

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III – Großhadern
der Ludwig-Maximilian Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. Wolfgang Hiddemann

**Untersuchung zur Proteasomenhemmung des Mantelzelllymphoms mittels
Bortezomib unter besonderer Berücksichtigung proteinanalytischer Verfahren**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Marc Oliver Weinkauff

aus
Nürnberg

Jahr
2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Martin Dreyling

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Hans-Gustav Klobeck
Prof. Dr. Marianne Jochum
Priv. Doz. Dr. Frank Kolligs

Mitbetreuung durch den
Promovierten Mitarbeiter: _____

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 24.07.2008

Ich widme diese Arbeit meinen geliebten Eltern,
die mich immer unterstützt haben.

und

Gewidmet meinen während dieser Arbeit verstorben Verwandten

Meine liebe Mutter Monika Weinkauf (1943-2008)

Meine Oma Karin Weinkauf (1921-2007)

Mein Opa Ernst Weinkauf (1918-2002)

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen bedanken, die mir diese Arbeit ermöglicht haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer und Doktorvater Martin Dreyling.
Auf seinen Rat und seine Hilfsbereitschaft konnte ich mich immer verlassen.

Für die gute Zusammenarbeit möchte ich darüber hinaus den verschiedenen Kooperationspartnern danken, insbesondere Andreas Rosenwald und Alexander Kohlmann.

Die gute Zusammenarbeit und das freundschaftliche Verhältnis zu meinen Kollegen in der KKG Leukämie und insbesondere der AG Dreyling werde ich immer in guter Erinnerung behalten.

Veröffentlichte Ergebnisse aus dieser Arbeit

Die Ergebnisse dieser Arbeit – oder Teile hiervon – wurden in folgenden Publikationen veröffentlicht:

M. Weinkauff, W. Hiddemann, M. Dreyling ; Sample pooling in 2-D gel electrophoresis: a new approach to reduce nonspecific expression background.; Electrophoresis. 2006 Nov; 27(22):4555-8.

M. Weinkauff, M. Christopeit, W. Hiddemann, M. Dreyling; Proteome - and microarray - based expression analysis of lymphoma cell lines identifies a p53-centered cluster of differentially expressed proteins in mantle cell and follicular lymphoma; Electrophoresis. 2007 Dec; 28(23):

M. Weinkauff, Y. Zimmermann, Elena Hartmann, Andreas Rosenwald, M. Rieken, A. Pastore, G. Hutter, W. Hiddemann, M. Dreyling; 2D-PAGE analysis reveals a p53-centered network of protein interactions that affect the cell viability of proteasome inhibitor bortezomib sensitive mantle cell lymphoma (2008) (Electrophoresis; eingereicht)

M. Lorenz, M. Rieken, **M. Weinkauff**, A. Pastore, M. Dreyling, R. Issles, V. Milani; Heat treatment in mantle cell lymphoma cells resistant and sensitive to the proteasome inhibitor bortezomib. (2008) (Hyperthermia; eingereicht)

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen (alphabetische Ordnung)

(e. ...)	aus dem Englischen
2D-PAGE	<u>Z</u> wei- <u>d</u> imensionale <u>P</u> oly <u>a</u> crylamid <u>G</u> eleelektrophorese
ACN	<u>A</u> ceton <u>i</u> tril
APS	<u>A</u> mmonium <u>p</u> ersulfat
CDK	(e. <u>c</u> yclin <u>d</u> ependend <u>k</u> inases) Cyclinabhängige Kinasen
CHAPS	3-[(3- <u>C</u> holamidopropyl)dimethyl <u>a</u> mmonio]-1- <u>p</u> ropane <u>s</u> ulfonate
CHOP	Chemotherapieregime: <u>C</u> yclophosphamid, <u>H</u> ydroxydaunorubicin, Vincristin (<u>Q</u> ncovir [®]), <u>P</u> rednison
CLL	<u>C</u> hronische <u>L</u> ymphatische <u>L</u> eukämie
CR	(e. complete remission) komplette Remission
CVAD	Chemotherapieregime aus <u>C</u> yclophosphamid, Vincristin, Doxorubicin und Dexamethason
DNA	(e. <u>d</u> eoxyribo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid) Desoxyribonukleinsäure
DMSO	<u>D</u> imethyl <u>s</u> ulfoxid
dpi	(e. <u>d</u> ots <u>p</u> er <u>i</u> nch) (Bild-)Punkte pro Inch; Einheit der Auflösung digitaler Bilddaten
DTE	<u>D</u> ithio <u>e</u> rythritol
EGFR	(e. <u>E</u> pithelial <u>G</u> rowth <u>F</u> actor <u>R</u> eceptor) epithelialer Wachstumsfaktorrezeptor
EDTA	<u>E</u> thylenediamine <u>t</u> etra <u>a</u> cetic acid
EGTA	<u>E</u> thylene glycol bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'- <u>t</u> etra <u>a</u> cetic acid
ELISA	(e. <u>E</u> nzyme- <u>L</u> inked <u>I</u> mmunosorbent <u>A</u> ssay) Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
ER	<u>E</u> ndoplasmatisches <u>R</u> eticulum

FACS	(e. <u>F</u> luorescence <u>a</u> ctivated <u>c</u> ell <u>s</u> orting) Durchflusszytometrie
FBS	(e. <u>f</u> oetal <u>b</u> ovine <u>s</u> erum) fötales Rinderserum
FL	<u>F</u> ollikuläres <u>L</u> ymphom
Gy	<u>G</u> ray: physikalische Einheit der Energiedosis
HSP	<u>H</u> itzes <u>s</u> chock <u>p</u> rotein
IEF	<u>I</u> soelektrische <u>F</u> okussierung
JNK	(e. c- <u>J</u> un <u>N</u> -terminal <u>K</u> inase)
MALDI-TOF	(e. <u>m</u> atrix- <u>a</u> ssisted <u>l</u> aser <u>d</u> esorption/ <u>i</u> onization = <u>t</u> ime- <u>o</u> f- <u>f</u> light)
MCL	(e. <u>m</u> antle <u>c</u> ell lymphoma) Mantelzelllymphom
MOWSE	(e. <u>m</u> olecular <u>w</u> eight <u>s</u> earch) Molekulargewichtssuche
MS	<u>M</u> assens <u>s</u> pektrometer
NHL	<u>N</u> on- <u>H</u> odgkin <u>L</u> ymphom
PAGE	<u>P</u> oly <u>a</u> crylamid <u>G</u> ele <u>e</u> ktrophorese
PCR	(e. <u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction) Polymerase-Kettenreaktion
PE	<u>P</u> hyco <u>e</u> rythrin
pI	isoelektrischer <u>P</u> unkt
PKC	<u>P</u> rotein <u>K</u> inase <u>C</u>
PR	(e. <u>p</u> artial <u>r</u> emission) Teilremission
rcf	(e. <u>r</u> elative <u>c</u> entrifugal <u>f</u> orce) relative Zentrifugalkräfte; (entspricht Erdanziehungskräften [g])
R-CHOP	<u>R</u> ituximab in Kombinationstherapie mit <u>CHOP</u>
SDS	(e. <u>S</u> odium <u>D</u> odecyl <u>S</u> ulfate) Natriumdodecylsulfat
TBS	(e. <u>T</u> ris <u>B</u> uffered <u>S</u> aline) Tris-gepufferte Salzlösung
TFA	(chem. <u>T</u> ri <u>f</u> luor <u>a</u> acetat) Trifluoressigsäure
Vh	<u>V</u> olt <u>s</u> tunden

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	IV
Veröffentlichte Ergebnisse aus dieser Arbeit	V
Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen (alphabetische Ordnung)	VI
1. EINFÜHRUNG	1
1.1 DAS MANTELZELLYMPHOM	1
1.1.1 <i>Klinische und phänotypische Charakterisierung</i>	1
1.1.2 <i>Molekulare Hintergründe</i>	3
1.2 THERAPIE DES MANTELZELLYMPHOM	5
1.2.1 <i>Konventionelle und etablierte Therapieansätze</i>	5
Klassische Chemotherapie	5
Rituximab - Antikörpertherapie	7
1.2.2 <i>Gezielte molekulare Therapien</i>	8
Allgemeine Hintergründe	8
Bortezomib und die Biologie des Proteasoms	9
2. ZIELSETZUNG	18
3. MATERIAL & METHODEN	20
3.1 MATERIAL	20
3.1.1 <i>Geräte</i>	20
3.1.2 <i>Biologisches Material</i>	21
Zelllinien	21
Charakterisierung des Patientenmaterials	23
3.1.3 <i>Verbrauchsmaterial & Chemikalien</i>	23
Allgemeine Bemerkung	23
Zellkulturmedien	23
Antikörper	24
Oligonukleotide	25
Enzyme	25
Fertigreagensysteme und spezielle Reagenzien (Kits)	26
Gele und Puffer	27
3.1.4 <i>EDV, Online- Ressourcen & Computerprogramme</i>	29
3.2 METHODEN	30
3.2.1 <i>Zellkultur</i>	30
Zellkulturbedingungen	30
Trypanblau-Ausschluss-Test	31
Behandlung von Zellen mit Bortezomib	31
Extraktion von MCL-Patientenzellen durch Dichtegradientenzentrifugation	32
WST1-Proliferationstest zur Bestimmung der mittleren inhibitorischen Konzentration (IC50)	33
Bestimmung der Apoptoserate durch 7-AAD-Färbung und FACS-Analyse	35
Zellzyklusanalyse durch Propidiumiodid-Färbung	37
3.2.2 <i>PCR-Nachweismethoden</i>	38
Polymerase-Kettenreaktion (PCR): Hintergrundinformationen	38
HRV-Polymorphismen-Test zur Validierung der Zelllinienidentität	39
PCR-Mykoplasmentest	40
3.2.3 <i>Proteinanalytische Methoden</i>	41
Zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese (2D-PAGE)	41
Bioinformatische Analyse der 2D-PAGE-Gele	44
Probenvorbereitung für die massenspektrometrische Proteinidentifikation	44
Massenspektrometrische Identifizierung differenziell abgebildeter Proteinpunkte durch Peptidmassen-Fingerabdrücke	45
Charakterisierung der identifizierten Kandidatenproteine durch Analyse funktioneller Netzwerke	48
Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	49
SDS-PAGE und Western Blot-Analyse	49
3.2.4 <i>Expressionsanalyse durch Affymetrix®-Microarray</i>	51
3.3 VERSUCHSSPEZIFISCHE ANPASSUNGEN DER BESCHRIEBENEN STANDARDMETHODEN	53
3.3.1 <i>Anpassungen des Versuchsaufbaus des „Proben-Pool“-Verfahrens und Vergleichsuntersuchungen von zwei NHL-Subtypen (MCL und FL)</i>	53
3.3.2 <i>Anpassungen des Versuchsaufbaus der Proteom-Analysen mit dem 26s-Proteasom-Inhibitor Bortezomib</i>	54

4. ERGEBNISSE	55
4.1 ETABLIERUNG EINER STANDARDISIERTEN PROTEINANALYTISCHEN PLATTFORM.....	55
4.1.1 <i>Etablierung eines stabilen 2D-PAGE Protokolls</i>	55
4.1.2 <i>Das „Proben-Pool“-Verfahren</i>	56
Hintergrund	56
Reduktion der Zahl von Phänotyp-unspezifischen Proteinpunkten bei der Analyse von „Proben-Pools“ mittels 2D-PAGE-Gelen	58
4.1.3 <i>Vergleichsuntersuchung von zwei NHL-Subtypen (MCL gegen FL)</i>	59
Hintergrund	59
Ermittlung der differentiellen Proteinspiegel in MCL- und FL-Zelllinien	60
Identifikation von 38 differentiell auftretenden Proteinpunkten durch MALDI-TOF MS	61
Funktionelle Einordnung der identifizierten Kandidatenproteine.....	63
Lokalisation der identifizierten Kandidatenproteine in einem funktionellen Netzwerk	66
Western Blot-Analysen zur Bestätigung der Aussagen der 2D-PAGE-Experimente.....	67
Eingeschränkte Korrelation der RNA-Expressionsdaten mit der Analyse der zellulären Proteinspiegel ..	70
4.2 UNTERSUCHUNGEN MIT DEM 26S-PROTEASOM-INHIBITOR BORTEZOMIB	71
4.2.1 <i>Wirksamkeit der Bortezomib-Behandlung bei MCL-Zelllinien</i>	71
Antiproliferative Wirkung von 25nM Bortezomib in MCL-Zelllinien	71
Bestimmung der IC ₅₀ -Werte der MCL-Zelllinien bei der Gabe von 25nM Bortezomib.....	72
Antiproliferative Wirkung von Bortezomib durch Apoptoseinduktion.....	74
Induktion eines G ₂ /M-Arrestes durch Bortezomib-Behandlung.....	75
4.2.2 <i>Proteom-Analyse</i>	76
Analyse der Veränderungen der zellulären Proteinspiegel der MCL-Zelllinien nach Bortezomib-Behandlung.....	77
Identifikation von 38 differentiell auftretenden Proteinpunkten durch MALDI-TOF MS	78
Funktionelle Einordnung der identifizierten Kandidatenproteine durch Literatur- und Datenbankrecherche	84
Lokalisation der identifizierten Kandidatenproteine in einem funktionellen Netzwerk	85
Western Blot-Analysen zur Bestätigung der 2D-PAGE-Ergebnisse.....	87
Untersuchungen an primären MCL-Zellen zur Bestätigung der Ergebnisse der MCL- Zelllinien.....	88
Identifizierung der beobachteten Hitzeschock-Proteinantwort durch RNA-Expressionsanalyse	91
5. DISKUSSION	92
5.1 METHODISCHE ASPEKTE	92
5.2 VERGLEICHSUNTERSUCHUNGEN ZWISCHEN MCL UND FL.....	95
5.3 ANALYSE DER VERÄNDERUNG DER PROTEINSPIEGEL IN BORTEZOMIB-BEHANDELTEM MCL.....	101
6. AUSBLICK	108
7. ZUSAMMENFASSUNG.....	110
8. ABSTRACT	112
9. LITERATURVERZEICHNIS.....	114
ANLAGEN.....	124
SCHRIFTENVERZEICHNIS.....	124
<i>Publikationen (Peer Review)</i>	124
<i>Einfache Fachartikel</i>	125
<i>Fachvorträge</i>	125
<i>Posterpräsentationen</i>	126
<i>Weitere Abstract - Veröffentlichungen</i>	128
CURRICULUM VITAE.....	129

1. Einführung

1.1 Das Mantelzelllymphom

1.1.1 Klinische und phänotypische Charakterisierung

Die neoplastische Erkrankung, die heute als Mantelzelllymphom (MCL) bezeichnet wird, wurde im deutschsprachigen Raum erstmalig im Jahr 1974 in der Kiel-Klassifikation der malignen Lymphome unter der Bezeichnung zentrozytisches Lymphom als eigenständiger Subtyp der B-Zell Non-Hodgkin Lymphome (NHL) beschrieben. Mit der Einführung der allgemeinen WHO-Tumor Klassifizierung im Jahr 2001 wurde dieser Lymphom-Subtyp unter dem heute gebräuchlichen Namen MCL auch weltweit definiert (Jaffe *et al.* 2001). Zuvor wurden Fälle dieser Erkrankung oft auch als zentrozytisch-zentroblastisches Lymphom, lymphozytisches Lymphom mittlerer Differenzierungsstufe oder diffus-kleinzelliges Lymphom mit gebuchtetem Kern bezeichnet, aber es existieren auch durch Nachanalyse als MCL bestätigte Zelllinien die ursprünglich als diffus-großzelliges Lymphom (HBL-2) oder B-Prolymphozytenleukämie (JVM-2) diagnostiziert wurden (Drexler und MacLeod 2002). Ursprünglich wurde das MCL als indolentes, niedrigmalignes Lymphom klassifiziert; Es wird inzwischen jedoch als aggressives Lymphom angesehen. Das MCL macht bei einer Neuerkrankungsrate von 2-3/100000 Einwohner etwa 5-10 % aller NHL aus (Dreyling *et al.* 2007) und gehört daher zu den NHL mittlerer Häufigkeit. Mit einer mittleren Überlebenszeit von etwa 3 Jahren und nur wenigen Langzeitüberlebenden besitzt das MCL die schlechteste Langzeitprognosen aller Lymphome (Hiddemann *et al.* 2004). Der klinische Verlauf der Erkrankung ist dabei aggressiv und durch ein schlechtes Ansprechen auf klassische Therapieregime

gekennzeichnet. Epidemiologisch gesehen handelt es sich beim MCL um eine Erkrankung, die mit einem Verhältnis von 3-4/1 überwiegend bei Männern fortgeschrittenen Lebensalters (durchschnittlich zwischen dem 65. und 75. Lebensjahr) auftritt und meist erst in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert wird. Als typische Symptome treten generalisierte Lymphadenopathien sowie oft Knochenmarksinfiltration und in der Mehrheit der Fälle auch Hepatosplenomegalie auf. Die neoplastischen Zellen werden auch als leukämische Ausschwemmung in 30% der Fälle regelmäßig im peripheren Blut nachgewiesen. Die neoplastischen Zellen des MCL zeigen normalerweise einen ausgereiften B-Zell-Immunophänotyp und tragen charakteristischerweise neben den normalen B-Zell-Antigenen auch das T-Zell-Oberflächenantigen CD5. Das auf reifen B-Zellen exprimierte Oberflächenantigen CD23 sowie die Follikelzentrums-Marker CD10 und Bcl-6 fehlen im Normalfall auf Zellen des MCL. Neben dem ‚klassischen‘ Typus existieren noch weitere Varianten des MCL, von denen die aggressivere, ‚blastoide‘ Variante die Bedeutsamste ist und nach zytologischen Gesichtspunkten in eine ‚klassisch blastoide‘ und eine ‚pleomorphisch blastoide‘ Variante unterteilt werden kann. Das ‚klassischen‘ MCL stellt sich als einförmige Vermehrung kleiner bis mittelgroßer Lymphozyten mit dichtem, unregelmäßig geformten, oftmals eingebuchtetem Zellkern und schmalem Zytoplasmasaum dar, während die Zellen der blastoiden Variante des MCL meist mittelgroßen Blasten mit zentrozytischer bis zentroblastischer Morphologie mit unauffälligen Nukleolen oder großen, pleomorphen Zellen mit prominenten Nukleolen entsprechen (Abbildung 1). Die blastoide Variante ist zudem durch einen erhöhten mitotischen Index gekennzeichnet und bildet häufig ‚apoptotische Körper‘ aus. Gemeinsam haben beide Varianten, dass die malignen Zellen den Lymphknoten im Normalfall unter kompletter Zerstörung der Lymphknotenarchitektur diffus oder angedeutet nodulär infiltrieren. Typisch ist auch

die Ausbildung hyalinisierter Gefäße (Bertoni und Ponzoni 2007, Salaverria *et al.* 2006, Tiemann *et al.* 2005).

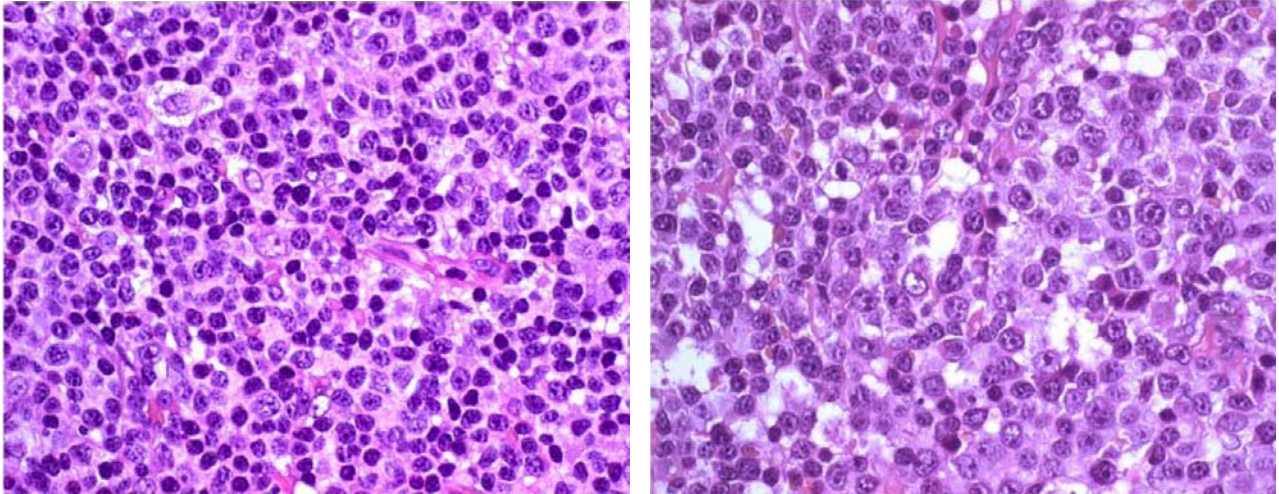


Abbildung 1: Morphologie des klassischen MCL (links) und der blastoiden Variante (rechts).
(Haematoxylin und Eosin – Färbung; 630x Vergrößerung)
Abbildung aus Bertoni and Ponzoni 2007

1.1.2 Molekulare Hintergründe

Auf molekularer Ebene zeichnet sich das MCL durch ectopische Expression von Cyclin D1 in den betroffenen B-Lymphozyten und eine damit verbundene Deregulation des Zellzyklusverlaufs aus. In über 95 % aller Fälle wird MCL durch eine chromosomale Translokation $t(11;14)(q13;q32)$ verursacht, bei der das Cyclin D1-kodierende Gen *CCND1* unter die transkriptionelle Kontrolle des in B-Zellen aktiven Promotors des Immunglobulin (Schwere-Ketten)-Gens kommt. Dennoch zeigen Analysen des JH/bcl-1 Bruchpunkts, dass zumindest die Translokation $t(11;14)(q13;32)$ während eines DH-JH Rearrangements in frühen B-Zellen entsteht. Dies zusammen mit der Tatsache, dass in zwei Dritteln der MCL-Fälle keine oder zumindest nur sehr wenige somatische Mutationen der Immunglobulingene gefunden

werden, deutet darauf hin, dass die Ursprungszelle des MCL eine Prä-Keimzentrumszelle ist (Hummel *et al.* 1994). Das verbliebene Drittel der MCL-Fälle besitzt jedoch somatische Hypermutationen der Immunglobulingene unter bevorzugter Beteiligung der VH₄₋₃₄- und VH₃₋₂₁-Gene, was auf eine Herkunft dieser Tumoren von B-Zellen hinweist, die bereits das folliculäre Keimzentrum durchlaufen haben (Kienle *et al.* 2003, Orchard *et al.* 2003). Die wenigen Cyclin D1-negativen Fälle weisen erhöhte Expressionsraten von Cyclin D2 auf (Fu *et al.* 2005, Gesk *et al.* 2006). Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Deregulation des G1-Zellzykluskontrollpunkts relevant für die Tumorentstehung ist (Fu *et al.* 2005). Die Überexpression dieser Cycline ist jedoch alleine nicht ausreichend, um eine maligne Transformation zu bewirken (Gladden *et al.* 2006). Zusätzliche Sekundärereignisse sind notwendig, um die betroffenen Zellen zu malignem Wachstum zu befähigen. Welche zusätzlichen Veränderungen dabei unabdingbar sind, ist jedoch größtenteils noch unbekannt.

Als wichtigster Faktor von prognostischem Interesse ist der Proliferationsindex der malignen Zellpopulation, d.h. der prozentuale Anteil der KI67-positiven Zellen an der Zellpopulation, zu nennen, wobei höhere Zellteilungsaktivität mit einer ungünstigeren Prognose korreliert ist (Rosenwald *et al.* 2003, Tiemann *et al.* 2005). Ebenfalls Einfluss auf die prognostische Einteilung hat der Expressionsstatus des proapoptotischen Proteins p53, dessen Überexpression häufig mit der blastoiden Variante des MCL assoziiert ist, sowie die normalerweise in T- und NK-Zellen exprimierte Tyrosinkinase ZAP70, die in ungefähr 50 % aller MCL nachgewiesen wurde und ebenfalls mit einer schlechteren Prognose korreliert ist (Rosenwald 2003, Sup *et al.* 2004). Anders als bei der chronisch lymphatischen Leukämie ist jedoch der Hypermutationsstatus der MCL-Zellen kein prognostischer Faktor und ist auch nicht mit der ZAP70-Expression korreliert (Carreras *et al.* 2005, Kienle *et al.* 2003).

Allgemein sind zusätzliche genetische Veränderungen assoziiert mit einem aggressiveren Krankheitsverlauf. Hervorzuheben sind, neben den erwähnten p53-Mutationen *ATM*-Deletionen, p15/p16-Deletionen, p18-Deletionen und p21-Expressionsverlust (Dreyling *et al.* 1997). Diese genetischen Veränderungen haben gemeinsam, dass sie einen der zwei zentralen Regulationswege der Zelle beeinflussen: den Zellzyklus und den programmierten Zelltod (Apoptose). Dabei kooperieren im MCL oft mehrere genetische Veränderungen, um gleichzeitig beide Regulationswegen zu deregulieren (Fernandez *et al.* 2005, Hernandez *et al.* 2005). Bei der blastoiden Variante treten daher oft komplexe Karyotypen auf. Interessanterweise haben cytogenetische Studien gezeigt, dass MCL die häufigsten chromosomalen Veränderungen der Gene aufweist, die zur Tumorprogression beitragen. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass Veränderungen, die die genomische Stabilität und die Kontrolle von Zellzyklusregulation beeinträchtigen, wichtige Schritte in der Pathogenese des MCL sind (Fernandez *et al.* 2005).

1.2 Therapie des Mantelzelllymphom

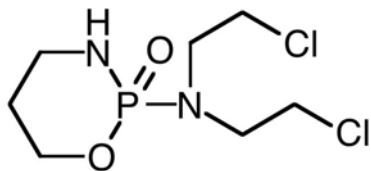
1.2.1 Konventionelle und etablierte Therapieansätze

Klassische Chemotherapie

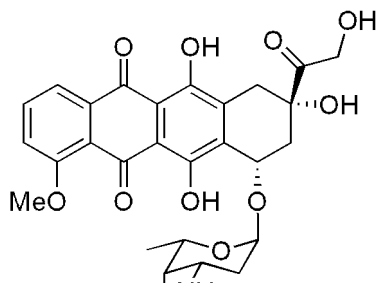
Diese erhöhte Frequenz genetischer Veränderungen von Zellproliferation und des programmierten Zelltodes spiegelt sich auch im klinischen Verlauf der Erkrankung wieder. Lediglich in 10 – 15 % aller Fälle in Frühstadien (Ann-Arbor-Stadien I und II)

können möglicherweise Heilungen erzielt werden, während in den 80% fortgeschrittenen Stadien, nur eine kurzzeitige Remission erreicht werden kann.

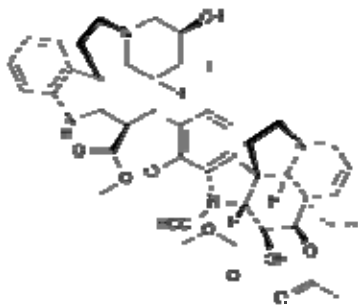
Im Stadium I und II besteht die empfohlene Behandlung aus einer alleinigen Strahlentherapie mit 30-40 Gy oder bei großer Tumormasse aus einer



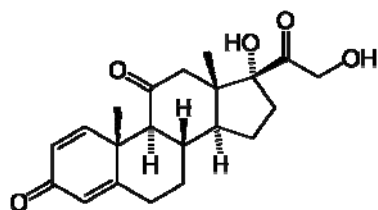
Cyclophosphamid



Hydroxydoxorubicin



Vincristin (Oncovin®)



Prednison

Bestandteile von CHOP

konsolidierenden Strahlentherapie nach initialer

Chemotherapie zur Tumorreduktion (Hiddemann und Dreyling 2003). In den fortgeschrittenen Stadien III-IV ist

CHOP das Standardregime zur Behandlung des MCL,

da in einer retrospektiven Studie eine Verlängerung des

Gesamtüberlebens nach anthrazyklinhaltiger

Chemotherapie beobachtet wurde (Zucca *et al.* 1995).

Eine Ausnahme bilden neudiagnostizierte Patienten, die

jünger als 65 Jahre sind. Für diese Patientengruppe ist

eine myeloablative Konsolidierung mit nachfolgender

autologen Stammzelltransplantation das aktuelle

Standardvorgehen und führte in einer europaweiten

randomisierten Studie zu einem signifikant verlängertem

progressionsfreien Überleben. Dennoch rezidivieren die

meisten Patienten im weiteren Verlauf. Zur Behandlung

des rezidiertem MCL existiert nur eine potentiell

kurative Methode: die allogene

Knochenmarkstransplantation, die bei frühzeitigem

Einsatz ein krankheitsfreies 4-Jahresüberleben von 80%

erreichen kann (Dreyling *et al.* 2005, Dreyling *et al.*

2007, Khouri *et al.* 2003). Die allogene

Knochenmarkstransplantation ist jedoch insbesondere bei älteren, zum Teil stark vorbehandelten Patienten mit schweren Nebenwirkungen verbunden, so dass fast alle Patienten mit chemotherapieresistenter MCL in einer anderen Studie innerhalb des ersten Jahres verstarben (Robinson *et al.* 2002). Daher werden in verschiedenen Studien weitere Therapieansätze untersucht. Viel versprechend erscheint hier insbesondere der Ansatz der dosisintensivierten Chemotherapie mit Hochdosis-Cytarabin (Ara-C) (Lefrere *et al.* 2004, Romaguera *et al.* 2005), die jedoch ebenfalls eine relativ hohe therapieassoziierte Morbidität aufweist. Auch Purinanaloga erzielen als Monotherapie nur moderate Ansprechraten; Sie tragen jedoch in Kombinationsansätzen mit Alkylantien und Anthrazyklinen zu deutlich erhöhten Remissionsraten bei (Cohen *et al.* 2001).

Rituximab - Antikörpertherapie

Ein neues, zugelassenes Therapieprinzip stellt die Antikörpertherapie mit dem rekombinant hergestellten, monoklonalen Anti-CD20-Antikörper Rituximab dar. Obwohl der Erfolg der Rituximabmonotherapie mit Remissionsraten von bis zu 28 % (Ghielmini *et al.* 2005) nur moderat ist, konnte in *in vitro*-Experimenten ein Synergismus mit konventionellen Chemotherapeutika gezeigt werden. Auf dieser Basis wurde auch in klinischen Studien nachgewiesen, dass eine Kombination des CHOP-Regimes mit dem Anti-CD20-Antikörper (R-CHOP) zu einer signifikanten Erhöhung der Ansprechraten und einer Verlängerung der rezidivfreien Zeit im Vergleich zu alleiniger CHOP-Therapie führt (Hiddemann und Dreyling 2003, Howard *et al.* 2002, Lenz *et al.* 2005). Dies bestätigte sich auch für das rezidierte/refraktäre MCL (Forstpointner *et al.* 2004). Die Metaanalyse dieser Studien ergab einen deutlichen Vorteil der Immunchemotherapie gegenüber konventionellen

Chemotherapien im Ansprechen, der Krankheitsprogression und dem Gesamtüberleben (Schulz *et al.* 2007). Daher ist Rituximab unter dem Namen MabThera® (Roche Pharma) eine der ersten molekular ausgerichteten Therapien, die heute in der klinischen Behandlung des MCL eingesetzt wird.

1.2.2 Gezielte molekulare Therapien

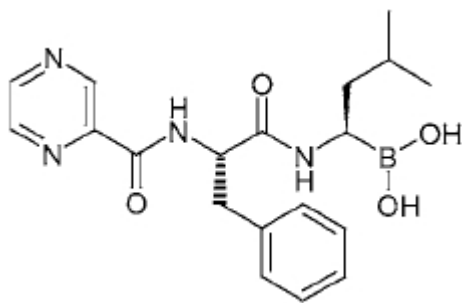
Allgemeine Hintergründe

Im Gegensatz zu den konventionellen Chemotherapien, die unspezifisch alle rasch teilenden Zellen schädigen, versteht man unter einer molekular ausgerichteten Therapie die Behandlung einer Erkrankung durch gezielten Eingriff in die gestörten, molekularen Signalwege, um die Fehlregulierung der malignen Zellen zu kompensieren. In den meisten Fällen führt dies zu einer Reaktivierung des in den malignen Zellen unterdrückten programmierten Zelltods (Apoptose). Als Zielstrukturen für diese Therapieformen werden im Allgemeinen Moleküle ausgewählt, deren Expression spezifisch für die Tumorzelle ist, so dass normale, sich teilende Zellen kaum in Mitleidenschaft gezogen werden. Dadurch weisen solche gezielten molekularen Therapien weniger Nebenwirkungen als konventionelle Zytostatika auf. Die Wirkung kann dabei entweder über relativ unspezifische Eingriffe in die zellulären Signaltransduktionswege ausgelöst werden oder spezifisch einer molekularen Veränderung der neoplastischen Zelle entgegenwirken. Beide Strategien besitzen Vor- und Nachteile. Insbesondere kann ein stark fokussierter Therapieansatz durch redundante zelluläre Signale und alternative Signalpfade stark in seiner Wirksamkeit eingeschränkt sein. So lassen sich z.B. ein Teil der Resistenzen, die gegen anti-EGFR-Therapien wie Cetuximab auftreten, auf die

Aktivierung der nachfolgenden Signalkaskaden durch alternative Tyrosinkinase-Rezeptoren oder die aberrante konstitutive Aktivierung dieser nachgeschalteten Signalkaskaden zurückführen (Camp *et al.* 2005).

Bei breiter wirksamen Behandlungsregime steigt die Gefahr von Nebenwirkungen durch die Adressierung unspezifischerer Zielmoleküle, da hier wie auch bei der konventionellen Zytostatika – Therapie, gesunde Zellen des Patienten betroffen sind. Im Gegensatz dazu sind jedoch unspezifischere Zielmoleküle, die einen Großteil der zellulären Signalwege, und im Idealfall diese auf verschiedenen Ebenen, beeinflussen, weniger anfällig für Resistenzmechanismen durch redundante Aktivierungswege.

Bortezomib und die Biologie des Proteasoms



Bortezomib

aus Voorhees und Orlowski 2006

Neben der zugelassenen Antikörpertherapie mit Rituximab werden auch andere, molekular gezielte Medikamente im Rahmen klinischer Studien getestet. Zu diesen Medikamenten gehört auch Bortezomib, ein Inhibitor der katalytischen 20s-Untereinheit des

menschlichen Proteasoms, der zur Behandlung des rezidierten multiplen Myeloms und in USA (FDA Zulassung Februar 2007) nach einer ‚fast track approval‘ auch für rezidierte und refraktäre MCL zugelassen ist, nachdem der Wirkstoff im Rahmen mehrerer Phase-II-Studien seine Wirksamkeit unter Beweis gestellt hatte (Nencioni *et al.* 2007). Das dipeptidische Borsäurederivat Bortezomib (Adams *et al.* 1998) inhibiert reversibel die chymotrypsinartige Aktivität des Proteasoms und beeinflusst dadurch

alle proteasomal regulierten zellulären Proteine. Interessanterweise weisen Tumorzellen eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber der Störung des zellulären Proteinabbaus auf, so dass sie sich im Gegensatz zu den gesunden Körperzellen des Patienten während der turnusmäßigen Therapiepausen nicht erholen können (Drexler 1997, Lopes *et al.* 1997). Während bekannt ist, dass die Inhibition des proteasomalen Abbaus Auswirkungen auf Zellzyklus, Angiogenese und Apoptose besitzt, sind die genauen Wirkmechanismen, die für das Ansprechen der neoplastischen Zellen nach Bortezomibgabe verantwortlich sind, noch weitgehend unbekannt.

Einer der Hauptgründe dafür ist, dass die Ubiquitin - gesteuerte proteasomale Degradation eine zentrale Rolle in der Regulierung der meisten zellulären Proteine besitzt. Dabei werden einerseits fehlgefaltete oder potentiell toxische Proteine in der Zelle abgebaut, andererseits werden durch kontrollierte Proteolyse die Spiegel wichtiger Regulatoren der Apoptose und des Zellzyklus aufrechterhalten, die für eine schnelle zelluläre Antwort auf schädigende Einflüsse notwendig sind (Glickman und Adir 2004).

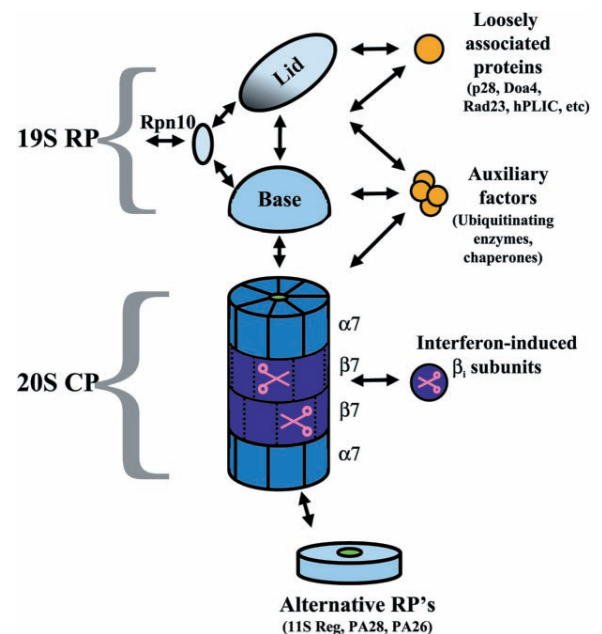


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Struktur des Proteasomenkomplexes

Schema aus Glickman und Ciechanover 2002

Der grundlegende Aufbau des Proteasoms ist in allen Eukaryoten konserviert (Abbildung 2). Der 26s Proteasom - Komplex ist aus zwei Unterkomplexen aufgebaut. Der zentrale 20s Kernkomplex besteht aus vier heptamerisch-ringförmigen Untereinheiten, von denen je 2 vom Typ Alpha bzw. vom Typ Beta sind. Diese bilden zusammen einen zylindrischen Multiproteinkomplex, in dessen geschützten Inneren sich die von den beta-Untereinheiten gebildete proteolytische Kammer befindet. An beiden Enden des 20s Kernkomplex bilden die alpha-Untereinheiten Vorkammern, die den Durchgang von Substraten und Peptiden durch die proteolytische Zentralkammer steuern. Zum Abbau der ubiquitinylierten Substrate ist jedoch zusätzlich die Anlagerung des ‚19s-Komplexes‘ an der Oberfläche der alpha-Untereinheiten des 20s-Komplexes notwendig. Der ‚19s- regulatorische Komplex‘ besteht aus einer Basis aus sechs ATPase-tragenden und drei nicht-ATPase – Untereinheiten sowie einer Abdeckung aus acht Untereinheiten, zu denen noch weitere, nicht essentielle oder auch Spezies-spezifische Einheiten kommen können. Dieser grundlegende Aufbau kann durch den Austausch eines der 19s-Komplexe durch einen von drei alternativen regulatorischen Einheiten ohne ATPase-Aktivität in einer Untergruppe der Proteasomenkomplexe weiter diversifiziert werden, wobei die genaue Funktion dieser alternativen Komplexe noch nicht bekannt ist (Glickman und Raveh 2005). Dieser Multiproteinkomplex durchläuft während seines Zusammenbaus weitere Reifungsschritte, wobei interessanterweise Reifungsfaktoren verwendet werden, die auch eine herausragende Rolle in der Ribosom-Biogenese besitzen, wie z.B. die Proteine Nob1, Pno1/Dim2 oder Cic1/Nsa3. Daneben assoziieren Ribosom und Proteasom auch beide mit einer Reihe von ‚HEAT repeat‘ – Proteinen (Noc1-4, Rrp12 und Rrp15), die eine Rolle bei nukleären Exportprozessen des Ribosoms spielen. Dies legt eine Verbindung von ribosomalen und

proteasomalen Prozessen nahe, was durch die Beobachtung unterstützt wird, dass das Proteasom mit RNase-Aktivität assoziiert ist (Gautier-Bert *et al.* 2003). Des Weiteren wird die Funktion des Proteasomenkomplexes zusätzlich durch seine zelluläre Lokalisation (Wojcik und DeMartino 2003), dynamische posttranslationale Modifikationen (Phosphorylierung, Glykosylierung, Spaltung von Untereinheiten des Proteasoms durch Caspasen) (Sato *et al.* 2001, Sumegi *et al.* 2003, Sun *et al.* 2004) und zusätzliche interagierende Proteine (E3 Ubiquitin-Ligasen, Polyubiquitin-bindende Proteine und deubiquitinierende Enzyme) (Amerik und Hochstrasser 2004, Leggett *et al.* 2002, Tongaonkar *et al.* 2000, Verma *et al.* 2004) beeinflusst.

Diese komplexen Regelungsmechanismen erlauben es den Proteasomen, die Homöostase etwa 80% aller zellulären Proteine durch gezielten Abbau zu kontrollieren (Rock *et al.* 1994). Daraus folgt auch, dass Proteasomen-Inhibitoren wie Bortezomib eine Vielzahl biologischer Prozesse beeinflussen, die der beobachteten Anti-Tumor-Wirkung zugrunde liegen können. Als erstes fiel das Augenmerk hier auf die Herunterregulierung des NF κ B-Signalwegs, der eine zentrale Rolle in der zellulären Kontrolle von Zellproliferation und Apoptose in neoplastischen Zellen, aber auch bei der Metastasenbildung, Tumorzellinfiltrationen sowie bei der Angiogenese spielt (Orlowski und Baldwin 2002) (Abbildung 3).

Physiologisch liegt NF κ B cytoplasmatisch an seinen Inhibitor I κ B gebunden vor. Nur nach phosphorylierungsgesteuerter Polyubiquitinylierung und proteasomalem Abbau von I κ B wechselt NF κ B in den Zellkern und kann als Transkriptionsfaktor wirken. Das Ausschalten des proteasomalen Proteinabbaus durch Proteasomen-Inhibitoren führt in diesem Signalweg dazu, dass I κ B in den Zellen erhalten und an NF κ B gebunden bleibt, wodurch NF κ B im Zytoplasma lokalisiert verbleibt und nicht als Transkriptionsfaktor wirken kann (Traenckner *et al.* 1994). Proteasomenhemmung kann durch den NF κ B-Signalweg direkt zum programmierten Zelltod führen (Ni *et al.*

2001, Sunwoo *et al.* 2001), beim MCL scheint dieser Signalweg jedoch eher im Zusammenhang mit einer Sensitivierung der Tumorzellen gegenüber anderen Therapeutika und dem Überwinden von Therapieresistenzen zu stehen, da er unter anderem eine entscheidende Rolle bei induzierter Chemoresistenz spielt (Wang *et al.* 1996). Im Gegensatz dazu scheint der direkte Einfluss der Proteasomenhemmung auf die zellulären NF κ B-Spiegel gering zu sein, da zwei von drei untersuchten MCL-Zelllinien und sechs von sieben untersuchten Patientenproben unveränderte oder sogar steigende NF κ B-Spiegel nach Bortezomib-Behandlung zeigten (Yang, Young, Kahl, Miyamoto; unpubliziert; American MCL study group; Abstract-Band 2007).

