
Aus dem Pathologischen Institut
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Thomas Kirchner

**2-Dimensionale Proteom-Vergleichsanalyse
von peripheren Stammzell-Präparaten
einer CML Kohorte mit gesunden Spendern und
korrespondierenden Zelllinien**

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

Vorgelegt
von Corinna Hopf
aus Memmingen

2009

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität
München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Ralf Huss

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Jan Braess

Priv. Doz. Dr. Ralf Schmidmaier

Priv. Doz. Dr. Stefan Lichtenthaler

Mitbetreuung durch die

promovierten Mitarbeiter:

Dr. rer. nat. Evelyn Zeindl-Eberhart

Dr. agr. Sibylle Liebmann

Dekan:

Prof. Dr. med.

Dr. med. h.c. M. Reiser

FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 26.11.2009

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Geschichtliches und Geschehenes	1
1.2 CML und PBSC	4
1.3 Proteomics, Proteinkarten und Biomarker	6
1.3.1 Von Genomics über funktionelle Genomics zu Proteomics	6
1.3.2 Stärken der 2-DE Proteomicsvorschung	7
2. Zielsetzung	10
3. Material und Methoden	12
3.1 Zellkultur	12
3.1.1 Verwendete Materialien	12
3.1.1.1 Chemikalien	12
3.1.1.2 Geräte und Zubehör	12
3.1.1.3 Zellen	13
3.1.2 Kultivierung der Zelllinien	14
3.1.3 Splitting und Zellzählung	15
3.1.4 Abernten der Zellen	16
3.2 PBSC	16
3.2.1 Definition	16
3.2.2 Gewinnung	17
3.2.3 Informationen zu den verwendeten PBSC Präparaten	18
3.3 PBSC Aufarbeitung/Biocoll Gradient [44, 45]	19
3.3.1 Chemikalien	19
3.3.2 Geräte und Zubehör	19
3.3.3 Vorgehen	20
3.4 Gesamtproteinaufarbeitung für 2-dimensionale Elektrophorese	21
3.4.1 Chemikalien	21
3.4.2 Geräte und Zubehör	22
3.4.3 Vorgehen	22
3.5 Quantitative Proteinbestimmung	23
3.5.1 Chemikalien	23
3.5.2 Geräte und Zubehör	23
3.5.3 Vorgehen	23
3.6 Zweidimensionale Gelelektrophorese (2-DE)	24
3.6.1 Chemikalien	24
3.6.2 Geräte und Zubehör	27
3.6.3 Erste Dimension	27
3.6.4 Zweite Dimension	28
3.7 Anfärbung der Proteine im Gel	30
3.7.1 Silberfärbung nach Heukeshoven und Dernick	30
3.7.1.1 Chemikalien	30
3.7.1.2 Geräte und Zubehör	31
3.7.1.3 Vorgehen	31
3.7.2 Coomassie-Brilliant-Blau Färbung (CBB) [48]	32
3.7.2.1 Chemikalien	32
3.7.2.2 Geräte und Zubehör	32
3.7.2.3 Vorgehen	32
3.8 Visuelle Auswertung	33
3.9 Quantitative und qualitative Auswertung der Spots	33
3.9.1 TopSpot®	33

3.9.2 Excel.....	34
3.10 MALDI-TOF Massenspektrometrie [49, 50]	34
4. Ergebnisse	35
4.1 PBSC/Biocoll	35
4.2 Gesamtproteinaufarbeitung	38
4.3 Proteinbestimmung.....	39
4.4 Vergleichende Proteomanalyse mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese.....	41
4.5 Identifizierung der Proteine mittels Massenspektrometrie.....	52
5. Diskussion	57
5.1 CML, immer noch ein paar offene Fragen	57
5.2 Imatinib	58
5.3 Im Fokus: Die identifizierten Proteine	59
5.3.1 Spot 4: Glucose-regulated-Protein 78/BiP	59
5.3.2 Spot 2, 9 und 11: Fibrin β , Fibrinogen β -Kette, Fibrinogen γ -Kette [187]	67
5.3.2.1 Die Blutgerinnung	67
5.3.2.2 Fibrin(ogen) Struktur.....	69
5.3.2.3 Fibrin(ogen) Aufgaben	71
5.3.2.4 Fibrin(ogen) und Malignität	72
5.3.2.5 Fibrinogen γ -Ketten Funktion	74
5.3.2.6 Fibrinogen γ -Kette und Pathologie	75
5.3.3 Spot 3: Proteasom 26S ATPase Subunit 2	76
5.3.3.1 Das 26S Proteasom (Nobelpreis in Chemie für Ciechanover, Hershko und Rose) [226]	76
5.3.3.2 Aufbau des 26S Proteasoms	77
5.3.3.3 Funktion und Krankheitswert des 26S Proteasoms.....	79
5.3.3.4 26S Proteasom und Malignität	80
5.3.3.5 26S Proteasom und CML	82
5.3.3.6 Proteasom 26S ATPase Subunit 2 Aufbau.....	83
5.3.3.7 Proteasom 26S ATPase Subunit 2 Funktion	83
5.3.3.8 AAA+ Proteine und Krankheitswert.....	84
5.3.4 Spot 34: Proteasom activator Komplex Subunit 1	85
5.3.5 Spot 8: Vinculin	87
5.3.5.1 CML und Integrin- β 1	87
5.3.5.2 Bcr-Abl, β 1 Integrine und cytoskelettale Proteine	89
5.3.5.3 Fokale Adhäsionen [307]	90
5.3.5.4 Paxillin und CML.....	90
5.3.5.5 Vinculin und CML	92
5.3.6 Spot 14 a und b: Annexin 1 bzw. 2	93
5.3.6.1 Annexin 1	94
5.3.6.2 Annexin 2	96
5.3.6.3 Annexin 1, ein neues HSP?!.....	96
5.3.6.4 Annexinopathien	98
5.3.7 Spot 19 und 20: Peroxiredoxin II bzw. I	100
5.3.7.1 Peroxiredoxine	100
5.3.7.2 Bau und Funktionsweise der Peroxiredoxine.....	101
5.3.7.3 Aufgaben der Peroxiredoxine.....	101
5.3.7.4 Aktivierung und Inaktivierung von Prxs I und II.....	102
5.3.7.5 Peroxiredoxine und H ₂ O ₂ Signaling.....	103
5.3.7.6 Prx I und II: Karzinogenese, -Progression, sowie Strahlen bzw. Chemoresistenz	104
5.3.7.6.1 Prx II.....	104

5.3.7.6.2 Prx I.....	105
5.3.7.7 Prx I, c-Abl und CML.....	106
5.3.7.8 Weitere Ansätze des Prxs I und II Einsatzes in der Krebsforschung.....	107
5.3.8 Spot 37: α Enolase.....	108
6. Zusammenfassung.....	111
7. Aussichten.....	113
8. Literaturverzeichnis.....	114
9. Anhang.....	146
9.1. Gele.....	146
9.2 Abkürzungsverzeichnis.....	152
9.3 Curriculum Vitae.....	157
9.4 Danksagung.....	160
10. Ehrenwörtliche Erklärung.....	161



1. Einleitung

1.1 Geschichtliches und Geschehenes

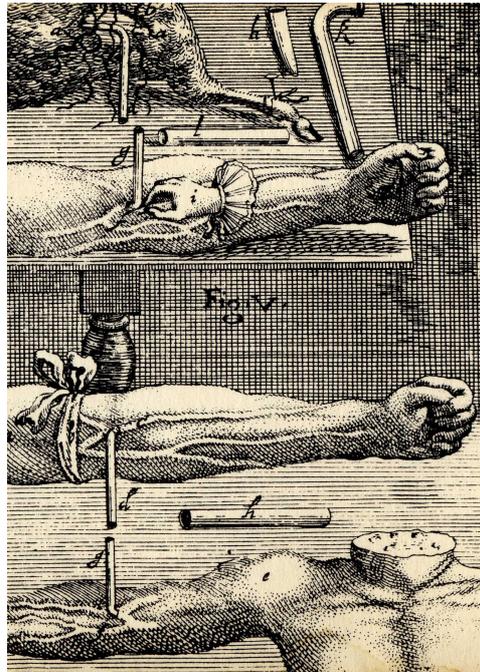


Bild 1.1-1.2 Mit freundlicher Genehmigung des medizinhistorischen Museums Ingolstadt

„Blut ist ein ganz besonderer Saft“, das wusste schon Mephisto in Goethes Faust. Zu allen Zeiten hat der rote Lebenssaft die Menschheit inspiriert und fasziniert. Bereits früh entstand die Vorstellung vom „schlechten“ Blut, bei dem Krankheit drohte und dem „guten“ Blut welches Gesundheit und Heilung versprach. Diese Ansicht reicht bis in die griechische Antike. Damals erwähnte der römische Dichter Ovid (43 v. Chr. bis 17 n. Chr.) im 7. Buch seiner Metamorphosen bereits die Injektion von Blut als Verjüngungskur: „Zückt die Schwerter und holt das alte Blut heraus, damit ich die leeren Adern mit jugendlichem auffülle!“ Und auch der römische Enzyklopädist Celsus (25 v. Chr. bis 50 n. Chr.) empfiehlt in seinem Werk „De medicina“ zur Behandlung der Epilepsie den Aderlass um gemäß den Vorstellungen der auf Galen (129 bis 200 v. Chr.) basierenden Humoralpathologie den schlechten Saft abfließen zu lassen.

Auch die Schilderung der ersten allogenen Bluttransfusion erscheint abenteuerlich: Im Juli 1492 wurde dem schwer erkrankten Papst Innozenz VIII das Blut dreier zehnjähriger Knaben als „Frischzellenkur“ verabreicht. Zuerst starben die Kinder, dann bekanntermaßen der Papst. Als Vater der homologen Bluttransfusion gilt James Blundell (1790-1877), der am Guy´s Hospital (King´s College) in London als Gynäkologe praktizierte. 1825 übertrug Blundell erstmals erfolgreich menschliches Fremdblut auf eine postpartal ausgeblutete Frau und rettete ihr somit das Leben.



Bild 1.3 Zeichnung einer postpartalen Bluttransfusion



Bild 1.4 James Blundell

Die meisten Experimente mit Blut und dessen Transfusion, die in den letzten Jahrhunderten durchgeführt wurden, wirken heute befremdlich. Erst durch die 1902 mit dem Nobelpreis gekrönte Entdeckung der Blutgruppen A, B und 0 durch den Wiener Arzt Karl Landsteiner, war der Grundstein für die moderne Transfusionsmedizin auf wissenschaftlicher Grundlage gelegt.

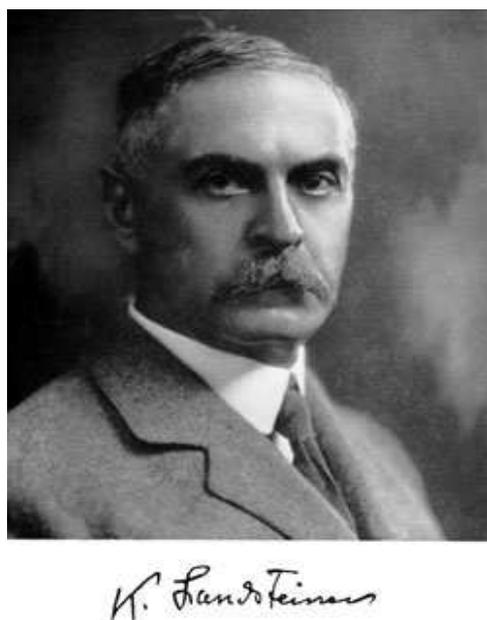


Bild 1.5 Karl Landsteiner

1.2 CML und PBSC

Je mehr das Blut durch den Menschen erforscht wurde, desto mehr Erkrankungen des Blutes, aber auch Heilungsmöglichkeiten durch Infusion des „roten Goldes“ wurden entdeckt.

In unserem Fall, der chronisch myeloischen Leukämie (CML), liegen sowohl Krankheit als auch Heilungschancen im Saft des Lebens.

Von einer Leukämie im Allgemeinen spricht man beim Auftreten einer bösartigen Erkrankung der weißen Blutkörperchen durch Proliferation unreifer hämatopoetischer Stammzellen. Die Expansion eines malignen Zellklons führt zur generalisierten Ausbreitung im blutbildenden Knochenmark, zu eventueller Infiltration extramedullärer Organe und Ausschwemmung der „leukämischen“ Zellen in das periphere Blut, welche die gesunden Zellen mehr und mehr verdrängen.

Die Einteilung der Leukämien erfolgt grob in leukämische und myeloische Leukämien sowie etwas detaillierter in der so genannten FAB (French-American-British-Group) Klassifikation nach morphologischen und zytochemischen Kriterien.

Bei der in meinem Fall näher untersuchten CML handelt es sich um eine sogenannte myeloproliferative Erkrankung. Diese ist auf die klonale Expansion einer frühen hämatopoetischen Stammzelle zurückzuführen, die zur Beeinflussung aller Reihen der Blutbildung führt. Zugrunde liegt zu über 90% die Chromosomentranslokation $t(9;22)(q34;q11)$ [1]. Die atypische CML ohne $t(9;22)$ ist mit einem Anteil unter 10% deutlich seltener. Das veränderte Chromosom Nr. 22 (= Philadelphia-Chromosom oder Ph) zeigt ein bcr-Gen-Rearrangement, verursacht durch Translokation des c-Abl-Protoonkogens (Abl = Ableson leukemia Virus) von Chromosom Nr. 9 auf Chromosom Nr. 22 in die Region des Bcr-Gens (breakpoint cluster Region). Dort fusioniert es zu einem Bcr-Abl-Fusionsgen. Das Fusionsgen Bcr-Abl kodiert die Synthese eines Fusionsproteins mit Tyrosinkinaseaktivität und proliferationsfördernder Wirkung [2]. Dies hat zur Folge, dass das Zellwachstum und das Überleben dieser hämatopoetischen Zellen entgleist [3, 4]. Das Fusionsprotein beeinflusst die natürliche Apoptose seiner Zellen und die Adhäsion an Proteine der extrazellulären Matrix durch Upregulierung der Integrin Aktivität, um nur einige der Folgen der Translokation zu nennen [6, 7].

Von den drei bekannten Subtypen des Bcr-Abl Fusionsproteins (190, 210 und 230 kDa), ist das 210 kDa Protein am häufigsten. Das 190 kDa Fusionsprotein wiederum stellt die aktivste Form der entstehenden Tyrosinkinasen und somit das potenteste Onkogen mit der schlechtesten Prognose dar [2, 7].

Die Störung im Genom der leukämischen Stammzelle führt nach Jahren über einen Überlebensvorteil zu einem völligen Überwiegen der Ph-positiven Zellklone mit weitgehender Unterdrückung der Ph-negativen normalen Hämatopoese. So teilt man die CML denn auch in drei Phasen ein.

Die chronische Phase:

Hier sind die exzessiv produzierten Granulozyten, durch die sich die CML vor allem auszeichnet, noch funktionstüchtig, im Gegensatz zu den unreifen Blasten der akuten Leukämien. Diese Phase ist weitgehend stabil, therapeutisch gut kontrollierbar und dauert zwischen vier und sechs Jahren. Ihr folgt die Akzelerationsphase:

Sie ist eine Übergangsphase von ca. einjähriger Dauer, die sich durch eine Progression der Erkrankung mit Verschlechterung des Allgemeinbefindens, zusätzlichen zytogenetischen Veränderungen bzw. durch eine Verschlechterung von Laborparametern auszeichnet.

In 2/3 der Fälle kommt es daraufhin zur myeloischen Blastenkrise:

Dies bedeutet einen Anstieg von unreifen myeloischen Vorläuferzellen auf über 30% im Blut und/oder Knochenmark. Das andere verbleibende Drittel der CML Patienten entwickelt eine lymphatische Blastenkrise. Patienten die nicht vorher an Komplikationen versterben, erleiden einen terminalen Blastenschub an dem sie dann versterben.

Damit es zu einer Blastenkrise kommen kann, müssen einige ganz bestimmte Veränderungen im Genom der Ph+ Zellen auftreten, die sich bei bis zu 80% der Patienten nachweisen lassen. Dazu zählen z.B. die Duplikation des Ph Chromosoms und die Trisomie 8 [8]. Begleitend kommt es zu vielfältigen weiteren cytogenetischen Veränderungen, wie zum Beispiel einer Mutation bzw. dem Verlust des Tumorsuppressorgenes p53, was den Übergang von der chronischen Phase in die Akzelerationsphase markiert [9]. Auch der Verlust des Tumorsuppressorgenes p16 kann mit variabler Häufigkeit beobachtet werden und weist dann ebenfalls auf den Übergang in die Akzelerationsphase bzw. eine Blastenkrise hin [10].

Der Altersgipfel der CML liegt zwischen 50 und 60 Jahren. Als Ursache gelten ionisierende Strahlung, Benzol und bisher unbekannte Faktoren. Mit der neuen Generation an Medikamenten, den Tyrosinkinasehemmern wie Imatinib (Glivec[®]), steht den Ärzten eine äußerst erfolgreiche Waffe im Kampf um das Leben Ph positiver CML Patienten zu Verfügung, mit zytogenetischen Remissionen (Ph Zellen nicht mehr nachweisbar) von über 80% in der chronischen Phase.

Dennoch ist und bleibt der einzig kurative Ansatz zur definitiven Ausheilung der Erkrankung noch immer die allogene Transplantation von Stammzellen via Knochenmarktransplantation oder peripherer Blutstammzelltransplantation (PBSCT). Bei der PBSCT handelt es sich

sozusagen um eine kurative Bluttransfusion. Was Blundell und seinen anämischen Patientinnen damals die allogene Bluttransfusion war, ist den CML Patienten heute die allogene Blutstammzellinfusion. Hier werden mittels spezieller Verfahren (siehe Material und Methoden 2.2.2.) Stammzellen aus dem Knochenmark eines gesunden Spenders in das periphere Blut ausgeschwemmt. Die Stammzellen werden angereichert, mit dem Blut des Spenders entnommen und dem CML Patienten nach meist ablativer Chemotherapie, reinfundiert. Die PBSC Infusion wird gegenüber der herkömmlichen Knochenmarkstransplantation mehr und mehr favorisiert, da sie viele Vorteile birgt. Dazu zählt, dass dem Spender zur Entnahme seiner Stammzellen nur das leicht zugängliche Blut entnommen wird, so dass Anästhesie und stationäre Aufnahme entfallen, außerdem kommt es nach PBSC Gabe nachweislich zu einer rascheren Rekonstruktion des Blutbildes beim Empfänger [11], als nach herkömmlicher Knochenmarkstransplantation.

1.3 Proteomics, Proteinkarten und Biomarker

1.3.1 Von Genomics über funktionelle Genomics zu Proteomics

Frühjahr 2001, das Human-Genom-Projekt kurz HUGO veröffentlicht die Sequenz des humanen Genoms.[12] Dies bedeutet das Ende des Wettlaufes um die richtige Reihenfolge der 3,2 Milliarden Basenpaare des menschlichen Genoms. Große Hoffnung lastete auf den Erkenntnissen der Genomentschlüsselung und tatsächlich führte die erfolgreiche Arbeit des Human Genom Projektes zu einem enorm verbesserten Verständnis von einigen Krankheiten auf molekularer Ebene.

Doch die geschätzte Zahl von 80.000 bis 140.000 Genen musste auf ca. 25.000 herunterkorrigiert werden. Anhand der enorm größeren Zahl an Proteinen schätzt man, dass es pro Gen also bis zu zehn verschiedene Proteine und mehr geben muss. Schnell wurde deshalb ersichtlich, dass sich die zellulären Abläufe nicht anhand nackter Gensequenzen erahnen lassen. In den letzten Jahren erkannte man, dass das Genom nur die Spitze des Eisberges darstellt. Biologische Funktionen lassen sich nicht allein auf das statische Genom zurückführen, sondern hauptsächlich auf die dynamische Population an Proteinen. Nur ein sehr geringer Teil ausgereifter Proteine lässt sich allein anhand der Genomsequenz vorhersagen. Alternatives Splicing und posttranslationale Proteinmodifikationen wie

Phosphorylierung, Glycosilierung, Ubiquitinierung und Methylierung führen zu einer viel größeren Proteinvielfalt als die Genomsequenzvariationen erahnen lassen. Um einen besseren Einblick in die aktuell in der Zelle ablaufenden Mechanismen zu erhalten, kam man ab von reiner Genomicsforschung und wandte sich der so genannten ´funktionalen Genomics` zu. Diese Methode arbeitet mit Mikroarrays, welche eine große Anzahl an „im Moment“ exprimierten und somit aktiven Genen sichtbar machen. Diese Technik lässt allerdings ebenso die vielen verschiedenen Proteinprodukte dieser Gene und deren funktionelle Signifikanz außer Acht. In der Tat korreliert die Genomexpressionsanalytik nicht gut mit der tatsächlichen Proteinexpression einer Zelle [13]. Außerdem können stabile Proteine in der Zelle noch lange aktiv bleiben, obwohl deren Gene längst herunterreguliert wurden. Dies entspricht der so genannten zeitlichen Entkoppelung zwischen Transkriptom und Proteom. Aus all diesen Gründen und da die Proteine nachweislich die Hauptakteure biologischer Aktivität sind, rücken die Proteine mehr und mehr in den Fokus des medizinischen Forschungsinteresses. Aufgrund der Schwächen von Genomics und funktioneller Genomics lenkte man das Augenmerk auf eine aufstrebende und viel versprechende neue Forschungsdisziplin: Die Proteomics Forschung.

Ursprünglich war das Proteom definiert als die Gesamtheit an Proteinen welche durch das Genom exprimiert werden (von: PROTEin, exprimiert durch das GenOM). Diese Definition lässt allerdings außer Betracht, dass das Proteom eine äußerst dynamische Einheit ist, welche sich abhängig vom Zellstatus und dem extrazellulären Milieu, in ständigem Wandel befindet. Deshalb sollte die Definition beinhalten, dass das Proteom die Gesamtheit an Proteinen einer gegebenen Zelle zu einer bestimmten Zeit darstellt.

Die große Attraktivität der Proteomics Forschung liegt in der Fähigkeit ihren Focus gezielt auf eine selektive Proteinpopulation unter ganz bestimmten Voraussetzungen zu richten, um so funktionelle Fragen und Mechanismen zu klären [14]. Der Reiz von Proteomics besteht also darin, biologische Prozesse und Krankheitsabläufe grundlegend aufzudecken. Diese und weitere Fragestellungen rund um das Proteom des Menschen, hat sich die Human-Proteom-Organisation kurz HUPO, zur Aufgabe gemacht [15].

1.3.2 Stärken der 2-DE Proteomicsforschung

Hochspezialisierte Proteine sind die Voraussetzung für fast alle Zellfunktionen. Proteine zeigen ein unglaubliches Repertoire an Fähigkeiten. Allein ein Protein das seiner Rolle nicht

gerecht wird, kann zu Krankheit und damit zu erheblichen Auswirkungen führen. So liegt es nahe, an krankheits-involvierten Proteinen mit neuen Wirkstoffen anzugreifen [16].

Da bereits heute Proteine die Hauptangriffspunkte moderner Arzneien darstellen, hat gerade auch die pharmazeutische Forschung großes Interesse daran solche Proteine zu ermitteln, sowie ihre Strukturen, die Protein-Protein Wechselwirkungen, die molekularen Mechanismen und ihre spezifischen Leistungen aufzuklären. Wie dies zum Beispiel auch bei Imatinib der Fall war, einem hochwirksamen CML Medikament, welches ein Protein und zwar besagte Bcr-Abl Tyrosinkinase, hemmt. Deshalb ist es von so außerordentlich hoher Bedeutung die Proteinveränderungen im kranken Zustand zu dechiffrieren, um die Identifikation pharmazeutisch relevanter Ziele zu ermöglichen. Und genau hier liegt die große Stärke der Proteomics, die weitreichende Einblicke in das molekulare Verständnis und die Behandlungsmöglichkeiten von Krankheiten gewährt.

Der große Vorteil der 2-D Elektrophorese besteht darin, dass durch die Kombination zweier verschiedener Trennverfahren, bis zu 2000 Proteine [17] in Form einer zweidimensionalen Proteinkarte, aufgelöst werden können. Da sich benachbarte Proteinbanden bzw. Peaks gerne überlappen, lässt sich mit eindimensionalen Verfahren, wie der herkömmlichen SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese), nur eine relativ geringe Menge an Proteinen darstellen. In der Regel weniger als 50. Jedem so genannten „Spot“ des vollendeten 2. DE Proteinkartengels entspricht ein Protein, dem aufgrund seiner Lage sein Molekulargewicht und seine Ladung zugeordnet werden kann. Die 1. Dimension fokussiert dabei die Proteine der Zelle entsprechend ihrer Beladung mit sauren und basischen Aminosäuren, an ihrem Isoelektrischen Punkt (IEF). In der 2. Dimension werden die Proteine entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.

Meilensteine in der Auftrennung von Proteinen durch elektrophoretische Verfahren waren sicherlich nach 1933, dem Einführungsjahr der Elektrophorese zur Proteintrennung durch Tiselius, 1955 die Einführung von Gelen auf Stärkebasis durch Smithies. 1959 verbessert Raymond das Verfahren durch Verwendung von Polyacrylamid-Gelen und Ornstein & Davis entwickeln in den darauf folgenden Jahren verbesserte Puffersysteme, die zur hoch auflösenden Trennung beitragen. 1966 führt Maizel das SDS für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese ein, bis schließlich 1975 O'Farrell und Klose etwa zur gleichen Zeit die Analyse von Proteinmischungen durch ein zweidimensionales Gelsystem revolutionieren [18-20].

Aber die Erforschung der Proteine mittels Proteomics bietet neben der Entwicklung neuer Medikamentenangriffspunkte noch viel mehr hoffnungsvolle Möglichkeiten. Indem man die Proteinveränderungen im kranken Organismus via Proteomics erforscht, erhält man die Möglichkeit auf:

- neue Tumormarker [21]
- Biomarker zur frühen Detektion und somit besseren Behandlungsmöglichkeit vieler Erkrankungen
- die Chance auf die Entwicklung völlig neuer Vaccine
- Erkennung der Ursachen für Resistenzen und somit Resistenzüberwindung [22]
- Einteilung von Krankheiten in verschiedene „Proteinmuster“ Subtypen und somit Ermöglichung einer individuell zugeschnittenen Therapie für jeden einzelnen Patienten bzw. Ermöglichung einer Prognosevorhersage.

Zunächst möchte ich näher auf die Tumormarker eingehen.

Es existiert bereits eine Vielzahl von klinisch eingesetzten Tumormarkern wie dem CA-125. Wie bei vielen bis heute verwendeten Tumormarkern ist dieser sehr unspezifisch. Er sagt weder aus ob eine Entzündung oder ein Malignom vorliegt, noch welches Malignom genau? In der nahen Zukunft könnten allerdings eine Reihe neuer Biomarker akkurate Diagnosen ermöglichen und das anhand einfacher Bluttests, um so maligne Erkrankungen bereits im frühen Stadium zu identifizieren. So wurden bereits mehrere neue tumorspezifische Proteine durch Proteomics entdeckt, wie zum Beispiel durch Roche in Basel, welche den „Proteasom activator-complex subunit 3“ als potentiellen Tumormarker für Colorektalkarzinome vorstellten, oder eine andere Arbeitsgruppe die HSP27 als möglichen ALL Marker aufführte [23]. Auch für die Suche nach Biomarkern zur frühen Detektion von verschiedensten Erkrankungen wie Alzheimer [24], rheumatischer Arthritis [25], Neurodermitis [26], Asthma [27] oder cystischer Fibrose [28] wird bereits Proteomics Technologie verwendet.

Traditionell konzentrierte sich die Biomarker Forschung darauf, **einen** Marker für eine bestimmte Erkrankung zu identifizieren. Heutzutage besteht jedoch Konsens darüber, dass mehrere unabhängige, krankheitsspezifische Proteine im Sinne einer Proteinkarte, weniger anfällig gegenüber Umwelt- und genetischen Einflüssen sind als ein einzelnes Protein [29, 30] und gerade Proteomics hat das Potenzial solche Proteinreihen mittels 2DE-Proteinkarten zu identifizieren.

Zuletzt möchte ich noch die Möglichkeit der patientenzugeschnittenen Therapie bzw. die Möglichkeit der Prognosevorhersage näher beleuchten.

Die 2.DE-Elektrophorese hat bereits mittels linienspezifischer Proteinmarker die Subtypen der ALL ermittelt. So konnten Vorhersagen bezüglich des wahrscheinlichen Ansprechens auf herkömmliche Chemotherapien getroffen werden, um so eine individuelle Prognose zu erstellen [31, 32]. Eine andere Forschergruppe hat mittels 2DE-Analyse einen Zusammenhang zwischen HSP27 Level und der Überlebenszeit von B-CLL Patienten gezeigt [33]. Die Aussage der Veröffentlichung war, dass der HSP27 Level das Ansprechen auf die konventionellen Chemotherapien vorhersagen lässt. Basierend auf solchem Wissen, könnte man einerseits die Prognose eines speziellen Patienten beurteilen und andererseits bei ermittelten „Risikogruppen“ angepasste, individuelle Therapien entwickeln, um so einen Überlebensvorteil für den Patienten zu erlangen, oder anders formuliert, low Risk Patienten ein hartes Chemotherapieregime mit all seinen Nebenwirkungen ersparen.

Soll ein Biomarker im klinischen Alltag zu Anwendung kommen, ist es von großem Vorteil, wenn er in leicht zugänglichem Material wie Blut oder Urin zu detektieren ist. Deshalb habe ich auch in meiner Doktorarbeit das leicht zugängliche Medium Blut ausgewählt. Proteomic-Protein-Muster aus Körperflüssigkeiten bergen wie gesagt nicht nur große Möglichkeiten für neue hochsensitive Diagnostiktools zur Früherkennung von Krebs [34, 35], sondern bescheren mit ihren Proteinkarten gerade bei der CML viele mögliche Angriffspunkte für neue potentiell kurative Medikamente.

Abschließend lässt sich feststellen: Eine bessere Beschreibung einer Erkrankung bedeutet eine bessere Möglichkeit diese zu verstehen und zu behandeln und Proteomics hilft an beiden Fronten.

2. Zielsetzung

Auf Chromosom 9q34, der Bruchstelle auf Chromosom 9 bei der chronisch myeloischen Leukämie, wurde 1983 das zelluläre Onkogen „Abelson-Leukämie-Virus“ kartiert.

Eine der wichtigsten Unterschiede zwischen dem physiologischen Abl Protein und Bcr-Abl, ist ihre unterschiedliche subzelluläre Lokalisation. Abl liegt sowohl im Nukleus, als auch im Cytoplasma vor, wohingegen p210 Bcr-Abl exklusiv im Cytoplasma vorkommt.

Das nukleäre Abl ist ein essentielles, proapoptotisches Protein. Bcr-Abl hingegen ist überaus antiapoptotisch.

Man weiss, dass diese transformierte CML-Progenitorzelle einen Überlebensvorteil hat. Auf welchem Weg sie jedoch zu diesem Überlebensvorteil kommt, ist weder genau bekannt, noch wie genau sie es schafft der Apoptose (durch physiologische Stimuli, Strahlen bzw. medikamentös induziert) zu entgehen.

Man geht davon aus, dass teilweise tief verborgen, gleichsam „schlafende“ leukämische Zellen bei therapierten CML Patienten verweilen, sog. Minimal-residual disease. Wie und ob man diese Zellen ausfindig machen oder bekämpfen kann, bleibt zu klären.

Man ist darüber übereingekommen, dass der so genannte „graft-versus-leukämia“ Effekt, maßgeblich am Erfolg einer allogenen Stammzelltransplantation beteiligt ist. Welche Antigene jedoch dabei durch die Graft-T-Zellen attackiert werden, ist nicht bekannt.

Auch die Proteine, mit denen Bcr-Abl interagiert, was zu dysregulierter Proliferation, verminderter Anhaftung an das Knochenmarkstroma und vermindertem Apoptoseansprechen der CML-Zellen führt, sind bisher weitestgehend nicht identifiziert.

Mit Imatinib steht der Medizin ein sehr potentes Medikament gegen die CML zu Verfügung. Dennoch ist bekannt, dass Imatinib sowohl weniger wirksam in fortgeschritteneren Phasen der CML ist, als auch, dass mehr und mehr Resistenzen gegen Imatinib auftreten.

Und auch die Frage, ob einem CML Patienten in der chronischen Phase eine allogene Stammzelltransplantation, mit all ihren Nebenwirkungen und Risiken an einer Graft-versus-host-Reaktion zu versterben, empfohlen werden sollte oder nicht, ist bisher eine Herausforderung an jeden behandelnden Arzt.

Aus all diesen Gründen ergab sich die Notwendigkeit periphere Stammzellen CML Erkrankter und gesunder Spender, sowie korrespondierende Zelllinien mittels Proteomanalyse zu vergleichen. Ziel der hochauflösenden 2-DE Testreihen, war die Identifizierung von CML relevanten Proteinen, um eine Grundlage zu schaffen für:

- Proteomics erstellte, patienten-spezifische Proteinkarten, um individuelle Risiko-Subtypen aufzudecken und Prognosen erstellen zu können. Dies könnte wesentlich zur Entscheidungsfindung hinsichtlich einer Stammzelltransplantation beitragen.
- Die Identifizierung von Zielantigenen des graft-versus-leukämia-Effektes, ebenso wie weitere Substratproteine von Bcr-Abl.
- Die Aufdeckung der Signalwege des CML-Fusionsgenes, nicht nur um zu verstehen mithilfe welcher Proteine es zu den Veränderungen wie Proliferationsdysregulation,

Apoptose-escape etc. kommt, sondern um ein umfassendes Verständnis bezüglich der grundlegenden Vorgänge der CML zu erlangen.

- Die Erstellung neuer Biomarker(karten), mit denen eine Früherkennung bzw. ein Follow-up möglich ist und auch eine minimal-residual-disease erkannt werden kann.
- Die Aufdeckung neuer Medikamenten-Angriffspunkte.

3. Material und Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Verwendete Materialien

3.1.1.1 Chemikalien

- Trypsin/EDTA, 0,05%/0,02% in PBS⁻ w/o Ca²⁺/Mg²⁺ (Biochrom, Berlin)
- Fötale Kälberserum (FCS) (PANTM Biotech, Aidenbach)
- RPMI 1640 Medium w2g/l NaHCO₃ ohne L-Glutamin (Biochrom, Berlin)
- L-Glutamin 200 mM (Biochrom, Berlin)
- Gentamycin, 10 mg/ml (Biochrom, Berlin)
- PBS 0,81% in Phosphatpuffer (0,0067 mol/l), pH 7,2 (Apotheke Klinikum München)
- Einfriermedium (max. 1*10⁷ Zellen in 1ml Einfriermedium)
 - 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) (Sigma-Aldrich, Deisendorf)
 - 90% FCS
- Trypan Blau 0,4% (Sigam-Aldrich, Deisendorf)

3.1.1.2 Geräte und Zubehör

- Brutschrank Typ B 5060 EK/CO₂ (Heraeus, Hanau)
- Phasenkontrastmikroskop Phaco Diavert (Ernst Leitz KG, München)
- Sterilbank Laminar Air Flow, Class 100, Typ BH-NG (Flow Laboratories, Meckenheim)
- Tischzentrifuge TJ-6R mit Kühlung (Beckmann Instruments, München)
- Sterile Zellkulturflaschen T75 und T25 mit einer Wachstumsfläche von 75 cm² bzw. 25 cm² (Corning Incorporated, New York, USA)

- Sterile PP-Röhrchen, 15 bzw. 50 ml (TPP, Trasadingen, Schweiz)
- Sterile PP-Pipetten, 2, 5, 10 bzw. 25 ml (Corning incorporated, New York, USA)
- Steriler Zellschaber, 40 cm (Greiner bio-one, Frickenhausen)
- Neubauer-Zählkammer, 0,1 mm Tiefe (Assistent, Sondheim)

3.1.1.3 Zellen

- V54/2. Es handelt sich dabei um eine charakterisierte humane Zelllinie aus peripheren Blutstammzellen eines gesunden Spenders, etabliert durch die Arbeitsgruppe Huss (Pathologisches Institut Innenstadt, Ludwig-Maximilians-Universität München). Immortalisiert wurde V54/2 mit dem „simian vacuolating Virus 40, kurz SV 40. Ein Poliomavirus aus der Familie der Papovaviren. V54/2 wächst als Monolayer.

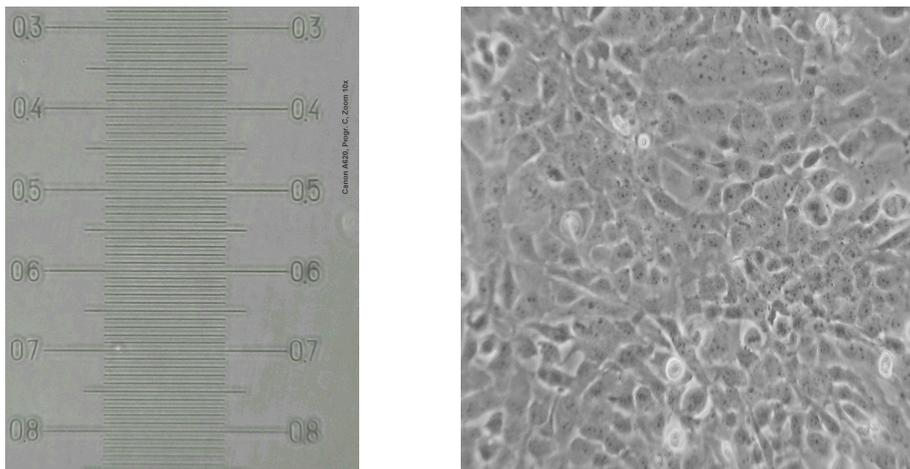


Bild 3.1.1 V54/2; Ein Abschnitt der Skalierung entspricht 100µm

- K562. Diese Zelllinie wurde 1970 aus dem Pleuraerguss einer 53-jährigen CML Patientin im Stadium der Blastenkrise etabliert [38]. K562 Blasten sind multipotente hämatopoetische und Bcr-Abl positive, maligne Zellen. K562 wächst als Suspension. [36-39]

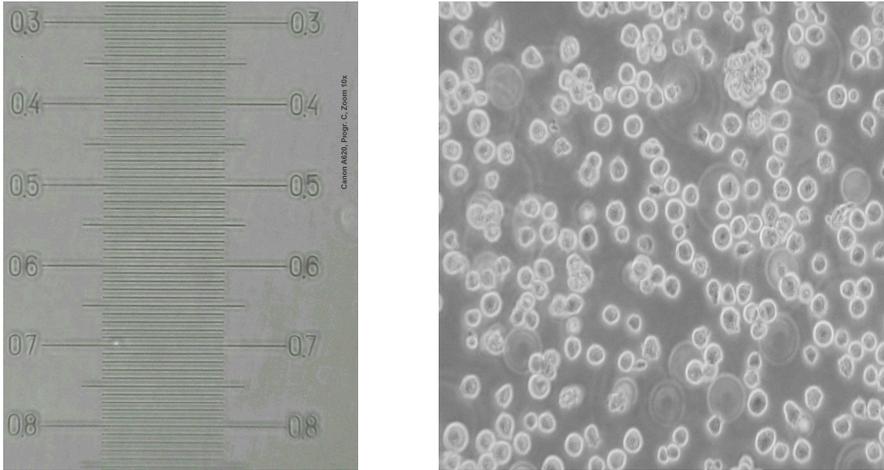


Bild 3.1.2 K562; ein Abschnitt der Skalierung entspricht 100µm

3.1.2 Kultivierung der Zelllinien

Das komplette Vorgehen erfolgt unter streng sterilen Bedingungen. Gearbeitet wird nur unter dem Steril-Flow. Als gemeinsames Medium für beide Zelllinien wurde RPMI in 10% FCS und 1% L-Glutamin verwendet. Die Zelllinien wurden Mycoplasmen negativ getestet. Es können sowohl T75 als auch T25 Flaschen verwendet werden. Im Folgenden wird die Kultivierung mit T75 Flaschen und die dafür benötigten Chemikalienmengen beschrieben.

Zunächst werden die in Stickstoff gelagerten Zellen bei 37°C im Wasserbad angetaut. In jeder Zellampulle befinden sich 1 ml Zellen. Jede, der zwei angetauten Zellampullen, wird jeweils in ein steriles 15 ml Spitzröhrchen überführt, nachdem zuerst jeweils 4 ml zimmerwarmes Medium vorgelegt wurde. Nach dem Vortexen werden die Spitzröhrchen für fünf Minuten bei 16°C und 1200 Umdrehungen zentrifugiert. Nachdem der abzentrifugierte Überstand verworfen wurde, wird jedes Zellpellet in je 14 ml Medium resuspendiert und anschließend in eine T75 Zellkulturflasche überführt. Die so bestückten Zellkulturflaschen werden in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 5% CO₂ bei 37°C im Inkubator bebrütet. Durch tägliche visuelle Kontrolle wird beobachtet in wiefern das Medium durch das Zellwachstum verbraucht wurde, was sich durch Abblassung des Phenolrots bzw. eines Farbumschlages ins Gelbliche ablesen lässt. Mittels des Phasenkontrastmikroskopes wird beobachtet, in wie weit das Wachstum der Zellen voranschreitet. Ab einer Besiedelungsfläche der Zellkulturflasche von 80% wird auf weitere Zellkulturflaschen gesplittet. Jeder Splittingvorgang entspricht einer Passage.

3.1.3 Splitting und Zellzählung

Bei Monolayer (V54/2)

Von den zu 80% confluenten Zellkulturflaschen wird zuerst das verbrauchte Medium abpipettiert. Anschließend werden die Zellen mit 2 ml PBS unter leichtem Schwenken gewaschen. Die Flüssigkeit wird erneut abpipettiert, um danach 2 ml Trypsin/EDTA auf die verbliebenen Zellen zu geben. Nach ungefähr drei bis fünf Minuten unter vorsichtigem Schwenken, kann das zum Ablösen der Zellen vom Flaschenboden verwendete Trypsin/EDTA vorsichtig abgenommen werden. Die auf diese Weise gelösten Zellen werden mit 5 ml Medium resuspendiert, um die Trypsinierung vollends zu stoppen. Um auch am Boden anhaftende Zellen zu lösen, wird die Lösung einige Male mit der Pipette aufgenommen, um damit den Boden zu spülen. Jeweils 2,5 ml werden auf zwei neue T75 Flaschen verteilt, wobei jede neue Flasche vorher mit 11,5 ml frischem Medium bestückt wurde. Nach dem Splittingvorgang, vor Aussähen der nächsten Passage, erfolgt zur Kontrolle die Zellzahlbestimmung in der Neubauer Zählkammer. Dafür werden 5 μ l des Zellen-Medium Gemisches aus der T75 Flasche entnommen und mit 45 μ l Trypanblau 1:10 verdünnt. 5 μ l dieser Mischung werden in die Neubauerkammer pipettiert. Nach dem Auszählen der Zellen eines Gitterfeldes der Kammer unter dem Phasenkontrastmikroskop, wird die Zellzahl pro Milliliter mit der Formel:

$$X (=Anzahl\ gezählter\ Zellen) * 10 (=Verdünnung) * 10^4$$

bestimmt.

Bei Suspensionen (K562)

Auch hier wird das verbrauchte Medium abgenommen. In diesem Fall aber indem das Zell-Medium-Gemisch in ein steriles Spitzröhrchen überführt und für fünf Minuten bei 16°C und 1200 Umdrehungen zentrifugiert wird. Der entstandene Überstand wird verworfen und das verbliebene Zellpellet mit 5 ml frischem Medium resuspendiert. Jeweils 2,5 ml davon werden auf jeweils eine neue, mit 11,5 ml frischem Medium bestückte T75 Zellkulturflasche verteilt. Auch hier findet eine Zellzählung in der Neubauerkammer, wie oben beschrieben, statt.

3.1.4 Abernten der Zellen

Bei Monolayer (V54/2)

Abgeerntet kann nach jeder beliebigen Passage werden, insofern die Zellen zu mindestens 80% confluent sind. Die Durchführung erfolgt auch hier stets unter sterilen Bedingungen unter dem Steril-Flow. Der Erntevorgang ähnelt dem Splitting. Auch hier werden die Zellen erst mit PBS gewaschen. Um dann mit Trypsin/EDTA abgelöst zu werden. Zum „Nachspülen“ und somit zur Beendigung der Trypsinreaktion, wird Medium verwendet. Um die Zellausbeute zu erhöhen, kann neben mehrmaliger Aufnahme des Zell-Medium Gemisches durch die Pipette und spülen des Flaschenbodens, auch ein Zellschaber verwendet werden, um am Boden haften gebliebene Zellen mechanisch zu lösen. Die so entstandene Suspension wird in ein steriles Spitzröhrchen überführt. Um ein Zellpellet zu erhalten, wird das Spitzröhrchen für 10 Minuten bei 16°C und 1200 Umdrehungen zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und verbliebene Flüssigkeitsreste werden vorsichtig entfernt. Gelagert wird das so gewonnene Zellpellet nach Vortexen bis zur baldigen Weiterverarbeitung bei -80°C, bzw. bei längerfristiger Lagerung nach Zugabe von Einfriermedium in einer Cryobox in der Stickstofftonne bei -170°C.

Bei Suspension (K562)

Auch hier erfolgt das Ernten analog dem Splittingvorgang, nur dass direkt nach dem Zentrifugieren und nach Abnahme des Überstandes, Einfriermedium zugesetzt wird. Durch Vortexen verbindet sich das Zellpellet mit dem Einfriermedium und die Zellen können bei -80°C bzw. -170°C gelagert werden.

3.2 PBSC

3.2.1 Definition

Periphere Blutstammzellen (Peripheral Blood Stem Cells = PBSC) oder auch periphere hämatopoetische Stammzellen, entsprechen unreifen Vorläuferzellen, aus denen sich alle Blutzellreihen eines Menschen entwickeln können. Die autologe und allogene PBSC-Transplantation erlangt auf den Gebieten der Autoimmuntherapie und der ablativen Hochdosis Radio- bzw. Chemotherapie immer mehr Bedeutung. Die Herstellung eines peripheren Blutstammzellpräparates ist zwar erheblich aufwendiger als diejenige eines

herkömmlichen Knochenmarkstransplantates, was vor allem an den apparativen, medikamentösen und sicherheitstechnischen (es handelt sich bei einem PBSC-Transplantat um ein „Medikament“) Voraussetzungen liegt, dennoch birgt es gegenüber dem Knochenmarkstransplantat wichtige Vorteile [40]. Der Zugang zur PBSC Quelle, dem Blut, ist leicht und schmerzfrei durch Venenpunktion möglich. Zur Entnahme wird keine Vollnarkose und somit keine stationäre Aufnahme benötigt. Die Gewinnung ist auch bei Patienten mit Knochenmarkfibrose und krankheitsbedingtem Knochenmarksbefall möglich und nicht zuletzt führt diese Art der Stammzelltransplantation zu einer schnelleren hämatopoetischen Rekonstruktion.

3.2.2 Gewinnung

Zur Mobilisation von Stammzellen in das periphere Blut spielen hämatopoetische Wachstumsfaktoren eine ganz entscheidende Rolle [41]. Der Granulozyten koloniestimmulierende Faktor (G-CSF) und der Granulozyten-Makrophagen koloniestimmulierende Faktor (GM-CSF) sind in der Lage, die Ausschwemmung der CD34+ Zellen des peripheren Blutes um das Achtzigfache zu steigern [40]. CD34 ist ein „Cluster of Differentiation“ Molekül, ein Oberflächenantigen das auf hämatopoetischen Progenitorzellen gefunden wird und als Marker dieser Zellen dient. Die Zahl der CD34+ Zellen beträgt normal nur 0,01-0,04% im peripheren Blut [42]. Ihre Bestimmung erfolgt meist durchflusszytometrisch [42]. Bis zu 90% der CD34+ Zellen sind als determinierte Vorläuferzellen der Hämatopoese anzusehen, da sie die Fähigkeit zur Selbsterneuerung verloren haben. Im Gegensatz dazu besitzen die restlichen pluripotenten Blutstammzellen die Fähigkeit zur dauerhaften Rekonstruktion aller Zellreihen der Hämatopoese. Bereits 100 solcher Zellen reichen im Mausmodell zur kompletten Rekonstruktion der Hämatopoese aus. Im klinischen Alltag hat sich G-CSF zur PBSC Gewinnung nicht zuletzt wegen seiner besseren Verträglichkeit durchgesetzt [11]. Es existieren mehrere Protokolle zur Stammzellmobilisation und Separation [41-43]. Bei gesunden Spendern wird G-CSF meist mehrere Tage hintereinander in einer Dosis von 5-24 µg/kg/d auf zwei tägliche Dosen aufgeteilt und subkutan injiziert. Dabei wird darauf geachtet, dass die Apherese, das heißt die Blutwaschung und somit Kollektion der PBSC`s aus dem Spenderblut am Apheresetag erst einige Stunden nach der morgendlichen Dosis erfolgt, da G-CSF paradoxerweise erst zu einem kurzen Abfall der zirkulierenden CD34+ Zellen führt.

Die Kombination von Zytostatika und G-CSF Gabe kann die Zahl der zirkulierenden CD34+ Zellen sogar um den Faktor 1000 steigern, weshalb bei Patienten, die an einer malignen Erkrankung leiden, die G-CSF Gabe mit einem an die jeweilige Erkrankung adaptierten Zytostatika Regime kombiniert wird [11, 40]. Die Gabe von G-CSF erfolgt dann in einer Dosis von 5-10 µg/kg/d, beginnt einen Tag nach Beendigung der Chemotherapie und wird bis zur letzten von mehreren Apherese durchgeföhrt. Bei diesen Patienten wird die Blutstammzellgewinnung, die als Backup oder autologe PBSC Spende dient, mittels Leukapherese am Zellseparator [41] durchgeföhrt, sobald der tiefste Wert der Leukozyten („Nadir“) durchschritten ist und/oder die Leukozyten über 1000/µl steigen und die tägliche Durchflusszytometrie einen Höchstwert der CD34+ Zellen bestätigt [40]. Dies ist etwa 10-14 Tage nach Ende der Mobilisierungstherapie der Fall.

Sind die Blutstammzellen mobilisiert, wird das Blut jedes „Spenders“ über Schläuche der Leukapherese am Zellseparator zugeföhrt. Hier werden die Blutstammzellen vom Blut gleich einer Dialyse abgetrennt und gesammelt, bevor dieses in die Vene zurückgeleitet wird. Für eine Transplantation werden mindestens $2 \cdot 10^6$ CD34+ Zellen/kgKG benötigt [11, 40, 41], so dass bei kranken autologen „Spendern“ bis zu vier Leukapheresen notwendig sein können, um eine genügend hohe Zellzahl zu erhalten. Die so gewonnenen Blutstammzellen werden nach Zugabe von DMSO Einfriermedium bei -192°C in flüssigem Stickstoff kryokonserviert. PBSC's von kranken „Spendern“ werden entweder als Backups verwendet, oder nach Aufreinigung eines möglichst hohen Anteils Philadelphiachromosom negativer (bei CML), CD34+ Zellen (=sog. „Purging“) [42] als autologe Stammzellspende.

