abbildung 8:</i> Seitenketten der Aminosäuren Arginin und Lysin.....	102
<i>Abbildung 9:</i> Stimulierungsreihe zur Expression des pET-28b-LASP1-Konstrukts.....	105
<i>Abbildung 10:</i> Reinigung von GST-CrkL aus kompetenten E. coli-Bakterien.....	107
<i>Abbildung 11:</i> Prinzip der Elution von GST-Tag tragenden Proteinen von GSH-Sepharose-Beads mittels Glutathion.....	108
<p>Quelle: <a href="http://www.abbkine.com/featured-purkine-gst-tag-protein-purification-kit-glutathione-released/">www.abbkine.com/featured-purkine-gst-tag-protein-purification-kit-glutathione-released/</a>  (abgerufen am 20.01.2018)  Reproduced with permission</p>	
<i>Abbildung 12:</i> Abspaltung des LASP1-Proteins vom GST-Tag mittels Thrombin.....	111
<i>Abbildung 13:</i> Prinzip der Nickel-Affinitätschromatographie.....	113
<p><i>Quelle:</i> ChemgaPedia Online-Enzyklopädie, Lerninheit Nickel-Affinitätschromatographie, Hemschemeier S K, Kriese J, Meyer-Rogger K, <a href="http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/16/biochem/pcr/pcr_del/deletion.vlu/Page/vsc/de/ch/16/biochem/pcr/pcr_anwendung/fusionsproteine.vscml/Supplement/1.html">www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/16/biochem/pcr/pcr_del/deletion.vlu/Page/vsc/de/ch/16/biochem/pcr/pcr_anwendung/fusionsproteine.vscml/Supplement/1.html</a> (abgerufen am 13.01.2018)</p> <p>Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH &amp; Co. KGaA.  Reproduced with permission</p>	

**Abbildung 14:** Anwendung der Centricon centrifugal filter devices zur Konzentration der His<sub>6</sub>-LASP1-Lösung.....114

*Quelle:*

[www.merckmillipore.com/DE/de/product/Amicon-Ultra-0.5mL-Centrifugal-Filters-for-DNA-and-Protein-Purification-and-Concentration,MM\\_NF-C82301?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.de%2F&bd=1](http://www.merckmillipore.com/DE/de/product/Amicon-Ultra-0.5mL-Centrifugal-Filters-for-DNA-and-Protein-Purification-and-Concentration,MM_NF-C82301?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.de%2F&bd=1) (abgerufen am 13.01.2018)

Reproduced with permission from Merck KGaA Darmstadt, Deutschland

**Abbildung 15a:** Reinigung von His<sub>6</sub>-LASP1 aus Bakterien ..... 115

**Abbildung 15b:** Konzentrierung des gereinigten His<sub>6</sub>-LASP1..... 116

**Abbildung 16:** Phosphorylierungsreihe zu GST-CrkL und GST-LASP1..... 118

**Abbildung 17a:** Far Western Blot unter Verwendung des Anti-GST-Antikörpers als Erstantikörper ..... 125

**Abbildung 17b:** Ladungskontrolle hinsichtlich der eingesetzten „Bait“-Menge für den Far Western Blot..... 126

**Abbildung 18:** Ex vivo Pulldown..... 132

**Abbildung 19:** Immunofluoreszenz zur Lokalisation von LASP1 und CrkL innerhalb hämatopoetischer Zellen..... 135

## Tabellen

<i>Tabelle 1:</i> Schema für PCR-Ansatz.....	56
<i>Tabelle 2:</i> Schema für Standard-PCR-Cycler-Programm .....	56
<i>Tabelle 3:</i> Schema für Verdau mit Restriktionsenzym I .....	58
<i>Tabelle 4:</i> Schema für Verdau mit Restriktionsenzym II .....	60
<i>Tabelle 5:</i> Pipettieransatz zur Vektordephosphorylierung .....	61
<i>Tabelle 6:</i> Pipettieransatz zur Integration von CrkL wt in pGEX4T-1.....	62
<i>Tabelle 7:</i> Pipettieransatz zur Integration von LASP1 in pET28b.....	63
<i>Tabelle 8:</i> Schema für Standard-Kolonie-PCR.....	66
<i>Tabelle 9:</i> Schema für PCR-Cycler-Programm bei Klonie- PCR.....	66
<i>Tabelle 10:</i> Pipettierschema für PCR zur Generierung der Mutante CrkL R39K.....	68
<i>Tabelle 11:</i> Schema für PCR-Cycler-Programm zur Ge- nerierung der Mutante CrkL R39K.....	69
<i>Tabelle 12:</i> Schema für Standardansatz für Phosphory- lierungsassay.....	82

# **1 Einleitung**

## **1.1 Gesellschaftliche Relevanz maligner Erkrankungen**

Nach Erkrankungen des Herzkreislaufsystems zählen maligne Erkrankungen zu den häufigsten Todesursache in Deutschland (1). Dabei hat der Anteil an Krebserkrankungen als Ursache für einen Todesfall in den letzten Jahren stetig zugenommen. Auch insgesamt stiegen sowohl Inzidenz als auch Prävalenz vieler maligner Erkrankungen in der deutschen Gesellschaft sowie weltweit im Verlauf der vergangenen Jahre. Dies gilt beispielsweise für maligne Prozesse der Bauchspeicheldrüse oder für das maligne Melanom, aber auch für Erkrankungen des Leukämie-Spektrums (2). Um dieser Entwicklung zu begegnen, war und ist es Aufgabe zahlreicher Forschungsprojekte die zugrunde liegenden, molekularen Mechanismen, die am dysregulierten Wachstum beteiligten Proteine und sogenannte Tumormarker, also biologische Substanzen wie Proteine, die bei Vorliegen eines bestimmten Tumors in erhöhter Konzentration beispielsweise im Blut zu messen sind, zu

identifizieren. Eines dieser Proteine, für das Veränderungen in Expressionslevel und zellulärer Lokalisation in zahlreichen Tumorentitäten im Vergleich zum gesunden Normalgewebe nachgewiesen werden konnte, ist das LIM and SH3 protein 1 (LASP1); dies konnte unter anderem für das kolorektale Karzinom (3), das Mamma-Karzinom (4-6), das Medulloblastom (7), das hepatozelluläre Karzinom (8-9), das Gallenblasen-Karzinom (10) sowie das Ovarial-Karzinom (11) gezeigt werden. Darüberhinaus belegen mehrerer Arbeiten, dass eine Überexpression von LASP1, beziehungsweise eine Veränderung in dessen Verteilungsmuster zwischen Zellkern und Zytoplasma in Tumorzellen, mit einer erhöhten Aggressivität der betreffenden Tumorerkrankung einhergeht (4, 7, 9, 8, 10, 12, 13, 14).

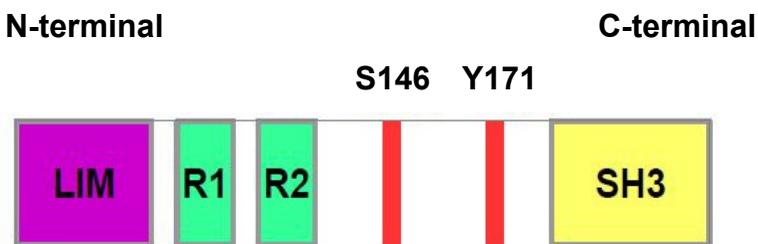
## **1.2 LIM und SH3 Protein 1 – LASP1**

Das Gen, das für das LASP1-Protein codiert, ist auf Chromosom 17q21 lokalisiert. Es wurde ursprünglich in einer cDNA-Bibliothek, isoliert aus axillären Lymphknotenmetastasen einer Brustkrebspatientin, identifiziert (15). Die Aminosäuresequenz von LASP1

umfasst 261 Aminosäuren (AS) und gliedert sich in drei wesentliche Domänen: eine N-terminale LIM-Domäne, zwei Nebulin-like-Repeats (R1 und R2) sowie eine C-terminale SH3-Domäne (16). Dabei besitzt keine dieser Komponenten enzymatische Aktivität. Jede dieser Proteinabschnitte erlaubt jedoch die Interaktion mit zahlreichen anderen, zellulären Komponenten, was eine Verflechtung von LASP1 in verschiedenste zelluläre Prozesse nahe legt.

Innerhalb der Sequenz der LIM-Domäne konnten zwei Zink-Finger-Strukturen identifiziert werden, die möglicherweise als unabhängige Faltungseinheit eine direkte Interaktion von LASP1 mit DNA erlauben (17, 18). Darüber hinaus scheint diese Domäne für die Interaktion von LASP1 mit dem Chemokinrezeptor CXCR2 verantwortlich zu zeichnen (19). In der LASP1-Sequenz schließt sich an den LIM-Bereich eine Domäne mit zwei Nebulin-like-Repeats (R1 und R2) an. Vermittelt durch diese beiden Strukturkomponenten, konnte für LASP1 eine Bindung an F-Aktin gezeigt werden (20-22). Die Interaktion mit Stressfasern hingegen scheint indirekt über eine Komplexbildung mit Palladin zu erfolgen (23).

Außerdem kommt mithilfe der R1- und R2-Bereiche auch die Interaktion mit dem zytoskelettalen Protein Krp1 zustande, welches eine Rolle bei der Verlängerung von Pseudopodien spielt (24, 25). Am C-terminalen Ende des Proteins findet sich schließlich eine Src Homology 3 (SH3)-Einheit. Diese Klasse von Proteindomänen ist durch Bindung an prolinreiche Domänen (Pro-x-x-Pro) innerhalb der Sequenz des jeweiligen Interaktionspartners gekennzeichnet (26). So sind bekannte Bindungspartner der SH3-Domäne von LASP1 unter anderem Palladin (23), Vimentin (27), Zyxin (28,29), LPP (29) sowie VASP (29) und Prointerleukin-16 (30).



**Abbildung 1: Strukturelle Gliederung von LASP1 in die unterschiedlichen funktionellen Einheiten.** Es finden sich eine LIM-Domäne, zwei Nebulin-like Repeats und eine SH3-Domäne.

Im Bereich der Linker-Region zwischen R2 und der C-

terminalen SH3-Domäne finden sich zwei Aminosäuren, deren Phosphorylierungsstatus unter anderem Einfluss auf Funktion und Lokalisation des Proteins nimmt: Serin 146 und Tyrosin 171.

Letzteres erwies sich als Phosphorylierungsstelle sowohl für die Src- als auch für die ABL-Kinase (31, 32). In Brustkrebszellen konnte nachgewiesen werden, dass LASP1, vermittelt durch Proteinkinase A (PKA)- abhängige Phosphorylierung an Serin 146, im Komplex mit ZO2 in den Zellkern transferiert wird, während es im entsprechenden, gesunden Gewebe üblicherweise an zytoplasmatischen Aktin-Ansammlungen lokalisiert ist (33). Hinsichtlich einer nukleären Fraktion von LASP1 konnte im Kontext des Mamma-Karzinoms in neueren Arbeiten zudem gezeigt werden, dass eine Stimulierung beispielsweise von CXCR4, CXCR2, EGFR oder Her2neu mit einer Steigerung des nukleären LASP1-Anteils einhergeht (6).

Die zellulären Funktionen von LASP1 scheinen vielfältig und komplex zu sein. Genauere Kenntnisse konnten in den letzten Jahren erst nach und nach gewonnen werden. So bestehen Daten, die für LASP1 bei

Lokalisation im Zytoplasma eine tragende Rolle bei Migration und Elongation von Pseudopodien, Stabilisierung von Aktin-Filament-Bündeln und der Organisation des Zytoskeletts nahe legen (20, 32, 34). Zudem forciert LASP1 die Transkription und Sekretion von Matrixmetalloproteasen (MMPs) mit konsekutiver Degeneration extrazellulärer Matrix. Hierdurch scheint das Protein bei Dysregulation ein wichtiger Faktor bei Metastasierungsprozessen im Rahmen maligner Erkrankungen beispielsweise der Brust oder der Prostata zu sein (35).

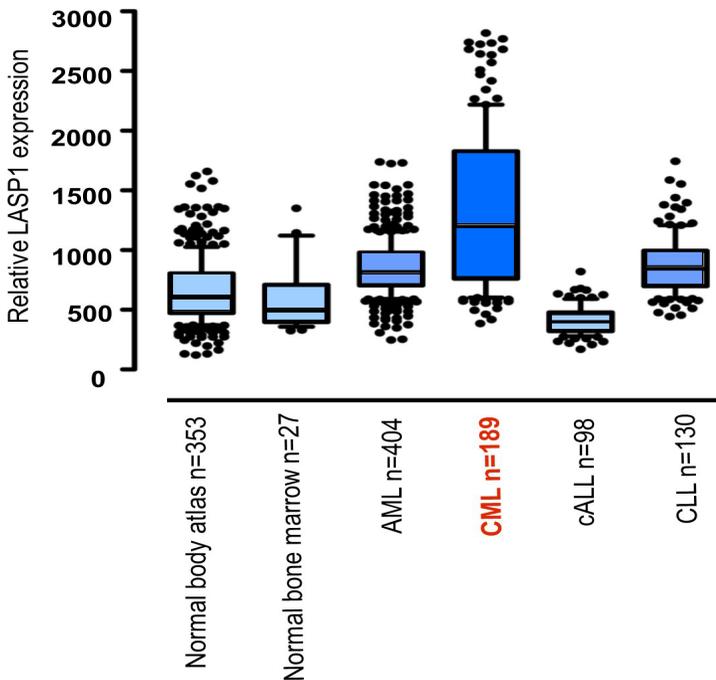
Insgesamt lässt die Struktur von LASP1 und die damit einhergehende Fähigkeit Interaktionen mit verschiedensten Proteingruppen einzugehen, vermuten, dass es zudem in zahlreiche Signalprozesse bishin zur Zellzykluskontrolle eingebunden ist (10, 36, 37). Insbesondere jedoch, welche Aufgaben dem Protein nach Transfer in den Nucleus zufallen, ist noch nicht abschließend geklärt. Duvall-Noelle N. et al. zeigten mit ihrer Arbeit im Rahmen maligner Erkrankungen der Brust auf, dass es bei einem Verlust an im Zellkern lokalisierten LASP1 zu einem weniger ausgeprägten invasiven

Wachstumsverhalten, sowie verstärkter Adhäsions-tendenz und einem veränderten Sekretionsmuster der Tumorzellen im Hinblick auf Zytokine und Chemokine kommt (6). Dabei bietet diese Arbeit auch Hinweise dafür, dass nukleäres LASP1 auch im Kontext epigenetischer Regulationsmechanismen ein zentrales Regelglied darstellt (6). Weiterhin scheint LASP1 wesentliche Aufgaben bei der zellulärer Entwicklung, Differenzierung und Organogenese zu übernehmen (38, 39). Diese Vermutung wird auch dadurch untermauert, dass LASP1 als hoch konserviertes Protein insbesondere während früher Entwicklungsphasen in verschiedensten Geweben exprimiert wird (40, 41).

Zusammengenommen scheint LASP1 zu einer wachsenden Gruppe von Proteinen zu gehören, die sowohl Aufgaben eines Strukturproteins als auch eines Signalproteins übernehmen (42).

Die Verflechtung in zahlreiche zelluläre Prozesse legt nahe, dass eine Veränderung des LASP1-Expressionslevels, beziehungsweise dessen zelluläre Verteilung, im Rahmen von Prozessen maligner Entartung eine Rolle spielt.

Die Relevanz von LASP1 konnte bereits für zahlreiche maligne Erkrankungen gezeigt werden (vgl. 1.1). Dabei scheint, wie bereits unter 1.1 angeführt, die Überexpression von LASP1 sowie die Anreicherung des Proteins im Zellkern mit einem aggressiveren Tumorcharakter einherzugehen. So weisen neuere Arbeiten zudem auf eine Beteiligung von LASP1 an der Epithelial-mesenchymal Transition (EMT) im Progress einer Tumorerkrankung und damit einer Forcierung eines Metastasierungsprozesses hin (43). Während sich ein Großteil der Arbeiten bisher weitestgehend auf solide Tumore konzentrierte, konnte kürzlich, in Vorarbeiten zu dieser Arbeit, durch die Gegenüberstellung von Ergebnissen aus Microarray-Analysen anhand von Material unter anderem aus normalem Knochenmark (KM) und vier verschiedenen Lymphom- beziehungsweise Leukämie-Entitäten eine deutliche und signifikante Überexpression von LASP1 auch in Zellen von Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie (CML) nachgewiesen werden (44). Dies ist in Abbildung 2 dargestellt.



## Abbildung 2: Microarray-Daten zur Überexpression von LASP1 in Zellen von CML-Patienten

Modifiziert nach Frietsch JJ et al., 2014

Für eine mögliche Relevanz von LASP1 in der Krankheitsbiologie der CML spricht auch die Arbeit von Yeung KY et al., die *lasp1* als eines von 6 Genen beschreibt, die als aussagekräftige, prädiktive Marker für einen möglichen Progress oder das Auftreten eines

Rezidiv einer CML-Erkrankung identifiziert werden konnten (45).

### **1.3 Chronische myeloische Leukämie (CML)**

#### 1.3.1 Definition und Epidemiologie

Neben dem Erkrankungskomplex der Leukämien lässt sich die chronische myeloische Leukämie (CML) auch der Gruppe der myeloproliferativen Neoplasien zuordnen, welcher auch Krankheitsbilder wie Polyzytämia vera, primäre Myelofibrose oder essentielle Thrombozytopenie angehören (46). Wie der übergeordnete Krankheitsbegriff bereits nahe legt, ist ein gemeinsames Kernmerkmal dieser Erkrankungen eine massive klonale Expansion, insbesondere von Zellen der myeloischen Zellreihe, in KM und peripherem Blut. Ausgangspunkt dieser Veränderungen in Blutbild und KM ist bei einer CML-Erkrankung ein maligner hämatopoetischer Stammzellklon, der die chimere BCR-ABL-Tyrosinkinase (vgl 1.3.3) exprimiert und durch eine hohe Proliferationsrate die normale Hämatopoese nach und nach zurückdrängt (47).

Bei rund 15 % aller Leukämiediagnosen im

Erwachsenenalter lautet der Befund CML (48). Sie tritt unter Erwachsenen mit einer zum Alter hin zunehmenden, mittleren Inzidenz von 1-2/100000 und einer geringfügigen Bevorzugung des männlichen Geschlechts auf (48). Das mittlere Alter bei Diagnosestellung liegt im Bereich von 65 Jahren.

### 1.3.2 Klinisches Bild und Verlauf

Der natürliche Krankheitsverlauf einer CML-Erkrankung kann in 3 Phasen unterteilt werden.

Heute wird ein Großteil der Patienten während der initialen, chronischen Phase (CP) diagnostiziert. In diesem Stadium sind rund 30-50 % der Betroffenen asymptomatisch und fallen im Rahmen von Routineuntersuchungen durch ein verändertes Blutbild auf (53). Kennzeichnend für die CP ist eine massive Leukozytose, vor allem verursacht durch eine sehr hohe Zahl an neutrophilen Granulozyten. Aber auch eosinophile und basophile Granulozyten können erhöht sein. Auffällig ist jedoch nicht nur der vergrößerte prozentuale Anteil an Leukozyten im Differentialblutbild, sondern auch eine pathologische Linksverschiebung.

Das heißt, neben reifen Granulozyten finden sich auch vermehrt unreife Vorstufen bis hin zum (Myelo-) Blasten im peripheren Blutbild. Daneben kann auch die Zahl der Thrombozyten erhöht sein. Im Knochenmarkspunktat zeigt sich das Bild eines hyperzellulären Knochenmarks mit einer zunehmenden Verdrängung der normalen Hämatopoese, vor allem der Erythropoese, durch die massive Vermehrung des malignen Zellklons. Werden Patienten in der CP symptomatisch, dann meist aufgrund von Anämie und Splenomegalie, bedingt durch extramedulläre Blutbildung. Kennzeichnend sind Leistungssabfall, Fatigue, Gewichtsverlust und Fieber (48-50).

Im Anschluss an die CP kann ein Progress in eine akzelerierte Phase (AP) stattfinden. Diese definiert sich unter anderem durch eine Verschlechterung des Blutbilds im Sinne einer weiteren Zunahme der Leukozytose, einen steigenden Blastenanteil (10-19 % bzw. 15-29 %) <sup>1</sup>, Eine therapierefraktäre, persistierende Thrombozytopenie ( $< 100 \times 10^6/\text{ml}$ ) oder Thrombozytose ( $> 1000 \times 10^6/\text{ml}$ ),

---

<sup>1</sup> Unterschiedliche Definition der AP durch WHO (10-19 % Blastenanteil im peripheren Blut oder KM) und European Leukemia Net (15-29 % Blastenanteil im peripheren Blut oder KM) (49-50)

sowie eine weitere Größenzunahme der Milz (48, 50, 51). Im Durchschnitt vergehen 3-4 Jahre bis ein Patient aus der CP in die AP übertritt. Dieser Zeitraum ist jedoch sehr individuell und kann auf 0,5 Jahre verkürzt, aber auch auf 15 Jahre ausgedehnt sein (52).

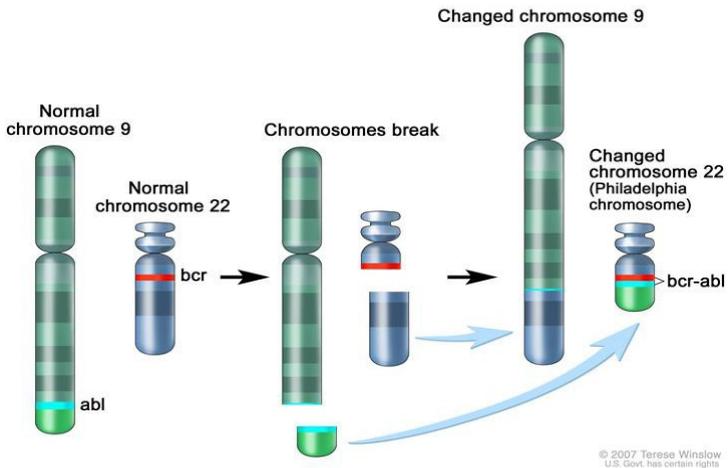
Jedoch nicht alle Patienten zeigen die Warnsignale einer AP. Rund 20 % der Erkrankten treten direkt aus der CP in die dritte Phase, die Blastenkrise (BC), über (53). Der Anteil an Blasten steigt in Knochenmark und/oder peripherem Blut auf >20% (WHO (51)) bzw >30 % (European Leukemia Net (50)). In 50 % der Fälle findet sich eine myeloblastisch betonte BC, in jeweils 25 % der Fälle jedoch eine lymphoblastisch betonte oder biphänotypische BC (48, 54). Die Patienten leiden unter den Auswirkungen der aggravierten Anämie und Thrombozytopenie. Es kann zu schweren Komplikation wie Blutungen oder generalisierten Infektionen kommen. Klinisch verhält sich die CML in diesem Stadium vergleichbar einer akuten Leukämie, rasch progredient und mit kurzer Überlebenszeit (48).

### 1.3.3 Pathophysiologische Aspekte

Die CML gehört zu einer der ersten malignen Erkrankungen, für die auf zytogenetischer und später auch auf molekularer Ebene die zugrunde liegende Veränderung identifiziert werden konnte. Bereits 1960 detektierten Peter Nowell und David Hungerford in Philadelphia eine chromosomale Besonderheit, ein verändertes Chromosom 22, in Granulozyten von CML-Patienten, die sie als Philadelphia-Chromosom beschrieben (55).

Rund 95% der CML-Patienten weisen diese chromosomale Aberration auf und werden somit als Philadelphia-Chromosom positiv (Ph+) bezeichnet (56).

Grundlage dieser Strukturveränderung der Chromosomen ist eine balancierte, reziproke Translokation zwischen den langen Armen der Chromosomen 9 und 22 ( $t(9;22)(q34;q11)$ ) (57). In Abbildung 3 wird der zugrunde liegende Mutationsprozess veranschaulicht.



### Abbildung 3: Reziproke Translokation (9;22), die Basis für die Entstehung des Philadelphia-Chromosoms

Quelle: National Cancer Institute (NCI) der USA, [www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/philadelphia-chromosome](http://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/philadelphia-chromosome) (abgerufen am 10.01.2018),  
For the National Cancer Institute © 2007 Terese Winslow LLC, U.S. Govt. has certain rights

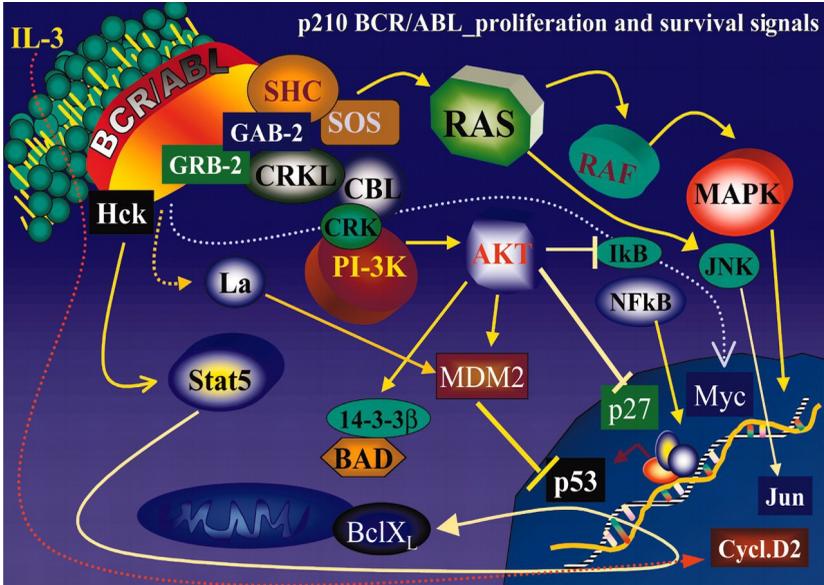
Der Zeitpunkt dieses Chromosomenstück-austausches scheint in einem frühen Stadium der Hämatopoese angesiedelt. Als Ursprungszelle, in welcher das Ereignis der Translokation stattfindet, wird eine pluripotente, hämatopoetische Stammzelle angenommen (58).

Als wichtigster Anhalt für diese Annahme gilt die Tatsache, dass neben einem myeloblastischen Verlauf der BC in jeweils 25% der Fälle ein lymphoblastisch oder auch ein biphänotypisch betonter Verlauf zu detektieren ist (48). Durch die Manifestation des transformierenden Ereignisses in einer wenig differenzierten hämatopoetischen Zelle können, neben der myeloischen Zellreihe, unterschiedlichste, hämatopoetische Zelltypen betroffen sein. So konnte das Ph-Chromosom in Zellen aller hämatopoetischer Zelllinien, außer reifen T-Lymphozyten, nachgewiesen werden (58).