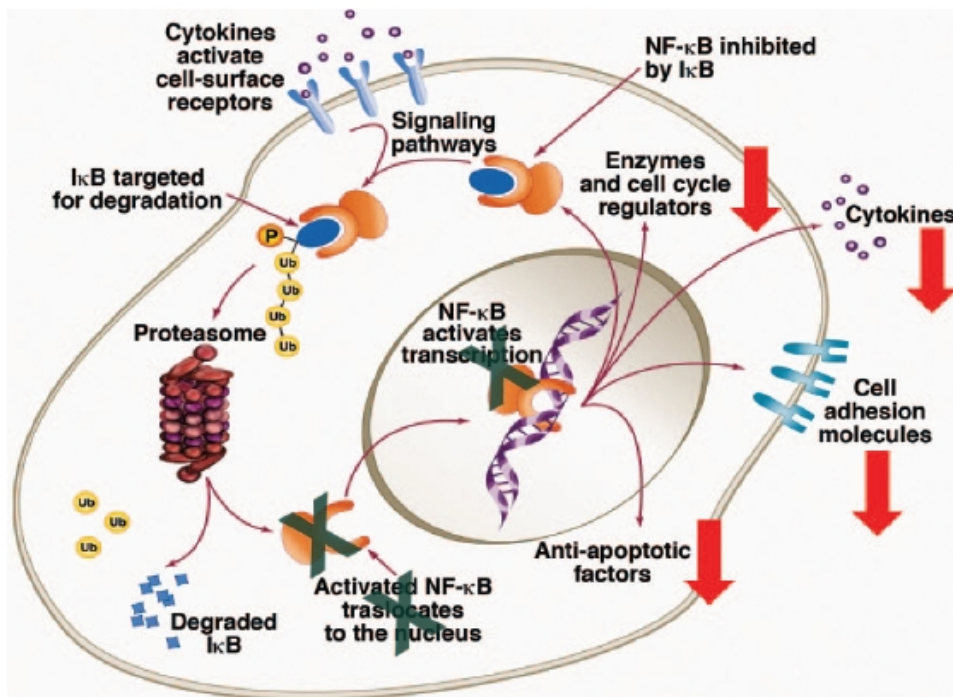


Abbildung 3: Einfluss der Proteasomenhemmung auf verschiedene zelluläre Systeme
Abbildung aus Armand *et al.* 2007

Die Modifikation des NF κ B-Signalwegs ist aber nur einer von mehreren Wirkmechanismen der Proteasomenhemmung (Nencioni *et al.* 2007). So induzierte Bortezomib in CLL- und Lymphom- Zellen, aber auch in soliden Tumoren Apoptose

ohne NF κ B-Inhibition (Kurland und Meyn 2001, Zhu *et al.* 2005). Ein weiterer Mechanismus, der zur Apoptose führt, wird über den c-Jun N-terminale Kinase (JNK)-Signalweg geleitet (Abbildung 4). Aktiviertes JNK löst dabei die Freisetzung von mitochondrialem Cytochrom c aus, indem es durch die Phosphorylierung von 14-3-3-Proteinen eine gesteuerte Verlagerung von Bax, eines proapoptotischen Mitglieds der Bcl-2 Proteinfamilie, an die Mitochondrien initiiert (Tsuruta *et al.* 2004). Durch Proteasomen-Inhibition konnte die JNK-Aktivierung in mehreren Modellsystemen aufrechterhalten werden, wobei eine JNK-Inhibition die Apoptose wieder blockieren konnte. Auch andere proapoptotische Mitglieder der Bcl-2 Proteinfamilie, wie z.B. Bid und Bim, werden durch proteasomale Degradation reguliert (Nikrad *et al.* 2005).

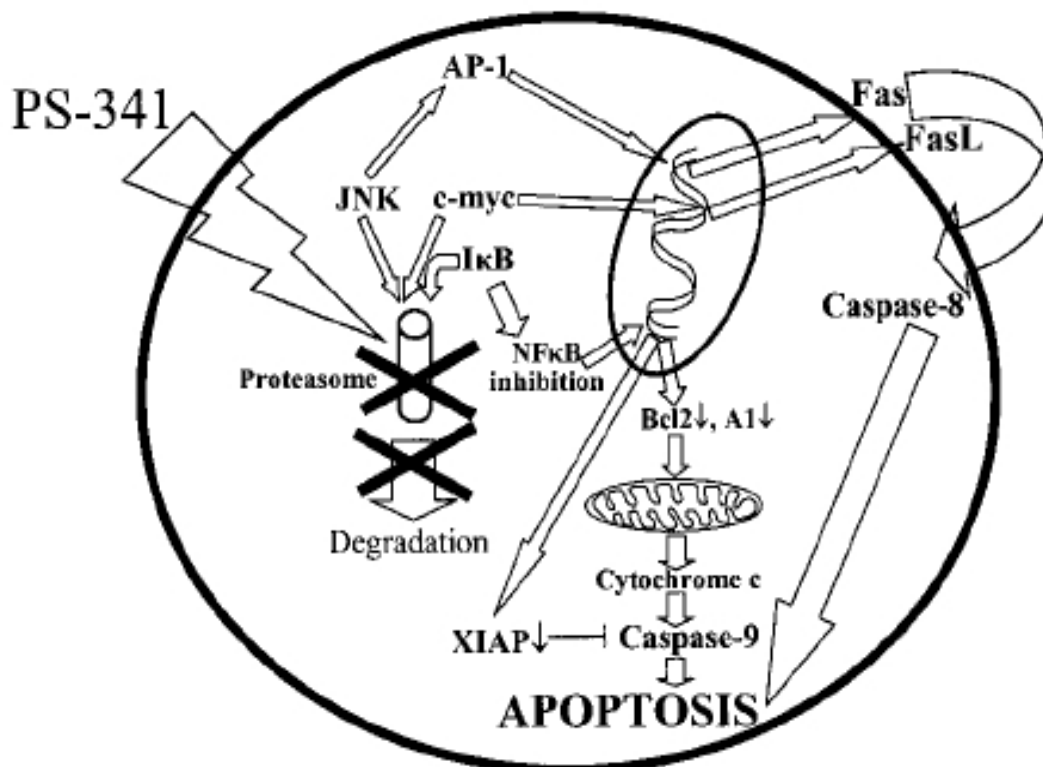


Abbildung 4: Apoptose-Induktion durch Bortezomib (PS-341)

Abbildung aus Mitsiades *et al.* 2002

Auch der Tumorsuppressor p53 wird durch proteasomalen Abbau reguliert, wobei aber Proteasomen-Inhibitoren auch p53-unabhängig den programmierten Zelltod auslösen können (Delic *et al.* 1998, Lopes *et al.* 1997). Proteasomenhemmung führt auch hier zu einer Stabilisierung und Akkumulation des Proteins (Adams 2004a, Adams 2004b). Insbesondere beim MCL ist aber die p53-vermittelte Apoptose häufig durch verschiedene genomische Veränderungen beeinträchtigt, so dass dieser Mechanismus für die Aktivität von Proteasomen-Inhibitoren bei dieser Erkrankung wahrscheinlich eine untergeordnete Rolle spielt (Perez-Galan *et al.* 2006). Vielmehr wird in dieser Studie nachgewiesen, dass im MCL die Apoptose durch die Erzeugung reaktiver Sauerstoff-Spezies und Noxa-Aktivierung induziert wird.

Ein anderes Protein, dessen Expression in verschiedenen Tumorerkrankungen, darunter auch MCL (Chiarle *et al.* 2000) zusammen mit p53 eine entscheidende prognostische Bedeutung zugesprochen wird, ist p27^{KIP}. Dieses Protein gehört zur cdc25-Proteinfamilie und ist ein zellulärer Hemmstoff der Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK), der durch Bindung an CDK-Komplexe einen G₁-S Zellzyklusarrest auslösen kann. Die Hemmung des Proteinabbaus hat eine Erhöhung der p27^{KIP}-Spiegel zur Folge (Hideshima *et al.* 2001), deren Apoptose-auslösender Effekt durch Antisense-p27-Oligonukleotide entgegengewirkt werden kann. Dies belegt die Apoptose-Induktion durch gesteigerten p27^{KIP}-Spiegel nach Proteasomen-Inhibition. Auch die Stabilität von p21^{WAF1}, einem anderen Mitglied der cdc25 – Proteinfamilie, wird während des Zellzyklus durch Proteasomenhemmung beeinträchtigt (Adams 2004a, Adams 2004b). Durch die gleichzeitige Stabilisierung von c-Myc und JNK sowie die erhöhte Phosphorylierungsrate von c-Jun und die vermehrte DNA-Bindungsaktivität des Transkriptionsfaktors AP-1 aktivieren Proteasomen-Inhibitoren ebenfalls die Fas/Fas-Ligand gesteuerte Apoptose (Mitsiades *et al.* 2002). Zusätzlich häufen sich

dabei im endoplasmatischen Reticulum (ER) der betroffenen Zellen fehlgefaltete Proteine an, die durch die Aktivierung der ‚ungefaltete Protein‘ – Signalkaskade zu Apoptose führen können (Rutkowski und Kaufman 2004). Insbesondere konnte gezeigt werden, dass durch proteasomale Hemmung ein ER-Stress ausgelöst werden kann (Fribley *et al.* 2004). Dabei wird durch die Proteasomenhemmung aber gleichzeitig die ‚ungefaltete Protein‘ – Reaktion herunterreguliert, da proteasomale Prozesse zur Aktivierung der ER Endoribonuklease/Kinase IRE1 α notwendig sind. Dieses Enzym ist für die Herstellung der aktiven, gespleißten Form des Transkriptionsfaktors XBP-1 verantwortlich, der wiederum zur Transkription für die ‚ungefaltete Protein‘ – Reaktion kritischer Proteine notwendig ist (Lee *et al.* 2003).

Bei der sensibilisierenden Wirkung der Proteasomenhemmung spielen auch noch weitere Mechanismen eine Rolle. So ist die Empfindlichkeit von Tumorzellen gegenüber DNA-schädigenden Agenzien nach Proteasomenhemmung erhöht, da die Transkription von Genen des DNA-Reparatursystems inhibiert wird (Mitsiades *et al.* 2003). Die Wirkung von Anthrazyklinen, Vincaalkaloiden und Epipodophyllotoxinen wird durch Proteasomenhemmung verstärkt, indem die Reifung des P-Glykoproteins, einer zellulären Effluxpumpe, blockiert wird, so dass unreife P-Glykoproteine mit eingeschränkter Transportfunktion in den Zellen akkumulieren. Das P-Glykoprotein spielt eine wichtige Rolle bei der intrazellulären Entgiftung und kann bei Überexpression eine Chemotherapieresistenz auslösen (Ambudkar *et al.* 2003).

Auch die Deregulierung des vom Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)-ähnlichen Apoptose – induzierenden Liganden (TRAIL) gesteuerten, proapoptotischen Signalwegs trägt zu einer Chemosensibilisierung durch Proteasomenhemmung bei (Leverkus *et al.* 2003, Sayers *et al.* 2003).

Allerdings hat die Proteasomenhemmung nicht nur proapoptotische Wirkungen, sondern es werden ebenfalls antiapoptotische Signalkaskaden aktiviert. Hier hat

insbesondere die Familie der Hitzeschockproteine (HSP) große Bedeutung, die durch Proteasomenhemmung hochreguliert werden und Apoptose-Resistenz vermitteln (Beere 2004, Zhou *et al.* 1996). Ein zweiter antiapoptotischer Signalweg wird durch die Mitogen-Aktivierte-Proteinkinase(MAPK)-Phosphatase-1 vermittelt, die durch Proteasomenhemmung ebenfalls hochreguliert wird und JNK durch Dephosphorylierung deaktiviert (Orlowski *et al.* 2002). In beiden Fällen kann die Apoptose-Aktivität durch spezifische Hemmung der betroffenen Proteine wiederhergestellt werden (Mimnaugh *et al.* 2004, Robertson *et al.* 1999, Small *et al.* 2004).

2. Zielsetzung

Die Therapieoptionen des MCL sind trotz deutlicher Fortschritte durch innovative, neue Ansätze noch immer äußerst begrenzt. Weitere Verbesserungen der Behandelbarkeit dieser Erkrankung versprechen insbesondere neue molekular ausgerichtete Therapieansätze, die in den Stoffwechsel der maligne veränderten Zellen eingreifen und ihre Wirkung gezielt in der Tumorzelle entfalten. Dabei richten sich diese Medikamente gegen die Moleküle, deren Vorhandensein zur malignen Transformation beiträgt und ihnen die notwendigen Überlebensvorteile verschafft, und z.B. die zellulären Regulationsmechanismen wie die DNA-Reparatur oder insbesondere die Kontrolle der Apoptose betreffen. Diese Wirkung wird erreicht, ohne das Transkriptom der betroffenen Zellen zu beeinflussen. Die Effekte dieser neuen therapeutischen Substanzen spiegeln sich daher auch nur eingeschränkt auf der Ebene der Transkription wieder, die häufig zur Untersuchung der Expressionsspiegel herangezogen wird.

Das Ziel dieser Arbeit war nun die Etablierung eines standardisierten Systems zur vergleichenden Analyse zellulärer Proteinspiegel in mehreren Proben, um z.B. deren molekulare Veränderungen nach einer Behandlung mit Zytostatika oder molekularen Substanzen zu beobachten.

Als Basismethode wurde dazu die zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2D-PAGE) mit einer anschließenden massenspektroskopischen Proteinidentifikation gewählt, da diese Methode Rückschlüsse auf bisher unbekannte Interaktionen zulässt und auch die Untersuchung noch unbekannter Proteine erlaubt.

Um diese probenintensive Methodik auch bei primären Patientenproben anwenden zu können, wurde darüber hinaus die Möglichkeit einer Probensammlung („Pooling“) getestet. Dazu wurden jeweils drei Zellkulturen eines NHL-Subtyps sowohl miteinander als auch mit einem „Pool“ der drei Kulturen verglichen und anhand der „Pools“ die Proteinexpressions-Unterschiede von folliculären Lymphomen (FL) und Mantelzelllymphomen (MCL) analysiert.

Nach der Etablierung der 2D-PAGE-Analyse wurde dieses System angewendet, um das Proteom von 5 MCL-Zelllinien nach Bortezomib-Behandlung zu untersuchen und möglichst frühe Veränderungen der zellulären Proteinspiegel aufgrund der Proteasomenhemmung zu identifizieren. Bortezomib als Inhibitor des proteasomalen Abbaus stellt dabei das Paradigma eines Wirkmechanismus dar, dessen primärer Effekt direkt die Proteinebene betrifft und der die Regulationsebene der Transkription nur indirekt beeinflusst.

In diesem Kontext sollten zudem Informationen über die primäre Wirkung von Bortezomib in den behandelten Zellen erlangt werden, da aufgrund der zentralen Rolle des Proteasomenkomplexes in der Regulation einer Vielzahl von Signalwegen verschiedene Mechanismen der Apoptoseinduktion möglich sind.

3. Material & Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

<u>Hersteller</u>	<u>Gerät</u>
Amersham Biosciences (GE Healthcare Europe GmbH) München, Deutschland	Ettan™ IPGphor™
Applied Biosystems, Foster City, USA	ABI Prism™ 310 Genetic Analyzer GeneAmp® 9700 PCR System 4700 Proteomics Discovery System with Mascot™
BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH Sonnenbühl-Genkingen, Deutschland	Laminar-Flow Sicherheitswerkbänke Klasse II (nach EN 12469 Typ BDK-SK)
Becton Dickinson GmbH (Biosciences) Heidelberg, Deutschland	FACS Calibur
Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland	PowerPac 300 PowerPac 1000 Mini-Protean II Elektrophorese System Protean II xl System für 2D-PAGE
BRAND GMBH + CO KG Wertheim, Deutschland	Accu-jet® Pipetierhelfer
Bruker Daltonics Inc., Bremen, Deutschland	Bruker Reflex III matrix-assisted laser desorption / ionization – time-of-flight (MALDI-TOF) MS
Gilson, Inc. Middleton, WI, USA	Pipetman® P (2, 20, 200, 1000)
Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG Eberstadt, Deutschland	pipetus standard
Molecular Devices Corporation Sunnyvale, CA, USA	Optimax pro microplate reader
W. C. Heraeus GmbH, Hanau, Deutschland	Begasungsbrutschrank (System B 5061 CO ₂ -Auto-Zero)

3.1.2 Biologisches Material

Zelllinien

Alle Zelllinien wurden kommerziell erworben (American Type Culture Collection (ATCC) - LGC Promochem GmbH, Wesel Deutschland; Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Braunschweig, Deutschland) oder direkt von den erstbeschreibenden Wissenschaftlern für diese Arbeit freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Alle verwendeten Zelllinien sind gut charakterisiert. Die nachfolgenden Informationen wurden dem *Leukemia – Lymphoma Cell Line Facts Book* (Drexler 2000), bzw. dessen elektronischen erweiterten Neuauflage aus dem Jahr 2005 entnommen.

<u>Zelllinie</u>	<u>Charakterisierung</u>	<u>Karyotyp</u>	<u>Erstbeschreibung</u>
DoHH-2	B-NHL (FL) (follicular centroblastic/centrocytic) Pleuraleffusion Mann (60 Jahre) (1990)	47(43-48), $\lt 2n \gt$ XY, +7, der(8)t(8;18)(q24;q21), der(14)t(8;14)(q24;q32), der(18) t(14;18)(q32;q21)	(Kluin-Nelemans <i>et al.</i> 1991)
Granta 519	B-NHL (MCL) (leukemic transformation of MCL) peripheral blood Frau (58 Jahre) (1991)	hypodiploid, 8% polyploidy; 44(39-44) $\lt 2n \gt$ XX, -12, -17, -18, +mar, add(1)(p22), del(3)(p14p23), i(8p), i(8q), add(9)(p22)x1-2, t(11;14)(q13;q32), add(13)(p12), add(18)(q21); side-line with two copies of der(14) and der(9)	(Rudolph <i>et al.</i> 2004)
HBL-2	B-NHL (MCL) (diffuse large cell) lymph node Mann (84 Jahre) (1985)	46, X, -Y, +7, der(?)t(3;?)(p13;?), der(4)t(1;4)(q21;p15.2), t(11;6;9)(q11;p23q21;p22), add(8)(p23), der(9)t(3;9)(q21;p22), del(9)(q32), add(11)(q23), der(11) t(?;11;14)(?;q13;q32), add(13)(q23), der(14)t(11;14)(q12.2;q32.3), t(11;14)(q32.3;q15), add(15)(p12), add(17)(p13), add(18)(q23), der(22)t(9;22)(q11;p12)	(Abe <i>et al.</i> 1988)

Jeko-1	B-NHL (MCL) (mantle cell lymphoma, large cell variant in leukemic conversion) peripheral blood Frau (78 Jahre) (1998?)	highly rearranged flat-moded hypertriploid; 70-78<3n>XXXX, +X, +1, +2, +2, +4, +6, +7, -8, +10, +11, -12, -12, +13, +14, +15, -17, +18, -19, -19, -22, +2-4mar, del(X)(p21)/add(X)(p11.2)x2, der(X)t(X;11)(q26-28;q13)t(11;?10)(q24;?p12), der(1) t(1;2)(p21;q22)x2, add(2)(q2?), del(2)(q11), add(3)(q27), der(5)t(5;12) (p15;p11-12)x2, add(6)(p21)x2, der(6;13)(p10;q10)x1-2, der(7)t(4;7)(q2?6;q32.1)x2, add(9)(p2?), der(9)t(9;14)(q34-35;q32-33)x2, der(10)t(10;11) (p12;?)x2, der(11)t(11;14)(q13;q32)x1-2, add(13)(p11), der(13)t(13;?) (p11;?)t(13;?) (q11), add(14)(p11), der(14)t(14;17)(p12;q11)t(14;6)(q24;?p11), der(14)t(11;14)(?;p11)t(11;?8)(?;?), del(16)(p11), add(17)(p11), ins(19;12)(q13.1;q13.2q2?4)x2	(Jeon <i>et al.</i> 1998)
Jurkat	ALL peripheral blood Mann (14 Jahre) (1976)	flat-moded hypotetraploid with 8% polypoidy; 87(78-91)<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)	Schneider U <i>et al.</i> , Int J Cancer 19: 621-626 (1977).
JVM-2	B-PLL (MCL) peripheral blood Frau (63 Jahre) (1984)	pseudodiploid, 1.8% polypoidy; 46(42-46)<2n>XX, t(1;15)(q32.3;q22.1), der(8)t(3;8)(q13;p21), t(11;14)(q13;q32), dup(16) (p11p13.2)	(Melo <i>et al.</i> 1986)
Karpas422	B-NHL (FL) (intraabdominal; diffuse large cell) pleural effusion Frau (73 Jahre) (1987)	hyperdiploid, 10% polypoidy; 47(44-48)<2n>XX, +14, t(2;10)(p23;q22), t(4;11)(q21;q24), t(4;16)(q21;p13), der(14)t(14;18)(q32;q21)x2	(Dyer <i>et al.</i> 1990)
NCEB-1	B-NHL (MCL) (diffuse centroblastic-centrocytic) peripheral blood Mann (57 Jahre) (1987)	43, X, -Y, -12, -15, -17, +mar, der(5)t(5;12)(p14;q12), der(8)t(8;?) (p11.2;?), t(9;?;13)(q32;?;q14), der(10)t(10;15)(q24;q15), t(11;14)(q13;q32)	(Saltman <i>et al.</i> 1988)
Rec-1	B-NHL (MCL) (diffuse large cell transformed mantle cell, blastoid variant) lymph node or peripheral blood? Mann (67 Jahre) (1987)	highly rearranged flat-moded near-diploid karyotype with 25% polypoidy; 41-47<2n>XY/XXY, -2, -8, +11, +12, -13, -22, add(5)(p15), i(7q), add(9)(p22), der(9)t(9;17)(q3?1;q11-12), add(10)(q24-q25), add(11)(q11), t(11;14)(q13;q32), add(12)(q22), der(12)t(8;12)(q11;p12), der(12)t(12;16)(p11;p11), der(16)t(16;17)(p11;?q25)t(2;16)(p1?2;q2?1), der(16)t(16;22)(p13;q11), add(17)(q25)x2; near tetraploid sideline with additional rearrangements present	(Prod'homme <i>et al.</i> 2004)
WSU-NHL	B-NHL (FL) (nodular histiocytic, follicular, large cell) pleural effusion Frau (48 Jahre) (1986)	hypodiploid, 6% polypoidy; 45(42-45)<2n>XX, -4, -15, +mar, der(1)t(1;4)(p36;q11), der(1)t(1;?7)(p34;q31.2)t(1;16)(q22;q22), del(5)(q32q35), der(6)t(1;6)(q22;p21), t(9;13)(p22;q13-14), der(13)t(13;?16)(p11;p11), t(14;18)(q32;q21), der(16)t(16;?) (q22;?)t(1;5)(?;q31), add(17)(p1?), add(19)(q13.2)	(Mohamed und al-Katib 1988)

Charakterisierung des Patientenmaterials

Die verwendeten primären MCL-Zellen wurden aus der Pleuraleffusionsflüssigkeit eines 61jährigen männlichen Patienten mit refraktärem, t(11;14)(q13;q32) – positiven MCL durch Dichtegradienten - Zentrifugation gewonnen. Die MCL-Zellen besitzen Deletionen der Gene *ATM* und *TP53*.

3.1.3 Verbrauchsmaterial & Chemikalien

Allgemeine Bemerkung

Falls nicht anders angegeben wurden alle Chemikalien von Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland), Serva (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland), Merck (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) oder Roth (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

Zellkulturmedien

Roswell-Park-Memorial-Institute 1640 (RPMI1640) Medium und alle benötigten Medienzusätze wurden von PAN-Biotech (PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland) bezogen.

Oligonukleotide

Alle als PCR-Primer eingesetzten Oligonukleotide wurden von der Metabion GmbH (Martinsried, Deutschland) bezogen.

HRV-Zellidentitätstest:

mtReg-F1: 5'-TCCACCATTAGCACCCAAAGC-3'

mtReg-R1: 5'-TCGGATACAGTTCACCTTAGC-3'

mtReg-F2: 5'-GGTCTATCACCTATTAACCAC-3'

mtReg-R2: 5'-CTGTTAAAAGTGCATACCGCC-3'

mtReg-F3: 5'-CGCACCTACGTTCAATATTAC-3'

mtReg-R3: 5'-GGGTGATGTGAGCCCGTCTAA-3'

Mycoplasmentest:

MycF: 5'-GGCGAATGGGTGAGTAACACG-3'

MycR: 5'-CGGATAACGCTTGCGACCTAT-3'

Enzyme

<u>Hersteller</u>	<u>Enzym</u>
Perkin Elmer LAS (Germany) GmbH, Rodgau-Jügesheim, Deutschland	AmpliTaq Gold® Taq Polymerase
Promega GmbH Mannheim, Deutschland	Trypsin, sequencing grade

Fertigreagensysteme und spezielle Reagenzien (Kits)

<u>Hersteller</u>	<u>Reagenssystem</u>
Affymetrix Inc., Santa Clara, USA	HG-U133A GeneChip
Amersham Biosciences (GE Healthcare Europe GmbH) München, Deutschland	IPG-Strip pH3-10, 18cm IPG-Buffer pH3-10
BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Deutschland	Annexin V-PE Apoptosis Detection Kit I
Biochrom AG, Berlin, Deutschland	Biocoll Solution
Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland	SeeBlue® Plus2 Prestained Standard
Macherey-Nagel GmbH & Co.KG, Düren, Deutschland	NuceloSpin® Blood Quick Pure
Perkin Elmer LAS (Germany) GmbH, Rodgau-Jügesheim, Deutschland	AmpliTaq Gold® Taq Polymerase ABI Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit
Qiagen, Hilden, Deutschland	Qiagen RNeasy Kit
Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland	WST1-Cell Proliferation Assay
Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland	IPG Blue Strips pH3-10, 18cm

Gele und Puffer

SDS-PAGE Gele

SDS-PAGE Trenngel für Western Blot	SDS (20% w/v)	75 µl
	Tris-HCl pH8,8 (1M)	5,6 ml
	Acrylamid-Lösung (40%)	4,3 ml
	Bisacrylamid-Lösung (2%)	1 ml
	Aqua purificata	ad. 16 ml
	APS	125 µl
	TEMED	5 µl
SDS-PAGE Sammelgel für Western Blot	SDS (20% w/v)	40 µl
	Tris-HCl pH6,6 (1M)	500 µl
	Acrylamid-Lösung (40%)	550 µl
	Bisacrylamid-Lösung (2%)	100 µl
	Aqua purificata	4 ml
	APS	30 µl
	TEMED	1,2 µl
SDS-PAGE Gel für 2D-PAGE (12%) (2. Dimension)	SDS (20% w/v)	400 µl
	Tris-HCl pH8,8 (1M)	29,76 ml
	Acrylamid-Lösung (40%)	25,68 ml
	Bisacrylamid-Lösung (2%)	5,28 ml
	Aqua purificata	ad. 80 ml
	APS	600 µl
	TEMED	24 µl

Protein-Lysepuffer

Lysis-Puffer für PI-Färbung	Natriumcitrat	100 mg
	Triton X-100	100 µl
	Propidiumiodid	2 mg
	Aqua purificata	ad 100 ml
	pH 8.0 mit HCl	
Lysis-Puffer für 2D-PAGE	Harnstoff	6,6 g
	Dithioerythritol	10 mg
	CHAPS	42 mg
	EGTA	12 mg
	EDTA	12 mg
	Aqua purificata	ad 10 ml
SDS-Lysis-Puffer für Western Blot	Glycerin	2 ml
	SDS (20% w/v)	400 µl
	Beta-Mercaptoethanol	1 ml
	Tris-Puffer (100mM)	ad 10 ml

Standard-Pufferlösungen

Membran Stripping-Puffer	Beta-Mercaptoethanol 1M Tris-HCl – Puffer pH6,6 SDS (20% w/v) Aqua purificata	360µl 2,5ml 4ml ad 40ml
10x SDS-PAGE Puffer	Tris Glycin SDS Aqua purificata	150g 720g 50g ad. 5l
Western Blot Transfer-Puffer	Tris Glycin Methanol Aqua purificata	15,15g 75g 1l ad. 5l
1,5M Tris-HCl (pH8,8 oder pH6,8)	Tris Aqua purificata (pH wurde mit HCl eingestellt)	908g ad. 5l
10x TBS pH8,0	Tris Natriumchlorid Aqua purificata (pH wurde mit HCl eingestellt)	12,11g 87,66g ad. 1l
10x NET-Puffer	Natriumchlorid Na ₂ -EDTA Tris Triton® X-100 Aqua purificata	438,3g 93,6g 302,85g 25g ad. 5l
G-NET (Gelatine löst sich durch erhitzen)	10x NET Gelatine Aqua purificata	500ml 12,5g ad. 5l
DTE/IAA Basispuffer	1M Tris-HCl pH6,8 Harnstoff Glycerin SDS Aqua purificata	2ml 14,4g 12ml 4ml ad. 40ml

3.1.4 EDV, Online- Ressourcen & Computerprogramme

Es wurde ein ASUS Workstation PC mit Intel Pentium® CPU 1.70GHz und 512 MB RAM-Speicher und den Betriebssystemen Microsoft Windows NT bzw. Microsoft Xp Professional (Microsoft GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) verwendet.

Hersteller	Anwendung	Internet-Adresse
Microsoft GmbH Unterschleißheim, Deutschland	Microsoft OfficeXP (2002) Service Pack 2	http://www.microsoft.de/
Affymetrix Inc. Santa Clara, USA	Microarray Suite 5.0.1	http://www.affymetrix.com/
Applied Biosystems Applera Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland	GPS Explorer 2 Software	http://www.appliedbiosystems.com/
Bruker Daltonics Inc. Bremen, Deutschland	XMASS 5.01	
Definiens AG München, Deutschland	ProteomeWeaver 2.1.0	http://www.definiens.com/
Freeware (copyright Josef Trotter)	WinMDI 2.8	http://facs.scripps.edu/software.html
Ingenuity Systems Inc. Redwood City, CA, USA	Ingenuity Pathway Analysis software (version 1.2)	http://www.ingenuity.com
MatrixScience ltd. London, Großbritannien	MASCOT – databank (2003; 2006)	http://www.matrixscience.com
National Center for Biotechnology Information (NCBI) Bethesda, MD, USA	BLAST 2 sequences package PubMed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/ http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez
Raytest Isotopenmessgeräte GmbH. Straubenhardt, Deutschland	TINA2.0 software	http://www.bioregio-stern.de/raytest_isotopenmessgeraete_gmbh
Verity Software House Topsham, ME, USA	ModFit LT™ for Mac	http://www.vsh.com

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

Zellkulturbedingungen

Alle Zelllinien wurden bei 37°C, 5% CO₂ – Gehalt und 95% relativer Luftfeuchtigkeit in Zellkulturflaschen mit 90% RPMI1640, 10% fötalem Rinderserum (FBS) bzw. 20% fötalem Rinderserum bei den MCL-Zelllinien (außer HBL-2) und einer Antibiotika-Kombination von 50U/ml Penicillin und 50µg/ml Streptomycin kultiviert. Vor der Verwendung in der Zellkultur wurde das FBS im Wasserbad durch Erhitzen auf 56°C für 40 min inaktiviert, wobei hitzeempfindliche Komponenten des Komplementsystems im Serum zerstört werden. Alle verwendeten Zelllinien weisen ähnliche Wachstumsraten auf und wurden dreimal wöchentlich zell-dichteabhängig gesplittet, wobei 2/3 der Zellsuspension durch frisches Medium ersetzt wurde.

Zur Gefrierlagerung der Zelllinien wurde die Dichte der viablen Zellen der Zellkulturen durch Trypanblau-Ausschluss-Test festgestellt und 1×10^7 Zellen pro Tiefkühlröhrchen durch Zentrifugation (250 rcf, 10min, 24°C) geerntet. Die Zellpellets wurden in 1ml vorgekühltem 90% FBS + 10% Dimethylsulfoxid pro 1×10^7 Zellen resuspendiert und bei -80°C im Tiefkühlschrank gelagert. Nach Möglichkeit wurden die Zellen nach einigen Tagen bei -80°C zur Lagerung in flüssigem Stickstoff (bei -180°C) überführt.

Zur Rekultivierung der eingefrorenen Zellkulturen wurden die Zellen rasch aufgetaut, die Zellsuspension in 15ml gekühltes Medium überführt und sofort abzentrifugiert (250 rcf, 10min, 4°C), um Reste des zelltoxischen Dimethylsulfoxid zu entfernen. Der Medien-Überstand wurde verworfen und die Zellen in 20ml frischem

Kulturmedium aufgenommen, wobei alle Zelllinien in den ersten 24h in einer erhöhten FBS-Konzentration von 20% suspendiert wurden.

Trypanblau-Ausschluss-Test

Zur routinemäßigen Bestimmung der Zellzahl und Viabilität der kultivierten Zelllinien wurde der Trypanblau-Ausschluss-Test verwendet. Apoptotische Zellen werden durch Trypanblau angefärbt, während viable Zellen den Farbstoff aus dem Zellinneren in das extrazelluläre Medium zurückpumpen und so bei der Bestimmung der Zelldichte in einer Neubauer-Zählkammer im Durchlichtmikroskop transparent erscheinen. Die Zelldichte wird durch die Anzahl der Zellen in vier Großquadraten bestimmt, wobei bei einer Mischung von Zellsuspension zu Trypanblau von 1:1 folgende Formel gilt:

$$(N_2) = (N_1/2) \times 10^4$$

Hierbei gibt (N_1) die Zellzahl in vier Großquadraten der Neubauer-Zählkammer an, (N_2) die Zellzahl pro ml Zellsuspension.

Behandlung von Zellen mit Bortezomib

Zur standardisierten Behandlung der kultivierten Zellen mit Bortezomib wurde die Zelldichte der Zelllinien bestimmt und auf eine Endkonzentration von 5×10^5 Zellen/ml in frischem Medium eingestellt. Die Zellsuspension wurde mit Bortezomib (100 μ M)

versetzt; in den Versuchen mit einheitlicher Bortezomib-Konzentration wurde eine Endkonzentration von 20nM verwendet und in Versuchen mit unterschiedlichen Konzentrationen eine Halbschritt-Verdünnungsreihe von 100nM – 6,125nM eingesetzt. Dazu wurde zu Beginn der Versuche die 100µM Bortezomib-Stammlösung (in DMSO) in ausreichender Menge hergestellt und bei -20°C gelagert, um Konzentrationsschwankungen in den Verdünnungsreihen auszuschließen.

Extraktion von MCL-Patientenzellen durch Dichtegradientenzentrifugation

Bei der Dichtegradientenzentrifugation wurden die verschiedenen Zelltypen einer Patientenprobe anhand ihrer Schwebedichte getrennt. Zur Isolation von mononukleären Zellen (hier B-Zellen) wurde dabei das synthetische Polysaccharid Ficoll verwendet. Dazu wurde die Patientenprobe zuerst durch zentrifugationsfreie Sedimentation mit 33% Plasmasteril von Erythrozyten gereinigt. Der Überstand wurde im Verhältnis 1:1 mit RPMI1640 mit 10% FBS gemischt und die vorgelegte Ficoll-Lösung im Verhältnis 1:1 vorsichtig überschichtet. Die eigentliche Dichtegradientenzentrifugation erfolgte bei 1400rcf für 20min und Raumtemperatur bei geringster Beschleunigung und ohne Bremsen, um die empfindliche Zellschicht auf der Oberfläche der Ficoll-Phase nicht wieder aufzuwirbeln. Die als wolkige weiße Schicht („buffy coat“) auf der Ficolloberfläche erkennbare Zellpopulation wurde mit einer serologischen Pipette vorsichtig aufgenommen und zweimal mit 10% FBS in RPMI1640 gewaschen, um Reste der toxischen Ficoll-Lösung zu entfernen. Die Zellen wurden nach der Isolation in FBS mit 10% DMSO bei -80°C bis zur Verwendung eingefroren. Für die Versuche wurden die Zellen für 24h vor Bortezomib-Exposition in RPMI1640 mit 20% FBS kultiviert. Anschließend wurde die

Zahl der viablen Zellen bestimmt und die Zellzahl der MCL-Primärkultur auf $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt, bevor die Zellen mit Bortezomib behandelt wurden.

WST1-Proliferationstest zur Bestimmung der mittleren inhibitorischen Konzentration (IC50)

Zur Bestimmung der Proliferationsrate einer Zellpopulation wurde neben dem Ausschlusstest mittels Trypanblau-Färbung auch der WST1-Test verwendet, der auf der Metabolisierung des Tetrazoliumsalses 4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazoleo]-1,3-Benzendisulfonat zum ringoffenen Formazan-Salz und einem damit einhergehenden Farbumschlag beruht, der kolorimetrisch ausgewertet werden kann (Abbildung 5). Das Absorptionsmaximum verschiebt sich dabei in den Bereich von 420-480nm. Der WST1-Proliferationstest wurde nach den Herstellerangaben durchgeführt. Dazu wurden die Zellen auf die gewünschte Dichte ($0,05 \times 10^6$ /ml) eingestellt und in 96-Well-Platten mit flachem Boden kultiviert (100µl der eingestellten Zellsuspension), wobei jeder Wert als Tripletts angesetzt und vermessen

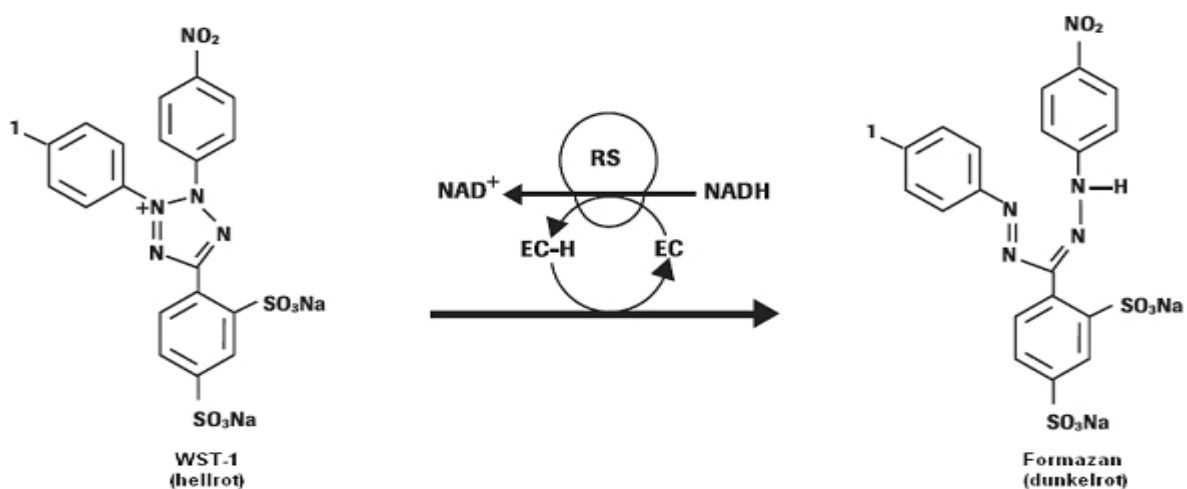
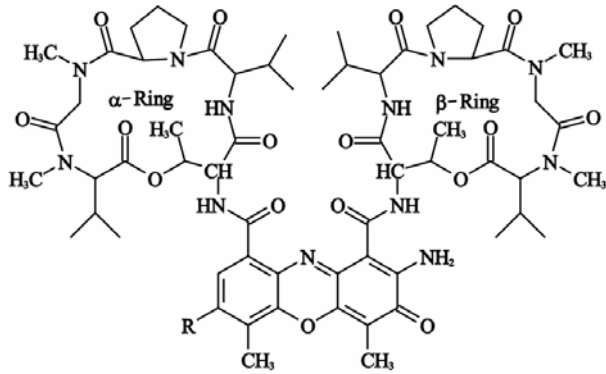


Abbildung 5: Umsatz von WST-1 zu Formazan

wurde. Als Hintergrundabgleich wurde hierbei reines Kulturmedium mit WST1-Reagenz und als Basiskontrolle jeweils unbehandelte, proliferierende Zellen verwendet. Die Untersuchungen wurden über einen Konzentrationsgradienten von 100nM – 6,125 nM Bortezomib durchgeführt. Nach einer Inkubationszeit von 24h oder 48h wurden die Zellen mit WST1-Reagenz versetzt und nach vierstündiger Inkubation am ELISA-Reader ausgewertet.

Aus den drei erhaltenen Messwerten wurde der Mittelwert gebildet, der Mittelwert der Blank-Werte subtrahiert und die Differenzwerte auf den Kontrollwert der unbehandelten Zellen bezogen. Die so erhaltenen prozentualen Werte können in einer Kurvenfunktion dargestellt werden, aus der die Konzentration berechnet werden kann, die notwendig ist, um *in vitro* eine 50%ige Inhibition zu erzielen (mittlere Inhibitorische Konzentration (IC₅₀)). Der IC₅₀ wurde als primärer Vergleichsparameter ausgewählt, da er sowohl die Viabilität als auch die Proliferationsrate der Zelllinien erfasst.

Bestimmung der Apoptoserate durch 7-AAD-Färbung und FACS-Analyse



7-Actinomycin (7-AAD)

Zur Bestimmung des Anteils apoptotischer Zellen in einer Kultur wurde das „Annexin V-PE Apoptosis Detection Kit I“ von BD Biosciences Pharmingen (Heidelberg, Deutschland) nach Herstellerangaben verwendet. Der Test beruht auf einer Doppelfärbung von

apoptotischen beziehungsweise toten Zellen mit fluoreszenzmarkiertem Annexin V und dem rötlichen 7-AAD.

