

**Charakterisierung der Glucocorticoid-induzierten Zellantwort
humaner ALL-Zelllinien nach zusätzlicher Modulation des
Ubiquitin-Proteasom-Signalweges zur Überwindung der
Glucocorticoid-Resistenz**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades
Doktorin der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.
genehmigte Dissertation von

Dipl.-Biol. Stefanie Verena Junk

geboren am 20.09.1977
in Hilden

Referentin: Prof. Dr. Brigitte Schlegelberger

Korreferent: PD Dr. Dirk Wedekind

Tag der Promotion: 09.03.2011

„Man merkt nie, was schon getan wurde, man sieht immer nur, was noch zu tun bleibt.“

Marie Curie

Die akute lymphoblastische Leukämie (ALL) ist die häufigste Tumorerkrankung im Kindesalter. Das Ansprechen auf die initiale Glucocorticoid (GC)-Therapie, die sogenannte *Prednisone-Response*, ist einer der verlässlichsten Marker zur Prognose des Erfolgs der späteren Poly-Chemotherapie und des Gesamtüberlebens der Patienten. GC induzieren in leukämischen Blasten Apoptose dagegen weisen GC-resistente Zellen defekte Apoptose-Signalwege auf. In der Vorstudie zu der vorliegenden Arbeit wurde eine Überexpression des *Valosin-containing proteins* (VCP/p97) in der Gruppe der *Prednisone-Poor-Responder* (PPR)-Patienten festgestellt. VCP besitzt im Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) eine Schlüsselposition und interagiert über den I κ B-Abbau mit dem NF κ B-Signalweg. Es wurde daher abgeleitet, dass eine Deregulation des UPS in die GC-Resistenz involviert sein könnte. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, den funktionellen Zusammenhang zwischen der GC-Resistenz und dem VCP sowie einigen weiteren aus der Vorstudie bekannten differentiell exprimierten Proteinen mit Hilfe eines zellbiologischen Systems zu untersuchen. Darüber hinaus sollte die potentielle prognostische Relevanz der Markerproteine an einem Patientenkollektiv validiert werden. Zur Charakterisierung und Modulation des zellbiologischen Systems wurden als GC Prednisolon (Solu-Decortin-H®, Merck-Serono GmbH) und als Proteasominhibitor Bortezomib (Velcade®, Millenium Pharmaceuticals) verwendet. Bortezomib blockiert die proteolytische Aktivität des Proteasoms und dadurch alle UPS-assoziierten Signalwege. Als *in vitro* Modellsystem dienten in erster Linie die humanen prä-B-ALL-Zelllinien MHH-cALL-2 und -3.

Prednisolon bewirkte in der GC-resistenten MHH-cALL-2 einen distinkt höheren Anstieg und eine um 24 h verzögerte maximale I κ B-Expression verglichen zur sensitiven ALL-Zelllinie. Zusätzlich wurde in der MHH-cALL-2 ein Anstieg der VCP-Expression festgestellt. Obwohl Bortezomib in beiden Zelllinien Dosis-abhängig Apoptose induzierte, erzeugte sie keine I κ B-Induktion. Die Kombination zu Prednisolon resultierte jedoch in einer Angleichung der I κ B-Expressionskinetik der GC-resistenten an die der GC-sensitiven Zelllinie. Nach 24 h erhöhte Bortezomib in beiden Zelllinien die VCP-Expression. Die funktionellen Analysen, die mit Hilfe spezifischer siRNA gegen VCP zur UPS-Modulation durchgeführt wurden, belegten, dass eine verminderte VCP-Expression in der GC-resistenten Zelllinie mit einer verstärkten GC-induzierten Zelltodrate einherging. Im Rahmen dieser Arbeit konnte demonstriert werden, dass die GC-Sensitivität für die anti-proliferative und pro-apoptotische Wirkung des Bortezomibs nicht entscheidend ist. Bemerkenswerterweise verminderte eine zusätzliche Prednisolon-Gabe in den GC-resistenten ALL-Zelllinien die Bortezomib-induzierte Apoptose, sie löste jedoch verstärkt alternative Zelltodmechanismen aus. Insbesondere schien die I κ B-Expression maßgeblich hierfür zu sein, da die Expressions-Kinetik des VCP in zeitlicher Abhängigkeit zu der des I κ B stand. Die deutlichen Unterschiede, die im GC-induzierten Zelltod durch die Bortezomib-Modulation des UPS auftraten, tragen daher, durch eine frühzeitigere Identifizierung multiresistenter Patienten, möglicherweise nicht nur zur Optimierung der Risikostratifizierung bei. Vielmehr stellen Proteasomen-Inhibitoren wahrscheinlich nach eingehender klinischer Prüfung insbesondere für die GC-resistenten Hoch-Risiko-Patienten eine neue Option zur Verbesserung der Therapie dar.

Schlagerwörter: Akute lymphoblastische Leukämie, Glucocorticoide, Glucocorticoid-Resistenz, *Valosin-containing protein*, Ubiquitin-Proteasom-System, Bortezomib

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common malignancy in childhood. The response to initial glucocorticoid (GC) therapy in ALL reliably predicts the response to multi-agent chemotherapy and overall-survival. GC induce apoptosis in leukemic blasts and impaired apoptosis is a hallmark of glucocorticoid-resistant ALL. Although the complex molecular effects of GC treatment were intensively analyzed, the mechanisms underlying GC resistance in leukemic cells are still poorly understood. In an earlier study, the Valosin-containing protein (VCP/p97), part of the ubiquitin proteasome system (UPS), was identified to be overexpressed in prednisone poor responder (PPR) patients. VCP holds a key position within the UPS and interacts with the the NF κ B signaling pathway supporting I κ B α degradation. This may indicate that the UPS is possibly altered and may be involved in GC resistance in childhood ALL patients. Thus, the aim of the study was to investigate the association of VCP and GC response and further differentially expressed proteins, that were identified by a preliminary study using an *in vitro* model system. Furthermore, the potential prognostic relevance of the marker proteins had to be validated by analyzing a patient collective. Characterization and modulation of the *in vitro* model was carried out using the glucocorticoid prednisolone (Solu-Decortin-H®, Merck-Serono GmbH) and the proteasome inhibitor bortezomib (Velcade®, Millenium Pharmaceuticals). Bortezomib blocks proteasomal degradation and hence signaling pathways associated with the UPS. Primarily, the human B-cell precursor leukemic cell lines MHH-cALL-2 and MHH-cALL-3 served as *in vitro* models.

Prednisolone treatment induced a distinctly higher increase of *I κ B* expression and a delay of 24 h in the GC-resistant MHH-cALL-2 cell line, compared to GC-sensitive MHH-cALL-3. In addition VCP levels were only elevated in MHH-cALL-2 cells to about 2-fold, whereas in PGR cells the amount remained largely unchanged. Although both cell lines showed a dose-dependent increase in apoptosis after bortezomib single treatment, no increase of I κ B was detected. Combined with prednisolone, bortezomib resulted in an adjustment of the I κ B expression kinetics in GC-resistant MHH-cALL-2 to the profile of the GC-sensitive MHH-cALL-3 cell line after prednisolone single treatment. Bortezomib led to a VCP increase in both cell lines within 24 h. Functional analysis using specific *VCP*-siRNA confirmed that reduced VCP expression in the GC-resistant cell line correlated with an increase of GC-induced cell death. The results of the current work demonstrate that the GC sensitivity is not decisive for the anti-proliferative and pro-apoptotic effect of bortezomib. Remarkably, addition of prednisolone reduced bortezomib-induced apoptosis in GC-resistant cells, but promoted alternative cell death mechanisms. Particularly *I κ B* expression seemed to be important for this, because the expression kinetics of VCP altered in temporal dependence upon those of *I κ B*. The obvious differences in GC-induced cell death caused by bortezomib modulation of the UPS probably provide a possibility of earlier identification of multi-resistant patients and therefore optimization of risk stratification. Moreover, after intensive clinical examination, proteasome inhibitors like bortezomib may be a novel option to improve therapy, especially for high risk GC-resistant ALL patients.

Key words: Acute lymphoblastic leukemia, glucocorticoids, glucocorticoid resistance, Valosin-containing protein, ubiquitin proteasome system, bortezomib

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
<u>1. Einleitung</u>	<u>1</u>
1.1 Akute lymphoblastische Leukämien (ALL) im Kindesalter	1
1.2 Glucocorticoidresistenz bei akuter lymphatischer Leukämie	3
1.3 Effekte der Behandlung mit Glucocorticoiden auf den NFκB-Signalweg	4
1.3.1 Eigenschaften der Glucocorticoide	4
1.3.2 Wirkung der Glucocorticoide auf den NFκB-Signalweg	4
1.4 Differentiell exprimierte Proteine als diagnostische Marker bei ALL	6
1.5 Das <i>Valosin-containing protein</i> und der Ubiquitin-Proteasom-Degradationsweg	7
1.5.1 Das VCP, eine ubiquitäre ATPase mit Chaperonin-Funktion	7
1.5.2 Das Proteasom, Zentrum des Ubiquitin-Proteasom-Degradationsweges	9
1.5.3 Abbau fehlgefalteter Proteine über den ER-assoziierten Degradationsweg (ERAD)	12
1.6 Katalase, ein Enzym mit anti-oxidativer Schutzfunktion	13
1.7 Apoptose und alternative Zelltodmechanismen	14
1.8 Zielsetzung der Arbeit	18
<u>2. Material und Methoden</u>	<u>19</u>
2.1 Material	19
2.1.1 Zelllinien und Kulturbedingungen	19
2.1.2 Verwendetes Patientenkollektiv zur Analyse mononukleärer Zellen	19
2.2 Verwendete Lösungen, Kits, Antikörper und Geräte	20
2.3 Molekularbiologische und biochemische Methoden	25
2.3.1 Isolierung von Proteinen	25
2.3.2 Zellfraktionierung	26
2.3.3 Aceton-Fällung von Proteinen	26
2.3.4 Proteinquantifizierung nach Bradford	26
2.3.5 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	26
2.3.6 Western-Blot	27
2.3.7 Immunologischer Nachweis der Proteine und densitometrische Analyse	28
2.3.8 Immunfluoreszenz-Färbung und konfokale Laserscanning-Mikroskopie	28
2.3.9 Isolierung von RNA	29

2.3.10 c-DNA Synthese	29
2.3.11 Quantitative Real-Time-PCR (RT-PCR)	30
2.3.12 <i>Automated Multiplexed Gene Expression Profiling</i> (GeXP)-Fragmentanalyse	31
2.4 Zellbiologische Methoden	33
2.4.1 Zellkulturstudien nach Behandlung mit Prednisolon und Bortezomib	33
2.4.2 Transiente Transfektion von ALL-Zelllinien und anschließende Prednisolon-Behandlung	33
2.4.3 Trypan-Blau-Färbung und morphologische Beurteilung der Zellen	34
2.4.4 Verminderung der metabolischen Aktivität als Maß für den Vitalitätsverlust	34
2.4.5 Quantifizierung Caspase-abhängiger Apoptose	35
2.4.6 Durchflusszytometrische Untersuchung nach Propidiumiodid-Färbung	35
2.4.7 Analyse spezifischer Marker-Proteine im Western-Blot zur Unterscheidung der induzierten Zelltodmechanismen	36
2.5 Statistische Analysen	36
<u>3. Ergebnisse</u>	<u>37</u>
3.1 Prednisolon- und Bortezomib-Zellkulturstudien	38
3.1.1 Einfluss der Prednisolon-Einzelbehandlung auf die Vitalität	38
3.1.2 Einfluss der Bortezomib-Einzelbehandlung auf die Vitalität	40
3.1.3 Untersuchungen zur Vitalität und Apoptose-Induktion nach Behandlung mit Prednisolon und Bortezomib	40
3.1.4 Dosis-abhängige Induktion Caspase-vermittelter Apoptose	41
3.1.5 Dosis-abhängige Zunahme letaler, Propidiumiodid(PI)-positiver Zellen	42
3.1.6 Nekrotische und apoptotische Spaltung der Poly-(ADP-ribose)-Polymerase-1	43
3.1.7 Untersuchung zur Lagerbarkeit von Bortezomib-Lösungen	44
3.2 Einfluss von Prednisolon und Bortezomib auf die Expression der Zielgene	45
3.2.1 RNA-Expression der Zielgene <i>VCP</i> und <i>IκB</i> mit Behandlung durch Prednisolon	45
3.2.2 RNA-Expression der Zielgene <i>VCP</i> und <i>IκB</i> mit Behandlung durch Bortezomib mit und ohne Kombination von Prednisolon	46
3.2.3 Einfluss von Prednisolon und Bortezomib auf die <i>Katalase</i> -RNA-Expression	48
3.2.4 RNA-Expressions-Analyse mittels <i>Automated Multiplexed Gene Expression Profiling</i> (GeXP)-Fragmentanalyse an ALL-Zelllinien	48
3.3 Expression und Lokalisierung der Proteine IκB und VCP mit und ohne Behandlung mit Prednisolon und Bortezomib	50
3.3.2 Protein-Expression von VCP und seiner Interaktionspartner aus dem Ubiquitin-Proteasom-Degradationsweg (IκB, Proteasom, NFκB und Hsp60)	50
3.3.3 Zellfraktionierung zur Lokalisation der Zielproteine IκB und NFκB	52

3.3.4	Immunfluoreszenzfärbung zur Lokalisation der Zielproteine VCP, IκB und 20S	53
3.4	Reduktion der VCP-Expression durch transiente Transfektion mit spezifischer siRNA gegen VCP	56
3.4.2	Effekte der Prednisolon-Behandlung nach spezifischer Genexpressionshemmung	57
3.5	Expressionsanalysen an primären leukämischen Blasten aus dem Knochenmark	59
<u>4. Diskussion</u>		<u>62</u>
4.1	Charakterisierung und Modulierung der zellulären Modellsysteme	63
4.1.1	Charakterisierung des durch die Prednisolon- und Bortezomib-Behandlung induzierten Zelltodes	63
4.1.2	Initiale Expressionsunterschiede zwischen GC-sensitiven und resistenten ALL-Zelllinien	70
4.1.3	GC-Sensitivität-assoziierte Veränderungen in der Expression und der Protein-Lokalisierung in ALL-Zelllinien nach Gabe von Prednisolon	70
4.1.4	Modulation der Zielgenexpression und der Zielprotein-Lokalisierung in ALL-Zelllinien durch die Gabe von Bortezomib in Abhängigkeit zur GC-Sensitivität	72
4.1.5	Konsequenzen der siRNA-vermittelten VCP-Herunterregulation für die GC-Resistenz von ALL-Zellen	76
4.2	Expression der Zielgene VCP und Katalase in primären Knochenmarkszellen	77
4.3	Ausblick: UPS-Modulation zur Überwindung der GC-Resistenz in kindlicher ALL	78
<u>5. Literaturverzeichnis</u>		<u>82</u>
<u>6. Anhang</u>		<u>100</u>
6.1	Zusätzliche Tabellen	100
6.2	Zusätzliche Abbildungen	101
<u>Lebenslauf</u>		<u>113</u>
<u>Publikationen</u>		<u>114</u>
<u>Danksagung</u>		<u>115</u>

Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µM	Mikromolar
ALL	<i>Acute lymphoblastic leukemia</i> (Akute lymphoblastische Leukämie)
Ap-1	<i>Activator protein 1</i> (Aktivator-Protein-1)
APS	Ammoniumpersulfat
BORT	<i>bortezomib</i> (Bortezomib)
cDNA	<i>complementary DNA</i> (komplementäre DNA, Produkt reverser Transkription)
CHOP	<i>C/EBP-homologous protein</i> ; Synonym: GADD153
CLSM	<i>Confocal laser scanning microscopy</i> (Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie)
C-Terminus	Carboxyterminus
Cyt C	Cytochrom C
DABCO	1,4-Diazabicyclo(2,2,2)octan (Triethylenediamine)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
ECL	<i>Enhanced Chemoluminescence</i>
ER	Endoplasmatisches Reticulum
F	<i>Forward primer</i> (vorwärts gerichteter Primer)
FKS	Fötales Kälber-Serum
FL	3' Fluorescein-Label an LightCycler-Sonden
GADD153	<i>Growth arrest- and DNA damage-inducible gene 153</i> ; Synonym: CHOP
GC	Glucocorticoid
GeXP	<i>Gene expression profiling</i>
GR	Glucocorticoid-Rezeptor
h	Stunde
HR-Gruppe	<i>High risk group</i> (Hohes-Risiko-Gruppe der ALL-Patienten)
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase)
Hsp	Hitzeschockprotein

I κ B α	NFKBIA; <i>Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor</i> (NF κ B-Inhibitor-Protein- α)
IL-	Interleukin-
L	Liter
LC	5' LightCycler® Red-Label an LightCycler-Sonden
min	Minute
mL	Milliliter
MRD	<i>Minimal residual disease</i> (Minimale Resterkrankung)
MR-Gruppe	<i>Medium risk group</i> (Mittleres-Risiko-Gruppe der ALL-Patienten)
mRNA	<i>messenger RNA</i> (Boten-RNA)
NF κ B	<i>Nuclear Factor kappa B</i> ; auch gebräuchlich: NF-kB
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
N-Terminus	Aminoterminus
p50	<i>NFKB1</i> ; p50 wird prozessiert aus dem Vorläuferprotein p105 (<i>NF-kappa-B p105 subunit isoform 1</i>)
p65	<i>NFKB3</i> ; <i>Nuclear factor NF-kappa-B p65 v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A</i> (RELA)
PARP-1	<i>Poly (ADP-ribose)-polymerase</i> (Poly-(ADP-ribose)-Polymerase-1)
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PGR	<i>Prednisone good responder</i> (Patient mit guter Prednisolon-Response an Tag 8)
PI	Propidiumiodid
PPR	<i>Prednisone poor responder</i> (Patient mit geringer Prednisolon-Response an Tag 8)
PRED	Prednisolon
R	<i>Reverse primer</i> (rückwärts gerichteter Primer)
RefSequ.	Referenzsequenz-Nummer in der Datenbank des NCBI
RIP1	<i>Receptor-interacting protein 1</i> Synonym: <i>Receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 1</i>
RIP3	<i>Receptor-interacting protein 3</i> Synonym: <i>Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3</i>

RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> (Hochreaktive Sauerstoffspezies)
rpm	<i>Rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT-PCR	<i>Real-Time-quantitative-PCR</i> (Quantitative Reverse Transkriptase PCR)
s	Sekunde
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> (Natrium-Dodecylsulfat)
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SR-Gruppe	<i>Standard risk group</i> (Standard-Risiko-Gruppe der ALL-Patienten)
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor alpha</i> (Tumor-Nekrose-Faktor-alpha)
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
UPD	<i>Ubiquitin proteasome degradation pathway</i> (Ubiquitin-Proteasom-Degradationsweg)
UPS	<i>Ubiquitin proteasome system</i> (Ubiquitin-Proteasom-System)
VCP	<i>Valosin-containing protein</i> , Synonyme: <i>Transitional endoplasmic reticulum ATPase</i> (TERA) und p97
WST-1	<i>Water Soluble Tetrazolium Salt 1</i> (Wasserlösliches Tetrazolium Salz 1)
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung (g)
μ g	Mikrogramm

1. Einleitung

1.1 Akute lymphoblastische Leukämien (ALL) im Kindesalter

Die Entwicklung von Tumorerkrankungen ist sehr komplex, sowohl bei der Bildung solider Tumoren als auch bei Neoplasien des hämatopoetischen Systems. Zu den hämatologischen Neoplasien gehört auch die akute lymphoblastische Leukämie (ALL), deren Ursprung eine entartete lymphatische Vorläuferzelle ist. Anders als die soliden Karzinome und Sarkome bilden die hämatopoetischen Neoplasien primär keinen festen Zellverband und werden daher als nicht-solide Tumoren bezeichnet. Während der Pathogenese durchlaufen beide Arten von Neoplasien gemeinsame Schritte und sind dadurch gekennzeichnet, dass die entarteten Zellen durch progressive und übermäßige Proliferation oder verlängertes Überleben die gesunden Zellen verdrängen. Bei Erwachsenen ist die ALL mit einem Erkrankten von 100 000 Personen eine seltene Leukämievariante. Im Kindesalter ist sie hingegen die häufigste maligne Erkrankung⁽¹⁾. Laut Kompetenznetz für pädiatrische Onkologie und Pädiatrie erkranken in Deutschland jährlich 550-600 Kinder und Jugendliche unter 18 Jahren. Davon sind 500 Patienten unter 14 Jahre alt.

Häufig geht die Entwicklung der ALL mit Translokationen in Genen für Transkriptionsfaktoren einher, so dass Differenzierung und Proliferation dereguliert werden. Die maligne lymphoblastische Zelle verbleibt durch den Verlust zur Differenzierungsfähigkeit und zur Apoptose in einem frühen Differenzierungsstadium zur B-, T- oder natürlichen Killer-Zelle, den so genannten Lymphoblasten. Die Expansion dieser malignen klonalen Zellen verdrängt nicht nur die normale Hämatopoese im Knochenmark und in den Lymphknoten, sondern es kann sogar zu einer Infiltration extralymphatischer Organe kommen. Je nachdem in welchem Stadium der lymphatischen Zellreifung es zum Differenzierungsarrest kommt, ähneln die Antigene auf der Zelloberfläche des malignen Klons denen der normalen Vorläuferzellen der verschiedenen Entwicklungsstufen. Auf Basis der präsentierten Antigene erfolgt die Immunophänotypisierung, bei der die ALL Erkrankungen in folgende Subtypen unterteilt werden: Die pro-B-ALL (*progenitor-B-ALL*), die common B-ALL, die prä-B-ALL, die reife B-ALL, die prä-T-ALL, die thymische T-ALL und die reife T-ALL⁽²⁻⁴⁾. Wobei die Vorläufer-B-Zell-ALL (87%) häufiger auftreten als die T-ALL-Erkrankungen (13%)⁽⁵⁾. Die Mehrzahl der Vorläufer-B-Zell-ALL sind common B-ALL oder prä-B-ALL.

Unspezifisch erscheinende grippeähnliche Symptome der ALL werden meist von einer erhöhten Blutungsneigung, Petechien, Blässe und einer erhöhten Infektneigung begleitet. Dies ist erklärbar durch die Verdrängung der normalen Hämatopoese. Des Weiteren treten Hepato- und Splenomegalien auf. Bei Erwachsenen wird die Pathogenese meist durch mehrere genetische Veränderungen verursacht, die im Laufe des Lebens erworben werden. Sie sind nicht erblich. Die Tatsache, dass die Erkrankung jedoch auch bei Kindern auftritt, spricht für eine genetische Prädisposition. Bei Kindern treten die ersten somatischen genetischen Veränderungen vereinzelt bereits intrauterin auf⁽⁶⁾. Die Ursachen für das Auftreten der Erkrankung sind bisher nicht vollständig geklärt.

Die ALL-Berlin-Frankfurt-München (BFM)-Studiengruppe zur Behandlung kindlicher ALL beschäftigt sich seit den 1970er Jahren mit der Verbesserung der Therapiekonzepte. Es handelt sich dabei um multizentrische, randomisierte internationale Therapieoptimierungsstudien der Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie. Dank kontinuierlich optimierter Therapieprotokolle hat sich die langfristige Überlebenswahrscheinlichkeit seitdem vor allem durch Einführung der Poly-Chemotherapie, von ursprünglichen 20-30 % auf heute rund 80 % erhöht⁽⁷⁻¹⁰⁾. Die ALL-BFM-Therapiekonzepte gehören weltweit zu den verbreitetsten und im Therapieerfolg, bei sehr geringem Zweitmalignomrisiko, zu den besten⁽⁸⁾. Zentraler Punkt der Studien war eine stetige Verbesserung der Risikostratifizierung anhand prognostischer Marker, die zum Zeitpunkt der Diagnose und zu definierten Zeitpunkten während der Behandlung als Kontrolle des Therapieerfolgs erfasst werden. Mit Hilfe dieser Marker konnte außerdem bis heute die Intensität der Therapie für die verschiedenen Risikogruppen angepasst werden^(11, 12).

Trotz stetiger Verbesserung erfahren etwa 90 Kinder allein in Deutschland pro Jahr ein Rezidiv der Erkrankung. Außerdem leiden die Kinder zum Teil an den schweren Nebenwirkungen und häufig lebenslang an den Spätschäden der Therapie.

Für Patienten, die im Rahmen der Therapieoptimierungsstudie ALL-BFM-2000 behandelt werden, erfolgt eine Risiko-Stratifizierung und Festlegung der Behandlungsintensität nach mehreren Prognosefaktoren, die mittels der vorausgegangenen Studien und in Zusammenarbeit mit internationalen Studiengruppen entwickelt wurden. Erstens wird das Ansprechen der Patienten auf die initiale Glucocorticoid (GC)-Behandlung erfasst, welche mit Prednison oder Dexamethason erfolgt. Für diesen als *Prednisone-Response* bezeichneten prognostischen Marker wird an Tag 8 der Therapie die Zahl der leukämischen Blasten im peripheren Blut gemessen. Bei mehr als 1000 leukämische Blasten pro μL Blut wird der Patient in die Gruppe der *Prednisone Poor Responder* (PPR) eingestuft, sind weniger enthalten, zählt er zur Gruppe der *Prednisone Good Responder* (PGR)⁽¹³⁾. Zweitens wird an Tag 33 während der Konsolidierungstherapie das Therapieansprechen mittels minimal verbleibender Resterkrankung (*minimal residual disease*, MRD) erfasst⁽¹⁴⁻¹⁷⁾. Dabei werden Rearrangements in dem Immunglobulin-schwere-Kette-Gen (IGH) und dem T-Zellrezeptor (TCR)-Gen als klonale Marker genutzt, um die Patienten in die Standard-Risiko-Gruppe (SR), Mittleres-Risiko-Gruppe (MR) oder die Hoch-Risiko-Gruppe (HR) einzugruppieren. Die Ergebnisse der AIEOP-BFM-ALL-2000-Studie bestätigten für die zu zwei Zeitpunkten durchgeführte, PCR-basierte MRD-Untersuchung eine sehr hohe Sensitivität und eine deutlich verbesserte Risikoeinschätzung für ein Wiederauftreten der Erkrankung^(18, 19). Außerdem zeigte sie, dass die Wahrscheinlichkeit für ein rückfallfreies Überleben nach 10 Jahren bei den MRD-HR Patienten bei 16 % liegt, während sie für MRD-SR Patienten 93 % beträgt⁽¹⁸⁾. Des Weiteren werden die Leukämie-Zellen auf chromosomale Aberrationen und genetische Veränderungen hin untersucht, die sich in der Vergangenheit als geeignete prognostische Marker herausgestellt haben. So gelten ein hyperdiploider Chromosomensatz⁽²⁰⁾ oder die Chromosomentranslokation t(12;21), die zu dem Fusionsgen *TEL-AML1* führt, als prognostisch günstig⁽²¹⁾. Im Gegensatz dazu zählen ein hypodiploider Chromosomensatz⁽²⁰⁾,

eine Philadelphia-Translokation t(9;22), die zu dem Fusionsgen *BCR-ABL* führt oder MLL-Translokationen wie die t(4;11), zu den prognostisch ungünstigen Faktoren⁽²²⁾.

In der initialen Therapie werden die Glucocorticoide mit Vincistrin und Methodextrat, einem Anthrazyklin-Derivat, kombiniert eingesetzt, um die Blastenzahl im Knochenmark bis Therapie-Tag 15 auf unter 5 % zu reduzieren, den Organbefall zu eliminieren und die Hämatopoese wieder herzustellen. Sobald die Induktionstherapie Erfolg zeigt, werden im Rahmen der Konsolidierungstherapie wechselnd verschiedene Zytostatika verabreicht, um im Knochenmark verbliebene leukämische Blasten zu eliminieren und einer möglichen Resistenzentwicklung entgegenzuwirken. Die initiale *Prednisone-Response* ist einer der verlässlichsten Marker für eine Multiresistenz der Leukämiezellen gegenüber Chemotherapeutika und damit Hinweis auf ein schlechteres Gesamtüberleben der Patienten^(11, 13, 23, 24). Im Laufe der Zeit haben jedoch die MRD-Messung und die genetischen Untersuchungen wegen ihrer hohen Sensitivität immer mehr an Bedeutung gewonnen. So erfolgt die Risikostratifizierung heute hauptsächlich aufgrund dieser prognostischen Marker^(8, 11, 25). In vielen Fällen korreliert die MRD-Risiko-Einstufung jedoch mit der initialen *Prednisone-Response*. Für die weitere Optimierung der Therapie ist es daher von großer Bedeutung, die Ursache für die unterschiedliche Glucocorticoid-Sensitivität der leukämischen Blasten herauszufinden.

1.2 Glucocorticoidresistenz bei akuter lymphatischer Leukämie

Glucocorticoide (GC) induzieren Apoptose in leukämischen Blasten. Hingegen weisen GC-resistente Zellen eine beeinträchtigte Apoptose auf⁽²⁶⁻²⁸⁾. Obwohl in zahlreichen Studien die komplexen molekularen Effekte der GC-Behandlung untersucht wurden⁽²⁹⁻³¹⁾, war eine vollständige Aufklärung des der Resistenz zugrunde liegenden Mechanismen bisher noch nicht vollständig möglich. In den Vorarbeiten zu der vorliegenden Studie wurde gezeigt, dass das *Valosin-containing protein*, welches als Chaperonin Teil des Ubiquitin-Proteasom-Degradationsweges ist, in GC-resistenten ALL-Patienten überexprimiert wird⁽³²⁾. Des Weiteren wurde beobachtet, dass in GC-resistenten akuten lymphoblastischen Leukämien Gene des Proteasom-Signalweges und anti-apoptotische Gene differentiell exprimiert werden^(33, 34).

Auch pathologische Veränderungen der Rezeptorkonfiguration, der Rezeptoraktivierung, des Eintritts des aktivierten Rezeptorkomplexes in den Zellkern sowie Veränderungen der Transkriptionshemmung und -aktivierung gelten als mögliche Ursache für eine ausbleibende GC-Wirkung. Es wird kontrovers diskutiert, ob die initiale Expression des GC-Rezeptors für das Ansprechen auf die GC-Behandlung ausschlaggebend ist oder die Transkriptionssteigerung der einzelnen Splice-Varianten nach Gabe von Prednisolon⁽³⁵⁻³⁷⁾. Diese Vielfalt von Möglichkeiten deutet darauf hin, dass nicht nur eine Ursache für die *in vivo* GC-Resistenz verantwortlich ist, sondern wahrscheinlich eine Vielzahl unterschiedlicher Einflussfaktoren die biologische Grundlage des Phänomens sind.

1.3 Effekte der Behandlung mit Glucocorticoiden auf den NFκB-Signalweg

1.3.1 Eigenschaften der Glucocorticoide

Cortison ist ein Steroidhormon, das in den Jahren 1935 bis 1940 in der Nebennierenrinde des Menschen entdeckt und beschrieben wurde. Es handelt sich dabei um die durch Oxidation inaktivierte Form des Glucocorticoids Cortisol, welches im Kohlenhydrathaushalt, dem Fettstoffwechsel und dem Proteinumsatz Bedeutung besitzt. Die seit 1951 mögliche synthetische Herstellung geht auf Robert Woodward zurück⁽³⁸⁾.

In physiologischen Konzentrationen fördern Cortisol und Glucocorticoide (GC) die Gluconeogenese, die Neubildung von Kohlenhydraten aus Proteinen und Fetten in der Leber. Sie beeinflussen außerdem wichtige biochemische, physiologische und pathologische Vorgänge in allen Organen.

Synthetische Glucocorticoide sind Derivate des körpereigenen Cortisols und besitzen weitgehend dasselbe Wirkungsspektrum wie das körpereigene Hormon Hydrocortison. Die künstlichen GC wurden vor allem deshalb entwickelt, weil größere Mengen des Hydrocortisons zu unerwünschten Nebenwirkungen führen.

Glucocorticoide werden wegen ihrer anti-inflammatorischen, anti-allergischen und immunsuppressiven Wirkung seit 1948⁽³⁹⁾ zur Behandlung von zahlreichen Erkrankungen eingesetzt. Je nach Anwendungsart wird zwischen topischen und systemischen Glucocorticoiden unterschieden. Die unter anderem bei der Leukämiebehandlung eingesetzten Glucocorticoide Prednison und Dexamethason gehören zu den systemischen. Bei Aufnahme werden Cortisonderivate in der Leber durch das Enzym β -Hydroxy-Steroid-Dehydrogenase in die aktiven Cortisole umgewandelt. Das in der vorliegenden Arbeit für die *in vitro* Experimente verwendete Prednisolon (1,2-Dehydrocortisol; früher auch Metacortandralon oder Deltahydrocortison genannt) ist der aktive Metabolit des Prednisons.

1.3.2 Wirkung der Glucocorticoide auf den NFκB-Signalweg

Für die Mehrzahl der ALL-Patienten wurde eine konstitutive NFκB-Aktivierung nachgewiesen⁽⁴⁰⁾. Daher ist die Wirkung der Glucocorticoide auf den NFκB-Signalweg für die Behandlung der ALL von besonderer Bedeutung. NFκB-Transkriptionsfaktoren wurden erstmals 1986 in humanen B-Zellen entdeckt⁽⁴¹⁾. In Säugetieren wurden bislang 5 Transkriptionsfaktoren der NFκB-Familie gefunden, dazu zählen RelA (p65), c-Rel, RelB, NF-κB1 (p50; p105), und NF-κB2 (p52; p100)⁽⁴²⁾. Die Faktoren p50 und p52 werden erst durch Abspaltung ihrer inhibitorisch wirkenden C-terminalen Region aus ihren zytoplasmatischen Vorläuferproteinen p105 und p100 gebildet und als Transkriptionsfaktoren aktiviert⁽⁴³⁻⁴⁶⁾. Die Prozessierung erfolgt über den Ubiquitin-Proteasom-Degradationsweg⁽⁴⁷⁾. Alle NFκB-Transkriptionsfaktoren besitzen ein hoch konserviertes Motiv am N-Terminus, welches ~300 Aminosäuren lang ist und als *Rel*-homologe Domäne bezeichnet wird⁽⁴⁶⁾. Sie enthält sowohl eine DNA-Bindungsdomäne als auch eine Dimerisierungs-Domäne und ein nukleäres Lokalisierungssignal (*nuclear localization signal*, NLS). Es besteht eine Homologie

zu dem Onkogen *v-rel* und dem *Morphogen Drosophila dorsal*. Die NFκB-Transkriptionsfaktoren sind durch die *Rel*-homologe Domäne in der Lage, untereinander Homo- oder Heterodimere zu bilden. In der ALL sind p50-Homodimere und p50-p65-Heterodimere involviert, deren konstitutive Aktivierung durch Lokalisierung dieser Faktoren im Kern nachgewiesen wurde⁽⁴⁰⁾. In gesunden, unstimulierten Zellen liegt das p50-p65-NFκB-Heterodimer im Zytoplasma vor, gebunden an IκBα ein Inhibitorprotein der IκB-Familie. Zu dieser Proteinfamilie zählen außerdem IκBβ, IκBγ, und IκBε, aber auch p100, p105 und BCL-3^(43, 44, 48, 49). Die Bindung der Inhibitorproteine an die NLS der NFκB-Proteine erfolgt über eine Folge von 5-7 repetitiven Ankyrin-Domänen, die aus je ca. 30 Aminosäuren bestehen.

In Folge einer Aktivierung z.B. durch Cytokine, TNF-α oder IL-1⁽⁵⁰⁾ wird über die IKK-Kinasen eine Phosphorylierung des IκBα vermittelt. Anschließend wird das Inhibitorprotein ubiquitiniert und über den Ubiquitin-Proteasomen-Degradationsweg abgebaut^(51, 52). Der freigesetzte NFκB-Transkriptionsfaktor transloziert in den Kern und stimuliert die Expression proliferativer, inflammatorischer und anti-apoptotische Gene⁽⁵³⁾.

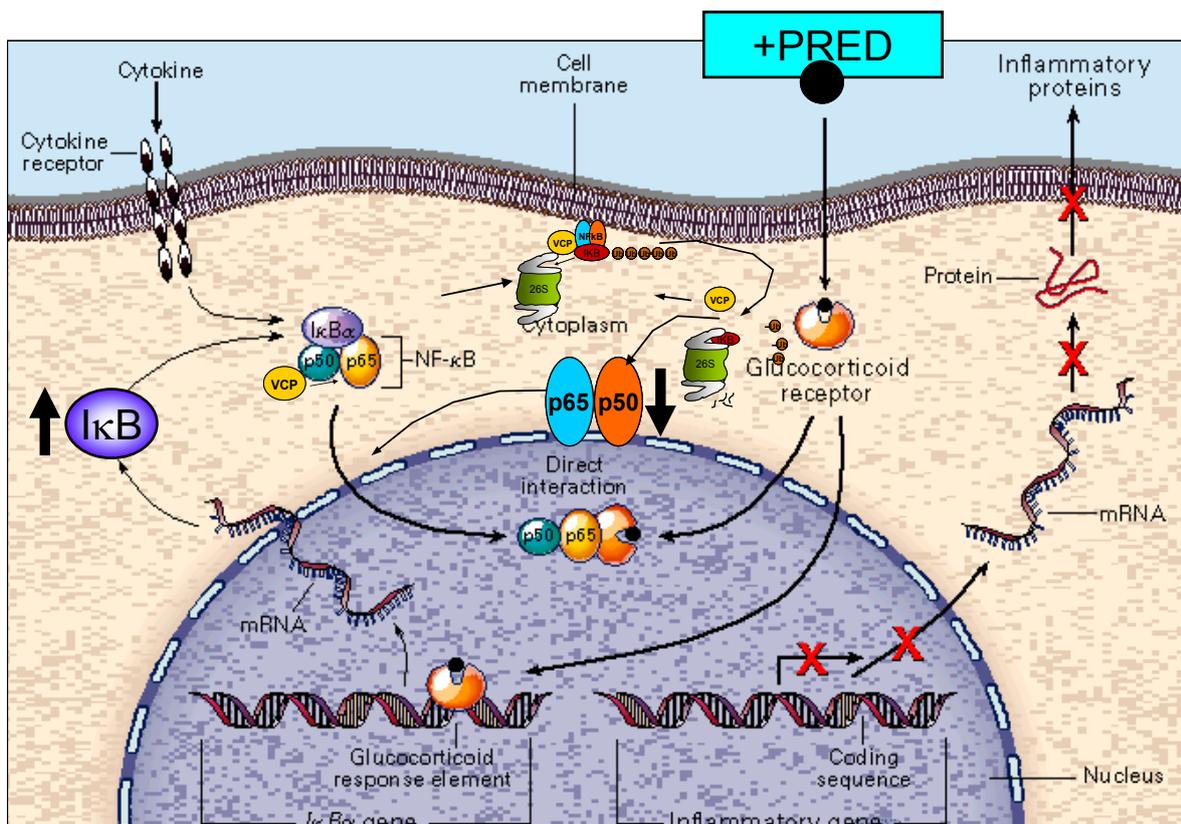


Abbildung 1-1:Schematische Darstellung der Stimulation des NFκB-Signalweges durch Glucocorticoide (Prednisolon) und der Zusammenhang mit dem Ubiquitin-Proteasom-Degradationsweg (adaptiert nach Barnes und Karin et al. 1997).

Durch die Strukturanalogie zu den körpereigenen Steroiden können Glucocorticoide Rezeptor-unabhängig ins Zellinnere diffundieren. Es wird grundsätzlich zwischen drei Wirkmechanismen unterschieden⁽⁵⁴⁾. Hierzu zählen ein vom membranständigen GC-Rezeptor abhängiger, nicht-genomischer Mechanismus und ein Rezeptor-unabhängiger nicht-

genomischer Mechanismus. Von besonderer Bedeutung für die ALL ist jedoch vor allem der Membranrezeptor-unabhängige genomische Wirkmechanismus. Bei diesem Mechanismus tritt das Glucocorticoid durch Diffusion in die Zelle ein und bindet an einen zytoplasmatischen GC-Rezeptor (GR)^(53, 55, 56) (Abbildung 1-1). Der GR wird durch die Bindung aktiviert und transloziert in den Zellkern. Dort moduliert es die Expression verschiedener durch den Transkriptionsfaktor NFκB regulierter Gene auf zwei unterschiedliche Arten⁽⁵³⁾. Die Wirkung erfolgt erstens durch direkte Interaktion mit der NFκB-Untereinheit p65 und zweitens durch Bindung an das sogenannte *GC-response Element* in der Promotorregion des *IκBα*-Gens. Durch die direkte Interaktion wird die Bindung des Transkriptionsfaktors an die Zielgene unterbunden und somit seine expressionssteigernde Wirkung verhindert. Durch die Bindung des GC-GR-Komplexes an die Promotorregion des für *IκBα* codierenden Gens wird außerdem die Expression dieses NFκB-Inhibitors angeregt. Das neu synthetisierte *IκB*-Protein bindet im Zytoplasma an bereits freigesetztes NFκB und führt zu dessen Inaktivierung. Die transkriptionelle Aktivität der NFκB-Dimere wird durch die GC-Gabe negativ beeinflusst^(57, 58). Es ist möglich, dass neben dem NFκB durch die GC-Stimulation auch weitere Transkriptionsfaktoren wie Interleukin-6 (IL-6) und das Aktivator-Protein-1 (Ap-1) reguliert werden, welche ebenfalls einen Einfluss auf die Expression immunmodulatorischer und inflammatorischer Gene besitzen.

Wie im Zusammenhang mit der GC-Resistenz bei kindlicher ALL bereits erwähnt, gibt es eine große Bandbreite an Studien zur Beantwortung der Frage, auf welche Weise die Zelltod-Induktion der Glucocorticoide in den leukämischen Blasten stattfindet. Untersuchungen belegen, dass die durch GC-Behandlung in leukämischen Zellen ausgelöste Apoptose sowohl Merkmale des intrinsischen als auch des extrinsischen Apoptose-Signalweges aufweist. Details hierzu werden in Kapitel 1.7 erläutert. Es wurde außerdem mit Hilfe von Zellkulturmodellen festgestellt, dass vor allem in GC-resistenten ALL-Zellen nicht nur Apoptose allein für das Absterben von Tumorzellen verantwortlich ist, sondern auch alternative Zelltodmechanismen wie Autophagie, Nekrose und Nekroptose eine Rolle spielen^(59, 60). Welche Art des Zelltods induziert wird, ist dabei unter anderem von der eingesetzten GC-Konzentration abhängig⁽⁶¹⁾.

1.4 Differentiell exprimierte Proteine als diagnostische Marker bei ALL

Zur Verbesserung der Risikostratifizierung von Patienten mit ALL wurde in der Vorstudie, mit Hilfe der Proteom-Analyse nach neuen prognostischen Markern gesucht. In einem Screeningansatz wurden dazu Proteom-Analysen an Knochenmarkszellen durchgeführt, die aus zwei streng nach klinischen Parametern gepaarten Kollektiven von PPR- und PGR-Patienten stammten⁽³²⁾. Im ersten Teil der Studie wurden 4 PPR-Patienten mit prä-B-ALL gegen 8 PGR-Patienten paarweise gruppiert mittels 2-D Gelelektrophorese untersucht. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden unter anderem das Valosin-containing-Protein (VCP) und die Katalase als potentielle Markerproteine identifiziert, da sie in der Gruppe der PPR Patienten verstärkt exprimiert waren. Neben den bereits genannten zählten, auch die Proteine

RING finger protein 22 alpha und *G-protein coupled receptor* (Familie C, Gruppe 5, Mitglied D (GPCR5D)) zu den überexprimierten Proteinen in der Gruppe der PPR-Patienten. Im zweiten Teil der Studie wurde die differentielle VCP-Expression mit Hilfe eines Validierungs-Kollektivs von 10 PPR-Patienten mit prä-B-ALL und 20 PGR-Patienten in einer gepaarten Studie durch Western-Blot-Analysen vergleichend untersucht⁽³²⁾. Die VCP-Überexpression in der Gruppe der PPR-Patienten konnte bestätigt werden. Genetische Marker werden bereits seit geraumer Zeit als prognostische und diagnostische Marker eingesetzt. Die ungerichtete Proteom-Analyse an Zellmaterial von Patienten mit einer bestimmten Erkrankung bietet die Möglichkeit, differenziell exprimierte Proteine zu entdecken. Wesentlich für den Einsatz als diagnostischer Marker ist jedoch die Bestätigung der Relevanz für das Auftreten eines bestimmten ALL-Subtyps. Die zellulären Funktionen, der potentiellen prognostischen Marker-Proteine VCP und Katalase werden in den folgenden Kapiteln näher erläutert.

1.5 Das *Valosin-containing protein* und der Ubiquitin-Proteasom-Degradationsweg

1.5.1 Das VCP, eine ubiquitäre ATPase mit Chaperonin-Funktion

Das in *Prednisone Poor Responder*-Patienten differentiiell exprimierte p97 oder auch *Valosin-containing protein* (VCP) ist 97 kDa groß und wurde anfänglich auch als *Transitional endoplasmic reticulum ATPase* (TERA) bezeichnet. VCP gehört zur Enzymfamilie der hoch konservierten Adenosintriphosphatasen (*ATPases Associated with various cellular Activities*, AAA-ATPasen)^(62, 63). Das für dieses Protein codierende Gen liegt im humanen Genom in der chromosomalen Region 9p12-p13⁽⁶⁴⁾. Alle ATPasen besitzen die Fähigkeit aus der Hydrolyse von ATP Energie zu gewinnen und diese für die Umgestaltung spezifischer Substrate zu verwenden⁽⁶⁵⁾. Sie teilen sich eine Reihe homologer Domänen, die für die Ausbildung der charakteristischen vorwiegend hexameren Rinstruktur der Oligomere und für die ATPase Aktivität verantwortlich sind. Einer N-terminalen Domäne von ~200 Aminosäuren, welche zur Substraterkennung und -bindung dient, folgt die sogenannte AAA-Domäne, die 200-250 Aminosäuren umfasst⁽⁶⁶⁻⁶⁹⁾. Zur Klasse I der ATPasen, welche zwei der homologen AAA-Domänen je Monomer besitzen, zählt neben dem VCP vor allem der *N-ethylmaleimide sensitive factor* (NSF)^(70, 71). Die homologen Domänen der Monomere dieser Klasse ordnen sich im Hexamer so an, dass sich zwei übereinanderliegende Ringe bilden^(68, 72).

VCP, welches ubiquitär in der Zelle vorkommt, ist je nach dem mit welchen Adapterproteinen es interagiert, in verschiedene zelluläre Prozesse involviert^(73, 74) (Abbildung 1-2). Ein Großteil der VCP-Moleküle ist im Zytosol lokalisiert, wo sie assoziiert zu den Membranen des Golgi-Apparates und des Endoplasmatischen Retikulum (ER) vorliegen. So spielt VCP eine maßgebliche Rolle bei der Aufrechterhaltung der normalen Funktion und Struktur des ER⁽⁷⁵⁾ und beim Wiederaufbau der Kern- und Golgi-Membran nach der Mitose, unter anderem durch die Zerstörung von SNARE-Proteinkomplexen (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor*, SNARE)^(63, 76-78). VCP ist außerdem in den Transport fehlgefalteter Proteine vom ER zum Ubiquitin-Proteasom-Degradationsweg eingebunden, den

sogenannten ER-assoziierten Degradationsweg (ERAD)⁽⁷⁹⁻⁸²⁾. Mit Hilfe des ERAD-Signalweges wird verhindert, dass Proteine, die durch Fehlfaltung ihre Funktion nicht erfüllen können, in den sekretorischen Signalweg gelangen und die Zellfunktion beeinträchtigen. Durch die Interaktion von VCP mit den Proteinen *ubiquitin fusion degradation 1* (Ufd1), *nuclear protein localization 4* (Npl4) und die Bereitstellung der Energie seitens der ATPase werden die aberant gefalteten Proteine aus dem ER ins Zytosol retrotransloziert^(68, 79, 83, 84). Die VCP-Interaktion mit der E3-Ligase gp78 sorgt für die Poly-Ubiquitinierung der Zielproteine⁽⁸⁵⁻⁸⁷⁾. Auch beim Transport der ubiquitinierten ER-Proteine zum Proteasom ist das Chaperon VCP von zentraler Bedeutung, indem es mit weiteren Kofaktoren und mit den Poly-Ubiquitinketten der Substratproteine interagiert^(81, 88, 89). Die Bindung des p97 erfolgt erwiesenermaßen bevorzugt an Lysin48 (K48)-verknüpfte Poly-Ubiquitinketten^(88, 90). Mit Hilfe von Ultrazentrifugation und Immunpräzipitation wurde in humanen Zellen eine Interaktion des VCP mit dem 26S Proteasom nachgewiesen⁽⁹¹⁾.

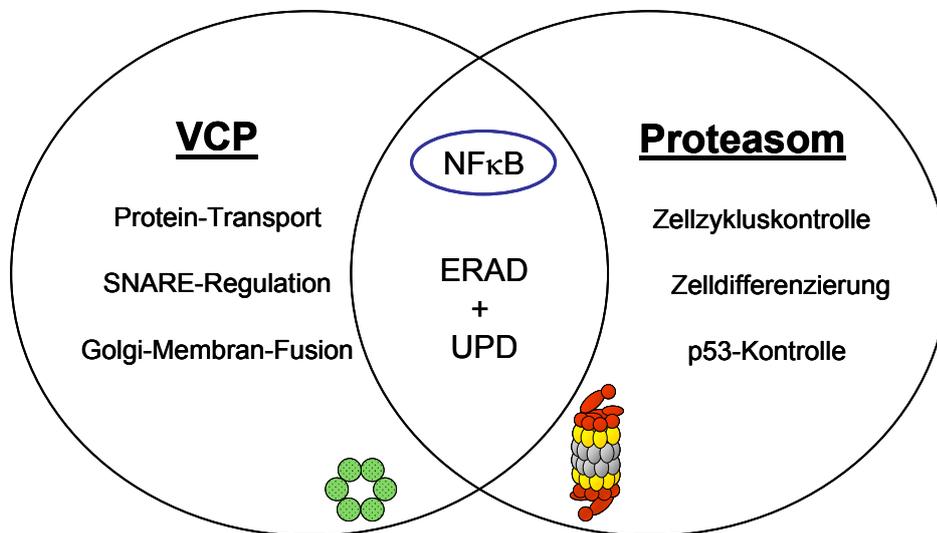


Abbildung 1-2: Interaktion des Chaperons VCP mit dem 26S-Proteasom

VCP ist neben der Degradation von ER-Proteinen auch in den Abbau zahlreicher zytosolischer Proteine über den Ubiquitin-Proteasom-Degradationsweg involviert, insbesondere des $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ ^(79, 88, 91, 92). Die Bindung an die Zielproteine erfolgt auch hier über eine direkte Interaktion der N-terminalen Domäne des VCP mit den Poly-Ubiquitinketten des Substrats^(83, 88, 90). Durch den Abbau des zytosolischen NF κ B-Inhibitormoleküls $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ mit Hilfe des VCP wird der NF κ B-Signalweg entscheidend moduliert⁽⁹³⁾. Mutationsanalysen zeigten, dass ein Funktionsverlust des VCP zu einer Inhibition des Ubiquitin-Proteasom-Systems und zu einer Akkumulation ubiquitinierten Proteine führt⁽⁸⁸⁾. Auch eine Herunterregulation der VCP-Expression in HeLA-Cervixkarzinomzellen mittels RNA-Interferenz unterstrich die Relevanz für den UPS-abhängigen ERAD-Signalweg, da sie eine Akkumulation ubiquitinierten ER-abhängigen Proteine (*unfolded protein response*, UPR)⁽⁸⁰⁾ und einer extremen Vakuolisierung der induzierten Zellen nach sich zog⁽⁷⁵⁾. In der Studie wurde jedoch nicht für alle getesteten ER-abhängigen Proteine eine Akkumulation nachgewiesen. Außerdem wurde auch keine zytoplasmatische Akkumulation von Proteinen (*cytoplasmic protein response*, CPR) detektiert, wie sie für die Inhibition des Proteasoms

charakteristisch ist⁽⁸⁰⁾. Des Weiteren erzeugte dieser Einsatz von RNA-Interferenz gegen VCP eine Regulation 30 verschiedener Gene, die bei der zellulären Stressantwort und bei der Apoptose eine Rolle spielen. Eine VCP-Überexpression ist in vielen Krebserkrankungen assoziiert mit fortschreitendem Tumorwachstum und einer schlechten Prognose⁽⁹³⁻¹⁰¹⁾. Es ist jedoch bislang ungeklärt, ob die VCP-Überexpression ursächlich an der Ausprägung dieser Erkrankungen beteiligt oder als nachgeschalteter Effekt zu betrachten ist.

1.5.2 Das Proteasom, Zentrum des Ubiquitin-Proteasom-Degradationsweges

Die letzte Station der meisten Proteine, die in eukaryotischen Zellen selektiv abgebaut werden, ist das 26S Proteasom. Es bildet das Zentrum eines als Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) oder Ubiquitin-Proteasom-Degradationsweg (UPD) bezeichneten Signalweges⁽¹⁰²⁻¹⁰⁴⁾. Jede eukaryotische Zelle besitzt etwa 30 000 Stück der hochmolekularen Multi-Enzymkomplexe, die in den 1980er Jahren unabhängig voneinander, von den Gruppen um A. L. Goldberg und M. C. Rechsteiner entdeckt⁽¹⁰⁵⁻¹⁰⁸⁾. Vollständige Proteasomen besitzen einen Sedimentationkoeffizienten von 26 Svedbergeinheiten (S), sie sind sowohl im nukleären als auch im zytosolischen Kompartiment der Zellen zu finden und machen bis zu 1 % des Gesamtgehaltes an löslichen Proteinen in der Zelle aus^(105, 109, 110). Vollständige 26S Proteasomkomplexe bestehen aus einem hoch konservierten, zylindrischen 20S Kernkomplex, dem 20S Proteasom und ein bis zwei regulatorischen 19S Partikel (19S Proteasom)⁽¹¹¹⁾, welche die Enden des proteolytisch aktiven Kernkomplexes verschließen.

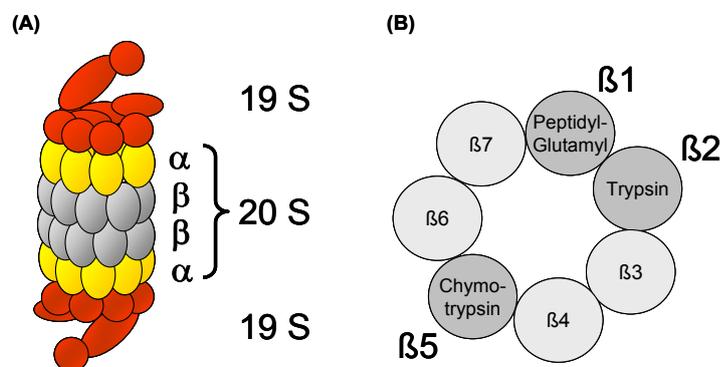


Abbildung 1-3: Bestandteile des 26S Proteasoms und Lage der proteolytisch aktiven Zentren der β -Ringe. (A) Das 26S-Proteasom besteht aus einem 20S-Kernkomplex und ein bis zwei regulatorischen 19S-Partikeln, die die Enden des aktiven Kernkomplexes verschließen und zur Erkennung und Entfaltung der Substrate dienen. (B) Aufbau der β -Ringe im Zentrum des Proteasoms. Sie vermitteln mit ihren aktiven Zentren die proteolytische Aktivität des Kernkomplexes (adaptiert nach Adams et al., 2004)⁽¹¹²⁾.