3.2.3 Informationen zu den verwendeten PBSC Präparaten

	Spender Geschlecht	Alter Spender	Alter PBSC	Leukos %	Erys %	Hb	Jugendliche%
Probe 15: PBSC- gesund	weiblich	30.05.1972	31.07.2003	35,4	4,3	13,8	1
	Stabkernige %	Segmentk. %	Eosinoph. %	Monozyten %	Lymphos %		
	5	83	2	2	7		

	Probe 15 PBSC-gesund	Probe 18 PBSC-gesund	Probe 21 PBSC-gesund	Probe 22 PBSC-gesund	Probe 23 PBSC-gesund	Probe 24 PBSC-gesund	Probe 17 PBSC-CML	Probe 25 PBSC-CML	Probe 36 PBSC-CML
Geschlecht	weiblich	weiblich					männlich	weiblich	weiblich
Alter Spender	30.05.1972							19.07.1948	11.07.1966
Alter PBSC	31.07.2003	01.08.2001	19.01.2004	26.08.2003	02.01.2006	01.12.2003	02.06.1997	02.10.2002	24.02.1997
Leukos/kgKG	35,50%	18,59*10 ⁸	14,55*10 ⁸	6,83*10 ⁸	12,52*10 ⁸	14,42*10 ⁸		0,41*10 ⁸	
CD3/4/8+Zellen pro kgKG			214,85*10 ⁶	195*10 ⁶	385*10 ⁶	572*10 ⁶			
CD34+Zellen pro kgKG			12,95*10 ⁶	9,91*10 ⁶	18,7*10 ⁶	13,7*10 ⁶	56,6*10 ⁶	0,6*10 ⁶	
mononukleare Zellen/kgKG			14,11*10 ⁸	6,83*10 ⁸	12,52*10 ⁸	14,42*10 ⁸	3,2*10 ¹⁰	0,31*10 ⁸	
Colony forming Units/kgKG			19,1*10 ⁵	16,4*10 ⁵	64*10 ⁵	46*10 ⁵		0,2*10 ⁵	0,18*10 ⁵ nach kryokonserv.
Burst forming Units 1*10 ⁵ /ml			79	13	28	0		25	
Quelle	José Carreras Ambulanz GroßHadem	Universitätskli- nikum Hamburg Eppendorf	Universitätskli- nikum H.- Eppendorf	José Carreras Ambulanz Groß Hadern					

Tabelle 3.2.1 und 3.2.2 Alle Proben auf einen Blick

3.3 PBSC Aufarbeitung/Biocoll Gradient [44, 45]

3.3.1 Chemikalien

- RPMI 1640 Medium w2g/l NaHCO₃ ohne L-Glutamin (Biochrom, Berlin)
Zellkulturmedium für normale und neoplastische Zellen, entwickelt am **Roswell Park Memorial Institute**.
- PBS 0,81% in Phosphatpuffer (0,0067 mol/l), pH 7,2 (Apotheke Klinikum München)
- Biocoll Separating Solution (Biochrom, Berlin)
- Corsolin (Basillofabrik, Hamburg)
- 100% Alkohol (Merck, Darmstadt)
- Aqua Bidest (Kerndl, München)

3.3.2 Geräte und Zubehör

- Auf 4°C vorgekühlte Zentrifuge (Beckmann TJ-6, USA und TJ-R Refrigeration Unit)
- Eis
- Laubsäge
- Flüssigstickstoff
- Abfalltüte für potentiell infektiöses Material
- PP-Röhrchen, 15 bzw. 50 ml (TPP, Trasadingen, Schweiz)
- PP-Pipetten, 5 und 10 ml (Corning incorporated, New York, USA)
- Pipettboy

- Auf 37°C vorgeheiztes Wasserbad (Haake, Gräfelfing)
- Waage (Sartorius 1307 MP, München)
- Sterile/unsterile Eppendorf Cups (Eppendorf, Hamburg)
- Vortex Genie 2TM (Bender & Hobein, Zürich, Schweiz)

3.3.3 Vorgehen

Ziel dieser Aufarbeitung ist es, mit Hilfe eines Biocoll Gradienten mononukleäre Zellen von Erythrozyten, Thrombozyten und Granulozyten zu separieren. Desweiteren wurden die mononukleären Zellen von dem Einfriermedium DMSO, sowie anderen störenden Bestandteilen befreit.

Von der zu bearbeitenden PBSC Konserve (-80°C) werden ungefähr 10 g entnommen. Abgefüllt in ein 50 ml Tube, wird die Probe bei 37°C im Wasserbad angetaut. Anschließend wird das Tube bis auf 30 ml mit PBS gefüllt und nach kurzem vortexen für fünf Minuten bei 1000 Umdrehungen (= 200 g) und 4°C, zentrifugiert. Der entstandene Überstand wird verworfen. Das Tube erneut auf 30 ml mit PBS aufgefüllt, mittels Vortex gemischt und dem gleichen Zentrifugationsvorgang unterzogen. Der erneut entstandene Überstand wird abgeschüttet. Im Anschluss an diesen Waschkvorgang wird RPMI Medium bis auf 20 ml des Tubes aufgefüllt und mit Hilfe des Vortex mit dem Zellpellet resuspendiert.

Jetzt werden jeweils vier 15 ml Tubes, jedes mit 9 ml Biocoll versehen, vorgelegt. Die Biocoll Lösung hat den Zweck einen bestimmten Dichtegradienten aufzubauen. Dies hat zur Folge, dass Blutbestandteile von höherer Dichte den Biocoll Layer durchwandern, wie zum Beispiel die trotz Apherese verbliebenen Erythrozyten, die durch die Biocoll Lösung komplett aggregieren und deshalb vollständig zum Röhrchenboden sedimentieren. Die mononukleären Zellen wandern aufgrund ihrer geringeren Dichte durch die Biocoll Lösung und können in der Schicht zwischen Biocoll und Plasma gemeinsam mit langsam sedimentierenden Partikeln abpipettiert werden.

Es wird also die 20 ml Probe vorsichtig auf die vier 15 ml Tubes, welche mit Biocoll versehen wurden, verteilt, das heißt jeweils 5 ml pro Tube. Die so bestückten Tubes werden für 20 Minuten bei 2100 (= 900 g) Umdrehungen und 4°C, OHNE Bremse zentrifugiert. Die entstandenen vier „Biocollringe“ (Siehe Abbildung 3.1.1) werden vollständig abpipettiert, auf zwei 15 ml Tubes verteilt und für 20 Minuten bei 1000 Umdrehungen und 4°C zentrifugiert. Die Überstände werden verworfen, die Pellets auf ein einzelnes 15 ml Tube vereinigt und dieses mit PBS bis auf 7 ml aufgefüllt. Nach Vortexen wird die Probe erneut für fünf Minuten

bei 1000 Umdrehungen in der gekühlten Zentrifuge abzentrifugiert. Diese Waschvorgänge haben das Ziel das Zellpellet von möglichen Resten an Biocoll Lösung, Blutblättchen, Plasma etc. zu reinigen. Nach erfolgter Zentrifugation wird der Überstand abgenommen und das Zellpellet mit 1 ml NaCl resuspendiert.

Die Probe wurde für folgende Untersuchungen verwendet:

1. 100 µl wurden für die Zellzählung in der Neubauer Zählkammer und Anfertigen von Ausstrichpräparaten in May-Grünwalds-Eosin-Methylenblau-Färbung, in ein steriles Eppendorf Cup pipettiert.

Die May-Grünwalds Färbung wurde an frischen luftgetrockneten und unfixierten Ausstrichen angewandt. Die Präparate wurden Herrn Prof. Dr. Huss und Frau Dr. Arbogast vorgelegt. So wurden Mononukleäre- und Vorläuferzellen identifiziert.

2. 800 µl wurden erneut für 10 Minuten bei 1000 Umdrehungen und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet erst in Stickstoff gefroren, dann bei -80°C gelagert.

3.4 Gesamtproteinaufarbeitung für 2-dimensionale Elektrophorese

Sowohl die PBSC Proben, also auch die Zellkulturen wurden identisch aufgearbeitet.

3.4.1 Chemikalien

- 10% DTT (=Dithiothreitol) (BioRad, München)
- Amphloyte: Servalyte, pH 5-7 (Serva, Heidelberg)
- Harnstoff (BioRad, München)
- CHAPS (3,3Cholamidopropyltrimethylammonio-1-propan-sulfat) Lösung in Eppendorf Cup ansetzen:

77 mg CHAPS (Serva, Heidelberg)

900 µl Puffer B (0.2M KCl, 20% Glycerol, 0,1 M Phosphat Puffer)

27 µl Aqua Bidest

Nachdem diese Stoffe gelöst sind,

80 µl Puffer H-1B (Proteasehemmer, inaktiviert die bei der Zellyse freigesetzten

Proteasen) (Puffer H-1B: 1 Tablette complete TM (Roche, USA)
auf 2 ml Puffer B)

20 µl Puffer H2, zugeben und alles ordentlich mischen. (Puffer H2: 1,4 µM Pepstatin A in 10 ml Ethanol und 1,0 mM PMSF (Phanlylmethylsulfonylfluoride) in 10 ml Ethanol)

3.4.2 Geräte und Zubehör

- Bei -20°C vorgekühlte Mörser
- Trockeneis/Eis
- Eppendorf Cups (Eppendorf, Hamburg)
- Flüssigstickstoff
- Pipetten (Gilson, France)
- Glasspatel
- Magnetstangen/Magnetrührer

3.4.3 Vorgehen

Um die Proben für die 2-D Elektrophorese verwenden zu können, müssen die Proteine aus den Zellen gelöst werden, dies erfolgte nach der von Klose beschriebenen Methode.

Zuerst wird das Zellpellet ausgewogen. Das erhaltene Gewicht multipliziert mit dem Faktor 1,4 ergibt diejenige Menge an CHAPS Lösung (in µl), die diesem Pellet zugefügt wird. Unter Beigabe eines Magnetrührers wird die Probe in einem mit 4°C kaltem Eiswasser gefüllten Gefäß, für 30 Minuten gerührt. Dieser Vorgang wird als „CHAPS Reaktion“ bezeichnet und führt zum Lösen der zytoplasmatischen, membrangebundenen und cytoskeletalen Proteine. Das zwitterionische Detergens CHAPS schützt dabei die Proteine vor Aggregation.

Die Summe aus gewogenem Pelletgewicht und berechneter CHAPS Lösungsmenge, multipliziert mit dem Faktor 1,08 ergibt die erforderliche Menge in mg an Harnstoff, welche für das weitere Vorgehen benötigt wird.

Nach Beendigung der CHAPS Reaktion folgt die Harnstoff Reaktion durch Zugabe der ausgewogenen Menge an Harnstoff, wodurch die Proteine 45 Minuten bei Raumtemperatur denaturiert werden. Nach Beendigung der Harnstoff Reaktion wird die Probe für 10 Minuten bei 14000 Umdrehungen und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wird ausgewogen. Dieses Volumen multipliziert mit dem Faktor 0,1 ergibt sowohl die erforderliche Menge an DTT in µl, als auch die benötigte Menge an Ampholyten in µl.

Die Ampholyte verbessern dabei die Proteinlöslichkeit, indem sie die Proteinaggregation auf ein Minimum reduzieren. Beide Substanzen werden zur Probe hinzugefügt und mit einem

Plastikspatel gut vermenget. Durch die Zugabe der verschiedenen Reagenzien kommt es zu einer möglichst vollständigen Lösung, Disaggregation, Reduktion und Denaturierung der Proteine. Die so behandelten Proben werden bei -192°C tiefgefroren und bei -80°C bis zu ihrer Verwendung gelagert.

3.5 Quantitative Proteinbestimmung

3.5.1 Chemikalien

- Non-Interfering Protein AssayTM Kit (Calbiochem, Darmstadt)

3.5.2 Geräte und Zubehör

- Vortex Genie 2TM (Bender & Hobein, Zürich, Schweiz)
- Kühlzentrifuge (Hettich EBA12/R, Tuttlingen)
- Spectrophotometer DU-640 (Beckmann, USA)
- Küvetten aus Kunststoff (Labor Schubert und Weiss, Schwandorf/München)
- 2 ml Eppendorf Cups (Eppendorf, Hamburg)

3.5.3 Vorgehen

Die Proteinmengenbestimmung wird durchgeführt, um annähernd gleiche Konzentrationen an Zelllysate auf die 2-D Gele auftragen zu können. Dies hat zum Ziel möglichst gleich intensive Gele für die visuelle Auswertung zu erhalten.

Das Kit arbeitet dabei zum einen mit UPPA Lösungen (Universal Protein Precipitating Agent), wodurch interagierende Agentien aus der Proteinprobe entfernt werden.

Zum anderen enthält das Kit pro Ansatz eine definierte Menge einer alkalischen Lösung, versetzt mit speziellen Kupferionen, die nur an die Hauptketten der Proteine binden.

Da diese nicht an die Seitenketten der Proteine binden, wird das Kit nicht durch interindividuelle Schwankungen der Proteine beeinträchtigt.

Prinzipiell kommt es zu einer Komplexbildung der Proteine mit den Kupferionen. Mit Hilfe eines Farbreagens werden dann die freien Kupferionen bestimmt. Die Farbintensität, die den nicht gebundenen Kupferionen entspricht und mittels eines kolorimetrischen Agens zustande kommt, verhält sich umgekehrt proportional der Proteinkonzentration.

Im ersten Schritt wurde mittels einer Bovine Serum Albumin (BSA)-Standardlösung (Konzentration 2 mg/ml) eine Verdünnungskurve aus sechs Eichpunkten hergestellt, die im Weiteren als Eichkurve diente (Doppelbestimmung sowohl für Standard als auch für die Proben). Für die Eichkurve ist auch ein „blank“ nötig, welcher alle verwendeten Lösungen enthält, mit Ausnahme von BSA bzw. Probe. Nun werden jeweils 10 µl pro Probe in ein Eppendorf Cup vorgelegt. Nach Zugabe von 500 µl UPPA-1 Lösung und vortexen, wird dies für 2-3 Minuten bei RT inkubiert. Nachdem weitere 500 µl an UPPA-2 Lösung hinzupipetiert wurden, zentrifugiert man das Gemisch bei 10.000 Umdrehungen für fünf Minuten um das Präzipitat als Sediment zu erhalten. Der Überstand wird komplett abgeschüttet, mögliche Flüssigkeitsreste werden vorsichtig entfernt. Zu jedem Präzipitat werden 100 µl Copper Solution Reagent-1 und 400 µl deionisiertes Wasser gegeben und gemischt, um das Pellet zu resuspendieren. Im letzten Schritt wird 1 ml Reagent-2, bestehend aus einer 100:1 Mischung der kolorimetrischen Agens A und B, zu den Proben hinzugefügt und jeweils sofort gevortext. Nach 15 bis 20 Minuten kann die Extinktion im Photometer bei 480 nm, mit Wasser als Referenz, bestimmt werden. Berechnet an der BSA-Eichkurve erhält man so die jeweiligen Proteinkonzentrationen in µg/µl der gemessenen Proteinproben. Bestimmt wurden die Proben 36, 17, 18, 25, V54/2A, K562B und V54/2B, in dieser Reihenfolge.

3.6 Zweidimensionale Gelelektrophorese (2-DE)

3.6.1 Chemikalien

1. Dimension

- Gellösung für die Glasröhrchen (Länge 15cm, Ø 0,15cm)
 - 5,4g Harnstoff, Endkonzentration 9M (BioRad, München)
 - 4,75ml Gellösung (angegeben sind die Endkonzentrationen im fertigen Gel)
 - 5% Glycerin
 - 3,5% Acrylamid (BioRad, München)
 - 0,3% N,N'- Methylenebisacrylamid (BioRad, München)
 - 0,06% N, N, N', N'- Tetramethyldiamin (TEMED), (BioRad, München)
 - 1ml Ampholyte 1+1+4, Endkonzentration 4%
 - 4 Teile Servalyte, pH 5-7 (Serva, Heidelberg)

1 Teil Pharmalyte, pH 3-10 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)

1 Teil Ampholine, pH 3,5-9,5 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)

- 250 µl APS, Endkonzentration 0,02%
- Kathodenpuffer für die untere Kammer (9 M Harnstoff)
 - 1620 g Harnstoff
 - 120 ml Glycerin
 - 150 ml Ethylendiamin } ad 3l H₂O bidest.

- Anodenpuffer für die obere Kammer (3 M Harnstoff)
 - 45 g Harnstoff
 - 12,5 ml H₃PO₄ } ad 250 ml H₂O bidest.
- 5 M Harnstofflösung (als Überschichtungslösung):
3,8 ml Stammlösung
 - 6 g Harnstoff
 - 1 g Glycerin } ad 19ml H₂O bidest.
mit 0,2 ml Ampholingemisch 1+1+4
- 8 M Harnstofflösung zum Überschichten der Röhrengel während der Aufbewahrung
- Glycerin

2. Dimension

- Laufpuffer
 - 44,9 g Tris Base
 - 232,3 g Glycerin
 - 15,5 g SDS } ad 15 l H₂O bidest.

- Äquilibrierungspuffer pH 6,8
 - 25 ml Glycerin
 - 0,33 g DTT
 - 5 g SDS
 - 3,8 g Tris Base
 - eine Spatelspitze Bromphenolblau } ad 250 ml H₂O bidest.

- Agarose (zum Überschichten der 1. Dimension auf dem Gradientengel)
 - 0,725 g Tris Base
 - 3,75 g Glycerin
 - 0,25 g SDS (Serva, Heidelberg)
 - 1,25 g Agarose (BioRad, München)

} ad 250ml H₂O bidest.

Die Agarose wird aufgekocht, in 15 ml Aliquots abgefüllt und diese bei -20°C gelagert.

- Puffer D Stammlösung

- 272,5 g Tris Base
- mit 5 M HCl auf pH 8,6 einstellen

} ad 1500ml H₂O bidest.

Puffer D wird verwendet

1. Als Stammlösung zum Gießen der 2-DE Gradientengele
 2. Als Überschichtungslösung 1:3 mit H₂O bidest. verdünnt
 3. Als Spüllösung für die Gradientengeloberfläche 1:3 mit H₂O bidest. verdünnt
- 10%ige und 16%ige Polyacrylamidlösung zum Gießen der 10-16%igen Gradientengele in den Gelkassetten nach der Methode von Anderson und Anderson 1988. Länge x Höhe: 16 x 16cm, Dicke: 1,5 mm (Ansatz für 22 Gele)

10%ige Lösung:

- 30,8 % Acrylamidlösung (Serva, Heidelberg) → 227,9 ml
- Puffer D → 175 ml
- Aqua bidest. → 282,5 ml
- 10% SDS → 7 ml
- 10% Ammonium Persulfat → 7 ml
- TEMED → 1,2 ml

16%ige Lösung:

- 30% Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung, 37,5:1 → 363,64 ml (Serva, Heidelberg)
- Puffer D Stammlösung → 175 ml
- Aqua bidest. → 94,61 ml
- 10% SDS-Lösung → 7 ml
- Glycerin 56 ml
- 10% TEMED → 0,25 ml
- 10% APS-Lösung → 3,5 ml

3.6.2 Geräte und Zubehör

- Laufkammern für die 1. und 2. Dimension Iso-Dalt[®] Electrophoresis System mit Zubehör (Hoefer Scientific Instruments, CA, USA)
 - Gelkassetten, 16 x 16 x 0,15 (innen)
 - Gelkassettenständer
 - Iso-Dalt Gradientenmischer
 - Gießapparatur für die erste Dimension
 - Borsilikat-Glasröhrchen 18 bzw. 20 cm Länge, innerer Durchmesser 1,5 mm
- Spannungsgerät Electrophoresis Power Supply EPS 3500 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
- 20 µl und 50 µl Hamiltonspritze (Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz)
- Glasrührstäbchen
- Glaspipetten (Poulten und Graf, Wertheim)

3.6.3 Erste Dimension

Die Auftrennung der Proteine in der 1. Dimension erfolgt gemäß ihrer Ladung. Die in der Gellösung vorhandenen Ampholyte bauen dabei einen relativ stabilen pH-Gradienten auf [46].

Verwendet werden vierundzwanzig 18 cm lange Glasröhrchen, die in eine spezielle Gießapparatur eingestellt werden. Zum Gießen der Gele wird Gellösung 15 cm hoch in die Glasröhrchen gedrückt. Nach Polymerisation werden die Gele mit etwa 5 µl 5 M Harnstofflösung als Austrocknungsschutz überschichtet und in einer feuchten Kammer bei RT aufbewahrt. Am folgenden Tag wird die Geloberfläche durch zweimaliges Spülen mit Aqua bidest. vorsichtig von Harnstoff befreit. Die Oberfläche muss dabei stets unverletzt bleiben. Die Glasröhrchen werden luftblasenfrei in die Iso-Dalt Laufkammer eingesetzt, wobei die untere Kammer mit Kathodenpuffer aufgefüllt wird. Anschließend erfolgt das luftblasenfreie Auftragen der Proteinlösung auf die Gele. Für Silberfärbung wird 14 bzw. 15 µl pro Probe und Röhrchen aufgetragen, für Coomassie-Blau Färbung werden 50 µl benötigt. Die Probe wird mit circa 5 µl an 5 M Harnstofflösung überschichtet, darauf wird dann bis zum oberen Rand der Röhrchen mit 3 M Harnstofflaufpuffer aufgefüllt. Die obere Kammer wird mit Anodenpuffer gefüllt, bis alle Röhrchen bedeckt sind, dann wird die Trennung der Proteine in der 1. Dimension gestartet. Es wurde eine anodische Fokussierung (AIF) vorgenommen.

Theoretisch beruht das Verfahren darauf, dass sich die Nettoladung eines Proteinmoleküls mit dem pH-Wert der umgebenden Lösung verändert. An die Stromquelle nach dem Protokoll Tabelle 2.3 angeschlossen, wandern die Proteine bis an die Stelle des pH-Gradienten, der ihrem charakteristischen isoelektrischen Punkt entspricht, an dem sie also keine Nettoladung tragen und daher im elektrischen Feld nicht mehr laufen (isoelektrische Fokussierung, IEF). Nach Ender der 1. Dimension werden die 1. DE Gele aus den Glasröhrchen befreit, in eine kleine Petrischale überführt, ihr basisches Ende makiert und bis zu Ihrer Verwendung in der 2. Dimension bei -80°C gelagert.

Laufprotokoll 1. Dimension

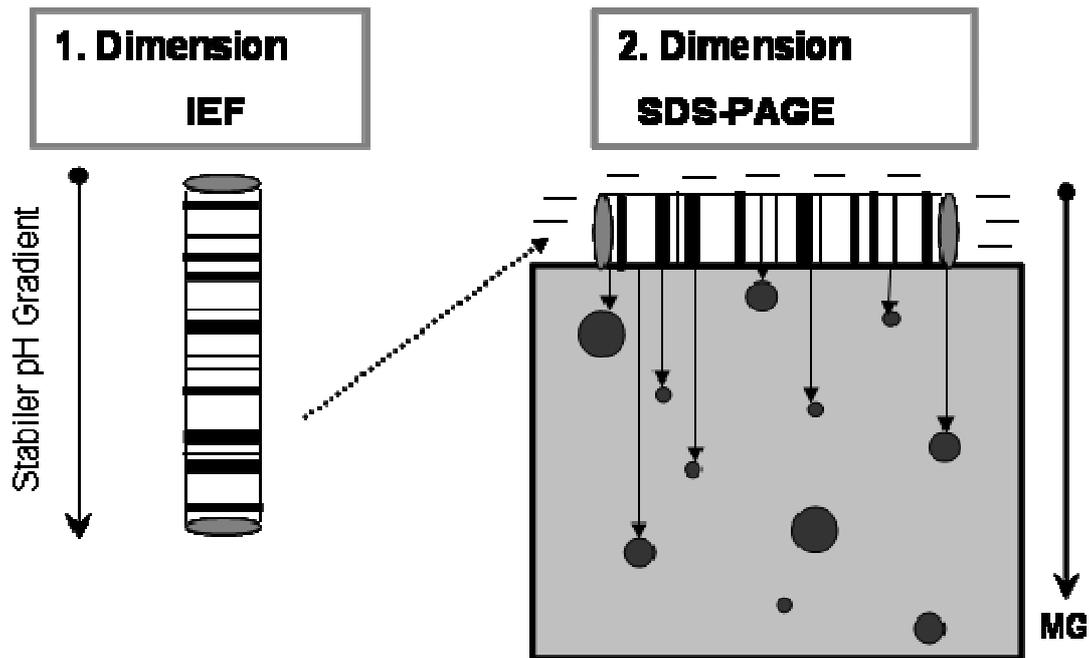
1 Stunde	100V	Benötigte Ampère und Watt Werte zieht sich das Gerät selbständig
1 Stunde	200V	
18 Stunden	450V	
30 Minuten	600V	
30 Minuten	900V	
5 Minuten	1400V	

Tabelle 3.6.1

3.6.4 Zweite Dimension

In der 2. Dimension werden die Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Zum Gießen der 2. Dimension werden die 22 Gekassetten in eine Gradientengießkammer (IsoDalt) eingestellt. Die 10 und 16%igen Gellösungen werden über einen Gradientenmischer in die Gießkassetten gepumpt. Nach Erreichen von 14,5 cm Gießhöhe werden die Gele überschichtet. Nach etwa 1,5 Stunden sind die Gele komplett auspolymerisiert, werden jedoch erst nach 4 Stunden zur Aufbewahrung bei 4 °C umgestellt. Verwendet wurden pro Lauf 10 Gradientengele 16 x 16 x 0,15, die im Gradientenmischer (Iso-Dalt) [47] mit einem Polyacrylamidverhältnis von 10-16 % gegossen wurden. Anfangs wird die Oberfläche der auspolymerisierten Gele zweimalig mit Puffer D gespült. Unterdessen wirkt bereits der Äquilibriumspuffer, der großzügig auf die 1.DE Gelwürmer gegeben wurde, für fünf Minuten ein. Dann wird das Gel der ersten Dimension auf die Oberflächenkante eines Acrylamid-Gradientengeles luftblasenfrei mit dem sauren Ende beginnend von links nach rechts aufgelegt und mit Agaroselösung überschichtet. Wenn alle

10 Gradientengele mit einem 1.DE-Gel bestückt sind und die Agarose fest ist, können die Gelkassetten in den 2D Tank, welcher mit Laufpuffer gefüllt ist, eingestellt werden. Das elektrische Feld befindet sich senkrecht zum Feld der isoelektrischen Fokussierung. Durch das Gradientengel wandert so jede Polypeptidkette der 1. Dimension zu dem ihrem Molekulargewicht entsprechenden Ort und bildet einen charakteristischen Fleck. Die Laufzeit zur Trennung der Proteine beträgt 18 Stunden.



Graphik 3.6.1 Prinzip der zweidimensionalen Gelelektrophorese.

In der 1. Dimension wandern die Proteine bis zu ihrem jeweiligen Isoelektrischen Punkt, das ist der pH Wert, bei dem die Proteine keine Nettoladungen tragen und sich deshalb in einem elektrischen Feld nicht mehr weiter bewegen. In der 2. Dimension werden die Proteine nach ihrem Molekulargewicht getrennt. Voraussetzung ist, dass die Proteine durch das stark negativ geladene Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) eine Negativladung bekommen, die proportional ihrem Molekulargewicht entspricht. Dabei bindet jedes Proteinmolekül entsprechend seiner Größe zahlreiche negativ geladene Detergensmoleküle, die die Proteine bei anlegen einer Spannung zur positiven Elektrode wandern lassen. Größere Proteine mit höherer negativer Beladung sind stärkeren elektrischen Kräften ausgesetzt, „schleifen“ aber auch stärker und werden daher im Gel viel stärker verlangsamt als kleine Proteine. Auf diese Art erfolgt die Auftrennung einer komplexen Proteinmischung.

3.7 Anfärbung der Proteine im Gel

3.7.1 Silberfärbung nach Heukeshoven und Dernick

3.7.1.1 Chemikalien

- Fixierlösung: (alles Endkonzentrationen) 50% Ethanol, 10% Essigsäure
 - 1000 ml Ethanol
 - 200 ml Essigsäure } ad 800 ml H₂O bidest.
- Inkubationslösung: 30% Ethanol, 0,5 M Natriumacetat, 0,5% Glutaraldehyd, 0,2% Natriumthiosulfat
 - 41 g Natriumacetat
 - 300 ml Ethanol
 - 2 g Natriumthiosulfat
 - 20 ml Glutaraldehyd } ad 1000 ml H₂O bidest.
- Silberlösung: 0,1% Silbernitrat, 0,01% Formaldehyd (37%) (Lösung bis Gebrauch im Dunkeln aufbewahren)
 - 1 g Silbernitrat ad 1000ml H₂O bidest.
 - 288 µl gefiltertes Formaldehyd
- Entwickler: 2,5% Natriumcarbonat, 0,05 mM Natriumthiosulfat, 0,01% Formaldehyd pH 11,3
 - 25 g Natriumcarbonat
 - 12 mg Natriumthiosulfat } ad 1000 ml H₂O bidest.
 - 288 µl gefiltertes Formaldehyd
 - pH Einstellung auf 11,3 mit Natriumhydrogencarbonat
- Stopplösung: 0,05 M EDTA, 0,02% Thimerosal (in zweifacher Ausführung)
 - 200 mg Thimerosal
 - (Sigma-Aldrich, Deisendorf)
 - 18,6 g EDTA } ad 1000 ml H₂O bidest.

3.7.1.2 Geräte und Zubehör

- Schüttler HS 250B (Janke und Kunkel, Staufen)
- Färbeschalen

3.7.1.3 Vorgehen

Durch Färben der Proteine werden diese im Gel sichtbar gemacht, sodass anhand ihrer Position im Gel bereits Rückschlüsse auf den pI und das Molekulargewicht möglich sind. Die Silberfärbung wird verwendet um über visuelle Auswertung Unterschiede im Proteinmuster der verwendeten Proben zu detektieren.

Die Silberfärbung überzeugt vor allem durch ihre hohe Sensitivität. Selbst in geringen Konzentrationen können vorhandene Proteine sichtbar gemacht werden. Dies erfolgt durch Anlagerung der Silberionen an basische und schwefelhaltige Aminosäurereste [17]. Das Prinzip beruht auf der Reduktion von Silberionen durch Natriumthiosulfat, was zu einer Umwandlung in metallisches Silber führt.

Nach Beendigung der 2. Dimension werden die aus den Kassetten gelösten Gele über Nacht fixiert, anschließend einzeln in Färbeschalen überführt und für 2 Stunden in 300 ml Inkubationslösung pro Färbeschale auf dem Schüttler geschwenkt. Nachdem jedes der Gele für drei mal 30 Minuten in jeweils frischem Aqua bidest. gewaschen wurde, wird jedes Gel für 30 Minuten in 300 ml Silberlösung inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wird die Silberlösung abgegossen und in Aqua bidest. für max. 30 Sekunden von verbliebenen Silberresten befreit, um störenden Background zu minimieren. Hinterher werden die Gele in 300 ml Entwicklerlösung inkubiert. Unter leichtem manuellen Schwenken zeigen sich die einzelnen Proteinspots. Die Entwicklungsdauer ist von der aufgetragenen Proteinmenge abhängig und liegt im Idealfall bei 2 bis 5 Minuten. Die Proteine sollten dabei möglichst gut gefärbt sein, der Hintergrund sollte nicht zu dunkel werden. Ist die gewünschte Farbintensität erreicht, werden die Gele in 250 ml Stopplösung überführt. Darin schwenkt jedes der Gele für 15 Minuten auf dem Schüttler. Es muss bedacht werden, dass die Farbintensität der Gele auch in der Stopplösung noch etwas zunimmt, da der Entwicklungsprozess nicht sofort beendet wird. Nach 15 Minuten wird die Stopplösung erneuert, um die Gele eine weitere Stunde darin zu belassen. Danach wird zweimal mit Aqua bidest. gespült und die Gele in einem mit Aqua bidest. gefüllten Behälter über Nacht abgedeckt gelagert. Am nächsten Arbeitstag können die Gele in Folie eingeschweißt werden und stehen der visuellen Auswertung zur Verfügung.

3.7.2 Coomassie-Brilliant-Blau Färbung (CBB) [48]

3.7.2.1 Chemikalien

- CBB-Fixierer: 10% Eisessig, 50% Methanol, 40% Aqua bidest.
 - 500 ml Methanol (Merck, Darmstadt)
 - 400 ml Aqua bidest.
 - 100 ml Eisessig (Merck, Darmstadt)
- Färbelösung: 10% Eisessig, 50% Methanol, 40% Aqua bidest.
 - 0,5 g = 20 Tabletten Coomassie Brilliant Blau R250 (Merck, Darmstadt)/ l Lösung
Die Tabletten werden in dem Methanol über Nacht unter Rühren gelöst
 - 500 ml Methanol
 - 400 ml Aqua bidest.
 - 100 ml EisessigLösung vor Gebrauch filtrieren
- Entfärber: 5% Methanol, 12,5% Eisessig, 82,5% Aqua bidest.
 - 250 ml Ethanol
 - 4125 ml Aqua bidest.
 - 625 ml Eisessig

3.7.2.2 Geräte und Zubehör

- Schüttler

3.7.2.3 Vorgehen

Die Coomassie Brilliant Blau (CBB) Färbemethode besitzt nicht die hohe Sensitivität der Silberfärbung [17]. Die Proteinnachweisgrenze liegt zehn Mal höher bei etwa 100 ng. Für CBB wurden von uns im Durchschnitt die 3,6 fachen Auftragemengen, also 50 µl, eingesetzt um ein auswertbares Muster zu erhalten. Nach Detektion auffälliger Spots in silbergefärbten Gelen wird die CBB Färbung für die massenspektrometrische Identifikation (MS) verwendet. Nach dem 2.DE-Lauf werden die Gele für mindestens fünf Stunden fixiert. Daraufhin werden sie in die CBB-Färbelösung überführt, in der sie über Nacht schüttelnd gefärbt werden. Am darauf folgenden Morgen werden die Polyacrylamidgele für sechs Stunden entfärbt, wobei die

Entfärberlösung zwei bis sechs mal, je nach Farbabgabe der Gele, erneuert werden muss. Der Entfärbevorgang ist beendet, wenn die Gele keine Farbwolken mehr abgeben. Abschließend kommen die Gele über Nacht in 7%ige Eisessiglösung bevor sie analog der Silberfärbung in Schlauchfolie eingeschweißt und bei -4°C gelagert werden können.

3.8 Visuelle Auswertung

Nach wiederholten 2-DE Läufen entstanden hochwertige und bezüglich Qualität und Konzentration der Proteinspots vergleichbare Gele sowohl des Patientengutes als auch der Zelllinien. Für den ersten Schritt der visuellen Auswertung wurden passende Geelpaare gebildet. Die visuelle Auswertung erfolgt an silbergefärbten Gelen. Verglichen wurden Proben von CML Patienten und gesunden Spendern, sowie von CML-Zelllinien und physiologischen Zelllinien. Ganz am Anfang steht die Detektion qualitativer und/oder quantitativer Proteinveränderungen innerhalb der einzelnen Geelpaare (Paarvergleich). Daran schließt sich der so genannte Quervergleich an. Darunter versteht man die Bestätigung bzw. Verwerfung der im Paarvergleich aufgefundenen Spots durch Abgleich jedes einzelnen gefundenen Spots in allen verwendeten Gelen. Zum Abschluss werden die Punkte des besonderen Augenmerks noch darauf untersucht, ob sie sich auch in den Paaren der Zelllinien finden und bestenfalls bestätigen lassen.

3.9 Quantitative und qualitative Auswertung der Spots

3.9.1 TopSpot®

Mit Hilfe des Softwareprogrammes TopSpot® können die Spots sowohl nach ihrer Anzahl, als auch nach ihrer Intensität vermessen werden. Um mit TopSpot® arbeiten zu können, müssen die Gele im Bitmap Format eingescannt vorliegen. Durch die visuelle Auswertung werden bereits auffällig veränderte Spots ausgewählt, diese werden dann einzeln in jedem der Gele aufgesucht um deren Intensitätsgrad zu vermessen. Die erhaltenen Werte werden in einer Excel Tabelle vermerkt, in der sie statistisch ausgewertet werden können.

3.9.2 Excel

Unter Einsatz des Windows Office Programms Excel[®] erfolgt die statistische Auswertung der ausgewählten Proteinspots. Diese Auswertung hat zum Sinn, rechnerisch die unvermeidbaren Konzentrationsschwankungen der einzelnen Gele zu relativieren und die Signifikanz der subjektiv, im visuellen Vergleich, aufgefundenen Spots zu objektivieren. Um die Konzentrationsunterschiede in den Gelen vernachlässigen zu können, müssen alle Gele auf die Konzentration eines „Mastergeles“ rechnerisch angeglichen werden. Nach diesem „Normalisieren“ der Gele an ein „Mastergel“ erfolgt nach Normalisieren der Paarpartner aneinander, die Darstellung der prozentualen Abweichung gesunder Spots vs. CML Spots im Paarvergleich.

Als CML-relevante Proteinveränderungen wurden von uns diejenigen Spots ausgewählt, die sich in mindestens 80% aller Patienten-PBSC-Gelpaare gleich verhielten. Also in mindestens vier von fünf „gesund vs. CML“-Vergleichspaaren in die gleiche Richtung verändert waren. Zusätzlich wurde verglichen, ob sich diese Veränderungen der Proteinexpression auch in den Zelllinienvergleichspaaren V54/2 und K562 bestätigen lies.

Wir setzten die Schwelle von 100% auf 80% herab, mit Blick auf das relativ neu entdeckte HER/2neu. Dieses Gen produziert den HER/2neu Oberflächen Zellrezeptor auch c-erbB-2 genannt, der einen wichtigen prognostischen Faktor für an Brustkrebs erkrankte Frauen darstellt und das wesentliche Kriterium für eine Weiterbehandlung mit Herceptin ist. Die Entdeckung dieses Genes bzw. Proteins stellte einen Meilenstein in der Brustkrebsforschung da und auch HER/2neu wird trotz seiner enormen Relevanz nur bei 5-55% der erkrankten Frauen überexprimiert.

Durch die Schwellensenkung wollte unsere Arbeitsgruppe sicherstellen, solche krankheitsrelevanten Proteine nicht zu übersehen.

3.10 MALDI-TOF Massenspektrometrie [49, 50]

Proteinspots, die durch die statistische Auswertung bestätigt werden konnten, wurden aus den CBB-Gelen ausgeschnitten und an die Arbeitsgruppe Prof. Dr. Axel Imhof am Adolf Butenandt Institut, Zentrallabor für Proteinanalytik in der Schillerstraße 44, 80336 München gesendet, welche die weitere Verarbeitung übernahm. Hier erfolgte ein tryptischer Verdau der Proteine (in-gel-digest) [51, 52]. Das Trypsin schneidet dabei die Proteine immer genau

zwischen den Aminosäuren Lysin und Arginin, so dass Peptidfragmente von ganz spezifischer Länge und Gewicht entstehen. Der MALDI (matrix-assisted laser desorption ionization) –TOF (time of flight) Massenspektrometer ionisiert und beschleunigt die Peptidfragmente im Vakuum mittels eines Lasers. Je nach molekularer Masse treffen die verschiedenen Fragmente unterschiedlich schnell am Auffangort auf und ergeben so verschiedene Spektren.

Verwendet wurde ein Voyager Massenspektrometer der Firma Applied BioSystems, USA. Es wurden 20000 V Spannung angelegt bei einer Laserintensität von 1770 V. Die Auswertung dieser Spektren (Massenfingerabdruck bzw. mass finger print) [53] erfolgte durch vollautomatischen Abgleich mit theoretischen Spaltungen von Proteinen in Sequenzdatenbanken durch das Mascot databank Research Software Programm mit einem Peaktoleranzbereich von +/- 150 ppm.

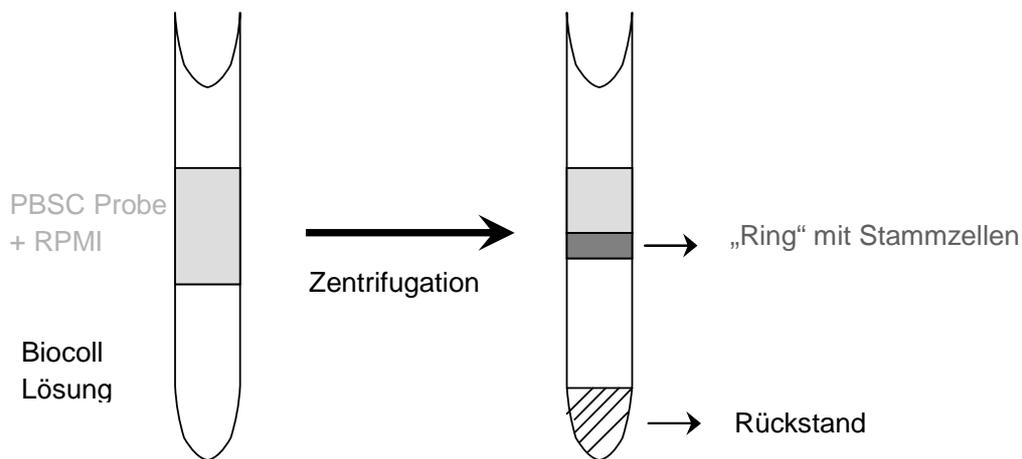
Dies führte zur Identifizierung der Proteinspots [54, 55].

Die weitere Charakterisierung der Proteine erfolgte durch interaktive Datenbankrecherche mittels SwissProt, TrEMBL und PubMed.

4. Ergebnisse

4.1 PBSC/Biocoll

Wie in Material und Methoden 3.3.3 beschrieben, wurden mit Hilfe der Biocoll Separating Solution mononukleäre Zellen aus den Leukapheresaten gesunder Spender, von CML Patienten, sowie von korrespondierenden Zelllinien extrahiert. Der mithilfe der Biocoll Lösung erhaltene „Ring“, wurde sorgsam abpipettiert, so dass eine möglichst reine Probe entstand, um diese weiter verarbeiten zu können. Zur Kontrolle, ob nicht wichtige Zellen im Rückstand verloren gehen, wurden auch 2-DE Gele des Rückstandes angefertigt. Diese waren aber wie erwartet blande.



Graphik 4.1.1

Einen wichtigen Kontrollpunkt stellten Ausstrichpräparate der separierten Zellen da. Diese dienten dazu sicherzustellen, dass durch den Separationsvorgang die richtigen Zellen extrahiert wurden. Anfangs zeigten sich auf den Ausstrichen allerdings so gut wie keine bzw. zerstörte Zellen.

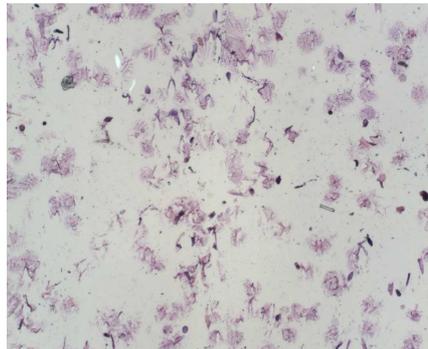


Bild 3.1 Probe 15: PBSC-gesund, Zelltrümmer und Kernschatten

Wie sich herausstellte, wurde anfangs eine zu hohe Umdrehungszahl zur Zentrifugation verwendet. Folglich wurden ab diesem Zeitpunkt keine höheren Umdrehungszahlen als 2100 (=900g) gefahren. Nach Behebung dieser Fehlerquelle zeigten sich zufrieden stellende Ausstrichpräparate an gereinigten mononukleären Zellen mit denen die Versuche fortgesetzt wurden.

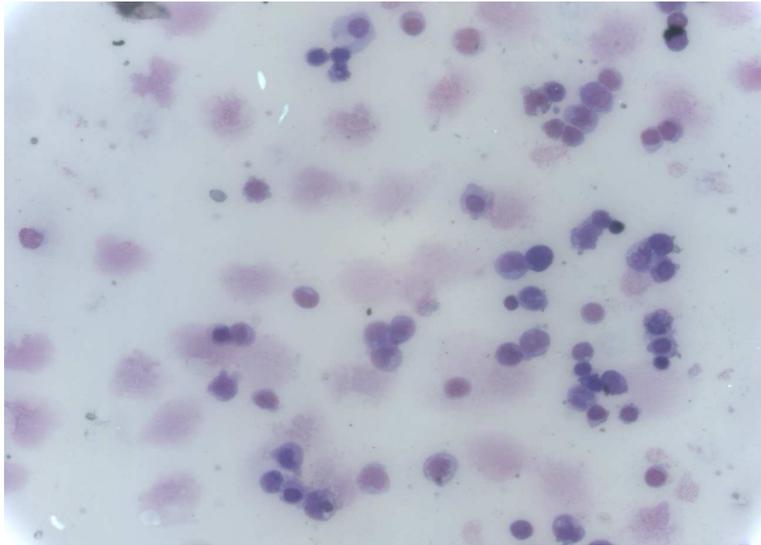


Bild 4.1.2 Probe 17: PBSC-CML

Um einen Anhalt auf mögliche Ursachen qualitativ schlechter Gele zu erhalten und nicht zuletzt als Hinweis auf die Qualität und den Proteingehalt der Proben, wurde von jedem aufgereinigten PBSC Pellet eine Zellzählung in der Neubauerzählkammer (siehe Material und Methoden 3.1.3) angefertigt.

Ergebnisse der Zellzählung

	Zellzahl in der 800 µl Probe
Probe 17 : PBSC- CML	19,28*1000.000
Probe 25 : PBSC- CML	3,68*1000.000
Probe 36 : PBSC- CML	Zellzählung nicht möglich
Probe 15 : PBSC- gesund	3,6*1000.000
Probe 18 : PBSC- gesund	2,8*1000.000
Probe 21 : PBSC- gesund	6,64*1000.000
Probe 22 : PBSC- gesund	15,04*1000.000
Probe 23 : PBSC- gesund	7,36*1000.000
Probe 24 : PBSC- gesund	18,24*1000.000

Tabelle 4.1.1

4.2 Gesamtproteinaufarbeitung

Die Gesamtproteinaufarbeitung wird angewandt um einerseits die Proteine aus der Zelle zu lösen und andererseits die Tertiärstruktur der Proteine aufzuwinden, so dass diese in der 2-DE verwendbar sind.

Sowohl die Zellkulturen als auch das PBSC-Spendermaterial wurden nach identischem Protokoll aufgearbeitet (siehe Material und Methoden 3.4).

In einer der PBSC-Spenderproben zeigte sich ein Problem. Die Viskosität dieser Probe erwies sich als enorm hoch, so dass es nicht möglich war diese mit der Pasteurpipette aufzunehmen, bzw. diese für die Elektrophorese zu verwenden. Bis zu diesem Zeitpunkt konnte kein Zusammenhang zu der stark variierenden Viskosität der einzelnen Probe aufgezeigt werden.

Gelöst wurde dieses Problem zum einen durch mehrmaliges Frieren in flüssigem Stickstoff und darauf folgendes Tauen, wodurch das Pellet bereits an Zähigkeit verlor, zum anderen durch Verdünnung mit Aufarbeitungslösung aus Puffer B + CHAPS + H1B + H2 und 9M Harnstoff. Als Ergebnis entstanden Proben von ideal gelösten Proteinen in gut verwendbarer Viskosität.

Ergebnisse nach Gesamtproteinaufarbeitung (GP)

	Zellzahl in der 800 µl Probe	Pelletgröße (PG)	PG nach GP	Viskosität	Verdünnungslösung in µl
Probe 17: PBSC-CML	19,28*1000.000	52mg	221,48mg	normal	/
Probe 25: PBSC-CML	3,68*1000.000	26mg	93,6mg	normal	/
Probe 36: PBSC-CML	Zellzählung nicht möglich	50mg	212,4mg	normal	/
Probe 15: PBSC-gesund	3,6*1000.000	31mg	156mg	sehr hoch	30
Probe 18: PBSC-gesund	2,8*1000.000	28mg	91,2mg	normal	/
Probe 21: PBSC-gesund	6,64*1000.000	17mg	48mg	normal	/
Probe 22: PBSC-gesund	15,04*1000.000	43mg	161,02mg	normal	/
Probe 23: PBSC-gesund	7,36*1000.000	24mg	73,2mg	normal	/
Probe 24: PBSC-gesund	18,24*1000.000	11mg	39,6	normal	/

Tabelle 4.2.1

4.3 Proteinbestimmung

Die Proteinmenge einer Probe wird standardmäßig bestimmt, um exakt gleiche Konzentrationen an Protein auf die 2-DE Gele auftragen zu können um so vergleichbare Gelqualitäten zu erhalten. In diesem Fall wurde der Proteingehalt der PBSC's bestimmt, um eventuelle Rückschlüsse auf die stark variierende Beschaffenheit der Gele schließen zu können.

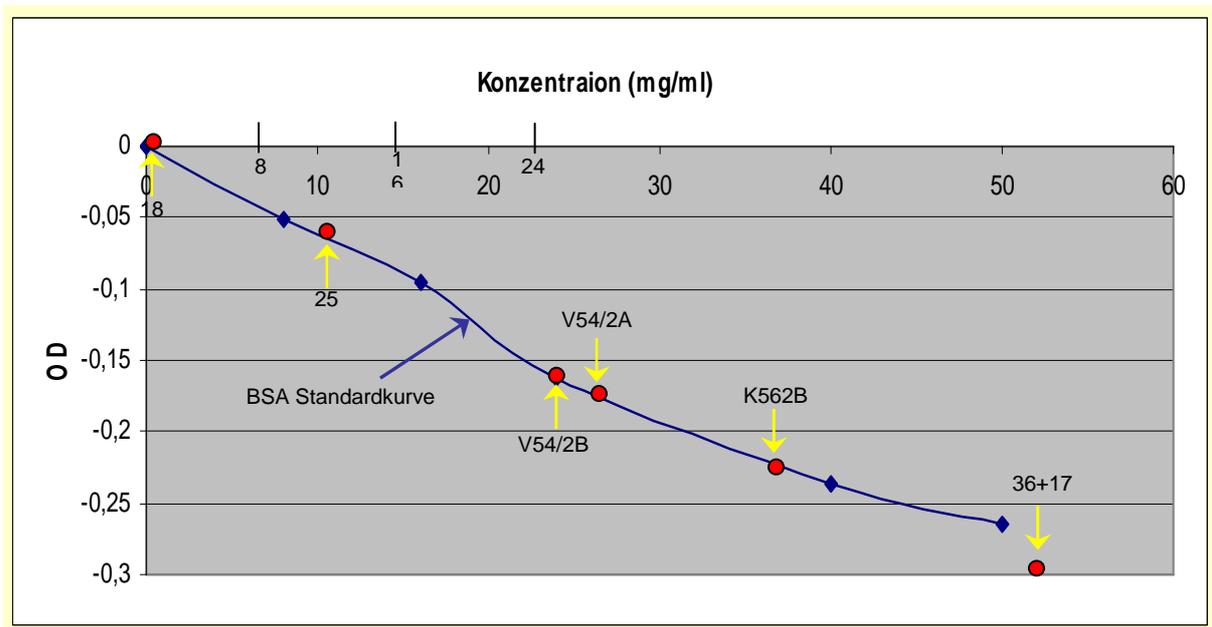
conc [mg/ml]	OD	BSA Standard
0	0	
8,000	-0,0513	4µl
16,000	-0,0946	8µl
24,000	-0,1619	12µl
40,000	-0,2368	20µl
50,000	-0,2640	25µl
x	y	

Probe	OD	conc. [mg/ml]
36	-0,3	53,46
17	-0,3	53,46
18	-0,02615	2,98
25	-0,0761	12,19
V54/2A	-0,1721	29,88
K562B	-0,2377	41,98
V54/2B	-0,1614	27,91

Tabelle 4.3.1 Optische Dichte(OD)/Konzentration(conc) des BSA Standards

Tabelle 4.3.2 Optische Dichte/Konzentration der Proben

Proteinbestimmung



Graphik 4.3.1

Nach Zusammenfassung der bisher erlangten Ergebnisse, ergibt sich folgende Tabelle.

	Zellzahl in der 800 µl Probe	Pelletgröße (PG)	PG nach GP	Viskosität	conc (mg/ml)
Probe 17: PBSC-CML	19,28*1000.000	52mg	221,48mg	normal	53,46
Probe 25: PBSC-CML	3,68*1000.000	26mg	93,6mg	normal	12,19
Probe 36: PBSC-CML	Zellzählung nicht möglich	50mg	212,4mg	normal	53,46
Probe 15: PBSC-gesund	3,6*1000.000	31mg	156mg	sehr hoch	Probe leer
Probe 18: PBSC-gesund	2,8*1000.000	28mg	91,2mg	normal	2,98
Probe 21: PBSC-gesund	6,64*1000.000	17mg	48mg	normal	Probe leer
Probe 22: PBSC-gesund	15,04*1000.000	43mg	161,02mg	normal	Probe leer
Probe 23: PBSC-gesund	7,36*1000.000	24mg	73,2mg	normal	Probe leer
Probe 24: PBSC-gesund	18,24*1000.000	11mg	39,6	normal	Probe leer

Tabelle 4.3.3

Es ist kein eindeutiger Zusammenhang zwischen Zellzahl und Pelletgröße oder Zellzahl und Proteinkonzentration der Probe zu erkennen.

4.4 Vergleichende Proteomanalyse mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese

Die aufgearbeiteten Proben wurden, wie beschrieben (siehe Material und Methoden 3.6.), mit Hilfe der hochauflösender 2-D Elektrophorese bearbeitet. Mittels der darauf folgenden Silberfärbung (siehe Material und Methoden 3.7.1) wurden die einzelnen Spots innerhalb der Gele sichtbar gemacht, wodurch anschauliche und reproduzierbare Proteinkarten entstanden. Unter den Gelen der verschiedenen Proben zeigten sich jedoch starke Qualitätsschwankungen.

Ergebnisse



Bild 4.4.1 Probe 22.2. PBSC-gesund (optimal)

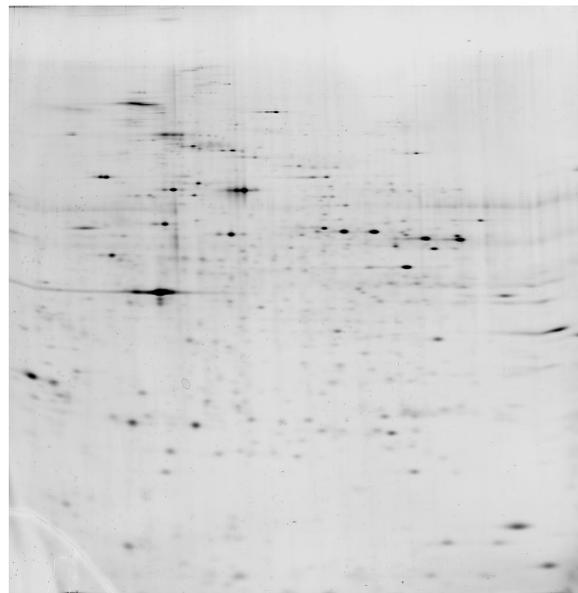


Bild 4.4.2 Probe 18.1. PBSC-gesund (suboptimal)

Nachdem alle Elektrophorese-Läufe der Proben abgeschlossen waren begann die Ursachenforschung, um möglichen Gründen für diese Schwankungen auf den Grund zu gehen. Es wurde eine Tabelle erstellt, welche alle verfügbaren Informationen einer jeden Probe zusammenfasst.