Eines der ersten Anzeichen für das Einsetzen von Apoptose ist der Verlust der Membran-Asymmetrie der Zellen, wobei es zur Exposition des Membranphospholipids Phosphatidylserin auf der Außenseite der Plasmamembran kommt. Dieser Prozess tritt neben dem Verlust des Membranpotentials und der verstärkten Produktion von Superoxid-Anion-Radikalen vor der nukleären Apoptose mit Chromatinkondensation und DNA-Fragmentierung auf (Castedo *et al.* 1996). Mittels Annexin V, einem Ca^{2+} -abhängigen, Phospholipid-bindenden Protein mit hoher Affinität für Phosphatidylserin können bereits Zellen in einem frühen Stadium der Apoptose identifiziert werden. Annexin V wird an Fluorochrome wie Phycoerythrin (PE) gekoppelt, wodurch es als sensitive Sonde für die durchflusszytometrische Analyse apoptotischer Zellen geeignet ist. Die Anfärbbarkeit von Zellen mit Annexin V-PE geht dem Verlust der Membranintegrität voraus, der die späten Stadien des Zelltods charakterisiert. Daher wird die Färbung mit Annexin V-PE typischerweise mit einem so genannten Vitalfarbstoff wie 7-Aminoactinomycin (7-AAD) kombiniert. 7-

AAD interkaliert zwischen Cytosin und Guanin und kann nur in Zellen mit nicht intakter Membran eindringen. Mittels Doppel-Färbung kann zwischen intakten Zellen (Annexin V-PE negativ, 7-AAD negativ), frühapoptotischen (Annexin V-PE positiv, 7-AAD negativ) und spätapoptotischen Zellen (Annexin V-PE positiv, 7-AAD positiv) unterschieden werden. Für jede Analyse wurden die korrekten Einstellungen des Durchflusszytometers anhand von nicht- bzw. einfach-gefärbten Proben ermittelt. Annexin V-PE wurde in Fluoreszenzkanal FL-2 und 7-AAD in Fluoreszenzkanal FL-3 detektiert. Nekrotische Zellen (Annexin V-PE negativ, 7-AAD positiv) gingen nicht in die Auswertung ein. Die Auswertung der Versuche erfolgte mit Hilfe von WinMDI 2.8 (copyright Josef Trotter). Der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen wurde mit Hilfe folgender Gleichung berechnet:

$$[1 - (A_{I,b}/A_{I,u})] \times 100\%$$

Hierbei steht $A_{I,b}$ für den Anteil lebender und behandelter Zellen, $A_{I,u}$ für den Anteil lebender und unbehandelter Zellen. Einen repräsentativen Dotplot zeigt Abbildung 6.

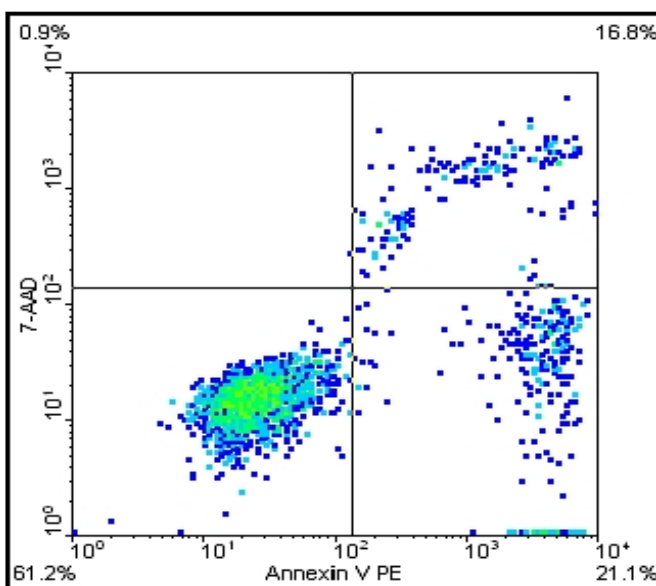


Abbildung 6:

Apoptose-Detektion mit Annexin V-PE und 7-AAD

Im unteren linken Quadranten befinden sich intakte Zellen (Annexin V-PE negativ, 7-AAD negativ, hier 61,2%), im unteren rechten Quadranten frühapoptotische Zellen (Annexin V-PE positiv, 7-AAD negativ, hier 21,1%) und im oberen rechten Quadranten spätapoptotische Zellen (Annexin V-PE positiv, 7-AAD positiv, hier 16,8%).

Zellzyklusanalyse durch Propidiumiodid-Färbung

Zur Durchführung von Zellzyklusanalysen wurden die Zellen zum entsprechenden Zeitpunkt gezählt, aus der Zellkultur entnommen und auf 200 000 pro FACS-Röhrchen eingestellt. Anschließend wurden die Ansätze einmal mit kaltem PBS gewaschen, auf Eis mit 350µl Lysis-Puffer für PI-Färbung versetzt und 5 min unter Lichtausschluss lysiert. Sofort nach der Lyse wurden die Zellen im Durchflusszytometer analysiert. Es wurden mindestens 10 000 Zellen gemessen und die Ergebnisse mit Hilfe von ModFit LTTM (Verity Software House, Topsham, USA) ausgewertet. Hierbei wurde eine Histogramm-Darstellung gewählt, bei der auf der X-Achse die Fluoreszenz-Intensität von Kanal FL-2 und auf der Y-Achse die Anzahl der detektierten Ergebnisse aufgetragen wurde. Es wurden sowohl die Werte auf der X-Achse als auch auf der Y-Achse linear dargestellt, um eine automatische Analyse mit dem Programm ModFit LTTM durchführen zu können. Im ersten Peak wurden Zellen in der G₀/G₁-Phase erfasst. Der zweite Peak, (mit etwa doppelter Intensität des ersten Peaks) gibt Zellen der G₂/M-Phase und der intermediäre Bereich Zellen in der S-Phase wieder. Zellen, die DNA-Fragmentationen aufweisen und daher eine Fluoreszenz im Sub-G₁-Bereich zeigten, wurden als apoptotisch angesehen und bei der Auswertung der Zellzyklusverteilung nicht berücksichtigt.

3.2.2 PCR-Nachweismethoden

Polymerase-Kettenreaktion (PCR): Hintergrundinformationen

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) handelt es sich um ein Verfahren zur wiederholten künstlichen Vervielfältigung eines durch die Sequenzen der verwendeten Primer-Oligonukleotide definierten Abschnitts der Template-DNA *in vitro*. Dabei werden thermostabile Polymerasen verwendet wie die in *Thermus aquaticus* entdeckte Taq-Polymerase. In einem Thermocycler wird der DNA-Doppelstrang der Template-DNA zunächst bei hohen Temperaturen (94-96°C) denaturiert, wobei die beiden Einzelstränge getrennt werden. An die offenen Einzelstränge können sich bei 50-65°C spezifisch Primer-Oligonukleotide an ihre komplementären Sequenzen auf den DNA-Einzelsträngen anlagern. Die eigentliche DNA Vervielfältigung findet dann abhängig von der verwendeten Polymerase bei 68-72°C statt, bei der die Polymerase Nukleotide Templatespezifisch an das Primer-Oligonukleotid bindet. Dieser Vorgang wird über 25-45 Zyklen wiederholt und so das Zielfragment vervielfältigt (Abbildung 7).

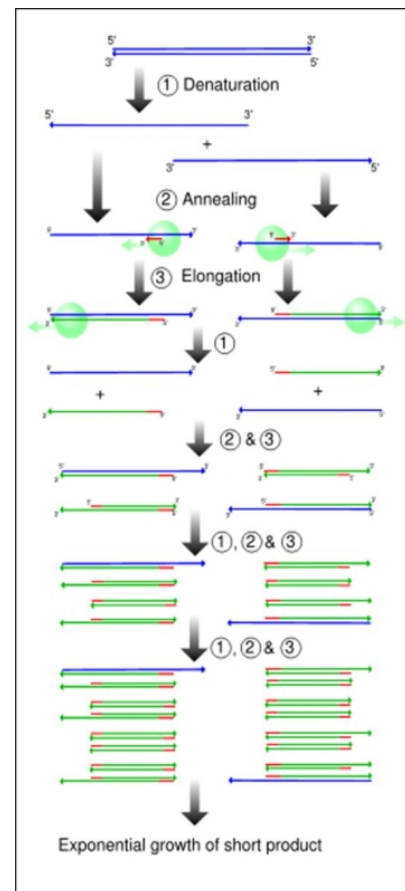


Abbildung 7:

Schematische Darstellung der Polymerase-Kettenreaktion

Abbildung copyright Madeleine Price Ball verwendet unter der „GNU Free Documentation Licence“

HRV-Polymorphismen-Test zur Validierung der Zelllinienidentität

Als Routinetest zum Ausschluss von Kreuzkontaminationen der Zelllinien wurden in regelmäßigen Abständen die Polymorphismen der hypervariablen Region der mitochondrialen DNA (mtDNA) der einzelnen Zelllinien überprüft. Dazu wurde den betreffenden Kulturen eine Probe von 1×10^7 Zellen entnommen und DNA mittels des NucleoSpin® Blood Quick Pure XL Kits nach Herstellerprotokoll isoliert. Die isolierte DNA diente als Template zur Amplifikation der mitochondrialen Sequenzen. Die PCR wurde in einem Volumen von 25µl durchgeführt und enthielt 10 pmol jedes Primers (siehe 3.1.3: Oligonukleotide), 1ng Template-DNA, 0,25mM aller dNTPs, 2,5mM MgCl₂, 5% Dimethylsulfoxid und 1,25U Ampli-Taq Gold® Polymerase im Reaktionspuffer. Für die PCR wurde nebenstehendes Protokoll verwendet:

	95°C	10,00 min
35x	94°C	0,30 min
	56°C	1,00min
	72°C	1,00min
	72°C	7,00min
	4°C	hold

Eine Menge von 1-2µl der amplifizierte mtDNA diente in einer 1:10 Verdünnung wiederum als Template für eine Sequenzierungsreaktion mit dem ABI Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit mit 5pM jedes Sequenzierungsprimers in einem Gesamtvolumen von 10µl. Für die PCR wurde nebenstehendes Protokoll verwendet:

	96°C	2,00min
25x	96°C	0,30 min
	50°C	0,15min
	60°C	4,00min
	4°C	hold

Die aufgereinigten Produkte wurden auf einem ABI310 Kapillarsequenzierer nach dem Amplitaq FS Dye Terminator Standardprotokoll sequenziert und die resultierenden Sequenzen durch die normale Nukleotid-Nukleotid Blast-Suche und das BLAST 2 Sequences Paket analysiert. Als Vergleichssequenz wurde die

vorliegende, komplette Referenzsequenz des menschlichen, mitochondrialen Genoms (>gi/13959823/ref/NC_001807.3/ Human mitochondrion, complete genome) sowie die bekannten Polymorphismen der Zelllinien verwendet (Hutter *et al.* 2004).

PCR-Mykoplasmentest

Eine der verbreitetsten Kontaminationen eukaryoter Zellkulturen sind Mykoplasmen. Um sicherzugehen, dass die durchgeführten Versuche nicht durch eine solche Kontamination verfälscht werden, wurden in regelmäßigen Abständen alle Zellkulturen auf eine Kontamination untersucht. Hierzu wurden Proben von 1ml Zellkultursuspension aus den Zellkulturen entnommen und thermisch (10 min bei 97°C im Heizblock) inaktiviert; eine gruppenspezifische PCR, die ein in den häufigsten Mykoplasmenarten konserviertes DNA-Fragment spezifisch amplifiziert, wurde in einem Endvolumen von 25µl durchgeführt und enthielt neben 10µl der aufgekochten Zellkultursuspension als Template 10 pmol jedes Primers, 0,25mM aller dNTPs, 2,5mM MgCl₂, und 1,25 U Taq-Polymerase im Reaktionspuffer. Für die PCR wurde nebenstehendes Protokoll verwendet:

Mycoplasmen-Test-PCR

43x	94°C	5,00 min
	55°C	1,45 min
	72°C	3,00min
	94°C	0,45min
	55°C	1,45min
	72°C	10,0min
	27°C	10,0min
	4°C	hold

Ein Volumen von 10µl der resultierenden PCR-Produkte wurden auf einem 2% Agarosegel aufgetrennt und nach Ethidiumbromidfärbung unter UV-Licht analysiert (Otto *et al.* 1996). In allen Versuchen wurden ausschließlich Mykoplasmen-freie Zellkulturen verwendet.

3.2.3 Proteinanalytische Methoden

Zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese (2D-PAGE)

Bei der 2D-PAGE handelt es sich um ein Verfahren zur Auftrennung komplexer Proteingemische anhand ihres pH-Werts und ihrer Molekularmasse. Im Idealfall entspricht jeder Punkt auf einem solchen Gel genau einem bestimmten Protein. Dazu werden die zu untersuchenden Proben zunächst mit einem neutralen Harnstoffpuffer lysiert. Für die Versuche in dieser Arbeit erwies sich dabei eine standardisierte Zellzahl von 3×10^6 viablen Zellen als ideale Probengröße. Dazu wurden die Zellen durch Zentrifugation (10 min, 300 rcf und 4°C) geerntet, zweimal mit PBS und einmal mit halbkonzentriertem PBS zur Verminderung der Salzkonzentration gewaschen und entweder als Zelniederschlag bei -80°C gelagert oder sofort in 300µl Harnstoffpuffer (66% Harnstoff, 1% DTE, 4% CHAPS, 2,5mM EDTA und 2,5mM EGTA) resuspendiert und mindestens 1h bei Raumtemperatur lysiert. Dabei konnte kein Unterschied zwischen den gefriergelagerten und den frisch lysierten Proben festgestellt werden. Die Lysate wurden durch Zentrifugation (90 min, 16100 rcf) von Zelltrümmern gereinigt. Vor der eigentlichen isoelektrischen Fokussierung (IEF) wurden die Proteinlysate mit 0,5% Trägerampholyten (IPG-Buffer pH3-10) versetzt, die während der Elektrophorese den pH-Gradienten im Gel aufbauen und die Mobilität der Proteine im pH-Gradienten erleichtern. Die IEF wurde in einer Ettan™ IPGphor™ mit 18cm IPG-Strips pH3-10 (GE Healthcare) oder 18cm BlueStrips pH3-10 (Serva) durchgeführt.

Die Beladung des IEF-Gels wurde bereits unter einer geringen Spannung von 30V durchgeführt, um den Eintritt hochmolekularer Proteine in den Gelstreifen zu erleichtern. Ein weiterer Programmschritt mit niedriger Spannung (100V) war dazu gedacht, zurückgebliebene Salzreste der Medien und PBS-

Tabelle 1: Elektrophorese-Programm für die 2D-PAGE

First Dimension: IEF			
Standard conditions: 20°C 50 µA/IPG-gel			
Step	V	t	
1	30	10:00	Hold
2	100	00:15	Gradient
3	100	06:00	Hold
4	500	00:30	Gradient
5	500	00:30	Hold
6	2000	03:00	Gradient
7	2000	01:00	Hold
8	8000	03:00	Gradient
9	8000	04:00	Hold
End		28 h 15 min	Total

Second Dimension: SDS-PAGE			
Standard conditions: ambient Temperature (passive cooling)			
Step	V	t	Vh
constant	60	24 h	1440

Waschschritte aus dem Gel zu eliminieren und „streaking“-Effekte, d.h. streifenartig ausgezogene Proteinpunkte zu vermeiden. Im Anschluss wurde die Spannung in mehreren Schritten auf 8000V angehoben und bis zu einem Endpunkt von 46000 bis 56000 Vh aufrechterhalten, um die vollständige Fokussierung der Proteine zu gewährleisten (Tabelle 1). Der IEF liegt das Prinzip zugrunde, dass Proteine über den größten Teil des pH-Spektrums eine Ladung aufweisen. Nur in einem engen pH-Bereich, dem isoelektrischen Punkt (pI) heben sich die Ladungen der verschiedenen sauren und basischen Aminosäure-Seitenketten des Proteins auf, so dass es in ungeladener Form vorliegt. In einem (im Gel immobilisierten) pH-Gradienten wandern die Proteine im angelegten elektrischen Feld entsprechend ihrer Ladung, bis sie ihren pI erreichen und somit ihre Ladung verlieren. Nach der Trennung der Proteine nach ihrem pI werden die IEF-Gele equilibriert. Dabei werden die Proteine zuerst in Equilibrierungs-Puffer (5% 1 M Tris pH 6,8, 36 % Harnstoff 37,5 % Glycerin und 2% SDS) mit 2% DTE reduziert und dann in einem zweiten Schritt mit 2,5% Iodacetamid alkyliert, um die artifizielle Alkylierung einzelner Aminosäurereste z.B. durch Trägerampholytmonomere oder freies Acrylamid zu

verhindern, die ebenfalls zu „streaking“-Effekten führen kann (Berkelman 2002). Gleichzeitig werden die Proteine während der Equilibrierung mit SDS-Molekülen beladen. SDS ist ein negativ geladenes Detergenz, das Proteine durch Entfaltung denaturiert. Dabei lagern sich die SDS-Moleküle grob proportional zur Molekularmasse des Proteins an, so dass alle Proteinspezies in etwa das gleiche Verhältnis von Masse/Ladung besitzen. Dadurch wandern alle Proteinspezies in einem elektrischen Feld potenziell mit der gleichen Geschwindigkeit. Das in der 2. Dimension verwendete Polyacrylamidgel wirkt als molekulares Sieb, das höhermolekulare Proteine stärker zurückhält als kleinere, wodurch eine Trennung der Proteinproben nach ihrer Molekularmasse gegeben ist. In dieser Arbeit wurden in der zweiten Dimension eine konventionelle 20cm Protean II xl – Kammer mit 12% Polyacrylamid-SDS-Gelen bei einer Spannung von 60V – 80V und einem Endpunkt von 1440Vh – 1530Vh verwendet (Weinkauf *et al.* 2006) (Abbildung 8).

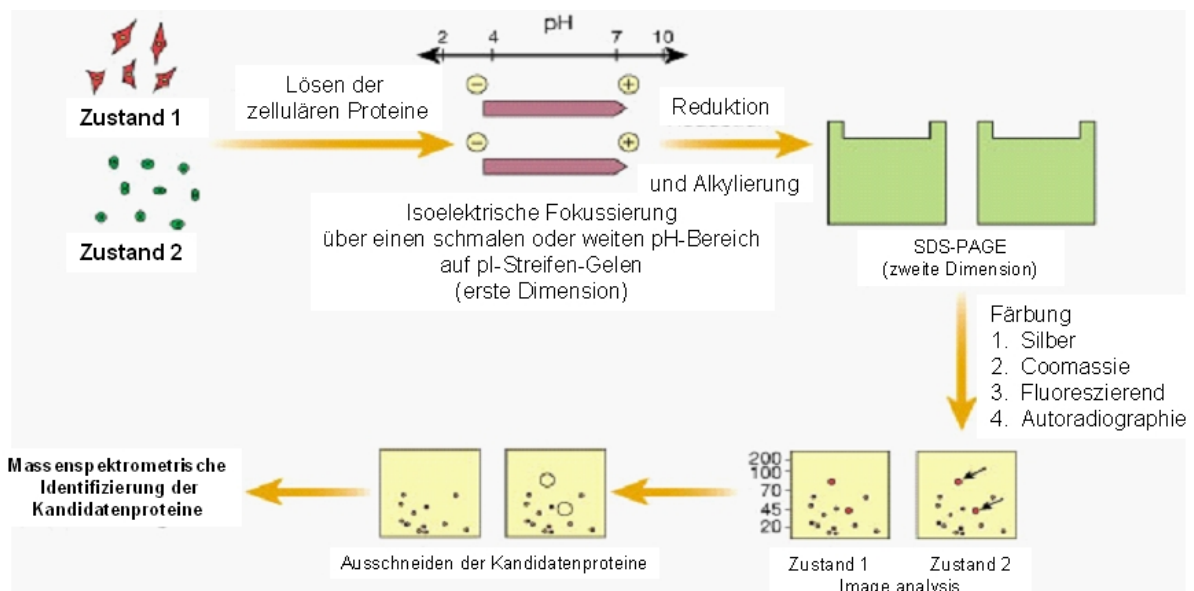


Abbildung 8: Schematische Darstellung eines 2D-PAGE-Experiments.

Verändert aus Pandey und Mann 2000

Bioinformatische Analyse der 2D-PAGE-Gele

Die getrockneten 2D-PAGE-Gele wurden anschließend dem Protokoll Shevchenkos folgend silbergefärbt (Shevchenko *et al.* 1996) und mittels eines Flachbettscanners digitalisiert. Die Bilddaten wurden als Graustufen-.tif - Dateien mit mindestens 300dpi Auflösung abgespeichert. Diese Bilddateien wurden direkt in das 2D-Auswertungsprogramm ProteomeWeaver 2.1.0 importiert und gruppenweise verglichen. Hierzu wurden die voreingestellten Standard-Vergleichsparameter verwendet, ausgenommen der Parameter für Radiuslimit (4) und Kontrastlimit (10). Der Gel-Vergleich wurde anhand dieser Parameter automatisiert durchgeführt, wobei im Anschluss die Kolo-kalisierung jedes gepaarten Proteinpunkts nochmals manuell abgeglichen wurde. Zur statistischen Analyse wurde das integrierte Statistikpaket des Analyseprogramms verwendet. Zur Identifikation wurden nur Proteinpunkte herangezogen, die sowohl einen vom Programm gemessenen, relativen Intensitätswert von mindestens 0,1 und gleichzeitig einen mindestens fünffachen Intensitätsunterschied zwischen den Analysegruppen besitzen.

Probenvorbereitung für die massenspektrometrische Proteinidentifikation

Die so definierten „Kandidaten – Proteinpunkte“ wurden mit einem neuen Skalpell aus den 2D-Gelen ausgeschnitten und zur massenspektrometrischen Identifizierung durch das Peptid-Fingerabdruck-Verfahren verwendet. Dazu wurden die ausgeschnittenen und 30 min in Wasser vorgequollenen Gel-Stücke entfärbt, indem das abgelagerte Silber mit Farmerschen Abschwächer (30mM Kaliumferrizyanid [rotes Blutlaugensalz] und 100mM Natriumthiosulfat jeweils in 10ml Wasser gelöst

und beide Lösungen 1:1 gemischt) oxidiert und die Silberreste vor dem Gel-internen Trypsinverdau der Proteine durch dreimaliges Waschen mit Wasser entfernt wurden. Danach wurden die Gel-Stücke zweimal abwechselnd mit 100µl Acetonitril und 100µl 50mM Ammoniumhydrogencarbonat - Lösung jeweils 15min gewaschen. Für den eigentlichen Trypsinverdau wurden die Gel-Stücke mit 20µl 50mM Ammoniumhydrogencarbonat bedeckt und 1µl Trypsin-Stocklösung zugegeben. Die Verdauung fand über Nacht bei 37°C in einem Brutschrank statt, um durch die erhöhte Luftfeuchtigkeit im Inneren des Brutschranks eine Kondensation der Lösung am Deckel des Reaktionsgefäßes zu vermeiden. Nach der Verdau-Reaktion wurde der Überstand entnommen, in ein neues Gefäß überführt, auf flüssigem Stickstoff (bei -198°C) eingefroren und in einer Vakuumzentrifuge gefriergetrocknet. Danach wurden die Gel-Stücke mit 30µl 70% ACN 1h bei 37°C nacheluiert, 30sec Ultraschall behandelt und dieses Eluat mit dem Lyophilisat zusammengeführt. Die Peptid-Lösung wurde erneut auf flüssigem Stickstoff eingefroren und lyophilisiert. Um Salzreste zu entfernen wurde das Lyophilisat wiederholt in Wasser gelöst, eingefroren und lyophilisiert, bis im Reaktionsgefäß keine weißen Salzurückstände mehr zu erkennen waren. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Peptid-Lyophilisat bei -80°C aufbewahrt (Shevchenko *et al.* 1996).

Massenspektrometrische Identifizierung differenziell abgebildeter Proteinpunkte durch Peptidmassen-Fingerabdrücke

Die so gewonnenen Peptid-Proben wurden auf einer Stahl-Trägerplatte in eine organische Kristallmatrix eingebettet (DHB-Matrix [für Bruker Reflex III MALDI-TOF]: 9:1 Mischung aus 20mg/ml 2,5-Dihydroxybenzoesäure und 20mg/ml 2-Hydroxy-5-

Methoxybenzoesäure jeweils in 20% ACN und 0,1% Trifluoressigsäure; HCCA [für Applied Biosystems 4700 Proteomics Discovery System MALDI-ToF]: 10mg/ml alpha-Cyano-4-Hydroxycimtsäure in 50% ACN und 0,1% Trifluoressigsäure) und kokristallisiert. Dazu wurden die Peptid-Lyophilisate in 33% ACN / 0,1% TFA gelöst und 1:1 mit der entsprechenden Matrix-Lösung gemischt und sofort auf die Trägerplatte aufgetropft. Durch die gepulste hochenergetische Laserstrahlung im Massenspektrometer (MS) werden die stark absorbierenden Matrixmoleküle angeregt, wodurch es zu einer lokalen explosiven Vaporisation der Matrixmoleküle und der Probenpeptide an der Oberfläche des Kristalls kommt. Die Matrix verhindert zusätzlich die Fragmentierung höhermolekularer Peptide. Die vaporisierten Peptide liegen als einfach geladene Kationen vor, wobei der genaue Ionisationsvorgang noch nicht vollständig bekannt ist. Zu den vorgeschlagenen Erklärungsmodellen gehören photochemische Ionisierung, Cluster-Ionisierung und Energietransfer-induzierte Disproportionierung (Chang *et al.* 2007). Die Peptidkationen werden nun in einem starken elektrischen Feld beschleunigt, wobei jedes Peptid idealerweise die gleiche kinetische Energie erhält. Da schwerere Peptide auch träger sind, erfahren sie dabei eine geringere Beschleunigung, so dass die Flugzeit des Peptids in quadratischer Abhängigkeit zum Verhältnis Masse/Ladung steht:

$$tof \propto \sqrt{\frac{m}{z}}$$

Das MS detektiert nun die Flugzeit der Peptide zum Detektor und erlaubt so die Berechnung der Peptidmassen. Die eigentliche Identifikation des Proteins erfolgt durch den Vergleich der gemessenen Zeitspektren, dem so genannte Peptidmassen-Fingerabdruck, der einer bestimmten Zusammensetzung verschiedener Peptidmassen entspricht, mit den für die verwendete Sequenz-spezifischen Proteinase theoretisch erwarteten Fragmentspektren. Hierzu stehen verschiedene Proteinsequenzdatenbanken zur Verfügung. In dieser Arbeit wurden die SwissProt-

Datenbank (Gasteiger *et al.* 2003) und die Proteinsequenzdatenbank des NCBI unter Verwendung der MASCOT-Suchmaschine (Matrixscience 2003) benutzt.

Zur Analyse der Proteinproben wurden ein Bruker REFLEX III Massenspektrometer bzw. ein AB4700 MALDI-TOF/TOF Massenspektrometer im Reflektormodus mit einem Ionenquellendruck von $\sim 0,5\mu\text{torr}$ verwendet. Mit einer Verzögerung von 400ns zur Ionenextraktion werden hierbei die Ionen mit 20°kV zur TOF-Massenanalyse beschleunigt. Für eine Analyse wurden durchschnittlich 600-1000 Laser-Schüsse verwendet und deren Signale zur MS/MS Analyse gemittelt. Die Spektren des AB4700 wurden mit der GPS Explorer Software unter Verwendung der SwissProt Datenbank ausgewertet. Die Massenspektrometer wurden vor jeder Messung mit Hilfe der Peptid-Peaks der Fragmente des Trypsin-Eigenverdaus kalibriert. Bei der Mascot-Suche wurden folgende Parameter verwendet: (1.) Monoisotopische Peptidmassen, (2.) Cysteinycarbamidomethylierung, (3.) variable Oxidation der Methioninreste, (4.) maximal eine ungeschnittene Trypsin-Schnittstelle und (5.) eine Massengenauigkeit von mindestens 60ppm für das AB4700-MS bzw. 100ppm für das Bruker REFLEX III-MS. Bei der Analyse mit dem AB4700 wurden die 10 Signalspitzen mit der höchsten Intensität innerhalb des Bereichs zwischen m/z von 1500 bis 2500 zur MS/MS-Peptidsequenzierung verwendet. Allgemein wurde ein *molecular weight search* (MOWSE) Wert >53 als signifikante Übereinstimmung angesehen ($p \leq 0,05$). Die GPS Explorer 2 Software des AB4700 integriert darüber hinaus 2 verschiedene Werte: den *best ion score*, der den besten Identifikationswert eines einzelnen Peptids wiedergibt, und den *total ion score*, der die Summe aller Peptid-Identifikationswerte eines Proteins darstellt. Der Signifikanzgrad eines Peptid-Werts sollte dabei größer als 20, der eines Proteins mindestens 40-50 sein. Die Werte verschiedener Datenbank-Suchen können nicht direkt miteinander verglichen werden, weil verschiedene Parameter wie z.B. Datenbankgröße und

unterschiedliche Anzahl an Peptidmassen, die zur Suche verwendet werden, die MASCOT - Signifikanzen beeinflussen. Um dieses Problem zu umgehen berechnet die GPS Explorer ein Konfidenzintervall aus den MASCOT Protein- oder Ionen-Werten, wobei der Grad der MASCOT-Signifikanz jeder Suche als 95% des Konfidenzgrades definiert ist.

Charakterisierung der identifizierten Kandidatenproteine durch Analyse funktioneller Netzwerke

Hintergrundinformationen einschließlich funktioneller Informationen zu den identifizierten Proteinen wurden in der ExPASy Proteomics Server Datenbank (Gasteiger *et al.* 2003) gesammelt. Zur Analyse der Proteininteraktionen wurde Ingenuity Pathways Analysis (Ingenuity[®] Systems, www.ingenuity.com) verwendet, um ein funktionelles Netzwerk der identifizierten Proteine zu erstellen. Dazu wurde ein Datensatz mit den SwissProt Identifikationsnummern der identifizierten Proteine in die Anwendung hochgeladen. Jede so vorgelegte SwissProt Identifikationsnummer wird mit dem Datensatz der Ingenuity Pathways Knowledge Base (IPKB) verglichen und bei einer positiven Identifikation einem entsprechenden datentragenden Gen-Objekt der IPKB zugeordnet und daraus ein globales molekulares Netzwerk errechnet. Dabei werden Gene bzw. Gen-Produkte als Schnittpunkte dargestellt, während Verbindungslinien eine biologische Beziehung zwischen ihnen wiedergeben. In dieser bioinformatischen Analyse werden die menschlichen, murinen und Ratten-Orthologe eines Gens als ein einziger Schnittpunkt gewertet.

Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Um sicherzustellen, dass alle Proteinproben einen gleichen Proteingehalt aufweisen, wurden die Proteinkonzentrationen der Proben für den Immunoblot mit Hilfe des photometrischen Bradford-Tests bestimmt. Der Nachweis beruht auf dem Prinzip, dass der Triphenylmethan-Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau G-250 in saurer Lösung sowohl mit kationischen als auch mit unpolaren Aminosäure-Seitenketten der Proteine Komplexe bildet. Dabei verschiebt sich das Absorptionsmaximum der Farbstoffmoleküle von 470nm nach 595nm, wodurch es zu einem Farbumschlag der Proteinlösung von Rot nach Blau kommt. Zur Kalibrierung des Bradford-Tests wird eine Verdünnungsreihe mit bekannter Konzentration des Proteins Rinder-Albumin verwendet. Der Nachweisbereich des verwendeten Mini-Tests liegt bei 1-25µg Protein. Der Test wurde in 1ml Endvolumen nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Auswertung erfolgte an einem Eppendorf BioPhotometer im Bradford-Modus mit den Kalibrierungskonzentrationen 1,4µg/ml, 2,8µg/ml, 7µg/ml, 14µg/ml und 28µg/ml.

SDS-PAGE und Western Blot-Analyse

Das Prinzip des Western Blots bezeichnet im engeren Sinne nur den Vorgang der Übertragung von aufgetrennten Proteinen aus einem SDS-Gel auf eine Membran. Im erweiterten Sinn schließt die Bezeichnung auch noch den Nachweis der übertragenen Proteine mit Hilfe einer Immunodetektion mit ein. Durch die Übertragung der separierten Proteine auf eine Trägermembran aus Nitrozellulose

oder PVDF, welches eine höhere Bindungskapazität für Proteine besitzt, werden diese wieder zugänglich für Antikörper, die zum spezifischen Nachweis bestimmter Proteine verwendet werden können. Dabei wird meist mit Hilfe eines ersten Antikörpers das gesuchte Protein gebunden und der erste Antikörper mit Hilfe eines Sekundärantikörpers, der meist spezifisch den Fc-Teil des Primärantikörpers bindet und an den ein Enzym wie die Meerrettich-Peroxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) konjugiert ist, detektiert. Durch Waschschriffe mit detergenzhaltigen Lösungen werden die nur unspezifisch schwach gebundenen Antikörper wieder von der Membran entfernt. Der Nachweis der Proteine erfolgt über die durch das Enzym HRP katalysierte Umsetzung von Luminol in einer Chemoluminiszenzreaktion bei der sichtbares Licht freigesetzt wird, das mit empfindlichem Filmmaterial aufgenommen werden kann.

Für die Western Blot-Analyse wurden Zellproben von 1×10^6 Zellen entnommen und durch Zentrifugation (500rcf, 10min) sedimentiert. Der Zellniederschlag wurde sofort in SDS-Lysepuffer (4% SDS, 100mM Tris, 20% Glycerin und 10% beta-Merkaptoethanol) aufgelöst und mindestens 1h bei Raumtemperatur lysiert. Die Proteinproben wurden anschließend im Heizblock bei 96°C aufgeköcht, um die Proteine vollständig zu denaturieren und bis zum Laden des SDS-Gels auf Eis gehalten. Die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht erfolgte in einer Mini-Protean II Elektrophoresekammer, wobei abhängig vom Molekulargewicht des untersuchten Proteins 8%-, 10%- oder 12%-SDS-PAGE-Gele verwendet wurden. Die Auftrennung der Proteine wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Dabei wurde die Spannung in drei Schritten gesteigert. Die Elektrophorese wird mit 60V für 30min gestartet um den Eintritt der Proteine in das Sammelgel zu erleichtern, für 1h auf 80V erhöht bis alle Proteine in das analytische Gel übergetreten waren und zuletzt für etwa eine weitere Stunde auf 121V gesteigert. Nach der Proteinseparation im

Trenngel wurden die Proteine in einer BioRad Semi-Dry Western Blot Transferkammer bei 250mA 150min auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Membranen wurden 2h in NET-Puffer mit 10% Gelatine (G-NET) mit unspezifischen Proteinen abgesättigt und über Nacht mit den entsprechenden Antikörperverdünnungen (1:200 in G-NET) bei 4°C auf einem Probenroller inkubiert. Nach drei 15minütigen Waschschritten mit TBS mit 1% Tween20 wurden die Membranen mit den sekundären Antikörpern in einer Verdünnung von 1:1000 in G-NET 1h bei 4°C auf einem Probenroller inkubiert. Anschließend wurden die Membranen wiederum dreimal mit TBS 1%Tween20 gewaschen und die Antikörper durch die HRP-Luminol-Reaktion (enhanced chemoluminescence detection (ECL) kit, Amersham Biosciences) mittels Kodak[®] BioMax MS Film, MS-1 detektiert. Zur Quantifizierung der Western Blot-Banden wurde das Computerprogramm TINA2.0 verwendet, das aus den relativen optischen Dichten der Probenbanden zur beta-Aktin-Kontrolle und dem Hintergrund die relativen Expressionswerte der Proteinbanden berechnet.

3.2.4 Expressionsanalyse durch Affymetrix[®]-Microarray

Microarrays sind heute die Standardmethode für Genexpressionsanalysen. Die verwendeten Affymetrix[®]-Microarrays basieren auf synthetisch hergestellten Oligonukleotiden, die auf einen Trägerchip aufgetragen sind. Auf dem verwendeten Affymetrix HG-U133A GeneChip befinden sich 22283 dieser Oligonukleotid-Sonden an definierten Positionen eines Rasters auf dem Chip. Die Proben-RNA wurde mit dem Qiagen RNeasy RNA-Extraktions Kit nach Herstellerprotokoll isoliert und sofort bei -80°C bis zur Weiterverarbeitung tiefgefroren. Die Probenvorbereitung erfolgte

nach den Angaben des Herstellers, wie von Kohlmann (Kohlmann *et al.* 2003) bzw. Rosenwald (Rosenwald 2003) beschrieben. Dabei werden die mRNAs aufgereinigt und in cDNA umgeschrieben, wobei sie gleichzeitig mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert wird. Diese markierten cDNA-Proben werden dann mit den DNA-Microarrays hybridisiert, wobei die markierten cDNAs an ihren komplementären Gegenpart auf dem Array binden. Nachdem nicht gebundenen cDNA-Proben durch verschiedene Waschschriffe von den Arrays entfernt worden sind, wird das Fluoreszenzsignal jeder Position des Microarrays mittels eines Lasers ausgelesen. Diese reinen Intensitätswerte werden üblicherweise mit Vergleichsproben normalisiert, um Abbaueffekte, unterschiedlich gute Extraktionen und andere Effekte, die während des Experiments auftreten können, auszugleichen.

Die Normalisierung von Signalen ist eine hochkomplexe Angelegenheit. Zur Auswertung der Arraydaten wurde das Affymetrix-Softwarepaket Microarray Suite 5.0.1 mit der U133A-Maske und einem TGT-Wert von 5000 verwendet. Als minimale Qualitätsmerkmale für den Einschluss eines Expressionsprofils waren mindestens 30% vorhandene Signale und eine 3'/5'-Verhältnis von weniger als 3 zu den Glyceraldehyd-3'-phosphat-Gen (*GAPDH*) Kontrollprobensätzen. Alle Probensätze wurden mit der aktuellen Version der NetAffx Datenbank annotiert.

3.3 Versuchsspezifische Anpassungen der beschriebenen Standardmethoden

3.3.1 Anpassungen des Versuchsaufbaus des „Proben-Pool“-Verfahrens und Vergleichsuntersuchungen von zwei NHL-Subtypen (MCL und FL)

Die MCL-Zelllinien Granta 519, HBL-2 und NCEB-1 sowie die FL-Zelllinien DOHH-2, Karpas 422 und WSU-NHL wurden bei einer Zelldichte von $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml in der exponentiellen Wachstumsphase kultiviert. Die verwendeten Zellkulturen wurden routinemäßig auf Kontaminationen untersucht (PCR-Mykoplasmentest und mikroskopische Kontrolle der Zellsuspension auf Microorganismen-Befall) und eine Kreuzkontamination ausgeschlossen (HRV-Zellidentitätstest). Bei einer Zelldichte von $0,7-1 \times 10^6$ Zellen/ml wurden Zellproben der Kulturen entnommen. Die Gesamtzellzahl einer Probe entsprach 3×10^6 Zellen, d.h. eine 2D-PAGE Proteinprobe bestand entweder aus 3×10^6 Zellen einer Zelllinie oder einem „Proben-Pool“ aus jeweils 1×10^6 Zellen aller drei Zelllinien eines NHL-Subtyps. Für die „Proben-Pools“ wurden die Zellen der einzelnen Zelllinien im letzten Waschschrift vor der eigentlichen Zellyse vereinigt und gemeinsam lysiert. Die IEF wurde bis zu einem Endpunkt von 40000 Vh durchgeführt. Die Auswertung der 2D-PAGE Gele erfolgte mit ProteomeWeaver Version 1.1.3. Für die MS Identifizierung der Kandidatenproteine wurde bei diesen Versuchen das Bruker Reflex III MALDI-TOF MS mit einer DHB-Matrix benutzt.

3.3.2 Anpassungen des Versuchsaufbaus der Proteom-Analysen mit dem 26s-Proteasom-Inhibitor Bortezomib

Die Wirkung des Proteasomen-Inhibitors Bortezomib wurde in den MCL-Zelllinien Granta 519, HBL-2, Jeko-1, NCEB-1 und Rec-1 mit der in Kapitel 3.2 dargestellten Methodik untersucht; als Kontrollen wurden die FL-Zelllinie Karpas 422 und die T-ALL-Zelllinie Jurkat verwendet. In allen Versuchen wurden auch unbehandelte Kontrollen eingeschlossen, um unspezifische Viabilitätsunterschiede auszuschließen. Die verwendeten Zellkulturen wurden routinemäßig auf Kontaminationen untersucht (PCR-Mykoplasmentest und mikroskopische Kontrolle der Zellsuspension auf Mikroorganismen-Befall) und eine Kreuzkontamination ausgeschlossen (HRV-Zellidentitätstest). Die gewonnenen Proben wurden auf ihre Zellzahl normalisiert, so dass jeweils 3×10^6 Zellen in einem 2D-PAGE-Experiment verwendet wurden. Die Analyse der 2D-PAGE Gele dieser Experimente erfolgte computergestützt mittels ProteomeWeaver Version 2.1. Massenspektrometrische Identifikation der durch veränderte Proteinspiegel ausgezeichneten Proteinpunkte auf den 2D-PAGE-Gelen erfolgte mit dem 4700 Proteomics Discovery System with Mascot™ unter Verwendung einer Zimtsäure-Matrix.

4. Ergebnisse

4.1 Etablierung einer standardisierten proteinanalytischen Plattform

4.1.1 Etablierung eines stabilen 2D-PAGE Protokolls

Um eine hohe Reproduzierbarkeit der proteinanalytischen Versuche zu gewährleisten, ist es erforderlich ein stabiles, standardisiertes Probenaufreinigungsverfahren und Elektrophoreseprotokoll zu verwenden. Dabei ist es entscheidend, möglichst viele Fehlerquellen bereits beim Versuchsaufbau auszuschließen. Aufgrund einer Literaturrecherche (Berkelman 2002, Shevchenko *et al.* 1996) wurden die Eckpunkte des Versuchsaufbaus definiert und anschließend getestet.

So wurde in Vorexperimenten an einzelnen Zelllinien die Zusammensetzung des Protein-Lysepuffers optimiert und das standardisierte Elektrophoreseprotokoll entwickelt. Insbesondere konnte durch den Einsatz Zwitter-ionischer Detergenzien die Proteinlöslichkeit erhöht und durch die Anpassung der Elektrophoreseprotokolle (erste und zweite Dimension) der Eintritt der Proteinprobe in das Gel sowie die Auftrennung der Proteine verbessert werden.

Als Ergebnis dieser Pilotversuche wurde das in Kapitel 3.2.3 dargestellte, standardisierte Versuchsprotokoll etabliert, das in allen folgenden Untersuchungen zur Anwendung kam.

4.1.2 Das „Proben-Pool“-Verfahren

Hintergrund

Zelllinien sind ein unverzichtbares Werkzeug bei der Aufklärung molekularer und zellulärer Zusammenhänge in der medizinischen sowie der Grundlagenforschung. Die meisten stabilen Zelllinien akkumulieren allerdings im Laufe ihrer Etablierung zusätzliche Veränderungen, die unabhängig vom ursprünglich untersuchten Phänotyp sind. Dies ist einer der Gründe, warum auf Zelllinien basierende *in vitro*-Untersuchungen nur mit Vorbehalt auf den Gesamtorganismus übertragbar sind. Mit Hilfe von Vergleichsanalysen des Gesamtproteoms von Lymphom-Zelllinien wurde eine Methode entwickelt, diese für den untersuchten Phänotyp unspezifischen Veränderungen der Proteinexpression durch Verdünnung der jeweiligen Einzelproben in einem Zusammenschluss mehrerer Proben zu einem „Proben-Pool“ unter den Signifikanzschwellenwert zu drücken. Dem liegt die Hypothese zugrunde, dass einem bestimmten Phänotyp ein charakteristisches molekulares Expressionsprofil bzw. ein eindeutiges Proteinstmuster entspricht.