In Folge dieses chromosomalen Rearrangements entsteht auf dem verkürzten Chromosom 22, nun als Philadelphia-Chromosom bezeichnet, ein Fusionsprodukt, das hybride *bcr-abl*-Onkogen, welches in ein entsprechendes chimeres Protein umgesetzt wird (59, 60). Abhängig vom Bruchpunkt im ursprünglichen *bcr*-Gen auf Chromosom 22, entstehen BCR-ABL-Proteine, die anhand ihres Molekulargewichts unterschieden werden können. Die häufigste Variante ist p210<sup>BCR-ABL</sup>, aber auch p230<sup>BCR-ABL</sup> und p190<sup>BCR-ABL</sup> treten auf (61).

Das *abl*-Gen auf Chromosoms 9 codiert für eine 145 kDa schwere, in nahezu allen Geweben exprimierte Nicht-Rezeptor-Tyrosin-Kinase, deren Aktivität unter physiologischen Bedingungen streng reguliert wird. Durch die Verbindung von Abschnitten von *abl* mit solchen des *bcr*-Gens geht diese strikte Kontrolle verloren und es resultiert ein Fusionsgen, das für eine kontinuierlich hoch exprimierte und konstitutiv aktive Kinase codiert (62-64). Die veränderten Eigenschaften und die unkontrollierte Aktivität der BCR-ABL-Kinase scheinen zu den wesentlichen Grundlagen für die maligne Transformation einer normalen hämatopoetischen Zellen zu gehören (65). Das BCR-ABL-Protein steht am Anfang zahlreicher Signalwege, durch deren pathologische Aktivierung oder Blockierung das Verhalten des Zellklons verändert wird. Einen Ausschnitt des komplexen Signalwegegeflechts, ausgehend von der BCR-ABL-Kinase, gibt Abbildung 4 wieder. So führt unter anderem die unphysiologische Aktivierung des Ras- (66), MYC- (67), STAT- (68) oder PI3K/AKT-Signalwegs (69) durch das BCR-ABL-Molekül zu einem gesteigerten mitogenen Potential und einer Blockade der Apoptose (70), auch bei Fehlen externer Wachstumsfaktoren.

Zudem scheint beispielsweise auch das Adhäsionsverhalten der Zellen an Stroma-Zellen und extrazellulärer Matrix gestört (71, 72).



**Abbildung 4: Zusammenschau molekularer Interaktionsprozesse, ausgehend von der BCR-ABL-Kinase**

Quelle: Calabretta B et al., 2004

Der Erwerb weiterer genetischer und epigenetischer Alterationen sowie die Veränderung des genetischen Expressionsmusters wird für den Progress einer CML-Erkrankung von der CP hin zu akuten Krankheitsverläufen, sowie für die Entwicklung von Therapieresistenzen verantwortlich gemacht (73, 74).

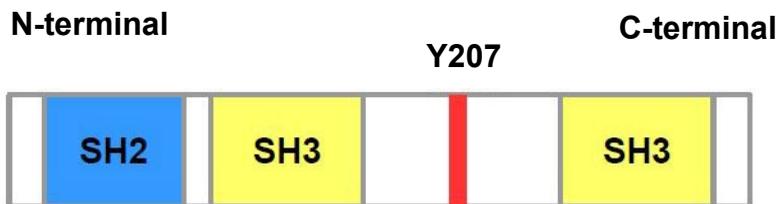
Mittlerweile sind zahlreiche Proteine identifiziert, die an die autophosphorylierten Tyrosin-Reste der BCR-ABL binden oder die selbst direkt durch die Tyrosin-Kinase-Aktivität an einem Tyrosinrest phosphoryliert werden. Eines der wichtigsten Substrate der BCR-ABL-Tyrosinkinase ist das Protein CrkL (75-77).

## **1.4 CT10 Regulator of Kinase Like Protein - CrkL**

### 1.4.1 Struktur und Bindungspartner

Das auf Chromosom 22q11 lokalisierte *crkl*-Gen codiert für das 39 kDa schwere CrkL-Protein, das zusammen mit CRK I und CRK II zur Gruppe der CRK-Proteine zählt, die in den späten 1980ern erstmals als homologe Gene zum v-CRK Fusions-Onkoprotein des CT10-Virus beschrieben wurden (78). CrkL wird nahezu ubiquitär in allen Geweben exprimiert.

Betrachtet man die strukturelle Zusammensetzung, wie in Abbildung 5 dargestellt, so fällt eine klare Gliederung in verschiedene funktionelle Untereinheiten auf. Das Protein besitzt drei größere Domänen, die durch eine Linker-Region miteinander verbunden sind. Zum einen findet sich eine Src Homology 2 (SH2)-Domäne, die die Bindung an Proteine mit einem pTyr-x-x-Pro-Motiv erlaubt (79). Zum anderen finden sich zwei SH3-Domänen, wobei nur die N-terminale SH3-Domäne das für selbige übliche Bindungsverhalten an Prolin-reiche Abschnitte (Pro-x-x-Pro-x) anderer Proteine zu zeigen scheint (26, 80).



**Abbildung 5: Strukturelle Gliederung von CrkL in seine verschiedenen Domänen.** Es besteht aus einer N-terminalen SH2-Domäne, einer SH3-Domäne sowie einer weiteren, C-terminalen SH3-Domäne.

In der Zwischenzeit konnten für die verschiedenen

Abschnitte zahlreiche Bindungspartner identifiziert werden. Zu den am besten charakterisierten Interaktionspartnern an der SH2-Domäne gehören Paxillin (81) und p130CAS (82), die Effektorproteine im Signalweg ausgehend von einer Integrin-Aktivierung sind. Daneben konnten viele weitere Proteine gefunden werden, die über die SH2-Domäne mit CrkL interagieren, darunter auch Wachstumsfaktorrezeptoren, wie Erythropoetin- (83) und Thrombopoetin-Rezeptoren (84). Mittels der N-terminalen SH3-Domäne ist es CrkL möglich, einen Komplex unter anderem mit SOS (85), C3G (86) oder DOCK180 (87) zu bilden. Für die C-terminale SH3-Gruppe jedoch konnten bisher noch keine Bindungspartner beschrieben werden.

#### 1.4.2 Funktion

Bereits ein Blick auf die strukturelle Gliederung des Proteins mit den definierten Domänen innerhalb der Aminosäuren-Sequenz (vgl. Abbildung 5) verdeutlicht, dass das nahezu ubiquitär exprimierte CrkL in der Zelle nicht die Rolle eines Enzyms übernimmt, sondern als sogenanntes Adaptor-Protein agiert. In dieser Funktion

ist CrkL Bestandteil einer Vielzahl von Signal- und Regulationswegen, ausgehend unter anderem von Wachstumsfaktor-Rezeptoren wie EGFR, IGFR, PDGFR $\alpha$  sowie VEGFR (88) oder Integrin-Rezeptoren (89). Eingebettet in Integrin-vermittelte Signalwege scheint CrkL an der Kontrolle von zellulärem Adhäsions- und Migrationsverhalten beteiligt zu sein (90). Daneben konnte gezeigt werden, dass bereits in frühen Entwicklungsphasen eine adäquate Expression von CrkL für eine normale Differenzierung von Zellen, insbesondere der Neuralleiste, eine tragende Rolle spielt (91). Durch die vorübergehende Komplexbildung mit zahlreichen Bindungspartnern und die umfangreiche funktionelle Verflechtung scheint CrkL für die Regulation vieler zellulärer Prozesse wie Zellproliferation, Apoptose, Adhäsions- und Migrationsverhalten essentiell zu sein (88). Nicht zuletzt konnte eine Beteiligung an der STAT5-regulierten Transkription bestimmter Gene gezeigt werden (68).

Vor dem Hintergrund der Einbindung von CrkL in zahlreiche, grundlegende zelluläre Signal- und Regulationsprozesse ist auch leicht zu verstehen, dass eine Veränderung des Expressionslevels oder der Eigen-

schaften dieses Proteins Bestandteil eines malignen Entartungsprozesses sein kann. Prominent wurde CrkL als wichtigstes Substrat der BCR-ABL-Kinase, dem pathophysiologischen Motor der CML (75-77). Die Kinase phosphoryliert CrkL an Tyrosin 207, das sich in der Linker-Region zwischen den beiden SH3-Gruppen befindet (vgl. Abbildung 5) (92). Die Bildung eines Enzym-Substrat-Komplexes zwischen der BCR-ABL-Kinase und ihrem Substrat, CrkL, scheint auf zwei unterschiedliche Weisen zustande kommen zu können. Einmal bindet die Kinase direkt mittels eines Prolin-reichen Abschnitts ihrer Sequenz an die N-terminale SH3-Domäne von CrkL. Aber auch eine indirekte Interaktion im Komplex mit weiteren Proteinen scheint für eine Phosphorylierung von CrkL ausreichend zu sein (93). Anhand zahlreicher Versuche konnte gezeigt werden, dass der veränderte Phosphorylierungsstatus von CrkL einen wesentlichen Baustein im Kontext einer malignen Transformation hämatopoetischer Zellen im Rahmen einer CML darstellt (94).

Da eine unkontrollierte Kinase-Aktivität der BCR-ABL-

als essentieller pathophysiologischer Mechanismus den allermeisten Fällen einer CML zugrunde liegt, bietet sich die Erfassung des Phosphorylierungsstatus von CrkL, als wichtigstes Substrat selbiger, als Parameter zur Beurteilung der Effektivität einer BCR-ABL-hemmenden Therapie an (95, 96).

Auch für zahlreiche solide Tumorerkrankungen wie das Mamma-Karzinom (97), das Pankreas-Karzinom (98), das Magen-Karzinom (99), das (nicht-kleinzellige) Bronchial-Karzinom (100), Gliome (101) oder das Zervix-Karzinom (102) konnte in der Zwischenzeit eine Relevanz von CrkL aufgezeigt werden. Dabei findet sich hier meist eine Amplifikation oder Überexpression des entsprechenden Gens.

## **1.5 Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKIs)**

Vor einigen Jahren revolutionierte die Einführung einer Medikamentenklasse, die sich spezifisch gegen die Aktivität der BCR-ABL-Kinase richtet, die Therapie der CML, sogenannte Tyrosin-Kinase-Inhibitoren (TKI) mit ihrem Vorreiter STI571 (Imatinib, Gleevec, Glivec) (103, 104).

Diese Moleküle blockieren mehr oder weniger spezifisch die ATP-Bindestelle des BCR-ABL-Enzyms (105). Dadurch konnte eine deutliche Verbesserung der Prognose im Vergleich zu bestehenden therapeutischen Möglichkeiten wie etwa Interferon  $\alpha$  erzielt werden (106, 107). Doch trotz der Weiterentwicklung hin zu Zweit- und Drittlinien-Tyrosinkinase-Inhibitoren wie Nilotinib, Dasatinib, Ponatinib oder Bosutinib kommt es immer wieder zu Therapieversagen aufgrund intrinsischer Resistenzmechanismen oder der Entwicklung von Resistenzen im Therapieverlauf. Aus diesem Grund besteht ein großes Interesse daran, weitere molekulare Komponenten und Prozesse zu identifizieren, die im Rahmen der Krankheitsbiologie der CML eine Rolle spielen, und so zuverlässigere Prognosen bezüglich des Ansprechens auf die verschiedenen Therapieoptionen und damit eine adäquate, prätherapeutische Stratifizierung der Patienten zu ermöglichen.

## **1.6 Zielsetzung und Arbeitshypothese**

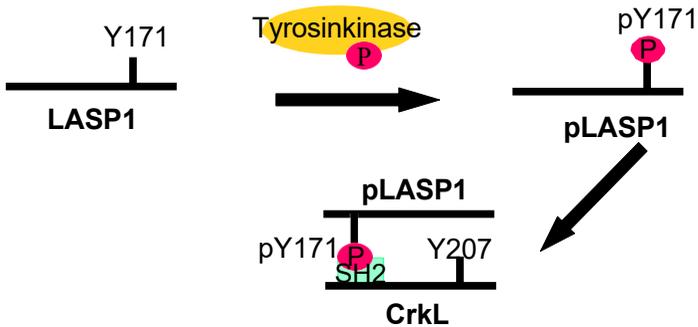
Der Protagonist meiner Arbeit, LASP1, könnte sich als ein solches wichtiges Puzzle-Stück im Komplex der durch BCR-ABL modifizierten Signalwege erweisen.

In letzter Zeit wurde LASP1 immer wieder im Zusammenhang mit CML diskutiert. So erwies es sich nicht nur als Substrat der physiologischen c-ABL (108), sondern auch der BCR-ABL, was im Rahmen einer Vorarbeit zu dieser Arbeit von unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte (44). Die beiden Kinasen, c-ABL und BCR-ABL, phosphorylieren das Protein an Tyrosin 171 (108). Außerdem konnte, wie bereits unter 1.2 (vgl. Abbildung 5) angeführt, anhand von weiteren Vorarbeiten, in der Auswertungen von Microarray-Daten ausgearbeitet werden, dass LASP1 in CML-Patienten signifikant ( $p < 0,0001$ ) überexprimiert ist (44). Desweiteren wurde beschrieben, dass das Expressionslevel der *lasp1*-mRNA in Abhängigkeit von den Phasen der Erkrankung variiert. So nimmt der *lasp1*-mRNA-Gehalt während der BC im Vergleich zur CP ab. Auf Basis dieser Befunde wurde *lasp1* als eines von 6 Genen definiert, die als aussagekräftige, prädiktive Marker für den Progress einer CML-Erkrankung dienen könnten und eine bessere Risikoabschätzung für das Auftreten eines Rezidivs erlauben könnten, als dies allein auf Basis bisheriger klinischer Risikofaktoren möglich ist (109).

Abgesehen davon ist jedoch bisher wenig über die Rolle von LASP1 im Kontext der CML bekannt.

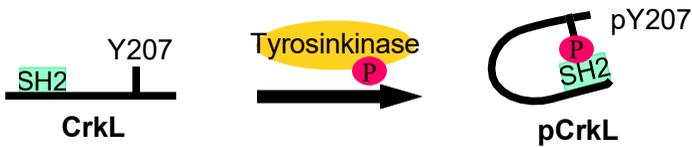
Vor dem Hintergrund, dass LASP1 nach Phosphorylierung durch die BCR-ABL-Kinase die Konsensus-Sequenz (pTyr-x-x-Pro) für die Bindung an eine SH2-Domäne besitzt, stellte sich die Frage, ob eine Verbindung zu einem anderem wichtigen Protein der CML, CrkL, besteht. Aus den strukturellen Eigenschaften der beiden Proteine heraus entwickelte sich die Arbeitshypothese einer Interaktion von CrkL mit pLASP1, vermittelt durch eine Phosphatgruppe an Tyrosin 171 von LASP1 sowie die SH2-Domäne des CrkL-Proteins. Da für die Bindung an die SH2-Domäne ein phosphoryliertes Tyrosin die wichtigste Voraussetzung darstellt, sollte daher für die Kombination CrkL und unphosphoryliertes LASP1 keine Interaktion detektierbar sein. Da durch verschiedene Publikationen gezeigt werden konnte, dass bei CrkL, wenn an Tyrosin 207 phosphoryliert, in gewissem Maße autoinhibitorische Mechanismen der eigenen SH2-Gruppe zu tragen kommen (110), erwarteten wir für die Versuchsanordnung (p)LASP1 mit pCrkL ein deutlich reduziertes Bindungsverhalten.

Abbildung 6a und b visualisieren unsere Arbeitshypothese.



**Abbildung 6a: pLASP1 Interaktion mit CrkL.**

Phosphoryliert an Tyrosin 171 kann pLASP1 mit der SH2-Domäne von CrkL in Interaktion treten.



**Abbildung 6b: Intramolekulare Wechselwirkungen im pCrkL-Protein.** An Tyrosin 207 phosphoryliert blockiert diese, mit einer Phosphatgruppe versehene Aminosäure durch intramolekulare Wechselwirkungen in gewissem Umfang die SH2-Domäne von CrkL.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Reagenzien und Peptide

Acrylamidlösung (Rotiphorese® Gel 30)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumchlorid (NH <sub>4</sub> Cl)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ampicillin  Verwendung: (10 %ig) Stock 100 mg/ml H <sub>2</sub> O Gebrauch 1:1000	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Agarose	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Borsäure ( $H_3BO_3$ )	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenol blau	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Calyculin A	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail with EDTA	Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
Complete Protease Inhibitor Cocktail EDTA-free	Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
Brilliant blue R	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Coumarinsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
DABCO <sup>®</sup>	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
DL-Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
DNA-/RNA-Farbreagenzien GelRed <sup>™</sup> Miodori Green <sup>™</sup>	INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland

DNA-Leiter Quantitas DNA Maker: 200bp-10kp	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Ethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glucose	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
L-Gluthation (reduziert) (GSH)	Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
Glycerin	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Goat Serum	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
GSH Sepharose 4B	GE Healthcare, Chicago, USA
Guanidine Hydrochlorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Hepes	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Imidazol	GE Healthcare, Chicago, USA
IPTG	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Isobutanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumdihydrogen- phosphat	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Kanamycin Verwendung: (5 %ig) Stock 50mg/ml H <sub>2</sub> O Gebrauch 1:1000	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Lysogeny Broth (LB)- Medium (Pulver)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Leupeptin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Luminol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Methanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Milchpulver (Non-Fat- Dry Milk)	Bio-Rad, München, Deutschland
Mowiol 4-88	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumcitrat (Na <sub>6</sub> H <sub>7</sub> NaO <sub>7</sub> )	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdesoxycholat (C <sub>24</sub> H <sub>39</sub> NaO <sub>4</sub> )	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdihydrogen- phosphat (Na <sub>2</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)-Plätzchen	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natrium-Orthovanadat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natrium-Peracetat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Nilotinib	Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA

dNTP-Mischung, 10mM	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
PageRuler™ prestained protein ladder	Thermo Fisher Scientific, Pierce Biotechnology, Rockford, USA
Pefabloc	Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Pepstatin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Phosphorsäure (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ) >85 %	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Pierce® BCA Protein Assay Reagent A	Thermo Fisher Scientific, Pierce Biotechnology, Rockford, USA
Pierce® BCA Protein Assay Reagent B	Thermo Fisher Scientific, Pierce Biotechnology, Rockford, USA
Ponceau S	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Protein A/G-Plus Agarose	Santa Cruz, Santa Cruz CA, USA
SDS (Sodium Dodecyl Sulphate)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
SeaKem® LE Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
S.O.C.-Medium	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland

Sucrose (Saccharose)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Temed	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Tris Buffer Grade	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Tween	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

### 2.1.2 Puffer und Lösungen

10 % APS	10 % Ammoniumpersulfat in dH <sub>2</sub> O
Bradford- Lösung	100 mg Coomassie brilliant blue 50 ml 100% Ethanol 850 ml dH <sub>2</sub> O 100 ml 85 % Phosphorsäure
CGS-Puffer	120 mM NaCl 12,9 mM Natriumcitrat 30 mM Glucose pH 6,5
Coomassie-Blau	0,04 % Coomassie brilliant blue 10 % Isopropanol absolut 10 % Essigsäure in VE-Wasser, flitrieren

Coomassie-Entfärbelösung	10 % Essigsäure 10 % Ethanol in VE-Wasser
De-/Renaturierungspuffer für Far Western Blot	100 mM NaCl 20 mM Tris 0,5 mM EDTA 10 % Glycerol 0,1 % Tween-20 2 % Milchpulver 1 mM DTT  dem De-/ Renaturierungsprotokoll entsprechender Zusatz an in der Molarität absteigender Menge an Guanidine-HCL
ECL-Lösung für Western Blot	Reagenz A: 200 ml 0,1 M Tris/HCL pH 8,6 50 mg Luminol  Reagenz B: 11 mg Coumarinsäure 10 ml DMSO  Reagenz C: 30 %ig H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>  Mischungsverhältnis: 3 ml Reagenz A 300 µl Reagenz B

	<p>0,9 µl Reagenz C</p> <p>3 ml Ansatz sind ausreichend für eine 10x10 cm große Membran</p>
10xElektrophoresepuffer	<p>Für 1 l Elektrophoresepuffer: in VE-Wasser</p> <p>30 g Tris</p> <p>144 g Glycine</p> <p>pH auf 8,9 einstellen und Zugabe von 10 g SDS</p> <p>vor Gebrauch 1:10 mit Wasser verdünnen</p>
GSH-Elutionspuffer	<p>60 mM GSH</p> <p>75 mM Tris</p> <p>150 mM NaCl</p> <p>pH 8,8</p>
Hepes-Puffer	<p>145 mM NaCl</p> <p>5 mM KCl</p> <p>1 mM MgCl<sub>2</sub></p> <p>10 mM Hepes</p> <p>10 mM Glucose</p> <p>pH 7,4</p>
Hypotoner Puffer	<p>10 mM Hepes</p> <p>1 mM KCl</p> <p>1,5 mM EDTA</p> <p>200 mM Sucrose</p> <p>pH 8,1</p> <p>frisch vor Verwendung</p>

	je 10 ml zugeben: +1 Tablette Complete Mini +1 mM Na-Orthovanadat +10 nM Calyculin A
100 mM IPTG-Aliquots	1 g IPTG in 42 ml H <sub>2</sub> O als 1 ml Aliquots bei -20 °C gelagert
Lyse-Puffer für Protein- aufreinigung aus E.coli- Bakterien  A) für GST- Fu- sionsproteine    B) für His <sub>6</sub> -getaggte- Protein	50 mM Tris 1 mM EDTA 100 mM NaCl 0,1 % Triton X-100 pH 8,0 frisch vor Verwendung zugeben: + 1 Tablette Complete Mini/10 ml  50 mM Tris 300 mM NaCl 0,1 % Triton X-100 0,6 mM EDTA frisch vor Verwendung zugeben: + 1 Tablette Complete Mini EDTA-free/10 ml

	<p>+ 10 mM Imidazol</p> <p>Bindepuffer:  + 1 Tablette Complete  Mini EDTA-free/10 ml  + 10 mM Imidazol</p> <p>Waschpuffer:  + 1 Tablette Complete Mini  EDTA-free/10 ml  + 35 mM Imidazol</p> <p>Elutionspuffer:  + 1 Tablette Complete Mini  EDTA-free/10 ml  + 350 mM Imidazol</p>
Medium zur Kryokonservierung	3,4 ml RPMI-Medium 0,6 ml DMSO 2,0 ml FCS für 6 ml Lösung
Mowiol-Lösung	6 g Glycerin 2,4 g Mowiol 4-88 6 ml H <sub>2</sub> O 12 ml 0,2 M Tris/HCl pH 8,1  Nach Erhitzen auf 50 °C und Zentrifugation 2,5 % DABCO hinzufügen
PBS	137 mM NaCl 10,14 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,76 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

	2,68 mM KCl pH 7,2 autoklavieren
10x Phosphorylierungs- puffer	50 mM Tris 10 mM MgCl <sub>2</sub> 1 mM DTT in H <sub>2</sub> O
Polyacrylamid Gel	Sammelgel: 14,4 ml dH <sub>2</sub> O 2,8 ml 30 % Acrylamid- Lösung  2,6 ml Tris Puffer (0,5 M, pH 6,7) 0,2 ml 10 % SDS 0,8 ml 10 % APS 20 µl Temed  Trenngel 10 %: 21,5 ml dH <sub>2</sub> O 13,3 ml 30 % Acrylamid Lösung 5 ml Tris Puffer (3 M, pH 8,9) 0,4 ml 10 % SDS 20 µl Temed 0,4 ml 10 % APS
Ponceau S	0,5 % Ponceau S in 10 % Essigsäure
SDS Stopp-Puffer 3fach (Laemmli-Probenpuffer)	200 mM Tris/HCl pH 6,7 6 % SDS 15 % Glycerin

	<p>30 µg/ml Bromphenolblau 10 % β-Mercatoethanol</p>
10x TBE	<p>890 mM Tris 890 mM Borsäure 20 mM EDTA pH 8,0 in VE-Wasser</p> <p>Für 1xTBE-Puffer 1:10 mit VE-Wasser verdünnen</p>
10x TBS	<p>100 mM Tris 1,5 M NaCl pH 7,5 in VE-Wasser für 1xTBS 1:10 mit VE- Wasser verdünnen</p>
0,1% TBS-T	<p>100 ml 10x TBS 1 ml Tween-20 in 900 ml VE-Wasser</p>
Transferpuffer für Western Blot	<p>für 10 l und pH 10,0 30 g Tris (25 mM) 144 g Glycin (192 mM) 56 g NaOH-Plätzchen 20 % Methanol in 5 l VE-Wasser</p> <p>+ 2 l Methanol anschlie- ßend auf 10 l mit VE- Wasser auffüllen</p>

### 2.1.3 Verwendete Kits

Centricon® Centrifugal Filter Devices YM-10 / YM-30	Amicon/ Merck Millipore, Billerica, USA Darmstadt, Deutschland
HisTrap HP 1ml	GE Healthcare, Chicago, USA
Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit	GE Healthcare, Chicago, USA
NucleoSpin® Plasmid for Plasmid Purification (Mini-Präp)	Machery-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
Plasmid Maxi Kit (Maxi-Präp)	Quiagen, Hilden, Deutschland
QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit	Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland
Quick Ligation Kit	New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland

### 2.1.4 Antikörper

#### 2.1.4.1 Erstantikörper für Western Blots

<b>Bezeichnung</b>	<b>Typ</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
Anti-Aktin	Polyclonal Kanninchen	1:3000	Santa Cruz, Santa Cruz CA, USA

Anti-CrkL (Phospho Y207)	Polyclonal Kanninchen	1:5000	Abcam, Cambridge, UK
Anti- Phosphotyrosine, Klon 4G10	Polyclonal Kanninchen	1:1000	Merck, Millipore, Darmstadt, Deutschland
Anti-CrkL (C-20)	Polyklonal Kanninchen	1:1000	Santa Cruz, Santa Cruz CA, USA
Anti-GST	Polyklonal Kanninchen	1:1000	ImmunoGlobe, Himmelstadt, Deutschland
Anti-LASP-1	Polyclonal Kanninchen	1:5000	ImmunoGlobe, Himmelstadt, Deutschland
Anti-LASP-1 Klon B8	Monoklonal Maus	1:1500	Nanotools, Teningen, Deutschland
LASP anti-phospho Tyr 171 (IG1180)	Polyclonal Kanninchen	1:500 bzw. 1:1000	ImmunoGlobe, Himmelstadt, Deutschland
Anti-p-Tyr (PY20)	Monoklonal Maus	1:1000	Santa Cruz, Santa Cruz CA, USA
Anti-Zyxin	Monoklonal Maus	1:2000	Synaptic systems, Göttingen, Deutschland

#### 2.1.4.2 Zweitantikörper für Western Blots

<b>Bezeichnung</b>	<b>Markierung</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
Goat-anti-rabbit IgG	Meerrettich-Peroxidase	1:5000	Bio-Rad, München, Deutschland
Goat-anti-mouse IgG	Meerrettich-Peroxidase	1:5000	