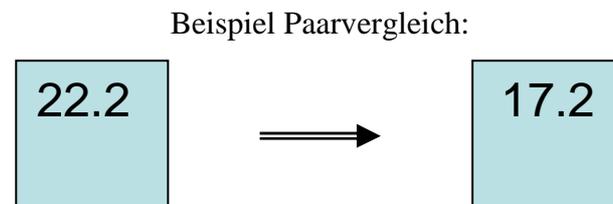
Qualitätskontrolle									
	Gel 1		Gel 2						
	Auftragmenge (AM) in µl	Qualität	AM in µl	Qualität	Zellzahl in der 800 µl Probe	Pelletgröße (PG)	PG nach GP	Viskosität	conc (mg/ml)
Probe 17: PBSC-CML	15	☼☼	15	☼☼	19,28*1000.000	52mg	221,48mg	normal	53,46
Probe 25: PBSC-CML	15	☼			3,68*1000.000	26mg	93,6mg	normal	12,19
Probe 36: PBSC-CML	15	☼			Zellzählung nicht möglich	50mg	212,4mg	normal	53,46
Probe 15: PBSC-gesund	14	⊖			3,6*1000.000	31mg	156mg	sehr hoch	Probe leer
Probe 18: PBSC-gesund	15	☼			2,8*1000.000	28mg	91,2mg	normal	2,98
Probe 21: PBSC-gesund	15	☼	15	☼	6,64*1000.000	17mg	48mg	normal	Probe leer
Probe 22: PBSC-gesund	15	☼☼	13	☼☼	15,04*1000.000	43mg	161,02mg	normal	Probe leer
Probe 23: PBSC-gesund	15	☼☼			7,36*1000.000	24mg	73,2mg	normal	Probe leer
Probe 24: PBSC-gesund	15	☼			18,24*1000.000	11mg	39,6	normal	Probe leer
☼☼ → sehr gut									
☼ → gut									
⊖ → schlecht									
Qualitätskontrolle									
	Probe 15 PBSC-gesund	Probe 18 PBSC-gesund	Probe 21 PBSC-gesund	Probe 22 PBSC-gesund	Probe 23 PBSC-gesund	Probe 24 PBSC-gesund	Probe 17 PBSC-CML	Probe 25 PBSC-CML	Probe 36 PBSC-CML
Geschlecht	weiblich	weiblich			männlich		männlich	weiblich	weiblich
Alter Spender	30.05.1972						02.11.1963	19.07.1948	11.07.1966
Alter PBSC	31.07.2003	01.08.2001	19.01.2004		02.01.2006	01.12.2003	02.06.1997	02.10.2002	24.02.1997
Vorbehandlung		Neupogen	Neupogen	Neupogen	Granozyte	Neupogen	Litalir, Interferon Cyclophosphamid Busulfan, positiv		
FISH bcr-abl								sieben	
Leukos/kgKG	35,50%	18,59*10 ⁸	14,55*10 ⁸		12,52*10 ⁸	14,42*10 ⁸		0,41*10 ⁸	
CD3/4/8+Zellen pro kgKG			214,85*10 ⁶		385*10 ⁶	572*10 ⁶			
CD34+Zellen pro kgKG		6*10 ⁶	12,95*10 ⁶	9,91*10 ⁶	18,7*10 ⁶	13,7*10 ⁶	0,6*10 ⁶	0,6*10 ⁶	
mononukleare Zellen/kgKG			14,11*10 ⁸	6,83*10 ⁸	12,52*10 ⁸	14,42*10 ⁸	3,2*10 ¹⁰	0,31*10 ⁸	
Colony forming Units/kgKG			19,1*10 ⁵	16,4*10 ⁵	64*10 ⁵	46*10 ⁵		0,2*10 ⁵	
Burst forming Units 1*10 ⁷ /ml				79	13	28	0	0,18*10 ⁵ nach kryokonserv.	25
Auftragmenge (AM) in µl 1. Gel	14	15	15	15	15	15	15	15	15
Qualität 1. Gel	⊖	☼	☼	☼☼	☼☼	☼	☼☼	☼	☼
AM in µl 2. Gel			15	13				15	
Qualität 2. Gel			☼	☼☼			☼☼		
Zellzahl in der 800 µl Probe	3,6*1000.000	2,8*1000.000	6,64*1000.000	15,04*1000.000	7,36*1000.000	18,24*1000.000	19,28*1000.000	3,68*1000.000	ng nicht möglich
Pelletgröße (PG)	31mg	28mg	17mg	43mg	24mg	11mg	52mg	26mg	50mg
PG nach GP	156mg	91,2mg	48mg	161,02mg	73,2mg	39,6	221,48mg	93,6mg	212,4mg
Viskosität	sehr hoch	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal
conc (mg/ml)	Probe leer	2,98	Probe leer	Probe leer	Probe leer	Probe leer	53,46	12,19	53,46
Quelle	José Carreras Ambulanz GroßHadern	Universitätskli- nikum Hamburg Eppendorf	Universitätskli- nikum H.- Eppendorf	Universitätskli- nikum H.- Eppendorf	José Carreras Ambulanz Groß Hadern				

Tabelle 4.4.1 und 4.4.2

Auch nach Abgleich aller zu Verfügung stehenden Daten wurde kein Zusammenhang zwischen Gelqualität und Probenzusammensetzung ersichtlich. Eine hohe Proteinkonzentration scheint für eine gute Gelqualität förderlich zu sein, dennoch kann dies nicht das einzige Qualitätskriterium sein, wie Ausreißer Probe 36 belegt. Diese weist ebensoviel Proteingehalt wie Probe 17 auf, hat aber nicht annähernd deren Qualität im Gel. Im Gegensatz dazu hat Probe 18 einen 25-fach geringeren Proteingehalt als Probe 36, erreicht aber die gleiche Qualität bei identischer Auftragemenge an Probenmaterial (nicht an Protein!). Auch die Dauer der Kryokonservierung kann als Störfaktor ausgeschlossen werden, da eines der besten Gele von einer PBSC Probe aus dem Jahre 1997 stammt (Probe 17), anders als erheblich schlechtere Proben aus den Jahren 2003 (Probe 15) oder 2004 (Probe 21). Ebenso verhält es sich mit dem Alter des Spenders, das auch nicht als störende Größe angesehen werden kann (Siehe Tabelle 4.4.2).

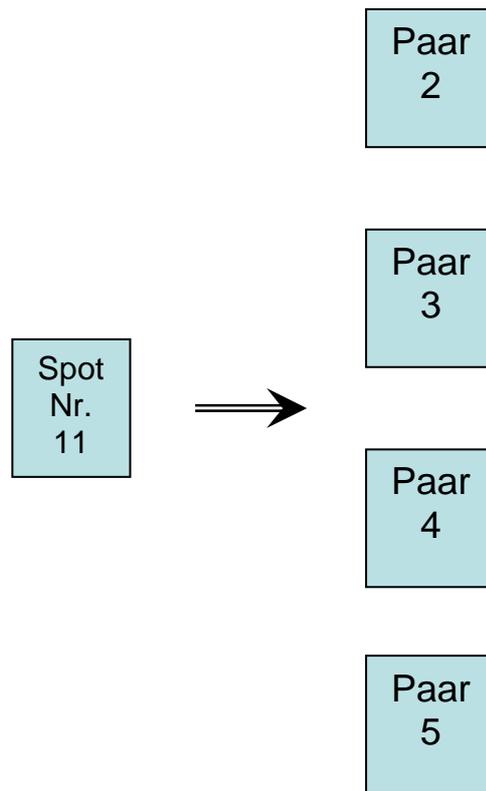
Trotz der Fragen die hinsichtlich der variierenden Qualitäten offen blieben, entstanden für die Untersuchung reproduzierbare und vergleichbare „Proben-Proteinkarten“. Es wurden die qualitativ besten Gele ausgewählt, um deren unterschiedliche 2-DE Muster auszuwerten, d.h. um unterschiedlich exprimierte Spots in den CML Proben zu detektieren.

Im Paarvergleich wird jeweils ein gesundes Gel mit einem CML Gel verglichen.

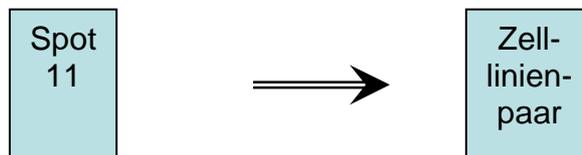


Im Quervergleich wird jeder einzelne, im Paarvergleich gefundene Spot mit allen untersuchten Gelpaaren verglichen.

Beispiel Quervergleich:



Zum Abschluss werden die Punkte des besonderen Augenmerks noch darauf untersucht, ob sie sich auch in den Paaren der Zelllinien finden und bestenfalls bestätigen lassen.



Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse gewährleisten zu können, erfolgten mehrmalige zweidimensionale Auftrennungen der Proben und Zelllinien unter den gleichen Versuchsbedingungen wie in Material und Methoden 3.6 beschrieben. Nach subjektiver visueller Auswertung verblieben 45 Spots, die sich anhand ihrer Expression im Vergleich gesund vs. CML unterschieden. Nur Spots, die in mindestens vier der fünf Gelpaare gleichsinnige Veränderungen aufwiesen, wurden in die computergestützte Auswertung mit TopSpot[®] einbezogen.

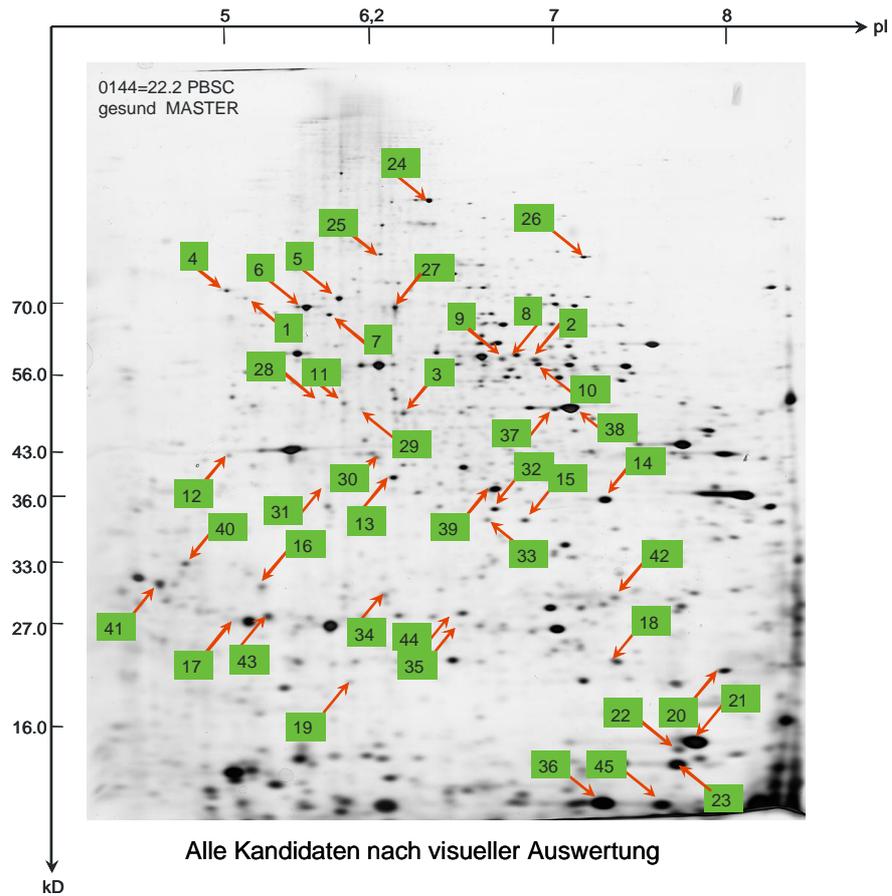


Bild 4.4.3

Zu Beginn der statistischen Auswertung wurde das qualitativ beste Gel als „Master“-Gel definiert, an das die anderen Gele bezüglich ihrer Konzentration rechnerisch mit Hilfe von 12 Kontrollspots angeglichen wurden (= Normalisierung), um alle visuell detektierten Spots statistisch zu verifizieren



Bild 4.4.4 „Master“, Gel der Probe 22: PBSC-gesund (Die komplette Sammlung restlicher Gele befindet sich im Anhang)

In der darauf folgenden Runde der Auswertung wurden die fünf Auswertungspartner der CML/gesund Paare, aufgrund der geringen Fallzahl (sechs gesunde und drei CML Spender), aneinander bezüglich der Intensität der Gele rechnerisch angeglichen und die prozentualen Abweichungen der auffälligen Spots bezüglich ihrer Expression berechnet.

Nach Normalisierung, Paarvergleich und Quervergleich wie in Material und Methoden 3.9 beschrieben, verblieben 14 Spots die sich objektiv bestätigen ließen.

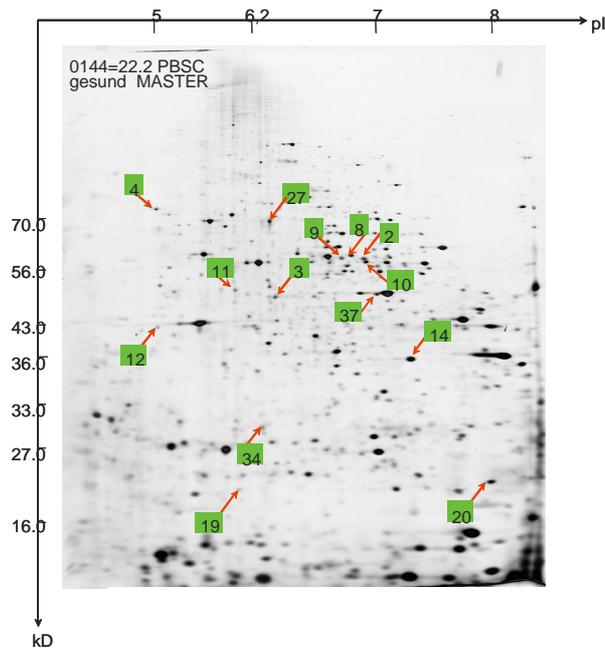


Bild 4.4.4 „Master“, Gel der Probe 22: PBSC-gesund (Die komplette Sammlung restlicher Gele befindet sich im Anhang)

Zur besseren Übersicht wurde die Geloberfläche in sechs Regionen aufgeteilt.

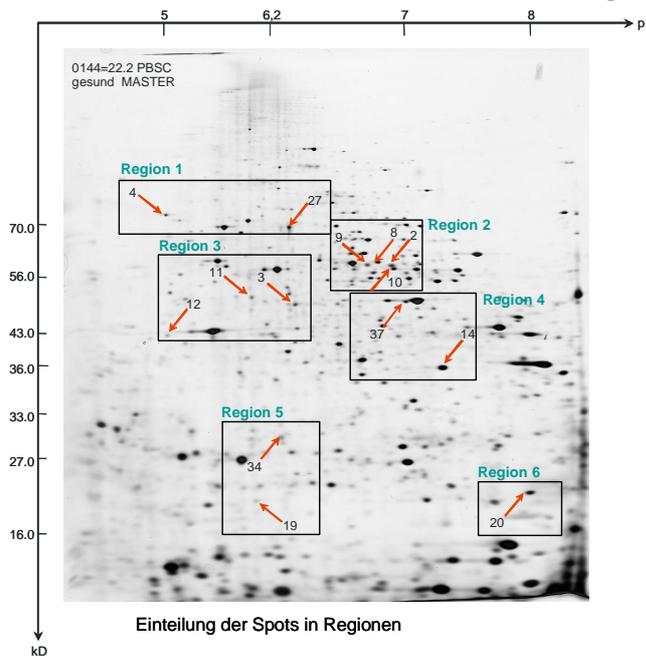


Bild 4.4.6

Auf diese Weise können die 2-DE Muster der einzelnen Regionen aus CML-Proben vs. gesunden Proben anschaulich gegenübergestellt werden, um die unterschiedlich ausgeprägte Proteinexpression darzustellen.

Beispielhaft soll diese Gegenüberstellung mit dem Gelvergleichs paar Probe 22.2 PBSC-gesund vs. Probe 17.2 PBSC-CML gezeigt werden. Die kompletten Gegenüberstellungen der restlichen Paare befinden sich im Anhang.

Graphische Darstellung der Proteinexpression CML vs. gesund

Paar 1: Probe 22.2 PBSC-gesund vs. Probe 17.2 PBSC-CML

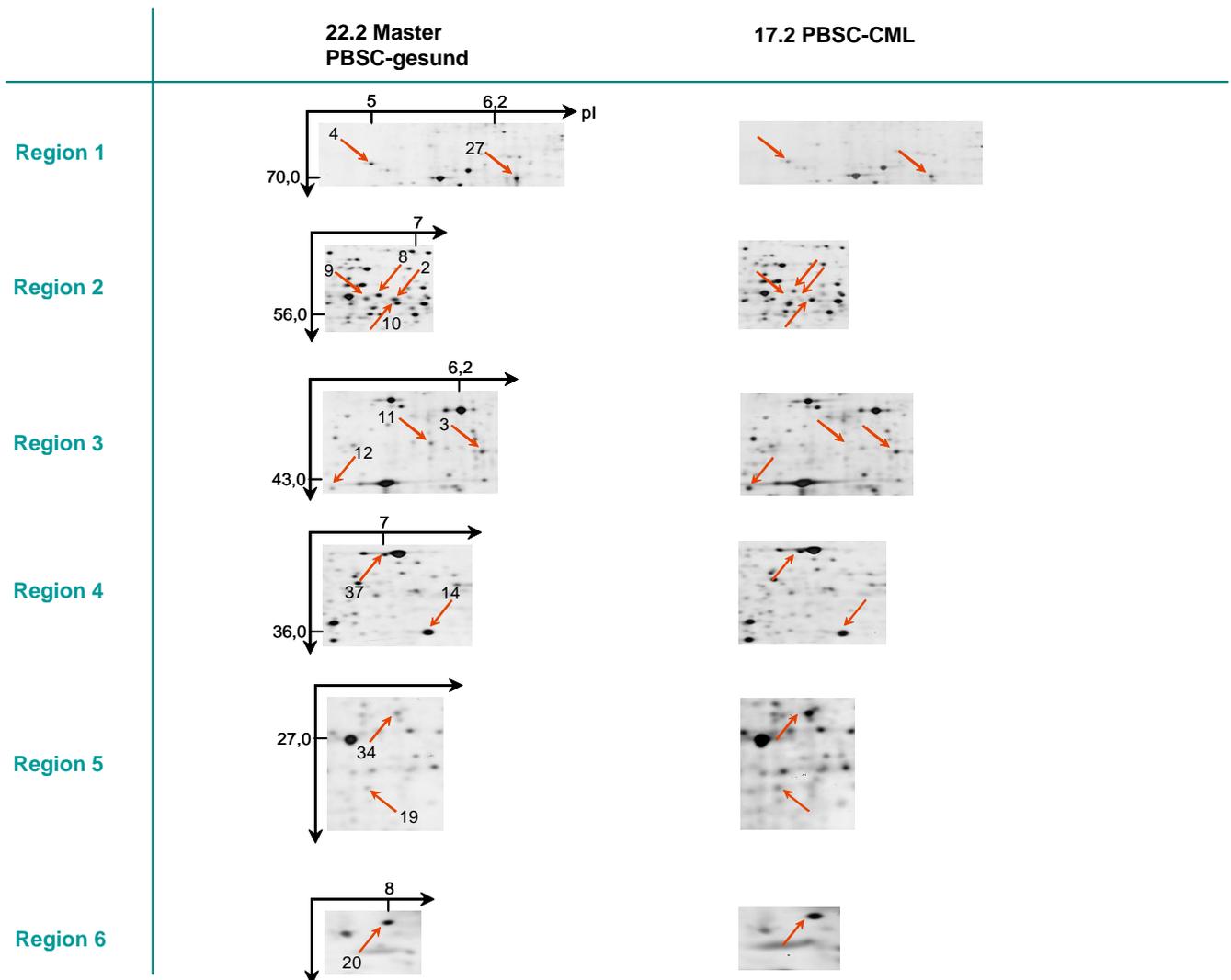


Bild 4.4.7

Tabelle 4.4.3 zeigt in wie weit jeder der Spots in den fünf Paaren verändert ist, heißt im CML Gel Up- oder Downreguliert ist. Des Weiteren gibt Tabelle 4.4.3 auch die bis auf eine Kommastelle errechnete Abweichung eines jeden Spots in Prozent an. Der gesunde Paarpartner gilt jeweils als Vergleichsstandard.

Dabei ist:

Paar 1: Probe 22.2 PBSC-gesund vs. Probe 17.2 PBSC-CML;

Paar 2: Probe 30 PBSC-gesund vs. Probe 25 PBSC-CML;

Paar 3: Probe 23 PBSC-gesund vs. Probe 17.3 PBSC-CML;

Paar 4: Probe 24 PBSC-gesund vs. Probe 36 PBSC-CML;

Paar 5: Probe 22.1 PBSC-gesund vs. Probe 17.1 PBSC-CML

und das Zelllinienpaar : Ad 19 V54/2 PBSC-gesund vs. Ad 18 K562 PBSC-CML.

Paar1	2	3	4	5	Zelllinie	Spot Nr.	pI	kD
↓	100	↓ 62,5	↓ 100	↓ 31,8	↓ 100	↑	100	2 6,9 58,1
↑	19,4	↑ 106,9	↑ 21,1	↓ 10,7	↑ 52	↓	47,3	3 6,3 49,5
↓	17,8	↓ 83	↑ 18,6	↓ 50	↓ 38,6	↓	20,9	4 5,1 70,2
↓	33,9	↓	↓ 14,5	↓ 74,3	↓ 15	↑	20,8	8 6,8 60,3
↓	100	↓	↓ 100	↓ 63,4	↓ 100	↑	12,7	9 6,7 59,2
↑	8,7	↑ 33,9	↑ 100	↑	↑ 105,7	↑	100	10 7 59,2
↓	100	↓ 77,1	↓ 53,4	↓ 7,3	↓ 74,5	↓	100	11 5,1 51,6
↑	191,1	↑ 100	↓ 5,5	↑ 67,2	↑ 63,6	↑	78,3	12 4,9 42,3
↓	9,7	↓ 61,1	↓ 4,7	↑ 30,1	↓ 41,7	↓	86,3	14 7,3 36
↑	45,7	↑ 100	↑ 100	↑ 340,7	↑ 6,6	↑	112,9	19 5,9 22
↑	46,8	↑ 100	↑ 109,5	↑ 14,4	↓ 22,3	↑	104,4	20 8,1 22
↓	30,6	↓ 86,6	↓ 20	↓ 100	↓ 61,1	↓	100	27 6,3 70
↑	100,7	↑ 96,9	↓ 48,6	↑ 6,5	↑ 62,3	↑	46,7	34 6,2 29,4
↑	44,9	↑ 93,4	↑ 55,6	↓ 74,5	↑ 31,4		0	37 7 50,6

 In allen Paaren incl. Zelllinie Veränderung der Proteinexpression in die gleiche Richtung

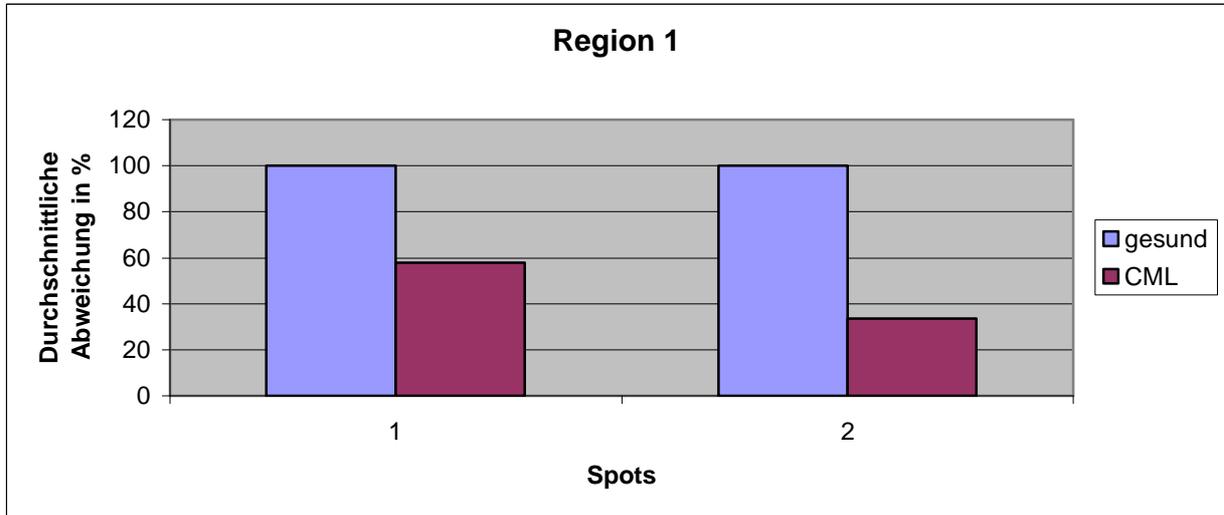
Durchschnittlich ca. 665 Spots
pro Gel (gemessen an Mastergel 22.2)

pI = Isoelektrischer Punkt
kD= Kilo Dalton

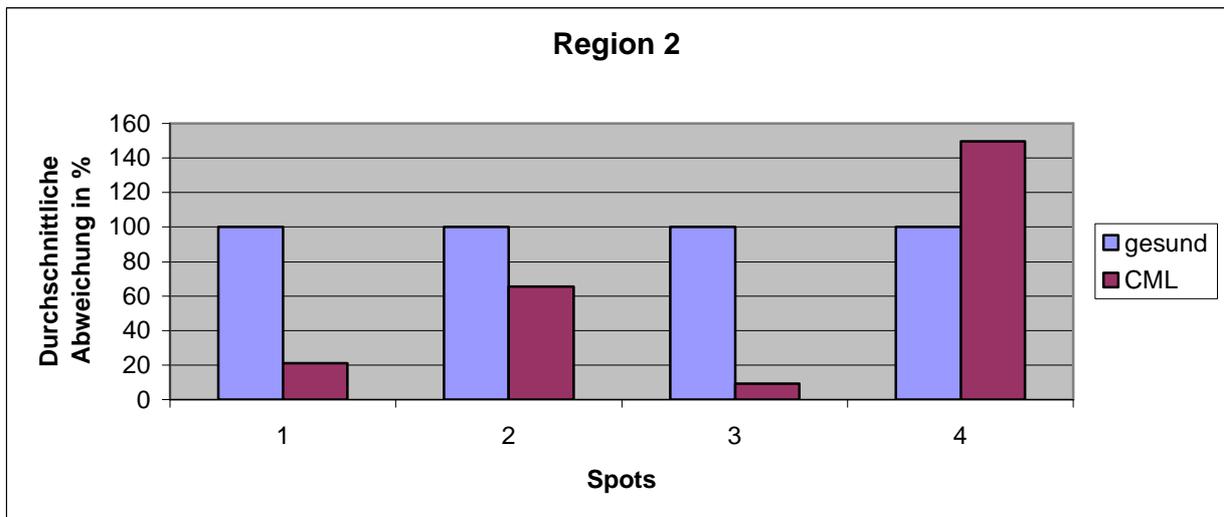
Tabelle 4.4.3 Die Zahlen hinter den Pfeilen geben die Up- bzw. Downregulation in Prozent an

Die folgenden Graphiken zeigen die gemittelten Expressionsunterschiede gesund vs. CML der verschiedenen Spots, aufgeteilt anhand der 6 Regionen aller Gelpaare.

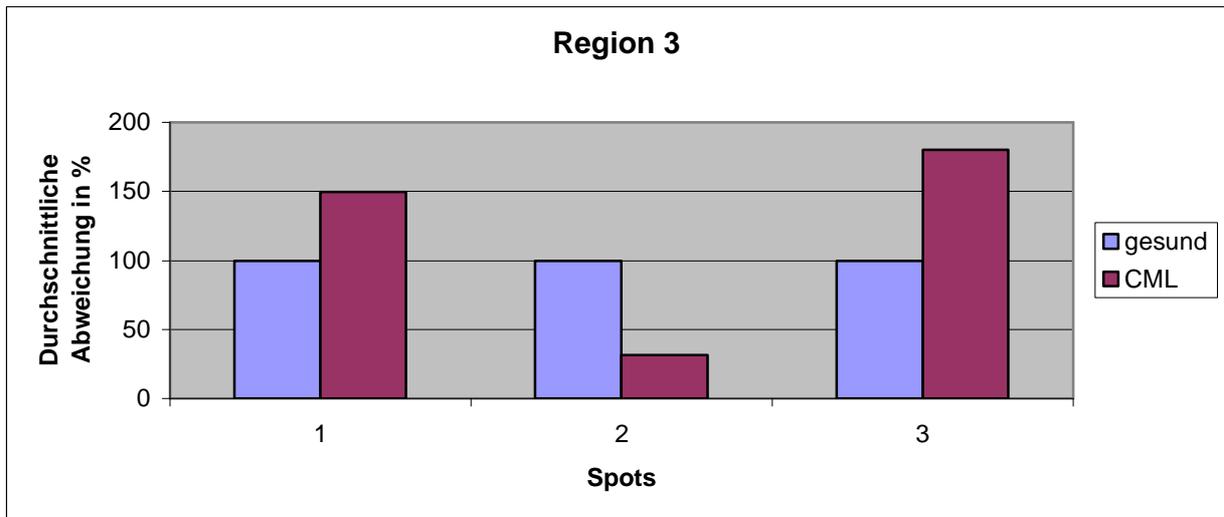
Graphik 4.4.1 – 4.4.6



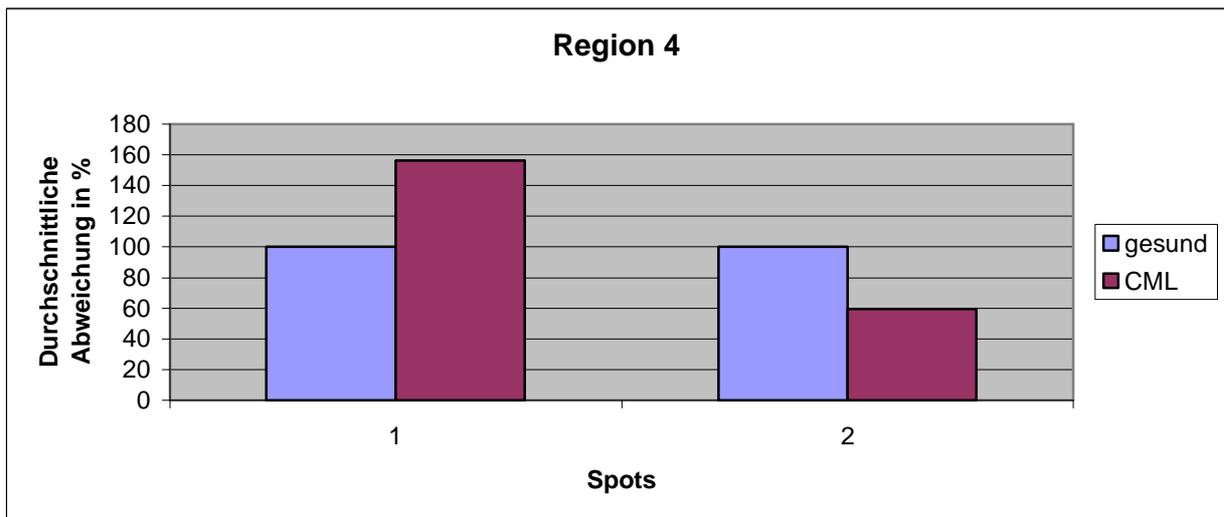
1=Spot 4 (GRP78) 2=Spot 27



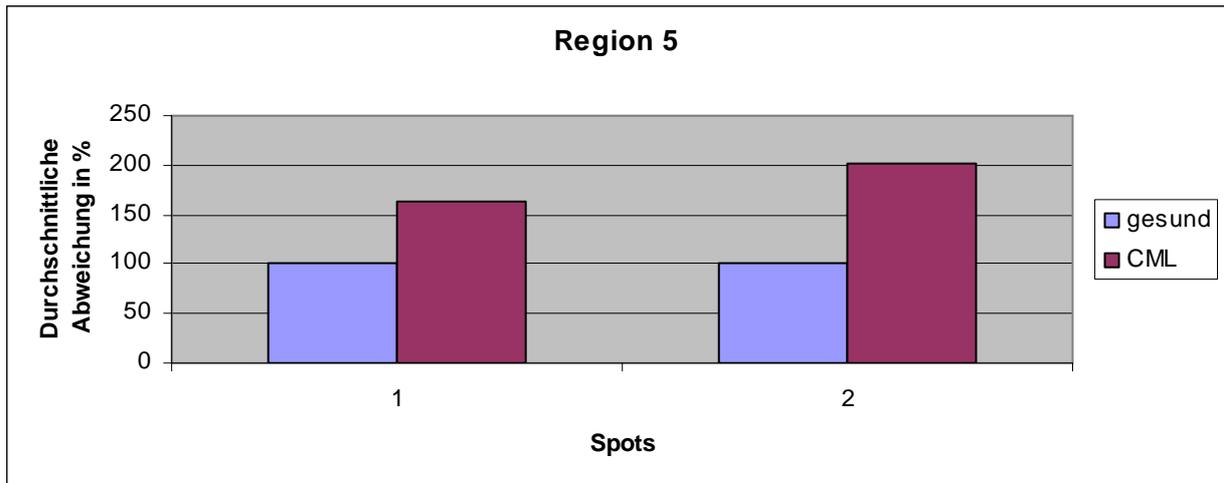
1=Spot 2 (Fibrin β) 2=Spot 8 (Vinculin) 3=Spot 9 (Fibrinogen β chain) 4=Spot 10



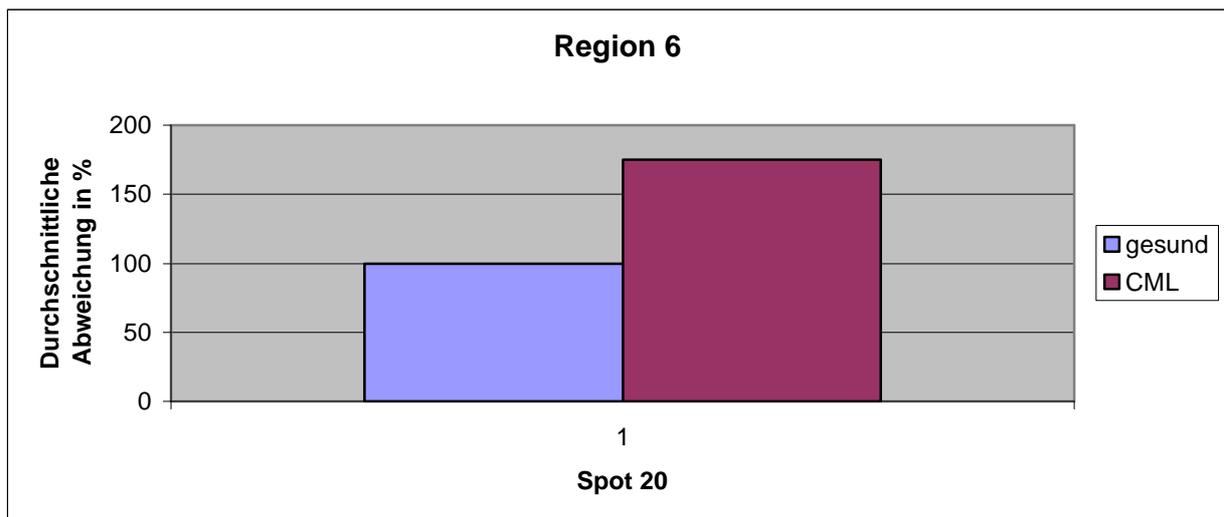
1=Spot 3 (Proteasom 26S ATPase Subunit 2) 2=Spot 11 (Fibrinogen γ chain) 3=Spot 12



1=Spot 37 (Enolase α) 2=Spot 14 (Mixture:Annexin 1 bzw. 2)



1=Spot 34 (Proteasom activator subunit 1) 2=Spot 19 (Peroxi-redoxin 2)



1=Spot 20 (Peroxi-redoxin 1)

Zwar sind 13 der 14 relevanten Spots auch in unserem Zelllinienpaar, welches in zweifacher Ausführung ausgewertet wurde, auffindbar, dennoch verhalten sich nur vier der Spots der Zelllinien wie ihre Pendanten im frischen Spendermaterial.

Visuell anschaulicher zeigen sich die Proteinexpressionsunterschiede gegenüber den Zelllinien-Gelen in Bild 4.4.8.

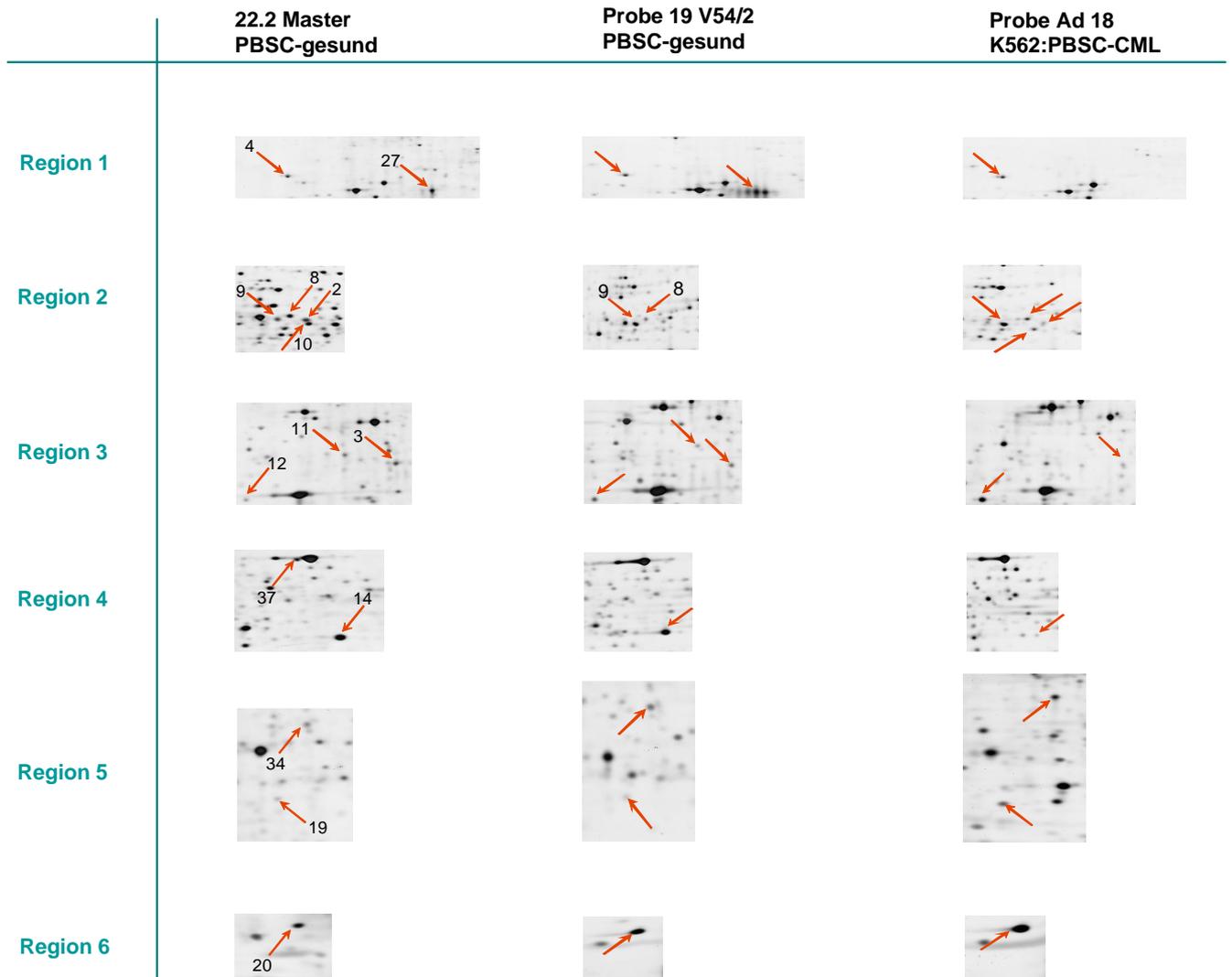
Zelllinie: Probe Ad 19 V54/2:PBSC-gesund vs. Probe Ad 18 K562:PBSC-CML

Bild 4.4.8

4.5 Identifizierung der Proteine mittels Massenspektrometrie

Die Silberfärbung wird wie bereits erwähnt zur Auswertung der Proteinspots genutzt. Der große Vorteil ist ihre hohe Sensitivität. Nicht zuletzt wird sie aber auch dazu benötigt, die für die Massenspektrometrie ausgewählten Spots in den Coomassi-Brilliant-Blau gefärbten Gelen lokalisieren zu können. Die Sensitivität der CBB Färbung ist erheblich niedriger als diejenige der Silberfärbung. Dennoch kann auch mit enorm größeren Auftragemengen, in unserem Fall 50 µl Probenmaterial pro CBB Gel, nicht die Qualität eines Silbergeles erreicht werden

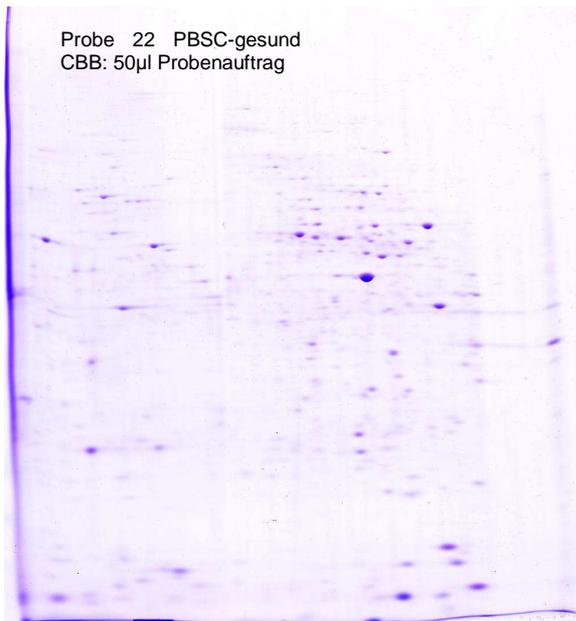


Bild 4.5.1

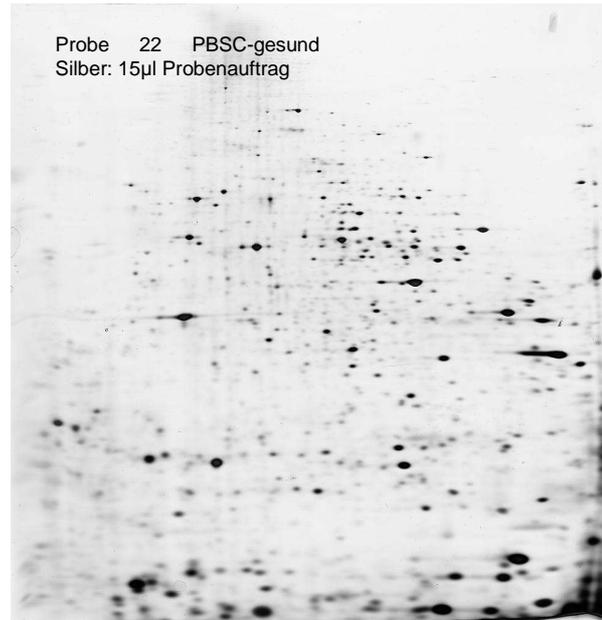


Bild 4.5.2

Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die von uns bearbeiteten Proben im gleichen 1. und 2.-DE Lauf sowohl für CBB, als auch jeweils für Silber gefahren, um Gele unter identischen Laufbedingungen zu erhalten. Dies hat zur Folge, dass man die auf den Silbergelen gefundenen Spots möglichst leicht auf den CBB Gelen lokalisieren kann. Auf diese Weise können die analysierten 14 Spots im CBB Gel eindeutig lokalisiert werden.

Die Proteinspots wurden aus den CBB Gelen ausgestanzt und zur Proteinidentifizierung an das Adolf Butenandt Institut, Zentrallabor für Proteinanalytik in der Schillerstraße 44, 80336 München gesendet. Dort wurden sie einem tryptischen Verdau wie in Material und Methoden 3.10 beschrieben, unterzogen um sie im MALDI-TOF (Matrix assisted laser desorption/ionization - time of flight; erfunden von Kiochi Tanaka, 2002 Chemienobelpreis) Massenspektrometer eindeutig bestimmen zu lassen.

Das Ergebniss waren Massenspektren, die mit denen von Datenbanken abgeglichen wurden und so zur Identifikation der Proteine führten.

Die Auswertung der Spots 10, 12 und 27 im MALDI-TOF Massenspektrometer erbrachte ein negatives Ergebnis, diese Spots konnten keinem Protein zugeordnet werden.

Ergebnisse

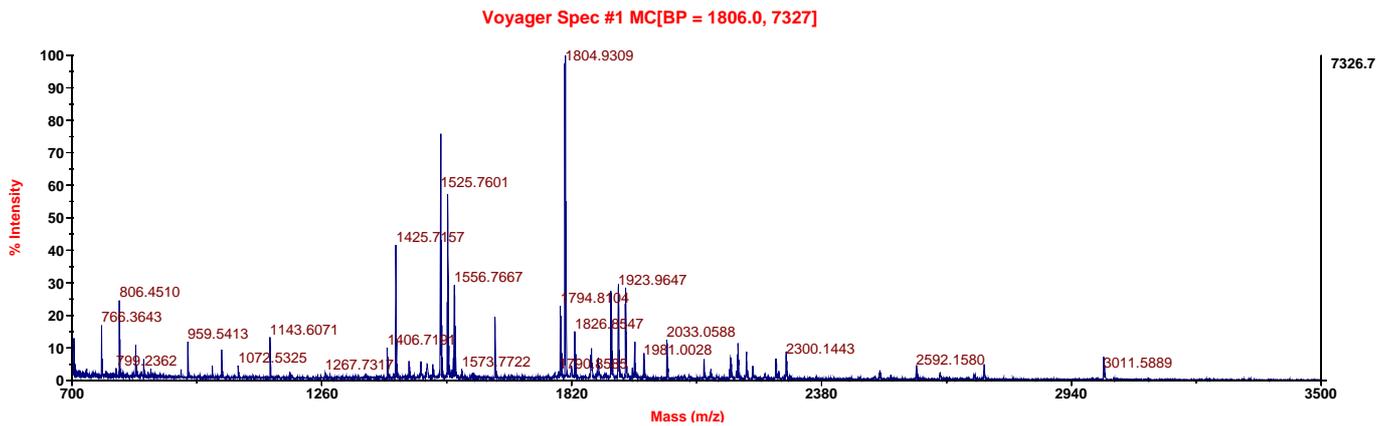


Bild 4.5.3 MALDI-TOF Massenspektrum am Beispiel der Enolase I. Jeder Peak kennzeichnet ein nach tryptischem Verdau entstandenes Peptid mit seiner jeweils spezifischen relativen Molekülmasse. Die Größe des Peaks gibt Auskunft über das quantitative Vorkommen des betreffenden Peptides im analysierten Protein. Anhand der Verteilung dieser Peptidmuster kann dann mittels Abgleich mit theoretischen Spaltungen von Proteinen in Sequenzdatenbanken durch das Mascot databank Research Software Programm das jeweilige Protein identifiziert werden.

Nachdem die durch MS erlangten Daten übermittelt wurden, erfolgte die weitere Charakterisierung der Proteine mittels interaktiver SwissProt, TrEMBL und PubMed Datenbankrecherche. Eine Identifizierung wurde akzeptiert, wenn der Score eines Proteins in der Datenbank mindestens 71 betrug bzw. die Signifikanz bei $p < 0,05$ liegt.

Tabelle 4.5.1 fasst alle Fakten der durch MS identifizierten Proteine zusammen inklusive der Gegenüberstellung des im 2-DE-Gelmuster bestimmten Molekulargewichtes bzw. pI mit denen der SwissProt Daten.

Proteine mit abweichender Expression in den CML Gelen													
Spot Nr	Accession Nr. Publied	Accession Nr. SwissProt	Name	Synonym	Familie	Maas (Kilo Dalton) beobachtet/errechnet	pI beobachtet/errechnet	Länge in aa	Score	Queries matched	p	Lokalisation	Funktion
2 ↓	0401173A		Fibrin beta			58.7150.87	6.9/7.95	447	150	12	3.9*10 ⁻⁹	secreted protein	Blutgerinnung
3 ↑	NP_002794	P36998	Proteasome 26S ATPase subunit 2	Protein MSS1	AAA ATPase	49.548.6	6.3/6.72	432	93	9	0.0018	Cytoplasma Nucleus	Involviert in die ATP abhängige Degradation ubiquitärer Proteine (Proteinabbau)
4 ↓	NP_005336	P11021	Heat shock 70kDa protein 5	Glukose regulated Protein 78 kDa BIP	Heat shock protein	70.272.3	5.1/5.07	654	223	17	2*10 ⁻⁶	Endoplasmatisches Retikulum (ER) Lumen ER transmembranal Zelloberfläche	molekulares Chaperon unerstützt Proteinfaltung schützt Zelle/ER bei Stress
8 ↓	CAI39669	P18206	Vinculin	Metavinculin	Vinculin/Alpha-catenin	60.3 (Fragment)/123.6	6.8/6.51	806	79	7	0.0019	Chromosom 10 Cytoskeletal	Involviert in Zelladhäsion; Involviert in der Anlagerung von auf Aktion basierenden Microfilamenten an die Plasmamembran; Wichtige Rolle für Zellmorphologie und Zellbeweglichkeit
9 ↓	AA107767	Q32065	Fibrinogen beta chain			59.255.8	6.7/6.54	491	162	13	2.5*10 ⁻¹⁰	secreted protein	Blutgerinnung
11 ↓	AAB59531	P02679	Fibrinogen gamma chain			51.649.4	5.1/5.37	437	146	12	9.8*10 ⁻⁹	secreted protein	Kofaktor der Plättchenaggregation; Ergiebliches Monomer welches in Fibrin polymerisiert
14a ↓ Mixture	NP_000691	P04083	Annexin I	Annexin A1 Lipocortin I Calpactin II Chromobindin-9 p35 Phospholipase A2 inhibitor protein	Annexin	36.88.6	7.3/6.64	346	129	10	4.9*10 ⁻⁷	secreted protein extracellular Raum	Calcium/Phospholipid bindendes Protein welches Membranfusion generiert und in die Exozytose involviert ist; Reguliert die Phospholipase A2 Aktivität; Bindet mit hoher Affinität an 2 Calcium Ionen
14b ↓	AAH09564	P07355	Annexin A2	Annexin II Lipocortin II Calpactin I heavy chain Chromobindin-8 p36 Protein I Placental anticoagulant protein IV PAP-IV	Annexin	36.88.5	7.3/7.6	339	121	10	3.1*10 ⁻⁵	secreted protein extracellular Raum	Calciumreguliertes, membranbindendes Protein dessen Calcium Affinität durch anionische Phospholipide stark verstärkt wird; Bindet mit hoher Affinität an 2 Calcium Ionen
19 ↑	NP_005800	Q53HC2	Peroxiredoxin 2 Isoform a (Fragment)		ahpC/TSA	22.27.6	5.9/7.68	256	87	7	0.0079	Cytoplasma	Antioxidations Enzym; Beeinflusst Peroxidase Aktivität; Involviert in Redox Regulation der Zelle; Reduziert Peroxide mit Reduzierungsäquivalenten, bereitgestellt durch das Thiooxinsystem; Wichtige Rolle bei der Elimination von Peroxiden welche im Metabolismus entstehen; Nimmt teil an der Signalkaskade von Wastumsfaktoren und TNF alpha indem es die intracelluläre H ² O ⁻ Konzentration reguliert; Früher Tumormarker vaskulärer Tumoren; Bei Trisomie 21 unterexprimiert

Spot Nr.	Accession Nr. PubMed	Accession Nr. SwissProt	Name	Synonym	Familie	Mass (Kilo Dalton) beobachtet/errechnet	pI beobachtet/errechnet	Länge beobachtet/errechnet in aa	Score	Queries matched	p	Lokalisation	Funktion
20 †	CA113096	Q06830	Peroxisredoxin 1	EC 1.11.1.15 Thioredoxin peroxidase 2 Thioredoxin-dependent peroxide reductase 2 Proliferation-associated gene protein PAG Natural killer-cell-enhancing factor A NKEF-A	ahpC/TSA	22222,1	8,1/8,27	199	89	7	0,005	Chromosom 1 Cytoplasma	siehe Peroxisredoxin 2 (Spot19)
34 †	NP_06254	Q06323	Proteasome activator subunit 1	Proteasome activator 28-alpha subunit PA28alpha PA28a Activator of multicatalytic protease subunit 1 11S regulator complex subunit alpha REG-alpha Interferon gamma up-regulated 1-5111 protein IGUP 1-5111	PA28	29.4/28,7	6,2/5,78	249	71	7	NICHT signifikant		Impliziert Aufbau im Immunproteasom und erforderlich für die effiziente Antigen-Weiterverarbeitung (processing). Erhöht die Generation von Klasse I bindenden Proteinen indem es das Spaltungsmuster der Proteasomen ändert. Induktion durch Interferon alpha
37 †	NP_001419 NP_005936	P06733	Enolase 1	Alpha-Enolase EC 4.2.1.11 2-phospho-D-glucerate hydro-lyase C-myc promoter-binding protein NNE Non-neural enolase Plasminogen-binding protein MBP-1 MPB-1 Phosphopyrate hydratase	Enolase	50.6/47	7/6,99	434	160	12	3,9*10 ⁻¹⁰	Chromosom 1 (M Band) Cytoplasma Zellmembran Isoform 1 im Nucleus	Beteiligt in Glycolyse. Wachstums-kontrolle, Hypoxietoleranz und allergischen Reaktionen. Beteiligt bei intravasaler und inter-zellulärer Fibrinolyse durch die Fähigkeit als Rezeptor und Aktivator des Plasminogens auf der Oberfläche vieler Zellen wie Leukos oder Neuronen zu fungieren. Bindet an den c-myc Promoter und fungiert als Transkriptionsunterdrücker. Wärsch. Ein Tumormarker. Identifiziert als Autoantigen der Hashimoto-encephalopathy. Enolase 1 Antikörper können in Seren von Patienten mit Krebsassoziiertem Retinopathie Syndrom (CAR) nachgewiesen werden. In heterodimerer Form: diagnostischer Marker für viele Tumoren und Marker bei hypoxischen Hirnschäden nach Herzinfarkt. Marker für Endometriose
				AAA = ATPase associated with various cellular activities Score= ersetzt "Sequence coverage" p < 0.05 ist signifikant									

Tabelle 4.5.1

5. Diskussion

Zielsetzung der vergleichenden Proteomanalyse war es, Unterschiede im Expressionsmuster von CML-PBSC und gesunden peripheren Stammzellen, bzw. den korrespondierenden Zelllinien zu erarbeiten.