Für ein erfolgreich analysierbares 2D-PAGE Gel wird eine minimale Probenmenge von 3×10^6 Zellen benötigt, eine Zellzahl die etwa 50 µg Gesamtprobenprotein enthält. Für den „Proben-Pool“ werden mehrere Proben des gleichen Phänotyps geringer Menge miteinander gemischt und gemeinsam analysiert. Dabei wird die Detektion aller auf nur einzelne Zelllinien beschränkten Veränderungen des Proteinstusters durch Verdünnung weitgehend unterdrückt. Dies vereinfacht insbesondere die Analyse von 2D-PAGE-Gelen mit einer großen Zahl von Proteinstpunkten, da die Zahl Phänotyp-unspezifischer Proteinstpunkte deutlich vermindert wird.

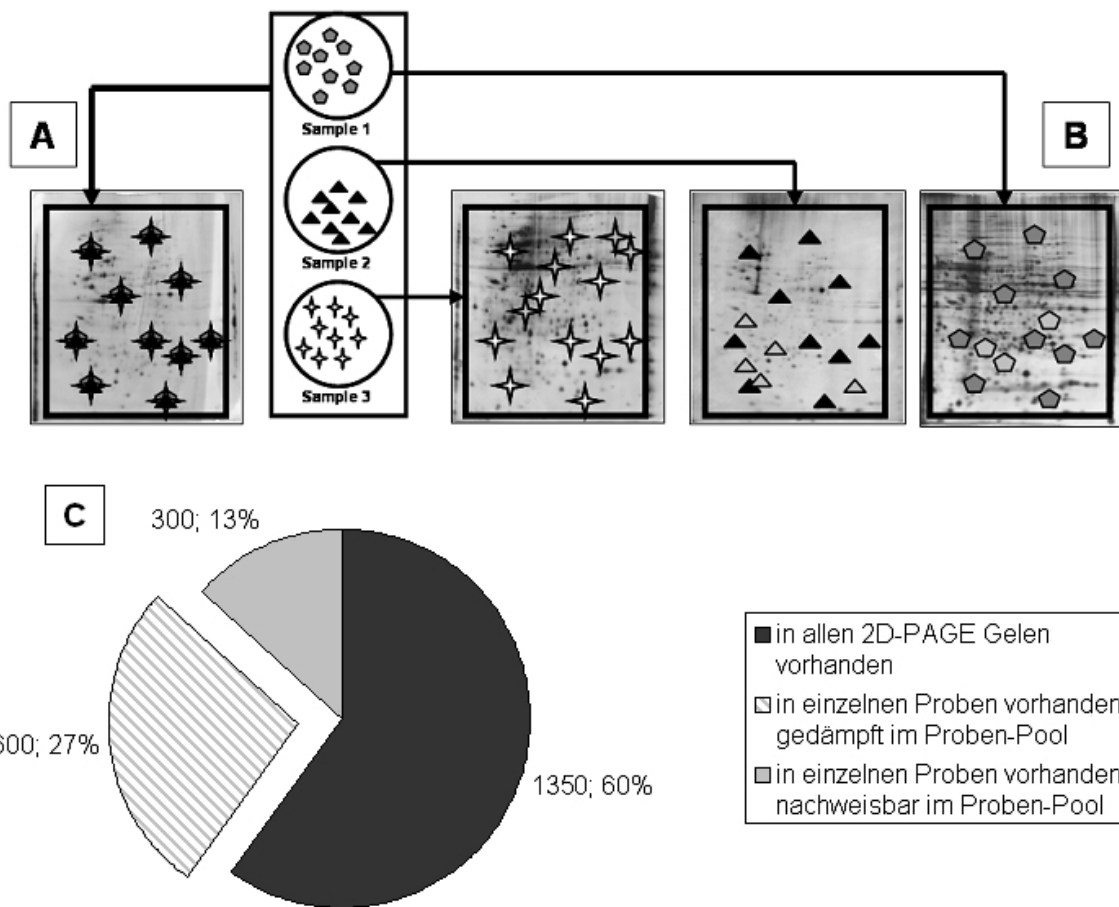


Abbildung 9: Schematische Darstellung des „Proben-Pool“ – Verfahrens

A: 2D-Gel des Proben-Pools: Identische Proteine aller drei Proben bilden gemeinsam einen Punkt auf dem 2D-PAGE-Gel; die Zahl der unspezifischen Punkte ist im Vergleich zu B reduziert.

B: 2D-PAGE-Gele der einzelnen Proben: Auf jedem der Gele befinden sich einzigartige, unspezifische Proteinpunkte.

C: Kreisdiagramm der Verringerung unspezifischer Proteinpunkte in 2D-PAGE-Gelen des „Proben-Pools“ im Vergleich zu den Einzelproben.

Reduktion der Zahl von Phänotyp-unspezifischen Proteinpunkten bei der Analyse von „Proben-Pools“ mittels 2D-PAGE-Gelen

Auf den 2D-PAGE Gelen der einzelnen MCL-Zelllinien wurden durchschnittlich 2250 Proteinpunkte detektiert. Etwa 900 dieser Proteinpunkte (40%) konnten nur in jeweils einer einzelnen der drei MCL-Zelllinien nachgewiesen werden und repräsentieren daher wahrscheinlich eine Veränderung der zellulären Proteinspiegel, die unabhängig vom eigentlichen Krankheitsphänotyp in dieser speziellen Zelllinie auftreten. Die Gesamtzahl der detektierten Proteinpunkte war in den Gelen der MCL-„Proben-Pools“ auf 1650 reduziert. Von diesen 1650 Proteinpunkten konnten 1350 (85%) sowohl in den Gelen aller drei MCL-Zelllinien als auch in denen des „Proben-Pools“ nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnten die restlichen 300 Proteinpunkte (15%) nicht in allen individuellen MCL-Zelllinien gefunden werden (Abbildung 9). Dies entspricht einer Reduktion der Phänotyp-unspezifischen Proteinpunkte um 66% (von 900 im Durchschnitt der Auswertungen der drei einzelnen MCL-Zelllinien auf 300 in den „Proben-Pools“). Auch bei der Analyse der 2D-PAGE-Gele der FL-Zelllinien konnte eine ähnliche Reduktionsrate beobachtet werden. Hier wurde eine Reduktion der Phänotyp-unspezifischen Proteinpunkte von 730 in den 2D-PAGE-Gelen der einzelnen FL-Zelllinien auf 150 in den FL-„Proben-Pools“ beobachtet, was einer Reduktion der Phänotyp-unspezifischen Proteinpunkte um 81% entsprach. Im Gegensatz dazu konnten auch Proteinpunkte niedrigerer Intensität, die in allen Einzel-Zelllinien eines „Proben-Pools“ detektiert wurden, in den 2D-PAGE Gelen des „Proben-Pools“ ebenfalls zuverlässig nachgewiesen werden.

4.1.3 Vergleichsuntersuchung von zwei NHL-Subtypen (MCL gegen FL)

Hintergrund

Die vorstehend beschriebenen 2D-PAGE-Gele wurden auch verwendet, um die beiden NHL-Subtypen MCL und FL miteinander zu vergleichen. In beiden Subtypen ist die primäre genomische Alteration eine Translokation, durch die ein wichtiges Kontrollgen der Zelle unter die transkriptionelle Kontrolle des Immunglobulin Schwere-Ketten-Promotors gerät. Beim MCL ist dieses Kontrollgen Cyclin D1, das sich teilende Zellen über den G₂/M Zellzykluskontrollpunkt treibt. Im FL fällt das wichtige antiapoptotische Protein BCL-2 unter die Kontrolle des in B-Zellen konstitutiv aktiven Immunglobulin Schwere-Ketten-Promotors. Die Überexpression jedes dieser Proteine ist jedoch nicht ausreichend um eine B-Zelle zu transformieren.

Auch physiologisch ähneln sich die betroffenen Zellen. Die eine Entität entspricht B-Zellen aus der folliculären Zone des Lymphknotens (FL), die andere solchen aus der Mantelzone (MCL). Sie stellen daher zwei direkt aufeinander folgende Stadien der B-Zell-Reifung dar.

Die Hypothese für die vergleichenden Untersuchungen lautet daher, dass die Zellen zwar einen sehr ähnlichen molekularen Hintergrund aufweisen, eventuell zu beobachtende Unterschiede der zellulären Proteinspiegel aber in einem direkten Zusammenhang mit dem unterschiedlichen klinischen Verhalten der beiden NHL-Subtypen stehen sollten.

Ermittlung der differentiellen Proteinspiegel in MCL- und FL-Zelllinien

Die im vorherigen Abschnitt beschriebenen 2D-PAGE-Gele der beiden NHL-Subtypen wurden als Triplikate computerunterstützt miteinander verglichen. Für beide Subtypen wurden dabei jeweils 1350 Proteinpunkte reproduzierbar in allen Gelen der Einzel-Zelllinien als auch der „Proben-Pools“ identifiziert (Abbildung 10).

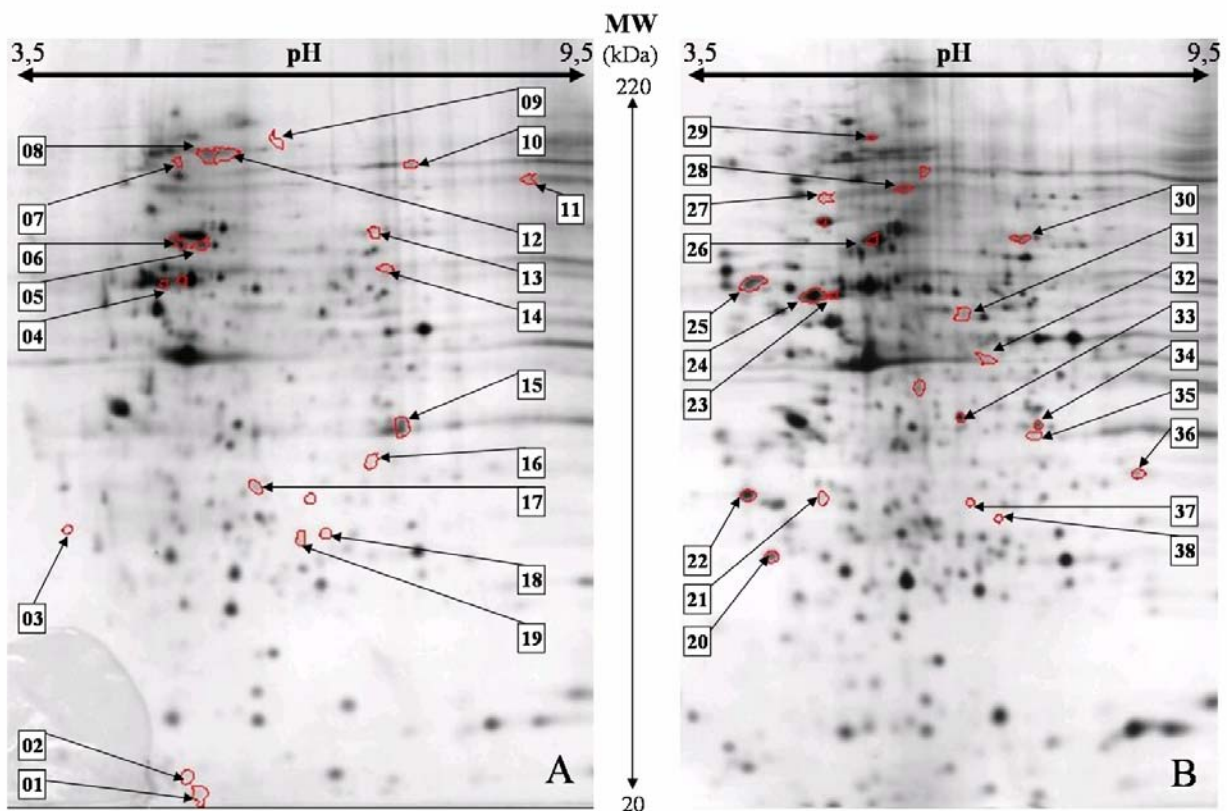


Abbildung 10: Lokalisierung der identifizierten Proteinpunkte auf den 2D-PAGE-Gelen

A: 2D-PAGE-Gel des Proben-Pool der FL Zelllinien (DOHH-2, Karpas 422, WSU-NHL)

B: 2D-PAGE-Gel des Proben-Pool der MCL Zelllinien (Granta 519, HBL-2, NCEB-1).

Die Analysedaten der markierten Proteinpunkte sind in den Tabellen 2 und 3 aufgelistet.

Identifikation von 38 differenziell auftretenden Proteinpunkten durch MALDI-TOF MS

Die 2D-PAGE-Gele der „Proben-Pools“ wurden auf reproduzierbar abgebildete Proteinpunkte mit einem mindestens zehnfachen Intensitätsunterschied zwischen den beiden NHL-Subtypen untersucht. Diesem Kriterium entsprachen 175 der 1350, also 13% der in allen Zelllinien reproduzierbar nachweisbaren Proteinpunkte. Um eine ausreichende Proteinmenge für die MS-Analyse zu gewährleisten, wurde ein von der Analysesoftware vorgegebener Intensitätswert von 0,1 für die Proteinpunkte als Grenzwert festgelegt, so dass 41 differenziell auftretende Proteinpunkte für die MS-Analyse ausgewählt wurden. Durch Peptidmassenfingerabdrücke konnten Proteine aus 38 dieser 41 ausgewählten Proteinpunkte mit signifikanten MOWSE-Werten identifiziert werden. Dabei wurde in 47,4% der Punkte (18/38) jeweils ein Protein eindeutig nachgewiesen, während aus den anderen Proteinpunkten jeweils mehrere „Kandidatenproteine“ mit signifikanten MOWSE-Werten identifiziert wurden (Tabelle 2).

Tabelle 2: (folgende Seite) Komplette Liste aller signifikanten Proteinidentifikationen der 38 differenziell auftretenden 2D-PAGE Punkte (geordnet nach ihrer Markierung in Abbildung 9)

Spalte 1: Nummer des zugehörigen Proteinpunkts in Abbildung 9

Spalte 2: Protein Accession Nummer in der SwissProt Datenbank

(Kandidatenproteine, die in multiplen Punkten identifiziert werden, sind farbig hervorgehoben; jede Farbe steht für ein Protein.)

Spalte 3: Bezeichnung des Gens

Spalte 4: Name des Proteins

Spalte 5: MOWSE-Wert

Mowse Werte über 62 entsprechen einer Signifikanz von $p < 0.05$ für die Identifikation des Proteins.

Protein Spot	SwissProt Accession Number	Gene Name	Protein Name	Protein Identification Score
1	Q5VTR2	<i>RNF20</i>	Ubiquitin-protein ligase BRE1A	82
1	Q9UL16	<i>CCDC19</i>	Coiled-coil domain-containing protein 19	78
1	Q9UK43	<i>CSA2</i>	Chondrosarcoma-associated protein 2	65
2	P52272	<i>HNRPM</i>	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M	76
2	O76038	<i>SCGN</i>	Secretagogin	65
2	Q7KYM9	<i>ORF</i>	ORF protein	64
3	Q9BST2	<i>IQCG</i>	IQCG protein [Fragment]	75
3	Q96FB7	<i>OLFM3</i>	Noelin-3 [Precursor]	70
4	P11387	<i>TOP1</i>	DNA topoisomerase 1	182
4	Q8N8U1	<i>UPF2</i>	Regulator of nonsense transcripts 2	71
4	Q8IYT6	<i>MNS1</i>	Meiosis-specific nuclear structural 1	70
4	P15924	<i>DSP</i>	Desmoplakin	69
4	Q8N1K2	-	CDNA FLJ40601 fis, clone THYMU2011447	65
4	O60289	<i>SFI1</i>	KIAA0542 protein [Fragment]	63
5	Q8IYE0	<i>KIAA1505</i>	KIAA1505 protein	94
5	O75475	<i>PSIP1</i>	PC4 and SFRS1-interacting protein	74
5	Q8IYB3	<i>SRRM1</i>	Serine/arginine repetitive matrix protein 1	70
6	Q9H8U9	-	CDNA FLJ13213 fis, clone NT2RP4001126, weakly similar to TRICHOHYALIN	73
6	Q92878	<i>RAD50</i>	DNA repair protein RAD50	72
6	Q9NQ38	<i>SPINK5</i>	Serine protease inhibitor Kazal-type 5 [Precursor]	64
7	Q8IZT6	<i>ASP</i>	Abnormal spindle-like microcephaly-associated protein	110
7	Q92878	<i>RAD50</i>	DNA repair protein RAD50	82
7	O76041	<i>NEBL</i>	Nebulette	78
7	Q14215	-	Nebulin [Fragment]	77
7	P06753	<i>TPM3</i>	Tropomyosin alpha-3 chain	72
7	Q96LE4	<i>FPGS</i>	Folypolyglutamate synthetase mitochondrial isoform [Fragment]	70
7	Q99968	<i>TPR</i>	Tpr	70
7	Q9UID2	<i>ERC1</i>	ELKS/RAB6-interacting/CAST family member 1	67
7	P05121	<i>SERPINE1</i>	Plasminogen activator inhibitor 1 [Precursor]	63
8	P23497	<i>SP100</i>	Nuclear autoantigen Sp-100	75
8	Q8IZT6	<i>ASP</i>	Abnormal spindle-like microcephaly-associated protein	69
9	Q9NUQ1	<i>MYEF2</i>	Myelin expression factor 2	76
10	Q9H6N6	<i>MYH16</i>	CDNA: FLJ22037 fis, clone HEP08868. [Fragment]	74
10	Q9BST2	<i>IQCG</i>	IQCG protein [Fragment]	64
11	P49914	<i>MTHFS</i>	5-formyltetrahydrofolate cyclo-ligase	104
12	Q96MT8	<i>CEP63</i>	Centrosomal protein of 63 kDa	72
12	O15083	<i>ERC2</i>	ERC protein 2	69
12	Q9P2K5	<i>MYEF2</i>	Myelin expression factor 2	69
12	Q9UG67	<i>DKFZp586D2123</i>	Hypothetical protein DKFZp586D2123 [Fragment]	65
12	O94832	<i>MYO1D</i>	Myosin-Id	63
13	Q8TE73	<i>DNAH5</i>	Ciliary dynein heavy chain 5	70
14	P52272	<i>HNRPM</i>	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M	70
15	Q95347	<i>SMC2</i>	Structural maintenance of chromosomes protein 2	75
15	Q8IZT6	<i>ASP</i>	Abnormal spindle-like microcephaly-associated protein	75
15	O76041	<i>NEBL</i>	Nebulette	73
15	Q15624	<i>TPR</i>	Tpr protein	73
15	Q6ZU80	<i>C14orf145</i>	Uncharacterized protein C14orf145	67
16	Q96HR3	<i>THRAP6</i>	Thyroid hormone receptor-associated protein 6	70
17	Q14683	<i>SMC1A</i>	Structural maintenance of chromosomes protein 1A	76
17	Q9Y6D9	<i>MAD1L1</i>	Mitotic spindle assembly checkpoint protein MAD1	72
17	Q9BST2	<i>IQCG</i>	IQCG protein [Fragment]	64
17	Q9HAG8	-	CDNA FLJ11667 fis, clone HEMBA1004697	64
18	P08631	<i>HCK</i>	Tyrosine-protein kinase HCK	99
19	Q9HDA6	-	LUCA-15 protein	86
20	Q8IZT6	<i>ASP</i>	Abnormal spindle-like microcephaly-associated protein	104
20	P36578	<i>RPL4</i>	60S ribosomal protein L4	81
20	O00362	-	Putative p150	66
20	O75494	<i>FUSIP1</i>	FUS-interacting serine-arginine-rich protein 1	64
20	P42766	<i>RPL35</i>	ribosomal protein L35	63
20	Q9UL09	<i>M1LP</i>	Microtubule-associated protein 1A like protein [Fragment]	63
20	Q9Y2K3	<i>MYH15</i>	KIAA1000	63
21	Q96A33	<i>CCDC47</i>	Coiled-coil domain-containing protein 47 [Precursor]	82
22	Q8IYE0	<i>KIAA1505</i>	KIAA1505 protein	64
23	Q15424	<i>SAFB</i>	Scaffold attachment factor B	71
23	Q9Y2W1	<i>THRAP3</i>	Thyroid hormone receptor-associated protein 3	70
23	Q5T200	<i>ZC3H13</i>	Zinc finger CCCH domain-containing protein 13	67
23	Q9NRI1	-	Junctin	65
24	Q8IZT6	<i>ASP</i>	Abnormal spindle-like microcephaly-associated protein	83
24	Q13439	<i>GOLGA4</i>	Golgin subfamily A member 4	64
25	P07437	<i>TUBB</i>	Tubulin beta chain	141
26	Q9NVU7	-	CDNA FLJ10498 fis, clone NT2RP2000328	79
26	Q9UF55	<i>WDR52</i>	Hypothetical protein DKFZp434A2017 [Fragment]	74
26	Q8NDV3	<i>SMC1B</i>	Structural maintenance of chromosomes protein 1B	67
27	P11021	<i>HSPA5</i>	78 kDa glucose-regulated protein [Precursor]	75
28	Q8VWV3	<i>EDARADD</i>	Ectodysplasin A receptor-associated adapter protein	83
29	Q86X95	<i>CIR</i>	CBF1-interacting corepressor	64
30	Q9H0G5	<i>CCDC55</i>	Coiled-coil domain-containing protein 55	70
31	Q9UC06	<i>ZNF70</i>	Zinc finger protein 70	64
32	Q8NET4	<i>RGAG1</i>	Retrotransposon gag domain-containing protein 1	77
33	Q96E15	<i>TCEAL4</i>	Transcription elongation factor A protein-like 4	104
34	Q7Z3E2	<i>C10orf118</i>	Uncharacterized protein C10orf118	70
34	Q5VTR2	<i>RNF20</i>	Ubiquitin-protein ligase BRE1A	69
35	Q14683	<i>SMC1A</i>	Structural maintenance of chromosomes protein 1A	70
36	Q8IYE1	<i>CCDC13</i>	Coiled-coil domain-containing protein 13	82
36	Q5T200	<i>ZC3H13</i>	Zinc finger CCCH domain-containing protein 13	80
36	Q92878	<i>RAD50</i>	DNA repair protein RAD50	79
36	Q9NXG0	<i>C9orf39</i>	Uncharacterized protein C9orf39	75
36	P20929	<i>NEB</i>	Nebulin	72
36	Q9UIG0	<i>BAZ1B</i>	Bromodomain adjacent to zinc finger domain protein 1B	70
36	O95613	<i>PCNT</i>	Pericentrin	68
36	Q8IYT3	<i>C6orf97</i>	Coiled coil-containing protein C6orf97	64
36	Q7Z3E2	<i>C10orf118</i>	Uncharacterized protein C10orf118	63
37	P09914	<i>IFIT1</i>	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	69
37	Q5T200	<i>ZC3H13</i>	Zinc finger CCCH domain-containing protein 13	65
38	Q8IYE0	<i>KIAA1505</i>	KIAA1505 protein	68
38	Q9NYF8	<i>BCLAF1</i>	Bcl-2-associated transcription factor 1	66
38	Q9NXE8	<i>CCDC49</i>	CDNA FLJ20291 fis, clone HEP04768	64

Funktionelle Einordnung der identifizierten Kandidatenproteine

Die Proteine mit den jeweils höchsten MOWSE-Werten der 38 Proteinpunkte wurden durch Datenbank- und Literaturrecherche (Expasy-Protein-Datenbank (Gasteiger *et al.* 2003) und durch eine PubMed-Suche nach relevanten Publikationen) funktionell gruppiert (Tabelle 3). So zeigen sich Unterschiede zwischen MCL und FL bei den zellulären Proteinspiegeln bekannter DNA-Reparaturfaktoren, z.B. hRAD50 und GRP78 sowie bei der Zellzykluskontrolle (hsMAD1, DNA-Topoisomerase 1 und SMC2_Human), der Apoptose (Luca-15, BCL2 associated transcription factor I und EDAD_Human) und der Transkriptionsregulation (SAFB1_Human, ZNF70_Human). Mit der Ubiquitin-Protein-Ligase BRE1A existiert auch eine Verbindung zum proteasomalen Proteinabbaumechanismus. Darüber hinaus wurden mehrere „hypothetische Proteine“ identifiziert, d.h. bisher noch nicht *in vivo* nachgewiesene Proteine, deren Struktur lediglich aufgrund von Genomanalysen vorhergesagt wurde

Tabelle 3: (folgende Seiten) Funktionelle Charakterisierung der in MCL und FL differierenden Kandidatenproteine.

Für jeden Proteinpunkt wurde nur das Kandidatenprotein mit dem höchsten MOWSE-Wert ausgewählt.

In separaten Spalten sind die relativen Werte der Protein- und RNA-Spiegel vermerkt.

Die Spot-Nummer bezieht sich auf die identifizierten Proteinpunkte in Abbildung 9.

Spot #	protein expression higher in	Mowse Score	SwissProt Accession Number	identified Gene	identified Protein	Protein Function	protein theoretical MW (Da)	protein theoretical pI	higher RNA-Expression in	RNA expression ratio (FL/MCL)
Apoptosis/cell death										
28	MCL	83	Q8WWZ3	EDARADD	Ectodysplasin A receptor associated adapter protein	interacts with EDAR DEATH domain and couples the receptor to EDA signaling pathway. Mediates the activation of NF-kappa-B.	24784	5.23	NO DIFFERENCE	1.2
38	MCL	66	Q9NYF8	ECLAF1	Bcl-2 associated transcription factor 1	Death-promoting transcriptional repressor.	106122	9.99	FL	1.5
19	FL	86	Q9HDA6		LUCA-15 protein	LUCA-15-encoded sequence variants regulate CD95-mediated apoptosis.	17055	5.24	FL	1.5
damage repair:										
6/7	FL	72	Q43254	RAD50	RAD50 homologue hRAD50	DNA damage repair; plays a central role in double-strand break (DSB) repair. DNA recombination, maintenance of telomere integrity and meiosis.	153892	6.47	FL	1.29
27	MCL	78	Q9UK02	HSPA5	GRP78 (BIP protein)	Probably plays a role in facilitating the assembly of multimeric protein complexes inside the ER.	72333	5.07	MCL	0.73
17/35	MCL	70	Q14683	SMC1L1	Structural maintenance of chromosome 1-like 1 prot.	Involved in chromosome cohesion during cell cycle and in DNA repair. Central component of cohesin complex.	142323	7.51	NO DIFFERENCE	0.95
cell cycle / proliferation										
2/14	FL	76	P52272	HNRNPM	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M	Involved in splicing. May initiate a series of signaling events leading to tyrosine phosphorylation of proteins and induction of IL-1 alpha, IL-6, IL-10 and tumor necrosis factor alpha cytokines.	77384	8.85	NO DIFFERENCE	1.05
15	FL	75	Q95347	SMC2L1	Structural maintenance of chromosome 2-like 1 prot.	Central component of the condensin complex, which probably introduces positive supercoils into relaxed DNA in the presence of type I topoisomerases and converts nicked DNA into positive knotted forms in the presence of type II topoisomerases.	135781	8.68		
4	FL	182	P11387	TOP1	DNA topoisomerase I	ATP-independent breakage of single-stranded DNA, followed by passage and rejoining.	90726	9.33	FL	5.49
17	FL	72	Q9Y6D9	MAD1L1	Mitotic spindle assembly checkpoint protein MAD1	Component of the spindle-assembly checkpoint that prevents the onset of anaphase until all chromosomes are properly aligned at the metaphase plate.	83067	5.72	FL	1.3
cellular maintenance										
7/15	FL	70	Q99968	TPR	Tpr -protein	protein p270Tpr is a constitutive component of the nuclear pore complex-attached intranuclear filaments	267335	4.98	FL	3.07
12	FL	96	Q9H8F5	CEP63	Centrosomal protein 63 kDa		81344	5.78	NO DIFFERENCE	1.05
11	FL	104	P49914	MTHFS	5-formyltetrahydrofolate cyclo-ligase	regulates cellular folate levels	23124	7.9	MCL	0.7
18	FL	99	P08631	HCK	Tyrosine-protein kinase HCK	May serve as part of a signaling pathway coupling the Fc receptor to the activation of the respiratory burst. May also contribute to neutrophil migration and may regulate the degranulation process of neutrophils.	59469	6.29	MCL	0.06
20	MCL	8381	P36578	RPL4	60s ribosomal protein L4	May bind IPO9 with low affinity.	47697	11.07	NO DIFFERENCE	1.06
25	MCL	141	P05218	TUBBS; OKSW-CL56	Tubulin beta-5 chain	Tubulin is the major constituent of microtubules.	49671	4.78	MCL	0.01
7/8/15/20/24	MCL	83	Q8LZT6	ASPM	Abnormal spindle-like neurocephaly-associated protein	Probable role in mitotic spindle regulation and coordination of mitotic processes	409802	10.45	FL	1.4
37	MCL	69	P09914	IFIT1	Interferon-induced protein with tetrapeptide repeats 1		55386	6.73	NO DIFFERENCE	0.5

transcriptional regulation

1/34	FL	78	Q96ID3	RNF20	Ubiquitin ligase protein BRE1A (RING finger protein 20)	DNA damage repair; plays a central role in histone code and gene regulation. Required for transcriptional activation of Hox genes. Recruited to the MDM2 promoter, probably by being recruited by p53/TP53, and thereby acts as a transcriptional coactivator.	113662	5,73	NO DIFFERENCE	0,8
9	FL	76	Q9NUQ1	MYEF2	Myelin expression factor 2	Transcriptional repressor of the myelin basic protein gene (MBP).	64180	8,98	NO DIFFERENCE	1,79
17	FL	95	P36897	TGFBFR1	TGF- β 1 type I receptor	Type II receptors phosphorylate and activate type I receptors which autophosphorylate, then bind and activate SMAD transcriptional regulators. Receptor for TGF- β .	55960	7,51		
16	FL	70	Q96HR3	THRAP6	TRAF3-interacting protein	Plays a role in transcriptional coactivation of nuclear hormone receptors as well as other classes of transcriptional activators.	20277	8,45		
23	MCL	71	Q15424	SAFB	scf-fold attachment factor B	Binds to scaffold/matrix attachment region (S/MAR) DNA and forms a molecular assembly point to allow the formation of a 'transcriptionosomal complex' (consisting of SR proteins and RNA polymerase II) coupling transcription and RNA processing. Can function as an estrogen receptor corepressor and can also bind to the HSP27 promoter and decrease its transcription. Can inhibit cell proliferation.	102640	5,32	FL	1,7
33	MCL	104	Q96E15	TCEAL4	TCEAL4 protein	May be involved in transcriptional regulation.	24647	5,1		
29	MCL	64	Q12804	CIR	reclin	Regulates transcription and acts as corepressor for RBPSUH. Required for RBPSUH-mediated repression of transcription.	52942	9,9		
31	MCL	64	Q9UC06	ZNF70	Zinc finger protein 70	May be involved in transcriptional regulation.	50802	8,68		

(tumor) antigens

35	MCL	75	Q8NET4	RGAG1	B1-HCC-23 tumor antigen		144280	5,81		
34/36	MCL	70	Q8N6C2	C10orf118	CTCL tumor antigen HD-CL-01 [Fragment]		103687	5,94	NO DIFFERENCE	1,51
8	FL	75	P23497	SP100	Nuclear autoantigen Sp-100	May play a role in the control of gene expression.	100417	8,49		

hypothetical proteins or unknown protein function

5/22/38	MCL	64	Q8IYED		KIAA1505 protein		112805	8,72		
10	FL	74	Q9H6N6	MYH16	FLJ22037		86993	5,29		
26	MCL	79	Q9NTU7		FLJ10498		73232	9,25	MCL	0,89
21	MCL	82	Q96A33, Q9H3E4		MSTP041	single-pass membrane protein	22659	9,36	NO DIFFERENCE	0,89
36	MCL	80	Q5T200		Coiled-coil domain-containing protein 13		196635	9,45		
30	MCL	70	Q9H0G5	CCDS5_HUMAN	Coiled-coil domain-containing protein 55		66390	8,9		

Other Protein Function

2	FL	76	O76038	SCGN	Secretagogin		32040	5,25	NO DIFFERENCE	1,08
7	FL	63	P05121	SERPINE1	Plasminogen activator inhibitor-1 [Precursor]	This inhibitor acts as 'bait' for tissue plasminogen activator, urokinase, and protein C.	45060	6,68	NO DIFFERENCE	1,1
7	FL	70	Q05932	PPG3	Folypolyglutamate synthase mitochondrial isoform	Conversion of folates to polyglutamate derivatives. This allows tissues to concentrate folate at higher levels than in plasma.	64609	8,71		
13	FL	70	Q6TE73	DNAH5	Axonemal beta dynein heavy chain	Force generating protein of respiratory cilia.	529021	5,79		
3	FL	70	Q96PB7	OLFM3	Noelin 3 [Precursor]	Secreted; Homodimer. Interacts with MYOC	54930	8,29		

Lokalisation der identifizierten Kandidatenproteine in einem funktionellen Netzwerk

Durch einen bioinformatischen Abgleich der Liste der SwissProt Identifikationsnummern der identifizierten Kandidatenproteine gegen die Ingenuity Pathways Knowledge Base (IPKB) mit Hilfe der Ingenuity Pathway Analysis Software (Version 1.2) konnten 11 der 17 (64%) in der IPKB vorliegenden Proteine in einem funktionellen Netzwerk lokalisiert werden (Abbildung 11). Dabei sind die identifizierten Proteine um zwei zentrale Moleküle des Netzwerks fokussiert: Zum

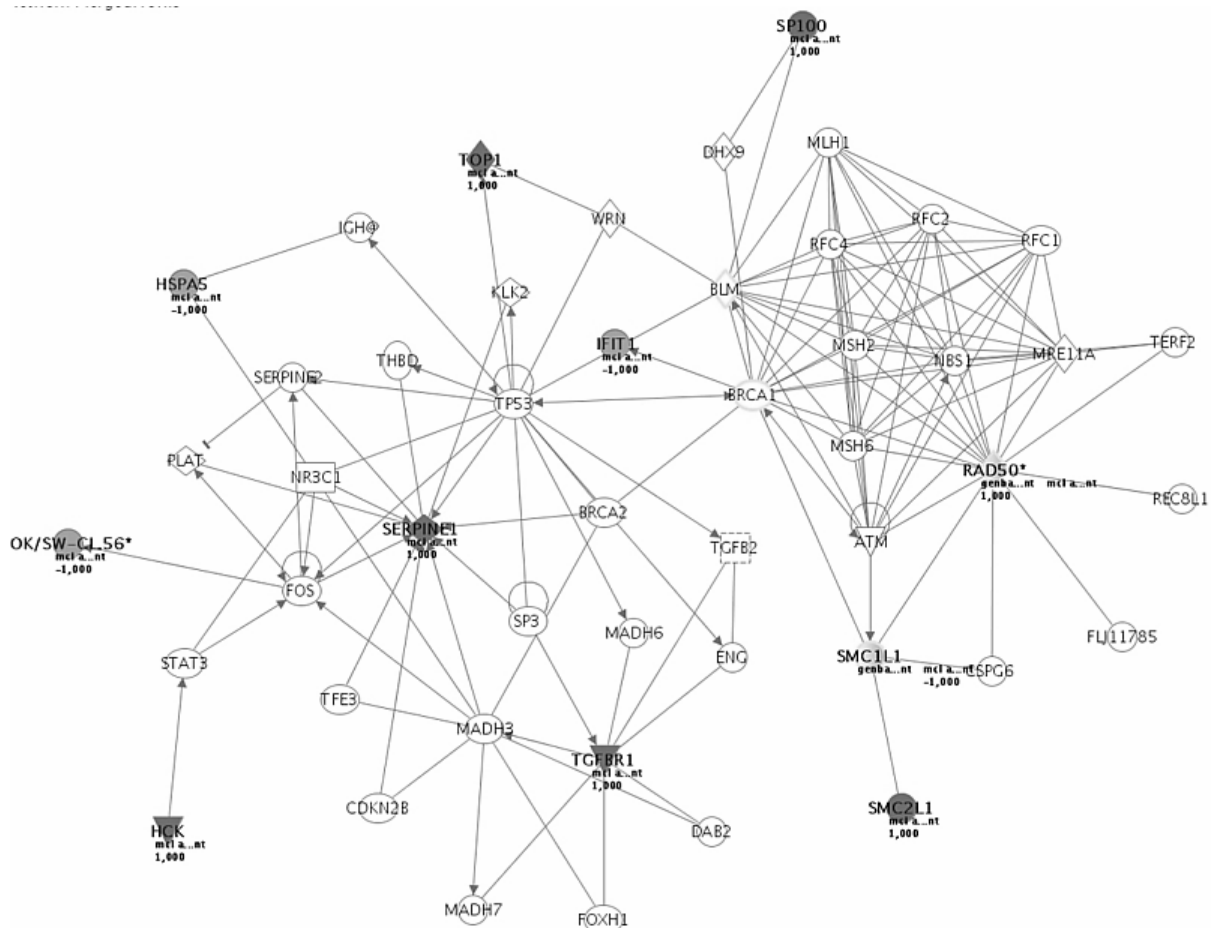


Abbildung 11: Funktionelles Netzwerk aller differenziell identifizierten Proteine.

TP53 bildet das Zentrum des ersten Teils dieses Netzwerks, was auf Unterschiede zwischen MCL und FL bei p53-kontrollierten Signalpfaden hindeutet. Das zweite Teilnetzwerk ist um das identifizierte Protein *RAD50* zentriert und über *BRCA1* mit *TP53* im Netzwerk verbunden. Zwei weitere identifizierte Proteine (*MAD1L1* and *RPL4*) interagieren indirekt mit diesem funktionellen Netzwerk.

einen clustert ein Teil der Proteine um *TP53* (*HSP AB*, *SERPINE1*, *TOP1*, *IFIT1*, *SP100*, *HSPA5*, *OK/SW56*, *HCK* and *TGFB1*). Der andere Teil der Proteine bildet einen Cluster mit den Kandidatenproteinen *Rad50*, *SP100*, *IFIT1* und *SMC1L1*, der über *BRCA 1* mit dem *TP53*-zentrierten Netzwerk verbunden ist. Zwei zusätzliche Kandidatenproteine (*Mad1L1*, *RPL4*) interagieren über indirekte Verbindungen mit diesem funktionellen Netzwerk, wodurch der Anteil der an diesem Netzwerk beteiligten Kandidatenproteine auf 76% ansteigt.

Western Blot-Analysen zur Bestätigung der Aussagen der 2D-PAGE-Experimente

Um die Aussagekraft der 2D-PAGE-Analyse zu testen, wurden Western Blot-Analysen zur Immunodetektion von 8 ausgewählten Kandidatenproteinen (*GRP78*, *MAD1*, *SAF-B*, *RAD50*, *Tubulin Beta*, *PAI-I* und *Topoisomerase I*) durchgeführt (Abbildung 12). Dabei zeigen die Western Blots tendenziell die gleichen Unterschiede der zellulären Proteinspiegel, die auch in den 2D-PAGE Proteinpunkten detektiert wurden. Allerdings waren die beobachteten Unterschiede der Proteinspiegel zwischen MCL und FL für diese Proteine generell niedriger als im Vergleich der 2D-PAGE-Gele.

Um das System weiter zu validieren, wurden auch die beiden Proteine durch Immunodetektion nachgewiesen, deren Überexpression aufgrund der primären genetischen Veränderung dieser Lymphome als Charakteristikum des entsprechenden NHL-Subtyps gilt (*Cyclin D1* für MCL und *BCL-2* für FL), wobei *Cyclin D1* ausschließlich in MCL-Zelllinien, *BCL-2* im FL und ebenfalls im MCL exprimiert wird.

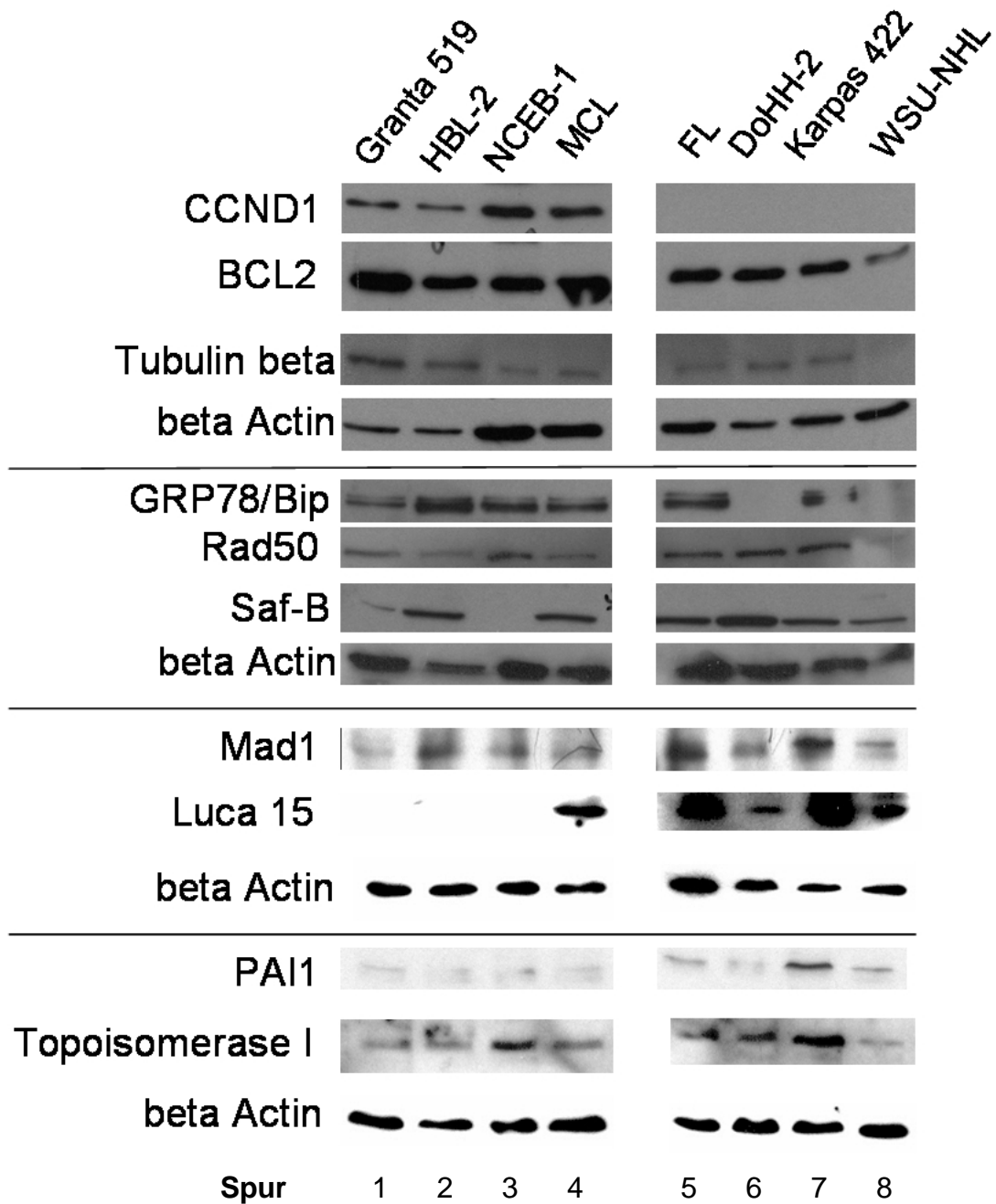


Abbildung 12: Semiquantitative Analyse der Unterschiede der Proteinspiegel von 10 ausgewählten Kandidatenproteinen durch Western Blot.