#### 2.1.4.3 Erstantikörper für Immunfluoreszenz

<b>Bezeichnung</b>	<b>Typ</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
Anti-LASP-1 Klon B8	Monoklonal Maus	1:150	Nanotools, Teningen, Deutschland
Anti-CrkL (C-20)	Polyklonal Kanninchen	1:100	Santa Cruz, Santa Cruz CA, USA

#### 2.1.4.4 Zweitantikörper für Immunfluoreszenz

<b>Bezeichnung</b>	<b>Markierung</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
Goat-anti-rabbit	Indocarbocyanin (Cy3)	1:250	Dianova, Hamburg, Deutschland

Goat anti-mouse	AMCA	1:10	Dianova, Hamburg, Deutschland
Phalloidin	Oregon green	1:30	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

### 2.1.5 Enzyme

Antarctic Phosphatase (mit entsprechendem 10xPuffer)	New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland
QuickLigase (aus Quick Ligation Kit)	New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland
Pfu Polymerase	Thermo Scientific, Wal- tham, MA, USA
Rekombinante ABL- Ki- nase	BPS Bioscience, San Die- go CA, USA
Restriktionsenzyme - BamHI - EcoRI - Not I - Sal I - Kpn I - Nde I - Xho I (und entsprechende Reaktionspuffer)	New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland

Taq-Polymerase	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Thrombin	Amersham pharmacia biotech, mittlerweile GE Healthcare

### 2.1.6 Primer

(Sequenz in 5' - 3'-Richtung angegeben)

CrkL wildtype	<p>Forward Primer mit Konsensussequenz für Sal I:  CGCG<u>TCTGACT</u>CATGTCCTCCG  CCAGGTTC</p> <p>Reverse Primer mit Not I- Konsensussequenz:  CGCG<u>CGGCCGCT</u>CACTCGTTT  TCATCTGGGT</p> <p><u>Primer für Kolonie-PCR:</u> Forward I (F1): TTACAA-  GATCCACTACCTGG</p> <p>Forward II (F2): GATGAT-  TCCTGTCCCTTATG</p>
CrkL R39K	CACGGTATGTTCCCTCGTCAAG GATTCTTCCACCTGCCCT AG- GGCAGGTGGAAGAATCCTT GACGAGGAACATACCGTG

LASP1	<p>Forward Primer mit Konsensussequenz für Bam HI:  <u>AATGGATCC</u>ATGAACCCCAAC  TGCGCCCGGTGCGGCAAG</p> <p>Reverse Primer mit Eco RI- Konsensussequenz: CGG-  <u>GAATTCTCAGATGGCCTC</u>  CACGTAGTTGGCCGGCA</p>
His <sub>6</sub> -tagged LASP1	<p>Forward Primer mit Konsensussequenz für Nde I:  CGCC<u>ATATGA</u>ACCCCAACTGC  GCCCGG</p> <p>Reverse Primer mit Xho I- Konsensussequenz: CGC<u>CTCGAG</u>-  TCAGATGGCCTC CACGTAGT</p>
pGEX-R	Reverse Primer für Kolonie-PCR von in pGEX4T-1 integrierten Genen; freundlicher Weise von AG Herterich zur Verfügung gestellt
Alle verwendeten Primer	Eurofins MWG Synthesis GmbH, Ebersberg, Deutschland

### 2.1.7 Vektoren

pET28b	Novagen/Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
pGEX4T-1	GE Healthcare, Chicago, USA

### 2.1.8 Bakterien

One Shot TOP10 chemosensitive E. coli	Invitrogen™/Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
BL21DE3 Competent E. coli	New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland

### 2.1.9 Zelllinien

K562
BaFp210T3151
BaFp210
M07p210
M07e

Alle Zelllinien wurden freundlicher Weise von Jochen Frietsch, Klinik für Innere Medizin II, Universitätsklinikum Jena, zur Verfügung gestellt

### 2.1.10 Zellkulturmaterialien

DMSO	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
FCS	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
RPMI-Medium	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
T25-Flaschen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland

### 2.1.11 Verbrauchsmaterialien

Biosphere® Pipetten Spitzen (0-10 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Deckgläschen	Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Desinfektionsmittel	Teralin liquid, Schülke&Mayr, Norstedt, Deutschland
Eppendorf PCR-Tubes	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Filme für Chemi- lumineszenz	X-RAY Film Super RX; FUJI medical GmbH, Düs- seldorf, Deutschland
Insulinspritzen Omnican 40	Braun, Melsungen, Deutschland

Kryo-Röhrchen	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland
Mikrozentrifugenröhrchen (1,5 ml, 2 ml, Protein LoBind Tubes)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Nitruccellulosemembran	PROTRAN®, Schleicher&Schuell, Bioscience GmbH, Dassel, Deutschland
Objektträger	Duran Gruppe GmbH, Wertheim/Main, Deutschland
Spritzen (2 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml)	Becton Dickinson, New Jersey, USA
Zellkulturflaschen	T25 und T75 Cellstar, Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Zellschaber	Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutsch- land

### 2.1.12 Geräte

Brutschrank	Model 3336, Labotect, Göt- tingen, Deutschland
Eisbereiter	AF-100, Scotsman Ice Systems, Mailand, Italien

Elektrophoresekammer	PROTEAN II XL Cell/ Sub-Cell® GT Cell Bio-Rad, München, Deutschland
ELISA microplate reader	Wallac 1420 VICTOR™, PerkinElmer, Waltham, MA, USA
Feinwaage	Type 1801/Universal, Sartorius, Göttingen, Deutschland
Filmentwickler	X-OMAT M35, Kodak- Industrie, Cedex, Frankreich OPTI- MAX, PROTEC, Oberstenfeld, Deutschland
Fluoreszenzmikroskope	Axioskop, Zeiss, Ober- kochen, Deutschland
	BZ 9000, Keyence, Osaka, Japan
Lichtmikroskop	Axiovert 25, Zeiss; Ober- kochen, Deutschland
Heizplatte	PC-420D, Coring Diagnostix, Gerns- heim, Deutschland
Kühl-/Gefrierschränke	
4 °C – 8 °C	Kirch GmbH, Offen- berg, Deutschland
-20 °C	Liebherr MediLine,

-80 °C	Newport, UK Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Laborschüttler	Heidolph Duomax 1030, Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Magnetrührer	Ika, Janke&Kunkel, Stau- fen, Deutschland
Nanodrop®	2000c, Thermo Scientific, Waltham MA, USA
PCR Cycler	PCR System 9700 "Gene Amp" Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
pH-Meter	PHM 82, Radiometer Analytical, Lyon, Frenkreich
Pipetten	10, 20, 200, 1000µl Rainin, Mettler, Toledo, Greifensee, Schweiz
Sonicator	Sonifier 250-102C Branson Ultrasonics, Danbury, CT, USA
Spannungsgerät	POWER PAC200 und MODEL200/2.0 POWER SUPPLY, BioRad, München, Deutschland
Sterilbank (Klasse II, Typ 2A)	SterilGard® e3, The Baker Company, Stan- ford Maine, USA
Test tube shaker	L46, BioRad, München, Deutschland

Thermomixer	5350, Eppendorf Biotech Company, Hamburg, Deutschland
Wasserbad	Gesellschaft für Labor-technik GmbH, Willich, Deutschland
Western Blot Kammer	TRANS-BLOT™, Bio-Rad, München, Deutschland
UV / VIS Spectrophotometer	Ultra Spec 2000 Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, USA
UV-Tisch	TFX-35, Live Technologies, New York, USA
Vortex–Genie	K-550-GE, Bender & Hobein AG, Zurich, Schweiz
Zentrifugen	
Tischzentrifuge	5415C, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zellkultur	ROTANTA/S und ROTIXA/K, Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Kühlzentrifuge	5417 R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Bakterienzentrifuge	RC5B, GSA Rotor, Sorvall, Waltham MA, USA

### 2.1.13 Software und Websites

Primer-Design	<a href="http://www.eurofinsgenomics.eu/de/ecom/tools/pcr-primer-design/">www.eurofinsgenomics.eu/de/ecom/tools/pcr-primer-design/</a> <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/">www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/</a> <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/">www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/</a> <a href="http://www.ensembl.org/index.html">http://www.ensembl.org/index.html</a>
Microsoft Office	Office 2013
BZ-9000 software	BZ-II Viewer
Nanodrop Software	Für 2000c, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Molekular- und mikrobiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Primer-Gestaltung und Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Zur Gewinnung und Amplifikation der DNA-Sequenzen gewünschter Gene im Rahmen einer Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) war es notwendig, Gen-spezifische Primer zu konstruieren. Dabei handelt sich bei Primern um einsträngige Oligonukleotide, die komplementär zu den das gewünschte Gen flankierenden Nukleotidsequenzen passen. Zu Beginn wurden mithilfe von Online-Datenbanken ([www.ensembl.org/index.html](http://www.ensembl.org/index.html) und [www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/)) die entsprechenden Nucleotid-Sequenzen der Gene, die durch Transkription und Translation in die Ziel-Proteine LASP1 und CrkL umgesetzt werden, und der angrenzenden Bereiche gesucht. Bei der eigentlichen Gestaltung der Primer spielten zudem der GC-Gehalt (gewünscht 40-60 %) und die Schmelztemperatur (gewünscht 58-60 °C) eine Rolle. Zusätzlich jedoch waren auch die Restriktionsenzyme zu beachten, die für eine spätere Integration der

DNA-Sequenzen in einen Vektor verwendet werden sollten. Die Konsensussequenz für die jeweiligen Restriktionsenzyme wurde in die Primer-Sequenz integriert. Zum eigentlichen Designen der Primer wurden die Seiten [www.eurofinsgenomics.eu/de/ecom/tools/pcr-primer-design/](http://www.eurofinsgenomics.eu/de/ecom/tools/pcr-primer-design/) und [www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/) verwendet.

Neben Primern ist für einen PCR-Vorgang eine DNA-Grundlage, die so genannte Matrize, notwendig, von der ausgehend eine Amplifikation eines durch die Primer definierten DNA-Abschnitts erfolgen kann. Hierzu diente cDNA, gewonnen aus HEK-Zellen, washed platelets (wp) und all human. Tabelle 1 gibt die Zusammenstellung des PCR-Ansatzes wieder, der nach dem in Tabelle 2 abgebildeten Schema im PCR-Cycler behandelt wurde.

37,75 µl dH <sub>2</sub> O
5 µl 10xPuffer mit MgSO <sub>4</sub>
1 µl 10 mM dNTPs
2 µl „Forward“-Primer
2 µl „Reverse“-Primer
0,25 µl Pfu-Polymerase
1,5 µl cDNA (wp, all human, HEK)

**Tabelle 1: Schema für PCR-Ansatz**

Initiale Denaturierung	95 °C	2 min	} 30 Zyklen
Denaturierung	95 °C	30 s	
Annealing	58 °C	30 s	
Elongation	72 °C	2 min 30s für CrkL  2 min für LASP1	
Finale Elongation	72 °C	5 min	
Kühlen	10 °C	∞	

**Tabelle 2: Schema für Standard-PCR-Cycler-Programm**

### 2.2.1.2 Agarose-Gelelektrophorese

Diese Methode fand Anwendung unter anderem zur Erfolgskontrolle des vorausgegangenen PCR-Schrittes. Für die Agarose-Gelelektrophorese wurden 1 %ige Agarose-Gele verwendet. Hierzu wurde 1 g Agarose in 100 ml 1xTBE-Puffer durch Aufkochen gelöst. Um später die DNA-Fragmente sichtbar zu machen, wurden, nach Abkühlen der TBE-Agarose-Mischung auf ca. 60 °C, entweder 5 µl GelRed oder 5 µl MidoriGreen (INTAS Science Imaging), also DNA-Färbereagenzien, zugesetzt. Nach Einbringen des Gels in die Elektrophoresekammer, Platzierung eines Kamms zur Schaffung von Taschen für die DNA-Proben und Aushärten, wurde das Gel mit Laufpuffer (1xTBE) überschichtet. Für die elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente wurde eine konstante Spannung von 100 V angelegt. Dabei wanderten die DNA-Abschnitte, bedingt durch ihre negative Ladung, in Richtung der Anode. Die Separierung der unterschiedlich großen DNA-Fragmente konnte unter UV-Licht begutachtet und die Größe der sichtbaren DNA-Abschnitte mittels entsprechendem

DNA-Marker (Quantitas DNA Marker, Biozym Scientific) quantifiziert werden.

### 2.2.1.3 Restriktionsenzym-Verdau

Um die amplifizierte DNA anschließend in den gewünschten Vektor integrieren zu können, war es notwendig, das PCR-Produkt, ebenso wie den gewünschten Vektor, mit den identischen Restriktionsenzymen zu verdauen. Tabelle 3 gibt die Zusammensetzung der dafür verwendeten Ansätze wieder.

Insert	Vektor
43 µl PCR-Produkt-DNA	2,5 µg Vektor-DNA
5 µl 10x Puffer (entsprechend des verwendeten Restriktions- Enzyms)	2 µl 10x Puffer (entsprechend des verwendeten Restriktions- Enzyms)
2 µl Restriktionsenzym	1 µl Restriktionsenzym
	mit dH <sub>2</sub> O auf 20 µl-Ansatz auffüllen

**Tabelle 3: Schema für Verdau mit Restriktionsenzym I**  
Hinsichtlich der jeweils verwendeten Restriktionsenzyme: für *crkl* in pGEX4T-1: Sal I; für *lasp1* in pET28b: Nde I; vgl. auch 2.1.6

Die Ansätze wurden bei 37 °C im Wasserbad für jeweils 1,5 h inkubiert.

Im Anschluss daran wurden die Proben mit jeweils 1/10 des ursprünglichen Ansatzvolumens (Insert-Ansatz: 50 µl; Vektor-Ansatz: 20 µl) an 3 M Natrium-Peracetat und dann dem 25-fachen Volumen an 96 % Ethanol versetzt. Die so präparierte Mischung wurde nun für mindestens 45 min bei -80 °C eingefroren. Durch die Zugabe eines Salzes und Ethanol lässt sich DNA bei Kälte präzipitieren.

So wurden die Proben für den Verdau mit dem gewünschten zweiten Restriktionsenzym zunächst 30 min bei 4 °C und 10000 g zentrifugiert, der entstandene flüssige Überstand verworfen und das gewonnene DNA-Pellet im Anschluss mit 150 µl 70 % Ethanol resuspendiert. Darauf folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt von 10 min bei 4 °C und 10000 g. Der neuerlich entstandene Überstand wurde wiederum verworfen und das Pellet für mindestens 15 min bei Raumtemperatur (RT) getrocknet. Daran anschließend wurde das Pellet in dH<sub>2</sub>O resuspendiert und die übrigen Komponenten des Verdauungsansatzes ergänzt.

Die Mischung wurde nun für 1 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert.

17 µl dH <sub>2</sub> O
2 µl 10xPuffer entsprechend des verwendeten Restriktionsenzym
1 µl Restriktionsenzym

**Tabelle 4: Schema für Verdau mit Restriktionsenzym II.** Ansatz gleichermaßen für Vektor und Insert gültig; hinsichtlich der verwendeten Restriktionsenzyme: für *crkl* in pGEX4T-1: Not I; für *lasp1* in pET28b: Xho I;

#### 2.2.1.4 Gelextraktion

Die DNA-Fragmente in den Proben des zweiten Restriktions-Enzym-Verdaus, sowohl des Vektors als auch des amplifizierten PCR-Produkts, wurden bei konstant anliegender Spannung von 100 V in einem 1 %igem und mit Gel Red versetztem SeaKem®- Agarose-Gel entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Unter UV-Licht konnte die Größe der DNA-Fragmente im Vergleich zu einem geeichten Marker überprüft werden und die DNA, vorliegend in kleinen Gel-Blöckchen, aus dem SeaKem®-Gel ausgeschnitten werden. Um die DNA aus den so erhaltenen Gel-Blöcken weiter extrahieren zu können,

wurde ein entsprechendes Gelextraktionskit (Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit, GE Healthcare) verwendet. Dabei wurde nach dem beiliegenden Protokoll des Herstellers verfahren. Mittels Kontroll-Agarose-Gelelektrophorese (Prinzip vgl. 2.2.1.2) erfolgte eine Erfolgskontrolle der Gelextraktion.

#### 2.2.1.5 Vektordephosphorylierung

Um zu verhindern, dass sich der mit beiden Restriktionsenzymen behandelte Vektor wieder in sich schließt oder umklappt, wurde die Vektor-DNA mit einer Phosphatase zunächst für 15 min bei 37 °C und dann 5 min bei 65 °C inkubiert. In Tabelle 5 ist der Pipettieransatz zur Vektordephosphorylierung angeführt.

1 µl Antarctic Phosphatase
1 µl 10xPuffer (der Phosphatase entsprechend)
10 µl Vektorprodukt

**Tabelle 5: Pipettieransatz zur Vektordephosphorylierung**

### 2.2.1.6 Ligation

Zur Integration des gewünschten DNA-Abschnitts in die Schnittstelle des Zielvektors wurden Volumina der Insert-DNA und der Vektor-DNA entsprechend dem Verhältnis ihrer Basenpaare eingesetzt. In den Tabellen 6 und 7 sind die Zusammensetzungen der Reaktionsgemische zur Integration von CrkL in pGEX4T-1 und LASP1 in pET28b wiedergegeben.

1 µl Vektor (pGEX4T-1)
5,5 µl CrkL wt
10 µl 2xPuffer (Ligationspuffer des Kits)
1 µl Quick-Ligase
3,5 µl dH <sub>2</sub> O

**Tabelle 6: Pipettieransatz zur Integration von CrkL wt in pGEX4T-1.** CrkL: 912 bp / pGEX4T-1: 4969 bp = etwa 1/5,5; entsprechend werden 5,5 µl CrkL- und 1 µl Vektor-Produkt eingesetzt

1 $\mu$ l pET28b
7 $\mu$ l LASP1
10 $\mu$ l 2xPuffer (Ligationspuffer des Kits)
1 $\mu$ l Quick-Ligase
1 $\mu$ l dH <sub>2</sub> O

**Tabelle 7: Pipettieransatz zur Integration von LASP1 in pET28b.** LASP1: 786 bp / pET28b: 5368 bp = etwa 1/7; dementsprechend wurden 7  $\mu$ l LASP1- und 1  $\mu$ l Vektorprodukt eingesetzt

Die Ansätze wurden für 10 min bei 25 °C (RT) inkubiert.

Das Konstrukt LASP1, integriert in einen pGEX4T-1-Vektor, lag bereits, transformiert in Bakterien, als Konstrukt in unserem Labor vor (vgl. Mihlan et al. Oncogene 2012, (33)).

#### 2.2.1.7 Transformation

Die Transformation der rekombinanten pGEX4T-1- und pET28b-Vektoren fand zunächst in One Shot TOP10 chemosensitive Escherichia coli Bakterien (E. coli) statt. Hierfür wurden die bei -80 °C verwahrten Bakterienaliquots auf Eis aufgetaut. 2,5  $\mu$ l Ligationsprodukt

pGEX4T-1-CrkL beziehungsweise pET28b-LASP1 wurden zu den kompetenten E. coli- Bakterien gegeben. Dann erfolgte eine Inkubation auf Eis für 30 min. Anschließend wurde für 45 s ein Hitzeschock bei 42 °C im Heizblock appliziert, um die Membran für die Aufnahme des rekombinanten Plasmids permeabel zu machen. Bevor 250 µl S.O.C.-Medium zugesetzt wurden, wurden die Bakterien zunächst auf Eis abgekühlt. Im Anschluss daran erfolgte eine Inkubation der Zellen in S.O.C.-Medium bei 37 °C im Bakterieneschüttler für 1 h. Ein Teil der Bakteriensuspension wurde auf einer Ampicillin- (bei pGEX4T-1) beziehungsweise Kanamycin- (bei pET28b) haltigen Agarplatte ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank bebrütet.

Eine Transformation fand auch in speziell für Proteinexpression geeignete BL21 DE3 kompetente E. coli-Bakterien statt. Hierzu wurde wiederum rekombinantes Ligationsprodukt zu den aufgetauten Bakterien gegeben. Im Anschluss daran erfolgte zunächst Inkubation auf Eis für 2 min, dann ein Hitzeschock für 30 s bei 45 °C, Abkühlung auf Eis für 2 min und schließlich Zugabe von

80 µl S.O.C.-Medium. Die Bakterien wurden dann für 60 min senkrecht im Bakterienschüttler bei 37 °C zur Vermehrung angeregt. 10 µl des mit Bakterien angereicherten S.O.C.-Mediums wurden abschließend auf einer Ampicillin- (bei pGEX4T-1) oder Kanamycin- (bei pET28b) haltigen Agarplatten ausplattiert und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

Um GST als Kontroll-Molekül zu erhalten, wurde ein pGEX4T-1-Vektor ohne weitere Integration eines DNA-Fragments in *E. coli*-Zellen transformiert.

#### 2.2.1.8 Kolonie-PCR

Von den über Nacht auf den Kulturplatten herangewachsenen Bakterienklonen wurden einzelne Klone ausgewählt. Mittels einer Pipettenspitze wurde ein Teil dieser Klone zu einem PCR-Ansatz gegeben, um zu überprüfen, welcher der Klone das rekombinante Plasmid tatsächlich inkorporiert hatte. Die Primer wurden je nach gewünschtem Zielprotein, LASP1 oder CrkL, gewählt und sind unter 2.1.6 aufgeführt. Tabelle 8 gibt das Schema für eine Standard-Kolonie-PCR wieder, Tabelle 9 das entsprechende PCR-Cycler-Programm.

18,8 µl dH <sub>2</sub> O
2,5 µl 10xPuffer für Taq-Polymerase
0,5 µl 10 mM dNTPs
1 µl „Forward“-Primer
1 µl „Reverse“-Primer
0,2 µl Taq-Polymerase

**Tabelle 8: Schema für Standard-Kolonie-PCR.** Für CrkL in pGEX4T-1 wurden F2 und pGEX-R als Primer verwendet, (vgl. 2.1.6)

95 °C	2 min	} 30 Zyklen
95 °C	30 s	
58 °C	30 s	
72 °C	30 s	
72 °C	5 min	
10 °C	∞	

**Tabelle 9: Schema für PCR-Cycler-Programm bei Kolonie-PCR**

Die Größe der amplifizierten DNA-Elemente wurde in einem 1,5 %igen Agarose-Gel (vgl. Kapitel 2.2.1.2) im Vergleich zu einer standardisierten DNA-Leiter unter UV-Licht kontrolliert.

2.2.1.9 Präparation des rekombinanten Plasmids  
Zunächst wurde LB-Medium mit Ampicillin (Stock 100 mg/ml) oder Kanamycin (Stock 50 mg/ml) im Verhältnis 1:1000 versetzt. Dann wurden 5 ml dieser Medium-Antibiotikum-Mischung mit einer der Kolonien, die sich in einer Kolonie-PCR als Träger des gewünschten, rekombinanten Plasmids erwiesen hatten, angeimpft. Nach Bebrütung im Bakterienschüttler bei 37 °C über Nacht erfolgte am nächsten Morgen eine Isolation des rekombinanten Plasmids mithilfe des NucleoSpin® Plasmid Mini-Präparations-Kits (Machery-Nagel GmbH & Co. KG) entsprechend dem Protokoll des Herstellers. Mittels Vollspektrum-UV-Vis-Spektralphotometer (NanoDrop® und entsprechende Software, Thermo Scientific) konnte die Konzentration der aus den Bakterien gereinigten DNA ermittelt werden. Hierbei erfolgte eine Absorptionsmessung bei 260 nm, dem Absorptionsmaximum von DNA. Zur Beurteilung der Reinheit der gewonnenen DNA und Quantifizierung möglicher Verunreinigungen etwa durch Proteine, wurden zudem die Verhältnisse der optischen Dichte (OD) bei 260 nm zur OD bei 280 nm beziehungsweise bei 260 nm

zur OD 230 nm ermittelt.

Die Korrektheit der Basensequenzen, der in das Plasmid integrierten Gene, wurde durch Sequenzierung, durchgeführt außer Haus, verifiziert.

#### 2.2.1.10 Generierung der Mutante CrkL R39K

Für den Austausch der Aminosäure Arginin an Position 39 der AS-Sequenz von CrkL gegen Lysin, waren drei Punktmutationen in der Basensequenz des *crkl wt* Gens notwendig (CGC → AAG). Hierzu wurden zunächst entsprechende Primer designt (vgl. 2.1.6 sowie 2.2.1.1). Als Template für die Mutagenese-PCR wurde der rekombinante Vektor pGEX4T-1-CrkL wt verwendet.

18,5 µl dH <sub>2</sub> O
2,5 µl 10xReaktionspuffer
1µl „Forward“-Primer
1 µl „Reverse“-Primer
15,3 ng Template-DNA
0,5 µl 10mM dNTPs
0,5 µl Turbo-Pfu-Polymerase

**Tabelle 10: Pipettierschema für PCR zur Generierung der Mutante CrkL R39K**

95 °C	30 s	} 16 Zyklen
95 °C	30 s	
55 °C	1 min	
68 °C	6 min	
10 °C	∞	

**Tabelle 11: Schema für PCR-Cycler-Programm zur Generierung der Mutante CrkL R39K.** Die Anzahl der PCR-Zyklen richtete sich danach, ob eine isolierte Punktmutation, ein einfacher AS-Austausch oder ein mehrfacher AS-Austausch stattfinden sollte. Für den Austausch einer AS waren 16 Zyklen notwendig.

Im Anschluss an den PCR-Vorgang wurde das gesamte PCR-Produkt für den entsprechenden Verdau mit 0,5 µl Dpn I-Enzym versetzt und für 1 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Zur Transformation des durch das Restriktionsenzym verdauten Produkts in XL-10 GOLD ultrakompetente Bakterien wurde zunächst 1 µl des Verdau-Produkts sowie 1 µl β-Mercaptoethanol zu einem Aliquot der Bakterien gegeben und für 10 min auf Eis inkubiert. Daran schlossen sich 30 min auf Eis, 45 s Hitzeschock bei 42 °C, 2 min Abkühlung auf Eis sowie die Zugabe von 250 µl S.O.C.-Medium an, ehe der Ansatz für 1 h bei 37 °C im Bakterieneschüttler inkubiert wurde.

Ein Teil der so erhaltenen Bakteriensuspension wurde auf LB-Ampicillin-haltigen Agarplatten ausplattiert und über Nacht im Brutschrank bebrütet. Mit ausgewählten Kolonien wurde eine Minipräparation (vgl. 2.2.1.9), sowie im Anschluss daran eine Sequenzierung (außer Haus erfolgt) durchgeführt, um zu verifizieren, welche der ausgewählten Kolonien Träger des rekombinanten Plasmids mit der adäquaten Mutation innerhalb der CrkL-Basensequenz waren. Mit den durch Sequenzierung in ihrer Korrektheit bestätigten Minipräparations-Produkten wurden dann BL21DE3 E. coli transformiert, die für die Expression rekombinanter Plasmide und die damit verbundene Proteinproduktion spezialisiert sind. Für den Mutagenese-Prozess wurde das QuickChange Site-directed Mutagenesis Kit von Agilent Technologies verwendet.