Aufgabe der Diskussion ist es, zu einem besseren Verständnis zellulärer Vorgänge im Rahmen der CML beizutragen. Dies soll durch eine intensive Beleuchtung möglicher Zusammenhänge zwischen den Eigenschaften der identifizierten Proteine und der Pathogenese der Erkrankung erreicht werden.

5.1 CML, immer noch ein paar offene Fragen

Ein Durchbruch der CML Forschung war die Entdeckung eines „verkürzten“ Chromosoms 22 bei CML Patienten [56], die sich als Translokation 9:22 entpuppte [1]. Ein weiterer entscheidender Einblick in die Pathogenese der CML war die Erkenntnis, dass dieses pathognomische, Philadelphia genannte Chromosom ein Bcr-Abl Fusionsprotein generiert, wobei die Bcr Serin-Threonin Kinase Domäne, die inhibierende NH²-terminale SH³ Domäne von Abl ersetzt. Dadurch entsteht ein Fusionsprotein mit kontinuierlich aktiver Abl Thyrosinkinase Aktivität [57-59][60].

Diese Einblicke in die molekularen Abläufe der CML waren Meilensteine im Verständnis um die CML. Dennoch bleiben einige entscheidende Fragen bezüglich der Entstehung und den pathologischen Abläufen dieser Erkrankung offen.

So ist zum Beispiel noch nicht geklärt, wie das Philadelphiachromosom zustande kommt. Vermutlich liegt ein banaler Vorgang zugrunde, da Bcr-Abl auch in sehr geringen Mengen bei gesunden Menschen gefunden werden kann [61, 62], allerdings nicht in Stammzellen, wo es bekanntermaßen zur Leukämie führt.

Man weiß, das Bcr-Abl viele Proteine aberant phosphoriliert [63, 64]. Man weiß jedoch nicht, welche davon für die Erkrankung kritisch und welche unbedenklich bezüglich der Signalkette des Onkoproteins vom Cytoplasma in den Kern sind.

Man weiß, dass eine Stammzelltransplantation CML Patienten heilen kann, man kennt aber noch immer nicht die Zielantigene der Leukämie, die dabei vom Graft angegriffen werden. Und gerade die sichere Identifikation dieser Zielantigene des vielseitig diskutierten Graft-

versus-Leukemia Effektes nach allogener Stammzelltransplantation wäre von enormer Bedeutung.

Man hat herausgefunden, dass beim Übergang von der chronischen in die akzelerierte Phase eine Anzahl weiterer molekularer Läsionen zustande kommen [8-10], man konnte aber weder ein einheitliches Muster nachweisen, noch wie es zu dieser genomischen Instabilität kommt.

5.2 Imatinib

Durch die genaue Erforschung der Bcr-Abl Tyrosinkinase gelang den Forschern rund um Ciba-Geigy (heute Novartis) in den frühen 90igern mit der Entdeckung von Imatinib Mesylate [65], einem Mitglied der 2-phenylaminopyrimidin Familie, der Durchbruch in der CML Behandlung. Wie genau Imatinib wirkt, ist noch unklar. Man weiß soviel, dass es einen Teil der ATP-Bindungstasche des Abl-Enzyms besetzt [66-68] und so wahrscheinlich größtenteils darüber wirkt, dass es das Bcr-Abl-Onkoprotein in seiner inaktiven Form bindet und stabilisiert. Imatinib erzielt sehr gute Ergebnisse. Abgesehen davon, dass die Überlebenszeit der behandelten Patienten deutlich steigt, induziert es bei einem Großteil der in der chronischen Phase behandelten CML Patienten eine komplette hämatologische Remission (41%) und eine major cytogenetische Remission bei 60% dieser Patienten [69, 70].

Aber auch Imatinib-Resistenzen sind bekannt.

Es gibt die verschiedensten Gründe für die Entstehung einer Imatinib Resistenz. Man unterscheidet zum Einen eine Imatinib unabhängige Resistenz, die von einem Bcr-Abl unabhängigen Mechanismus ausgeht. Zum Anderen existieren Resistenzen, die auf Bcr-Abl zurückzuführen sind.

Am häufigsten ist dies der Fall, wenn es zu verschiedenen Punktmutationen innerhalb der Abl-Kinasen Domäne kommt [71-78] und deshalb die Kinase durch Imatinib nicht mehr inhibiert werden kann. Mehr als 30 solcher Mutationen sind bekannt, die erheblich in Ihrer Resistenzvermittlung variieren. [79] Des Weiteren kann es durch eine Bcr-Abl Genamplifikation und Überexprimierung zur Resistenz kommen [80-82].

Abgesehen davon besteht immer die Möglichkeit, dass ein Patient auf Imatinib nicht anspricht, weil er das Medikament nicht absorbieren kann oder es mit unnatürlicher Schnelligkeit inaktiviert bzw. degradiert wird. Diskutiert werden dabei eine Inaktivierung durch Bindung des Akut-Phase Proteins „alfa-1 Säure Glycoprotein“ an Imatinib [83-85]

und Überexpression des P-Glykoproteins [86]. Andererseits wird auch eine Überexpression an Heat-shock Proteinen in Zusammenhang mit einer Imatinib Resistenz gebracht [87].

5.3 Im Fokus: Die identifizierten Proteine

5.3.1 Spot 4: Glucose-regulated-Protein 78/BiP

In der Massenspektrometrie wurde Spot 4 mit einem Score von 229 als Glucose-regulated-Protein 78 identifiziert. Spot 4 zeigt sich in vier von fünf CML/gesund Gelpaaren, sowie im Zelllinienvergleich, erniedrigt.

Das Glukose regulierte Protein 78 erhielt seinen Namen, da es bei Glucosedepriuation der Zelle zu einer vermehrten Expression dieses 78 kDa Proteins kommt [88]. Etwa zur gleichen Zeit entdeckte man ein Protein, welches man aufgrund seiner Eigenschaft in Prä-B-Zellen die schweren Ketten der Immunglobuline zu binden, „Immunoglobulin heavy-chain binding Protein“ oder kurz BiP nannte [89].

Nach Dekodierung der GRP78 Gensequenz [90] stellte man fest, dass GRP78 und BiP ein und das Selbe Protein sind [91, 92].

Bei GRP78 handelt es sich um ein molekulares Chaperon aus der Familie der 70 kDa Heat-Shock-Proteine [93, 94], die insgesamt zehn Mitglieder umfasst. Molekulare Chaperone haben weitreichende Aufgaben innerhalb der Zelle [95, 96]. Sie stabilisieren neusynthetisierte Polypeptide und unterstützen deren Faltung. Sie binden fehlgefaltete Peptide, schützen diese vor Aggregation und helfen ihnen in eine richtige Faltung überzugehen oder leiten deren lysosomale Degradation über Ubiquitinierung ein. Sie leiten die Proteintranslokation in das ER und den Proteintransport über Organellenmembranen hinweg. Ebenso sind sie beteiligt an der Dissoziation von Clathrin vom coated vesicle und an der Regulation einer Reihe von Signalproteinen wie zum Beispiel Kernrezeptoren (z.B. Steroid Hormon Rezeptor), Kinasen (RAF, eIF2 α Kinase, CyclinB1) und Transkriptionsfaktoren (HSF, c-Myc, pRb). Sie schützen die Zelle vor Apoptose, können diese aber auch, wenn der Zellstress überwiegt, einleiten [97]. Nicht zuletzt spielen sie eine noch wenig erforschte Rolle innerhalb der Immunantwort [98].

GRP78 befindet sich im Inneren des Endoplasmatischen Retikulums (ER), eine Subpopulation existiert auch als Transmembranproteine des ER [99, 100]. Außerdem stieß man auf der Zelloberfläche verschiedenster (Krebs)Zellen auf dieses Protein [101-103].

Das ER ist ein Sammel- und Distributionsort für Proteine, die zur Sekretion oder für die Zellmembran vorgesehen sind [104]. Außerdem reguliert es die Verteilung der Proteine in die verschiedenen Zellkompartimente, die Proteinsynthese und die Speicherung von freiem Ca^{2+} [105]. Des Weiteren reagiert das ER auf Zellstress sowie Veränderungen im zellulären Ca^{2+} Haushalt [104-106]. Innerhalb des ER hat GRP78 als molekulares Chaperon die Aufgabe der Protein-Qualitätskontrolle, Apoptoseregulierung, Ca^{2+} Speicherung [107] und ist beteiligt an der so genannten „unfolded Protein Response“.

GRP78 ist also eine Qualitätskontrollinstanz des ER [108] da es un- und missgefaltete Proteine bindet und so sicherstellt [109], dass nur korrekt gefaltete Proteine prozessiert werden bevor sie den Golgi Apparat zur weiteren Verarbeitung ansteuern [110, 111].

Man muss sich die Retention von nicht/falsch gefalteten Proteinen im ER wie einen immer wiederkehrenden Prozess von Bindung und Lösung an das GRP78 vorstellen. In der Lösungsphase können ungefaltete Proteine weiter ausreifen, so lange bis sie eine Konfiguration annehmen, bei der die GRP78 Bindungsdomäne fehlt oder maskiert ist, womit dann das als reif erkannte Protein aus dem ER freigegeben werden kann. Fehlgefaltete Proteine hingegen werden stabil an GRP78 gebunden, verbleiben so im ER bzw. gelangen durch Peptidtranslokation über die ER Membran hinweg ins Cytosol, wo sie zur proteasomalen Degradation freigegeben werden [112, 113].

GRP78 bindet also kurz an richtig gefaltete Proteine, erkennt diese und gibt sie frei. Falsch gefaltete oder aggregierte Proteinen werden als solche erkannt und stabil gebunden [114] und zwar über die von falsch gefalteten, unreifen oder aggregierten Proteinen exprimierten hydrophoben Motive [115-117].

Mittels der so genannten „unfolded Protein Response“ bzw. über eine Apoptosekontrolle ist GRP78 in die Regulierung von Zellstress involviert [99].

Kommt es zu Stress innerhalb der Zelle z.B. durch oxidativen Stress oder chemische Noxen, sammeln sich un- und missgefaltete Proteine innerhalb des ER an, welches darauf mit der „unfolded Protein Response“ (UPR) reagiert [93, 94, 118, 119].

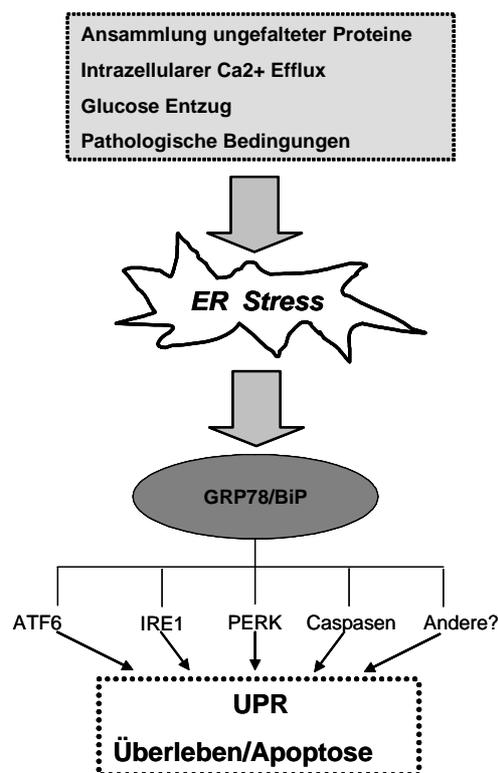
Dank der „unfolded Protein Response“ (UPR) wird das ER mit einem gewissem Level an Stress fertig, was die Zelle vor Apoptose bewahrt. Die UPR beinhaltet, dass die Einfuhr falschgefalteter Proteine gedrosselt wird, die Einleitung eines sofortigen Transkriptionsstops fast aller Proteine mit einem Arrest der Zelle in der G1 Phase [99] und die durch GRP78 unterstützte Korrekturfaltung missgefalteter Proteine. So wird ein tödlicher Overload des ER an fehlgefalteten Proteinen verhindert.

GRP78 vermittelt die UPR und somit den Zellschutz indem es sich unter Stress von den ER-Membran-ständigen UPR-Signalproteinen

- IRE1 (Serin/Threonin Kinase und Endoribonuklease)
- PERK (Serin/Threonin Kinase) und
- ATF6 (basischer Leucin-Zipper Transcriptionsfaktor)

löst [120, 121]. Bindet GRP 78 an diese drei Proteine, sind sie inaktiv. Löst sich der Komplex jedoch, wandert ATF6 nach Prozessierung im Golgi Apparat in den Kern wo es UPR Zielgene aktiviert, inklusive die des GRP78 (positive Rückkopplung) [122-124]. IRE1 und PERK ihrerseits homodimerisieren bzw. autophosphorilieren und werden so aktiv [125].

Bis zu diesem Zeitpunkt fungiert GRP78 als Apoptoseinhibitor und zwar über einen Caspase abhängigen Weg, indem es die Caspasen 7 und 12 bindet [99], und einen Caspase unabhängigen Weg [99, 100, 126]. Andererseits kann GRP78, wird ein zu hohes Maß an Stress innerhalb der Zelle in kurzer Zeit überschritten, über die Aktivierung verschiedener Caspasen (Caspase 7 + 12) und bisher unbekannter Mediatoren, den Apoptoseschutz einer Zelle blockieren und sie somit in die Apoptose treiben.



Graphik 5.3.1

Caspasen sind cysteinabhängige, aspartatgerichtete Proteasen. Sie spielen eine zentrale Rolle in der Induzierung des Zelltodprogrammes, der Apoptose [127, 128]. Caspase 12 gehört zur Interleukin-1 β converting Enzym Subfamilie der Caspasen [129]. Sie ist normalerweise an die cytoplasmatische Seite der ER Membran assoziiert [130].

Zellstress führt dazu, dass cytosolische Caspase7 zur ER Oberfläche geleitet wird, wo sie die ER membranständige Caspase 12 [129] aktiviert was zur Folge hat, dass sich die Caspase 12 von der ER Membran löst und anschließend ins Cytosol wandert, wo sie über die Aktivierung der Caspase 9 die cytosolische Komponente der ER stressinduzierten apoptotischen Kaskade einleitet [131].

Will GRP78 die Zelle vor ihrem Untergang schützen, lagert sich GRP78 als Transmembranprotein der ER Membran an, bindet dabei Caspase 7 und 12 [99] und blockiert über diese Komplexbildung die Kaskadenaktivierung. Diese Bindung an Caspase 7 und 12 und somit die apoptoseschützende Eigenschaft des GRP78, hängt von seiner ATP-bindenden Domäne ab [100]. Die Hydrolyse von ATP führt zur Lösung des Caspase7+12+GRP78 Komplexes [132], ebenso wie die Phosphorylierung und ADP-Ribosylierung zu einer Inaktivierung der GRP78 führt [91, 133], so dass die Inhibition aufgehoben wird und Caspase 12 seinen Weg ins Cytosol beschreiten kann, wo es die caspaseinduzierte Apoptose-Kaskade incl. Cytochrom C, in Gang setzt [99].

Auch wenn die Fähigkeit des GRP78 die Zelle vor Apoptose zu schützen essentiell ist, birgt diese Fähigkeit auch negative Aspekte. Wie oben beschrieben, steht die Regulation und Expression von GRP78 eindeutig in Zusammenhang mit einer Apoptoseresistenz von Zellen [134]. Dies hat zur Folge, dass eine GRP78 Überexpression eindeutig in Zusammenhang mit Tumorentstehung [93, 97, 135, 136], Tumorprogression [97, 136, 137] und einer Resistenzentwicklung gegen medikamenteninduzierte Tumorzellapoptose, gebracht werden kann [93, 135, 138].

Vor kurzem wurde mit einer Signifikanz von $p < 0,005$ [139] gezeigt, dass die Expression von GRP78 im Laufe der schrittweisen hepatozellulären Karzinogenese [140] ansteigt. Dies könnte auf den großen Glucosehunger der Tumorzellen und deren besonderen Metabolismus zurückzuführen sein [141] oder aber darauf, dass ein Tumor gerade anfangs einer schlechten Versorgung unterliegt und deshalb GRP78 hochreguliert, um diesen hypoxischen Stress solange zu überleben, bis die Blutversorgung nach Sprossung neuer Gefäße gewährleistet wird [142].

In einer Kolon CA Zelllinienstudie wurden ebenfalls sehr hohe GRP78 Werte, nebst sehr hohen c-myc Leveln nachgewiesen, was zu dem Schluss führte, dass GRP78 ein direktes Ziel

des Transkriptionsfaktors c-myb sei. C-myb scheint die GRP78 Expression unabhängig von dem UPR Weg zu aktivieren und hilft so dem Tumor schnell einen Überlebensvorteil zu erlangen [142]. Auch die in Studien untersuchte, durch GRP78 Überexpression vermittelte Chemotherapieresistenz in den verschiedensten Krebsarten, ist von UPR Signalen unabhängig. Im Gegensatz zum Ablauf der UPR kommt es bei selektiver GRP78 Überexpression während der Chemotherapieresistenzvermittlung nicht zu einem Arrest der Zelle in der G1 Phase. Die zum Beispiel durch das Chemotherapeutikum Etoposid vermittelte Caspase7 Aktivierung und somit Apoptose Einleitung wird vielmehr durch GRP78 verhindert, indem die oben bereits erwähnte transmembranständige GRP78 Subpopulation die Caspase 7 bindet und so deren Aktivierung verhindert [100].

Aus diesen Gründen ist die weitere genaue Erforschung von GRP78 von wissenschaftlichem Interesse, um mögliche neue Therapieangriffsziele zu entwickeln, wie das neuentwickelte Versipelostatin welches maligne Progression und Metastasierung über GRP Regulierung kontrolliert [141].

Hier zeigt sich auch der Zusammenhang zu dem Bruder des GRP78, dem Heat-Shock-Protein 70 (HSP70) in Hinsicht auf Tumorerkennung, Prognoseprediktion und neue Therapieansätze. GRP78 und HSP70 sind nicht nur Mitglieder der gleichen Proteinfamilie, sie sind auch zu über 60% genetisch identisch [143, 144], inklusive der ATP Bindungsdomäne die für die Chaperonfunktion von Nöten ist.

Beide unterscheiden sich darin, dass GRP78 ein Signalpeptid besitzt, welches es in das Innere des ER lenkt, wohingegen HSP70 im Cytosol verbleibt bzw. bei Zellstress in den Kern wandern kann.

HSP70 ist bereits ausführlicher erforscht als GSP78, vor allem in Zusammenhang mit Tumoren, Leukämien und möglichen neuen Therapieansätzen. Aufgrund ihres hohen genetischen und funktionellen Verwandtschaftsgrades, bergen die HSP70 Erkenntnisse Chancen in der GRP78 Forschung, da viele Therapieansätze, Prognosemarkeransätze etc, die sich bei HSP70 bereits in klinischen Forschungsstadien befinden, auch auf GRP78 übertragen werden könnten.

Bei dem Heat-Shock Protein 70 handelt es sich um ein molekulares Chaperon von 70kDa. HSP70 besteht aus einer 45kDa N-terminalen ATPase Domäne und einer 25 kDa C-terminalen substratbindenden Domäne, wobei HSP70 mit ADP eine starke Affinität zu Proteinen hat und HSP70 mit ATP zur Ablösung des gebundenen Proteins führt [145, 146]. HSP70 ist ein wesentlicher Bestandteil der so genannten „heat-shock-response“, daher der Name Heat-Shock Proteine [147, 148]. Hohe Temperaturen, Hypoxie, Ethanol,

Schwermetalle und andere Chemikalien verursachen Zellstress. Dieser Zellstress führt dazu, dass sich innerhalb der Zelle mehr und mehr un- und missgefaltete Proteine ansammeln. Dies löst wie erwähnt einen rapiden Synthesestop fast aller Proteine der Zelle aus, bis auf eine kleine Population an Proteinen, den Heat-Shock Proteinen. Diese erleben einen enormen Anstieg ihrer Synthese [148].

Die Syntheseinduktion des HSP70 erfolgt über die Aktivierung von HSF1, einem präexistenten Pool an Heat-Shock Transkriptionsfaktoren, welche an Heat-Shock-Promoter-Elemente der DNA binden (Wiederholungen von nGAAn) [145]. HSP70 verhindert die Apoptose der gestressten Zelle indem es den Einstrom einer zu großen Last und somit einen Overload an fehlgefalteten Proteinen in das ER stoppt, die Aggregation falsch gefalteter Proteine und damit deren Anhäufung verhindert und die Re- und Richtigfaltung dieser Problemproteine unterstützt [97]. Ist der Stress für die Zelle subletal und die Heat-Shock Response bzw. ihre Proteine induziert, können auch darauf folgende höhere, vormals letale Stresslevel überlebt werden [147]. Dies bezeichnet man als *Thermotoleranz* [149].

Da HSP70 bei der Regulation von Zellwachstum und Differenzierung eine nicht unwesentliche Rolle spielt liegt der Verdacht nahe, auch bei der Entstehung und dem Fortschreiten von Krebs beteiligt zu sein [150, 151].

Schon vor Jahren wurde entdeckt, dass eine Überexpression von HSP70 und anderen Heat-Shock Proteinen eine schlechte Prognose bei Brust- [152] und Ovarialmalignomen bedeutet. Auch bei GRP78 wurde eine Überexpression bei vielen Krebsarten entdeckt [136, 153] und teilweise konnte man auch hier einen Zusammenhang zwischen Überexpression und Prognose stellen [93, 136, 153, 154], wie bei Brust-, Nieren- und Blasenkrebs [154, 155].

In einer weiteren Studie konnte der Zusammenhang einer HSP70 Überexpression mit einer höheren Malignität und Therapieresistenz bei der CML aufgezeigt werden. Eine Überexpression scheint hier mit einer Imatinib Resistenz assoziiert zu sein [87]. Untersucht wurden resistente Patienten die nicht die herkömmlichen Resistenz Mutationen und Amplifikationen aufwiesen, sondern als einzige Auffälligkeit bis zu 6,5 fach erhöhte HSP70 Werte.

Auch bei der AML wurde eine hohe HSP70 Membran Expression auf leukämischen Zellen mit einer schlechten Prognose korreliert [156]. Abgesehen davon sollen niedrigere HSP70 Werte bei der AML mit höheren cytogenetischen Remissionsraten und einem längeren medianen Überleben korrelieren [157]. Zudem wurde beobachtet, dass Patienten mit hohen HSP70 Werten nie zu einer FAB Gruppe mit niedrigem Risiko gehören, was zu der

Vermutung: hoher HSP70 Wert - schlechte Prognose führt, wie auch schon bei Mamma CA, Endometrium CA, Uterus- und Cervical CA, Kolorektal und Hepatozellulärem CA.[158-160]. In diesem Zusammenhang wurde aufgedeckt, dass AML Patienten mit cytogenetischer Remission, niedrigere HSP70 Werte aufwiesen und Patienten mit hoher HSP70 Membranexpression auf ihren KM Zellen, eine kürzere rückfallfreie Zeit hatten.

Da HSP70 nur auf der Plasmamembran von Tumorzellen und nicht auf der von Gesunden exprimiert wird [161, 162], würde es sich nach Meinung mancher Forscher auch als Tumormarker eignen.

Was wieder zu GRP78 führt, das ebenfalls auf der Oberfläche von (Krebs)Zellen gefunden wurde. Die Tatsache, dass GRP78 als Transmembranprotein des ER existiert und das ER ein „Membranlieferant“ ist, erklärt die Tatsache, dass GRP78 auf der Zelloberfläche verschiedenster Zellarten gefunden wurde [101, 103], wobei besonders die übermäßige Oberflächenexpression auf hypoxischen Tumorzellen erwähnenswert ist [135].

Hervorzuheben, vor allem wegen der therapeutischen Implikationen als möglicher neuer „Malignom-Vaccinierungs-Kandidat“ ist die Tatsache, dass GRP78 auf der Oberfläche dieser Krebszellen in Assoziation mit MHC Klasse 1 Molekülen vorkommt [102].

Innerhalb des ER ist GRP78 ebenfalls assoziiert mit MHC Klasse 1, aber nur solange das MHC-1 Molekül noch unreif ist und sich sein beta2-m Teil noch nicht angelagert hat [163]. GRP78 dient dem MHC I also als Chaperon.

Die Möglichkeit der Vaccinierung gegen körpereigenen Krebs durch Krebszellen gebildetes GRP78 wäre denkbar, ähnlich wie mit HSP70, bei dem sich die „Krebs-Impfung“ teilweise bereits im klinischen Stadium der Forschung befindet [102].

Aus diesem Grund könnte GRP78 nicht nur ein möglicher Leukämie Früherkennungs- und Prognosemarker sein, sondern auch ein interessanter Kandidat für medikamentöse Interventionen, gerade bei Imatinib-Versagern.

Die Idee, Patienten gegen „ihren“ Krebs durch Vaccinierung zu immunisieren, ist nicht neu. Eine Möglichkeit wäre sicherlich der Gebrauch tumorspezifischer Antigene. Drei Antigene wurden für eine spezielle CML Impfung bereits in Betracht gezogen.

Erstens: Bcr-Abl generiert neue Aminosäuresequenzen die nur auf leukämischen Zellen exprimiert werden. Eine Immunisierung von Mäusen mit solch Bcr-Abl generierten Proteinen, resultierte in Studien in einer peptid-spezifischen CD4+ T-Zell Antwort [164-167].

Der zweite Ansatz wäre der Gebrauch von PR1, einem Nonapeptid ausgehend von Proteinase 3. Proteinase 3 ist eine Serin Protease die durch die Neutrophilen Differenzierung induziert

wird und in myeloiden Leukämien überexprimiert wird [168, 169]. PR1 wird durch HLA-A2.1 präsentiert und ruft eine spezifische Antwort cytotoxischer T-Lymphozyten hervor [170]. Der dritte Ansatz wäre der Gebrauch von Heat Shock Proteinen zur Vaccinierung [171]. Mittels Apherese wird dem Patienten dabei malignom-generiertes HSP70 entnommen und dann wieder injiziert, dies soll eine spezifische cytotoxische T-Zell Antwort gegen Antigene derjenigen Zellen auslösen, aus denen das Heat Shock Protein 70 gewonnen wurde und so die CML eradizieren [172, 173].

Dies wurde an Hand von Mausmodellen getestet, in denen die Vaccinierung mit tumorproduziertem HSP70 und Grp94 eine tumorprotektive Immunität auslöste [174]. Man geht davon aus, dass man, indem man leukämiegenerierte HSP`s isoliert und diese an große Proteine bindet, eine verbesserte Host gegen Tumor Antwort generieren könnte, da die HSP`s das gesamte Tumorrepertoir enthalten und so T-Zellen gegen die verschiedensten Epitope des Tumors generiert werden könnten.

Es existiert bereits eine klinische Studie über HSP70 Vaccinierung bei CML Patienten. Eine komplette cytogenetische Remission wurde bei allen fünf Patienten erreicht, die das Impfgieme vollständig absolvierten, zwei davon hatten eine molekulare Remission [175].

Ein weiteres sich im Versuch befindliches, personalisiertes Vaccin ist AG-858, welches sich in einer Phase 2 Studie befindet. Durch Leukapherese werden dabei Krebszellen des Patienten isoliert. Ziel ist ein Angriff der Körperabwehr nach Injektion des generierten Vaccins gegen viele unterschiedliche Epitope des Malignoms. AG-858 basiert darauf HSP70 und assoziierte Proteine zu isolieren und in injizierbare Form zu bringen. [176]

Dies wäre auch mit GRP78 denkbar.

In meinem CML Patientengut war GRP78 herunterreguliert. In Anlehnung auf die oben erwähnten Forschungsergebnisse bei HSP70 könnte dies daran liegen, dass sich die Patientengruppe in guter Remission befand oder einer prognostisch günstigen FAB-Klasse angehörte, was nicht zu eruieren war.

Zuletzt soll noch der kürzlich entdeckte Einfluss von GRP78 auf die Gerinnung erwähnt werden.

Es wurde bereits mehrfach demonstriert, dass eine Überexpression von GRP78 in Säugerzellen zur Expressionsunterdrückung spezieller Koagulationsfaktoren führt. Watson et al. zeigt z.B., dass eine GRP78 Überexpression zu einem signifikanten Abfall der zelloberflächenvermittelten Thrombingenerierung führt [177]. Dies führt Watson auf die Fähigkeit des GRP78 zurück, die prokoagulative Aktivität (PCA) des Tissuefaktors (TF) zu inhibieren und zwar aufgrund der Tatsache, dass man eine signifikant niedrigere Konversion

von Faktor X zu Xa und Faktor VII zu VIIa auf der Oberfläche GRP78 überexprimierender Zellen beobachtete.

Der Hauptaktivator der extrinsischen Koagulationskaskade ist der TF, ein 47kDa Transmembran-Glycoprotein [178, 179]. TF initiiert die Koagulationskaskade indem es einen Komplex mit Faktor VII/VIIa auf der Zelloberfläche eingeht, was zur Aktivierung von Faktor XI und X und somit zur Thrombingenerierung führt.

GRP78 Upregulation führt allerdings nicht zu einem Abfall der TF Level auf der Zelloberfläche, was zu der Erkenntnis führt, dass die Inhibition von TF PCA nicht auf einer Retention im ER durch GRP78 beruht.

Zusammengefasst bedeutet das, dass Überexpression von GRP78 die Thrombin Generierung reduziert, indem es den TF PCA inhibiert und so das koagulatorische Potenzial der Zelle supprimiert. GRP78 verändert die TF PCA also über Mechanismen die unabhängig von seiner Chaperon Aktivität sind. Man vermutet dass die GRP78 Fähigkeit als ER Ca²⁺ Homöostaseregulator zu fungieren, eine wichtige Rolle bei der TF PCA Regulierung spielt, da [107, 180] die TF PCA durch Veränderungen des intrazellularen Levels an freiem Ca²⁺ vermittelt wird. Ein Anstieg des intrazellularen freien Ca²⁺ Spiegels führt nämlich zur Induktion von TF PCA.[181-184] GRP78 könnte demnach die TF Aktivität inhibieren, indem es intrazelluläres Ca²⁺ sequestriert.

Desweiteren ist bekannt, dass erhöhte Level an GRP78 zu verminderter Sekretion an von Willebrand Faktor und Faktor VIII führen. [185, 186] GRP78 fungiert dabei als Chaperon für von Willebrand Faktor und Faktor VIII im ER.

5.3.2 Spot 2, 9 und 11: Fibrin β , Fibrinogen β -Kette, Fibrinogen γ -Kette [187]

5.3.2.1 Die Blutgerinnung

Die Spots 2, 9 und 11 stellten sich in der MALDI-TOF Untersuchung als Fibrin β (Score 150), sowie Fibrinogen β Kette (Score 166) und Fibrinogen γ Kette (Score 146) heraus. Alle drei Spots waren in fünf von fünf CML/gesund Gelpaaren erniedrigt, Spot 11 zusätzlich im korrespondierenden Zelllinienvergleich.

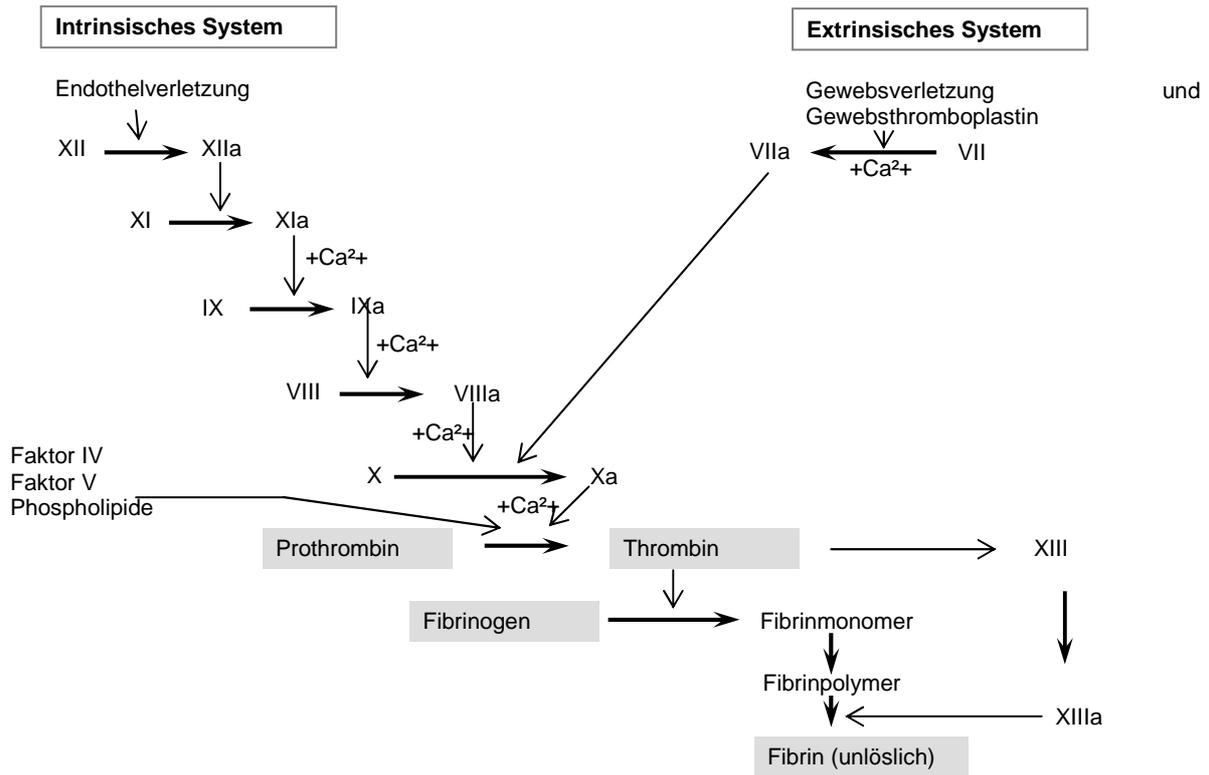
Kommt es zu einer Verletzung des Körpers, reagieren die beschädigten Gefäße zunächst mit Vasokonstriktion. An die Verletzungsstelle lagern sich Thrombozyten, der so genannte weiße Thrombus entsteht. Anschließend kommt es zur Plättchendegranulation und somit zur Freigabe von ADP, Serotonin, von Willebrand Faktor, Platelet derived growth Faktor und

Faktor V. Parallel werden durch die Gefäßverletzung auch die plasmatischen Gerinnungsfaktoren aktiviert, welche für die sekundäre Blutstillung und somit den endgültigen Defektverschluss verantwortlich sind. Die plasmatische Blutgerinnung kann dabei sowohl durch Verletzung der Gefäßwand, als auch durch Verletzung des Gefäßendothels aktiviert werden. Die beteiligten Faktoren werden fast ausschließlich in der Leber gebildet. Man unterscheidet innerhalb der plasmatischen Blutgerinnung das intrinsische (Aktivierung nach Endothelverletzung) und das extrinsische (Aktivierung nach äußerer Verletzung) System. Auf die Aktivierung der Start-Faktoren XII im intrinsischen und VII im extrinsischen System, folgt die kaskadenartige Aktivierung nachgestellter Faktoren, bis es zur endgültigen Bildung eines unlöslichen Fibrinthrombus kommt, der aufgrund der Einlagerung von Erythrozyten „roter Thrombus“ genannt wird.

Inhibitoren des Gerinnungssystems sind das Antithrombin III (ATIII), sowie Protein S und C. ATIII inhibiert Thrombin, Faktor Xa und die Faktoren XIIa, XIa und IXa. Protein S inaktiviert, Vitamin K abhängig, die Gerinnungsfaktoren VIII sowie V und reguliert die Fibrinolyse zusätzlich durch die Inhibierung des Plasminogen-Aktivator-Inhibitors 1.

Die Fibrinolyse verhindert zum einen eine überschießende Gerinnungsbildung und baut zum anderen überflüssig gewordene Gerinnung wieder ab. Mitglieder der Fibrinolyse sind der Tissue-Plasminogen-Aktivator (tPA), der Urokinase-type-Plasminogen-Aktivator (uPA), das Plasminogen und seine aktive Form das Plasmin, welches hoch affin an Fibrin bindet und dieses in kleine Fragmente proteolytisch spaltet.

Inhibitoren der Fibrinolyse wiederum sind die Antiplasminen: Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 und α -Plasmin-Inhibitor.



Graphik 5.3.2.1

5.3.2.2 Fibrin(ogen) Struktur

Fibrinogen ist ein 45 nm Molekül, das aus zwei außenständigen D Domänen besteht, welche über coiled-coil Segmente mit der zentralen E Domäne verbunden sind. Das Molekül wird zusammengehalten aus zwei Polypeptidkettensets bestehend aus je drei Ketten namens A α , B β und γ , die sich an ihrem N-terminalem Ende in der E Region über fünf symmetrische Disulfidbrücken [188, 189] vereinigen.

Jede Fibrinogen α -Kette enthält eine N-terminale Fibrinopeptid A (FPA) Sequenz, deren Abspaltung durch Thrombin zur Fibrinpolymerisation führt [191] und zwar über die Exposition von Polymerisationsseiten, die Ea genannt werden. Ein Teil dieser Ea befindet sich am N-Terminus der α -Kette und ein anderer Teil ist in der β -Kette lokalisiert. Jedes Ea geht eine Bindung mit einer komplementären Bindungstasche (Da) in der D Domäne eines benachbarten Moleküls ein, die in der γ -Kette lokalisiert ist. Die initiale Ea:Da Assoziation bringt die Fibrin Moleküle dazu sich in einem überlappenden End-zu-Mitte Domänen Arrangement aufzureihen und so doppelsträngige, in sich verdrehte Fibrillen zu bilden [192, 193]. Diese Fibrillen wiederum gehen laterale Bindungen ein um so vielsträngige Fibrillen zu bilden [194].

jedoch ist der entstehende Thrombus weniger stabil als der des A-A Fibrins. Nicht zuletzt gibt es zwei selbst-assoziiierende Seiten (γ -XL) in der γ -Ketten Region.

5.3.2.3 Fibrin(ogen) Aufgaben

Die Funktionen des Fibrin(ogens) sind vielschichtig und noch nicht vollständig erfasst. Zu seinen Aufgaben gehören:

- Suppression der Plasmafaktor XIII vermittelten „cross-linking Aktivität“ durch Bildung eines „Faktor XIII-A²B²“ Komplexes.

(Faktor XIII bindet dabei nur an γ' -Ketten enthaltene Fibrinogen Moleküle, die so nicht nur die Faktor XIII Aktivität kontrollieren, sondern auch als XIII-Karrier Proteine fungieren.)

- Spezielle Bindung an Thrombin, genannt Antithrombin I (AT-I) nach Segers [196]. Diese spezielle Bindung regelt die Thrombin Generierung in gerinnendem Blut.

(Das nach FPA und FPB Abspaltung entstandene Fibrin bietet übrig gebliebenes Thrombin-Bindungspotential. Die beiden Bindungsseiten des Fibrins befinden sich dabei in der E Domäne und, diejenige mit höherer Affinität, in der D Domäne von γ' -Ketten enthaltenden Molekülen. Sie werden Exosite 1 und 2 genannt.)

- Eine aus einer schwalbenartigen tPA-Plasminogen-Fibrin Komplexformation resultierende, tPA stimulierte, Plasminogen Aktivierung [197].

(Im Gegensatz dazu behindert die Bindung von Inhibitoren wie α 2-Antiplasmin, Plasminogen Activator Inhibitor-2, Lipoprotein (a) oder histidinreiches Glykoprotein an das Fibrin, die Plasminogen Aktivierung bzw. verstärkt die Fibrinolyse Resistenz)

- Verstärkte Interaktion mit der extrazellulären Matrix durch Bindung an Fibronectin

- Molekulare und zelluläre Interaktionen mit Fibrin- β 15-42. Diese Sequenz bindet auch an Heparin und vermittelt die Verteilung von Thrombozyten und endothelialen Zellen, steuert die Fibroblastenproliferation [198] und Kapillarsprossung [198, 199] sowie die Freigabe von von-Willebrand-Faktor. Interaktion zwischen Fibrin β 15-42 und vaskulärem Endothel Cadherin, ebenso wie mit dem endotheliale Zellrezeptor, führt ebenfalls zur Kapillarsprossung [200].

- Bindung (über die γ -Kette) an den Thrombozytenrezeptor α IIb- β 3, der wichtig für den Einbau der Thrombozyten in den sich formierenden Thrombus ist.

- Bindung an Leukozyten über Integrin α M β ² (MAC-1), der ein Rezeptor stimulierter Monozyten und Neutrophilen ist und wichtig für die Fibrin(ogen)-Leukozyten Interaktionen in Zusammenhang mit der inflammatorischen Antwort. Diese Bindung findet an zwei Stellen der γ -Kette statt, genannt P1 und P2 [201].

- Fibroblast growth faktor-2 und Vascular endothelial growth Faktor können an Fibrinogen binden und potenzieren dann die endotheliale Zellproliferation [202, 203].
- Interleukin 1, ein Cytokin, das einen Teil der Inflammatorischen Antwort darstellt, bindet an Fibrin(ogen) um dann verstärkt die endothelialen Zellen zu stimmulieren [204].

5.3.2.4 Fibrin(ogen) und Malignität

Fibrinogen und Fibrin spielen also sich überlappende Rollen in der Blutgerinnung, Fibrinolyse, Zell-Matrixinteraktion, bei Entzündungen und Wundheilung.

Gerade wegen ihrer Fähigkeit, Zellproliferation und Angiogenese zu initiieren ist es nachzuvollziehen, dass dem Fibrinogen bzw. Fibrin, eine zunehmend bedeutende Rolle in Bezug auf die Entstehung und Progression von Neoplasien zugeschrieben wird.

Experimentelle Daten zeigen einen Zusammenhang zwischen Koagulation- und Fibrinolyse System mit der Tumor Entstehung, Progression und Metastasierung. Man nimmt an, dass indem man das Blutgerinnungs- und Fibrinolyse System zum Ziel der medikamentösen Behandlung macht, der Verlauf einer malignen Erkrankung positiv beeinflusst werden könnte [205].

Korte et al. sieht eine mögliche Zukunft der Blutgerinnungsfaktoren als Risikomarker bei Krebspatienten und den Einsatz von antikoagulativen und/oder antifibrinolytischen Strategien in der antineoplastischen Therapie [205]. Abgesehen davon gibt es Daten die bestätigen, dass die antikoagulatorische Therapie und im Speziellen die niedermolekulare Heparintherapie, antineoplastische Effekte hat und dass ihr Gebrauch in Kombination mit Chemotherapie womöglich das Outcome bei verschiedenen Krebsarten verbessern wird [205].

Auch gibt es bereits Hinweise dafür, dass Mitglieder der Blutgerinnung gute Prognosefaktoren darstellen könnten, wie der "Urokinase-ähnliche Plasminogen Aktivator" und sein Rezeptor ("uPAR"), die bereits als starke Prediktoren bezüglich des Outcomes in verschiedenen Krebsarten verwendet werden, insbesondere bei Brustkrebs [205].

Sharma et al. zeigt, dass man Leukämien (CML, AML und ALL) anhand verschiedener Blutparameter wie Blutviskosität, Plasmaviskosität, Hämatokrit, Fibrinogenspiegel etc. unterscheiden kann. Bei der CML beispielsweise zeigt sich ein Anstieg der gesamten Blutviskosität, Plasmaviskosität, Blutsenkungsgeschwindigkeit und eine Erhöhung des Fibrinspiegels sowie eine verminderte Blutungszeit [131].

Wada et al. belegen, dass die Sterberate bei Leukämiepatienten hoch ist, wenn sie eine hohe Fibrinogen Konzentration aufweisen. Ebenso zeigen diejenigen Leukämiepatienten eine hohe Organversagensrate, bei denen hohe Fibrinogen Level gemessen wurden [206].

Bei akuten nicht-lymphatischen Leukämien korrelieren hohe t-PA Level mit einer schlechten Prognose [207] und bei Prostatakrebs gilt, je aggressiver der Krebs desto höher die u-PA Werte. Ebenso wurden hohe Werte an u-PA bei Gehirntumoren, Magenkrebs und Leberkrebs gemessen [207].

Da Tumorzellen sowohl t-PA als auch u-PA enthalten, könnte die Balance zwischen tumorvermittelter Fibrinogenbildung und Fibrinolyse zu einem wichtigen Punkt in Bezug auf antimetastatische Behandlungsprotokolle werden [208].

Die weitreichenden Einflüsse der Blutgerinnungsfaktoren in der Kanzerogenese sind bei weitem noch nicht aufgedeckt, dies zeigt sich auch daran, dass immer mehr Mitglieder der Blutgerinnung und Fibrinolyse in Zusammenhang mit der Kanzerogenese gebracht werden.

Der mögliche Zusammenhang zur Krebsentstehung wird ersichtlich wenn man bedenkt, dass die Fibrinolyse essentiell für die Freigabe von Zellen aus ihrem ursprünglichen Zellverband ist, was pathognomisch für Malignome ist und zwar indem sie die Versorgung für das neoplastische Zellwachstum durch Kapillarsprossung bereitstellt und Zellmobilität gewährleistet [207].

In Bezug auf myeloische Leukämien kann gesagt werden, dass Blutgerinnungs- und Auflösungsstörungen bekannte Komplikationen bei Leukämiepatienten sind, insbesondere bei AML Patienten. Diese Komplikationen beruhen auf thromboplastischen Substanzen die durch die Blastenzellen selbst getrickert werden [209].

Die Plasmakonzentration an D-Dimer (quervernetztes Fibrin Degradationsprodukt) dient dabei als spezifischer Marker für die Aktivierung des Koagulations- und des Fibrinolyse systems. Bei Leukämie Patienten ist zum Zeitpunkt der Diagnosestellung der D-Dimer Level erhöht, fällt ab bei kompletter Remission und steigt wieder bei Rückfall oder Chemotherapieresistenz, was den D-Dimer Level als Verlaufsparemeter qualifizieren könnte [210].

Die Blutungsstörungen von CML Patienten lassen sich auch wie folgt erklären. Untersucht man leukämische Blasten von CML Patienten und bringt man diese in Gerinnsel ein, sind diese Blasten in der Lage selbstständig die Plasminogen enthaltenden Gerinnsel aufzulösen. Diese Fähigkeit wird zurückgeführt auf eine erhöhte u-PA Expression dieser Zellen [211].

Es wurde bereits spekuliert, dass die Expression von Plasminogenaktivatoren wie u-PA eine zentrale Rolle bei der Ermöglichung der Invasion von normalem Gewebe durch maligne

Zellen spielt [212, 213] und in der Tat enthält sowohl das Plasma, als auch das Knochenmark von CML Patienten hohe Werte an u-PA, wohingegen das Mark gesunder Probanden nur t-PA enthält [214].

5.3.2.5 Fibrinogen γ -Ketten Funktion

Fibrinogen bindet über seine γ -Kette an Zelloberflächenrezeptoren, Wachstumsfaktoren und Koagulationsfaktoren, um seine Schlüsselrolle in der Blutgerinnung, Plättchenaggregation und Wundheilung auszuführen.

Neu gefundene γ -Ketten Epitope binden außerdem an den Thrombozytenrezeptor Integrin $\alpha\text{IIb}\beta^3$ und den Leukozytenrezeptor Integrin $\alpha\text{M}\beta^2$ [215].

Die Funktionen der Fibrinogen γ -Kette sind im Einzelnen:

- Fibrinpolymerisation und Quervernetzung (Faktor XIIIa vermittelt die Quervernetzung der C-terminalen Regionen von γ -Ketten in jeder D Domäne (die γXL Seite)).

Wie wichtig die Rolle der γ -Kette bei der Fibrin-Gerinnung Formation ist, zeigt ihre Ausschaltung durch Antikörper, was in einen 25fachen Anstieg der Perfusionsrate und verstärkter Fibrinolyse resultiert. Diese Tatsache bietet die Möglichkeit, durch Ansteuerung auf die Fibrinogen γ -Kette neue antithrombotische Therapien zu entwickeln [215].

- Initiierung der Fibrinolyse
- Regulation der Faktor XIII Aktivität
- Interaktion mit Thrombozyten und anderen Zellen;

Das Fibrinogen nimmt an der Plättchenaggregation durch Bindung an das Thrombozyten Integrin $\alpha\text{IIb}\beta^3$ (Glykoprotein IIb-IIIa) teil. Mäuse die diese γ Region nicht aufweisen, bilden zum einen schneller Thromben, die zum anderen auch häufiger embolisieren [216].

- Mitwirkung bei der Vermittlung der Thrombinbindung an Fibrin, was Antithrombin I genannt wird und eine thrombin-inhibitorische Funktion aufweist [217]. Schätzungsweise 1/4 des Thrombins ist an Fibrin gebunden, und ungefähr 4% davon an eine γ' -Kette. Einige Forscher glauben, dass diese alternative γ -Kette als Negativregulator fungiert [218] und nannten sie daher "Antithrombin I" nach Seegers 1945. Studien zeigen, dass die Bindung der γ' carboxyl terminalen Peptidgruppe an das Thrombin in der Tat die thrombin-induzierte Plättchenaggregation unterdrückt [219]. Außerdem dient die Antithrombin I Bindung womöglich dazu das Thrombin an die Stelle der Verletzung zu lenken um ein seitliches Wachsen des Gerinnsels zu verhindern.

Andere Forschungsgruppen unterstützen dagegen die Meinung, dass diese Bindungsseite dazu dient das Thrombin zur Gerinnseloberfläche zu lenken und zwar in einer aktiven Form, um so mehr Fibrinogen in Fibrin zu konvertieren, als so genannter positiver "feed-forward" Modulator.

Erwähnenswert ist, dass die γ' -Kette an das Thrombin Exosite II [219] bindet, die Hauptbindungsstelle des Heparins am Thrombin, wodurch die γ' -Kette die Thrombininaktivierung durch Heparin verhindert, was ein klinisches Problem darstellt [215].

5.3.2.6 Fibrinogen γ -Kette und Pathologie

Dem Fibrinogen wird unterstellt ein zentraler Regulator der inflammatorischen Antwort zu sein. Fibrinogen ist ein klassisches "Akut-Phase" Protein, das bei Entzündungen vermehrt in der Leber gebildet wird. Zusätzlich kommt es zu einer extrahepatischen Induktion und vermehrten Zirkulation.

Eine wichtige Verbindung zwischen Fibrin(ogen) und der Leukozyten Biologie scheint der Integrin Rezeptor $\alpha M\beta^2$ (Mac-1) zu sein, der an die Fibrin(ogen) γ -Kette bindet und die Leukozyten Aktivität reguliert. Die Bindung an MAC-1 erfolgt über Sequenzen in der γ -Kette, genannt P1 [220] und P2 [201]. P1 und P2 liegen auf der γ -Kette dicht beieinander [201].