Membran 1: Cyclin D1, Bcl-2, Tubulin-beta und beta-Actin (Kontrolle);

Membran 2: GRP78, hRad50, Saf-B, beta-Actin (Kontrolle);

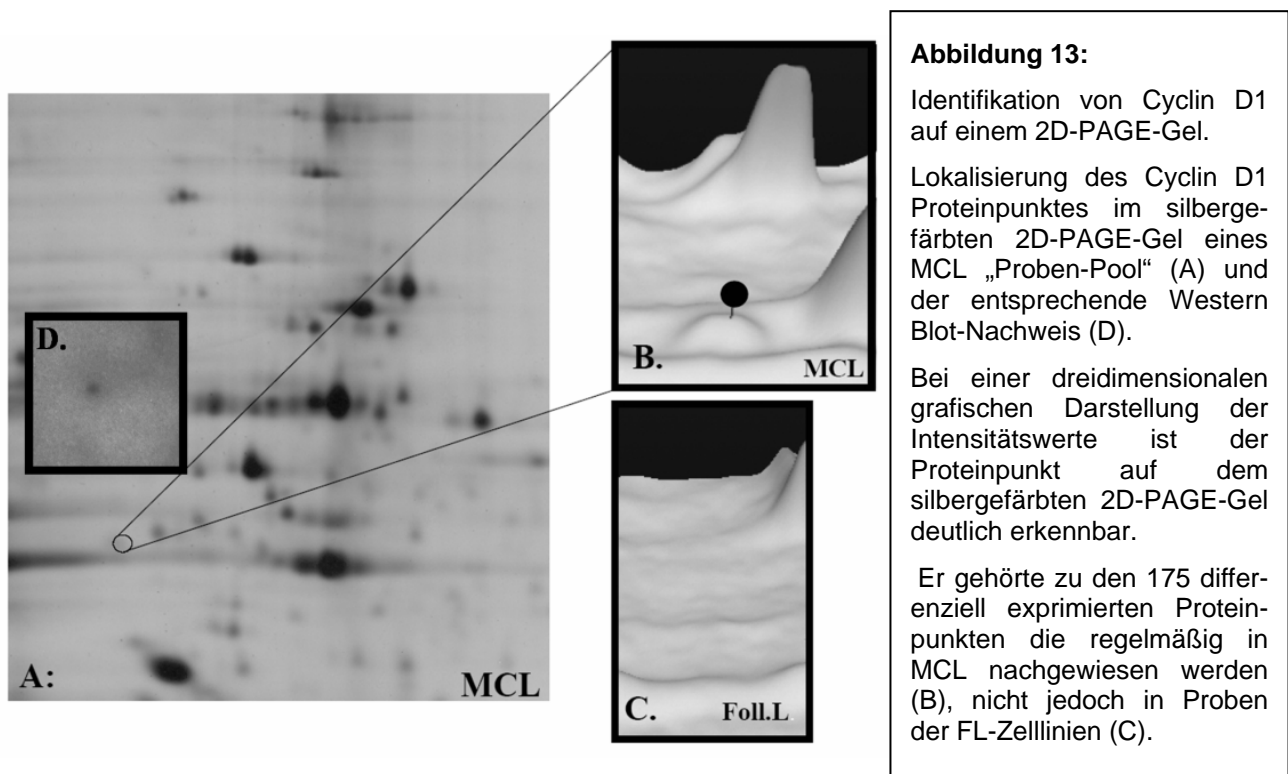
Membran 3: Luca-15, beta-Actin (Kontrolle);

Membran 4: Pai-1, Topoisomerase I, Mad1, beta-Actin (Kontrolle).

Spur 1: Granta 519; 2: HBL-2; 3: NCEB-1; 4: MCL-Pool (Granta 519, HBL-2, NCEB-1)

Spur 5: FL-Pool (DoHH-2, Karpas-422, WSU-NHL); 6: DoHH-2; 7: Karpas-422; 8: WSU-NHL.

Beide Proteine wurden auch auf einem 2D-PAGE-Western Blot untersucht. Dabei konnte Cyclin D1 nur auf dem 2D-PAGE-Western Blot der MCL-Zelllinien (aber nicht auf dem der FL-Zelllinien) nachgewiesen werden mit einer Lokalisation entsprechend seiner theoretischen Molekularmasse und pI. Cyclin D1 konnte dabei als einer der 175 bei MCL und FL differentiell exprimierten Proteinpunkte bestätigt werden. Allerdings lag der Intensitätswert in der ProteomeWeaver-Auswertung niedriger als 0,1, so dass dieser Proteinpunkt nicht für die MS-Proteinidentifikation verwendet wurde (Abbildung 13).



Wie aus den eindimensionalen Western Blots zu erwarten war, konnte BCL-2 in den 2D-PAGE-Western Blots beider NHL-Subtypen in etwa gleichen Konzentrationen nachgewiesen werden. Allerdings waren interessanterweise nur auf dem 2D-PAGE-Western Blot der FL-Zelllinien neben dem auch in MCL auftretenden „Hauptpunkt“ eine Reihe zusätzlicher schwacher „Nebenpunkte“ detektierbar. Dies deutet darauf hin, dass Bcl-2 in den Zellen der FL-Zelllinien in erhöhtem Maße in verschiedenen,

posttranslational modifizierten Formen vorkommt (Fadeel *et al.* 1999, Fu und Fan 2002), während in den MCL-Zelllinien diese „Nebenpunkte“ nicht detektierbar waren.

Eingeschränkte Korrelation der RNA-Expressionsdaten mit der Analyse der zellulären Proteinspiegel

Schließlich wurden die erhobenen Proteindaten noch mit dem Ergebnis einer RNA-Expressionsanalyse der beiden NHL-Subtypen verglichen. Von den 22283 Sonden auf dem HG-UA133A Affymetrix Microarray-Chip wiesen 12010 (54%) bei den MCL- und 11599 (52%) bei den FL-Zelllinien auf eine Genexpression hin. Basierend auf einem Expressions-Schwellenwert $\geq 1,2$, wie er von Kohlmann (Kohlmann *et al.* 2003) definiert wurde, zeigten 3389 RNAs (15%) eine höhere Expression in FL und 2906 RNAs (13%) höhere Expressionsspiegel in MCL, während bei den restlichen 15988 der 22283 RNAs vergleichbare Expressionspiegel in den beiden NHL-Subtypen nachgewiesen wurden. Auf den Microarray-Chips waren 26 der massenspektrometrisch identifizierten Kandidaten repräsentiert. Von diesen zeigten 9 (34,6%) ein den zellulären Proteinspiegeln ähnliches Expressionsverhalten. Bei 12 weiteren Fällen (46,1%) konnten dagegen keine Unterschiede zwischen den Expressionsraten der beiden NHL-Subtypen festgestellt werden. Bei den restlichen 5 Fällen (19,2%) verhielten sich die Ergebnisse der RNA-Expressionsanalyse zu den Ergebnissen der Analyse der zellulären Proteinspiegel reziprok. Die Expressionsanalyse bestätigte jedoch die im Western Blot nachgewiesenen unterschiedlichen *BCL2*-Spiegel bei MCL und FL und die ausschließliche Detektion der Cyclin D1 RNA-Expression im MCL.

Interessanterweise war die *TP53*-Expression in FL-Zelllinien um den Faktor 1,79 niedriger als in MCL-Zelllinien.

Abschließend kann somit festgestellt werden, dass die Daten der RNA-Expressionsanalyse nur in begrenztem Maße mit den beobachteten Proteinspiegeln übereinstimmten, was die Bedeutung posttranslationaler Regulationsmechanismen auf den Proteinumsatz bei der Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase unterstreicht.

4.2 Untersuchungen mit dem 26s-Proteasom-Inhibitor Bortezomib

4.2.1 Wirksamkeit der Bortezomib-Behandlung bei MCL-Zelllinien

Antiproliferative Wirkung von 25nM Bortezomib in MCL-Zelllinien

Um den Effekt von Bortezomib auf verschiedene MCL-Zelllinien (Granta 519, HBL-2, JeKo-1, NCEB-1 und REC-1) zu untersuchen, wurden diese, sowie zwei hämatologische Kontrollzelllinien, die T-ALL-Zelllinien Jurkat und die t(14;18)(q32;q21)-positive DLBCL-Zelllinie Karpas 422, bei einer Zelldichte von $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml über 72h mit verschiedenen Dosen Bortezomib behandelt und die Zellzahl mittels des Trypanblau-Ausschlusstests analysiert. In allen Zelllinien konnte eine dosis- und zeitabhängige Proliferationshemmung sowie eine verminderte Zellviabilität nachgewiesen werden. So waren im Vergleich zu den unbehandelten Zellen die Zahl viabler (Trypanblau-negativer) Zellen vermindert (Abbildung 14) und der Anteil Trypanblau-positiver Zellen erhöht. Sowohl MCL- als auch Kontrollzelllinien lagen dabei, mit Ausnahme von NCEB-1 (resistent gegen Bortezomib-Behandlung)

und Jeko-1 (hohe Sensitivität für Bortezomib) im gleichen Empfindlichkeitsbereich. Dieser Mittelwert lag bei 25nM Bortezomib, einem Wert, der auch klinisch erreicht werden kann, und der einer Dosis von 1,5mg/m² entspricht.

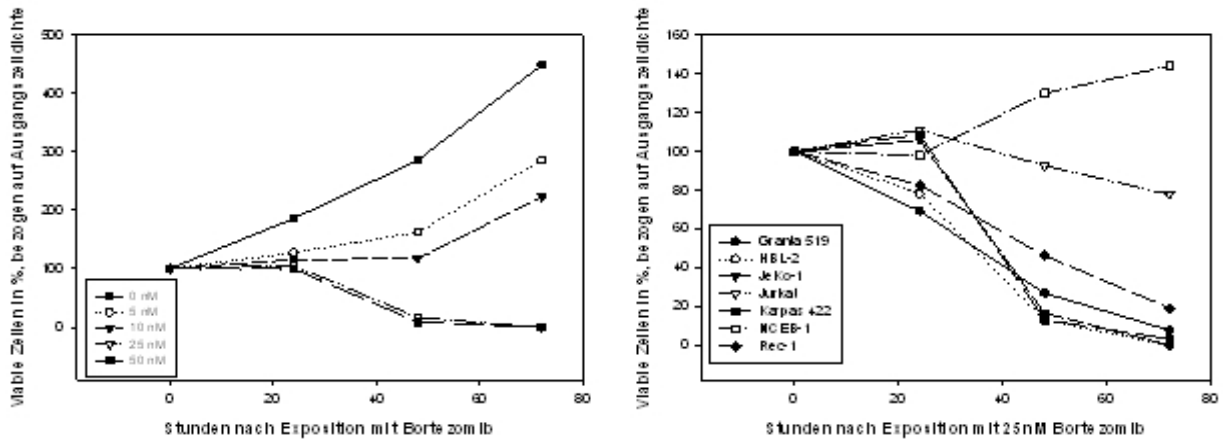


Abbildung 14: Viabilitäts-Reduktion durch Bortezomib nach 24, 48 und 72 h

Alle Zelllinien wurden mit einer Zelldichte von $0,5 \times 10^6$ /ml ausgesät und über 72h Bortezomib ausgesetzt. Zu den Messzeitpunkten wurde die Viabilität mittels Trypanblau-Ausschluss-Test bestimmt.

(links) Zelldichte der Zelllinie JeKo-1 bei einem Konzentrationsgradienten von 0 bis 50 nM; Bortezomib besitzt eine dosis- und zeitabhängige proliferationshemmende Wirkung.

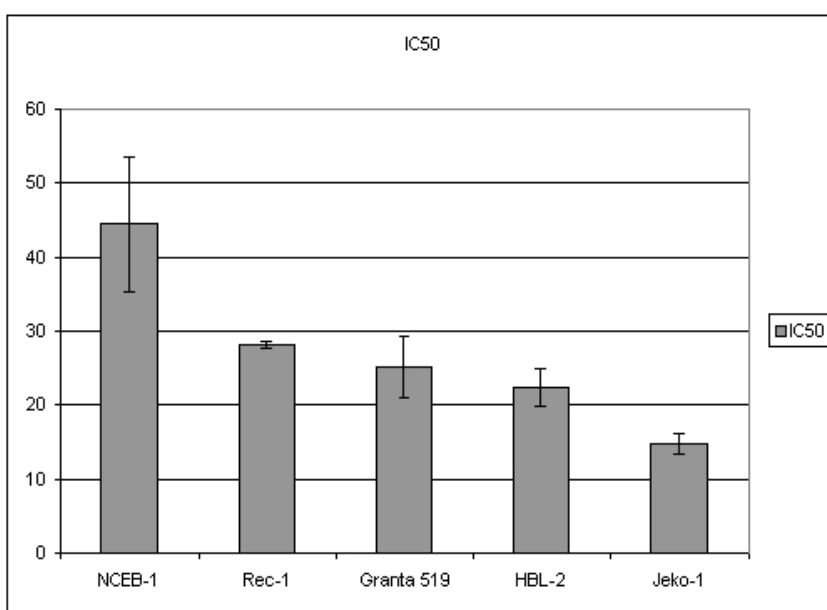
(rechts) Zelldichte verschiedener MCL Zelllinien bei einer Dosis von 25nM Bortezomib

Die verschiedenen MCL-Zelllinien zeigen deutliche Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber Bortezomib-Exposition.

Bestimmung der IC₅₀-Werte der MCL-Zelllinien bei der Gabe von 25nM Bortezomib

Zur genaueren Beurteilung der antiproliferativen Wirkung von Bortezomib auf die Zelllinien wurden für die einzelnen Zelllinien die IC₅₀-Werte mit Hilfe des WST1-Zellproliferationstests bestimmt. Dazu wurden 1×10^6 Zellen/ml im 96-well-Format ausgesät, mit einem Bortezomib-Konzentrationsgradienten von 100nM bis 6,125nM behandelt und über 24h inkubiert, um die relativen Proliferationswerte mit WST1 zu detektieren. Die IC₅₀-Werte der Zelllinien entsprachen dabei gut den im Trypanblau-Ausschlusstest ermittelten Proliferationsraten. Auch in der Auswertung der WST1-

Analysen erwies sich NCEB-1 mit einem IC_{50} von $44,5 \pm 9,1$ nM als resistent gegen Bortezomib, während Jeko-1 mit einem IC_{50} von $14,8 \pm 1,3$ nM besonders sensitiv auf die Behandlung reagierte. Die IC_{50} -Werte aller anderen Zelllinien lagen innerhalb eines Bereichs von $20,3 \pm 2,2$ nM bis $25,2 \pm 4,2$ nM Bortezomib. Da die detektierte wirksame Konzentration von 25 nM Bortezomib sowohl bei allen Zelllinien eine antiproliferative Wirkung zeigte als auch klinisch relevant ist, wurden alle weiteren Untersuchungen mit dieser Bortezomib-Konzentration durchgeführt (Abbildung 15).



ZL	IC_{50}
NCEB-1	44,5 +/- 9,1
Rec-1	28,2 +/- 0,4
Granta 519	25,2 +/- 4,2
HBL-2	22,4 +/- 2,6
Jeko-1	14,8 +/- 1,3

Abbildung 15: Übersicht über die IC_{50} – Werte der MCL-Zelllinien für Bortezomib

Die IC_{50} – Werte wurden über einen Bortezomib-Konzentrationsgradienten von 100 - 6,125 nM durch den WST-1 Zellproliferations – Test ermittelt. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen.

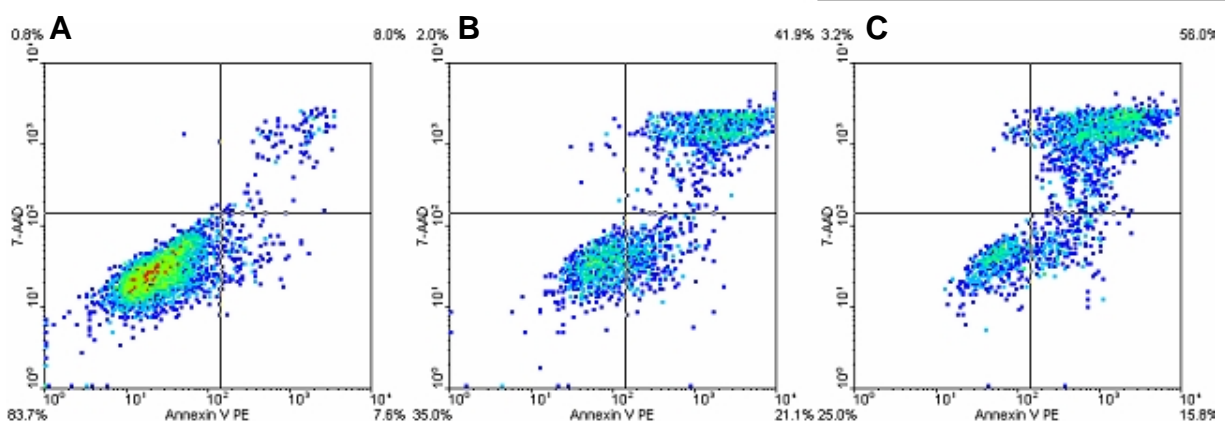


Abbildung 16: Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Apoptoseinduktion durch Bortezomib-Exposition (25 nM) am Beispiel der MCL-Zelllinie Granta 519

- (A) Granta 519 vor Bortezomib- Exposition
- (B) Granta 519 nach 12h Exposition (25 nM Bortezomib)
- (C) Granta 519 nach 24h Exposition (25 nM Bortezomib)

Die Zellpopulation verschiebt sich dabei deutlich von viablen (doppelt-negativen) zu (spät-)apoptotischen (doppelt-positiven) Zellen.

Antiproliferative Wirkung von Bortezomib durch Apoptoseinduktion

Es ist bekannt, dass Bortezomib in verschiedenen Tumorentitäten Apoptose-induzierend wirkt. Um das Ausmaß dieses Effekts bei MCL-Zelllinien zu untersuchen, wurde die Apoptoserate behandelter Zelllinien nach 12h und 24h mit dem Annexin V-PE/7-AAD Test untersucht (Abbildung 16). Nach 12h Bortezomib-Behandlung lag der Anteil der nicht-apoptotischen MCL – Zellen zwischen 50% und 82,4%, nach 24h zwischen 22,1% und 75,3% der Ausgangszellzahl. Auch hierbei bestätigte sich die Beobachtung der Proliferationsanalysen, dass NCEB-1 resistent und Jeko-1 besonders sensitiv waren, während sich die anderen Zelllinien im üblichen Wirkungsbereich befanden (Abbildung 17).

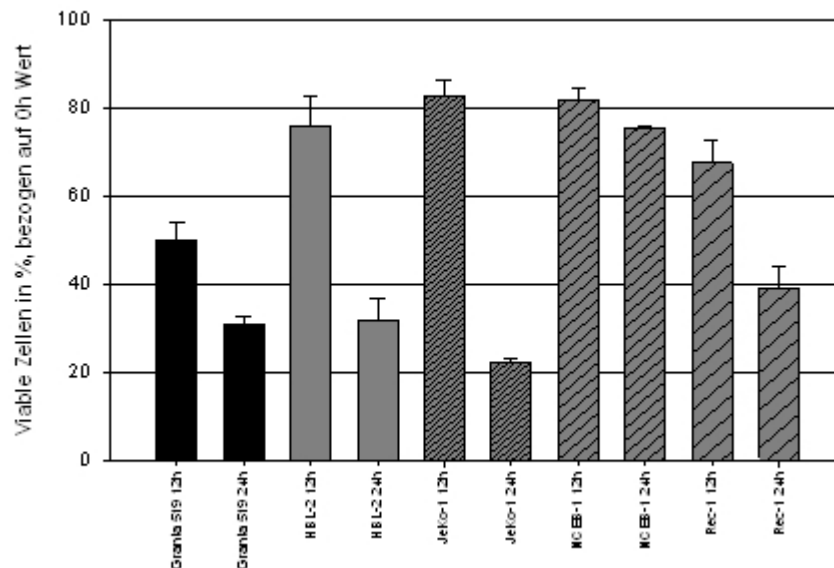


Abbildung 17: Übersicht über die Apoptose-Induktion für die verschiedenen MCL-Zelllinien

Abgebildet ist der Prozentsatz viabler Zellen 12 und 24 h nach einer Gabe von 25nM Bortezomib im Vergleich zur Zellzahl viabler unbehandelter Zellen.

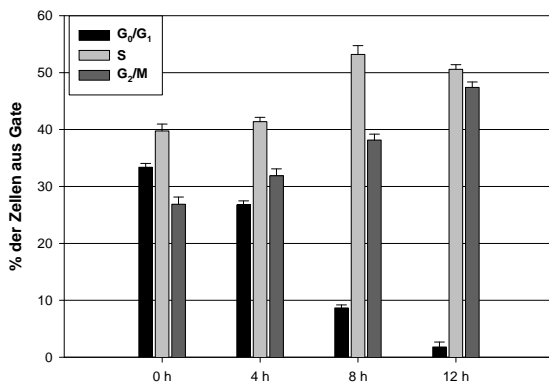
Das Diagramm repräsentiert den Mittelwert der durchflußzytometrischen Analyse von drei unabhängigen Versuchen.

Induktion eines G₂/M-Arrestes durch Bortezomib-Behandlung

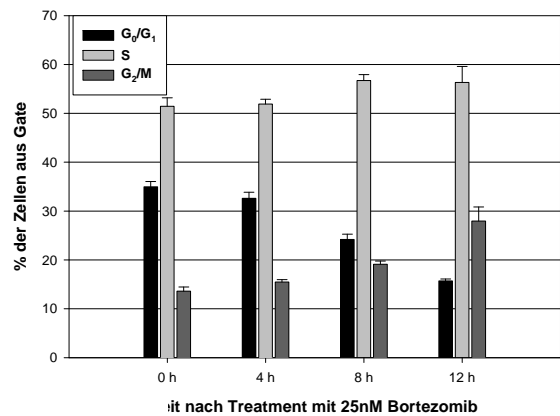
Zusätzlich zur Untersuchung der Apoptoserate wurden die Veränderungen des Zellzyklusprofils der Bortezomib-behandelten Zelllinien mittels Propidiumiodid (PI)-Färbung analysiert, um zu klären, ob der Rückgang der Proliferationsraten der behandelten Zelllinien ausschließlich auf die Apoptoseinduktion zurückzuführen ist. Da die Veränderungen des Zellzyklusprofils einer Apoptoseinduktion vorausgehen, und alle MCL-Zelllinien bereits eine deutliche Apoptoseinduktion zeigten, wurden für diese Versuche 4h, 8h und 12h nach Inhibitorgabe Analysen durchgeführt und mit dem Zellzyklusprofil unbehandelter Kulturen verglichen. Entsprechend stieg unter Bortezomib-Exposition zeitabhängig auch der Anteil der in der Sub-G₁-Phase detektierten Zellen an, die apoptotischen Nuklei entsprechen, wie bereits zuvor beschrieben (Gatto *et al.* 2003, Vaziri *et al.* 2005). In unseren Analysen wurde diese Zellpopulation bei der Verteilung der Zellzyklusphasen nicht berücksichtigt. Innerhalb des Beobachtungszeitraums wurde nach Bortezomib-Behandlung bei allen MCL-Zelllinien eine Expositionszeit-abhängige, kontinuierliche Verschiebung der Zellzyklusphasen beobachtet, die durch eine Zunahme der G₂/M-Phase und einer entsprechenden Abnahme der G₀/G₁-Phase gekennzeichnet war. Diese Ergebnisse deuten auf einen G₂/M-Zellzyklusarrest hin (Abbildung 18).

Auch bei dieser Analyse stimmten die Ergebnisse bezüglich der Sensitivität der Zelllinien mit denen der vorangegangenen Untersuchungen überein, so dass die Verschiebung des Zellzyklusprofils bei den resistenteren MCL-Zelllinien NCEB-1 und REC-1 deutlich geringer ausgeprägt war als bei den sensitiveren Zelllinien. Eine Ausnahme bildet die besonders Bortezomib-sensitive Zelllinie Jeko-1, bei der zwar eine Reduktion der G₀/G₁-Phase zu beobachten war, der Anteil der Zellen in der G₂/M-Phase jedoch nur geringfügig anstieg.

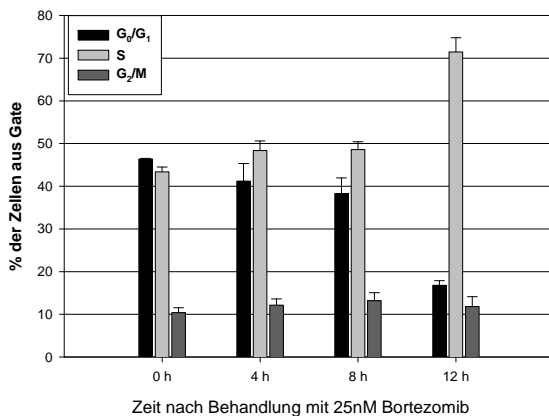
Granta 519



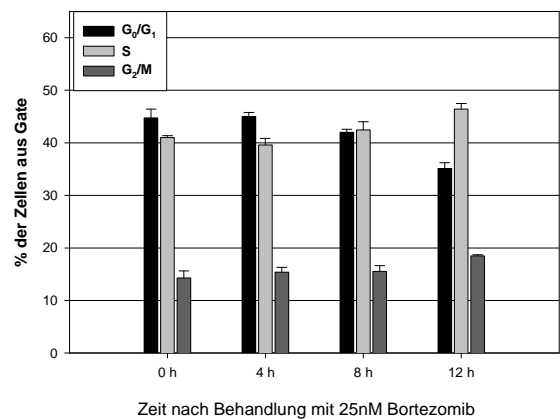
HBL-2



JeKo-1



NCEB-1



Rec-1

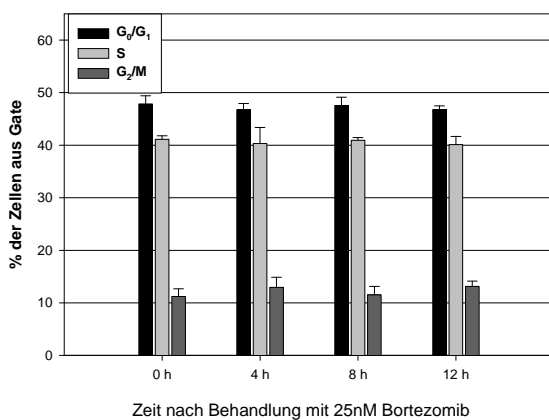


Abbildung 18: Zellzyklusanalysen der MCL-Zelllinien

Veränderung der prozentualen Zusammensetzung der Zellzyklusphasen verschiedener MCL-Zelllinien innerhalb der ersten 12h nach Exposition zu 25nM Bortezomib. Deutlich sichtbar ist ein Anstieg des Anteils der Zellen in der S- und ein analoger Rückgang des Anteils der Zellen in der G₀/G₁-Phase in Abhängigkeit zur Bortezomib - Sensitivität der MCL Zelllinien.

(Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten)

4.2.2 Proteom-Analyse

Analyse der Veränderungen der zellulären Proteinspiegel der MCL-Zelllinien nach Bortezomib-Behandlung

Wie im vorangehenden Abschnitt beschrieben, wurden alle Versuche mit einer Konzentration (25nM) Bortezomib durchgeführt, die dem durchschnittlichen IC_{50} aller Bortezomib-sensitiven MCL-Zelllinien entspricht (Weigert *et al.* 2007). Da innerhalb der ersten 12h nach Bortezomib-Behandlung einerseits eine deutliche Apoptose-induktion in den verwendeten Zelllinien festgestellt wurde, und andererseits die Proteasomenhemmung bereits 1h nach Exposition gezeigt wurde (Schwartz und Davidson 2004), wurden die Proteomanalysen zu den 1h- und 4h-Zeitpunkten durchgeführt und mit unbehandelten Kontrollzellen verglichen, um die durch die Proteasomenhemmung ausgelösten Veränderungen der zellulären Proteinspiegel zu erfassen, aber auch Translationsprozessen Rechnung zu tragen. Bei dreifachen Experimenten aller 5 untersuchten MCL-Zelllinien wurden durchschnittlich 1500 Proteinpunkte auf den 2D-PAGE Gelen identifiziert. Davon konnten mindestens 1013 Proteinpunkte in allen sensitiven MCL-Zelllinien reproduzierbar detektiert werden. Etwa 15% (148/1013) aller auf den 2D-PAGE-Gelen abgebildeten zellulären Proteine zeigten dabei eine Veränderung ihrer Proteinspiegel um das 10fache, während 19,8% (201/1013) um den Faktor 5 veränderte Proteinspiegel aufwiesen. Wie aufgrund der Wirkung der Proteasomeninhibition erwartet, stiegen die zellulären Spiegel der Mehrzahl (79%; 158/201) der letzteren Proteine an, während nur bei 21% (44/201) dieser Proteinpunkte eine Verringerung der Proteinspiegel beobachtet wurde. Etwa 65% (133/201) dieser Proteinpunkte zeigten veränderte Proteinspiegel bereits 1h nach Bortezomib-Exposition, während die verbleibenden 68 Proteinpunkte erst nach 4h eine Veränderung um den Faktor 5 erreichten.

Für die MS-Identifikation wurden die 41 Proteinpunkte mit mehr als 10fach-veränderten Proteinspiegeln ausgewählt, die gleichzeitig eine minimale Punktintensität von 0,1 besaßen (Abbildung 19). Von diesen 41 ausgewählten Proteinpunkten erreichten 95,1% (d.h. 39 Proteinpunkte) den Schwellenwert bereits nach 1h, wohingegen die Intensitäten der verbleibenden 2 Punkte erst nach 4h um den Faktor 10 verändert waren. Interessanterweise zeigten diese beiden Proteinpunkte eine Reduktion ihrer Proteinspiegel, während alle Proteinpunkte mit steigenden Proteinspiegeln den Schwellenwert bereits nach 1h erreichten. Nach 1h Bortezomib-Exposition waren die Proteinspiegel von 28 der 41 ausgewählten Punkte (68%) deutlich erhöht, die restlichen 11 Proteinpunkte wiesen bereits nach 1h eine deutliche Abnahme des Proteingehaltes auf.

Identifikation von 38 differenziell auftretenden Proteinpunkten durch MALDI-TOF MS

38 der 41 analysierten Proteinpunkte konnten durch MALDI-TOF MS signifikant identifiziert werden, während die drei übrigen Peptidproben nicht charakterisiert werden konnten (Tabelle 4). Interessanterweise konnten veränderte Proteinspiegel von 20 der 41 (48,8%) analysierten Proteinpunkte auch in der Bortezomib-refraktären Zelllinien NCEB-1 nachgewiesen werden (Tabelle 4b), während die Spiegel der anderen 21 Proteinpunkte nur in den Bortezomib-sensitiven Zelllinien verändert waren (Tabelle 4a).

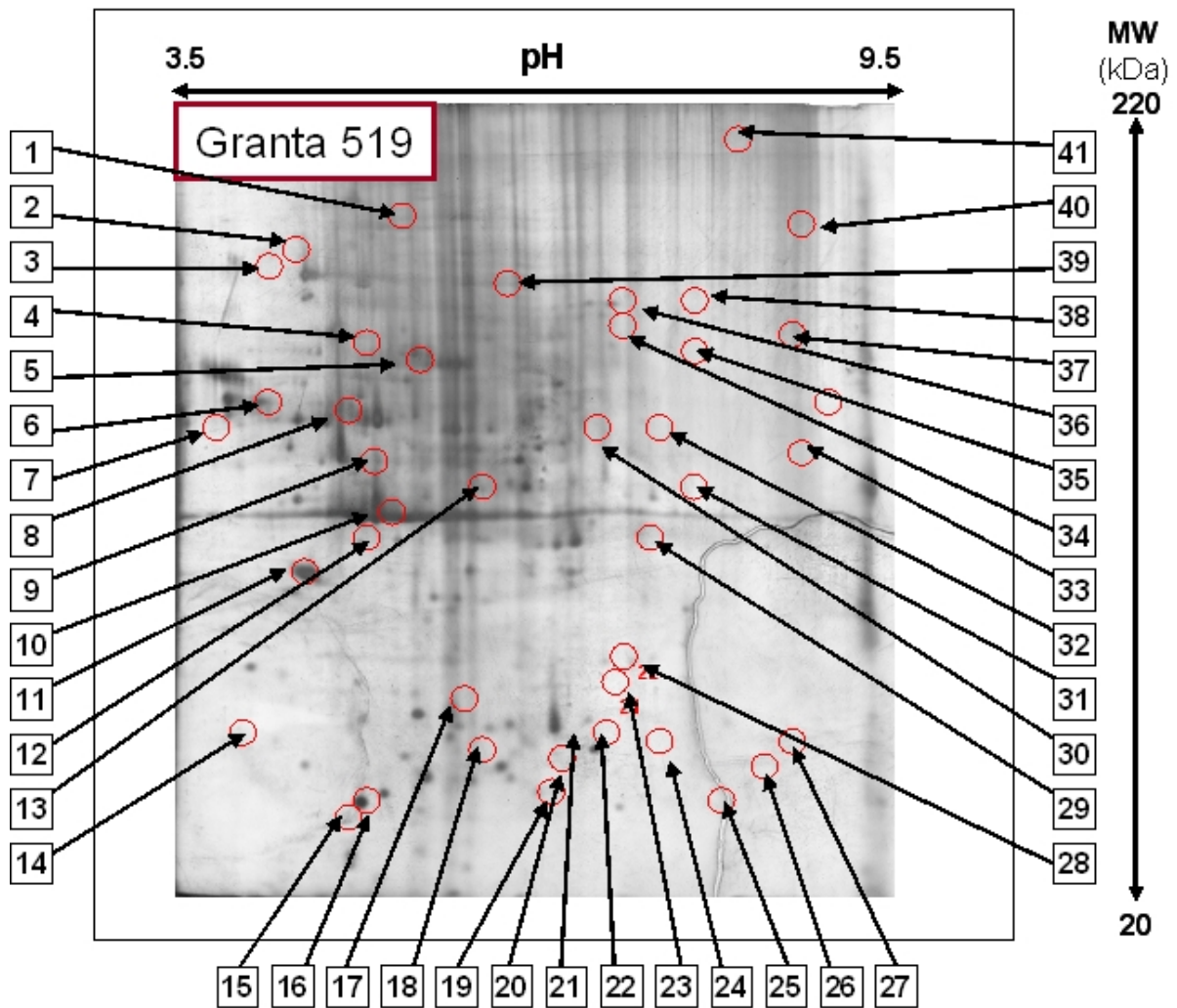


Abbildung 19:

Lokalisierung der durch Bortezomib-Exposition veränderten Proteinpunkte auf einem 2D-PAGE Gel der MCL-Zelllinien

(Granta 519 nach 1h Bortezomib-Exposition)

Tabelle 4: (folgende Seiten) Funktionelle Charakterisierung der Kandidatenproteine der identifizierten, durch Bortezomib-Exposition veränderten Proteinpunkte.

In separaten Spalten sind die relativen Werte der Protein- und RNA-Spiegel vermerkt.

Die Spot-Nummer bezieht sich auf die identifizierten Proteinpunkte in Abbildung 9.

MOWSE-Werte über 62 entsprechen einer Signifikanz von $p < 0.05$ für die Identifikation des Proteins.

Tabelle 4a: Funktionelle Identifikation von ausschließlich in Bortezomib-sensitiven MCL-Zelllinien veränderte Proteinpunkte

Protein-punkt	Swiss-Prot. Accession #	Gen-Bezeichnung	Protein-Bezeichnung	Proteinfunktion	Protein-spiegel	Cell Viability	MOWSE-Wert	% Konfidenz
2					↗ (1 h)			
	Q13519	PNOC	Noiceptin precursor (Orphanin FQ) (PPNOC) (PNOC_Human)	Wachstumsfaktor/Ligand/Zytokin/Chemokine	↗	↗	56	96,59
	Q14863	SMC1A	SMC1A_Human (structural maintenance of chromosome 1 like protein, SMC1alpha protein)	DNA repair, cell division, motor, protein binding	↗	↗	60	96,673
	P06576	ATP4B	ATP4B_HUMAN (ATP synthase beta chain, mitochondrial)	ATPase; hydrolase, protein binding, transporter	↗	↗	135	100
9	P63261	ACTG1	Actin, cytoplasmic 2 (Gamma-Actin)	Zytoskelett; Protein-bindend	↗ (1h)	↗	155	100
	P60709	ACTB	Actin beta	Zytoskelett; Protein-bindend	↗	↗	165	99,5
	P62736	ACTA2	Actin alpha	Zytoskelett; Protein-bindend	↗	↗	165	99,5
10	P63261	ACTG1	Actin gamma	Zytoskelett; Protein-bindend	↗ (1 h)	↗	303	100
11	O76041	NEBL	Nebulette (actin-binding z-disk protein, NEBL_HUMAN)	Zytoskelett	↗	↗	54	95,183
	P62995	SFRS10	Arginine/serine-rich splicing factor 10 (Transformer-2 beta) (HTRA2-beta) (TRA2B_Human) (Transformer 2 Protein homolog)	Protein-bindend; Kontrolle des pre-mRNA-Splicing	↗	↗	90	100
	P07910	HNRPC	HNRPC protein (heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2)	RNA-bindend	↗	↗	149	100
12	P63261	ACTG1	Actin, cytoplasmic 2 (Gamma-Actin)	Zytoskelett; Protein-bindend	↗ (1 h)	↗	155	100
	P63261	ACTG1	Actin gamma	Zytoskelett; Protein-bindend	↗	↗	123	100
	P62736	ACTA2	Actin-alpha	Zytoskelett; Protein-bindend	↗	↗	134	100
13	P60709	ACTB	Actin-beta	Zytoskelett; Protein-bindend	↗ (1 h)	↗	206	100
19	P30048	PRDX3	Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial precursor (Peroxiredoxin 3) (Antioxidant protein 1) (AOP-1) (MER5 protein homolog) (HBC188) (PRX-III) (PRDX3_Human)	Oxidoreductase; Peroxidase	↗ (1 h)	↗	222	100
20	O7560B	LYPLA1	Acylprotein-thioesterase 1 (LYPLA1_HUMAN)	Hydrolase	↗ (1 h)	↗	58	97,945
	Q9Y6X8	AK5	Adenylate kinase isoenzyme 5 (ATP-AMP transphosphorylase) (KAD5_Human)	Transferase	↗	↗	57	97,53
	Q13813	SPTAN1	Spectrin alpha-chain, brain (spectrin alpha non erythrocytic 1) (alpha-fodrin)	Zytoskelett; Apoptose durch Todesrezeptoren	↗	↗	70	99,9
22	G70J48	MORKL2C	Mps one binder kinase activator-like 2C (Mob-1-homologue 3C)	Reguliert möglicherweise die Aktivität von Kinasen	↗ (4 h)	↗	56	96,9
	P13929	ENO3	Enolase3 (beta-enolase)	Lyase	↗	↗	77	96,596
	P09104	ENO2	ENO2 (gamma enolase)	Lyase	↗	↗	82	99,993
			Hypothetical Protein (gi162546922)		?	?	87	99,998
			Hypothetical Protein (gi181873302)		?	?	166	100
	P06733	ENO1	ENO1 protein	DNA-bindend; Lyase; Transkriptionsfaktor	↗	↗	173	100
23	P60174	TPH1	Trospophosphate isomerase (TIM) (Trospophosphate isomerase) (TPIS_Human)	Isomerase; Glycolyse	↗ (1 h)	↗	1020	100
25					↗ (1 h)			
	Q6NDY7	PGAM4	Putative Phosphoglycerate mutase 3 (PGAM3_Human)	Hydrolase; Isomerase	↗	↗	162	100
	P15259	PGAM2	Phosphoglycerate mutase 2 (Phosphoglycerate mutase isoenzym M) (PGAM-M) (Muscle-specific phosphoglycerate mutase) (PGAM2_Human)	Hydrolase; Isomerase	↗	↗	220	100
28	P18669	PGAM1	Phosphoglycerate mutase 1 (Phosphoglycerate mutase isoenzym B) (PGAM-B) (EPG-dependent PGAM 1) (PGAM1_Human)	Hydrolase; Isomerase	↗ (1 h)	↗	645	100

Protein- punkt	Swiss-Prot. Accession.#	Gen- Bezeichnung	Protein-Bezeichnung	Proteinfunktion	Protein- spiegel	Cell Viability	MOWSE- Wert	% Konfidenz
30	P09972	ALDOC	Fructose-bisphosphate aldolase C (Brain type aldolase)	Lyase, Glycolyse		↖	74	99,947
	Q15366	PCBP2	Poly(C)-binding protein 2 (Alpha-CF2) (PCBP2_human)	DNA-bindend; RNA-bindend; Protein-bindend		↗	83	100
	P57721	PCBP3	Poly(C)-binding protein 3 (Alpha-CF3) (PCBP3_human)	DNA-bindend; RNA-bindend; Protein-bindend		↗	88	100
	Q15365, P06733	ENO1	phospho-D-glycerate hydro-lyase (Non Neutral Enolase) (NNE) (c-Myc promotor-binding protein) (MBP-1) (MPB-1) (Plasminogen-binding protein)	DNA-bindend; Lyase, Transkriptionsfaktor		↗	197	100
		PCBP1	Poly(C)-binding protein 1 (Alpha-CF1) (PCBP1_human)	DNA-bindend; RNA-bindend; Protein-bindend	(1 h)	↗	244	100
31	P07964	FH	fumarate hydratase (EC4.2.1.2) precursor, mitochondrial	Lyase, fungiert auch als Tumorsuppressor.		↗	56	98,6
		-	Hypothetical Protein (gi131873302)			?	77	98,425
	P06733	ENO1	ENO1 protein	DNA-bindend; Lyase, Transkriptionsfaktor		↗	83	99,647
		-	unnamed protein product (gi134535151)			?	91	99,909
	P04406	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, liver (EC1.2.1.12) (GAPDH) (G3P2_Human)	Oxidoreductase, Glycolyse	(1 h)	↗	95	100
32		AK5	Adenylate kinase isoenzyme 5 (ATP-AMP transphosphorylase) (KAD5_Human)	Transferase		↗	73	99,939
	P62195	PSMCS	26S protease regulatory subunit 8 (Proteasome subunit r45) (p45/SUG) (proteasome 26S subunit ATPase 5) Thyroid hormone receptor-interacting protein 1) (TRIP1) (FRS3_Human)	ATPase, Hydrolase, Antigen Prozessierung und Präsentation durch MHCs, CDK5 Signalkweg, DNA-Reparatur-Mechanismus, ER-vermittelte Phagozytose, Ostrogen-vermittelter S-Phasen-Eintritt, G2-M Phasen-Übertritt, Ubiquitin-Proteasome-abhängiger Proteinabbau, WNT- Signalkweg, p53-Signalkweg		↗	147	100
	P20472	PVALB	Structural maintenance of chromosome 1-like 1 protein (SMC1alpha protein)			↗	77	98,6
	P26098	MSN	Moessin (Membrane-organizing extension spike protein) (MOES_Human)	Zytoskelett	(1 h)	?		99,8
	Q96L93	C20orf23	kinesin-like motor protein C20orf23 (Sorting nexin23) (SNX23_Human)	Motor-Protein; Protein-bindend		↗	68	99,799
34	P40227	CCT6A	T-complex protein 1, zeta subunit (TCP1-zeta) (CCT1-zeta) (CCT1-zeta-1) Tcp20) (HTR3) (Acute morphine dependence related protein 2) (TCPZ_Human)	Proteinfaltung (Actin/Tubulin)		↗	68	99,825
	Q12931	TRAP1	heat shock protein 75kDa (Tumor necrosis factor type 1 receptor associated protein) (TRAP-1) (TNFR-associated protein 1)	unbekannter biologischer Prozess; Proteinfaltung; Bindet an die intrazelluläre Domäne des Tumor Necrose Faktor Typ 1 Rezeptor; Bindet an RB1.		↗	96	100
	Q9Y6K8	AK5	Adenylate kinase isoenzyme 5 (ATP-AMP transphosphorylase) (KAD5_Human)	Transferase	(1 h)	↗	52	93
	P31948	STIP1	Stress-induced-phosphoprotein 1 (STI1) (Hsc70/Hsp90-organizing protein) (Hop) (Transformation-sensitive protein IEF SSP 3521) (STIP1_Human)	Transferase	(1 h)	↗	55	96,065
	P14866	HNRPL	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L (hnRNP.L) (P/Okl.1.14) (HNRPL_human)	Vermittelt die Bindung der molekularen Chaperone HSC70 und HSP90 (HSPCA und HSPCB)	(1 h)	↗	632	100
38	P69905	HBA1; HBA2	Hemoglobin alpha chain (HBA_human)	RNA-bindend; pre-miRNA Prozessierung		↗	86	99,997
	P68871	HBB	Hemoglobin beta chain (HBB_human)	Sauerstofftransport		?	100	100
	Q9Y6K8	AK5	Adenylate kinase isoenzyme 5 (EC2.7.4.3) (ATP-AMP transphosphorylase) (KAD5_human)	Sauerstofftransport	(1 h)	?	150	100
40	Q8WVY9	SFRS12	Splicing factor, arginine/serine-rich 12 (Serine-arginine-rich splicing regulatory protein 86) (SRRp86) (Splicing regulatory protein 508) (SRRp508) (SFR12_Human)	Transferase		↗	54	94,966
	Q8WVY9	SFRS12	Splicing factor, arginine/serine-rich 12 (Serine-arginine-rich splicing regulatory protein 86) (SRRp86) (Splicing regulatory protein 508) (SRRp508) (SFR12_Human)	Regulation des alternativen Spleicen		↗	54	94,939
	Q9Y6K8	AK5	Adenylate kinase isoenzyme 5 (ATP-AMP transphosphorylase) (KAD5_Human)	Transferase	(1 h)	↗	60	98,971

Tabelle 4b: Funktionelle Identifikation von nach Bortezomib-Exposition veränderte Proteinpunkte, deren Veränderung auch in der refraktären Zelllinie NCEB-1 zu beobachten ist.

Protein-punkt	Swiss-Prot. Accession #	Gen-Bezeichnung	Protein-Bezeichnung	Proteinfunktion	Protein-Spiegel	Cell Viability	MOWSE-Wert	% Konfide
1	Q13347	EIF3S2	Eucaryotic translation initiation factor 3 subunit 2 (eIF-3 beta) (eIF3 p36) (eIF3)	Protein-bindend; Translationsfaktor		↗	52	92,188
	O60765	ZNF354A	Zink finger protein 354A (Transcription factor 17) (Zink finger protein eZNF) (TCF17_Human)	DNA-bindend; Transkriptionsfaktor; JNK-Signalweg; WNT-Signalweg		↗	72	99,914
3	P11142	HSPA8	Heat shock cognate 71 kDa protein (Heat shock 70 kDa protein 8) (HSP7C_Human)	Protein-bindend; Proteinfaltung	↗	↗	635	100
	P11021	HSPA5	GRP78 (BIP) (78kDa glucose-regulated protein precursor) (immunoglobulin heavy chain binding protein) (ER luminal Ca(2+)-binding protein grp78)	Apoptose	(1 h) ↗	↗	716	100
4	P39646	HSPA9B	GRP75 (stress 70 protein); heat shock 70 kDa protein 8 isoform 2	Apoptose; Proteinfaltung; Proliferationskontrolle; Kontrolle der zellulären Alterung	(1 h) ↗	↗	55	99,9
	P11142	HSPA8	Heat shock cognate 71 kDa protein (Heat shock 70 kDa protein 8) (HSP7C_Human)	Protein-bindend; Proteinfaltung	↗	↗	109	100
	P13667	PDI4A	Protein disulfide isomerase A4 precursor (Protein ERP72)	Elektrotransporter; Isomerase; Oxidoreductase	(1 h) ↗	↗	54	95,8
	P11142	HSPA8	heat shock 70 kDa protein 8 (HSP7C) / heat shock related 70 kDa protein 2 (HSP7Z)	Protein-bindend; Proteinfaltung	↗	↗	646	100
	P34931	HSPA1L	unnamed protein product			?		99,1
5	P48741	HSPA7	Heat shock 70 kDa protein 7 [Fragment]	Protein-bindend; Proteinfaltung	↗	↗		99,6
	P08107	HSPA1A; HSPA1B	Heat shock 70 kDa protein 1	Protein-bindend; Proteinfaltung	↗	↗		99,6
	Q14683	SMC1L1	SMC1alpha protein	DNA-Reparatur-Mechanismus; Zellteilung; Motor; Protein-bindend	(1 h) ↗	↗		99,6
	P33241	LSP1	Lymphocyte specific protein 1; LSP1 isoform 1; LSP1 protein pp52	Zytoskelett; Signaltransduktion	↗ (1 h)	?	72	99,8
	O43852	CALU	Calumenin-precursor (coccablin) CALU	Unbekannter biologischer Prozess	↗ (1 h)	↗	65	98,5
8	P10809	HSPD1	60 kDa heat shock protein, mitochondrial precursor (HSP60) (60 kDa chaperonin) (CPN60) (Heat shock protein 60) (HSP-60) (Mitochondrial matrix protein P1) (P60 lymphocyte protein) (HUCHA60) (C60_HUMAN)	Apoptose; Protein-bindend; Proteinfaltung	↗ (1 h)	↗	842	100
	P22626	HNRPA2B	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 (hnRNP A2 / hnRNP B1) (ROA2_Human)	RNA-bindend; Protein-bindend; pre-mRNA-Prozessierung; Telomer-Verlängerung durch Telomerase	↗	↗	52	93,196
14	Q16548	BCL2A1	BCL2-related protein A1 (BFL-1 protein) (Hemopoietic-specific early response protein) (GRS protein) (BFL_Human)	Apoptose	↗	↗	53	93,795
	Q9Y6K8	AK5	Adenylylase isoenzyme 5 (ATP-AMP transphosphorylase) (KAD5_Human)	Transferrase	(1 h) ↗	↗	61	99,017
15	P09362	LGALS1	Galectin-1 (Beta-galactoside-binding lectin L-14-1) (Lactose-binding lectin) (S-Lac lectin 1) (Galaptin) (14kDa lectin) (HL) (MAPK activating protein MP12)	Apoptosis; Signaltransduktion	↗ (1 h)	↗	154	100
	O43252	PAPSS1	(Sulfurylase kinase 1) (SK1) (SK-1) [Includes: Sulfate adenylyltransferase (Sulfate adenylylase transferase) (SAT) (ATP-sulfur)]	ATP-Sulfurylase- und APS-Kinase-Aktivität; vermittelt zwei Schritte des Sulfat-aktivierungs-Signalwegs	↗	↗	53	93,795
16	O75041	RAB34	Ras-related protein Rab-34 (Rab-39) (Ras-related protein) (RAB34_Human)	Vassikel-vermittelter Transport (Protein)	↗	?	61	99,061
	Q9BYX7	NEBL	Nebulette (ectin-binding Z-disk protein)	Zytoskelett	↗	↗	63	99,394
	P63261	ACTG1	Actin, cytoplasmatic 2 (Gamma-Actin)	gehört zur Actin-Familie	↗	↗	126	100
17	P22090	RPS4Y1	40S ribosomal protein S4, Y isoform (RS4Y_Human)	Zytoskelett; Protein-bindend	(4 h) ↗	↗	194	100
	P23246	SFPQ	Splicing factor, proline- and glutamine-rich (Polypyrimidine tract-binding protein-associated splicing factor) (PSP) (DNA-binding p52/p100 complex; 100 kDa subunit) (SFPQ_Human)	Ribosom	↗	↗	54	95,071
	-	-	myoblast antigen 24 1D5	DNA-bindend; DNA-Reparaturmechanismus; RNA-bindend; Protein-bindend; Transkriptionsfaktor	↗	?	137	100
	-	-	mitochondrial ribosomal protein L17	Ribosom	(4 h) ↗	↗	140	100
	-	-						99,1

Protein- punkt	Swiss-Prot. Accession #	Gen-Bezeichnung	Protein-Bezeichnung	Proteinfunktion	Protein-spiegel	Cell Viability	MOWSE- Wert	% Konfide
18	P19404	<i>NDUFB2</i>	NADH-ubiquinon oxidoreductase 24kDa mitochondrial precursor	Dehydrogenase; Atmungskette	↗ (1 h)	↗	107	99,998
21	Q99714	<i>HADH2</i>	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type II (EC1.1.35)(Type II HADH)(ER-associated amyloid beta peptide binding protein)(Short-chain type dehydrogenase/reductase XH96G2) ; HCD2	Protein-bindend	↗ (1 h)	?	131	99,95
	Q9UJN3	<i>MACF1</i>	Microtubule-actin crosslinking factor 1, isoforms 1/2/3/5 (Actin cross-linking family protein 7; Macrophin 1; Trabeculin-alpha)	Unbekannter biologischer Prozess; Zytoskelett		↗	53	93,936
	P26038	<i>MSN</i>	Moesin (Membrane-Organizing extension spike protein (MOES_Human))	Zytoskelett		↗	53	94,209
	P60174	<i>TPH1</i>	Triosephosphate isomerase (TIM) (Triose-phosphate isomerase) (TPIS_Human)	Isomerase; Glycolyse		↗	93	100
	P18669	<i>PGAM1</i>	Phosphoglycerate mutase 1 (Phosphoglycerate mutase isoenzym B) (PGAM-B) (BPG-dependent PGAM 1) (PGAM1_human)	Hydrolase; Isomerase	↗	↗	261	100
24	O15078	<i>CEP290</i>	TPA; centrosome protein CEP290; 3H11 antigen; KIAA0373; FUJ13615	Protein-bindend; Transkriptionsfaktor	(1 h)	?	57	97,2
26	P30086	<i>PEBP1</i>	Phosphatidylethanolamine-binding protein (PEBP) (Prostatic binding protein) (HCNPPp) (Neuropolypeptide h3) (Raf kinase inhibitor protein) (RKIP) (PEBP_Human)	Proteasen-Inhibitor	(1 h)	?	142	100
27	P30086	<i>PEBP1</i>	Phosphatidylethanolamine-binding protein (PEBP) (Prostatic binding protein) (HCNPPp) (Neuropolypeptide h3) (Raf kinase inhibitor protein) (RKIP) (PEBP_Human)	Proteasen-Inhibitor	(1 h)	?	164	100
	Q14683	<i>SMC1L1</i>	SMC1A_Human (structural maintenance of chromosome 1 like protein; SMC1alpha protein)	DNA-Reparaturmechanismus		↗	52	92,54
	Q9UE70	.	plasminderogen-related protein A			?	68	99,1
29	P04406	<i>GAPDH</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, liver (EC1.2.1.12) (GAPDH) (G3P2_Human)	Oxidoreductase	(1 h)	↗	88	99,998
	Q9Y2D5	<i>AKAP2</i>	A-kinase anchor protein 2 (protein kinase A anchoring protein 2) (PRKA2) (AKAP2) (AKAP2_human)	Bindet die regulatorische Untereinheit (RII) von Proteinkinase A		↗	57	97,695
	P22626	<i>HNRPA2B1</i>	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 (hnRNP A2 / hnRNP B1) (ROA2_Human)	RNA-bindend; Protein-bindend; pre-mRNA-Prozessierung; Telomer-Verlängerung durch Telomerase	↗	↗	114	100
33	P04406	<i>GAPDH</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, liver (EC1.2.1.12) (GAPDH) (G3P2_Human)	Oxidoreductase	(4 h)	↗	179	100
37	P25705	<i>ATP5A1</i>	ATP synthase alpha chain, mitochondrial precursor (ATPA_Human)	ATPase; Hydrolase; Protein-bindend; Transporter	(1 h)	↗	52	93,196
39	Q92945	<i>KHSRP</i>	Far upstream element binding protein 2 (FUSE binding protein 2) (KH type splicing regulatory protein) (KSRP) (p75) (FUBP2_human)	DNA-bindend; RNA-bindend; Transkriptionsfaktor	↗ (1 h)	↗	282	100

Funktionelle Einordnung der identifizierten Kandidatenproteine durch Literatur- und Datenbankrecherche

Ein bedeutender Anteil der auch in der Bortezomib-refraktären Zelllinien identifizierten Proteinpunkte mit veränderter Expression sind Hitzeschockproteine (*HSPD1*, *HSPA5*, *HSPA8*, *HSPA9B*, *HSPA10*, *HSC70*) und Strukturproteine (*ACTG1*, *CEP290*, *MACF1*), deren Regulation als unspezifische Antwort auf zellulären Stress anzusehen ist. Zusätzlich wurden auch Proteine mit spezifischen Funktionen identifiziert, wie z.B. *NDUFV2*, *BCL2A1*, *KHSRP*, *PEBP1*, *PGAM1*, *HADH2*, *SFPQ* und *RAB34*. Diese repräsentieren möglicherweise Bortezomib - wirkungsspezifische Signalwege, die in der refraktären Zelllinie blockiert, bzw. durch die murinen Genanaloga von NCEB-1 (Camps *et al.* 2006, Drexler und MacLeod 2002) kompensiert werden. Im Gegensatz dazu waren in den sensitiven Zelllinien Granta 519, HBL-2, Jeko-1 und Rec-1 zusätzlich die Konzentrationen von Proteinen verändert, die an verschiedenen metabolischen Prozessen beteiligt sind, insbesondere solche des Energiestoffwechsels (*ATP5B*, *AK5*, *TPI1*, *ENO1*, *ENO2*, *ENO3*, *ALDOC*, *GAPDH*, *FH*), der RNA-Regulation (einschließlich transkriptioneller Prozesse) (*HNRPL*, *SFRS12*), sowie der Zellteilungsmaschinerie (*NEBL*, *ACTB*, *SMC1A*, *C20orf23*). Auch das 26s Protease Regulatorische Untereinheit 8-Protein kommt in diesen Zelllinien mit signifikant erhöhten Spiegeln vor und erreicht hochsignifikante Identifikationswerte (MOWSE-Wert 147; 100% C.I.). Einige Kandidatenproteine wurden in den Proben verschiedener Proteinpunkte mit signifikanten Werten identifiziert (*ACTG1*, *PEBP1*, *GAPDH*, *HSPA8A*, *ATP5B*, *AK5*, *ENO1*), was den Schluss nahe legt, dass sie posttranskriptionellen Modifikationen

unterworfen sind oder in verschiedenen Spliceformen auftreten. Interessanterweise wurden bei 6 der 7 aus mehreren Punkte identifizierten Proteinen gegenläufige Veränderungen der Proteinspiegel beobachtet, was auf eine differenzielle posttranskriptionelle Regulierung dieser Isoformen hinweisen könnte. Nur im Fall von *PEBP1* wurde eine gleichförmige Zunahme der Punktintensitäten beider benachbarten Proteinpunkte detektiert.

Lokalisation der identifizierten Kandidatenproteine in einem funktionellen Netzwerk

Um einen Einblick in die funktionellen Zusammenhänge der identifizierten Kandidatenproteine zu erhalten, wurde eine bioinformatische Analyse mit Hilfe der 'Ingenuity Pathway Analysis'-Anwendung durchgeführt. Bei dieser Analyse waren 46 der 69 eingereichten Proteinidentifikationen in der IPKB vorhanden, und konnten in ein gemeinsames funktionelles Netzwerk eingeordnet und abgebildet werden (Abbildung 20). Dabei gruppierten sich die Kandidatenproteine um die zentralen zellulären Kontrollproteine *TP53* und *MYC*. Dies deutet auf einen entscheidenden Effekt von Bortezomib auf die zentralen Regulationsmechanismen hin, die die Zelle von Proliferation zu Apoptoseinduktion umschalten.

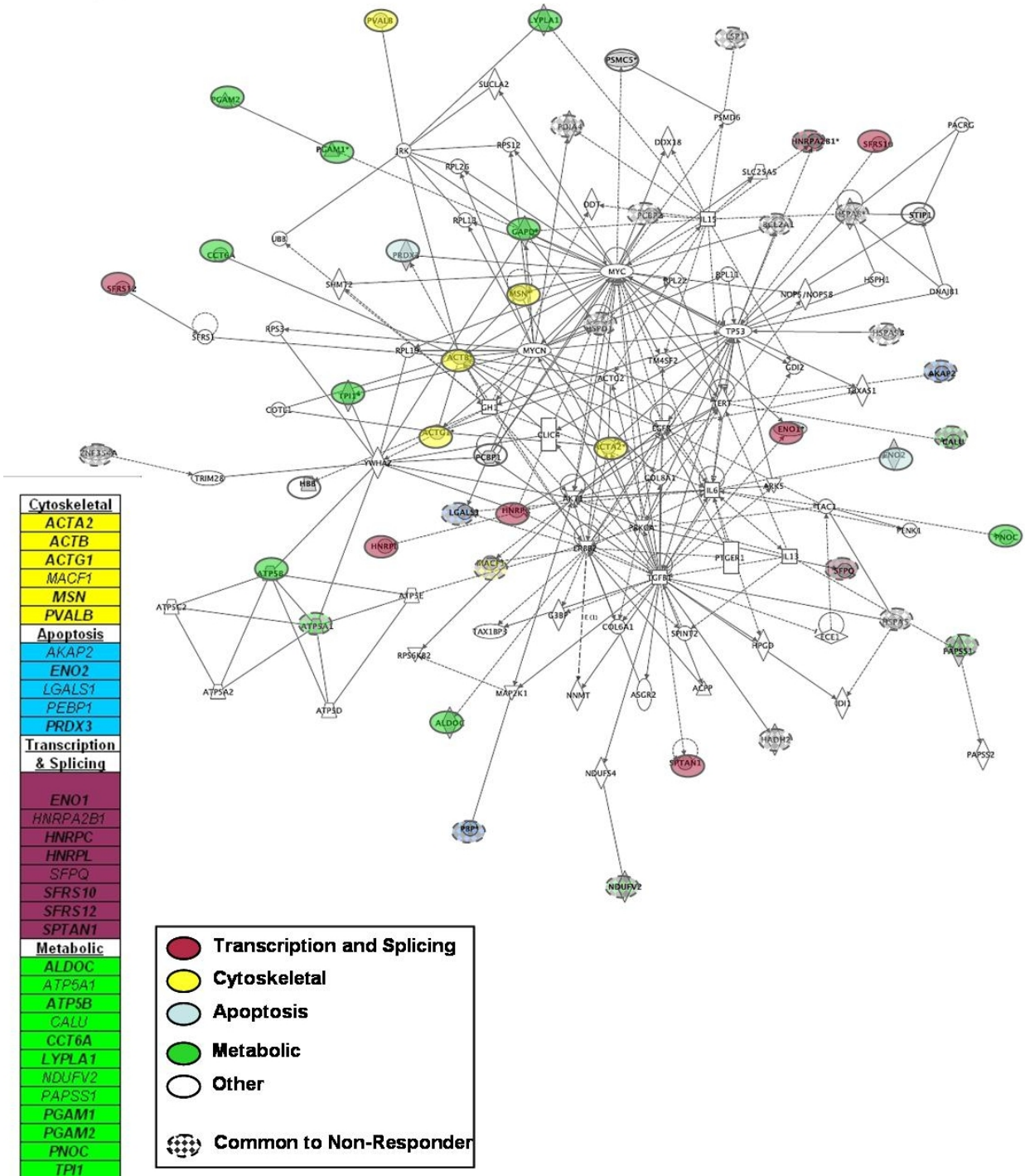


Abbildung 20: Funktionelles Interaktions-Netzwerk der identifizierten durch Bortezomib-Exposition beeinflussten Kandidaten-Proteine

Die Proteine sind nach ihrer Funktion farblich klassifiziert. Proteine, deren Spiegel auch in der nicht-Bortezomib sensitiven Zelllinie NCEB-1 verändert waren, sind grau gerastert dargestellt.

Western Blot-Analysen zur Bestätigung der 2D-PAGE-Ergebnisse

Um die Ergebnisse der Proteinidentifikation zu validieren, wurden Western Blot-Analysen für 17 der identifizierten Kandidatenproteine durchgeführt (Abbildung 21). Im Einzelnen handelte es sich um die Proteine Raf-Kinasen-Inhibitor-Protein (*PBP*), Fumarathydratase (*FH*), Peroxyredoxin 3 (*PRDX3*), Hitzeschock-verwandtes 71kDa Protein (*HSPA8*), Stress-Induziertes Phosphoprotein 1 (*STI1*), alpha-Enolase (*ENO1*), Spectrin (*SPTAN1*), Triosephosphatisomerase (*TPI1*), Far-Upstream-Element-bindendes Protein 2 (*FUBP2*), Galectin (*LGALS1*), Glycerinaldehyd-3-phosphatase-Dehydrogenase (*GAPDH*), heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein A2/B1 (*HNRNPA2B1*), Hitzeschockprotein 60kDa (*HSP60*), Acyl-Protein-Thioesterase (*LYPLA1*), Prolin- und Glutamin-reicher Spliceing-Faktor (*SFPQ*), Ras-abhängiges Protein RAB34 (*RAB34*) sowie beta-Aktin (*ACTB*), deren Spiegel jeweils in unbehandelten Proben sowie 4h und 8h nach Bortezomib-Behandlung untersucht wurden.

Die dabei beobachteten Veränderungen der Proteinspiegel bestätigten bei 12 der 17 (76%) untersuchten Proteine die in den 2D-PAGE-Gelen beobachteten Veränderungen. So sanken die zellulären Spiegel von *STI1* und *Spectrin* in beiden Analyseverfahren, während *RKIP*, *Fumarathydratase*, *PRX III*, *FBP*, *Galectin*, *HSP60* und *LSP-1* steigende Proteinspiegel aufwiesen. Die Proteine *Enolase*, *GAPDH* sowie *hnRNP A2/B1* müssen hier als Sonderfall behandelt werden, da sie in der 2D-PAGE-Analyse in mehreren Proteinpunkten nachgewiesen wurden, die gegenläufige Veränderungen ihrer Proteinspiegel besaßen. Diese drei Proteine zeigten in der Western Blot-Analyse jeweils steigende Proteinspiegel.

Nur im Fall von Aktin, das in den 2D-PAGE-Analysen deutlich sinkende Proteinspiegel besaß, wurden im Western Blot unveränderte Proteinspiegel detektiert. Bei den restlichen vier Proteinen (HSC70, TIM, PSF, RAB34) bei 2D-PAGE und Western Blot gegensätzliche Veränderungen der Proteinspiegel beobachtet wurden, wobei die jeweiligen Proteinspiegel in den 2D-PAGE-Gelen abnahmen, während die Expression in den Western Blot-Analysen anstiegen. Ein Vergleich der Ergebnisse der beiden Methoden ist in Tabelle 5 aufgeführt.

Untersuchungen an primären MCL-Zellen zur Bestätigung der Ergebnisse der MCL-Zelllinien

Die Ergebnisse der Proteomuntersuchungen an MCL-Zelllinien wurden durch einen Vergleich mit analog behandeltem Patientenmaterial eines MCL-Patienten ergänzt. Ein 2D-PAGE-Gel der unbehandelten Patientenzellen zeigte dabei ein den MCL-Zelllinien sehr ähnliches Proteinmuster (Abbildung 22 oben). Von einer genaueren Untersuchung mittels 2D-PAGE und einer statistischen Auswertung musste jedoch Abstand genommen werden, da das Patientenmaterial in zu geringem Umfang zur Verfügung stand. Deshalb wurden analog zu den Zelllinien Western Blot-Analysen mit den primären MCL-Proben durchgeführt (Abbildung 22 unten). Dabei stimmten die Ergebnisse der Analysen in Zelllinien und Patientenmaterial bei 14 von 16 (87,5%) untersuchten Proteinen im Western Blot überein. Interessanterweise handelt es sich bei den beiden abweichenden Ergebnissen um Proteine (ENO-1 und GAPDH), die in den 2D-PAGE-Analysen aus mehreren Punkten mit unterschiedlich veränderten Proteinspiegeln identifiziert wurden. Die Spiegel dieser Proteine sind in

den Zelllinien nach Bortezomib-Exposition deutlich erhöht, während sich ihre Spiegel in der Patientenprobe nicht veränderten (Tabelle 5).

Protein-Bezeichnung	Gen	2D-PAGE	WB (ZL)	WB (pMCL)
RKIP	<i>PBP</i>	↗	↗	↗
Fumarate Hydratase	<i>FH</i>	↗	↗	↗
PRX III	<i>PRDX3</i>	↗	↗	↗
HSC70	<i>HSPA8</i>	↘	↗	↘
STI-1	<i>STIP1</i>	↘	↘	↘
Alpha-Enolase	<i>ENO1</i>	↗ X	↗	↗
Spectrin	<i>SPTAN1</i>	↘	↘	↘
TIM	<i>TP1</i>	↘	↗	↗
FBP	<i>FUBP1</i>	↗	↗	↗
Galectin	<i>LGALS1</i>	↗	↗	↗
GAPDH	<i>GAPD</i>	↗ X	↗	↗
hnRNP A2/B1	<i>HNRNPA2B1</i>	↗ X	↗	↗
HSP60	<i>HSPA5</i>	↗	↗	↗
LSP-1	<i>LYPLA1</i>	↗	↗	↗
PSF	<i>SFPQ</i>	↘	↗	↗
RAB34	<i>RAB34</i>	↘	↗	↗
beta-Actin	<i>ACTB</i>	↘	↗	↗

Tabelle 5: Vergleich der Resultate der 2D-PAGE- und der Western Blot-Analyse (WB) der Zelllinien (ZL) und primären MCL (pMCL).

Die Tabelle zeigt eine Auswertung der Veränderungen der zellulären Proteinspiegel nach Bortezomib-Behandlung im Vergleich mit unbehandelten Kontrollzellen.

Ein aufwärtsgerichteter Pfeil zeigt steigende, ein abwärtsgerichteter Pfeil sinkende Proteinspiegel des Proteins bei dem angegebenen Analyseverfahren an.

Gekreuzte Pfeile (Spalte 2D-PAGE) bezeichnen Proteine, die in mehreren Punkten der 2D-PAGE-Gele nachgewiesen wurden die gegenläufige Änderungen der Proteinspiegel besaßen.

Horizontale Pfeile (WB) stehen für unveränderte Proteinspiegel.

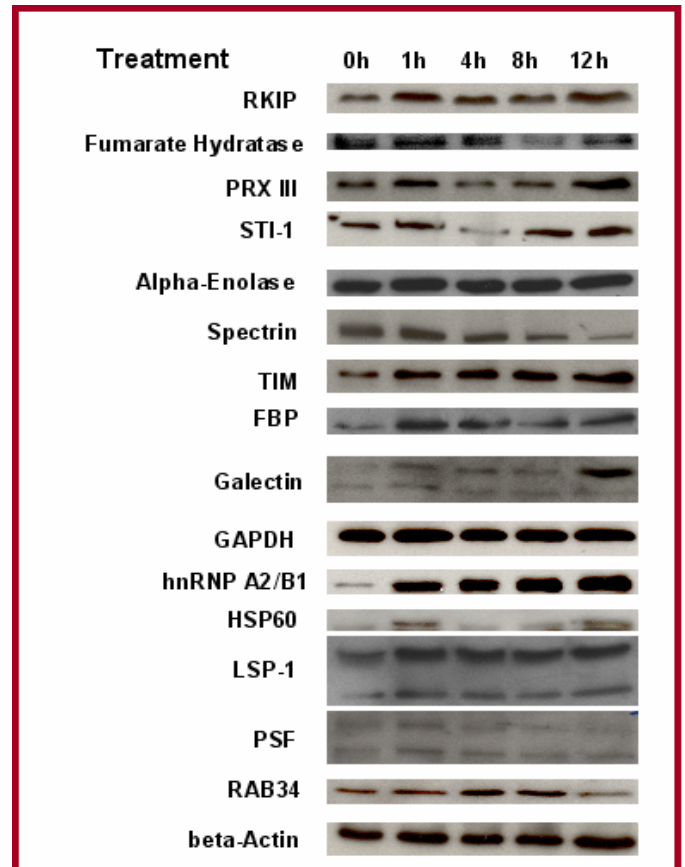
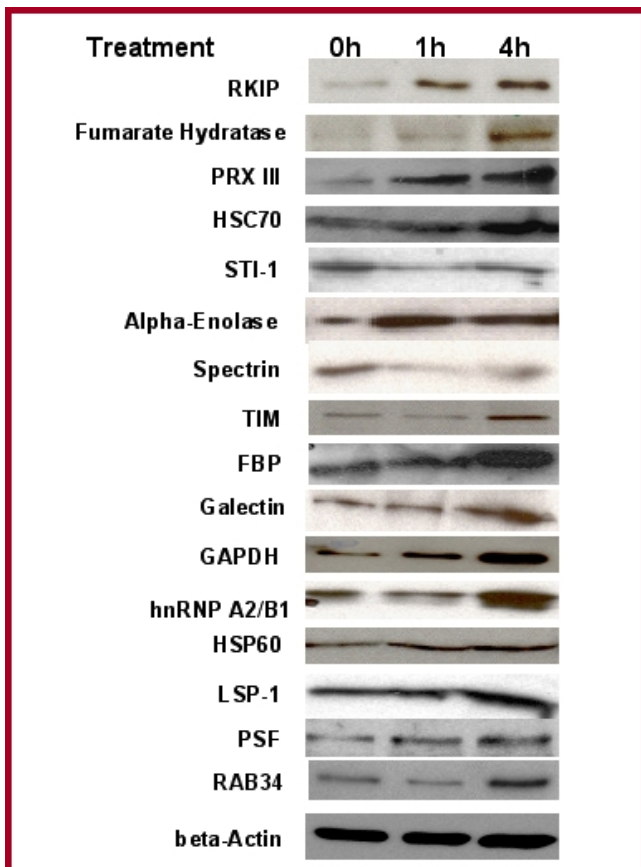


Abbildung 21: Nachweis der veränderten Proteinspiegel von 17 ausgewählten Kandidaten-Proteinen durch Western Blot-Analyse der Zelllinien

Immundetektion der Proteine (RKIP, FH, PRX III, HSC70, STI-1, ENO-1, Spectrin, TIM, FBP, Galectin, GAPDH, hnRNP A2/B1, HSP60, LSP-1, PSF, RAB34, ACNB) aus unbehandelten Proben, sowie nach 1 und 4h Bortezomib-Exposition.

Abbildung 22: Vergleichende Darstellung der Western Blot-Analyse von primärem Patientenmaterial

(oben) 2D-PAGE Gel von unbehandelten primären Patientenzellen. Das Proteinmuster stimmt in hohem Maß mit dem der Zelllinien überein.

(unten) Western Blot Analyse von 16 Kandidatenproteinen. Die Ergebnisse stimmen in 13 Fällen mit den Ergebnissen der Analyse der Zelllinien überein.

Identifizierung der beobachteten Hitzeschock-Proteinantwort durch RNA-Expressionsanalyse

Als zusätzliche Kontrolle wurden die Veränderungen der RNA-Expressionsspiegel der Bortezomib-behandelten MCL-Zelllinien durch Affymetrix-Microarray-Analyse bestimmt. Dabei zeigte sich, dass nur eine geringe Korrelation der beobachteten Proteinspiegel zu den RNA-Expressionsdaten vorlag, da die Hemmung des proteasomalen Protein-Abbaus durch transkriptionelle Prozesse nur indirekt beeinflusst wird, während andererseits Proteine mit hohem Umsatz sofort in der Zelle akkumulieren und so die zelluläre Protein-Homöostase direkt beeinflusst wird. So gab die RNA-Expressionsanalyse hauptsächlich einen Anstieg der Expression verschiedener Hitzeschockproteine wieder, als typisches Zeichen einer zellulären Stressreaktion. Wie auch auf der Proteinebene wurde die Hitzeschockantwort in der Bortezomib-refraktären MCL-Zelllinien NCEB-1 aktiviert. Interessanterweise ließ die Analyse der RNA-Expression keinerlei Einfluss des Proteasomen-Inhibitors auf die Expression Proliferations-assoziiierter Gene erkennen.

5. Diskussion

5.1 Methodische Aspekte

Zur vergleichenden molekularen Expressions-Analyse mehrerer Probenkollektive stehen heute verschiedene Methoden zur Verfügung: einerseits die RNA-Expressionsanalysen, insbesondere verschiedene Mikroarrays und gezielte RT-PCR-Untersuchungen, auf der anderen Seite die Proteinanalytik, die sowohl die klassischen, auf Antikörperbindung basierenden Methoden wie Western Blot und ELISA sowie die von diesen abgeleiteten Proteinarrays umfasst, als auch Rasteruntersuchungen auf der Basis chromatographischer Verfahren oder 2D-PAGE. Differenziell exprimierte Proteine werden bei diesen Verfahren meist durch massenspektrometrische Verfahren identifiziert.

Heute werden am häufigsten RNA-Expressionsanalysen in der wissenschaftlichen Forschung eingesetzt. Sie geben nicht nur Aufschluss über die relative Expression von einzelnen Genen, sondern können auch in der Gesamtheit eines Expressionsmusters z.B. eines Mikroarrays zur diagnostischen Klassifikation einer Probe verwendet werden, um z.B. Krankheitssubtypen mit unterschiedlichem klinischen Verhalten zu charakterisieren (Feuring-Buske *et al.* 2006, Siebert *et al.* 2001). Diese gezielten Expressionsanalysen bestimmter Gene setzen, genau wie die Analyse zellulärer Proteinspiegel durch antikörpervermittelte Nachweisreaktionen, ein detailliertes Vorwissen über die relevanten molekularen Zielmoleküle voraus. Im Gegensatz dazu stehen die Screening-Methoden der 2D-PAGE oder chromatographische Trennungen von gesamtzellulären Proteinlysaten sowie die RNA-Mikroarrays und in geringerem Maße auch die Proteinarrays. Dabei können im Fall der Fraktionierung und anschließenden Analyse von Proteinlysaten durch 2D-

PAGE oder chromatographische Auftrennung die zellulären Spiegel eines Großteils des Proteoms einer Probe analysiert werden. Ähnliches gilt, in Abhängigkeit von der Größe des verwendeten Probensets, auch für die Array-Untersuchungen. Insbesondere die RNA-Mikroarray-Technologie erlaubt es, ein nahezu vollständiges Expressionsprofil des gesamten Transkriptoms einer Probe zu erstellen, während entsprechende Proteinarrays bisher nur einen vergleichsweise geringen Teil der zellulären Proteine abbilden, und zumindest auch in naher Zukunft stärker auf funktionell definierte, zusammenhängende Proteingruppen beschränkt bleiben werden. Im Vergleich zu den auf Nukleinsäuren basierenden Untersuchungsmethoden werden für Proteinuntersuchungen allerdings hohe Mengen an Probenmaterial benötigt, da zelluläre Proteine nicht direkt *in vitro* amplifiziert werden können, wie es für DNA und RNA mittels der verschiedenen PCR-Methoden möglich ist. Ein weiterer qualitativer Unterschied zwischen den Methoden ist, dass proteinbasierende Untersuchungen den Einfluss posttranslationaler Modifikationen und Veränderungen der Homöostase der zellulären Proteinspiegel durch gesteuerten Proteinabbau erfassen. Im Gegensatz dazu ermöglichen RNA-Expressionsanalysen die Analyse der zellulären RNA, deren Stabilität einen weiteren bedeutenden biologischen Regulationsmechanismus darstellt.

Auch zwischen den verschiedenen proteinbasierenden Screening-Methoden bestehen Unterschiede: So ermöglichen chromatographische Verfahren neben einer Auftrennung der Proteinlysate nach IEP und Molekularmasse, auf die die 2D-PAGE beschränkt ist, noch weitere physikalische Eigenschaften der Proteine, wie z.B. deren Löslichkeit (Verteilungs-Chromatographie) oder deren Adsorptionsverhalten (Adsorptions-Chromatographie) zur weiteren Fraktionierung der Proben zu nutzen. Dennoch ist 2D-PAGE noch immer der Standard der Proteinauftrennung in der Proteomanalyse, da sie eine hohe Sensitivität erreicht.

Das zur Zeit am häufigsten angewandte massenspektrometrische Identifikationsverfahren, der Peptidmassen-Fingerabdruck, beruht auf dem Prinzip, dass die Fragmente eines bestimmten Proteins, das mit einem proteolytischen Enzym, in der Praxis meist Trypsin, verdaut wurde, eine definierte, als Massenspektrum messbare Peptidzusammensetzung besitzen. Zusätzlich erfassen moderne Massenspektrometer auch die Zerfallsprodukte, die während der energetischen Anregung der Fragmentpeptide durch die ionisierende Strahlung im MS entstehen, und nutzen sie zur Sequenzierung der Aminosäuren dieser Fragmente. Dieses Vorgehen erhöht die Identifikationskonfidenz der Analyse eines Peptidfingerabdrucks erheblich (Gevaert und Vandekerckhove 2000).

Die Entscheidung welches dieser Verfahren zur Anwendung kommt, hängt dabei hauptsächlich von der primären Fragestellung ab, wobei experimentelle Limitationen, wie z. B. die Verfügbarkeit ausreichender Mengen von Probenmaterial ebenfalls berücksichtigt werden müssen. Eine Möglichkeit, die letztgenannte Limitation bei der Erforschung neoplastischer Erkrankungen zu umgehen, besteht in der Untersuchung repräsentativer Zelllinien. Obwohl diese Zelllinien ein biologisches Modellsystem für die entsprechenden malignen Erkrankungen in der Krebsforschung darstellen, haben sie doch häufig während ihrer Etablierung zusätzliche genetische Veränderungen akkumuliert, die unabhängig vom primären, charakteristischen Krankheitsphänotyp sind. Eine gemeinsame Analyse mehrerer Zelllinien des selben Phänotyps auf ihre gemeinsame molekulare und pathologische Charakteristika, wie dies z.B. für die Zelllinien eines bestimmten Lymphom-Subtyps der Fall ist, in einem „Proben-Pool“ kann dieses Problem teilweise umgehen. Unspezifische Veränderungen, die nur in einzelnen Zelllinien des „Proben-Pools“ auftreten, werden durch Verdünnung soweit abgeschwächt, dass sie nicht länger als signifikante Alterationen detektiert werden (Weinkauff *et al.* 2006). Derartige „Proben-Pools“ wurden bereits in vorangegangenen

Studien bei Heterozygotieuntersuchungen (Gille *et al.* 1991) und bei Microarrays (Benson *et al.* 2002) verwendet, um die Detektion unspezifischer Veränderungen einzelner Proben in Rasteruntersuchungen zu unterdrücken. Die Verwendung von „Proben-Pools“ hat auf der Proteinebene einen zusätzlichen Vorteil: Klinische Proben geringer Zellzahl können gemeinsam analysiert werden, um an primären Zellen eines klinisch und molekular definierten Kollektivs grundlegende Untersuchungen anzustellen. Dieses Vorgehen kann einen Einblick in die gemeinsamen molekularen Prozesse erlauben und zu neuen Erkenntnissen über den untersuchten Krankheitsphänotyp führen. Die so gewonnenen Daten basieren einerseits auf primärem Patientenmaterial, andererseits ermöglichen sie die Analyse eines repräsentativen Patientenkollektivs und übertreffen in ihrer Aussagekraft Einzelfallbeschreibungen mit ausreichendem primärem Material. Obwohl diese Methoden der Proteinanalytik im Gegensatz zu RNA-Microarray-Expressionsanalysen wegen des höheren Bedarfs an Probenmaterial momentan noch keine direkte diagnostische Relevanz besitzt, können mit Hilfe dieser Methoden neue diagnostische Marker identifiziert werden, die in einem zweiten Schritt mit gängigen diagnostischen Verfahren, wie z.B. ELISA-Tests oder Western Blot-Analysen in einem größeren Kollektiv nachgewiesen werden könnten.