19S Proteasomen bestehen ihrerseits aus insgesamt 18 Untereinheiten^(113, 114) und besitzen eine Masse von ca. 2,5 MDa⁽¹¹⁵⁾. Es handelt sich bei diesen 19S Partikeln um außergewöhnliche AAA-ATPase-Komplexe, in denen sich jeweils ein aus 6 ATPasen und 3 nicht-ATPase-Untereinheiten bestehender basaler Subkomplex mit einem Deckel-Subkomplex aus 8 nicht-ATPasen zu einer funktionellen Einheit verbinden^(115, 116). Der ringförmig gebaute, basale Subkomplex stellt die Verbindung mit dem 20S Kernkomplex her, was zur proteolytischen Aktivierung des Gesamtkomplexes führt^(114, 116). Die Funktionen des

19S-Partikels beruhen einerseits auf der durch ATP-Hydrolyse freiwerdenden Energie durch die ATPasen an der Basis des 19S-Partikels. Andererseits basieren sie auf der Fähigkeit des Deckel-Subkomplexes diejenigen Proteine zu erkennen, die eine K48-verknüpfte Poly-Ubiquitinkette tragen, sie zu binden, zu deubiquitinieren, zu entfalten und sie in den Tunnel des 20S Kernkomplexes zu schleusen⁽¹¹⁶⁻¹²¹⁾. Während die Ubiquitinmoleküle direkt ins Zytosol zurück transportiert werden⁽¹¹⁶⁾, werden die Zielproteine im Kernkomplex mit Hilfe proteolytisch aktiver Zentren zu kleinen Polypeptiden von 3-25 Aminosäuren abgebaut⁽¹²²⁾. So stehen die grundlegenden Bausteine für die Proteinbiosynthese schnell wieder zur Verfügung und eine aus der Akkumulation fehlgefalteter Proteine resultierende zelluläre Stressantwort wird vermieden. Neben dem 19S Komplex ist der 11S Komplex (auch PA28) ein weiterer möglicher Bindungspartner des 20S Proteasoms⁽¹²³⁾. Die Bindung mit PA28 ist ATP-unabhängig und anders als beim 26S Proteasom werden von dem PA28-20S Komplex nur Peptide, aber keine intakten Proteine gespalten.

Neben Sequenzanalysen belegten vor allem Röntgenstrukturanalysen und elektronenmikroskopische Studien, dass das 20S Proteasom hoch konserviert ist⁽¹²⁴⁻¹²⁷⁾. Die tunnelförmige Struktur des Kernkomplexes entsteht durch die Zusammenlagerung von vier Ringen, aus je sieben verschiedenen Untereinheiten⁽¹²⁸⁻¹³¹⁾. Die Untereinheiten der beiden näher zu den Tunnelenden liegenden, äußeren Ringe werden als α -Untereinheiten und die der beiden inneren als β -Untereinheiten bezeichnet. Jeder β -Ring besitzt drei verschiedene proteolytisch aktive Zentren, die ins Innere des Tunnels gerichtet sind. Proteasomen zählen zu den N-terminalen nucleophilen Hydrolasen, da in diesen Zentren Threonine sitzen, die als N-terminale aktive Nucleophile agieren^(125, 126, 132, 133). Entsprechend der Spaltpräferenzen der proteolytisch aktiven Zentren wird zwischen Chymotrypsin-artigen, Trypsin-artigen und Peptidyl-glutamyl-hydrolysierenden (Caspase-ähnlichen) Aktivitäten unterschieden^(122, 134-136).

Die zweite essentielle Komponente des UPS ist die Ubiquitinierung, welche eine reversible post-translationalen Proteinmodifikation darstellt. Zwar wird die Ubiquitinierung auch in anderen zellulären Prozessen zur Markierung verwendet, aber ihre am besten charakterisierte Rolle ist es den zielgerichteten, proteolytischen Abbau von Proteinen zu steuern. Die für den Abbau vorgesehenen Proteine werden dabei mit einem Ubiquitinmolekül isopeptidisch verknüpft. Die Bindung mindestens drei weiterer Ubiquitineinheiten an dieses erste Molekül führt zur Bildung einer Poly-Ubiquitinkette und bewirkt, dass das Zielprotein vom 26S Proteasom spezifisch erkannt und degradiert werden kann^(137, 138). Entscheidend für die Erkennung durch das Proteasom ist es, dass die Verknüpfung der Ubiquitin-Einheiten jeweils über das Lysin (K) an Position 48 der Aminosäuresequenz des ersten Moleküls, mit dem Glycin (G) an Position 76 des darauffolgenden erfolgt. Der Verknüpfungsprozess erfolgt in drei Schritten über eine hierarchisch geordnete Reaktionskette, mit Hilfe von Ubiquitin aktivierenden, konjugierenden und ligierenden Enzymen E1, E2 und E3^(103, 104). Andere Formen der Ubiquitinierung wie die K63-Ubiquitinierung des I κ B-Kinase-Komplexes, induzieren nicht den Abbau, sondern nur eine Modulation der Proteinfunktion^(139, 140). Der intrazelluläre Transport der ubiquitinierten Proteine erfolgt meist durch Chaperone wie die Hitzeschockproteine oder Chaperonine wie das VCP.

Das Ubiquitin-Proteasom-System ist der wichtigste extralysosomale Proteinabbau-mechanismus in eukaryotischen Zellen, es ist für den Abbau zahlreicher Proteine verantwortlich und erfüllt eine Vielzahl von unterschiedlichen Aufgaben^(141, 142). Hierzu zählt vor allem der Abbau abnormaler und fehlgefalteter Proteine aus dem Zytosol und dem Endoplasmatischen Retikulum (ER). In Abhängigkeit zur Zellumgebung und dem Proliferationsstatus werden aber auch zelluläre Prozesse wie Zellzyklus, Differenzierung oder Proliferation beeinflusst, indem beteiligte Proteine degradiert werden. Zu den Substraten des UPS zählen Tumorsuppressorproteinen wie p53⁽¹⁴³⁾, Zellzyklusproteinen wie Cycline und cyclin-abhängige Kinasen (p21, p27)^(144, 145) sowie Transkriptionsfaktoren (p105)⁽¹⁴⁶⁾ und deren Inhibitoren (IκB)⁽⁹¹⁾. Einige der Vorgänge, in die das UPS involviert ist, weisen eine deutliche Überschneidung mit denjenigen Prozessen auf, in die das VCP involviert ist, vergleiche dazu Abbildung 1-2. Unterbrechung des Ubiquitin-Proteasom-Signalweges durch Einsatz des spezifischen Proteasominhibitors Bortezomib

Das Proteasom und das UPS stellen aufgrund ihrer zentralen Rolle bei der Regulation von Zellzyklus, Differenzierung und Apoptose ein wichtiges Ziel für therapeutische Ansätze zur Behandlung entzündlicher und maligner Erkrankungen dar. Durch die Entwicklung spezifischer Inhibitoren gegen die proteolytischen Aktivitäten des Proteasoms gelang es daher nicht nur das Verständnis für den komplexen Mechanismus des UPS zu vertiefen, sondern auch neue therapeutische Möglichkeiten zu erschließen. Eine wichtige Klasse der Proteasominhibitoren stellen die Peptidboronsäuren dar. Die Vertreter dieser Klasse zeichnen sich durch hohe Selektivität und Stabilität, reversible Hemmung und relativ geringe Nebenwirkungen aus. Ein Vertreter dieser Klasse ist Bortezomib, welches unter den Namen PS-341 oder *Velcade*® besser bekannt ist. Dieser Inhibitor blockiert selektiv die Chymotrypsin-artige Aktivität des Proteasoms (Abbildung 1-3). Dies führt, anders als eine Hemmung der Trypsin- und Peptidyl-glutamylhydrolysierenden Aktivitäten, zu einer drastischen Verringerung der Proteindegradation⁽¹⁴⁷⁾. Für klinische Anwendungen ist Bortezomib von besonderem Interesse, weil es erstens weder in die durch die Blut-Hirnschranke geschützten Bereiche, noch in Hoden oder Augen vordringt⁽¹⁴⁸⁾. Zweitens tritt die maximale Proteasom-Hemmung nach intravenöser Gabe innerhalb einer Stunde ein und bereits nach 72-96 Stunden ist die Proteasom-Aktivität vollständig wiederhergestellt^(149, 150). Darüber hinaus belegte eine initialen Studie an 60 verschiedenen Tumorzelllinien, darunter auch Leukämiezelllinien, eine anti-proliferative Wirkung von 50 % verglichen zu unbehandelten Kontrollen, bei der Verwendung einer Konzentration von nur 7 nM^(148, 151). Weiterführende Untersuchungen an humanen Xenograft-Modellen bestätigten die Antitumorwirkung der Substanz⁽¹⁴⁸⁾. Proteasom-Inhibition induziert nachweislich Apoptose in Tumorzellen, während es nur einen geringen Einfluss auf Nicht-Tumorzellen ausübt^(112, 152, 153). Eine der wichtigsten Konsequenzen der Proteasom-Hemmung mittels Bortezomib für die Therapie ist die induzierbare Blockierung des Transkriptionsfaktors NFκB, welcher in vielen neoplastischen und inflammatorischen Erkrankungen konstitutiv aktiv ist⁽⁵³⁾. Das Proteasom ist auf zweierlei Arten relevant für die NFκB-Aktivierung, erstens durch die Teildegradation des NFκB-Vorläuferproteins p105 zum aktiven p50 und zweitens durch den Abbau des Inhibitorproteins IκBα^(47, 53).

Der Proteasominhibitor MG132 bewirkte in der Prostatakarzinomzelllinie PC-3, die eine konstitutive NFκB-Aktivierung aufweist, sowohl die Anregung der IκB-Expression als auch eine Translokation des Inhibitors in den Kern⁽¹⁵⁴⁾. Die Ergänzung von Bortezomib zur herkömmlichen Therapie von Patienten, die an Multiplem Myelom erkrankt sind, hat mit tolerierbarer Toxizität nachweislich zu einer deutlichen Verbesserung der Therapieergebnisse geführt^(155, 156). Nach ersten positiven Einzelfallbeobachtungen zur Therapie von refraktärer kindlicher ALL wurde Bortezomib auch erfolgreich in Phase I Studien zur Behandlung von Rezidivfällen kindlicher ALL eingesetzt^(157, 158). Wegen der akzeptablen Toxizität wird es inzwischen auch in klinischen Studien der Phase II getestet. Detaillierte Informationen zu diesen Studien (NCT00440726 und NCT00873093) sind unter <http://clinicaltrials.gov>, im Internet zu finden.

1.5.3 Abbau fehlgefalteter Proteine über den ER-assoziierten Degradationsweg (ERAD)

Die Akkumulation fehlgefalteter Proteine im Lumen des ER stellt für die lebende Zelle eine Bedrohung dar, da die normalen ER-Funktionen stark beeinträchtigt werden, was unter Umständen zum Kollaps der gesamten Zelle führt. Der ER-assoziierten Degradationsweg (ERAD) ist Bestandteil eines als *Unfolded Protein Response* (UPR) bezeichneten Mechanismus, mit dem die Zelle versucht, den ER-Stress zu verringern und so dem Zelltod zu entgehen. Zhang und Kaufman⁽¹⁵⁹⁾ geben einen umfassenden Überblick über diesen Prozess, dessen Deregulation eine Mitursache für eine Vielzahl von Erkrankungen darstellt. Die UPR umfasst initial die transkriptionelle Stimulation spezifischer UPR-Gene, die Translation neuer Proteine wird vermindert und die ER-assoziierte Degradation von Proteinen erhöht^(160, 161). Das komplexe Netzwerk der zellulären Antwort auf ER-Stress wird von den drei ER-Transmembranproteinen IRE1, PERK und ATF6 reguliert⁽¹⁶²⁾. Als spezifische zelluläre Marker für ER-Stress in humanen Zellen gelten vor allem die Ausschüttung von Kalziumionen durch das ER, die Induktion der Transkriptionsfaktoren GADD 34 und GADD 153 auch bekannt als CHOP sowie die Aktivierung der Caspase-12^(161, 163).

Im Verlauf der Proteinbiosynthese werden sekretorische Proteine als lineare Polypeptide über das Sec61 Translokon in das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) importiert⁽¹⁶⁴⁾. Hier werden sie mit Hilfe in energieabhängigen Prozessen gefaltet, zusammengebaut und durch Anheftung eines speziellen Oligosaccharids glykosiliert, bevor sie mit Hilfe von Vesikeln zum Golgi-Apparat transportiert werden. Dieser Prozess wird von einer Reihe von Enzymen begleitet, unterstützt und kontrolliert. Dazu gehören u.a. Chaperone, Co-Chaperone, Redox-Enzyme, Protein-Disulfid-Isomerasen, Glykan-prozessierende Enzyme und Lektine⁽¹⁶⁵⁻¹⁶⁷⁾. Nur korrekt gefaltete und glykosilierte Proteine werden vollständig sezerniert und gelangen zum Golgi-Apparat, von wo aus sie an ihre Bestimmungsorte verteilt werden. Fehlgefaltete Proteine werden von einer im ER-Lumen vorkommenden Glycosyltransferase erkannt und mit einem zusätzlichen Glucoserest versehen. Diese Markierung wird von den Lektinen erkannt und das Protein wird, anders als die korrekt gefalteten, mit Hilfe des Sec61-Translokons aus dem ER ins Zytosol exportiert und dem ERAD zugeführt. Die wichtigsten an der Protein-Retranslokation ins Zytoplasma beteiligten, Proteine sind VCP, Ufd1 und Npl4,

wobei die ATPase den Energiebedarf deckt^(68, 79, 83, 84) und für die Ubiquitinierung der Zielproteine sorgt^(85, 86). Außerdem eskortiert VCP die ubiquitinierten ER-Proteine zum 26S Proteasom^(81, 88, 89) (vergleiche Kapitel 1.5.1). Dort werden die Zielproteine spezifisch erkannt und degradiert, während die Ubiquitinmoleküle direkt ins Zytosol zurück transportiert werden^(116, 122, 137, 138).

Mutationsanalysen einzelner UPS-Komponenten belegten eine funktionelle Relevanz des Degradationsweges für die UPR, indem eine Induktion ER-Stress assoziierter und apoptotischer Gene nachgewiesen wurde⁽¹⁶⁸⁾. Dies wurde später durch spezifische MG132 vermittelte Proteasom-Hemmung bestätigt, da sie in einer erhöhten Apoptoserate und einer massiven Komplexbildung im centrosomalen Bereich des Zytosols resultierte^(152, 169-171). Eine Analyse der gebildeten Proteinkomplexe, der so genannten Aggreasomen, zeigte, dass neben ubiquitinierten Proteinen vor allem Chaperone, Proteasomenpartikel und andere Bestandteile des UPS enthalten waren^(169, 172, 173). Interessanterweise erzeugten andere ER-Stress-auslösenden Substanzen wie Tunicamycin oder Brefeldin-A keine Proteinaggregation. Eine Studie an HeLa-Cervixkarzinomzellen bestätigte, dass eine zusätzliche RNAi-vermittelte Herunterregulation des VCP-Chaperons ebenfalls eine erhöhte Apoptoserate induzierte^(75, 80). Verglichen mit der Proteasom-Inhibition allein, kam es jedoch zu einer disperseren Protein-Aggregation im Zytosol. Außerdem wurde trotz Vakuolisierung der ER-Lumen keine Akkumulation ubiquitiniertes Proteine im ER festgestellt.

1.6 Katalase, ein Enzym mit anti-oxidativer Schutzfunktion

Ein weiteres Protein, welches ebenfalls in der Vorstudie zu dieser Arbeit als differentiell exprimiert beschrieben wurde, ist das Enzym Katalase⁽³²⁾. Ebenso wie die anderen in der Gruppe der PPR-Patienten als überexprimiert gefundenen Proteine, wurde auch die Katalase bereits im Zusammenhang mit Neoplasien beschrieben^(174, 175).

Die Monomere dieses Enzyms sind ca. 60 kDa groß und tragen eine Häm-Gruppe. Aktive Katalasen liegen jedoch als Homotetramere vor. Das Enzym katalysiert die Abbaureaktion von hochreaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) zu Wasser und Sauerstoff⁽¹⁷⁶⁾. In Säugetieren findet diese katalytische Reaktion meist räumlich getrennt vom Zytosol in den Peroxisomen statt, bei einem optimalen pH-Wert von 7. Zu den ROS zählen Sauerstoffverbindungen, die ungepaarte Elektronen enthalten. Sie werden als Beiprodukte der mitochondrialen Atmungskette kontinuierlich neu gebildet und sind sehr toxisch^(177, 178). Dies ist darauf zurückzuführen, dass sie in der Lage sind, alle zellulären Hauptbestandteile wie Lipide, Proteine und DNA zu oxidieren und folglich die Struktur und Funktion der Zelle zu schädigen⁽¹⁷⁹⁻¹⁸¹⁾. Zahlreiche Studien demonstrieren, dass intrazelluläre ROS zu einer NFκB-Aktivierung führen⁽¹⁸²⁻¹⁸⁵⁾. Zu den Antioxidantien mit deren Hilfe Zellen das ROS-Niveau tolerierbar niedrig halten, gehört neben der Katalase vor allem die Superoxid-Dismutase⁽¹⁸⁶⁾. Ein wichtiger Beitrag zur Aufklärung alternativer Zelltodmechanismen war die Feststellung, dass die Akkumulation von ROS während des autophagischen Zelltodmechanismus darauf zurückzuführen ist, dass Katalase selektiv abgebaut wird⁽¹⁸⁷⁾.

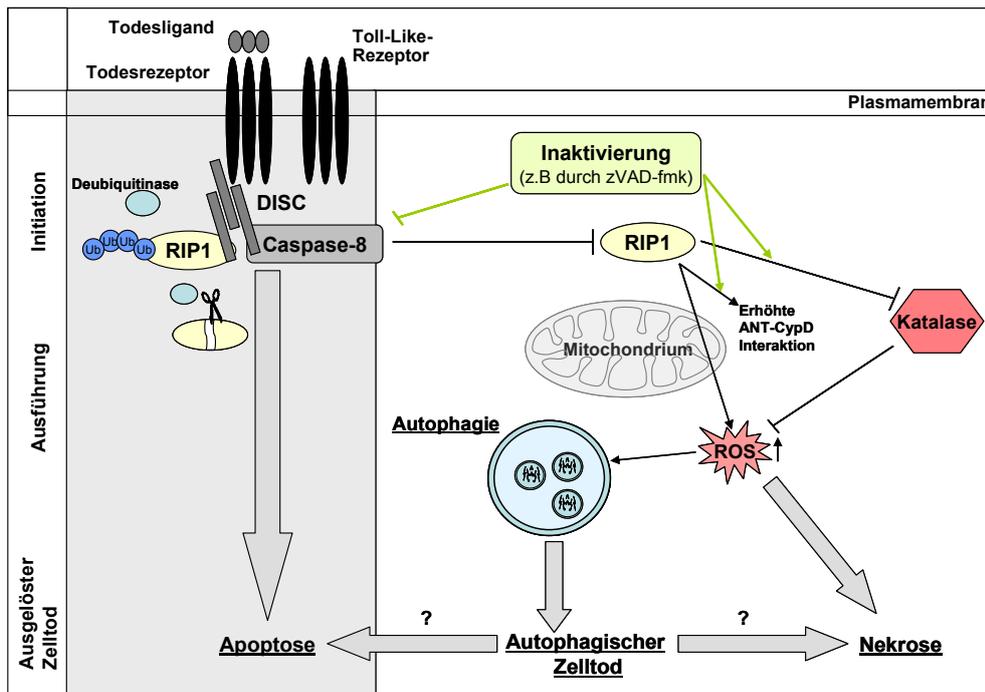


Abbildung 1-4: Zusammenhang zwischen Katalase-Expression und Zelltod-Induktion (adaptiert nach Vandenamee et al., 2006). Eine Inhibition der Caspase-8-vermittelten Apoptose mit Hilfe des Breitband-Caspase-Inhibitors zVAD-fmk führt zu einer Aktivierung der RIP1-vermittelten alternativen Zelltodmechanismen Autophagie-abhängiger Zelltod und Nekrose⁽¹⁸⁸⁾. Der Inhibitor verhindert zusätzlich die Katalase-Degradation was zu einer ROS-Akkumulation führt⁽¹⁸⁷⁾. Darüber hinaus und vermindert zVAD-fmk die Interaktion von ANT und Cyclophilin-D (CypD)⁽¹⁸⁹⁾.

So führte eine Inhibition der Caspase-8, welche den extrinsischen Apoptosemechanismus vermittelt, erst zur Katalase-Degradation und in Folge dessen zu einem enormen Anstieg der ROS-Akkumulation, einer Peroxidation von Membranproteinen und letztendlich zu einem Zelltod, der jedoch keine apoptotischen Merkmale aufweist. Alternative Zelltodmechanismen wie der autophagische Zelltod sind vermutlich auch bei den Prozessen von Bedeutung, die der GC-Resistenz zugrundeliegen. Deshalb werden die Auslöser und Zusammenhänge dieser Mechanismen im folgenden Abschnitt näher erläutert.

1.7 Apoptose und alternative Zelltodmechanismen

Die komplexe molekulare Wirkungsweise der Glucocorticoide auf Zellen eine Rolle wurde noch nicht abschließend geklärt. In ALL-Zellen induziert die Behandlung jedoch vorwiegend den programmierten Zelltod, die sogenannten Apoptose. GC-vermittelte Apoptose weist in nicht-resistenten leukämischen Zellen Merkmale des intrinsischen Apoptose-Signalweges auf^(31, 34)(Abbildung 1-5). Dazu zählen die Induktion verschiedener Proteine der BH-3-Gruppe wie Bim, Bad, Noxa und Puma, die verwandt mit der BCL-2-Proteinfamilie sind. Es gibt jedoch auch Hinweise auf eine Induktion des extrinsischen Apoptose-Signalweges. Dieser wird über den Todesrezeptor vermittelt, die Aktivierung der Caspasekaskade erfolgt über die Caspase-8 und durch Involvement des Mitochondriums erfährt das Apoptose-Signal eine Verstärkung⁽¹⁹⁰⁾. Sowohl die intrinsische als auch die extrinsische andere Apoptose-Induktion resultiert in der Aktivierung der Effektor-Caspasen-3 und -7 und in der apoptotischen

PARP-1-Spaltung. Verschiedene Studien demonstrieren, dass in GC-resistenten Zellen möglicherweise eine Störung des Caspase-vermittelten Apoptose-Signalweges vorliegt und stattdessen durch GC-Gabe alternative Zelltodmechanismen ausgelöst werden⁽⁵⁹⁻⁶¹⁾.

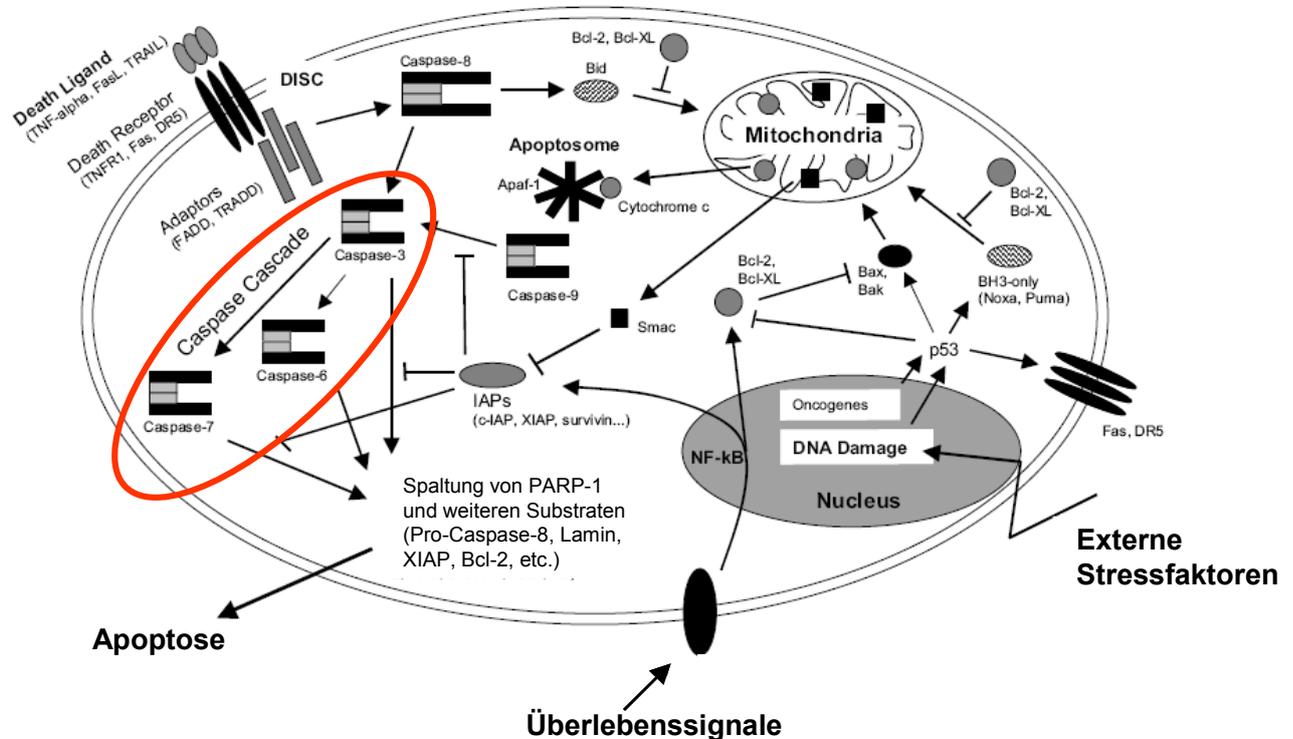


Abbildung 1-5: Schematische Darstellung der Apoptose-Signalwege (adaptiert nach A. Gewies 2004⁽¹⁹¹⁾).

Zu den an Zellkulturmodellen nachgewiesenen alternativen Zelltodmechanismen zählen Autophagie-abhängiger Zelltod, Nekrose und Nekroptose. Galt die Nekrose bislang als ungeordneter Prozess, so wurde vor allem in den letzten Jahren gezeigt, dass dieser Prozess unter bestimmten Umständen ebenfalls durch einen streng kontrollierten Mechanismus initiiert und moduliert wird⁽¹⁹²⁻¹⁹⁷⁾. Um diesem Kontrollmechanismus Rechnung zu tragen, wird in diesen Fällen von Nekroptose gesprochen^(197, 198). Die Grenzen zwischen Nekrose, programmierter Nekrose bzw. Nekroptose nehmen jedoch erst langsam Gestalt an und es ist noch unklar, inwieweit die zugrundeliegenden Mechanismen übereinstimmen⁽¹⁹⁹⁾. Durch differenzierte Studien hat sich auch das Verständnis der mit der Autophagie von Zellen verknüpften Mechanismen erheblich vertieft. Einen guten Überblick über die Vielschichtigkeit dieser regulatorischen Vorgänge geben die Autoren Vandenabeele, Kroemer, Hotchkiss und Vanden Berghe^(188, 200-203), der im folgenden Abschnitt kurz dargestellt wird. Die unterschiedlichen intrazellulären Vorgänge der Mechanismen führen sowohl auf molekularer als auch morphologischer Ebene zu charakteristischen Unterschieden. Kennzeichnend für die Apoptose sind die Kernkondensation, die Zellschrumpfung, das Abschnüren von Membranbläschen, der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials, die Aktivierung der Caspase-Kaskade, die charakteristische Spaltung der Poly-(ADP-ribose)-Polymerase-1 (PARP-1) durch die Effektor-Caspase-3 und der geordnete Abbau von DNA^(201, 204). Als spezifische Merkmale für Nekrose gelten die frühe Öffnung der Plasma-

membrankanäle für Ionen und extrazelluläre Flüssigkeiten, ein starkes Anschwellen der Zellorganellen und der gesamten Zelle, die Ruptur der Plasmamembran ebenso wie die Spaltung von PARP-1 durch die lysosomalen Cathepsine B und D^(192-195, 205-207).

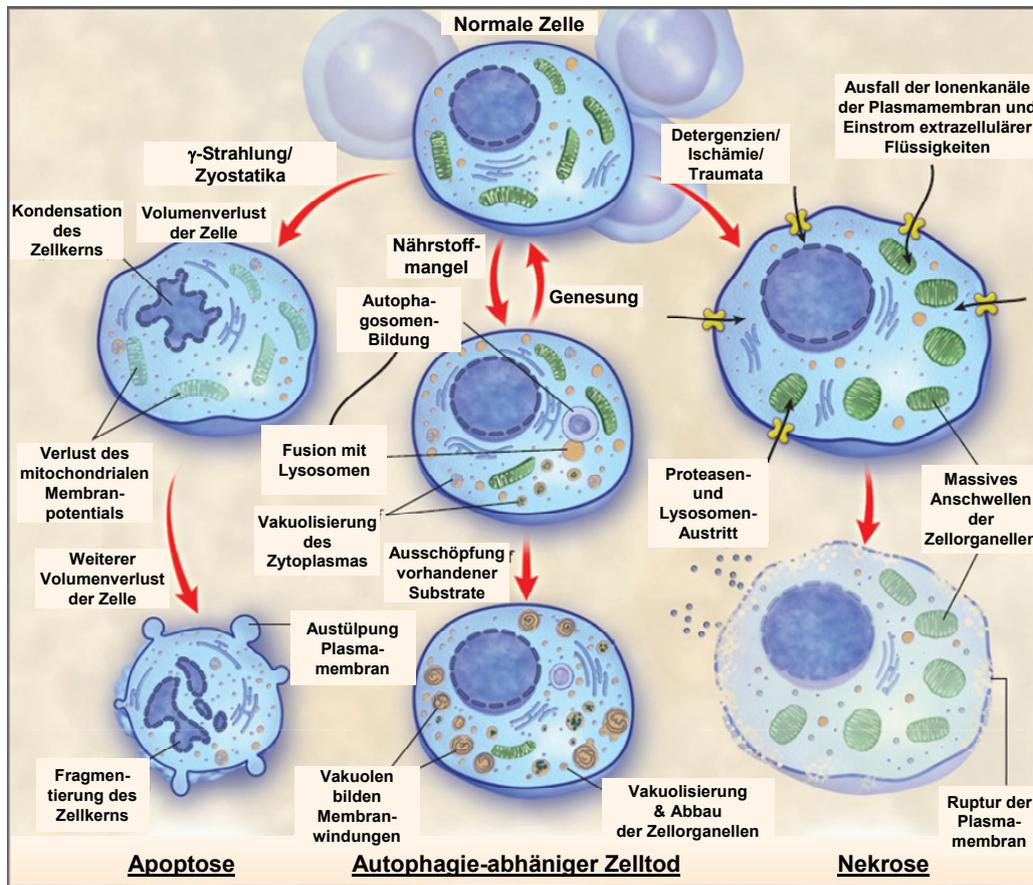


Abbildung 1-6: Zellmorphologische Veränderungen während des Fortschreitens der Zelltodmechanismen wie Apoptose, Autophagie-abhängigem Zelltod und Nekrose (adaptiert nach Hotchiss et al., 2006)⁽²⁰⁰⁾.

Es wurden außerdem Proteine identifiziert, die spezifisch in die nekroptotischen Zelltodmechanismen involviert sind und die mit dem durch den Todesrezeptor-vermittelten apoptotischen Signalweg interagieren^(179, 204). Zu diesen Proteinen zählen vor allem die Serin-Threoninkinasen RIP1 und RIP3, deren Phosphorylierungs- und Ubiquitinierungszustand dabei entscheidende Funktion besitzt^(198, 199, 208-211). Belege für die Bedeutung von RIP1 und die funktionellen Zusammenhänge wurden einerseits durch Inhibition der Caspase-vermittelten Apoptose und durch die Inhibition der Nekrose erbracht. Andererseits führte eine Zellstimulation mit Tumor-Nekrosefaktor- α (TNF), Cytokinen, dem TNF-abhängigen Todesligand (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*, TRAIL), dem Fas-Ligand (FasL) oder dem Einsatz DNA-schädigende Substanzen zu einem besseren Verständnis. Obwohl es keine generelle Übereinkunft gibt, durch welche Eigenschaften sich die Nekroptose von der Nekrose abgrenzt, wird der Begriff auf biochemischer Ebene so definiert, dass eine Inhibition des RIP1 zu einer Vermeidung dieser Art des Zelltods führt^(198, 209). Nekrose stellt eine sehr schnelle Zellantwort dar, bei der unter anderem mitochondriale ROS-Produktion und verringerte ATP-Konzentration eine Rolle spielen und die unweigerlich zum Zelltod führt⁽¹⁸⁸⁾. Währenddessen handelt es sich bei Autophagie zunächst um eine Überlebensstrategie. Sie

blockiert ein Fortschreiten der Nekrose, indem Teile des Zytoplasmas und der Zellorganellen in Vakuolen verpackt werden, um die Zelle vor toxischen Bestandteilen zu schützen^(212, 213). Gelingt der Abbau der unbrauchbaren und schädlichen Zellbestandteile schließlich in den Autophagosomen mit Hilfe lysosomaler Enzyme, so überlebt die Zelle⁽²¹³⁾. Bei Nährstoffmangel dient der enzymatische Abbau von Zellorganellen zur Wiedergewinnung zellulärer Bausteine. Gelingt dies nicht, so stirbt die Zelle ab, was als autophagischer Zelltod oder Autophagie-abhängiger Zelltod bezeichnet wird. Ein spezifischer Marker für die Autophagosomenbildung ist das Mikrotubuli-assoziierte Leichtkette-3-Protein (*microtubule-associated protein light chain 3, LC3*)⁽²¹⁴⁾. Dieser Prozess geht anders als die Apoptose nicht mit einer Chromatin-Kondensation einher und es besteht auch kein Kontakt zu Phagozyten. Es kommt allerdings zu einer enormen Vakuolisierung der Zellen^(201, 204, 215, 216). Kürzlich wurde von Bonapace et al. ein Absterben von Jurkat-Zellen durch Autophagie-abhängige Nekroptose beschrieben, da unter anderem sowohl LC3 als auch RIP1 in den induzierten Zelltodmechanismus involviert waren⁽⁶⁰⁾. Durch den Einsatz eines Antagonisten der BCL-2-Familie, Obatoclax, wurden die GC-resistenten Jurkat-Zellen, welche eine defekte mitochondriale Apoptose besitzen, für die Steroidbehandlung resensibilisiert. Es wurde damit jedoch keine Apoptose ausgelöst. Die Charakterisierung der molekularen Zusammenhänge und die Identifizierung der Auslöser für diese alternativen Zelltodmechanismen sind noch unvollständig. Die Indizien legen jedoch nahe, dass die Aufklärung der zugrundeliegenden Kontrollmechanismen für das Verständnis und die Überwindung mit der GC-Resistenz von besonderer Bedeutung ist.

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Die in den *Prednisone-Poor-Responder*-Patienten verstärkt exprimierte ATPase VCP, besitzt im Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) eine Schlüsselposition und greift über den Abbau des I κ B α auch in die Regulation des NF κ B-Signalweges ein. Für die Mehrheit der ALL Patienten wurde in den leukämischen Blasten eine konstitutive Aktivierung des NF κ B festgestellt, welche sich möglicherweise auf eine Deregulation des UPS zurückführen lässt. Zur Untersuchung der funktionellen Relevanz des UPS und des assoziierten VCP sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein Zellkulturmodell etabliert werden. GC-resistente ALL-Zellen sollten zur Klärung der molekularen Mechanismen eingesetzt werden. Im Fokus der Untersuchungen sollten die prä-B-ALL-Zelllinien MHH-cALL-2, und -3 stehen, da zu ihnen zahlreiche klinische Informationen sowie die GC-Sensitivität der Patienten bekannt sind.

Aus den Vorstudien wurde eine Beteiligung der Proteasom-assoziierten Signalwege abgeleitet. Die Proteasom-Inhibition durch den spezifischen Proteasom-Inhibitor Bortezomib ermöglicht eine spezifische Unterbrechung des UPS. Anhand des Modellsystems sollte überprüft werden, ob durch eine solche Modulation auch eine Regulation des I κ B α und damit des NF κ B-Signalweges möglich ist. Des Weiteren sollte die pro-apoptotische und anti-proliferative Wirkung des Bortezomibs auf ALL-Zelllinien getestet werden. Um insbesondere die funktionelle Relevanz der VCP-Überexpression zu untersuchen, sollte außerdem eine siRNA-vermittelte Verminderung der VCP-Expression etabliert und auf ihre Konsequenzen getestet werden.

Weiterhin sollte mit Hilfe des etablierten zellbiologischen Systems überprüft werden, ob es auch einen funktionellen Zusammenhang zwischen der in den PPR-Patienten differentiell exprimierten Katalase und der GC-Resistenz gibt. Darüber hinaus sollten die in den Vorstudien gefundenen Markerproteine an einem Patientenkollektiv validiert werden.

Kinder mit ALL, die eine *Prednisone-Poor-Response* aufweisen oder aufgrund anderer diagnostischer Befunde der HR-Gruppe zugeordnet werden, haben in der Regel eine sehr schlechte Prognose. Sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein funktioneller Zusammenhang zwischen dem differentiell exprimierten VCP, dem UPS und der GC-Resistenz bei kindlicher ALL nachgewiesen werden, so wäre dies aus zwei Gründen von großer Bedeutung. Einerseits würde dies eine neue, aus den zellbiologischen Mechanismen abgeleitete Option für die Risikostratifizierung darstellen. Andererseits würden neue Möglichkeiten zur Entwicklung alternativer Therapiestrategien eröffnet. Dieses wäre insbesondere für die ALL-Patienten bedeutsam, die ein sehr schlechtes Therapieansprechen und besonders hohes Gesamtrisiko aufweisen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelllinien und Kulturbedingungen

Für die *in vitro* Experimente wurden hauptsächlich die beiden humanen prä-B-ALL-Zelllinien (*B-Zell-precursor ALL*), MHH-cALL-2 und -3 verwendet. Da diese Zelllinien in der Kinderklinik der Medizinischen Hochschule Hannover etabliert wurden, ist neben umfangreichen Diagnosedaten der Patienten auch ihre *Prednisone-Response* an Tag 8 bekannt. Die MHH-cALL-2 stammt von einem Patienten mit einer schlechten *Prednisone-Response* (PPR) die MHH-cALL-3 stammt dagegen von einem Patienten mit einer guten *Prednisone-Response*. Für einige Experimente wurden außerdem die Zelllinien MHHcALL-4, REH, Jurkat, SD-1 und SUP-B15 untersucht. Bezugsquellen, Referenzdaten und Eigenschaften der Zelllinien sind in der Tabelle 6-1, im Anhang zusammengefasst. Alle Zelllinien wurden unter Standardbedingungen in einem wasserdampfgesättigten Inkubator bei 37° C und 5 % CO₂-Begasung kultiviert. Als Kultivierungsmedium diente das in Tabelle 2-2 beschriebene Zellkulturmedium.

Durch grundlegende Zellkulturexperimente mit verschiedenen Prednisolon-Konzentrationen, in Form von Prednisolon-21-hydrogensuccinat (Solu-DecortinH®, Merck Serono GmbH), wurde der Nachweis erbracht, dass diese auch *in vitro* eine unterschiedliche Glucocorticoid-Sensitivität besitzen, die der der initialen *Prednisone-Response* der Patienten entspricht. Sie sind daher als Modell für die Untersuchung der molekularen Vorgänge nach Stimulation mit Prednisolon sehr gut geeignet. Obwohl die Zelllinie MHH-cALL-2 schwächer auf Prednisolon-Behandlung anspricht, als die MHH-cALL-3 Zelllinie, so liegen die Konzentrationen, mit denen man eine Reduktion der Vitalität um 50 % erreichen kann, doch relativ nahe beieinander.

2.1.2 Verwendetes Patientenkollektiv zur Analyse mononukleärer Zellen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden kryokonservierte, mononukleäre Knochenmarkszellen einer Gruppe von 5 Patientenpaaren aus der ALL-BFM-2000-Studie untersucht. Es handelte sich um Patienten, die aufgrund folgender Kriterien ausgewählt worden waren: Alter zum Zeitpunkt der Diagnose, Geschlecht, und GC-Sensitivität (*Prednisone Response* an Tag 8, PPR/PGR). Die Blastenzahl der ausgewählten Proben betrug jeweils mehr als 90%. Die Analysen zur Expression der Zielgene *VCP* und *Katalase* der Proben je Paar erfolgten parallel.

Tabelle 2-1: Klinische Informationen zu den untersuchten Patienten

Patient	Paar	Leukämische Blasten					Leukozyten		
		Tag 0			Tag 8		Tag 0	Tag 8	
		KM [%]	PB [%]	PB abs.	PB [%]	PB abs.	Response	PB abs.	PB abs.
1	1	94	63	18900	25	2675	PPR	30000	10700
2	2	96	82	16072	31	1178	PPR	19600	3800
3	3	95	89	51202	67	6311	PPR	57530	9490
4	4	96	78	10920	59	2478	PPR	14000	4200
5	5	99	85	69700	61	5466	PPR	82000	8960
6	1	96	84	30240	13	299	PGR	36000	2300
7	2	97	82	32472	9	306	PGR	39600	3400
8	3	97	73	31171	4	92	PGR	42700	2300
9	4	98	54	6156	0	0	PGR	11400	2800
10	5	99	91	73801	55	880	PGR	81100	1600

2.2 Verwendete Lösungen, Kits, Antikörper und Geräte

Tabelle 2-2: Lösungen

<u>Bezeichnung</u>	<u>Bestandteile</u>
Zellkulturmedium	RPMI 1640-Medium 10 % FKS 1% Penicillin-Streptomycin 1% Glutamin
Serumfreies Medium für die Elektroporation	Zellkulturmedium ohne FKS
PBS nach Dulbecco (pH 7,4)	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 1,76 mM KH ₂ PO ₄ bidestilliertes Wasser
RIPA-Puffer	10 mM Tris HCl (pH 7,5) 150 mM Natriumchlorid 1 mM EDTA 0,5 % NP-40 0,1 % SDS 0,5 % Natriumdesoxycholat

Fortsetzung Tabelle 2-2: Lösungen

Bezeichnung	Bestandteile
Lysis-Puffer	89 % RIPA-Puffer 1 % Proteinaseinhibitoren 1 % Phosphataseinhibitoren
PBST-Puffer (PBS-0,05%-Tween) (pH 7,5)	0,05 % [v/v] Tween20 PBS
10x Blotting Puffer (pH 8,3-8,6)	25 mM Tris 150 mM Glycin bidestilliertes Wasser
1x Blotting Puffer	10 % 10x Blotting Puffer 10 % Methanol bidestilliertes Wasser
Tris HCl, 1 M (pH 6,8) und (pH 7,5)	1 M Tris bidestilliertes Wasser -HCl, zur Einstellung des pH-Wertes
Tris HCl, 1,5 M (pH 8,8)	1,5 M Tris bidestilliertes Wasser -NaOH, zur Einstellung des pH-Wertes
Ponceau-Färbelösung	0,1 % Ponceau 5 % Eisessig bidestilliertes Wasser
Coomassie-Färbelösung	25 % Isopropanol [v/v] 10 % Essigsäure [v/v] 0,1 % Coomassie Brilliant Blue G [w/v] bidestilliertes Wasser

Fortsetzung Tabelle 2-2: Lösungen

Bezeichnung	Bestandteile
200 mM NH ₄ Cl/PBS-Lösung (pH 7,2)	200 mM NH ₄ Cl 1x PBS
0,5 % Triton-X-100-PBS-Lösung, (pH 7,2)	0,5 % [v/v] Triton-X-100-Lösung 1x PBS
2% PFA-Lösung (pH 7,2)	2% PFA [w/v] 1x PBS -NaOH, zur Einstellung des pH-Wertes -muss unter Rühren auf 60°C erwärmt -Aliquotieren und bei -20°C lagern -nach Auftauen, lichtgeschützt, bei 4°C
0,1 % Poly-L-Lysin-Lösung	0,1 % Poly-L-Lysin [w/w] bidestilliertes Wasser
0,5% BSA-PBS-Puffer	0,5 % BSA-Lösung [v/v] PBS
Propidiumiodid(PI)-Färbelösung	0,5 µg/mL PI FACS-Inkubationspuffer
µMAC-Lysispuffer	150 mM NaCl 1 % Triton X-100 50 mM Tris-HCL(pH 8,0) 1 % Proteinaseinhibitoren 1 % Phosphataseinhibitoren

Fortsetzung Tabelle 2-2: Lösungen

<u>Bezeichnung</u>	<u>Bestandteile</u>
IP-Elutionspuffer	50 mM Tris, pH 6,8 1 % SDS 10 % Glycerol 0,005 % Bromphenol-Blau bidestilliertes Wasser 50 mM DTT, jeweils frisch zugesetzt

Tabelle 2-3: Verwendete Kits

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller/Bezugsquelle</u>
LightCycler ® FastStart DNA Master HybProbe	Roche Applied Science
Qproteome Cell Compartment	Qiagen GmbH
Revert Aid First Strand cDNA Sythesis Kit	Fermentas GmbH
RNeasy® mini kit	Fermentas GmbH
GeXP Start Kits A21019 und A21458	Beckman Coulter

Tabelle 2-4: Verwendungsparameter der primären Antikörper, Kontroll-Immunglobuline und Neutralisierungs-Peptide

<u>Bezeichnung</u>	<u>Antikörper-Spezies</u>	<u>Eingesetzte Verdünnung</u>		<u>Hersteller/Bezugsquelle</u>
		<u>WB</u>	<u>IF</u>	
19S-Proteasom, Subunit S5A	Maus, monoklonal	1:1000	-	Abcam/ BIOZOL
19S-Proteasom, Subunit 10B	Kaninchen, polyklonal	-	1:75	Abcam/ BIOZOL
20S-Proteasom, Subunit-alpha 5	Kaninchen, polyklonal	1:1000	1:250	ThermoScientific/ Dianova
Beta-Actin	Maus, monoklonal	1:60000	-	MP Biomedicals Europe
Calreticulin (ER-Marker)	Kaninchen, polyklonal	-	1:1000	ABR(Dianova)
Katalase	Kaninchen, polyklonal	1:5000	1:1000	Abcam/ BIOZOL
GADD153[9C8](CHOP)	Maus, monoklonal	1:1000	-	Abcam/ BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH
GAPDH	Maus, monoklonal	1:10000	-	Santa Cruz Biotechnology

Fortsetzung Tabelle 2-4: Verwendungsparameter der primären Antikörper, Kontroll-Immunglobuline und Neutralisierungs-Peptide

<u>Bezeichnung</u>	<u>Antikörper-Spezies</u>	<u>Eingesetzte Verdünnung</u>		<u>Hersteller/Bezugsquelle</u>
		<u>WB</u>	<u>IF</u>	
Giantin (Golgi-Marker)	Kaninchen, polyklonal	-	1:2000	Covance (Hiss Diagnostics GmbH)
HSP60	Maus, monoklonal	1:2000	-	Stressgen/ Enzo Life Sciences GmbH
IκB-alpha	Kaninchen, polyklonal	1:2000	1:250	Cell Signalling Technology/ New England Biolabs GmbH
Lamin-B1 (Kern-Membran Marker)	Kaninchen, polyklonal	1:15000	-	Abcam/ BIOZOL
NFκB, Subunit p50	Ziege, polyklonal	1:3000	-	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
P97 ATPase(VCP),	Maus, monoklonal	1:1000	-	Progen Biotechnik GmbH
Normal-Kaninchen-IgG		-	1:101 (IκB) 1:750 (20S)	Invitrogen GmbH
PARP-1	Maus, monoklonal	1:1000	-	Santa Cruz Biotechnology,
RIP1	Maus, monoklonal	1:3000	-	BD Transduction Laboratories/ BD Bioscience Europe
Ubiquitin(FL-76)	Kaninchen, polyklonal	1:1000	-	Santa Cruz Biotechnology,
VCP	Maus, monoklonal	1:2000	1:300	ABR Affinity BioReagent/
VCP-Neutralisierungspeptid		-	1:4	ABR Affinity BioReagent/

Tabelle 2-5: Verwendete sekundäre Antikörper für Western-Blot(WB)-Analysen und Immunfluoreszenzfärbungen(IF) sowie DNA-interkalierende Substanzen

<u>Bezeichnung</u>	<u>Antikörper-Spezies</u>	<u>Wellenlänge [nm]</u> <u>Absorption/Emission</u>	<u>Methode</u>	<u>Hersteller/Bezugsquelle</u>
anti-Mause IgG, HRP-konjugiert	Ziege, polyklonal	-	WB	BD Pharmingen/BD
anti-Kaninchen IgG, HRP-konjugiert	Ziege, polyklonal	-	WB	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
anti-Ziege IgG, HRP-konjugiert	Esel, polyklonal	-	WB	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
anti-Mause IgG, Rhodamin-RedX-konjugiert	Esel, polyklonal	570/590	IF	ThermoScientific / Dianova
anti-Kaninchen IgG, Alexa488-konjugiert	Ziege, polyklonal	495/519	IF	Invitrogen GmbH
TO-PRO-3 (DNA-interkalierender Kernfarbstoff)	-			Invitrogen GmbH

Tabelle 2-6: Geräte

Bezeichnung	Hersteller/Bezugsquelle
Allegra™ 2IR Centrifuge	Beckman Coulter GmbH
Brutschrank/Inkubator	KENDRO laboratory products GmbH
Durchflusszytometer BD FACSCalibur™ System	BD Bioscience
Elektrophoresekammer	BIO-RAD Laboratories GmbH
Elektroporator (Elektroporation Pulse Generator EPI 2500)	Dr. L. Fisher
ELISA-Reader (Multi-Mode Microplate Reader, Synergy 2)	BioTek Instruments/BioTek Germany
Eppendorf Centrifuge 5415R (Tischzentrifuge, temperierbar)	Eppendorf AG
Eppendorf MiniSpin Plus (Tischzentrifuge)	Eppendorf AG
Eppendorf Research Pipetten	Eppendorf AG
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss AG
Heizblock	Eppendorf AG
Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop, DM IRB System mit TCS SP2 AOBS Scankopf	Leica Microsystems CMS GmbH
Lichtmikroskop, Labovert	Leitz GmbH
MACS® MultiStand	Miltenyi Biotec GmbH
Multifuge 3 S-R (Untertisch-Zentrifuge, temperierbar)	Heraeus
NanoDrop, Photometer	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Rocket-Shaker (Laborwippe), ELMI, Shaker DRS- 12	LTF-Labortechnik GmbH
Sterile Werkbank, HERA safe	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Stickstofftank	MVE (New Prague, USA)
Vertikale Gelelektrophoresekammer (Thermo Scientific Owl Emperor Penguin™ Dual-Gel Vertical System P9DS-1)	Thermo Scientific, Inc.
Vortexer, IKA MS3 basic	IKA® Werke GmbH
Wasserbad	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH
Western-Blot-Gerät (Semi-Dry-Transfer-System)	BIO-RAD Laboratories GmbH
µMACS Separation Unit	Miltenyi Biotec GmbH

2.3 Molekularbiologische und biochemische Methoden

2.3.1 Isolierung von Proteinen

Für die Herstellung von Gesamtzelllysaten wurden jeweils 1×10^7 Zellen für 10 min bei $301 \times g$ und $4^\circ C$ pelletiert. Das Medium wurde durch Dekantieren entfernt und die Zellpellets in je 1,5 mL kaltem PBS resuspendiert. Die Zellsuspensionen wurden in 1,5 mL Reaktionsgefäße überführt und erneut bei $100 \times g$, $4^\circ C$ für 10 min zentrifugiert. Nach sorgfältigem Entfernen des PBS-Puffers, wurden die Zellen resuspendiert und in 100 µL Lysis-Puffer aufgenommen. Die Lysate wurden 15 s sonifiziert und anschließend bei $4^\circ C$ und $1300 \times g$ für 10 min zentrifugiert, um verbliebene Zelltrümmer zu entfernen. Die Lagerung der proteinhaltigen Überstände erfolgte, nach Überführung in neue Reaktionsgefäße, bei $-80^\circ C$.

2.3.2 Zellfraktionierung

Die Zellfraktionierung wurde mit Hilfe des Qproteome Cell Compartment Kits (#37502, Qiagen GmbH) durchgeführt. Durch sequentielle Zugabe verschiedener detergenshaltiger Puffer und Zentrifugationsschritte ermöglicht diese Methode die Auftrennung von Proteinen in Fraktionen aus zytosolischen, membranösen, nukleären und zytoskelettalen Proteinen. Je Fraktionierung wurden 1×10^7 Zellen eingesetzt. Medienrückstände und Serumproteine wurden durch einen initialen Waschschrift mit eiskaltem PBS entfernt. Die weitere Durchführung erfolgte gemäß Herstellerangaben. Die resultierenden subzellulären Fraktionen wurden zur Erhöhung der Konzentration und Entfernung von Salzen einer Aceton-Fällung unterzogen.

2.3.3 Aceton-Fällung von Proteinen

Hierzu wurden proteinhaltige Lösungen mit dem vierfachen ihres eigenen Volumens an eiskaltem Aceton vermischt und für mindestens 1h bei -20°C gefällt. Die Proteine wurden durch Zentrifugation für 10 min, bei $12\,000 \times g$ und 4°C pelletiert, Der Überstand verworfen und die Pellets luftgetrocknet. Die aus dieser Aufreinigung resultierenden präzipitierten Proteine wurden in Lysis-Puffer (vgl. Tabelle 2-2) resuspendiert, der Phosphatase und Protease-Inhibitoren enthielt.

2.3.4 Proteinquantifizierung nach Bradford

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration der Gesamtzelllysate wurde die Quantifizierung nach Bradford durchgeführt. Diese Proteinbestimmung nutzt die Tatsache, dass sich Triarylmethanfarbstoffe mit ausgedehntem π -Elektronensystem und Proteine durch hydrophobe Wechselwirkungen aneinander binden, wobei der Farbstoff eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm zu 595 nm erfährt. Die Farbintensität ist abhängig vom Gehalt an basischen Aminosäureresten, insbesondere Arginin. Zur Standardisierung wurde eine Verdünnungsreihe aus BSA, verdünnt in Baker-Wasser, mit 6 verschiedenen Konzentrationen im Bereich der erwarteten Lysatkonzentrationen verwendet. Je $2,5 \mu\text{L}$ der Proben und BSA-Standards wurde mit $800 \mu\text{L}$ 1:5 in Baker-Wasser verdünnter Bradford-Lösung gemischt. Für die Messung wurden Triplikate á $200 \mu\text{L}$ in 96-Loch-Platten pipettiert. Anschließend wurde die Absorption der Proteinlösungen bei einer Wellenlänge von 595 nm gegen eine Nullprobe (Lysispuffer) im Microplate Autoreader (BioTek Instruments) gemessen. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mithilfe des Genfive1.07.5 Programms.

2.3.5 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine zur späteren Analyse erfolgte durch eine diskontinuierliche SDS-PAGE nach Laemmli, in einer vertikalen Elektrophoresekammer (*Owl Emperor Penguin™ Dual-Gel Vertical System*). Diese Art der Gelelektrophorese ermöglicht es Proteine durch Anlegen eines elektrischen Feldes, allein aufgrund ihrer

Molekülmasse, voneinander zu trennen. Das im Gel und im Ladepuffer enthaltene Natriumdodecylsulfat (SDS) überdeckt die Eigenladung der Proteine. Der Zusatz von β -Mercaptoethanol zum Ladepuffer und reduktives Erhitzen sorgen für eine Spaltung Disulfidbrücken und einer Zerstörung der dreidimensionalen Struktur der Proteine.

Durch die Schichtung zweier, als Sammel- bzw. Trenngel bezeichneten, Gelteile unterschiedlichen PolyacrylamidGehaltes und pH-Wertes erfahren die Proteine erst eine Aufkonzentrierung durch den Stapeleffekt und werden danach im unteren Teil vollständig aufgetrennt.

Tabelle 2-7: Gel-Zusammensetzung

	8%	10%	3%
1,5 M Tris HCl, pH 8,8	3 mL	3 mL	-
1,0 M Tris HCl, pH 6,8	-	-	0,75 mL
1 % SDS	1,2 mL	1,2 mL	0,6 mL
30 % Polyacrylamidlösung	3,0 mL	3,9 mL	0,6 mL
bidestilliertes Wasser	4,8 mL	3,9 mL	4,05 mL
40 % APS	24 μ L	24 μ L	12 μ L
TEMED	24 μ L	24 μ L	12 μ L

Je nach Größe der untersuchten Proteine wurden Trenngele (pH 8,8) mit 8 bzw. 10 % Polyacrylamid hergestellt. Die Konzentration der Sammelgele (pH 6,8) betrug immer 3%. Die Elektrophorese wurde bei Raumtemperatur, bei einer Spannung von konstant 80 V im Sammel- und 180 V im Trenngel durchgeführt. Die Zusammensetzung der Gele ist in Tabelle 2-7 beschrieben. Die eingesetzte Proteinmenge betrug, je nach der Expressionsstärke des untersuchten Proteins, 20-40 μ g. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit Ladepuffer (4x RotiLoad, Carl-Roth AG) gemischt und durch Erhitzen für 5 Minuten bei 95 °C denaturiert.