Die Leukozyten Interaktion mit der Fibrin(ogen) γ -Kette über den Leukozytenrezeptor Integrin $\alpha M\beta^2$ innerhalb entzündetem oder beschädigtem Gewebe ist möglicherweise ein wichtiger Schlüssel für die Zielerkennung der Leukozyten.

Die Fibrin(ogen) γ -MAC1 Interaktion führt zu Zellveränderungen wie Kalziummobilisation, Aktivierung von NF- κ B [221], verstärkte Phosphorylierung, Degranulation, Hochregulierung von Adhäsionsmolekülen, verstärkte Migration und verminderter Apoptose [222].

Experimente an Knock-out Mäusen haben gezeigt, dass besonders die γ -Ketten Region 390-396 wichtig für die Bindung zwischen Fibrin(ogen) und Leukozyten ist. Mäuse, die diese Region nicht besitzen, weisen einen gravierenden Defekt in ihrer Immunabwehr auf, genannt: Leukozyten-Adhäsions-Defizienz Typ1, die zu schweren Defekten in der Leukozyten Funktion und chronischen Infektionen führt [223].

Die Fibrinogen γ Kette könnte also ein wichtiger Funktionsmodulator der Entzündungszellen sein.

Die Fibrinogen γ -MAC1 Achse könnte deshalb ein interessantes Ziel in der Entwicklung neuer Therapien von z.B. chronischen Entzündungen darstellen. Die

pharmakologische/genetische Ausschaltung von Fibrinogen γ im Mausmodell führte bereits zu einer verminderten Progression der Arthritis dieser Tiere[224].

Besonders hervorzuheben ist, dass neue auf die Fibrinogen γ -Leukozyten Interaktion gerichtete Therapien nicht notwendigerweise die Funktion des Fibrin(ogens) innerhalb der Hämostase beeinflussen, da diese nachweislich unabhängig von der immunmodulatorischen Funktion ist.

Das Fibrinogen enthält außerdem Bindungsseiten für verschiedene Wachstumsfaktoren und Cytokine, inklusive dem endothelialen Wachstumsfaktor [202], FGF-2, und Interleukin 1b [204]. Diese Bindungsseiten dienen höchst wahrscheinlich dazu, diese Faktoren im Gerinnsel zum Zwecke der Entzündungsantwort und der Wundheilung zu konzentrieren. Die FGF-2 Bindungsseite ist dabei einmal mehr am C-terminus der γ -Kette lokalisiert [225].

5.3.3 Spot 3: Proteasom 26S ATPase Subunit 2

Spot 3 zeigte sich in der Massenspektrometrie mit einem Score von 95 als Proteasom 26S ATPase Subunit 2 und war in vier von fünf CML/gesund Gelpaaren erhöht.

5.3.3.1 Das 26S Proteasom (Nobelpreis in Chemie für Ciechanover, Hershko und Rose) [226]

Das 26S Proteasom mit seinen ca. 2000 kDa, gehört zu den Peptidasen die Proteine und ATP in verknüpften Reaktionen hydrolisieren.

Das Proteasom ist bei Eukaryoten sowohl im Nukleus als auch im Cytoplasma lokalisiert. Die Hauptfunktion des Proteasoms besteht darin, unnütze oder beschädigte Proteine per Proteolyse abzubauen. Die Enzyme, die diese Reaktion ausführen, werden Proteasen genannt. Proteine, welche durch das Proteasom degradiert werden sollen, werden mit einem sehr kleinen Protein, dem Ubiquitin, gewissermaßen markiert. Die Wichtigkeit der proteolytischen Degradation innerhalb einer Zelle und die Rolle des Ubiquitins in diesem Geschehen, wurde 2004 durch die Vergabe des Chemienobelpreises an Aaron Ciechanover, Avram Hershko und Irwin Rose, anerkannt.

Da das 26S Proteasom sowohl im Zytosol, angeheftet an das ER, als auch im Nukleus aller Zellen vorkommt, muss seine Aktivität streng kontrolliert werden. Diese Kontrolle erfolgt hauptsächlich über eine strenge Substratauswahl. Die verschiedenen AAA ATPasen (= ATPases associated with various cellular activities) des Proteasoms binden jeweils an

bestimmte kurze Peptidsequenzen, die so genannten Flaggen oder Erkennungssignale, die meist nahe des C- oder N-Terminus gelegen sind. Des Weiteren gibt es spezielle Adapter oder Lieferproteine, die die Substratspezifität des Proteasoms ebenfalls kontrollieren. Im Falle des 26S Proteasoms ist dies das Ubiquitin [227, 228]. Nur ubiquitinierte Proteine, und eine sehr geringe Menge nicht-ubiquitinerter Proteine, werden degradiert. Die Ubiquitinierung erfolgt dabei durch drei Enzyme: E1 (Ub-activating Enzym), E2 (Ub-konjugating Enzym) und E3 (Ub Ligase) [229].

5.3.3.2 Aufbau des 26S Proteasoms

Das 26S Proteasom [230] besteht aus einer 20S Kerneinheit und ein oder zwei 19S Kappen [231]. 20S hat eine zylindrische Struktur, bestehend aus vier aufeinandergesteckten heptameren Ringen, den zwei äußeren α Ringen und zwei inneren β Ringen. [232, 233] Jeder der Ringe besteht wiederum aus 7 Untereinheiten. Die Substrate betreten das Zentrum der 20S Kerneinheit durch ein enges Gate, welches durch die α Untereinheiten gebildet wird, deren N-Termini je nach Konformation, den Eingang entweder verschließen oder den Eintritt gewähren. Sie fungieren also als "Türsteher" [234].

Die katalytischen Zentren befinden sich in vier der β Ringuntereinheiten, gebildet aus den N-terminalen Threonin Resten [235]. Sie zerlegen die Substratproteine in Peptide.

An einem oder auch beiden Enden der 20S Kerneinheit hängen die 19S Regulatorkappen, 900-1000 kDa Partikel. Diese Kappen regulieren die Bindung der Proteine an das 26S Proteasom und den Zutritt in den 20S Hohlzylinder. Sie bestehen jeweils aus einer Basis und einem Deckel, wobei der Deckel die Polyubiquitinflaggen der Proteine erkennt, bindet und zum Zwecke des Recyclings abspaltet. Die Basis hingegen besteht aus sieben homologen ATPasen (Rpt 1-7) [231] und vier Nicht-ATPasen. Die ATPasen entfalten die Proteine, da nur lineare, entfaltete Proteine die enge Öffnung des Proteasoms durchschreiten können. Man geht davon aus, dass die AAA ATPasen an das Ubiquitinerkennungssignal andocken und das Protein von dort in das Innere des 26S Proteasoms „ziehen“. Durch den Zug werden die folgenden Reste des Proteins denaturiert [236]. 19S besteht aus schätzungsweise 18 Untereinheiten. Die ATPasen sind sich in ihrer Sequenz sehr ähnlich und bilden eine Subfamilie innerhalb der AAA+ Superfamilie [237]. Diese ATPasen stellen die Energie für die Proteinenfaltung bereit, denn die Protein Degradation durch das Proteasom benötigt ATP Hydrolyse, welche durch diese assoziierten Hexameren AAA ATPasen Komplexe bereitgestellt wird. ATP erfüllt dabei mehrere Funktionen innerhalb der Proteolyse und der

einzigste Schritt der unbedingt die Hydrolyse von ATP erfordert ist die Entfaltung von großen Proteinen. Des weiteren hat man erkannt, dass die Basis der 19S Einheit bestimmte chaperonähnliche Eigenschaften aufweist, z.B. kann es die Proteinaggregation verringern, Refaltung denaturierter Proteine initiieren [238, 239] und bestimmte, missgefaltete Substrate umbauen. Diese Fähigkeit scheint auch in Zusammenhang mit der 19S Fähigkeit der Gen-Transkriptions-Regulierung zu stehen.

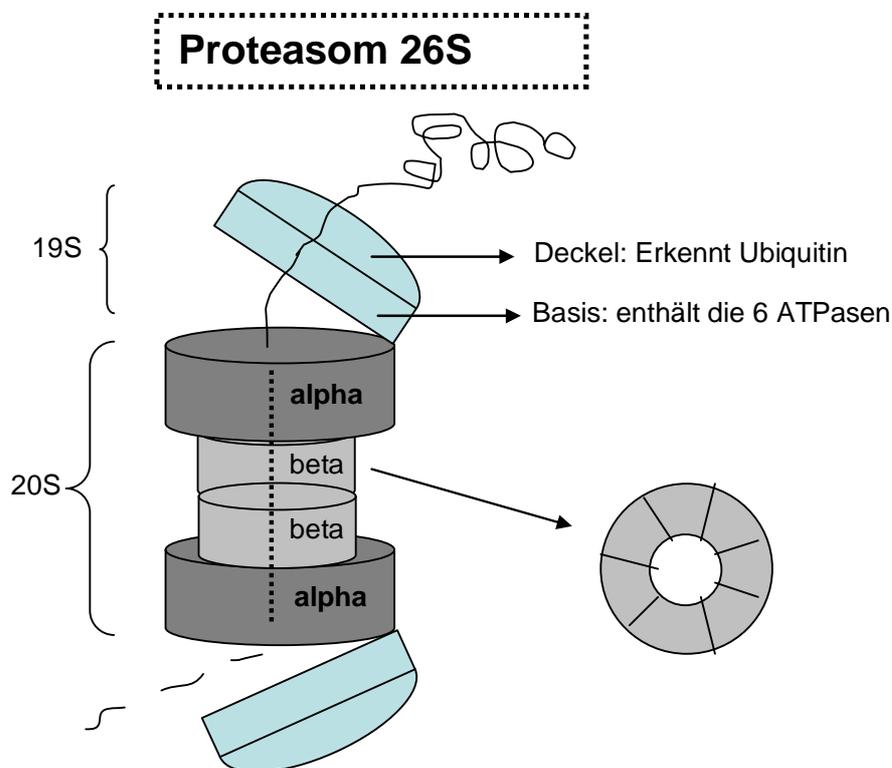
Zwar wird für die Proteindegradation eine ATP Hydrolyse benötigt, ist ein Protein aber bereits denaturiert, wird kein ATP mehr für die Translokation in bzw. die Degradation durch die 20S Einheit, benötigt.

Einige Wissenschaftler gehen deshalb davon aus, dass die Translokation entfalteter Proteine in den 20S Kern durch reine "passive Diffusion" erfolgen kann.

Diese Vermutung stützt sich auch auf die Erkenntniss von Smith et al. [240], dass beide Schritte unabhängig voneinander sind:

- Der Entfaltungsprozess benötigt ATP Hydrolyse aber KEINE Substrattranslokation
- Die Translokation benötigt entfaltete Proteine, aber KEINE ATP Hydrolyse.

Die restlichen Untereinheiten sind Nicht-ATPasen. Davon ist S5a das einzige bekannte Protein welches an die Ubiquitinkonjugate bindet [241].



Graphik 5.3.3

5.3.3.3 Funktion und Krankheitswert des 26S Proteasoms

Ein gehäufter Anfall von freien Radikalen führt zur Zellschädigung durch Oxidation von Biomolekülen. Um die Integrität der genetischen Information und der Proteinhomöostase zu gewährleisten, müssen geschädigte, un- oder fehlgefaltete Proteine selektiv proteolysiert und die DNA repariert werden.

Chronischer oder kritischer oxidativer Stress führt zur Akkumulation oxidierter Proteine, die ihrerseits Aggregate bilden. Das proteolytische System, hauptverantwortlich für die Entfernung oxidierter cytosolischer oder nuklearer Proteine, ist das Proteasom.

Abgesehen davon ist das Proteasom in viele Schlüsselfunktionen zellulärer Prozesse involviert wie den Zellzyklus, Kontrolle der Genexpression, Proteinturnover, Apoptose, Signaltransduktion, Proteinqualitätskontrolle und Antigenpräsentation. Außerdem ist es dafür verantwortlich, dass wichtige regulatorische Proteine rechtzeitig und selektiv degradiert werden, wie zum Beispiel das Zellzyklus abhängige Cyklin und Cyklin abhängige Kinasen. Außerdem ist es verantwortlich für die Aktivierung von NF- κ B, sowie den Umsatz von Transkriptionsfaktoren und p53 [226, 242].

Betrachtet man die Liste der Proteasom Aufgaben ist es nicht verwunderlich, dass das 26S Proteasom durch Dys-, Über- und Unterfunktion mit verschiedenen Krankheiten in Verbindung gebracht wird, wie zum Beispiel neurodegenerativen Erkrankungen [243]. Die Dysregulation des enzymatischen Proteasomsystems spielt wahrscheinlich auch eine Rolle bei der Tumorentstehung und Progression, Medikamentenresistenzentwicklung und Entwicklung einer veränderten Immunkompetenz [244].

Da das 26S Proteasom die aktive Form des NF- κ B generiert, einem anti-apoptotischen und proinflammatorischen Regulator der Cytokinexpression, ist die proteasomale Aktivität auch verknüpft mit Entzündungsaktivität und Autoimmunkrankheiten [245]. In diesem Zusammenhang korrelieren erhöhte Werte an proteasomaler Aktivität mit der Krankheitsaktivität bei systemischem Lupus Erythematosus und rheumatischer Arthritis [245].

Andere Studien hingegen belegen, dass es bei verschiedensten Erkrankungen zu einem Abfall der 26S Aktivität kommt [246, 247], analog den Beobachtungen beim Alterungsprozess [248, 249]. Da beides - Krankheit und Alterungsprozess - auf eine Akkumulation oxidierter Proteinaggregate zurückzuführen ist, wird angenommen, dass solche quervernetzten Aggregate mögliche Inhibitoren des Proteasoms darstellen. Es liegen experimentelle Daten

vor, dass mutierte Proteine zur Aggregation neigen und fähig sind das Proteasom zu inhibieren [250, 251].

Proteasom 26S Serumlevel werden auch als Prognosefaktoren bei Multiplem Myelom herangezogen, da ein hoher Level nachweislich ein schlechtes Ansprechen bzw. Resistenz gegenüber herkömmlicher Chemotherapie bedeutet [252].

5.3.3.4 26S Proteasom und Malignität

Da die Fähigkeit des Proteasoms tumorsupprimierende und proapoptische Proteine zu degradieren bei vielen Neoplasien dysreguliert ist, stellt das Proteasom ein wichtiges Ziel der Krebsforschung dar. Die Liste der Proteasom Substratproteine ist lang und enthält unter anderem positive und negative Zellzyklus Regulatoren wie die Cykline A-E, Cyclin abhängige Kinasen, Inhibitoren wie p21 und p27, verschiedenste Mitglieder der cdc25 Phosphatasenfamilie, Regulatoren der onkogenetischen Transformation wie c-fos, c-jun oder c-Myc, Tumorsuppressoren wie p53, proapoptische und antiapoptische Regulatoren wie bax und Bcl-2, negative Transkriptions Regulatoren wie Id, IkappaBalpha einem Inhibitor des NFkappaB und die Zelladhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 [267]. Bei dieser Auswahl an Proteinen ist es offensichtlich, dass das Proteasom eine kritische Rolle bei der Proliferation und dem Überleben von Tumorzellen spielt.

Jakob et al. [290] weisen eine erhöhte Proteasomaktivität in Myelomzellen nach und zeigen, dass es bei behandelten Patienten mit aktivem multiplem Myelom nach der Malignomtherapie zu einem Abfall der Proteasomkonzentration im Serum kommt und zwar ausschließlic bei Respondern, nicht jedoch bei Non-Respondern. Aufgrund der Tatsache, dass sie in dieser Studie eindeutig einen Zusammenhang zwischen erhöhten Proteasom Serumspiegeln und vorangeschrittener MM Erkrankung zeigen konnten, wurde das Proteasom als neuer unabhängiger Prognosefaktor für MM Patienten angeregt.

Adams et al. [268] haben ihrerseits die Chance einer neuen Klasse an effektiven Antitumor Medikamenten aufgezeigt, den Proteasominhibitoren. Aufgrund der Erkenntnis, dass das Proteasom eine Threonin Protease ist [235] wurde ein sehr potenter und selektiver Proteasominhibitor entwickelt, das Bortezomid. Dies bildet einen kovalenten und reversiblen Komplex mit dem Proteasom [291].

In der klinischen Phase I, II und III der APEX Studie mit Bortezomid zeigte sich laut Ludwig et al. [275], dass Bortezomid nicht nur beim Multiplen Myelom sondern in einer Vielzahl von hämatologischen und soliden Tumoren zu einer verminderten Proliferation führt, Apoptose

maligner Zellen induziert und die Aktivität von Chemo- und Strahlentherapie verstärkt, ja sogar Chemoresistenz umkehren kann.

Den mit einer Überexpression an 26S assoziierten Medikamentenresistenzen, liegt folgendes Zugrunde: NFκB wandert nach seiner Aktivierung in den Kern wo es eine Reihe von antiapoptotischen Signalwegen in Gang setzt, was zur Resistenz von Tumorzellen gegen viele Antitumormedikamente führt. Da der NFκB Inhibitor IκB bei Zellstress vom Proteasom degradiert wird, kann so NFκB erst aktiv werden.

Eine Proteasom Inhibierung führt also über die indirekte Inhibierung von NFκB einerseits zu einer Sensibilisierung der Tumorzellen gegenüber Chemotherapie, andererseits werden zusätzlich proapoptotische Wege in Gang gesetzt [267]. Bortezomib (N-pyrazinecarbonyl-L-phenylalanine-L-leucine Boron Säure), auch bekannt als PS-341 oder MLN-341 ist der erste Proteasominhibitor der es in klinische Studien geschafft hat [197, 268, 269]. Er blockiert das Proteasom schnell, hoch selektiv und reversibel indem es direkt an den 20S Komplex bindet und seine enzymatische Aktivität blockiert.

Bortezomib wurde im May 2003 von der US Food and Drug Administration zur Behandlung von rezidivierten oder fortgeschrittenen Multiplen Myelom Patienten zugelassen [270] und überzeugte mit seine antitumor Wirkung in einer Versuchsreihe von 60 Krebszelllinien des US National Cancer Institutes [268].

Bortezomib vermittelt einen Zellzyklusarrest durch die Stabilisierung von Cyklin abhängigen Kinaseinhibitoren wie p21 und p27 wobei es auch aktiv gegen Krebszellen mit sehr niedrigen Proliferationsraten ist [267].

Des Weiteren induziert es Apoptose, indem es den Abbau bestimmte Proteine verhindert und so zu deren Akkumulation innerhalb der Zelle führt wie p53 und Bax, welches die Cytochrom C Freigabe aus dem Mitochondrium triggert. Außerdem triggert Bortezomib die Induktion der Caspase 12 vermittelten Apoptose durch Induktion des ER vermittelten Apoptose Signalweges.

Bortezomib erzielt seine zytotoxische Aktivität also auch durch die Aktivierung der ER Stress Antwort [271] und Störung der Unfolded Protein Response in Myelom Zellen.

Außerdem verstärkt Bortezomib auch die antineoplastischen Effekte anderer Chemotherapien, der Strahlentherapie, sowie der Immunotherapie [267, 271] und kehrt sogar Resistenzen um. Interessanterweise auch Resistenzen, die durch die Bcr-Abl/p210 Protein Tyrosin Kinase vermittelt werden [272].

Bortezomib wurde in vivo bereits bei den verschiedensten Neoplasien getestet, darunter T-Zell-Leukämie, Lungenkrebs, Brustkrebs, NHL, CLL, Pankreas-, Kolonkrebs und zeigt bei allen viel versprechende erste Ergebnisse [267, 274, 275].

In den klinischen Studien zeigte sich bemerkenswerterweise, dass Proteasom Inhibitoren selektive Cytotoxizität gegenüber transformierten Zellen aufweisen [276, 277].

Bei Tests von Proteasominhibitoren an K562 Zellen kam es zu deren Apoptose, diese wurde induziert durch eine Aktivierung der Caspase 3 und anderen Caspasen und führte dosisabhängig zu einem linearen Anstieg von apoptotischen Zellen.

Die Apoptose Induktion durch Proteasominhibitoren wurde begleitet durch einen Zellzyklusarrest dieser Zellen in der G₂/M Phase und von Akkumulation und Stabilisierung des Cyclin-abhängigen Kinase Inhibitors p21 und des Tumorsupressorproteins p53 wohingegen gesunde CD34⁺ Zellen kaum in ihrer Ausreifung gestört wurden. Die Proteasominhibitoren beeinflussen also bevorzugt maligne Zellen [268, 277].

Das 26S Proteasom ist auch in humanen leukämischen Zellen abnormal hoch exprimiert [266]. Seine Expression normalisiert sich jedoch, wenn die Zellen durch Medikamente zur Ausreifung gebracht werden [278]. Die Proteasomaktivität könnte also für die Lebensfähigkeit und maligne Proliferation leukämischer Zellen, von Nöten sein.

5.3.3.5 26S Proteasom und CML

Es gibt auch bereits erste Ergebnisse von Bortezomib in der CML Behandlung. In Vitro unterdrückt Bortezomib das Wachstum Bcr-Abl positiver Zellen, sowohl Imatinib sensitiver als auch resistenter Zellen [279].

Die Wachstumsinhibition korrelierte dabei mit einem Zellzyklusarrest in der G₂/M Phase und war dabei mit einer reduzierten NFκB DNA Bindungsaktivität assoziiert, sowie mit einer Herunterregulierung von Bcr-Abl, Aktivierung der Caspase3 und reduzierter Expression und Phosphorylierung von Bcr-Abl. Gleichzeitige Gabe von Imatinib und Bortezomib wirkte antagonistisch, wobei ein Regime von Bortezomib und darauf folgender Imatinib Gabe synergistisch wirkte. Auch bei der AML erzielte das Bortezomib Regime bereits erste Ergebnisse. Einige Patienten wiesen eine komplette Remission auf.

Zusätzlich zeigt sich aber, dass Bortezomib auch eine cytoprotektive Antwort auslöst, indem es Heat Shock Proteine hochreguliert. Rajkumar et al. [244] geht davon aus, dass eine Kombinationsgabe von HSP Inhibitoren und Bortezomib, zu einer erhöhten Sensitivität bzw. zur Resistenzüberwindung führen wird [280].

In diesem Zusammenhang wird Bortezomib bereits in Kombination mit dem HSP90 Inhibitor „17AAG“ bei Myelom Patienten getestet, da einige Zellen dem proapoptotischen Effekt von Bortezomib durch eine Hochregulierung verschiedenster HSP`s entkommen [280].

Besonders hervorzuheben ist, dass Bortezomib bei MM nachgewiesener Massen nicht nur die im KM verweilenden Krebszellen angreift, sondern auch das umliegende Mikroumfeld an gesunden Zellen in die Richtung gehend beeinflusst, dass sie die Tumorzellen nicht länger mit parakrinen Proliferationsstimuli unterstützen [281].

Dies ist auch bezüglich der CML interessant, da man davon ausgeht dass bei minimal residualen Fällen tief im Knochenmark "schlafende" Krebszellen nicht durch die Medikamente erreicht werden. Würde diesen Zellen die "Nahrungslieferung" durch ihre umliegenden gesunden KM Zellen entzogen, wäre dies ein möglicher Weg, solche Zellen "auszuhungern".

5.3.3.6 Proteasom 26S ATPase Subunit 2 Aufbau

Der Proteasom 26S ATPase Subunit 2 (S2) gehört der Superfamilie der AAA+ ATPasen (= ATPases associated with various cellular Activities) an.

Ihre Mitglieder sind charakterisiert durch ein oder zwei 200-250 AS lange ATP Bindungsdomänen [254], genannt AAA Motiv, die ihrerseits aus einem Walker A und B Motiv bestehen. Der im Walker A Motiv enthaltene P-Loop interagiert direkt mit den Phosphaten des ATP und ist essentiell für die ATP Bindung.

Das Walker B Motiv ist ebenfalls unablässig für die Nukleotidbindung. Mutationen in diesem Motiv führen zu so genannten Substratfallen, die die Substrate zwar binden aber nicht mehr freigeben können.

Die eukaryotischen proteasomalen ATPasen gehören einer Subfamilie der AAA ATPasen an die ein zusätzliches Motiv besitzen, genannt "second Region of homology" (SRH) [256]. Die SRH koordiniert die Nukleotid Hydrolyse und Konformationsänderungen zwischen den Untereinheiten, sie ist also verantwortlich für einige einzigartige Eigenschaften der AAA+ Familie.

5.3.3.7 Proteasom 26S ATPase Subunit 2 Funktion

Die Proteasom 26S ATPase Subunit 2 reguliert das Tor des 20S Partikels [234, 257]. Es öffnet das Gate in Anwesenheit von ATP [258], wobei ATP nicht zwangsläufig hydrolysiert

werden muss. Das bedeutet, dass bereits entfaltete Proteine ohne Energieaufwand in das 20S Innere transportiert werden können.

Die AAA ATPasen allgemein lagern sich gern zu oligomeren Ringstrukturen mit einer zentralen Pore zusammen und unterliegen während sich wechselnden Zyklen von Nukleotidbindung und Hydrolyse ständigen Konformationsänderungen.

Zusätzlich scheinen die meisten dieser ATPasen in Proteinfaltung-, Entfaltung sowie Proteinkomplexzusammenlagerung und -entwischung, involviert zu sein [240].

Abgesehen davon nehmen sie teil an der Proteindegradation und -entfaltung, DNA Replikation, Thermotoleranz, Membranfusion und Bewegung von mikrotubulären Motoren [259].

Einige ATPasen wirken demnach auch unabhängig von ihren zugehörigen Proteasen, um Substratproteine umzumodelieren oder Proteinkomplexe aufzulösen. Sie könnten in diesem Zusammenhang einen wichtigen Part in der Unfolded Protein Response bzw. Heat Shock Response spielen. Man hat bereits entdeckt, dass eine spezielle AAA ATPase, Proteineaggregate in Zusammenspiel mit dem HSP70 Chaperonsystem auflöst [260]. Wie genau und warum die AAA+ Proteine mit dem HSP70 Chaperon System kollaborieren muss aber noch eruiert werden [261].

5.3.3.8 AAA+ Proteine und Krankheitswert

Unter den ersten AAA+ Proteinen, das identifiziert und eindeutig mit Erkrankungen in Zusammenhang gebracht werden konnte, ist das PEX1, auch PAS1 genannt. Dieses Protein ist zu über 70% bei der peroxisomalen Erkrankung vom Zellweger Typ mutiert [262].

Die 26S Subunits rücken immer mehr in den Fokus des Fachinteresses, da experimentell nachgewiesen werden konnte, dass eine aberante Expression und Dysfunktion von Proteasomuntereinheiten in die maligne Transformation von Zellen und deren Resistenzentwicklung gegenüber verschiedensten zytotoxischen Agenzien involviert ist.

Eine 26S Subunit 11 Überexpression führt beispielsweise in Säugerzellen zur Entwicklung von Resistenzen gegen zytotoxische Medikamente und beeinflusst die Zellproliferation. Beides trägt dazu bei, dass die Tumorzelle dann Chemotherapie-resistent ist, sodass Subunit 11 nach Spataro et al. als ein Marker für Multi-drug-resistente Zellen fungieren könnte [253]. Ein anderer Subunit der 19S Einheit, genannt Gankyrin, ist ein Onkoprotein und wirkt an der Erkennung von ubiquitiniertem p53 mit. Es wirkt anti-apoptotisch und ist in vielen Tumoren überexprimiert, beispielsweise dem HCC [146].

AAA+ Mutationen werden auch mit Erkrankungen wie der Myositis, frontotemporaler Demenz und Morbus Paget in Zusammenhang gebracht [263].

Abgesehen von bestimmten AAA+ Mutationen bestehen auch eindeutige Zusammenhänge zwischen dem Expressionslevel von AAA+ Proteinen und Krankheiten. Zum Beispiel korreliert ein erhöhter Level des AAA+ Proteins p97/VCP mit einer schlechten Prognose bei Krebs [140] und es besteht ein Zusammenhang zwischen erniedrigtem Level des AAA+ Proteins NSF und Schizophrenie bzw. Epilepsie Entstehung [264, 265].

5.3.4 Spot 34: Proteasom activator Komplex Subunit 1

Spot 34 wurde mittels Massenspektrometrie mit einem Score von 88 als Proteasom activator Komplex Subunit 1 identifiziert. Dieser zeigte sich in vier von fünf Geelpaaren, sowie dem Zelllinienvergleich als erhöht.

Wie bereits erwähnt, besteht das 26S Proteasom der Eukaryoten aus einem 20S Kernpartikel, welcher die proteaseaktiven Seiten enthält um die proteolytischen Reaktionen auszuführen. Vervollständigt wird das 26S Proteasom dann entweder durch zwei 19S Partikel oder dem 11S Partikel, welcher das Proteasom zu einem Immunoproteasom macht.

Diese heptamere Struktur die keine ATPase Aktivität zeigt und keine Degradation kompletter Proteine, sondern die Degradation kurzer Peptide initiiert, ist bekannt als Proteasom activator Komplex Subunit 1, 11S, REG oder auch PA28.

Der Mechanismus mit dem 11S mit seinem C-terminalen Schwanz an den 20S Kern bindet und die α Ring Konformationsänderung initiiert um das 20S-Tor für Peptide zu öffnen, ist wahrscheinlich dem Mechanismus der 19S Einheit sehr ähnlich.

Die Expression des 11S Partikels wird durch Interferon γ induziert und ist gemeinsam mit den Immunoproteasom β Untereinheiten für die Generierung von Peptiden verantwortlich, die an den Major-Histocompatibilitäts-Faktor I (MHC I) binden.

Die Wichtigkeit der Erforschung des Proteasoms in Karzinogenese, Progression und Metastasierung liegt darin begründet, dass das Proteasom wie bereits erwähnt, in äußerst wichtige Prozesse der Zelle eingreift, wie Zellzyklus und Apoptose, aber auch Stressantwort mit HSP's und der Immunantwort.

Abgesehen davon spielt das Proteasom als sogenanntes Immunoproteasom auch eine wichtige Rolle innerhalb des adaptiven Immunsystems. Peptidantigene werden durch den MHC I an der Oberfläche von Antigen-präsentierenden Zellen präsentiert. Diese Peptide sind das Produkt der Degradation des Immunoproteasoms von Proteinen, die durch das invasierende

Pathogen generiert werden. Dieser spezialisierte Komplex produziert Peptide der optimalen Größe und Komposition um an MHC I zu binden. Solche Proteasome, die während der Immunantwort vermehrt exprimiert werden, enthalten das 11S regulatorische Peptid. Dessen biologische Hauptrolle ist die Regulation der Produktion von MHC I Liganden, sowie die Regulation der Produktion spezialisierter β Untereinheiten, genannt $\beta 1i$, $\beta 2i$ und $\beta 5i$, mit unterschiedlicher Substratspezifität.

11S ist ein 180.000 Dalton Protein, das die Hydrolyse kleiner, nicht polyubiquitinerter Peptide durch das 20S Proteasom initiiert. 11S besteht aus zwei homologen Untereinheiten, α und β [282-284], die in alternierenden Positionen innerhalb eines ringförmigen Oligomers arrangiert sind. Song et al. zeigen, dass das C-terminale Ende der α Untereinheit für 11S nötig ist um an den 20S Kern zu binden und um es dann zu aktivieren [242, 285-287]. Im Gegensatz zur 19S Regulatoreinheit, benötigt 11S jedoch kein ATP, um an den 20S Kern zu binden und ihn zu aktivieren [283]. Song et al. [288] gehen auch davon aus, dass die β Untereinheit wiederum die 11S Aktivität moduliert, indem es womöglich die 11S Affinität für den 20S Kern beeinflusst.

Der Proteasom Aktivator 11S, ist ein Proteinkomplex, der aus zwei verschiedenen Polypeptiden genannt 11S α und 11S β , besteht. 11S zeigt selbst keine hydrolytische Aktivität sondern aktiviert die vielen Peptidaseaktivitäten des Proteasoms indem es an die terminalen Ringe dieser Proteinase bindet [289].

11S, Malignome und 11S Aktivatoren

Die kritische Rolle des 11S Regulatorproteins innerhalb der Zelle und Erkenntnisse über das 11S in einigen neueren Studien, legen den Verdacht nahe, dass speziell auch das 11S Regulatorprotein eine maßgebliche Rolle bei der Kanzerogenese bzw. Progression trägt. Welche Rolle genau das ist und inwiefern diese zum Angriffspunkt neuer Therapieansätze geeignet sein könnte, sollte Gegenstand weiterer Studien sein.

Das speziell 11S bei der Karzinogenese beteiligt ist, zeigt auch der Bericht von Zhang et al. [292]. Er weist nach, dass 11S in HBV infiziertem G1 HCC herunterreguliert ist.

11S ist auch in einer Reihe wichtiger Vorgänge der adaptiven Immunantwort involviert.

Die Präsentation von HLA Klasse I erfordert die koordinierte Expression verschiedener Komponenten, die in das Antigenprocessing und die Präsentation involviert sind. Ein Mechanismus von malignen Zellen der Immunantwort zu entgehen könnte sein, dass sie die Expression solcher Komponenten verändern, um die HLA I Expression herunterzuschrauben. Diese These beruht auf der Beobachtung von Miyagi et al. [293], dass einige menschliche

Kolonkarzinom Zelllinien wenig oder gar kein MHC I exprimieren wie die Linie DLD-1. Diese Linie, die absolut kein MHC I exprimiert, war es auch, die überhaupt kein 11S exprimiert, auch nicht einen der Untereinheiten α oder β , während die anderen Zelllinien, die HLA I exprimierten, auch 11S aufwiesen.

Eine intensive Interferon γ Behandlung dieser DLD-1 Linie führte zwar zur Produktion von 11S β , aber nicht zu einer HLA I Expression. Forcierte 11S α Expressierung allerdings induzierte die HLA I Expression in IFN γ behandelten DLD-1 Zellen, aber nicht in unbehandelten Zellen. Daraus schließen Miyagi et al., dass die ungleiche Expression von Proteasom Untereinheiten in den Verlust der HLA I Expression menschlicher Kolonkarzinomzellen mündet.

Dies könnte heißen, ohne 11S kein HLA I. Ohne HLA I, keine Erkennung der Tumorzellen durch das Immunsystem. Dies wiederum könnte ein sehr interessanter Ansatzpunkt neuer Anti-Krebs-Strategien sein.

Dass Proteasominhibitoren äußerst wirksam bei der Behandlung verschiedenster Krebsarten zu sein scheinen, ist bereits mehrfach belegt. Mit 11S Aktivatoren jedoch, bestünde vermutlich die Chance auf noch spezifischere Ansätze gegen entartete Zellen.

Da die heute verwendeten Proteasominhibitoren auch das vermeintlich „gute“ Immunoproteasom angreifen, das dafür sorgt, dass entartete Zellen von der körpereigenen Abwehr erkannt und vernichtet werden, wäre zumindest eine Kombination aus Proteasominhibitoren und 11S Aktivatoren vorstellbar, welche zu einer verstärkten Immunoproteasom Aktivierung und somit verbesserten Erkennung maligner Zellen durch das adaptive Immunsystem führen könnte.

5.3.5 Spot 8: Vinculin

5.3.5.1 CML und Integrin- β 1

Mit Spot Nr. 8 wurde das Vinculin mit einem Score von 150 identifiziert, welches in fünf von fünf Gelvergleichspaaren, jedoch nicht im Zelllinienvergleich, erniedrigt war.

Klinisch zeichnet sich die CML bekanntlich durch eine Expansion von myeloiden Progenitorzellen, erhöhten Leveln an zunächst reifen Granulozyten und Freigabe unreifer Progenitor/Precursorzellen aus dem KM aus. Die Bcr-Abl transformierten Zellen zeigen im Gegensatz zu normalen Zellen eine andauernde Motilität. Eine Interferon α Behandlung kann diese abnormale Motilität rückgängig machen [294-296].

CML Zellen zeigen zwar eine reduzierte Adhäsion an einige Extrazellulärmatrirkomponenten [297], aber der Mechanismus dieses Phänomens ist bisher noch ungeklärt.

Vermutet wird, dass diese abnormale Zirkulation maligner hämatopoetischer Progenitorzellen zurückzuführen sein könnte auf das Nichtansprechen der CML Progenitorzellen auf die durch Adhäsion an Integrin- $\beta 1$ vermittelte Inhibition der Progenitorproliferation durch die Knochenmarkmikroumgebung.

Adhäsionsrezeptor-vermittelte Interaktionen mit der extrazellulär Matrix spielen eine wichtige Rolle in der Regulation der Zellproliferation, -differenzierung und dem Zellüberleben [298]. Neoplastische Transformierungen gehen oft einher mit einer veränderten Zell-Matrix Interaktion und Störung der normalen Mikroumgebungsregulierung von Zellwachstum und -funktion.

Retention und Homing der Progenitorzellen im Knochenmark hängen in weiten Teilen von der Funktion der $\beta 1$ Integrin Familienmitglieder ab, die den Adhäsionsrezeptoren angehören. Signalübertragung via dem $\beta 1$ Integrin Rezeptor spielt abgesehen davon auch eine wichtige Rolle in der Proliferationsregulation, Differenzierung und dem Überleben der verschiedensten Zelltypen.

Experimente haben gezeigt, dass Signale, die von der Mikroumgebung über den $\beta 1$ Integrin-Rezeptor geleitet werden, eine wichtige Rolle in der von der Mikroumwelt gesteuerten Regulation der normalen hämatopoetischen Progenitorproliferation spielen. Passend dazu wurde gezeigt, dass CML Progenitorzellen nicht auf die $\beta 1$ Integrin vermittelte Inhibierung der Proliferation ansprechen.

Im Gegensatz zu normalen hämatopoetischen Progenitorzellen zeigen die CML Progenitorzellen eine herabgesetzte Adhäsion an ihre Mikroumwelt. Sie haben zwar normale Level an $\beta 1$ -Integrin, welches aber viel schlechter an Fibronectin [299] bindet, dies wiederum führt zu der Vermutung, dass die $\beta 1$ -Integrin-Rezeptoren der CML Progenitoren eine abnormale Funktion aufweisen [299].

Deshalb ist der Defekt der Integrinfunktion in CML Zellen vermutlich nicht nur verantwortlich für deren abnormale Zirkulation, sondern auch für die kontinuierliche Proliferation der CML Progenitorzellen, was zu deren selektiver Expansion und ihrem Wachstumsvorteil gegenüber normalen Zellen führt.

Wie kommt es aber zu dieser „gestörten“ Integrinfunktion?

5.3.5.2 Bcr-Abl, $\beta 1$ Integrine und cytoskelettale Proteine

Es wird vermutet, dass p210 Bcr-Abl mit einigen cytoskelettalen Proteinen interagiert, die in die inside-out und outside-in Signalvermittlung durch $\beta 1$ Integrine involviert sind, wie F-Aktin, FAK, Crkl und Paxillin [300-303].

Dies führt zu der Annahme, dass die Interaktion von p210 Bcr-Abl mit den für die $\beta 1$ -Integrin Signalvermittlung wichtigen cytoskelettalen Elementen, wie Paxillin und Vincullin, erst für die abnormale Integrinfunktion und gestörte Proliferationsregulierung durch die Mikroumwelt bei CML verantwortlich ist.

P210 Bcr-Abl könnte also eine abnormale Integrinfunktion verursachen, indem es cytoskelettale Proteine oder cytoskelettal-assoziierte Signalproteine die für die normale Integrinfunktion von Nöten sind, abnorm phosphoryliert.

Es gibt einige Beobachtungen, die vermuten lassen, dass Bcr-Abl die cytoskelettale Funktion über Beeinflussung solcher Proteine verändert [294, 301].

Erstens ist das Bcr-Abl Protein im Cytoskelett lokalisiert, wo es an Aktin über eine Aktin-Bindungsdomäne im C-Terminus [294] bindet und viele weitere Substrate der Bcr-Abl Thyrosinkinase sind cytoskelettale Proteine [294, 301]. Diese cytoplasmatische Lokalisation des Bcr-Abl Proteins scheint wichtig für die Transformationsfähigkeit von Bcr-Abl zu sein, da Bcr-Abl Mutanten die andernorts lokalisiert sind, eine reduzierte Transformationsaktivität aufweisen, vielleicht weil durch die cytoplasmatische Lokalisation der Zugang zu kritischen Substraten erlaubt wird [301, 304, 305].

Des Weiteren haben CML Zellen eine herabgesetzte Fähigkeit an Stromaschichten zu binden bzw. an Fibronectin. [299, 304]. Andererseits zeigen CML Zellen eine erhöhte Adhäsion an Laminin und Kollagen Typ 4 [299]. Diese Beobachtungen sind von großer Bedeutung, da eine veränderte Adhäsion an extrazelluläre Matrix Proteine zu einer verfrühten, unreifen Freigabe von CML Zellen aus dem Knochenmark führen könnte.

Weitere Studien haben ergeben, dass Bcr-Abl einige Signaltransduktionswege, die in normalen Zellen sonst durch Adhäsion, Bindung extrazellulärer Matrixproteine oder Integrinquerverknüpfung aktiviert werden, unabhängig aktiviert [306].

Es kann also gesagt werden, dass Bcr-Abl großflächig die Funktion der Zellmaschinerie stört, welche mit der Mikroumwelt interagiert. Das Ergebnis könnte eine CML-Zelle mit gestörter Motilität sein, die falsche "Signale" erhält, welche ihr eingeben, dass bestimmte Adhäsionsrezeptoren (wie die Integrine) stimuliert wurden, obwohl keine tatsächliche aktuelle Ligandenbindung vorliegt.

5.3.5.3 Fokale Adhäsionen [307]

Fokale Adhäsionen sind spezialisierte Strukturen des Cytoskeletts und der Plasmamembran die Kontaktareale zwischen der Zelle und den Proteinen der extrazellulären Matrix (ECM), wie Fibronectin, schaffen. Tatsächlich dienen sie nicht nur der Verankerung der Zelle, sondern fungieren darüber hinaus auch als Signalüberträger.

Der Kontakt zu Proteinen der ECM wird hauptsächlich über die transmembranären Integrine vermittelt, die mit ihrer extrazellulären Domäne an Proteine binden (z.B. Fibronectin, Laminin oder Kollagen). Sie stellen also die Transmembranverbindung zwischen Cytoskelett und extrazellulärer Matrix dar. Sie fungieren dabei als Rezeptoren für extrazelluläre Matrixproteine, wobei ihre intrazelluläre Domäne über Adapterproteine (z.B.: Talin, alpha-Aktinin und Vinculin) an Aktinfilamente gekoppelt ist. Neben strukturgebenden Proteinen finden sich in fokalen Adhäsionen viele signalübertragende Proteine wie die Tyrosinkinase c-Src oder FAK (focal adhesion kinase). Adhäsive Ereignisse zwischen den hämatopoetischen Zellen und der extrazellulären Matrix scheinen sehr wichtig für die Wanderungs- und Homingeigenschaften der hämatopoetischen Zellen zu sein [299].

Fokale Adhäsionen besitzen eine sehr hohe Konzentration an Proteinen die an ihren Thyrosinresten phosphoryliert werden und die Tyrosinkinase die einzigartig für diese Struktur ist, p126FAK, wurde bereits in mehreren Studien beschrieben. Eine Phosphorylierung dieser Proteine innerhalb der fokalen Adhäsionen ist eng assoziiert mit einer Strukturveränderung des Aktin-Cytoskeletts [307].

Man geht davon aus, dass die Thyrosinphosphorylierung als Regulator der fokalen Adhäsionsfunktion dient [308]. Die fokale Adhäsion scheint also eine Struktur zu sein, die Signale von beiden Seiten der Zellmembran in einer komplexen Art und Weise erhält, eventuell moduliert und weiterleitet.

Die Phosphorylierung des Paxillins, einem fokalen Adhäsionsprotein, scheint dabei eine Konsequenz der Signaltransduktion von (Integrin) Membranrezeptoren zu sein.

5.3.5.4 Paxillin und CML

Bekannt ist, dass in Bcr-Abl transformierten Zellen die fokalen Adhäsionsproteine Paxillin, Vinculin, p125FAK (focale adhesion Kinase), Talin und Tensin konstitutiv thyrosinphosphoryliert und somit konstitutiv aktiviert sind.

Außerdem wurde in myeloiden Zelllinien p210 Bcr-Abl konzentriert in punktuellen Strukturen, angrenzend an die Zellmembran gefunden, die daneben auch Vinculin und Paxillin enthielten [294].

Paxillin und FAK [300, 303] sind also Substrate des p210 Bcr-Abl. Paxillin seinerseits enthält Bindungsseiten für die SH³ Domäne von Src und die SH² Domäne von Crk, beides Onkogene mit denen es direkt interagieren kann [309, 310]. Ebenso koprezipitiert es mit zwei weiteren fokalen Adhäsionsproteinen, dem Vinculin an dessen Carboxyl-Terminus es bindet [311] und der fokalen Adhäsions-Kinase p125FAK [311]. Es wird angenommen, dass p125FAK durch diese Assoziation mit Paxillin zu fokalen Adhäsionen geleitet wird.

Da Paxillin auch mit p210 Bcr-Abl in myeloiden Zelllinien koprezipitiert, liegt die Vermutung nahe, dass hier multimere Komplexe gebildet werden. Und in der Tat zeigt eine Studie, dass in Bcr-Abl transformierten Zellen das Paxillin sowohl mit p210 Bcr-Abl selbst, als auch mit Vinculin und FAK interagiert [303].

Eine Reihe von Beobachtungen lassen deshalb vermuten, dass das Paxillin in die Signaltransduktion zwischen Rezeptoren und fokalen Adhäsionen involviert ist, gerade weil das Paxillin als Antwort auf Integrin vermittelte Zelladhäsion Thyrosin phosphoryliert wird [307]. Die dafür verantwortliche Thyrosinkinase ist bisher unbekannt, in vitro allerdings lässt sich Paxillin von p125 FAK phosphorylieren [312], was vor allem deshalb interessant ist, da in CML Zellen FAK, p210 Bcr-Abl und Paxillin koprezipitieren.

Die Thyrosinphosphorylierung des Paxillins wird begleitet von cytoskelettaler Reorganisation [308]. Deshalb ist es möglich, dass diese Phosphorylierung einen Regulationsmechanismus der Paxillin Interaktion mit Signalmolekülen und anderen cytoskelettalen Proteinen darstellt. Die Formation solcher Signalkomplexe und die begleitende strukturelle Reorganisation des Cytoskelettes trägt möglicherweise zur Regulation normaler Zellfunktionen wie Zelladhäsion, Genexpression und Wachstum bei.

Es wurde herausgefunden, dass die Serin und Thyrosin Phosphorylierung von Paxillin in Bcr-Abl transformierten myeloiden Zelllinien erheblich und konstitutiv erhöht ist. Dies ist für sich schon bemerkenswert, da nur wenige potentielle Substrate der p210 Bcr-Abl Thyrosinkinase bisher identifiziert wurden [313].

Abgesehen davon lässt die Struktur des Paxillin mit seinen vielen komplexen Bindungsdomänen vermuten, dass dieses Protein ein einzigartiges cytoskelettales Protein darstellt, welches fähig zur Interaktion mit einer Vielzahl intrazellulärer Signal und Struktur Proteine ist, die wichtig für die Wachstumskontrolle und die cytoskelettale

Organisationsregulation sind und somit stark im Verdacht eines Signaltransduktionsregulators steht.

Die aberante Phosphorylierung des Paxillins und anderer fokaler Adhäsionsproteine, verursacht durch p210 Bcr-Abl, könnte also zu der bekannten Veränderung der Adhäsionseigenschaften von CML Zellen beitragen.

Die Interaktion von Paxillin mit den verschiedensten Proteinen via Phosphorylierung und Dephosphorylierung könnte kritisch für die korrekte Zusammenlagerung cytoskelettal-assoziiierter Signalkomplexe nahe der Plasmamembran sein. Werden diese Interaktionen z.B. durch SH² enthaltende Onkoproteine wie src oder crk bzw. durch Interaktion mit p210 Bcr-Abl gestört, könnte dies die Ursache für die unterbrochene cytoskelettale Organisation in transformierten Zellen sein und der Grund für das Scheitern der korrekten Prozessierung extrazellulärer Signale, die für normales Zellwachstum wichtig sind [314].

5.3.5.5 Vinculin und CML

Cytoskelettale Proteine sind involviert in Zellfunktionen die Zellbewegung erfordern und spielen auch eine Rolle in der Modulierung der Signaltransduktion während zellulärer Proliferation und Differenzierung.

Wie bereits erläutert, scheint das Vinculin durch seine Assoziation mit Paxillin in CML transformierten Zellen, indirekt in die pathogenetischen Abläufe rund um p210 Bcr-Abl involviert zu sein. Inwiefern es in die durch p210 Bcr-Abl gestörte Integrin/Paxillin Signalvermittlung miteinbezogen ist, erfordert weitere Klärung.

Die Studie von Leung et al. zeigt allerdings, dass ein Zusammenhang zwischen Vinculin und Differenzierung myeloider Zellen besteht.

HL60 (AML) Zellen, die Retinoidsäure ausgesetzt wurden, welche die Differenzierung dieser Zellen induziert, enthielten daraufhin mehr Vinculin als ihre Kontrollen.

Daraus schließen die Forscher um Leung, dass dieses Vinculin zusammen mit anderen Aktinbindungsproteinen, wichtig für die Expression eines reifen Phänotypes ist [315].

In Zusammenhang mit unserem p210 Bcr-Abl-Integrin-Paxillin Konstrukt könnte das bedeuten, dass durch die abnormale Assoziation dieser Proteine mit dem Vinculin, nicht nur die Adhäsion der Zelle gestört ist (was zu ihrer verfrühten Freigabe aus dem Knochenmark führen kann), sondern auch durch die Beeinflussung des Vinculins eine reife Differenzierung der Zelle von Bcr-Abl unterdrückt wird.

In der Klinik könnte das bedeuten, dass ein niedriger Vinculin Spiegel auf eine geringe Anzahl an reifen myeloiden Zellen schließen lässt und womöglich ein Prognosefaktor darstellen könnte. So könnten niedrige Serum Vinculinspiegel schon im Frühstadium den Verdacht auf eine leukämische Erkrankung lenken.

Dass sich das Vinculin in unseren Zelllinienproben entgegengesetzt verhält, bestätigt auch die Vermutungen anderer Forschungsgruppen, dass sich viele Eigenschaften von CML Zelllinienzellen und CML Patientenproben unterscheiden [316].

5.3.6 Spot 14 a und b: Annexin 1 bzw. 2

Spot 14 wurde in der Massenspektrometrie mit einem Score von 240 als Mischung aus Annexin 1 und 2 identifiziert. Spot 14 zeigt sich in vier von fünf CML/gesund Gelvergleichspaaren, sowie im Zelllinienvergleich, als erniedrigt.

Der Name Annexin stammt vom griechischen Wort ANNEX ab, welches "zusammenbringen, zusammenhalten" bedeutet. Der Name lässt sich zurückführen auf die Fähigkeit fast aller Annexine an bestimmte biologische Strukturen zu binden bzw. diese zusammen zu halten, insbesondere Membranen.

Die Annexine erhielten im Laufe ihrer Entdeckung die unterschiedlichsten Namen die sich jeweils auf ihre jeweiligen biochemischen Fähigkeiten bezogen. Unter diesen, Synexin, Chromobindins ("Proteine, welche an Chromafin binden"), Calcimedins ("Proteine welche Ca²⁺ Signale leiten"), Lipocortins ("Steroid induzierbare Lipase Inhibitoren") und Calpactins ("Proteine die Ca²⁺, Phospholipide und Actin binden").

Annexine nehmen an der Membranorganisation, dem Membranverkehr und der Regulation des Ca²⁺-Ionenflusses über Membranen hinweg teil, sowie an der Regulation der Ca²⁺ Konzentration innerhalb der Zelle. Obwohl Annexine keine Signalsequenz zur Sekretion aufweisen, wurden einige Mitglieder der Annexinfamilie auch extrazellulär gefunden, wo sie sowohl als Rezeptoren für Serumproteasen am Endothel fungieren können, als auch als Inhibitoren der Neutrophilen Diapedese und Blutgerinnung.

Annexine regulieren die Ca²⁺ Homöostase der Zelle und nehmen so eine Schlüsselrolle der Zellkontrolle ein, auch wenn ihre präzise Position innerhalb der Ca²⁺ Signalkette zu klären bleibt. Ca²⁺ ist ein äußerst wichtiges Ion. Es dient einer Reihe von Prozessen als second messenger, um extrazelluläre Signale an zelluläre Antworten zu koppeln. Da membranassoziierte Annexine sowohl als Ionenkanal, als auch als Ionenkanal-Regulator fungieren können und somit sowohl Effektoren als auch Regulatoren des Ionenflusses sind,

stellen sie eine Schlüsselrolle der zellulären Ca^{2+} -Homöostase da [317]. Neuere Knock-out Modelle und die Entwicklung von dominant-negativen Mutant-Proteinen konnten zeigen, dass gewisse Dysregulationen der Annexin-Expression und -Aktivität mit Krankheiten korrelieren z.B. der akuten promyelozytischen Leukämie und dem Antiphospholipid-Antikörpersyndrom. Dies führte zur Einführung des Begriffes der Annexinopathien.