5.2 Vergleichsuntersuchungen zwischen MCL und FL

Jede neoplastische Erkrankung basiert auf dem genauen molekularen Hintergrund der betroffenen Zelle. Dabei führen bestimmte, grundlegende genetische Veränderungen der neoplastischen Zelle zu einem charakteristischen Erscheinungsbild und Verlauf der Erkrankung, wobei allerdings auch die Herkunft

und Differenzierungsstufe der entarteten Zelle von Bedeutung ist. Die Gesamtheit der klinischen, morphologischen und molekularen Charakteristiken der Erkrankung ermöglicht so eine Zuordnung zu einem bestimmten Krankheitstyp oder Subtyp, der teilweise auch eine genaue Prognose des Krankheitsverlaufs und eine individualisierte Behandlung des Krankheitsbildes erlaubt. Dennoch existiert innerhalb einer Erkrankung auf molekularer Ebene eine gewisse Variabilität molekularer Marker, die für das heterogene Verhalten der Krankheitsverläufe verantwortlich ist. Daher ist eine möglichst genaue Charakterisierung der Zelllinien notwendig, die in einer Untersuchung verwendet werden, um eine hohe Aussagekraft der Ergebnisse zu gewährleisten.

Ein weiterer experimenteller Ansatz zur vergleichenden Analyse der Zelllinien zweier NHL-Subtypen ist die oben beschriebene Verwendung eines „Proben-Pools“. Dabei ist zu beachten, dass die Zelllinien des „Proben-Pools“ möglichst einen repräsentativen Querschnitt dieses Phänotyps darzustellen.

Für die hier vorgestellten Vergleiche zwischen zwei NHL-Subtypen wurden das folliculäre Lymphom (FL) und das Mantelzelllymphom (MCL) verwendet. In beiden Fällen liegt als primäre molekulare Veränderung eine Translokation vor, bei der der Promotor des Immunglobulin (Schwere-Ketten)-Gens die Überexpression eines anderen Gens (*BCL1* im MCL und *BCL2* im FL) antreibt. Außerdem stammen die Zelllinien von zwei aufeinander folgenden Differenzierungsstadien der B-Zell-Reifung ab. Auch besitzen alle verwendeten Zelllinien vergleichbare Wachstumsgeschwindigkeiten.

Es wurden dabei jeweils 3 Zelllinien (MCL: Granta-519, HBL-2 und NCEB1; FL: DOHH-2, Karpas-422 und WSU-NHL) von jedem der beiden NHL-Subtypen gepoolt. Die chromosomalen Veränderungen der verwendeten Zelllinien sind im Methodenteil aufgelistet. Jeweils eine der verwendeten Zelllinien beider Subtypen (HBL-2 und

Karpas-422) repräsentierte eine sekundäre Transformation zum DLBCL. Eine der MCL- und zwei der FL-Zelllinien waren darüber hinaus EBV positiv (EBV nuclear antigen positiv).

Die Wirksamkeit der „Proben-Pools“ konnte im Vergleich mit den verschiedenen einzelnen Zelllinien nachgewiesen werden, wobei eine Analyse eine 65% Korrelation der Proteinpunkte ergab. Zieht man die unvermeidbare Variabilität zwischen einzelnen 2D-PAGE-Gelen und den erwarteten Effekt der „Proben-Pool“-Methodik in Betracht, die die Zahl der unspezifischen Proteinpunkte reduziert, aber nicht vollständig unterdrücken kann, so erscheint dies eine akzeptable Korrelationsrate. Durch die Wahl eines angemessenen Intensitäts-Schwellenwerts können gezielt die molekularen Veränderungen eines definierten NHL-Subtyps analysiert werden. Entsprechend konnte durch die Verwendung der „Proben-Pools“ die Zahl der nur in einzelnen Zelllinien des Pools beobachteten Proteinpunkte um 60% reduziert werden, wobei die überwiegende Mehrheit der in allen Einzelzelllinien eines NHL-Subtyps nachgewiesenen Proteinpunkte ebenfalls auf den 2D-PAGE-Gelen der „Proben-Pools“ identifiziert wurden.

Wie auch bei der RNA-Array-Analyse besitzen MCL und FL ein zu 87% identisches 2D-PAGE-Proteinmuster. Dieses Ergebnis bestätigt auch frühere Untersuchungen, in denen B-Zell Lymphom-Zelllinien trotz ihrer unterschiedlichen klinischen und morphologischen Charakteristika bei einer 2D-PAGE-Analyse ein hochgradig konserviertes Proteinmuster aufwiesen (Mohammad *et al.* 1994). Die Veränderung der zellulären Spiegel nur weniger Proteine scheint also für die zum Teil gravierenden Unterschiede der Biologie und des klinischen Verlaufs der entsprechenden Erkrankungen verantwortlich zu sein. Die in unserer Studie identifizierten Kandidatenproteine können allerdings auch indirekt beeinflusst sein und so vorgeschaltete Veränderungen eines ganzen Signalwegs repräsentieren.

Dies gilt insbesondere bei der Identifikation mehrerer Proteine des selben Signalwegs oder Proteinkomplexes.

In Kontrollexperimenten konnten auf den 2D-PAGE-Gelen auch die beiden Proteine identifiziert werden, die für den respektiven NHL-Subtyp charakteristisch sind: Cyclin D1 für das MCL (Fernandez *et al.* 2005, Thomazy *et al.* 2002) und BCL-2 für das FL (Aster und Longtine 2002, Petrovic *et al.* 1998). Durch Immunodetektion konnte die Überexpression dieser beiden Proteine auch in Western Blot-Analysen der 2D-PAGE-Gele bestätigt werden. Cyclin D1 wurde nur in MCL detektiert, aber die Intensität des Proteinpunkts war zu gering, um für MS-Peptidfingerabdruckanalyse verwendet zu werden. Der mit BCL-2 assoziierte Proteinpunkt mit der höchsten Punktintensität konnte auf den silbergefärbten 2D-PAGE-Gelen beider NHL-Subtypen nachgewiesen werden, besaß jedoch keinen >5fachen Intensitätsunterschied zwischen den MCL- und FL-„Proben-Pools“. Nur in 2D-PAGE-Gelen der FL-„Proben-Pools“ wurden jedoch durch Immunodetektion eine Reihe Satellitenpunkte niedriger Intensität erfasst. Diese Ergebnisse bestätigen die frühere Beobachtung, dass *BCL2* auch im MCL hoch exprimiert ist (Menendez *et al.* 2004). Auch wurden in anderen Zellsystemen bereits verschiedene, posttranslational modifizierte Formen von BCL-2 beschrieben, die an der Regulation der Zellapoptose beteiligt sind (Breitschopf *et al.* 2000, Chleq-Deschamps *et al.* 1993).

Wie die Liste der durch 2D-PAGE-Proteomanalyse identifizierten, in MCL und FL differenziell auftretenden Kandidatenproteine belegt, unterscheiden sich die beiden NHL-Subtypen in mehreren wichtigen zellulären Regulationssystemen, die zur Tumorentstehung führen können. Dazu gehören sowohl apoptoseinduzierende Signalwege und die Kontrolle der zellulären DNA-Reparatursysteme als auch die Regulation von Zellzyklus und Transkription (Tabelle 3). Da viele dieser Kandidatenproteine eine essentielle Rolle bei der Regulierung des physiologischen

Zellstoffwechsels spielen, kann dies als Hinweis darauf verstanden werden, dass erst eine simultane Deregulation verschiedener Signalwege zur Entstehung eines bestimmten Krankheitsphänotyps führt. So ist aus verschiedenen Untersuchungen bekannt, dass die primären genomischen Veränderungen, die als Charakteristika der beiden untersuchten NHL-Subtypen gelten, alleine nicht für eine maligne Transformation der B-Zelle ausreichen (Dreyling *et al.* 1997, Seto 2002). Zusätzliche, größtenteils noch unbekannte sekundäre molekulare Alterationen sind notwendig, um die maligne Entartung in den lymphatischen Zellen zu bewirken. Diese sekundären Veränderungen lassen sich möglicherweise zu wenigen, miteinander kommunizierenden Signalpfaden zurückverfolgen, deren Deregulation der malignen Transformation zugrunde liegt. Diese Hypothese wird durch die Identifikation eines funktionellen Netzwerks erhärtet, das die meisten der identifizierten Kandidatenproteine (z.B. *HSP AB*, *SERPINE1*, *TOP1*, *IFIT1*, *HSPA5*, *OK/SW56*, *HCK* and *TGFB1*) umfasst. Dieses Netzwerk ist wesentlich durch *TP53* charakterisiert, eines bekannten Regulators einer Vielzahl von Signalpfaden, die in verschiedenen neoplastischen Erkrankungen verändert sind (Motoyama und Naka 2004). *TP53* stellt zudem eine zentrale Schnittstelle in der Regulation von Apoptose und Zellproliferation dar. Ein zweiter Cluster, bestehend aus den Kandidatenproteinen *Rad50*, *SP100* und *SMC1L1*, ist mit diesem ersten Netzwerk funktionell über das Gen *BRCA1* und zusätzlich indirekt mit den Kandidatenproteinen *MAD1L1* und *RPL1* verbunden. Leider stand nur ein Teil der durch 2D-PAGE identifizierten Kandidatenproteine (41,5%; 17 der 41 identifizierten Kandidatenproteine) für die Berechnung des funktionellen Netzwerks zur Verfügung, da außer von den 6 hypothetischen Kandidatenproteine (14,6%) auch von weiteren Proteinen (*BCLF1_Human*, *Luca-15*, *BRE1A_Human*, *HNRPM_human*, *ASPM_human*, *SEGN_human*, *TPR_human*, *TR25_human*, *Q12804_human*,

NOE3_human) noch keine funktionellen Daten in der IPKDB vorhanden waren. Interessanterweise waren die Proteine im Cluster um *TP53* häufiger im MCL mit höheren Proteinspiegeln vertreten, während die Proteine des Rad50-Clusters fast ausschließlich Proteine umfassten, die höhere Proteinspiegel in FL aufwiesen. Obwohl die geringe Zahl der zugeordneten Proteine die Aussagekraft dieser Beobachtungen beeinträchtigt, deuten sie dennoch darauf hin, dass in den beiden NHL-Subtypen verschiedene Signalwege tangiert sind bzw. ein Signalweg an verschiedenen Stellen beeinflusst ist.

Dennoch müssen diese Ergebnisse mit Vorsicht bewertet werden, da normale B-Lymphozyten nicht als Kontrolle in die Untersuchung eingeschlossen wurden. Auch wurden Mechanismen, die bei der malignen Transformation beider NHL-Subtypen eine Rolle spielen, nicht erfasst, so dass das identifizierte funktionelle Netzwerk nur die Proteine repräsentiert, deren Proteinspiegel sich in beiden NHL-Subtypen unterscheiden.

Vergleicht man die Ergebnisse der RNA-Expressionsunterschiede beider NHL-Subtypen mit den beobachteten Unterschieden der zellulären Proteinspiegel bei den 2D-PAGE-Untersuchungen, so ergibt sich ein vergleichbarer prozentualer Anteil von Gemeinsamkeiten bzw. Unterschieden in der RNA-Expression zwischen beiden Lymphom-Subtypen. Allerdings stimmen die identifizierten Expressionsunterschiede zwischen den RNA- und Proteinspiegeln nur zu 34,6% überein. Diese Resultate belegen, dass nicht nur genomische Veränderungen und unterschiedliche Gen-Expression, sondern vor allem posttranskriptionelle Regulierungsmechanismen für die Aufrechterhaltung der zellulären Proteinspiegel (Greenbaum *et al.* 2003) und der normalen Funktion einer Zelle verantwortlich sind.

5.3 Analyse der Veränderung der Proteinspiegel in Bortezomib-behandeltem MCL

Im klinischen Alltag wird häufig das MCL häufig in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert, in denen eine Heilung allein mit konventionellen Chemotherapien nicht möglich ist (Dreyling *et al.* 2007). Der aggressive klinische Verlauf und die Unempfindlichkeit gegenüber klassischen Behandlungsformen führen dazu, dass MCL die schlechtesten Langzeitprognosen aller Lymphomsubtypen besitzt.

In den letzten Jahren konnten dennoch Fortschritte bei der Behandlung dieser Erkrankung erzielt werden. So erwies sich eine kombinierte Immunochemotherapie mit dem Anti-CD20 Antikörper Rituximab als vorteilhaft, da die Ansprechraten gegenüber alleiniger Chemotherapie deutlich erhöht werden konnten (Howard *et al.* 2002, Lenz *et al.* 2005). Auch der Einsatz von dosisintensivierten Chemotherapien, insbesondere die sequenzielle Gabe von Hochdosis-Cytarabin (Ara-C) zeigte in verschiedenen Phase-II-Studien eine deutliche Erhöhung der Remissionsraten gegenüber konventionellen Chemotherapie-Kombinationen (Lefrere *et al.* 2004, Romaguera *et al.* 2005). Die autologe Stammzelltransplantation stellt für Patienten unter 65 Jahren zur Zeit die effektivste Konsolidierungstherapie dar und führt zu einer signifikanten Verbesserung des progressionsfreien Überlebens (Dreyling *et al.* 2007). Dennoch haben all diese Fortschritte bisher nur eine tendenzielle Verbesserung des Gesamtüberlebens erreicht. Daher zielen die neuartigen Therapiekonzepte in der Behandlung von MCL in zunehmendem Maße auf spezifische regulatorische Moleküle der maligne veränderten Zellen. Viele der Zielmoleküle haben eine Funktion bei der posttranskriptionellen Modifikation verschiedener Proteine oder bei der Kontrolle der zytoplasmatischen Spiegel verschiedener Proteinen durch direkte

Degradation oder Verlagerung ihrer sub-zellulären Lokalisation (Culmsee und Landshamer 2006).

Eine wichtige Funktion bei der Steuerung zellulärer Prozesse fällt dabei der Aufrechterhaltung stabiler oder auch mit dem Zellzyklus synchronisierter zellulärer Proteinspiegel zu. Die Regulierung der zellulären Proteinspiegel ermöglicht dabei einerseits die Steuerung zyklischer Prozesse: Phasenspezifisch Proteine werden synthetisiert und anschließend wieder kontinuierlich abgebaut, bis eine basale Proteinkonzentration unterschritten und die Proteinsynthese erneut initiiert wird (Rückkopplungsschleife). Andererseits wird die schnelle Regulation zellulärer Prozesse auch durch signalinduzierte posttranslationale Modifikation von Signalproteinen erreicht (Glickman und Adir 2004), indem z.B. Transkriptionsfaktoren vom Zytoplasma in den Nukleus verlagert oder inhibitorische Proteine abgebaut werden. So stellt das 26s-Proteasom einen zentralen, unspezifischen Regulator des zellulären Protein-Gleichgewichts dar (Auld und Silver 2006), was es zu einem viel versprechenden Ziel für neue Therapieansätze macht.

Bei dem kleinmolekularen Wirkstoff Bortezomib handelt es sich um ein dipeptidisches Borsäurederivat, das unter dem Handelsnamen Velcade[®] von Ortho Biotech (Janssen-Cilag GmbH) vertrieben wird. Bortezomib wurde als erster und bisher einziger einer Reihe von proteasominhibitorischen Wirkstoffen für den klinischen Bereich zugelassen. Seine Wirkung beruht auf molekularer Ebene auf einer reversiblen und dosisabhängigen Blockade der chymotrypsinartigen Aktivität der 20s Untereinheit des Proteasomenkomplexes (Adams *et al.* 1998). Durch die zentrale Rolle des proteasomalen Proteinabbaus bei der Regulierung einer Vielzahl zellulärer Prozesse sind jedoch die Auswirkungen dieses Eingriffs in die zellulären Regulationsmechanismen vielschichtig und betreffen eine Reihe zellulärer Signalwege. Unter anderem werden der NF-kappaB- und der JNK-Signalweg, die

Regulation der zellulären Spiegel des Tumorsuppressors p53 sowie die durch reaktive Sauerstoff-Spezies und Noxa vermittelte Apoptoseinduktion moduliert. Des Weiteren wird der Zellzyklus unter anderem durch die Deregulation der zellulären Spiegel von p27^{KIP} und p21^{WAF1} beeinflusst (Nencioni *et al.* 2007, Voorhees und Orłowski 2006). Aufgrund der hohen Zahl zellulärer Prozesse, die durch proteasomalen Abbau beeinflusst werden, ist die genaue Wirkungsweise der Proteasomeninhibition noch nicht vollständig verstanden. Insbesondere kann sie sich auch in verschiedenen Erkrankungen unterscheiden. Häufig sind Signalwege der proteasomalen Regulation unterworfen, die für die Kontrolle der zellulären Integrität zuständig sind, z.B. der Unterdrückung der Zellapoptose und der Zellzyklusprogression (Nencioni *et al.* 2007, Voorhees und Orłowski 2006). Dabei beeinflusst die proteasomale Degradation gleichzeitig verschiedene, alternative Signalkaskaden dieser beiden zentralen zellulären Kontrollmechanismen. Es ist daher nicht verwunderlich, dass die Hemmung dieses Enzymkomplexes auch in verschiedenen neoplastischen Erkrankungen Wirkung zeigt. So laufen zur Zeit verschiedene klinische Studien, die die Wirksamkeit von Bortezomib bei diversen hämatologischen Erkrankungen und soliden Tumoren untersuchen (Zavrski *et al.* 2007). Da Bortezomib möglicherweise Tumorzellen auch gegenüber Chemo- oder Strahlentherapie sensibilisieren oder sogar Resistenzen überwinden kann, wird der Hemmstoff auch in Kombination mit Chemotherapeutika getestet (Voorhees und Orłowski 2006).

Wie bereits erwähnt, inhibiert Bortezomib einen zentralen, proteinvermittelten Regulationsmechanismus der Zellproliferation und Apoptose und beeinflusst somit direkt die zellulären Proteinspiegel. Daher können auch nur Proteom-basierte Untersuchungen ein umfassendes Bild der durch Proteasomenhemmung modulierten molekulare Signalwege geben. Dies gilt insbesondere für Effekte, die zu frühen

Zeitpunkten nach Bortezomib-Behandlung zu beobachten und wahrscheinlich direkt auf die Hemmung des zellulären Proteinabbaus zurückzuführen sind.

Während Untersuchungen bekannter, beteiligter Signalkaskaden zu wichtigen Einsichten in die Lymphomagenese führten (Esparis-Ogando *et al.* 2005, Goel *et al.* 2005, Zheng *et al.* 2004), kann nur eine globale Screeninganalyse wie die 2D-PAGE bisher unbekannte funktionelle Pfade identifizieren und gleichzeitig Hinweise auf Veränderungen der posttranskriptionellen Proteinregulation geben.

In unseren Untersuchungen zeigte der Proteasominhibitor Bortezomib in vier der fünf getesteten MCL-Zelllinien hohe Ansprechraten bei einer für die klinische Anwendung relevanten Konzentration von 25nM, während die MCL-Zelllinie NCEB-1 gegenüber einer Proteasomenhemmung refraktär ist.

Nach Abschluss unserer Experimente wurde in dieser Zelllinie 5-8 stabil vererbte murine Chromosomen nachgewiesen (Camps *et al.* 2006). Im Einzelnen handelt es sich um die Maus-Chromosomen 1, 2, 9, 10, 12, 14, 16 und 19, welche auch murine Proteine, wie z.B. mBCL-2, exprimieren. Da nicht auszuschließen ist, dass die Maus-Chromosomen für die besondere Unempfindlichkeit der Zelllinie NCEB-1 verantwortlich ist, kann sie nur mit Vorsicht als Modellsystem für Bortezomib-resistente MCL angesehen werden. Daher wurden nur solche Proteinpunkte, die in allen sensitiven MCL-Zelllinien nach Bortezomib-Behandlung signifikant veränderte Proteinspiegel aufwiesen, für die *in silico*-Analyse ausgewählt. Die Bortezomib-refraktäre MCL-Zelllinie NCEB-1 wurde dabei lediglich als Kontroll-Zelllinie verwendet, um Hinweise auf mögliche molekulare Mechanismen der Bortezomib-Resistenz zu erhalten.

Bei den Proteinen, die auf 2D-PAGE-Gelen von NCEB-1 ihre Proteinspiegel veränderten, handelt es sich hauptsächlich um Proteine der physiologischen Stressantwort. Entsprechend sind auch die Kandidatenproteine überwiegend

stressbedingte Hitzeschockproteine (*HSPA9, HSP7C, HSPA5, HSPD1*), oder Komponenten des Zytoskeletts (*ACTG1, FKSG30, NEBL, MACF1, MSN9*). Interessanterweise wurden die Spiegel von Proteinen der RNA-Transkription (*EIF3S2, ZNF54A, HNRPA2B1, SFPQ, KHSRP; SFRS10, HNRPC, HNRPL; SFRS12*) genauso wie Kinasen und andere phosphorylierungsregulierende Proteine (*MOBKL2C, AK5, AKAP2, LGALS1, PAPSS1*) sowohl in den sensitiven als auch in der refraktären Zelllinie moduliert. Diese Befunde könnten durchaus auf spezifische zelluläre Reaktionen auf die Proteasomenhemmung hinweisen, deren Effekt in NCEB-1 durch die Expression von murinen Proteinhomologen kompensiert wird. Die meisten dieser Proteine, z.B. *BCLA2, LSP1* und *ZNF354A* können in das spezifische funktionelle Netzwerk eingefügt werden.

Im Gegensatz dazu werden nur in den Bortezomib-sensitiven Zelllinien veränderte Proteinspiegel von Tumorsuppressorgenen (*ENO1, ENO2, ENO3, FH*) nachgewiesen. Auch die meisten am Energiestoffwechsel beteiligten Proteine (*LYPLA1, AK5, ATP5B, ALDOC, GAPDH, CCT ζ A; NDUFV2*) zeigen ausschließlich in sensitiven Zelllinien veränderte Proteinspiegel. Ebenso ist nur in den sensitiven Zelllinien der Spiegel einer Untereinheit des 26s-Proteasomenkomplexes erhöht. Wie erwartet führen diese veränderten Proteinspiegel nach Bortezomib-Behandlung zu einer verringerten Viabilität der sensitiven Zelllinien und einer erhöhten Anfälligkeit für die Zellapoptose, wie in Proliferations- und Apoptose-Assays bzw. RNA-Expressionsanalysen (Real Time PCR) nachgewiesen werden konnten (Pastore *et al.* 2005, Weigert *et al.* 2007). Diese Experimente belegen die frühen Auswirkungen der Proteasomenhemmung bereits 1h nach Bortezomib-Exposition. Besonders hervorzuheben ist, dass die Zell-experimentell wirksamen Bortezomib-Konzentrationen auch im klinischen Einsatz im Patienten erreicht werden (Belch *et al.* 2006, Fisher *et al.* 2006), was die klinische Relevanz unserer Untersuchungen unterstreicht.

Wie aufgrund der Hemmung des proteasomalen Proteinabbaus zu erwarten ist dabei, sind die meisten Proteinspiegel der Kandidatenproteine nach Bortezomib-Behandlung erhöht. Dabei konnten die identifizierten Proteine grob in vier funktionelle Gruppen eingeteilt werden: Proteine, die Gen-Expressionsvorgänge kontrollieren, z.B. Transkriptions- oder Splicingfaktoren, und Proteine verschiedener Signalwege des Energiestoffwechsels weisen ausschließlich in den sensitiven Zelllinien veränderte Proteinspiegel auf, während veränderte Spiegel von Strukturproteinen, die auch bei Zellteilungsprozessen eine Rolle spielen (*ACTG1*, *CEP290*, *MACF1*, *NEBL*), sowie von Hitzeschockproteinen der unspezifischen zellulären Stressantwort (*HSPA9*, *HSP7C*, *HSPA5*, *HSPD1*) auch in der refraktären Zelllinie NCEB-1 nach Bortezomib-Behandlung beobachtet werden.

Dies deckt sich auch mit den noch unveröffentlichten Beobachtungen (Lorenz *et al.* in Vorbereitung) in unseren Untersuchungen zur Hyperthermie in Kombination mit Bortezomib an den MCL-Zelllinien. Wie in früheren Mikroarray-Analysen von Shringarpure (Shringarpure *et al.* 2006) konnte auch hier eine Abhängigkeit der Bortezomib-Sensitivität von der Expression der Hitzeschockproteine HSP27, HSP90 und HSP70 (*HSP7C*) gezeigt werden. Dabei wies die Bortezomib- und Temperatur-resistente Zelllinie NCEB-1 deutlich höhere basale Spiegel dieser Proteine auf, als die Bortezomib-sensitiven Zelllinien. Interessanterweise führt auch eine starke Erhöhung der zellulären Hitzeschock-Proteinspiegel nach vorangehender milder Hyperthermie-Behandlung entgegen früheren Hypothesen (Isaacs *et al.* 2003) nicht zu einer verringerten Sensitivität gegenüber Bortezomib. Bei hoher Temperaturdosis zeigte sich sogar ein additiver Effekt auf die Überlebensraten der sensitiven Zelllinien. Daraus folgt, dass lediglich stark erhöhte konstitutive Expression der Hitzeschockproteine mit der Bortezomib-Resistenz korreliert werden kann.

Um die Ergebnisse der 2D-PAGE-Analysen zu validieren, wurden für 17 der Kandidatenproteine, für die Antikörper kommerziell erhältlich waren, Western Blot-Analysen durchgeführt. Dabei entsprachen die Bortezomib-induzierten Veränderungen der Proteinmenge in der Western Blot-Analyse nur bei 13 der 17 untersuchten Proteine eindeutig den veränderten Proteinspiegeln der 2D-PAGE-Gele. Drei weitere Western Blots waren nur eingeschränkt auswertbar, da die entsprechenden Proteine in mehreren Proteinpunkten der 2D-PAGE-Analyse mit gegenläufiger Intensitätsveränderung identifiziert wurden. Dennoch weisen diese Ergebnisse auf die Relevanz posttranslationaler Modifikationen bei der Regulierung zellulärer Programme hin. Im Falle der Proteasomenhemmung ist eine Polyubiquitinylierung die wahrscheinlichste posttranslationale Proteinmodifikation, da die so markierten Proteine im inhibierten Proteasom nicht abgebaut werden können und sich daher in der Zelle anhäufen. Eine weitere mögliche posttranslationale Proteinmodifikation stellt die Proteinphosphorylierung dar, die an der Regulation vieler zellulärer Signalwege beteiligt ist (Delom und Chevet 2006). In diesem Zusammenhang ist besonders interessant, dass 5 Kinasen (*MOBK2C*, *AK5*, *AKAP2*, *LGALS1*, *PAPSS1*) unter den identifizierten Kandidatenproteinen nach Proteasomenhemmung sind. Mit einer einzigen Ausnahme konnten alle identifizierten Kandidatenproteine der Bortezomib-sensitiven Zelllinien einem engen, funktionellen Interaktionsnetzwerk zugeordnet werden, das um die zentralen zellulären Kontrollpunkte *TP53* und *MYC* gruppiert ist. Es erscheint daher plausibel, dass die identifizierten Kandidatenproteine den Effekt der Proteasom-Inhibition auf das Überleben der MCI-Zellen vermitteln.

6. Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen einerseits, dass die 2D-PAGE-Proteomanalyse mit anschließender massenspektrometrischer Identifikation eine zuverlässige Methodik darstellt, diverse Typen einer Erkrankung wie dem Mantelzelllymphom (MCL) zu vergleichen und molekulare Veränderungen über eine zeitliche Abfolge zu erfassen. Andererseits stellen die hier identifizierten, durch den Proteasomen-Inhibitor Bortezomib beeinflussten Proteine erste Hinweise für weitere Untersuchungen der Mechanismen der Bortezomib-Resistenz dar. Zudem bieten diese Proteine die Möglichkeit, weitere Wirkmechanismen des Proteasomen-Inhibitors aufzuklären. Die Tumorsuppressor - Proteine Enolase und Fumarathydratase sind hierbei ebenso wie die verschiedenen Transkriptionsfaktoren interessante Kandidaten. Außerdem scheint auch der Energiestoffwechsel eine Rolle bei der Bortezomib-Sensitivität zu spielen.

Schließlich kann die hier verwendete Methodik benutzt werden, um die molekularen Auswirkungen verschiedener neuer Therapieformen beim MCL zu klären. An erster Stelle stehen hier die Analysen weiterer, auf bestimmte Zielmoleküle ausgerichteter Inhibitoren, z.B. des Proteinkinase C-beta Inhibitors Enzastaurin oder des Flavopiridol, eines Inhibitors der Cyklin-abhängigen Kinasen. Mit Hilfe dieser Substanzen, die in präklinischen Studien bereits eine deutliche Wirksamkeit in MCL-Zelllinien aufweisen, sollen die Mechanismen der Resistenzentstehung weiter untersucht werden, um einen tieferen Einblick in die beteiligten Signalwege zu erreichen. Ein spezielles Augenmerk soll dabei auch auf die Analyse synergistisch wirkender Kombinationstherapien gelegt werden, um die Signalwege zu identifizieren, die eine Sensitivierung der neoplastischen Zellen gegenüber Chemotherapie-basierten Therapien bewirken. Ein Beispiel hierfür könnte die

Kombination von Bortezomib mit Hochdosis-Cytarabine (Ara-C) sein, deren Synergismus von der Abfolge der Behandlung abhängig ist. Auf der Basis dieser rationalen molekularen Strategien sollten in Zukunft Therapiekombinationen gezielt entwickelt werden deren Wirkungsweisen sich ergänzen und bestehende Resistenzmechanismen überwinden können.

7. Zusammenfassung

Das Mantelzelllymphom (MCL) ist eine neoplastische Erkrankung des blutbildenden Systems, die durch die ektopische Expression des Zellzyklus-regulierenden Proteins Cyclin D1 charakterisiert ist und im Regelfall durch eine chromosomale Translokation t(11;14)(q13;q32) ausgelöst wird. Trotz stetiger Verbesserungen der Behandlungsmethoden, insbesondere der Optimierung der Kombinationstherapie und dem Einsatz der Anti-CD20-Antikörpertherapie- konnte bislang jedoch keine wesentliche Verbesserung des Gesamtüberlebens erzielt werden. Die Untersuchung der Wirksamkeit und der Wirkmechanismen neuer, molekular ausgerichteter Therapieformen hat daher bei dieser Erkrankung besonders große Bedeutung.

Zu diesem Zweck wurde ein 2D-PAGE-basiertes Verfahren zur Analyse der zellulären Proteinspiegel etabliert und durch die Charakterisierung der Unterschiede zwischen zwei Non-Hodgkin-Lymphom (NHL)-Subtypen (MCL und FL) auf Proteomebene validiert. Im Verlauf dieser Tests wurde darüber hinaus die Aussagekraft der 2D-PAGE-Analyse durch die Verwendung von „Proben-Pools“ verbessert, wodurch die Detektion zufallsbedingter molekularer „Bystander“-Aberrationen unterdrückt und ein repräsentativer molekularer Phänotyp charakterisiert werden konnte. Die Zahl solcher unspezifischen Proteinpunkte, die nur in einzelnen Zelllinien des Probenkollektivs nachgewiesen wurden, konnten in den „Proben-Pools“ um $\geq 66\%$ gesenkt werden. Im Vergleich der zellulären Proteinspiegel der beiden NHL-Subtypen wiesen 175 von insgesamt 1350 Punkte auf den 2D-PAGE-Gelen Subtyp-spezifisch unterschiedliche Proteinspiegel auf, von denen 38 Punkte durch Massenspektrometrie (MS) identifiziert wurden. Die identifizierten Kandidatenproteine können grob 7 funktionellen Gruppen (Apoptose / Zelltod, Reparaturmechanismen, Zellzyklus und Proliferation, Regulation der

Transkription, grundlegende zelluläre Funktionen, Tumor-Antigene, unbekannte Proteinfunktion / hypothetische Proteine) zugeordnet werden und interagieren vorwiegend in einem Netzwerk um den Tumorsuppressor p53.

Das Verfahren der 2D-PAGE-Analyse mit massenspektrometrischer (MS) Proteinidentifizierung wurde anschließend benutzt, um die molekulare Wirkung des Proteasomen-Inhibitors Bortezomib auf MCL (Zelllinien und primäre Patientenzellen) zu analysieren. Dazu wurden 5 MCL-Zelllinien (Granta519, HBL-2, Jeko-1, NCEB-1 und Rec-1) einer Bortezomib-Konzentration von 25nM ausgesetzt und die Veränderungen der zellulären Proteinspiegel nach 1h und 4h mit denen von unbehandelten Zellen verglichen. In dieser Analyse waren die Proteinspiegel von 148 der insgesamt 1013 in allen MCL-Zelllinien nachweisbaren Proteinpunkten nach Bortezomib signifikant verändert. Durch MS konnten 38 der 41 reproduzierbar nachweisbaren Proteinpunkte identifiziert werden, wobei 20 ausschließlich in Bortezomib-sensitiven Zelllinien veränderte Spiegel aufwiesen. Eine Western Blot-Analyse von 17 der 38 identifizierten Proteine bestätigte in 76% die in 2D-PAGE-Gelen beobachteten Veränderungen der Proteinspiegel. Alle Zelllinien zeigten veränderte Spiegel von verschiedenen Hitzeschockproteinen (*HSPA9*, *HSP7C*, *HSPA5*, *HSPD1*), während Zelllinien die auf eine Behandlung mit Bortezomib ansprachen, auch veränderte Proteinspiegel bei Parametern des Energiestoffwechsels (*ATP5B*, *AK5*, *TPI1*, *ENO2*, *ENO3*, *ALDOC*, *GAPDH*), der RNA- und Transkriptionsregulation (*HNRPL*, *SFRS12*) und der Zellteilung (*NEBL*, *ACTB*, *SMC1A*, *C20orf23*) sowie der Tumorsuppressoren ENO-1 und FH aufwiesen. Diese Proteine konnten in einem engen Interaktionsnetzwerk um das wichtige zelluläre „Checkpoint“-Molekül p53 gruppiert werden. Entsprechend konnten diese Ergebnisse in primären MCL-Patientenproben bestätigt werden, was die Rolle dieser Proteine im Rahmen der Proteasomeninhibition beim MCL unterstreicht.

8. Abstract

MCL is a neoplastic disease of the hematopoietic system and characterized by the ectopic expression of the cell cycle regulator protein cyclin D1 in B-lymphocytes induced by the chromosomal translocation t(11;14)(q13;q32). Despite continuous advances of treatment options, especially optimizing combined therapies and the introduction of the anti-CD20 antibody therapy, overall survival has not been improved. Thus, research with respect to the efficacy and mechanism of new molecular targeted therapies is of utmost importance in this disease.

Therefore, a 2D-PAGE-based technique for analysis of cellular protein levels was established and tested by characterization of the proteomic differences of two B-NHL subtypes (MCL and FL). In the subsequent experiments, stability of 2D-PAGE was improved by suppression of case-specific “bystander alterations” and generation of a defined molecular disease phenotype, using a sample pooling approach. The number of such unspecific protein spots detectable only in single cell lines was reduced by $\geq 66\%$ in sample pool gels. In direct comparison of the two NHL subtypes 175 of 1350 reproducible protein spots on the 2D-PAGE gels exhibited diverging cellular protein levels, of which 38 were subsequently identified by mass spectrometry (MS). The identified candidate proteins were categorized in 7 broad functional groups (apoptosis/cell death, repair mechanism, cell cycle and proliferation, transcriptional regulation, basic cellular functions, tumor antigens and unknown function/hypothetical protein) and were mapped into an interaction network centered around p53.

This method was subsequently used to assess the molecular effect of the proteasome inhibitor bortezomib in MCL cell lines and primary MCL cells. Five MCL cell lines (Granta519, HBL-2, Jeko-1, NCEB-1 and Rec-1) were screened for cellular

protein level alterations following treatment with 25nM bortezomib for up to 4 hours. In this analysis, the levels of 148 of the 1013 reproducible protein spots detected in all sensitive cell lines were significantly altered. Using tandem mass spectrometry, we identified 38 of the 41 most prominent reproducibly detected protein spots, of which 20 were only affected in sensitive cell lines. For 17 of the 38 identified proteins Western Blot analysis was performed and confirmed 76% of protein level alterations observed in the 2D-gels. All cell lines exhibited alterations of the cellular protein levels of heat shock induced protein species (*HSPA9*, *HSP7C*, *HSPA5*, *HSPD1*), while cell lines responding to bortezomib also exhibited altered cellular protein levels of energy metabolism (*ATP5B*, *AK5*, *TPI1*, *ENO2*, *ENO3*, *ALDOC*, *GAPDH*), RNA and transcriptional regulation (*HNRPL*, *SFRS12*) and cell division (*NEBL*, *ACTB*, *SMC1A*, *C20orf23*) as well as the tumor suppressors (ENO-1; FH). These proteins clustered in a tight interaction network centered on the major cellular checkpoint molecule TP53. The results were confirmed in primary MCL patient cells, thus emphasizing the critical role of these proteins after proteasome inhibition.

9. Literaturverzeichnis

- Abe, M., Nozawa, Y., Wakasa, H., Ohno, H. & Fukuhara, S. (1988) Characterization and comparison of two newly established Epstein-Barr virus-negative lymphoma B-cell lines. Surface markers, growth characteristics, cytogenetics, and transplantability. *Cancer*, **61**, 483-490.
- Adams, J. (2004a) The development of proteasome inhibitors as anticancer drugs. *Cancer Cell*, **5**, 417-421.
- Adams, J. (2004b) The proteasome: a suitable antineoplastic target. *Nat Rev Cancer*, **4**, 349-360.
- Adams, J., Behnke, M., Chen, S., Cruickshank, A.A., Dick, L.R., Grenier, L., Klunder, J.M., Ma, Y.T., Plamondon, L. & Stein, R.L. (1998) Potent and selective inhibitors of the proteasome: dipeptidyl boronic acids. *Bioorg Med Chem Lett*, **8**, 333-338.
- Ambudkar, S.V., Kimchi-Sarfaty, C., Sauna, Z.E. & Gottesman, M.M. (2003) P-glycoprotein: from genomics to mechanism. *Oncogene*, **22**, 7468-7485.
- Amerik, A.Y. & Hochstrasser, M. (2004) Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochim Biophys Acta*, **1695**, 189-207.
- Armand, J.P., Burnett, A.K., Drach, J., Harousseau, J.L., Lowenberg, B. & San Miguel, J. (2007) The emerging role of targeted therapy for hematologic malignancies: update on bortezomib and tipifarnib. *Oncologist*, **12**, 281-290.
- Aster, J.C. & Longtine, J.A. (2002) Detection of BCL2 rearrangements in follicular lymphoma. *Am J Pathol*, **160**, 759-763.
- Auld, K.L. & Silver, P.A. (2006) Transcriptional regulation by the proteasome as a mechanism for cellular protein homeostasis. *Cell Cycle*, **5**, 1503-1505.
- Beere, H.M. (2004) "The stress of dying": the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis. *J Cell Sci*, **117**, 2641-2651.
- Belch, A., Kouroukis, C.T., Crump, M., Sehn, L., Gascoyne, R.D., Klasa, R., Powers, J., Wright, J. & Eisenhauer, E.A. (2006) A phase II study of bortezomib in mantle cell lymphoma: the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group trial IND.150. *Ann Oncol*.
- Benson, M., Svensson, P.A., Carlsson, B., Jernas, M., Reinholdt, J., Cardell, L.O. & Carlsson, L. (2002) DNA microarrays to study gene expression in allergic airways. *Clin Exp Allergy*, **32**, 301-308.
- Berkelman, T.S., T (2002) *2-D Electrophoresis Principles and Methods*,. Amersham Biosciences.
- Bertoni, F. & Ponzoni, M. (2007) The cellular origin of mantle cell lymphoma. *Int J Biochem Cell Biol*.
- Breitschopf, K., Haendeler, J., Malchow, P., Zeiher, A.M. & Dimmeler, S. (2000) Posttranslational modification of Bcl-2 facilitates its proteasome-dependent degradation: molecular characterization of the involved signaling pathway. *Mol Cell Biol*, **20**, 1886-1896.
- Camp, E.R., Summy, J., Bauer, T.W., Liu, W., Gallick, G.E. & Ellis, L.M. (2005) Molecular mechanisms of resistance to therapies targeting the epidermal growth factor receptor. *Clin Cancer Res*, **11**, 397-405.
- Camps, J., Salaverria, I., Garcia, M.J., Prat, E., Bea, S., Pole, J.C., Hernandez, L., Del Rey, J., Cigudosa, J.C., Bernues, M., Caldas, C., Colomer, D., Miro, R. & Campo, E. (2006) Genomic imbalances and patterns of karyotypic variability in mantle-cell lymphoma cell lines. *Leuk Res*, **30**, 923-934.

- Carreras, J., Villamor, N., Colomo, L., Moreno, C., Ramon y Cajal, S., Crespo, M., Tort, F., Bosch, F., Lopez-Guillermo, A., Colomer, D., Montserrat, E. & Campo, E. (2005) Immunohistochemical analysis of ZAP-70 expression in B-cell lymphoid neoplasms. *J Pathol*, **205**, 507-513.
- Castedo, M., Hirsch, T., Susin, S.A., Zamzami, N., Marchetti, P., Macho, A. & Kroemer, G. (1996) Sequential acquisition of mitochondrial and plasma membrane alterations during early lymphocyte apoptosis. *J Immunol*, **157**, 512-521.
- Chang, W.C., Huang, L.C., Wang, Y.S., Peng, W.P., Chang, H.C., Hsu, N.Y., Yang, W.B. & Chen, C.H. (2007) Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) mechanism revisited. *Anal Chim Acta*, **582**, 1-9.
- Chiarle, R., Budel, L.M., Skolnik, J., Frizzera, G., Chilosi, M., Corato, A., Pizzolo, G., Magidson, J., Montagnoli, A., Pagano, M., Maes, B., De Wolf-Peeters, C. & Inghirami, G. (2000) Increased proteasome degradation of cyclin-dependent kinase inhibitor p27 is associated with a decreased overall survival in mantle cell lymphoma. *Blood*, **95**, 619-626.
- Chleq-Deschamps, C.M., LeBrun, D.P., Huie, P., Besnier, D.P., Warnke, R.A., Sibley, R.K. & Cleary, M.L. (1993) Topographical dissociation of BCL-2 messenger RNA and protein expression in human lymphoid tissues. *Blood*, **81**, 293-298.
- Cohen, B.J., Moskowitz, C., Straus, D., Noy, A., Hedrick, E. & Zelenetz, A. (2001) Cyclophosphamide/fludarabine (CF) is active in the treatment of mantle cell lymphoma. *Leuk Lymphoma*, **42**, 1015-1022.
- Culmsee, C. & Landshamer, S. (2006) Molecular insights into mechanisms of the cell death program: role in the progression of neurodegenerative disorders. *Curr Alzheimer Res*, **3**, 269-283.
- Delic, J., Masdehors, P., Omura, S., Cosset, J.M., Dumont, J., Binet, J.L. & Magdelenat, H. (1998) The proteasome inhibitor lactacystin induces apoptosis and sensitizes chemo- and radioresistant human chronic lymphocytic leukaemia lymphocytes to TNF-alpha-initiated apoptosis. *Br J Cancer*, **77**, 1103-1107.
- Delom, F. & Chevet, E. (2006) Phosphoprotein analysis: from proteins to proteomes. *Proteome Sci*, **4**, 15.
- Drexler, H.C. (1997) Activation of the cell death program by inhibition of proteasome function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 855-860.
- Drexler, H.G. (2000) *The Leukemia-Lymphoma Cell Line Facts Book*. Academic Press.
- Drexler, H.G. & MacLeod, R.A. (2002) Malignant hematopoietic cell lines: in vitro models for the study of mantle cell lymphoma. *Leuk Res*, **26**, 781-787.
- Dreyling, M., Lenz, G., Hoster, E., Van Hoof, A., Gisselbrecht, C., Schmits, R., Metzner, B., Truemper, L., Reiser, M., Steinhauer, H., Boiron, J.M., Boogaerts, M.A., Aldaoud, A., Silingardi, V., Kluin-Nelemans, H.C., Hasford, J., Parwaresch, R., Unterhalt, M. & Hiddemann, W. (2005) Early consolidation by myeloablative radiochemotherapy followed by autologous stem cell transplantation in first remission significantly prolongs progression-free survival in mantle-cell lymphoma: results of a prospective randomized trial of the European MCL Network. *Blood*, **105**, 2677-2684.
- Dreyling, M., Unterhalt, M., Weigert, O. & Hiddemann, W. (2007) [Therapy of mantle cell lymphoma.]. *Internist (Berl)*, **48**, 382-388.
- Dreyling, M.H., Bullinger, L., Ott, G., Stilgenbauer, S., Muller-Hermelink, H.K., Bentz, M., Hiddemann, W. & Dohner, H. (1997) Alterations of the cyclin D1/p16-pRB pathway in mantle cell lymphoma. *Cancer Res*, **57**, 4608-4614.

- Dyer, M.J., Fischer, P., Nacheva, E., Labastide, W. & Karpas, A. (1990) A new human B-cell non-Hodgkin's lymphoma cell line (Karpas 422) exhibiting both t(14;18) and t(4;11) chromosomal translocations. *Blood*, **75**, 709-714.
- Esparis-Ogando, A., Alegre, A., Aguado, B., Mateo, G., Gutierrez, N., Blade, J., Schenkein, D., Pandiella, A. & San Miguel, J.F. (2005) Bortezomib is an efficient agent in plasma cell leukemias. *Int J Cancer*, **114**, 665-667.
- Fadeel, B., Zhivotovsky, B. & Orrenius, S. (1999) All along the watchtower: on the regulation of apoptosis regulators. *FASEB J*, **13**, 1647-1657.
- Fernandez, V., Hartmann, E., Ott, G., Campo, E. & Rosenwald, A. (2005) Pathogenesis of mantle-cell lymphoma: all oncogenic roads lead to dysregulation of cell cycle and DNA damage response pathways. *J Clin Oncol*, **23**, 6364-6369.
- Feuring-Buske, M., Hartmann, E.M., Ott, G., Reuter, H., Buske, C. & Rosenwald, A. (2006) [DNA-chips in the diagnosis of hematological malignancies]. *Internist (Berl)*, **47**, 39-46.
- Fisher, R.I., Bernstein, S.H., Kahl, B.S., Djulbegovic, B., Robertson, M.J., de Vos, S., Epner, E., Krishnan, A., Leonard, J.P., Lonial, S., Stadtmauer, E.A., O'Connor, O.A., Shi, H., Boral, A.L. & Goy, A. (2006) Multicenter phase II study of bortezomib in patients with relapsed or refractory mantle cell lymphoma. *J Clin Oncol*, **24**, 4867-4874.
- Forstpointner, R., Dreyling, M., Repp, R., Hermann, S., Hanel, A., Metzner, B., Pott, C., Hartmann, F., Rothmann, F., Rohrberg, R., Bock, H.P., Wandt, H., Unterhalt, M. & Hiddemann, W. (2004) The addition of rituximab to a combination of fludarabine, cyclophosphamide, mitoxantrone (FCM) significantly increases the response rate and prolongs survival as compared with FCM alone in patients with relapsed and refractory follicular and mantle cell lymphomas: results of a prospective randomized study of the German Low-Grade Lymphoma Study Group. *Blood*, **104**, 3064-3071.
- Fribley, A., Zeng, Q. & Wang, C.Y. (2004) Proteasome inhibitor PS-341 induces apoptosis through induction of endoplasmic reticulum stress-reactive oxygen species in head and neck squamous cell carcinoma cells. *Mol Cell Biol*, **24**, 9695-9704.
- Fu, K., Weisenburger, D.D., Greiner, T.C., Dave, S., Wright, G., Rosenwald, A., Chiorazzi, M., Iqbal, J., Gesk, S., Siebert, R., De Jong, D., Jaffe, E.S., Wilson, W.H., Delabie, J., Ott, G., Dave, B.J., Sanger, W.G., Smith, L.M., Rimsza, L., Braziel, R.M., Muller-Hermelink, H.K., Campo, E., Gascoyne, R.D., Staudt, L.M. & Chan, W.C. (2005) Cyclin D1-negative mantle cell lymphoma: a clinicopathologic study based on gene expression profiling. *Blood*, **106**, 4315-4321.
- Fu, Y.F. & Fan, T.J. (2002) Bcl-2 family proteins and apoptosis. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)*, **34**, 389-394.
- Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R.D. & Bairoch, A. (2003) ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res*, **31**, 3784-3788.
- Gatto, S., Scappini, B., Pham, L., Onida, F., Milella, M., Ball, G., Ricci, C., Divoky, V., Verstovsek, S., Kantarjian, H.M., Keating, M.J., Cortes-Franco, J.E. & Beran, M. (2003) The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth and induces apoptosis in Bcr/Abl-positive cell lines sensitive and resistant to imatinib mesylate. *Haematologica*, **88**, 853-863.

- Gautier-Bert, K., Murol, B., Jarrousse, A.S., Ballut, L., Badaoui, S., Petit, F. & Schmid, H.P. (2003) Substrate affinity and substrate specificity of proteasomes with RNase activity. *Mol Biol Rep*, **30**, 1-7.
- Gesk, S., Klapper, W., Martin-Subero, J.I., Nagel, I., Harder, L., Fu, K., Bernd, H.W., Weisenburger, D.D., Parwaresch, R. & Siebert, R. (2006) A chromosomal translocation in cyclin D1-negative/cyclin D2-positive mantle cell lymphoma fuses the CCND2 gene to the IGK locus. *Blood*, **108**, 1109-1110.
- Gevaert, K. & Vandekerckhove, J. (2000) Protein identification methods in proteomics. *Electrophoresis*, **21**, 1145-1154.
- Ghielmini, M., Schmitz, S.F., Cogliatti, S., Bertoni, F., Waltzer, U., Fey, M.F., Betticher, D.C., Schefer, H., Pichert, G., Stahel, R., Ketterer, N., Bargetzi, M. & Cerny, T. (2005) Effect of single-agent rituximab given at the standard schedule or as prolonged treatment in patients with mantle cell lymphoma: a study of the Swiss Group for Clinical Cancer Research (SAKK). *J Clin Oncol*, **23**, 705-711.
- Gille, C., Grade, K. & Coutelle, C. (1991) A pooling strategy for heterozygote screening of the delta F508 cystic fibrosis mutation. *Hum Genet*, **86**, 289-291.
- Gladden, A.B., Woolery, R., Aggarwal, P., Wasik, M.A. & Diehl, J.A. (2006) Expression of constitutively nuclear cyclin D1 in murine lymphocytes induces B-cell lymphoma. *Oncogene*, **25**, 998-1007.
- Glickman, M.H. & Adir, N. (2004) The proteasome and the delicate balance between destruction and rescue. *PLoS Biol*, **2**, E13.
- Glickman, M.H. & Ciechanover, A. (2002) The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev*, **82**, 373-428.
- Glickman, M.H. & Raveh, D. (2005) Proteasome plasticity. *FEBS Lett*, **579**, 3214-3223.
- Goel, A., Dispenzieri, A., Greipp, P.R., Witzig, T.E., Mesa, R.A. & Russell, S.J. (2005) PS-341-mediated selective targeting of multiple myeloma cells by synergistic increase in ionizing radiation-induced apoptosis. *Exp Hematol*, **33**, 784-795.
- Greenbaum, D., Colangelo, C., Williams, K. & Gerstein, M. (2003) Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale. *Genome Biol*, **4**, 117.
- Hernandez, L., Bea, S., Pinyol, M., Ott, G., Katzenberger, T., Rosenwald, A., Bosch, F., Lopez-Guillermo, A., Delabie, J., Colomer, D., Montserrat, E. & Campo, E. (2005) CDK4 and MDM2 gene alterations mainly occur in highly proliferative and aggressive mantle cell lymphomas with wild-type INK4a/ARF locus. *Cancer Res*, **65**, 2199-2206.
- Hiddemann, W. & Dreyling, M. (2003) Mantle cell lymphoma: therapeutic strategies are different from CLL. *Curr Treat Options Oncol*, **4**, 219-226.
- Hiddemann, W., Dreyling, M. & Stein, H. (2004) *Lymphome Neue Erkenntnisse und Therapiestrategien*. Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart.
- Hideshima, T., Richardson, P., Chauhan, D., Palombella, V.J., Elliott, P.J., Adams, J. & Anderson, K.C. (2001) The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. *Cancer Res*, **61**, 3071-3076.
- Howard, O.M., Gribben, J.G., Neuberg, D.S., Grossbard, M., Poor, C., Janicek, M.J. & Shipp, M.A. (2002) Rituximab and CHOP induction therapy for newly diagnosed mantle-cell lymphoma: molecular complete responses are not predictive of progression-free survival. *J Clin Oncol*, **20**, 1288-1294.

- Hummel, M., Tamaru, J., Kalvelage, B. & Stein, H. (1994) Mantle cell (previously centrocytic) lymphomas express VH genes with no or very little somatic mutations like the physiologic cells of the follicle mantle. *Blood*, **84**, 403-407.
- Hutter, G., Nickenig, C., Garritsen, H., Hellenkamp, F., Hoerning, A., Hiddemann, W. & Dreyling, M. (2004) Use of polymorphisms in the noncoding region of the human mitochondrial genome to identify potential contamination of human leukemia-lymphoma cell lines. *Hematol J*, **5**, 61-68.
- Isaacs, J.S., Xu, W. & Neckers, L. (2003) Heat shock protein 90 as a molecular target for cancer therapeutics. *Cancer Cell*, **3**, 213-217.
- Jaffe, E., Harris, N., Stein, H., Vardiman, J. & (2001) *World Health Organisation Classification of Tumours: Tumours of the Haemopoietic and Lymphoid Tissues*. IARC Press, Lyon.
- Jeon, H.J., Kim, C.W., Yoshino, T. & Akagi, T. (1998) Establishment and characterization of a mantle cell lymphoma cell line. *Br J Haematol*, **102**, 1323-1326.
- Khoury, I.F., Lee, M.S., Saliba, R.M., Jun, G., Fayad, L., Younes, A., Pro, B., Acholonu, S., McLaughlin, P., Katz, R.L. & Champlin, R.E. (2003) Nonablative allogeneic stem-cell transplantation for advanced/recurrent mantle-cell lymphoma. *J Clin Oncol*, **21**, 4407-4412.
- Kienle, D., Krober, A., Katzenberger, T., Ott, G., Leupolt, E., Barth, T.F., Moller, P., Benner, A., Habermann, A., Muller-Hermelink, H.K., Bentz, M., Lichter, P., Dohner, H. & Stilgenbauer, S. (2003) VH mutation status and VDJ rearrangement structure in mantle cell lymphoma: correlation with genomic aberrations, clinical characteristics, and outcome. *Blood*, **102**, 3003-3009.
- Kluin-Nelemans, H.C., Limpens, J., Meerabux, J., Beverstock, G.C., Jansen, J.H., de Jong, D. & Kluin, P.M. (1991) A new non-Hodgkin's B-cell line (DoHH2) with a chromosomal translocation t(14;18)(q32;q21). *Leukemia*, **5**, 221-224.
- Kohlmann, A., Schoch, C., Schnittger, S., Dugas, M., Hiddemann, W., Kern, W. & Haferlach, T. (2003) Molecular characterization of acute leukemias by use of microarray technology. *Genes Chromosomes Cancer*, **37**, 396-405.
- Kurland, J.F. & Meyn, R.E. (2001) Protease inhibitors restore radiation-induced apoptosis to Bcl-2-expressing lymphoma cells. *Int J Cancer*, **96**, 327-333.
- Lee, A.H., Iwakoshi, N.N., Anderson, K.C. & Glimcher, L.H. (2003) Proteasome inhibitors disrupt the unfolded protein response in myeloma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 9946-9951.
- Lefrere, F., Delmer, A., Levy, V., Delarue, R., Varet, B. & Hermine, O. (2004) Sequential chemotherapy regimens followed by high-dose therapy with stem cell transplantation in mantle cell lymphoma: an update of a prospective study. *Haematologica*, **89**, 1275-1276.
- Leggett, D.S., Hanna, J., Borodovsky, A., Crosas, B., Schmidt, M., Baker, R.T., Walz, T., Ploegh, H. & Finley, D. (2002) Multiple associated proteins regulate proteasome structure and function. *Mol Cell*, **10**, 495-507.
- Lenz, G., Dreyling, M., Hoster, E., Wormann, B., Duhrsen, U., Metzner, B., Eimermacher, H., Neubauer, A., Wandt, H., Steinhauer, H., Martin, S., Heidemann, E., Aldaoud, A., Parwaresch, R., Hasford, J., Unterhalt, M. & Hiddemann, W. (2005) Immunochemotherapy with rituximab and cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone significantly improves response and time to treatment failure, but not long-term outcome in patients with previously untreated mantle cell lymphoma: results of a prospective randomized trial of the German Low Grade Lymphoma Study Group (GLSG). *J Clin Oncol*, **23**, 1984-1992.

- Leverkus, M., Sprick, M.R., Wachter, T., Mengling, T., Baumann, B., Serfling, E., Brocker, E.B., Goebeler, M., Neumann, M. & Walczak, H. (2003) Proteasome inhibition results in TRAIL sensitization of primary keratinocytes by removing the resistance-mediating block of effector caspase maturation. *Mol Cell Biol*, **23**, 777-790.
- Lopes, U.G., Erhardt, P., Yao, R. & Cooper, G.M. (1997) p53-dependent induction of apoptosis by proteasome inhibitors. *J Biol Chem*, **272**, 12893-12896.
- Lorenz, M., Rieken, M., Weinkauff, M., Pastore, A., Dreyling, M., Issels, R. & Milani, V. (in Vorbereitung) *Heat treatment in mantle cell lymphoma cells resistant and sensitive to the proteasome inhibitor bortezomib*. University Hospital Großhadern/LMU; Department of Medicine III; CCG Hyperthermia.
- Matrixscience (2003) *MASCOT*.
- Melo, J.V., Brito-Babapulle, V., Foroni, L., Robinson, D.S., Luzzatto, L. & Catovsky, D. (1986) Two new cell lines from B-prolymphocytic leukaemia: characterization by morphology, immunological markers, karyotype and Ig gene rearrangement. *Int J Cancer*, **38**, 531-538.
- Menendez, P., Vargas, A., Bueno, C., Barrena, S., Almeida, J., De Santiago, M., Lopez, A., Roa, S., San Miguel, J.F. & Orfao, A. (2004) Quantitative analysis of bcl-2 expression in normal and leukemic human B-cell differentiation. *Leukemia*, **18**, 491-498.
- Mimnaugh, E.G., Xu, W., Vos, M., Yuan, X., Isaacs, J.S., Bisht, K.S., Gius, D. & Neckers, L. (2004) Simultaneous inhibition of hsp 90 and the proteasome promotes protein ubiquitination, causes endoplasmic reticulum-derived cytosolic vacuolization, and enhances antitumor activity. *Mol Cancer Ther*, **3**, 551-566.
- Mitsiades, N., Mitsiades, C.S., Poulaki, V., Chauhan, D., Fanourakis, G., Gu, X., Bailey, C., Joseph, M., Libermann, T.A., Treon, S.P., Munshi, N.C., Richardson, P.G., Hideshima, T. & Anderson, K.C. (2002) Molecular sequelae of proteasome inhibition in human multiple myeloma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 14374-14379.
- Mitsiades, N., Mitsiades, C.S., Richardson, P.G., Poulaki, V., Tai, Y.T., Chauhan, D., Fanourakis, G., Gu, X., Bailey, C., Joseph, M., Libermann, T.A., Schlossman, R., Munshi, N.C., Hideshima, T. & Anderson, K.C. (2003) The proteasome inhibitor PS-341 potentiates sensitivity of multiple myeloma cells to conventional chemotherapeutic agents: therapeutic applications. *Blood*, **101**, 2377-2380.
- Mohamed, A.N. & al-Katib, A. (1988) Establishment and characterization of a human lymphoma cell line (WSU-NHL) with 14;18 translocation. *Leuk Res*, **12**, 833-843.
- Mohammad, R.M., Maki, A., Vistisen, K. & al-Katib, A. (1994) Protein studies of human non-Hodgkin's B-lymphoma: appraisal by two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis*, **15**, 1566-1572.
- Motoyama, N. & Naka, K. (2004) DNA damage tumor suppressor genes and genomic instability. *Curr Opin Genet Dev*, **14**, 11-16.
- Nencioni, A., Grunebach, F., Patrone, F., Ballestrero, A. & Brossart, P. (2007) Proteasome inhibitors: antitumor effects and beyond. *Leukemia*, **21**, 30-36.
- Ni, H., Ergin, M., Huang, Q., Qin, J.Z., Amin, H.M., Martinez, R.L., Saeed, S., Barton, K. & Alkan, S. (2001) Analysis of expression of nuclear factor kappa B (NF-kappa B) in multiple myeloma: downregulation of NF-kappa B induces apoptosis. *Br J Haematol*, **115**, 279-286.

- Nikrad, M., Johnson, T., Puthalalath, H., Coultas, L., Adams, J. & Kraft, A.S. (2005) The proteasome inhibitor bortezomib sensitizes cells to killing by death receptor ligand TRAIL via BH3-only proteins Bik and Bim. *Mol Cancer Ther*, **4**, 443-449.
- Orchard, J., Garand, R., Davis, Z., Babbage, G., Sahota, S., Matutes, E., Catovsky, D., Thomas, P.W., Avet-Loiseau, H. & Oscier, D. (2003) A subset of t(11;14) lymphoma with mantle cell features displays mutated IgVH genes and includes patients with good prognosis, nonnodal disease. *Blood*, **101**, 4975-4981.
- Orlowski, R.Z. & Baldwin, A.S., Jr. (2002) NF-kappaB as a therapeutic target in cancer. *Trends Mol Med*, **8**, 385-389.
- Orlowski, R.Z., Small, G.W. & Shi, Y.Y. (2002) Evidence that inhibition of p44/42 mitogen-activated protein kinase signaling is a factor in proteasome inhibitor-mediated apoptosis. *J Biol Chem*, **277**, 27864-27871.
- Otto, E., Zalewski, C., Kaloss, M., Del Giudice, R.A., Gardella, R. & McGarrity, G.J. (1996) Quantitative detection of cell culture Mycoplasmas by a one step polymerase chain reaction method. *Methods in Cell Science*, **18**, 261-268.
- Pandey, A. & Mann, M. (2000) Proteomics to study genes and genomes. *Nature*, **405**, 837-846.
- Pastore, A., Rieken, M., Weigert, O., Zimmermann, Y., Hutter, G., Weinkauff, M., Hiddemann, W. & Dreyling, M. (2005) Inhibition of Proteasome Is Associated with Early Alterations of Cell Cycle Regulators and Induces Synergistic Antitumour Activities in Mantle Cell Lymphoma in a Sequence Dependent Manner. *ASH Annual Meeting Abstracts*, **106**, 2409-.
- Perez-Galan, P., Roue, G., Villamor, N., Montserrat, E., Campo, E. & Colomer, D. (2006) The proteasome inhibitor bortezomib induces apoptosis in mantle-cell lymphoma through generation of ROS and Noxa activation independent of p53 status. *Blood*, **107**, 257-264.
- Petrovic, A.S., Young, R.L., Hilgarth, B., Ambros, P., Korsmeyer, S.J. & Jaeger, U. (1998) The Ig heavy chain 3' end confers a posttranscriptional processing advantage to Bcl-2-IgH fusion RNA in t(14;18) lymphoma. *Blood*, **91**, 3952-3961.
- Prod'homme, T., Drenou, B., De Ruyffelaere, C., Barbieri, G., Wiszniewski, W., Bastard, C., Charron, D. & Alcaide-Loridan, C. (2004) Defective class II transactivator expression in a B lymphoma cell line. *Leukemia*, **18**, 832-840.
- Robertson, J.D., Datta, K., Biswal, S.S. & Kehrer, J.P. (1999) Heat-shock protein 70 antisense oligomers enhance proteasome inhibitor-induced apoptosis. *Biochem J*, **344 Pt 2**, 477-485.
- Robinson, S.P., Goldstone, A.H., Mackinnon, S., Carella, A., Russell, N., de Elvira, C.R., Taghipour, G. & Schmitz, N. (2002) Chemoresistant or aggressive lymphoma predicts for a poor outcome following reduced-intensity allogeneic progenitor cell transplantation: an analysis from the Lymphoma Working Party of the European Group for Blood and Bone Marrow Transplantation. *Blood*, **100**, 4310-4316.
- Rock, K.L., Gramm, C., Rothstein, L., Clark, K., Stein, R., Dick, L., Hwang, D. & Goldberg, A.L. (1994) Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell*, **78**, 761-771.
- Romaguera, J.E., Fayad, L., Rodriguez, M.A., Broglio, K.R., Hagemester, F.B., Pro, B., McLaughlin, P., Younes, A., Samaniego, F., Goy, A., Sarris, A.H., Dang, N.H., Wang, M., Beasley, V., Medeiros, L.J., Katz, R.L., Gagneja, H., Samuels, B.I., Smith, T.L. & Cabanillas, F.F. (2005) High rate of durable

- remissions after treatment of newly diagnosed aggressive mantle-cell lymphoma with rituximab plus hyper-CVAD alternating with rituximab plus high-dose methotrexate and cytarabine. *J Clin Oncol*, **23**, 7013-7023.
- Rosenwald, A. (2003) DNA microarrays in lymphoid malignancies. *Oncology (Williston Park)*, **17**, 1743-1748; discussion 1750, 1755, 1758-1749 passim.
- Rosenwald, A., Wright, G., Wiestner, A., Chan, W.C., Connors, J.M., Campo, E., Gascoyne, R.D., Grogan, T.M., Muller-Hermelink, H.K., Smeland, E.B., Chiorazzi, M., Giltnane, J.M., Hurt, E.M., Zhao, H., Averett, L., Henrickson, S., Yang, L., Powell, J., Wilson, W.H., Jaffe, E.S., Simon, R., Klausner, R.D., Montserrat, E., Bosch, F., Greiner, T.C., Weisenburger, D.D., Sanger, W.G., Dave, B.J., Lynch, J.C., Vose, J., Armitage, J.O., Fisher, R.I., Miller, T.P., LeBlanc, M., Ott, G., Kvaloy, S., Holte, H., Delabie, J. & Staudt, L.M. (2003) The proliferation gene expression signature is a quantitative integrator of oncogenic events that predicts survival in mantle cell lymphoma. *Cancer Cell*, **3**, 185-197.
- Rudolph, C., Steinemann, D., Von Neuhoff, N., Gadzicki, D., Ripperger, T., Drexler, H.G., Mrasek, K., Liehr, T., Claussen, U., Emura, M., Schrock, E. & Schlegelberger, B. (2004) Molecular cytogenetic characterization of the mantle cell lymphoma cell line GRANTA-519. *Cancer Genet Cytogenet*, **153**, 144-150.
- Rutkowski, D.T. & Kaufman, R.J. (2004) A trip to the ER: coping with stress. *Trends Cell Biol*, **14**, 20-28.
- Salaverria, I., Perez-Galan, P., Colomer, D. & Campo, E. (2006) Mantle cell lymphoma: from pathology and molecular pathogenesis to new therapeutic perspectives. *Haematologica*, **91**, 11-16.
- Saltman, D.L., Cachia, P.G., Dewar, A.E., Ross, F.M., Krajewski, A.S., Ludlam, C. & Steel, C.M. (1988) Characterization of a new non-Hodgkin's lymphoma cell line (NCEB-1) with a chromosomal (11:14) translocation [t(11:14)(q13;q32)]. *Blood*, **72**, 2026-2030.
- Satoh, K., Sasajima, H., Nyomura, K.I., Yokosawa, H. & Sawada, H. (2001) Assembly of the 26S proteasome is regulated by phosphorylation of the p45/Rpt6 ATPase subunit. *Biochemistry*, **40**, 314-319.
- Sayers, T.J., Brooks, A.D., Koh, C.Y., Ma, W., Seki, N., Raziuddin, A., Blazar, B.R., Zhang, X., Elliott, P.J. & Murphy, W.J. (2003) The proteasome inhibitor PS-341 sensitizes neoplastic cells to TRAIL-mediated apoptosis by reducing levels of c-FLIP. *Blood*, **102**, 303-310.
- Schulz, H., Bohlius, J.F., Trelle, S., Skoetz, N., Reiser, M., Kober, T., Schwarzer, G., Herold, M., Dreyling, M., Hallek, M. & Engert, A. (2007) Immunochemotherapy with rituximab and overall survival in patients with indolent or mantle cell lymphoma: a systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst*, **99**, 706-714.
- Schwartz, R. & Davidson, T. (2004) Pharmacology, pharmacokinetics, and practical applications of bortezomib. *Oncology (Williston Park)*, **18**, 14-21.
- Seto, M. (2002) Molecular mechanisms of lymphomagenesis through transcriptional dysregulation by chromosome translocation. *Int J Hematol*, **76 Suppl 1**, 323-326.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. & Mann, M. (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem*, **68**, 850-858.
- Shringarpure, R., Catley, L., Bhole, D., Burger, R., Podar, K., Tai, Y.T., Kessler, B., Galardy, P., Ploegh, H., Tassone, P., Hideshima, T., Mitsiades, C., Munshi, N.C., Chauhan, D. & Anderson, K.C. (2006) Gene expression analysis of B-

- lymphoma cells resistant and sensitive to bortezomib. *Br J Haematol*, **134**, 145-156.
- Siebert, R., Rosenwald, A., Staudt, L.M. & Morris, S.W. (2001) Molecular features of B-cell lymphoma. *Curr Opin Oncol*, **13**, 316-324.
- Small, G.W., Shi, Y.Y., Edmund, N.A., Somasundaram, S., Moore, D.T. & Orlowski, R.Z. (2004) Evidence that mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 induction by proteasome inhibitors plays an antiapoptotic role. *Mol Pharmacol*, **66**, 1478-1490.
- Sumegi, M., Hunyadi-Gulyas, E., Medzihradsky, K.F. & Udvardy, A. (2003) 26S proteasome subunits are O-linked N-acetylglucosamine-modified in *Drosophila melanogaster*. *Biochem Biophys Res Commun*, **312**, 1284-1289.
- Sun, X.M., Butterworth, M., MacFarlane, M., Dubiel, W., Ciechanover, A. & Cohen, G.M. (2004) Caspase activation inhibits proteasome function during apoptosis. *Mol Cell*, **14**, 81-93.
- Sunwoo, J.B., Chen, Z., Dong, G., Yeh, N., Crowl Bancroft, C., Sausville, E., Adams, J., Elliott, P. & Van Waes, C. (2001) Novel proteasome inhibitor PS-341 inhibits activation of nuclear factor-kappa B, cell survival, tumor growth, and angiogenesis in squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, **7**, 1419-1428.
- Sup, S.J., Domiati-Saad, R., Kelley, T.W., Steinle, R., Zhao, X. & Hsi, E.D. (2004) ZAP-70 expression in B-cell hematologic malignancy is not limited to CLL/SLL. *Am J Clin Pathol*, **122**, 582-587.
- Thomazy, V.A., Luthra, R., Uthman, M.O., Davies, P.J. & Medeiros, L.J. (2002) Determination of cyclin D1 and CD20 mRNA levels by real-time quantitative RT-PCR from archival tissue sections of mantle cell lymphoma and other non-Hodgkin's lymphomas. *J Mol Diagn*, **4**, 201-208.
- Tiemann, M., Schrader, C., Klapper, W., Dreyling, M.H., Campo, E., Norton, A., Berger, F., Kluin, P., Ott, G., Pileri, S., Pedrinis, E., Feller, A.C., Merz, H., Janssen, D., Hansmann, M.L., Krieken, H., Moller, P., Stein, H., Unterhalt, M., Hiddemann, W. & Parwaresch, R. (2005) Histopathology, cell proliferation indices and clinical outcome in 304 patients with mantle cell lymphoma (MCL): a clinicopathological study from the European MCL Network. *Br J Haematol*, **131**, 29-38.
- Tongaonkar, P., Chen, L., Lambertson, D., Ko, B. & Madura, K. (2000) Evidence for an interaction between ubiquitin-conjugating enzymes and the 26S proteasome. *Mol Cell Biol*, **20**, 4691-4698.
- Traenckner, E.B., Wilk, S. & Baeuerle, P.A. (1994) A proteasome inhibitor prevents activation of NF-kappa B and stabilizes a newly phosphorylated form of I kappa B-alpha that is still bound to NF-kappa B. *EMBO J*, **13**, 5433-5441.
- Tsuruta, F., Sunayama, J., Mori, Y., Hattori, S., Shimizu, S., Tsujimoto, Y., Yoshioka, K., Masuyama, N. & Gotoh, Y. (2004) JNK promotes Bax translocation to mitochondria through phosphorylation of 14-3-3 proteins. *EMBO J*, **23**, 1889-1899.
- Vaziri, S.A., Hill, J., Chikamori, K., Grabowski, D.R., Takigawa, N., Chawla-Sarkar, M., Rybicki, L.R., Gudkov, A.V., Mekhail, T., Bukowski, R.M., Ganapathi, M.K. & Ganapathi, R. (2005) Sensitization of DNA damage-induced apoptosis by the proteasome inhibitor PS-341 is p53 dependent and involves target proteins 14-3-3sigma and survivin. *Mol Cancer Ther*, **4**, 1880-1890.
- Verma, R., Oania, R., Graumann, J. & Deshaies, R.J. (2004) Multiubiquitin chain receptors define a layer of substrate selectivity in the ubiquitin-proteasome system. *Cell*, **118**, 99-110.

- Voorhees, P.M. & Orlowski, R.Z. (2006) The proteasome and proteasome inhibitors in cancer therapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **46**, 189-213.
- Wang, C.Y., Mayo, M.W. & Baldwin, A.S., Jr. (1996) TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB. *Science*, **274**, 784-787.
- Weigert, O., Pastore, A., Rieken, M., Lang, N., Hiddemann, W. & Dreyling, M. (2007) Sequence-dependent synergy of the proteasome inhibitor bortezomib and cytarabine in mantle cell lymphoma. *Leukemia*, **21**, 524-528.
- Weinkauf, M., Hiddemann, W. & Dreyling, M. (2006) Sample pooling in 2-D gel electrophoresis: a new approach to reduce nonspecific expression background. *Electrophoresis*, **27**, 4555-4558.
- Wojcik, C. & DeMartino, G.N. (2003) Intracellular localization of proteasomes. *Int J Biochem Cell Biol*, **35**, 579-589.
- Zavrski, I., Kleeberg, L., Kaiser, M., Fleissner, C., Heider, U., Sterz, J., Jakob, C. & Sezer, O. (2007) Proteasome as an emerging therapeutic target in cancer. *Curr Pharm Des*, **13**, 471-485.
- Zheng, B., Georgakis, G.V., Li, Y., Bharti, A., McConkey, D., Aggarwal, B.B. & Younes, A. (2004) Induction of cell cycle arrest and apoptosis by the proteasome inhibitor PS-341 in Hodgkin disease cell lines is independent of inhibitor of nuclear factor-kappaB mutations or activation of the CD30, CD40, and RANK receptors. *Clin Cancer Res*, **10**, 3207-3215.
- Zhou, M., Wu, X. & Ginsberg, H.N. (1996) Evidence that a rapidly turning over protein, normally degraded by proteasomes, regulates hsp72 gene transcription in HepG2 cells. *J Biol Chem*, **271**, 24769-24775.
- Zhu, H., Zhang, L., Dong, F., Guo, W., Wu, S., Teraishi, F., Davis, J.J., Chiao, P.J. & Fang, B. (2005) Bik/NBK accumulation correlates with apoptosis-induction by bortezomib (PS-341, Velcade) and other proteasome inhibitors. *Oncogene*, **24**, 4993-4999.
- Zucca, E., Roggero, E., Pinotti, G., Pedrinis, E., Cappella, C., Venco, A. & Cavalli, F. (1995) Patterns of survival in mantle cell lymphoma. *Ann Oncol*, **6**, 257-262.

Anlagen

Schriftenverzeichnis

Publikationen (Peer Review)

M. Weinkauff, W. Hiddemann, M. Dreyling; Sample Pooling in 2D Gel Electrophoresis – A New Approach to Reduce Non-Specific Expression Background; Electrophoresis; Oct 25; (2006)

M. Weinkauff, M. Christopeit, W. Hiddemann, M. Dreyling; Proteome - and Microarray - Based Expression Analysis of Lymphoma Cell Lines Identifies a p53-Centered Cluster of Differentially Expressed Proteins in Mantle Cell and Follicular Lymphoma; Electrophoresis. 2007 Dec; 27 (23)

M. Weinkauff, Y. Zimmermann, Elena Hartmann, Andreas Rosenwald, M. Rieken, A. Pastore, G. Hutter, W. Hiddemann, M. Dreyling; 2D-PAGE Analysis Reveals a p53-centered Network of Protein Interactions That Affect the Cell Viability of Proteasome Inhibitor Bortezomib Sensitive Mantle Cell Lymphoma (2008) (Proteomics – Clinical Applications; eingereicht)

M. Lorenz, M. Rieken, **M. Weinkauff**, A. Pastore, M. Dreyling, R. Issles, V. Milani; Heat Treatment in Mantle Cell Lymphoma Cells Resistant and Sensitive to the Proteasome Inhibitor Bortezomib. (2008) (Hyperthermia; eingereicht)

Einfache Fachartikel

M. Weinkauff, J. Lu-Hesselmann, G. Herzog, W. Hiddemann, M. Dreyling:
Proteom-Analyse von Mantelzell-Lymphomen – Standardisierung und initiale
Analyse von differentiellen Effektor-Mustern bei Zellzyklusregulatoren. TZM
News 1: 6-9, 2002

Fachvorträge

M. Weinkauff, W. Hiddemann, M. Dreyling: 2dimensional proteome analysis of
mantle cell and follicular lymphoma – differential protein expression patterns.
8th Annual Congress of the European Hematology Association, Lyon.
Hematology J 4 (Suppl. 2): 260 (2003)

M. Weinkauff, A. Kohlmann, T. Haferlach, W. Hiddemann, M. Dreyling:
Different expression patterns of mRNA and protein levels – a comparison of
follicular and mantle cell lymphomas. Annual Meeting of the American Society
of Hematology, San Diego. Blood 102, No. 11: (2003)

M. Weinkauff, Y. Zimmermann, M. Rieken, A. Pastore, G. Hutter, W.
Hiddemann, M. Dreyling; Two-dimensional gel electrophoresis identifies 41
proteins affected by 26s proteasome inhibitor bortezomib treatment in mantle
cell lymphoma.; Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie 2006,
Leipzig. Onkologie 29 (Suppl. 3): (2006)

Posterpräsentationen

M. Weinkauff, J. Lu-Hesselmann, G. Herzog, W. Hiddemann, M. Dreyling: Proteom analysis of mantle cell lymphomas – standardization and initial analysis of differential effector patterns of cell cycle regulators. 6th International Symposium Biological Therapy of Cancer, Munich. Eur J Cancer 37 (Suppl. 3): S86 (2001)

M. Weinkauff, A. Kohlmann, T. Haferlach, W. Hiddemann, M. Dreyling: Differential analysis of the protein expression pattern of mantle cell and follicular lymphoma by 2-D PAGE. Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie 2003, Basel. Onkologie 26 (Suppl. 5): 52 (2003)

M. Weinkauff, M. Rieken, W. Hiddemann, M. H. Dreyling; Identification of alterations in the cellular proteome induced by the protease inhibitor bortezomib (Velcade®) in mantle cell lymphoma; Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie 2005, Hannover. Onkologie 28 (Suppl. 3): 90 (2005)

L. Biller, **M. Weinkauff**, M. Dreyling, P. Behrmann, T. Zivkovic, E.M. Murga Penas, K. Hinz, M.G. Wetzel, C. BBokemeyer, J. Dierlamm; Comparative expressed sequence hybridization (CESH) reveals novel RNA expression profiles in mantle cell lymphoma.; Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie 2005, Hannover. Onkologie 28 (Suppl. 3): 89 (2005)

G. Hutter, A. Pastore, M. Rieken, Y. Zimmermann, O. Weigert, **M. Weinkauff**, W. Hiddemann, M. Dreyling; The proteasome inhibitor bortezomib (Velcade®) induces rapid alterations of cell cycle regulators in mantle cell lymphoma; Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie 2005, Hannover. Onkologie 28 (Suppl. 3): 89 (2005)

Pastore, M. Rieken, O. Weigert, Y. Zimmermann, G. Hutter, **M. Weinkauff**, W. Hiddemann, M. Dreyling; The protein kinase C beta inhibitor enzastaurin-HCl (LY 317615) downregulates BCL-2, Cyclin D1 and p14 at protein and RNA level in mantle cell lymphoma; Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie 2005, Hannover. Onkologie 28 (Suppl. 3): 89 (2005)

O. Weigert, M. Rieken, A. Pastore, G. Hutter, **M. Weinkauff**, Y. Zimmermann, W. Hiddemann, M. Dreyling; Efficacy of the proteasome inhibitor bortezomib (Velcade®) as single agent and in combination with cytostatic agents in mantle cell lymphoma.; Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie 2005, Hannover. Onkologie 28 (Suppl. 3): 90 (2005)

O. Weigert, M. Rieken, A. Pastore, Y. Zimmermann, G. Hutter, **M. Weinkauff**, W. Hiddemann, M. Dreyling; The proteasome inhibitor bortezomib (Velcade®) induces rapid alterations of cell cycle regulators and augments sensitivity to cytostatic drugs in mantle cell lymphoma; ASCO (2005)

M. Weinkauff, M. Rieken, A. Pastore, E. Hartmann, A. Rosenwald, W. Hiddemann, M. H. Dreyling; Altered Cellular Protein Levels of Tumor Suppressor Genes and Heat Shock Elements (TRAP1) Indicate Sensitivity to the Proteasome Inhibitor Bortezomib (Velcade®) in Mantle Cell Lymphoma.; Annual Meeting of the American Society of Hematology, Atlanta. Blood 103, No. 11: xxxb (2005)

G. Hutter, Y. Zimmermann, **M. Weinkauff**, A. Pastore, G. Ott, W. Hiddemann, M. Dreyling; Onkogenische Hierarchie genomischer Alterationen der 17p13.3 chromosomalen Region in Mantelzelllymphomen; Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie 2006, Leipzig. Onkologie 29 (Suppl. 3): (2006)

Weitere Abstract - Veröffentlichungen

M. Weinkauff, J. Lu-Hesselmann, G. Herzog, W. Hiddemann, M. Dreyling: Proteom analysis of mantle cell lymphomas – standardization and initial analysis of differential effector patterns of cell cycle regulators. Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie 2001, Mannheim. *Onkologie* 24 (Suppl. 1): 72 (2001)

M. Weinkauff, W. Hiddemann, M. Dreyling: Analysis of protein pattern differences between two different distinct lymphoma subtypes. Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie 2002, München. *Onkologie* 25 (Suppl. 4): 206 (2002)

M. Weinkauff, W. Hiddemann, M. Dreyling: 2dimensional proteome analysis of malignant lymphomas – identification of characteristic protein expression patterns. Analysis of protein pattern differences between two different distinct lymphoma subtypes. Annual Meeting of the American Society of Hematology, Philadelphia. *Blood* 100, No. 11: 279b (2002)

Curriculum Vitae

Marc Oliver Weinkauff
Diplom-Biologe
* 01.07.1973

Adenauerstr. 20
82178 Puchheim
Telefon: 089/84933147 Mobil: 0160/7754091
E-Mail: marcweinkauff@googlemail.com

Familienstand:
ledig; keine Kinder

Schule

1980-1984	Grundschule Preißlerstraße
1984-1993	Dürer-Gymnasium Nürnberg

Studium

09/1993-05/2000	Studium der Biologie, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg; Diplomarbeit: „Die Funktion des latenten HHV-8 Proteins K10.1 bei der Transformation“
-----------------	---

Berufliche Tätigkeit

1999-2000	Studentische Hilfskraft im Institut für Virologie der FAU Erlangen
01/2001-	Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Klinischen Kooperationsgruppe Leukämie der Medizinischen Klinik 3 des Universitätskrankenhauses Großhadern in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dreyling

Methodische Erfahrung

- Zellkulturmethoden (einschließlich Mycoplasmentest, Proliferationsanalyse)
- FACS (einschließlich Apoptose- und Zellzyklusanalyse)
- Immunfluoreszenznachweis
- PCR („normale PCR“, RT-PCR, Sequenzierung)
- Klonierung
- Transfektion und Transduktion von eukaryoten Zellen
- Western Blot
- 2-dimensionale Polyacrylamid Gelelektrophorese (Auswertung mittels ProteomeWeaver Software)
- MALDI-TOF Massenspektrometrie (BrukerDaltronics® Reflex III und ABI® 4700 Proteomics Discovery System with Mascot™)

Sprachkenntnisse

- Englisch sehr gut
- Latein: großes Latinum

EDV-Kenntnisse

- Administration der Computer-Nebenstellen der Klinischen Kooperationsgruppe Leukämie innerhalb des Microsoft Windows Xp –Netzwerks der GSF
- Office (verschiedene Versionen und Hersteller)

Grundkenntnisse:

- Access
- Pascal-Delphi
- Unix
- Apple

Weitere Aufgaben

- methodische Anleitung medizinischer Doktoranden in verschiedene Labortechniken
- Betreuung von Schülerpraktika
- Präsentation von Forschungsergebnissen auf internationalen Kongressen (Jahrestagungen der EHA, DGHO und ASH)
- Wiederholte „peer review“-Tätigkeit für *Electrophoresis*