#### 2.2.1.11 Kryokonservierung von Bakterien

Um jederzeit auf Bakterien zurückgreifen zu können, die Träger des gewünschten rekombinanten Plasmids sind, wurden einzelne Kolonien von der Agarplatte nach Transformation über Nacht in flüssigem LB-Medium bei 37 °C

unter Schütteln inkubiert. 800 µl dieser Bakteriensuspension wurden mit 200 µl 80 % Glycerol in Kryo-Röhrchen gut vermischt und konnten so präpariert bei -80 °C konserviert werden.

## 2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

### 2.2.2.1 Expression und Reinigung rekombinanter Proteine

Die Isolation der gewünschten Fusionsproteine aus den Bakterienzellen nahm 3 Tage in Anspruch. Am Abend des ersten Tages wurden 10 ml LB-Medium, das mit Ampicillin (Stock 100 mg/ml) beziehungsweise Kanamycin (Stock 50 mg/ml), dem Antibiotika-Resistenz-Gen des Vektor des zu exprimierenden Konstrukts entsprechend, im Verhältnis 1:1000 versetzt war, mit einem ausgewählten Klon angeimpft und die Kultur über Nacht im Bakterienschüttler bei 37 °C und 180 rpm zum Wachstum angeregt. Am Folgetag wurde diese Vorkultur in 100 ml LB-Ampicillin-Medium beziehungsweise LB-Kanamycin-Medium überführt und im Bakterienschüttler weiter inkubiert. Dabei wurde in regelmäßigen Abständen zur Ermittlung der Bakterienkonzentration der Lösung der

Extinktionswert bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen; als Nullwert diente reines LB-Medium. Die Inkubation wurde bis zum Erreichen eines OD<sub>600</sub>-Werts von mindestens 0,7 fortgesetzt. Ab diesem Wert konnte davon ausgegangen werden, dass eine adäquate Bakteriendichte vorlag, um eine ausreichende Proteinmenge zu erzielen. Dann wurde durch die Zugabe von 1 ml 100 mM IPTG die Expression des gewünschten Fusionsproteins induziert. Nach Ablauf von 3 h nach Stimulation wurden die Bakterien durch Zentrifugation bei 4000 g und 4 °C geerntet. Das Bakterienpellet wurde gewogen und konnte bei -20 °C eingefroren werden. Nach einer Resuspension des Bakterienpellets in Lysepuffer (Volumen abhängig vom Gewicht des Pellets: 1,5 ml Lysepuffer je 0,55 g Pellet) und 10 min Inkubation auf Eis wurde die Suspension für einen effektiven Aufschluss der Bakterienzellen nach folgendem Protokoll sonifiziert: 30 s 60 % Impuls, 1 min Pause auf Eis, 30 s 60 % Impuls, 5 min Pause auf Eis; Wiederholung des Sonifizierungsschrittes. Das so entstandene Homogenat wurde für 10 min bei 4 °C und 12000 g zentrifugiert, um unlösliche Bakterienbestandteile zu sedimentieren.

Zur Isolation der GST-Fusionsproteine (CrkL wt und Mutante R39K, LASP1 sowie GST als Einzelkomponente) wurde der durch Zentrifugation erzielte klare Überstand mit 100 µl in Lysepuffer äquilibrierten GSH Sepharose 4B Beads versetzt und für 2 h bei 4 °C im Überkopfschüttler inkubiert. Dann konnten die Beads mit dem daran gebundenen Fusionsprotein durch Zentrifugieren (30 s bei 500 g und 4 °C) sedimentiert und dreimal mit PBS gewaschen werden. Das isolierte, an die Sepharose Beads gebundene Fusionsprotein wurde in PBS bei 4 °C gelagert.

Zur Aufreinigung des His<sub>6</sub>-getaggtten LASP1 fanden Ni<sup>2+</sup>-Affinitätssäulen des HisTrap HP-Kits (GE Healthcare), entsprechend dem Protokoll des Herstellers, nach dem Prinzip der Nickel-Affinitätschromatographie Anwendung.

#### 2.2.2.2 Elution der GST-Proteine mittels GSH-Elutionpuffer

Um von Beads gelöste, frei in Lösung vorliegende, mit GST-Tag versehene Proteine zu erhalten, wurde eine gewünschte Menge mit Fusionsprotein besetzter Beads

mit 60 mM GSH-Elutionspuffer aufgeschlemmt. Dabei war mindestens das 10 fache Volumen an Puffer in Relation zum eingesetzten Beads-Volumen anzuwenden. Die Mischung wurde für ca. 40 min bei 4 °C im Überkopfschüttler inkubiert. Anschließend wurden die Beads durch einminütiges Zentrifugieren bei 500 g pelletiert und der nun GST-Fusionsprotein-haltige Überstand abgenommen. Eine Probe des Eluats wurde in SDS-Stopp-Puffer abgestoppt, um mittels Gelelektrophorese und anschließender Coomassie-Färbung den Erfolg der Elution nachzuweisen und in Relation zu standardisierten BSA-Proben zu quantifizieren.

Die Beads wurden anfänglich zwei weitere Male mit GSH-Elutionspuffer inkubiert, um verbliebenes GST-Fusionsprotein zu lösen. In den Erfolgskontrollen aus dem jeweiligen Überstand zeigte sich, dass der Hauptanteil an Fusionsprotein bereits während der ersten Inkubationsphase eluiert wurde.

### 2.2.2.3 Abspaltung des GST-Tags unter Verwendung von Thrombin

Eine gewünschte Menge an Protein besetzter Beads wurde mit einer adäquaten Menge an Thrombin in PBS aufgeschlemmt. Für die Bestimmung der nötigen Menge an Thrombin war die Kenntnis der Enzymaktivität wichtig: 1 U Thrombin  $\approx$  100  $\mu$ g Protein-Umsatz. Der Ansatz wurde für mindestens 4 h bei 25 °C unter kontinuierlichem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde durch Zentrifugation für 2 min der das Zielprotein enthaltende Überstand von den Beads getrennt. Bei LASP1 als Zielprotein wurde nach Ende der Inkubationszeit dem Ansatz zudem eine der initial eingesetzten Thrombinmenge entsprechende Konzentration an Pefabloc zur Blockade der Thrombin- Aktivität zugesetzt.

### 2.2.2.4 Konzentration des His<sub>6</sub>-LASP1-Eluats

Um die Konzentration des Eluats zu erhöhen, fanden Centricon® centrifugal filter devices (Amicon, Millipore) mit einer Ultracel YM-10 und YM-30 Membran Anwendung. Hierbei wurde das Eluat in ein spezielles Proben-Reservoir oberhalb der Membran gegeben.

Abhängig von dem eingesetzten Eluatvolumen und gewünschtem Zielvolumen wurde die Zentrifugationszeit bei 2000 g und 4 °C für den anschließenden Zentrifugationsschritt gewählt. Dadurch konnte das Volumen, in dem das gewünschte Zielprotein vorlag, verringert und so die Konzentration der Protein-haltigen Lösung erhöht werden. Durch Umdrehen des Probenreservoirs und erneute Zentrifugation konnte das verkleinerte Probenvolumen in einem Falcon gesammelt werden. Die Centri-con® centrifugal filter devices wurden nach dem Protokoll des Herstellers verwendet.

#### 2.2.2.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Um Protein-Proben mittels Gelelektrophorese analysieren zu können, wurden selbige, entsprechend der gewünschten Verdünnung, mit dem jeweiligen Volumen an SDS-Stopp-Puffer versetzt und für 5 min bei 95 °C im Heizblock erhitzt. Derartig behandelte Proben konnten bis zur Auftragung auf ein Acrylamidgel bei -20 °C verwahrt werden.

Die für die SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese

verwendeten Gele setzten sich aus einem 10 %igem Acrylamid-Trenngel und einem darüber liegendem Sammelgel zusammen. Das Gel wurde umgeben von 1xElektrophoresepuffer platziert. Nach Einbringen der Proben in die dafür vorgesehenen Taschen des Sammelgels wurde eine Spannung von 80 V angelegt, bis eine einheitliche Lauffront den Übergang zwischen Sammel- und Trenngel erreicht hatte. Bei einer angelegten Spannung von nun 130 V passierten die in den Proben enthaltenen Proteine innerhalb 1 h das Trenngel. Durch SDS wurden die Proteine gleichmäßig mit negativer Ladung besetzt und wanderten in Richtung der Anode. Die zurückgelegte Laufstrecke ist dabei umgekehrt proportional zum Logarithmus des Molekulargewichts der Proteine. Im Anschluss daran wurden die so separierten Proteine entweder mittels Western Blot-Verfahren (vgl. 2.2.5) auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen oder mittels Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Für letzteren Prozess erfolgte eine Inkubation des Polyacrylamid-Gels für 1 h bei RT und kontinuierlichem Schütteln in entsprechender Coomassie-Färbung. Um jedoch nur die

einzelnen Proteinbanden auf dem Gel sichtbar zu machen und Hintergrundungenauigkeiten zu eliminieren, wurde das zuvor mit Farbe behandelte Gel im Anschluss für 1 h in Coomassie-Entfärber geschüttelt.

#### 2.2.2.6 Western Blot

Nach der Separierung der Proteine in der Gelelektrophorese wurden selbige nach dem Protokoll eines Western Blot für 1 h bei 4 °C und konstant 1,6 A vom Acrylamid-Gel auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Während des Vorgangs waren Gel und Membran in entsprechendem Western Blot Transferpuffer eingebettet. Mittels Ponceau-S-Färbung konnte das Resultat des Transfers auf die Membran begutachtet werden. Eine Entfärbung erfolgte durch einen Waschschrift in TBS-T. Vor der Übersichtung mit dem jeweiligen Erstantikörper wurden die Membranen für 1 h bei RT entweder mit TBST-T 3 % Milch oder 5 % BSA (je nach verwendetem Antikörper) geblockt, um unspezifische Bindungen zu reduzieren. Die Antikörper wurden in einer, den Herstellerangaben entsprechenden Verdünnung in TBST-T 3 % Milch oder 5 % BSA

angewendet. Die Inkubation mit dem Erstantikörper erfolgte über Nacht bei 4 °C und unter permanenter Bewegung. Vor Aufbringen des Sekundärantikörpers erfolgte ein dreimaliger Waschvorgang der Membran mit TBS-T für jeweils 10 min. Daran schloss sich eine Inkubation mit dem in TBS-T 3 % Milch verdünntem Sekundärantikörper (vgl. 2.1.4.2), der mit Meerettich-Peroxidase gekoppelt war, für 1 h bei RT auf dem Laborschüttler an. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit TBS-T für je 10 min konnten die Membranen mit ECL home made benetzt, für 1 min inkubiert und schließlich einem Film exponiert werden. Die Entwicklung dieser Filme erfolgte mittels X-OMAT M35 von Kodak.

#### 2.2.2.7 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Als einfachste, aber auch ungenau Methode wurde eine einfache Konzentrationsabschätzung eines Proteins auf einem Coomassie-Gel im Vergleich zu definierten BSA-Standards vorgenommen. Darüber hinaus fanden zwei weitere Methoden größerer Genauigkeit ihre Anwendung:

Die BCA-Methode zur Quantifizierung der in einer Probe enthaltenen Proteinmenge beruht auf der Tatsache, dass

Bicinchoninsäure (BCA) mit dem durch Peptidbindung mit Cystein, Cystin, Tyrosin und Tryptophan zu  $\text{Cu}^+$  reduziertem  $\text{Cu}^{2+}$  einen Farbkomplex bildet, der kolorimetrisch bei einer Wellenlänge von 562 nm nachgewiesen werden kann. Hierzu wurde neben verschiedenen BSA-Standards (0,1 / 0,2 / 0,4 / 0,6 / 0,8 / 1 mg/ml) und dem Puffer, in welchem das zu analysierende Proteingemisch vorlag, je 10  $\mu\text{l}$  der Proteinprobe vorgelegt. Puffer und Proteinprobe wurden hierfür jeweils in einer 1:5 und 1:10 sowie 1:20 Verdünnung eingesetzt. Zu den vorbereiteten 10  $\mu\text{l}$  Probe wurden jeweils 200  $\mu\text{l}$  eines Gemisches aus Pierce® BCA Protein Assay Reagent A und B (im Verhältnis 20:1) gegeben. Anschließend wurden die Lösungen für 1 h bei RT inkubiert. Mit dem ELISA-Reader konnte im Anschluss das Ausmaß des Farbumschlags von grün nach violett bei einer Wellenlänge von 562 nm detektiert werden. Die Stärke des Farbumschlags korrelierte dabei positiv mit dem Ausmaß der durch die Proteinmenge bedingten Reduktion des in Reagents B enthaltenen  $\text{Cu}^{2+}$  und der anschließenden Farbkomplexbildung mit BCA.

Der Bradford-Assay zur Bestimmung der Proteinmenge in einer Probe beruht auf dem Farbstoff Coomassie-Brillant blau, dessen Absorptionsmaximum sich in Anwesenheit von Proteinen sowie in saurem Milieu von 465 nm zu 595 nm verschiebt. Bei der Durchführung des Tests wurde in Küvetten zunächst 1 ml der Bradford-Lösung vorgelegt, zu welcher dann alle 20 s jeweils 10 µl der BSA-Standard-Proben, des verwendeten Puffers sowie der zu erfassenden Proteinprobe (letztere jeweils in 1:5 und 1:10 Verdünnung) gegeben wurden. Nach jeweils 5 min Inkubation der einzelnen Proben, wurde am UV-Photometer die Extinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm erfasst. Mittels einer Eichgeraden, die sich aus den BSA-Standards ergab, konnte von der Extinktion der Proben auf den Proteingehalt selbiger rückgeschlossen werden.

#### 2.2.2.8 Phosphorylierung

Um ein den CML-Zellen entsprechendes Phosphorylierungsmuster bezüglich der entsprechenden Aminosäuren von LASP1 und CrkL zu erhalten, wurde zur Phosphorylierung der Proteine (GST-LASP1, His<sub>6</sub>-LASP1

und GST-CrkL) eine rekombinante, konstitutiv aktive ABL-Kinase (Biomol) verwendet.

Zunächst wurden die Protein-tragenden Beads in 1xPhosphorylierungspuffer äquibriert. Diese wurden anschließend zum Phosphorylierungs-Ansatz gegeben. Dieser ist in Tabelle 12 abgebildet.

ABL-Kinase	Wahl des eingesetzten Volumens jeweils so, dass
Protein-tragende Beads	Endkonzentration- ver- hältnis Kinase:Protein = 1:20
ATP	1 mM
10xPhosphorylierungspuffer	10 µl
dH <sub>2</sub> O	Volumen, um den Ansatz auf 100 µl zu komplettie- ren

**Tabelle 12: Schema für Standardansatz für Phosphorylierungsassay.** Angaben für 100 µl Ansatz

Dabei lag das Konzentrationsverhältnis von Kinase und Substrat in der Regel bei 1:20. Die Ansätze wurden bei 30 °C für mindestens 2 h (LASP1) beziehungsweise mindestens 4 h (CrkL) im Thermomixer inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Protein-tragenden Beads

durch Zentrifugation pelletiert und dreimal in PBS gewaschen. Um eine möglicherweise noch unspezifisch an den Sepharose-Beads haftende ABL-Kinase zu inaktivieren, wurden dem Ansatz Nilotinib in 20 facher Molarität der ursprünglichen ABL-Molarität zugesetzt. Um dem Erfolg der Phosphorylierung zu kontrollieren, wurden jeweils Proben vor und nach der Inkubation mit der ABL-Kinase in SDS-Stopp-Puffer zur Western Blot Analyse abgestoppt.

### 2.2.3 Interaktionsassays

#### 2.2.3.1 Ex-vivo-Pulldown-Assay

(Verwendete Zelllinien: K562, BaFp210, M07)

Der erste Schritt für einen ex-vivo-Pulldown stellte die Gewinnung eines Zelllysats dar. Am Vortag erfolgte die Zugabe von entweder 160 nM Nilotinib oder eines entsprechenden Volumens an DMSO zu etwa äquivalent mit den entsprechenden Zellen besiedelten T25-Kulturflaschen. Im Anschluss daran wurden die Zellen weitere 24 h mit dem jeweiligen Zusatz inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Zellen für 4 min bei 210 g abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Es folgte eine Resuspension des gewonnenen Zellpellets in 1 ml PBS und mit anschließender Wiederholung des Zentrifugationsschritts. Das neuerliche Zellpellet wurde in 700 µl hypotonem Puffer unter Zugabe von einer Tablette Complete Mini, 1 mM Orthovanadat sowie 1 nM Calyculin A resuspendiert und der Ansatz bei 4 °C für 30 min im Überkopfschüttler inkubiert. Danach wurde die Probe für 1 min in flüssigen Stickstoff schockgefroren und anschließend über 60 min auf Eis langsam aufgetaut. Mittels Auf- und Abpipetieren mit einer Insulin-Spritze (29 Gauge x ½ Inch) sollte der Aufschluss der Zellmembranen forciert werden. Durch einen letzten Zentrifugationsschritt über 15 min bei 4 °C und 20000 g wurden Zellmembranbestandteile vom zu gewinnenden zytoplasmatischen Proteinlysat abgetrennt.

Für den eigentlichen Pulldown-Versuch erfolgte die Inkubation des gewonnenen Zelllysats der entweder zuvor mit Nilotinib oder DMSO behandelten Zellen mit verschiedenen an Beads gekoppelten Proteinen (GST-LASP1,

GST-pLASP1, GST-CrKL, GST-pCrKL, GST) sowie 1,8  $\mu$ M Nilotinib. Damit äquivalente Proteinmengen in beiden Ansätzen eingesetzt wurden, wurde zunächst der Proteingehalt der Lysate (DMSO- oder Nilotinib- behandelte Zellen) mittels Bradford-Assay ermittelt.

Die Ansätze wurden je für 2 h bei 4 °C im Überkopfschüttler inkubiert. Mittels Zentrifugation wurden die Proteintragenden Beads pelletiert und der Überstand konnte abgenommen werden. Der Nachweis von an die Fusionsproteine gebundene Proteine aus dem Zelllysat wurde mittels Western Blot durch die Wahl entsprechender Erstantikörper geführt.

#### 2.2.3.2 In-vitro-Pulldown-Assay

Für den in-vitro-Pulldown-Assay kamen als Proteinkomponenten His<sub>6</sub>-LASP1 und GST-CrKL zum Einsatz. Zudem waren auch die jeweils an Tyrosin 171 (LASP1) und Tyrosin 207 (CrKL) phosphorylierten Pendants notwendig (Gewinnung der phosphorylierten Proteinkomponenten vgl Kapitel 2.2.7). CrKL-tragende Beads die zur Gewinnung von pCrKL einen Phosphorylierungsschritt durchlaufen hatten, wurden vor weiterer Verwendung

in der Versuchsanordnung in 3 Schritten jeweils mit PBS gewaschen. Für den tatsächlichen Pulldown-Versuch wurden jeweils etwa 5 µg an GSH-Sepharose-Beads immobilisiertes GST-CrkL, GST-pCrkL oder nur GST mit je 5 µg in Lösung befindlichem His<sub>6</sub>-LASP1 inkubiert. Jedem Ansatz, der eine phosphorylierte Proteinkomponente enthielt, wurde zudem die 20fache Molarität an Nilotinib zugesetzt, die ursprünglich im jeweiligen Phosphorylierungsprozess an ABL-Kinase verwendet wurde. Insgesamt fand der Inkubationsprozess beider Proteinkomponenten in PBS statt, wobei das Volumen so gewählt wurde, dass letztendlich ein Ansatzvolumen von etwa 500 µl erreicht wurde.

Die einzelnen Ansätze inkubierten für 4 h bei 4 °C im Überkopfschüttler. Anschließend wurde durch einen Zentrifugationsschritt bei 500 g eine Pelletierung der Proteintragenden Beads erreicht und das darüber stehende Flüssigkeitsvolumen wurde abgenommen. Die Beads wurden dann zweimal mit PBS gewaschen, durch Zentrifugation neuerlich pelletiert und der Überstand erneut abgenommen.

Zum Nachweis von etwaig gebundenem His<sub>6</sub>-(p)LASP1 an die an den Beads immobilisierten Proteine, erfolgte ein WB mit Proben aus dem Beads-haltigen Bodensatz. Als Erstantikörper wurde hierbei ein AK gegen LASP1 gewählt. Dieser wurde in den standardmäßigen Verdünnungen eingesetzt.

### 2.2.3.3 Overlay

In einem ersten Schritt erfolgte ein SDS-Page- Gel-elektrophorese mit jeweils 0,2 µg Protein (His<sub>6</sub>-LASP1 bzw. His<sub>6</sub>-pLASP1) als sogenannte „Prey“. Die im Gel gewanderten Protein-Proben wurden dem Protokoll eines konventionellen Western Blots entsprechend auf eine Nitrocellulose-Membran geblottet (vgl. 2.2.5). Diese wurde für 1 h bei Raumtemperatur mit 3 % TBST-Milch unter kontinuierlichem Schütteln geblockt. Beim Versuchsaufbau mit De- sowie Renaturierungsschritt schloss sich an das Blockieren der Membran die Behandlung derselben mit dem entsprechenden De-/Renaturierungspuffer mit Zusatz einer absteigenden Molarität an Guanidine-HCL (1. 30 min mit 6 M Guanidine-HCL bei RT,

2. 30 min mit 3 M Guanidine-HCL bei RT, 3. 30 min mit 0,1 M Guanidine-HCL bei 4 °C, 4. 1 h mit Guanidine-HCL-freiem Puffer) an. Bei Versuchsanordnungen ohne De- / Renaturierungszwischenschritt wurde die Membran unmittelbar mit 1 µg „Bait“ (GST-CRKL, GST-pCRKL, GST-CRKL R39K, GST) in 5 % TBST-Milch überschichtet und über Nacht bei 4 °C unter kontinuierlichem, horizontalem Schütteln inkubiert. Die GST-Fusionsproteine waren zuvor mittels GSH-Elution von den Beads gelöst worden, sodass sie in freier Suspension vorlagen (vgl. 2.2.3.1). Nach Abgießen der „Bait“-Lösung und drei Waschschritten für je 10 min mit 5 % Milch erfolgte zur Detektion von möglichen Interaktionen das weitere Vorgehen nach dem Protokoll eines konventionellen Western Blots mit einem polyklonalen Anti-GST-Antikörper als Primärantikörper und dem entsprechenden Sekundärantikörper.

#### 2.2.4 Immunofluoreszenz

Da es sich bei K562, M07p210, M07e um Suspensionskulturzellen handelt, wurden die zu untersuchenden Zellen mittels Zentrifugation auf den jeweiligen

Objektträgern fixiert (freundlicher Weise bereit gestellt von Jochen Frietsch, Universitätsklinikum Jena). In einem nächsten Schritt wurden die Objektträger zunächst für ca. 3 min mit PBS gewaschen, über 10 min mit 1 ml 50 mM Ammoniumchlorid blockiert und erneut mit PBS gewaschen. Zur Permeabilisierung der Zellmembran für die nachfolgenden Antikörper wurden die auf den Objektträgern fixierten Zellen für 10 min mit 1 ml 0,1 % Triton/PBS inkubiert. Um eine weitere unspezifische Hintergrundbindung zu reduzieren, folgte vor der Antikörperzugabe ein weiterer Blockierungsschritt über 30 min mit 500 µl Goat Serum in 0,1 % Triton/PBS. Als Erstantikörper wurden der polyklonale anti-CrkL-Ak (C20, Santa Cruz) in einer Verdünnung 1:100 und LASP1 mono B8 in einer Verdünnung 1:150 in Goat Serum in 0,1 % Triton/PBS eingesetzt. Die Objektträger wurden in einer mit Wasser gesättigten Kammer mittig platziert und mit ca. 60-70 µl der beschriebenen Antikörperverdünnung benetzt. In dieser Anordnung erfolgte eine Inkubation über 2,5 h bei RT. Zur Entfernung der Erstantikörper wurden die Objektträger dann fünfmalig mit PBS unter leichtem Schwenken gewaschen. Als Zweitantikörper wurden

AMCA goat-anti-mouse (1:10) und Cy3 goat-anti-rabbit (1:250) jeweils in 0,1 % Triton/PBS eingesetzt. Zudem erfolgte die Anwendung von Oregon green Phalloidin (1:30) zur Markierung von Aktin. Die Inkubation mit diesen erfolgte analog zu der mit den Erstantikörpern, ebenfalls gefolgt von Waschschritten mit PBS und einem letzten in dH<sub>2</sub>O. Ehe sie mit einem Deckgläschen versehen wurden, wurden die Objektträger noch mit 10- 20 µl Mowiol betropft.

## 2.2.5 Zellkultur-Methoden

Die Arbeiten an den jeweiligen Zelllinien erfolgten stets in einer Sterilbank. Alle hier verwendeten Zelllinien lagen als Suspensionskultur vor und waren nicht adhärent.

### 2.2.5.1 Kultivierung von Zellen

Die Zellen wurden bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub> in entsprechendem Medium (RPMI-Medium + 10 % FCS + 1 % Penicillin/Streptomycin) kultiviert.

### 2.2.5.2 Kryokonservierung und Rekultivierung von Zellen

Die Kryokonservierung diente zur Erhaltung von Zelllinien über einen langen Zeitraum. Hierfür wurde nach Zentrifugation der in Kultur befindlichen Zellen mit 200 g das überstehende Medium abgesaugt und das Zellpellet vorsichtig in Einfriermedium (3,4 ml RPMI-Medium + 0,6 ml DMSO + 2,0 ml FCS + Penicillin/Streptomycin) resuspendiert und in ein Kryo-Röhrchen überführt. Zunächst erfolgte ein Einfrieren bei -80 °C für 24 h und dann das Einfrieren in flüssigem Stickstoff.

Um Zellen wieder aufzutauen, wurde das Kryo-Röhrchen aus dem flüssigen Stickstoff genommen und rasch bei 37 °C aufgetaut. Die Zellen-Gefriermedium-Mischung wurden mit 5 ml frischem RPMI-Medium vorsichtig durch Pipettieren vermischt und die Zellen anschließend durch Zentrifugation bei 200 g pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und anschließend in entsprechende Kulturflaschen übertragen.

### **3 Ergebnisteil**

#### **3.1 In vitro – Versuche – Analyse der Interaktionsbasis von LASP1 und CrkL**

Um unserer Arbeitshypothese einer Interaktion von LASP1 und CrkL, vermittelt durch das phosphorylierte Tyrosin 171 von LASP1 und die SH2-Domäne von CrkL, durch entsprechende Versuche verifizieren beziehungsweise falsifizieren zu können, benötigten wir als Arbeitsgrundlage reine Proben der betreffenden Proteine, LASP1 und CrkL.

##### 3.1.1 Gewinnung Tag-tragender Fusionsproteine

###### 3.1.1.1 Von der Vektorenwahl zum rekombinanten Bakterienklon

Zur Gewinnung der notwendigen Proteine entschieden wir uns, rekombinante, die gewünschten Eiweiße exprimierenden Bakterienklone zu generieren. Dabei wurden Bakterien zur Aufnahme eines Vektors, in den die DNA-Sequenz des für LASP1 beziehungsweise CrkL codierenden Gens integriert wurde, stimuliert und die Expression der transformierten DNA-Sequenzen über definierte

Induktoren initiiert (s. u.).

Da die isolierte Aufnahme doppelsträngiger, aber linearer DNA in Bakterienzellen nicht gelingen würde, war es notwendig, geeignete Transporter, so genannte Vektoren, für die Transformation der entsprechenden DNA-Sequenzen in die E. coli Bakterien zu wählen. Als Vektor sollten Plasmide, also zirkulär geschlossene, doppelsträngige DNA-Einheiten dienen. Neben der Tatsache, dass ein Vektor notwendig ist, um Gene in Bakterienzellen einzubringen, sollte das gewählte Plasmid weitere Kriterien erfüllen. So sollte die Sequenz Antibiotika-Resistenz-Gene aufweisen, die, bei Kultivierung von Bakterien auf entsprechend Antibiotika-haltigen Nährmedien, eine Selektion derer Bakterien erlaubte, die Träger des rekombinanten Konstrukts und somit resistent bezüglich des Antibiotikums waren. Darüber hinaus sollte der Vektor auch eine Möglichkeit bieten, das gewünschte Protein nach Expression aus den exprimierenden Bakterien isolieren zu können. Beide dieser Anforderungen erfüllten sowohl der pGEX4T-1- als auch der pET28b-Vektor.

Die erste Wahl fiel auf den pGEX4T-1-Vektor als Transporter für die gewünschten DNA-Sequenzen in die Bakterienzellen. Neben der Tatsache des Vorhandenseins eines Resistenzgens gegen Ampicillin, bot die Polyklonierungsstelle des Vektors mit Konsensussequenzen für verschiedenste Restriktionsenzyme die Möglichkeit, die DNA des gewünschten Gens unmittelbar nach für Glutathion-S-Transferase (GST) codierende Sequenzen einzubringen. Mit dem Einbau der Ziel-DNA an dieser Stelle des Vektors wurde diese in ein Operon zusammen mit dem *gst*-Gen integriert und damit, bei entsprechender Induktion, zusammen mit diesem exprimiert. Das Ergebnis war ein Fusionsprotein, also LASP1 oder CrkL, versehen mit einem N-terminalen GST-Tag, der die Isolation aus den Bakterienzellen ermöglichen sollte.

Aufgrund seiner Größe und der damit verbundenen Erhöhung des Molekulargewichts des LASP1- beziehungsweise des CrkL-Fusionsproteins um rund 27 kDa, erschien es nicht für alle Versuche vorteilhaft, ausschließlich mit GST-Tag versehenen Proteinen zu arbeiten. Aus diesem Grund entschieden wir uns zusätzlich für die Verwendung eines weiteren Vektors, pET28b, in

den die DNA-Sequenz für LASP1 integriert wurde.

Dieser Vektor mit einem Resistenz-Gen gegenüber Kanamycin erlaubte durch die Wahl geeigneter Restriktionsenzyme den Einbau des für LASP1 codierenden DNA-Abschnitts an einer Stelle, die eine Expression von LASP1 zusammen mit einem N-terminalen Tag aus 6 Histidinen (His<sub>6</sub>-Tag) zur Folge hatte. Dieser ermöglichte, wie auch der GST-Tag, eine selektive Reinigung des Zielproteins aus den Bakterienzellen. Jedoch war dieser im Vergleich zum GST-Tag in seiner Größe und damit der Veränderung des Molekulargewichts des gewünschten Proteins praktisch zu vernachlässigen.

Nach der Wahl des geeigneten Transportmittels in die Bakterienzellen galt es, das gewünschte Insert, also diejenigen DNA-Sequenzen zu gewinnen, die mithilfe eben jener Plasmide in den prokaryotischen Organismus überführt werden sollten.

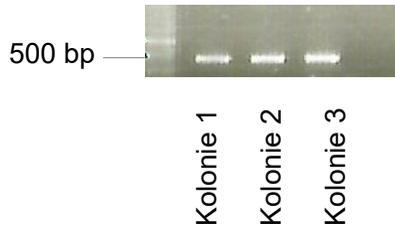
Hierfür wurde zunächst in einem ersten Schritt versucht, die Sequenz des gewünschten Gens aus einem cDNA-Pool (all human, washed platelets oder HEK-Zell-DNA) mittels entsprechender Primer in einem PCR-Verfahren zu isolieren und zu amplifizieren.

Um eine Einpassung des Inserts, also der gewonnenen DNA von LASP1 beziehungsweise CrkL in den Vektor zu erreichen, wurden sowohl die Vektor-DNA als auch die PCR-Produkte, *lasp1*- und *crkl*-DNA, mit identischen Restriktionsenzymen inkubiert, um an beiden DNA-Komponenten Enden zu erhalten, die, vergleichbar Puzzle-Teilen, ineinander greifen.

Dadurch war ein Zusammenpassen der einzelnen Bestandteile, Vektor und Insert, gewährleistet. Die Verbindung wurde durch Inkubation mit einem Ligase-Enzym, welches die Kontinuität des Glucose-Phosphat-Rückrats einer durchgängigen DNA-Sequenz wieder herstellt, stabilisiert. Das Ergebnis all dieser Prozesse waren rekombinante Vektor-Konstrukte, die die DNA-Sequenzen unserer Zielproteine enthielten: pGEX4T-1-CrkL wt und pET28b-LASP1. Das pGEX4T-1-LASP1-Konstrukt existierte bereits im Bestand unseres Labors (vgl. Mihlan et al. Oncogene 2012, (33)).

In einem letzten Schritt wurde das rekombinante Konstrukt in Bakterienzellen, TOP10 und BL21 E. coli Bakterien, eingebracht. Mithilfe thermischer Transformation (einem Protokoll entsprechende Abfolge stark wechselnder Temperaturen) wurden Zellwand und Zellmembran der prokaryotischen Zellen für die Aufnahme der veränderten Vektoren kompetent gemacht. Durch Kultivierung der so behandelten Zellen auf Nährböden mit einem Zusatz an Antibiotika, den Resistenzgenen der transformierten Vektoren entsprechend (Ampicillin bei pGEX4T-1 und Kanamycin bei pET28b), erfolgte selektierendes Heranwachsen nur von Plasmid-tragenden Bakterien. Mittels PCR-Verfahren mit geeigneten Primern (vgl. 2.1.6) wurde bei ausgewählten Kolonien überprüft, ob der Vektor auch das gewünschte Insert enthielt und nicht ein Leervektor ohne integrierte Ziel-DNA in die Bakterien aufgenommen worden war. Wie in Abbildung 7 dargestellt, wurde das PCR-Ergebnis aus den einzelnen Bakterienklonen mittels Agarose-Gelelektrophorese hinsichtlich der Größe der gewonnenen PCR-Produkte im Vergleich zu einer standardisierten DNA-Leiter überprüft.

Die Banden konnten unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.



**Abbildung 7: Agarose-Gel nach Kolonie-PCR zum Nachweis der Aufnahme des pGEX4T-1-CrkL-Konstrukts in entsprechende Bakterienkolonien.** Für die abgebildete Kolonie-PCR wurden als Primer F2 und pEGX-R (vgl. 2.1.6) verwendet. Damit wurde ein knapp 500 bp großer Abschnitt der im PGEX4T-1-Vektor integrierten CrkL-DNA amplifiziert und im Agarose-Gel nachgewiesen.

Letztendlich verifizierten wir die Korrektheit der Sequenzen der in den Vektor integrierten und von Bakterien aufgenommenen, gewünschten DNA-Abschnitte mittels einer Sequenzierung von aus den Bakterien isolierten Vektoren (Sequenzierung ex domo durchgeführt).

### 3.1.1.2 Generierung der CrkL-Mutante R39K

Im vorausgegangenen Kapitel wurde die Generierung eines Bakterienklons zur Expression des CrkL Wildtyp (wt) Proteins beschrieben. Um jedoch unsere Arbeitshypothese detaillierter untermauern zu können, erschien die Gewinnung eines CrkL-Moleküls, das in seiner Sequenz an relevanter Stelle verändert wurde, als essentiell.

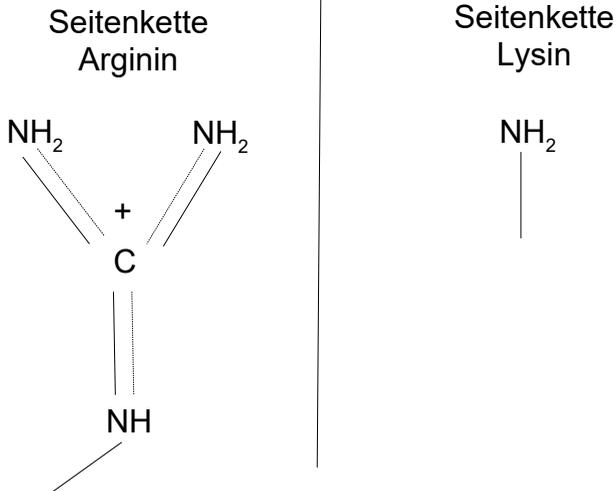
Wie bereits ausgeführt, basierte unsere Hypothese darauf, dass die Interaktion zwischen dem pTyrosin 171 des LASP1-Proteins und der SH2-Domäne von CrkL stattfindet. Um belegen zu können, dass für die Kontaktaufnahme von CrkL mit pLASP1 eine intakte SH2-Domäne essentiell ist, sollte ein CrkL-Konstrukt mit einer Punktmutation in eben diesem Domänenbereich erzeugt werden. Diese Mutante sollte gemäß unserer Arbeitshypothese ein deutlich abgeschwächtes beziehungsweise fehlendes Bindungsverhalten gegenüber an Tyrosin 171 phosphoryliertem LASP1 zeigen.

Nun galt es, die richtige Stelle für den Aminosäureaustausch innerhalb der SH2-Domäne von CrkL zu definieren.

In vielen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass in nahezu allen SH2-Domänen ein hoch konserviertes Motiv, das FLVR(ES)-Motiv, vorliegt (111, 112). Dabei steht diese Abkürzung für eine bestimmte Abfolge an Aminosäuren: F - Phenylalanin, L - Leucin, V - Valin, R - Arginin, E - Glutaminsäure, S - Serin. Dieses Motiv und insbesondere das darin enthaltene Arginin werden im Wesentlichen für die Interaktion mit phosphorylierten Tyrosinen der jeweiligen Bindungspartner verantwortlich gemacht (113, 114). Desweiteren konnte durch verschiedene Publikationen belegt werden, dass bereits der Austausch des Arginins innerhalb dieses Motivs gegen Lysin die Bindung an pTyrosin-haltige Proteine nahezu vollständig unterbindet (111, 113). Zunächst erscheint es paradox, dass das Ersetzen einer basischen Aminosäure durch eine andere, wiederum basische Aminosäure einen derartig massiven Einfluss auf die Bindungseigenschaften eines Proteins haben soll. Schließlich würde auf den ersten Blick wohl die positive Ladung des Arginins für die Wechselwirkung mit dem aufgrund der Phosphatgruppe negativ geladenen Tyrosin verantwortlich gemacht.

Bei näherer Betrachtung der Struktur der Seitenketten von Arginin und Lysin jedoch wird klar, dass zwar beide AS- Seitenketten eine positive Ladung tragen, jedoch der sterische Aufbau dieser und die Verteilung der positiven Ladung über die Seitenkette deutlich differieren. Eben dieser Unterschied in Konstellation und Ladungsverteilung scheint ursächlich für das nicht übereinstimmende Bindungsverhalten von Arginin und Lysin zu sein (111, 115). Abbildung 8 stellt die Seitenketten der Aminosäuren Arginin und Lysin dar.

Gestützt auf die Erkenntnisse aufgeführter Publikationen, entschieden wir uns ebenfalls dafür, das Arginin des FLVR-Motivs innerhalb der SH2-Domäne von CrkL durch Lysin zu ersetzen.



**Abbildung 8: Seitenketten der Aminosäuren Arginin und Lysin**

In der AS-Abfolge des CrkL-Proteins befindet sich das betreffende Arginin an Position 39 und wird auf DNA-Ebene durch das Basen-Triplett CGC codiert. Um einen Aminosäureaustausch gegen Lysin zu erzielen, war es notwendig, drei Punktmutationen in der das CrkL-Protein codierenden DNA-Sequenz vorzunehmen; also CGC durch die Basenabfolge AAG zu ersetzen, welche für das gewünschte Lysin codiert. Als Klonierungsgrundlage wurde der rekombinante pGEX4T-1-CrkL-wt-Vektor

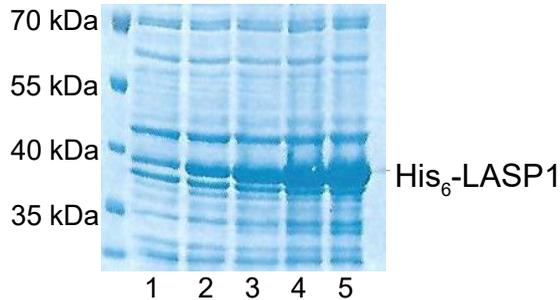
verwendet. Mit Hilfe des QuickChange Site directed Mutagenesis Kit® (Agilent Technologies) und dem gewünschten Basenaustausch entsprechend gewählten Primern (vgl. 2.1.6) gelang es, die anvisierte Mutation in der DNA-Sequenz des Wildtyp-Gens vorzunehmen und ein rekombinantes pGEX4T-1-CrkL-R39K-Konstrukt zu erzeugen. Das mittels Gensequenzierung auf die Korrektheit des dreifachen Basenaustausches kontrollierte Konstrukt konnte entsprechend thermischer Transformation in XL10 Gold ultracompetente E. coli Bakterien eingebracht werden. (Sequenzierung ex domo durchgeführt)

### 3.1.1.3 Vom rekombinanten Bakterienklon zum isolierten Fusionsprotein

Die transformierten Bakterienklone sollten nun also als „Proteinproduzenten“ fungieren. Um das Ablesen des eingebrachten Plasmids durch die Bakterienzelle zu induzieren, wurde die Bakterienkultur mit IPTG behandelt. IPTG agiert als künstlicher, der Lactose strukturell ähnlicher Induktor eines Laktose-Operons in prokaryotischen Zellen. Das heißt, unter Zugabe von

IPTG kommt es zur Expression der einem *lac*-Operator unterstehenden Gene. Da sowohl die Sequenzen für GST-LASP1, GST-CrkL wt und R39K, als auch von His<sub>6</sub>-LASP1 in den jeweiligen Vektoren der Regulation durch einen *lac*-Operator unterlagen, konnte ihre Expression durch Behandlung des Bakterienkulturansatzes mit IPTG induziert werden.

Der Zeitraum, nach dem mit einer adäquaten Proteinexpression zu rechnen war, wurde anhand von Stimulationsreihen ermittelt. Dabei ergab sich, dass nach rund 3 h von einer ausreichenden Menge an produziertem Protein ausgegangen werden konnte. Abbildung 9 zeigt, aufgetragen auf ein Coomassie-Gel, die zunehmende Expression von His<sub>6</sub>-LASP1 in den Bakterien abhängig von der Zeit nach Induktion mit IPTG.



**Abbildung 9: Stimulierungsreihe zur Expression des PET28b-LASP1-Konstrukts.** Durch die IPTG-Gabe wird die Expression von His<sub>6</sub>-LASP1, das im pET28b- Vektor einem *lac*-Operator untersteht, induziert.

1: vor IPTG, 2: 30 min nach IPTG, 3: 1 h nach IPTG, 4: 2 h nach IPTG, 5: 3 h nach IPTG;

Mittels Zugabe von Lysepuffer und anschließender Sonifizierung, also einer Behandlung des Zellen-Lysepuffer-Gemisches mit Ultraschall-Wellen im Bereich > 20 kHz, wurden die Bakterienzellwand und -membran permeabel gemacht und so die Lyse der Bakterienzellen forciert. Ein Zentrifugationsschritt ermöglichte die Abtrennung von Zellwand und Zellmembranbestandteilen von den zytosolischen Komponenten, zu welchen auch unsere Zielproteine zählten. Zur Isolierung der gewünschten Proteine war nun die Tatsache wichtig, dass diese, durch Integration an entsprechender Stelle in den Vektor,

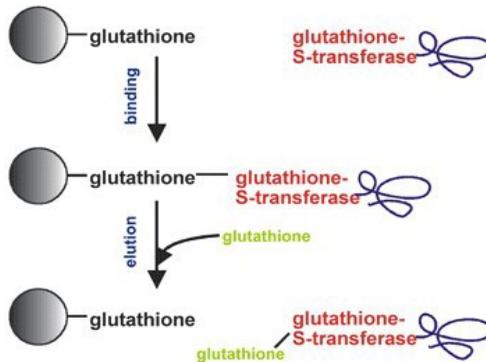
zusammen mit einem Tag am N-terminalen Ende, GST oder einer Abfolge von 6 Histidinen (His<sub>6</sub>), exprimiert wurden.

Um GST-getaggte Fusionsproteine aus dem Cytosol-Gemisch zu reinigen, wurde das Zelllysate mit Beads inkubiert, die an ihrer Oberfläche mit Glutathion besetzt waren. Die Glutathion-S-Transferase (GST) der Fusionsproteine besitzt hierfür hohe Affinität, bindet daran und erlaubt so die selektive Isolation von GST-Fusionsproteinen aus dem bakteriellen Zelllysate. Abbildung 10 zeigt die einzelnen Schritte der Reinigung von CrkL mittels GST-Tag in einem Coomassie-Gel. Äquivalent verhielt es sich mit GST-getaggttem LASP1. (Daten nicht gezeigt) Da GST ein Molekulargewicht von 27 kDA besitzt, sind die Fusionsproteine im Coomassie-Gel oder dem Western Blot entsprechend 27 kDa über ihrem eigenen Molekulargewicht zu finden.



**Abbildung 10: Reinigung von GST-CrkL aus kompetenten E. coli-Bakterien.** Das mit Coomassie gefärbte Polyacrylamid-Gel zeigt Proben aus dem Zelllysat bzw. dem das gereinigte Protein tragenden Beads-Stock zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Aufreinigungsprozesses.

Die GST-Fusionsproteine konnten unter Verwendung von 60 mM Glutathion-Lösung wiederum bei Bedarf von den Beads eluiert werden, so dass letztendlich reines, freies GST-LASP1, GST-CrkL wt und GST-CrkL R39K zur Verfügung stand. Dieses Prinzip wird in Abbildung 11 wiedergegeben.



### Abbildung 11: Prinzip der Elution von GST-Tag tragenden Proteinen von GSH-Sepharose Beads mittels Glutathion.

Quelle: [www.abbkine.com/featured-purkine-gst-tag-protein-purification-kit-glutathione-released/](http://www.abbkine.com/featured-purkine-gst-tag-protein-purification-kit-glutathione-released/) (abgerufen am 20.01.2018)

Reproduced with permission

Da für eine ausreichende Ausbeute an eluiertem Fusionsprotein häufig mehrfache Behandlungsschritte der Protein-tragenden Beads mit Glutathion-Lösung notwendig waren, fand sich das gelöste Protein zum Ende des Elutionsprozesses oft in stark verdünnter Konzentration in einem großen Puffervolumen. Daher kamen hier spezielle Filter (Centricon® centrifugal filter devices, Amicon, Millipore) zum Einsatz, die zusammen mit einem Zentrifugationsschritt eine Konzentrationserhöhung der Protein-haltigen Lösung durch Verringerung des

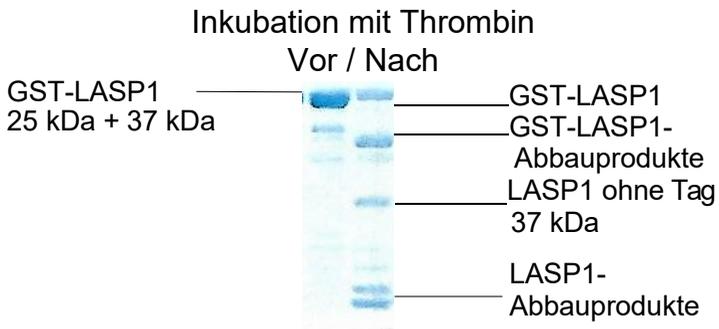
Flüssigkeitsvolumens erlaubten.

Initial erschien es nicht für alle geplanten Versuche sinnvoll, dass die gewonnenen Proteine mit einem 27 kDa großen GST-Tag versehen waren, da dieser unter Umständen auch Einfluss auf Bindungsverhalten und weitere Proteineigenschaften nehmen könnte. Daher bestand die Überlegung, die GST-Fusionsproteine nach Reinigung an Sepharose-Beads nicht zusammen mit dem GST-Tag durch Glutathion von diesen zu eluieren, sondern den Tag vom gewünschten Zielprotein abzuspalten. Für diesen Ansatz bot es sich an, das Enzym Thrombin zu nutzen, für das eine Schnittstellen-Konsensussequenz im Linker-Bereich zwischen GST-Tag und Zielprotein vorlag (bedingt durch die DNA-Sequenz des pGEX4T-1-Vektors). Nach Inkubation mit dem Enzym und anschließender Zentrifugation sollte sich im Überstand, gelöst im entsprechenden Puffer, das freie, ungetaggte Protein finden und die Beads mit dem weiterhin an Glutathion gebundenen GST im Bodensatz.

Allerdings ergaben sich in diesem Kontext zwei wesentliche Probleme:

Im Falle von LASP1 fand sich nicht nur in der Linker-Region zwischen Tag und LASP1 eine Schnittstellesequenz für Thrombin, sondern auch in der AS-Sequenz von LASP1 selbst ist diese Konsensussequenz enthalten. Daraus resultierte, dass durch Inkubation mit Thrombin nicht nur die Verbindung zwischen Tag und Zielprotein, sondern auch LASP1 selbst Ziel der Enzymaktivität von Thrombin wurde. Durch Zeitversuche konnte eine geeigneten Inkubationszeit ermittelt werden, innerhalb welcher der LASP1-Abbau in einen tolerablen Ausmaß gehalten und genug vom Tag abgespaltenes, komplettes LASP1 gewonnen werden konnte. Darüber hinaus wurde bei Versuchen mit dem Zielprotein LASP1 nach Abschluss der Inkubationszeit dem Ansatz Pe-fabloc, ein Enzyminhibitor, zugesetzt, der die Thrombinaktivität unterbinden und die Stabilität von LASP1 gewährleisten sollte. Jedoch konnte auch durch diese Maßnahmen kein freies LASP1 im Überstand gefunden werden, sondern weiterhin im Bodensatz der Beads, obwohl es nicht mehr mit einem Tag versehen war. Vermutlich machten es unspezifische Wechselwirkungen zwischen den Beads und dem LASP1-Protein unmöglich,

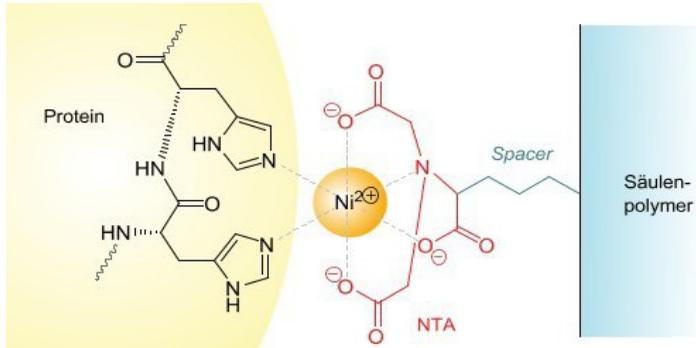
selbiges durch Zentrifugation vom Beads-Volumen abzutrennen. Besonders ausgeprägt zeigte sich diese Problematik, wenn das Protein bereits an Tyrosin 171 phosphoryliert war. Auch durch verschiedenste Variationen, wie die Verwendung silikonisierter Eppis oder Elongation der Inkubationszeiten, gelang die Isolation von Tag-freiem, intaktem LASP1 nicht. Abbildung 12 zeigt anhand eines Coomassie-Gels die Problematik der LASP1-Degeneration durch Thrombin.



**Abbildung 12: Abspaltung des LASP1-Proteins vom GST-Tag mittels Thrombin.** In dem mit Coomassie gefärbten Gel ist neben dem freien, vom GST-Tag abgetrennten LASP1 auch der Abbau des LASP1-Proteins selbst durch das Enzym Thrombin abgebildet. Ursächlich hierfür ist die Thrombin-Schnittstellenkonsensussequenz in der LASP1-AS-Abfolge.

Das Verbleiben des vom GST-Tag abgetrennten Proteins im Beadsbodensatz zeigte sich auch bei dem Versuch freies CrkL mittels dieser Methode zu gewinnen. (Daten nicht gezeigt)

Aus diesem Grund entschieden wir uns dazu, LASP1 zusätzlich durch Einbringen in einen alternativen Vektor, den pET28b Vektor, mit einem His<sub>6</sub>-Tag, also einer Abfolge von 6 Histidinen, zu versehen und auf diesem Weg zu isolieren. Damit wurde die Gewinnung einer Protein-komponente unserer geplanten Interaktionsversuche mit einem in Relation zum Proteingewicht quasi nicht ins Gewicht fallenden Tag ermöglicht. Zur Reinigung des His<sub>6</sub>-getaggten LASP1 aus dem bakteriellen Zelllysat kamen Säulen zur Anwendung, deren Füllmaterial mit Ni<sup>+</sup>-Ionen besetzt war. Passierte das Zelllysat diese Säulen, banden die mit einem His<sub>6</sub>-Tag versehenen Proteine an die Nickel-Ionen und wurden so vom übrigen, zellulären Material abgetrennt, das ungehindert die Säule passieren konnte. Dieses Prinzip der Nickel-Affinitätschromatographie ist in Abbildung 13 gezeigt.



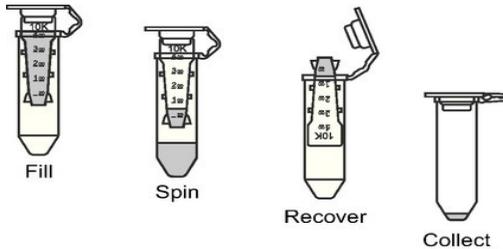
### Abbildung 13: Prinzip der Nickel-Affinitätschromatographie.

Quelle: Chemgapedia Online-Enzyklopädie, [www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/16/biochem/pcr/pcr\\_de//deletion.vlu/Page/vsc/de/ch/16/biochem/pcr/pcr\\_anwendung/fusionsproteine.vscml/Supplement/1.html](http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/16/biochem/pcr/pcr_de//deletion.vlu/Page/vsc/de/ch/16/biochem/pcr/pcr_anwendung/fusionsproteine.vscml/Supplement/1.html) (abgerufen am 13.01.2018)  
Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Reproduced with permission

Durch Spülung der Säule mit einem Imidazol-haltigen Elutionspuffer konnten die Zielproteine wieder von der Nickel-besetzten Säule gelöst werden.

Da für den Elutionsvorgang große Volumina an Elutionspuffer notwendig waren, lag das gewonnene His<sub>6</sub>-LASP1 in starker Verdünnung vor. Zur Gewinnung einer stärker konzentrierten Proteinlösung wurde das Eluat, aufgebracht auf spezielle Filter (Centricon centrifugal filter devices YM-30 und YM-10, Amicon, Millipore), zentrifugiert und so das Probenvolumen verkleinert.

Das Prinzip der Anwendung zeigt Abbildung 14.



**Abbildung 14: Anwendung der Centricon centrifugal filter devices zur Konzentration der His<sub>6</sub>-LASP1-Lösung.**

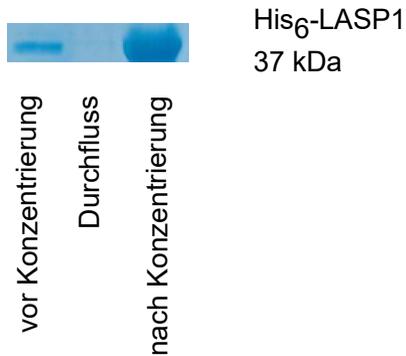
Quelle: [www.merckmillipore.com/DE/de/product/Amicon-Ultra-0.5mL-Centrifugal-Filters-for-DNA-and-Protein-Purification-and-Concentration,MM\\_NF-C82301?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.de%2F&bd=1](http://www.merckmillipore.com/DE/de/product/Amicon-Ultra-0.5mL-Centrifugal-Filters-for-DNA-and-Protein-Purification-and-Concentration,MM_NF-C82301?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.de%2F&bd=1) (abgerufen am 13.01.2018)  
Reproduced with permission from Merck KGaA Darmstadt, Deutschland

Auf diesem Weg war es möglich freies, reines His<sub>6</sub>-LASP1 in gewünschter Konzentration zu gewinnen. Abbildung 15a zeigt anhand von Proben zu verschiedenen Zeitpunkten des Aufreinigungsprozesses die Gewinnung von reinem His<sub>6</sub>-getagtem LASP1.



**Abbildung 15a: Reinigung von His<sub>6</sub>-LASP1 aus Bakterien.** Das mit Coomassie gefärbte Polyacrylamid-Gel zeigt Proben aus unterschiedlichen Phasen des Aufreinigungsprozesses von His<sub>6</sub>-LASP1 aus mit IPTG stimulierten Bakterien.

Die Erhöhung der Konzentration des gewonnenen, His<sub>6</sub>-LASP1-haltigen Protein-Eluats durch die speziellen Zentrifugationsfilter ist in Abbildung 15b dargestellt.

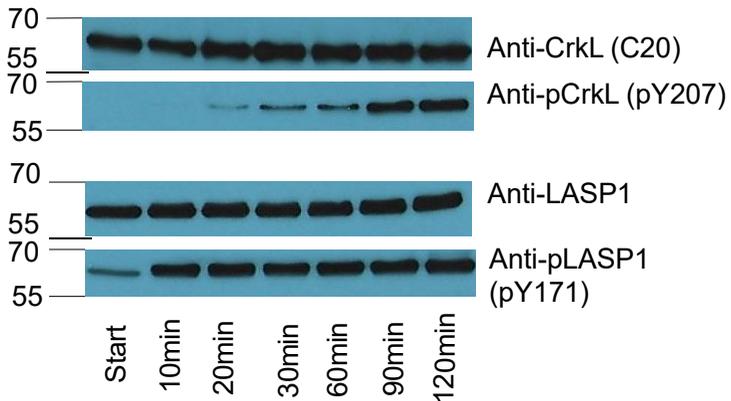


**Abbildung 15b: Konzentrierung des gereinigten His<sub>6</sub>-LASP1.** Das mit Coomassie gefärbte Polyacrylamid-Gel zeigt die Erhöhung der His<sub>6</sub>-LASP1-Konzentration durch Zentrifugation unter Verwendung der speziellen Filter.

In welcher Konzentration die gereinigten Proteine jeweils vorlagen, wurde mittels Bradford- bzw. BCA-Assay oder im Coomassie-Gel, durch Quantifizierung im Vergleich zu BSA-Standards definierter Konzentration, ermittelt. Die isolierten Proteine waren in PBS über mehrere Monate bei 4 °C stabil.

### 3.1.2 Phosphorylierungsassay

Da unserer Hypothese zu Folge die Interaktion abhängig vom Phosphorylierungsstatus der beiden beteiligten Proteine sein sollte, war es für nachfolgende Versuche essentiell, die entsprechenden Aminosäuren von CrkL wt/R39K und LASP1 mit einer Phosphatgruppe zu versehen. Um im Kontext der CML zu bleiben, wurde für diesen Versuchsteil mit einer konstitutiv aktiven, rekombinanten ABL-Kinase (BPS Bioscience) gearbeitet. Zur Bestimmung des Zeitpunkts einer maximalen Phosphorylierung der eingesetzten Proteinmenge, wurde eine Phosphorylierungsreihe durchgeführt. Dabei erfolgte während des Phosphorylierungsprozesses zu definierten Zeitpunkten die Entnahme von Proben sowie die Ermittlung des aktuellen Ausmaßes der Phosphorylierung der in den Proben enthaltenen Proteine mittels WB. Abbildung 16 zeigt in einem WB das Ergebnis der Phosphorylierungsreihe für GST-LASP1 und GST-CrkL wt. Dadurch konnte für weitere Versuche die optimale Inkubationszeit zur Phosphorylierung von LASP1 und CrkL festgelegt werden.



**Abbildung 16: Phosphorylierungsreihe zu GST-CrkL und GST-LASP1.** Die beiden Fusionsproteine wurden durch die konstitutiv aktive ABL-Kinase phosphoryliert.

Wie in Abbildung 16 zu sehen, scheint für eine vollständige Phosphorylierung der eingesetzten LASP1-Menge zu pLASP1 bereits eine Inkubationszeit von 20 min ausreichend zu sein, während sich für CrkL erst zwischen 90-120 min ein Steady State einstellt. Aufgrund der Tatsache, dass in diesem Versuchsaufbau GST-getaggte Proteine verwendet wurden, zeigten sich die Proteinbanden im Western Blot auf einer Höhe +25 kDa des eigentlichen Molekulargewichts. Dabei entsprechen die zusätzlichen 25 kDa dem GST-Molekulargewicht. Die bereits zu Beginn des Phosphorylierungsassays mit Anti-

pLASP1 (pY171) detektierte Bande ist einer in geringem Ausmaße auftretenden, unspezifischen Erkennung von nicht an Tyrosin 171 phosphoryliertem LASP1 durch diesen Antikörper geschuldet. Dies konnte in weiteren Versuchen im Vergleich mit anderen Anti-LASP1-AK gezeigt werden. Die Daten sind hier nicht gezeigt.

Da für weitere Versuche ein definierter Phosphorylierungsstatus der beiden Proteine eine wesentliche Rolle spielte, also auch die Kombination einer phosphorylierten und einer nicht-phosphorylierten Proteinkomponente, war es notwendig, die Aktivität der ABL-Kinase nach Erreichen des gewünschten Phosphorylierungsprofils für den weiteren Versuchsaufbau zu blockieren. Waren die Proteine im Rahmen des Phosphorylierungs-Assay noch an Sepharose-Beads gebunden, so konnte zum einen durch mehrfache Waschschriffe der Protein-besetzten Beads mit PBS versucht werden, die ABL-Kinase größtenteils zu entfernen. Zum anderen stand mit dem Tyrosin-Kinase-Inhibitor Nilotinib ein kompetenter Hemmstoff der ABL-Kinase zur Verfügung. Dieser wurde in 20-facher Molarität zum ursprünglich eingesetzten ABL-Volumen dem Ansatz hinzugefügt, um so

eine möglichst 100 %ige Unterbindung der ABL-Kinase-Aktivität zu erzielen.

Nach diesen Schritten standen uns alle Ausgangsprodukte zur Verfügung, um in-vitro-Studien zum Bindungsverhalten von LASP1 und CrkL durchzuführen.

Zur Detektion einer Protein-Protein-Interaktion sind in der Literatur zahlreiche Methoden beschrieben.

### 3.1.3 In-vitro Pulldown-Assay

Für eine erste Evaluation der CrkL-LASP1-Interaktion entschieden wir uns für das Versuchsmodell des in-vitro Pulldown-Assays. Ziel war es, GST-(p)CrkL wt und R39K, immobilisiert an Beads, mit freiem His<sub>6</sub>-(p)LASP1 zu inkubieren und mittels spezifischer Antikörper im Western Blot Verfahren das an (p)CrkL gebundene LASP1 quantitativ und qualitativ nachzuweisen. Als Kontrolle diente der Tag GST alleine, gebunden an GSH-Sephasrose-Beads, der ebenfalls mit His<sub>6</sub>-(p)LASP1 inkubiert wurde.

Leider zeigte sich auch in der GST-Kontrolle ein ausgeprägtes, unspezifisches Bindungsverhalten mit Nachweis von (p)LASP1 im Western Blot. Als Ursache für diese starke unspezifische Proteinbindung eruierten wir

einen zu hohen Proteineinsatz bei den an Beads immobilisierten Proteinen. Jedoch gelang es nicht, die eingesetzte Proteinkonzentration auf ein akzeptables Level zu reduzieren. Hierfür hätte das zu verwendende Beadsvolumen so gering gewählt werden müssen, dass nach Inkubation eine ausreichende Sedimentierung des Beadsvolumens durch Zentrifugation und so eine Trennung von Überstand (das freie, nicht gebundene His<sub>6</sub>-LASP1 enthaltend) und Beadsbodensatz auch aus visuellen Gründen nicht mehr möglich gewesen wäre.

Im Versuch, die eingesetzte Proteinmenge zu reduzieren, aber dennoch ein sedimentierbares Beadsvolumen zu erhalten, wurden die Protein-tragenden Beads durch ein gewisses Volumen unbesetzter Beads ergänzt. Doch auch hier zeigte sich unspezifische Bindung von His<sub>6</sub>-(p)LASP1, mit dessen Nachweis auch in der GST-Kontrolle. Dabei war die Problematik unabhängig davon, ob Tyrosin 171 des LASP1-Proteins phosphoryliert oder dephosphoryliert vorlag. Daher vermuteten wir eine unspezifische Wechselwirkung von (p)LASP1 mit den Beads.

Auch eine Erhöhung der Anzahl der Waschschrirte und eine Intensivierung selbiger brachten keine wesentliche Verbesserung hinsichtlich unspezifischer Interaktionen.

Daher entschieden wir uns dazu, die Interaktion von LASP1 und CrkL mit alternativen Methoden zu untersuchen.

### 3.1.4 Overlay (Far Western Blot)

Als alternatives in vitro Nachweisverfahren wählten wir das Verfahren des Far Western Blot, der durch die Immobilisierung einer Proteinkomponente auf einer Membran die Möglichkeit zur deutlichen Reduktion der verwendeten Proteinmenge bot. Hierbei wurde, vergleichbar dem Vorgehen bei einem „konventionellen“ Western Blot, eine definierte Menge (0,2 µg) von His<sub>6</sub>-LASP1 und His<sub>6</sub>-pLASP1 auf Nitrozellulose-Membranen aufgebracht. Diese nun auf der Membran fixierten Proteine dienten als so genannte „*Prey*“, also als „*Beute*“ für ein anderes Protein. Denn, anders als bei einem üblichen Western Blot, erfolgte nun nicht unmittelbar die Inkubation mit Antikörpern, sondern die Membranen wurden mit je 1 µg „*Bait*“-Protein (GST-CRKL wt, GST-pCRKL,

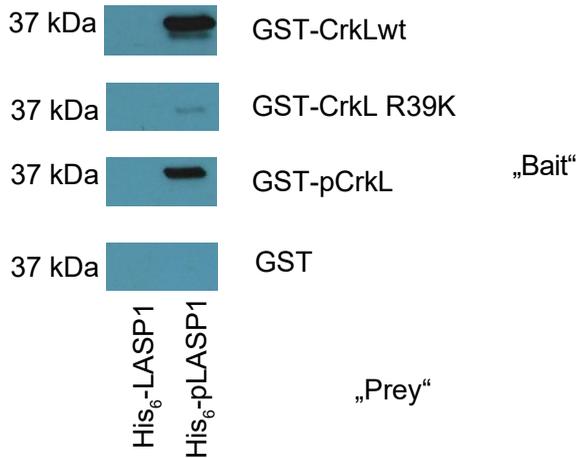
GST-CRKL R39K oder GST als Kontrolle) in 5 % Milch überschichtet und über Nacht inkubiert.

Bei der Wahl von „*Prey*“ und „*Bait*“ entschieden wir uns für His<sub>6</sub>-(p)LASP1 als „*Prey*“ und die GST-getaggtten CrkL-Varianten als „*Bait*“. Damit ergab sich die Möglichkeit den Nachweis aller gebundenen Protein-Komponenten zunächst mittels eines gegen den GST-Tag gerichteten Antikörpers zu führen. Dies erlaubte einen qualitativen und quantitativen Vergleich der gebundenen Proteinmenge, unabhängig von interindividuellen Unterschieden im Affinitätsverhalten, wie sie bei der Verwendung unterschiedlicher Antikörper nicht sicher auszuschließen sind.

Der GST-Ansatz diente wiederum als Kontrolle, um zu verifizieren, dass zu detektierende Bindungen von GST-Fusionsproteinen an die Proteine auf der Membran nicht durch den 25 kDa großen GST-Tag vermittelt und fälschlicherweise als Interaktion zwischen LASP1 und CrkL interpretiert wurden.

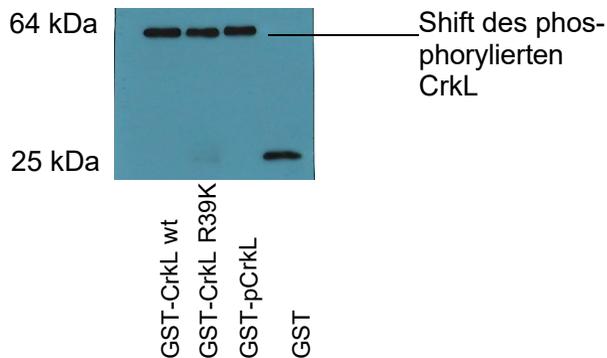
Nach der Behandlung mit den erwähnten Proteinen erfolgte, dem Protokoll eines „normalen“ WB entsprechend, die Inkubation mit einem Erstantikörper. Wie bereits angeführt, wurde hierfür ein gegen GST gerichteter Antikörper gewählt. Mittels dieses Antikörpers konnten alle eventuell gebundenen GST-Fusionsproteine oder aber auch die Kontroll-GST-Komponente anhand ihres Tags detektiert werden.

Nach der Behandlung mit einem entsprechenden Zweitantikörper und dem Entwicklungsvorgang konnte das Ergebnis ausgewertet werden. Dies wird in Abbildung 17a im Rahmen eines Western Blots gezeigt.



**Abbildung 17a: Far Western Blot unter Verwendung des Anti-GST-Antikörpers als Erstantikörper.** Dabei werden gegebenenfalls gebundene GST-Fusionsprotein mit dem Anti-GST-Antikörper bei 37 kDa, also dem Molekulargewicht von LASP1, an das sie gebunden haben, nachgewiesen.

Abbildung 17b gibt die Ladungskontrolle für die als „*Bait*“ eingesetzten Proteine wieder, um die Vergleichbarkeit der verwendeten Proteinmenge zu verifizieren.



**Abbildung 17b: Ladungskontrolle hinsichtlich der eingesetzten „Bait“-Menge für den Far Western Blot. WB mit Primärantikörper gegen GST**

Zuallererst konnte festgehalten werden, dass keines der als „Bait“ eingesetzten Proteine an His<sub>6</sub>-LASP1 gebunden hatte, sondern ausschließlich Interaktionspartner zu detektieren waren, wenn LASP1 an Tyrosin 171 phosphoryliert war. Dies untermauerte unsere Hypothese, dass für eine Interaktion zwischen LASP1 und CrkL eine Tyrosin-Phosphorylierung im LASP1-Protein vorliegen muss.

Da der Kontroll-Ansatz mit GST keinerlei Bindung, weder an LASP1 noch an pLASP1 zeigte, konnten unspezifische, über den GST-Tag vermittelte Interaktionen ausgeschlossen werden.

Im direkten Vergleich - GST-CrkL und GST-pCrkL - zeigte sich eine deutlich größere Bindungstendenz von unphosphorylierten CrkL an pLASP1. Dieses Ergebnis war konsistent mit unserer Annahme, dass die Phosphatgruppe an Tyrosin 207 von CrkL die Protein-eigene SH2-Domäne für die Interaktion mit anderen Proteinen in gewissem Ausmaß blockiert. Dass dennoch eine gewisse Interaktion nachgewiesen werden konnte, könnte durch eine nicht vollständige Blockierung aller eingesetzter CrkL-Moleküle durch intramolekulare Wechselwirkungen erklärt werden.

Bei Betrachtung des Resultats hinsichtlich des Ausmaßes der Bindung von GST-CrkL R39K an His<sub>6</sub>-(p)LASP1 zeigte sich eine massiv eingeschränkte, bis gar keine Bindung, unabhängig von der Phosphorylierung von LASP1 an Tyrosin 171. Damit schien nun auch eine weitere Komponente unserer Hypothese belegt, dass für die Interaktion von CrkL und pLASP1 die SH2-Domäne, und insbesondere das Arginin des FLVR-Motivs, von CrkL eine essentielle Rolle spielt.

Der Nachweis an gebundenem GST-(p)CrkL auf dem Overlay Blot wird bei 37 kDa (und nicht bei 64 kDa) erbracht, da hier die „Bait“, also His6-(p)LASP1, immobilisiert ist.

Dasselbe Resultat konnte mehrfach reproduziert werden. Vor dem Hintergrund, dass ein Western Blot-Verfahren, bedingt durch die zu Beginn erfolgende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, stets auch mit einem gewissen Denaturierungsprozess der eingesetzten Proteine einhergeht, wurde zusätzlich ein alternatives Far Western Blot Protokoll angewendet, das neben dem klassischen Vorgehen einen De- und Re-Naturierungsschritt enthielt. Dabei wurde die Nitrocellulose-Membran nach Übertragung der „Prey“-Proteine vom Polyacrylamid-Gel auf diese, mit einem entsprechenden De- und Renaturierungspuffer behandelt. Hierbei zeigte sich aber im Vergleich zum Protokoll ohne diese Komponente keine signifikante Veränderung des Ergebnisses, so dass nicht von einer Verfälschung der Versuchsergebnisse durch mögliche Denaturierung der auf die Membran aufgetragenen Proteine auszugehen ist.

Zudem waren, entsprechend unserer Arbeitshypothese, bei pCrkL intramolekulare Wechselwirkung zwischen der Phosphat-Gruppe und der SH2-Domäne von CrkL zu erwarten. Bei oben geschildeter Versuchsanordnung durchlief das als „*Bait*“ eingesetzte GST-(p)CrkL wt/R39K den Schritt des SDS-PAGE nicht, so dass die intramolekularen Wechselwirkungen, die in diesem Kontext von großer Relevanz waren, nicht beeinträchtigt wurden.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass der Versuchsaufbau des Far Western Blots unsere Hypothese in vollem Umfang bestärkte. Eine Bindung zwischen CrkL und LASP1 scheint durch die Phosphorylierung des Tyrosin 171 auf Seiten von LASP1 und die SH2-Domäne von CrkL, die bei Tyrosin-Phosphorylierung von CrkL für Interaktion mit anderen Proteinen nicht mehr in vollem Umfange zur Verfügung zu stehen scheint, vermittelt zu werden.

## 3.2 Ex vivo und in vivo Versuche

### 3.2.1 Ex-vivo-Pulldown-Assay

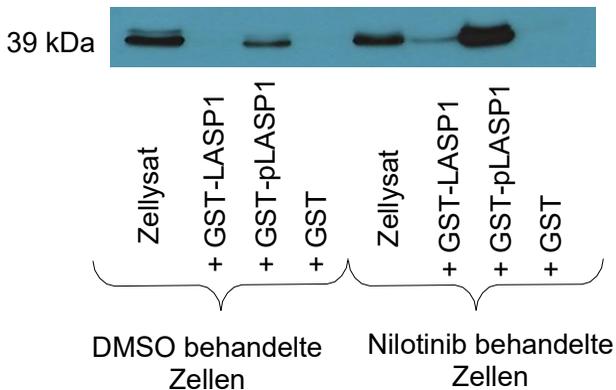
Eine weitere Methode, zur Überprüfung unserer Arbeitshypothese, war ein ex vivo Pulldown-Versuch unter Verwendung von Modell-Zelllinien für CML.

Hierfür wurden K562-Zellen, welche das chimere Enzym BCR-ABL-Kinase exprimierten, in entsprechendem Medium kultiviert. Ein Teil der Zellen wurde mit 160 nM Nilotinib in DMSO behandelt. Dabei betrug die Zeitspanne der Inkubation 24 h, denn nach einem anfänglich gewählten Zeitraum von 48 h zeigte sich ein relevanter Teil der ursprünglich eingesetzten Zellen als nicht mehr vital. Eine zweite Gruppe wurde ohne TKI angezchtet, lediglich versetzt mit einer zur ersten Gruppe vergleichbaren Menge an DMSO, um, abgesehen vom Inhibitor, äquivalente Voraussetzungen für beide Subgruppen zu schaffen. Nach Ablauf der 24 h zeigte sich eine Differenz in der Zellzahl der beiden Zellgruppen, bedingt durch eine Proliferationshemmung bei den mit Nilotinib behandelten Zellen. Für den weiteren Versuchsablauf wurden eine etwa vergleichbare Zellzahl beider Gruppen verwendet.

Beide Zell-Gruppen wurden durch Behandlung mit entsprechendem Lyse-Puffer und anschließendem Spritzenaufschluss lysiert und somit die zytosolischen Zellkomponenten freigesetzt. Das gewonnene Lysat wurde im Anschluss daran mit an GSH-Sepharose-Beads gebundenem GST-pLASP1, GST-LASP1 oder GST inkubiert. Dem Versuchsansatz wurde zudem 1,8  $\mu$ M Nilotinib zugesetzt. Diese Zugabe war aus zweierlei Gründen wichtig: Zum einen sollte so Kinase-Aktivität einer durch Waschschrte nicht vollständig von den phosphorylierten Fusionsproteinen entfernten ABL-Kinase geblockt werden. Zum anderen war es essentiell, insbesondere für Pulldown-Versuche mit nicht-phosphorylierten Fusionsproteinen, die BCR-ABL-Kinase des Zelllysats zu hemmen, denn in Vorversuchen konnten wir zeigen, dass dephosphorylierte Fusionsproteine durch die im Lysat enthaltene BCR-ABL-Kinase phosphoryliert werden konnten.

Danach wurde nach einem Zentrifugationsschritt der Cytosol-Überstand entfernt und die Protein-tragenden Beads mehrfach mit PBS gewaschen.

In einem anschließenden Western Blot konnte evaluiert werden, ob, gebunden an GST-LASP1, GST-pLASP1 oder nur an GST, CrkL beziehungsweise pCrkL aus den Zellen isoliert wurde. Das Ergebnis dieser Versuchsabfolge zeigt Abbildung 18.



**Abbildung 18: Ex vivo Pulldown.**

WB mit Anti-CrkL-Ak als Primärantikörper aus dem Beads-Volumen, nachdem diese, besetzt mit GST-(p)LASP1-Fusionsproteinen bzw. GST, mit dem Zellysat der K562-Zellen inkubiert worden waren, um eine mögliche CrkL-Bindung an p(LASP1) zu detektieren.

Zum einen belegte der Western Blot, dass an unphosphoryliertem LASP1 quasi kein CrkL, weder phosphory-

liert noch unphosphoryliert, gebunden detektiert werden konnte. Dadurch wurde erneut belegt, dass eine Phosphatgruppe an Position 171 im LASP1-Protein für Komplexbildung mit CrkL unabdingbar zu sein scheint. Zum anderen zeigte sich, dass vor allem an Tyrosin 207 nicht-phosphoryliertes CrkL an pLASP1 gebunden vorlag. Dies zeigte sich besonders bei Gegenüberstellung der gebundenen Proteinmenge aus dem Zelllysate der Inhibitor behandelten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. In den mit Nilotinib-inkubierten Zellen lag das pCrkL:CrkL-Verhältnis auf Seiten des unphosphorylierten CrkLs, dementsprechend fand sich in diesem Versuchsansatz mehr CrkL an pLASP1 gebunden. Dies wiederum sprach für die Annahme, dass sich das Bindungsverhalten von pCrkL durch intramolekulare Blockade der proteineigenen SH2-Domäne durch eine Phosphatgruppe an Tyrosin 207 deutlich verändert.

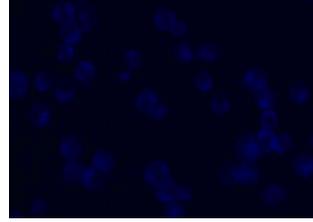
Das hier beschriebene Ergebnis konnte wiederholt mit K562-Zellen, aber auch mit weiteren CML-Zelllinien wie M07p210 und BAFp210, reproduziert werden.

### 3.2.2 Immunfluoreszenz

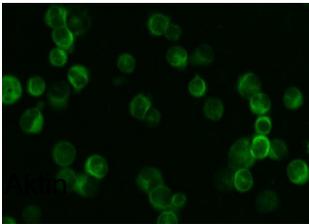
Um einen Anhalt bezüglich der Rolle von LASP1 und CrkL, beziehungsweise deren Interaktion, in CML-Zellen zu erhalten, sollte die zelluläre Lokalisation, auch im Vergleich zu nicht maligne transformierten Zellen, evaluiert werden. Hierzu wurden Zelllinien, die die BCR-ABL-Kinase exprimieren (K562 und M07p210), sowie „gesunde“ Zelllinien ohne Expression des Markerenzym der CML (M07e) verwendet. Die Zellen wurden fixiert, permeabilisiert und mittels geeigneter Antikörper-Wahl bezüglich LASP1 und CrkL gefärbt. Dabei zeigt sich für beide Proteine eine vom Phosphorylierungsstatus unabhängige, also im Vergleich „gesunder“ Zellen zu maligne transformierter Zellen, Lokalisation im Zytosol, genauer im Bereich der Zellmembran. Dies ist in Abbildung 19 exemplarisch anhand von M07p210-Zellen gezeigt.



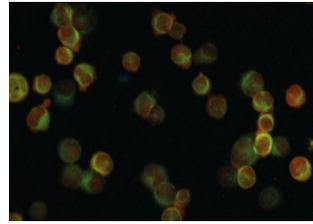
CrkL



LASP1



Aktin



Merge

**Abbildung 19: Immunfluoreszenz zur Lokalisation von LASP1 und CrkL innerhalb hämatopoetischer Zellen.** Hier exemplarisch anhand der BCR-ABL exprimierenden Zelllinie M07p210 abgebildet.

## 4 Diskussion

Die CML gehört zu den malignen Erkrankungen, für die heute sehr zielgerichtete und spezifische Therapeutika zur Verfügung stehen, sogenannten Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKIs). Den Grundstein hierfür legten Novell und Hungerford mit der Entdeckung des Philadelphia-Chromosoms (55). Weitere grundlegende Erkenntnisse waren die Identifikation der hinter dem Philadelphia-Chromosom stehenden reziproken Translokation der Chromosome 9 und 22 (57) und des hervorgehenden BCR-ABL-Moleküls (47, 59, 60) mit einer konstitutiv aktiven Tyrosinkinase-Funktion (vgl Kapitel 1.3.3). Auch wenn die Entdeckung der Medikamentengruppe der TKIs (103, 104), die sich gezielt gegen das pathognomische Molekül dieser Erkrankung, die BCR-ABL-Kinase, richtet, die Therapie der CML revolutioniert hat (106, 107), gibt es weiterhin Krankheitsverläufe mit Auftreten eines primären Nicht-Ansprechens gegenüber TKIs, eines Wirkungsverlusts der TKI-Therapie und von Krankheitsrezidiven (116-118). Um frühzeitig Therapieversager einer TKI-Therapie zu erkennen, beziehungsweise schon vor

Therapiebeginn etwaige Risikopatienten hinsichtlich eines Nicht-Ansprechens auf eine TKI-Therapie identifizieren zu können und diesen ein alternatives Therapiekonzept anbieten zu können, ist es essentiell, die molekularen Prozesse, ausgehend von der BCR-ABL-Kinase, zu verstehen und Resistenzmechanismen zu entschlüsseln.

Mit LASP1 konnte ein neues Protein im vielschichtigen Krankheitskonzept der CML identifiziert werden. Dabei fanden sich nicht nur signifikant höhere LASP1-Spiegel in CML-Zellen verglichen mit nicht maligne transformierten Zellen der hämatopoetischen Reihe ( $p < 0,0001$ ), sondern es konnte auch gezeigt werden, dass LASP1 ein bisher noch nicht bekanntes Substrat der BCR-ABL-Kinase ist (44). Dabei stellt konkret das Tyrosin 171 in der Aminosäuresequenz von LASP1 die Phosphorylierungsstelle für die konstitutiv aktive Tyrosin-Kinase in CML-Zellen dar. In meiner Arbeit konnte ich aufzeigen, dass eben diese Phosphorylierung die Grundlage für eine Interaktion mit der SH2-Domäne des CrkL-Proteins darstellt. Dabei konnte mithilfe des durch drei

Punktmutationen modifizierten Proteins CrkL R39K das FLVR-Motiv und die Aminosäure Arginin in dessen Sequenz im Besonderen, als wichtigstes Strukturelement innerhalb der SH2-Domäne von CrkL für die Bindung an pLASP1 identifiziert werden.

Doch auch CrkL wird in pathologischem Ausmaß, verglichen mit normalen hämatopoetischen Zellen, phosphoryliert. Dies hat in gewissem Umfang durch intramolekulare Wechselwirkungen eine Blockade der für die Interaktion mit anderen Proteinen wie (p)LASP1 oder Paxillin notwendigen SH2-Domäne zur Folge (110, 119). Vor diesem Hintergrund scheint die Balance des Bindungsausmaßes beziehungsweise -grades der beiden Proteine, LASP1 und CrkL, in der Situation einer CML mit einer ABL-Kinase, die durch Translokation unter den Einfluss des BCR-Promotors fällt und nicht mehr dem physiologischen Regulierungsnetzwerk unterliegt, aus dem Gleichgewicht gebracht. Da CrkL das wohl prominenteste Substrat der BCR-ABL-Kinase ist (75-77), könnte eben diese Störung in einem unter physiologischen Bedingungen sensibel geregelten Gleichgewichtssystem und damit auch LASP1

Eine wichtige Rolle in der Biologie dieser myeloproliferativen Erkrankung spielen.

In welchem Rahmen beziehungsweise innerhalb welcher Signalwege LASP1 und die Bindung an CrkL in der Pathophysiologie der CML von Relevanz sind, bleibt gegenwärtig noch näher zu beleuchten.

Aspekte wie die Erkenntnis, dass die LASP1-Expression über eine Aktivierung des Sonic Hedgehog (Shh) Signalwegs induziert wird (120), tragen zur Integration der beiden Proteine in das pathophysiologische Konzept der CML bei. Dieser Aspekt wird vor dem Hintergrund interessant, als dass bei Arbeiten zur Erforschung von Resistenzmechanismen unter einer Therapie der CML mit TKIs eine von der CP zur BC steigende Aktivierung des Shh-Signalwegs gezeigt werden konnte (73, 121). Die Hyperaktivität dieses hoch konservierten Signalwegs, der im Rahmen der embryonalen Entwicklung und bei der Aufrechterhaltung von Stammzeleigenschaften auch im hämatopoetischen System von essentieller Bedeutung ist (122, 123), korreliert mit der Expression von CD34<sup>+</sup> auf den entsprechenden Zellen (121) und scheint ein

wichtiger Baustein im Konzept der Existenz von Tumorstammzellen (LSC – leucemic stem cells) im Rahmen einer CML-Erkrankung zu sein. Diese spezielle Subgruppe im heterogenen Zellsystem einer CML-Erkrankung mit „klassischen“ Stammzeleigenschaften, wie etwa der Fähigkeit zur Selbsterneuerung, scheint durch Mutation von Molekülen relevanter Signal- und Interaktionswege einen beträchtlichen Anteil am Auftreten von Resistenzen und Rezidiven, trotz oder eben aufgrund langwieriger Therapie mit TKIs und damit Blockade der BCR-ABL-Funktion, zu tragen (124-126). Dabei sind es wohl insbesondere sehr primitive, ruhende Subpopulationen von LSCs, die von Beginn an nicht sensitiv gegenüber TKIs sind, da deren Überleben nicht allein von der Aktivität der BCR-ABL abzuhängen scheint (125, 127). Zudem scheint ein Verweilen dieser LSCs in so genannte Stammzellnischen und die Interaktion mit Stromazellen der selbigen einen wesentlichen Beitrag zum Überleben dieses Zellkompartiments, auch unter langwieriger TKI-Therapie, zu leisten (128). Die Persistenz dieser BCR-ABL-positiven Zellen, selbst bei Patienten mit nicht detektierbarer Minimal Residual Disease

(MRD), wird für das erneute Aufflammen der Erkrankung nach Pausieren einer langjährigen TKI-Therapie verantwortlich gemacht (128). Einer der Oberflächenmarker, die für die Rückkehr und das Verweilen von hämatopoetischen Stammzellen (HSCs) im Allgemeinen und LSCs im Besonderen in Stammzellnischen des Knochenmarks sowie den Übergang in einen ruhenden Zustand verantwortlich sind, ist CXCR4 und sein Ligand CXCL12 (129, 130). Die Expression dieses Rezeptors ist bei BCR-ABL-positiven Zellen zunächst reduziert (131). Unter der Therapie mit TKIs kann es jedoch zu einer gesteigerten Expression von CXCR4 an der Zellmembran kommen, was einen vermehrten Rückzug der entsprechenden Zellen in die Stammzellnische, verbunden mit gesteigerter Resistenz gegenüber der TKI- und Chemotherapie, zur Folge hat (132). Raman D. et al. konnten nachweisen, dass LASP1 an die Chemokine-Rezeptoren CXCR1-4 bindet, was ein weiterer Hinweis für die Relevanz von LASP1 in der Tumorbilogie der CML sein dürfte. Dabei ist die Bindung von LASP1 an CXCR4 von einer Phosphorylierung an Serin 146 durch Proteinkinase A abhängig (133).

Inwiefern die Phosphorylierung von LASP1 an Tyrosin 171 durch zum Beispiel die BCR-ABL die Interaktion mit dem CXCR4-Rezeptor beeinflusst, bleibt zu evaluieren. In einer Arbeit von 2016 konnten Duvall-Noelle N. et al. im Kontext maligner Erkrankungen der Mamma zudem aufzeigen, dass eine Stimulierung unter anderem von CXCR4 durch seinen Liganden CXCL12 zu einer Zunahme des nukleären LASP1-Anteils führt und sich bedingt dadurch unter anderem das Invasions- und Migrationsverhalten betreffender Zellen beziehungsweise des Tumorgewebes ändert. Zudem fand die Arbeitsgruppe Hinweise dafür, dass im Zellkern befindliches LASP1 ein zentrales Glied bei epigenetischen Mechanismen ist (6).

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Immunfluoreszenzversuche zeigten im Wesentlichen eine zytoplasmatische Lokalisation von LASP1. Dabei ergab sich kein quantifizierbarer Unterschied zwischen BCR-ABL exprimierenden Zelllinien, die somit einen erhöhten pLASP1-Anteil im Sinne einer Phosphorylierung an Tyrosin 171 aufwiesen, und Zellen-Linien ohne Expression der BCR-ABL-Kinase.

Wie (p)LASP1 war CrkL im Zytoplasma lokalisiert. Bei der Betrachtung unter anderem der Ergebnisse von Duvall-Noelle N. et al. ist ein wichtiger Aspekt zu berücksichtigen. Bei der im Rahmen der Arbeit untersuchten Tumorerkrankung, dem Mamma-Karzinom, handelt es sich um eine solide Tumorerkrankung. Die Zellen einer malignen, hämatologischen Erkrankung wie der CML jedoch flottieren frei im Blutstrom oder sind beispielsweise im Bereich des KM ansässig, so dass sich das Anforderungsprofil an zelluläre Mechanismen bei beiden Erkrankungen wohl deutlich unterscheiden dürfte.

Die konstitutiv aktive BCR-ABL-Kinase mit der pathologischen Phosphorylierung zahlreicher Substrate scheint auch das unter physiologischen Bedingungen fein ausbalancierte Bindungsgleichgewicht zwischen LASP1 und CrkL zu stören. Denn wie bereits angeführt, bedeutet zwar eine vermehrte Phosphorylierung des Tyrosins 171 von LASP1 eine vermehrte Bindungstendenz an die SH2-Domäne von CrkL, doch diese scheint wiederum durch die BCR-ABL-bedingte Phosphorylierung von Tyrosin 207 durch intramolekulare Wechselwirkungen zumindest teilweise autoinhibiert zu sein (119).

Diese Annahme konnte ich durch unsere Pulldown- und Overlay-Assays bestätigen.

Neben der ABL- bzw. der BCR-ABL-Kinase ist Tyrosin 171 der LASP1-Sequenz auch Phosphorylierungssite für die SRC-Kinase. Fibrinogen-aktivierte SRC-Kinase bewirkt unter anderem eine Induktion von Zellwanderung, Ausbildung von Lamellipodien und Translokation von zytoplasmatisch lokalisiertem LASP1 an fokale Kontakte (134). Ähnliches konnte für CrkL und einen bekannten Bindungspartner, p130CAS, beobachtet werden. So fördert die SRC-vermittelte Phosphorylierung von p130CAS die Bindung an CrkL. Dies resultiert in einer Verlagerung von CrkL an fokale Kontakte und in einer Aktivierung von kleinen G-Proteinen (135, 136). Zusammengenommen scheint unter physiologischen Bedingungen die Interaktion von LASP1 und CrkL im Wesentlichen durch die SRC-abhängige LASP1-Phosphorylierung gesteuert zu werden, während in der Situation einer chronischen myeloischen Leukämie durch die übermäßige Tyrosinkinase-Aktivität der BCR-ABL-Kinase mit Phosphorylierung

großer Teile von LASP1 und CrkL die Balance im Bindungsverhalten beider Moleküle gestört ist.

Einen neuen Aspekt hinsichtlich der Rolle von LASP1 im Rahmen maligner Erkrankungen erbrachte erst kürzlich Gao Q et al. für Tumore des nasopharyngeale Bereichs (137). Die Arbeitsgruppe zeigte auf, dass eine Überexpression von LASP1, die wie bei vielen anderen malignen Erkrankungen auch bei Karzinomen des Nasen-Rachenraums zu finden ist, mit einer vermehrten Ubiquitinierung von PTEN und damit dessen Abbau einhergeht (137). Dadurch scheint LASP1 zu einer übermäßigen Aktivierung des PI3K-AKT-mTOR-Signalwegs bei zu tragen. Eine vergleichbare, unphysiologisch hohe Aktivierung dieses Signalwegs konnte auch in Zellen bei einer CML-Erkrankung nachgewiesen werden (138). Dabei wird der PI3K-AKT-mTOR-Signalweg zum einen, vermittelt über Adaptorproteine wie GAB2/GRB2 und möglicherweise auch CrkL/Cbl (138), direkt durch die BCR-ABL-Kinase initiiert und ist damit ein wichtiger Effektor und essentielle Komponente der transformierenden Eigenschaften der BCR-ABL-Kinase (138).

Zum anderen scheint eine persistierende, unphysiologische Aktivierung dieser Signalkaskade ein relevanter Mechanismus für die Entwicklung einer Resistenz gegenüber TKIs zu sein (139). Arbeiten, die durch die Kombination von Inhibitoren des PI3K-Signalwegs und TKIs einen synergistischen Effekt beider Medikamentengruppen bei CML-Zellen sowie die Möglichkeit der Überwindung einer TKI-Resistenz nachweisen konnten, untermauern diese Annahme (140, 141). Welche molekularen Mechanismen zu einer BCR-ABL-unabhängigen Aktivierung dieser Signalkaskade führen und damit zu einer TKI-Resistenz beitragen, ist bisher wenig bekannt. Als eine erste, mögliche Komponente in diesem Prozess wurde GAB2 identifiziert (142). Ob auch LASP1, möglicherweise wie von Gao Q et al. beschrieben, durch die Suppression von PTEN, einem Negativ-Regulator des PI3K-AKT-Signalwegs, zusammen mit CrkL eine Rolle in diesem Konstrukt übernimmt, bleibt zu beweisen.

In den letzten Jahren konnten zunehmend neue Erkenntnisse über die pathophysiologischen Zusammenhänge, die dem Krankheitsprozess einer chronischen myeloischen Leukämie zugrunde liegen, gewonnen werden. Dazu konnte auch meine Arbeit beitragen, die LASP1 als ein neues, relevantes Puzzelstück in der Biologie der CML näher beleuchtet. Ein zunehmend besseres Verständnis der zugrunde liegenden, aberranten Prozesse und zentralen Moleküle kann helfen, ein auf das individuelle, ermittelte Risikoprofil der einzelnen Patienten angepasstes Therapiekonzept zu entwickeln und so das Outcome jedes einzelnen Patienten zu verbessern.

## 5 Zusammenfassung

### 5.1 Deutsche Version

Das Verständnis der molekularen Mechanismen, die einer malignen Erkrankung zugrunde liegen, ist der Schlüssel zur Entwicklung zielgerichteter und effektiver therapeutischer Möglichkeiten. Für das LIM und SH3 Domänen Protein 1, LASP1, konnte im Kontext zahlreicher Tumorerkrankungen wie dem Mamma-Karzinom, dem Prostata-Karzinom oder dem Ovarial-Karzinom eine Überexpression ebenso wie eine Korrelation mit Aggressivität und Prognose der Tumorerkrankung gezeigt werden. Bisher war eine Relevanz von LASP1 jedoch nur für solide Tumorerkrankungen nachgewiesen worden. Kürzlich allerdings wurde *lasp1* als eines von 6 Genen identifiziert, die eine exaktere Vorhersage von Krankheitsprogress und -rezidiv bei Patienten mit einer chronischen myeloischen Leukämie (CML) zulassen sollen. Zudem konnte, wie bereits bei zahlreichen anderen, soliden Tumorerkrankungen, eine signifikante Überexpression des *lasp1*-Gens in CML-Zellen nachgewiesen werden.

Basierend auf diesen neuen Erkenntnissen beschäftigte ich mich im Rahmen dieser Arbeit mit der Frage, welche Funktion LASP1 im Netz der einer CML zugrunde liegenden, molekularen Mechanismen übernimmt. Mittels verschiedener Interaktionsassays konnte LASP1 als ein neuer, phosphorylierungs-abhängiger Bindungspartner von CrkL, dem wohl prominentesten Substrat der BCR-ABL-Kinase, identifiziert werden. Dabei impliziert das Attribut „phosphorylierungs-abhängig“ sowohl den Phosphorylierungsstatus von LASP1 als auch des Interaktionspartners CrkL. Wie in Vorarbeiten gezeigt, stellt das Tyrosin 171 in der Aminosäuresequenz von LASP1 eine Phosphorylierungsstelle für die BCR-ABL-Kinase dar; mit LASP1 wurde somit auch ein neues Substrat dieser konstitutiv aktiven Tyrosinkinase entdeckt. Phosphoryliert an Tyrosin 171 kann LASP1 an die SH2-Domäne von CrkL, genauer an das FLVR-Motif innerhalb dieser, binden. Jedoch selbst an Tyrosin 207 durch die BCR-ABL-Kinase phosphoryliert, blockiert CrkL die eigene SH2-Domäne durch intramolekulare Wechselwirkungen für andere Protein-Protein-Interaktionen in gewissem Umfang.

Diese neu gewonnenen Erkenntnisse liefern ein weiteres Puzzlestück zum Verständnis des molekularen Netzwerks, das einer CML-Erkrankung zugrunde liegt und tragen so dazu bei, die Therapieoptionen dieser stetig zu verbessern.

## **5.2 Englische Version**

Understanding the molecular mechanisms underlying a malignant disease makes it possible to develop targeted and effective therapeutic options. For numerous malignant disease such as breast cancer, prostata cancer or ovarian cancer it has been shown that the LIM and SH3 domain protein 1, LASP1, is overexpressed and that there is a correlation with regard to aggressive growth and outcome of the tumour. So far relevance of LASP1 has only been proven for solid tumours. However recently *lasp1* was identified as a component of six genes that may allow to predict more reliably disease's progress and relapse in CML patients. In addition to that a significant overexpression of *lasp1* in CML cells has been discovered, a phenomenon already known from a lot of solid malignant tumours. Based on these new findings, i dealt with the issue of the function of LASP1 in the network

of molecular mechanisms underlying CML. Using different kinds of interaction assays, LASP1 was identified as a new, phosphorylation-dependent ligand of CrkL, the most prominent substrate of the BCR-ABL-kinase.

In this case the attribute "phosphorylation-dependent" refers to the phosphorylation status of LASP1 as well as of its binding-partner CrkL. As shown in preliminary studies, tyrosine 171 is a phosphorylation site for BCR-ABL-kinase within the AS sequence of LASP1; therefore, with LASP1, a new substrate of this constitutive active tyrosine kinase has been discovered. When phosphorylated on tyrosine 171, LASP1 is able to bind to the SH2-domain of CrkL, more exactly to the FLVR-motive within this domain. But when CrkL is phosphorylated on tyrosine 207 by BCR-ABL-kinase, there are intramolecular interactions that block the SH2- domain of CrkL for other protein-protein-interactions. These new findings help to understand the molecular network underlying a CML disease and may contribute to continuous improvement of therapeutic options.

## 6 Literaturverzeichnis

- (1) Daten des Statistischen Bundesamtes zu den Todesursachen im Jahr 2015 - [www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen.html](http://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen.html)
- (2) Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut (Hrsg). Berlin, 2016 - [www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebsgeschehen/Krebsgeschehen\\_download.pdf?blob=publicationFile](http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebsgeschehen/Krebsgeschehen_download.pdf?blob=publicationFile)
- (3) Zhao L, Wang H, Liu C, Liu Y, Wang X, Wang S et al., Promotion of the colorectal cancer growth and metastasis by the LIM and SH3 domain protein 1, Gut (BMJ), 2010; 59(9): 1226-1235
- (4) Frietsch JJ, Grunewald TGP, Jasper S, Kammerer U, Herterich S, Kapp M et al., Nuclear localisation of LASP-1 correlates with a poor long-term survival in female breast cancer, British Journal of Cancer, 2010; 102(11): 1645-1653
- (5) Grunewald TG, Kammerer U, Kapp M, Eck M, Dietl J, Butt E et al., Nuclear localisation and cytosolic overexpression of LASP-1 correlates with tumor size and nodal positivity of human breast carcinoma, BMC Cancer, 2007; 7: 198
- (6) Duvall-Noelle N, Karwandyar A, Richmond A, Raman D, LASP-1 – A nuclear hub for the UHRF1-DNMT1-G9a-Snail1 complex, Oncogene, 2016;

35(9): 1122-1133

- (7) Traenka C, Remke M, Korshunov A, Bender S, Hielscher T, Northcott PA et al., Role of LIM and SH3 Protein1 in the metastatic dissemination of medulloblastoma, *Cancer Research*, 2010; 70(20): 8003-8014
- (8) Wang H, Li W, Jin X, Cui S, Zhao L, LIM and SH3 protein1, a promoter of cell proliferation and migration, is anovel independent prognostic indicator in hepatocellular carcinoma, *Eur. J. Cancer*, 2013; 49(4): 974-983
- (9) Salvi A, Bongarzone I, Ferrari L, Abeni E, Arici B, De Bortoli M et al., Molecular characterization of LASP-1 expression reveals vimentin as its new partner in human hepatocellular carcinoma cells, *Int J Oncol*, 2015; 46 (5):1901-1912
- (10) Li Z, Chen Y, Wang X, Zhang H, Zhang Y, Gao Y et al., LASP-1 induces proliferation, metastasis and cell cycle arrest at the G2/M phase in gallbladder cancer by down-regulating S100P via the PI3K/AKT pathway, *Cancer Letter*, 2016; 372(2): 239-250
- (11) Dimova I, Orsetti B, Negre V, Rouge C, Ursule L, Lasorsa L et al., Genomic markers for ovarian cancer at chromosomes 1, 8 and 17 revealed by array CGH analysis, *Tumori*, 2009; 95(3): 357-366
- (12) Hailer A, Grunewald TG, Orth M, Reiss C, Kneitz B, Spahn M et al., Loss of tumor suppressor mir-203 mediates overexpression of LIM and SH3 Protein 1 (LASP1) in high risk prostate cancer

- thereby increasing cell proliferation and migration, *Oncotarget*, 2014; 5(12): 4144-4153
- (13) Zheng J, Yu S, Qiao Y, Zhang H, Liang S, Wang H et al., LASP-1 promotes tumor proliferation and metastasis and is an independent unfavorable prognostic factor in gastric cancer, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 2014; 140(11): 1891-1899
- (14) Fanayan S, Smith JT, Lee LY, Yan F, Snyder M, Hancock WS et al., Proteogenomic analysis of human coloncarcinoma cell lines LIM1215, LIM1899, and LIM2405, *J. Proteome Res.*, 2013; 12(4): 1732-1742
- (15) Tomasetto C, Régnier C, Moog-Lutz C, Mattei MG, Chenard MP, Lidereau R et al., Identification of four novel human genes amplified and overexpressed in breast carcinoma and localized to the q11-q21.3 region of chromosome 17. *Genomics*, 1995; 28: 367–376
- (16) Tomasetto C, Moog-Lutz C, Regnier CH, Schreiber V, Basset P, Rio MC, Lasp-1 (MLN 50) defines a new LIM protein subfamily characterized by the association of LIM and SH3 domains, *FEBS Letter*, 1995; 373 (3): 245-249
- (17) Schmeichel KL, Beckerle MC, The LIM domain is a modular protein binding interface, *Cell*, 1994; 79(2): 211-219
- (18) Hammarstrom A, Berndt KD, Sillard R, Adermann K, Otting G, Solution structure of a naturally- occurring zinc-peptide complex demonstrates that the N-terminal zinc-binding module of the Lasp-1

- LIM domain is an independent folding unit, *Biochemistry*, 1996; 35 (39):12723-12732
- (19) Raman D, Sai J, Neel NF, Chew CS, Richmond A, LIM and SH3 Protein-1 modulates CXCR2-mediated cell migration, *PLOS ONE*, 2010; 5(4): e10050
- (20) Schreiber V, Moog-Lutz C, Regnier CH, Chenard MP, Boeuf H, Vonesch JL et al., Lasp1, a novel type of actin-binding protein accumulating in cell membrane extensions, *Mol Med.*, 1998; 10 (4): 675-687
- (21) Chew CS, Chen X, Parente JA Jr, Tarrer S, Okamoto C, Qin HY, Lasp1 binds to non-muscle F-actin in vitro and is localized within multiple sites of dynamic actin assembly in vivo, *J Cell Sci*, 2002; 115: 4787-4799
- (22) Butt E, Gambaryan S, Gottfert N, Galler A, Marcus K, Meyer HE, Actin binding of human LIM and SH3 protein is regulated by cGMP- and cAMP-dependent protein kinase phosphorylation on serine 146, *J Biol Chem*, 2003; 278(18): 15601- 15607
- (23) Rachlin AS, Otey CA, Identification of palladin isoforms and characterization of an isoform-specific interaction between LASP1 and palladin, *J Cell Sci*, 2006; 119(6): 994-1004
- (24) Spence HJ, McGarry L, Chew CS, Carragher NO, Scott-Carragher LA, Yuan Z et al., AP-1 differentially expressed proteins Krp1 and fibronectin cooperatively enhance Rho-ROCK-

- independent mesenchymal invasion by altering the function, localization, and activity of nondifferentially expressed proteins, *Mol Cell Biol*, 2006; 26(4): 1480-1495
- (25) Gray CH, McGarry LC, Spence HJ, Riboldi-Tunnicliffe A, Ozanne BW, Novel beta-propeller of the BTB-Kelch protein Krp1 provides a binding site for Lasp-1 that is necessary for pseudopodial extension, *J Biol Chem*, 2009; 284(44): 30498- 30507
- (26) Yu H, Chen JK, Feng S, Dalgarno DC, Brauer AW, Schreiber SL, Structural basis for the binding of proline-rich peptides to SH3 domains, *Cell*, 1994; 76(5): 933–945
- (27) Salvi A, Bongarzone I, Ferrari L, Abeni E, Arici B, De Bortoli M et al., Molecular characterization of LASP-1 expression reveals vimentin as its new partner in human hepatocellular carcinoma cells, *Int J Oncol*, 2015, 46(5):1901-1912
- (28) Li B, Zuang L, Trueb B, Zyxin interacts with the SH3 domains of the cytoskeletal proteins LIM-nebulette and LASP1, *J Biol Chem*, 2004, 279(19): 20401-20410
- (29) Keicher C, Gambaryan S, Schulze E, Marcus K, Meyer HE, Butt E, Phosphorylation of mouse LASP1 on threonine 156 by cAMP- and cGMP-dependent protein kinase, *Biochemistry Biophysics Research commun*, 2004; 324(1): 308-316
- (30) Haag M, Interaktionspartner of Prointerleukin-16, Faculty of Biology FU Berlin, 2007; <https://refubium.fu-berlin.de/handle/fub188/5613>

- (31) Traenka J, Hauck CR, Lewandrowski U, Sickmann A, Gambaryan S, Thalheimer P et al., Integrin-dependent translocation of LASP-1 to the cytoskeleton of activated platelets correlates with LASP-1 phosphorylation at tyrosine171 by Src- kinase, *Thromb Haemost*, 2009; 102(3): 520-528
- (32) Lin YH, Park ZY, Lin D, Brambhatt AA, Rio MC, Yates JR 3<sup>rd</sup> et al., Regulation of cell migration and survival by focal adhesion targeting of Lasp1, *J Cell Biol*, 2004; 165(3): 421-432
- (33) Mihlan S, Reiß C, Thalheimer P, Herterich S, Gaetzner S, Kremerskothen J et al., Nuclear import of LASP-1 is regulated by phosphorylation and dynamic protein-protein interactions, *Oncogene*, 2013; 32(16): 2107-2113
- (34) Chew CS, Parente JA Jr., Chen X, Chaponnier C, Cameron RS, The LIM and SH3 domain- containing protein, *lasp-1*, may link the cAMP signaling pathway with dynamic membrane restructuring activities in ion transporting epithelial, *J Cell Sci*, 2000; 113(11): 2035-2045
- (35) Endres M, Kneitz S, Orth MF, Perera RK, Zernecke A, Butt E, Regulation of matrix metalloproteinases (MMPs) expression and secretion in MDA-MB-231 breast cancer cells by LIM and SH3 protein 1 (LASP1), *Oncotarget*, 2016; 7(39): 64244-64259
- (36) Shimizu F, Shiiba M, Ogawara K, Kimura R, Minakawa Y, Baba T et al., Overexpression of LIM and SH3 Protein 1 leading to accelerated G2/M

phase transition contributes to enhanced tumourigenesis in oral cancer, PLOS ONE, 2013; 8(12): e83187

- (37) Grunewald TG, Kammerer U, Schulze E, Schindler D, Honig A, Zimmer M et al., Silencing of LASP-1 influences zyxin localization, inhibits proliferation and reduces migration in breast cancer cells, *Exp Cell Res*, 2006; 312(7): 974-82
- (38) Kleitner N, Artner I, Gmachl N, Ghaffari-Tabrizi N, Kratochwil K, Mutagenetic transgene insertion into a region of high gene density and multiple linkage disruptions on mouse chromosome 11, *Cytogenet Genome Res*, 2002; 97(1-2):100-105
- (39) Sun HJ, Bahk YY, Choi YR, Shim JH, Han SH, Lee JW, A proteomic analysis during serial subculture and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells, *J Orthoped Res*, 2006; 24(11): 2059-2071
- (40) Schreiber V, Masson R, Linares JL, Mattei MG, Tomasetto C, Rio MC, Chromosomal assignment and expression pattern of the murine Lasp-1 gene, *Gene*, 1998; 207(2): 171-175
- (41) Suyama R, Jenny A, Curado S, Pellis-van Berkel W, Ephrussi A, The actin-binding protein Lasp promotes Oskar accumulation at the posterior pole of the *Drosophila* embryo, *Development*, 2009; 136(1): 95-105
- (42) Benmerah A, Scott M, Poupon V, Marullo S, Nuclear functions for plasma membrane-associated proteins?, *Traffic*, 2003; 8(4): 503-511

- (43) Wang H, Shi J, Luo Y, Liao Q, Niu Y, Zhang F et al., LIM and SH3 Protein 1 induces TGF  $\beta$ - mediated epithelial–mesenchymal transition in human colorectal cancer by regulating S100A4 expression, *Clin Cancer Res*, 2014; 20(22): 5835- 5847
- (44) Frietsch JJ, Kastner C, Grunewald TGP, Schweigel H, Nollau P, Ziermann J et al., LASP1 is a novel BCR-ABL substrate and a phosphorylation-dependent binding partner of CRKL in chronic myeloid leukemia, *Oncotarget*, 2014; 5(14): 5257-5271
- (45) Yeung KY, Gooley TA, Zhang A, Raftery AE, Radich JP, Oehler VG, Predicting relapse prior to transplantation in chronic myeloidleukemia by integrating expert knowledge and expression data, *Bioinformatics*, 2012; 28(6): 823-830
- (46) Tefferi A, Thiele J, Vardiman JW, The 2008 World Health Organization classification system for myeloproliferative neoplasms: order out of chaos, *Cancer*, 2009; 115(17): 3842-3847
- (47) Shtivelman E, Lifshitz B, Gale RP, Canaani E, Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukaemia, *Nature*, 1985; 315(6020): 550-554
- (48) Apperley JF, Chronic myeloid leukemia, *Lancet*, 2015; 385(9976): 1447-1459
- (49) Gerd Herold und Mitarbeiter, *Innere Medizin*, Herold, Gerd (Verlag), Köln, 2017

- (50) Baccarani M, Saglio G, Goldman J, Hochhaus A, Simonsson B, Appelbaum F et al., Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: Recommendations from an expert panel on behalf of the European Leukemia Net. *Blood*, 2006; 108(6): 1809-1820
- (51) Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD, The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms, *Blood*, 2002; 100(7): 2292-2302
- (52) Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, Kantarjian HM, Chronic myelogenous leukemia: Biology and therapy, *Ann Intern Med*, 1999; 131(3): 207-219
- (53) Jabbour E, Kantarjian H, Chronic myeloid leukemia: 2014 update on diagnosis, monitoring, and management, *American Journal of Hematology*, 2014; 89(5): 547-556
- (54) Rosenthal S, Canellos GP, De Vita VT, Gralnick HR, Characteristics of blast crisis in chronic granulocytic leukemia, *Blood*, 1977; 49(5): 705- 714, 1977
- (55) Nowell PC, Hungerford DA, A minute chromosome in human granulocytic leukemia, *Science*, 1960; 132: 1497
- (56) Burgstaller S, Reiter A, Cross NC, BCR-ABL-negative chronic myeloid leukemia, *Curr Hematol Malig Rep*, 2007; 2(2): 75-82
- (57) Rowley JD, A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia

identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining, *Nature*, 1973; 243(5405): 290-293

- (58) Takahashi N, Miura I, Saitoh K, Miura AB, Lineage involvement of stem cells bearing the Philadelphia chromosome in chronic myeloid leukemia in the chronic phase as shown by a combination of fluorescence-activated cell sorting and fluorescence in situ hybridization, *Blood*, 1998; 92(12): 4758-4763
- (59) Bartram CR, de Klein A, Hagemeijer A, van Agthoven, Geurts van Kessel A, Bootsma O et al., Translocation of c-abl oncogene correlates with the presence of a Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia, *Nature*, 1983; 306: 277-280
- (60) Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, O'Brien S, Kurzrock R, Kantarjian HM, The Biology of Chronic Myeloid Leukemia, *N Engl J Med*, 1999; 341: 164- 172
- (61) Melo JV, The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype, *Blood*, 1996; 88(7): 2375-2384
- (62) Heisterkamp N, Stephenson JR, Groffen J, Hansen PF, de Klein A, Bartram CR et al., Localization of the c-abl oncogene adjacent to a translocation breakpoint in CML, *Nature*, 1983; 306(5940): 239-242
- (63) Lugo TG, Pendergast AM, Müller AJ, Witte ON, Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products, *Science*,

1990; 247(4946): 1079-1082

- (64) Hantschel O, Superti-Furga G, Regulation of the c-ABL and BCR-ABL tyrosine kinase, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004; 5(1): 33-44
- (65) Daley GQ, Van Etten RA, Baltimore D, Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the p210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome, *Science*, 1990; 247(4944): 824-830
- (66) Puil L, Liu J, Gish G, Mbamalu G, Bowtell D, Pellicci PG et al., Bcr-Abl oncoproteins bind directly to activators of the Ras signalling pathway, *EMBO Jo*, 1994; 13(4): 764-773
- (67) Afar DE, Goga A, McLaughlin J, Witte ON, Sawjers CL, Differential complementation of BCR-ABL point mutants with c-MYC, *Science*, 1994; 264(5157): 424-426
- (68) Rhodes J, York RD, Tara David, Tatjinda K, Bruker BJ, CRKL functions as a nuclear adaptor and transcriptional activator in BCR-ABL expressing cells, *Experimental Hematology*, 2000; 28(3): 305-310, 2000
- (69) Kharas MG, Fruman DA, ABL oncogenes and phosphoinositide 3-kinase: mechanism of activation and downstream effectors, *Cancer Res.*, 2005; 65(6): 2047-2053
- (70) Bedi A, Zehnbauer BA, Barber JP, Sharkis SJ, Jones RJ, Inhibition of apoptosis by BCR-ABL in chronic myeloid leukemia, *Blood*, 1994; 83(8): 2038-2044

- (71) Gordon MY, Dowding CR, Riley GP, Goldman JM, Greaves MF, Altered adhesive interactions with marrow stroma of haematopoietic progenitor cells in chronic myeloid leukaemia, *Nature*, 1987; 328(6128): 342-344
- (72) Salgia R, Li JL, Ewaniuk DS, Pear W, Pisick E, Burky S et al., BCR/ABL induces multiple abnormalities of cytoskeletal function, *J Clin Invest*, 1997; 100(1): 46-57
- (73) Radich JP, Dai H, Mao M, Oehler V, Schelter J, Druker B et al., Gene expression changes associated with progression and response in chronic myeloid leukemia, *Proc Natl Acad Sci*, 2006; 103(8): 2794-2799
- (74) Melo JV, Barnes DJ, Chronic myeloid leukaemia as a model of disease evolution in human cancer, *Nat Rev Cancer*, 2007; 7(6): 441-453
- (75) Oda T, Heaney C, Hagopian J, Okuda K, Griffin JD, Druker BJ, Crkl is the major Tyrosine-phosphorylated protein in neutrophils from patients with chronic myelogenous leukemia, *J Biol Chem*, 1994; 269(37): 22925-22928
- (76) Nichols GL, Raines MA, Vera JC, Lacomis L, Tempst P, Golde DW, Identification of CRKL as the constitutively phosphorylated 39 kD tyrosine phosphoprotein in chronic myelogenous leukemia cells, *Blood*, 1994; 84(9): 2912-29180
- (77) ten Hoeve J, Arlinghaus RB, Guo JQ, Heisterkamp N, Groffen J, Tyrosine phosphorylation of CRKL in Philadelphia+ leukemia, *Blood*, 1994; 84(6):1731-1736

- (78) Mayer BJ, Hamaguchi M, Hanafusa H, A novel viral oncogene with structural similarity to phospholipase C, *Nature*, 1988; 332(6161): 272- 275
- (79) Songyang Z, Shoelson SE, Chaudhuri M, Gish G, Pawson T, Haser WG et al., SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences, *Cell*, 1993; 72(5): 767–778
- (80) Muralidharan V, Dutta K, Cho J, Vila-Perello M, Raleigh DP, Cowburn D et al., Solution structure and folding characteristics of the C-terminal SH3-domain of c-CRK II, *Biochemistry*, 2006; 45(29): 8874-8884
- (81) Birge RB, Fajardo JE, Reichman C, Shoelson SE, Songyang Z, Cantley LC et al., Identification and characterization of a high-affinity interaction between v-Crk and tyrosine-phosphorylated paxillin in CT10-transformed fibroblasts, *Mol Cell Biol*, 1993; 13(8): 4648-4656
- (82) Sakai R, Iwamatsu A, Hirano N, Ogawa S, Tanaka T, Mano H et al., A novel signaling molecule, p130, forms stable complexes in vivo with v-Crk and v-Src in a tyrosine phosphorylation-dependent manner, *EMBO J*, 1994; 13(16): 3748-3756
- (83) Arai A, Kanda E, Nosaka Y, Miyasaka N, Miura O, CrkL is recruited through its SH2 domain to the erythropoietin receptor and plays a role in Lyn-mediated receptor signaling, *J Biol Chem*, 2001; 276(35):33282-33290

- (84) Oda A, Miyakawa Y, Druker BJ, Ishida A, Ozaki K, Ohashi H et al., CrkL is constitutively tyrosine phosphorylated in platelets from chronic myelogenous leukemia patients and inducibly phosphorylated in normal platelets stimulated by thrombopoietin, *Blood*, 1996; 88(11): 4304-4313
- (85) Matsuda M, Hashimoto Y, Muroya K, Hasegawa H, Kurata T, Tanaka S et al., CRK protein binds to two guanine nucleotide-releasing proteins for the Ras family and modulates nerve growth factor-induced activation of Ras in PC12 cells, *Mol Cell Biol*, 1994; 14(8): 5495-5500
- (86) Knudsen BS, Feller SM, Hanafusa H, Four proline-rich sequences of the guanine-nucleotide exchange factor C3G bind with unique specificity to the first Src homology 3 domain of Crk, *J Biol Chem*, 1994; 269(52): 32781-32787
- (87) Hasegawa H, Kiyokawa E, Tanaka S, Nagashima K, Gotoh N, Shibuya M et al., DOCK180, a major CRK-binding protein, alters cell morphology upon translocation to the cell membrane, *Mol Cell Biol*, 1996; 16(4): 1770-1776
- (88) Birge RB, Kalodimos C, Inagaki F, Tanaka S, Crk and CrkL adaptor proteins: networks for physiological and pathological signaling, *Cell Commun Signal*, 2009; 7:13
- (89) Cabodi S, del Pilar Camacho-Leal M, Di Stefano P, Defilippi P, Integrin signalling adaptors: not only figurants in the cancer story, *Nat Rev Cancer*,

2010; 10(12): 858-870

- (90) Arai A, Nosaka Y, Kohsaka H, Miyasaka N, Miura O, CRKL activates integrin-mediated hematopoietic cell adhesion through the guanine nucleotide exchange factor C3G, *Blood*, 1999; 93(11): 3713-3722
- (91) Guris DL, Fantes J, Tara D, Druker BJ, Imamoto A, Mice lacking the homologue of the human 22q11.2 gene CRKL phenocopy neurocristopathies of DiGeorge syndrome, *Nature Genetics*, 2001; 27(3): 293-298
- (92) de Jong R, ten Hoeve J, Heisterkamp N, Groffen J, Tyrosine 207 in CRKL is the BCR/ABL phosphorylation site, *Oncogene*, 1997; 14(5): 507- 513
- (93) Heaney C, Kolibaba K, Bhat A, Oda T, Ohno S, Fanning S et al., Direct binding of CRKL to BCR-ABL is not required for BCR-ABL transformation, *Blood*, 1997; 89(1): 297-306
- (94) Seo JH, Wood LJ, Agarwal A, O'Hare T, Elsea CR, Griswold IJ et al., A specific need for CrkL in p210 BCR-ABL-induced transformation of mouse hematopoietic progenitors, *Cancer Res*, 2010; 70(18): 7325-7335
- (95) White D, Saunders V, Grigg A, Arthur C, Flishie R, Leahy MF et al., Measurement of in vivo BCR-ABL kinase inhibition to monitor imatinib-induced target blockade and predict response in chronic myeloid leukemia, *J Clin Oncol*, 2007; 25(28): 4445-4451

- (96) LaRoseé P, Holm-Eriksen S, König H, Härtel N, Ernst T, Debatin J et al., Phospho-CRKL monitoring for the assessment of BCR-ABL activity in imatinib-resistant chronic myeloid leukemia or Ph+ acute lymphoblastic leukemia patients treated with nilotinib, *Haematologica*, 2008; 93(5): 765- 769
- (97) Zhao T, Miao Z, Wang Z, Xu Y, Wu J, Liu X et al., Overexpression of CRKL correlates with malignant cell proliferation in breast cancer, *Tumour Biol*, 2013; 34(5): 2891-2897
- (98) Fu L, Dong Q, Xie C, Wang Y, Li Q, CRKL protein overexpression enhances cell proliferation and invasion in pancreatic cancer, *Tumour Biol*, 2015; 36(2): 1015-1022
- (99) Natsume H, Shinmura K, Tao H, Igarashi H, Suzuki M, Nagura K et al., The CRKL gene encoding an adaptor protein is amplified, overexpressed, and a possible therapeutic target in gastric cancer, *J Transl Med*, 2012; 10: 97
- (100) Kim YH, Kwei KA, Girard L, Salari K, Kao J, Pacyna-Gengelbach M et al., Genomic and functional analysis identifies CRKL as an oncogene amplified in lung cancer, *Oncogene*, 2010; 29(10): 1421-1430
- (101) Takino T, Nakada M, Miyamori H, Yamashita J, Yamada KM, Sato H, Crkl adapter protein modulates cell migration and invasion in glioblastoma, *Cancer Res*, 2003; 63(9): 2335-2337
- (102) Ji H, Li B, Zhang S, He Z, Zhou Y, Ouyang L,

Crk-like adapter protein is overexpressed in cervical carcinoma, facilitates proliferation, invasion and chemoresistance, and regulates Src and Akt signaling, *Oncol Lett*, 2016; 12(5): 3811-381

- (103) Deininger MW, Goldman JM, Lydon N, Melo JV, The tyrosine kinase inhibitor CGP57148B selectively inhibits the growth of BCR-ABL-positive cells, *Blood*, 1997; 90(9): 3691-3698
- (104) Druker BJ, Sawyers CL, Kantarjian H, Resta DJ, Reese SF, Ford JM et al., Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome, *N Engl J Med*, 2001; 344(14): 1038- 1042
- (105) Druker BJ, Lydon NB, Lessons learned from the development of an abl tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia, *J Clin Invest*, 2000; 105(1): 3-7
- (106) O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA, Gathmann I, Baccarani M, Cervantes F et al., Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia, *N Engl J Med*, 2003; 348(11): 994-1004
- (107) Deininger M, O'Brien SG, Guilhot F, Goldman JM, Hochhaus A, Hughes TP et al., International randomized study of interferon vs STI571 (IRIS) 8-year follow up: sustained survival and low risk for

- progression or events in patients with newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic phase (CML-CP) treated with Imatinib, *Blood*, 2009; 114:1126
- (108) Lin YH, Park ZY, Lin D, Brahmbhatt AA, Rio MC, Yates JR 3<sup>rd</sup> et al., Regulation of cell migration and survival by focal adhesion targeting of LASP1, *J Cell Biol*, 2004; 165(3): 421-432
- (109) Yeung KY, Gooley TA, Zhang A, Raftery AE, Radich JP, Oehler VG, Predicting relapse prior to transplantation in chronic myeloid leukemia by integrating expert knowledge and expression data, *Bioinformatics*, 2012; 28(6): 823-830
- (110) Rosen M, Yamazaki T, Gish G, Kay C, Pawson T, Kay LE, Direct demonstration of an intramolecular SH2 - phosphotyrosine interaction in the Crk protein, *Nature*, 1995; 374(6521): 477- 479
- (111) Schaffhausen B, SH2 domain structure and function, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1995; 1242: 61-75
- (112) Campbell SJ, Jackson RM, Diversity in the SH2 domain family phosphotyrosyl peptide binding site, *Protein engineering*, 2003; 3(16): 217-227
- (113) Mayer BJ, Jackson PK, Van Etten RA, Baltimore D, Point mutations in the abl SH2 domain coordinately impair phosphotyrosine binding in vitro and transforming activity in vivo, *Mol Cell Biol*, 1992; 2(12): 609-618

- (114) Bibbins KB, Boeuf H, Varmus HE, Binding of the Src SH2 domain to phosphopeptides is determined by residues in both the SH2 domain and the phosphopeptides, *Mol Cell Biol*, 1993; 12(13): 7278-7287
- (115) Calnan B, Tidor B, Biancalan S, Hudson D, Frankel A, Arginine-mediated RNA recognition: the arginine fork, *Science*, 1991; 252(5009): 1167-1171
- (116) Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K, Hsu N, Paquette R, Rao PN et al., Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification, *Science*, 2001; 293(5531): 876-880
- (117) Bhatia R, Holtz M, Niu N, Gray R, Snyder DS, Sawyers CL et al., Persistence of malignant hematopoietic progenitors in chronic myelogenous leukemia patients in complete cytogenetic remission following imatinib mesylate treatment, *Blood*, 2003; 101(12): 4701-4707
- (118) Mahon FX, Réa D, Guilhot J, Guilhot F, Huguet F, Nicolini F et al., Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained complete molecular remission for at least 2 years: the prospective, multicentre Stop Imatinib (STIM) trial, *Lancet Oncol*, 2010; 11(11): 1029-1035
- (119) Jankowski W, Saleh T, Pai MT, Sriram G, Birge RB, Kalodimos CG, Domain organization differences explain Bcr-Abl's preference for CrkL

- over CrkII, *Nat Chem Biol*, 2012; 8(6): 590-596
- (120) Ingram WJ, Wicking CA, Grimmond SM, Forrest AR, Wainwright BJ, Novel genes regulated by Sonic Hedgehog in pluripotent mesenchymal cells, *Oncogene*, 2002; 21(53): 8196-8205
- (121) Crews LA, Jamieson CH, Selective elimination of leukemia stem cells: hitting a moving target, *Cancer Lett.*, 2013; 338(1): 15-22
- (122) Bhardwaj G, Murdoch B, Wu D, Baker DP, Williams KP, Chadwick K et al., Sonic hedgehog induces the proliferation of primitive human hematopoietic cells via BMP regulation, *Nat Immunol*, 2001; 2(2): 172-180
- (123) Trowbridge JJ, Scott MP, Bhatia M, Hedgehog modulates cell cycle regulators in stem cells to control hematopoietic regeneration, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006; 103(38): 14134-14139
- (124) Corbin AS, Agarwal A, Loriaux M, Cortes J, Deininger MW, Druker BJ, Human chronic myeloid leukemia stem cells are insensitive to imatinib despite inhibition of BCR-ABL activity, *J Clin Invest*, 2011; 121(1): 396-409
- (125) Hamilton A, Helgason GV, Schemionek M, Zhang B, Myssina S, Allan EK et al., Chronic myeloid leukemia stem cells are not dependent on Bcr-Abl kinase activity for their survival, *Blood*, 2012; 119(6): 1501-1510
- (126) Bhatia R, Holtz M, Niu N, Gray R, Snyder DS, Sawyers C et al., Persistence of malignant

hematopoietic progenitors in chronic myelogenous leukemia patients in complete cytogenetic remission following imatinib mesylate treatment, *Blood*, 2003; 101(12): 4701-4707

- (127) Graham SM, Jorgensen HG, Allan E, Pearson C, Alcorn MJ, Richmond L et al. Primitive, quiescent, Philadelphia-positive stem cells from patients with chronic myeloid leukemia are insensitive to STI571 in vitro, *Blood*, 2002; 99(1): 319-325
- (128) Chomel JC, Bonnet ML, Sorel N, Bertrand A, Meunier MC, Fichelson S et al., Leukemic stem cell persistence in chronic myeloid leukemia patients with sustained undetectable molecular residual disease, *Blood*, 2011; 118(13): 3657-3660
- (129) Nie Y, Han YC, Zou YR, CXCR4 is required for the quiescence of primitive hematopoietic cells, *J Exp Med*, 2008; 205(4): 777-783
- (130) Sugiyama T, Kohara H, Noda M, Nagasawa T, Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches, *Immunity*, 2006; 25(6): 977-988
- (131) Geay JF, Buet D, Zhang Y, Foudi A, Jarrier P, Berthebaud M et al., p210BCR-ABL inhibits SDF-1 chemotactic response via alteration of CXCR4 signaling and down-regulation of CXCR4 expression, *Cancer Res*, 2005; 65(7): 2676-2683
- (132) Jin L, Tabe Y, Konoplev S, Xu Y, Leysath CE, Lu H et al., CXCR4 up-regulation by imatinib induces

- chronic myelogenous leukemia (CML) cell migration to bone marrow stroma and promotes survival of quiescent CML cells, *Mol Cancer Ther*, 2008; 7(1): 48-58
- (133) Raman D, Sai J, Neel NF, Chew CS, Richmond A, LIM and SH3 protein-1 modulates CXCR2-mediated cell migration, *PLoS One*, 2010; 5(4): e10050
- (134) Traenka J, Hauck CR, Lewandrowski U, Sickmann A, Gambaryan S, Thalheimer P et al., Integrin-dependent translocation of LASP-1 to the cytoskeleton of activated platelets correlates with LASP-1 phosphorylation at tyrosine 171 by Src-kinase, *Thromb Haemost*, 2009; 102(3): 520-528
- (135) Li L, Guris DL, Okura M, Imamoto A, Translocation of CrkL to focal adhesions mediates integrin-induced migration downstream of Src family kinases, *Mol Cell Biol*, 2003; 23(8): 2883- 2892
- (136) Cho YJ, Hemmeryckx B, Groffen J, Heisterkamp N, Interaction of Bcr/Abl with C3G, an exchange factor for the small GTPase Rap1, through the adapter protein Crkl, *Biochem Biophys Res Commun*, 2005; 333(4):1276-1283
- (137) Gao Q, Tang L, Wu L, Li K, Wang H, Li W et al., LASP1 promotes nasopharyngeal carcinoma progression through negatively regulation of the tumor suppressor PTEN, *Cell Death Dis*, 2018; 9(3):393
- (138) Kharas MG, Fruman DA, ABL oncogenes and

phosphoinositide 3-kinase: mechanism of activation and downstream effectors, *Cancer Res.*, 2005; 65(6): 2047-2053

- (139) Quentmeier H, Eberth S, Romani J, Zaborski M, Drexler HG, BCR-ABL1-independent PI3Kinase activation causing imatinib-resistance, *J Hematol Oncol*, 2011; 4: 6
- (140) Klejman A, Rushen L, Morrione A, Slupianek A, Skorski T, Phosphatidylinositol-3 kinase inhibitors enhance the anti-leukemia effect of STI571, *Oncogene*, 2002; 21(38): 5868-5876
- (141) Ding J, Romani J, Zaborski M, MacLeod RA, Nagel S, Drexler HG et al., Inhibition of PI3K/mTOR overcomes nilotinib resistance in BCR-ABL1 positive leukemia cells through translational down-regulation of MDM2, *PLoS One*, 2013; 8(12): e83510
- (142) Wöhrle FU, Halbach S, Aumann K, Schwemmers S, Braun S, Auberger P et al., Gab2 signaling in chronic myeloid leukemia cells confers resistance to multiple Bcr-Abl inhibitors, *Leukemia*, 2013; 27(1): 118-129



# **Danksagung**



# Lebenslauf



## **Affidavit/Eidesstattliche Erklärung**

I hereby confirm that my thesis entitled „LASP1 – a new phosphorylation-dependent binding partner of CrkL in CML“ is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Place, Date

Signature

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „LASP1 – ein neuer phosphorylierungs-abhängiger Bindungspartner von CrkL in CML“ eigenständig, d.h. insbesondere selbstständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ort, Datum

Unterschrift