Allgemein kann gesagt werden, dass die verschiedenen Annexine verschiedene subzelluläre Distributionen aufweisen und oft sowohl in einem cytosolischen als auch in einem Membran-assoziierten Pool vorliegen, wobei ein Switch der Lokalisation durch Ca^{2+} reguliert wird [317].

Ein weiterer interessanter Punkt ist das seit Jahren erforschte Konzept der Rafts (Membranmikrodomänen), das an dieser Stelle kurz angeschnitten werden soll.

Rafts sollen in den Membrantransport involviert sein, aber auch eine Plattform der Signalkommunikation darstellen. Der typische lipide Aufbau der Rafts ist vor allem auf der exoplasmatischen Seite beschrieben worden. Weniger ist über das innere Blatt bekannt und hier liegt der Zusammenhang mit den Annexinen. Einige Mitglieder der Annexinfamilie wurden in Raftpräparationen identifiziert. Einige Forschungsergebnisse lassen vermuten, dass Annexin 2 direkt an der Organisation und der Dynamik der Membranrafts involviert ist. Diese Untersuchungen kommen auch zu dem Schluss, dass das Annexin 2 ein cytoplasmatisches Protein darstellt, welches mit dem cytoplasmatischen Blatt der Membranrafts assoziiert ist und so diese Domänen stabilisiert und gleichzeitig einen Link zum Aktinskelett und somit dem intrazellulären Signaling herstellt.

5.3.6.1 Annexin 1

Annexin 1 wurde ursprünglich als ein 37 kDa, glucocorticoid-induzierbares Protein identifiziert [318] und erwies sich als ein wichtiger endogener Entzündungsmodulator. Man geht davon aus, dass das Annexin 1 ein Mediator der anti-inflammatorischen Eigenschaften der Glucocorticoide ist [319]. Es inhibiert die Phospholipase A2 Aktivität ebenso wie die Prostaglandinherstellung und Generation aktivierter Makrophagen [320].

Annexin 1 wurde erstmals 1986 synthetisch hergestellt [321]. Daraufhin konnte gezeigt werden, dass es die akute inflammatorische Antwort inhibiert [322]. Zur Annexin Erforschung hilfreich war auch die Entwicklung von Annexin 1 knock-out Mäusen [323]. Mit ihnen konnte demonstriert werden, dass Annexin 1 von den verschiedensten Zelltypen exprimiert wird. Darunter Makrophagen und Monozyten, deren Akkumulation in einer

induzierten Peritonitis durch Annexin 1 Überexpression, gehemmt wird [324]. Dies geschieht, indem Annexin 1 die Adhäsion von Monozyten an das vasculäre Endothel [325] und so eine trans-endotheliale Migration, inhibiert.

Eine Überexpression an Annexin 1 resultierte auch in einer Inhibition der zellulären Proliferation [326]. Dieser Effekt scheint auf die Zerstörung des Cytoskeletts zurückzuführen zu sein.

Desweiteren zeigt Annexin 1 auch einen anti-proliferativen Effekt auf T-Zell Linien und PBSC`s [327].

Kamal et al. konnte zudem eine Annexinexpression und Annexinaktivität in folgenden Entzündungszellen nachweisen: Neutrophilen, Lymphozyten, Monozyten/Makrophagen, Fibroblasten und epithelialen Zellen [328]. Annexin 1 wird schon lange als zellulärer Mediator der anti-inflammatorischen Antwort von Glukokortikoiden angesehen, da seine Expression und Sekretion in verschiedenen Zelltypen durch Glucocorticoide induzierbar ist [329, 330].

Anfangs wurde dieser Effekt hauptsächlich auf die Annexin 1-Fähigkeit zurückgeführt, PLA2 zu inhibieren und dadurch auch die Produktion von Eicosanoiden. Seit kurzem wird aber mehr und mehr klar, dass seine anti-inflammatorische Aktivität am wahrscheinlichsten durch die Störung des Granulozytenrecruitments, ihrer Migration, Diapedese und/oder Aktivierung an Stelle der Entzündung, zurückzuführen ist [331, 332].

Daraus ergeben sich zwei Fragen. Erstens, wie kommt es genau zu diesem Effekt und zweitens, kann endogenes Annexin 1 als ein Modulator der Leukozytenextravasation fungieren um so die Entzündungsantwort einzugrenzen und eine chronische Entzündung zu verhindern.

Abgesehen von der Beeinflussung des Arachidonsäuremetabolismus beeinflusst Annexin 1 viele weitere Komponenten der inflammatorischen Antwort. Zum Beispiel verhindert Annexin 1 die Expression und/oder Aktivität anderer inflammatorischer Enzyme wie der nitric oxide Synthase in Makrophagen oder Cyclooxygenase 2 in der aktivierten Mikroglia. Abgesehen davon führt Annexin 1 zur Apoptose von Entzündungszellen durch eine kurzzeitige Erhöhung des intrazellulären Calciums sowie der Caspase 3 Aktivität [333]. Nicht zuletzt wurde Annexin 1 kürzlich als so genanntes "ess-mich" Signal auf apoptotischen Zellen identifiziert, welches von Phagozyten erkannt und phagozytiert wird. Auf Grund dieser Tatsachen geht man davon aus, dass das Annexin 1 zum anti-inflammatorischen Signaling beiträgt, welches zudem eine sichere post-apoptische Clearance toter Zellen ermöglicht [334].

5.3.6.2 Annexin 2

Die in 4.3.2 besprochene Fibrinolyse wird unter anderem durch verschiedene Rezeptoren reguliert, welche die proteolytische Aktivität auf die Zelloberfläche leiten. Einer dieser Rezeptoren ist das Annexin 2. Es dient als profibrinolytischer Corezeptor sowohl für Plasminogen als auch für tPA auf der Oberfläche von Endothelzellen und ermöglicht so die Generation von Plasmin [263]. Indem es beide Moleküle bindet und so in nahe Nachbarschaft bringt, unterstützt es die Bildung von aktivem Plasmin und dient so der Überwachung der fibrinolytischen Kaskade. Zudem sind tPA und Plasminogen vor Abbau geschützt solange sie an Annexin 2 gebunden sind.

Annexin 2, das Substrat der Protein-Tyrosin Kinase, ist ein Genprodukt, dessen Expression bei einigen Krebsarten erhöht ist. Es wird diskutiert, dass es in multiple physiologische Schritte wie DNA-Synthese und Zellproliferation, involviert ist. Dies stützt sich auf die Beobachtung, dass eine Transfektion von Zellen mit Antisense-Annexin 2 Vektoren in einer Inhibition von Zellteilung und Proliferation mündet [335]. Zudem ist das Annexin 2 wichtig für die Organisation von Interfaces zwischen bestimmten Membranen oder Membrandomänen und dem Aktinskelett [336]. Außerdem verhindert es die Katecholaminsekretion in nicotinergen chromaffinen Zellen. Zudem scheint A2 an der Sekretion von von-Willebrand Faktor beteiligt zu sein, der seinerseits Ca^{2+} abhängig von statten geht [337].

Annexin 2 ist also beteiligt an einer Vielzahl physiologischer Vorgänge wie Zellproliferation, fötaler Immuntoleranz, Ionenkanalaktivierung, Zell-Zell Interaktionen und dem Bridging von Membranen. Annexin 2 ist aber nicht nur in viele physiologische Prozesse involviert, sondern auch in viele pathologische. So konnten Gilmore et al. zeigen, dass die Annexin 2 Expression stark zurückgeht wenn Zellen durch all-trans-retinoic Säure zur Ausdifferenzierung gebracht werden, und geht deshalb davon aus, dass Annexin 2 ein wichtiger Modulator der Zelldifferenzierung und ihrer Störungen ist [338]. Außerdem wurde Annexin 2 in einer Hypoxiestudie bzw. einem hyperoxidativem Stressmodell bei Nierenkrebs erhöht nachgewiesen [339].

5.3.6.3 Annexin 1, ein neues HSP?!

Wie in Kapitel 4.3.1 bereits besprochen reagieren Zellen auf Stress mit der Generation von bestimmten Proteinen, den Heat Shock Proteinen, die ihnen eine erhöhte Toleranz gegenüber Stress verschaffen. Obwohl die HSP's eine der gut-erforschten Exemplare unter den Proteinen sind, die durch Zellstress induziert werden, zeigte sich, dass z.B. thermaler Stress auch zur

Induktion einer nicht unerheblichen Zahl an Genen führt, die traditionell nicht zu den HSP's gerechnet werden. Die meisten dieser Proteine weisen Chaperonaktivität auf, die nicht nur für den Zellschutz, sondern auch zur Sicherstellung normaler zellulärer Funktion essentiell ist. Sonna et al. listen eine Vielzahl an Proteinen auf, deren Expression durch Hitze bzw. Kälte beeinflusst wird, darunter die traditionellen HSP's wie HSP 70, aber auch Proteine wie das β -Fibrinogen, welches durch Zellstress herunterreguliert wird, bzw. das Annexin 1, das sich als überexprimiert erweist.

Rhee et al. zeigten vor kurzem, dass das Annexin 1 Chaperonfähigkeiten besitzt und so womöglich ein HSP sein könnte [340]. Auch Kim et al. berichteten von einer Chaperon-ähnlichen Aktivität des Annexin 1 [340], da es in vitro die Citrat Synthase und Glutamat Dehydrogenase vor Hitzeinaktivierung schützt [340].

Zudem zeigen Rhee et al., dass Zellen der Linie A549 auf eine Hitze- und Chemikalienbehandlung mit einer Annexin 1 Erhöhung reagieren, wobei HeLa-Zellen (Uterus CA Zelllinie) mit einer Senkung des Annexin 1 Levels reagieren [341].

Viele der Fähigkeiten des Annexin 1 erinnern an HSP's. Zum Beispiel bewahrt das Annexin 1 das Gehirn vor ischämischen Schaden [342], spielt eine Rolle bei der Regulation des Zelltodes und kann Zellen vor oxidativem Stress schützen [343]. Außerdem führt Zellstress zu dessen Translokation vom Cytosol in den Nukleus [341].

Auch wenn die Signifikanz der nuklearen und perinukleären Redistribution des Annexins 1 unter Zellstress zu klären bleibt, könnte dies für die Protektion essentieller Kernkomponenten vor Stress eine Rolle spielen, zum Beispiel indem das Annexin die „Reparatur“ von durch Stress beeinflussten Proteinen reguliert.

Die Idee, dass Mitglieder der Annexinfamilie eine neue Klasse der Heat-Shock-Proteine darstellen könnten, wird auch in Forschungsmodellen mit Pflanzen verfolgt und nachgewiesen [343, 344].

All diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass das Annexin 1 die Kriterien für ein HSP erfüllt und womöglich eine völlig neue Art an HSP darstellen könnte, vor allem da es im Unterschied zu den bisherigen HSP's nur in Eukaryoten vorkommt [341].

Es ist bekannt, dass sich Krebszellen, die eine Überexpression an HSP's aufweisen, relativ resistent gegenüber cytotoxischen Therapien erweisen. Daher könnte eine therapeutische Intervention, die darauf abzielt diesen Coping Mechanismus der malignen Zellen mit Hilfe der Annexine zu blockieren, prinzipiell die Effektivität der Chemo- und Radiotherapie deutlich erhöhen [150].

Ein detailliertes Verständnis der Zellantwort auf Stress und die Beobachtung, dass die Adaption auf einen Stressor oft zu einer Kreuzresistenz gegenüber anderen Stressoren führt, könnte deshalb großen Einfluss auf die Entwicklung neuer Therapeutika haben [345].

5.3.6.4 Annexinopathien

Viele Annexine scheinen in Zusammenhang mit Malignität zu stehen. Zum Beispiel zeigt sich das Annexin 5 in Melanomen erhöht, bei Leukämien allerdings erniedrigt. Annexin 9 wurde erhöht bei Prostata sowie Kolon Karzinomen nachgewiesen und Annexin 1 bei Prostata CA. Korrelationen dieser Art lassen vermuten, dass Veränderungen in der Expression bestimmter Annexine das Zellverhalten bezüglich Motilität, Invasivität und Proliferationsrate beeinflussen könnte ohne allerdings den Transformationsprozess selbst zu initialisieren. Aus diesem Grund könnten sich die Annexine als nützliche Werkzeuge in der Behandlung maligner Erkrankungen herausstellen [317].

Annexin 1 und 2 wurden schon früh als Substrate der Thyrosinphosphorylierung durch den EGF Rezeptor identifiziert, ebenso als Substrate des transformierenden Genproduktes des Rous Sarcoma Viruses. Dies impliziert, dass diese Proteine in irgendeiner Weise in verschiedene Krebswege involviert sind [317].

Zu den Annexinopathien wird, neben dem Antiphospholipidsyndrom und der Präeklampsie, welche durch eine Annexin 5 Überexpression des plazentaren Trophoblasten verursacht wird [346], nun auch die akute Promyelozytische Leukämie (APL) gezählt. Diese ist oft assoziiert mit einer hämorrhagischen Störung unbekannter Ursache, mit einer stets nachweisbaren 15:17 Translokation [347]. Diese spricht auf eine Behandlung mit all-trans-retinoid Säure an. Menell et al. haben die Folgen der all-trans-retinoid-Säure Behandlung auf die Annexin 2 Expression dieser Patienten sowie die Plasminexpression auf der Zelloberfläche der APL-Zellen untersucht. Das Ergebnis zeigt, dass auf leukämischen Zellen der APL Patienten eine deutlich erhöhte Expression von Annexin 2 nachzuweisen ist. Sie schlussfolgerten, dass abnorm hohe Level an Annexin 2 auf APL Zellen die Produktion von Plasmin erhöht und deshalb eine Überexpression an Annexin 2 ein Grund für die hämorrhagischen Komplikationen der APL sein könnte [347].

Olwill et al. vermuten ihrerseits, dass eine Überexprimierung des Annexin 2 auf der Promyelozytenoberfläche zu einem erhöhten fibrinolytischen Potential dieser Zellen und somit den Blutungsstörungen führt [348]. Dieselbe Forschungsgruppe zeigt, dass APL-Zelllinien eine signifikant erniedrigte Annexin 2-Expression in Folge einer all-trans-retinoid-

Säure (ATRS) Behandlung zeigen, welche zu einer morphologischen und immunphenotypischen myeloiden Ausdifferenzierung führt [349].

Ein phosphoryliertes Annexin 2 mit erhöhter Expression konnte in Kernextrakten der Leukämie Zelllinien K562 und HeLa, nachgewiesen werden. Chiang et al. schließen aus ihren Beobachtungen, dass dieses phosphorylierte Annexin 2 für das Zellüberleben und die Proliferation dieser Krebszellen wichtig ist [350].

Einige fortgeschrittene Tumoren, darunter auch Brusttumoren, überexprimieren Plasmin, welches beschuldigt wird, die Angiogenese und Metastasierung der Tumoren zu begünstigen. Annexin 2, ein endothelialer Corezeptor des t-PA und Plasminogens, war nicht in normalem und benigne verändertem Brustdrüsengewebe nachzuweisen, wohl aber, deutlich erhöht, in invasiv verändertem Brustkrebsgewebe und DCIS. Sharmas et al. Ergebnisse lassen vermuten, dass die Annexin 2 abhängige Plasmingenerierung in Brustkrebszellen womöglich zur Angiogenese und Metastasierung beiträgt. Aufgrund dieser Vermutung könnte das Annexin 2 ein attraktives Ziel für neue anti-angiogenetische bzw. neue Krebstherapieansätze sein [351].

De Bont et al. fanden eine signifikant erhöhte Annexin 1 Expression in pädiatrischen primitiven neuroectodermalen Tumoren und Ependymomen und schlagen es als tumorspezifisches Protein für PNETs und Ependymome vor [352].

Die Forschungsgruppe um Frey geht davon aus, dass das Annexin 1 seine Wirkung hauptsächlich über die Kontrolle des intrazellulären Calciumrelease ausübt.

Nacktmäuse deren Tumoren mit Annexin 1-Antisense Plasmiden bestückt wurden, entwickelten erheblich kleinere und stark ausdifferenzierte Tumoren, im Gegensatz zu Mäusen deren Tumoren mit Annexin 1-Sense Plasmiden bestückt wurden. Bei diesen stieg das Tumolvolumen nach Annexin 1-Sense Injektion proportional zur Annexin 1 Expression.

Desweiteren führte eine Bestückung von Annexin 1-Sense Plasmiden in Zellen der MCF1 Zelllinie (wenig invasives Brust CA) zu verstärktem Tumorwachstum und aggressivem invasivem Wachstum [353].

In verschiedenen Studien wurde eine enorme Überexpression von Annexin 1 auch in Prostatakrebszelllinien [354], Speiseröhrenkrebs, Magenkrebszelllinien, Mamma Adeno CA und Leberzellkrebs [355-358] nachgewiesen.

In TNF resistenten myeloiden leukämischen Blasten wurden konstitutiv höhere Annexin 1 Level gefunden als in TNF sensitiven myeloiden leukämischen Zelllinien. Daraus wurde geschlossen, dass der konstitutiv erhöhte Level an Annexin 1 in leukämischen Blasten diese womöglich gegen eine Immunvermittelte Vernichtung schützt.

Wu et al. verglichen die Annexin 1-Expression in 12 verschiedenen AML-Blastengruppen die sich gegenüber TNF als resistent erwiesen. 11 von diesen 12 zeigten stark erhöhte Annexin 1 Werte. Diese Daten lassen einen Annexin 1 involvierten Resistenzmechanismus der leukämischen Blasten vermuten, der ihnen einen gewissen Schutz gegen die TNF vermittelte Vernichtung und womöglich vor immunvermittelter Zerstörung im Allgemeinen bietet [360, 361].

5.3.7 Spot 19 und 20: Peroxiredoxin II bzw. I

Mittels MALDI-TOF wurde Spot 19 mit einem Score von 94 als Peroxiredoxin II und Spot 20 mit einem Score von 92 als Peroxiredoxin I identifiziert. Spot 19 zeigt sich in allen CML/gesund Gelvergleichspaaren, sowie im Zelllinienvergleich als erhöht. Spot 20 zeigt sich ebenfalls erhöht und zwar in vier von fünf CML/gesund Gelvergleichspaaren, sowie im Zelllinienvergleich.

5.3.7.1 Peroxiredoxine

Im Hefeexperiment wurde ein 25 kDa Protein entdeckt, welches Enzymaktivierung durch ein Thiol/Eisen III/ O² gemischtes Oxidationssystem verhinderte.

Die für diese Oxidation wichtige aktive Seite ist der Cysteinrest am C-terminalen Ende dieses 25 kDa Proteins. Man wieß diese Peroxiredoxine (Prxs), wie man diese 25 kDa Proteine nannte, in so gut wie allen Zellen nach [362]. Peroxi- zeigt dabei die Natur der reduzierten Substrate an und -redoxin lehnt sich an Thioredoxin und Glutaredoxin an, welche ebenfalls redox-sensitive Cysteine enthalten, die einem Oxidations-Reduktions Zyklus unterworfen sind.

Hervorzuhaben ist, dass die Prxs in drei Mikroorganismen spezies-spezifische Antigene darstellten: *E. histolytica* [363], *H. pylori* [364] und *M. avium* [365]. Es wurde spekuliert, das die Prxs in diesem Zusammenhang vielleicht essentiell für diese Organismen sind, um sich vor Makrophagen und Neutrophilen generierten Oxidantien schützen zu können.

Obwohl die Prxs hauptsächlich im Cytosol zu finden sind, sind sie auch innerhalb von Mitochondrien, Chloroplasten und Peroxisomen anzutreffen, außerdem sind einige mit dem Nukleus oder Membranen assoziiert und auch ein Export der Prxs wurde nachgewiesen [368].

5.3.7.2 Bau und Funktionsweise der Peroxiredoxine

Alle Peroxiredoxine enthalten einen Cysteinrest, welcher während des zelleigenen Katabolismus zyklisch peroxid-abhängig oxidiert und thiol-abhängig reduziert wird.

Je nach Anzahl und Position des Cysteinrestes der an der Katalyse teilnimmt, unterteilen sich die Peroxiredoxine in insgesamt sechs Isoenzyme die in drei Gruppen unterteilt [362, 369, 370] werden: 2-Cys, atypische 2-Cys und 1-Cys, wobei Prxs I und II zu den 2-Cys Peroxiredoxinen zählen, welche obligate Homodimere mit zwei identischen aktiven Seiten sind [371-373]. Sie alle teilen sich den gleichen katalytischen Basismechanismus, indem ein redoxaktives Cystein durch das Substrat Peroxid zu einer Sulfylsäure oxidiert wird. Die Art des Recyclings dieser Säure zurück zu einem Thiol unterscheidet die drei Klassen.

5.3.7.3 Aufgaben der Peroxiredoxine

Prxs schützen die Zelle, indem sie Peroxide, welche durch den normalen Zellmetabolismus entstehen, entfernen.

Peroxiredoxine [362, 366] sind also antioxidative Enzyme, die den Peroxidlevel der Zelle kontrollieren, wodurch sie wiederum in die Signalweiterleitung innerhalb der Zelle bezüglich Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose eingreifen. [367, 368].

Peroxide wie H_2O_2 und Peroxynitrit sind Resultate normaler zellulärer Prozesse die O^2 beinhalten. Aber das Vorhandensein von selbst kleinsten Mengen dieser Peroxide stellt ein Risiko für die Zelle dar, da diese zu toxischen Radikalen werden können und als diese erheblichen Schaden innerhalb der Zelle verursachen. Aus diesem Grund sind Zellen mit peroxideliminierenden Enzymen wie der Katalase, der Glutathionperoxidase (GPx) und den Prxs ausgestattet. Abgesehen von den ständig durch Zellprozesse entstehenden Peroxiden, produzieren die Zellen außerdem H_2O_2 als Antwort auf die Aktivierung verschiedener Zelloberflächenrezeptoren. So produziertes H_2O_2 wurde als ein wichtiger intrazellulärer Messenger identifiziert, der die Funktionen vieler Proteine wie der Protein-Tyrosin Phosphatase [341, 376, 377], durch Oxidierung kritischer Cysteinreste, modifiziert.

Die Entfernung von H_2O_2 aus der Zelle erfolgt fast ausschließlich durch die Katalase, die GPx und die Prxs. Katalase befindet sich exklusiv in den Peroxisomen, weshalb eine Eliminierung von cytosolischem H_2O_2 eine Diffusion in diese Organellen erforderlich machen würde. Die meist verbreitete Isoform der GPx, GPxI, befindet sich vor allem im Cytosol aber auch in den Mitochondrien. Prx I und II, auch wenn ihre katalytische Effektivität nicht an die der GPx oder Katalasen reicht, befinden sich in großer Zahl und ausschließlich im Cytosol und zeigen

eine höhere Affinität zu H_2O_2 als GPx [378]. Aus diesen Gründen sind Prx I und II die Hauptverantwortlichen für die Regulation des oberflächenrezeptor-vermittelten H_2O_2 Signalings. Dies wird dadurch untermauert, dass eine Überexpression oder ein partielles Entfernen der Prxs durch inverse RNA, den intrazellulären Level an H_2O_2 in Studien beeinflusste. Dies geschah in Zellen, die durch platelet-derived-growth Faktor und TNF-alpha stimuliert wurden. Daraufhin wurde das durch diese Liganden induzierte Signaling moduliert [379-383].

5.3.7.4 Aktivierung und Inaktivierung von Prxs I und II

Prxs I wurde bald als ein Genprodukt identifiziert, dessen Expression während der Proliferation menschlicher epithelialer Zellen rapide ansteigt [374] und, ebenso wie Prx II, als cytosolischer Faktor, der die Aktivität natürlicher Killerzellen verstärken kann [375].

Rhee et al. zeigen mit ihren Versuchen, dass Prx I und II durch Cdc2 (cyclin-dependent Kinase 2) abhängige Phosphorylierung in ihrer Peroxidaseaktivität inaktiviert werden können [384]. Allerdings erfolgt diese Phosphorylierung ausschließlich in der M-Phase des Zellzyklus. Diese Spezifität reflektiert die Tatsache, dass Prx I ein zytosolisches Enzym ist und deshalb nur durch aktivierte Cdks, welche erst nach dem Zusammenbruch der nukleären Schutzhülle während der Mitose entstehen, inaktiviert werden kann. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass die Cdc2 abhängige Phosphorylierung von Prx I und II und die resultierende Akkumulation von H_2O_2 , ein kritischer Schritt innerhalb der normalen Zellteilung sein könnte. Auf maligne Zellen bezogen könnte das bedeuten, dass ein erniedrigter Anteil an aktivem Prx eine eventuelle Hyperoxidation oder vermehrte Zellteilung anzeigt.

Abgesehen von der Phosphorylierung wird die Prx Aktivität auch durch Überoxidation und Proteolyse reguliert [90, 384-386]. Es wurde gezeigt, dass die Inaktivierung der 2-Cys-Prxs durch Hyperoxidation [387], reversibel ist [388, 389]. Toledano identifizierte dasjenige Enzym, welches verantwortlich für die Reduzierung des hyperoxidierten Prx zurück zur aktiven Thiolform war, das Sulfiredoxin [390]. Diese Reduktion durch das Sulfiredoxin erfordert zum einen ATP-Hydrolyse, zum anderen Mg^{2+} und ein Thiol als Elektronenspender [157, 259].

Interessanterweise sind prokariotische 2-Cys Prx, die den C-terminalen GGLG Schwanz ihrer eukariotischen Partner nicht enthalten, immun gegen oxidative Inaktivierung, weshalb Prokaryoten auch kein Sulfiredoxin besitzen [390, 391]. Der C-terminale Schwanz ist also

verantwortlich für die Überoxidation und somit Inaktivierung, da die Entfernung des C-terminalen Endes aus einem überoxidations-sensitiven Enzym ein resistentes formt [386]. Man geht jedoch mittlerweile davon aus, dass sich eine solche Überoxidations-Immunität der Prokaryoten im Laufe der Evolution als kontraproduktiv in Bezug auf das H_2O_2 Signaling, erwiesen hat.

Es kann also gesagt werden, dass zwei verschiedene Mechanismen für die vorübergehende Inaktivierung der Prx I und II bestehen und zwar zum einen durch Cdc2- Phosphorylierung, welches in der G²M Phase des Zellzykluses aktiviert wird und durch Hyperoxidierung des aktiven Cysteinrestes zu einer Cystein-Sulfid-Säure, mit einer reversen sulfiredoxinkatalysierten Reaktion. Ein weiterer Mechanismus der Prx-Kontrolle könnte die spezifische Proteolyse des C-Terminus darstellen, was die Prxs vor Peroxid vermittelter Inaktivierung schützen könnte [386]. Interessanterweise ist die regulatorische Protease Calpain in Erythrozyten vorzufinden, wo sie diese Region *in vitro* entfernt [90]. Proteolyse würde die Prx resistent gegenüber Überoxidation machen, würde aber gleichzeitig die Möglichkeit der Inaktivierung durch Phosphorylierung nicht ausschließen.

All diese Regulationsmechanismen der Prxs Aktivität sind von großem wissenschaftlichem Interesse, da immer mehr Enzyme und Transkriptions-Regulatoren nachgewiesen werden, deren Aktivität durch die Regulierung von Redoxsignalen durch Peroxid und Peroxynitrit vermittelte Cysteinmodifikation gesteuert wird [124].

5.3.7.5 Peroxiredoxine und H_2O_2 Signaling

Die Funktion des H_2O_2 als Messenger erfordert, dass seine Konzentration innerhalb der Zelle in kürzester Zeit über einen gewissen Schwellenwert steigt. Eine Anforderung, die den Schutz der generierten H_2O_2 Moleküle vor den Prxs bedarf. Solch ein Schutz ist nötig aufgrund der enormen Mengen an Prxs I und II im Cytosol, deren Aufgabe eben genau die Elimination des H_2O_2 ist.

Es hat sich gezeigt, dass die Reduktion der Prxs durch das Srx ein langsamer Vorgang ist. Genau deshalb spekulieren Rhee et al., dass diese eingebaute Inaktivierung und langsame Reaktivierung der Prxs genau diesen H_2O_2 Schutzmechanismus darstellt, der dem H_2O_2 genug Zeit zur Akkumulation und somit Aufbau der Signalkaskade gibt.

Vereinfacht kann zum Verhältnis Prx und H_2O_2 gesagt werden, dass die Prxs entscheiden, ob H_2O_2 als Signalstoff oder schädliche Substanz auf die Zelle wirkt. Einerseits haben die Prxs eine Schutzfunktion, da sie H_2O_2 bis zu bestimmten Konzentrationen abbauen. Zuviel der

Wasserstoffverbindung dagegen stört die Prxs, was dazu führt, dass der Körper H_2O_2 gezielt als Signal einsetzen kann, z.B. um bestimmte Körperzellen zu veranlassen, sich zu teilen oder die Apoptose zu starten.

Sind die Prxs nun sehr stabil oder durch irgendeinen Mechanismus vor Inaktivierung geschützt, könnten sie ihre Hostzelle vor dem H_2O_2 induzierten Selbstmordprogramm schützen, was eine Erklärungsmöglichkeit für therapieresistente Malignomzellen sein könnte.

5.3.7.6 Prx I und II: Karzinogenese, -Progression, sowie Strahlen bzw. Chemoresistenz

In vielen Bereichen der Krebstherapie gehört die Bestrahlung zum Standard der Behandlung vieler Malignome. Dennoch existiert eine signifikante Zahl an Tumoren, die nicht auf Strahlungs- und/oder Chemotherapie ansprechen, da sie weniger sensitiv oder sogar resistent gegen diese konventionellen Behandlungsmethoden zu sein scheinen.

Auch wenn der Mechanismus der Chemo- und/oder Strahlenresistenz von Krebszellen bisher noch nicht ausreichend geklärt ist, geht man davon aus, dass die Inhibition der stressaktivierten Geninduktion ein vielversprechender Ansatz sein könnte, um diese Resistenzen zu durchbrechen.

Peroxiredoxine schützen die Zelle vor so genannten reactive-oxygen-species (ROS), die während Zellstress bzw. normalem Zellmetabolismus entstehen. Eine der Effekte ionisierender Strahlung, welche standardmäßig in der Behandlung vieler Malignome eingesetzt wird, ist die Entstehung solcher ROS wie O_2^- und H_2O_2 , weshalb ersichtlich wird warum die Prxs zur Resistenz gegenüber einer solchen Behandlung beitragen können.

5.3.7.6.1 Prx II

Prx II ist schon länger als antioxidatives Protein bekannt [397], welches mit thiolenthaltenden Proteinen wie Thioredoxin reagiert. Da thiol-spezifische Proteine unter dem Verdacht stehen, die Aktivität anderer Zellproteine mit einem Thiol als regulatorischer Domäne zu kontrollieren [359, 398], könnte die Inhibition der Prx II Aktivität eventuell die Signalstruktur für Zellwachstum und Überleben beeinflussen.

Eine Störung des zellulären Redoxstatus resultiert in einer Apoptose, ausgelöst durch die aktivierte Caspase 3-Kaskade [399]. Zhang et al. [383] haben gezeigt, dass eine Prx II Überexpression die Apoptose in Molt-4 Leukämiezellen verhinderte und ähnlich dem Bcl-2 funktionierte.

Prx II schützt Zellen also nicht nur vor oxidativem Stress, es stattet Krebszellen auch mit einer Resistenz gegen gewisse Chemotherapeutika wie Cisplatin aus und garantiert ihnen Radioresistenz. Yo et al. fanden heraus, dass Antisense-Prx II, Zellen für einen Cisplatin induzierten Zelltod sensibilisiert. Aus diesem Grund gehen Yo et al. davon aus, dass Antisense Prx II ein guter Sensitizer für Cisplatin Therapien sein könnte, im Allgemeinen ein gutes Ziel für Chemosensitizer und somit ein viel versprechendes Agens für zukünftige Krebstherapieansätze darstellen könnte [400].

Zhang et al. zeigten ihrerseits, dass Prx II vermehrt in radioresistentem Patientengewebe nachgewiesen werden konnte und eine Behandlung mit Prx II-Antisense erst eine verminderte Prx II Expression und anschließend eine vermehrte Strahlungssensitivität der Zellen zur Folge hatte.

Park et al. zeigten dass Prx II Antisense allein schon die Apoptose induzieren kann, auch ohne folgende Chemotherapie oder Bestrahlung. Diesbezüglich wird vermutet, dass das Verhältnis von aktiven und inaktiven Prx eine Rolle spielen könnte, ob die Zellen empfänglich für cytokinininduzierte Apoptose sind oder nicht [392].

5.3.7.6.2 Prx I

Abgesehen von seiner Funktion als Redox Regulator, ist Prx I Teil der Signalkaskade von Wachstumsfaktoren und dem Tumor-Nekrose-Faktor α , indem es die intrazelluläre H_2O_2 Konzentration reguliert. Prx I ist außerdem auch involviert in eine Anzahl von zellulären Funktionen wie Zellproliferation und Differenzierung, der Immunantwort und dem intrazellulären Signaling [387, 401, 402].

Eine erhöhte Expression an Prx I wurde bereits in verschiedenen Krebszellen beobachtet [93, 143, 402-405].

Auch Zhang et al. zeigten mit ihren Experimenten, dass eine Ausschaltung von Prx I in SW480 Zellen zu einem verminderten Zellwachstum, einer verminderten antioxidativen Antwort auf Bestrahlung und einer erhöhten Sensitivität auf strahlungsinduzierte Apoptose führte [383].

Es liegen Ergebnisse über Prostatakrebszellen vor, die belegen, dass eine Sensitivierung für Hydrogenperoxid durch eine Herunterregulierung an Prx I via Antisensetechnik erreicht werden konnte [123].

Zhang et al. gehen auf Grund ihrer Studie davon aus, dass Prx I bei der Vorhersage des Patientenoutcomes auf Bestrahlung herangezogen werden könnte und davon abgesehen Antisense-Prx I als neuer Radiosensitizer in Betracht gezogen werden sollte.

5.3.7.7 Prx I, c-Abl und CML

Neue Studien vermuten, dass die katalytische Seite des Prx I selbst von physiologischer Wichtigkeit sein könnte, da es vielleicht die strukturelle und funktionelle Transformation des Prx I von einem antioxidativem Enzym zu einem molekularen Chaperon ermöglichen könnte [139, 412]. Diese Hypothese ist konsistent mit dem Verhalten des Prx I, mit verschiedenen Zellproteinen wie dem c-Abl zu interagieren um ihre Aktivität zu modulieren [414-416].

C-Abl wird bekannterweise durch oxidativen Stress aktiviert, dennoch ist seine genaue Funktion innerhalb dieser Stressantwort unklar.

Die c-Abl-Thyrosinkinase kann sowohl durch die Rezeptor-Thyrosinkinase (RTK), einem DNA-Schaden, als auch durch oxidativen Stress aktiviert werden [417, 418]. Aktiviertes c-Abl, welches durch einen DNA Schaden aktiviert wurde, trägt wahrscheinlich zu einer darauf folgenden Apoptose bei. Dennoch ist bisher unklar wie ROS c-Abl aktivieren. Es wurde bereits berichtet, dass c-Abl mit einigen Proteinen interagiert, welche in der oxidativen Stressantwort beteiligt sind wie der Proteinkinase C. Diese Interaktion wiederum wird durch H₂O₂ vermittelt. Zipfel et al. fand heraus, dass Osteoblasten denen das c-Abl fehlte, Defekte in der Ausreifung zeigten, ebenso wie eine verstärkte Anfälligkeit auf oxidativen Stress. Außerdem zeigten diese c-Abl defizienten Osteoblasten eine erhöhte Prx I-Induktion [175].

Forscher berichten von der protektiven Wirkung des c-Abl gegenüber oxidativem Stress, unter anderem da c-Abl Knock-out Mäuse massive Apoptose in allen Geweben aufzeigen und Prä- und Pro-B-Zellen defizient für c-Abl, hypersensitiv auf IL-7 und Dexamethason induzierte Apoptose reagieren [419-421].

Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass Prx I Knock-out Mäuse eine Hypersensitivität auf oxidativen Stress zeigen und zu der Entstehung verschiedenster Tumoren neigen [423]. Dies könnte auf die Fähigkeit der dann überhand nehmenden ROS zurückzuführen sein, DNA, Lipide und Proteine zu modifizieren, was zu DNA-Schaden und inaktivierten Tumorsuppressoren führen könnte.

Aufgrund dieser Ergebnisse schließen Li et al. auf eine neue CML Entstehungstheorie, die besagt, dass Bcr-Abl zu einer verminderten Prx I-Expression führen könnte um so die vermehrte Transformation maligner Zellen zu initiieren.

Li et al. [175] spekulieren weiter, dass Prx I in Bezug auf die CML als Tumorsuppressor fungiert.

Sie zeigen, dass eine c-Abl Defizienz zu einer erhöhten Prx I Expression führt. Dies könnte zwei Funktionen haben, zum einen die ROS zu eliminieren und so zum anderen die ROS induzierte Zelltransformation zu unterdrücken. Li et al. spekulieren, dass ein aktiviertes Abl wie bei Bcr-Abl die Expression von Prx I inhibieren würde, und dass solche Bcr-Abl Zellen (wie bei der CML) unter vermehrtem oxidativem Stress stehen würden und so vermehrt maligne transformiert werden würden. Diese könnte eine neue Erklärung darstellen wie Abl seine eigene onkogenetische Aktivität leitet, was folgende Fragen aufwirft: Könnte Prx I wenigstens teilweise die CML-Entwicklung verhindern und könnten antioxidative Reagenzien die Bcr-Abl induzierte Zelltransformation verzögern oder sogar verhindern?

5.3.7.8 Weitere Ansätze des Prxs I und II Einsatzes in der Krebsforschung

Di Pietro et al. haben in ihren Experimenten die Effekte ionisierender Strahlung auf die Expression von Prx I, II und IV in K562 Zellen erforscht und kamen zu dem Resultat, dass in Radio-resistenten leukämischen Zellen eine hoch stabile Form an Prxs besteht [406].

Chung et al. [408] zeigen, dass eine erhöhte Prx II Expression zu einer Resistenz der durch Cisplatin und H₂O₂ induzierten Apoptose führt. Diese Beobachtung führte zu der Vermutung, dass eine Prx II Überexprimierung in Krebszellen zu einer Chemoresistenz, insbesondere gegenüber oxidativen stressproduzierenden Krebsmedikamenten, führt.

Park et al. [409] fanden bei ihren Tests mit Kopf/Nackentumorzellen heraus, dass eine erhöhte Expression an Prx II in Gewebe derjenigen Patienten nachgewiesen werden konnte, die nicht auf eine Strahlungstherapie ansprachen, wohingegen nur eine schwache Prx II-Expression im Gewebe der Patienten mit rückläufigen Tumoren nachgewiesen werden konnte. Sie verwendeten Prx II-Antisense und erreichten so eine verminderte Prx II-Induktion, was zu einer verstärkten Sensitivität der Tumorzellen auf Bestrahlung führte.

Chen et al. [407] zeigen, dass eine verminderte Prx I Expression via Antisense Technik zu einer Wachstumsinhibierung von Lungentumoren sowie einer verbesserten Radiosensitivität führt. Es zeigte sich, dass die Prx I-Antisense infizierten Zellen eine dreifach längere Zeit benötigten, um palpable Tumoren zu generieren. Außerdem war die Inzidenz an spontaner Metastasierung der Prx I-Antisense-Gruppe signifikant geringer als der des Wildtypes. Daraus schließen Chen et al., dass die Inaktivierung von Prx I in Krebszellen ein vielversprechender

Ansatz in der Behandlung von Lungenkrebspatienten, aber auch anderer Krebspatienten, sein könnte.

Warum jedoch manche Tumoren der gleichen Tumorklasse solche "Schutzprogramme" starten können und manche nicht, bleibt ungeklärt.

Kim et al. [410] berichten von einem erhöhten Prx I in Stage one Non-small-Cell-Lungenkrebs als einen unabhängigen neuen Prognosefaktor für einen frühen Krankheitsrückfall und eine reduzierte Überlebensdauer nach Resektion. Laut Kim et al. wurde Prx I in verschiedenen Krebsarten erhöht nachgewiesen und ließ dort auf einen aggressiven Phenotyp schließen.

Natürlich ist kein einzelner Marker in der Lage mit hundertprozentiger Sicherheit den Outcome eines Patienten vorherzusagen. Ein Profil basierend auf einer Kombination der Prx Expression und anderer molekularer Signaturen, könnte sich als nützlich erweisen, um diejenige Untergruppe an Malignompatienten herauszufiltern, die von einer adjuvanten Therapie profitieren würden. Zieht man die potentielle Morbidität einer zusätzlichen Therapie in Betracht, wäre die Möglichkeit das Risiko eines Relapses einzuschätzen sehr hilfreich um unnötige Behandlungen vermeiden zu können und so den Behandlungserfolg zu steigern.

5.3.8 Spot 37: α Enolase

Spot 37, der sich in vier von fünf CML/gesund Gelvergleichspaaren als erhöht erwies, wurde mit einem Score von 166 als Enolase α identifiziert. Enolase α konnte im Zelllinienvergleich nicht als verändert nachgewiesen werden.

Enolase α , auch bekannt als Enolase 1, 2-phospho-D-glycerate Hydro-lyase oder non-neural Enolase, Phosphopyruvat-Hydratase, c-Myc promoter-binding Protein oder auch Plasminogen-binding Protein, alles Synonyme, die sich auf die verschiedenen Funktionen der α Enolase beziehen.

Die α Enolase ist eines von drei Isonenzymen der Enolase: α (im Cytoplasma), β (assoziiert mit Muskelgewebe) und γ (Neuronen spezifisch). Sie alle gehören zur Enolasesuperfamilie. Die Enolase ist ein Enzym, welches an der Gylkolyse beteiligt ist. Es katalysiert die Umwandlung von 2-Phosphoglycerat zu Phosphoenolpyruvat, einer der energiereichen ATP bildenden und wichtigen Schritte innerhalb der Umwandlung von Glukose zu Pyruvat. Enolase wird durch Fluoride inhibiert.

Enolase α ist ein Homodimer, bestehend aus zwei α Untereinheiten. Ihr Gen, die ENO1, kodiert auch das Myc-binding Protein 1 (MBP1) [424], welches die Aktivität des c-myc

Protooncogenes herunterreguliert [425]. Die α Enolase ist die 48 kDa und somit längere Form der beiden und ist hauptsächlich im Cytosol lokalisiert, wohingegen MBP1 mit seinen 37 kDa nur im Nukleus gefunden wird.

Dass die α Enolase, abgesehen von ihrer wichtigen Funktion innerhalb der Glykolyse auch noch in anderen klinischen Belangen wichtige Rollen spielt, zeigt unter anderem der Nachweis von α Enolase als Autoantigen bei der Hashimoto-Enzephalopathie [426], sowie bei schwerem Asthma [427] und der Behçet Krankheit [428].

Subramanian et al. zeigen, dass MBP-1 aufgrund einer alternativen Translationsinitiation der α Enolasen RNA entsteht und nicht auf Grund von alternativem Splicing. Enolase α und MBP-1 sind also beide Produkte des α Enolasegens [424, 429].

Solch eine interne Translationsinitiierung wurde bereits bei anderen Genen beschrieben, wie C/EBP α und β [430], Myc [247], GATA-1 [431], CREM α/β [432], N-Oct-3 [433] und Oct-4 [434], bei denen diese Form der Translation eine effiziente und schnelle Methode der Modulierung ihrer Aktivität zu sein scheint.

Das c-myc Protooncogen ist ein DNA-bindendes Phosphoprotein, welches eine wichtige Rolle innerhalb der Regulation von Zellwachstum und Differenzierung spielt [435, 436]. Die Regulierung dieses Proteins ist sehr komplex wobei die c-myc Überexpression eine bekannte Charakteristik vieler maligner Zellen ist.

MBP-1 ist ein negativer Regulator der c-Myc Expression. Konsistent mit seiner negativen Regulatorfunktion auf c-Myc und als ein potentieller Tumorsuppressor, kommt es bei einer Transfektion von menschlichen Brustkrebszellen mit MBP-1 cDNA, zu einer Inhibition der Tumorformierung in Nacktmäusen [437].

Auch die α Enolase besitzt die Fähigkeit, die c-Myc Promoter Aktivität herunterzuregulieren, wenn auch in einem sehr viel geringerem Ausmaß als MBP-1, das die Aktivität um 65% reduziert, wohingegen Enolase α nur zu 40% die Aktivität zu reduzieren vermag.

Subramanian et al. [425] vermuten auf Grund ihrer Studien, dass diese c-Myc Regulationsaktivität im N-terminalen Bereich der Enolase α liegt, die auch im alternativen Translationsprodukt MBP-1 repräsentiert ist. Sie zeigen, dass das α Enolasegen bifunktional wirkt, indem es zwei verschiedene Proteine kodiert, von denen eines eine Rolle bei der Glykolyse spielt und das andere eine Rolle bei der Regulation der c-Myc Expression.

Es liegen Beweise vor, dass die α Enolase nicht nur als glykolytisches Enzym eine Rolle spielt [438, 439], sondern unter anderem eine sowohl direkte als auch indirekte Funktion in Zellprozessen wie Thermotoleranz, Wachstumskontrolle und Hypoxietoleranz [440].

Außerdem dient es als Oberflächenrezeptor für Plasminogen, was zu einer verstärkten Plasminogenaktivierung und -leitung der proteolytischen Aktivität des Plasmins an die Zelloberfläche führt [441].

Myc und Enolase α scheinen positiv Feedback kontrolliert zu sein, da eine Myc-Überexpression zu einer Expressions-Hochregulierung glykolytischer Proteine sowie der Glykolyse selbst führt.

Diese Beobachtung, neben der Beobachtung der bifunktionalen Rolle der α Enolase sowohl als glykolytisches Enzym als auch als Regulator der c-Myc Expression, zeigt ein Model auf, indem c-Myc und α Enolase die Lücke im Zusammenspiel von Energiemetabolismus und Wachstumskontrolle schließen.

Bekanntermaßen ist in malignen Zellen der Zuckerverbrauch enorm gesteigert, das heißt die Glykolyse ist zu einem Maximum angekurbelt. Aufgrund des vorher festgestellten, könnte dies heißen, dass in solchen Zellen die Enolase α Expression deshalb stark angehoben ist, was eventuell zu einem Verlust oder wenigstens zu einer Runterregulierung der MBP-1 Expression führen könnte, ganz simpel aus Mangel an genügend RNA um beide Enzyme gleichermaßen exprimieren zu können. Dies wiederum könnte zur Folge haben, dass die c-Myc Protooncogenaktivität in solchen Zellen gesteigert ist, da die MBP-1 c-Myc Suppressoraktivität wegfällt oder stark vermindert ist. Auf diese Art würden die Tumorzellen selbst für eine vermehrte Transformation innerhalb der Zelle sorgen.

Viele Autoantikörper gegen Tumorantigene repräsentieren bereits heute Biomarker um in Patientenseren Krebs zu entdecken oder die Krankheitsprogression zu beobachten. Auch He et al. [444] haben einen Autoantikörper entdeckt, der ihrer Meinung nach ein viel versprechender neuer Biomarker sein könnte. Sie entdeckten, ebenso wie Ueda et al. bei Lungen-Adeno-Karzinomen [443], Autoantikörper gegen die α Enolase in einem großen Teil ihrer NSCLC-Patientenkohorte. Die immunhistochemische Untersuchung dieser Patienten zeigte eine erhöhte Expression der α Enolase und die Flow-cytometrische Analyse bestätigte die Expression der α Enolase auf der Oberfläche dieser Krebszellen. Die kombinierte Detektion von α Enolase Autoantikörpern und den bereits etablierten Tumormarkern CEA sowie CYFRA 21-1, verstärkte die Diagnosesensitivität von NSCLC signifikant [444].

Dies zeigt nicht nur, dass die α Enolase und ihre Autoantikörper, viel versprechende neue Biomarker sein könnten, sondern auch, dass der Trend weg von einem einzelnen Biomarker allein, hin zu einer Biomarker "Karte" bei der Erkennung von Malignomen geht.

6. Zusammenfassung

Mittels hochauflösender 2-DE Gelelektrophorese, die durch MALDI-TOF ergänzt wurde, ließen sich 11 Proteinspots mit Unterschieden hinsichtlich ihrer Intensität bei PBSC-CML Gelen identifizieren.

Unter diesen Proteinen befindet sich das GRP 78, das Fibrin(ogen) β und γ , das Proteasom 26S ATPase Subunit 2, 11S, das Vincullin, die Annexine I/II, sowie die Peroxiredoxine I bzw. II und die α Enolase.

Bei GRP78, einem Mitglied der Heat-Shock-Protein-Familie 70, handelt es sich um ein molekulares Chaperon. Es stellt eine Qualitätskontrollinstanz innerhalb des ER dar und schützt die Zelle mittels der „Unfolded-Protein-Response“ vor Apoptose. Chaperone wie das GRP78 sind bereits seit längerem dafür bekannt, in die Kanzerogenese bzw. Chemo/Strahlentherapieresistenz Entstehung, involviert zu sein.

Auch das Fibrin(ogen) β und γ zeigt sich dysreguliert, was nicht nur auf eine Störung der Hämostase hinweisend ist, auch eine Progression von Tumorerkrankungen konnte mit veränderten Fibrinogen Konzentrationen in Verbindung gebracht werden.

Das 26S Proteasom ist in Zellabläufe wie Proteinturnover, Mitose, DNA-Replikation/Reperatur, der Unfolded-Protein-Response bzw. der Heat Shock Response etc. involviert. In leukämischen Zellen wurde es in Studien mehrfach als überexprimiert nachgewiesen. Phase 3-Studien mit neu entwickelten Proteasominhibitoren zeigen bereits vielversprechende Ergebnisse in der Behandlung verschiedenster Malignome incl. der imatinib-resistenten CML.

In Assoziation mit dem 20S Kern bildet die 11S Einheit das so genannte Immunoproteasom. Es wurde gezeigt, dass Krebszellen womöglich der Immunantwort entgehen, indem sie 11S und somit die Antigenpräsentation durch MHC I Moleküle herunterregulieren, was sie wiederum gleichsam „unsichtbar“ für das Immunsystem macht.

Vinculin ist ein Adapterprotein, welches die Zellkommunikation innerhalb fokaler Adhäsionen über die Kopplung der Integrine an Aktinfilamente vermittelt. Vinculin ist in Bcr-

Abl transformierten Zellen konstitutiv aktiviert. In solchen Zellen interagiert p210 Bcr-Abl mit Paxillin und Vinculin in einer komplexen Art und Weise, was womöglich zu einer andauernden Störung der korrekten Prozessierung extrazellulärer Signale führt. Man nimmt an, dass die p210 Bcr-Abl Interaktion mit den für die β 1-Integrin Signalvermittlung wichtigen, cytoskelettalen Elementen wie dem Vinculin, für die abnorme Integrinfunktion der CML verantwortlich ist. Dies führt zu einer gestörten Proliferationsregulation der CML Progenitorzellen durch die Mikroumwelt, sowie deren abnorme Mobilität bzw. Freigabe aus dem Knochenmark.

Annexin 1 ist ein Mediator des anti-inflammatorischen Signalings, Annexin 2 ist vor allem ein Modulator der Fibrinolytischen Kaskade. Annexin 2 scheint zusätzlich an Zellteilung und –proliferation beteiligt zu sein, wohingegen das Annexin 1 unter dem Verdacht steht, eine bisher unbekannte neue Art an HSP darzustellen.

Eine abnorme Annexinaktivität bzw. -Expression wurde mehrfach mit verschiedenen Erkrankungen in Zusammenhang gebracht, was zu dem Begriff der „Annexinopathien“ führte. Viele Annexine scheinen auch mit verschiedenen Malignomen in Zusammenhang zu stehen. Nicht zuletzt ist belegt, dass eine Annexin 1-Überexpression in leukämischen Blasten zu deren Chemotherapieresistenz bzw. Schutz vor immunvermittelter Vernichtung beiträgt.

Die Peroxiredoxine schützen die Zelle mittels eines Oxidations-Reduktions-Zyklus. Indem sie den Peroxid-Level der Zelle kontrollieren, greifen sie in die H_2O_2 -vermittelte Signalweiterleitung bezüglich Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose ein. Außerdem ist belegt, dass die Prxs zu Chemo- bzw. Strahlenresistenz beitragen, da Antisense-Prx II bestückte Krebszellen für einen chemotherapieinduzierten Zelltod sensibilisiert waren. Prx I steht abgesehen davon unter dem Verdacht, eine Art Chaperonfunktion zu besitzen.

Hinsichtlich der CML geht man davon aus, dass durch Interaktion von c-Abl mit Prx I, dessen Aktivität unterdrückt wird und so die vermehrte, durch ROS vermittelte, maligne Transformierung initiiert wird.