Zur Größenabschätzung der Proteine wurde neben den Proben ein Molekulargewicht-Marker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder SM0671 (10-170kDa) oder SM1811 (11-250 kDa), Fermentas) aufgetragen.

2.3.6 Western-Blot

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine können durch Anlegen eines senkrecht zum Gel gerichteten elektrischen Feldes auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen und so weiteren Analyseverfahren zugänglich gemacht werden. Das in der SDS-PAGE erzeugte Auftrennungsmuster bleibt dabei erhalten.

Die Proteine wurden mittels eines Semi-Dry-Transfer-Systems (Biometra GmbH) auf eine Nitrozellulosemembran mit einer Porengröße von 0,2 μ m (Protran BA 83, Whatman GmbH/Schleicher & Schuell BioScience) transferiert. Je nach Größe des untersuchten Proteins erfolgte der Transfer für 0,25 – 0,5 h, bei 4° C und einer konstanten Stromstärke von 2,5 mA/cm². Zur Kontrolle der Transfer-Effizienz wurde die Membran mit Ponceau-Lösung reversibel gefärbt. Bei Western-Blot Analysen zu Immunpräzipitationen wurde außerdem das

Gel mit Coomassie-Lösung über Nacht gefärbt und am folgenden Tag mit Entfärberlösung so lange entfärbt, bis nur noch die Proteinbanden deutlich blau gefärbt waren. Die untere Nachweisgrenze dieser Färbemethode liegt bei ca. 0,1 -0,5 µg Protein pro Bande.

2.3.7 Immunologischer Nachweis der Proteine und densitometrische Analyse

Vor dem immunologischen Nachweis der transferierten Proteine wurden zuerst die freien Bindungsstellen der Membran blockiert, um eine unspezifische Bindung der Antikörper an diese Absorptionsplätze zu verhindern. Die Membran wurde dazu in 5 % [w/v] Magermilch in PBST, bei RT, für 1 h schwenkend inkubiert. Im Anschluss folgte die Inkubation mit den Primärantikörpern über Nacht, bei 4 °C. Je nach Antikörper, wurde als Lösemittel entweder ebenfalls 5 % [w/v] Magermilch oder 2 % [w/v] Slim Fast Schokolade in PBST verwendet. Nicht-gebundene Antikörper wurden mit drei Waschvorgängen in PBST entfernt, bevor die Inkubation mit den Sekundärantikörpern für 1 h, bei RT durchgeführt wurde. Alle verwendeten Sekundärantikörper waren mit Meerrettich-Peroxidase (*horseradish peroxidase*), konjugiert. So war es möglich, die Proteine mit Hilfe des Luminol-haltigen „ECL Western Blotting Detection Reagents“ (Amersham Bioscience/ GE Healthcare), über eine Chemilumineszenzreaktion zu detektieren. Mit der freigesetzten Lumineszenz wurden Röntgenfilme belichtet. Die Expositionszeit wurde abhängig von der Signalintensität der untersuchten Proteine gewählt und betrug meist zwischen 1 und 60 s.

Die Röntgenfilme wurden gescannt und mit Hilfe des Programms ImageJ^(217, 217) ausgewertet. Die Signalintensität einer Proteinbande wird dabei bestimmt aus dem Verhältnis des Grauwerts, also dem Anteil schwarzer Pixel pro Fläche, verglichen zum Hintergrund. Um die Vergleichbarkeit der Resultate zu gewährleisten wurden die Ergebnisse der untersuchten Zielproteine zu denen von konstitutiv exprimierten Proteinen wie β-Actin oder GAPDH normalisiert. Die verwendeten Antikörper und deren Verdünnungen sind in Tabelle 2-4 und Tabelle 2-5 beschrieben.

2.3.8 Immunfluoreszenz-Färbung und konfokale Laserscanning-Mikroskopie

Zur Untersuchung der subzellulären Lokalisierung der Zielproteine VCP, IκB, 20S und Katalase wurden Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Die Analyse erfolgte an behandelten und unbehandelten Zellen der Zelllinien MHH-cALL-2 und -3, sowie an kryokonservierten, mononukleären Knochenmarkszellen von Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose.

Es gab zwei Methoden die Zellen für die Färbung vorzubereiten. Bei der ersten Methode wurden die Zellen für 20 min mit 2 % Paraformaldehyd (PFA) direkt auf Poly-L-Lysin beschichteten Objektträgern fixiert. Bei der zweiten wurden die Zellen erst in 100 % Ethanol fixiert und erst am Tag der Färbung auf die Objektträger aufgebracht. Nach Verdunsten des Alkohols, wurden diese Zellen ebenso behandelt, wie die PFA-fixierten. Nach einem 5 minütigen Waschschrift mit PBS wurden sie für 10 min mit 50 mM NH₄Cl-Lösung inkubiert. Die Permeabilisierung wurde mit 0,5 % [v/v] Triton-X-100-PBS-Lösung für exakt 5 min durchgeführt. Nach gründlichem Waschen mit PBS wurden unspezifische Bindungsstellen

durch Inkubation der Zellen mit 10 % humanem Serum für 1 h bei 37°C abgesättigt. Die Antikörper-Inkubation mit den jeweiligen Primäantikörpern erfolgte entweder für 1 h bei 37°C oder über Nacht bei 4 °C. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen für 30 min bei 37 °C mit den entsprechenden sekundären Antikörpern inkubiert. Die Anfärbung der Zellkerne, für 10 min mit dem Farbstoff TO-PRO-3 (1:1000 in PBS, Molecular Probes, Invitrogen) bei RT durchgeführt. Nach einmaligem Waschen der Präparate wurden sie mit Mowiol® 4-88 (Calbiochem), welchem 25 mg/mL DABCO als Ausbleichschutz zugesetzt wurde, und mit einem Deckglas bedeckt. Die konfokale Laserscanning-Mikroskopie wurde an einem LEICA DM IRB System mit TCS SP2 AOBS Scankopf (Leica Microsystems CMS GmbH) durchgeführt. Die Verdünnungen der eingesetzten Antikörper, deren Verdünnungen, die an die Sekundärantikörper konjugierten Farbstoffe und die bei der Mikroskopie verwendeten Wellenlängen sind in Tabelle 2-4 und in Tabelle 2-5 aufgelistet. Zur Kontrolle der Antikörperspezifität wurden zusätzliche Färbungen durchgeführt. Der VCP-Antikörper wurde mit einem spezifischen Blocking-Peptid getestet. Als Nachweis für die Spezifität des Signals der IκB- und 20S-Antikörper wurden Zellen mit Kontroll-IgGs anstelle der Primäantikörper inkubiert. Zur Kontrolle unspezifischer Signale wurden außerdem Tests mit falschen sekundären Antikörpern durchgeführt.

2.3.9 Isolierung von RNA

Für die Isolierung von Gesamt-RNA wurden 5×10^6 Zellen eingesetzt. Die Zellen wurden, zur Entfernung von Medium-Rückständen, einmal zentrifugiert, in PBS resuspendiert und erneut pelletiert. Die RNA wurde nach dem Prinzip der Guanidiniumthiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt⁽²¹⁸⁾, dazu wurden die Zellen entweder in 1 mL TRIzol-Reagent® (Invitrogen) aufgenommen. Es enthält Guanidiniumthiocyanat als chaotropes Denaturierungsmittel. Für die Extraktion wurden anschließend 200 µl Chloroform zugefügt. Nach gründlicher Vermischung der Substanzen, mit Hilfe eines Vortexers, wurde zur Phasentrennung für 15 min bei 12 000x g (Allegra) und 4°C zentrifugiert. Die Aufreinigung der isolierten RNA erfolgte mit dem Rneasy-Mini-Kit® (Qiagen) gemäß Herstellerangaben, unter Zusatz von 100 %Ethanol. Die isolierte RNA wurde in sterilem, Rnase-freiem Wasser (Qiagen) aufgenommen und bei -80°C gelagert. Zur photometrischen Konzentrationsbestimmung mit einem NanoDrop-Photometer (Thermo Scientific) wurden 3 µL RNA-Lösung eingesetzt.

2.3.10 c-DNA Synthese

Aus 1000 ng Gesamt-RNA wurden mit Hilfe des „Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kits“ (Fermentas GmbH) cDNA synthetisiert. Die Durchführung erfolgte gemäß Herstellerangaben, nach dem Protokoll optimiert für RT-PCR, unter Verwendung des im Kit enthaltenen Random Hexamer Primers und der RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase.

2.3.11 Quantitative Real-Time-PCR (RT-PCR)

Um die RNA-Expression der Zielgene VCP, I κ B und Katalase in den ALL-Zelllinien und in Patientenproben zu untersuchen, wurde die Methode der quantitativen RT-PCR durchgeführt. Durch den Einsatz sequenzspezifischer Primer und Sonden ist es mit Hilfe dieser Methode möglich, die Expression eines Gens zu quantifizieren. Die verwendeten Hybridisierungs sonden bestehen aus einem Paar 3'-Fluorescein (FL) und 5'-LightCycler® Red (LC) markierten Oligonukleotid-Sonden. Das Fluorescein überträgt seine Energie auf den benachbarten Farbstoff, wenn diese Sonden benachbart binden. Das generierte FRET-Signal ist proportional zu der Menge an gebundenem einzelsträngigen Target.

Tabelle 2-8: Zusammensetzung der RT-PCR-Ansätze

4 μ L	HybProbe® Master-Mix-Solution
1 μ L	Vorwärts-Primer (10 μ M)
1 μ L	Rückwärts-Primer (10 μ M)
1 μ L	Sonde (4 μ M)
1 μ L	Sonde (4 μ M)
7 μ L	bidest. H ₂ O
5 μ L	cDNA

Die RT-PCR wurde unter Verwendung der LightCycler® Technologie (Roche Applied Science) durchgeführt. Die Zusammensetzung der RT-PCR-Ansätze sind in Tabelle 2-8 und die Sequenzen der verwendeten Primer sind in Tabelle 2-9 beschrieben. Die Bedingungen für die PCR-Reaktion umfasste folgende Temperaturen und Zeitstufen: 1 Zyklus bei 95° C für 10 min (initiale Denaturierung), danach 24 Zyklen bei 95° C für 15 s, 60° C für 30 s und 72° C für 1 min.

Tabelle 2-9: RT-PCR-Primer und Sonden

<u>Bezeichnung</u>	<u>Beschreibung</u>	<u>Sequenz (5'->3')</u>	<u>NCBI-RefSeq.</u>
TBP (F)	Primer	TTCGGAGAGTTCTGGGATTGTA	NM_003194
TBP (R)	Primer	TGGACTGTTCTTCACTCTTGGC	NM_003194
TBP (LC)	Sonde	TGAGGATAAGAGAGCCACGAACCAC	NM_003194
TBP (FL)	Sonde	CCAAGCGGTTTGTGCGGTAATC	NM_003194
VCP (F)	Primer	TTCCTGAAGTTTGGCATGACAC	NM_007126
VCP (R)	Primer	GCGGGCCTTGTC AAAGAT	NM_007126
VCP (LC)	Sonde	CACCATGTGGTTTGGGGAGTCTGAG	NM_007126
VCP (FL)	Sonde	CTCCATCAAGGGTCTGAGCTGC	NM_007126
I κ B (F)	Primer	TCCTGAAGGCTACCAACT	NM_020531
I κ B (R)	Primer	TACAGGGCTCCTGAGCAT	NM_020532
I κ B (LC)	Sonde	TGGTGTCTTGGGTGCTGAT	NM_020529
I κ B (FL)	Sonde	CTGGGCATCGTGGAGCTT	NM_020530

Fortsetzung Tabelle 2-10: RT-PCR-Primer und Sonden

Katalase (F)	Primer	TGGAGAAGTGCGGAGATTCAAC	NM_001752.3
Katalase (R)	Primer	TGTGCATCCTTCAGGTGGC	NM_001752.3
Katalase (LC)	Sonde	CGTGCTGAATGAGGAACAGAGGAAACGT	NM_001752.3
Katalase(FL)	Sonde	TTACTCAGGTGCGGGCATTCTATGTGA	NM_001752.3

Als Referenz wurde bei allen Analysen eine cDNA benutzt, die unter Einsatz von Universal Human Reference RNA (# 740000, Stratagene Division of Agilent Technologies GmbH & Co. KG), synthetisiert wurde. Es handelt sich dabei um eine Mischung von Gesamt-RNAs aus 10 verschiedenen humanen Tumorzelllinien. Die cDNA-Synthese erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie für die untersuchten Proben. Als konstitutiv exprimiertes Housekeeping-Gen wurde das TATA Box Binding Protein (TBP) untersucht. Die Ergebnisse der Real-Time-PCR wurden mit der Quantifizierungssoftware, *RelQuant* (Roche Applied Science) des LightCyclers ausgewertet.

2.3.12 Automated Multiplexed Gene Expression Profiling (GeXP)-Fragmentanalyse

Die GeXP-Fragmentanalyse (Beckman Coulter) ermöglichte es zusätzlich zur oben beschriebenen Real-Time-PCR mit dem LightCycler-System exemplarisch globalere Genexpressionsmuster der Zelllinien MHH-cALL-2 und -3 sowie der initialen Patientenproben zu untersuchen.

Die GeXP-Fragmentanalyse bestand aus mehreren Schritten und wurde gemäß Hersteller-Angabe durchgeführt. Zuerst wurde aus Gesamt-RNA unter Verwendung von chimären Rückwärts-Primern (siehe Tabelle 2-11), bestehend aus einem Zielgen-spezifischen und einem universellen Sequenzabschnitt, cDNA synthetisiert. Die cDNA-Synthese erfolgte unter folgenden Bedingungen: Bei 48°C für 1 min, bei 42°C für 60 min und bei 95°C für 5 min. Anschließend folgte eine PCR-Reaktion, bei der Primer gegen den neu eingeführten universellen Sequenzabschnitt eingesetzt wurden. Die PCR-Reaktion umfasste folgende Temperaturstufen und Zeiten: 1 Zyklus bei 95°C für 15 min (initiale Denaturierung), 35 Zyklen bei 94°C für 0,5 min, 55°C für 0,5 min, 70°C für 1 min sowie abschließend 1 Zyklus bei 72°C für 5 min. Puffer und Enzyme für die Reaktionen stammten aus den GeXP Start Kits (A21019 und A21458, Beckman Coulter). Im letzten Schritt folgte eine Amplifikation mit Hilfe von universellen Vorwärts- und Rückwärts-Primern, an die Fluoreszenz-Farbstoffe gekoppelt waren. Die Auftrennung der resultierenden PCR-Produkte erfolgte in einem Kapillarelektrophorese-System (Beckman Coulter). Anhand der Größe der Amplicons, die zwischen 137 und 394 Basenpaaren lag war es möglich die PCR-Produkte mit Hilfe der Fragment-Analyse-Methode, *Frag-3* aufzutrennen. Die Quantifizierung der detektierten Amplicons erfolgte mittels GeXP-Software (Beckman Coulter), wobei Expressionsintensitäten von der Menge PCR-Produkte abgeleitet wurden. Die aus dem Elektropherogramm abgeleiteten Flächen-unter-der-Kurve (area-under-curve) Ergebnisse wurden exportiert und mit Hilfe des Programms Excel weiter ausgewertet. Die Resultate der Zielgene wurden im Vergleich zu den konstitutiv exprimierten Housekeeping-Genen das

TATA Box Binding Protein (TBP) und *Actin* gemessen und gegen eines der beiden normalisiert.

Tabelle 2-11: Bezeichnung und Sequenzen der in der GeXP-Analyse eingesetzten Vorwärts- (F) und Rückwärts-Primer (R) sowie die Größe der generierten Amplicons

<u>Bezeichnung</u>	<u>Sequenz (5'->3')</u>	<u>NCBI RefSeq.</u>	<u>Produktgröße [bp]</u>
MCM5 (F)	AGGACATCCAGGTCATGCTC	NM_006739	137
MCM5 (R)	ATGATGCCAGGGATCTTCAC	NM_006739	137
VCP (F)	GTGGTAGAGGTGCCACAGGT	NM_007126	144
VCP (R)	AATTTGTCTGGGTGCTCCAC	NM_007126	144
MCM6 (F)	AACCAGCAACTTCCACCAC	NM_005915	151
MCM6 (R)	ATCCTTGGCAAGAGGGATCT	NM_005915	151
Katalase (F)	CCCATTTTCTTCATCAGGGA	NM_001752	158
Katalase (R)	CAGGACGTAGGCTCCAGAAG	NM_001752	158
NF-Kappa B-1 (F)	ACTGTGAGGATGGGATCTGC	NM_003998	165
NF-Kappa B-1 (R)	CTCTGTCATTCGTGCTTCCA	NM_003998	165
Transferrin Rez (F)	CCATCAAGCTGCTGAATGAA	BC001188	172
Transferrin Rez (R)	CAAAATGTTGATCACGCCAG	BC001188	172
I Kappa B (F)	GAAACAACAGCTGCCTCTCC	NM_001556	179
I Kappa B (R)	GATGTGATCCCAAACCTCGGT	NM_001556	179
NF-Kappa B-2 (F)	CAGTATGCCATTGTGTTCCG	NM_002502	186
NF-Kappa B-2 (R)	TCCTTGTCTTCCACCAGAGG	NM_002502	186
MCM3 (F)	GGGGTGAGGAAAGAGGAGAC	NM_002388	193
MCM3 (R)	ACAGAAAACAGTTGTGCCCC	NM_002388	193
TTK (F)	GAACATGCCACCACAAGATG	NM_003318	247
TTK (R)	GATCCAGGCACAACCAAATC	NM_003318	247
Prohibitin TAG (F)	CATCCCGTGGGTACAGAAAC	NM_002634	262
Prohibitin TAG (R)	GCCACCACTGACTTGAGGAT	NM_002634	262
MX1 (F)	ACCAGACTCCGACACGAGTT	NM_002462	275
MX1 (R)	AAGCAAGCCGGACCATATC	NM_002462	275
FGFR1 (F)	AGCAACGTGGAGTTCATGTG	NM_023110	287
FGFR1 (R)	GCAGAGTGATGGGAGAGTCC	NM_023110	287
beta-Actin (Actin) (F)	CTGTGGCATCCACGAAACTA	NM_001101	297
beta-Actin (Actin) (R)	TGATCCACATCTGCTGGAAG	NM_001101	297
TBP (F)	GGGGAGCTGTGATGTGAAGT	NM_003194	305
TBP (R)	GGAGGCAAGGGTACATGAGA	NM_003194	305
MCL1 (F)	AGACCTTACGACGGGTTGG	NM_021960	394
MCL1 (R)	TCCTGATGCCACCTTCTAGG	NM_021960	394
universal Primer (F)	AGGTGACACTATAGAATA	-	Amplicon-abhängig
universal Primer (R)	GTACGACTCACTATAGGGA	-	Amplicon-abhängig

2.4 Zellbiologische Methoden

2.4.1 Zellkulturstudien nach Behandlung mit Prednisolon und Bortezomib

Das eingesetzte Prednisolon-21-hydrogensuccinat (Solu-DecortinH®, Merck Serono GmbH) wird innerhalb weniger Minuten in wässriger Lösung vollständig hydrolysiert, wobei der Wirkstoff freigesetzt wird. Bei Gabe von Prednison müsste dieses dagegen erst in der Leber in den aktiven Alkohol Prednisolon umgewandelt werden. So wurden in den Zellkultur-Experimenten die natürlichen Gegebenheiten im Organismus imitiert, unter denen die Tumorzelle, bei Behandlung mit Prednison oder Prednisolon immer dem aktiven Metaboliten ausgesetzt wird. Für die molekularen Analysen wurden beide Zelllinien mit 6,2 μM Predisolon stimuliert und bis zu 96 h inkubiert. Dieser Zeitraum entspricht dem Verdopplungszeitraum beider Zelllinien. Die Zellen wurden außerdem mit 1,5, 7 oder 12 nM des Proteasominhibitors Bortezomib (Velcade®, Janssen Cilag) stimuliert. Zur Standardisierung der durchgeführten Experimente wurden die Zelllinien MHHcALL-2, -3 und -4 vor der Behandlung mit den Medikamenten auf ihrer optimalen Zelldichte von $3 \times 10^6/\text{mL}$ eingestellt. Die zusätzlich untersuchten ALL Zelllinien REH, Jurkat und MHH-cALL-4 wurden ebenfalls auf ihre optimale Zelldichte von $1 \times 10^6/\text{mL}$ eingestellt.

Die Wirkung der Medikamente wurde im Verlauf jedes Experiments alle 24 Stunden anhand der in Abbildung 3-1 zusammengefassten Parameter untersucht und bewertet.

2.4.2 Transiente Transfektion von ALL-Zelllinien und anschließende Prednisolon-Behandlung

Zur Untersuchung der VCP-Funktion im Zusammenhang mit der Steroidresistenz in kindlichen Leukämien wurden die etablierten ALL-Zelllinien bekannter Steroidsensitivität mit siRNA transient transfiziert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Transfektion durch Elektroporation für die untersuchten Suspensionszelllinien etabliert.

Hierzu wurden Zellen in einer Zelldichte von $1 \times 10^7/\text{mL}$ serumfreiem-Zellkultur-Medium resuspendiert. Je Transfektionsansatz wurden 200 μL dieser Zellsuspension luftblasenfrei in eine sterile Elektroporationsküvette gefüllt und dort mit 60 pmol siRNA vermischt. Die Elektroporation wurde mit einem ‚*Elektroporation Pulse Generator EPI 2500*‘ (Dr. L. Fisher) durchgeführt. Dazu wurde bei RT, für 10 s eine Spannung von 330 Volt an die Küvette angelegt. Die Ansätze verblieben für 15 min in den Küvetten, bevor 1000 μL serum-haltiges Zellkulturmedium zugefügt wurden. Für die siRNA-Transfektionen, an die sich eine Prednisolon-Behandlung anschloss, wurden alle Elektroporationsansätze der gleichen siRNA vereinigt und auf die entsprechende Anzahl von Zellkulturschalen verteilt. Das Volumen eines Transfektionsansatzes wurde so letztendlich auf 2 Löcher einer 24-Loch-Zellkultur-Platte überführt. Dieses Verfahren diente zur Standardisierung der Versuchsbedingungen.

Die Behandlung mit 6,2 μM Prednisolon wurde 24 h nach der Elektroporation durchgeführt. Die Zellen wurden maximal weitere 48 h inkubiert, um die Effekte zu untersuchen (siehe Abbildung 3-1).

Es wurden vor allem die Auswirkungen dieser Kombination auf Vitalität und Apoptose untersucht. Die Analyse des Regulationseffektes bezüglich der Expression des Zielgens erfolgte mit Hilfe der quantitative RT-PCR (LightCycler) und durch Western-Blot- Analysen.

Tabelle 2-12: Verwendete siRNAs

Bezeichnung	Zielgen/Spezies	Target Sequenz	Gene ID
AllStars Neg. Control	- / Mammalia	firmeneigen	-
AllStars Neg. Control-Alexa488	- / Mammalia	firmeneigen	-
Hs_VCP_6	VCP/Homo sapiens	AAGATGGATCTCATTGACCTA	7415
Hs_VCP_7	VCP/Homo sapiens	AACAGCCATTCTCAAACAGAA	7415

Neben den Transfektionen mit den Seitens des Herstellers validierten siRNAs gegen VCP, wurden als Kontrollen Zellen mit nicht-hemmender-siRNA (*non-silencing-siRNA*) „AllStar negativ“ und ohne siRNA transfiziert. Dies diente zum Ausschluss sequenzunabhängiger, unspezifischer Effekte. Diese Kontrollen wurden ebenfalls einer Prednisolon-Behandlung unterzogen.

2.4.3 Trypan-Blau-Färbung und morphologische Beurteilung der Zellen

Um den Effekt der Behandlung auf die Vitalität der Zellen zu untersuchen, wurden verschiedene Methoden angewandt. Wie in der Einleitung beschrieben, gibt es verschiedene Parameter, anhand derer die abnehmende Vitalität zu erkennen ist. Neben der morphologischen Veränderung der Zelle, die sich schon unter einem Lichtmikroskop betrachten lässt, eröffnet auch die zunehmende Durchlässigkeit der Zellmembran die Möglichkeit diese Entwicklung zu untersuchen.

Für eine erste Beurteilung wurden jeweils 10 µL der Zellsuspensionen im Verhältnis 1:10 mit dem Farbstoff Trypan-Blau vermischt. Mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer wurden unter einem Lichtmikroskop die Anteile der vitalen und der letalen Zellen, welche für diesen Farbstoff durchlässig sind, bestimmt. Hierbei wurde außerdem die Morphologie der Zellen untersucht, vor allem der nachlassende Zellтургор und die zunehmende Granularität, in Folge der Auflösung der Kernmembran sowie der DNA-Kondensation.

2.4.4 Verminderung der metabolischen Aktivität als Maß für den Vitalitätsverlust

Das wasserlösliche Tetrazoliumsals WST-1 (1 644 807, Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland) wird über Katalyse mitochondrialer Dehydrogenasen zu Formazan reduziert, dessen Konzentration ein Maß für die Stoffwechselaktivität bzw. Proliferation darstellt.

Die Einstellung der Zellsuspensionen zu Versuchsbeginn auf immer dieselbe Zelldichte von 3×10^6 /mL, ermöglichte es zu den Untersuchungszeitpunkten durch Entnahme gleicher Volumina den Anteil metabolisch aktiver Zellen zu ermitteln. Zur Durchführung des WST-1-Assays wurden Zellsuspensionen im Verhältnis 1:10 mit Zellkulturmedium verdünnt. Für jede

Probe und eine Nullprobe, nur mit Medium, wurden Triplikate-Ansätze pipettiert. Dazu wurden je Ansatz 20 µL des WST-1-Reagenzes in einer 96-Loch-Platte vorgelegt. Anschließend wurden jeweils 200 µL der verdünnten Zellsuspensionen zugefügt. Die 96-Loch-Platte wurde für 2h unter Standard-Zellkultur-Bedingungen inkubiert.

Die spektrophotometrische Quantifizierung des entstehenden Formazans erfolgte mit Hilfe eines ELISA-Readers (Microplate Autoreader, BioTek Instruments) bei 450 nm. Von den gemessenen Extinktionen wurden die Extinktionen bei 650 nm und die Messwerte der Blindprobe abgezogen. Für die Bewertung der resultierenden Daten, wurden die Ergebnisse der behandelten Proben auf die der jeweiligen unbehandelten Negativkontrolle zum selben Zeitpunkt bezogen.

2.4.5 Quantifizierung Caspase-abhängiger Apoptose

Für den Nachweis Caspase abhängiger Apoptose wurde die Aktivität der Effektor-Caspasen -3 und -7 sowie der Initiator-Caspase 8 untersucht. Dazu wurden das Caspase-Glo® 3/7 Assay und das Caspase-Glo® 8 Assay eingesetzt. Das im Caspase-Glo® 3/7 Reagenz enthaltene Z-DEVD-Aminoluciferin ist ein Substrat für die Caspasen-3 und -7, das gespalten wird, wobei Aminoluciferin freisetzt wird. Das Caspase-Glo® 8 enthält Z-LETD-Aminoluciferin. Aus diesen Luciferin-Derivaten, wird nur durch spezifische Caspase-Spaltung Luciferin freigesetzt, welches wiederum als Substrat für eine ebenfalls im Reagenz enthaltene thermostabile und besonders robuste Luciferase dient. Diese katalysiert eine Luciferasereaktion mit verlängerter Halbwertszeit.

Auch für diese Assays wurden die Zellsuspensionen 1:10 mit Medium verdünnt eingesetzt. In einem Triplikate-Ansatz wurden 20 µL der jeweiligen verdünnten Suspension auf 20 µL des in einer lichtundurchlässigen Mikrotiterplatte vorgelegten Caspase-Reagenzes gegeben und 1 h unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Intensität der freigesetzten Lumineszenz mit Hilfe eines ELISA-Readers (*Microplateplate Autoreader*, BioTek Instruments) gemessen und die Ergebnisse mit Hilfe des Programms Gen5 1.07.5 (BioTek Instruments) ausgewertet. Zum Ausgleich von Schwankungen der Zellzahl, wurden die gemessenen Caspase-Aktivitäten, auf die Messwerte der parallel, mit denselben Zellsuspensionen durchgeführten WST-1-Assays bezogen und in Relation zur unbehandelten Kontrolle gesetzt.

2.4.6 Durchflusszytometrische Untersuchung nach Propidiumiodid-Färbung

Die Unterscheidung von früh- und spät-apoptotischen Zellen kann über zusätzliche Färbung mit Propidiumiodid (PI) erfolgen, einem DNA-interkalierenden Farbstoff, der von lebenden Zellen nicht aufgenommen wird. Da hier jedoch nicht zwischen spät-apoptotischen und nekrotischen Zellen unterschieden werden kann werden diese im Folgenden als „PI-positive“ oder „letale“ Zellen bezeichnet.

Für die Färbung wurden jeweils 1×10^6 Zellen aus jeder Zellsuspension entnommen, einmal mit PBS gewaschen und pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets wurden in 100 μ L PI-Färbelösung resuspendiert und mit weiteren 700 μ L 0,5 % BSA-PBS-Puffer versetzt. Die Quantifizierung der gefärbten Zellen erfolgte mit Hilfe eines Durchflusszytometers.

2.4.7 Analyse spezifischer Marker-Proteine im Western-Blot zur Unterscheidung der induzierten Zelltodmechanismen

Je nachdem welcher Zelltodmechanismus in einer Zelle ausgelöst wird, werden charakteristische Proteine reguliert oder prozessiert. In der vorliegenden Arbeit wurde das Spaltungsmusters des Poly-(ADP-ribose)-Polymerase-1 (PARP-1)-Proteins im Western-Blot untersucht. Das 116 kDa große PARP-1 wird bei der Caspase-abhängigen Apoptose von den Effektor-Caspasen zu einem 89 kDa und einem 27 kDa Fragment gespalten. Im Verlauf der Nekrose dagegen entstehen durch die lysosomalen Cathepsine B und D die Spaltprodukte der Größen 72, 55 und 42 kDa. Als spezifische Kontrollen wurden Gesamtzelllysate von Zellen hergestellt, die für 6 h mit 10 % Ethanol oder 0,1 % Wasserstoffperoxid inkubiert wurden⁽²⁰⁵⁾. Ein weiteres differenziert prozessiertes Protein ist das 72 kDa große *Receptor-interacting protein 1* (RIP1). Seine Spaltung durch Caspase 8 gilt als charakteristisch für die rezeptorvermittelte, Caspase-abhängige Apoptose. Ist trotz Zunahme letaler Zellen kein Spaltprodukt von 34 kDa nachweisbar, so ist dies ein Hinweis auf Nekroptose. Das 34 kDa große *C/EBP-homologous protein* (CHOP/GADD153) wurde untersucht, weil es während der sogenannten *unfolded protein respons*, einer vom endoplasmatischen Retikulum ausgehenden zellulären Stressreaktion, sehr stark exprimiert wird. In vitalen Zellen ist es jedoch kaum nachzuweisen. Als Kontrollen wurden Gesamtzelllysate von Zellen hergestellt, die für 6 h mit 5 μ g/mL Tunicamycin, als ER-Stress induzierendes Agens, inkubiert wurden.

2.5 Statistische Analysen

Die aus dieser explorativen Zellkulturstudie resultierenden Daten wurden mit Hilfe des Programms GraphPad Prism 5.02 (GraphPad Software, Inc.) statistisch ausgewertet und graphisch dargestellt. Resultierende Tendenzen und Aussagen beruhen auf deskriptiver Statistik und wurden durch Verwendung des parametrischen *Students' t-Test*, mit *Welch-Korrektur*, oder des *Einstichproben-t-Tests* gegen die Kontrolle ermittelt.

3. Ergebnisse

Der NF κ B-Signalweg, welcher über I κ B direkt durch Glucocorticoide beeinflusst wird, ist eng mit dem Proteasom-Ubiquitin-Degradationsweg (UPD) verknüpft. Zur Identifikation möglicher molekulare Ursachen, die mit diesen beiden Signalwegen zusammenhängen und die zu einer verminderten Glucocorticoid-Sensitivität führen können, wurden zwei experimentelle Strategien verfolgt. Erstens wurden die Zelllinien sowohl mit Prednisolon als auch mit dem Proteasominhibitor Bortezomib stimuliert. Zweitens wurde eine transiente Transfektion der Zelllinien mit siRNA gegen das *Valosin-containing protein (VCP)* codierende Gen etabliert. Diese funktionelle Studie, die in Kombination mit einer Prednisolon-Behandlung der Zellen durchgeführt wurde, sollte zeigen, in wie weit die VCP-Überexpression für eine geringe GC-Sensitivität von Bedeutung sein kann. Der zeitliche Ablauf beider Strategien der Zellkulturstudie ist in Abbildung 3-1 und Abbildung 3-2 zusammengefasst.

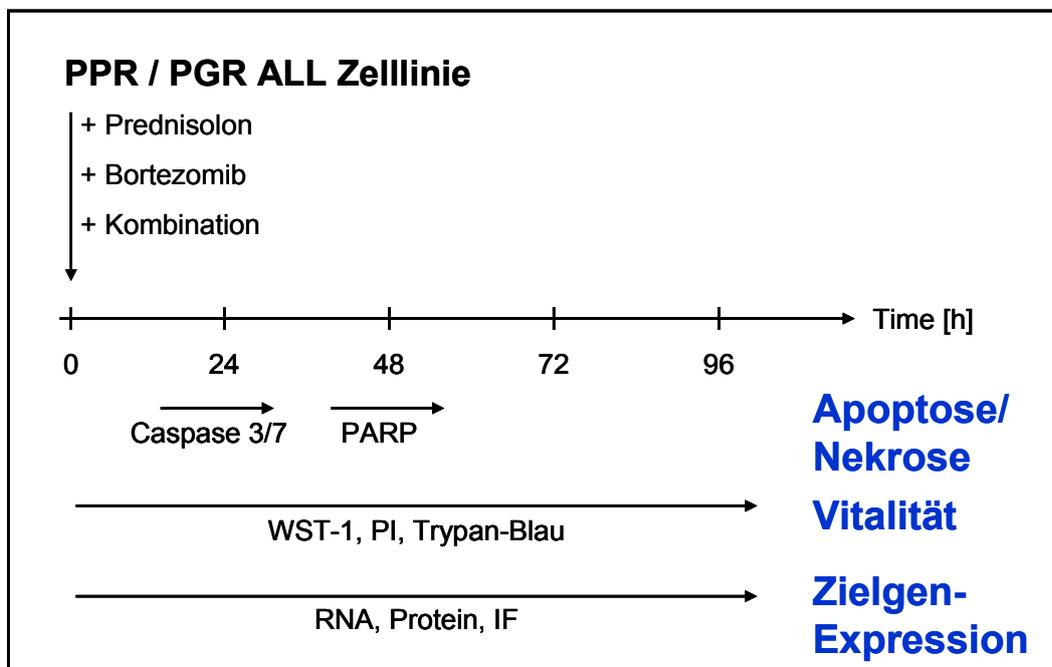


Abbildung 3-1: Zeitliche Abfolge der Untersuchungen nach der Behandlung mit Prednisolon und Bortezomib.

Die Behandlungsversuche wurden entweder mit Prednisolon (PRED), Bortezomib (BORT) oder einer Kombination beider Medikamente (KOMB) durchgeführt. Für die molekularen Analysen wurden beide Zelllinien mit 6,2 μ M Prednisolon stimuliert und bis zu 96 h inkubiert (Kapitel 3.1.1).

Beide Zelllinien wurden mit 7 nM Bortezomib, der von uns ermittelten IC₅₀-Konzentration, der *half maximal inhibitory concentration*, des Proteasominhibitors, stimuliert (Kapitel 3.1.2). Die Inkubation mit zwei weiteren Konzentrationen, einer höheren (12 nM) und eine niedrigeren (1,5 nM) diente dazu, eine Abstufungen des anti-proliferativen Effektes zu erzielen. Im Rahmen der Bortezomib-Zellkulturstudien wurden Expressionsanalysen auf RNA- und Proteinebene zu den Zielgenen *VCP* und *I κ B* durchgeführt.

Außerdem wurde die Lokalisierung der Proteine durch Einsatz von Zellfraktionierungen und Immunfluoreszenzfärbungen untersucht. Neben den oben genannten Zielgenen wurde auch die Expression der *Katalase* untersucht, einem weiteren potentiellen diagnostischen Marker neben VCP.

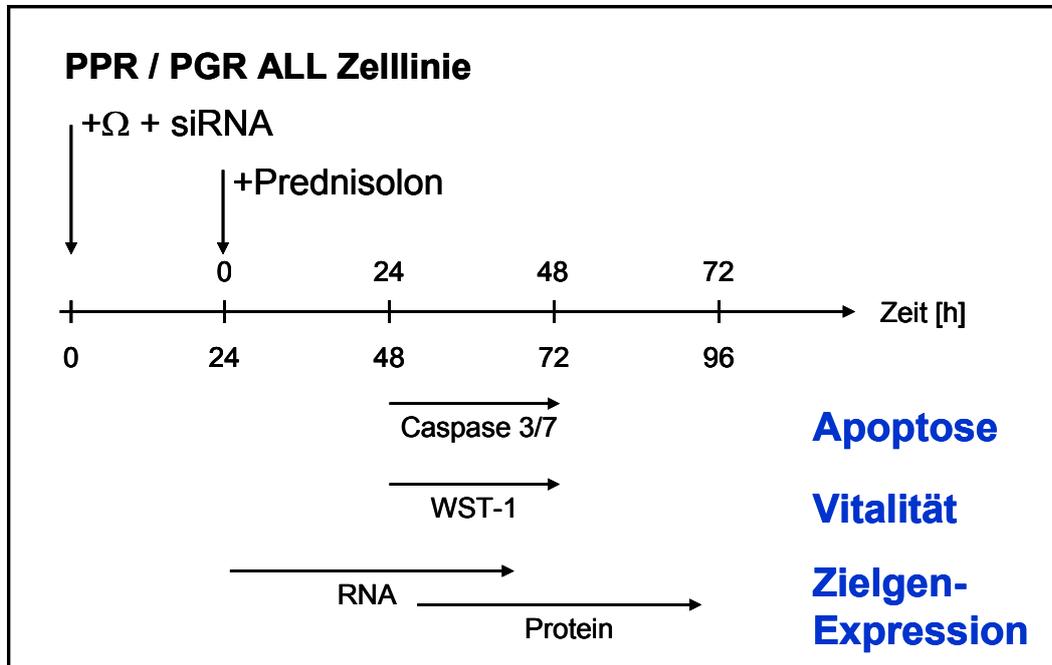


Abbildung 3-2: Zeitliche Abfolge der Untersuchungen nach mittels Elektroporation durchgeführter transientsier siRNA-Transfektion (+Ω +siRNA) und Behandlung mit Prednisolon.

Die funktionellen Studien (Kapitel 3.4) konzentrierten sich hauptsächlich auf die GC-resistente Zelllinie MHH-cALL-2. Diese zeigte sowohl bei initialen Untersuchungen als auch bei Behandlung mit Prednisolon eine VCP-Überexpression. Die Behandlung mit 6,2 µM Prednisolon erfolgte 24 h nach der Elektroporation, da zu diesem Zeitpunkt eine Verminderung der VCP-RNA durch die siRNA-Transfektion nachweisbar war. Die Zellen wurden danach maximal weitere 48 h inkubiert. Im Vordergrund der Untersuchungen stand hier vor allem, ob eine verminderte VCP-Expression die Glucocorticoid-Sensitivität der Zelllinie erhöht.

Mit den primären Zellen, bei denen es sich um kryo-konservierte Zellen handelte, wurden keine Behandlungsversuche durchgeführt, die Untersuchungen konzentrierten sich hier auf die initiale Expression der Zielgene *VCP*, *IκB* und *Katalase* (siehe Kapitel 3.4.2).

3.1 Prednisolon- und Bortezomib-Zellkulturstudien

3.1.1 Einfluss der Prednisolon-Einzelbehandlung auf die Vitalität

Grundlegende Zellkulturexperimente mit Prednisolon-Konzentrationen von 2 nM bis 4 mM in Form von Prednisolon-21-hydrogensuccinat zeigten, dass die verwendeten Zelllinien auch *in vitro* eine unterschiedliche GC-Sensitivität aufwiesen, die der initialen *Prednisone-Response* der Patienten entsprach. Sie sind daher als Modell für die Untersuchung der molekularen

Vorgänge nach Stimulation mit Prednisolon gut geeignet. Interessanterweise zeigte sich bei der Auftragung der metabolischen Aktivität nach 48 h gegen den Logarithmus der Konzentration, für die Vitalitätsabnahme beider Zelllinien ein biphasischer Kurvenverlauf (Abbildung 6-1). Eine Ermittlung des IC_{50} -Wertes mit Hilfe einer Dosis-Wirkungskurve nach *Hill* war durch diesen Verlauf der Kurve nicht möglich. Trotzdem benötigte die GC-resistente MHH-cALL-2 eine deutlich höhere Dosis um eine Vitalitätsminderung von mehr als 50 % zu erreichen. Trypan-Blau-Färbungen zeigten, dass die Zelllinie MHH-cALL-2 eindeutig 24 h langsamer und schwächer auf die Behandlung mit Prednisolon ansprach als die Zelllinie MHH-cALL-3. Trotzdem konnte, wie in Abbildung 3-3 dargestellt, bei beiden Zelllinien der Anteil vitaler Zellen durch Gabe von 6,2 μ M Prednisolon innerhalb von 96 h halbiert werden. Für alle weiteren Versuche wurde daher diese Konzentration verwendet.

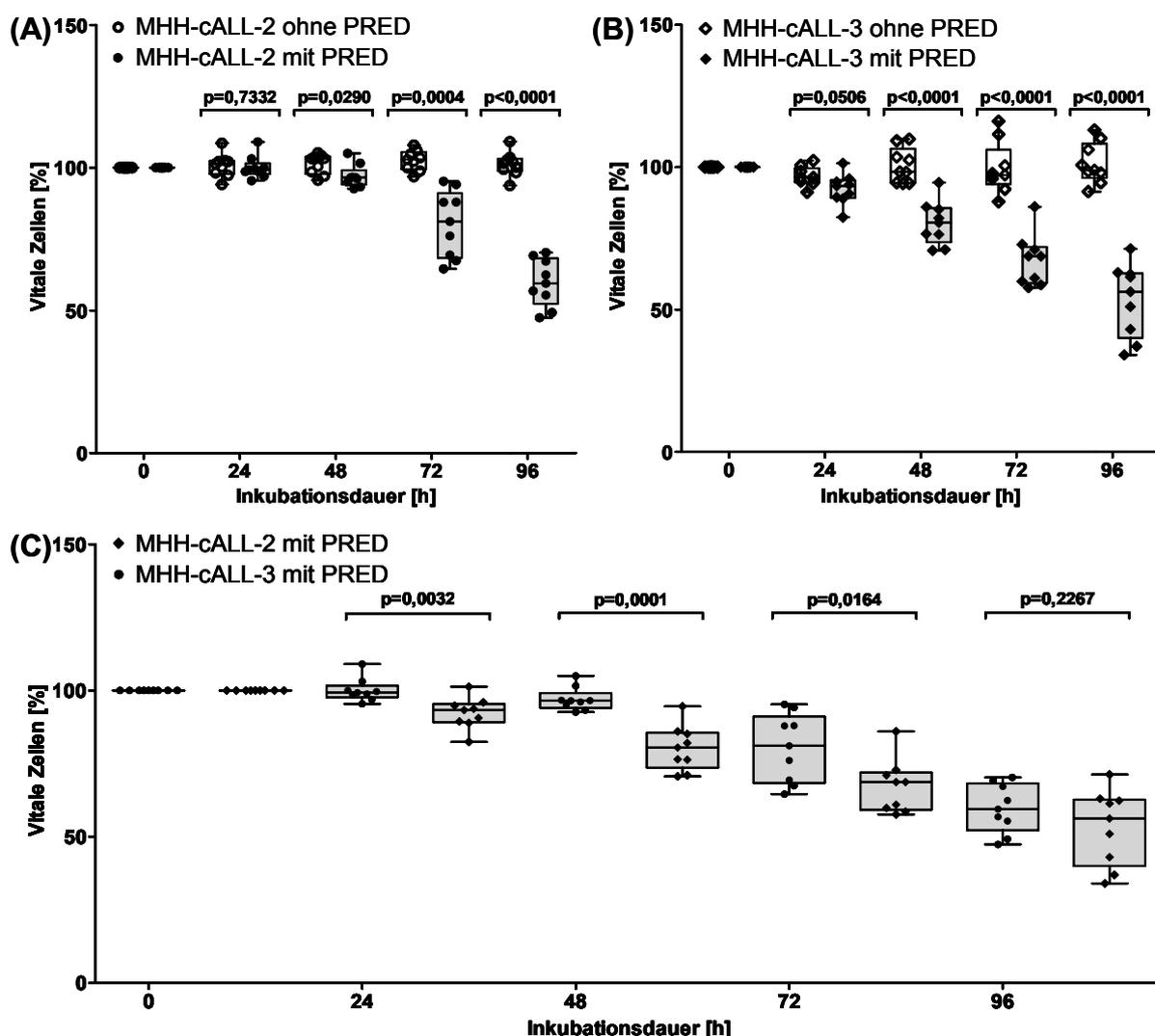


Abbildung 3-3: Ergebnisse der Trypanblau-Färbungen nach Behandlung mit Prednisolon.

Die Abbildungen zeigen den Prozentanteil der vitalen, also Trypan-Blau- negativen, Zellen. Die beiden oberen Diagramme zeigen die Resultate der Zelllinien (A) MHH-cALL-2 und (B) MHH-cALL-3 zu den jeweiligen Zeitpunkten mit und ohne Prednisolon. (C) Direkter Vergleich der Zelllinien nach Prednisolon-Behandlung. Die in der Abbildung notierten p-Werte, resultieren aus einer statistischen Analyse der Mittelwerte, mittels *Students'-t-Test*.

3.1.2 Einfluss der Bortezomib-Einzelbehandlung auf die Vitalität

Initiale Zellkulturexperimente zeigten, dass der Proteasomen-Inhibitor Bortezomib bereits in nanomolaren Konzentrationen eine anti-proliferative Wirkung auf alle untersuchten ALL-Zelllinien besaß. Aus der Literatur ist bekannt, dass sich die IC_{50} -Konzentrationen, die für eine Reihe von ALL-Zelllinien nach 48 h und 72 h bestimmt wurden, nicht wesentlich unterscheiden⁽²¹⁹⁾, daher wurden die IC_{50} -Konzentration für die vorliegende Arbeit zum Zeitpunkt 48 h austitriert. Für die Bestimmung der IC_{50} -Konzentration der Zelllinien MHH-cALL-2 und -3 wurden verschiedene Konzentrationen, im Bereich von 1 bis 20 nM Bortezomib, getestet.

Die Bestimmung der metabolischen Aktivität der Zellen wurde wie in Kapitel 2.4.4 beschrieben durchgeführt. Zur Durchführung einer nichtlinearen 4-Parameter-Dosis-Wirkungs-Analyse, mit variabler Steigung, wurden die resultierenden Daten gegen den Logarithmus der Bortezomib-Konzentration aufgetragen (Abbildung 6-2). Die aus dieser Auswertung resultierenden IC_{50} -Konzentrationen betragen für die Zelllinie MHH-cALL-2 7,22 nM und für die MHH-cALL-3 7,48 nM Bortezomib. Diese mathematisch bestimmten Konzentrationen für diese beiden Zelllinien, konnten durch Untersuchungen mit 7 nM Bortezomib bestätigt werden.

3.1.3 Untersuchungen zur Vitalität und Apoptose-Induktion nach Behandlung mit Prednisolon und Bortezomib

In Abbildung 3-4 sind die Ergebnisse der WST-1-Zellvitalitäts-Assays der Behandlungsversuche nach 48 h, mit Prednisolon und Bortezomib zusammengefasst. Die Daten wurden zur unbehandelten Kontrolle desselben Zeitpunkts normalisiert. Während die Prednisolon-Einzelbehandlung zu diesem Zeitpunkt nur bei der Zelllinie MHH-cALL-3 einen deutlich vitalitätsmindernden Effekt hatte, zeigte sich bei beiden Zelllinien nach der Bortezomib Einzelbehandlung eine Dosis-abhängige Reduktion der metabolischen Aktivität bzw. der Vitalität. Eine Kombination von Bortezomib und Prednisolon führte hauptsächlich bei der Zelllinie MHH-cALL-3 zu einer verstärkten Reduktion der Stoffwechselaktivität der Zellen. Obwohl die Kombination Prednisolon und 1,5 nM Bortezomib bei der Zelllinie MHH-cALL-2 eine ähnlich vitalitätsmindernde Tendenz besaß, bewirkten die höheren Konzentrationen das Gegenteil. Mit Hilfe eines *Einstichproben-t-Tests* konnte gezeigt werden, dass alle Behandlungen, außer der bei der Zelllinie MHH-cALL-3, mit 1,5 nM Bortezomib, eine im Vergleich zur Kontrolle eindeutig niedrigere Stoffwechselaktivität induzierten.

Neben den in Abbildung 3-4 dargestellten Analysen zum Zeitpunkt 48 h wurde auch die Entwicklung der metabolischen Aktivität über den Verlauf eines Verdopplungszeitraums untersucht. Die Zelllinien wurden dazu mit Prednisolon und 1,5 nM bzw. 7 nM Bortezomib behandelt, entweder einzeln oder in Kombination. Die resultierenden Daten wurden zu denen der jeweiligen unbehandelten Kontrollen, zum Zeitpunkt 0 h, normalisiert (Abbildung 3-7)

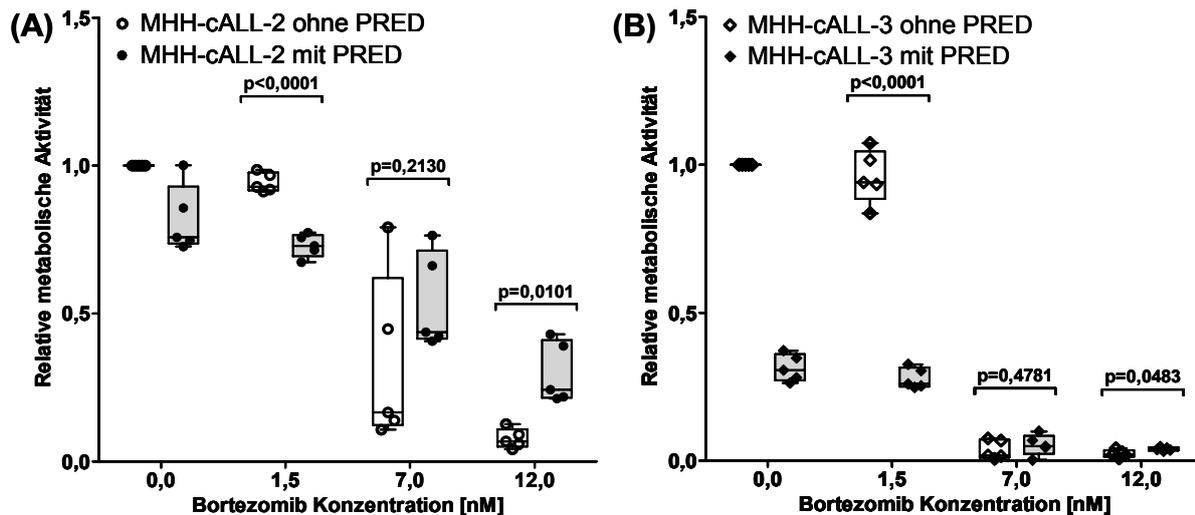


Abbildung 3-4: Graphische Darstellung der Ergebnisse der WST-1-Zellvitalitäts-Assays.

Mit Hilfe des WST-1-Reagenzes wurde die metabolische Aktivität der Zelllinien (A) MHH-cALL-2 und (B) MHH-cALL-3, 48h nach der Behandlung mit Prednisolon und Bortezomib bestimmt. Die Boxplots der mit Prednisolon behandelten Zellen sind grau hinterlegt. Die horizontalen Linien repräsentieren die Mediane. Die in der Abbildung notierten p-Werte, resultieren aus einer statistischen Analyse der Mittelwerte, mittels *Students' t-Test*.

Prednisolon führte bei beiden Zelllinien zum Zeitpunkt 96 h zu einer vergleichbaren Reduktion der Vitalität, wobei die Zelllinie MHH-cALL-2 später reagierte. Die Vitalität der beiden Zelllinien wurde durch Einzelbehandlung von 1,5 nM Bortezomib nicht reduziert. Der Einsatz von 7 nM Bortezomib führte zu einem deutlichen anti-proliferativen Effekt. Auffällig war, dass im Vergleich zur Prednisolon-Einzelbehandlung die kombinierte Behandlung mit 1,5 nM des Proteasominhibitors bei beiden Zelllinien die Stoffwechselaktivität im Verlauf verstärkt reduzierte. Die größten Unterschiede zwischen den Behandlungen ließen sich jedoch nach 48 h feststellen.

3.1.4 Dosis-abhängige Induktion Caspase-vermittelter Apoptose

Die Ergebnisse der Apoptose-Caspase3/7-Aktivitäts-Assays, 24 h nach der Behandlung, wurden zu parallel durchgeführten WST-1-Zellvitalitäts-Assays desselben Zeitpunkts und zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle normalisiert. Eine vorhergehende Testreihe zeigte, dass die höchste Caspase3/7-Aktivität unter Einsatz der getesteten Medikamente nach 24 h Inkubation erreicht wurde. In Abbildung 3-5 ist zu sehen, dass nur bei der Zelllinie MHH-cALL-3 eine Einzelbehandlung mit Prednisolon zu einer gesteigerten Caspase-Aktivität führte, bei der weniger GC-sensitiven Zelllinie MHH-cALL-2 jedoch zu einer Verminderung. Ein *Einstichproben-t-Test* zeigte, dass beide Veränderungen eindeutig unterschiedlich zur Kontrolle waren.

Die Einzelbehandlung mit 7 nM Bortezomib induzierte bei beiden Zelllinien eine ca. 6-fache Erhöhung der Caspase-Aktivität, während 12 nM zu einer 40- bzw. 60-fachen Steigerung führten. Die Einzelbehandlung mit der kleinsten Dosis bewirkte keinerlei Apoptose-Induktion. Die Zelllinie MHH-cALL-3 reagierte auf die Kombinationsbehandlung mit 1,5 nM

Bortezomib mit einer ähnlich hohen Steigerung der Apoptose wie bei der Prednisolon-Einzelbehandlung. Bei den höheren Konzentrationen führten die Kombinations-Behandlungen nur bei dieser Zelllinie zu gleich hoher Caspase-Aktivität wie die Einzelbehandlungen. Im Gegensatz dazu besaß die Zelllinie MHH-cALL-2 interessanterweise eine signifikant geringere Caspase-Aktivität im Vergleich zur Einzelbehandlung. Die Durchführung eines *Einstichproben-t-Tests* zeigte, dass alle Bortezomib-Behandlungen, außer denen mit 1,5 nM, eine im Vergleich zur Kontrolle signifikant höhere Caspase-Aktivität induzierten.

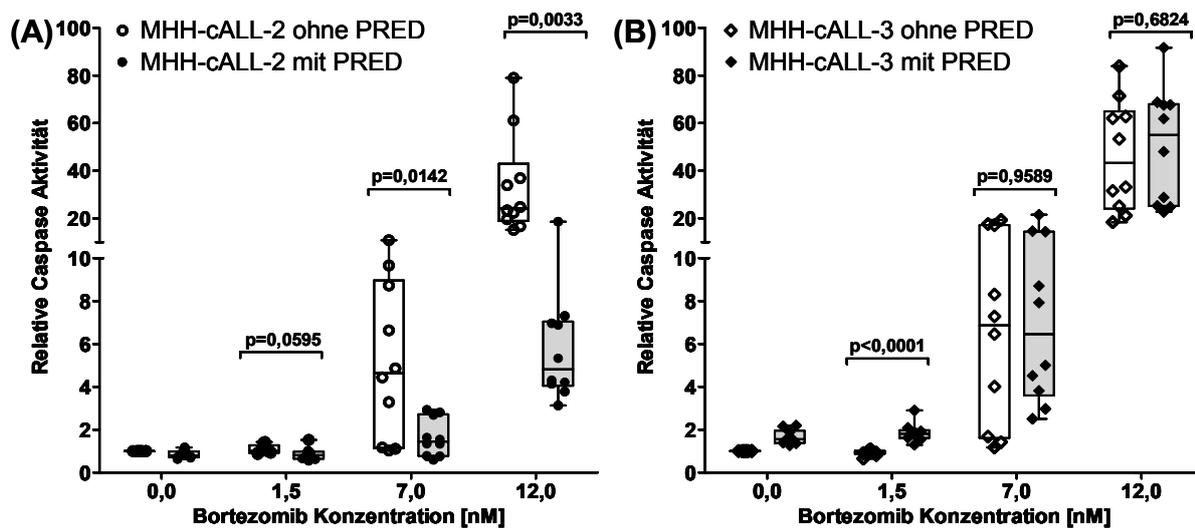


Abbildung 3-5: Graphische Darstellung der Ergebnisse der Apoptose-Caspase3/7-Aktivitäts-Assays. Mit Hilfe des Caspase3/7-Aktivitäts-Assays wurde der Anteil apoptotischer Zellen 24 h nach der Behandlung mit Prednisolon und Bortezomib, in den Zelllinien (A) MHH-cALL-2 und (B) MHH-cALL-3, bestimmt. Die Boxplots der mit Prednisolon behandelten Zellen sind grau hinterlegt. Die horizontalen Linien beschreiben den Median. Die in der Abbildung notierten p-Werte, resultieren aus einer statistischen Analyse der Mittelwerte, mittels *Students' t-Test*.

Aus der Literatur ist bekannt, dass die Effektor-Caspasen-3 und -7 am Ende der Caspase-vermittelten Apoptose-Kaskade stehen. Um zu untersuchen, welcher Apoptose-Signalweg durch Prednisolon und Bortezomib aktiviert wird, wurde die Aktivität der Initiator-Caspase-8 nach 8, 24 und 48 h gemessen. Die mit Lumineszenz-Assays nach 8 und 24 h quantifizierten Caspase-8-Aktivitäten der behandelten Zellen, waren jedoch höher als die der unbehandelten. Erst 48 Stunden nach der Behandlung war eine leichte Erhöhung nachweisbar.

3.1.5 Dosis-abhängige Zunahme letaler, Propidiumiodid(PI)-positiver Zellen

Zusätzlich zu den bisher beschriebenen Analysen wurde zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten an den Zellen auch eine PI-Färbung durchgeführt. Für die Quantifizierung apoptotischer Zellen wurde das Lumineszenz-basierte Caspase3/7-Assay durchgeführt.

Für die FACS-Untersuchungen wurden die Zellen, wie beim WST-1-Vitalitäts-Assay, maximal 96 h nach der Medikamentengabe untersucht. Die daraus resultierenden Daten sind

in Abbildung 3-6 und Abbildung 6-4 zusammengefasst. Die größten Unterschiede zwischen den Behandlungen ließen sich jedoch nach einer Inkubationszeit von 72 h feststellen.

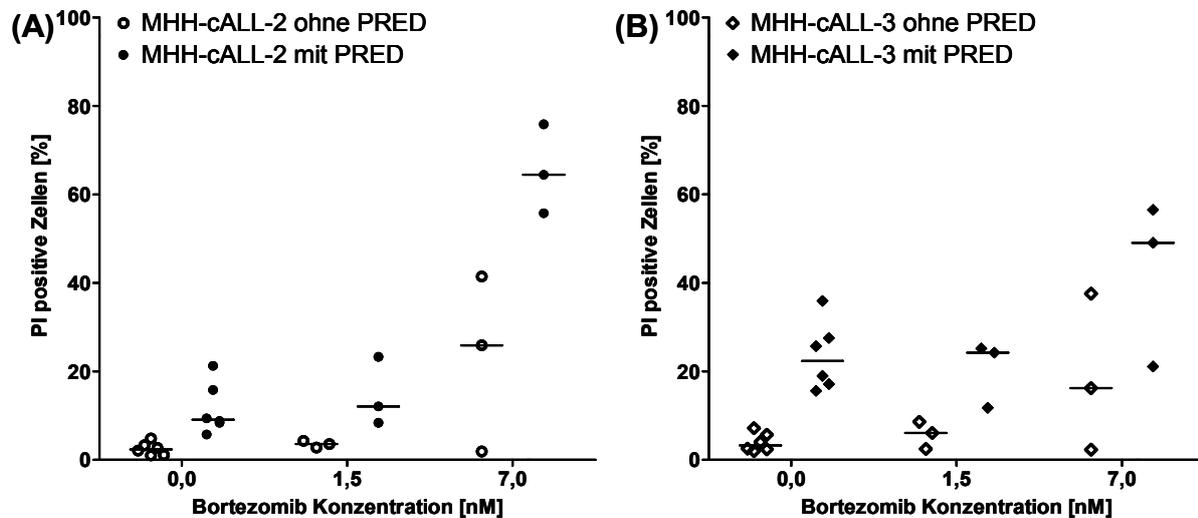


Abbildung 3-6: Graphische Darstellung der Ergebnisse der PI-Färbung letaler Zellen.

Die Zelllinien (A) MHH-cALL-2 und (B) MHH-cALL-3 wurden 72 h nach der Behandlung mit Prednisolon und Bortezomib mit Propidiumiodid (PI) gefärbt. Die horizontalen Linien beschreiben den Median. Der Anteil der letalen, PI-positiven Zellen wurde durchflusszytometrisch quantifiziert.

Die Einzelbehandlung mit Prednisolon führte bei der Zelllinie MHH-cALL-3 zu einer deutlich höheren und 24 h früher einsetzenden PI-Positivität, als bei der Zelllinie MHH-cALL-2. Während die Einzelbehandlung mit 1,5 nM Bortezomib nicht zu einer Erhöhung der Letalität führte, steigerte die kombinierte Behandlung mit dieser Dosis den Anteil PI-positiver Zellen auf rund 20 % bei 72 h. Bei Steigerung der Konzentration konnte ebenfalls eine Verstärkung festgestellt werden. So reagierte die Zelllinie MHH-cALL-2, bei Einzelbehandlung mit 7 nM Bortezomib mit einer Steigerung auf mehr als 20 % innerhalb von 48 h. Eine maximale Erhöhung der Letalität wurde durch die kombinierte Behandlung mit dieser Dosis bei 72 h induziert. Bei den MHH-cALL-3 waren 42 % und bei den MHH-cALL-2 ca. 60 % Zellen PI-positiv.

3.1.6 Nekrotische und apoptotische Spaltung der Poly-(ADP-ribose)-Polymerase-1

Aus der Diskrepanz zwischen der festgestellten Vitalitäts-Verminderung und der Letalitäts-Zunahme zur Apoptose-Induktion der Zelllinie MHH-cALL-2 nach kombinierter Behandlung ergab sich die Fragestellung nach der Art des induzierten Zelltods. Die dazu durchgeführte Analyse des PARP-1-Spaltungsmusters wurde jeweils 48 h nach der Stimulation der Zellen an Proben aus vier unabhängigen Experimenten vorgenommen. Das ungespaltene Protein besitzt eine Größe von 116 kDa. Durch Caspase-vermittelte apoptotische Spaltung entsteht ein 89 kDa großes Fragment. Charakteristisch für Nekrose sind dagegen, die durch die lysosomalen Cathepsine B und D prozessierten Spaltprodukte der Größen 72 und 55 kDa⁽²⁰⁵⁾.

In Kontroll-Analysen (Abbildung 6-8) konnte gezeigt werden, dass unter Verwendung der bekannten Nekrose induzierenden Agenzien Wasserstoffperoxid und Ethanol ebenfalls

geringe Menge des 89 kDa großen PARP-1-Spaltproduktes entstand. Die detektierte Signalstärke der zugehörigen Bande fiel im Vergleich zu den stark ausgeprägten nekrotischen Fragmenten jedoch geringer aus. Die Behandlung mit 10 % Ethanol hatte auf die Zelllinie MHH-cALL-2 einen geringeren Nekrose-induzierenden Effekt, als die mit 0,1 % Wasserstoffperoxid. Wie in Abbildung 6-8 (A) in den Spalten 1 und 2 sowie in (B) in den Spalten 1 und 4 zu sehen ist, waren dagegen bei den Zelllinien MHH-cALL-3 und -4 die Spaltungsmuster sehr ähnlich.

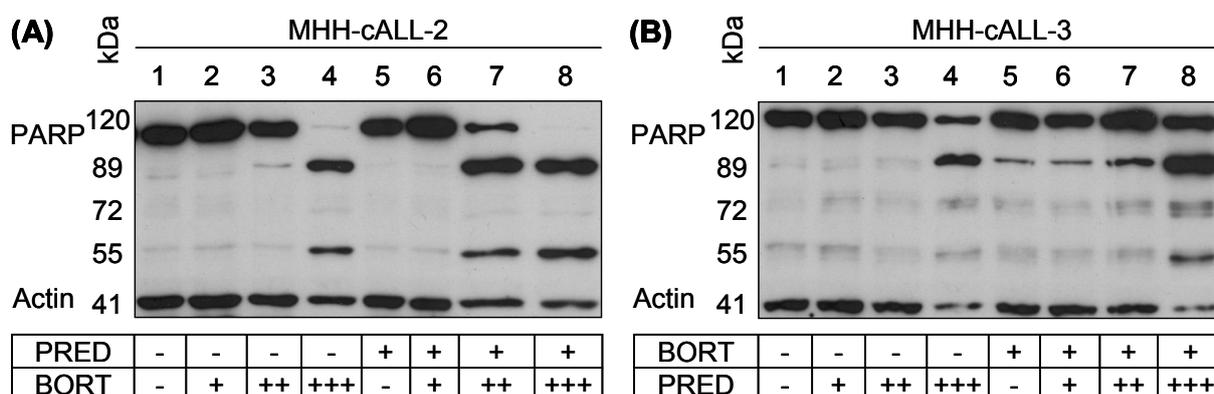


Abbildung 3-7: Exemplarische Western-Blot-Analyse des PARP-1-(PARP) Spaltungsmusters.

Die untersuchten Gesamtzelllysate der Zelllinien (A) MHH-cALL-2 und (B) MHH-cALL-3 wurden 48 h nach der Behandlung mit Prednisolon (PRED) und Bortezomib (BORT) isoliert. Die Symbole kennzeichnen die eingesetzte Konzentration der Medikamente. PRED : ohne (-); mit 6,2 μ M (+); BORT: ohne (-); mit 1,5 nM (+); 7,0 nM (++) und 12 nM (+++).

Mit Hilfe von Western-Blot-Analysen (siehe Abbildung 3-7 und Abbildung 6-7) wurde daher durch den Vergleich zu den Kontrollanalysen demonstriert, dass die Gabe von Prednisolon bei der Zelllinie MHH-cALL-2 nicht zu einer apoptotischen Spaltung des PARP-1-Proteins führte, anders als bei der MHH-cALL-3. Die Einzelbehandlungen mit 7 und 12 nM Bortezomib induzierten hauptsächlich die apoptotische PARP-1-Spaltung bei beiden Zelllinien. Dagegen erzeugten die Kombinationsbehandlungen mit besonders bei der Zelllinie

3.1.7 Untersuchung zur Lagerbarkeit von Bortezomib-Lösungen

Bortezomib wird vom Hersteller als Lyophilisat vertrieben. Es existieren verschiedene Informationen darüber, wie lange die gelöste Substanz in Lösung stabil bleibt. Laut Herstellerangaben sollte Bortezomib, sobald es in der mitgelieferten 0,9 %-igen Kochsalzlösung resuspendiert wurde innerhalb weniger Stunden verwendet werden. Mit Hilfe von HPLC-Analysen und magnetischer Kernresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie) wurde jedoch gezeigt, dass Bortezomib in Form einer Stammlösung von 1 mg/mL für mindestens 1 Woche bei 4°C lichtgeschützt, ohne molekulare Veränderungen lagerbar ist⁽²²⁰⁻²²²⁾. Allerdings war nichts darüber bekannt, inwieweit sich die anti-proliferative Wirkung des Medikaments durch Lagerung verändert. In der vorliegenden Arbeit wurde daher getestet, ob eine am selben Tag frisch hergestellte und eine drei Tage unter den beschriebenen Bedingungen gelagerte Stammlösung eine unterschiedliche Wirksamkeit besitzen. Wie bei den anderen Experimenten wurden 1,5; 7 und 12 nM Bortezomib eingesetzt. Die Ergebnisse des WST-1-Vitalitäts-Assays und der Caspase-3/7-Aktivitätsmessung eines

Experiments sind exemplarisch in Abbildung 6-5 und in Abbildung 6-6 dargestellt. Die Resultate bestätigen, dass es durch die Lagerung der Bortezomib-Stammlösung zu einer deutlichen Verminderung der Wirkung kam. Sowohl die vitalitätsmindernde als auch die Apoptose-induzierende Wirkung des Bortezomibs der gelagerten Proben war herabgesetzt. Aus diesem Grund wurden in den Experimenten für die vorliegende Arbeit nur frische Bortezomib-Lösung eingesetzt.

3.2 Einfluss von Prednisolon und Bortezomib auf die Expression der Zielgene

Das Chaperonin des Ubiquitin-Proteasom-Degradationsweges, VCP, interagiert mit dem NF κ B-Signalweg über Bindung des I κ B⁽⁹¹⁾. Aus diesem Grund war zu erwarten, dass eine Stimulation dieser Signalwege mit Glucocorticoiden oder Bortezomib zu einer Regulation dieser Gene führt. Die RT-PCR-Analysen wurden wie in Kapitel 2.3.11 beschrieben durchgeführt. Die Resultate der untersuchten Proben wurden sowohl gegen die Ergebnisse, der als interner Kalibrator verwendeten *Human Reference RNA*, als auch gegen die Expression des *TBP*-Gens normalisiert. Während in der initial exprimierten Menge der *I κ B*-RNA keine Unterschiede zwischen den Zelllinien bestanden, wiesen die MHH-cALL-2-Zellen eine 1,9-fach höhere *VCP*-RNA-Expression auf, als die MHH-cALL-3-Zellen (Abbildung 6-10). Die Behandlungen mit den verschiedenen Medikamenten beeinflussten nicht nur die Vitalität der Zellen, sondern induzierten auch eine veränderte RNA-Expression der untersuchten Zielgene *I κ B* und *VCP*.

3.2.1 RNA-Expression der Zielgene *VCP* und *I κ B* mit Behandlung durch Prednisolon

Die Behandlung mit 6,2 μ M Prednisolon induzierte in beiden Zelllinien eine Erhöhung der *I κ B*-Expression. Die maximale Expression der Zelllinie MHH-cALL-3 wurde nach 24 h erreicht, sie war 2,2-fach höher als in unbehandelten Zellen. Die Zelllinie MHH-cALL-2 zeigte ihr Maximum von 3,4-fach dagegen erst nach 48 h. Die Prednisolon-Behandlung erzeugte nur in der Zelllinie MHH-cALL-2 einen Anstieg der *VCP*-RNA auf das 1,8-fache im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Dieses Maximum wurde nach 72 h Stimulation erreicht. Die *VCP*-Expression auf RNA-Ebene blieb bis 96 h in dieser Zelllinie erhöht.

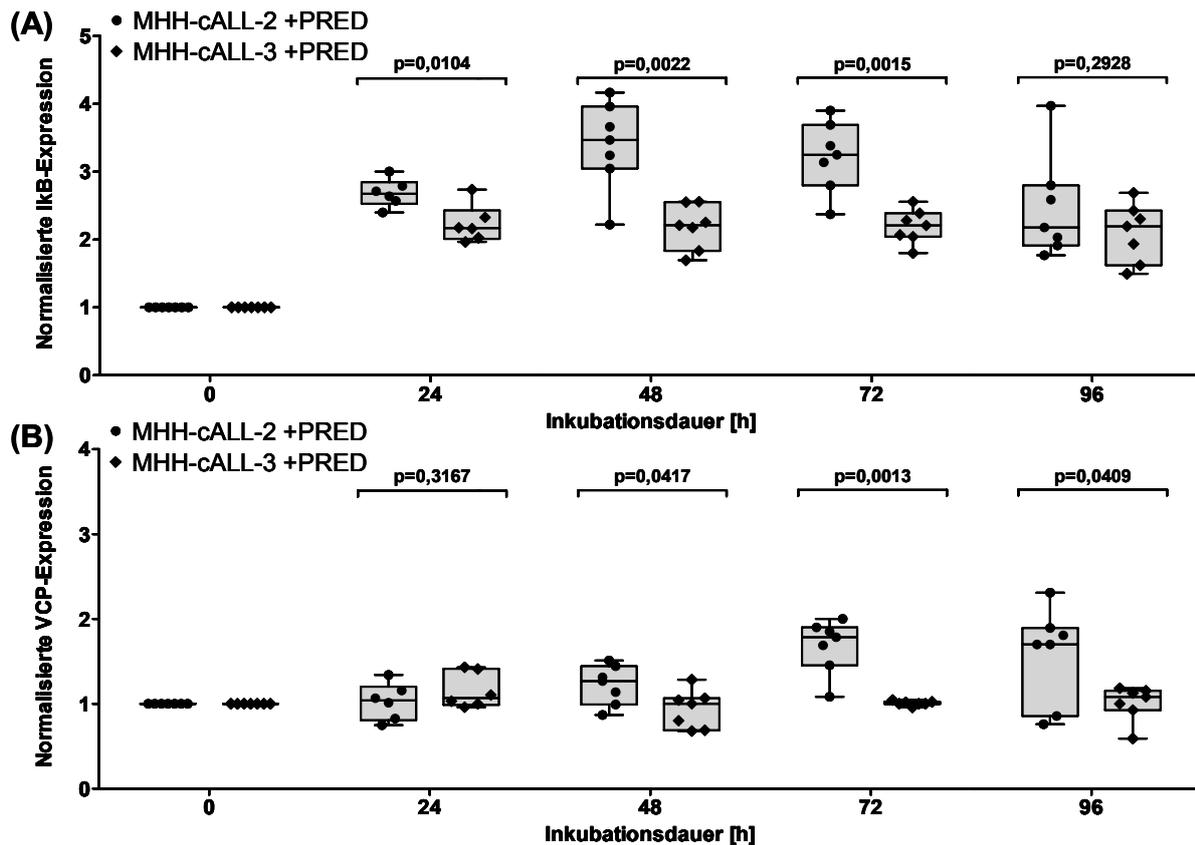


Abbildung 3-8: Graphische Darstellung der Ergebnisse der RT-PCR-Analysen.

Mit Hilfe der RT-PCR-Analysen wurde die mRNA-Expression der Zielgene (A) *IκB* und (B) *VCP* in den Zelllinien MHH-cALL-2 und -3, von 0 bis 96h nach der Behandlung mit Prednisolon quantifiziert. Die horizontalen Linien repräsentieren die Mediane. Die in der Abbildung notierten p-Werte, resultieren aus einer statistischen Analyse der Mittelwerte, mittels *Students' t*-Test.

3.2.2 RNA-Expression der Zielgene *VCP* und *IκB* mit Behandlung durch Bortezomib mit und ohne Kombination von Prednisolon

Die kombinierte Behandlung mit 1,5 nM Bortezomib und Prednisolon führte in beiden Zelllinien zu ähnlichen Expressionsmustern wie die Prednisolon-Einzelbehandlung, während die Einzelbehandlung mit dieser Konzentration zu keinerlei Veränderungen führte (Abbildung 6-12).

Im Gegensatz dazu beeinflusste die Behandlung mit 7 nM Bortezomib die Expressionsmuster beider Zelllinien (Abbildung 3-9). Die Einzelbehandlung verursachte zwar keine Veränderung der *IκB*-Expression, erhöhte aber bereits innerhalb von 24 h die *VCP*-Expression beider Zelllinien auf mehr als das Zweifache verglichen zu unbehandelten Zellen. In den MHH-cALL-2 Zellen wurde die maximale *VCP*-Expression von 2,9-fach bereits nach 48 h detektiert. Anders als nach der Prednisolon-Einzelbehandlung (Abbildung 3-8) folgte dem Maximum eine konstante Abnahme der *VCP*-Expression bis zum initialen Niveau in beiden Zelllinien.

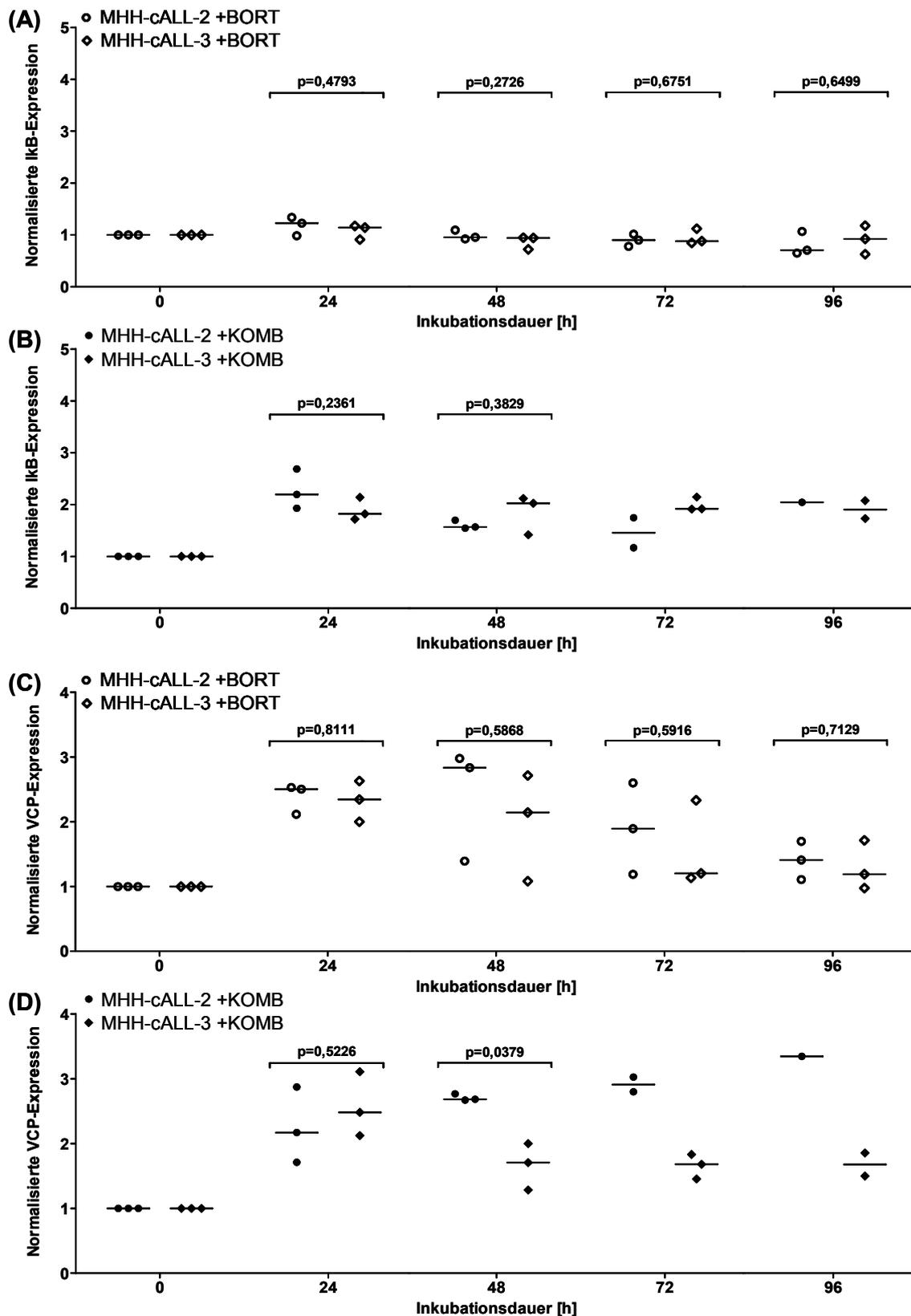


Abbildung 3-9: RNA-Expression der Zielgene *IκB* und *VCP* im zeitlichen Verlauf.

Detektierte Zielgenexpression nach der Behandlung der Zelllinien MHH-cALL-2 und -3 mit ((A) und (C)) 7,0 nM Bortezomib oder ((B) und (D)) der kombinierten Behandlung dieser Konzentration mit Prednisolon. Die RT-PCR-Analysen wurden im Vergleich zu einer Kalibrator-RNA aus 10 verschiedenen humanen Tumorzelllinien durchgeführt und die Ergebnisse der Analysen wurden gegen die Expression des *TBP*-Gens normalisiert. Die horizontalen Linien repräsentieren den Median.

Anders als die Einzelbehandlung stimulierte die Kombination mit 7 nM Bortezomib auch die *IκB*-Expression beider Zelllinien. In der Zelllinie MHH-cALL-2 induzierte sie innerhalb von 24 h eine *IκB*-Erhöhung auf die 2,4-fache Menge verglichen zur unbehandelten Kontrolle. Die höchste *VCP*-Expression (2,7-fach) dieser Zelllinie wurde nach 48 h detektiert.

Verglichen mit der Prednisolon-Einzelbehandlung (Abbildung 3-8) wurde die in den MHH-cALL-2-Zellen festgestellte maximale *IκB*-Expression sowohl durch die Einzel- als auch durch die Kombinationsbehandlung mit Bortezomib deutlich reduziert. Außerdem trat das Maximum früher nach der Stimulation ein. Beides traf ebenso für die *VCP*-Expression zu.

3.2.3 Einfluss von Prednisolon und Bortezomib auf die *Katalase*-RNA-Expression

Die Untersuchung der *Katalase*-Expression unbehandelter Zellen zeigte, dass in der Zelllinie MHH-cALL-3 1,5-fach mehr exprimiert wurde als in der Zelllinie MHH-cALL-2 (Abbildung 6-11). Die Behandlung mit Prednisolon und 1,5 nM Bortezomib führten in beiden Zelllinien zu einem ähnlichen Verlauf der Expression, proportional zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle (Abbildung 6-13).

3.2.4 RNA-Expressions-Analyse mittels *Automated Multiplexed Gene Expression Profiling* (GeXP)-Fragmentanalyse an ALL-Zelllinien

Die Methode der GeXP-Fragmentanalyse wurde etabliert, um zusätzlich zur oben beschriebenen herkömmlichen Real-Time-PCR mit dem LightCycler-System globalere Gen-Expressionsmuster untersuchen zu können. Der Einsatz dieser Methode ermöglichte es mit Hilfe eines speziell zusammengestellten Primersets in einer einzigen Expressions-Analyse sechzehn verschiedene Gene gleichzeitig zu untersuchen. Für die Untersuchungen zu der vorliegenden Arbeit wurden sechzehn Gene ausgewählt (Tabelle 2-11) die bereits durch Microarray-Experimente als mögliche Klassifikatoren im Zusammenhang mit der GC-Resistenz in Erscheinung getreten waren^(27, 223). Ziel war es die Methode so weit zu etablieren, dass sie möglicherweise auch zur Unterscheidung von GC-resistenten und GC-sensitiven Patienten eingesetzt werden kann. Die GeXP-Fragmentanalyse würde außerdem die Validierung von Microarray-Analysen vereinfachen und verbessern, da im Vergleich zur herkömmlichen RT-PCR weniger kostbares Patientenmaterial eingesetzt und weniger PCR-Reaktionen durchgeführt werden müssten. Die Optimierung der PCR-Bedingungen und Primer gestaltete sich jedoch als sehr zeitaufwendig. Zur Gewährleistung eines optimalen Ergebnisses, musste die Konzentration der einzelnen Primer für die gemeinsame PCR-Reaktion ausgetestet werden. Die Konzentration war unter anderen Faktoren vor allem abhängig von der Expressionsstärke der einzelnen Gene, damit sich die aus der Messung resultierenden Peaks der einzelnen Fragmente nicht gegenseitig beeinflussten. Exemplarisch wurden einzelne Zellkulturversuche, durchgeführt mit 1,5 nM Bortezomib und Prednisolon, die bereits mit Hilfe der herkömmlichen RT-PCR untersucht worden waren, mit dem GeXP-System getestet. Es zeigte sich eine weitgehende Übereinstimmung in den Resultaten für die intensiv untersuchten Zielgene *VCP*, *IκB* und *Katalase*. In weiteren Analysen wurde das

Expressionsprofil der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Zelllinien im Vergleich zur *Human Reference RNA* gemessen (Abbildung 3-10). Auch hier stimmten die Resultate für die Zelllinien MHH-cALL-2 und -3 mit denen aus den herkömmlichen RT-PCR-Analysen weitgehend überein. Auffällig ist, dass sich das Expressionsprofil der GC-resistenten Zelllinie SD-1 im Vergleich zu denen der anderen untersuchten Prä-B-ALL-Zelllinien deutlich unterscheidet. Die *VCP*-Expression dieser Zelllinie und die der ebenfalls resistenten MHH-cALL-2 ist im Vergleich zu den übrigen ALL-Zelllinien deutlich erhöht. Die Expression der Zelllinien REH und Jurkat, welche beide zwar ebenfalls GC-resistent sind, jedoch beide einen defekten GC-Rezeptor besitzen war nicht erhöht. Des Weiteren wies keine der GC-resistenten Zelllinien eine Erhöhung der *Katalase*-Expression auf. Die Resultate für *IκB* und *NFκB* und für die anderen untersuchten Gene erwiesen sich als heterogen.

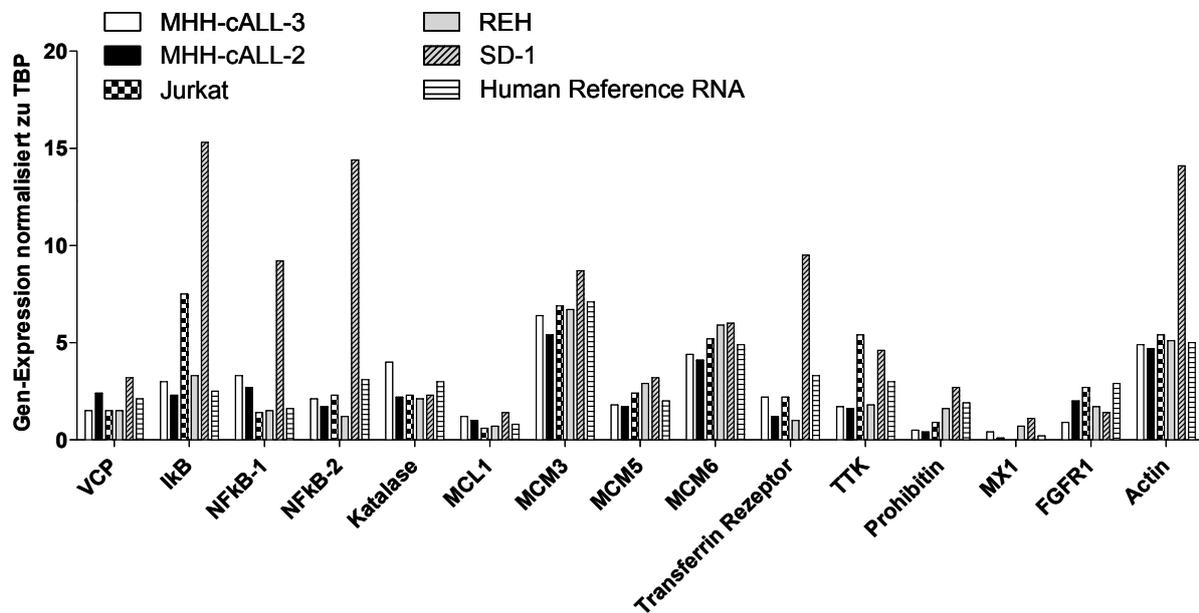


Abbildung 3-10: Exemplarische GeXP-RNA-Expressionsanalyse an unbehandelten ALL-Zelllinien im Vergleich zur *Human Reference RNA*. Die RNA-Mengen der Zielgene wurden gegen die *TBP*-Expression normalisiert.

Es handelte sich bei den bisher durchgeführten Untersuchung jedoch um exemplarische Analysen, daher müssen die vorliegenden Resultate für eine gesicherte Aussage durch systematische Studien an einer größeren Zahl von Zelllinien bekannter GC-Sensitivität genauer erforscht werden. Die aus den GeXP-Analysen resultierenden Daten legen nahe, dass es sich bei dieser Methode um ein zukunftssträchtiges System handelt.

3.3 Expression und Lokalisierung der Proteine I κ B und VCP mit und ohne Behandlung mit Prednisolon und Bortezomib

3.3.2 Protein-Expression von VCP und seiner Interaktionspartner aus dem Ubiquitin-Proteasom-Degradationsweg (I κ B, Proteasom, NF κ B und Hsp60)

Zur Analyse der Proteinexpression wurden Western-Blot-Analysen an Gesamtzelllysaten mit und ohne Behandlung von 0 bis 96 h durchgeführt. Je nach Behandlung wurde eine maximale Veränderung der Expressionsmuster nach 48 oder 72 h beobachtet. Bei den Behandlungen mit 7 und 12 nM Bortezomib konnten Protein-Expressionsanalysen wegen des großen Anteils letaler Zellen nur bis 48 h durchgeführt werden. Die Intensität der mit Hilfe der immunologischen Nachweisreaktion detektierten Banden wurde mittels densitometrischer Auswertung quantifiziert (Kapitel 2.3.7). Die Resultate der Zielproteine wurden gegen die von Actin normalisiert.

Die Auswertung von siebzehn Western-Blot-Analysen zu unbehandelten Proben aus unabhängigen Experimenten zeigte, dass beide Zelllinien eine gleich hohe I κ B-Protein-Expression aufwiesen (Abbildung 6-14(A)). Im Gegensatz dazu war die in vierundzwanzig Western-Blots quantifizierte VCP-Expression der Zelllinie MHH-cALL-2 1,5-fach höhere als die der Zelllinie MHH-cALL-3 (Abbildung 6-14(B)).

Prednisolon-Einzelbehandlung erhöhte die I κ B-Expression innerhalb von 48 h in beiden Zelllinien auf fast das zweifache der initialen Menge, dies wurde mittels Western-Blot-Analysen und densitometrischer Auswertung der Bandenintensitäten belegt (Abbildung 3-11 und Abbildung 6-16).

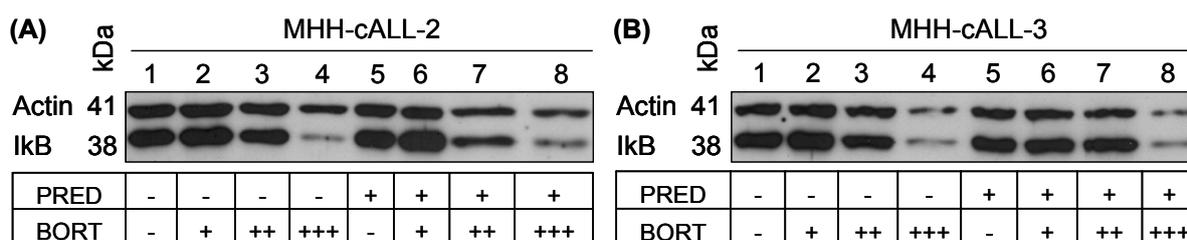


Abbildung 3-11: I κ B-Protein-Expression nach 48 h.

Exemplarische Western-Blot-Analyse von Gesamtzelllysaten der Zelllinien (A) MHH-cALL-2 und (B) MHH-cALL-3, 48 h nach der Behandlung mit Prednisolon und Bortezomib. Die Symbole kennzeichnen die eingesetzte Konzentration der Medikamente. PRED : ohne (-); mit 6,2 μ M (+); BORT: ohne (-); mit 1,5 nM (+); 7,0 nM (++) und 12 nM (+++).

Die GC-Stimulation bewirkte innerhalb dieses Zeitraums keine Veränderung der VCP-Expression im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Der Einsatz von 1,5 nM Bortezomib veränderte die Expression der Zielproteine nur wenig im Vergleich zur Prednisolon-Behandlung. Lediglich die Kombinationsbehandlung mit dieser Dosis führte zu einer deutlichen Steigerung der I κ B Expression in der MHH-cALL-2 Zelllinie.

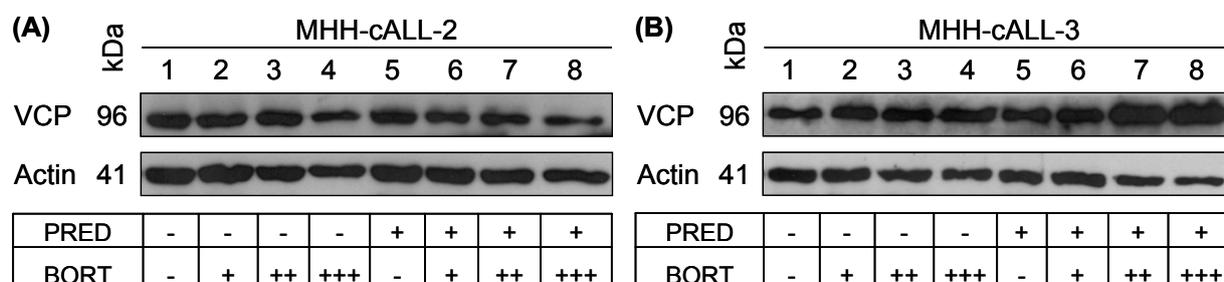


Abbildung 3-12: VCP-Protein-Expression nach 48 h.

Exemplarische Western-Blot-Analyse von Gesamtzelllysaten der Zelllinien (A) MHH-cALL-2 und (B) MHH-cALL-3, 48 h nach der Behandlung mit Prednisolon und Bortezomib. Die Symbole kennzeichnen die eingesetzte Konzentration der Medikamente. PRED : ohne (-); mit 6,2 μ M (+); BORT: ohne (-); mit 1,5 nM (+); 7,0 nM (++) und 12 nM (+++).

Im Gegensatz dazu bewirkten 7 und 12 nM Bortezomib eine deutliche Reduktion der $\text{I}\kappa\text{B}$ -Expression bei beiden Zelllinien innerhalb von 48 h. Die Behandlung der Zelllinie MHH-cALL-2 mit diesen hohen Dosen des Inhibitors führte außerdem zu einer leichten VCP-Reduktion. Während in der Zelllinie MHH-cALL-3 interessanterweise eine Erhöhung auf das Zweifache des initialen VCP-Niveaus festgestellt wurde (Abbildungen 3-12 und 6-17).

Die Expression des 20S-Proteasoms wurde durch die Expressionsanalyse der Proteinuntereinheit alpha-5 im Western-Blot untersucht, sie war in beiden Zelllinien initial vergleichbar hoch und wurde nicht durch die Behandlung beeinflusst. Jedoch wurde bei zunehmender Letalität der Zellen weniger detektiert, korrelierend zur abnehmenden Menge Actins (Abbildung 3-13).



Abbildung 3-13: 20S-Protein-Expression nach 48 h Behandlung.

Exemplarische Western-Blot-Analyse von Gesamtzelllysaten der Zelllinien (A) MHH-cALL-2 und (B) MHH-cALL-3, 48 h nach der Behandlung mit Prednisolon und Bortezomib. Die Symbole kennzeichnen die eingesetzte Konzentration der Medikamente. PRED : ohne (-); mit 6,2 μ M (+); BORT: ohne (-); mit 1,5 nM (+); 7,0 nM (++) und 12 nM (+++).

In Situationen in denen eine zelluläre Stressantwort ausgelöst wird sorgen Hitzeschockproteine (*heat shock proteins*) wie Hsp90, Hsp70 und Hsp60 für die Stabilisierung von Proteinen, um sie vor der Denaturierung zu schützen. Ebenso wie das VCP sorgen sie auch für den Transport nicht funktionsfähiger Proteine zum Proteasom. Mehreren Studien zur Folge handelt es sich bei dem Chaperonin Hsp60 außerdem um einen Apoptose regulierenden Faktor vor allem in Tumorzellen⁽²²⁴⁻²²⁶⁾. In Abbildung 3-14 ist exemplarisch eine von drei durchgeführten Western-Blot-Analysen zur Hsp60-Protein-Expression dargestellt. In unbehandelten Zellen wurde für die Zelllinie MHH-cALL-2 eine leicht höhere Expression im Vergleich zur MHH-cALL-3 festgestellt. Während die Bortezomib-Behandlungen bei dieser Zelllinie keinen Einfluss auf die Expression hatten, verminderte die

Prednisolon-Behandlung die Hsp60-Expression auf ein Drittel der ursprünglichen Menge (Abbildung 6-18). Im Gegensatz dazu wurde für die MHH-cALL-3 eine deutliche Expressionssteigerung auf das 20-fache der initial exprimierten Menge nach Gabe mit 12 nM Bortezomib in Kombination mit Prednisolon festgestellt (*Students-t-Test*, $p=0,2696$).

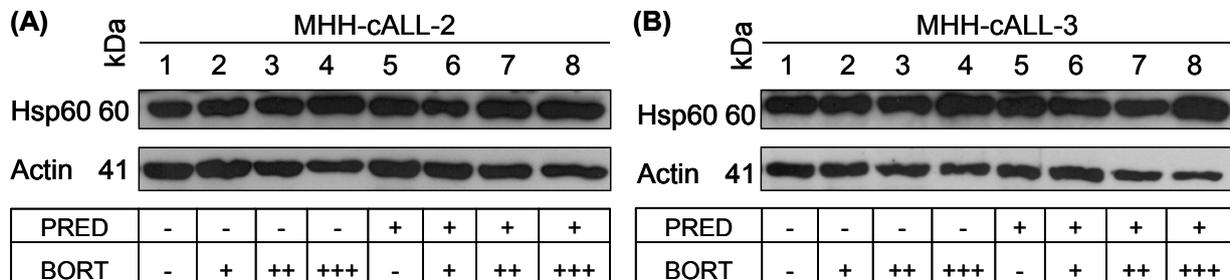


Abbildung 3-14: Expression des Hitzeschockproteins Hsp60.

Exemplarische Western-Blot-Analyse von Gesamtzelllysaten der Zelllinien (A) MHH-cALL-2 und (B) MHH-cALL-3, 48 h nach der Behandlung mit Prednisolon und Bortezomib. Die Symbole kennzeichnen die eingesetzte Konzentration der Medikamente. PRED : ohne (-); mit 6,2 μ M (+); BORT: ohne (-); mit 1,5 nM (+); 7,0 nM (++) und 12 nM (+++).

3.3.3 Zellfraktionierung zur Lokalisation der Zielproteine I κ B und NF κ B

Zur Untersuchung der Proteinlokalisierung und Erfassung möglicher Translokationen nach der Behandlung wurden Zellfraktionierungen durchgeführt. Der Focus der Untersuchungen lag hier auf der Lokalisierung der Proteine I κ B und NF κ B, da in humanen menschlichen Prostatakarzinom PC-3 Zellen nach Proteasomen-Inhibition eine Verlagerung des I κ Bs in den Kern beobachtet wurde⁽¹⁵⁴⁾. Diese PC-3-Zelllinie zeichnet sich durch eine konstitutive NF κ B-Aktivierung aus wie sie auch für die Mehrheit der akuten lymphoblastischen Leukämien gezeigt wurde⁽⁴⁰⁾. Getestet wurde die Lokalisation der Zielproteine in unbehandelten Zellen und unter Einfluss von 7 nM Bortezomib, 24 h nach der Behandlung (Abbildung 3-15). Die Tatsache, dass Lamin-B hauptsächlich im Zellkern und GAPDH ausschließlich im Zytoplasma detektiert wurde, belegte eine saubere Trennung der Fraktionen. Es wurde jedoch in drei unabhängigen Experimenten bei unbehandelten Zelllinien MHH-cALL-2 und -3 festgestellt, dass I κ B und die NF κ B-Untereinheit p50 nur im Zytoplasma nachweisbar sind. Durch die Bortezomib-Behandlung kam es in der zytoplasmatischen Fraktion zu einer Abnahme der Zielproteine. Außerdem wurden geringe Mengen des Transkriptionsfaktors im Kern detektiert.

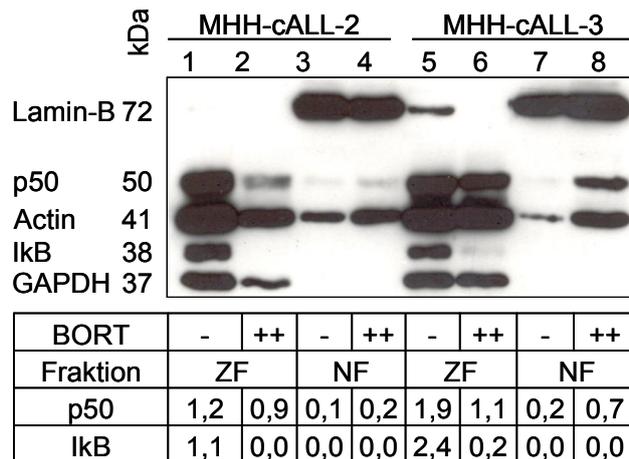


Abbildung 3-15: Lokalisierung der Zielproteine IκB und NFκB (p50) unter Einfluss von Bortezomib.

Die Zellfraktionierung in nukleäre Fraktion (NF) und zytoplasmatische Fraktion (ZF) wurde an den Zelllinien MHH-cALL-2 und -3 durchgeführt. Die Resultate der unbehandelten Zellen sind mit BORT (-) und die derjenigen, die 24 h vorher mit 7 nM Bortezomib stimuliert worden waren sind mit BORT (++) gekennzeichnet. Als Fraktionen Markerproteine für die einzelnen Fraktionen wurden Lamin-B (Zellkern) und GAPDH (Zytoplasma) getestet. In den unteren beiden Zeilen der Tabelle sind die Ergebnisse der densitometrischen Analyse der Zielproteine normalisiert zu Actin zusammengefasst.

3.3.4 Immunfluoreszenzfärbung zur Lokalisation der Zielproteine VCP, IκB und 20S

Zur Lokalisierung der Zielproteine wurden 24, 48 und 72 h nach der Behandlung mit Prednisolon, 1,5 und 7 nM Bortezomib Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Es zeigte sich jedoch, dass die Färbungen bei den höheren Bortezomib-Konzentrationen durch zunehmende Letalität der Zellen bei 72 h beeinträchtigt wurden. Daher wurde 24 h nach der Behandlung mit 7 nM Bortezomib die Lokalisierung von IκB und nach 48 h die des 20S-Proteasoms untersucht (Abbildungen 3-15 bis 3-18). Der für die 20S- und IκB-Detektion benutzte sekundäre Antikörper war mit dem Farbstoff Alexa-488 gekoppelt. VCP, welches zu beiden Zeitpunkten angefärbt wurde, wurde mit einem Rhodamin-RedX gelabelten Sekundäreantikörper detektiert. Durch die Steuerungssoftware des konfokalen Laser-Scanning Mikroskops (CLSM) wurden den detektierten Emissionen die Farben Rot für VCP und Grün für die Proteine IκB und 20S zugeordnet. Mit Hilfe einer TO-PRO-3-Kernfärbung wurde überprüft, ob die untersuchten Zellen noch einen intakten Zellkern besaßen. Kontrollfärbungen bestätigten die Spezifität der Antikörper (Abbildung 6-19). Die Immunfluoreszenzfärbungen bestätigten, dass alle drei untersuchten Proteine hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert waren und es auch durch die Proteasom-Inhibition nicht zu einer Translokation in den Kern kam. Außerdem ermöglichte es diese Methode die erhöhte VCP-Expression der Zelllinie MHH-cALL-2 zu visualisieren. Durch die kombinierte Behandlung der Zellen kam es zu einer Akkumulation der Proteine im Zytoplasma. Zwar wurde dieser Effekt bei beiden Zelllinien beobachtet, besonders auffällig war er aber bei der Zelllinie MHH-cALL-2 für das 20S-Proteasom zu sehen. In der Durchlichtaufnahme ist zu erkennen, dass diese Aggregation der Proteine einhergeht mit einer Veränderung der zytoplasmatischen Strukturen. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle besaßen die mit Bortezomib behandelten Zellen eine größere Granularität.

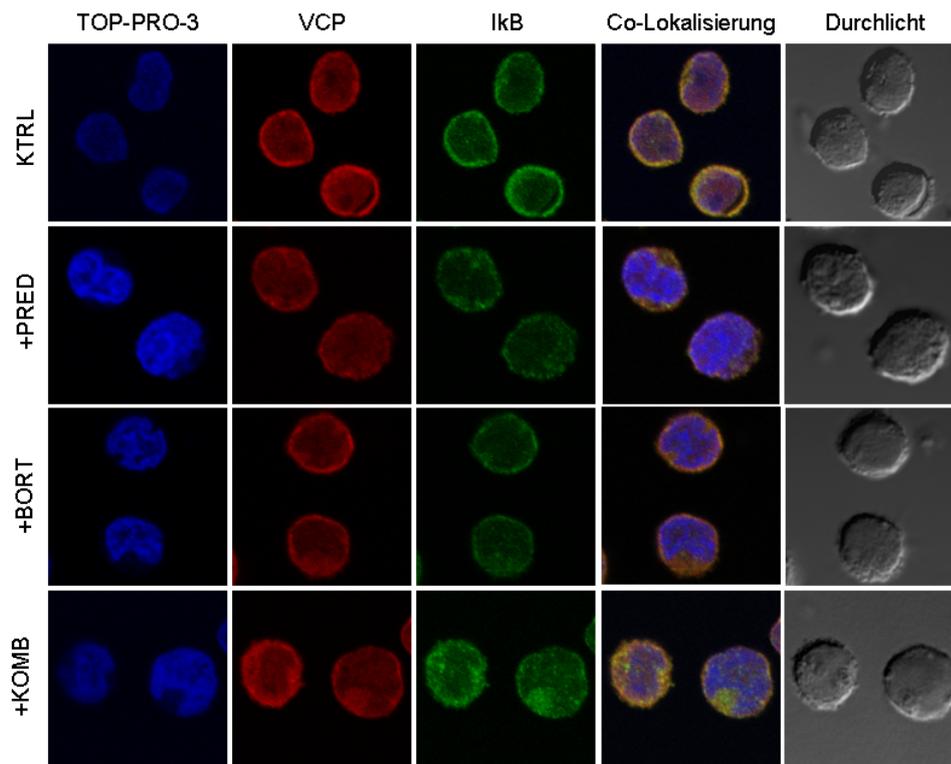


Abbildung 3-16: Studie zur Lokalisierung von VCP (rot) und IκB (grün), (CLSM-Aufnahme).
 Die Zelllinie MHH-cALL-2 wurde für 24 h mit Prednisolon, 7 nM Bortezomib oder der Kombination beider Medikamente inkubiert. Anschließend wurde eine Immunfluoreszenzfärbung der Zellen gegen die Zielproteine VCP und IκB durchgeführt. Die Kerne wurden mit TO-PRO-3 angefärbt.

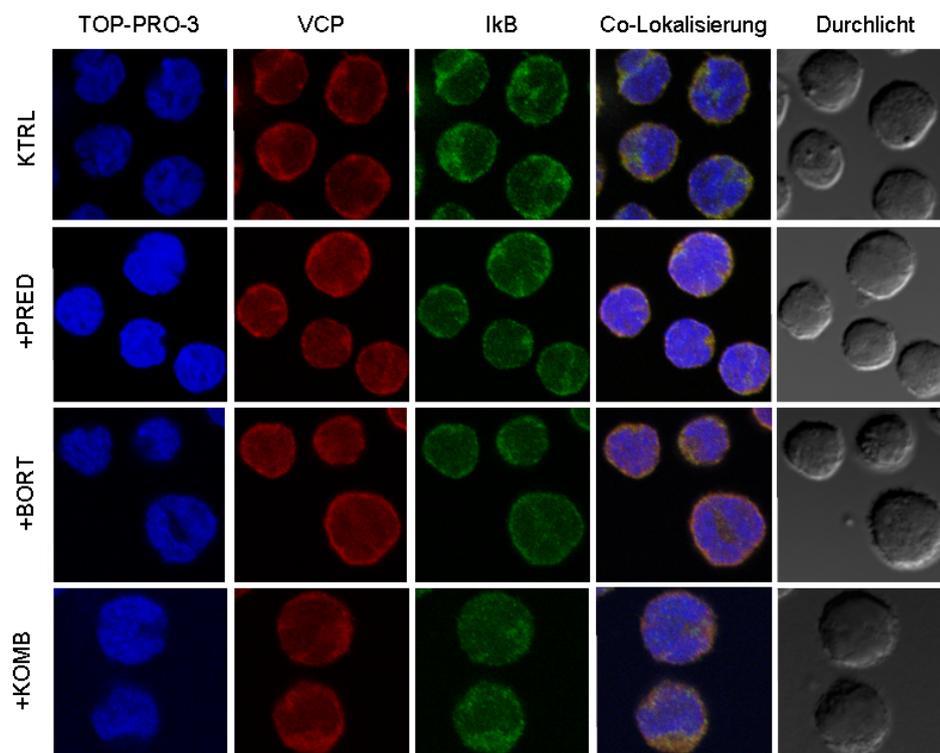


Abbildung 3-17: Studie zur Lokalisierung von VCP (rot) und IκB (grün), (CLSM-Aufnahme).
 Die Zelllinie MHH-cALL-3 wurde für 24 h mit Prednisolon, 7 nM Bortezomib oder der Kombination beider Medikamente inkubiert. Anschließend wurde eine Immunfluoreszenzfärbung der Zellen gegen die Zielproteine VCP und IκB durchgeführt. Die Kerne wurden mit TO-PRO-3 angefärbt.

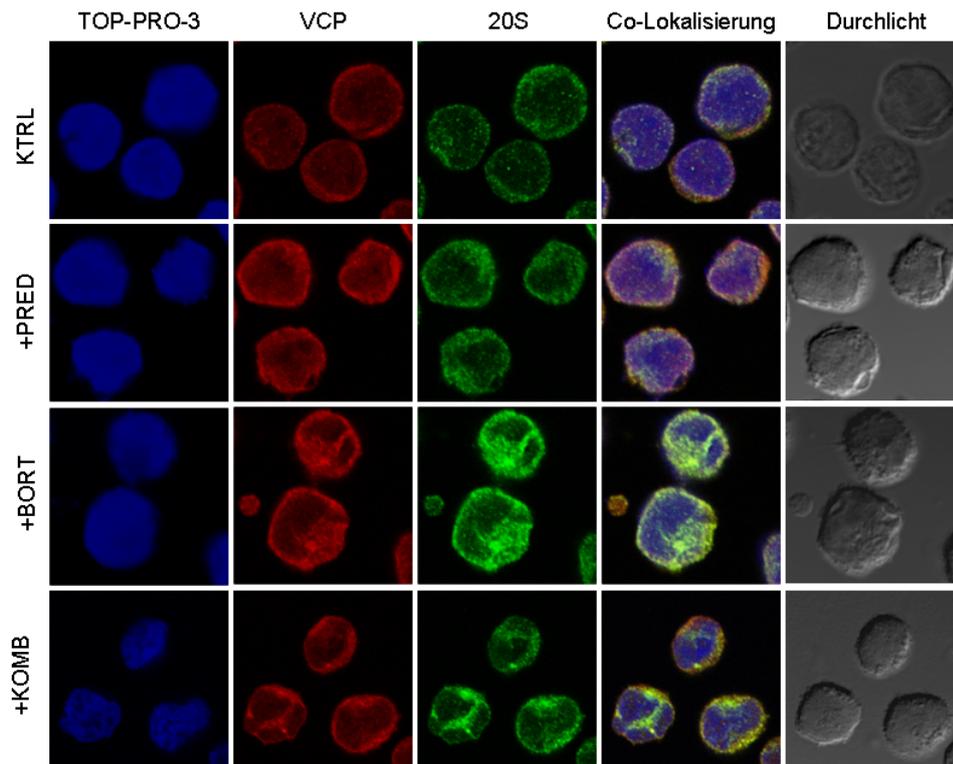


Abbildung 3-18: Studie zur Lokalisierung von VCP (rot) und 20S (grün), (CLSM-Aufnahme). Die Zelllinie MHH-cALL-2 wurde für 48 h mit Prednisolon, 7 nM Bortezomib oder der Kombination beider Medikamente inkubiert. Anschließend wurde eine Immunfluoreszenzfärbung der Zellen gegen die Zielproteine VCP und I κ B durchgeführt. Die Kerne wurden mit TO-PRO-3 angefärbt.

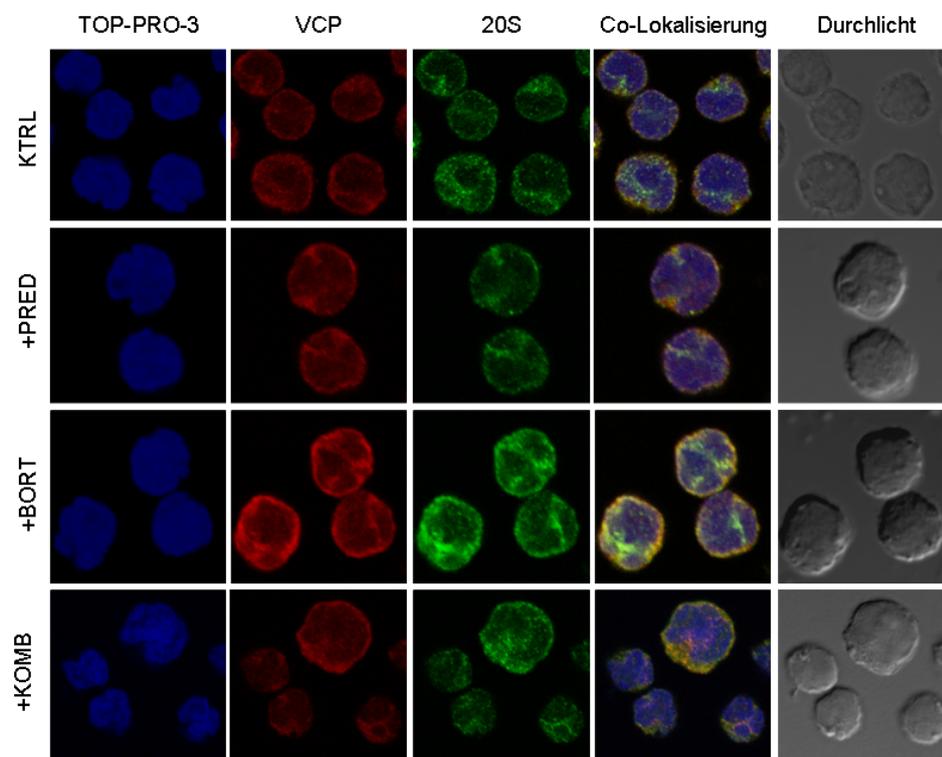


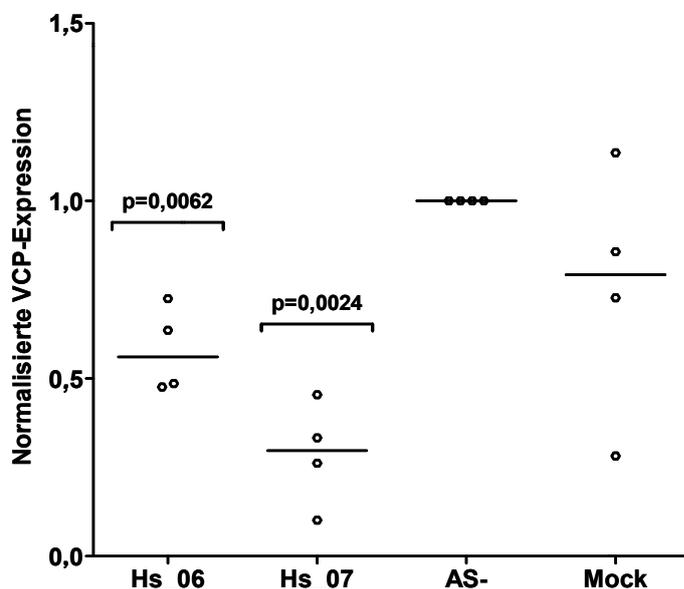
Abbildung 3-19: Studie zur Lokalisierung von VCP (rot) und 20S (grün), (CLSM-Aufnahme). Die Zelllinie MHH-cALL-3 wurde für 48 h mit Prednisolon, 7 nM Bortezomib oder der Kombination beider Medikamente inkubiert. Anschließend wurde eine Immunfluoreszenzfärbung der Zellen gegen die Zielproteine VCP und I κ B durchgeführt. Die Kerne wurden mit TO-PRO-3 angefärbt.

3.4 Reduktion der VCP-Expression durch transiente Transfektion mit spezifischer siRNA gegen VCP

Die Herunterregulation der VCP-Expression erfolgte durch transiente Genexpressionshemmung auf Ebene der RNA. Hierzu wurden mit Hilfe von Elektroporation spezifische siRNAs gegen VCP in die GC-resistente Zelllinie MHH-cALL-2 eingebracht. Die Transfektion von Suspensionszellen setzt ein hohes Maß an Etablierungsarbeit voraus.

Zunächst wurde die Methode der Elektroporation an MHH-cALL-2 Zellen unter Verwendung einer Alexa-488-gekoppelten nicht-hemmenden Kontroll-siRNA (AS-Negativ-Alexa-488) getestet. Zur Kontrolle der siRNA-Lokalisierung wurde im Anschluss an die Transfektion eine Kernfärbung der Zellen mit TO-PRO-3 durchgeführt und mittels CLSM-Mikroskopie überprüft. Durch diese Untersuchung war es möglich den Eintrag der Farbstoff-gekoppelten Kontroll-siRNA in den Kern nachzuweisen.

Nach Etablierung der Elektroporation für die Suspensionszellen, wurden die Auswirkungen der VCP-Herunterregulierung etabliert. Neben den Transfektionen mit den beiden *VCP*-siRNAs (Hs_06 und Hs_07) wurden zur Kontrolle auch nicht-hemmende siRNAs sogenannten *non-silencing siRNAs* (AS-) transfiziert. Diese siRNAs besitzen eine Sequenz die zu keinem bekannten Gen homolog ist. Außerdem wurde jeweils ein Ansatz ohne Oligonucleotide elektroporiert (Mock), um die Nebenwirkungen der Elektroporation bewerten zu können. Zur Bestimmung der optimalen Bedingungen wurden siRNA Konzentrationen im



Bereich von 1,2 -120 pmol pro 100 μ L Transfektionsansatz getestet.

Abbildung 3-20: Transkriptionshemmender Effekt spezifischer siRNAs auf die *VCP*-RNA Expression
Zur Kontrolle des siRNA-Effektes auf die *VCP*-Expression in MHH-cALL-2 Zellen wurde 24 h nach der Elektroporation Gesamt-RNA mittels RT-PCR untersucht. Die Ergebnisse der spezifischen RNAs wurden zur nicht-hemmenden Kontrolle (AS-) normalisiert. Die horizontalen Linien repräsentieren den Median. Die in der Abbildung notierten p-Werte, resultieren aus einer deskriptiven statistischen Analyse der Mittelwerte, mittels *Einstichproben-t-Test*.

Die Verwendung von 60 pmol siRNA pro Ansatz führte in 24 h zu einer Reduktion der *VCP*-RNA auf 58 % (Hs_06) bzw. 29 % (Hs_07) verglichen zu den mit der Kontroll-siRNA transfizierten Zellen (Abbildung 3-20). Die Elektroporation ohne siRNA (Mock) hatte jedoch in einigen Fällen ebenfalls einen expressionsmindernden Effekt. Zur Analyse des Transkriptionshemmenden Effektes der siRNA auf die VCP Proteinexpression wurden nach 24, 48 und 96 h Gesamtzelllysate hergestellt und im Western-Blot untersucht.

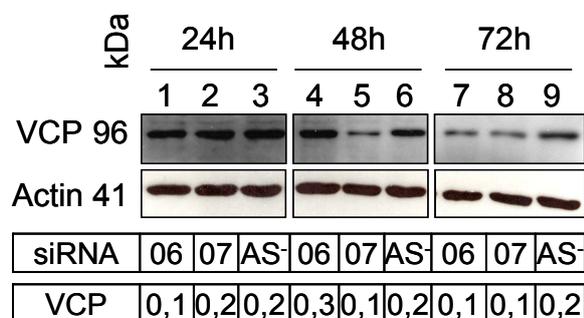


Abbildung 3-21: Reduktion der VCP-Protein-Expression nach Transfektion mit spezifischer siRNA
Die Transfektion der Zellen erfolgte mit den spezifischen siRNAs gegen *VCP* Hs_06 (06) und Hs_07(07) sowie der Kontroll-siRNA AS-Negativ (AS). In der Tabelle unterhalb der Abbildung sind die Ergebnisse der densitometrischen Analyse normalisiert zu Actin zusammengefasst.

Die spezifischen siRNAs induzierten nach einer Inkubationszeit von 72 h bzw. für die Hs_07 bereits nach 48 h, eine um die Hälfte verminderte *VCP*-Protein-Expression. In der durchgeführten Wiederholung wurde eine ähnliche Reduktion innerhalb von 24 h erreicht, jedoch ließ der Effekt nach 48 h bereits nach.

3.4.2 Effekte der Prednisolon-Behandlung nach spezifischer Genexpressionshemmung

Für die Prednisolon-Stimulation in einem kombinierten Ansatz wurde der Zeitpunkt 24 h nach der siRNA-Transfektion gewählt, um das Zeitfenster der *VCP*-Reduktion auf Protein-Ebene einzuhalten. Aufgrund der geringen Zellzahl, die bei der Methode pro Ansatz eingesetzt werden konnte wurden wie in 2.4.2 beschrieben, sechs Transfektionen je siRNA durchgeführt und gemischt. Anschließend wurden diese für die Prednisolon-Stimulation auf zwölf Löcher einer 24-Lochplatte verteilt. Für jeden dieser Ansätze wurden WST-1-Vitalitäts- und Caspase3/7-Apoptose-Assays nach 24 bzw. 48 h durchgeführt. Je zwei der korrespondierenden Ansätze wurden anschließend zusammengeführt und für die Herstellung von Gesamtzelllysate oder für die RNA-Extraktion verwendet.

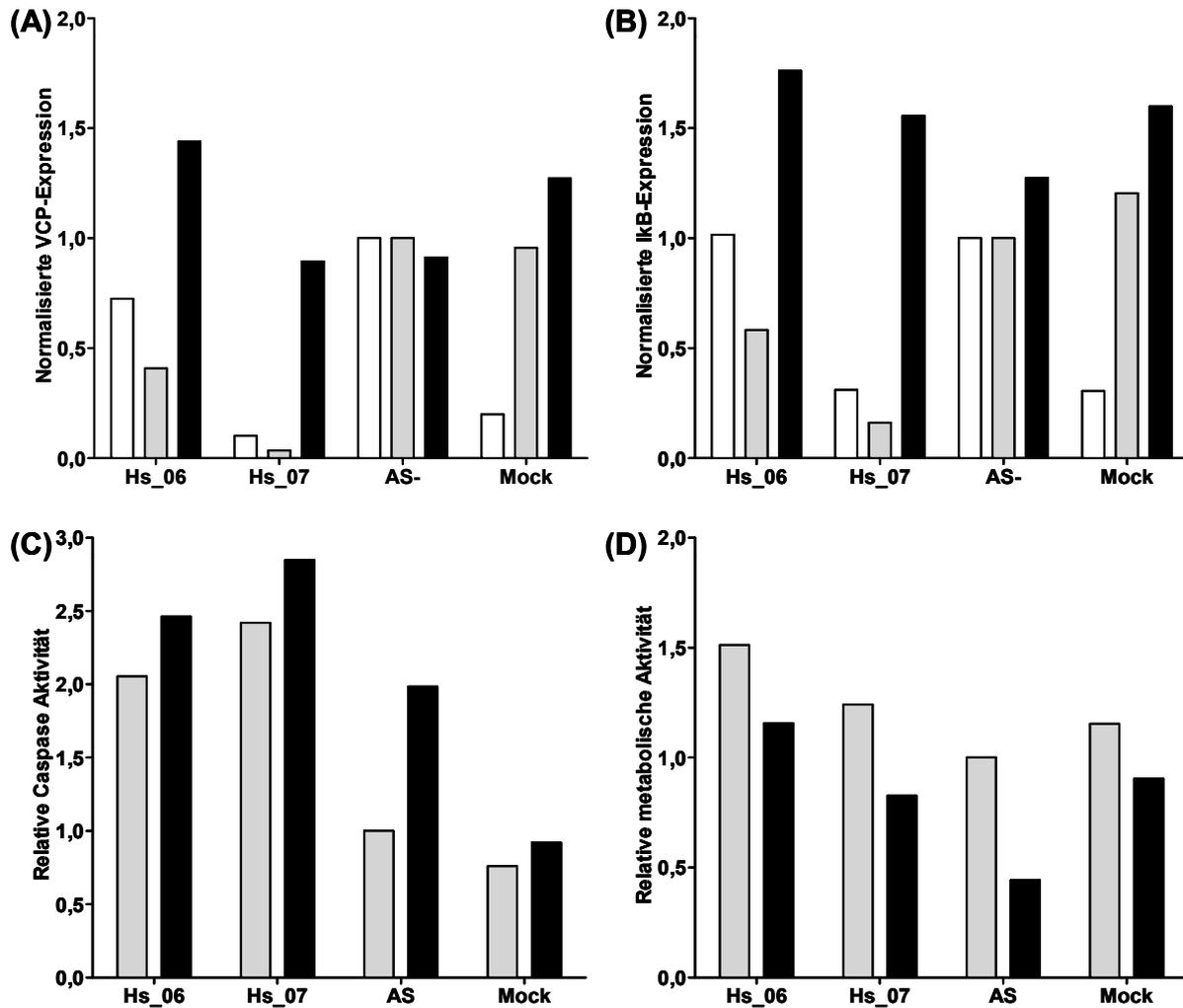


Abbildung 3-22: Effekte spezifischer *VCP*-Genexpressionshemmung in Kombination mit Prednisolon. Die Zelllinien wurden 24 h nach der siRNA-Transfektion mit Prednisolon stimuliert. Die quantifizierte RNA-Expression von (A) *VCP* und (B) *IκB* zum Zeitpunkt der Stimulation ist in weiß dargestellt. Die grau hinterlegten Balken kennzeichnen die nach weiteren 24 h Inkubation detektierte Expression der Zellen ohne Prednisolon und die schwarzen Balken bilden die der Zellen mit zusätzlicher GC-Stimulation ab. Zur Darstellung der Ergebnisse des 24 h nach Prednisolonabgabe durchgeführten (C) Caspase3/7-Aktivitäts-Assays und des 48 h nach GC-Behandlung ausgeführten (D) WST-1-Vitalitäts-Assays wurde diese Farbgebung der Balken fortgeführt.

Mit Hilfe der RT-PCR wurde der Nachweis erbracht, dass durch Einsatz der spezifischen siRNAs nach 24 h eine deutliche Verminderung der *VCP*-RNA-Expression erzielt wurde (Abbildung 3-22(A)). Neben der spezifischen Expressionshemmung des *VCP* wurde zudem eine verminderte *IκB*-Expression (Abbildung 3-22 (B)) detektiert. Die zusätzliche Stimulation der Zellen mit Prednisolon führte zu einer deutlichen Expressionssteigerung beider Zielgene. Allerdings wurde für die Kontrollen ebenfalls eine Erhöhung festgestellt. Die Transfektion der Zellen mit spezifischer *VCP*-siRNA führte sowohl zu einer Induktion der Caspase-3/7-Aktivität als auch zu einer Verminderung der Stoffwechselaktivität (Abbildung 3-22 (C) und (D)), die der Kontroll-siRNAs jedoch nur mit zusätzlicher Prednisolonstimulation. Zum Zeitpunkt der Prednisolonabgabe wurde für die Mock-Kontrolle im Vergleich zur

Transfektion mit der nichthemmenden siRNA ebenfalls ein Expressionsmindernder Effekt festgestellt. Dieser Effekt war allerdings schon nach 48 h nicht mehr nachweisbar.

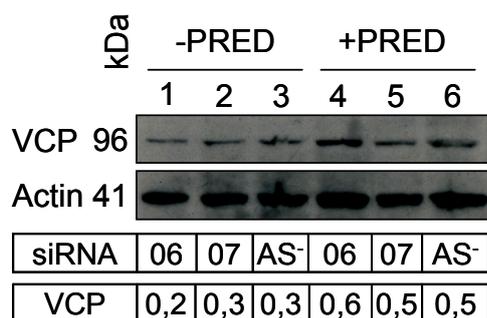


Abbildung 3-23: Effekte der siRNA-Transfektion und der Prednisolongabe auf die VCP-Expression

Die Transfektion erfolgte mit den spezifischen siRNAs gegen *VCP* Hs_06 (06) und Hs_07(07) sowie der Kontroll-siRNA AS-Negativ (AS). Die 96 h nach Transfektion bzw. 72 h nach GC-Stimulation gewonnenen Gesamtzelllysate wurden mittels Western-Blot untersucht. In der Tabelle unterhalb der Abbildung sind die Ergebnisse der densitometrischen Analyse normalisiert zu Actin zusammengefasst.

Der spezifische Einfluss der Genexpressionshemmung auf die Proteinexpression war nach 96 h nicht mehr festzustellen, dagegen war die Expression in den zusätzlich zur Transfektion mit Prednisolon behandelten Zellen deutlich höher.

3.5 Expressionsanalysen an primären leukämischen Blasten aus dem Knochenmark

Zur Expressionsanalyse der Zielgene bzw. Zielproteine *VCP* und *Katalase* wurden die primären Zellen zur Herstellung von Gesamtzelllysaten zur Extraktion von Gesamt-RNA und für Zellfraktionierungen verwendet. Aus den RT-PCR-Analysen (Abbildung 3-24 (A) und (B)) ging hervor, die mediane Expression der PPR-Patienten 1,4-fach höher war als die der Gruppe der PGR-Patienten. Bei der Untersuchung *Katalase*-Expression wiesen drei von fünf PGR-Patienten eine Erhöhung auf. Der für diese Gruppe ermittelte Median war 1,3-fach höher als der der GC-resistenten Patienten. Die deskriptive statistische Analyse der Mittelwerte zeigte zwar leichte Tendenzen an, war aber nicht statistisch signifikant. Western-Blot-Analysen an isolierten subzellulären Fraktionen und an Gesamtzelllysaten (Abbildung 3-24 (C) und (D)) stützten die Ergebnisse der RNA-Studien. Weder über die Proteinexpression des VCP noch über die Expression der Katalase ließen sich die Patienten eindeutig einer der beiden Gruppen zuordnen. Die Untersuchungen der Zellfraktionen zeigten hauptsächlich eine Lokalisierung der untersuchten Proteine VCP, Katalase und 20S-Proteasom im Zytoplasma. Zur Erklärung der der schwach ausgeprägten Unterschiede, bzw. konträrem Ergebnis einzelner Patienten wurden die klinischen Daten herangezogen. Es konnte jedoch kein Zusammenhang der Patienten, die eine für die Gruppe untypische Expression der Zielproteine aufwiesen zu einer ungewöhnlichen Blastenzahl an Tag 8 oder einer veränderten prozentualen Reduktion der Blasten hergestellt werden.

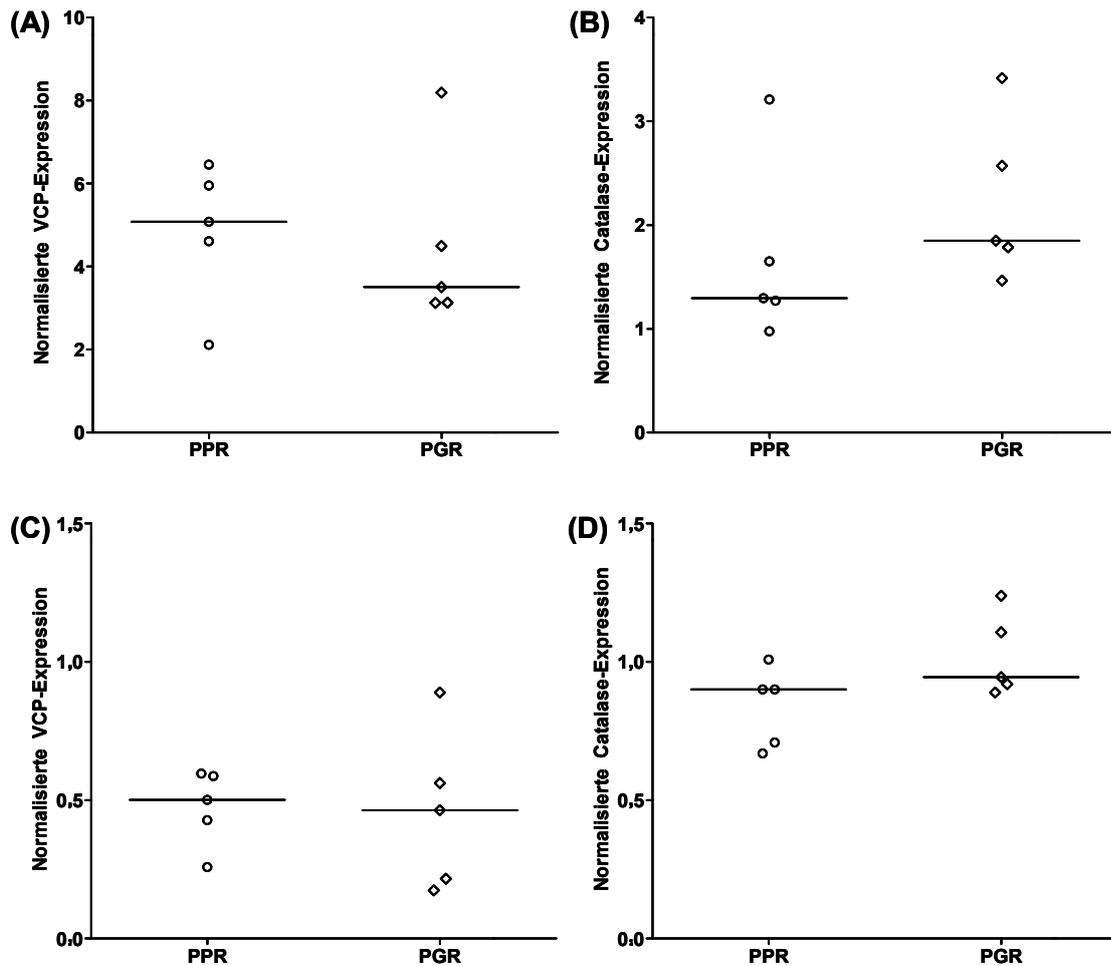


Abbildung 3-24: Expressionsanalysen an primären leukämischen Blasten aus dem Knochenmark. Die RT-PCR-Analysen wurden für die Zielgene (A) *VCP* und (B) *Katalase* durchgeführt. Unterhalb der RNA-Expressionsdaten sind die Resultate der densitometrischen Auswertung der im Western-Blot untersuchten Gesamtzelllysate für *VCP* (C) und *Katalase* (D) normalisiert zu Actin zusammengefasst. Die horizontalen Linien repräsentieren den Median.

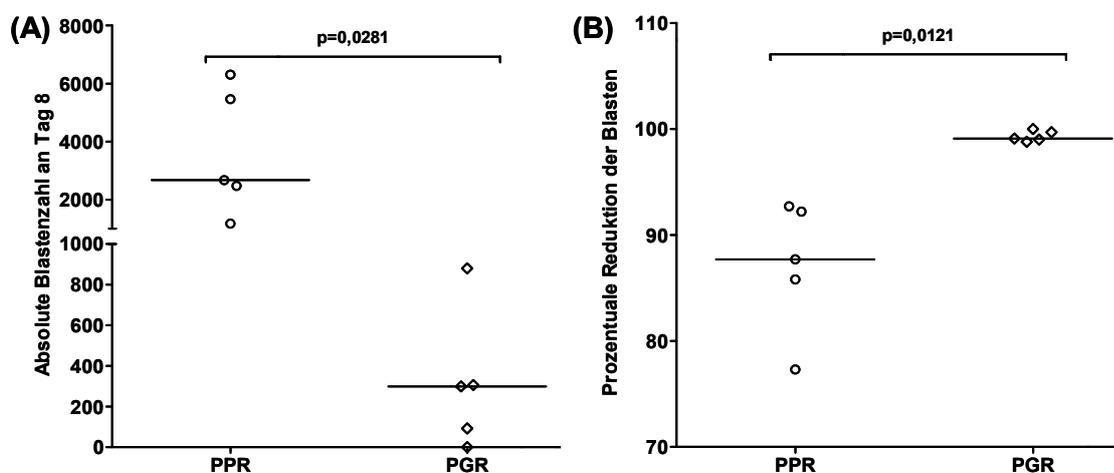


Abbildung 3-25: Vergleich der absoluten Blastenzahl an Tag 8 und der relativen Blastenzahl. Aus den klinischen Daten der Patienten wurde (A) die absolute Blastenzahl an Tag 8 im peripheren Blut und (B) die aus dem Vergleich zur initialen Blastenzahl resultierende prozentuale Reduktion der leukämischen Blasten der Patienten zusammengefasst.

3.3.2. RNA-Expressionsanalyse an primären leukämischen Blasten aus dem Knochenmark mittels GeXP

Die isolierte Gesamt-RNA von zwei PPR-Patienten und vier PGR-Patienten aus primären Zellen wurden im Vergleich zur *Human Reference RNA* in einer GeXP-Analyse untersucht.

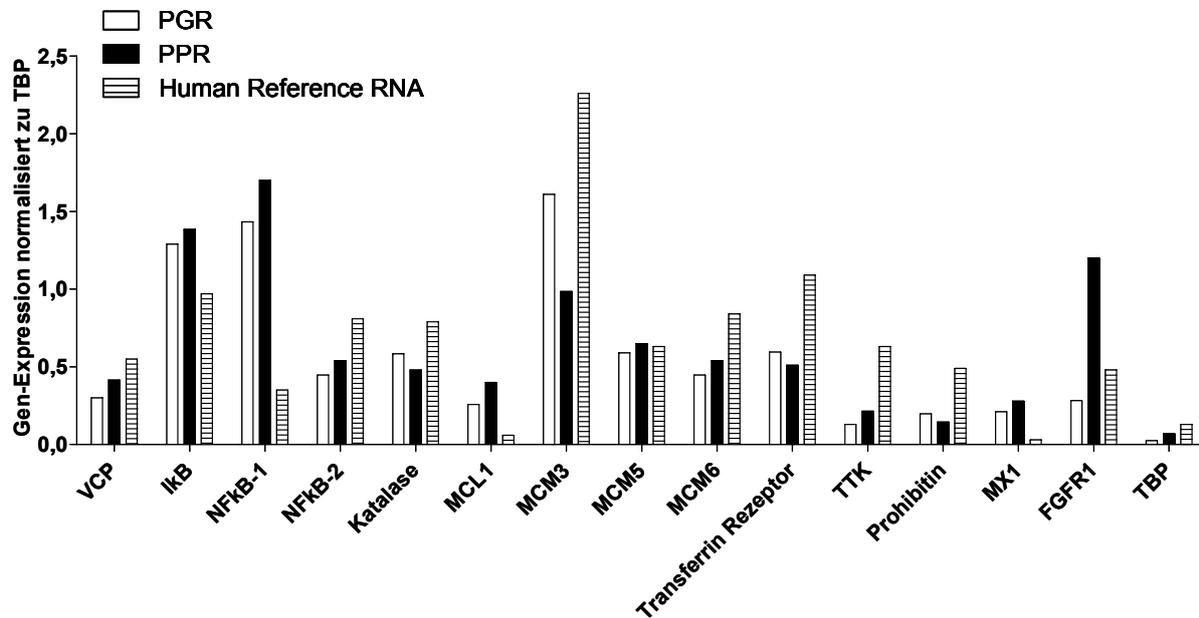


Abbildung 3-26: Exemplarische GeXP-RNA-Expressionsanalyse an primären leukämischen Blasten.

Die RNA-Expressionen der Zielgene wurden im Vergleich zur *Human Reference RNA* gemessen und gegen die *beta-Actin*-Expression normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte der gemessenen Patientenproben jeder Gruppe.

Für den Vergleich wurden die Expressionsprofile der Patienten nach der *Prednisone-Response* der Patienten gruppiert. Zur Optimierung der PCR-Reaktion musste die Intensität des *TBP*-Signals durch Einsatz kleinerer Primermengen verringert werden. Dies führte dazu, dass in zwei von vier getesteten PGR-Patienten keine *TBP*-Expression detektiert werden konnte. Aus diesem Grund sind die dargestellten Ergebnisse, anders als die untersuchten Zelllinien (Abbildung 3-10), zur Expression des in allen GeXP-Messungen ebenfalls gemessenen *Actins* normalisiert worden. Auffällig war, dass die leukämischen Blasten im Vergleich zur Referenz eine deutlich höhere Expression des *NFκB-1* aufwiesen, welches für die NFκB-Untereinheit p50 codiert. Es zeigte sich jedoch insgesamt, dass in der kleinen Gruppe von Patienten keine deutlichen Unterschiede im Expressionsprofil festzustellen waren.

4. Diskussion

Die akute lymphoblastische Leukämie ist die häufigste Tumorerkrankung im Kindesalter⁽¹⁾. Die stetige Optimierung der Risikostratifizierung und Verbesserung der Therapiekonzepte steht seit den frühen 1970er Jahren im Fokus der ALL-BFM-Studiengruppe. Die Identifizierung spezifischer, prognostisch relevanter Merkmale, die kennzeichnend für den Therapieverlauf sind, war ebenso entscheidend wie die Intensivierung der zytogenetischen Diagnostik und die Einführung der MRD-Analyse. Mittlerweile besitzt die MRD-Diagnostik wegen ihrer hohen Sensitivität sogar eine größere Aussagekraft für die Prognose der Patienten als die *Prednisone-Response*, die lange als der verlässlichste Marker galt^(11, 13, 23, 24). Die Überlebenswahrscheinlichkeit der an ALL erkrankten Patienten hat sich seit dem Beginn der Therapieoptimierungsstudien drastisch erhöht⁽⁷⁻¹⁰⁾. Auch der Zusammenschluss mit internationalen Forschungsgruppen hat dazu beigetragen. Trotzdem haben Hoch-Risiko(HR)-Patienten, die 8 % aller Patienten ausmachen, mit 84 % noch immer eine deutlich höhere Wahrscheinlichkeit, innerhalb von 10 Jahren einen Rückfall zu erfahren als Patienten der Mittleres-Risiko (MR)- oder Standard-Risiko (SR)-Gruppe, mit 26 % bzw. 7 %⁽¹⁸⁾. Die eindeutige Identifizierung der HR-Patienten, zum Zeitpunkt der Diagnose durch einen validen prognostischen Marker würde zusammen mit der Weiterentwicklung des speziell auf sie abgestimmten Therapiekonzeptes einen enormen Fortschritt bedeuten.

GC-resistente leukämische Blasten weisen Merkmale für defekte Apoptose-Signalwege auf und neigen zur Induktion alternativer Zelltodmechanismen^(26, 26-28, 59, 59-61). Zu den Studien, die neue Therapieoptionen aufzeigen, gehören insbesondere diejenigen, die dies berücksichtigen. Gerade der Einsatz spezifischer Inhibitoren, welche in die zugrundeliegenden zellulären Mechanismen regulierend eingreifen, lieferte vielversprechende Resultate^(34, 60, 157, 158, 219). Einer dieser Inhibitoren ist Bortezomib, welcher in der Lage ist, spezifisch das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) zu unterbrechen und die assoziierten Signalwege zu modulieren. Es ist jedoch weitgehend unklar, welcher der Signalwege der ausschlaggebende für die anti-proliferative und pro-apoptotische Wirkung des Proteasominhibitors auf Tumorzellen ist. Einen Hinweis darauf, dass gerade die Signalwege NFκB, UPS und der assoziierte ERAD von entscheidender Bedeutung für die GC-Resistenz sein könnten, lieferte die Entdeckung, dass die Gruppe der PPR-Patienten initial das *Valosin-containing protein* (VCP) übermäßig exprimiert⁽³²⁾. Diese ATPase eskortiert in beiden Signalwegen ubiquitinierte Proteine zum Proteasom und besitzt dadurch einen großen Einfluss auf die Homöostase der Zelle^(79, 80, 88, 91-93, 227). Zu diesen Proteinen zählt unter anderem auch das NFκB-Inhibitorprotein IκBα. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zur Untersuchung der molekularen Zusammenhänge und der funktionellen Relevanz des VCP zelluläre Modellsysteme erfolgreich charakterisiert. Im Fokus lag vor allem die Identifizierung der in die GC-Resistenz involvierten Signalwege. Des Weiteren gelang es, die Zellantwort durch spezifische Proteasom-Hemmung und siRNA-vermittelte VCP-Herunterregulation in Kombination zur Prednisolon-Gabe zu modulieren. Darüber hinaus wurde die Aussagekraft, der in der Vorstudie gefundenen potentiellen prognostischen Marker VCP und Katalase⁽³²⁾ durch Untersuchungen an primären Knochenmarkszellen überprüft. In den folgenden Kapiteln wird die Bedeutung und der

Zusammenhang zwischen den Einzelergebnissen dieser Arbeit erläutert und in die aktuelle Literatur zu diesem Themenbereich eingeordnet.

4.1 Charakterisierung und Modulierung der zellulären Modellsysteme

Die untersuchten ALL-Zelllinien reagierten in Abhängigkeit zu ihrer Glucocorticoid (GC)-Sensitivität mit einer charakteristischen Zellantwort auf die Prednisolon-Behandlung. Diese spezifische Zellantwort ließ sich durch zusätzliche Proteasom-Inhibition mittels Bortezomib und durch siRNA-vermittelte VCP-Herunterregulation modifizieren.

4.1.1 Charakterisierung des durch die Prednisolon- und Bortezomib-Behandlung induzierten Zelltodes

Zur Differenzierung der GC-induzierten Zelltodmechanismen wurden neben dem Vitalitätsverlust der Zellen, spezifische Marker für die Induktion der Apoptosesignalwege und nekrotischer Prozesse herangezogen. Die GC-Stimulation der Zelllinien MHH-cALL-2 und -3 belegte, dass die verwendeten Zelllinien auch *in vitro* eine unterschiedliche GC-Sensitivität aufwiesen, die der initialen *Prednisone-Response* der Patienten entsprach. Sie sind daher als Modell für die Untersuchung der molekularen Vorgänge nach Stimulation mit Prednisolon gut geeignet. Der besonders bei der MHH-cALL-2 ausgeprägte biphasische Verlauf der Vitalitätsabnahme bei aufsteigender GC-Konzentration (Abbildung 6-1) wurde in ähnlicher Weise bereits von Lambrou et al., 2009 für die ebenfalls GC-resistente ALL-Zelllinie CCRF-CEM beschrieben⁽⁶¹⁾. Globale Genexpressions-Assays, die nach der Behandlung mit geringeren Prednisolon-Konzentrationen (10 nM-1 µM) durchgeführt wurden, belegten außerdem eine vorrangig mitogene Wirkung. Gleichzeitig wurde aber auch eine Zelltod-induzierende Wirkung festgestellt. Allerdings wies dieser Zelltod nekrotische Merkmale auf. Erst höhere Konzentrationen induzierten in dieser Studie Dosis-abhängig eine Apoptose-Induktion. Ploner et al. beschrieben 2005 ähnliche Vorgänge als GC-induzierten Zelltod mit „apo-nekrotischen Merkmalen“⁽⁵⁹⁾. Sie zeigten außerdem, dass die GC-Wirkungsweise vom zellulären Kontext und unter anderem von der Funktionsfähigkeit der am Wirkmechanismus beteiligten Komponenten wie dem Glucocorticoid-Rezeptor (GR) oder den Caspasen abhängig ist.

Die in den initialen Studien ermittelte Prednisolon-Konzentration, bei der beide Zelllinien verglichen zur unbehandelten Kontrolle eine Vitalitätsminderung von 50 %, innerhalb eines Verdopplungszeitraums zeigten, betrug 6,2 µM (Abbildung 6-1 und nicht gezeigte Daten). Für die GC-resistente MHH-cALL-2 Zelllinie ließ sich bei Verwendung dieser Prednisolon-Konzentration eine spätere und schwächere Reaktion auf die Behandlung detektieren als bei der MHH-cALL-3. Besonders auffällig war, dass die resistente Zelllinie zwar einen leichten Vitalitätsverlust, aber keine Caspase-vermittelte Apoptose-Induktion aufwies (Abbildung 3-5). Die Ergebnisse des Caspase-3/-7-Aktivitäts-Assays schienen eher für eine verminderte Apoptose im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zu sprechen, was ebenfalls zu den 2009 von Lambrou et al. veröffentlichten Daten passte. Möglicherweise ist dies auf die

beschriebenen mitogenen GC-Effekte zurückzuführen. Als Bestätigung hierfür ist zu werten, dass bei der Analyse des PARP-1-Spaltungsmusters nach Prednisolon-Behandlung kein Apoptose-spezifisches Spaltprodukt von 89 kDa detektiert wurde (Abbildung 3-7). Darüber hinaus wurden nach 48 h jedoch auch keine der nekrotischen Produkte bei 55 oder 72 kDa nachgewiesen. Die nach 72 h Inkubation festgestellte Erhöhung der PI-Positivität, geht vermutlich trotzdem auf Prozesse alternativer Zelltodmechanismen zurück, da sonst das apoptotische Spaltprodukt nachzuweisen gewesen wäre. Auch das zellbiologische Phänomen der „sekundären Nekrose“, bei dem in der terminalen Phase der Apoptose eine erhöhte Durchlässigkeit der Zellmembran festzustellen ist, setzt eine Caspase-Aktivierung voraus⁽²⁰³⁾. Aufgrund der fehlenden Caspase-3/-7-Aktivität und des apoptotischen PARP-1-Spaltproduktes, ist es daher also vermutlich nicht die Ursache der beobachteten Steigerung der PI-Positivität. Möglicherweise wären einer Analyse nach 72 h oder später nekrotische PARP-1-Spaltprodukte nachzuweisen.

Erst eine Verwendung von mehr als 200 μ M Prednisolon führte bei der MHH-cALL-2 ebenfalls zu einer deutlichen Caspase-3/-7-Aktivierung (nicht gezeigte Daten). Dies entspricht einer höheren Konzentration als der, die 2009 von Lambrou et al. beschrieben wurde⁽⁶¹⁾. Für die CCRF-CEM Zelllinie stellte er fest, dass Konzentrationen ab 1 μ M zur Apoptose-Induktion reichten. Für die Induktion gleicher zellbiologischer Reaktionen waren bei der GC-sensitiven Zelllinie MHH-cALL-3, wie erwartet, geringere Prednisolon-Konzentrationen erforderlich als bei der GC-resistenten Zelllinie. Darüber hinaus wurde bei keiner Zelllinie eine initiale Aktivierung der Caspase-8-Aktivität nachgewiesen (nicht gezeigte Daten), was den Rückschluss zulässt, dass keine Induktion des extrinsischen Apoptose-Signalweges erfolgte. Hingegen wiesen beide untersuchten Zelllinien ein ähnlich abgestuftes Profil bei der Vitalitätsminderung auf (Abbildung 6-1), wie es von Lambrou et al. beschrieben wurde. Der biphasische Verlauf ist möglicherweise auf die drei zu unterscheidenden Dosis-abhängigen GC-Wirkungsweisen zurückführen, die Buttgerit et al., 1998 publizierten⁽⁵⁴⁾. Sie postulierten, dass geringe GC-Konzentrationen durch Bindung an den zytosolischen GC-Rezeptor (GR) spezifische genomische Effekte ausüben, während größere Mengen zur Induktion nicht-genomischer, aber Rezeptor-vermittelter Effekte führen. Sehr hohe GC-Konzentrationen besäßen dagegen eine Rezeptor-unabhängige physikochemische Wirkung und würden sekundäre Effekte auslösen. Allerdings bezogen sich die in dieser erläuterten Beschreibung vor allem auf endogene und nicht auf synthetische Glucocorticoide⁽²²⁸⁾.

Insgesamt wies der GC-induzierte Zelltodmechanismus der MHH-cALL-2 einige Merkmale auf, die für einen alternativen Zelltodmechanismus sprechen. Besonders ist hier die Diskrepanz zwischen Vitalitätsminderung und Apoptose-Induktion zu nennen (Abbildungen 3-4 bis 3-6). Im Gegensatz dazu belegten die Ergebnisse der Analysen für die GC-sensitive MHH-cALL-3 Zelllinie eindeutig eine Induktion der Caspase-vermittelten Apoptose als Ursache für das Absterben der Zellen.

Die Bortezomib Einzel-Behandlung führte hingegen bei beiden Zelllinien zu einer deutlichen, dosisabhängigen Vitalitätsminderung und einer Induktion der Effektor-Caspasen-3 und -7. Korrelierend dazu wurde auch eine Letalitätszunahme beobachtet (Abbildung 3-6). Diese Ergebnisse bestätigten somit die für Bortezomib postulierte anti-proliferative und pro-

apoptotische Wirkung auch für ALL-Zelllinien. Die für die im Rahmen dieser Arbeit getesteten Zelllinien ermittelte IC_{50} -Konzentration von $7 \text{ nM} \pm 0,5 \text{ nM}$, liegt im Konzentrationsbereich der 1999 von Adams et al. in einer Studie an 60 verschiedenen Tumorzelllinien und der von Horton et al. (2006) für einige ALL-Zelllinien veröffentlichten Werte^(148, 219). Horton et al. zeigten in dieser Studie überdies, dass bei primären ALL-Zellen eine etwas höhere Dosis von ca. 10 nM benötigt wird. Entscheidend ist jedoch, dass sowohl für die im Rahmen dieser Arbeit und dem zugrundeliegenden Projekt als auch für die von Horton et al. untersuchten Zelllinien eindeutig belegt wurde, dass die GC-Sensitivität für die Bortezomib-Sensitivität nicht relevant ist. Weiterführende Untersuchungen mit 1,5; 7 und 12 nM Bortezomib demonstrierten anschaulich, dass der Wirkstoff Dosis-abhängig in beiden Zelllinien sowohl vitalitätsmindernd wirkte als auch in vergleichbarer Intensität Caspase-3/-7-vermittelte Apoptose auslöste (Abbildungen 3-4 und 3-5). Korrelierend dazu wurde auch die Caspase-3-vermittelte, apoptotische PARP-1-Spaltung nachgewiesen (Abbildung 3-7). Die nach 72 h detektierte Zunahme der PI-Positivität bei 7 nM Bortezomib geht daher wahrscheinlich auf sekundäre nekrotische Prozesse der terminalen Apoptosephase zurück⁽²⁰³⁾. Die nekrotische PARP-1-Spaltung (Banden bei 55 kDa oder 72 kDa)⁽²⁰⁵⁾, die bei der Zelllinie MHH-cALL-2, 48 h nach Behandlung mit 12 nM Bortezomib detektiert wurde (Abbildung 3-7), spricht dagegen für eine Beteiligung der Cathepsine B und D. Diese lysosomalen Proteasen gelten als charakteristisch für Nekroseprozesse und werden durch klassische Nekrose-Induktoren wie H_2O_2 erzeugt⁽²⁰⁵⁾. Das gänzliche Verschwinden des vollständigen PARP-1-Proteins und die minimale Stoffwechselaktivität nach dieser hohen Konzentration deuten darauf hin, dass hier vermutlich die Auflösung der gesamten Zelle schon sehr weit fortgeschritten war.

Die Kombinationsbehandlung mit Prednisolon und 1,5 nM Bortezomib induzierte in beiden Zelllinien eine stärkere Vitalitätsminderung als die Bortezomib-Einzelbehandlungen. Jedoch führten die beiden höheren Bortezomib-Konzentrationen kombiniert mit Prednisolon in der GC-resistenten MHH-cALL-2-Zelllinie zu einer weniger starken Verminderung der Stoffwechselaktivität. Die nach der kombinierten Behandlung mit Bortezomib und Prednisolon beobachtete Caspase-Aktivität war in beiden Zelllinien deutlich höher, als nach der Prednisolon-Einzelbehandlung. Ferner wurde bei der GC-sensitiven MHH-cALL-3 Zelllinie dagegen eine der Einzelbehandlung entsprechende Caspase-Aktivität nachgewiesen. Der Zusatz von Prednisolon bewirkte in den GC-resistenten Zellen bemerkenswerterweise eine Reduktion der Bortezomib-induzierten Caspase-vermittelten Apoptose (Abbildung 3-5). Im Gegensatz dazu löste die Kombinationsbehandlung mit 7 nM Bortezomib nach 72 h Inkubation vor allem in den GC-resistenten Zellen eine extreme Erhöhung der PI-Positivität aus (Abbildung 3-6). Die PARP-1-Spaltungs-Analyse nach 48 h bestätigte, dass vor allem bei den kombinierten Behandlungen nekrotische Prozesse zum Zelltod führten. Allerdings wurde bei beiden Zelllinien auch eine starke Intensität des apoptotischen Spaltproduktes nachgewiesen. Diese Indizien sprechen dafür, dass es sich hierbei möglicherweise um sekundäre Nekrose handelte. Dagegen spricht jedoch, dass durch die Kombination auch nach einer verkürzten Inkubationsdauer von 8 h keine Verstärkung der Apoptose-Induktion bei den MHH-cALL-2-Zellen nachgewiesen wurde (nicht gezeigte Daten). Die bisher beschriebenen

Ergebnisse und insbesondere die fehlende Caspase-3/-7-Aktivität lassen den Schluss zu, dass bei der GC-Resistenz vermutlich alternative Zelltodmechanismen eine entscheidende Rolle spielen. Im Laufe der Jahre konnte mit Hilfe von spezifischen Untersuchungen gezeigt werden, dass es sich auch bei diesen Mechanismen um regulierte Prozesse handelt (siehe Kapitel 1.7). Die Unterscheidung, ob es sich bei dem GC-induzierten Zelltod um Autophagie-abhängigen Zelltod, Nekrose oder um Nekroptose handelt, ließ sich mit den bisher beschriebenen Analysen jedoch nicht klären. Gerade Nekrose und Nekroptose stimmen in ihren morphologischen Merkmalen weitgehend überein⁽²⁰³⁾. Sie lassen sich jedoch durch Analyse des spezifischen molekularen Markers RIP1 voneinander abgrenzen. Darüber hinaus fehlte bisher auch ein Beleg dafür, welcher der apoptotischen Signalwege durch Prednisolon und Bortezomib angesprochen wird. Sowohl die Induktion der Caspase-vermittelten Apoptose als auch die Induktion der Caspase-unabhängigen Zelltodmechanismen sind von zahlreichen Faktoren abhängig (Abbildung 4-1). Die meisten der beteiligten Proteine sind in mehr als nur einen dieser Signalwege involviert. PARP-1 wird sowohl apoptotisch als auch nekrotisch gespalten.

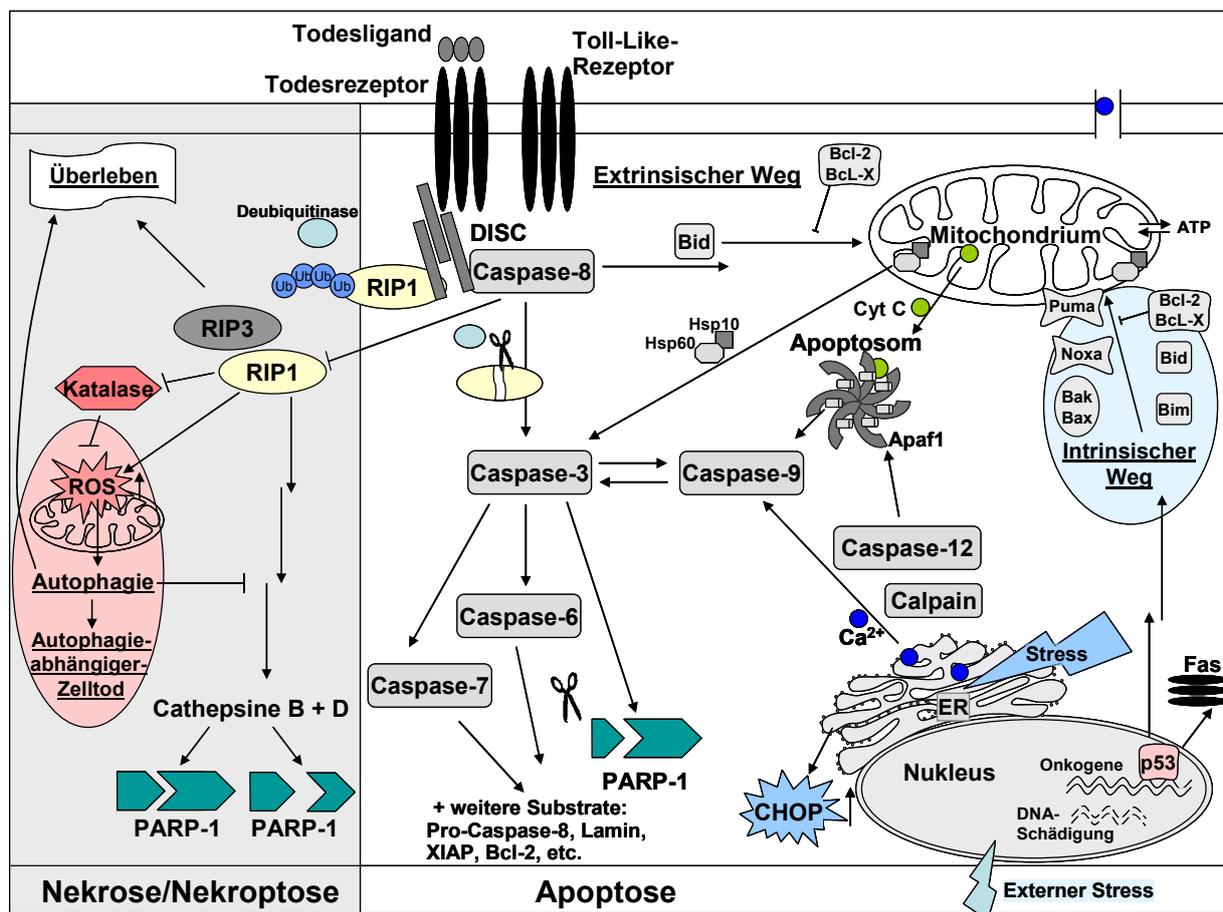


Abbildung 4-1: Charakteristische Merkmale der für Apoptose und alternative Zelltodmechanismen.

Zur Aufklärung der durch Prednisolon und Bortezomib beeinflussten Signalwege war es daher notwendig, zusätzlich zum PARP-1-Spaltungsmuster weitere Proteine, die als spezifische Marker für die einzelnen Mechanismen gelten, zu untersuchen. Als Nachweise für den Todesrezeptor-vermittelten Apoptose Signalweg wurden daher die Caspase-8-

Aktivierung und die Caspase-8-induzierte Spaltung der Serin-Threoninkinase RIP1 ausgewählt^(203, 211, 229, 230). Als Marker für die Induktion von ER-Stress wurde außerdem das Expressionsniveau des Transkriptionsfaktors CHOP, auch bekannt als GADD153, analysiert.

Zuerst wurde die Caspase-8-Aktivität mit einem Lumineszenz-basierten Assay analog zu den für die vorliegende Arbeit durchgeführten Caspase-3/-7-Assays quantifiziert (nicht gezeigte Daten). Es zeigte sich jedoch, dass die Caspase-8 weder durch eine Prednisolon- noch durch eine Bortezomib-Behandlung als Initiator-Caspase aktiviert wurde, obwohl die Effektor-Caspasen-3 und -7 aktiv waren. Erst nach 48 h war eine leichte Erhöhung zu detektieren. Als Nachweis für die RIP1-Spaltung wurde eine Reduktion der RIP1-Bande bei 74 kDa gewertet, da ein Spaltprodukt nicht detektiert wurde (siehe Anhang, Abbildung 6-9) (Stephanie Trittel, Diplomarbeit). Die Stimulation der Zellen mit 6,2 µM Prednisolon löste weder eine RIP1-Spaltung aus, noch wurde eine erhöhte CHOP-Expression oder eine Translokation dieses Transkriptionsfaktors in den Nukleus detektiert. Im Gegensatz dazu führte die Behandlung beider Zelllinien mit 12 nM Bortezomib nach 48 h zu einer RIP1-Spaltung. Bei den MHH-cALL-2 Zellen induzierte diese Stimulation außerdem eine Erhöhung der CHOP-Expression, was eine ER-Stress-Induktion bestätigte. Zusammen mit der sehr spät aktivierten Caspase-8 ist dies ein Hinweis auf eine sekundäre Induktion dieser Caspase, wie sie von Kruidering et al.⁽²³¹⁾ diskutiert wurde. Die ER-Stress induzierte Apoptose verläuft über die Caspasen-12 und -9, welche die Effektor-Caspasen aktivieren (Abbildung 4-1). Studien belegten, dass die Pro-Caspase-8 ein Substrat dieser Effektor-Caspasen ist und auf diesem Weg nachgeschaltet eine Aktivierung des Caspase-8 vermittelten Apoptose-Signalweges stattfinden kann^(231, 232).

Die vorliegenden Daten führten zu der Hypothese, dass 12 nM Bortezomib durch ER-Stress-vermittelte Apoptose zum Zelltod führt. Unterstützt wird dies dadurch, dass für Bortezomib und andere Proteasominhibitoren bereits nachgewiesen wurde, dass die Inhibition des UPS zu einer übermäßigen Akkumulation von Proteinen im ER und im Zytoplasma führt^(152, 169-171, 233, 234). Gelingt es Zellen nicht, die Homöostase mit Hilfe der *Unfolded-Protein-Response* (UPR) wieder herzustellen, so führt dies zu ER-Stress und letztendlich zum programmierten Zelltod⁽¹⁵⁹⁾. Der beobachtete Effekt war ebenso wie die RIP1-Spaltung jedoch nur bei der höchsten eingesetzten Dosis festzustellen. Dies lässt darauf schließen, dass entweder die CHOP-Expression trotz Induktion unterhalb der Nachweisgrenze lag oder dass die niedrigeren Konzentrationen über einen anderen Mechanismus zum Zelltod führten, der weder vom ER-Stress noch von der Caspase-8-Aktivität abhängig war. Die Untersuchung des ER-Stresses setzte eine besonders vorsichtige und genaue Handhabung der Zelllinien ebenso voraus wie einen regelmäßigen Wechsel des Nährmediums, da insbesondere Nährstoffmangel diese zelluläre Stressantwort auslösen kann. Zur Bestätigung der festgestellten Tendenz, dass die Caspase-8-Aktivierung nachgeschaltet erfolgt, wäre eine präzise Untersuchung der Kinetik der Caspase-Aktivitäten notwendig. Des Weiteren sind zusätzliche Untersuchungen von Markern des intrinsischen Apoptose-Signalweges essentiell (Abbildung 4-1), als Nachweis dafür, dass die Effektor-Caspasen über diesen Weg induziert werden und die in ALL-Zellen induzierte Apoptose primär Caspase-8 unabhängig verläuft. Es ist zu überlegen, ob zudem die Untersuchung weiterer Schlüsselproteine wie Caspase-12 oder Calpain sinnvoll

ist, um die Bortezomib-Induktion des ER-Stresses nachzuweisen, da nur die getestete Höchstdosis diese Zellantwort hervorrief. Schließlich gaben Immunfluoreszenzfärbungen, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit Antikörpern gegen VCP und 20S-durchgeführt wurden, erste Hinweise darauf, dass bereits die Zugabe von 7 nM Bortezomib vor allem in der MHH-cALL-2 Zelllinie zu einer Protein-Aggregation führt (Abbildung 3-18). Möglicherweise ist die Zelle jedoch bei dieser Konzentration noch in der Lage den ER-Stress über die UPR abzubauen. Die Untersuchung von Suspensionszellen erwies sich für die Untersuchung der Lokalisierung als nachteilig, da der zytoplasmatische Bereich dieser Zellen sehr klein ist im Verhältnis zum Kern. An adhärennten Zellen wurde der Nachweis für die zytoplasmatische Protein-Akkumulation als Folge der Proteasom-Hemmung bereits erbracht^(152, 169, 170, 170). In Suspensionszellen wären für eine präzisere Lokalisierung der Protein-Akkumulation weitere Immunfluoreszenzfärbungen notwendig, z. B. zum Nachweis von Ubiquitin oder ER-segregierter Proteine. Die erhöhte Granularität der Zellen, die bei lichtmikroskopischer Betrachtung vor allem der GC-resistenten Zelllinie nach Prednisolon-Zugabe festgestellt wurde, deutet auf eine mögliche autophagische Vakuolisierung der Zellen hin, wie sie 2009 von Laane et al. für einzelne Dexamethason-behandelte ALL-Zelllinien beschrieben wurde⁽²³⁵⁾. Diese Hypothese könnte durch eine Immunfluoreszenzfärbung des spezifischen Autophagosomen-Markers LC3 bestätigt werden. Abschließend ist über die Ergebnisse der Vitalitätsstudien zu sagen, dass es eindeutige Indizien dafür gibt, dass Prednisolon nicht nur Apoptose in ALL-Zellen auslöst, sondern besonders in den GC-resistenten Zellen auch alternative Zelltodmechanismen von Bedeutung sind. Eine Identifizierung der ausschlaggebenden Regulationsprozesse bietet besonders für die GC-resistenten Patienten die Möglichkeit zur Entwicklung neuer Therapieoptionen. In erster Linie sollten diese Studien an dem etablierten Modellsystem sowie an weiteren als resistent bekannten Zelllinien fortgeführt werden. Allerdings handelt es sich bei Zelllinien immer um artifizielle Systeme, so dass auch intensive Studien an primären Zellen unerlässlich sind.

Laut Herstellerangaben sollte Bortezomib, sobald es in der mitgelieferten 0,9 %-igen Kochsalzlösung resuspendiert wurde, innerhalb weniger Stunden verwendet werden. Mittels isokratischer HPLC-Analysen und NMR-Spektroskopie wurde jedoch demonstriert, dass Bortezomib in Form einer Stammlösung von 1 mg/mL mindestens eine Woche bei 4°C lichtgeschützt molekular stabil bleibt⁽²²⁰⁻²²²⁾. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit an ALL-Zelllinien durchgeführten Untersuchungen zeigten jedoch schon nach drei Tagen Lagerung einen deutlichen Verlust der anti-proliferativen Wirkung im direkten Vergleich zu frisch angesetzter Lösung. Zusätzlich zu den standardmäßig durchgeführten Analysen zur metabolischen Aktivität und zur Apoptose-Induktion wurde kürzlich ein 20S-Proteasom-Aktivitäts-Assay (APT280, Chemicon-Millipore GmbH) gemäß Herstellerangaben etabliert. Für den Test der proteolytischen 20S-Aktivität wurde die Zelllinie MHH-cALL-2 für 24 h mit 7 nM frischem oder drei Tage gelagertem Bortezomib inkubiert. Erste mit dieser Methode gewonnenen Ergebnisse bestätigten eine um 93 % verminderte inhibitorische Wirkung des Bortezomibs (nicht gezeigte Daten). Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit an ALL-Zelllinien durchgeführten Untersuchungen zur Lagerbarkeit der Bortezomib-Stammlösung zeigten, dass schon nach drei Tagen Lagerung ein deutlicher Verlust der anti-proliferativen

Wirkung im direkten Vergleich zu frisch angesetzter Lösung festzustellen war. Zur endgültigen Validierung dieser Ergebnisse wären jedoch noch weitere Experimente durchzuführen. Mittels Röntgenkristallographie wurde gezeigt, dass eine spezifische Hemmung der chymotrypsin-artigen proteolytischen Aktivität des Bortezomibs nicht nur auf die kovalente Bindung der Dipeptidboronsäure an die Threoninreste der β 5-Untereinheiten im Innern des 20S-Kernkomplexes zurück geht (Abbildung 4-2)⁽²³⁶⁾.

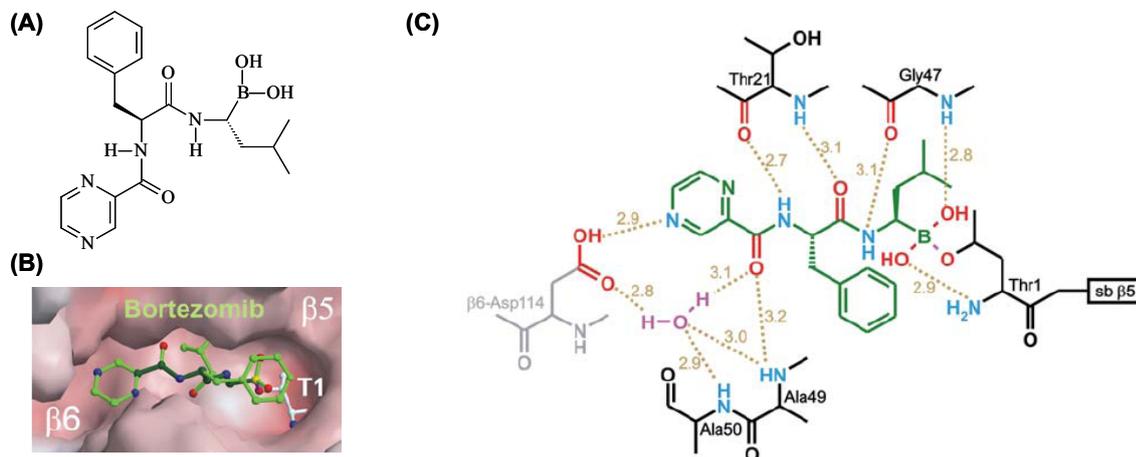


Abbildung 4-2: Interaktionen des Bortezomibs mit dem 20S-Proteasom.

Bortezomib inhibiert hauptsächlich die β 5-Zentren, welche chymotrypsin-Aktivität besitzen, da besonders hier die Ausbildung kovalenter und nicht-kovalenter Bindungen zu einer Konformationsänderung der Substratbindungsstellen führt⁽²³⁶⁾. (A) Strukturformel des Bortezomibs, (B) und (C) Interaktion des Inhibitors mit den reaktiven proteolytischen Zentren im Inneren des 20S-Kernkomplexes (adaptiert nach Groll et al., 2006). Das Boronsäuredipeptid bindet vornehmlich an die N-terminalen Threoninreste der aktiven β 5-Zentren. Die Bindung wird durch die Interaktion mit benachbarten Aminosäuren des aktiven Zentrums stabilisiert. Darüber hinaus bildet das Inhibitor-molekül Wasserstoffbrückenbindungen zu den β -6-Zentren aus, die sich in räumlicher Nähe befinden. Durch diese Interaktionen kommt es zu einer leichten Konformationsänderung der Substratbindungsstellen des 20S-Enzymkomplexes, wobei die Substratbindungstaschen vergrößert werden.

Zusätzlich interagieren die Bortezomibmoleküle durch die Ausbildung von Wasserstoffbrücken mit den Aminosäuren benachbarter reaktiver Zentren. Dies führt zu einer Konformationsänderung der Substratbindungstaschen. Daraus resultiert eine Beeinträchtigung der Substratbindung und die Substrate werden folglich nicht mehr gespalten. Möglicherweise kommt es während der Lagerung von Bortezomiblösungen zu molekularen Veränderungen der hochreaktiven Dipeptidboronsäuren, wodurch sie die Fähigkeit zur spezifischen 20S-Hemmung verlieren. Sowohl die Bildung intramolekularer Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Carbonyl- und den Aminogruppen des Inhibitors als auch *Van-der-Waals*'sche Wechselwirkungen würden zu einer erheblichen Konformationsänderung des Moleküls führen und die spezifische Hemmung beeinträchtigen. Nur mit Hilfe zweidimensionaler NMR-Analysen oder einer HPLC-Gradienten-Messung ließen sich diese Veränderungen nachweisen. Aufgrund des beobachteten Verlustes der inhibitorischen und der anti-proliferativen Wirkung wurde darauf geachtet, dass für die durchgeführten Experimente ausschließlich Bortezomib verwendet wurde, welches am selben Tag auch resuspendiert worden war.

Bisher wurde lediglich der induzierte Zelltod als Indiz für die anti-Tumorwirkung von Prednisolon und Bortezomib beschrieben. Es handelt sich hierbei jedoch nur um die terminalen Prozesse, die zum Absterben der Zellen führen. Die Induktion dieser Signalwege erfolgt meist durch vorgeschaltete und übergeordnete Prozesse. In den folgenden Kapiteln wird daher die spezifische Wirkung der verwendeten Substanzen auf diejenigen Signalwege näher erläutert, die vermutlich die GC-Resistenz von ALL-Zellen beeinflussen. Aufgrund der Indizien aus der Vorstudie und den Hinweisen aus der Literatur zählt hierzu neben dem ERAD vor allem der UPS-assoziierte NF κ B-Signalweg. Mit Hilfe von Expressionsanalysen und Lokalisierungsstudien der in diesen Signalweg involvierten Proteine I κ B, NF κ B, VCP und des Proteasoms sollte diese Hypothese belegt werden. Zusätzlich dazu sollte die Untersuchung der differenziell exprimierten Katalase⁽³²⁾ und des Proteins Hsp60, zur Aufklärung der Wirkmechanismen dienen. Bei letzterem handelt es sich nicht nur um ein Chaperonin, das eng mit dem Mitochondrium verknüpft ist, sondern auch um einen Apoptose-regulierenden Faktor^(225, 226, 237, 238).

4.1.2 Initiale Expressionsunterschiede zwischen GC-sensitiven und resistenten ALL-Zelllinien

In der Vorstudie zu der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass das VCP in der Gruppe der PPR-Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung überexprimiert wird⁽³²⁾. Zur Charakterisierung des zellbiologischen Modellsystems wurden daher auch die RNA- und Protein-Expression dieses Zielgens untersucht. Außerdem stand sein Interaktionspartner mit dem NF κ B-Signalweg, das Inhibitorprotein I κ B α ⁽⁹¹⁾ im Fokus der Untersuchungen. Während die initiale VCP-Expression sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene wie erwartet in der GC-resistenten Zelllinie MHH-cALL-2 höher war als in der GC-sensitiven Zelllinie MHH-cALL-3, wies die initiale I κ B-Expression keine Unterschiede auf. Die innerhalb von 96 h nach Gabe von Prednisolon und Bortezomib durchgeführten Expressionanalysen belegten, dass beide Medikamente die Regulation dieser Gene deutlich beeinflussten. Hieraus lässt sich ableiten, dass sowohl der NF κ B-Signalweg als auch der UPS in die zelluläre Antwort involviert sind und vermutlich an der GC-Resistenz beteiligt sind.

4.1.3 GC-Sensitivität-assoziierte Veränderungen in der Expression und der Protein-Lokalisierung in ALL-Zelllinien nach Gabe von Prednisolon

Die Ergebnisse der RT-PCR-Analysen, die nach der Prednisolongabe im Verlauf durchgeführt wurden, demonstrierten, dass besonders die Hochregulation von I κ B α einen deutlichen Unterschied zwischen den GC-sensitiven und den GC-resistenten Zellen darstellte. Die maximale I κ B α -Expression der GC-sensitiven Zelllinie MHH-cALL-3 war zweifach höher, als die Expression in der unbehandelten Kontrolle und wurde bereits nach 24 h erreicht. Die GC-resistente MHH-cALL-2 Zelllinie zeigte bereits hier eine deutlich höhere I κ B-Expression, allerdings steigerte sich die Expression in dieser Zelllinie weiter. Die maximale Expression wurde erst nach 48 h erreicht und war 3,4-fach höher als das Ausgangsniveau und

deutlich höher verglichen zum Maximum der GC-sensitiven Zelllinie. Dies entspricht dem von Barnes et al.⁽⁵³⁾ detailliert beschriebenen GC-Wirkmechanismus. Hierbei wird der zytosolische GR-Komplex durch die GC-Bindung aktiviert, transloziert in den Nucleus und induziert dort die I κ B α -Expression. Dies geschieht durch Bindung des GC-GR-Komplexes an sogenannte *GC-response Elements* in der Promotorregion des *I κ B α* -Gens. Zudem wirft es die Frage auf, warum ausgerechnet in der GC-resistenten Zelllinie dieser Effekt größer ist, als in der GC-sensitiven. Denn neben der direkten Interaktion des GR mit der NF κ B-Untereinheit p65 ist es vor allem die Neusynthese von I κ B α , die dazu führt, dass der Transkriptionsfaktor inaktiviert wird. Wie Kordes et al.⁽⁴⁰⁾ zeigten, ist NF κ B in fast allen ALL-Zellen konstitutiv aktiv. Daher ist die Inaktivierung dieses proliferativ wirkenden Transkriptionsfaktors für die Leukämitherapie von entscheidender Bedeutung. Die Western-Blot-Analysen zeigten jedoch, dass sich die deutlich höhere *I κ B α* -RNA-Expression der MHH-cALL-2-Zelllinie in der exprimierten Proteinmenge nach 48 und 72 h nicht niederschlug, denn die Untersuchungen nach 48 h demonstrierten für beide Zelllinien gleichermaßen eine zweifache Erhöhung der I κ B α -Menge, verglichen zur unbehandelten Kontrolle. Allerdings belegen diese Untersuchungen, dass in beiden Zelllinien die GC-Wirkung über den zytosolischen GR vermittelt wird, wie es 1997 von Barnes et al. publiziert wurde (vergleiche hierzu Abbildung 1-1). Buttgeriet et al.⁽⁵⁴⁾ würden die festgestellten zellulären Reaktionen dem GR-vermittelten genomischen Wirkmechanismus zuordnen. Überdies stellt sich die Frage, weshalb die GC-resistenten Zelllinien trotz sehr starker RNA-Expression nur eine vergleichsweise geringe I κ B α -Proteinmenge aufweisen. Es gibt zwei naheliegende Erklärungen für dieses Phänomen. Einerseits wäre es möglich, dass ein translationales Problem in dieser Zelllinie besteht und das Protein daher nicht vollständig gebildet und angereichert wird. Andererseits ist dies ein möglicher Hinweis darauf, dass die GC-resistenten Zellen das I κ B α gleich wieder über das 20S-Proteasom degradieren. Die Tatsache, dass das Protein aber generell in unbehandelten Zellen beider Zelllinien gleichermaßen exprimiert wird, spricht eher gegen eine translationale Störung. Mit Hilfe des bereits erwähnten 20S-Aktivitätsassays wurde festgestellt, dass es in unbehandelten Zellen keine nennenswerten Unterschiede in der proteolytischen Aktivität zwischen beiden Zelllinien gab (nicht gezeigte Daten). Denkbar wäre, dass es vor allem in den GC-resistenten Zellen zu einer stärkeren Aktivierung des Proteasoms kommt, wodurch das nach Stimulation verstärkt transkribierte *I κ B α* gleich nach der Translation wieder degradiert wird. Möglicherweise wäre hier auch die Analyse des Phosphorylierungs- und des Ubiquitinierungsstatus von I κ B hilfreich, da diese Markierungen das Signal zur Degradation des Inhibitors darstellen. Insgesamt ist die I κ B-Expression in der Zelllinie MHH-cALL-2 daher vor allem als weiteres molekulares Merkmal für die GC-Resistenz der Zelllinie zu betrachten, da erst nach GC-Behandlung die Unterschiede auftraten, nicht aber initial. Weiterhin wäre eine Beeinträchtigung der GR-Bindung an den Transkriptionsfaktor NF κ B denkbar und eine daraus resultierende Störung der Inaktivierung. Die Bindung an die Promotor-Region des *I κ B*-Gens war jedoch nicht negativ beeinflusst, was durch die Induktion der I κ B-Expression demonstriert wurde.

Im Gegensatz zu $I\kappa B$ veränderte sich die VCP-Expression ausschließlich bei den MHH-cALL-2 Zellen. Die maximale VCP-Expression trat 24 h nach der maximalen $I\kappa B$ -Expression in dieser Zelllinie auf. Die maximale Expression war fast zweifach höher als die initiale VCP-Konzentration. Hingegen blieb die VCP-Expression in den GC-sensitiven Zellen unverändert. Auf Proteinebene war jedoch innerhalb von 96 h bei keiner der Zelllinien eine deutliche Erhöhung des VCP zu detektieren. Allerdings wurden die Western-Blot-Analysen fast ausschließlich nach 48 oder 72 h durchgeführt, einem Zeitpunkt, zu dem gerade das maximale VCP-RNA-Niveau erreicht wurde. Spätere Analysen wurden nicht durchgeführt, weil das Medium der Suspensionszellen während der Versuche nicht gewechselt wurde. Bei Ergebnissen nach mehr als 96 h Inkubationszeit wären daher möglicherweise auch unspezifische Effekte aufgrund beginnenden Nährstoffmangels aufgetreten. Die differenzierte Regulation der Zielgene durch die GC-Gabe in Abhängigkeit zur GC-Sensitivität der Zellen bestätigte den Verdacht, dass beide Signalwege für die GC-Resistenz von Bedeutung sein könnten. Daher erschien die gezielte Hemmung des 20S-Proteasoms als geeignetes Werkzeug zur Modulation der GC-induzierten Effekte.

4.1.4 Modulation der Zielgenexpression und der Zielprotein-Lokalisierung in ALL-Zelllinien durch die Gabe von Bortezomib in Abhängigkeit zur GC-Sensitivität

Die Unterbrechung des UPS mittels spezifischer Inhibition der 20S-Proteasomen führt zu einer reversiblen Blockade aller Proteasom-assoziierten Signalwege. Im Zusammenhang mit der GC-Wirkung auf ALL-Zellen sind vermutlich besonders der NF κ B- und der ERAD-Signalweg von einer solchen Inhibition betroffen. Zum einen ist das Proteasom an der Prozessierung der NF κ B-Untereinheit p50 aus dem Vorläufermolekül p105 und an der Degradation von $I\kappa B\alpha$ beteiligt^(47, 53). Zum anderen induzierte die Hemmung mit MG132 die Neusynthese des NF κ B-Inhibitors⁽¹⁵⁴⁾ und führte zur Akkumulation ER-segregierter Proteine^(152, 169-171). Außerdem ist die in PPR-Patienten überexprimierte ATPase VCP in beide Signalwege involviert^(81, 88, 89, 91).

Es stellte sich heraus, dass Konzentrationen von 1,5 und 7 nM Bortezomib nicht zu einer Induktion der $I\kappa B$ -Expression führten. Auf Proteinebene wurde bei einer Dosis von 12 nM sogar eine verminderte $I\kappa B$ -Menge festgestellt. Besonders die kombinierte Behandlung mit Prednisolon und 7 nM Bortezomib führte zu bemerkenswerten Ergebnissen, da die $I\kappa B$ -Expression der GC-resistenten Zelllinie MHH-cALL-2 auf das Expressionsmaximum der GC-sensitiven Zellen nach alleiniger Prednisolon-Behandlung herabgesenkt wurde. Nach 24 h wurde in beiden Zelllinien eine etwa zweifache Erhöhung verglichen zur Kontrolle festgestellt. Nach 48 h Inkubation machte sich das auf Proteinebene hauptsächlich bei der Zelllinie MHH-cALL-3 bemerkbar. Diese Ergebnisse widersprechen auf den ersten Blick deutlich der von Vu et al.⁽¹⁵⁴⁾ festgestellten induktiven Wirkung der 20S-Inhibition durch MG132 auf die $I\kappa B$ -Expression. Sie korrelieren jedoch mit Daten einer Studie, bei der die Effekte von Bortezomib auf Multiple Myelom Zelllinien und auf Multiple Myelom Zellen in Xenograft-Mausmodellen untersucht wurde⁽²³⁹⁾. Hierbei wurde festgestellt, dass der Inhibitor

innerhalb von 8 h signifikant die I κ B-Expression verringerte. Nicht untersucht wurde für diese Studie jedoch, ob es durch die Proteasom-Inhibition zu einer Akkumulation des ubiquitinierten I κ Bs im Zytosol kam. Diese als Aggresomen bezeichneten Komplexe gelten als charakteristisch für Zellen, die einer solchen 20S-Hemmung ausgesetzt sind^(169, 170). Um eine Aggresomenbildung und eine I κ B-Beteiligung nachzuweisen, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit Immunfluoreszenzfärbungen gegen I κ B, VCP und eine Untereinheit des 20S-Proteasoms durchgeführt. Ebenso wie in den RT-PCR- und den Western-Blot-Analysen wurde jedoch auch mit dieser Methode kein Anstieg der I κ B-Expression nach der Bortezomib-Einzelbehandlung detektiert. Eine deutliche I κ B-Akkumulation in klar abgegrenzten zytosolischen Bereichen, was auf die Bildung von Aggresomen schließen lässt, wurde jedoch hauptsächlich nach der kombinierten Behandlung festgestellt (Abbildungen 3-16 und 3-17). Die Immunfluoreszenzfärbung von VCP und der 20S-Untereinheit zeigten außerdem, dass diese Proteine durch die Behandlung mit Bortezomib verstärkt nachzuweisen waren und es zu einer Komplexbildung kam (Abbildungen 3-18 und 3-19), insbesondere in der GC-resistenten MHH-cALL-2 Zelllinie. Diese sehr kompakten Aggregate sind wahrscheinlich SDS-resistent. In diesem Fall wären sie eventuell nicht mehr in den für die vorliegende Arbeit untersuchten Gesamtzelllysaten enthalten, weil sie im abschließenden Zentrifugationsschritt des verwendeten Protokolls zur Herstellung der Lysate sedimentieren könnten. Damit wäre eine I κ B-Reduktion im Western-Blot zu erklären. In einer ersten Untersuchung nach 48 h Inkubation, bei der dieser Zentrifugationsschritt ausgelassen wurde, ließ sich tendenziell eine höhere I κ B-Menge in den Proben nachweisen. Eine Normalisierung gegen Actin wurde jedoch nicht durchgeführt (nicht gezeigte Daten). Insgesamt sprechen sowohl die Expressionsanalysen als auch die Immunfluoreszenzfärbungen trotzdem eher für eine Verminderung der I κ B-Expression durch die Gabe von Bortezomib. Immunpräzipitationen, die an unbehandelten und Prednisolon-behandelten Zellen durchgeführt wurden, deuteten an, dass sich eine direkte Interaktion zwischen I κ B und VCP nur schwach und auch nur im VCP-Präzipitat nachweisen ließ (nicht gezeigte Daten). Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass VCP überwiegend über die Ubiquitinketten mit den Substratmolekülen interagiert^(83, 88, 90) bzw. auf eine wenig robuste Bindung zwischen I κ B und VCP. Für eine endgültige Aussage fehlen jedoch noch weitere IP-Experimente, die 48 und 72 h nach Behandlung mit Bortezomib und Prednisolon durchgeführt werden sollten. Hier wären auf Basis der bisherigen Ergebnisse die deutlichsten Effekte auf Proteinebene zu erwarten.

Konzentrationen von 7 nM oder 12 nM Bortezomib bewirkten bei beiden Zelllinien einen deutlichen VCP-Anstieg. Dies fügte sich gut in das Bild der bisherigen Informationen über die Funktionen des Chaperons innerhalb des UPS ein, die weit über die Degradation des I κ B hinausgehen. Schließlich ist es innerhalb des ERAD an der Retro-Translokation missgefalteter Proteine ins Zytoplasma beteiligt^(68, 79, 83, 84), an ihrer Ubiquitinierung^(85, 86) und am Transport zum Proteasom^(85, 86). Weiterhin ist es ein Hinweis darauf, dass für die anti-Tumor-Wirkung des Bortezomibs vielleicht nicht ausschließlich die I κ B-Regulation entscheidend ist. Möglicherweise ist stattdessen eher die unterbundene Prozessierung des NF κ B-Vorläuferproteins p105 oder die Induktion einer zellulären Stressantwort durch die

Unterbrechung des ERAD verantwortlich. Insbesondere der VCP-Anstieg ist ein Hinweis darauf, dass ein größerer Bedarf für dieses Chaperon besteht, weil durch die 20S-Hemmung die ubiquitinierten Substratproteine nicht abgebaut werden und so an die vorhandenen ATPase-Moleküle gebunden bleiben. Eine Isolierung und Charakterisierung der zytoplasmatischen Proteinaggregate würde Aufschluss darüber geben, wie stark das VCP neben anderen Chaperon-Molekülen in diesen Komplexen vertreten ist. Außerdem würde die Co-Lokalisierung des VCP mit dem Strukturprotein Tubulin mittels Immunfluoreszenzfärbungen einen weiteren Nachweis für seine Beteiligung an der Aggresombildung darstellen.

Fraktionierungen, die zur NF κ B-Lokalisierung durchgeführt wurden, zeigten, dass in unbehandelten Zellen beider Zelllinien keine konstitutive Präsenz der NF κ B-Untereinheit p50 im Kern nachweisbar war. Dies entsprach nicht den Erwartungen, da bei konstitutiver Aktivierung beide NF κ B-Untereinheiten, p50 und p65, im Kern auftreten sollten, wie es von Vu et al.⁽¹⁵⁴⁾ für Prostatakarzinom-Zellen gezeigt wurde. Es ist jedoch vermutlich ein weiteres Indiz dafür, dass die pro-apoptotische Wirkung des Bortezomibs über einen anderen Mechanismus verläuft. Die Fraktionierung belegte außerdem eine starke Präsenz der Untereinheit p50 im Zytoplasma. Die Zugabe von Bortezomib induzierte einen Rückgang der p50-Proteinmenge. Dies ist möglicherweise ein Hinweis auf die Unterbrechung der p105-Teilgradation zur p50 Neusynthese. Die Untersuchung der Zellfraktionen sollte außerdem als Nachweis für eine I κ B-Kerntranslokation nach Bortezomib-Behandlung dienen wie sie von Vu et al. in Prostatakarzinomzellen nach MG132-Behandlung beobachtet wurde. Eine Translokation des Inhibitors wurde in den ALL-Zellen nicht festgestellt. Allerdings wurde in dieser Publikation beschrieben, dass vor allem die Untereinheit p65 in den Zellkernen für die Interaktion mit I κ B empfänglich ist, wodurch die Transkriptionssteuerung anti-poliferativer Gene inhibiert wird. Zur abschließenden Beantwortung der Frage wären zusätzliche Untersuchungen beider NF κ B-Untereinheiten notwendig. Außerdem ist auszuschließen, ob auch hier die zytosolische Komplexbildung eine Rolle spielt. Falls sich jedoch bei weiteren Untersuchungen bestätigen sollte, dass Bortezomib keine I κ B-Induktion in ALL-Zellen hervorruft, so könnte dieser Unterschied zur MG132-induzierten 20S-Hemmung an der geringeren Selektivität dieses Inhibitors liegen. MG132 inhibiert nicht nur die proteolytischen Zentren des Proteasoms sondern auch weitere Enzyme wie Calpain I und Cathepsine^(240, 241). Andererseits könnte es sich aber auch um einen Zelltyp-abhängigen Effekt handeln, da von Hideshima et al.⁽²³⁹⁾ an Multiplen Myelom-Zellen gezeigt wurde, dass die 20S-Inhibitoren MG132 und Lactacystin ebenfalls einen I κ B-reduzierenden Effekt aufweisen. Wie aus den Daten der vorliegenden Arbeit hervorgeht, schien für die Induktion der I κ B-Expression in den ALL-Zellen eher das Prednisolon verantwortlich zu sein als das Bortezomib. Hideshima et al.⁽²³⁹⁾ zeigten zudem, dass Bortezomib den Abbau von I κ B vermutlich über die aktivierende Phosphorylierung der IKK-Kinase und des Rezeptor-interagierenden Proteins-2 (RIP2) steuert. Durch zusätzliche spezifische IKK-Inhibition war es außerdem möglich, den Abbau von I κ B zu verhindern. Des Weiteren wurde in Prostatakarzinomzellen eine konstitutive Aktivierung dieser Kinase als Ursache für eine konstitutive NF κ B-Aktivierung gefunden^(242, 243). Daher bietet die Analyse, der in die Aktivierung dieser Kinase involvierten Mechanismen

eine weitere Option den Bortezomib-Wirkmechanismus aufzudecken. Hier rückt wiederum das UPS in den Vordergrund, da die IKK-Kinase-Aktivierung, die für die Phosphorylierung des I κ B sorgt und ebenfalls über das UPS mit Hilfe einer K63-Ubiquitinierung gesteuert wird.

Die bisher erläuterten Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Bortezomib-Behandlung auf die ALL-Zelllinien einen anti-proliferativen Effekt besitzt, der möglicherweise auf die Induktion einer zellulären Stressantwort zurückgeht. Es war bisher nicht eindeutig nachweisbar, dass die Wirkung ausschließlich auf der Unterbrechung des NF κ B-Signalweges basiert. Besonders die kombinierte Behandlung mit Prednisolon und Bortezomib zeigte, dass die I κ B-Expression entgegen der Erwartungen nicht erhöht, sondern im Vergleich zur Prednisolon-Einzelbehandlung in den resistenten Zellen sogar erniedrigt wurde. Trotzdem war die Apotoserate der Zellen mit der kombinierten Behandlung deutlich höher, als die mit der Prednisolon-Einzelbehandlung.

Neben der höheren VCP-Expression gibt es noch einen weiteren Hinweis darauf, dass in GC-resistenten Zellen ein erhöhtes zelluläres Stress-Niveau herrscht. Dieses Enzym sorgt für den Abbau von hochreaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in der Zelle und schützt sie so vor Oxidation der Zellbestandteile, die dadurch in Struktur und Funktion geschädigt würden⁽¹⁷⁹⁻¹⁸¹⁾. Initial besaßen die MHH-cALL-2 Zellen eine geringere *Katalase*-Expression als die MHH-cALL-3 Zellen. Für die *Katalase*-Expression schien ebenso wie für das I κ B für beide Zelllinien vor allem die Gabe von Prednisolon oder die Kombination beider Medikamente von Bedeutung zu sein. Möglicherweise deshalb, weil die Zelle so versucht dem autophagischen Zelltod zu entgehen, der mit einer Degradation des Katalase-Proteins und daraus resultierend einer Akkumulation von ROS einhergeht⁽¹⁸⁷⁾. Zum Nachweis, dass Katalase einer der Hauptregulatoren der GC-vermittelten Zellantwort ist, wäre sowohl eine ROS-Quantifizierung als auch eine Analyse weiterer in den autophagischen Zelltod involvierter Schlüsselproteine wie etwa LC3 notwendig.

Im Zusammenhang mit mitochondrialem ROS ist auch die Hsp60-Expression von Bedeutung, die offenbar Dosis-abhängig durch die Gabe von Bortezomib reguliert wird. Ein Großteil der Hsp60-Proteine bindet an das Hsp10 und ist im Mitochondrium lokalisiert⁽²⁴⁴⁾. An HeLa- und Jurkat-Zellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* wurde gezeigt, dass diese beiden Hitzeschockproteine mit der Pro-Caspase-3 assoziieren und an ihrer Prozessierung zur Caspase-3 beteiligt sind^(225, 226). Sie werden als Reaktion auf Apoptoseinduktion beispielsweise mittels Staurosporin oder Camptothecin ins Zytoplasma freigesetzt. An Herzmuskelzellen wurde gezeigt, dass Hsp60 neben dieser pro-apoptotischen auch noch eine anti-apoptotische Funktion inne hat, in dem es mit den Bcl-2 verwandten Proteinen Bax und Bak interagiert und so deren mitochondriale Translokation verhindert^(238, 245). Ein hohes zytosolisches Hsp60-Niveau bewirkte ein Überleben von Ischämie- und Reperfusionsgeschädigten Zellen. Die im Rahmen dieser Arbeit zur Hsp60-Expression ausgeführten Analysen wurden an Gesamtzelllysaten durchgeführt. Beobachtet wurde eine deutliche Erhöhung des Hsp60-Expressionsniveaus nach Bortezomibgabe. Diese Erhöhung korrelierte zu der verstärkt auftretenden Caspase-3/-7-Aktivität. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Bortezomib-induzierte Apoptose in den ALL-Zellen über das

Mitochondrium verläuft und die Aktivierung der Caspase-3 möglicherweise mit Hilfe von Hsp60 erfolgt. Dafür spricht, dass auch nach Bortzomib-Behandlung keine initiale Caspase-8-Aktivität festgestellt wurde, diese Initiator-Caspase beim extrinsischen Apoptose-Signalweg für die Aktivierung der Caspase-3 verantwortlich.

Nach wie vor stand das VCP im Fokus der vorliegenden Arbeit, weil es bei der Bortezomib-induzierten Zellantwort von entscheidender Bedeutung ist. Wegen dieser zentralen Rolle dieses Chaperons wurde das UPS durch siRNA-vermittelte VCP-Herunterregulation unterbrochen. Die Ergebnisse dieser Versuche werden im folgenden Kapitel erläutert.

4.1.5 Konsequenzen der siRNA-vermittelten VCP-Herunterregulation für die GC-Resistenz von ALL-Zellen

Die transiente siRNA-Transfektion zur VCP-Herunterregulation in Suspensionszellen wurde erfolgreich mittels Elektroporation der Zellen durchgeführt (Abbildungen 3-21 und 3-22). Dieses Transfektionsverfahren wurde gewählt, da sich in Voruntersuchungen die Verwendung von Transfektionsreagenzien als ineffizient erwiesen hatte. Parallel dazu war eine verminderte *IκB*-Expression festzustellen, was entweder auf eine unspezifische Wirkung der siRNA zurückzuführen sein könnte oder auf eine regulierende Wirkung des VCP. Für eine Regulation der *IκB*-Expression durch VCP spricht, dass die exprimierten Mengen der Zielgene auch bei Prednisolon-Zugabe miteinander korrelierten. Wie eine im Anschluss an die Transfektion durchgeführten Analysen zeigten, wurde durch die VCP-Herunterregulation außerdem eine Erhöhung der Caspase-3/-7-Aktivität ermittelt. Beides könnten Indizien dafür sein, dass allein die VCP-Überexpression pro-proliferativ und anti-apoptotisch wirkt. Eine im Anschluss an die VCP-Herunterregulation durchgeführte Prednisolonbehandlung führte zu einer völligen Aufhebung der Genexpressionshemmung innerhalb von 24 h. Für dieses Ergebnis sind möglicherweise mehrere Faktoren entscheidend. Erstens führt die transiente siRNA-Transfektion nur zu einer vorübergehenden *VCP*-Herunterregulation, die schon 96 h nach der Transfektion auf Proteinebene wieder nachließ. Zweitens bewirkt Prednisolon in den GC-resistenten Zellen einen enormen *VCP*-Anstieg. Ferner ist festzuhalten, dass die Elektroporation das Risiko birgt, die Zellen zusätzlich durch unspezifische Effekte des Stromflusses zu beeinflussen, die zu einer zellulären Stressantwort führen können. Zumal es sich bei dem reprimierten Zielgen *VCP* um ein Chaperonin handelt, welches durch die Beteiligung am ERAD insbesondere in die Prozesse der zellulären Stressantwort involviert ist⁽⁷⁹⁻⁸²⁾. Aus diesen Gründen wäre es für weitere Untersuchungen zur funktionellen Relevanz des VCP sinnvoll zusätzlich ein induzierbares System zu etablieren, um die spezifischen Effekte von den Nebeneffekten der Elektroporation abzukoppeln. Hierfür würden sich vor allem shRNA-Vektor-Systemen anbieten. Neben der Induzierbarkeit bieten diese Vektorsysteme außerdem die Möglichkeit die Genexpression für einen längeren Zeitraum zu hemmen als dies mit siRNA möglich ist. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur *VCP*-Expressionshemmung reichten nicht aus, um die funktionelle Relevanz der VCP-Überexpression für die GC-Resistenz nachzuweisen. Dies lag einerseits an der geringen Anzahl der durchgeführten Experimente. Andererseits waren auch

die durch die Methode vorgegebenen, oben beschriebenen Beschränkungen von Bedeutung. Darüberhinaus konzentrierten sich die Studien bisher ausschließlich auf *VCP*-Herunterregulation in GC-resistenten Zellen. Eine wesentliche Methode die funktionelle Bedeutung der *VCP*-Überexpression für die GC-Resistenz genauer zu untersuchen wäre außerdem die Etablierung eines induzierbaren Vektorsystems, mit dem *VCP* in GC-sensitiven Zellen überexprimiert werden könnte. Mit einem solchen System wäre es möglich zu prüfen, ob durch eine künstlich herbeigeführte *VCP*-Überexpression eine verminderte GC-Sensitivität der Zellen zu erzeugen ist.

4.2 Expression der Zielgene *VCP* und Katalase in primären Knochenmarkszellen

Die Analysen an primären Knochenmarkszellen beschränkten sich auf die Untersuchung der Zielgenexpression in 10 Patienten. Für diese Studien waren je fünf Patienten ausgewählt worden, die aufgrund ihrer Blastenzahlen an Tag 8 entweder zur Gruppe der *Prednisone Poor Responder* (PPR) oder der Gruppe der *Prednisone Good Responder* (PGR) gehörten. Die Analysen der *VCP*-Expression zeigten, dass in 3 von 5 PPR-Patienten eine *VCP*-Überexpression vorlag, wie es aufgrund der Vorstudie⁽³²⁾ zu erwarten war. Im Gegensatz zu den 2006 von Lauten et al. publizierten Daten wurde jedoch auch festgestellt, dass in 3 von 5 PGR-Patienten eine erhöhte Katalase-Expression vorlag. Dieses Ergebnis passt allerdings dazu, dass initial in der GC-sensitiven Zelllinie MHH-cALL-3 mehr *Katalase* nachgewiesen wurde als in der GC-resistenten MHH-cALL-2 (Abbildung 6-11). Die Ergebnisse der Untersuchungen an primären Zellen sind wegen der geringen Anzahl untersuchter Proben als kritisch zu betrachten. Für eine validierte Aussage müsste eine wesentlich größere Gruppe von Patienten untersucht werden. Trotzdem geben die Ergebnisse dieser Untersuchungen gemeinsam mit der in den Zelllinien festgestellten *Katalase*-Regulation nach Prednisolongabe einen weiteren Hinweis darauf, dass bei der GC-Wirkung nicht nur der programmierte Zelltod eine Rolle spielt, sondern auch alternative Zelltodmechanismen involviert sein könnten. Zusätzlich zu den bisher untersuchten potentiellen Markerproteinen der Vorstudie *VCP* und Katalase, gibt es noch fünf weitere Proteine deren Validierung als prognostische Marker ebenfalls erfolgen sollte. Möglicherweise eröffnen sich dadurch noch weitere Einblicke in die molekularen Mechanismen, die der GC-Resistenz zugrunde liegen.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es potentielle prognostische Markerproteine, die aus der Vorstudie bekannt waren zu validieren. Für *VCP* konnte die prognostische Aussagekraft bestätigt werden, für Katalase jedoch nicht. Im Zusammenhang mit der initialen GC-Behandlung könnte die differentielle $\text{I}\kappa\text{B}$ -Expression einen prognostischen Wert besitzen. Dies ist allerdings noch durch umfangreichere Studien insbesondere an primären Zellen bekannter GC-Sensitivität zu untersuchen. Gerade wegen der vermuteten multifaktoriellen Ursache der GC-Resistenz bleibt es trotzdem unerlässlich, weitere sowohl globalere als auch Signalweg-spezifische Gen-Expressionanalysen durchzuführen, um prognostisch relevante Gene zu identifizieren. Zu diesem Zweck wurde ein System getestet, mit dem umfangreichere Genexpressionsprofile erstellt werden können als mit herkömmlichen RT-PCR-Verfahren. Dieses GeXP-System sollte dazu dienen, die Expression von mehreren prognostisch

relevanten Genen gleichzeitig zu ermöglichen, die bereits durch Microarray-Analysen als mögliche Klassifikatoren im Zusammenhang mit der GC-Resistenz in Erscheinung getreten waren^(27, 223).

Die Expressions-Analyse sechzehn verschiedener Gene an einer einzigen Probe gleichzeitig bedeutet für den Laboralltag einen immensen Fortschritt durch Einsparung von Probenmaterial und Zeit. Allerdings wurde durch die bislang zur Verfügung stehende noch in der Entwicklung befindliche Software viel Zeit für die Auswertung der Daten benötigt. Aus diesem Grund mussten die Messdaten in ein Tabellenkalkulationsprogramm exportiert und dort einzeln analysiert werden. Außerdem war das System durch die vielen an der PCR-Reaktion beteiligten Komponenten relativ störanfällig, so dass die Ergebnisse zusätzlich noch mit herkömmlichen Analysen validiert werden müssen. Obwohl die Expressionsmuster derjenigen Gene, die im Rahmen dieser Arbeit auch mit herkömmlicher RT-PCR untersucht wurden weitgehend übereinstimmten, besteht trotzdem noch weiterer Optimierungsbedarf für diese Methode. Das für die Untersuchung umfangreicherer Genexpressionsprofile gedachte GeXP-System, welches im Rahmen dieser Arbeit getestet wurde, erwies sich daher noch nicht als ausgereift, so dass es für die routinemäßige Untersuchung größerer Patientengruppen eingesetzt werden könnte.

4.3 Ausblick: UPS-Modulation zur Überwindung der GC-Resistenz in kindlicher ALL

Mit Hilfe des im Rahmen dieser Arbeit etablierten Modellsystems konnte gezeigt werden, dass sowohl I κ B als auch VCP an den molekularen Prozessen beteiligt sind, die durch die Prednisolon-Behandlung stimuliert werden. Obwohl die funktionelle Relevanz mit den bisher durchgeführten Analysen nicht abschließend bewiesen werden konnte, ist wahrscheinlich insbesondere das VCP für die GC-Resistenz der Zellen mitverantwortlich. Zum einen geht dies aus der Tatsache hervor, dass in PPR-Patienten initial eine VCP-Überexpression festgestellt wurde⁽³²⁾. Zum anderen wird es dadurch bestätigt, dass durch die Modifikation der zellulären Modellsysteme eine verminderte VCP-Expression, induziert durch Bortezomib und spezifische Genexpressionshemmung, zu einer erhöhten Zelltoderate führten. Interessanterweise führten bei dem durch Prednisolon induzierten Zelltod nicht nur apoptotische, sondern auch alternative Mechanismen zum Absterben der Tumorzellen. Allerdings gelang es mit den bisher durchgeführten Untersuchungen noch nicht die involvierten alternativen Zelltodmechanismen vollständig zu charakterisieren. Laut den auf diesem Gebiet veröffentlichten Studien weist der GC-induzierte Zelltod neben apoptotischen sowohl autophagische als auch nekrotische Merkmale auf⁽⁵⁹⁻⁶¹⁾. Mit den bislang durchgeführten Analysen war es jedoch möglich zu bestätigen, dass gerade GC-resistente Zellen, in denen die Apoptose zumindest teilweise blockiert ist, eher über alternative Zelltodmechanismen absterben. Dies lässt den Schluss zu, dass die Induktion alternativer Zelltodmechanismen in Abhängigkeit zur GC-Resistenz der Zellen steht.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde festgestellt, dass durch die Bortezomib-induzierte Modulation des UPS deutliche Unterschiede im GC-induzierten Zelltod auftreten. So wurde nachgewiesen, dass in GC-resistenten Zellen Prednisolon einen antagonistischen Effekt auf

die Bortezomib-induzierte Apoptose ausübt. Sollte sich herausstellen, dass dieses Merkmal auch für primäre Zellen von GC-resistenten Patienten charakteristisch ist, so könnte dies zu einer frühzeitigeren Identifizierung multiresistenter Patienten und dadurch zu einer Optimierung der Risikostratifizierung beitragen. Wie aus den in dieser Arbeit durchgeführten Zellkulturexperimenten hervorgeht, genügte es für einen solchen Nachweis, nach einer Inkubation isolierter Zellen für 24 h mit den vorgestellten Medikamenten ein Caspase-3/-7-Aktivitätsassay durchzuführen.

Zur Verbesserung der Risikostratifizierung sollte auch die Validierung des aus der Vorstudie bekannten potentiellen prognostischen Markerproteine VCP und Katalase an einem Patientekollektiv beitragen. Wie bereits erläutert, konnte in Übereinstimmung zur Vorstudie tendenziell eine höhere VCP Expression in den PPR-Patienten detektiert werden. Im Widerspruch zur Vorstudie, wurde die Katalase jedoch als stärker exprimiert in den PGR-Patienten nachgewiesen. Darüber hinaus wurde auch festgestellt, dass die GC-sensitive MHH-cALL-3-Zelllinie mehr Katalase exprimierte als die GC-resistente. Die Ergebnisse der Untersuchungen an primären Zellen zeigen Tendenzen, sind aber statistisch nicht aussagekräftig. Zur Validierung der prognostischen Relevanz wären daher weitere Untersuchungen an einem größeren Patientekollektiv erforderlich. Auch die Validierung der bisher nicht geprüften potentiellen Markerproteine bietet weiterhin eine Option zur Verbesserung der Risikostratifizierung. Des Weiteren könnte eine differenzierte Untersuchung der induzierten alternativen Zelltodmechanismen zur Identifizierung neuer prognostischer Marker und zur Entwicklung neuer Therapieoptionen führen. In diesem Kontext ist außerdem zu prüfen, ob sich die Toxizität alternativer Zelltodmechanismen auf einen tolerierbaren Umfang beschränkt. Trotz der Schlüsselfunktion, die das VCP in den untersuchten UPS-assoziierten Signalwegen einnimmt, ist eine multifaktorielle Ursache für die GC-Resistenz nicht auszuschließen. Zur vollständigen Beantwortung dieser Fragestellung wären daher weitere Untersuchungen unter Verwendung von induzierbaren vektoriellen Systemen sowie die Identifikation der involvierten VCP-Interaktionspartner erforderlich. Obwohl die GC-Wirkungsweise noch immer nicht endgültig aufgeklärt ist, schlägt sich vermutlich doch die von Buttgeriet et al.⁽⁵⁴⁾ beschriebene Dosis-abhängige Wirkungsweise in der Konzentrations-abhängigen Induktion verschiedener Zelltodmechanismen nieder. Unterstützt wird dies übereinstimmend von den Beobachtungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit und den von Lambrou et al. publizierten Daten⁽⁶¹⁾. Trotzdem ist der klinische Einsatz der Glucocorticoide in der ALL-Therapie so effektiv, dass die Tumorlast in einem Großteil der Patienten damit deutlich reduziert werden kann.

Die vorliegende Arbeit konnte außerdem erste Einblicke in die molekularen Zusammenhänge der Bortezomib-Wirkungsweise geben, trotzdem bleiben noch viele Fragen offen. Sicher ist, dass Bortezomib in ALL-Zellen Caspase-vermittelte Apoptose auslöst, die vermutlich über den intrinsischen Apoptose-Signalweg und das Mitochondrium verläuft. Besonders das Hsp60 spielt hier, vermutlich bei der Aktivierung der Procaspase-3 eine Rolle. Damit könnte die Caspase-8-unabhängige Aktivierung der Effektor-Caspasen zu erklären sein. Gerade das Mitochondrium übt aber durch die ROS-Produktion auch eine Schlüsselfunktion im Bezug auf die Regulation alternativer Zelltodmechanismen aus. Ferner widersprachen die

vorgestellten I κ B-Expressionsdaten der ursprünglich postulierten I κ B-Induktion durch Bortezomib; sie stehen aber in Einklang mit den Bortezomib-Effekten, die in Multiplen Myelom-Zellen beobachtet wurden⁽²⁴⁶⁾. Statt der I κ B-Induktion ist daher möglicherweise insbesondere die Aktivierung der IKK-Kinase bzw. der Abbau von I κ B entscheidend für die Bortezomib-Wirkung. Obwohl die bisher erzielten Therapie-Erfolge der Bortezomib-Behandlung sehr vielversprechend sind, ist es denkbar, dass nach vollständiger Aufklärung des regulierten Mechanismus vielleicht eine spezifischere Hemmung involvierter Schlüsselproteine eine bessere Therapieoption darstellt. Beispielsweise könnte eine gezielte Hemmung der IKK-Kinase oder des VCP durch spezifische Inhibitoren durchgeführt werden^(247, 248).

Mittlerweile stehen neben Bortezomib auch weitere nicht-reversible Inhibitoren wie die Salinosporamide⁽²⁴⁹⁾ zur Verfügung. Sie eröffnen die Möglichkeit zur detaillierten Untersuchung des Mechanismus, da eine längere Kulturdauer der Zellen unter Einfluss der Inhibition möglich ist. Es bleibt jedoch abzuwarten, ob diese für den therapeutischen Einsatz geeignet sind. Der Patient profitiert zwar offenbar von der reversiblen Hemmung des UPS, vermutlich würde aber eine dauerhafte Unterbrechung zu einer nachhaltigen Schädigung der Proteinregulation führen.

Zur Untersuchung der Bortezomibwirkungsweise im Organismus werden neben weiteren Untersuchungen an primären Zellen vor allem xenogene Transplantationen im Tiermodell unerlässlich sein. Durch die Transplantation von ALL-Zelllinien und von primären Knochenmarkszellen von Patienten bekannter GC-Sensitivität in immundefiziente Mäuse, wäre es möglich, das Fortschreiten der Tumorentwicklung mit und ohne Bortezomib-Behandlung in einem komplexen Organismus zu beobachten. Der biomedizinischen Forschung stehen dazu verschiedene Modellsysteme wie z. B. das NOD scid gamma (NSG)-Mausmodell (*NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ*) zur Verfügung. Weder das *Prkdc*-Gen noch das *IL2rg*-Gen wird in diesen Mäusen exprimiert. Die Mutationen führen neben der Beeinträchtigungen in T-Zell- und B-Zell-Entwicklung und Funktion, zu einer vollständigen Verhinderung der Entwicklung der natürlichen Killer-Zellen (NK-Zellen)^(250, 251). Durch den genetischen Hintergrund der NSG kommen außerdem Defekte innerhalb des angeborenen Immunsystems, wie eine verminderte Makrophagen-Funktionalität und die Abwesenheit von hämatolytischem Komplement hinzu. Xenograft-Transplantations-Untersuchungen bestätigten bereits erfolgreich die anti-proliferativen und anti-Tumor-Eigenschaften von Bortezomib auch *in vivo*⁽²⁵²⁾, unter anderem für Multiple Myelom-Zellen⁽²⁵³⁾, B-Zell-Lymphoma-Zellen⁽²⁵⁴⁾ und primäre T-ALL-Zellen⁽²⁵⁵⁾. In einigen Fällen wurde allerdings auch eine Bortezomib-Resistenz beschrieben⁽²⁵⁶⁾. Auch für die Untersuchung von ALL, insbesondere bezogen auf die Toxizität, bietet sich durch die Verwendung von Xenograft-Modellen die Möglichkeit einer besseren Risikoabschätzung. Wie sich im Rahmen dieser Arbeit zeigte, ist darüber hinaus insbesondere der sorgfältige Umgang mit dem Wirkstoff unerlässlich, damit es nicht zu Einbußen bei der Wirksamkeit kommt. Ein weiteres Risiko der Bortezomib-Behandlung ist, dass auch eine Langzeit-Therapie möglicherweise zur Ausbildung von Resistenzen führen kann, wie sie *in vitro* bereits gezeigt wurde⁽²⁵⁷⁾. Möglicherweise spielt dies jedoch bei der Behandlung von ALL eine untergeordnete Rolle, da erste Erfahrungsberichte zur Verwendung

von Bortezomib in Kombination zur herkömmlichen Therapie bereits nach kurzer Therapiedauer zum Erfolg führten⁽¹⁵⁷⁾.

Die Verwendung des Bortezomibs erwies sich auch im Laufe der Untersuchungen zu der vorliegenden Arbeit nicht nur als sinnvolles Werkzeug zur Modifikation der durch GC-Behandlung ausgelösten Mechanismen, sondern ist möglicherweise auch ein potentieller Inhibitor für das Tumorzellwachstum. Gemeinsam mit den bisher in diesem Bereich publizierten Daten^(148, 151, 219) belegen die vorliegenden Ergebnisse auf zellulärer und molekularer Ebene, dass Bortezomib auf Tumor- und insbesondere auf Leukämiezellen eine ausgeprägte anti-Tumor-Wirkung ausübt. Andererseits wurde bereits gezeigt, dass dieser Proteasominhibitor zwar in Tumorzellen nachweislich Apoptose ausübt, aber nur einen geringen Einfluss auf gesunde Zellen besitzt^(112, 152, 153). Wichtig ist insbesondere die Tatsache, dass die GC-Sensitivität für die anti-proliferative und pro-apoptotische Wirkung des Bortezomibs nur wenig relevant ist, was sowohl in der vorliegenden Arbeit als auch durch Untersuchungen von Horton et al. 2006 gezeigt werden konnte⁽²¹⁹⁾. Des Weiteren bestätigten sowohl erste Therapieerfolge bei refraktärer kindlicher ALL als auch positiv verlaufene Phase I-Studien zur Behandlung von Rezidiven kindlicher ALL eine gute Wirksamkeit bei guter tolerierbarer Toxizität^(157, 158). Inzwischen wird der Inhibitor sogar in klinischen Studien der Phase II getestet.

Insgesamt sprechen somit viele Indizien dafür, dass die gezielte Unterbrechung des UPS durch Proteasom-Inhibition eine vielversprechende neue Option zur Verbesserung der ALL-Therapie insbesondere für die GC-resistenten Hoch-Risiko-Patienten darstellt.

5. Literaturverzeichnis

- (1) Pui, C. H. & Evans, W. E., 1998, Acute lymphoblastic leukemia, *N.Engl.J.Med.*, **339** (9), 605-615.
- (2) Bené, M. C.; Castoldi, G. et al., 1995, Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL), *Leukemia*, **9** (10), 1783-1786.
- (3) Ludwig, W. D.; Rieder, H. et al., 1998, Immunophenotypic and genotypic features, clinical characteristics, and treatment outcome of adult pro-B acute lymphoblastic leukemia: results of the German multicenter trials GMALL 03/87 and 04/89, *Blood*, **92** (6), 1898-1909.
- (4) Swerdlow, S., Campo, E. et al., WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues , *4th Edition*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2008.
- (5) Schrappe, M.; Reiter, A. et al., 2000, Improved outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia despite reduced use of anthracyclines and cranial radiotherapy: results of trial ALL-BFM 90. German-Austrian-Swiss ALL-BFM Study Group, *Blood*, **95** (11), 3310-3322.
- (6) Mori, H.; Colman, S. M. et al., 2002, Chromosome translocations and covert leukemic clones are generated during normal fetal development, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **99** (12), 8242-8247.
- (7) Riehm, H.; Gadner, H. et al., 1990, Results and significance of six randomized trials in four consecutive ALL-BFM studies, *Haematol.Blood Transfus.*, **33**, 439-450.
- (8) Schrappe, M.; Reiter, A. et al., 2000, Long-term results of four consecutive trials in childhood ALL performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 1995. Berlin-Frankfurt-Munster, *Leukemia*, **14** (12), 2205-2222.
- (9) Creutzig, U.; Henze, G. et al., 2003, Krebserkrankungen bei Kindern. Erfolg durch einheitliche Therapiekonzepte seit 25 Jahren, *Dtsch.Ärztebl*, **100** (13), 842-852.
- (10) Möricke, A.; Zimmermann, M. et al., 2010, Long-term results of five consecutive trials in childhood acute lymphoblastic leukemia performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 2000, *Leukemia*, **24** (2), 265-284.
- (11) Schrappe, M., 2004, Evolution of BFM trials for childhood ALL, *Ann.Hematol.*, **83** Suppl. 1, S121-S123.
- (12) Möricke, A.; Reiter, A. et al., 2008, Risk-adjusted therapy of acute lymphoblastic leukemia can decrease treatment burden and improve survival: treatment results of 2169 unselected pediatric and adolescent patients enrolled in the trial ALL-BFM 95, *Blood*, **111** (9), 4477-4489.

- (13) Riehm, H.; Reiter, A. et al., 1987, Corticosteroid-dependent reduction of leukocyte count in blood as a prognostic factor in acute lymphoblastic leukemia in childhood (therapy study ALL-BFM 83), *Klin.Padiatr.*, **199** (3), 151-160.
- (14) Biondi, A.; Valsecchi, M. G. et al., 2000, Molecular detection of minimal residual disease is a strong predictive factor of relapse in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia with medium risk features. A case control study of the International BFM study group, *Leukemia*, **14** (11), 1939-1943.
- (15) van Dongen, J. J.; Seriu, T. et al., 1998, Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood, *Lancet*, **352** (9142), 1731-1738.
- (16) Seriu, T.; Erz, D. et al., 1997, T cell receptor Ddelta2Ddelta3 rearrangement: a suitable allele-specific marker for the detection of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia, *Leukemia*, **11** (5), 759-761.
- (17) Foroni, L.; Coyle, L. A. et al., 1997, Molecular detection of minimal residual disease in adult and childhood acute lymphoblastic leukaemia reveals differences in treatment response, *Leukemia*, **11** (10), 1732-1741.
- (18) Flohr, T.; Schrauder, A. et al., 2008, Minimal residual disease-directed risk stratification using real-time quantitative PCR analysis of immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in the international multicenter trial AIEOP-BFM ALL 2000 for childhood acute lymphoblastic leukemia, *Leukemia*, **22** (4), 771-782.
- (19) Conter, V.; Bartram, C. R. et al., 2010, Molecular response to treatment redefines all prognostic factors in children and adolescents with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: results in 3184 patients of the AIEOP-BFM ALL 2000 study, *Blood*, **115** (16), 3206-3214.
- (20) Forestier, E.; Johansson, B. et al., 2000, Cytogenetic findings in a population-based series of 787 childhood acute lymphoblastic leukemias from the Nordic countries. The NOPHO Leukemia Cytogenetic Study Group, *Eur.J.Haematol.*, **64** (3), 194-200.
- (21) Stams, W. A.; den Boer, M. L. et al., 2005, Expression levels of TEL, AML1, and the fusion products TEL-AML1 and AML1-TEL versus drug sensitivity and clinical outcome in t(12;21)-positive pediatric acute lymphoblastic leukemia, *Clin.Cancer Res.*, **11** (8), 2974-2980.
- (22) Arico, M.; Valsecchi, M. G. et al., 2000, Outcome of treatment in children with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia, *N.Engl.J.Med.*, **342** (14), 998-1006.
- (23) Reiter, A.; Schrappe, M. et al., 1994, Chemotherapy in 998 unselected childhood acute lymphoblastic leukemia patients. Results and conclusions of the multicenter trial ALL-BFM 86, *Blood*, **84** (9), 3122-3133.
- (24) Pui, C. H. & Evans, W. E., 2006, Treatment of acute lymphoblastic leukemia, *N.Engl.J.Med.*, **354** (2), 166-178.
- (25) Schrappe, M., 2003, Prognostic factors in childhood acute lymphoblastic leukemia, *Indian J.Pediatr.*, **70** (10), 817-824.

- (26) Holleman, A.; Cheok, M. H. et al., 2004, Gene-expression patterns in drug-resistant acute lymphoblastic leukemia cells and response to treatment, *N.Engl.J.Med.*, **351** (6), 533-542.
- (27) Cario, G.; Stanulla, M. et al., 2005, Distinct gene expression profiles determine molecular treatment response in childhood acute lymphoblastic leukemia, *Blood*, **105** (2), 821-826.
- (28) Flotho, C.; Coustan-Smith, E. et al., 2006, Genes contributing to minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia: prognostic significance of CASP8AP2, *Blood*, **108** (3), 1050-1057.
- (29) Planey, S. L.; Abrams, M. T. et al., 2003, Role of apical caspases and glucocorticoid-regulated genes in glucocorticoid-induced apoptosis of pre-B leukemic cells, *Cancer Res.*, **63** (1), 172-178.
- (30) Holleman, A.; den Boer, M. L. et al., 2005, Decreased PARP and procaspase-2 protein levels are associated with cellular drug resistance in childhood acute lymphoblastic leukemia, *Blood*, **106** (5), 1817-1823.
- (31) Abrams, M. T.; Robertson, N. M. et al., 2004, Inhibition of glucocorticoid-induced apoptosis by targeting the major splice variants of BIM mRNA with small interfering RNA and short hairpin RNA, *J.Biol.Chem.*, **279** (53), 55809-55817.
- (32) Lauten, M.; Schrauder, A. et al., 2006, Unsupervised proteome analysis of human leukaemia cells identifies the Valosin-containing protein as a putative marker for glucocorticoid resistance, *Leukemia*, **20** (5), 820-826.
- (33) Sanda, T.; Li, X. et al., 2010, Interconnecting molecular pathways in the pathogenesis and drug sensitivity of T-cell acute lymphoblastic leukemia, *Blood*, **115** (9), 1735-1745.
- (34) Ploner, C.; Rainer, J. et al., 2009, Repression of the BH3-only molecule PMAIP1/Noxa impairs glucocorticoid sensitivity of acute lymphoblastic leukemia cells, *Apoptosis.*, **14** (6), 821-828.
- (35) Beger, C.; Gerdes, K. et al., 2003, Expression and structural analysis of glucocorticoid receptor isoform gamma in human leukaemia cells using an isoform-specific real-time polymerase chain reaction approach, *Br.J.Haematol.*, **122** (2), 245-252.
- (36) Lauten, M.; Fernandez-Munoz, I. et al., 2009, Kinetics of the in vivo expression of glucocorticoid receptor splice variants during prednisone treatment in childhood acute lymphoblastic leukaemia, *Pediatr.Blood Cancer*, **52** (4), 459-463.
- (37) Tissing, W. J.; Lauten, M. et al., 2005, Expression of the glucocorticoid receptor and its isoforms in relation to glucocorticoid resistance in childhood acute lymphocytic leukemia, *Haematologica*, **90** (9), 1279-1281.
- (38) Woodward, R. B.; Sondheimer, F. et al., 1951, The total synthesis of cortisone, *Journal of the American Chemical Society*, **73** (8), 4057-4057.
- (39) Hench, P. S.; Kendall, E. C. et al., 1949, The effect of a hormone of the adrenal cortex (17-hydroxy-11-dehydrocorticosterone; compound E) and of pituitary adrenocorticotrophic hormone on rheumatoid arthritis, *Mayo Clin.Proc.*, **24** (8), 181-197.

- (40) Kordes, U.; Krappmann, D. et al., 2000, Transcription factor NF-kappaB is constitutively activated in acute lymphoblastic leukemia cells, *Leukemia*, **14** (3), 399-402.
- (41) Sen, R. & Baltimore, D., 1986, Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein NF-kappa B by a posttranslational mechanism, *Cell*, **47** (6), 921-928.
- (42) Li, Q. & Verma, I. M., 2002, NF-kappaB regulation in the immune system, *Nat.Rev.Immunol.*, **2** (10), 725-734.
- (43) Rice, N. R.; MacKichan, M. L. et al., 1992, The precursor of NF-kappa B p50 has I kappa B-like functions, *Cell*, **71** (2), 243-253.
- (44) Mercurio, F.; DiDonato, J. A. et al., 1993, p105 and p98 precursor proteins play an active role in NF-kappa B-mediated signal transduction, *Genes Dev.*, **7** (4), 705-718.
- (45) Ghosh, S. & Baltimore, D., 1990, Activation in vitro of NF-kappa B by phosphorylation of its inhibitor I kappa B, *Nature*, **344** (6267), 678-682.
- (46) Verma, I. M.; Stevenson, J. K. et al., 1995, Rel/NF-kappa B/I kappa B family: intimate tales of association and dissociation, *Genes Dev.*, **9** (22), 2723-2735.
- (47) Palombella, V. J.; Rando, O. J. et al., 1994, The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B, *Cell*, **78** (5), 773-785.
- (48) Baldwin, A. S., Jr., 1996, The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights, *Annu.Rev.Immunol.*, **14**, 649-683.
- (49) Ghosh, S.; May, M. J. et al., 1998, NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses, *Annu.Rev.Immunol.*, **16**, 225-260.
- (50) Pahl, H. L., 1999, Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors, *Oncogene*, **18** (49), 6853-6866.
- (51) Chen, Z. J.; Parent, L. et al., 1996, Site-specific phosphorylation of IkappaBalpha by a novel ubiquitination-dependent protein kinase activity, *Cell*, **84** (6), 853-862.
- (52) DiDonato, J.; Mercurio, F. et al., 1996, Mapping of the inducible IkappaB phosphorylation sites that signal its ubiquitination and degradation, *Mol.Cell Biol.*, **16** (4), 1295-1304.
- (53) Barnes, P. J. & Karin, M., 1997, Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases, *N.Engl.J.Med.*, **336** (15), 1066-1071.
- (54) Buttgereit, F.; Wehling, M. et al., 1998, A new hypothesis of modular glucocorticoid actions: steroid treatment of rheumatic diseases revisited, *Arthritis Rheum.*, **41** (5), 761-767.
- (55) Barnes, P. J., 1998, Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms, *Clin.Sci.(Lond)*, **94** (6), 557-572.

- (56) Barnes, P. J. & Adcock, I., 1993, Anti-inflammatory actions of steroids: molecular mechanisms, *Trends Pharmacol.Sci.*, **14** (12), 436-441.
- (57) Auphan, N.; DiDonato, J. A. et al., 1995, Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis, *Science*, **270** (5234), 286-290.
- (58) Scheinman, R. I.; Cogswell, P. C. et al., 1995, Role of transcriptional activation of I kappa B alpha in mediation of immunosuppression by glucocorticoids, *Science*, **270** (5234), 283-286.
- (59) Ploner, C.; Schmidt, S. et al., 2005, Glucocorticoid-induced apoptosis and glucocorticoid resistance in acute lymphoblastic leukemia, *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.*, **93** (2-5), 153-160.
- (60) Bonapace, L.; Bornhauser, B. C. et al., 2010, Induction of autophagy-dependent necroptosis is required for childhood acute lymphoblastic leukemia cells to overcome glucocorticoid resistance, *J.Clin.Invest*, **120** (4), 1310-1323.
- (61) Lambrou, G. I.; Vlahopoulos, S. et al., 2009, Prednisolone exerts late mitogenic and biphasic effects on resistant acute lymphoblastic leukemia cells: Relation to early gene expression, *Leuk.Res.*,
- (62) Koller, K. J. & Brownstein, M. J., 1987, Use of a cDNA clone to identify a supposed precursor protein containing valosin, *Nature*, **325** (6104), 542-545.
- (63) Rabouille, C.; Levine, T. P. et al., 1995, An NSF-like ATPase, p97, and NSF mediate cisternal regrowth from mitotic Golgi fragment, *Cell*, **82** (6), 905-914.
- (64) Hoyle, J.; Tan, K. H. et al., 1997, Mapping the valosin-containing protein (VCP) gene on human chromosome 9 and mouse chromosome 4, and a likely pseudogene on the mouse X chromosome, *Mamm.Genome*, **8** (10), 778-780.
- (65) White, S. R. & Luring, B., 2007, AAA+ ATPases: achieving diversity of function with conserved machinery, *Traffic.*, **8** (12), 1657-1667.
- (66) Confalonieri, F. & Duguet, M., 1995, A 200-amino acid ATPase module in search of a basic function, *Bioessays*, **17** (7), 639-650.
- (67) Patel, S. & Latterich, M., 1998, The AAA team: related ATPases with diverse functions, *Trends Cell Biol.*, **8** (2), 65-71.
- (68) Zhang, X.; Shaw, A. et al., 2000, Structure of the AAA ATPase p97, *Mol.Cell*, **6** (6), 1473-1484.
- (69) DeLaBarre, B. & Brunger, A. T., 2003, Complete structure of p97/valosin-containing protein reveals communication between nucleotide domains, *Nat.Struct.Biol.*, **10** (10), 856-863.
- (70) Beyer, A., 1997, Sequence analysis of the AAA protein family, *Protein Sci.*, **6** (10), 2043-2058.

- (71) Neuwald, A. F.; Aravind, L. et al., 1999, AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes, *Genome Res.*, **9** (1), 27-43.
- (72) Rouiller, I.; Butel, V. M. et al., 2000, A major conformational change in p97 AAA ATPase upon ATP binding, *Mol.Cell*, **6** (6), 1485-1490.
- (73) Woodman, P. G., 2003, p97, a protein coping with multiple identities, *J.Cell Sci.*, **116** (Pt 21), 4283-4290.
- (74) Ye, Y., 2006, Diverse functions with a common regulator: ubiquitin takes command of an AAA ATPase, *J.Struct.Biol.*, **156** (1), 29-40.
- (75) Wojcik, C.; Yano, M. et al., 2004, RNA interference of valosin-containing protein (VCP/p97) reveals multiple cellular roles linked to ubiquitin/proteasome-dependent proteolysis, *J.Cell Sci.*, **117** (Pt 2), 281-292.
- (76) Latterich, M.; Frohlich, K. U. et al., 1995, Membrane fusion and the cell cycle: Cdc48p participates in the fusion of ER membranes, *Cell*, **82** (6), 885-893.
- (77) Hetzer, M.; Meyer, H. H. et al., 2001, Distinct AAA-ATPase p97 complexes function in discrete steps of nuclear assembly, *Nat.Cell Biol.*, **3** (12), 1086-1091.
- (78) Shorter, J. & Warren, G., 2002, Golgi architecture and inheritance, *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.*, **18**, 379-420.
- (79) Ye, Y.; Meyer, H. H. et al., 2001, The AAA ATPase Cdc48/p97 and its partners transport proteins from the ER into the cytosol, *Nature*, **414** (6864), 652-656.
- (80) Wojcik, C.; Rowicka, M. et al., 2006, Valosin-containing protein (p97) is a regulator of endoplasmic reticulum stress and of the degradation of N-end rule and ubiquitin-fusion degradation pathway substrates in mammalian cells, *Mol.Biol.Cell*, **17** (11), 4606-4618.
- (81) Hirsch, C.; Gauss, R. et al., 2009, The ubiquitylation machinery of the endoplasmic reticulum, *Nature*, **458** (7237), 453-460.
- (82) Vij, N., 2008, AAA ATPase p97/VCP: cellular functions, disease and therapeutic potential, *J.Cell Mol.Med.*, **12** (6A), 2511-2518.
- (83) Ye, Y.; Meyer, H. H. et al., 2003, Function of the p97-Ufd1-Npl4 complex in retrotranslocation from the ER to the cytosol: dual recognition of nonubiquitinated polypeptide segments and polyubiquitin chains, *J.Cell Biol.*, **162** (1), 71-84.
- (84) DeLaBarre, B.; Christianson, J. C. et al., 2006, Central pore residues mediate the p97/VCP activity required for ERAD, *Mol.Cell*, **22** (4), 451-462.
- (85) Zhong, X.; Shen, Y. et al., 2004, AAA ATPase p97/valosin-containing protein interacts with gp78, a ubiquitin ligase for endoplasmic reticulum-associated degradation, *J.Biol.Chem.*, **279** (44), 45676-45684.
- (86) Fang, S.; Ferrone, M. et al., 2001, The tumor autocrine motility factor receptor, gp78, is a ubiquitin protein ligase implicated in degradation from the endoplasmic reticulum, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **98** (25), 14422-14427.

- (87) Ballar, P.; Shen, Y. et al., 2006, The role of a novel p97/valosin-containing protein (VCP)-interacting motif of GP78 in endoplasmic reticulum-associated degradation, *Journal of Biological Chemistry*, M603355200-
- (88) Dai, R. M. & Li, C. C., 2001, Valosin-containing protein is a multi-ubiquitin chain-targeting factor required in ubiquitin-proteasome degradation, *Nat.Cell Biol.*, **3** (8), 740-744.
- (89) Richly, H.; Rape, M. et al., 2005, A series of ubiquitin binding factors connects CDC48/p97 to substrate multiubiquitylation and proteasomal targeting, *Cell*, **120** (1), 73-84.
- (90) Rape, M.; Hoppe, T. et al., 2001, Mobilization of processed, membrane-tethered SPT23 transcription factor by CDC48(UFD1/NPL4), a ubiquitin-selective chaperone, *Cell*, **107** (5), 667-677.
- (91) Dai, R. M.; Chen, E. et al., 1998, Involvement of valosin-containing protein, an ATPase Co-purified with IkappaBalpha and 26 S proteasome, in ubiquitin-proteasome-mediated degradation of IkappaBalpha, *J.Biol.Chem.*, **273** (6), 3562-3573.
- (92) Yen, C. H.; Yang, Y. C. et al., 2000, Involvement of the ubiquitin-proteasome pathway in the degradation of nontyrosine kinase-type cytokine receptors of IL-9, IL-2, and erythropoietin, *J.Immunol.*, **165** (11), 6372-6380.
- (93) Asai, T.; Tomita, Y. et al., 2002, VCP (p97) regulates NFkappaB signaling pathway, which is important for metastasis of osteosarcoma cell line, *Jpn.J.Cancer Res.*, **93** (3), 296-304.
- (94) Tsujimoto, Y.; Tomita, Y. et al., 2004, Elevated expression of valosin-containing protein (p97) is associated with poor prognosis of prostate cancer, *Clin.Cancer Res.*, **10** (9), 3007-3012.
- (95) Yamamoto, S.; Tomita, Y. et al., 2004, Expression of valosin-containing protein in colorectal carcinomas as a predictor for disease recurrence and prognosis, *Clin.Cancer Res.*, **10** (2), 651-657.
- (96) Yamamoto, S.; Tomita, Y. et al., 2004, Valosin-containing protein (p97) and Ki-67 expression is a useful marker in detecting malignant behavior of pancreatic endocrine neoplasms, *Oncology*, **66** (6), 468-475.
- (97) Yamamoto, S.; Tomita, Y. et al., 2004, Expression level of valosin-containing protein (p97) is associated with prognosis of esophageal carcinoma, *Clin.Cancer Res.*, **10** (16), 5558-5565.
- (98) Yamamoto, S.; Tomita, Y. et al., 2004, Increased expression of valosin-containing protein (p97) is associated with lymph node metastasis and prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma, *Ann.Surg.Oncol.*, **11** (2), 165-172.
- (99) Yamamoto, S.; Tomita, Y. et al., 2003, Expression level of valosin-containing protein is strongly associated with progression and prognosis of gastric carcinoma, *J.Clin.Oncol.*, **21** (13), 2537-2544.

- (100) Yamamoto, S.; Tomita, Y. et al., 2004, Expression level of valosin-containing protein (p97) is correlated with progression and prognosis of non-small-cell lung carcinoma, *Ann.Surg.Oncol.*, **11** (7), 697-704.
- (101) Yamamoto, S.; Tomita, Y. et al., 2003, Elevated expression of valosin-containing protein (p97) in hepatocellular carcinoma is correlated with increased incidence of tumor recurrence, *J.Clin.Oncol.*, **21** (3), 447-452.
- (102) Hershko, A.; Ciechanover, A. et al., 1980, Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of protein with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **77** (4), 1783-1786.
- (103) Ciechanover, A., 1998, The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life, *EMBO J.*, **17** (24), 7151-7160.
- (104) Hershko, A. & Ciechanover, A., 1998, The ubiquitin system, *Annu.Rev.Biochem.*, **67**, 425-479.
- (105) Tanaka, K.; Ii, K. et al., 1986, A high molecular weight protease in the cytosol of rat liver. I. Purification, enzymological properties, and tissue distribution, *J.Biol.Chem.*, **261** (32), 15197-15203.
- (106) Hough, R.; Pratt, G. et al., 1987, Purification of two high molecular weight proteases from rabbit reticulocyte lysate, *J.Biol.Chem.*, **262** (17), 8303-8313.
- (107) Arrigo, A. P.; Tanaka, K. et al., 1988, Identity of the 19S 'prosome' particle with the large multifunctional protease complex of mammalian cells (the proteasome), *Nature*, **331** (6152), 192-194.
- (108) Goldberg, A. L.; Elledge, S. J. et al., 2001, The cellular chamber of doom, *Sci.Am.*, **284** (1), 68-73.
- (109) Hendil, K. B., 1988, The 19 S multicatalytic "prosome" proteinase is a constitutive enzyme in HeLa cells, *Biochem.Int.*, **17** (3), 471-477.
- (110) Tanaka, K. & Tsurumi, C., 1997, The 26S proteasome: Subunits and functions, *Molecular Biology Reports*, **24** (1-2), 3-11.
- (111) Peters, J. M.; Franke, W. W. et al., 1994, Distinct 19-S and 20-S Subcomplexes of the 26-S Proteasome and Their Distribution in the Nucleus and the Cytoplasm, *Journal of Biological Chemistry*, **269** (10), 7709-7718.
- (112) Adams, J., 2004, The development of proteasome inhibitors as anticancer drugs, *Cancer Cell*, **5** (5), 417-421.
- (113) Fujimuro, M.; Tanaka, K. et al., 1998, Son1p is a component of the 26S proteasome of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *FEBS Lett.*, **423** (2), 149-154.
- (114) Baumeister, W.; Walz, J. et al., 1998, The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease, *Cell*, **92** (3), 367-380.
- (115) Voges, D.; Zwickl, P. et al., 1999, The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis, *Annu.Rev.Biochem.*, **68**, 1015-1068.

- (116) Glickman, M. H.; Rubin, D. M. et al., 1998, A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3, *Cell*, **94** (5), 615-623.
- (117) Deveraux, Q.; Ustrell, V. et al., 1994, A 26 S protease subunit that binds ubiquitin conjugates, *J.Biol.Chem.*, **269** (10), 7059-7061.
- (118) van Nocker, S.; Sadis, S. et al., 1996, The multiubiquitin-chain-binding protein Mcb1 is a component of the 26S proteasome in *Saccharomyces cerevisiae* and plays a nonessential, substrate-specific role in protein turnover, *Mol.Cell Biol.*, **16** (11), 6020-6028.
- (119) Lam, Y. A.; Xu, W. et al., 1997, Editing of ubiquitin conjugates by an isopeptidase in the 26S proteasome, *Nature*, **385** (6618), 737-740.
- (120) Pickart, C. M., 1997, Targeting of substrates to the 26S proteasome, *FASEB J.*, **11** (13), 1055-1066.
- (121) Piotrowski, J.; Beal, R. et al., 1997, Inhibition of the 26 S proteasome by polyubiquitin chains synthesized to have defined lengths, *J.Biol.Chem.*, **272** (38), 23712-23721.
- (122) Nussbaum, A. K.; Dick, T. P. et al., 1998, Cleavage motifs of the yeast 20S proteasome beta subunits deduced from digests of enolase 1, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **95** (21), 12504-12509.
- (123) Song, X.; von Kampen, J. et al., 1997, Relative functions of the alpha and beta subunits of the proteasome activator, PA28, *J.Biol.Chem.*, **272** (44), 27994-28000.
- (124) Dahlmann, B.; Kopp, F. et al., 1989, The multicatalytic proteinase (prosome) is ubiquitous from eukaryotes to archaebacteria, *FEBS Lett.*, **251** (1-2), 125-131.
- (125) Löwe, J.; Stock, D. et al., 1995, Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution, *Science*, **268** (5210), 533-539.
- (126) Groll, M.; Ditzel, L. et al., 1997, Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution, *Nature*, **386** (6624), 463-471.
- (127) Unno, M.; Mizushima, T. et al., 2002, The structure of the mammalian 20S proteasome at 2.75 Å resolution, *Structure.*, **10** (5), 609-618.
- (128) Grziwa, A.; Baumeister, W. et al., 1991, Localization of subunits in proteasomes from *Thermoplasma acidophilum* by immunoelectron microscopy, *FEBS Lett.*, **290** (1-2), 186-190.
- (129) Pühler, G.; Weinkauff, S. et al., 1992, Subunit stoichiometry and three-dimensional arrangement in proteasomes from *Thermoplasma acidophilum*, *EMBO J.*, **11** (4), 1607-1616.
- (130) Kopp, F.; Dahlmann, B. et al., 1993, Evidence indicating that the human proteasome is a complex dimer, *J.Mol.Biol.*, **229** (1), 14-19.

- (131) Heinemeyer, W.; Trondle, N. et al., 1994, PRE5 and PRE6, the last missing genes encoding 20S proteasome subunits from yeast? Indication for a set of 14 different subunits in the eukaryotic proteasome core, *Biochemistry*, **33** (40), 12229-12237.
- (132) Brannigan, J. A.; Dodson, G. et al., 1995, A protein catalytic framework with an N-terminal nucleophile is capable of self-activation, *Nature*, **378** (6555), 416-419.
- (133) Seemüller, E.; Lupas, A. et al., 1995, Proteasome from *Thermoplasma acidophilum*: a threonine protease, *Science*, **268** (5210), 579-582.
- (134) Orłowski, M., 1990, The multicatalytic proteinase complex, a major extralysosomal proteolytic system, *Biochemistry*, **29** (45), 10289-10297.
- (135) Dick, T. P.; Nussbaum, A. K. et al., 1998, Contribution of proteasomal beta-subunits to the cleavage of peptide substrates analyzed with yeast mutants, *J. Biol. Chem.*, **273** (40), 25637-25646.
- (136) Kisselev, A. F.; Akopian, T. N. et al., 1999, Proteasome active sites allosterically regulate each other, suggesting a cyclical bite-chew mechanism for protein breakdown, *Mol. Cell*, **4** (3), 395-402.
- (137) Hershko, A. & Ciechanover, A., 1992, The ubiquitin system for protein degradation, *Annu. Rev. Biochem.*, **61**, 761-807.
- (138) Thrower, J. S.; Hoffman, L. et al., 2000, Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal, *EMBO J.*, **19** (1), 94-102.
- (139) Deng, L.; Wang, C. et al., 2000, Activation of the I κ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain, *Cell*, **103** (2), 351-361.
- (140) Weissman, A. M., 2001, Themes and variations on ubiquitylation, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2** (3), 169-178.
- (141) Coux, O.; Tanaka, K. et al., 1996, Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes, *Annu. Rev. Biochem.*, **65**, 801-847.
- (142) Naujokat, C. & Hoffmann, S., 2002, Role and function of the 26S proteasome in proliferation and apoptosis, *Lab Invest*, **82** (8), 965-980.
- (143) Inoue, T.; Geyer, R. K. et al., 2001, MDM2 can promote the ubiquitination, nuclear export, and degradation of p53 in the absence of direct binding, *J. Biol. Chem.*, **276** (48), 45255-45260.
- (144) Carrano, A. C.; Eytan, E. et al., 1999, SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27, *Nat. Cell Biol.*, **1** (4), 193-199.
- (145) Pagano, M.; Tam, S. W. et al., 1995, Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27, *Science*, **269** (5224), 682-685.

- (146) Orian, A.; Gonen, H. et al., 2000, SCF(beta)(-TrCP) ubiquitin ligase-mediated processing of NF-kappaB p105 requires phosphorylation of its C-terminus by IkappaB kinase, *EMBO J.*, **19** (11), 2580-2591.
- (147) Kisselev, A. F. & Goldberg, A. L., 2001, Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates, *Chem.Biol.*, **8** (8), 739-758.
- (148) Adams, J.; Palombella, V. J. et al., 1999, Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents, *Cancer Res.*, **59** (11), 2615-2622.
- (149) Adams, J., 2002, Development of the proteasome inhibitor PS-341, *Oncologist.*, **7** (1), 9-16.
- (150) Schwartz, R. & Davidson, T., 2004, Pharmacology, pharmacokinetics, and practical applications of bortezomib, *Oncology (Williston.Park)*, **18** (14 Suppl 11), 14-21.
- (151) Boyd, M. R. & Paull, K. D., 1995, Some practical considerations and applications of the national cancer institute in vitro anticancer drug discovery screen, *Drug Dev.Res.*, **34** (2), 91-109.
- (152) Wojcik, C., 2002, Regulation of apoptosis by the ubiquitin and proteasome pathway, *J.Cell Mol.Med.*, **6** (1), 25-48.
- (153) Soligo, D.; Servida, F. et al., 2001, The apoptogenic response of human myeloid leukaemia cell lines and of normal and malignant haematopoietic progenitor cells to the proteasome inhibitor PSI, *Br.J.Haematol.*, **113** (1), 126-135.
- (154) Vu, H. Y.; Juvekar, A. et al., 2008, Proteasome inhibitors induce apoptosis of prostate cancer cells by inducing nuclear translocation of IkappaBalpha, *Arch.Biochem.Biophys.*, **475** (2), 156-163.
- (155) San Miguel, J. F.; Schlag, R. et al., 2008, Bortezomib plus melphalan and prednisone for initial treatment of multiple myeloma, *N.Engl.J.Med.*, **359** (9), 906-917.
- (156) Mateos, M. V.; Richardson, P. G. et al., 2010, Bortezomib plus melphalan and prednisone compared with melphalan and prednisone in previously untreated multiple myeloma: updated follow-up and impact of subsequent therapy in the phase III VISTA trial, *J.Clin.Oncol.*, **28** (13), 2259-2266.
- (157) Horton, T. M.; Pati, D. et al., 2007, A phase 1 study of the proteasome inhibitor bortezomib in pediatric patients with refractory leukemia: a Children's Oncology Group study, *Clin.Cancer Res.*, **13** (5), 1516-1522.
- (158) Messinger, Y.; Gaynon, P. et al., 2010, Phase I study of bortezomib combined with chemotherapy in children with relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL): a report from the therapeutic advances in childhood leukemia (TACL) consortium, *Pediatr.Blood Cancer*, **55** (2), 254-259.
- (159) Zhang, K. & Kaufman, R. J., 2004, Signaling the unfolded protein response from the endoplasmic reticulum, *J.Biol.Chem.*, **279** (25), 25935-25938.
- (160) Kaufman, R. J., 2002, Orchestrating the unfolded protein response in health and disease, *J.Clin.Invest*, **110** (10), 1389-1398.

- (161) Ron, D., 2002, Translational control in the endoplasmic reticulum stress response, *J.Clin.Invest*, **110** (10), 1383-1388.
- (162) Mori, K., 2000, Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum, *Cell*, **101** (5), 451-454.
- (163) Nakagawa, T.; Zhu, H. et al., 2000, Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta, *Nature*, **403** (6765), 98-103.
- (164) Matlack, K. E.; Mothes, W. et al., 1998, Protein translocation: tunnel vision, *Cell*, **92** (3), 381-390.
- (165) Brodsky, J. L. & McCracken, A. A., 1997, ER-associated and proteasomemediated protein degradation: how two topologically restricted events came together, *Trends Cell Biol.*, **7** (4), 151-156.
- (166) Kopito, R. R., 1997, ER quality control: the cytoplasmic connection, *Cell*, **88** (4), 427-430.
- (167) van Anken, E. & Braakman, I., 2005, Versatility of the endoplasmic reticulum protein folding factory, *Crit Rev.Biochem.Mol.Biol.*, **40** (4), 191-228.
- (168) Travers, K. J.; Patil, C. K. et al., 2000, Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation, *Cell*, **101** (3), 249-258.
- (169) Wojcik, C.; Schroeter, D. et al., 1996, Ubiquitin-mediated proteolysis centers in HeLa cells: indication from studies of an inhibitor of the chymotrypsin-like activity of the proteasome, *Eur.J.Cell Biol.*, **71** (3), 311-318.
- (170) Johnston, J. A.; Ward, C. L. et al., 1998, Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins, *J.Cell Biol.*, **143** (7), 1883-1898.
- (171) Garcia-Mata, R.; Bebok, Z. et al., 1999, Characterization and dynamics of aggresome formation by a cytosolic GFP-chimera, *J.Cell Biol.*, **146** (6), 1239-1254.
- (172) Wigley, W. C.; Fabunmi, R. P. et al., 1999, Dynamic association of proteasomal machinery with the centrosome, *J.Cell Biol.*, **145** (3), 481-490.
- (173) Fabunmi, R. P.; Wigley, W. C. et al., 2000, Activity and regulation of the centrosome-associated proteasome, *J.Biol.Chem.*, **275** (1), 409-413.
- (174) Kasugai, I. & Yamada, M., 1992, High production of catalase in hydrogen peroxide-resistant human leukemia HL-60 cell lines, *Leuk.Res.*, **16** (2), 173-179.
- (175) Tome, M. E.; Baker, A. F. et al., 2001, Catalase-overexpressing thymocytes are resistant to glucocorticoid-induced apoptosis and exhibit increased net tumor growth, *Cancer Research*, **61** (6), 2766-2773.
- (176) Riley, P. A., 1994, Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation, *Int.J.Radiat.Biol.*, **65** (1), 27-33.

- (177) Turrens, J. F., 1997, Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain, *Biosci.Rep.*, **17** (1), 3-8.
- (178) Balaban, R. S.; Nemoto, S. et al., 2005, Mitochondria, oxidants, and aging, *Cell*, **120** (4), 483-495.
- (179) Holler, N.; Zaru, R. et al., 2000, Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule, *Nat.Immunol.*, **1** (6), 489-495.
- (180) Pan, J.; She, M. et al., 2005, Farnesyltransferase inhibitors induce DNA damage via reactive oxygen species in human cancer cells, *Cancer Res.*, **65** (9), 3671-3681.
- (181) Martinvalet, D.; Zhu, P. et al., 2005, Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis, *Immunity.*, **22** (3), 355-370.
- (182) Aggarwal, B. B., 2000, Apoptosis and nuclear factor-kappa B: a tale of association and dissociation, *Biochem.Pharmacol.*, **60** (8), 1033-1039.
- (183) Shi, X.; Dong, Z. et al., 1999, The role of hydroxyl radical as a messenger in the activation of nuclear transcription factor NF-kappaB, *Mol.Cell Biochem.*, **194** (1-2), 63-70.
- (184) Wang, S.; Leonard, S. S. et al., 1999, The role of superoxide radical in TNF-alpha induced NF-kappaB activation, *Ann.Clin.Lab Sci.*, **29** (3), 192-199.
- (185) Schmidt, K. N.; Amstad, P. et al., 1995, The roles of hydrogen peroxide and superoxide as messengers in the activation of transcription factor NF-kappa B, *Chem.Biol.*, **2** (1), 13-22.
- (186) Mates, J. M. & Sanchez-Jimenez, F., 1999, Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes, *Front Biosci.*, **4**, D339-D345.
- (187) Yu, L.; Wan, F. et al., 2006, Autophagic programmed cell death by selective catalase degradation, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **103** (13), 4952-4957.
- (188) Vandenabeele, P.; Vanden Berghe, T. et al., 2006, Caspase inhibitors promote alternative cell death pathways, *Sci.STKE.*, **2006** (358), e44-
- (189) Temkin, V.; Huang, Q. et al., 2006, Inhibition of ADP/ATP exchange in receptor-interacting protein-mediated necrosis, *Mol.Cell Biol.*, **26** (6), 2215-2225.
- (190) Kofler, R., 2000, The molecular basis of glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoblastic leukemia cells, *Histochem.Cell Biol.*, **114** (1), 1-7.
- (191) Gewies, A., 2004, Investigation of the ubiquitin-specific protease UBP41 and of the lysosomal cysteine proteases cathepsin-L and cathepsin-B as potential mediators of proapoptotic signalling,
- (192) Laster, S. M.; Wood, J. G. et al., 1988, Tumor necrosis factor can induce both apoptotic and necrotic forms of cell lysis, *J.Immunol.*, **141** (8), 2629-2634.

- (193) Festjens, N.; Vanden Berghe, T. et al., 2006, Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response, *Biochim.Biophys.Acta*, **1757** (9-10), 1371-1387.
- (194) Zong, W. X. & Thompson, C. B., 2006, Necrotic death as a cell fate, *Genes Dev.*, **20** (1), 1-15.
- (195) Golstein, P. & Kroemer, G., 2007, Cell death by necrosis: towards a molecular definition, *Trends Biochem.Sci.*, **32** (1), 37-43.
- (196) Luke, C. J.; Pak, S. C. et al., 2007, An intracellular serpin regulates necrosis by inhibiting the induction and sequelae of lysosomal injury, *Cell*, **130** (6), 1108-1119.
- (197) Hitomi, J.; Christofferson, D. E. et al., 2008, Identification of a molecular signaling network that regulates a cellular necrotic cell death pathway, *Cell*, **135** (7), 1311-1323.
- (198) Degtarev, A.; Huang, Z. et al., 2005, Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury, *Nat.Chem.Biol.*, **1** (2), 112-119.
- (199) Moquin, D. & Chan, F. K., 2010, The molecular regulation of programmed necrotic cell injury, *Trends Biochem.Sci.*, **35** (8), 434-441.
- (200) Hotchkiss, R. S.; Strasser, A. et al., 2009, Cell death, *N.Engl.J.Med.*, **361** (16), 1570-1583.
- (201) Kroemer, G.; Galluzzi, L. et al., 2009, Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009, *Cell Death.Differ.*, **16** (1), 3-11.
- (202) Vanden Berghe, T.; Vanlangenakker, N. et al., 2009, Necroptosis, necrosis and secondary necrosis converge on similar cellular disintegration features, *Cell Death.Differ.*,
- (203) Vanden Berghe, T.; Vanlangenakker, N. et al., 2010, Necroptosis, necrosis and secondary necrosis converge on similar cellular disintegration features, *Cell Death.Differ.*, **17** (6), 922-930.
- (204) Galluzzi, L.; Maiuri, M. C. et al., 2007, Cell death modalities: classification and pathophysiological implications, *Cell Death.Differ.*, **14** (7), 1237-1243.
- (205) Gobeil, S.; Boucher, C. C. et al., 2001, Characterization of the necrotic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1): implication of lysosomal proteases, *Cell Death.Differ.*, **8** (6), 588-594.
- (206) Nishimura, Y. & Lemasters, J. J., 2001, Glycine blocks opening of a death channel in cultured hepatic sinusoidal endothelial cells during chemical hypoxia, *Cell Death.Differ.*, **8** (8), 850-858.
- (207) Malhi, H.; Gores, G. J. et al., 2006, Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of two deaths?, *Hepatology*, **43** (2 Suppl 1), S31-S44.
- (208) Kalai, M.; van Loo, G. et al., 2002, Tipping the balance between necrosis and apoptosis in human and murine cells treated with interferon and dsRNA, *Cell Death.Differ.*, **9** (9), 981-994.

- (209) Degtarev, A.; Hitomi, J. et al., 2008, Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins, *Nat.Chem.Biol.*, **4** (5), 313-321.
- (210) Cho, Y. S.; Challa, S. et al., 2009, Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation, *Cell*, **137** (6), 1112-1123.
- (211) Vandenabeele, P.; Declercq, W. et al., 2010, The role of the kinases RIP1 and RIP3 in TNF-induced necrosis, *Sci.Signal.*, **3** (115), re4-
- (212) Kroemer, G. & Jaattela, M., 2005, Lysosomes and autophagy in cell death control, *Nat.Rev.Cancer*, **5** (11), 886-897.
- (213) Kroemer, G. & Levine, B., 2008, Autophagic cell death: the story of a misnomer, *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*, **9** (12), 1004-1010.
- (214) Tanida, I.; Ueno, T. et al., 2008, LC3 and Autophagy, *Methods Mol.Biol.*, **445**, 77-88.
- (215) Clarke, P. G., 1990, Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms, *Anat.Embryol.(Berl)*, **181** (3), 195-213.
- (216) Baehrecke, E. H., 2005, Autophagy: dual roles in life and death?, *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*, **6** (6), 505-510.
- (217) Rasband, W. S. ImageJ, 1.43u. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997.
- (218) Chomczynski, P. & Sacchi, N., 1987, Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, *Anal.Biochem.*, **162** (1), 156-159.
- (219) Horton, T. M.; Gannavarapu, A. et al., 2006, Bortezomib interactions with chemotherapy agents in acute leukemia in vitro, *Cancer Chemother.Pharmacol.*, **58** (1), 13-23.
- (220) Friess, D.; Nguyen, H.-C. et al., 2005, HPLC-Stabilitätsuntersuchungen zu rekonstituierten Bortezomib-Lösungen, *Krankenhauspharmazie*, **26** (6), 206-210.
- (221) Andre, P.; Cisternino, S. et al., 2005, Stability of bortezomib 1-mg/mL solution in plastic syringe and glass vial, *Ann.Pharmacother.*, **39** (9), 1462-1466.
- (222) Bolognese, A.; Esposito, A. et al., 2009, An NMR Study of the Bortezomib Degradation under Clinical Use Conditions, *Adv.Hematol.*, **2009**, 704928-
- (223) Chiaretti, S.; Li, X. et al., 2004, Gene expression profile of adult T-cell acute lymphocytic leukemia identifies distinct subsets of patients with different response to therapy and survival, *Blood*, **103** (7), 2771-2778.
- (224) Ghosh, J. C.; Dohi, T. et al., 2008, Hsp60 regulation of tumor cell apoptosis, *J.Biol.Chem.*, **283** (8), 5188-5194.

- (225) Samali, A.; Cai, J. et al., 1999, Presence of a pre-apoptotic complex of pro-caspase-3, Hsp60 and Hsp10 in the mitochondrial fraction of jurkat cells, *EMBO J.*, **18** (8), 2040-2048.
- (226) Xanthoudakis, S.; Roy, S. et al., 1999, Hsp60 accelerates the maturation of pro-caspase-3 by upstream activator proteases during apoptosis, *EMBO J.*, **18** (8), 2049-2056.
- (227) Lass, A.; McConnell, E. et al., 2007, A novel function of VCP (valosin-containing protein; p97) in the control of N-glycosylation of proteins in the endoplasmic reticulum, *Arch.Biochem.Biophys.*, **462** (1), 62-73.
- (228) Wilckens, T., 1999, Further thoughts on the immunomodulatory role of glucocorticoids: comment on the article by Buttgerit et al, *Arthritis Rheum.*, **42** (2), 393-396.
- (229) Declercq, W.; Vanden Berghe, T. et al., 2009, RIP kinases at the crossroads of cell death and survival, *Cell*, **138** (2), 229-232.
- (230) Bertrand, M. J. & Vandenabeele, P., 2010, RIP1's function in NF-kappaB activation: from master actor to onlooker, *Cell Death.Differ.*, **17** (3), 379-380.
- (231) Kruidering, M. & Evan, G. I., 2000, Caspase-8 in apoptosis: the beginning of "the end"?, *IUBMB.Life*, **50** (2), 85-90.
- (232) Viswanath, V.; Wu, Y. et al., 2001, Caspase-9 activation results in downstream caspase-8 activation and bid cleavage in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced Parkinson's disease, *J.Neurosci.*, **21** (24), 9519-9528.
- (233) Nawrocki, S. T.; Carew, J. S. et al., 2005, Bortezomib sensitizes pancreatic cancer cells to endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis, *Cancer Res.*, **65** (24), 11658-11666.
- (234) Nawrocki, S. T.; Carew, J. S. et al., 2006, Aggresome disruption: a novel strategy to enhance bortezomib-induced apoptosis in pancreatic cancer cells, *Cancer Res.*, **66** (7), 3773-3781.
- (235) Laane, E.; Tamm, K. P. et al., 2009, Cell death induced by dexamethasone in lymphoid leukemia is mediated through initiation of autophagy, *Cell Death.Differ.*, **16** (7), 1018-1029.
- (236) Groll, M.; Berkers, C. R. et al., 2006, Crystal structure of the boronic acid-based proteasome inhibitor bortezomib in complex with the yeast 20S proteasome, *Structure.*, **14** (3), 451-456.
- (237) Lin, K. M.; Lin, B. et al., 2001, Combined and individual mitochondrial HSP60 and HSP10 expression in cardiac myocytes protects mitochondrial function and prevents apoptotic cell deaths induced by simulated ischemia-reoxygenation, *Circulation*, **103** (13), 1787-1792.
- (238) Kirchhoff, S. R.; Gupta, S. et al., 2002, Cytosolic heat shock protein 60, apoptosis, and myocardial injury, *Circulation*, **105** (24), 2899-2904.
- (239) Hideshima, T.; Ikeda, H. et al., 2009, Bortezomib induces canonical NF- κ B activation in multiple myeloma cells, *Blood*,

- (240) Adams, J. & Stein, R., 1996, Chapter 28. Novel Inhibitors of the Proteasome and Their Therapeutic Use in Inflammation, **Volume 31**, 279-288.
- (241) Vink, J.; Cloos, J. et al., 2006, Proteasome inhibition as novel treatment strategy in leukaemia, *Br.J.Haematol.*, **134** (3), 253-262.
- (242) Palayoor, S. T.; Youmell, M. Y. et al., 1999, Constitutive activation of IkappaB kinase alpha and NF-kappaB in prostate cancer cells is inhibited by ibuprofen, *Oncogene*, **18** (51), 7389-7394.
- (243) Gasparian, A. V.; Yao, Y. J. et al., 2002, The role of IKK in constitutive activation of NF-kappaB transcription factor in prostate carcinoma cells, *J.Cell Sci.*, **115** (Pt 1), 141-151.
- (244) Bukau, B. & Horwich, A. L., 1998, The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines, *Cell*, **92** (3), 351-366.
- (245) Gupta, S. & Knowlton, A. A., 2002, Cytosolic heat shock protein 60, hypoxia, and apoptosis, *Circulation*, **106** (21), 2727-2733.
- (246) Hideshima, T.; Chauhan, D. et al., 2009, Biologic sequelae of I{kappa}B kinase (IKK) inhibition in multiple myeloma: therapeutic implications, *Blood*, **113** (21), 5228-5236.
- (247) Yemelyanov, A.; Gasparian, A. et al., 2006, Effects of IKK inhibitor PS1145 on NF-kappaB function, proliferation, apoptosis and invasion activity in prostate carcinoma cells, *Oncogene*, **25** (3), 387-398.
- (248) Bursavich, M. G.; Parker, D. P. et al., 2010, 2-Anilino-4-aryl-1,3-thiazole inhibitors of valosin-containing protein (VCP or p97), *Bioorg.Med.Chem.Lett.*, **20** (5), 1677-1679.
- (249) Groll, M.; McArthur, K. A. et al., 2009, Snapshots of the fluorosalinosporamide/20S complex offer mechanistic insights for fine tuning proteasome inhibition, *J.Med.Chem.*, **52** (17), 5420-5428.
- (250) Ohbo, K.; Suda, T. et al., 1996, Modulation of hematopoiesis in mice with a truncated mutant of the interleukin-2 receptor gamma chain, *Blood*, **87** (3), 956-967.
- (251) Ito, M.; Hiramatsu, H. et al., 2002, NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells, *Blood*, **100** (9), 3175-3182.
- (252) Boccadoro, M.; Morgan, G. et al., 2005, Preclinical evaluation of the proteasome inhibitor bortezomib in cancer therapy, *Cancer Cell Int.*, **5** (1), 18-
- (253) LeBlanc, R.; Catley, L. P. et al., 2002, Proteasome inhibitor PS-341 inhibits human myeloma cell growth in vivo and prolongs survival in a murine model, *Cancer Res.*, **62** (17), 4996-5000.
- (254) Sarosiek, K. A.; Cavallin, L. E. et al., 2010, Efficacy of bortezomib in a direct xenograft model of primary effusion lymphoma, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **107** (29), 13069-13074.

- (255) Satou, Y.; Nosaka, K. et al., 2004, Proteasome inhibitor, bortezomib, potently inhibits the growth of adult T-cell leukemia cells both in vivo and in vitro, *Leukemia*, **18** (8), 1357-1363.
- (256) Houghton, P. J.; Morton, C. L. et al., 2008, Initial testing (stage 1) of the proteasome inhibitor bortezomib by the pediatric preclinical testing program, *Pediatr. Blood Cancer*, **50** (1), 37-45.
- (257) Fuchs, D.; Berges, C. et al., 2007, Increased expression and altered subunit composition of proteasomes induced by continuous proteasome inhibition establish apoptosis resistance and hyperproliferation of Burkitt lymphoma cells, *J. Cell Biochem.*, **103** (1), 270-283.

6. Anhang

6.1 Zusätzliche Tabellen

Tabelle 6-1: Weiterführende Informationen zu den eingesetzten Zelllinien

Bezeichnung	DSMZ-Nr.	Immunphänotyp	Predictionsensitivität		Patienteninformation		Immortalisiert	Referenz (PUBMED-ID)	Zytopenetik	Molek. Genetik
			Patient	<i>in vitro</i>	Aller.	Geschlecht				
MHH cALL-2	ACC 341	pre-B-ALL	PPR	PPR	15	♀	-	Toneczkows ki et al. 1995, (7539624)	human hyperdiploid karyotype with 13% polyploidy - 52,(50-52)>2n>XX,+8,+10,+18,+18,-21,+21 - hyperdiploidy with tetrasomy 21 associated with pre B-ALL in children - resembles published karyotype	
MHH cALL-3	ACC 339	pre-B-ALL	PGR	PGR	11	♀	-	Toneczkows ki et al. 1995, (7539624)	human pseudodiploid karyotype - 46,(45-46)>2n>XX, del(6)(q15), der(9)(q9)(p21;q11), der(19)(t(1;19)(q23;p13) - carries t(1;19) primary and 6q- secondary rearrangements associated with pre B-ALL - resembles published karyotype	
MHH cALL-4	ACC 337	pre-B-ALL	PGR	PGR	10	♂	-	Toneczkows ki et al. 1995	human hypodiploid karyotype with 4% polyploidy - 45,(42-46)>2n>X,-Y, r(12)(qter;p13-pter)	
REH	ACC 22	pre-B-ALL	?	PPR	15	♀	-	Rosenfeld et al. 1977, 1998, (197411)	human pseudodiploid karyotype - 46,(44-47)>2n>X,-X,+16, del(3)(p22), t(4;12;21;16)(q32;p13;q22;q24;3)-inv(12)(p13;q22), t(5;12)(q31-q32;p12), der(16)t(16;21)(q24.3;q22) - AML1 sideline with inv(5)der(5)(p15q31), +18 - carries t(12;21) and del(12) producing respective TELAML1 fusion and deletion of residual TEL -	fusion gene TEL-
Jurkat	ACC 282	T-ALL	?	PPR	14	♂	+EBV	Schneider et al. 1977, (68013)	human flat-moded hypotetraploid karyotype with 7.8% polyploidy - 87,7,8-4n>XX,-Y,-Y,-5,-16,-17,-22, add(2)(p21)del(2)(p23)x2 - sideline with additional der(5)t(5;10)(q11;p15), del(9)(p11)	
SUP B-15	ACC 389	pre-B-ALL	?	PGR	9	♂	-	Naumovski et al. 1988, 2000, (3162827)	human pseudodiploid karyotype - 46-2n>XY, der(1)(1;1)(p11;q31), add(3)(q27), fusion gene BCR- der(4)t(1;4)(p11;q35), t(9;22)(q34;q11), add(10)(q25), ?del(14)(q23q31), ABL (e1-a2) der(16)t(9;16)(q11;p13) - resembles published karyotype	fusion gene BCR-
SD-1	ACC 366	pre-B-ALL	?	PPR	?	♀	+EBV	Dhut et al. 1991, 1999	human near-tetraploid karyotype - 92,(85-92)-4n>XXXX, t(9;22)(q34;q11)x2 - carries two fusion gene BCR- balanced Ph translocations - tetraploid derivate of original diploid karyotype	fusion gene BCR- ABL (e1-a2)

6.2 Zusätzliche Abbildungen

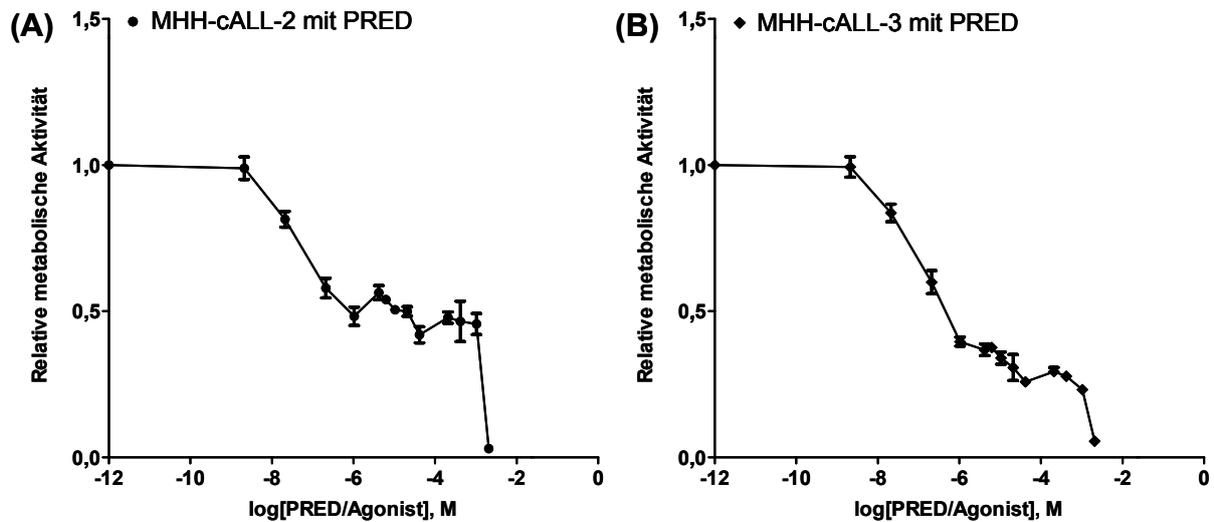
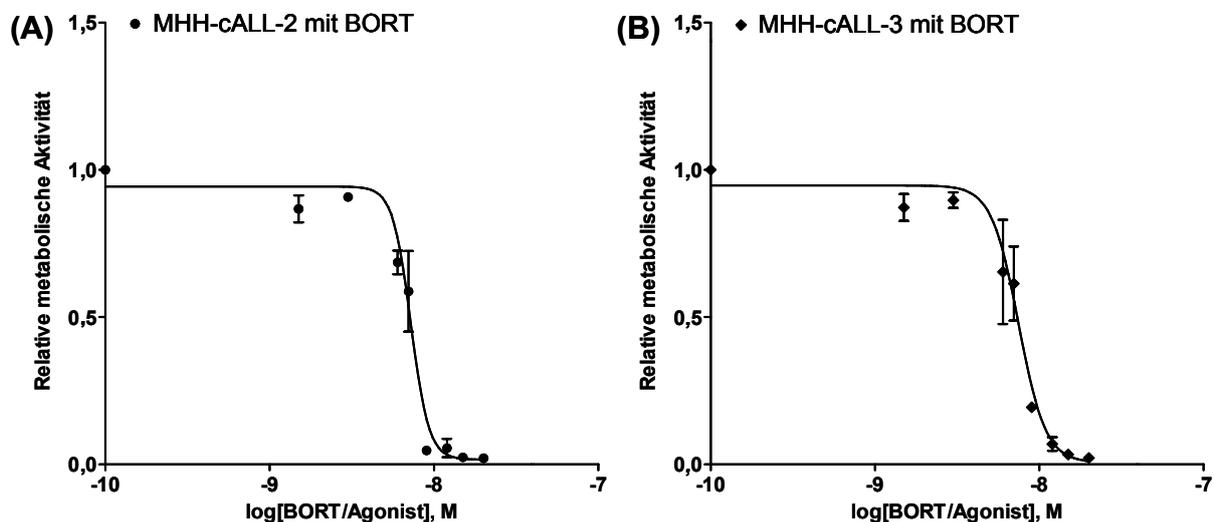


Abbildung 6-1: Dosis-Wirkungskurve nach der Gabe von Prednisolon (PRED).

Die Zelllinien (A) MHH-cALL-2 und (B) MHH-cALL-3 wurden für diese Untersuchung jeweils mit 2 nM bis 4 mM Prednisolon für 48 h inkubiert. Die Quantifizierung des Vitalitätsverlustes, bzw. der verminderten metabolischen Aktivität, erfolgte mit Hilfe von WST-1-Assays. Die Auftragung der gemessenen metabolischen Aktivität nach 48 h erfolgte gegen den Logarithmus der Prednisolonkonzentration.

Abbildung 6-2: Dosis-Wirkungskurve nach *Hill* zur Bestimmung der Bortezomib-IC₅₀-Konzentration.

Die Zelllinien (A) MHH-cALL-2 und (B) MHH-cALL-3 wurden für diese Untersuchung jeweils mit 1 bis 20 nM Bortezomib für 48 h inkubiert. Die Quantifizierung des Vitalitätsverlustes, bzw. der verminderten metabolischen Aktivität, erfolgte mit Hilfe von WST-1-Assays. Die Auftragung der gemessenen metabolischen Aktivität nach 48 h erfolgte gegen den Logarithmus der Prednisolonkonzentration.

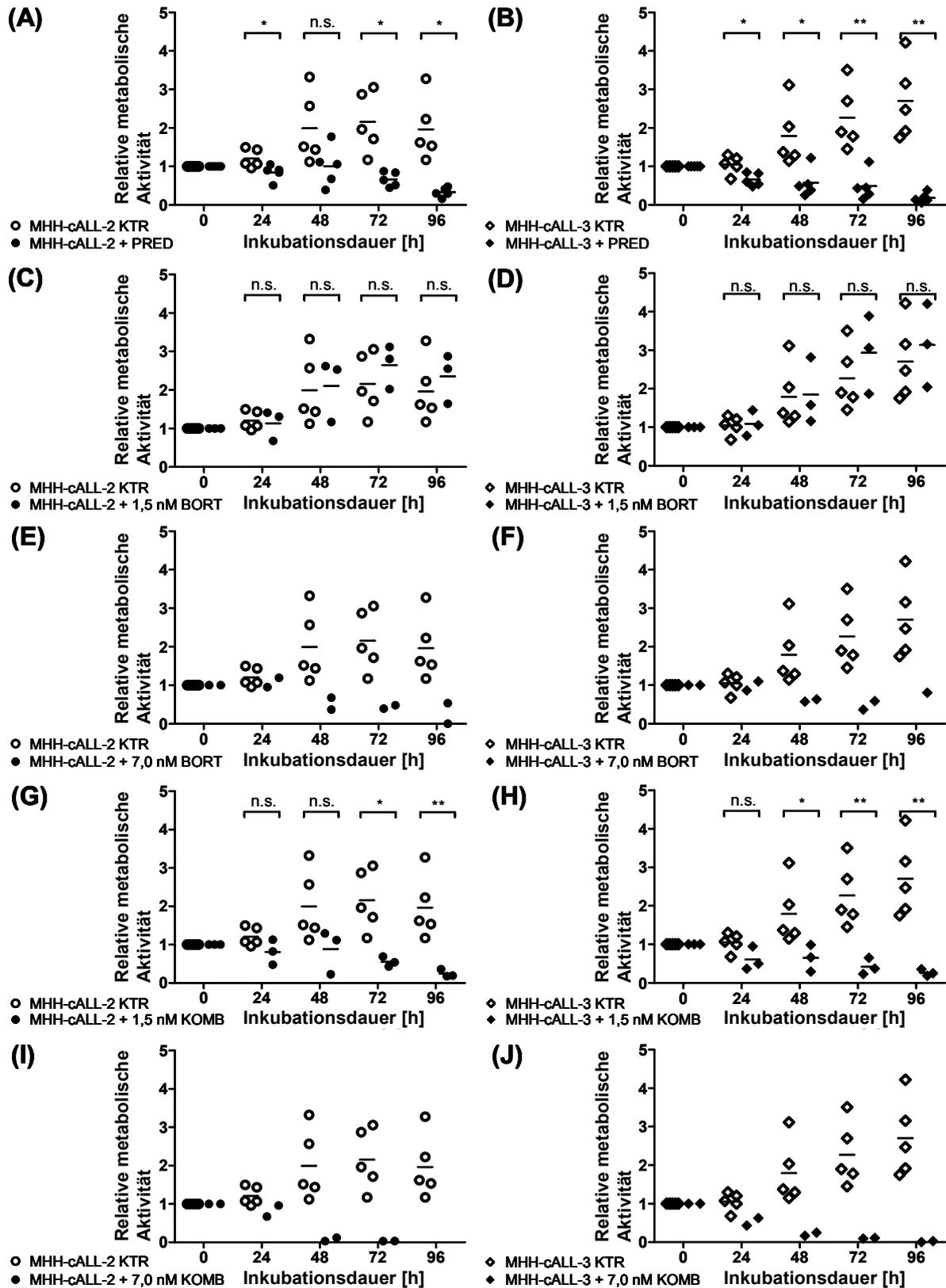


Abbildung 6-3: Ergebnisse des WST-1-Zellvitalitäts-Assays über einen Verdopplungszeitraum.

Mit Hilfe des WST-1-Reagenzes wurde die metabolische Aktivität der Zelllinien (A, C, E, G und I) MHH-cALL-2 und (B, D, F, H und J) MHH-cALL-3, in dem Zeitraum 0 bis 96 h nach der Behandlung mit Prednison (PRED) und Bortezomib (BORT) oder der Kombination beider Medikamente (KOMB) untersucht.

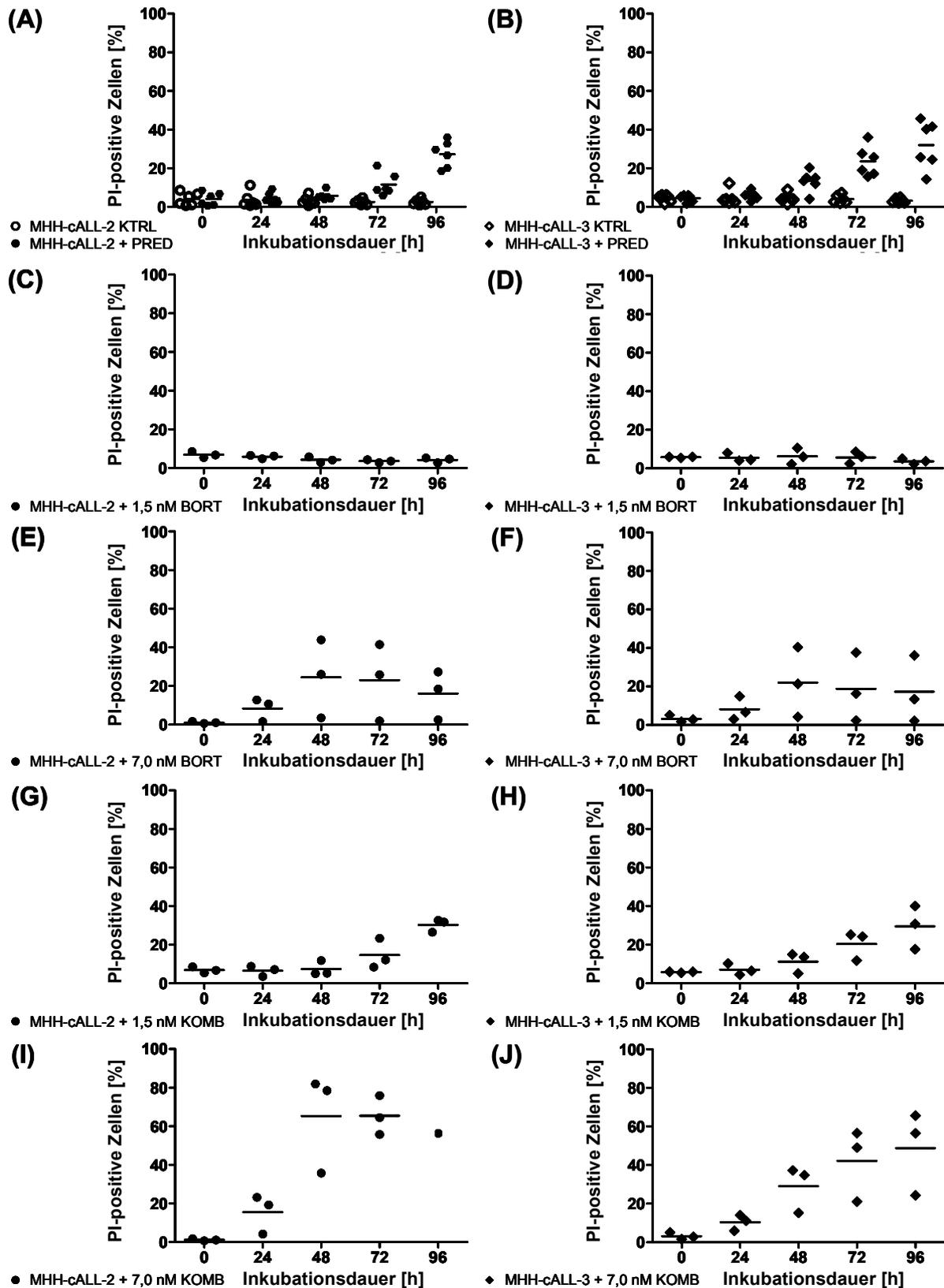


Abbildung 6-4: Graphische Darstellung der Ergebnisse der PI-Färbung letaler Zellen.

Mit Hilfe der PI-Färbung wurde die Zunahme letaler Zellen, in dem Zeitraum 0 bis 96 h nach der Behandlung, der Zelllinien (A, C, E, G und I) MHH-cALL-2 und (B, D, F, H und J) MHH-cALL-3 mit Prednisolon (PRED) und Bortezomib (BORT) oder der Kombination beider Medikamente (KOMB) untersucht.

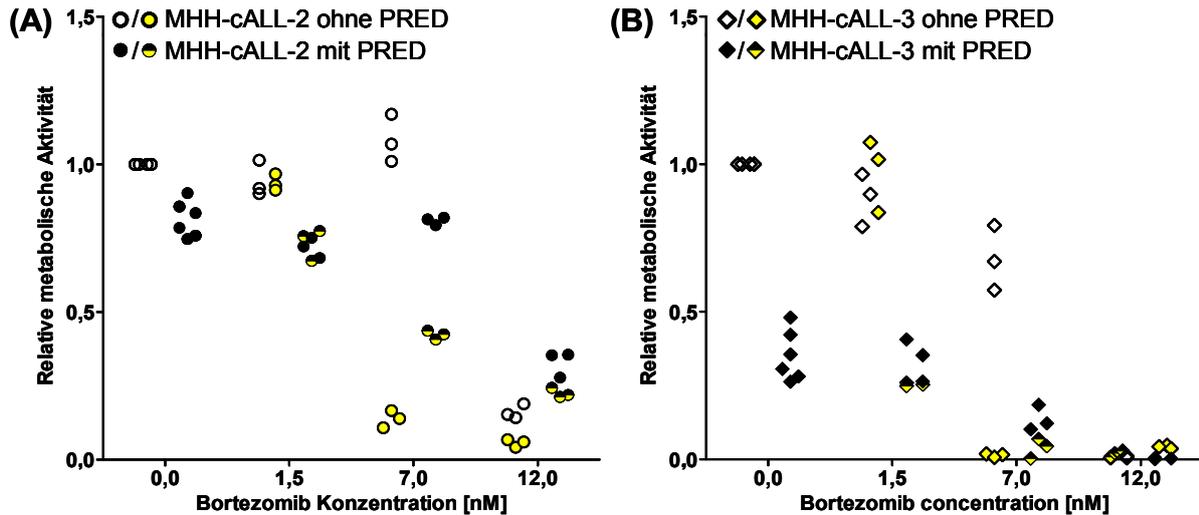


Abbildung 6-5: Ergebnisse des WST-1-Zellvitalitäts-Assays, zur Lagerbarkeit von Bortezomib.

Mit Hilfe des WST-1-Reagenzes wurde die metabolische Aktivität der Zelllinien (A) MHH-cALL-2 und (B) MHH-cALL-3, 48 h nach der Behandlung mit Prednisolon (PRE) und Bortezomib bestimmt. Die farbig hinterlegten Symbole kennzeichnen die Proben, die mit frisch angesetztem Bortezomib stimuliert wurden. Diejenigen ohne farbigen Hintergrund wurden mit der gelagerten Bortezomib-Stammlösung behandelt.

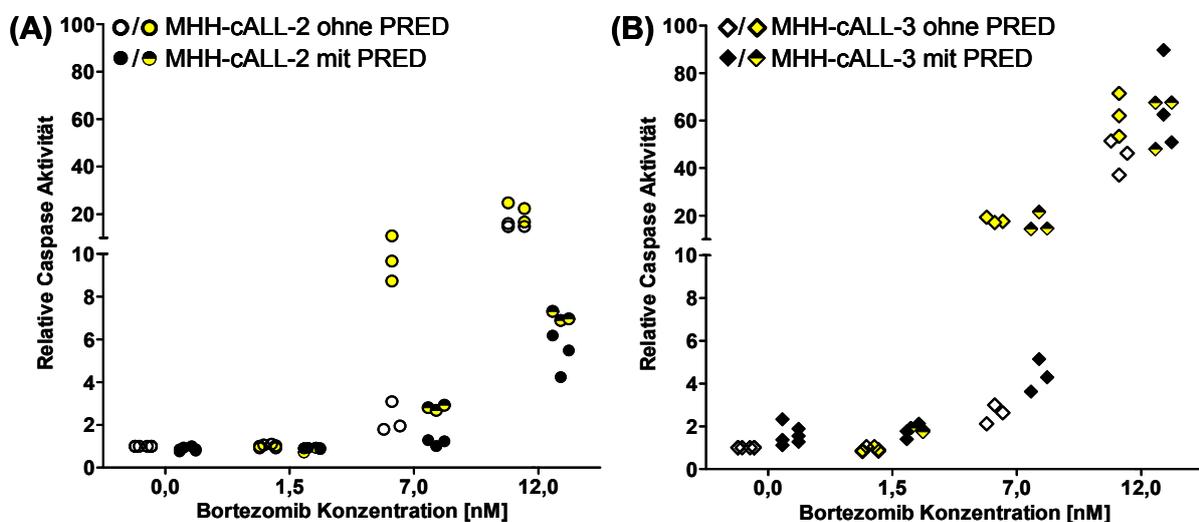


Abbildung 6-6: Ergebnisse des Caspase3/7-Aktivitäts-Assays, zur Lagerbarkeit von Bortezomib.

Mit Hilfe des Caspase-Aktivitäts Assays wurde der Anteil apoptotischer Zellen 24h nach der Behandlung mit Prednisolon (PRE) und Bortezomib, in den Zelllinien (A) MHH-cALL-2 und (B) MHH-cALL-3, bestimmt. Die farbig hinterlegten Symbole kennzeichnen die Proben, die mit frisch angesetztem Bortezomib stimuliert wurden. Diejenigen ohne farbigen Hintergrund wurden mit der gelagerten Bortezomib-Stammlösung behandelt.

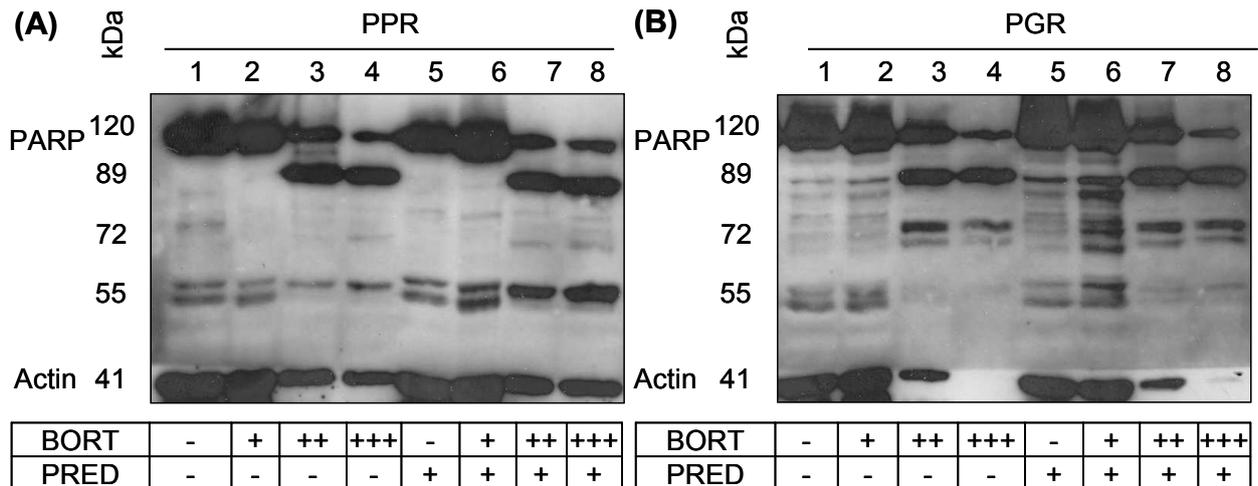


Abbildung 6-7: Exemplarische Western-Blot-Analysen des PARP-1-(PARP) Spaltungsmusters.

Die untersuchten Gesamtzelllysate der Zelllinien (A) MHH-cALL-2 und (B) MHH-cALL-3 wurden 48 h nach der Behandlung mit Prednisolon und Bortezomib isoliert. Die Symbole kennzeichnen die eingesetzte Konzentration der Medikamente. PRED : ohne (-); mit 6,2 μ M (+); BORT: ohne (-); mit 1,5 nM (+); 7,0 nM (++) und 12 nM (+++).

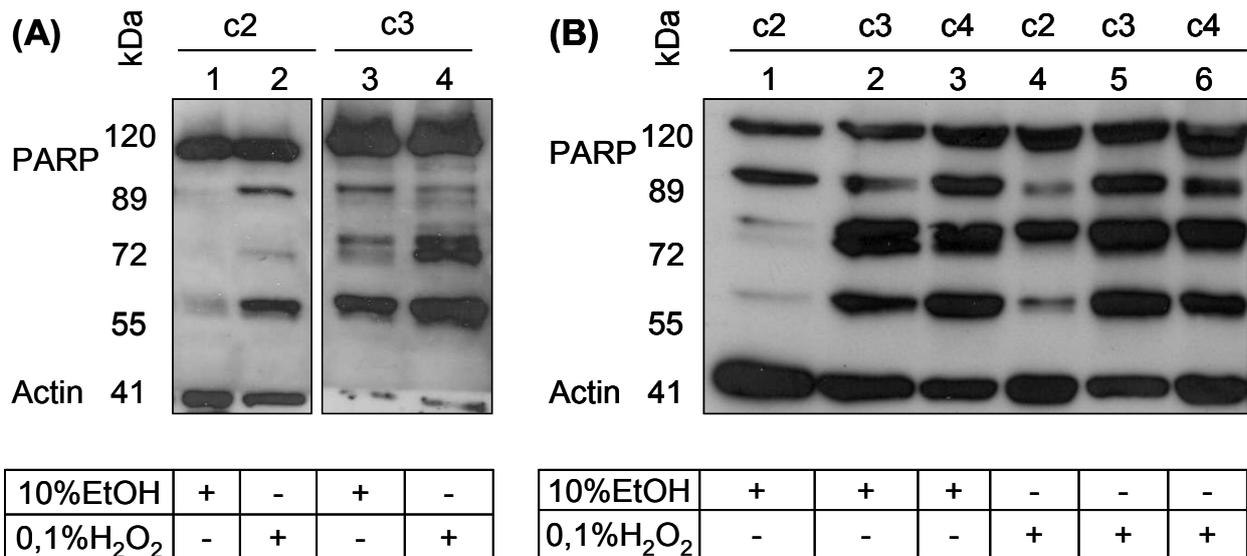


Abbildung 6-8: Exemplarische Western-Blot-Analysen des PARP-1-(PARP) Spaltungsmusters.

Die untersuchten Gesamtzelllysate der Zelllinien MHH-cALL-2(c2) -3(c3) und -4(c4) wurden nach 6-stündiger Inkubation mit den Nekrose-induzierenden Agenzien Wasserstoffperoxid (H₂O₂) und Ethanol (EtOH) hergestellt.

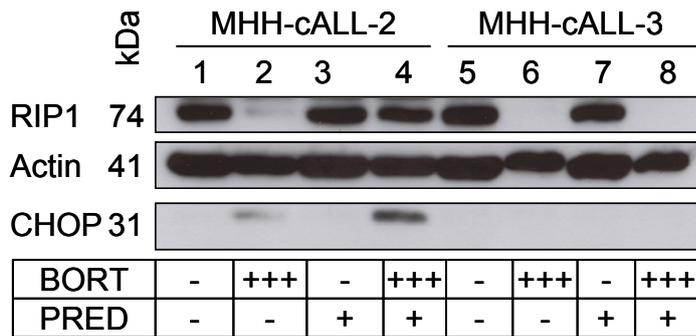


Abbildung 6-9: Exemplarische Western-Blot-Analyse zur Untersuchung von RIP1 und CHOP. Die Untersuchung erfolgte an Gesamtzelllysaten der Zelllinien MHH-cALL-2 und -3, die 48 h nach der Stimulation mit 6,2 μ M Prednisolon (PRED +) und 12 nM Bortezomib (BORT +++) extrahiert wurden. Untersucht wurden die Proteine RIP1 und CHOP im Vergleich zu Actin. RIP1-Spaltung gilt als Marker für Todesrezeptor-vermittelte Apoptose und CHOP-Expression ist charakteristisch für die zelluläre Stressantwort. Diese Western-Blot-Analyse wurde von Stephanie Trittel im Rahmen ihrer Diplomarbeit durchgeführt.

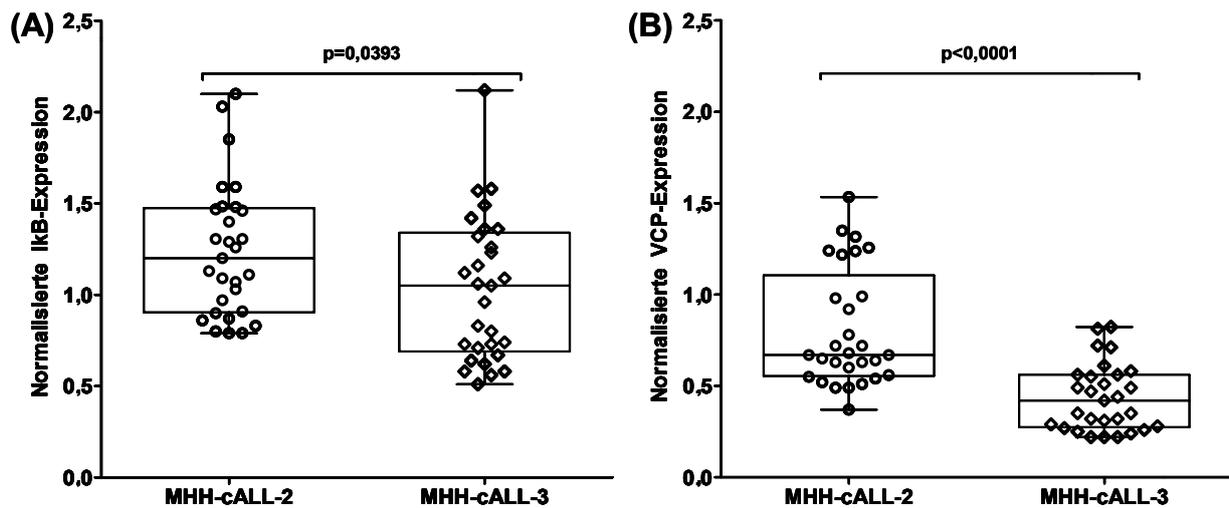


Abbildung 6-10: Initiale RNA-Expression der Zielgene (A) $I\kappa B$ und (B) VCP in ALL-Zelllinien. Für die Analyse wurden unbehandelte Zellen der Zelllinien (A) MHH-cALL-2 und (B) MHH-cALL-3 verwendet. Die RT-PCR-Analysen wurden im Vergleich zu einer Kalibrator-RNA aus 10 verschiedenen humanen Tumorzelllinien durchgeführt und die Ergebnisse der Analysen wurden gegen die Expression des TBP-Gens normalisiert. Die horizontalen Linien repräsentieren den Median.

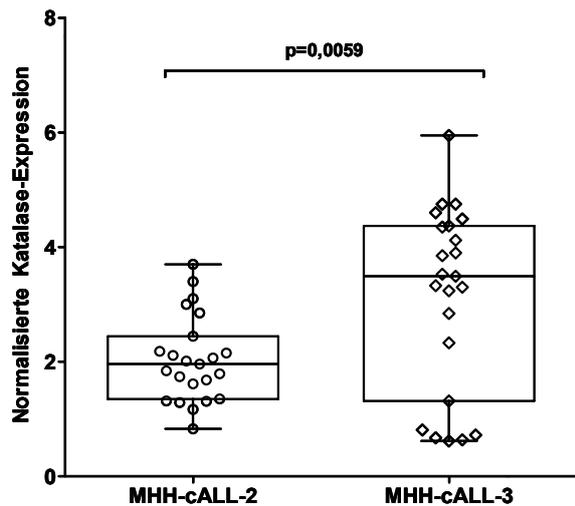


Abbildung 6-11: Initiale RNA-Expression des Zielgens Katalase in den unbehandelten Zelllinien MHH-cALL-2 und -3. Die RT-PCR-Analysen wurden im Vergleich zu einer Kalibrator-RNA aus 10 verschiedenen humanen Tumorzelllinien durchgeführt und die Ergebnisse der Analysen wurden gegen die Expression des TBP-Gens normalisiert. Die horizontalen Linien repräsentieren den Median.

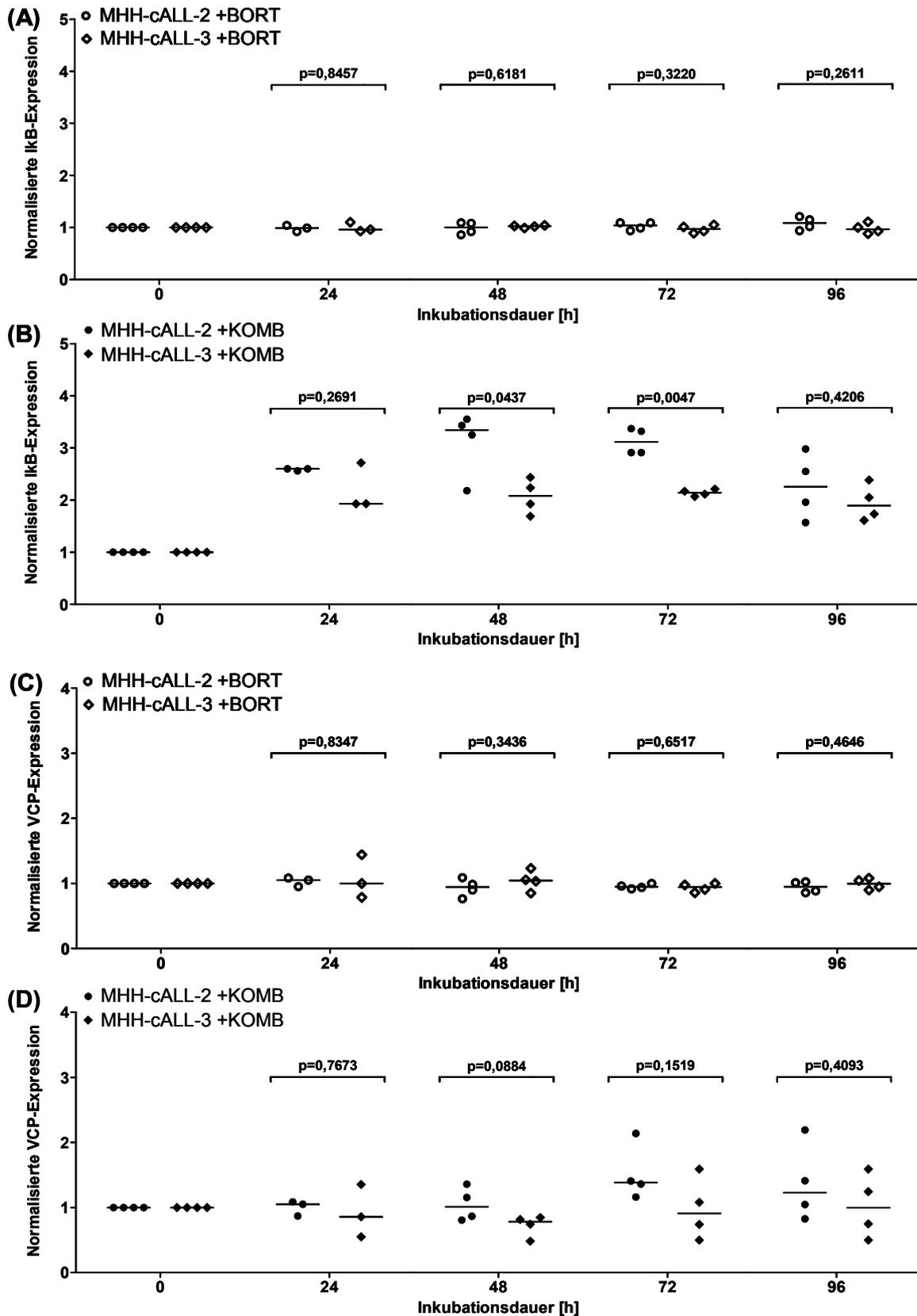


Abbildung 6-12: RNA-Expression der Zielgene IκB und VCP, dargestellt in (A) und (B) bzw. in (C) und (D), nach Behandlung der Zelllinien MHH-cALL-2 und -3 mit 1,5 nM Bortezomib (BORT) oder der kombinierten Behandlung dieser Konzentration mit Prednisolon (KOMB). Die RT-PCR-Analysen wurden im Vergleich zu einer Kalibrator-RNA aus 10 verschiedenen humanen Tumorzelllinien durchgeführt und die Ergebnisse der Analysen wurden gegen die Expression des TBP-Gens normalisiert. Die horizontalen Linien repräsentieren den Median.

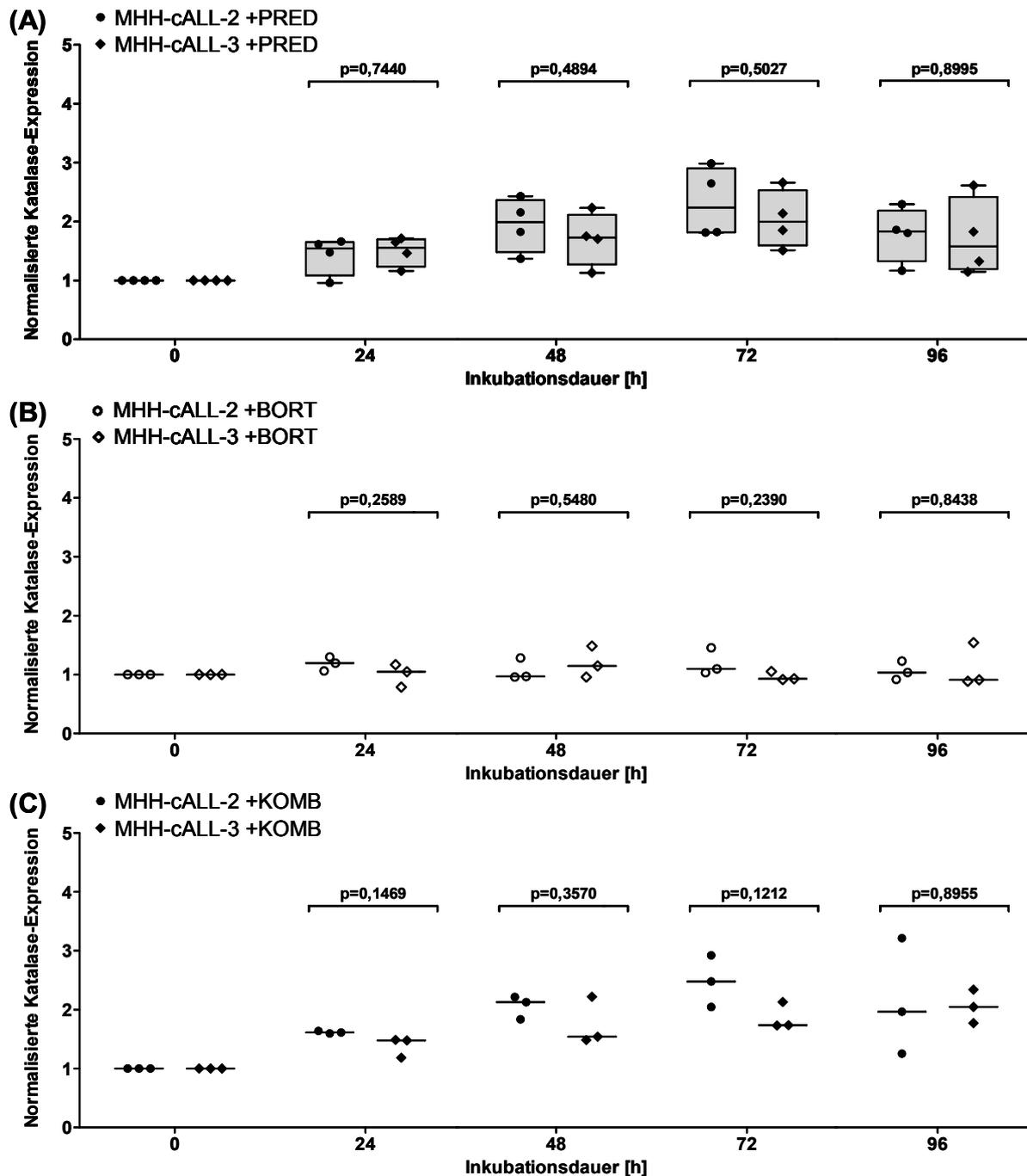


Abbildung 6-13: RNA-Expression des Zielgens *Katalase*, dargestellt in (A) und (B) und in (C) nach Behandlung der Zelllinien MHH-cALL-2 und -3 mit Prednisolon (PRED), 1,5 nM Bortezomib (BORT) oder der kombinierten Behandlung dieser Konzentration mit Prednisolon (KOMB). Die RT-PCR-Analysen wurden im Vergleich zu einer Kalibrator-RNA aus 10 verschiedenen humanen Tumorzelllinien durchgeführt und die Ergebnisse der Analysen wurden gegen die Expression des *TBP*-Gens normalisiert. Die horizontalen Linien repräsentieren den Median.

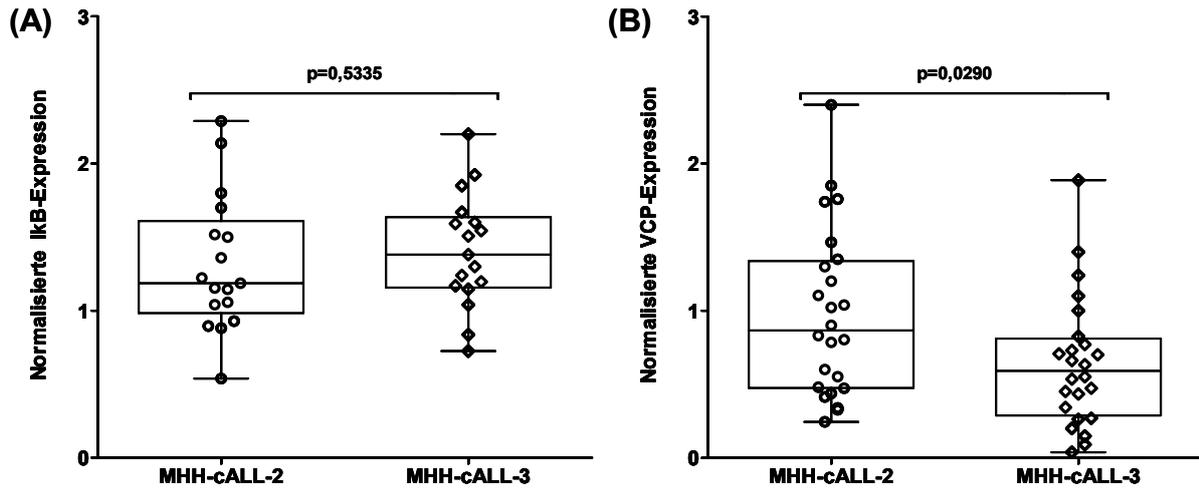


Abbildung 6-14: Protein-Expression von (A) IκB und (B) VCP in den unbehandelten Zelllinien MHH-cALL-2 und -3. Die Expression der Zielproteine wurde gegen Actin normalisiert. Die horizontalen Linien repräsentieren den Median.

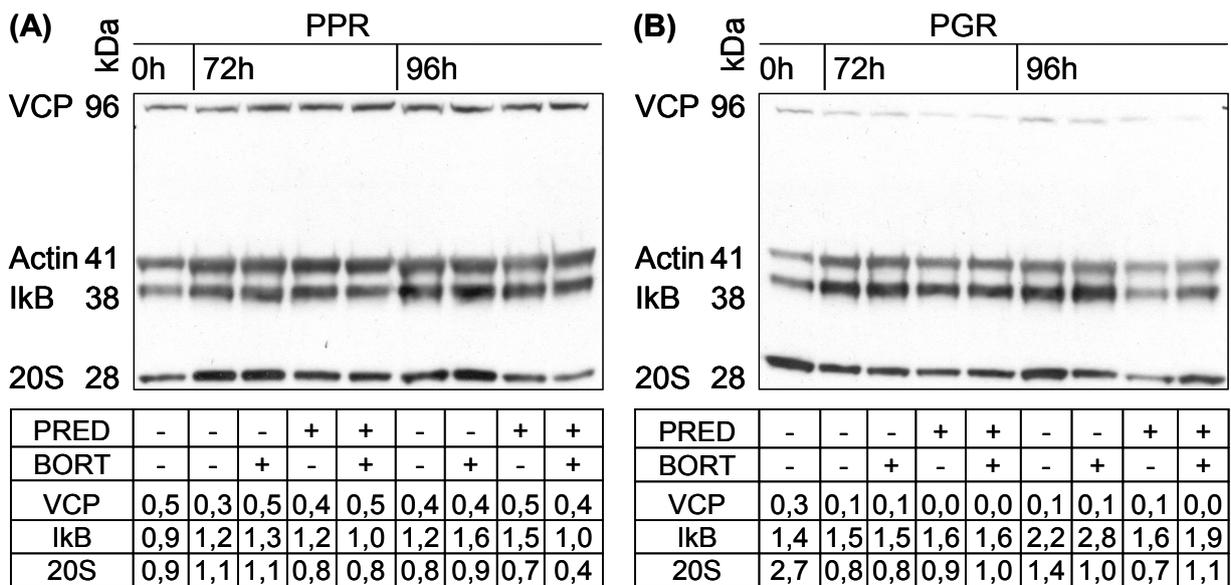


Abbildung 6-15: Exemplarische Western-Blot-Analyse zur Untersuchung von VCP, IκB und 20S. Die untersuchten Gesamtzelllysate der Zelllinien (A) MHH-cALL-2 und (B) MHH-cALL-3 wurden 72 und 96 h nach der Behandlung mit Prednisolon und Bortezomib isoliert. Die Symbole kennzeichnen die eingesetzte Konzentration der Medikamente. PRED : ohne (-); mit 6,2 μM (+); BORT: ohne (-); mit 1,5 nM (+); 7,0 nM (++) und 12 nM (+++). In der Tabelle unterhalb der Abbildung sind die Ergebnisse der densitometrischen Analyse normalisiert zu Actin zusammengefasst.

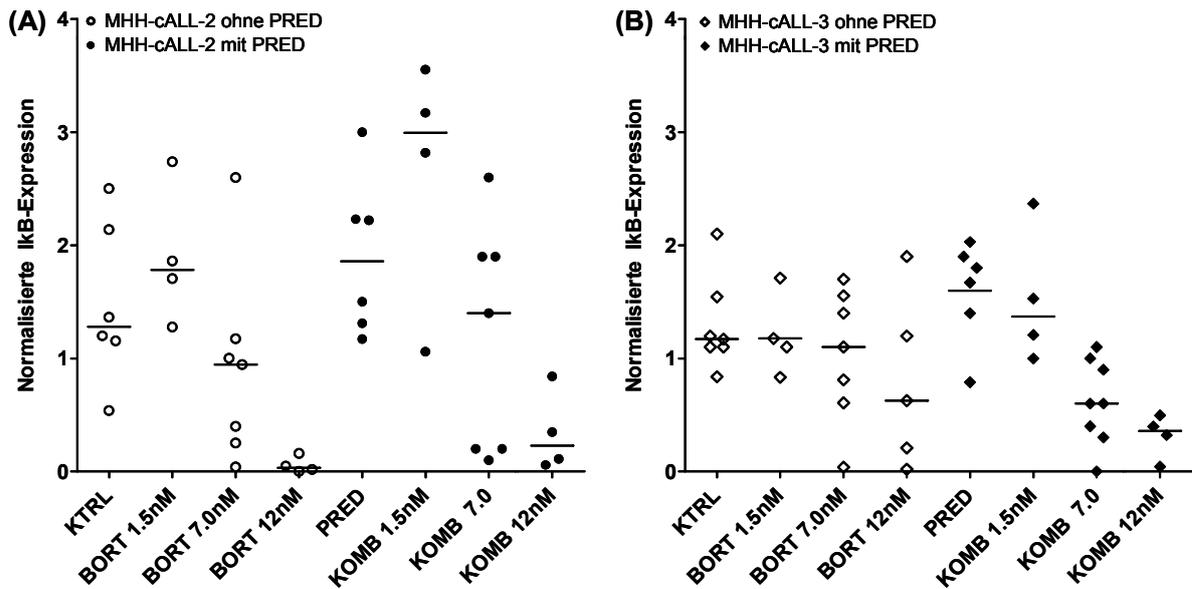


Abbildung 6-16: IκB-Protein-Expression nach 48 h Inkubation

Zusammenfassung der densitometrische Auswertungen der Western-Blot-Analysen nach Behandlung mit Prednisolon (PRED), Bortezomib (BORT) oder der kombinierten Behandlung (KOMB).

(A) MHH-cALL-2 und (B) MHH-cALL-3.

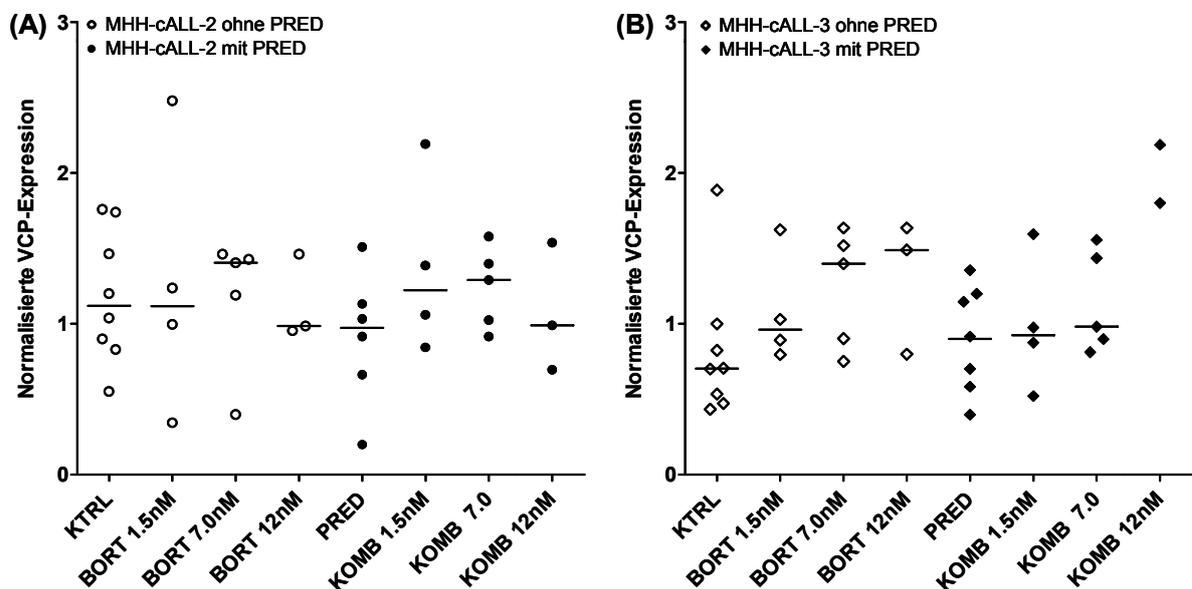


Abbildung 6-17: VCP-Protein-Expression nach 48 h Inkubation

Zusammenfassung der densitometrische Auswertungen der Western-Blot-Analysen nach Behandlung mit Prednisolon (PRED), Bortezomib (BORT) oder der kombinierten Behandlung (KOMB).

(A) MHH-cALL-2 und (B) MHH-cALL-3.

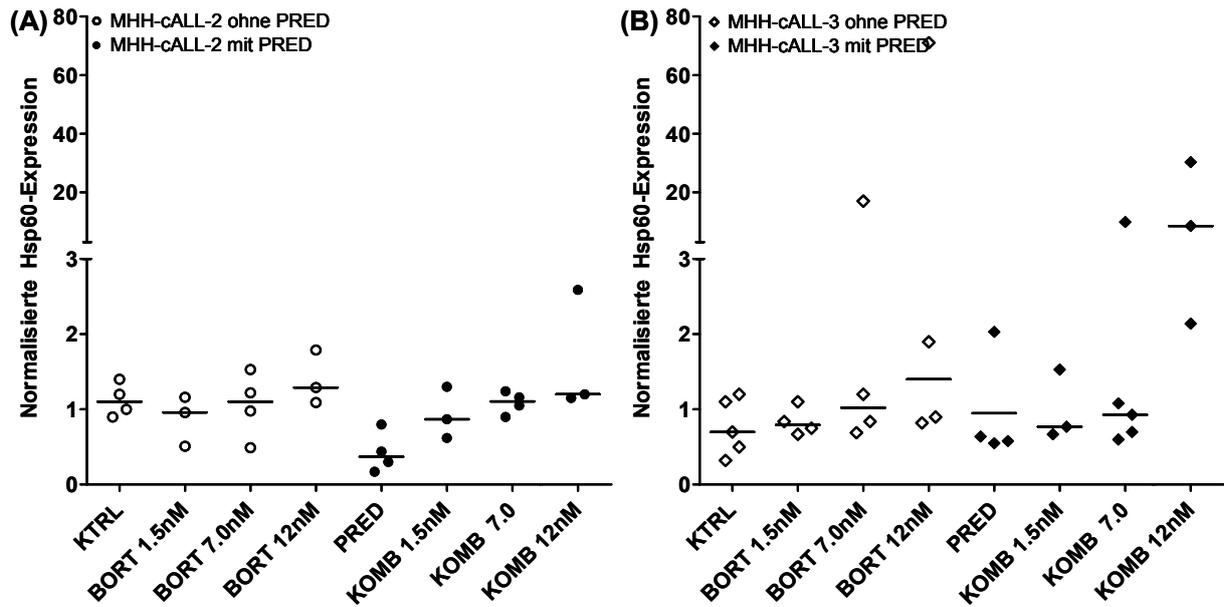


Abbildung 6-18: Hsp60-Protein-Expression nach 48 h Inkubation

Zusammenfassung der densitometrische Auswertungen der Western-Blot-Analysen nach Behandlung mit Prednisolon (PRED), Bortezomib (BORT) oder der kombinierten Behandlung (KOMB).

(A) MHH-cALL-2 und (B) MHH-cALL-3.

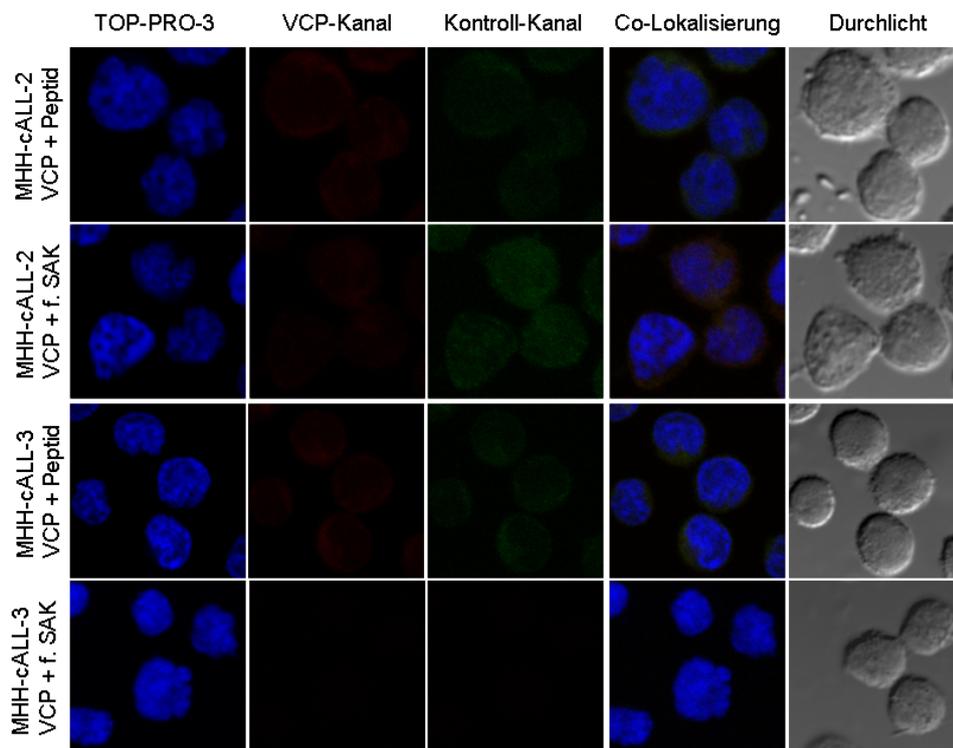


Abbildung 6-19: Kontrollfärbungen zur der Antikörperspezifität (CLSM-Aufnahme).

Zur Kontrolle der Spezifität des primären VCP-Antikörpers in der Immunfluoreszenzfärbung wurden die Zelllinien MHH-cALL-2 und -3 mit einem Gemisch aus VCP-Antikörper und spezifischem Blocking-Peptid gegen diesen Antikörper inkubiert (VCP + Peptid). Bei der zweiten Kontrolle wurde nach der Inkubation mit dem anti-VCP-Antikörper ein falscher Sekundärantikörper (f. SAK) eingesetzt. Dies diente zur Kontrolle der spezifischen Bindung des primären an den sekundären Antikörper. Als falscher Sekundärantikörper wurde statt des anti-Maus-IgG-Antikörpers ein gegen Kaninchen-IgG gerichteter verwendet. Die Kerne wurden mit TO-PRO-3 angefärbt.

Lebenslauf

Name: Stefanie Verena Junk

Geburtstag: 20.09.1977

Geburtsort: Hilden, Nordrhein Westfalen (NRW)

Bildungsweg:

1984-1988 Katholische Grundschule Erkrath, NRW

1988-1997 Gymnasium am Neandertal Erkrath, NRW
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife / Abitur

Oktober 1997 – März 2001 Studiengang Chemie Diplom an der
Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig

März 2001 – September 2005 Studiengang Biologie Diplom an der
Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig

Diplomarbeit am Institut für Genetik
Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig
Leitung: Prof. Dr. rer. nat. R. Cerff

Thema:
Lokalisierung von Fructose-1,6-bisphosphat Aldolasen der Klasse II aus
komplexen Algen in der Diatomee *Phaeodactylum tricornutum* mit Hilfe
von GFP-Reportergenkonstrukten

Abschluss: Diplom-Biologin

Seit Oktober 2005 Promotion am Institut für Zell- und Molekularpathologie
der Medizinischen Hochschule Hannover
Leitung: Prof. Dr. med. B. Schlegelberger

Thema:
Charakterisierung der Glucocorticoid-induzierten Zellantwort humaner
ALL-Zelllinien nach zusätzlicher Modulation des Ubiquitin-Proteasom-
Signalweges zur Überwindung der Glucocorticoid-Resistenz

Publikationen

Vorträge:

Proteasome inhibitor bortezomib induces apoptosis in prednisone-resistant childhood acute lymphoblastic leukemia cells

Junk, S., Lauten, M., Stanulla, M., Cario, G., Wittner, N., Schrappe, M., Schlegelberger, B., von Neuhoff, N.

23. Jahrestagung der Kind-Philipp-Stiftung für Leukämieforschung, Juli 2010, Wilsede, Deutschland

Poster-Veröffentlichungen:

Proteasome inhibitor bortezomib induces apoptosis in prednisone-resistant childhood acute lymphoblastic leukemia cells

Junk, S., Lauten, M., Stanulla, M., Cario, G., Wittner, N., Schrappe, M., Schlegelberger, B., von Neuhoff, N.

51. Jahrestagung der *American Society of Hematology (ASH)*, 2009, New Orleans, USA

The proteasome inhibitor bortezomib modulates the effect of glucocorticoid treatment in prednisone-resistant childhood acute lymphoblastic leukemia cells

Junk, S., Lauten, M., Cario, G., Wittner, N., Schrappe, M., Schlegelberger, B., von Neuhoff, N.

14. Jahrestagung der *European Hematology Association (EHA)*, 2009, Berlin, Deutschland

Validation of Mx1 (MxA) as a genetic marker for glucocorticoid-induced apoptosis in acute lymphoblastic leukemia cells?

Junk, S., Lauten, M., Cario, G., Wittner, N., Schrappe, M., Schlegelberger, B., von Neuhoff, N.

14. Jahrestagung der *European Hematology Association (EHA)*, 2009, Berlin, Deutschland

Can Bortezomib Treatment Overcome Glucocorticoid Resistance of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Cells?

Junk, S., Lauten, M., Cario, G., Wittner, N., Schrappe, M., Schlegelberger, B., von Neuhoff, N.

49. Jahrestagung der *American Society of Hematology (ASH)*, 2007, Atlanta, USA

Differential expression of valosin-containing protein (VCP, p97) in acute lymphoblastic leukemia cells with and without glucocorticoid treatment

von Neuhoff, N., Junk, S., Cario, G., Wittner, N., Schrappe, M., Schlegelberger, B., Lauten, M.

12. Jahrestagung der *European Hematology Association (EHA)*, 2007, Wien, Österreich

Differential in vivo and in vitro expression of valosin-containing protein (VCP, p97) in acute lymphoblastic leukemia cells with and without glucocorticoid treatment

Junk, S., Lauten, M., Cario, G., Wittner, N., Schrappe, M., Schlegelberger, B., von Neuhoff, N.

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik (GFH), 2007, Bonn, Deutschland

Danksagung

Ich danke Prof. Brigitte Schlegelberger und Dr. Nils von Neuhoff für die sehr interessante Aufgabenstellung und dafür, dass sie mir die Möglichkeit gegeben haben, die vorliegende Arbeit am Institut für Zell- und Molekularpathologie der Medizinischen Hochschule Hannover, anzufertigen. Durch ihre Unterstützung und wertvolle fachliche Betreuung kombiniert mit dem wissenschaftlichen Freiraum, den sie mir gewährt haben, ermöglichten sie es mir, die Dissertation in dieser Form anzufertigen.

Mein Dank geht insbesondere auch an unsere Kooperationspartner PD Dr. Melchior Lauten, Prof. Martin Stanulla, Dr. Gunnar Cario und Prof. Martin Schrappe. Im Rahmen der intensiven fachlichen Gespräche habe ich viel über die klinischen Aspekte unseres Projektes erfahren und ihren Blick von dieser Perspektive auf unsere Daten schätzen gelernt. Vielen Dank auch für die Unterstützung und das freundschaftliche Arbeitsklima bei unseren Treffen.

Ich danke der deutschen José-Carreras-Stiftung für die großzügige finanzielle Unterstützung dieses Forschungsprojektes.

Bei Nicole Wittner bedanke ich mich herzlich für die hervorragende Unterstützung bei der Bewältigung der praktischen Arbeit und der Diskussion der erarbeiteten Ergebnisse. Ohne die nette und freundschaftliche Zusammenarbeit mit ihr im Labor wäre die Zeit bestimmt anders und mit distinkt weniger Freude bei der Arbeit verlaufen.

Stephanie Trittel, die im Rahmen ihrer Diplomarbeit Untersuchungen zur Proteinexpression von RIP1 und CHOP an ALL-Zelllinien durchgeführt hat, möchte ich für die erfolgreiche Etablierung des ER-Stress-Nachweises mit Hilfe der CHOP-Analysen und für die gute Zusammenarbeit danken. Außerdem danke ich allen anderen Mitarbeitern der Hochschule sowie des Instituts für Zell- und Molekularpathologie, mit denen ich während der Arbeit an diesem Forschungsprojekt zusammen arbeiten durfte. Insbesondere gilt mein Dank Prof. Makito Emura, Dr. Noreen Otto, Sabine Schreek, Markus Meyer und Gillian Teicke für ihre nützlichen Ratschläge in allen fachlichen und praktischen Fragen, ihr Engagement und zahlreiche interessante Gespräche. Mein Dank geht natürlich auch an Inka Praulich, Susanne Wolf und alle, die mit mir in den letzten Jahren das „Kinderzimmer“ im Institut geteilt haben und mit ihren Talenten, ihrem Wesen und ihrem Humor zu einer positiven Arbeitsatmosphäre beigetragen haben. Erwähnen möchte ich auch Luis Somarribas-Patterson und Vivien Serbent, die als Praktikanten unser Projekt mit ihren Ideen und ihrer Motivation bereichert haben. Dr. Rudi Bauerfeind und der Abteilung für konfokale Mikroskopie danke ich für die freundliche und hilfreiche Unterstützung bei der Anfertigung und Interpretation der CLSM-Aufnahmen. Ich danke allen fleißigen Korrekturlesern dieser Arbeit. Mein besonderer Dank gilt PD Dr. Dirk Wedekind für die Übernahme des Korreferats.

Meiner Familie und meinen Freunden möchte ich für den Rückhalt danken, den sie mir während der Doktorarbeit gegeben haben, aber auch für alle kritischen Anmerkungen und kreativen Ideen. Im Besonderen möchte ich meinem Vater dafür danken, dass er mich auf meinem Weg immer begleitet und wie selbstverständlich unterstützt hat. Jan danke ich von ganzem Herzen für seine liebevolle Unterstützung und sein Verständnis für diesen arbeits- und zeitintensiven Lebensabschnitt.