Die α Enolase ist ein Enzym der Glykolyse. Ihr Gen, die ENO1, kodiert zudem das Myc-binding-Protein 1 (MBP1), welches die Aktivität des c-Myc Protooncogenes herunterreguliert.

MBP1 entsteht durch alternative Translationsinitiierung der α Enolase RNA. Sowohl MBP1, als auch die Enolase α , fungieren als Tumorsuppressoren.

Die Glykolyse ist in Krebszellen bis zu einem Maximum angekurbelt. Dies könnte zur Folge haben, dass weniger MBP1 gebildet werden kann, da auf Grund des enormen Enolasebedarfes zu wenig ENO1 RNA zu Verfügung steht. Dieser Wegfall des c-Myc Unterdrückers MBP1 wiederum, könnte zu einer vermehrten malignen Transformation führen.

Studien belegen ausserdem die Biomarkerqualitäten der Enolase α , da ein Nachweis von Enolase α -Autoantikörpern in Kombination mit einem erhöhten Nachweis an CEA und CYFRA 21, die Diagnosesensitivität von NSCLC signifikant erhöht.

7. Aussichten

Die Disziplin der Proteom-Forschung ist noch sehr jung und birgt großes Potenzial. Um ihre ganze Bandbreite weiter ausschöpfen zu können, gibt es Bestrebungen wie, einheitliche Verfahrensprotokolle zu gewährleisten, so dass jeder Proteomics-Forscher mit den gleichen Chemikalien, Versuchsaufbauten, Laufzeiten, Gelen, Proteinaufarbeitsverfahren etc. arbeiten könnte, um so auf der ganzen Welt vergleichbare Proteinkarten erstellen zu können.

Nicht zuletzt ist es sinnvoll die weltweiten Proteindatenbanken zu vervollständigen. So wäre es möglich, jederzeit auf gezielte Informationen eines jeden Proteins zugreifen zu können, diese eventuell zu erweitern und bestenfalls auf diese Weise komplexe krankheitsspezifische „Protein-Expressions-Karten“ zu erstellen.

Diesem Ziel hat sich das HuPO Projekt verschrieben.

8. Literaturverzeichnis

1. Rowley, J.D., *Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining.* Nature, 1973. **243**(5405): p. 290-3.
2. Lugo, T.G., et al, *Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products.* Science, 1990. **247**(4946): p. 1079-82.
3. Gishizky, M.L. and O.N. Witte, *Initiation of deregulated growth of multipotent progenitor cells by bcr-abl in vitro.* Science, 1992. **256**(5058): p. 836-9.
4. McLaughlin, J., E. Chianese, and O.N. Witte, *In vitro transformation of immature hematopoietic cells by the P210 BCR/ABL oncogene product of the Philadelphia chromosome.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(18): p. 6558-62.
5. Cortez, D., et al, *The BCR-ABL tyrosine kinase inhibits apoptosis by activating a Ras-dependent signaling pathway.* Oncogene, 1996. **13**(12): p. 2589-94.
6. Bazzoni, G., et al, *Bcr/Abl expression stimulates integrin function in hematopoietic cell lines.* J Clin Invest, 1996. **98**(2): p. 521-8.
7. Sawyers, C.L., *Chronic myeloid leukemia.* N Engl J Med, 1999. **340**(17): p. 1330-40.
8. Bernstein, R., *Cytogenetics of chronic myelogenous leukemia.* Semin Hematol, 1988. **25**(1): p. 20-34.
9. Ahuja, H., et al, *The spectrum of molecular alterations in the evolution of chronic myelocytic leukemia.* J Clin Invest, 1991. **87**(6): p. 2042-7.
10. Sill, H., J.M. Goldman, and N.C. Cross, *Homozygous deletions of the p16 tumor-suppressor gene are associated with lymphoid transformation of chronic myeloid leukemia.* Blood, 1995. **85**(8): p. 2013-6.
11. Kunihiro, T. and O. JHitoshi, *PBSC mobilization.* Transfusion and Apheresis Science, 2004. **31**: p. 233-243.
12. Lander, E.S., et al, *Initial sequencing and analysis of the human genome.* Nature, 2001. **409**(6822): p. 860-921.
13. Gygi, S.P., et al, *Correlation between protein and mRNA abundance in yeast.* Mol Cell Biol, 1999. **19**(3): p. 1720-30.
14. de Hoog, C.L. and M. Mann, *Proteomics.* Annu Rev Genomics Hum Genet, 2004. **5**: p. 267-93.

15. Tyers, M. and M. Mann, *From genomics to proteomics*. Nature, 2003. **422**(6928): p. 193-7.
16. Hanash, S., *Disease proteomics*. Nature, 2003. **422**(6928): p. 226-32.
17. Görg, A., W. Weiss, and M.J. Dunn, *Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics*. Proteomics, 2004. **4**: p. 3665-3685.
18. O'Farrell, P., *High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins*. J Biol Chem, 1975. **250**: p. 4007-4021.
19. Klose, J., *Protein Mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach totesting for induced point mutations in mammals*. Humangenetik, 1975. **26**: p. 231-243.
20. Klose, J. and U. Kobalz, *Two-Dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis fo the genome*. Electrophoresis, 1995. **6**: p. 1034-1059.
21. Alaiya, A.A., et al, *Cancer proteomics: from identification of novel markers to creation of artificial learning models for tumor classification*. Electrophoresis, 2000. **21**(6): p. 1210-7.
22. Verrills, N.M. and M. Kavallaris, *Drug resistance mechanisms in cancer cells: a proteomics perspective*. Curr Opin Mol Ther, 2003. **5**(3): p. 258-65.
23. Strahler, J.R., et al, *Identification of two related markers for common acute lymphoblastic leukemia as heat shock proteins*. J Clin Invest, 1990. **85**(1): p. 200-7.
24. Shin, S.J., et al, *Profiling proteins related to amyloid deposited brain of Tg2576 mice*. Proteomics, 2004. **4**(11): p. 3359-68.
25. Ali, M. and N. Manolios, *Proteomics in rheumatology: a new direction for old diseases*. Semin Arthritis Rheum, 2005. **35**(2): p. 67-76.
26. Park, Y.D., et al, *Towards a proteomic analysis of atopic dermatitis: a two-dimensional-polyacrylamide gel electrophoresis/mass spectrometric analysis of cultured patient-derived fibroblasts*. Proteomics, 2004. **4**(11): p. 3446-55.
27. Roh, G.S., et al, *Proteome analysis of differential protein expression in allergen-induced asthmatic mice lung after dexamethasone treatment*. Proteomics, 2004. **4**(11): p. 3318-27.
28. Sloane, A.J., et al, *Proteomic analysis of sputum from adults and children with cystic fibrosis and from control subjects*. Am J Respir Crit Care Med, 2005. **172**(11): p. 1416-26.

29. Rai, A.J., et al, *Proteomic approaches to tumor marker discovery*. Arch Pathol Lab Med, 2002. **126**(12): p. 1518-26.
30. Zhang, Z., et al, *Three biomarkers identified from serum proteomic analysis for the detection of early stage ovarian cancer*. Cancer Res, 2004. **64**(16): p. 5882-90.
31. Hanash, S.M., et al, *Lineage-related polypeptide markers in acute lymphoblastic leukemia detected by two-dimensional gel electrophoresis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(3): p. 807-11.
32. Yeoh, E.J., et al, *Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling*. Cancer Cell, 2002. **1**(2): p. 133-43.
33. Voss, T., et al, *Correlation of clinical data with proteomics profiles in 24 patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia*. Int J Cancer, 2001. **91**(2): p. 180-6.
34. Wulfkuhle, J.D., L.A. Liotta, and E.F. Petricoin, *Proteomic applications for the early detection of cancer*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(4): p. 267-75.
35. Srinivas, P.R., et al, *Proteomics in early detection of cancer*. Clin Chem, 2001. **47**(10): p. 1901-11.
36. Drexler, *Leukemia cell lines: in vitro models for the study of chronic myeloid leukemia*. Leuk Res, 1994. **18**: p. 919-927.
37. Lozzio, e.a., *Cytotoxicity of a factor isolated from human spleen*. J Natl Cancer Inst, 1973. **50**: p. 535-538.
38. Lozzio, e.a., *Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome*. Blood, 1975. **45**: p. 321-334.
39. Drexler, H., et al, *False leukemia-lymphoma cell lines: an updated on over 500 cell lines*. Leukemia, 2003. **17**: p. 416-426.
40. Kazuma, I., K. Teruhiko, and H. Mine, *Factors for PBPC collection efficiency and collection predictors*. Transfusion and Apheresis Science, 2004. **31**: p. 245-259.
41. Kurth, R., K.D. Bachmann, and K. Vilmar, *Richtlinien zur Transplantation peripherer Blutstammzellen* Deutsches Ärzteblatt, 1997. **94**: p. 68-76.
42. Cutler, C. and J.H. Antin, *Peripheral blood stem cells for allogeneic transplantation: a review*. Stem cells, 2001. **19**: p. 108-117.
43. Russell, N.H. and J.L. Byrne, *Allogeneic transplantation using peripheral blood stem cells*. Best Practice & Research Clinical Haematology, 2001 **14**: p. 685-700.

44. Boyum, A., *Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood*. Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1968. **21**: p. 77-89.
45. Peper, R.J., W.Z. Tina, and M.M. Mickelson, *Purification of lymphocytes and platelets by gradient centrifugation* J. Lab. and Clin. Med., 1968. **72**: p. 842-848.
46. Gorg, A., W. Weiss, and M.J. Dunn, *Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics*. Proteomics, 2004. **4**(12): p. 3665-85.
47. Zeindl-Eberhart, E. and H. Rabes, *Variant protein patterns in hepatomas and transformed liver cell lines as determined by high resolution two-dimensional gel electrophoresis (2-DE)*. Carcinogenesis, 1992. **13**: p. 1177-1183.
48. Neuhoff, V., et al, *Electrophoresis*, 1985. **9**: p. 255-262.
49. Shevchenko, A., et al, *Mass Spectrometric sequencing of proteins from silver stained polyacrylamid gels*. Anal. Chem., 1996. **68**: p. 850-858.
50. Aebersold, R. and M. Mann, *Mass spectrometry-based proteomics*. nature, 2003. **422**(6928): p. 198-207.
51. Hellman, U., C. Wernstedt, and J. Gonez, *Improvement of an "in-gel" digestion procedure for the micropreparation of internal protein fragments for amino acid sequencing*. Anal. Biochem., 1995. **224**: p. 451-455.
52. Rosenfeld, J., et al, *In-gel digestion of proteins for internal sequence analysis after one- or two-dimensional gel elctrophoresis*. Anal. Biochem., 1992. **203**: p. 173-179.
53. James, P., et al, *Protein identification by mass profile fingerprinting*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1993. **195**: p. 58-64.
54. Henzel, W.J., et al, *Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1993. **90**: p. 5011-5015.
55. Mann, M., P. Hojrup, and P. Roepstorff, *Use of mass spectrometric molecular weight information to identify proteins in sequence databases*. Biol. Mass Spectrom, 1993. **22**: p. 338-345.
56. Nowell, P. and D. Hungerford, *A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia*. Science, 1960. **132**: p. 1497, abstract.
57. Konopka, J.B., S.M. Watanabe, and O.N. Witte, *An alteration of the human c-abl protein in K562 leukemia cells unmasks associated tyrosine kinase activity*. Cell, 1984. **37**(3): p. 1035-42.
58. Kurzrock, R., J.U. Gutterman, and M. Talpaz, *The molecular genetics of Philadelphia chromosome-positive leukemias*. N Engl J Med, 1988. **319**(15): p. 990-8.

59. Raitano, A.B., Y.E. Whang, and C.L. Sawyers, *Signal transduction by wild-type and leukemogenic Abl proteins*. *Biochim Biophys Acta*, 1997. **1333**(3): p. F201-16.
60. Goldman, J.M., *Chronic myeloid leukemia-still a few questions*. *Exp Hematol*, 2004. **32**(1): p. 2-10.
61. Biernaux, C., et al, *Detection of major bcr-abl gene expression at a very low level in blood cells of some healthy individuals*. *Blood*, 1995. **86**(8): p. 3118-22.
62. Bose, S., et al, *The presence of typical and atypical BCR-ABL fusion genes in leukocytes of normal individuals: biologic significance and implications for the assessment of minimal residual disease*. *Blood*, 1998. **92**(9): p. 3362-7.
63. Deininger, M.W., J.M. Goldman, and J.V. Melo, *The molecular biology of chronic myeloid leukemia*. *Blood*, 2000. **96**(10): p. 3343-56.
64. Sattler, M. and J.D. Griffin, *Molecular mechanisms of transformation by the BCR-ABL oncogene*. *Semin Hematol*, 2003. **40**(2 Suppl 2): p. 4-10.
65. Druker, B.J. and N.B. Lydon, *Lessons learned from the development of an abl tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia*. *J Clin Invest*, 2000. **105**(1): p. 3-7.
66. Gambacorti-Passerini, C.B., et al, *Molecular mechanisms of resistance to imatinib in Philadelphia-chromosome-positive leukaemias*. *Lancet Oncol*, 2003. **4**(2): p. 75-85.
67. Nagar, B., et al, *Crystal structures of the kinase domain of c-Abl in complex with the small molecule inhibitors PD173955 and imatinib (STI-571)*. *Cancer Res*, 2002. **62**(15): p. 4236-43.
68. Schindler, T., et al, *Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase*. *Science*, 2000. **289**(5486): p. 1938-42.
69. Druker, B.J., et al, *Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia*. *N Engl J Med*, 2001. **344**(14): p. 1031-7.
70. Kantarjian, H., et al, *Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia*. *N Engl J Med*, 2002. **346**(9): p. 645-52.
71. Gorre, M.E., et al, *Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification*. *Science*, 2001. **293**(5531): p. 876-80.
72. Hochhaus, A., et al, *Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (STI571) therapy*. *Leukemia*, 2002. **16**(11): p. 2190-6.
73. Roche-Lestienne, C., et al, *Several types of mutations of the Abl gene can be found in chronic myeloid leukemia patients resistant to STI571, and they can pre-exist to the onset of treatment*. *Blood*, 2002. **100**(3): p. 1014-8.

74. Barthe, C., et al, *Mutation in the ATP-binding site of BCR-ABL in a patient with chronic myeloid leukaemia with increasing resistance to STI571*. Br J Haematol, 2002. **119**(1): p. 109-11.
75. Branford, S., et al, *High frequency of point mutations clustered within the adenosine triphosphate-binding region of BCR/ABL in patients with chronic myeloid leukemia or Ph-positive acute lymphoblastic leukemia who develop imatinib (STI571) resistance*. Blood, 2002. **99**(9): p. 3472-5.
76. Roumiantsev, S., et al, *Clinical resistance to the kinase inhibitor STI-571 in chronic myeloid leukemia by mutation of Tyr-253 in the Abl kinase domain P-loop*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(16): p. 10700-5.
77. Shah, N.P., et al, *Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia*. Cancer Cell, 2002. **2**(2): p. 117-25.
78. von Bubnoff, N., et al, *BCR-ABL gene mutations in relation to clinical resistance of Philadelphia-chromosome-positive leukaemia to STI571: a prospective study*. Lancet, 2002. **359**(9305): p. 487-91.
79. Corbin, A.S., et al, *Several Bcr-Abl kinase domain mutants associated with imatinib mesylate resistance remain sensitive to imatinib*. Blood, 2003. **101**(11): p. 4611-4.
80. Gambacorti-Passerini, C., *Decrease of resistance to imatinib in leukaemia*. Lancet, 2002. **359**(9319): p. 1777.
81. Mahon, F.X., et al, *Selection and characterization of BCR-ABL positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor STI571: diverse mechanisms of resistance*. Blood, 2000. **96**(3): p. 1070-9.
82. Weisberg, E. and J.D. Griffin, *Mechanism of resistance to the ABL tyrosine kinase inhibitor STI571 in BCR/ABL-transformed hematopoietic cell lines*. Blood, 2000. **95**(11): p. 3498-505.
83. Gambacorti-Passerini, C., et al, *Role of alpha1 acid glycoprotein in the in vivo resistance of human BCR-ABL(+) leukemic cells to the abl inhibitor STI571*. J Natl Cancer Inst, 2000. **92**(20): p. 1641-50.
84. Gambacorti-Passerini, C., et al, *Binding of imatinib by alpha(1)-acid glycoprotein*. Blood, 2002. **100**(1): p. 367-8; author reply 368-9.
85. le Coutre, P., et al, *Determination of alpha-1 acid glycoprotein in patients with Ph+ chronic myeloid leukemia during the first 13 weeks of therapy with STI571*. Blood Cells Mol Dis, 2002. **28**(1): p. 75-85.

86. Mahon, F.X., et al, *MDR1 gene overexpression confers resistance to imatinib mesylate in leukemia cell line models*. Blood, 2003. **101**(6): p. 2368-73.
87. Pocaly, M., et al, *Overexpression of the heat-shock protein 70 is associated to imatinib resistance in chronic myeloid leukemia*. Leukemia, 2006.
88. Shiu, R.P., J. Pouyssegur, and I. Pastan, *Glucose depletion accounts for the induction of two transformation-sensitive membrane proteins in Rous sarcoma virus-transformed chick embryo fibroblasts*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(9): p. 3840-4.
89. Haas, I.G. and M. Wabl, *Immunoglobulin heavy chain binding protein*. Nature, 1983. **306**(5941): p. 387-9.
90. Schroder, E., A.C. Willis, and C.P. Ponting, *Porcine natural-killer-enhancing factor-B: oligomerisation and identification as a calpain substrate in vitro*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1383**(2): p. 279-91.
91. Hendershot, L.M., J. Ting, and A.S. Lee, *Identity of the immunoglobulin heavy-chain-binding protein with the 78,000-dalton glucose-regulated protein and the role of posttranslational modifications in its binding function*. Mol Cell Biol, 1988. **8**(10): p. 4250-6.
92. Munro, S. and H.R. Pelham, *An Hsp70-like protein in the ER: identity with the 78 kd glucose-regulated protein and immunoglobulin heavy chain binding protein*. Cell, 1986. **46**(2): p. 291-300.
93. Noh, D.Y., et al, *Overexpression of peroxiredoxin in human breast cancer*. Anticancer Res, 2001. **21**(3B): p. 2085-90.
94. Lee, A.S., *Mammalian stress response: induction of the glucose-regulated protein family*. Curr Opin Cell Biol, 1992. **4**(2): p. 267-73.
95. Hartl, F.U., *Molecular chaperones in cellular protein folding*. Nature, 1996. **381**(6583): p. 571-9.
96. Hartl, F.U. and M. Hayer-Hartl, *Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein*. Science, 2002. **295**(5561): p. 1852-8.
97. Garber, K., *Researchers target unfolded protein response in cancerous tumor growth*. J Natl Cancer Inst, 2006. **98**(8): p. 512-4.
98. Pockley, A.G., *Heat shock proteins as regulators of the immune response*. Lancet, 2003. **362**(9382): p. 469-76.
99. Rao, R.V., et al, *Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program: role of the ER chaperone GRP78*. FEBS Lett, 2002. **514**(2-3): p. 122-8.

100. Reddy, R.K., et al, *Endoplasmic reticulum chaperone protein GRP78 protects cells from apoptosis induced by topoisomerase inhibitors: role of ATP binding site in suppression of caspase-7 activation*. J Biol Chem, 2003. **278**(23): p. 20915-24.
101. Shin, B.K., et al, *Global profiling of the cell surface proteome of cancer cells uncovers an abundance of proteins with chaperone function*. J Biol Chem, 2003. **278**(9): p. 7607-16.
102. Triantafilou, M., D. Fradelizi, and K. Triantafilou, *Major histocompatibility class one molecule associates with glucose regulated protein (GRP) 78 on the cell surface*. Hum Immunol, 2001. **62**(8): p. 764-70.
103. Xiao, G., et al, *KDEL proteins are found on the surface of NG108-15 cells*. Brain Res Mol Brain Res, 1999. **72**(2): p. 121-8.
104. Rapoport, T.A., *Transport of proteins across the endoplasmic reticulum membrane*. Science, 1992. **258**(5084): p. 931-6.
105. Sambrook, J.F., *The involvement of calcium in transport of secretory proteins from the endoplasmic reticulum*. Cell, 1990. **61**(2): p. 197-9.
106. Berridge, M.J., *Capacitative calcium entry*. Biochem J, 1995. **312** (Pt 1): p. 1-11.
107. Lievremont, J.P., et al, *BiP, a major chaperone protein of the endoplasmic reticulum lumen, plays a direct and important role in the storage of the rapidly exchanging pool of Ca²⁺*. J Biol Chem, 1997. **272**(49): p. 30873-9.
108. de Silva, A.M., W.E. Balch, and A. Helenius, *Quality control in the endoplasmic reticulum: folding and misfolding of vesicular stomatitis virus G protein in cells and in vitro*. J Cell Biol, 1990. **111**(3): p. 857-66.
109. Kuznetsov, G., L.B. Chen, and S.K. Nigam, *Multiple molecular chaperones complex with misfolded large oligomeric glycoproteins in the endoplasmic reticulum*. J Biol Chem, 1997. **272**(5): p. 3057-63.
110. Gething, M.J. and J. Sambrook, *Protein folding in the cell*. Nature, 1992. **355**(6355): p. 33-45.
111. Ruddon, R.W. and E. Bedows, *Assisted protein folding*. J Biol Chem, 1997. **272**(6): p. 3125-8.
112. Brodsky, J.L., et al, *The requirement for molecular chaperones during endoplasmic reticulum-associated protein degradation demonstrates that protein export and import are mechanistically distinct*. J Biol Chem, 1999. **274**(6): p. 3453-60.

113. Meerovitch, K., S. Wing, and D. Goltzman, *Proparathyroid hormone-related protein is associated with the chaperone protein BiP and undergoes proteasome-mediated degradation*. J Biol Chem, 1998. **273**(33): p. 21025-30.
114. Klausner, R.D. and R. Sitia, *Protein degradation in the endoplasmic reticulum*. Cell, 1990. **62**(4): p. 611-4.
115. Blond-Elguindi, S., et al, *Affinity panning of a library of peptides displayed on bacteriophages reveals the binding specificity of BiP*. Cell, 1993. **75**(4): p. 717-28.
116. Knarr, G., et al, *BiP binding sequences in antibodies*. J Biol Chem, 1995. **270**(46): p. 27589-94.
117. Knarr, G., et al, *BiP-binding sequences in HIV gp160. Implications for the binding specificity of bip*. J Biol Chem, 1999. **274**(42): p. 29850-7.
118. Kaufman, R.J., *Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls*. Genes Dev, 1999. **13**(10): p. 1211-33.
119. Kaufman, R.J., *Orchestrating the unfolded protein response in health and disease*. J Clin Invest, 2002. **110**(10): p. 1389-98.
120. Rutkowski, D.T. and R.J. Kaufman, *A trip to the ER: coping with stress*. Trends Cell Biol, 2004. **14**(1): p. 20-8.
121. Sommer, T. and E. Jarosch, *BiP binding keeps ATF6 at bay*. Dev Cell, 2002. **3**(1): p. 1-2.
122. Hong, M., et al, *Underglycosylation of ATF6 as a novel sensing mechanism for activation of the unfolded protein response*. J Biol Chem, 2004. **279**(12): p. 11354-63.
123. Shen, C. and C. Nathan, *Nonredundant antioxidant defense by multiple two-cysteine peroxiredoxins in human prostate cancer cells*. Mol Med, 2002. **8**(2): p. 95-102.
124. Claiborne, A., et al, *Protein-sulfenic acids: diverse roles for an unlikely player in enzyme catalysis and redox regulation*. Biochemistry, 1999. **38**(47): p. 15407-16.
125. Bertolotti, A., et al, *Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(6): p. 326-32.
126. Bernstein, H., et al, *Activation of the promoters of genes associated with DNA damage, oxidative stress, ER stress and protein malfolding by the bile salt, deoxycholate*. Toxicol Lett, 1999. **108**(1): p. 37-46.
127. Alnemri, E.S., et al, *Human ICE/CED-3 protease nomenclature*. Cell, 1996. **87**(2): p. 171.

128. Guo, H., et al, *Brefeldin A-mediated apoptosis requires the activation of caspases and is inhibited by Bcl-2*. Exp Cell Res, 1998. **245**(1): p. 57-68.
129. Nakagawa, T., et al, *Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta*. Nature, 2000. **403**(6765): p. 98-103.
130. Liu, H., et al, *Endoplasmic reticulum stress proteins block oxidant-induced Ca²⁺ increases and cell death*. J Biol Chem, 1998. **273**(21): p. 12858-62.
131. Sharma, K., et al, *Blood viscosity parameter correlation with types of leukemia*. Physiol Chem Phys Med NMR, 1992. **24**(2): p. 159-64.
132. Kassenbrock, C.K. and R.B. Kelly, *Interaction of heavy chain binding protein (BiP/GRP78) with adenine nucleotides*. Embo J, 1989. **8**(5): p. 1461-7.
133. Freiden, P.J., J.R. Gaut, and L.M. Hendershot, *Interconversion of three differentially modified and assembled forms of BiP*. Embo J, 1992. **11**(1): p. 63-70.
134. Morris, J.A., et al, *Immunoglobulin binding protein (BiP) function is required to protect cells from endoplasmic reticulum stress but is not required for the secretion of selective proteins*. J Biol Chem, 1997. **272**(7): p. 4327-34.
135. Li, J. and A.S. Lee, *Stress induction of GRP78/BiP and its role in cancer*. Curr Mol Med, 2006. **6**(1): p. 45-54.
136. Gazit, G., J. Lu, and A.S. Lee, *De-regulation of GRP stress protein expression in human breast cancer cell lines*. Breast Cancer Res Treat, 1999. **54**(2): p. 135-46.
137. Jamora, C., G. Dennert, and A.S. Lee, *Inhibition of tumor progression by suppression of stress protein GRP78/BiP induction in fibrosarcoma B/C10ME*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(15): p. 7690-4.
138. Shen, J., et al, *Coinduction of glucose-regulated proteins and doxorubicin resistance in Chinese hamster cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(10): p. 3278-82.
139. Jang, H.H., et al, *Phosphorylation and concomitant structural changes in human 2-Cys peroxiredoxin isotype I differentially regulate its peroxidase and molecular chaperone functions*. FEBS Lett, 2006. **580**(1): p. 351-5.
140. Shuda, M., et al, *Activation of the ATF6, XBP1 and grp78 genes in human hepatocellular carcinoma: a possible involvement of the ER stress pathway in hepatocarcinogenesis*. J Hepatol, 2003. **38**(5): p. 605-14.
141. Park, H.R., et al, *Effect on tumor cells of blocking survival response to glucose deprivation*. J Natl Cancer Inst, 2004. **96**(17): p. 1300-10.
142. Ramsay, R.G., et al, *Expression of stress response protein glucose regulated protein-78 mediated by c-Myb*. Int J Biochem Cell Biol, 2005. **37**(6): p. 1254-68.

143. Chang, J.W., et al, *Peroxiredoxin-I is an autoimmunogenic tumor antigen in non-small cell lung cancer*. FEBS Lett, 2005. **579**(13): p. 2873-7.
144. Wooden, S.K. and A.S. Lee, *Comparison of the genomic organizations of the rat grp78 and hsc73 gene and their evolutionary implications*. DNA Seq, 1992. **3**(1): p. 41-8.
145. Craig, E.A., J.S. Weissman, and A.L. Horwich, *Heat shock proteins and molecular chaperones: mediators of protein conformation and turnover in the cell*. Cell, 1994. **78**(3): p. 365-72.
146. Higashitsuji, H., et al, *The oncoprotein gankyrin negatively regulates both p53 and RB by enhancing proteasomal degradation*. Cell Cycle, 2005. **4**(10): p. 1335-7.
147. Gerner, E.W. and M.J. Schneider, *Induced thermal resistance in HeLa cells*. Nature, 1975. **256**(5517): p. 500-2.
148. Lindquist, S. and E.A. Craig, *The heat-shock proteins*. Annu Rev Genet, 1988. **22**: p. 631-77.
149. Parsell, D.A., J. Taulien, and S. Lindquist, *The role of heat-shock proteins in thermotolerance*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 1993. **339**(1289): p. 279-85; discussion 285-6.
150. Jaattela, M., *Heat shock proteins as cellular lifeguards*. Ann Med, 1999. **31**(4): p. 261-71.
151. Jolly, C. and R.I. Morimoto, *Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death*. J Natl Cancer Inst, 2000. **92**(19): p. 1564-72.
152. Ciocca, D.R., et al, *Heat shock protein hsp70 in patients with axillary lymph node-negative breast cancer: prognostic implications*. J Natl Cancer Inst, 1993. **85**(7): p. 570-4.
153. Bini, L., et al, *Protein expression profiles in human breast ductal carcinoma and histologically normal tissue*. Electrophoresis, 1997. **18**(15): p. 2832-41.
154. Patierno, S.R., et al, *Increased expression of the glucose-regulated gene encoding the Mr 78,000 glucose-regulated protein in chemically and radiation-transformed C3H 10T1/2 mouse embryo cells*. Cancer Res, 1987. **47**(23): p. 6220-4.
155. Fernandez, P.M., et al, *Overexpression of the glucose-regulated stress gene GRP78 in malignant but not benign human breast lesions*. Breast Cancer Res Treat, 2000. **59**(1): p. 15-26.

156. Ray, S., et al, *Genomic mechanisms of p210BCR-ABL signaling: induction of heat shock protein 70 through the GATA response element confers resistance to paclitaxel-induced apoptosis*. J Biol Chem, 2004. **279**(34): p. 35604-15.
157. Hamann, M., et al, *Quantitation of protein sulfinic and sulfonic acid, irreversibly oxidized protein cysteine sites in cellular proteins*. Methods Enzymol, 2002. **348**: p. 146-56.
158. Ciocca, D.R. and S.K. Calderwood, *Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications*. Cell Stress Chaperones, 2005. **10**(2): p. 86-103.
159. Luk, J.M., et al, *Proteomic profiling of hepatocellular carcinoma in Chinese cohort reveals heat-shock proteins (Hsp27, Hsp70, GRP78) up-regulation and their associated prognostic values*. Proteomics, 2006. **6**(3): p. 1049-57.
160. Shotar, A.M., *P53 and heat shock protein 70 expressions in colorectal adenocarcinoma*. Saudi Med J, 2005. **26**(10): p. 1602-6.
161. Hantschel, M., et al, *Hsp70 plasma membrane expression on primary tumor biopsy material and bone marrow of leukemic patients*. Cell Stress Chaperones, 2000. **5**(5): p. 438-42.
162. Gehrmann, M., et al, *Membrane-bound heat shock protein 70 (Hsp70) in acute myeloid leukemia: a tumor specific recognition structure for the cytolytic activity of autologous NK cells*. Haematologica, 2003. **88**(4): p. 474-6.
163. Nossner, E. and P. Parham, *Species-specific differences in chaperone interaction of human and mouse major histocompatibility complex class I molecules*. J Exp Med, 1995. **181**(1): p. 327-37.
164. Cathcart, K., et al, *A multivalent bcr-abl fusion peptide vaccination trial in patients with chronic myeloid leukemia*. Blood, 2004. **103**(3): p. 1037-42.
165. Chen, W., et al, *T-cell immunity to the joining region of p210BCR-ABL protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(4): p. 1468-72.
166. Pinilla-Ibarz, J., et al, *Vaccination of patients with chronic myelogenous leukemia with bcr-abl oncogene breakpoint fusion peptides generates specific immune responses*. Blood, 2000. **95**(5): p. 1781-7.
167. Yotnda, P., et al, *Cytotoxic T cell response against the chimeric p210 BCR-ABL protein in patients with chronic myelogenous leukemia*. J Clin Invest, 1998. **101**(10): p. 2290-6.

168. Molldrem, J.J., et al, *Evidence that specific T lymphocytes may participate in the elimination of chronic myelogenous leukemia*. Nat Med, 2000. **6**(9): p. 1018-23.
169. Dengler, R., et al, *Immunocytochemical and flow cytometric detection of proteinase 3 (myeloblastin) in normal and leukaemic myeloid cells*. Br J Haematol, 1995. **89**(2): p. 250-7.
170. Molldrem, J.J., et al, *Cytotoxic T lymphocytes specific for a nonpolymorphic proteinase 3 peptide preferentially inhibit chronic myeloid leukemia Kolony-forming units*. Blood, 1997. **90**(7): p. 2529-34.
171. Tamura, Y., et al, *Immunotherapy of tumors with autologous tumor-derived heat shock protein preparations*. Science, 1997. **278**(5335): p. 117-20.
172. Suto, R. and P.K. Srivastava, *A mechanism for the specific immunogenicity of heat shock protein-chaperoned peptides*. Science, 1995. **269**(5230): p. 1585-8.
173. Connecticut, S.d.U.o., *Study using vaccination with HSP70 for the treatment of CML in chronic Phase*. 2000-2002
174. Udono, H. and P.K. Srivastava, *Heat shock protein 70-associated peptides elicit specific cancer immunity*. J Exp Med, 1993. **178**(4): p. 1391-6.
175. Li, B., *c-Abl in oxidative stress, aging and cancer*. Cell Cycle, 2005. **4**(2): p. 246-8.
176. Antigenics, *AG-858 personalized cancer vaccine*. 2006.
177. Watson, L.M., et al, *Overexpression of the 78-kDa glucose-regulated protein/immunoglobulin-binding protein (GRP78/BiP) inhibits tissue factor procoagulant activity*. J Biol Chem, 2003. **278**(19): p. 17438-47.
178. Nemerson, Y., *Tissue factor and hemostasis*. Blood, 1988. **71**(1): p. 1-8.
179. Ruf, W. and T.S. Edgington, *Structural biology of tissue factor, the initiator of thrombogenesis in vivo*. Faseb J, 1994. **8**(6): p. 385-90.
180. van de Put, F.H. and A.C. Elliott, *The endoplasmic reticulum can act as a functional Ca²⁺ store in all subcellular regions of the pancreatic acinar cell*. J Biol Chem, 1997. **272**(44): p. 27764-70.
181. Bach, R. and D.B. Rifkin, *Expression of tissue factor procoagulant activity: regulation by cytosolic calcium*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(18): p. 6995-9.
182. Bach, R.R. and C.F. Moldow, *Mechanism of tissue factor activation on HL-60 cells*. Blood, 1997. **89**(9): p. 3270-6.
183. Carson, S.D., G.A. Perry, and S.J. Pirruccello, *Fibroblast tissue factor: calcium and ionophore induce shape changes, release of membrane vesicles, and redistribution of*

- tissue factor antigen in addition to increased procoagulant activity.* Blood, 1994. **84**(2): p. 526-34.
184. Consonni, R. and R.M. Bertina, *Antigen and functional expression of tissue factor in endotoxin stimulated U937 cells: regulation of activity by calcium ionophore A23187.* Thromb Haemost, 1995. **74**(3): p. 904-9.
185. Dorner, A.J., M.G. Krane, and R.J. Kaufman, *Reduction of endogenous GRP78 levels improves secretion of a heterologous protein in CHO cells.* Mol Cell Biol, 1988. **8**(10): p. 4063-70.
186. Dorner, A.J., L.C. Wasley, and R.J. Kaufman, *Overexpression of GRP78 mitigates stress induction of glucose regulated proteins and blocks secretion of selective proteins in Chinese hamster ovary cells.* Embo J, 1992. **11**(4): p. 1563-71.
187. Henschen, A. and F. Lottspeich, *Amino acid sequence of human fibrin. Preliminary note on the completion of the beta-chain sequence.* Hoppe Seylers Z Physiol Chem, 1977. **358**(12): p. 1643-6.
188. Blomback, B., B. Hessel, and D. Hogg, *Disulfide bridges in nh₂ -terminal part of human fibrinogen.* Thromb Res, 1976. **8**(5): p. 639-58.
189. Henschen, A., et al, *Covalent structure of fibrinogen.* Ann N Y Acad Sci, 1983. **408**: p. 28-43.
190. Chung, D.W. and E.W. Davie, *gamma and gamma' chains of human fibrinogen are produced by alternative mRNA processing.* Biochemistry, 1984. **23**(18): p. 4232-6.
191. Blomback, B., et al, *A two-step fibrinogen--fibrin transition in blood coagulation.* Nature, 1978. **275**(5680): p. 501-5.
192. Ferry, J.D., *The Mechanism of Polymerization of Fibrinogen.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1952. **38**(7): p. 566-9.
193. Fowler, W.E., et al, *Structure of the fibrin protofibril.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. **78**(8): p. 4872-6.
194. Mosesson, M.W., et al, *Identification of covalently linked trimeric and tetrameric D domains in crosslinked fibrin.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(4): p. 1113-7.
195. Mosesson, M.W., et al, *Evidence for a second type of fibril branch point in fibrin polymer networks, the trimolecular junction.* Blood, 1993. **82**(5): p. 1517-21.
196. Seegers, W.H., J.F. Johnson, and C. Fell, *An antithrombin reaction to prothrombin activation.* Am J Physiol, 1954. **176**(1): p. 97-103.

197. Schielen, W.J., et al, *The sequence A alpha-(154-159) of fibrinogen is capable of accelerating the t-PA catalysed activation of plasminogen*. Blood Coagul Fibrinolysis, 1991. **2**(3): p. 465-70.
198. Sporn, L.A., L.A. Bunce, and C.W. Francis, *Cell proliferation on fibrin: modulation by fibrinopeptide cleavage*. Blood, 1995. **86**(5): p. 1802-10.
199. Chalupowicz, D.G., et al, *Fibrin II induces endothelial cell capillary tube formation*. J Cell Biol, 1995. **130**(1): p. 207-15.
200. Bach, T.L., et al, *Endothelial cell VE-cadherin functions as a receptor for the beta15-42 sequence of fibrin*. J Biol Chem, 1998. **273**(46): p. 30719-28.
201. Ugarova, T.P., et al, *Identification of a novel recognition sequence for integrin alphaM beta2 within the gamma-chain of fibrinogen*. J Biol Chem, 1998. **273**(35): p. 22519-27.
202. Sahni, A. and C.W. Francis, *Vascular endothelial growth factor binds to fibrinogen and fibrin and stimulates endothelial cell proliferation*. Blood, 2000. **96**(12): p. 3772-8.
203. Sahni, A., L.A. Sporn, and C.W. Francis, *Potential of endothelial cell proliferation by fibrin(ogen)-bound fibroblast growth factor-2*. J Biol Chem, 1999. **274**(21): p. 14936-41.
204. Sahni, A., et al, *Interleukin-1beta but not IL-1alpha binds to fibrinogen and fibrin and has enhanced activity in the bound form*. Blood, 2004. **104**(2): p. 409-14.
205. Korte, W., *Changes of the coagulation and fibrinolysis system in malignancy: their possible impact on future diagnostic and therapeutic procedures*. Clin Chem Lab Med, 2000. **38**(8): p. 679-92.
206. Wada, H., et al, *High plasma fibrinogen level is associated with poor clinical outcome in DIC patients*. Am J Hematol, 2003. **72**(1): p. 1-7.
207. Bell, W.R., *The fibrinolytic system in neoplasia*. Semin Thromb Hemost, 1996. **22**(6): p. 459-78.
208. Rickles, F.R. and W.W. Hancock, *Antimetastatic agents. II. Summary of the interactions of tumor cells with blood coagulation factors, platelets, fibrinolytic factors, and inflammatory cells and their soluble mediators: potential for therapeutic interventions*. Semin Thromb Hemost, 1988. **14**(1): p. 126-32.
209. Castaman, G., et al, *Fibrinogen survival and fibrinopeptide A in acute leukemia*. Haematologica, 1993. **78**(6 Suppl 2): p. 52-6.

210. Cielinska, S., et al, [*Observation of D-dimer levels in serum of patients with acute leukemia*]. Pol Arch Med Wewn, 2000. **103**(1-2): p. 7-14.
211. Robbie, L., et al, *Myeloid leukaemic cells can lyse fibrin directly*. Br J Haematol, 2000. **111**(2): p. 524-9.
212. Dano, K., et al, *Plasminogen activators, tissue degradation, and cancer*. Adv Cancer Res, 1985. **44**: p. 139-266.
213. Pollanen, J., R.W. Stephens, and A. Vaheri, *Directed plasminogen activation at the surface of normal and malignant cells*. Adv Cancer Res, 1991. **57**: p. 273-328.
214. McWilliam, N., et al, *Plasminogen activator in acute myeloid leukaemic marrows: u-PA in contrast to t-PA in normal marrow*. Br J Haematol, 1998. **101**(4): p. 626-31.
215. Farrell, D.H., *Pathophysiologic roles of the fibrinogen gamma chain*. Curr Opin Hematol, 2004. **11**(3): p. 151-5.
216. Ni, H., et al, *Control of thrombus embolization and fibronectin internalization by integrin alpha IIb beta 3 engagement of the fibrinogen gamma chain*. Blood, 2003. **102**(10): p. 3609-14.
217. Mosesson, M.W., *Fibrinogen gamma chain functions*. J Thromb Haemost, 2003. **1**(2): p. 231-8.
218. Mosesson, M.W., *Antithrombin I. Inhibition of thrombin generation in plasma by fibrin formation*. Thromb Haemost, 2003. **89**(1): p. 9-12.
219. Lovely, R.S., M. Moaddel, and D.H. Farrell, *Fibrinogen gamma' chain binds thrombin exosite II*. J Thromb Haemost, 2003. **1**(1): p. 124-31.
220. Altieri, D.C., J. Plescia, and E.F. Plow, *The structural motif glycine 190-valine 202 of the fibrinogen gamma chain interacts with CD11b/CD18 integrin (alpha M beta 2, Mac-1) and promotes leukocyte adhesion*. J Biol Chem, 1993. **268**(3): p. 1847-53.
221. Sitrin, R.G., et al, *Fibrinogen activates NF-kappa B transcription factors in mononuclear phagocytes*. J Immunol, 1998. **161**(3): p. 1462-70.
222. Rubel, C., et al, *Fibrinogen promotes neutrophil activation and delays apoptosis*. J Immunol, 2001. **166**(3): p. 2002-10.
223. Flick, M.J., X. Du, and J.L. Degen, *Fibrin(ogen)-{alpha}M{beta}2 Interactions Regulate Leukocyte Function and Innate Immunity In Vivo*. Experimental Biology and Medicine, 2004. **229**(11): p. 1105-1110.
224. Busso, N., et al, *Exacerbation of antigen-induced arthritis in urokinase-deficient mice*. J Clin Invest, 1998. **102**(1): p. 41-50.

225. Sahni, A. and C.W. Francis, *Plasmic degradation modulates activity of fibrinogen-bound fibroblast growth factor-2*. J Thromb Haemost, 2003. **1**(6): p. 1271-7.
226. Ciechanover, A., *The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway*. Cell, 1994. **79**(1): p. 13-21.
227. Ciechanover, A., *Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(1): p. 79-87.
228. Glickman, M.H. and A. Ciechanover, *The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction*. Physiol Rev, 2002. **82**(2): p. 373-428.
229. Hershko, A. and A. Ciechanover, *The ubiquitin system*. Annu Rev Biochem, 1998. **67**: p. 425-79.
230. Kanayama, H.O., et al, *Demonstration that a human 26S proteolytic complex consists of a proteasome and multiple associated protein components and hydrolyzes ATP and ubiquitin-ligated proteins by closely linked mechanisms*. Eur J Biochem, 1992. **206**(2): p. 567-78.
231. Voges, D., P. Zwickl, and W. Baumeister, *The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis*. Annu Rev Biochem, 1999. **68**: p. 1015-68.
232. Groll, M., et al, *Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution*. Nature, 1997. **386**(6624): p. 463-71.
233. Lowe, J., et al, *Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon T. acidophilum at 3.4 Å resolution*. Science, 1995. **268**(5210): p. 533-9.
234. Groll, M., et al, *A gated channel into the proteasome core particle*. Nat Struct Biol, 2000. **7**(11): p. 1062-7.
235. Seemuller, E., et al, *Proteasome from Thermoplasma acidophilum: a threonine protease*. Science, 1995. **268**(5210): p. 579-82.
236. Sauer, R.T., et al, *Sculpting the proteome with AAA(+) proteases and disassembly machines*. Cell, 2004. **119**(1): p. 9-18.
237. Patel, S. and M. Latterich, *The AAA team: related ATPases with diverse functions*. Trends Cell Biol, 1998. **8**(2): p. 65-71.
238. Braun, B.C., et al, *The base of the proteasome regulatory particle exhibits chaperone-like activity*. Nat Cell Biol, 1999. **1**(4): p. 221-6.
239. Strickland, E., et al, *Recognition of misfolding proteins by PA700, the regulatory subcomplex of the 26 S proteasome*. J Biol Chem, 2000. **275**(8): p. 5565-72.
240. Smith, D.M., N. Benaroudj, and A. Goldberg, *Proteasomes and their associated ATPases: a destructive combination*. J Struct Biol, 2006. **156**(1): p. 72-83.

241. Gorbea, C., D. Taillandier, and M. Rechsteiner, *Assembly of the regulatory complex of the 26S proteasome*. Mol Biol Rep, 1999. **26**(1-2): p. 15-9.
242. Coux, O., K. Tanaka, and A.L. Goldberg, *Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes*. Annu Rev Biochem, 1996. **65**: p. 801-47.
243. Bader, N. and T. Grune, *Protein oxidation and proteolysis*. Biol Chem, 2006. **387**(10-11): p. 1351-5.
244. Rajkumar, S.V., et al, *Proteasome inhibition as a novel therapeutic target in human cancer*. J Clin Oncol, 2005. **23**(3): p. 630-9.
245. Wang, J. and M.A. Maldonado, *The ubiquitin-proteasome system and its role in inflammatory and autoimmune diseases*. Cell Mol Immunol, 2006. **3**(4): p. 255-61.
246. Keck, S., et al, *Proteasome inhibition by paired helical filament-tau in brains of patients with Alzheimer's disease*. J Neurochem, 2003. **85**(1): p. 115-22.
247. Keller, J.N., K.B. Hanni, and W.R. Markesbery, *Impaired proteasome function in Alzheimer's disease*. J Neurochem, 2000. **75**(1): p. 436-9.
248. Sitte, N., et al, *Proteasome inhibition by lipofuscin/ceroid during postmitotic aging of fibroblasts*. Faseb J, 2000. **14**(11): p. 1490-8.
249. Stadtman, E.R., *Protein oxidation and aging*. Science, 1992. **257**(5074): p. 1220-4.
250. Friguet, B. and L.I. Szwedda, *Inhibition of the multicatalytic proteinase (proteasome) by 4-hydroxy-2-nonenal cross-linked protein*. FEBS Lett, 1997. **405**(1): p. 21-5.
251. Shringarpure, R., et al, *4-Hydroxynonenal-modified amyloid-beta peptide inhibits the proteasome: possible importance in Alzheimer's disease*. Cell Mol Life Sci, 2000. **57**(12): p. 1802-9.
252. Jakob, C., et al, *Circulating proteasome levels are an independent prognostic factor for survival in multiple myeloma*. Blood, 2006.
253. Spataro, V., K. Simmen, and C.A. Realini, *The essential 26S proteasome subunit Rpn11 confers multidrug resistance to mammalian cells*. Anticancer Res, 2002. **22**(6C): p. 3905-9.
254. Beyer, A., *Sequence analysis of the AAA protein family*. Protein Sci, 1997. **6**(10): p. 2043-58.
255. Walker, J.E., et al, *Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold*. Embo J, 1982. **1**(8): p. 945-51.
256. Lupas, A.N. and J. Martin, *AAA proteins*. Curr Opin Struct Biol, 2002. **12**(6): p. 746-53.

257. Kohler, A., et al, *The axial channel of the proteasome core particle is gated by the Rpt2 ATPase and controls both substrate entry and product release*. Mol Cell, 2001. **7**(6): p. 1143-52.
258. Glickman, M.H., et al, *Functional analysis of the proteasome regulatory particle*. Mol Biol Rep, 1999. **26**(1-2): p. 21-8.
259. Chang, T.S., et al, *Characterization of mammalian sulfiredoxin and its reactivation of hyperoxidized peroxiredoxin through reduction of cysteine sulfinic acid in the active site to cysteine*. J Biol Chem, 2004. **279**(49): p. 50994-1001.
260. Glover, J.R. and S. Lindquist, *Hsp104, Hsp70, and Hsp40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins*. Cell, 1998. **94**(1): p. 73-82.
261. Weibezahn, J., et al, *Thermotolerance requires refolding of aggregated proteins by substrate translocation through the central pore of ClpB*. Cell, 2004. **119**(5): p. 653-65.
262. Reuber, B.E., et al, *Mutations in PEX1 are the most common cause of peroxisome biogenesis disorders*. Nat Genet, 1997. **17**(4): p. 445-8.
263. Watts, G.D., et al, *Inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia is caused by mutant valosin-containing protein*. Nat Genet, 2004. **36**(4): p. 377-81.
264. Guan, Z., et al, *A spontaneous recurrent seizure-related Rattus NSF gene identified by linker capture subtraction*. Brain Res Mol Brain Res, 2001. **87**(1): p. 117-23.
265. Mirnics, K., et al, *Molecular characterization of schizophrenia viewed by microarray analysis of gene expression in prefrontal cortex*. Neuron, 2000. **28**(1): p. 53-67.
266. Kumatori, A., et al, *Abnormally high expression of proteasomes in human leukemic cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(18): p. 7071-5.
267. Mitsiades, C.S., et al, *Proteasome inhibition as a therapeutic strategy for hematologic malignancies*. Expert Rev Anticancer Ther, 2005. **5**(3): p. 465-76.
268. Adams, J., et al, *Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents*. Cancer Res, 1999. **59**(11): p. 2615-22.
269. Richardson, P.G., et al, *A phase 2 study of bortezomib in relapsed, refractory myeloma*. N Engl J Med, 2003. **348**(26): p. 2609-17.
270. Kane, R.C., et al, *Velcade: U.S. FDA approval for the treatment of multiple myeloma progressing on prior therapy*. Oncologist, 2003. **8**(6): p. 508-13.
271. Boccadoro, M., G. Morgan, and J. Cavenagh, *Preclinical evaluation of the proteasome inhibitor bortezomib in cancer therapy*. Cancer Cell Int, 2005. **5**(1): p. 18.

272. Dou, Q.P., et al, *Proteasome inhibition leads to significant reduction of Bcr-Abl expression and subsequent induction of apoptosis in K562 human chronic myelogenous leukemia cells*. J Pharmacol Exp Ther, 1999. **289**(2): p. 781-90.
273. Orłowski, R.Z., et al, *Phase I trial of the proteasome inhibitor PS-341 in patients with refractory hematologic malignancies*. J Clin Oncol, 2002. **20**(22): p. 4420-7.
274. Cheson, B.D., *Hematologic malignancies: new developments and future treatments*. Semin Oncol, 2002. **29**(4 Suppl 13): p. 33-45.
275. Ludwig, H., et al, *Proteasome inhibition and its clinical prospects in the treatment of hematologic and solid malignancies*. Cancer, 2005. **104**(9): p. 1794-807.
276. Masdehors, P., et al, *Ubiquitin-proteasome system and increased sensitivity of B-CLL lymphocytes to apoptotic death activation*. Leuk Lymphoma, 2000. **38**(5-6): p. 499-504.
277. Orłowski, R.Z., et al, *Tumor growth inhibition induced in a murine model of human Burkitt's lymphoma by a proteasome inhibitor*. Cancer Res, 1998. **58**(19): p. 4342-8.
278. Shimbara, N., et al, *Regulation of gene expression of proteasomes (multi-protease complexes) during growth and differentiation of human hematopoietic cells*. J Biol Chem, 1992. **267**(25): p. 18100-9.
279. Gatto, S., et al, *The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth and induces apoptosis in Bcr/Abl-positive cell lines sensitive and resistant to imatinib mesylate*. Haematologica, 2003. **88**(8): p. 853-63.
280. Mitsiades, N., et al, *Molecular sequelae of proteasome inhibition in human multiple myeloma cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(22): p. 14374-9.
281. Hideshima, T., et al, *The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells*. Cancer Res, 2001. **61**(7): p. 3071-6.
282. Dubiel, W., et al, *Purification of an 11 S regulator of the multicatalytic protease*. J Biol Chem, 1992. **267**(31): p. 22369-77.
283. Gray, C.W., C.A. Slaughter, and G.N. DeMartino, *PA28 activator protein forms regulatory caps on proteasome stacked rings*. J Mol Biol, 1994. **236**(1): p. 7-15.
284. Ma, C.P., C.A. Slaughter, and G.N. DeMartino, *Identification, purification, and characterization of a protein activator (PA28) of the 20 S proteasome (macropain)*. J Biol Chem, 1992. **267**(15): p. 10515-23.
285. DeMartino, G.N. and C.A. Slaughter, *Regulatory proteins of the proteasome*. Enzyme Protein, 1993. **47**(4-6): p. 314-24.

286. Rechsteiner, M., L. Hoffman, and W. Dubiel, *The multicatalytic and 26 S proteases*. J Biol Chem, 1993. **268**(9): p. 6065-8.
287. Rubin, D.M. and D. Finley, *Proteolysis. The proteasome: a protein-degrading organelle?* Curr Biol, 1995. **5**(8): p. 854-8.
288. Song, X., et al, *Relative functions of the alpha and beta subunits of the proteasome activator, PA28*. J Biol Chem, 1997. **272**(44): p. 27994-8000.
289. Kuehn, L. and B. Dahlmann, *Structural and functional properties of proteasome activator PA28*. Mol Biol Rep, 1997. **24**(1-2): p. 89-93.
290. Jakob, C., et al, *Circulating proteasome levels are an independent prognostic factor for survival in multiple myeloma*. Blood, 2007. **109**(5): p. 2100-5.
291. Adams, J., et al, *Potent and selective inhibitors of the proteasome: dipeptidyl boronic acids*. Bioorg Med Chem Lett, 1998. **8**(4): p. 333-8.
292. Zhang, D., S.G. Lim, and E.S. Koay, *Proteomic identification of down-regulation of oncoprotein DJ-1 and proteasome activator subunit 1 in hepatitis B virus-infected well-differentiated hepatocellular carcinoma*. Int J Oncol, 2007. **31**(3): p. 577-84.
293. Miyagi, T., et al, *Impaired expression of proteasome subunits and human leukocyte antigens class I in human Kolon cancer cells*. J Gastroenterol Hepatol, 2003. **18**(1): p. 32-40.
294. Salgia, R., et al, *Increased tyrosine phosphorylation of focal adhesion proteins in myeloid cell lines expressing p210BCR/ABL*. Oncogene, 1995. **11**(6): p. 1149-55.
295. Bhatia, R., et al, *Interferon-alpha restores normal adhesion of chronic myelogenous leukemia hematopoietic progenitors to bone marrow stroma by correcting impaired beta 1 integrin receptor function*. J Clin Invest, 1994. **94**(1): p. 384-91.
296. Dowding, C., et al, *Interferon-alpha overrides the deficient adhesion of chronic myeloid leukemia primitive progenitor cells to bone marrow stromal cells*. Blood, 1991. **78**(2): p. 499-505.
297. Gordon, M.Y., et al, *Altered adhesive interactions with marrow stroma of haematopoietic progenitor cells in chronic myeloid leukaemia*. Nature, 1987. **328**(6128): p. 342-4.
298. Davis, L.S., et al, *Fibronectin promotes proliferation of naive and memory T cells by signaling through both the VLA-4 and VLA-5 integrin molecules*. J Immunol, 1990. **145**(3): p. 785-93.
299. Verfaillie, C.M., J.B. McCarthy, and P.B. McGlave, *Mechanisms underlying abnormal trafficking of malignant progenitors in chronic myelogenous leukemia*.

- Decreased adhesion to stroma and fibronectin but increased adhesion to the basement membrane components laminin and collagen type IV.* J Clin Invest, 1992. **90**(4): p. 1232-41.
300. Gotoh, A., et al, *Tyrosine phosphorylation and activation of focal adhesion kinase (p125FAK) by BCR-ABL oncoprotein.* Exp Hematol, 1995. **23**(11): p. 1153-9.
301. McWhirter, J.R. and J.Y. Wang, *An actin-binding function contributes to transformation by the Bcr-Abl oncoprotein of Philadelphia chromosome-positive human leukemias.* Embo J, 1993. **12**(4): p. 1533-46.
302. Oda, T., et al, *Crkl is the major tyrosine-phosphorylated protein in neutrophils from patients with chronic myelogenous leukemia.* J Biol Chem, 1994. **269**(37): p. 22925-8.
303. Salgia, R., et al, *Molecular cloning of human paxillin, a focal adhesion protein phosphorylated by P210BCR/ABL.* J Biol Chem, 1995. **270**(10): p. 5039-47.
304. McWhirter, J.R. and J.Y. Wang, *Activation of tyrosinase kinase and microfilament-binding functions of c-abl by bcr sequences in bcr/abl fusion proteins.* Mol Cell Biol, 1991. **11**(3): p. 1553-65.
305. Van Etten, R.A., et al, *The COOH terminus of the c-Abl tyrosine kinase contains distinct F- and G-actin binding domains with bundling activity.* J Cell Biol, 1994. **124**(3): p. 325-40.
306. Salgia, R., et al, *BCR/ABL induces multiple abnormalities of cytoskeletal function.* J Clin Invest, 1997. **100**(1): p. 46-57.
307. Burridge, K., et al, *Focal adhesions: transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton.* Annu Rev Cell Biol, 1988. **4**: p. 487-525.
308. Burridge, K., C.E. Turner, and L.H. Romer, *Tyrosine phosphorylation of paxillin and pp125FAK accompanies cell adhesion to extracellular matrix: a role in cytoskeletal assembly.* J Cell Biol, 1992. **119**(4): p. 893-903.
309. Birge, R.B., et al, *Identification and characterization of a high-affinity interaction between v-Crk and tyrosine-phosphorylated paxillin in CT10-transformed fibroblasts.* Mol Cell Biol, 1993. **13**(8): p. 4648-56.
310. Weng, Z., et al, *Detection of Src homology 3-binding proteins, including paxillin, in normal and v-Src-transformed Balb/c 3T3 cells.* J Biol Chem, 1993. **268**(20): p. 14956-63.
311. Turner, C.E., J.R. Glenney, Jr., and K. Burridge, *Paxillin: a new vinculin-binding protein present in focal adhesions.* J Cell Biol, 1990. **111**(3): p. 1059-68.

312. Turner, C.E., M.D. Schaller, and J.T. Parsons, *Tyrosine phosphorylation of the focal adhesion kinase pp125FAK during development: relation to paxillin*. J Cell Sci, 1993. **105 (Pt 3)**: p. 637-45.
313. Matulonis, U., et al, *Interleukin-3 and p210 BCR/ABL activate both unique and overlapping pathways of signal transduction in a factor-dependent myeloid cell line*. Exp Hematol, 1993. **21(11)**: p. 1460-6.
314. Turner, C.E. and J.T. Miller, *Primary sequence of paxillin contains putative SH2 and SH3 domain binding motifs and multiple LIM domains: identification of a vinculin and pp125Fak-binding region*. J Cell Sci, 1994. **107 (Pt 6)**: p. 1583-91.
315. Leung, M.F., T.S. Lin, and A.C. Sartorelli, *Changes in actin and actin-binding proteins during the differentiation of HL-60 leukemia cells*. Cancer Res, 1992. **52(11)**: p. 3063-6.
316. Laurent, E., et al, *The BCR gene and philadelphia chromosome-positive leukemogenesis*. Cancer Res, 2001. **61(6)**: p. 2343-55.
317. Gerke, V. and S.E. Moss, *Annexins: from structure to function*. Physiol Rev, 2002. **82(2)**: p. 331-71.
318. Di Rosa, M., et al, *Anti-phospholipase proteins*. Prostaglandins, 1984. **28(4)**: p. 441-2.
319. Goulding, N.J. and P.M. Guyre, *Lipocortin 1 binding to human leukocytes correlates with its ability to inhibit IgG interactions with Fc gamma receptors*. Biochem Biophys Res Commun, 1993. **192(2)**: p. 351-8.
320. Flower, R.J., *Eleventh Gaddum memorial lecture. Lipocortin and the mechanism of action of the glucocorticoids*. Br J Pharmacol, 1988. **94(4)**: p. 987-1015.
321. Wallner, B.P., et al, *Cloning and expression of human lipocortin, a phospholipase A2 inhibitor with potential anti-inflammatory activity*. Nature, 1986. **320(6057)**: p. 77-81.
322. Cirino, G., et al, *Human recombinant lipocortin 1 has acute local anti-inflammatory properties in the rat paw edema test*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86(9)**: p. 3428-32.
323. Hannon, R., et al, *Aberrant inflammation and resistance to glucocorticoids in annexin 1-/- mouse*. Faseb J, 2003. **17(2)**: p. 253-5.
324. Getting, S.J., R.J. Flower, and M. Perretti, *Inhibition of neutrophil and monocyte recruitment by endogenous and exogenous lipocortin 1*. Br J Pharmacol, 1997. **120(6)**: p. 1075-82.

325. Solito, E., et al, *Annexin 1 binds to U937 monocytic cells and inhibits their adhesion to microvascular endothelium: involvement of the alpha 4 beta 1 integrin*. J Immunol, 2000. **165**(3): p. 1573-81.
326. Alldridge, L.C., et al, *The annexin protein lipocortin 1 regulates the MAPK/ERK pathway*. J Biol Chem, 1999. **274**(53): p. 37620-8.
327. Almawi, W.Y., et al, *Partial mediation of glucocorticoid antiproliferative effects by lipocortins*. J Immunol, 1996. **157**(12): p. 5231-9.
328. Kamal, A.M., R.J. Flower, and M. Perretti, *An overview of the effects of annexin 1 on cells involved in the inflammatory process*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2005. **100 Suppl 1**: p. 39-47.
329. Philip, J.G., R.J. Flower, and J.C. Buckingham, *Blockade of the classical pathway of protein secretion does not affect the cellular exportation of lipocortin 1*. Regul Pept, 1998. **73**(2): p. 133-9.
330. Comera, C. and F. Russo-Marie, *Glucocorticoid-induced annexin 1 secretion by monocytes and peritoneal leukocytes*. Br J Pharmacol, 1995. **115**(6): p. 1043-7.
331. Goulding, N.J., et al, *Novel pathways for glucocorticoid effects on neutrophils in chronic inflammation*. Inflamm Res, 1998. **47 Suppl 3**: p. S158-65.
332. Perretti, M., *Endogenous mediators that inhibit the leukocyte-endothelium interaction*. Trends Pharmacol Sci, 1997. **18**(11): p. 418-25.
333. Perretti, M. and E. Solito, *Annexin 1 and neutrophil apoptosis*. Biochem Soc Trans, 2004. **32**(Pt3): p. 507-10.
334. Parente, L. and E. Solito, *Annexin 1: more than an anti-phospholipase protein*. Inflamm Res, 2004. **53**(4): p. 125-32.
335. Chiang, Y., et al, *Specific down-regulation of annexin II expression in human cells interferes with cell proliferation*. Mol Cell Biochem, 1999. **199**(1-2): p. 139-47.
336. Merrifield, C.J., et al, *Annexin 2 has an essential role in actin-based macropinocytic rocketing*. Curr Biol, 2001. **11**(14): p. 1136-41.
337. Konig, J., et al, *The annexin II-p11 complex is involved in regulated exocytosis in bovine pulmonary artery endothelial cells*. J Biol Chem, 1998. **273**(31): p. 19679-84.
338. Gilmore, W.S., et al, *Annexin A2 expression during cellular differentiation in myeloid cell lines*. Biochem Soc Trans, 2004. **32**(Pt 6): p. 1122-3.
339. Tanaka, T., et al, *Expression of stress-response and cell proliferation genes in renal cell carcinoma induced by oxidative stress*. Am J Pathol, 2000. **156**(6): p. 2149-57.

340. Kim, G.Y., et al, *Chaperone-like function of lipocortin I*. *Biochem Mol Biol Int*, 1997. **43**(3): p. 521-8.
341. Rhee, S.G., et al, *Hydrogen peroxide: a key messenger that modulates protein phosphorylation through cysteine oxidation*. *Sci STKE*, 2000. **2000**(53): p. PE1.
342. Relton, J.K., et al, *Lipocortin-1 is an endogenous inhibitor of ischemic damage in the rat brain*. *J Exp Med*, 1991. **174**(2): p. 305-10.
343. Gidrol, X., et al, *Annexin-like protein from Arabidopsis thaliana rescues delta oxyR mutant of Escherichia coli from H2O2 stress*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(20): p. 11268-73.
344. Kovacs, I., et al, *Immunolocalization of a novel annexin-like protein encoded by a stress and abscisic acid responsive gene in alfalfa*. *Plant J*, 1998. **15**(2): p. 185-97.
345. Sonna, L.A., et al, *Invited review: Effects of heat and cold stress on mammalian gene expression*. *J Appl Physiol*, 2002. **92**(4): p. 1725-42.
346. Rand, J.H., *The annexinopathies: a new category of diseases*. *Biochim Biophys Acta*, 2000. **1498**(2-3): p. 169-73.
347. Menell, J.S., et al, *Annexin II and bleeding in acute promyelocytic leukemia*. *N Engl J Med*, 1999. **340**(13): p. 994-1004.
348. Olwill, S.A., et al, *Annexin II cell surface and mRNA expression in human acute myeloid leukaemia cell lines*. *Thromb Res*, 2005. **115**(1-2): p. 109-14.
349. Olwill, S.A., et al, *All-trans retinoic acid-induced downregulation of annexin II expression in myeloid leukaemia cell lines is not confined to acute promyelocytic leukaemia*. *Br J Haematol*, 2005. **131**(2): p. 258-64.
350. Chiang, Y., R.G. Davis, and J.K. Vishwanatha, *Altered expression of annexin II in human B-cell lymphoma cell lines*. *Biochim Biophys Acta*, 1996. **1313**(3): p. 295-301.
351. Sharma, M.R., et al, *Angiogenesis-associated protein annexin II in breast cancer: selective expression in invasive breast cancer and contribution to tumor invasion and progression*. *Exp Mol Pathol*, 2006. **81**(2): p. 146-56.
352. de Bont, J.M., et al, *Identification of novel biomarkers in pediatric primitive neuroectodermal tumors and ependymomas by proteome-wide analysis*. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2007. **66**(6): p. 505-16.
353. Frey, B.M., et al, *Annexin I modulates cell functions by controlling intracellular calcium release*. *Faseb J*, 1999. **13**(15): p. 2235-45.

354. Vaarala, M.H., et al, *Differentially expressed genes in two LNCaP prostate cancer cell lines reflecting changes during prostate cancer progression*. Lab Invest, 2000. **80**(8): p. 1259-68.
355. Emmert-Buck, M.R., et al, *An approach to proteomic analysis of human tumors*. Mol Carcinog, 2000. **27**(3): p. 158-65.
356. de Coupade, C., et al, *Annexin I expression and phosphorylation are upregulated during liver regeneration and transformation in antithrombin III SV40 T large antigen transgenic mice*. Hepatology, 2000. **31**(2): p. 371-80.
357. Pencil, S.D. and M. Toth, *Elevated levels of annexin I protein in vitro and in vivo in rat and human mammary adenocarcinoma*. Clin Exp Metastasis, 1998. **16**(2): p. 113-21.
358. Sinha, P., et al, *Increased expression of annexin I and thioredoxin detected by two-dimensional gel electrophoresis of drug resistant human stomach cancer cells*. J Biochem Biophys Methods, 1998. **37**(3): p. 105-16.
359. Sato, N., et al, *Thiol-mediated redox regulation of apoptosis. Possible roles of cellular thiols other than glutathione in T cell apoptosis*. J Immunol, 1995. **154**(7): p. 3194-203.
360. Wu, Y.L., et al, *Upregulation of lipocortin 1 inhibits tumour necrosis factor-induced apoptosis in human leukaemic cells: a possible mechanism of resistance to immune surveillance*. Br J Haematol, 2000. **111**(3): p. 807-16.
361. Wu, Y.L., et al, *Failure to activate cytosolic phospholipase A2 causes TNF resistance in human leukemic cells*. J Immunol, 1998. **160**(12): p. 5929-35.
362. Chae, H.Z., et al, *Cloning and sequencing of thiol-specific antioxidant from mammalian brain: alkyl hydroperoxide reductase and thiol-specific antioxidant define a large family of antioxidant enzymes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(15): p. 7017-21.
363. Torian, B.E., et al, *cDNA sequence analysis of a 29-kDa cysteine-rich surface antigen of pathogenic Entamoeba histolytica*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(16): p. 6358-62.
364. O'Toole, P.W., et al, *Isolation and biochemical and molecular analyses of a species-specific protein antigen from the gastric pathogen Helicobacter pylori*. J Bacteriol, 1991. **173**(2): p. 505-13.

365. Yamaguchi, R., et al, *Cloning and expression of the gene for the Avi-3 antigen of Mycobacterium avium and mapping of its epitopes*. Infect Immun, 1992. **60**(3): p. 1210-6.
366. Chae, H.Z., S.J. Chung, and S.G. Rhee, *Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast*. J Biol Chem, 1994. **269**(44): p. 27670-8.
367. Fujii, J. and Y. Ikeda, *Advances in our understanding of peroxiredoxin, a multifunctional, mammalian redox protein*. Redox Rep, 2002. **7**(3): p. 123-30.
368. Hofmann, B., H.J. Hecht, and L. Flohe, *Peroxiredoxins*. Biol Chem, 2002. **383**(3-4): p. 347-64.
369. Choi, H.J., et al, *Crystal structure of a novel human peroxidase enzyme at 2.0 Å resolution*. Nat Struct Biol, 1998. **5**(5): p. 400-6.
370. Ellis, H.R. and L.B. Poole, *Novel application of 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole to identify cysteine sulfenic acid in the AhpC component of alkyl hydroperoxide reductase*. Biochemistry, 1997. **36**(48): p. 15013-8.
371. Alphey, M.S., et al, *The structure of reduced tryparedoxin peroxidase reveals a decamer and insight into reactivity of 2Cys-peroxiredoxins*. J Mol Biol, 2000. **300**(4): p. 903-16.
372. Hirotsu, S., et al, *Crystal structure of a multifunctional 2-Cys peroxiredoxin heme-binding protein 23 kDa/proliferation-associated gene product*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(22): p. 12333-8.
373. Wood, Z.A., et al, *Dimers to doughnuts: redox-sensitive oligomerization of 2-cysteine peroxiredoxins*. Biochemistry, 2002. **41**(17): p. 5493-504.
374. Prosperi, M.T., et al, *A human cDNA corresponding to a gene overexpressed during cell proliferation encodes a product sharing homology with amoebic and bacterial proteins*. J Biol Chem, 1993. **268**(15): p. 11050-6.
375. Shau, H. and A. Kim, *Identification of natural killer enhancing factor as a major antioxidant in human red blood cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1994. **199**(1): p. 83-8.
376. Finkel, T., *Oxygen radicals and signaling*. Curr Opin Cell Biol, 1998. **10**(2): p. 248-53.
377. Rhee, S.G., *Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger*. Exp Mol Med, 1999. **31**(2): p. 53-9.

378. Chae, H.Z., et al, *Characterization of three isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in the presence of thioredoxin*. *Diabetes Res Clin Pract*, 1999. **45**(2-3): p. 101-12.
379. Jin, D.Y., et al, *Regulatory role for a novel human thioredoxin peroxidase in NF-kappaB activation*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(49): p. 30952-61.
380. Kang, S.W., et al, *Mammalian peroxiredoxin isoforms can reduce hydrogen peroxide generated in response to growth factors and tumor necrosis factor-alpha*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(11): p. 6297-302.
381. Kang, S.W., et al, *Cytosolic peroxiredoxin attenuates the activation of Jnk and p38 but potentiates that of Erk in Hela cells stimulated with tumor necrosis factor-alpha*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(4): p. 2535-43.
382. Kwon, J., et al, *Reversible oxidation and inactivation of the tumor suppressor PTEN in cells stimulated with peptide growth factors*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(47): p. 16419-24.
383. Zhang, P., et al, *Thioredoxin peroxidase is a novel inhibitor of apoptosis with a mechanism distinct from that of Bcl-2*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(49): p. 30615-8.
384. Chang, T.S., et al, *Regulation of peroxiredoxin I activity by Cdc2-mediated phosphorylation*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(28): p. 25370-6.
385. Cha, M.K., C.H. Yun, and I.H. Kim, *Interaction of human thiol-specific antioxidant protein I with erythrocyte plasma membrane*. *Biochemistry*, 2000. **39**(23): p. 6944-50.
386. Koo, K.H., et al, *Regulation of thioredoxin peroxidase activity by C-terminal truncation*. *Arch Biochem Biophys*, 2002. **397**(2): p. 312-8.
387. Yang, K.S., et al, *Inactivation of human peroxiredoxin I during catalysis as the result of the oxidation of the catalytic site cysteine to cysteine-sulfinic acid*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(41): p. 38029-36.
388. Woo, H.A., et al, *Reversing the inactivation of peroxiredoxins caused by cysteine sulfinic acid formation*. *Science*, 2003. **300**(5619): p. 653-6.
389. Woo, H.A., et al, *Reversible oxidation of the active site cysteine of peroxiredoxins to cysteine sulfinic acid. Immunoblot detection with antibodies specific for the hyperoxidized cysteine-containing sequence*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(48): p. 47361-4.
390. Biteau, B., J. Labarre, and M.B. Toledano, *ATP-dependent reduction of cysteine-sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin*. *Nature*, 2003. **425**(6961): p. 980-4.
391. Wood, Z.A., L.B. Poole, and P.A. Karplus, *Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling*. *Science*, 2003. **300**(5619): p. 650-3.

392. Wood, Z.A., et al, *Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins*. Trends Biochem Sci, 2003. **28**(1): p. 32-40.
393. Chauhan, R. and S.C. Mande, *Characterization of the Mycobacterium tuberculosis H37Rv alkyl hydroperoxidase AhpC points to the importance of ionic interactions in oligomerization and activity*. Biochem J, 2001. **354**(Pt 1): p. 209-15.
394. Kitano, K., et al, *Stimulation of peroxidase activity by decamerization related to ionic strength: AhpC protein from Amphibacillus xylanus*. J Biochem, 1999. **126**(2): p. 313-9.
395. Shau, H., et al, *Cloning and sequence analysis of candidate human natural killer-enhancing factor genes*. Immunogenetics, 1994. **40**(2): p. 129-34.
396. Shau, H., R.K. Gupta, and S.H. Golub, *Identification of a natural killer enhancing factor (NKEF) from human erythroid cells*. Cell Immunol, 1993. **147**(1): p. 1-11.
397. Shau, H., et al, *Thioredoxin peroxidase (natural killer enhancing factor) regulation of activator protein-1 function in endothelial cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **249**(3): p. 683-6.
398. Sun, Y., *Free radicals, antioxidant enzymes, and carcinogenesis*. Free Radic Biol Med, 1990. **8**(6): p. 583-99.
399. Hampton, M.B., B. Fadeel, and S. Orrenius, *Redox regulation of the caspases during apoptosis*. Ann N Y Acad Sci, 1998. **854**: p. 328-35.
400. Yo, Y.D., et al, *Synergistic effect of peroxiredoxin II antisense on cisplatin-induced cell death*. Exp Mol Med, 2002. **34**(4): p. 273-7.
401. Kinnula, V.L., P. Paakko, and Y. Soini, *Antioxidant enzymes and redox regulating thiol proteins in malignancies of human lung*. FEBS Lett, 2004. **569**(1-3): p. 1-6.
402. Lehtonen, S.T., et al, *Peroxiredoxins, a novel protein family in lung cancer*. Int J Cancer, 2004. **111**(4): p. 514-21.
403. Alfonso, P., et al, *Proteomic analysis of lung biopsies: Differential protein expression profile between peritumoral and tumoral tissue*. Proteomics, 2004. **4**(2): p. 442-7.
404. Yanagawa, T., et al, *Peroxiredoxin I expression in human thyroid tumors*. Cancer Lett, 1999. **145**(1-2): p. 127-32.
405. Yanagawa, T., et al, *Peroxiredoxin I expression in oral cancer: a potential new tumor marker*. Cancer Lett, 2000. **156**(1): p. 27-35.
406. Di Pietro, R., et al, *Peroxiredoxin genes are not induced in myeloid leukemia cells exposed to ionizing radiation*. Int J Immunopathol Pharmacol, 2006. **19**(3): p. 517-24.

407. Chen, M.F., et al, *Inhibition of lung tumor growth and augmentation of radiosensitivity by decreasing peroxiredoxin I expression*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2006. **64**(2): p. 581-91.
408. Chung, Y.M., et al, *Increased expression of peroxiredoxin II confers resistance to cisplatin*. Anticancer Res, 2001. **21**(2A): p. 1129-33.
409. Park, S.H., et al, *Antisense of human peroxiredoxin II enhances radiation-induced cell death*. Clin Cancer Res, 2000. **6**(12): p. 4915-20.
410. Kim, J.H., et al, *Elevated peroxiredoxin 1, but not NF-E2-related factor 2, is an independent prognostic factor for disease recurrence and reduced survival in stage I non-small cell lung cancer*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(13): p. 3875-82.
411. Iwao-Koizumi, K., et al, *Prediction of docetaxel response in human breast cancer by gene expression profiling*. J Clin Oncol, 2005. **23**(3): p. 422-31.
412. Jang, H.H., et al, *Two enzymes in one; two yeast peroxiredoxins display oxidative stress-dependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function*. Cell, 2004. **117**(5): p. 625-35.
413. Kim, Y.J., et al, *Prx1 suppresses radiation-induced c-Jun NH2-terminal kinase signaling in lung cancer cells through interaction with the glutathione S-transferase Pi/c-Jun NH2-terminal kinase complex*. Cancer Res, 2006. **66**(14): p. 7136-42.
414. Jung, H., et al, *Regulation of macrophage migration inhibitory factor and thiol-specific antioxidant protein PAG by direct interaction*. J Biol Chem, 2001. **276**(18): p. 15504-10.
415. Mu, Z.M., X.Y. Yin, and E.V. Prochownik, *Pag, a putative tumor suppressor, interacts with the Myc Box II domain of c-Myc and selectively alters its biological function and target gene expression*. J Biol Chem, 2002. **277**(45): p. 43175-84.
416. Wen, S.T. and R.A. Van Etten, *The PAG gene product, a stress-induced protein with antioxidant properties, is an Abl SH3-binding protein and a physiological inhibitor of c-Abl tyrosine kinase activity*. Genes Dev, 1997. **11**(19): p. 2456-67.
417. Pendergast, A.M., *The Abl family kinases: mechanisms of regulation and signaling*. Adv Cancer Res, 2002. **85**: p. 51-100.
418. Wang, J.Y., *Regulation of cell death by the Abl tyrosine kinase*. Oncogene, 2000. **19**(49): p. 5643-50.
419. Cao, C., Y. Leng, and D. Kufe, *Catalase activity is regulated by c-Abl and Arg in the oxidative stress response*. J Biol Chem, 2003. **278**(32): p. 29667-75.

420. Dorsch, M. and S.P. Goff, *Increased sensitivity to apoptotic stimuli in c-abl-deficient progenitor B-cell lines*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(23): p. 13131-6.
421. Koleske, A.J., et al, *Essential roles for the Abl and Arg tyrosine kinases in neurulation*. Neuron, 1998. **21**(6): p. 1259-72.
422. Hussain, S.P., L.J. Hofseth, and C.C. Harris, *Radical causes of cancer*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(4): p. 276-85.
423. Neumann, C.A., et al, *Essential role for the peroxiredoxin Prdx1 in erythrocyte antioxidant defence and tumour suppression*. Nature, 2003. **424**(6948): p. 561-5.
424. Ray, R. and D.M. Miller, *Cloning and characterization of a human c-myc promoter-binding protein*. Mol Cell Biol, 1991. **11**(4): p. 2154-61.
425. Subramanian, A. and D.M. Miller, *Structural analysis of alpha-enolase. Mapping the functional domains involved in down-regulation of the c-myc protooncogene*. J Biol Chem, 2000. **275**(8): p. 5958-65.
426. Nakagawa, K., et al, *Plasma levels of soluble fibrin in patients with malignancy-associated disseminated intravascular coagulation*. Blood Coagul Fibrinolysis, 1994. **5**(5): p. 725-30.
427. Nahm, D.H., et al, *Identification of alpha-enolase as an autoantigen associated with severe asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2006. **118**(2): p. 376-81.
428. Lee, A.H., et al, *Proteasome inhibitors disrupt the unfolded protein response in myeloma cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(17): p. 9946-51.
429. Giallongo, A., et al, *Molecular cloning and nucleotide sequence of a full-length cDNA for human alpha enolase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(18): p. 6741-5.
430. Ossipow, V., P. Descombes, and U. Schibler, *CCAAT/enhancer-binding protein mRNA is translated into multiple proteins with different transcription activation potentials*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(17): p. 8219-23.
431. Calligaris, R., et al, *Alternative translation initiation site usage results in two functionally distinct forms of the GATA-1 transcription factor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(25): p. 11598-602.
432. Delmas, V., et al, *Alternative usage of initiation codons in mRNA encoding the cAMP-responsive-element modulator generates regulators with opposite functions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(10): p. 4226-30.
433. Tobler, A., E. Schreiber, and A. Fontana, *The human Oct-6 POU transcription factor lacks the first 50 amino acids of its murine counterpart*. Nucleic Acids Res, 1993. **21**(4): p. 1043.

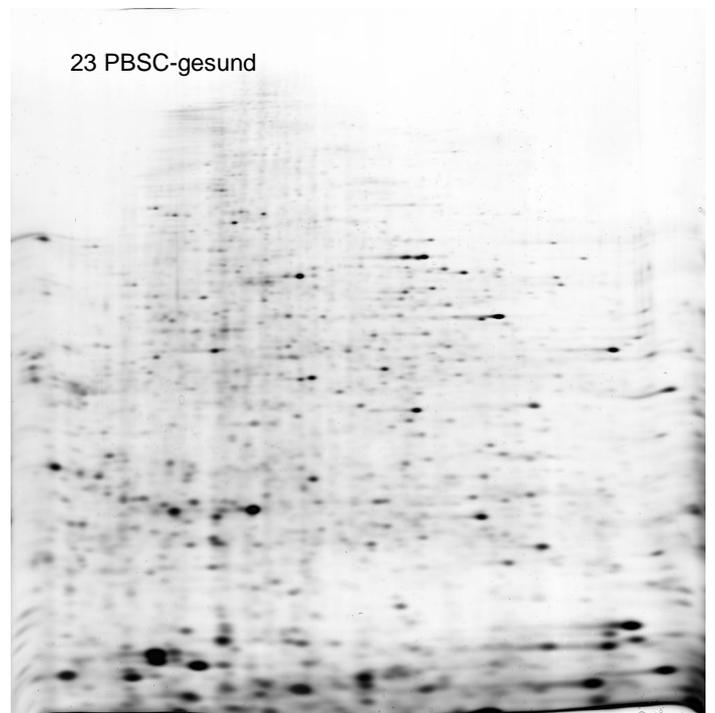
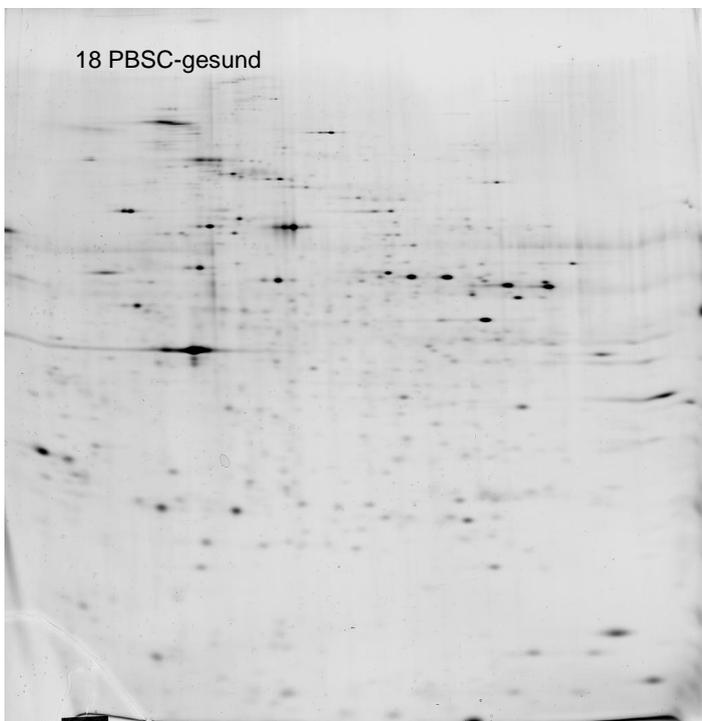
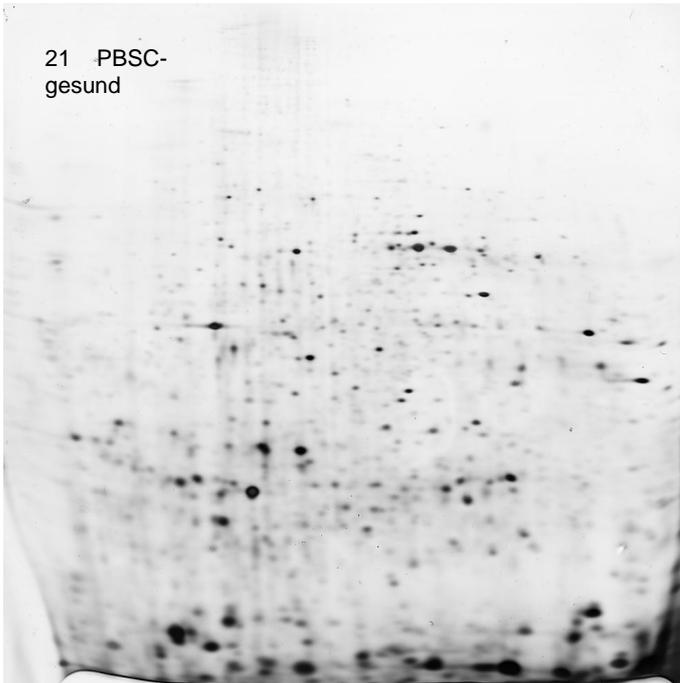
434. Scholer, H.R., et al, *New type of POU domain in germ line-specific protein Oct-4*. Nature, 1990. **344**(6265): p. 435-9.
435. Marcu, K.B., S.A. Bossone, and A.J. Patel, *myc function and regulation*. Annu Rev Biochem, 1992. **61**: p. 809-60.
436. Spencer, C.A. and M. Groudine, *Control of c-myc regulation in normal and neoplastic cells*. Adv Cancer Res, 1991. **56**: p. 1-48.
437. Ray, R.B., et al, *Human breast carcinoma cells transfected with the gene encoding a c-myc promoter-binding protein (MBP-1) inhibits tumors in nude mice*. Cancer Res, 1995. **55**(17): p. 3747-51.
438. Cooper, J.A., et al, *Three glycolytic enzymes are phosphorylated at tyrosine in cells transformed by Rous sarcoma virus*. Nature, 1983. **302**(5905): p. 218-23.
439. Graven, K.K., et al, *Endothelial cell hypoxia associated proteins are cell and stress specific*. J Cell Physiol, 1993. **157**(3): p. 544-54.
440. Aaronson, R.M., et al, *Non-neuronal enolase is an endothelial hypoxic stress protein*. J Biol Chem, 1995. **270**(46): p. 27752-7.
441. Miles, L.A., et al, *Role of cell-surface lysines in plasminogen binding to cells: identification of alpha-enolase as a candidate plasminogen receptor*. Biochemistry, 1991. **30**(6): p. 1682-91.
442. Pancholi, V. and V.A. Fischetti, *alpha-enolase, a novel strong plasmin(ogen) binding protein on the surface of pathogenic streptococci*. J Biol Chem, 1998. **273**(23): p. 14503-15.
443. Ueda, K., [*Proteome analysis of autoantibodies in sera of patients with cancer*]. Rinsho Byori, 2005. **53**(5): p. 437-45.
444. He, P., et al, *Proteomics-based identification of alpha-enolase as a tumor antigen in non-small lung cancer*. Cancer Sci, 2007. **98**(8): p. 1234-40.

9. Anhang

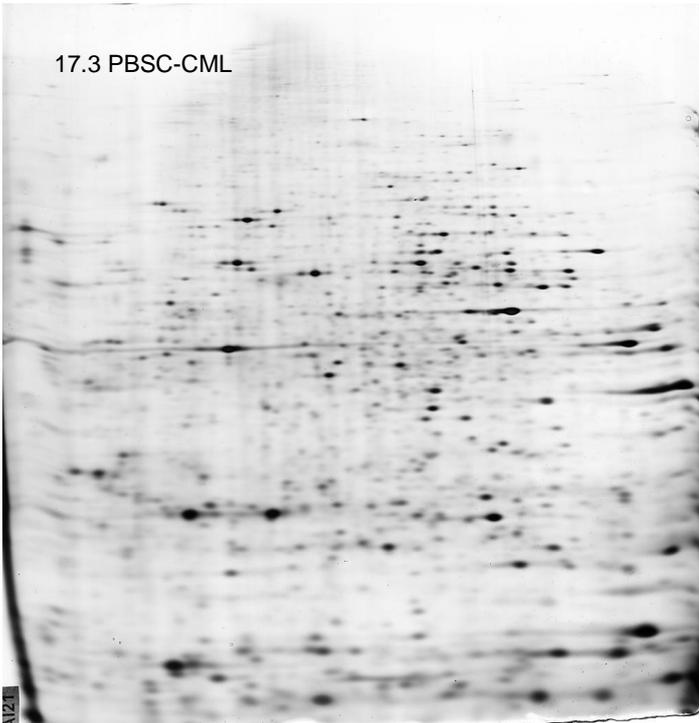
9.1. Gele

Gele von allen unseren Proben (die Zahl hinter dem Punkt gibt die Nummer des Laufes in der 2-DE wieder, wenn eine Probe mehrfach gefahren wurde.





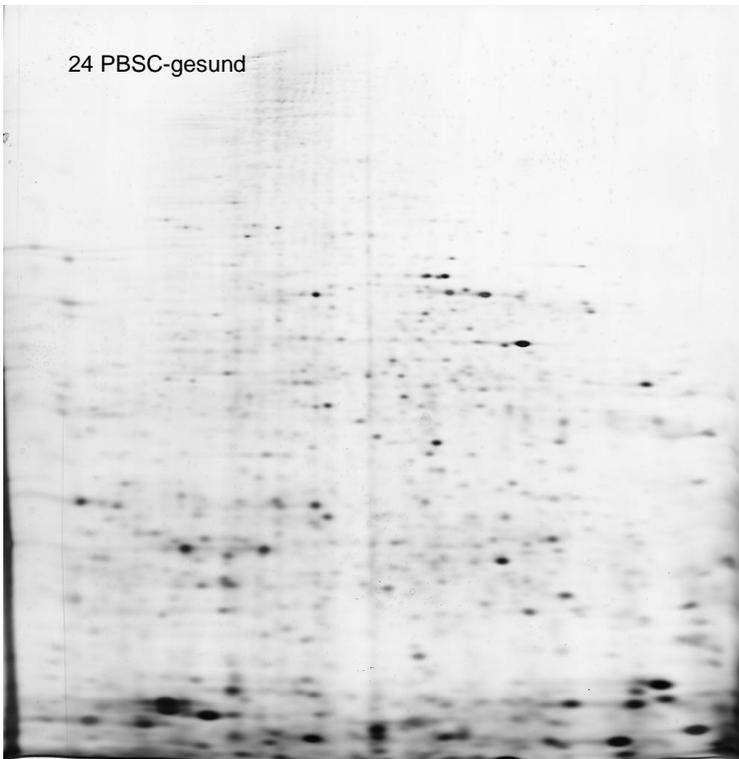
17.3 PBSC-CML



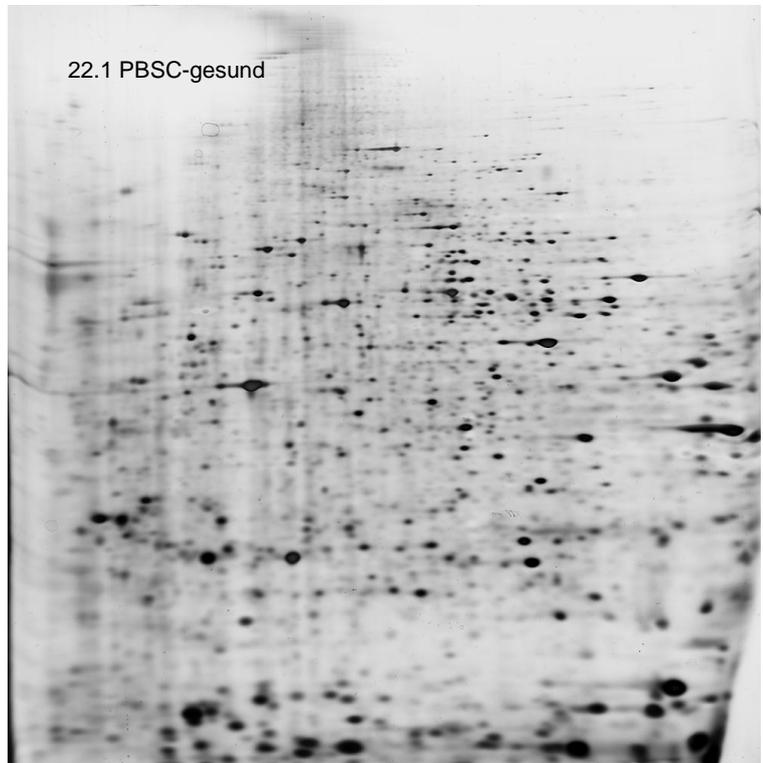
36 PBSC-CML



24 PBSC-gesund



22.1 PBSC-gesund

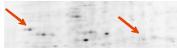
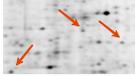
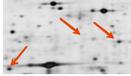
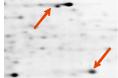
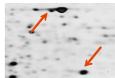
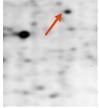
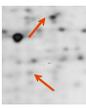




Paar 2: Probe 18 PBSC-gesund vs. Probe 25 PBSC-CML

	Probe 18 PBSC-gesund	Probe 25 PBSC-CML
Region 1		
Region 2		
Region 3		
Region 4		
Region 5		
Region 6	Keine Spots auf Gelprobe 18, Region 6	

Paar 3: Probe 23 PBSC-gesund vs. Probe 17.3 PBSC-CML

	Probe 23 PBSC-gesund	Probe 17.3 PBSC-CML
Region 1		
Region 2		
Region 3		
Region 4		
Region 5		
Region 6		

Paar 4: Probe 24 PBSC-gesund vs. Probe 36 PBSC-CML

	Probe 24 PBSC-gesund	Probe 36 PBSC-CML
Region 1		
Region 2		
Region 3		
Region 4		
Region 5		
Region 6		

Paar 5: Probe 22.1 PBSC-gesund vs. Probe 17.1 PBSC-CML

	Probe 22.1 PBSC-gesund	Probe 17.1 PBSC-CML
Region 1		
Region 2		
Region 3		
Region 4		
Region 5		
Region 6		

9.2 Abkürzungsverzeichnis

2-DE	Zweidimensionale Gelelektrophorese
AAA ATPase	ATPases associated with various cellular activities
ABL	Abelson Onkogen
ADP	Adenosin Di-Phosphat
Ad	bis, auf
ALL	Akute Lymphatische Leukämie
AML	Akute Myeloische Leukämie
APL	akute Promyelozytische Leukämie
ATF6	basischer Leucin-Zipper Transcriptionsfaktor
ATP	Adenosin-Tri-Phosphat
ATRS	all-trans-retinoid-Säure
AT-1	Antithrombin I
A2	Annexin 2
BCR	Breakpoint Cluster Region
BiP	Immunoglobulin heavy-chain binding Protein
BSA	Bovines Serum Albumin
C	Celsius
CA	Cancer (engl.: Krebs)
Ca ²⁺	Kalzium
CA-125	Cancer Antigen 125
CBB	Coomassie Brilliant Blau
CD	Cluster of Differentiation
CD34	Cluster of Differentiation 34
Cdc2	cyclin-dependent Kinase 2
CEA	Carcinoembryonic antigen
cDNA	complementary DNA
c-erbB-2	auch gekannt als HER2/neu: Human Epidermal growth factor Receptor
CHAPS	Choamidopropyldimethylammoniopropansulfat
Cm	Zentimeter
CML	Chronisch-myeloische Leukämie
c-Myc	in Anlehnung an das ähnliche v-Myc:myelocytomatosis viral oncogene
CO ²	Kohlenstoffdioxid

Conc	Konzentration
CYFRA 21-1	cytokeratin 19-fragments 21-1
DCIS	Ductal carcinoma in situ
D-Dimer	Fibrin Spaltprodukt
dl	Deziliter
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoyiribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ECM	extrazellulären Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF Rezeptor	Epidermal Growth Factor Rezeptor
E. histolytica	Entamoeba histolytica
ELISA	Enzyme linked Immunosorbent Assay
Eosinoph.	Eosinophile
Et al.	et aliter (lat.: und andere)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Erys	Erythrozyten
FAK	focal adhesion kinase
FCS	Fötales Kälberserum
FGF-2	Fibroblast Growth Factor-2
FPA/FPB	Fibrinopeptid A/B
G	Gramm
G-CSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen koloniestimmulierende Faktor
GP	Gesamtproteinaufarbeitung
G-Phase	Gap Phase
GPx	Glutathion Peroxidase
GRP78	Glucose-regulated-Protein 78
H	Stunde
Hb	Hämoglobin
HBV	Hepatitis B Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCl	Chlorwasserstoff
HER/2neu	Human Epidermal growth factor Receptor 2

HLA	Human Leucocyte Antigen
HL60	AML Zelllinie
H. pylori	Helicobacter pylori
HSA	Humanes Serum Albumin
HSF	Heat Shock Factor
HSP27	Heat-shock-protein 27
HSP70	Heat-Shock-Protein 70
HUGO	Human-Genom-Project
HUPO	Human-Proteom-Organisation
H ² O	Wasser
H ² O ²	Wasserstoffperoxid
IE	Internationale Einheit
IEF	isoelektrische Fokussierung
IFN	Interferon
IL-7	Interleukin 7
IRE1	Serin/Threonin Kinase und Endoribonuklease
kDa	Kilodalton
KM	Knochenmark
L	Liter
Leukos	Leukozyten
Lymphos	Lymphozyten
mA	Milliampere
MAC-1	Integrin $\alpha M\beta^2$
M. avium	Mycobacterium avium
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time of Flight
MBP	c-myc binding Protein
MCF1 Zelllinie	wenig invasives Brust CA-Zelllinie
Mg	Milligramm
Mg ²⁺	Magnesium
MHC I	Major Histocompatibilitäts Faktor I
Min	Minute
ml	Milliliter
MM	Multiples Myelom
Mm	Millimeter

Mmol	Millimol
mRNA	Messenger Ribonucleinacid
MS	Massenspektrometer
MW	Molekulargewicht
NaCl	Natriumchlorid
NF- κ B	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
Nr.	Nummer
NSCLC	Non-small-cell Lung-cancer
NSF	N-ethylmaleimide-sensitive factor
N-Terminal	Amino-Terminal
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PBSC	Periphere Blut-Stammzellen
PCA	prokoagulative Aktivität
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PERK	Serin/Threonin Kinase
PG	Pelletgröße
pI	Isoelektrischer Punkt
Ph	Philaderlphia Chromosom
Ph+	Philadelphia-Chromosom positiv
pH	pH Wert (pondus Hydrogenii)
PMSF	Phanylmethylsulfonylfluoride
PNETs	primitiven neuroectodermalen Tumoren
Ppm	Peptide mass
pRb	Retinoblastom-Suppressorprotein
Prxs	Peroxiredoxine
PubMed	englischsprachige Meta-Datenbank mit medizinischen Artikeln
ROS	reactive-oxygen-species
RPMI	Zellkulturmedium für normale und neoplastische Zellen, entwickelt am Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Thyrosinkinase

S	Sekunde
SCF	Stem Cell Factor
SDS	Sodiumdecylsulfat
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
Segmentk.	Segmentkernige Granulozyten
SRH	second Region of homology
Stabkernige	Stabkernige Granulozyten
SV 40	simian vacuolating Virus 40
SwissProt	Protein Datenbank, entwickelt durch das Swiss Institute of Bioinformatics
SW480	Kolonkarzinomzelllinie
TF	Tissuefaktors
TNF	Tumor Nekrose Faktor
t-PA	tissue Plasminogenaktivator
TrEMBL	T ranslated EMBL
Ub	Ubiquitin
uPA	Urokinase-type-Plasminogen-Aktivator
UPPA Lösung	Universal Protein Precipitating Agent
uPAR	Urokinase-like Plasminogen Aktivator Rezeptor
UPR	unfolded Protein Response
USA	United States of America
V	Volt
Vol.-%	Volumenprozent
Vs.	versus(=gegen)
z.B.	zum Beispiel

9.3 Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name: Corinna Hopf
Geburtsdatum: 23.12.1980
Geburtsort: 87700 Memmingen
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig

Medizinische Tätigkeit

Seit 01/04/2009 Assistenzärztin am Klinikum Großhadern

Hochschulausbildung

Studium der Humanmedizin an der LMU München

04/2004 - 11/2008 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung (nach neuer ÄAppO)
(Note: 1,5)
04/2002 - 03/2004: Ärztliche Vorprüfung (Note: 2,66)

Praktisches Jahr

10/2007 - 02/2008: 3. Tertial
Chirurgie (Transplantations- sowie Visceralchirurgie, Notfall, Unfall- und Herz/Gefäßchirurgie)
Universitätsspital Zürich
Schweiz

08/2007 - 10/2007: 2. Tertial/2. Hälfte
Abteilung für Innere Medizin
Klinikum Starnberg

06/2007 - 08/2007: 2. Tertial/1. Hälfte
Onkologische Abteilung
Guy's Hospital
Kings College London

Großbritannien

04/2007 - 06/2007: 1. Tertial/ 2. Hälfte
Abteilung für Anästhesie und Intensivmedizin
Klinikum Starnberg

02/2007 - 04/2007: 1. Tertial/ 1. Hälfte
Abteilung für Anästhesie
Royal Prince Alfred Hospital
University of Sydney
Australien

Famulaturen

06/2006 - 07/2006: Chirurgie/Gefäßchirurgie
Praxis Dr. med Reinhold Geisbüsch, Mainz

02/2006 - 03/2006: Institut für Pathologie
Ludwig-Maximilians-Universität, München

02/2005 - 03/2005: Abteilung für Innere Medizin
Schwerpunkt: Gastroenterologie/Onkologie, Klinikum Memmingen

08/2004 - 09/2004: Abteilung für Innere Medizin
Schwerpunkt: Kardiologie, Kreisklinik Ottobeuren

Pflegepraktikum

11/2001 - 12/2001: Abteilung für pädiatrische Herzchirurgie und angeborene Herzfehler
Deutsches Herzzentrum
Technische Universität, München

10/2001 - 11/2001: Abteilung für Kardiologie
Deutsches Herzzentrum
Technische Universität, München

Dissertation

08/2005 - 01/2009: Experimentelle Doktorarbeit am Institut für Pathologie der LMU:
„Proteomics: 2-Dimensionale, gelelektrophoretische Vergleichsanalyse von peripheren Stammzell-Präparaten einer CML Kohorte mit gesunden Spendern“
Betreuer: Prof. Dr. Ralf Huss, Roche Diagnostics; LMU München

10/2001 – 04/2002: Grundstudium der Betriebswirtschaftslehre an der LMU München

Schulbildung

1990 – 2000: Bernhard-Striegel Gymnasium, Memmingen
→ 05/1996 Idaho Falls, Idaho, USA (Austauschprogramm)
→ 05/2000 Abitur (Abschlussnote: 1,9)

1987 – 1990: Theodor-Heuss Grundschule, Memmingen

Fertigkeiten und Interessen

Fremdsprachen: Englisch: fließend in Sprache und Schrift
Französisch: Basis Kenntnisse
Latein: Großes Latinum

Computerkenntnisse: Microsoft Office (Word, Excel, Power Point), KISIM (Medizinisches Datenverarbeitungsprogramm, Schweiz), TopSpot (Proteomics)

Interessen: Eishockey, Joggen, Reiten, Klavierspielen, Kochen für und mit Freunden

9.4 Danksagung

Ich danke herzlich allen Personen, die mich bei dieser Arbeit unterstützt und motiviert haben.

Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. Thomas Kirchner für die freundliche Aufnahme am Institut für Pathologie und die Unterstützung bei der Umsetzung dieser wissenschaftlichen Arbeit.

Herrn Prof. Dr. med. Ralf Huss für die Bereitstellung und Entwicklung des interessanten Themas und seine stets kompetente Betreuung.

Frau Dr. Evelyn Zeindl-Eberhard und Frau Dr. Sibylle Liebmann für ihre unermüdliche Hilfe bei der Einarbeitung in das Labor, die Proteomicstechniken und beim Aufbau der ersten Versuchsanordnungen. Ohne ihre Hilfe wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Vielen Dank.

Allen Mitarbeitern des Instituts gebührt besonderer Dank für die freundliche Aufnahme und die tägliche bereitwillige Unterstützung bei der Umsetzung dieser Forschungsarbeit.

Des weiteren danke ich der José Charreras Ambulanz im Klinikum der Universität München Großhadern und insbesondere Herrn Dr. Georg Ledderose, sowie dem Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf für die freundliche Hilfe.

Herrn Dipl.-Ing. Stephan Hausmann, ohne dessen technisches Know-How diese Arbeit nie zur Druckreife gekommen wäre.

Und nicht zuletzt gilt mein kaum in Worte zu fassender Dank meinen Eltern, Frau Heidi Hopf und Herrn Engelbert Liboschik, denen ich alles verdanke.

10. Ehrenwörtliche Erklärung

Diese Dissertation wurde selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt.

München, den

.....

(Corinna Hopf)

Dissertation eingereicht am: