

*AUS DEM INSTITUT
FÜR FUNKTIONELLE GENOMIK
PROF. DR. PETER OEFNER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG*

*GLUKOKORTIKOIDE UND AKUTE LYMPHATISCHE LEUKÄMIE:
EIN PROTEOMISCHER ANSATZ*

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Matthias Aubin

2019

*AUS DEM INSTITUT
FÜR FUNKTIONELLE GENOMIK
PROF. DR. PETER OEFNER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG*

*GLUKOKORTIKOIDE UND AKUTE LYMPHATISCHE LEUKÄMIE:
EIN PROTEOMISCHER ANSATZ*

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Matthias Aubin

2019

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Peter Oefner
2. Berichterstatter:	PD Dr. Kathrin Renner-Sattler
Tag der mündlichen Prüfung:	01. April 2019

Abstract

Glucocorticoids are used in the therapy of acute lymphoid leukemia (ALL) as well as and other lymphoid malignancies. An initial insufficient response to glucocorticoids has been shown to be an important prognostic marker for a bad outcome.

2-Deoxy-glucose (2-DG) is a glucose analog which is not metabolized and sensitizes ALL-cells to non-toxic doses of glucocorticoids and resistant cells to glucocorticoids. However, the underlying molecular mechanism of glucocorticoid-induced cell death and the synergism with 2-DG remains poorly understood.

Prior work has shown a downregulation of the mitochondrial glutamate/H⁺-symporter (*SLC25A22*) and the mitochondrial dicarboxylate carrier (*SLC25A10*) in response to treatment with the glucocorticoid dexamethasone (DEX). Here I analyze the microsomal fraction of treated leukemic cells with a proteomic approach to further elucidate the mechanism.

I show that treatment with 2-DG alone and in combination with DEX leads to increased expression of NMT-1, which has been implicated in the induction of apoptosis, and a reduction of HADH, an enzyme of beta-oxidation.

I also show that inhibition of glycolysis by 2-DG is associated with downregulation of VDAC1. No synergistic effect with DEX can be shown.

The mechanism of synergy between 2-DG and glucocorticoids remains unclear.

Keywords: acute lymphoid leukemia, glucocorticoids, 2-deoxy-glucose, VDAC1, glycolysis, tumor metabolism, apoptosis

Kurzfassung

Glukokortikoide (GK) werden in der Therapie der Akuten Lymphatischen Leukämie (ALL) sowie weiterer maligner lymphatischer Erkrankungen eingesetzt. Ein schlechtes initiales Ansprechen auf GK ist prognostisch für einen schlechten Verlauf.

Das nicht verstoffwechselbare Glukoseanalog 2-Desoxy-Glukose (2-DG) sensibilisiert GK-empfindliche ALL-Zellen gegen sehr niedrige Dosen GK und macht GK-resistente Zellen für GK empfindlich. Der genaue Mechanismus der Synergie zwischen GK und 2-DG ist jedoch noch unklar.

Vorarbeiten haben gezeigt, dass die Behandlung von ALL-Zellen mit Dexamethason (DEX) zu einer verringerten Expression des mitochondrialen Glutamat/H⁺-Symporters (*SLC25A22*) und des mitochondrialen Dicarboxylattransporters (*SLC25A10*) führt. Hier

untersuche ich die mikrosomale Fraktion behandelter Zellen mit einem proteomischen Shotgun-Ansatz um den Mechanismus weiter aufzuklären.

Ich zeige, dass die Behandlung mit 2-DG alleine und in Kombination mit DEX zu einer erhöhten Expression von NMT-1, für welches eine Rolle in der Apoptoseinduktion beschrieben ist, und einer verringerten Expression von HADH, einem Enzym der Beta-Oxidation, führt.

Weiterhin führt die Inhibition der Glykolyse durch 2-DG zu einer sehr stark erniedrigten Expression von VDAC1. Es zeigt sich kein synergistischer Effekt mit DEX.

Somit bleibt der synergistische Effekt zwischen 2-DG und Dexamethason weiter unklar.

Schlagwörter: Akute Lymphatische Leukämie, Glukokortikoide, 2-Desoxy-Glukose, VDAC1, Glykolyse, Tumormetabolismus, Apoptose

Inhaltsverzeichnis

Abstract	1
Kurzfassung	1
Inhaltsverzeichnis	3
Abbildungsverzeichnis	5
Tabellenverzeichnis	7
Abkürzungsverzeichnis.....	8
Einleitung	9
1.1 Einteilung der Leukämien.....	9
1.2 Akute Lymphatische Leukämie	9
1.2.1 Epidemiologie	9
1.2.2 Prognose und Krankheitsverlauf.....	10
1.2.3 Therapie	11
1.3 Glukokortikoide	12
1.3.2 Wirkmechanismus.....	13
1.3.3 Apoptoseinduktion	15
1.3.4 Glukokortikoide und ALL	17
1.3.5 Metabolische Theorie.....	19
1.3.6 Vorarbeiten der Arbeitsgruppe.....	21
1.4 Ziel der Arbeit.....	24
2 Material.....	25
2.1 Geräte	25
2.2 Verbrauchsmaterialien und Chemikalien.....	25
2.3 Software	27
2.4 Zellkultur.....	28
3 Methoden	29
3.1 Zellkultur und Zellzählung.....	29
3.2 Apoptoseinduktion	29
3.3 Durchflusszytometrie	29
3.4 Hochauflösende Respirometrie	30
3.5 Gewinnung der mikrosomalen Fraktion	30
3.6 Proteingehaltsbestimmung	31
3.7 Differentielle Proteomanalyse mittels iTRAQ™.....	31
3.8 Gelelektrophorese und Silberfärbung	33

3.9	Flüssigchromatographie	33
3.9.1	Zweidimensionale Trennung.....	34
3.9.2	Dreidimensionale Trennung.....	35
3.9.3	Umkehrphasen-Chromatographie	36
3.10	Massenspektrometrie	37
3.11	Datenbanksuche	37
3.12	Auswertung der Daten	38
3.13	Statistik.....	38
4	Ergebnisse	40
4.1	Reproduktion der Vorergebnisse	40
4.1.1	Apoptoserate	40
4.1.2	Hochauflösende Respirometrie	40
4.2	Gekoppelte Massenspektrometrie	41
4.2.1	Anzahl regulierter Proteine	41
4.2.2	Evaluierung der Chromatographie	42
4.3	Regulierte Proteine.....	43
4.3.1	Enzyme der Glykolyse	43
4.3.2	Weitere Stoffwechselenzyme.....	44
4.3.3	Mitochondriale Transportproteine	45
4.3.4	ER-Stress.....	46
4.3.5	Sonstige Proteine.....	46
4.3.6	Statistische Güte der Daten	46
5	Diskussion	50
5.1	Chromatographie.....	50
5.2	VADC1	50
5.3	Ki-67	51
5.4	Glykolyse	51
5.5	NMT-1	52
5.6	Weitere Stoffwechselenzyme.....	52
5.7	ER-Stress.....	52
5.8	Zusammenfassung.....	53
Anhang A: Methodvalidierung		54
Anhang B: Regulierte Proteine		56
Literaturverzeichnis.....		93
Danksagung.....		98
Eidesstattliche Versicherung.....		99

Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1:</i> Inzidenz der ALL pro 100.000 Einwohner in Deutschland von 2000 bis 2010 nach Altersgruppe sortiert, Daten aus Krebs in Deutschland	10
<i>Abbildung 2:</i> Prozentualer Verteilung von Krebsarten bei unter 15-jährigen Personen in Deutschland von 2003 bis 2012, aus Krebs in Deutschland	10
<i>Abbildung 3:</i> Überlebensrate an ALL Erkrankter in den USA von 1988-2001, Daten aus U.S. SEER Programm	11
<i>Abbildung 4:</i> Struktur des GR. N-terminale oder immunogene Domäne (NTD) mit der Transaktivierungs-Domäne AF1 (Activation Function 1), Desoxyribonukleinsäure-Bindungs-Domäne (DBD), Scharnierregion (HR), und die C-terminale Liganden-Bindungs-Domäne (LBD) mit der Transaktivierungs-Domäne AF2, aus Ratman <i>et al.</i>	14
<i>Abbildung 5:</i> Struktur der anti- und pro-apoptotischen sowie der nur die dritte BH-Domäne aufweisenden Mitglieder der BCL-2-Familie, aus Martinou <i>et al.</i>	16
<i>Abbildung 6:</i> Zugehörigkeit zu Gene Ontology Gruppen unterschiedlich exprimierter Gene je nach Resistenz gegenüber Chemotherapeutika in Blasten von pädiatrischen ALL-Patienten. Abgebildet mit Genehmigung aus Holleman <i>et al.</i> , Copyright Massachusetts Medical Society.	19
<i>Abbildung 7:</i> Hinzufügen von 3 mM beziehungsweise 1 mM 2-DG beschleunigt die DEX-induzierte Apoptose in CEM-C7H2 (A) und 697/EU-3 (B) Zellen um 24 h. Außerdem macht 2-DG beide Zelllinien für niedrigere Dosen an DEX empfindlich ((C) CEM-C7H2: 5 nM DEX; (D) 697/EU-3: 10 nM DEX), aus Eberhart <i>et al.</i>	22
<i>Abbildung 8:</i> Mitochondriale Routineatmung (ROUTINE) und nach Entkopplung (ETS) sowie zellulärer ATP-Gehalt in ganzen Zellen der T-ALL Zelllinie C7H2 sowie der pre-B-ALL-Zelllinie 697/EU-3 nach 24 beziehungsweise 36 h in der Kontrollgruppe und nach Behandlung mit 100 nM DEX, aus Eberhart <i>et al.</i>	22
<i>Abbildung 9:</i> Maximale Aktivität einzelner Komplexe der Atmungskette nach Entkopplung nach 24 h Behandlung in der Kontrollgruppe sowie nach Behandlung mit DEX in permeabilisierten Zellen ((A) C7H2, (B) 697/EU-3), aus Eberhart <i>et al.</i>	23
<i>Abbildung 10:</i> Molekulare Struktur der Markierung in iTRAQ™, aus Ross <i>et al.</i>	32
<i>Abbildung 11:</i> Anteil der apoptotischen Zellen zu den Zeitpunkten 18, 24, 32 und 48 h in der Kontrollgruppe sowie nach Behandlung mit 100 nM DEX, 3 mM 2-DG, bzw. einer Kombination aus 100 nM DEX und 3 mM 2-DG. (zum Vergleich Abbildung aus Eberhart <i>et al.</i> rechts)	40
<i>Abbildung 12:</i> Hochauflösende Respirometrie von intakten C7H2 Zellen in MiR05-Medium nach 18 h in der Kontrollgruppe (A) sowie nach Behandlung mit 100 nM DEX (B), 3 mM 2-DG (C) sowie 100 nM DEX und 3 mM 2-DG (D). Zunächst Messung des Sauerstoffverbrauchs ohne Behandlung, dann Permeabilisierung mit Digitonin und schrittweise Zugabe von Glutamat und Malat, ADP, Cytochrom <i>c</i> , Succinat, FCCP, Rotenon sowie Antimycin A (jeweils durch vertikale Linien angezeigt).	41
<i>Abbildung 13:</i> Regulationsfaktor der 18 h Kontrolle, DEX, 2-DG, Kombination sowie 30 h DEX und 2-DG Gruppe im Verhältnis zur 30 h Kontrolle der Fruktose-bisphosphat-Aldolase A (A), Phosphoglyceratkinase 1 (B), Pyruvatkinase (C), L-Laktat-Dehydrogenase A (D), L-Laktat-	

Dehydrogenase B (E) und Glukose-6-phosphat-Isomerase (F). Für die Glukose-6-phosphat-Isomerase liegen nur Daten zum Zeitpunkt 30 h vor. (* $p < 0.05$ nach Benjamini-Hochberg-Korrektur)	43
<i>Abbildung 14:</i> Regulationsfaktor der 18 h Kontrolle, DEX, 2-DG, Kombination sowie 30 h DEX und 2-DG Gruppe im Verhältnis zur 30 h Kontrolle der ATP-Synthase-Untereinheit alpha (A), ATP-Zitrat-Synthase (B), Glutamatdehydrogenase 1 (C), Serin-Hydroxymethyltransferase (D), Hydroxyacyl-Coenzym-A-Dehydrogenase (E) und C-1-tetrahydrofolat-Synthase (F). (* $p < 0.05$ nach Benjamini-Hochberg-Korrektur).....	45
<i>Abbildung 15:</i> Regulationsfaktor der 18 h Kontrolle, DEX, 2-DG, Kombination sowie 30 h DEX und 2-DG Gruppe im Verhältnis zur 30 h Kontrolle von VDAC1 (A), GRP78 (B), KI-67 (C) und Glycylpeptide-N-tetradecanoyltransferase-1 (D). (* $p < 0.05$ nach Benjamini-Hochberg-Korrektur)	46

Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1:</i> Zuordnung der iTRAQ™-Reporterionen:.....	32
<i>Tabelle 2:</i> Puffer für die Silberfärbung:	33
<i>Tabelle 3:</i> Puffer für die starke Kationenaustauschchromatographie in der 2- dimensionalen Trennung:	34
<i>Tabelle 4:</i> Gradient für die starke Kationenaustauschchromatographie in der zweidimensionalen Trennung:.....	34
<i>Tabelle 5:</i> Puffer für die starke Kationenaustauschchromatographie in der dreidimensionalen Trennung:	35
<i>Tabelle 6:</i> Puffer für die basische Umkehrphasen-Chromatographie in der dreidimensionalen Trennung:	36
<i>Tabelle 7:</i> Gradient für die basische Umkehrphasen-Chromatographie in der dreidimensionalen Trennung:	36
<i>Tabelle 8:</i> Puffer für die Umkehrphasen-Chromatographie:	37
<i>Tabelle 9:</i> Gradient für die Umkehrphasen-Chromatographie:	37
<i>Tabelle 10:</i> Einstellungen für Protein Pilot:	38
<i>Tabelle 11:</i> Nach der Bonferroni-Korrektur signifikante Regulationsfaktoren mit einem korrigierte Signifikanzniveau $p < 2,61 \cdot 10^{-5}$:	47
<i>Tabelle 12:</i> Nach der Benjamini-Hochberg-Korrektur bei einer „false discovery rate“ von 5 % signifikante Regulationsfaktoren:.....	47
<i>Tabelle 13:</i> Gemeinsame Proteine in der Gesamtgruppe sowie in der zwei- und dreidimensional Trennung aller Replikate zum Zeitpunkt 18 h	54
<i>Tabelle 14:</i> Gemeinsame Proteine der Gesamtgruppe und der einzelne Replikate in der zweidimensionalen Trennung zum Zeitpunkt 18 h	54
<i>Tabelle 15:</i> Gemeinsame Proteine der Gesamtgruppe und der einzelne Replikate in der dreidimensionalen Trennung zum Zeitpunkt 18 h.....	54
<i>Tabelle 16:</i> Gemeinsame Proteine aller dritten Fraktionen der drei Replikate der dreidimensionalen Trennung zum Zeitpunkt 18 h.....	55
<i>Tabelle 17:</i> Gemeinsame Proteine aller Fraktionen des ersten Replikats der dreidimensionalen Trennung zum Zeitpunkt 18 h.....	55
<i>Tabelle 18:</i> Signifikant regulierte Proteine: 18h DEX.....	56
<i>Tabelle 19:</i> Signifikant regulierte Proteine: 18h 2-DG.....	61
<i>Tabelle 20:</i> Signifikant regulierte Proteine: 18h Kombination.....	70
<i>Tabelle 21:</i> Signifikant regulierte Proteine: 18h Kontrolle.....	75
<i>Tabelle 22:</i> Signifikant regulierte Proteine: 30h DEX.....	78
<i>Tabelle 23:</i> Signifikant regulierte Proteine: 30h 2-DG.....	85

Abkürzungsverzeichnis

2-DG	2-Desoxy-Glukose
2-FDG	2-Fluoro-Desoxy-Glukose
AF	„Activation Function“
ALL	Akute Lymphatische Leukämie
BH-Domäne	BCL-2-Homologie-Domäne
DEX	Dexamethason
DBD	DNS-Bindungs-Domäne
DNS	Desoxyribonukleinsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
FCCP	Carbonyl-cyanid-p-(trifluoromethoxy)-phenylhydrazon
HK	Hexokinase
HR	Scharnierregion
GK	Glukokortikoide
GR	Glukokortikoidrezeptor
GRE	Glucocorticoid Responsive Element
GRP78	78 kDa glucose-regulated protein
FAS	First Apoptosis Signal
iTRAQ™	Isobaric tag for relative and absolute quantitation
LBD	Liganden-Bindungs-Domäne
m-RNS	messenger-Ribonukleinsäure oder Boten-Ribonukleinsäure
mi-RNS	mikro-Ribonukleinsäure
MRD	„Minimal Residual Disease“ (minimale Resterkrankung)
m/z	Quotient Masse durch Ladung
NTD	N-terminale Transaktivierungs-Domäne
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
SMAC	second mitochondria-derived activator of caspases

Einleitung

1.1 Einteilung der Leukämien

Leukämien gehören zu den malignen hämatologischen Erkrankungen. Wie alle malignen Erkrankungen zeichnen sie sich durch eine unkontrollierte Zellteilung aus.

Historisch werden maligne hämatologische Erkrankungen nach befallener Körperregion unterschieden. Lymphome befallen bevorzugt die lymphatischen Organe wie Lymphknoten, Milz, und Thymus. Leukämien befallen das Knochenmark¹.

Leukämien werden je nach klinischem Verlauf und betroffenem Zelltyp weiter eingeteilt.

Anhand des zeitlichen Verlaufs wird zwischen akuten und chronischen Formen unterschieden. Bei den akuten Verlaufsformen kommt es durch die schnelle Zellvermehrung früh zu einer Ausschwemmung der unreifen Tumorzellen, sogenannter Blasten, ins Blut. Diese kann unbehandelt innerhalb von Tagen zum Tod führen^{2,3}. Die chronischen Verlaufsformen zeichnen sich durch eine mildere Symptomatik und einen längeren Verlauf aus, können aber auch in eine der akuten Verlaufsform ähnliche Form übergehen.

Bei der Blutbildung im Knochenmark werden eine lymphatische und eine myeloide Zellreihe unterschieden. Aus der lymphatischen Linie entstammen die natürlichen Killerzellen sowie die Zellen des spezifischen Abwehrsystems, die B- und T-Lymphozyten.

Grob kann man Leukämien in vier Gruppen einteilen: Chronische Myeloide Leukämie, Chronische Lymphatische Leukämie, Akute Myeloide Leukämie und Akute Lymphatische Leukämie (ALL).

Bei der ALL unterscheidet man, je nach Zellreihe von der sie entstammt, noch zwischen B-ALL und T-ALL.

1.2 Akute Lymphatische Leukämie

1.2.1 Epidemiologie

Die ALL hat weltweit eine Inzidenz zwischen 1 und 4,75 pro 100.000 Einwohner⁴.

In Deutschland lag die Inzidenz im Zeitraum von 2000 bis 2010 bei 1,4 für Männer und 1,1 für Frauen pro Jahr und 100.000 Einwohner. Dabei sind 1,23-mal mehr Männer als Frauen betroffen. Hauptsächlich erkranken Kinder im Alter zwischen eins und vier Jahren. Weiterhin gibt es einen zweiten Altersgipfel jenseits der 65 Jahre (*Abbildung 1*).

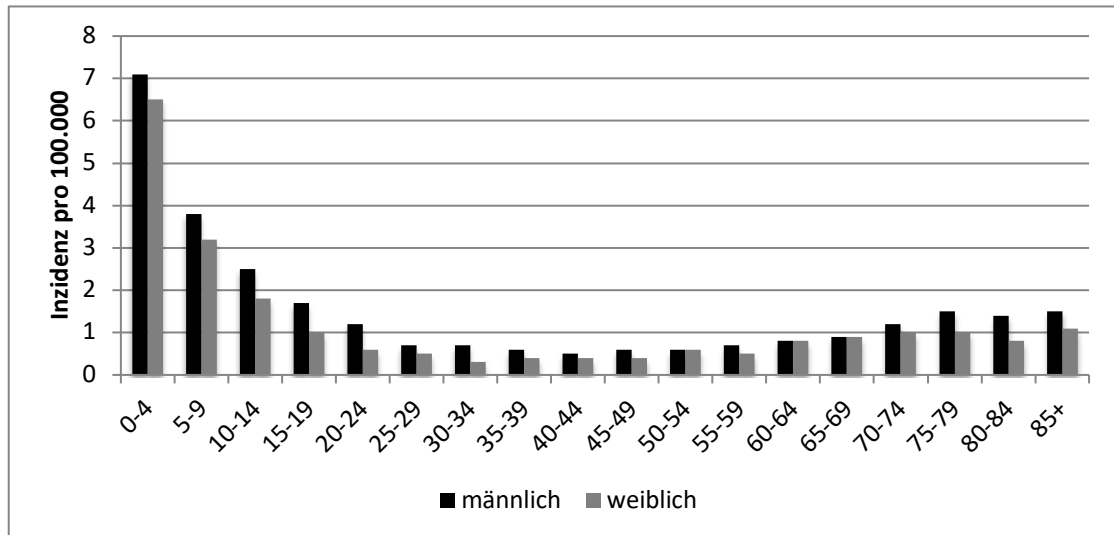


Abbildung 1: Inzidenz der ALL pro 100.000 Einwohner in Deutschland von 2000 bis 2010 nach Altersgruppe sortiert, Daten aus Krebs in Deutschland⁵

In der Altersgruppe der über 14-jährigen macht die ALL nur 0,1% aller Krebserkrankungen aus. Bei den unter 15-jährigen machen Leukämien 33,8 % der Krebserkrankungen aus und davon die ALL den Großteil (Abbildung 2). Damit ist die ALL vor allem eine Erkrankung des Kindesalters und die häufigste Krebsart bei Kindern^{5,6}.

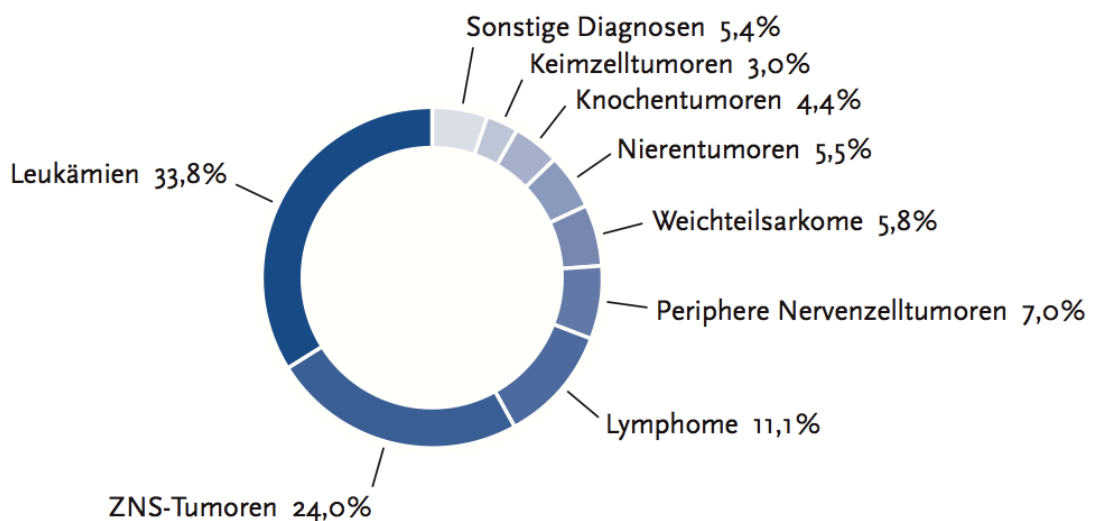


Abbildung 2: Prozentualer Verteilung von Krebsarten bei unter 15-jährigen Personen in Deutschland von 2003 bis 2012, aus Krebs in Deutschland⁵

1.2.2 Prognose und Krankheitsverlauf

Durch die moderne Multichemotherapie hat sich die ALL von einer zwangsläufig tödlich verlaufenden Erkrankung zu einer in der Mehrheit der Fälle heilbaren Krankheit entwickelt^{7,8}.

Das langfristige Überleben an ALL Erkrankter hängt dabei maßgeblich vom Erkrankungsalter ab. Laut Daten des U.S. SEER Programms lag in den USA zwischen 1988 und 2001 die Zehnjahresüberlebensrate bei Kinder und Jugendlichen bei 76,5 %, bei Erwachsenen jedoch nur bei 19,3 % (*Abbildung 3*).

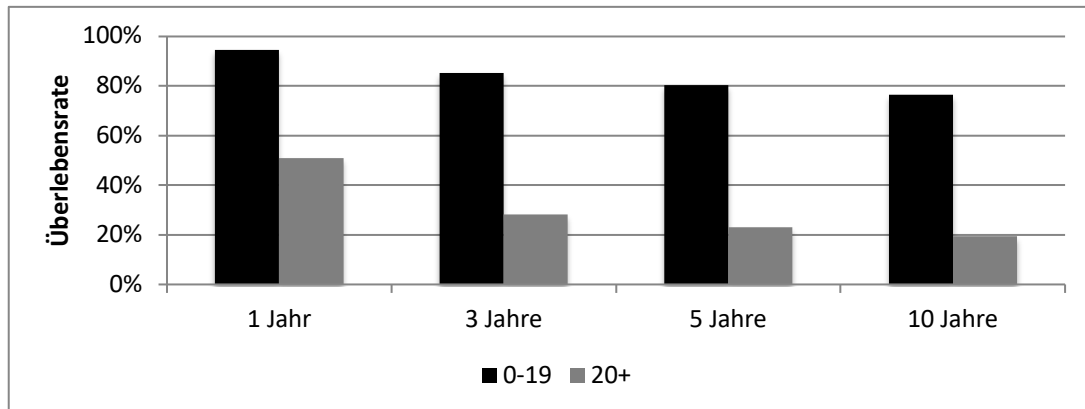


Abbildung 3: Überlebensrate an ALL Erkrankter in den USA von 1988-2001, Daten aus U.S. SEER Programm⁹

Dabei bessert sich die Überlebensrate durch Verbesserungen in der Behandlung kontinuierlich. In neueren Therapieoptimierungsstudien werden inzwischen höhere Überlebensraten erreicht¹⁰.

1.2.3 Therapie

1.2.3.1 Risikostratifizierung

Die Intensität der Therapie wird anhand einer Reihe von Kriterien wie der anfänglichen Leukozytenzahl, dem Patientenalter, dem Ansprechen auf die Induktionstherapie, sowie molekulargenetischen Veränderungen angepasst¹¹. Je höher das Risiko eines schlechten Verlaufs, desto intensiver die Behandlung.

Wichtig ist das Ansprechen auf die anfängliche GK Therapie. Dördelmann *et al.* konnten zeigen, dass ein schlechtes Ansprechen auf Glukokortikoide (GK) im Rahmen der Induktionstherapie einen wichtigen Risikofaktor für einen schlechteren Verlauf der Erkrankung darstellt¹².

Weiterhin wird im Verlauf der Therapie die minimale Resterkrankung (MRD) zur Beurteilung des Therapieansprechens herangezogen. Dabei wird die verbliebene Menge an Blasten im Knochenmark der Patienten beurteilt¹³. Diese korreliert mit dem weiteren Verlauf der Erkrankung^{14,15}.

1.2.3.2 Behandlung

Die interdisziplinäre Leitlinie der Deutschen Krebsgesellschaft und der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie gliedert die Behandlung der ALL in vier Teile: Die Induktion, die Extrakompartimenttherapie, die Reinduktion und die Erhaltungstherapie¹¹.

Das Ziel der Induktion ist eine schnelle und große Reduktion der Tumorlast. Erreicht wird dies durch eine Kombination von GK wie Prednisolon oder Dexamethason mit diversen Chemotherapeutika. Dazu gehören Vincristin, Anthrazykline, Asparaginase und Cyclophosphamid.

Aufgrund der mangelnden Penetration der Blut-Hirn-Schranke durch die meisten Chemotherapeutika wird bei der Extrakompartimenttherapie Methotrexat intrathekal appliziert. Dieses kann weiterhin je nach Risiko um weitere Chemotherapeutika oder eine ZNS-Bestrahlung ergänzt werden.

Die Reinduktionstherapie ist eine Wiederholung der Induktionstherapie die nach Erreichen einer Remission durchgeführt wird. Das Ziel ist eine Zerstörung möglichst aller verbliebener Blasten. Im Rahmen dieser Therapie werden Methotrexat, Cytarabin und Asparaginase verabreicht.

Die Erhaltungstherapie wird bis zum Ablauf von zwei Jahren nach der Diagnose durchgeführt und besteht aus Mercaptopurin und Methotrexat. Das Ziel ist es, die wenigen Tumorzellen, die überlebt haben, zu zerstören und einen Rückfall zu verhindern.

Darüber hinaus gibt es neuere Medikamente, die zusätzlich oder bei bestimmten Patientengruppen anstatt der Chemotherapie eingesetzt werden können: dazu gehören der anti-CD20-Antikörper Rituximab und der Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib¹⁶.

Schließlich besteht die Möglichkeit einer Stammzelltransplantation. Die genaue Indikation wird noch diskutiert, sie wird aber vor allem bei Hochrisikogruppen wie zum Beispiel Rezidiven eingesetzt. Problematisch ist vor allem die mit einer Transplantation assoziierte Sterblichkeit, die sich jedoch in letzter Zeit deutlich gebessert hat¹⁷.

1.3 Glukokortikoide

Glukokortikoide gehören zu den Steroidhormonen, welche strukturell dem Cholesterin verwandte sind. Weitere Steroidhormone im menschlichen Organismus sind Mineralkortikoide, Gestagene, Östrogene, Androgene sowie Vitamin D.

Als GK kommt im menschlichen Organismus vor allem Cortisol vor. Es wird in der Zona Fasciculata der Nebennierenrinde gebildet. Seine Ausschüttung wird durch Sekretion von adrenocorticotropem Hormon aus der Hypophyse reguliert. Dieses wird wiederum durch Ausschüttung des „corticotropin-releasing hormone“ aus dem Hypothalamus reguliert¹⁸.

1.3.1.1 Biologische Funktion

Die biologische Funktion der GK ist vielfältig und hängt von den Zellen ab, auf die sie wirken. Dabei kann man grob drei Funktionen unterscheiden: immunologisch, metabolisch und kognitiv¹⁹.

Die Wirkungen von GK auf den Stoffwechsel sind generell katabol, GK führen also zur Bereitstellung energiereicher Substrate. GK mindern die Wirkung von Insulin, fördern die Glukoneogenese in der Leber, fördern die Lipolyse und führen zum Abbau von Proteinen²⁰.

Die immunologische Wirkung ist vielfältig. So reduzieren GK je nach betroffenen Zelltyp die Sekretion von aber auch die Reaktion auf Zytokine, fördern die Apoptose oder induzieren einen weniger reaktiven Zelltyp²¹.

Kognitiv können GK sowohl Euphorie als auch eine Depression auslösen¹⁹.

1.3.1.2 Therapeutischer Einsatz

Es gibt vielfältige Indikationen zum Einsatz von GK. Am wichtigsten sind die anti-inflammatorischen Effekte bei Autoimmunkrankheiten und Organtransplantationen. Weiterhin werden GK in der Therapie maligner lymphoider Erkrankungen eingesetzt.

Therapeutisch werden eine Reihe synthetischer GK eingesetzt. Diese werden nach ihrer Wirkstärke, Wirkung am Mineralkortikoidrezeptor und Wirkdauer eingeteilt. In der Therapie der ALL werden die GK Prednisolon und Dexamethason eingesetzt.

Die Nebenwirkungen einer Therapie mit Glukokortikoiden orientieren sich dabei grob an den genannten biologischen Funktionen. Speziell bei ALL-Patienten werden in Bezug auf GK besonders eine proximale Myopathie, Osteopenie, Osteonekrosen sowie eine erhöhte Infektionsneigung beobachtet²².

1.3.2 Wirkmechanismus

GK diffundieren durch ihre lipophile Struktur passiv durch die Zellmembran. Dadurch benötigen sie im Gegensatz zu anderen Hormonen keinen „second messenger“. Sie binden an den Glukokortikoidrezeptor (GR), welcher ein Mitglied (*NR3C1*) der Familie der nukleären Rezeptoren ist. Der GR beeinflusst die Funktion der Zelle auf der genomischen und nichtgenomischen Ebene.

1.3.2.1 Glukokortikoidrezeptor

Vom GR existieren durch alternatives „splicing“ und alternative Start-Codons mehrere Isoformen. Verschiedene Zelltypen haben unterschiedliche Isoformen und diese

regulieren teilweise unterschiedliche Gene. GR- α kommt am häufigsten vor und ist am besten untersucht²³.

Der GR hat drei funktionelle Domänen: N-terminal eine Transaktivierungs-Domäne AF1, gefolgt von einer zentralen DNS-Bindungs-Domäne. Darauf folgt die Scharnierregion sowie C-terminal eine Hormon-Bindungs-Region mit der Transaktivierungs-Domäne AF2 (Abbildung 4)²⁴.



Abbildung 4: Struktur des GR. N-terminale oder immunogene Domäne (NTD) mit der Transaktivierungs-Domäne AF1 (Activation Function 1), Desoxyribonukleinsäure-Bindungs-Domäne (DBD), Scharnierregion (HR), und die C-terminale Liganden-Bindungs-Domäne (LBD) mit der Transaktivierungs-Domäne AF2, aus Ratman *et al.*²⁵

Die Desoxyribonukleinsäure-Bindungs-Domäne (DBD) besteht aus zwei Zinkfinger-Domänen und ist auch für die Homodimerisierung des GR wichtig. Zwischen DBD und Scharnierregion liegen zwei Kernlokalisierungssignale. Neben der N-terminalen Transaktivierungsdomäne hat auch die Hormonbindungsregion LBD eine Transaktivierungs-Domäne (AF2) zur Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren und Proteinen, welche die Chromatinstruktur verändern²⁵.

Ohne einen Liganden gebunden zu haben liegt der GR als Komplex mit verschiedenen Chaperonen im Zytoplasma vor. Zu diesen gehören unter anderen das Heat Shock Protein 90, das Heat Shock Protein 70 und die sogenannten Immunophilinen. Die Rolle der Chaperone ist sehr komplex und umfangreicher als lange angenommen. Sie beeinflussen nicht nur das Binden von GK am GR und den Transport des GR in den Zellkern sondern auch das Binden des GR an die Desoxyribonukleinsäure (DNS) und den Abbau des GR²⁶.

1.3.2.2 Genomische Effekte

Bei Bindung des Liganden verlässt der GR den Komplex aus Chaperonen, homodimerisiert und wird über aktiven Transport in den Zellkern befördert²⁷. Dort kann er Gene transaktivieren oder transreprimieren.

Ratman *et al.*²⁵ beschreibt vier Arten wie der GR die Transkription beeinflusst: durch Interaktion mit DNS als simpler Transkriptionsfaktor, durch gleichzeitige Interaktion mit DNS und anderen Transkriptionsfaktoren, durch alleinige Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren ohne Bindung von DNS sowie durch epigenetische Mechanismen.

Als einfacher Transkriptionsfaktor wirkt der GR an sogenannten „glucocorticoid responsive elements“ (GRE). Diese sind imperfekte palindromische Sequenzen der DNS in der Promoterregion regulierter Gene²⁸. An diese bindet der GR als Homodimer und aktiviert

die Transkription. Analog zu diesen gibt es negative GRE die zu Repression von Genen führen²⁹. Diese benötigen jedoch keine Dimerisierung des GR.

Weiterhin kooperiert der GR mit anderen Transkriptionsfaktoren. Diese wurden durch die Untersuchung von Mutanten des GR entdeckt, die nicht dimerisieren können³⁰. Gut untersucht ist zum Beispiel die Interaktion von GR und AP-1 an Promotern, die sowohl eine AP-1 als auch ein positives GRE oder negatives GRE enthalten. GR und AP-1 können je nach Promoter und Zelltypus kooperativ an der DNS binden und die Expression von Genen erhöhen oder erniedrigen^{31,32}.

Weiterhin können auch Mutanten des GR, die keine DNS binden können, die Transkription beeinflussen³³. Dies basiert auf Protein-Protein-Interaktionen zwischen GR und anderen Transkriptionsfaktoren. Der genauen Mechanismus variiert: wenn der GR mit an DNS gebundenen Transkriptionsfaktor an DNS interagiert wird dies „tethering“ genannt, wenn der GR zur Transkription notwendige Kofaktoren kompetitiv bindet und so die Transkription behindert wird dies „squelching“ genannt²⁵.

Außerdem können GK die Chromatinstruktur beeinflussen: einige Kofaktoren die vom GR rekrutiert werden weisen Aktivität als Histonacetylase oder -deacetylase auf²⁵.

Schließlich beeinflussen GK die Translation, es gibt eine gegenseitige Beeinflussung von GKs und mikro-Ribonukleinsäuren (mi-RNS). So beeinflussen GKs die Produktion von mi-RNS, mi-RNS die Produktion von GR und die mi-RNS von regulierten Genen²⁵.

1.3.2.3 Nichtgenomische Effekte

In unterschiedlichen Studien konnten nach Gabe von GK Effekte *in vitro* und *in vivo* in weniger als einer halben Stunde und teilweise nach einer Minute gezeigt werden³⁴⁻³⁶. Dies erscheint zu schnell um ein Binden des GK am GR, Translokation in den Zellkern und Transkription und Translation eines Proteins zu ermöglichen. Deshalb wurden nichtgenomische Effekte des GR postuliert. Deren genauer Mechanismus ist noch ungeklärt³⁷⁻³⁹

1.3.3 Apoptoseinduktion

Apoptose ist eine regulierte Form des Zelltodes und steht damit im Gegensatz zur Nekrose. In einer Übersichtsarbeit aus dem Jahr 2007 nennt Elmore⁴⁰ folgende morphologischen Kennzeichen einer apoptotischen Zelle: Kondensierung der Zelle und des Chromatins, Fragmentierung der DNS und des Zellkerns, ein Blasenbilden der Zellmembran sowie Fragmentierung der Zelle in kleinere apoptotische Körper.

Elmore beschreibt zwei unterschiedliche Wege die zu Apoptose führen: den extrinsischen und den intrinsischen Weg. Die Initiierung der Apoptose unterscheidet sich in den beiden Wegen, es werden dann aber die gleichen Prozesse durch die gleichen Moleküle, die sogenannten Caspasen, eingeleitet. Caspasen sind Cysteinproteasen, die Proteine C-terminal von Aspartat spalten. Caspasen liegen in der Zelle als inaktive Zymogene vor.

Der extrinsische und intrinsische Weg aktivieren unterschiedliche sogenannte Initiator-caspasen, die dann die gleichen Effektorcaspasen aktivieren (Caspase-3, -6 und -7). Diese spalten dann unter anderen Proteine des Zytoskeletts und führen so zu den oben genannten charakteristischen Veränderungen der Zelle.

Der extrinsische Weg basiert auf der Bindung von Transmembranrezeptoren der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-Familie. Am besten charakterisiert ist first apoptosis signal (FAS). Nach Bindung vom FAS-Ligand rekrutiert der FAS-Rezeptor Caspase-8 zum „death inducing signaling complex“, der dann die Effektorcaspasen aktiviert.

Der intrinsische Weg spielt sich in den Mitochondrien ab. Bestimmte apoptotische Stimuli führen dazu, dass Proteine der BCL-2-Familie eine Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran bewirken. Dadurch gelangen pro-apoptotische Proteine wie Cytochrom *c* und second mitochondria-derived activator of caspases (SMAC) aus dem mitochondrialen Intermembranraum ins Zytosol⁴¹. Cytochrom *c* bildet mit Apoptotic protease activating factor 1 und Caspase-9 das sogenannte Apoptosom, welches wiederum die Effektorcaspasen aktiviert. SMAC indessen hemmt „inhibitors of apoptosis proteins“, eine Gruppe von Proteinen, welche Caspasen binden und so ihre Aktivierung verhindern.

1.3.3.1 BCL-2 Rheostat

Die BCL-2-Familie an Proteinen ist essentiell für den intrinsischen Weg der Apoptose. Ihr Zusammenspiel wird als BCL-2-Rheostat bezeichnet. Sie integrieren pro- und anti-apoptotische Stimuli. Bei Überwiegen der apoptotischen Stimuli lösen sie eine Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran aus.

Allen Mitgliedern ist die BCL-2-Homologie-Domäne (BH-Domäne) gemein. Man kann die Proteine anhand ihrer Funktion und Struktur in drei Gruppen teilen: Eine pro- und eine anti-apoptotische Gruppe, die jeweils alle vier BH-Domänen aufweisen, und eine Gruppe, die nur die dritte BH-Domäne aufweist (*Abbildung 5*)⁴².

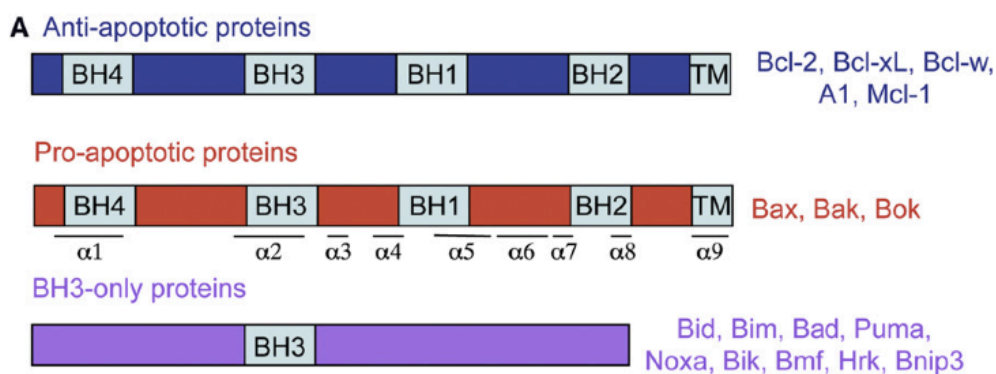


Abbildung 5: Struktur der anti- und pro-apoptotischen sowie der nur die dritte BH-Domäne aufweisenden Mitglieder der BCL-2-Familie, aus Martinou *et al.*⁴³

Die pro-apoptotischen Proteine wie zum Beispiel BAX und BAK sind dabei für die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran zuständig. Dies ist der entscheidenden Schritt des intrinsischen Weges der Apoptose. Für diese ist vor allem die Oligomerisierung von BAX von Bedeutung.

Das genaue Zusammenspiel ist sehr komplex und mehrere Modelle wurden vorgeschlagen. Zusammenfassend liegt die Gruppe der pro-apoptotischen Proteine in einer inaktiven Form vor und kann von der nur die dritte BH-Domäne aufweisenden Gruppe wie zum Beispiel BIM und BMF aktiviert werden. Gleichzeitig binden und neutralisieren die anti-apoptotischen Proteine, wie z.B. BCL-2 und MCL-1, sowohl die pro-apoptotischen als auch die nur die dritte BH-Domäne aufweisenden Proteine. Allerdings reagieren nicht alle Proteine gleich miteinander, sie haben bevorzugte Interaktionspartner. Zusätzlich scheinen viele weitere Faktoren wie die Lipid- und Proteinzusammensetzung der Membran und die konstitutiv ablaufende Fusion und Spaltung von Mitochondrien diesen Prozess zu beeinflussen.

1.3.4 Glukokortikoide und ALL

In der den Zelltod auslösenden Wirkung von GK auf ALL-Blasten wurde der intrinsische Weg der Apoptose als ursächlich erkannt.

CCRF-CEM ist eine 1964 gewonnene T-ALL Zelllinie, die GK-empfindlich ist und in der Erforschung der ALL eingesetzt wird^{44,45}. Im Subklon C7H2 dieser Zelllinie blockiert der spezifische Inhibitor crmA Caspase-8 und damit die extrinsische Apoptose, aber nicht die durch GK induzierte Apoptose⁴⁶. Außerdem verhindert die Expression von BCL-2 die GK-induzierte Apoptose für 24 Stunden⁴⁷.

Ploner *et al.*⁴⁸ untersuchten die Expression der BCL-2-Familie in Primärmaterial aus ALL-Patienten nach Behandlung mit GK. Mehrere Gene der BCL-2-Familie waren reguliert, am meisten waren die pro-apoptotischen, nur die dritte BH-Domäne aufweisenden Gene *BCL2L11* und *BMF* reguliert.

Weiterhin reduzierte ein „knockdown“ und erhöhte eine Induktion dieser Gene die Apoptose in C7H2-Zellen nach Behandlung mit GK. Die Induktion anti-apoptotischer Mitglieder der BCL-2-Familie wie *BCL2* verhindert die Apoptose nach Behandlung mit GK.

Zusammenfassend scheinen GK ihre apoptotische Wirkung über eine Beeinflussung des sogenannten BCL-2-Rheostats auszuüben. Der genaue Mechanismus ist jedoch unklar und es gibt viele Mitglieder der BCL-2-Familie, die über unterschiedliche Wege beeinflusst werden könnten.

Beispielhaft gibt es Studien zur Expression von dem pro-apoptotischen, nur die dritte BH-Domäne aufweisendem Protein BIM in ALL-Zellen bei Behandlung mit GK. Heidari *et*

*al.*⁴⁹ implizieren in CCRF-CEM-Zellen *c-JUN* und *RUNX2* als von GK induzierten Transkriptionsfaktoren. Beide sind für die Induktion von *BCL2L1* notwendig. Jing *et al.*⁵⁰ zeigten in einem Maus-Xenograft-Modell der ALL eine Regulation von *BCL2L1* über ein direktes Binden des GR an ein GRE. GR fördert außerdem die Expression von *KLF13*, welches die Expression von *MYB* hemmt, welches wiederum die Expression von *BCL2* hemmt.

Da es 25 Gene in der BCL-2-Familie gibt, scheint die Regulation durch GK außerordentlich komplex.

1.3.4.1 GK Resistenz

Resistenz gegen GK lässt sich in einigen Patienten schon vor Therapiebeginn in Blasten nachweisen. Der Anteil GK-resistenter Blasten aus Patientenproben nimmt mit Verlauf der Therapie und damit nach wiederholter Behandlung mit GK zu⁵¹.

Schlechtes Ansprechen auf GK ist ein schlechter prognostischer Faktor¹². Der Mechanismus, der zur Resistenz von ALL-Zellen gegen GK führt, könnte Aufschluss über apoptotischen Wirkmechanismus von GK geben.

Der Fokus der Erforschung der Resistenzentwicklung gegen GK im Rahmen der ALL lag lange Zeit auf dem GR⁵². So zeigten Bachmann *et al.*³⁴, dass die Translokation des GR in den Zellkern und das Binden an GRE in GK-resistenten Zelllinien aber nicht in Primärmaterial beeinträchtigt ist. Weiterhin findet man durch Sequenzierung des GR-Gens in pädiatrischen Patienten sowohl vor Behandlung als auch nach einem Rezidiv nur selten somatische Mutationen des GR^{53,54}. Zudem konnte in Untersuchungen der Boten-RNS (m-RNS) des GR von Patienten sowohl vor Behandlung als auch nach Rezidiven kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Splicevarianten und GK-Resistenz nachgewiesen werden⁵⁵.

Hollemann *et al.*⁴⁴ untersuchten ALL-Blasten aus unbehandelten Patienten auf Empfindlichkeit auf standardmäßig in der Induktionsphase eingesetzte Chemotherapeutika. In GK-resistenten Zellen wurde im Vergleich zu anderen Zellen besonders Gene aus dem Kohlenhydratstoffwechsel unterschiedlich exprimiert. Für die Resistenz gegen Asparaginase, einem standardmäßig in der ALL eingesetzten Therapeutikum, welches in den Aminosäurestoffwechsel eingreift, zeigte sich eine differentielle Expression von Genen des Proteinmetabolismus (*Abbildung 6*).

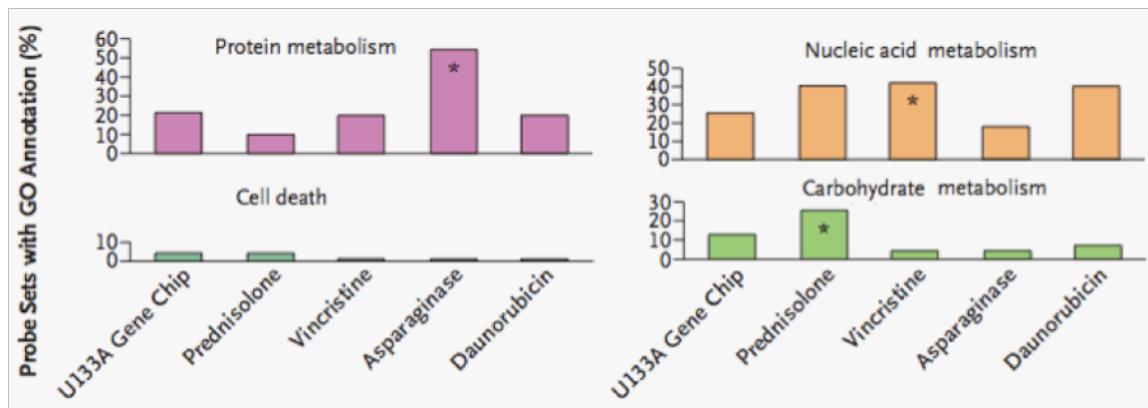


Abbildung 6: Zugehörigkeit zu Gene Ontology Gruppen unterschiedlich exprimierter Gene je nach Resistenz gegenüber Chemotherapeutika in Blasten von pädiatrischen ALL-Patienten. Abgebildet mit Genehmigung aus Holleman *et al.*⁴⁴, Copyright Massachusetts Medical Society.

In T-ALL-Zelllinien geht Resistenz gegen GK mit einer veränderten Expression von Genen in den Bereichen Glykolyse, oxidative Phosphorylierung, Cholesterolsynthese, Glutamatstoffwechsel und Aktivierung des PI3K/AKT/mTOR-Signalweges einher. Differenzielle Expression der Enzyme der Glykolyse, des Glutamin- und des Cholesterolfstoffwechsels waren in einer Reanalyse einer vorherigen Gensequenzierungsstudie von Zellen pädiatrischen ALL-Patienten prädiktiv für ein Rezidiv⁵⁶.

Verschiedene Arbeitsgruppen zeigten, dass der Inhibitor der Glykolyse 2-Desoxy-Glukose (2-DG) mit GK synergistisch wirkt. In GK-resistenten Zelllinien ist der apoptotische Effekt von 2-DG ausgeprägter^{6,57,58}.

Dieser Synergismus ist selektiv. Ein Synergismus zwischen 2-DG und Vincristin, Gemcitabin, Daunorubicin, einer Reexpression von p53 oder einem FAS-Liganden wurde nicht gefunden.

1.3.5 Metabolische Theorie

Ein veränderter Tumormetabolismus zählt zu den zehn „hallmarks of cancer“⁵⁹. Otto Warburg beschrieb 1924, dass Krebszellen auch in Anwesenheit von Sauerstoff eine stark erhöhte glykolytische Aktivität aufweisen und vermehrt durch Glykolyse ATP erzeugen⁶⁰.

Lange Zeit glaubte man, dass defekte Mitochondrien Auslöser für die gesteigerte Glykolyse wären. Mittlerweile weiß man, dass nicht eine ausreichende Produktion von ATP sondern Metaboliten wie Acetyl-CoA für die Makromolekülsynthese den limitierenden metabolischen Faktor für proliferierende Zellen darstellt. Die gesteigerte Glykolyse ist eine Adaptation, welche über den Pentosephosphatweg, den Ein-Kohlenstoff-Stoffwechsel und den Krebszyklus die benötigten Metabolite zur Biogenese bereitstellt⁶¹.

Weiterhin weiß man, dass Variationen des Stoffwechsels wie Diabetes und dessen Behandlung das Entstehen und Fortschreiten von malignen Erkrankungen beeinflussen, onkogene Mutationen den Stoffwechsel von malignen Zellen regulieren und der Stoffwechsel von malignen Zellen ein effektives Ziel für onkologischen Therapien ist⁶².

Asparaginase ist ein Beispiel für eine erfolgreiche Behandlungsstrategie, welche in den Tumormetabolismus eingreift. Sie wird neben GK in der Therapie der ALL eingesetzt und nutzt den Umstand, dass ALL-Zellen im Gegensatz zu normalen Zellen kein Asparagin bilden können und dieses aus dem Blut aufnehmen müssen. Der durch Asparaginase katalysierte, vermehrte Abbau von zirkulierendem Asparagin zu Aspartat und Ammoniak entzieht daher den Leukämiezellen benötigtes Asparagin, was wiederum zum Zelltod führt.

GK haben vielfältige metabolische Wirkungen. Genexpressionstudien an ALL-Zellen zeigen, dass GK die Expression glykolytischer Enzyme hemmen und die Expression des Enzyms 6-Phospho-fructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase fördern^{63,64}. Dieses Enzym ist ein wichtiger Regulator der Glykolyse. So liegt die Vermutung nahe, dass die zytostatische und zytotoxische Wirkung von GK auch durch eine Hemmung der Glykolyse erfolgt.

2-DG ist ein Glukoseanalog, welches über Glukosetransporter in die Zelle aufgenommen und zu 6-Phospho-2-Desoxy-Glukose konvertiert wird. 6-Phospho-2-Desoxy-Glukose kann nicht weiter verstoffwechselt werden und akkumuliert in der Zelle. Über eine kompetitive Hemmung der Glucose-6-phosphat-Isomerase bewirkt es eine Hemmung der weiteren Schritte der Glykolyse^{65,66}.

Einige Arbeitsgruppen vertreten jedoch die alternative Theorie, dass 2-DG die Apoptose nicht über eine Hemmung der Glykolyse sondern über eine Hemmung der O-Glykosylierung von Membranproteinen im endoplasmatischen Retikulum (ER) auslöst⁶⁷.

DeSalvo *et al.*⁶⁸ zeigten, dass Zugabe von Mannose die Apoptose durch 2-DG in ALL-Zellen teilweise mindert. Es ist jedoch unklar inwieweit die Verstoffwechselung von Mannose gegenüber Glukose durch 2-DG unterschiedlich gehemmt wird.

Zudem wurde die Apoptoseinduktion durch 2-Fluoro-Desoxy-Glukose (2-FDG) untersucht. 2-FDG verhindert die O-Glykosylierung weniger stark als 2-DG, ist aber auch ein Hemmstoff der Glykolyse⁶⁹. 2-FDG wirkt in ALL-Zelllinien weniger apoptotisch, was die Theorie stützt, dass die Hemmung der O-Glykosylierung eine Rolle bei der Induktion der Apoptose spielt.

Die Inhibierung von 78 kDa glucose-regulated protein (GRP78) verstärkt die apoptotische Wirkung von 2-DG. GRP78 ist an der „unfolded protein response“ als Antwort auf ER-Stress beteiligt. Gleichzeitig verleiht GRP78 jedoch Resistenz gegen verschiedene Chemotherapeutika und interagiert direkt mit BCL-2-Proteinen⁷⁰.

1.3.6 Vorarbeiten der Arbeitsgruppe

Eberhart *et al.* konnten zeigen, dass 2-DG die von Dexamethason (DEX) induzierte Apoptose beschleunigt und Zellen der T-ALL-Zelllinie CEM-CCRF-C7H2 und der pre-B-ALL-Zelllinie 697/EU-3 auf per-se nichttödliche Dosen DEX empfindlich macht (*Abbildung 7*)⁶.

Weiterhin wurden in dieser Arbeit die durch die Kombination beider Substanzen verursachten metabolischen Veränderungen genauer untersucht. Dass DEX und 2-DG einzeln und in Kombination tatsächlich die Glykolyse hemmen, zeigen die unter Behandlung erniedrigte Laktatsekretion und die verringerte Glukoseaufnahme. Diese konnten nicht allein durch eine verringerte Laktatdehydrogenaseaktivität beziehungsweise eine verringerte Expression von Glukosetransportern erklärt werden. Eine Akkumulation von 2-Desoxy-Phosphogluconat und Orotat deuten darauf hin, dass auch der Pentosephosphatweg von der metabolischen Störung betroffen ist.

Zusätzlich wurde die mitochondriale Aktivität unter Behandlung analysiert. 24 h nach Behandlung mit DEX und 2-DG alleine war der basale Sauerstoffverbrauch der Zellen im Vergleich zur Kontrolle nicht verändert, durch die Kombination der beiden Substanzen kam es jedoch zu einer Reduktion von 35 %. Es konnte sowohl ein Substratmangel im Zitratzyklus sowie ein reduzierter Mitochondriengehalt als Ursachen ausgeschlossen werden. Die Gabe von DEX alleine führte nach ca. 36 h zu einer ähnlichen Reduktion. Diese Daten legten nahe, dass mitochondriale Veränderungen durch die Kombination verstärkt induziert werden.

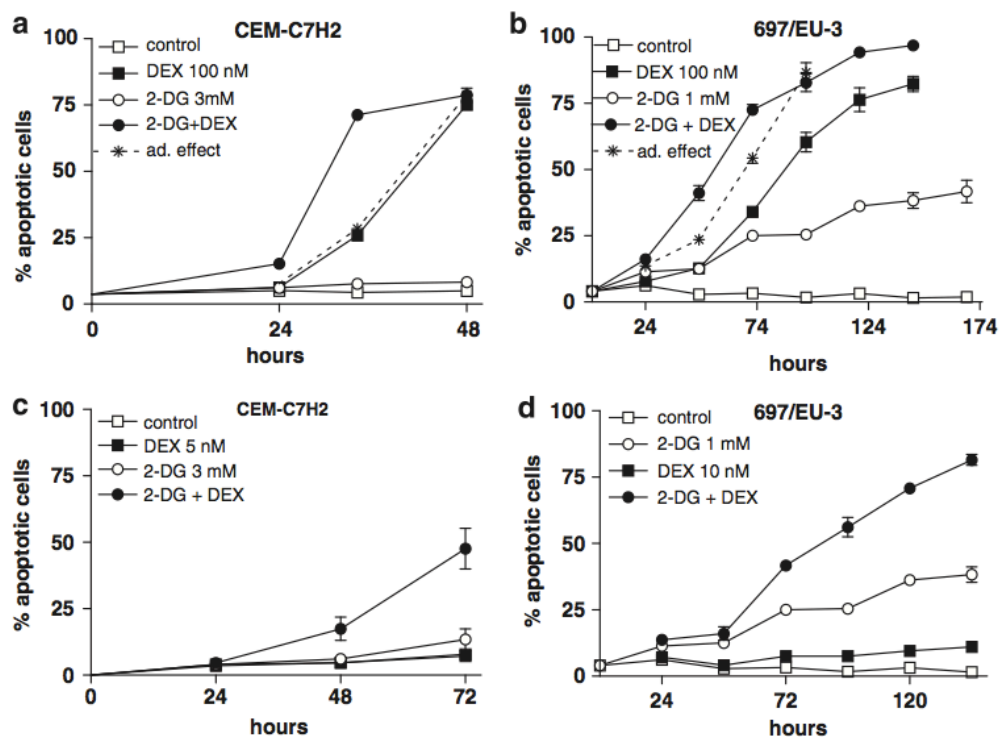


Abbildung 7: Hinzufügen von 3 mM beziehungsweise 1 mM 2-DG beschleunigt die DEX-induzierte Apoptose in CEM-C7H2 (A) und 697/EU-3 (B) Zellen um 24 h. Außerdem macht 2-DG beide Zelllinien für niedrigere Dosen an DEX empfindlich ((C) CEM-C7H2: 5 nM DEX; (D) 697/EU-3: 10 nM DEX), aus Eberhart *et al.*⁶

Weiterhin konnte in der Kombinationsbehandlung ein stärker reduzierter Gehalt an mitochondrial gebundener Hexokinase II (HK II) nachgewiesen werden.

Eberhart *et al.* konnten mittels hochauflösender Respirometrie zeigen, dass die durch DEX reduzierte Atmung nicht in resistenten Subklonen beobachtet werden (*Abbildung 8*)⁷¹.

Diese Daten legen nahe, dass GK zumindest teilweise durch eine Hemmung des Energiestoffwechsels Apoptose induzieren.

			ROUTINE	ETS	ATP
			[$\text{pmol s}^{-1} \text{mg}^{-1}$]	[$\text{pmol s}^{-1} \text{mg}^{-1}$]	[nmol mg^{-1}]
<i>C7H2</i>					
24 h	C		216 ± 6	468 ± 35	43 ± 0
	DEX		211 ± 4	466 ± 36	42 ± 1
36 h	C		214 ± 5	534 ± 5	49 ± 1
	DEX		$157 \pm 5^{***}$	$369 \pm 29^*$	$41 \pm 1^{**}$
<i>697/EU-3</i>					
24 h	C		187 ± 6	305 ± 13	39 ± 2
	DEX		171 ± 15	219 ± 46	40 ± 2
36 h	C		189 ± 9	327 ± 42	42 ± 6
	DEX		$117 \pm 12^{***}$	171 ± 52	$28 \pm 3^*$

Abbildung 8: Mitochondriale Routineatmung (ROUTINE) und nach Entkopplung (ETS) sowie zellulärer ATP-Gehalt in ganzen Zellen der T-ALL Zelllinie C7H2 sowie der pre-B-ALL-Zelllinie 697/EU-3 nach 24 beziehungsweise 36 h in der Kontrollgruppe und nach Behandlung mit 100 nM DEX, aus Eberhart *et al.*⁷¹

Außerdem wurde die Aktivität der einzelnen Komplexe der Atmungskette genauer untersucht. Dafür wurde die Zellmembran mit Digitonin permeabilisiert, im Anschluss wurde

die maximale Kapazität einzelner Enzyme der Atmungskette im gekoppelten und entkoppelten Zustand durch die Gabe von spezifischen Substraten analysiert.

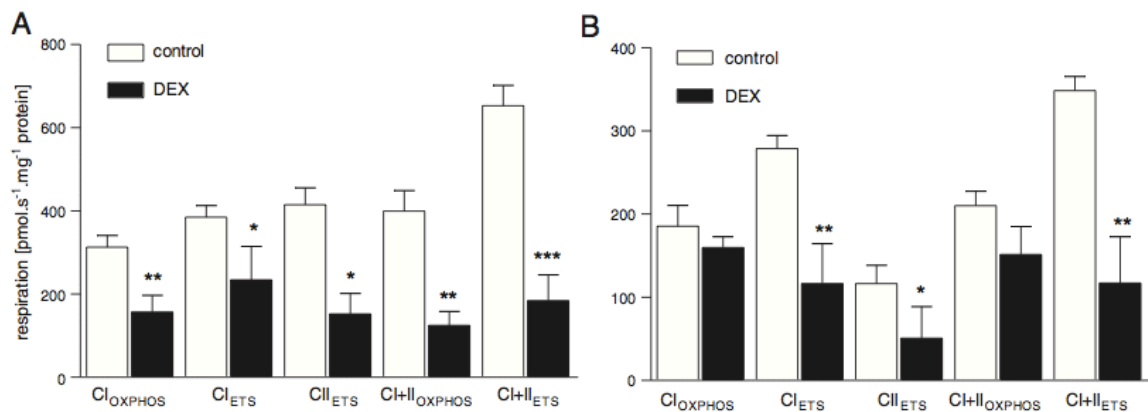


Abbildung 9: Maximale Aktivität einzelner Komplexe der Atmungskette nach Entkoppelung nach 24 h Behandlung in der Kontrollgruppe sowie nach Behandlung mit DEX in permeabilisierten Zellen ((A) C7H2, (B) 697/EU-3), aus Eberhart *et al.*⁷¹

Dabei zeigt sich ein Absinken des Sauerstoffverbrauchs in den mit DEX behandelten Zellen nach Permeabilisierung gegenüber unbehandelten Zellen nach 24 h (*Abbildung 9*). Dies steht im Gegensatz zu den intakten Zellen, in denen sich ein Unterschied im Sauerstoffverbrauch erst nach 36 h zeigt.

Dies weist auf eine Veränderung der Mitochondrienmembran in den mit DEX behandelten Zellen hin. Digitonin permeabilisiert die Zellmembran durch Interaktion mit Cholesterin. Durch den geringen Gehalt der Mitochondrienmembran an Cholesterin sollte Digitonin auf diese keinen Einfluss haben⁷².

Weil eine Zugabe von Cytochrom *c* einen Teil der Aktivität in permeabilisierten Zellen wiederherstellen konnte, kann davon ausgegangen werden, dass die Permeabilisierung der Zellen zu einer Freisetzung von Cytochrom *c* aus dem Intermembranraum der Mitochondrien führt. Dies geschieht normalerweise nur nach Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran durch BCL-2-Proteine im Zuge der Apoptose.

Daraufhin wurde zunächst die Regulation von Membranproteinen in den Mitochondrien auf DNS-Ebene untersucht. Es zeigte sich eine Repression des mitochondrialen Glutamat/H⁺-Symporters (*SLC25A22*) und des Dicarboxylattransporters (*SLC25A10*), sowie der Untereinheiten E und C1 des F₀-Komplexes der ATP-Synthase.

Es wurde außerdem die mRNS von TIM und TOM Untereinheiten untersucht. 15 Untereinheiten waren in allen drei Zelllinien signifikant weniger exprimiert. Dieser Trend war in den pre-B-ALL-Zelllinien weniger stark ausgeprägt. Weiterhin war der Gehalt an dem Chaperonprotein Heat Shock Protein 70, welches an dem Proteintransport durch TIM und TOM beteiligt ist, erniedrigt.

Für *TIMM8A* und *TOMM40* wurde auch eine Verringerung der Proteinkonzentration gezeigt.

Die Analyse von Patientendaten ergab eine statistisch signifikante Erniedrigung der ATP-Synthase. Eine verringerte Expression von TIM und TOM und Dicarboxylattransporter konnte auch in den Patientenproben gezeigt werden, es waren jedoch unterschiedliche Transporter als in den Zelllinien.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass GK die Glykolyse und in weiterer Folge auch die mitochondriale Aktivität inhibieren und dies für den apoptotischen Effekt von GK von Bedeutung ist. Die Bedeutung der Regulation der Proteine in den Mitochondrienmembran und die unspezifischen Veränderungen der äußeren Mitochondrienmembran bleiben unklar.

1.4 Ziel der Arbeit

Diese Arbeit verfolgt zwei Ziele. Erstens soll der Mechanismus des synergistischen, apoptotischen Effekts von 2-DG und DEX weiter aufgeklärt werden. Zu diesem Zweck werden mit einem proteomischen Shotgunverfahren die Konzentrationen von Proteingruppen in der mikrosomalen Fraktion von unbehandelten sowie mit DEX, 2-DG und beiden Wirkstoffen behandelten Zellen des GK-empfindlichen Subklons C7H2 der ALL-Zelllinie CCRF-CEM-C7H2 18 h und 30 h nach Beginn der Gabe von Dexamethason, also vor Einsetzen der Apoptose, bestimmt.

Zweitens soll zur Optimierung von zukünftigen proteomischen Experimenten eruiert werden, ob eine drei- statt zweidimensionale chromatographische Trennung von Peptiden vor der massenspektrometrischen Analyse zu einer höheren Anzahl an identifizierten Proteingruppen führt.

2 Material

2.1 Geräte

Brutschränke	BBD 6220	Heraeus GmbH, Hanau
Zentrifugen	Megafuge 30R	Heraeus GmbH, Hanau
Zellzähler	CASY1 TT	Schärfe System, Reutlingen, Germany
Durchflusszytometer	FACS Calibur	BD, Heidelberg
Respirometer	Oxygraph-2k	Oroboros Instruments, Innsbruck
Spektrometer	Omega FLUOstar	BMG Labtech GmbH, Ortenberg
Ultrazentrifuge	Optima TL Ultracentrifuge	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Chromatograph	Agilent 1100 Series	Agilent Technologies Deutschland GmbH, Reutlingen
Chromatograph	Ultimate3000 nano-HPLC	Dionex, Idstein
Massenspektrometer	Q-Star XL quadrupole-TOF Tandem-Massenspektrometer	AB Sciex Germany GmbH, Darmstadt
Wasservollentsalzer	Purelab Plus	ELGA LabWater Veolia Water Technologies Deutschland GmbH, Celle

2.2 Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

Alle Verbrauchsmaterialien und Chemikalien wurden von Sigma Aldrich bestellt, falls nicht anders aufgeführt.

Zellkulturzusätze	Penicillin	Life Technologies GmbH, Ober-Olm
Zellkulturzusätze	Streptomycin	Life Technologies GmbH, Ober-Olm
Zellkulturzusätze	L-Alanyl-L-Glutamin	Biochrom GmbH, Berlin
Apoptosebestimmung	Dead Cell Apoptosis Kit with Annexin V FITC and PI, for flow cytometry	Beckman Coulter, Krefeld
Proteinkonzentrationsbestimmung	Fluoroprobe Protein Quantification Kit	Sigma-Aldrich
Elektrophoresemarker	PageRuler Broad Range Protein Ladder	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Elektrophoresegele	NuPAGE 4-12% Bis-Tris-Gele	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Elektrophoresepuffer	NuPAGE MOPS SDS Running Buffer (20X)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Elektrophoreseprobenpuffer	NuPAGE LDS Sample Buffer	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Silberfärbung	Ethanol, p.a. Qualität	Sigma-Aldrich
Silberfärbung	Essigsäure, p.a. Qualität	Sigma-Aldrich
Silberfärbung	Natriumthiosulfat, p.a. Qualität	Sigma-Aldrich
Silberfärbung	Silbernitrat, p.a. Qualität	Sigma-Aldrich
Silberfärbung	Natriumhydrogencarbonat, p.a. Qualität	Sigma-Aldrich
Silberfärbung	Formaldehyd, p.a. Qualität	Sigma-Aldrich

Silberfärbung	Ethylendiamintetraacetat	Sigma-Aldrich
Proteinverdauung	Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade	Promega GmbH, Mannheim
Isotopenmarkierung der Peptide	iTRAQ™ 4plex	ABSciex
SCX Spintips	PolyLC Sulfoethyl A Top-tips	Chromatographic Technologies, Basel, Schweiz
Chromatographie	K ₂ HPO ₄ , p.a. Qualität	Sigma-Aldrich
Chromatographie	NaCl, p.a. Qualität	Sigma-Aldrich
Chromatographie	Acetonitril, p.a. Qualität	Sigma-Aldrich
Chromatographie	KCl, p.a. Qualität	Sigma-Aldrich
Chromatographie	Ammoniumhydroxid, p.a. Qualität	Sigma-Aldrich
Chromatographie	Ammoniumformiat, p.a. Qualität	Sigma-Aldrich
Chromatographie	Methanol, LC-grade	Sigma-Aldrich
Chromatographie	Ameisensäure, p.a. Qualität	Sigma-Aldrich

2.3 Software

Auswertung der Massenspektrometischen Daten	ProteinPilot (Version 4.5; Revision 1656; Paragon Algorithm 4.5.0.0, 1654)	ABSciex
---	--	---------

2.4 Zellkultur

Es wurde der GK-empfindliche Subklon C7H2 der ALL-Zelllinie CCRF-CEM-C7H2 benutzt⁷³.

3 Methoden

3.1 Zellkultur und Zellzählung

Die Zellen wurden in RPMI 1640 mit 10 % hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum kultiviert. Weiterhin wurden 500 ml Medium 2,5 ml Penicillin und 2,5 ml Streptomycin für eine Konzentration von 50 U/ml beziehungsweise 50 µg/ml sowie 5 ml L-Alanyl-L-Glutamin für eine Konzentration von 2 mM zugesetzt.

Die Zellen wurden in Brutschränken bei 37,2 °C, in einer Atmosphäre von 5 % CO₂ und einer 93 % relativen Luftfeuchtigkeit kultiviert.

Zellzahlen wurden mit dem CASY bestimmt und die Zellen wurden auf 300.000 /ml verdünnt und in 75 cm² Zellkulturflaschen gegeben. Die Zellen wurden alle 48 bis 72 h wieder auf die Ausgangskonzentration verdünnt.

3.2 Apoptoseinduktion

Dem Zellkulturmedium wurden DEX und 2-DG hinzugegeben um Konzentrationen von 100 nM DEX beziehungsweise 3 mM 2-DG zu erreichen.

Da DEX in Ethanol gelöst ist wurden alle nicht mit DEX behandelten Zellen mit einer entsprechenden Menge Ethanol als Lösungsmittelkontrolle zugegeben.

Nach 18 h und 30 h wurden die Zellen abzentrifugiert, mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen und eingefroren.

3.3 Durchflusszytometrie

Die Apoptoserate nach Behandlung der Zellen wurde per Durchflusszytometrie und Färbung mit Annexin-V und 7-AAD bestimmt ⁴⁶. Annexin-V ist ein spezifisch an Phosphatidylserin bindendes Protein, welches in der frühen Phase der Apoptose an der Zelloberfläche exprimiert wird. 7-AAD ist ein Vitalfarbstoff und färbt Zellen deren Plasmamembran bereits geschädigt ist an. Apoptoseraten wurden nach 18, 24, 30 und 48 h Behandlung bestimmt.

Dazu wurde das „Dead Cell Apoptosis Kit with Annexin V FITC and PI“ nach Herstellerprotokoll eingesetzt.

Der Annexin V „binding buffer“ wurde 1:10 mit Aqua bidestillata verdünnt. Es wurden 1×10^6 Zellen für 4 min bei 552 g und 4 °C zentrifugiert, mit phosphatgepufferter Salzlösung gewaschen und in 100 µl „binding buffer“ rekonstituiert. Es wurden pro Probe je 5 µl Annexin V und 7-AAD hinzugegeben und für 15 min bei Raumtemperatur im

Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden 400 µl “binding buffer” hinzugegeben und die Probe am FACS Calibur gemessen.

3.4 Hochauflösende Respirometrie

Um die Vergleichbarkeit des Zellmodells mit den Vorarbeiten zu überprüfen wurde der Sauerstoffverbrauch der Zellen mittels hochauflösender Respirometrie überprüft. Dabei wird der Sauerstoffverbrauch einer Zellsuspension in einer abgedichteten Kammer mit einer Clark-Elektrode gemessen. Damit kann der Sauerstoffverbrauch von Zellen sehr genau bestimmt werden.

Dazu verwendete ich einen Oxygraph-2k. Die Zellen wurden in mitochondrialem Medium MiR05 suspendiert und in einer Konzentration von 1×10^6 /ml in die Kammern des Respirometers gefüllt. Die Temperatur der Kammern lag bei 37 °C. Da das Respirometer zwei Kammern enthält, konnten jeweils zwei Behandlungsgruppen gleichzeitig gemessen werden.

Zunächst wurde die Routineatmung gemessen. Nach Zugabe von 2 mM Malat wurde die Zellmembran mit 8,1 µM Digitonin permeabilisiert. Nach Zugabe von 10 mM Glutamat und 2,5 mM ADP wurde die Kapazität des Komplex I der Atmungskette gemessen. Die Intaktheit der äußeren Mitochondrienmembran wurde überprüft, indem 10 µM Cytochrom *c* hinzugegeben wurden. Dabei zeigt ein stimulierender Effekt von Cytochrom *c* auf den Sauerstoffverbrauch, dass die äußere Mitochondrienmembran permeabel ist.

Die maximale Kapazität zur oxidativen Phosphorylierung wurde nach Zugabe von 10 mM Succinat bestimmt. Anschließend wurde die Kapazität der Komplexe I und II nach Entkoppelung mittels Carbonyl-cyanid-p-(trifluoromethoxy)-phenylhydrazon (FCCP) bestimmt. FCCP wurde hierfür in Schritten von 0.5 mM titriert, bis der maximale Sauerstoffverbrauch erreicht war. FCCP ist ein Ionophor, welches reversibel Protonen bindet und diese durch die innere Mitochondrienmembran transportiert. Dadurch wird der Protonengradient aufgehoben und die Zellatmung von der ATP-Synthese entkoppelt. Gleichzeitig kommt es zu einer gesteigerten Atmung, da ein niedriges Membranpotential einen starken Stimulus darstellt.

Durch Zugabe von 0,5 µM Rotenon wurde der Komplex I gehemmt. Dadurch konnte die Kapazität von Komplex II im entkoppelten Zustand gemessen werden. Der Restsauerstoffverbrauch wurde nach Hemmung von Komplex III durch 2,5 µM Antimycin A gemessen.

3.5 Gewinnung der mikrosomalen Fraktion

Die Zellpellets wurden in 1,5 ml Reinstwasser gelöst und mit einer Ultraschallanode lysiert. Dazu wurde fünfmal auf der Einstellung Cycle 5 je 10 s lysiert, während die

Zellpellets auf Eis gekühlt wurden. Dann wurden die Proben für 10 min bei 12.000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Reinstwasser auf 3 ml aufgefüllt und für 1 h bei 150.000 g und 4 °C in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Die Pellets stellen die mikrosomale Fraktion dar und wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert⁷⁴.

Zu den Pellets wurden 600 µl 0,2 % Natriumdodecylsulfat hinzugegeben und über Nacht bei 4 °C in einer Kühlkammer unter ständigem Schütteln aufgelöst.

3.6 Proteingehaltsbestimmung

Der Proteingehalt der Proben wurde mit dem „FluoroProfile Protein Quantification Kit“ nach Protokoll des Herstellers bestimmt. Zusammenfassend wurden Reinstwasser, der Farbstoff Epicocconon und Puffer im Verhältnis 8:1:1 gemischt. In eine 96-Well-Platte wurden pro Well je 100 µl Reagenz und 100 µl Probe gefüllt. Die Fluoreszenz wurde im FLUOstar gemessen.

Zunächst wurde eine Kalibriergerade per Rinderserumalbumin erstellt. Dazu wurden für eine Verdünnungsreihe jeweils zwei Löcher mit den Konzentrationen 200 µg/ml, 150 µg/ml, 100 µg/ml, 75 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml, 12,5 µg/ml, 6,25 µg/ml, 3,125 µg/ml und 0 µg/ml befüllt.

Weiterhin wurden jeweils drei Löcher mit einer Probe gefüllt und der Proteingehalt jedes Loches anhand der Kalibriergeraden errechnet. Schließlich wurde der Mittelwert der drei Werte errechnet.

3.7 Differentielle Proteomanalyse mittels iTRAQ™

Zur relativen Quantifizierung der Proteine der unterschiedlichen Behandlungsgruppen wurde das „Isobaric tag for relative and absolute quantitation“ (iTRAQ™) System eingesetzt. Dabei werden die Proteine mit Trypsin verdaut und die Peptide N-terminal markiert. Die eingesetzten Markierungen werden aus Isotopen synthetisiert, so dass alle vier die gleiche Struktur und das gleiche Molekulargewicht haben. Dadurch verhalten sie sich in der Chromatographie und in der Ionisierung gleich. Nach Fragmentierung entstehen aber Reporterionen, die sich in ihrem Molekulargewicht und damit m/z unterscheiden (*Abbildung 10*). Anhand der relativen Menge an Reporterionen können die relativen Mengen an Peptiden und damit an Proteinen der unterschiedlichen Behandlungsgruppen bestimmt werden⁷⁵.

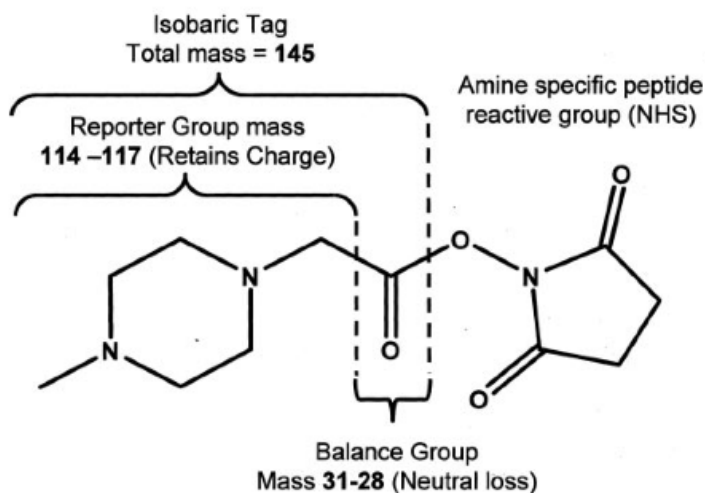


Abbildung 10: Molekulare Struktur der Markierung in iTRAQ™, aus Ross *et al.*⁷⁵

Zur Markierung der Peptide wurde das „iTRAQ™-4-Plex-Kit“ (ABSciex) nach einem leicht modifizierten Protokoll eingesetzt.

Zusammenfassend wurden 100 µg Protein pro Probe in 20 µl „dissolution buffer“ und 1 µl „denaturant“ aufgelöst. Dann wurden 2 µl „reducing agent“ hinzugegeben und für 1 h bei 60 °C inkubiert. Anschließend wurde 1 µl „cysteine blocking reagent“ hinzugegeben und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert.

2,5 µg Trypsin wurden in 25 µl Reinstwasser aufgelöst. Es wurden 10 µl pro Probe hinzugegeben und über Nacht 18 h inkubiert. Anschließend wurde erneut 2 µl Trypsin hinzugegeben und für 2 h inkubiert.

Dann wurden 2,5 µl je Probe für die Silberfärbung zur Verdauungskontrolle entnommen.

Die iTRAQ™-Reagenzien wurden in je 70 µl Ethanol aufgelöst, zu den Proben hinzugeben und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die miteinander zu quantifizierenden Proben vermischt.

Es wurden jeweils pro Replikat zwei Gruppen erstellt, in denen Behandlungsgruppe und Markierung wie folgt kombiniert wurden.

Tabelle 1: Zuordnung der iTRAQ™-Reporterionen:

	114	115	116	117
18 h Gruppe	18 h Kontrolle	18 h DEX	18 h 2-DG	18 h Kombi
30 h Gruppe	18 h Kontrolle	30 h Kontrolle	30 h DEX	30 h 2-DG

3.8 Gelelektrophorese und Silberfärbung

Um den Verdau der Proteine durch Trypsin zu kontrollieren wurden die Peptide per Gelelektrophorese⁷⁶ aufgetrennt und mit einer Silberfärbung⁷⁷ gefärbt. Es wurde auf Anwesenheit von Banden im Größenbereich von Proteinen überprüft.

Für die Gelelektrophorese wurden 2,5 µl der verdauten Probe mit 3,75 µl vierfach konzentriertem Lithium-Dodecyl-Sulfat-Puffer (NuPAGE) und 8,75 µl Reinstwasser gemischt. Die Proben wurden dann gleichzeitig mit 2 µl „PageRuler Broad Range Protein Ladder“ (ThermoScientific) auf 15-Well NuPAGE 4-12 % Bis-Tris-Gele aufgetragen und für 20 min bei 50 V und anschließend für 1 h bei 200 V elektrophoretisch getrennt.

Anschließend wurden die Gele silbergefärbt.

Tabelle 2: Puffer für die Silberfärbung:

Puffer 1	4 %	Ethanol
	10 %	Essigsäure
Puffer2	30 %	Ethanol
Puffer 3	0,02 %	Natriumthiosulfat
Puffer 4	0,1 %	Silbernitrat
Puffer 5	3 %	Natriumhydrogencarbonat
	0,05 %	Formaldehyd
Puffer 6	0,05 M	Ethylendiamintetraacetat

Die Gele wurden 1 h bei Raumtemperatur in Puffer 1 fixiert. Dann wurden sie zweimal für je 20 min mit Puffer 2 und einmal 20 min mit Reinstwasser gewaschen. Die Gele wurden daraufhin für 1 min mit Puffer 3 sensitiviert.

Dann wurden die Gele für 20 min bei 4 °C mit Puffer 4 inkubiert. Durch Zugabe von Puffer 5 wurden die Gele entwickelt, durch Zugabe von Puffer 6 die Reaktion gestoppt (*Tabelle 2*).

3.9 Flüssigchromatographie

Flüssigchromatographie ist eine Methode, um Stoffe anhand ihrer chemischen Eigenschaften aufzutrennen. Dabei werden eine mobile flüssige Phase und eine stationäre feste Phase eingesetzt. Dabei binden Stoffe an die stationäre Phase. Durch Variation der mobilen Phase im Zeitverlauf gehen die Stoffe zu unterschiedlichen Zeitpunkten in Lösung. So können die Peptide je nach eingesetztem chromatographischem Verfahren anhand von Eigenschaften wie zum Beispiel ihrer Ladung, Größe oder Lipophilie aufgetrennt werden.

Die isotopenmarkierten Peptide wurden mittels Flüssigchromatographie und Verwendung von zwei bzw. drei Trenndimensionen aufgetrennt, um die Anzahl der massenspektrometrisch identifizierten Proteine zu erhöhen. Die letzte Trennung geschah jeweils mittels Umkehrphasen-Chromatographie mit direkter Elution der getrennten Peptide in das Massenspektrometer.

3.9.1 Zweidimensionale Trennung

Zur zweidimensionalen Trennung wurden die Peptide zunächst mittels starker Kationenaustauschchromatographie in 40 Fraktionen aufgetrennt. Dazu nutzen wir einen Agilent 1100 Chromatographen und eine Agilent PL SCX Säule (1000 Å, 150 x 0,3 mm) und einen Puffer A aus in H₂O gelöstem Dikaliumhydrogenphosphat sowie einen Puffer B welcher zusätzlich Natriumchlorid und Acetonitril enthielt (*Tabelle 3*). Es wurde ein Fluss von 4 µl/min eingesetzt und der Anteil des Puffers B über 60 min von 2 % auf 98 % erhöht (*Tabelle 4*).

Es wurde von Minute 25 bis 65 je eine Fraktion pro Minute gesammelt.

Tabelle 3: Puffer für die starke Kationenaustauschchromatographie in der 2-dimensionalen Trennung:

Puffer A		Reinstwasser	pH 3
	20 mM	K ₂ HPO ₄	
Puffer B		Reinstwasser	pH 5,5
	20 mM	K ₂ HPO ₄	
	1,0 M	NaCl	
	10 %	Acetonitril	

Tabelle 4: Gradient für die starke Kationenaustauschchromatographie in der zweidimensionalen Trennung:

Zeit	Anteil Puffer B	Fluss
0 min	2 %	4 µl/min
10 min	2 %	4 µl/min
50 min	98 %	4 µl/min
55 min	98 %	4 µl/min
60 min	2 %	4 µl/min

3.9.2 Dreidimensionale Trennung

Zur dreidimensionalen Trennung wurden die Peptide zunächst auch per starker Kationenaustauschchromatographie aufgetrennt. Dazu wurden PolyLC Sulfoethyl A Toptips genutzt und mit fünf Puffern fünf Fraktionen eluiert. Als Puffer 1 wurden in Reinstwasser gelöste Ameisensäure und Acetonitril genutzt, als Puffer 5 wurden in Reinstwasser gelöstes Ammoniumhydroxid und Methanol genutzt. Puffer 2 bis 4 enthielten in Reinstwasser gelöstes Dikaliumhydrogenphosphat, Acetonitril sowie aufsteigende Konzentrationen an Kaliumchlorid (*Tabelle 5*).

Tabelle 5: Puffer für die starke Kationenaustauschchromatographie in der dreidimensionalen Trennung:

Puffer 1	0,1 %	Ameisensäure	
	20 %	Acetonitril	
Puffer 2	10 mM	K ₂ HPO ₄	pH 3
	100 mM	KCl	
	20 %	Acetonitril	
Puffer 3	10 mM	K ₂ HPO ₄	pH 3
	200 mM	KCl	
	20 %	Acetonitril	
Puffer 4	10 mM	K ₂ HPO ₄	pH 3
	300 mM	KCl	
	20 %	Acetonitril	
Puffer 5		Reinstwasser	
	5 %	Ammoniumhydroxid	
	30 %	Methanol	

Zunächst wurden die Toptips gewaschen. Dazu wurden 10 µl Puffer 1 aufgeladen und mit der mitgelieferten Spritze durch das TopTip gespritzt.

Die Peptide wurden nun in 10 µl Puffer 1 aufgenommen und durch das TopTip gespritzt. Der Durchlauf wurde weitere zweimal durch das TopTip gespritzt. Der Durchlauf mit den darin enthaltenen ungebundenen Peptiden wurde als Fraktion eins gesammelt.

Daraufhin wurden dreimal 10 µl Puffer 2 durch das TopTip gespritzt. Der Durchlauf wurde daraufhin als Fraktion zwei gesammelt. Dies wurde sequentiell mit Puffer 3 bis 5 für Fraktion drei bis fünf wiederholt.

Diese fünf Fraktionen wurden anschließend per basischer Umkehrphasen-Chromatographie in jeweils 15 weitere Fraktionen aufgetrennt. Dazu nutzen wir einen Agilent 1100 Chromatographen und eine Agilent Zorbax SB-C18 Säule (5 µm, 150 x 0,5 mm) und einen Puffer A aus in Reinstwasser gelöstem Ammoniumformiat sowie einen Puffer B welcher zusätzlich Acetonitril enthielt (*Tabelle 6*). Es wurde ein Fluss von 30 µl/min eingesetzt und der Anteil des Puffers B über 50 min von 2 % auf 95 % erhöht (*Tabelle 7*).

Zwischen Minute 5 und 50 wurde pro Minute eine Fraktion gesammelt. Anschließend wurden die Fraktionen der Minuten 5, 20 und 35, 6, 21 und 36, 7, 22 und 37, usw., für die abschließende Umkehrphasen-Chromatographie vereint.

Tabelle 6: Puffer für die basische Umkehrphasen-Chromatographie in der dreidimensionalen Trennung:

Puffer A		Reinstwasser	pH 7,5
	200 mM	Ammoniumformiat	
Puffer B		Reinstwasser	pH 7,5
	20 mM	Ammoniumformiat	
	80 %	Acetonitril	

Tabelle 7: Gradient für die basische Umkehrphasen-Chromatographie in der dreidimensionalen Trennung:

Zeit	Anteil Puffer B	Fluss
0 min	2 %	5 µl/min
5 min	2 %	30 µl/min
43 min	48 %	30 µl/min
45 min	95 %	30 µl/min
50 min	2 %	30 µl/min

3.9.3 Umkehrphasen-Chromatographie

Anschließend wurden die Fraktionen beider Protokolle wiederum per Umkehrphasen-Chromatographie weiter aufgetrennt und die eluierenden Peptide direkt in das Massenspektrometer durch Elektrospray-Ionisation eingeführt.

Dazu nutze ich einen Ultimate 3000 nano-HPLC und eine Pepmap100-C18-Säule (3 µm, 150 x 0,075 mm) und einen Puffer A aus in Reinstwasser gelöster Ameisensäure sowie einen Puffer B aus in Acetonitril gelöster Ameisensäure (*Tabelle 8*). Es wurde ein

Fluss von 0,3 $\mu\text{l}/\text{min}$ eingesetzt und der Anteil des Puffers B über 108 min von 4 % auf 90 % erhöht (Tabelle 9).

Tabelle 8: Puffer für die Umkehrphasen-Chromatographie:

Puffer A	Reinstwasser 0,1 % Ameisensäure
Puffer B	Acetonitril 0,1 % Ameisensäure

Tabelle 9: Gradient für die Umkehrphasen-Chromatographie:

Zeit	Anteil Puffer B	Fluss
0 min	4 %	0,3 $\mu\text{l}/\text{min}$
106 min	30 %	0,3 $\mu\text{l}/\text{min}$
108 min	90 %	0,3 $\mu\text{l}/\text{min}$

3.10 Massenspektrometrie

Die isotope markierten und aufgetrennten Peptide wurden anschließend mit einem QStar XL Massenspektrometer gemessen. Dieses misst wiederholt alle Peptide des Eluates im Massenbereich von 400-1250 m/z und wählt dann die zwei intensivsten aus, um ihre Fragmente zu messen.

3.11 Datenbanksuche

Die Daten wurden mithilfe des Programms ProteinPilot ausgewertet. Die gemessenen Spektren wurden gegen die menschliche Proteindatenbank Swissprot gesucht.

Aus den Peptidsequenzen kann durch Suche gegenüber einer menschlichen Proteindatenbank auf das Protein geschlossen werden. Da jedoch eine Unterscheidung zwischen unterschiedlichen Splicevarianten beziehungsweise posttranslatorische Modifikationen eines Proteins durch ein „bottom-up“ Shotgun-Verfahren nicht möglich ist, können im eigentlichen Sinne nur Proteingruppen identifiziert werden. Ich werde im folgenden der Einfachheit halber jedoch von Proteinen sprechen.

Um die Zahl falsch positiver Identifizierungen zu kontrollieren wird zudem die „false discovery rate“ bestimmt. Dabei werden die Peptide nicht nur gegen die entsprechende Proteindatenbank, sondern auch gegen eine künstliche, randomisierte Proteindatenbank gesucht.

Dabei wurden für die Liste regulierter Proteine alle Replikate und Methoden zum jeweiligen Zeitpunkt gemeinsam gesucht. Weiterhin wurden einzelne Replikate beziehungsweise Methoden oder Fraktionen einzeln gesucht um die Trennschärfe der verschiedenen chromatographischen Protokolle zu überprüfen.

Dazu wurden die Daten mit den Einstellungen ausgewertet (*Tabelle 10*).

Tabelle 10: Einstellungen für Protein Pilot:

Suchart	Paragon
Sample Type	iTRAQ™ 4-plex (peptide-labeled)
Digestion	Trypsin
Instrument	QSTAR ESI
Species	Homo Sapiens
Quantitate	on
Bias Correction	on
Background Correction	off
Database	Uniprot Swissprot
Search Effort	Rapid ID
Detected Protein Threshold	0,05 (10 %)

3.12 Auswertung der Daten

Es wurden die „protein summaries“ aus ProteinPilot exportiert. Es wurden nur die Proteine ausgewertet, die bei einer Suche gegen einer „Decoy“-Datenbank einer „false discovery rate“ von 1 % entsprechen. Weiter wurde die Auswertung auf Proteine begrenzt, die um den Faktor 1,5 im Vergleich zur Kontrollgruppe hoch- oder runterreguliert waren und mindestens $p < 0,05$ signifikant waren.

Aus der Liste der signifikant regulierten Proteine wurden einzelne Proteine ausgewählt und graphisch für alle Behandlungsgruppen dargestellt.

3.13 Statistik

ProteinPilot bietet zur Auswertung der Regulationsfaktoren der unterschiedlichen Behandlungen lediglich die Möglichkeit, für jede Behandlung für jedes Protein das Ergebnis eines t-Tests gegenüber der Kontrollgruppe auszugeben.

Da pro Protein mehrere Behandlungsgruppen und damit p-Werte ausgegeben werden, akkumulieren die Alphafehler. Dies könnte mit der Durchführung einer Varianzanalyse und anschließendem *post-hoc* Tests wie zum Beispiel eines Dunnett-Tests verhindert werden. Dies ist aufgrund der Art der Datenausgabe von ProteinPilot jedoch nicht möglich.

Weiterhin führt die große Anzahl an Proteinen, die untersucht werden zu einer Kumulierung der Alphafehler.

Es gibt unterschiedliche Möglichkeiten, dies zu kompensieren. Unter den häufig eingesetzten Möglichkeiten gehört die Bonferroni-Korrektur zu den strengen Korrekturverfahren, die die Signifikanz der Ergebnisse eher unterschätzt. Dabei entspricht das korrigierte Signifikanzniveau $pk = p / n$, wobei p das ursprüngliche Signifikanzniveau ist und n die Anzahl an Vergleichen.

Eine alternative, weniger strenge Möglichkeit ein alternatives Signifikanzniveau zu errechnen besteht in der Benjamini–Hochberg-Korrektur⁷⁸. Dabei werden die p-Werte aufsteigend nach ihrer Größe sortiert. Es wird der Vergleich mit dem größten p-Wert gesucht, für den gilt $p < (i/n) * R$. Alle Vergleiche mit einem kleineren p-Wert gelten als signifikant. Dabei ist i der Rang in Auflistung der p-Werte, n die Anzahl der Vergleiche. R entspricht der „false discovery rate“, der gewünschten Rate an falsch positiven Ergebnissen, welche nicht mit der „false discovery rate“ der Proteinidentifizierung verwechselt werden sollte.

4 Ergebnisse

4.1 Reproduktion der Vorergebnisse

4.1.1 Apoptoserate

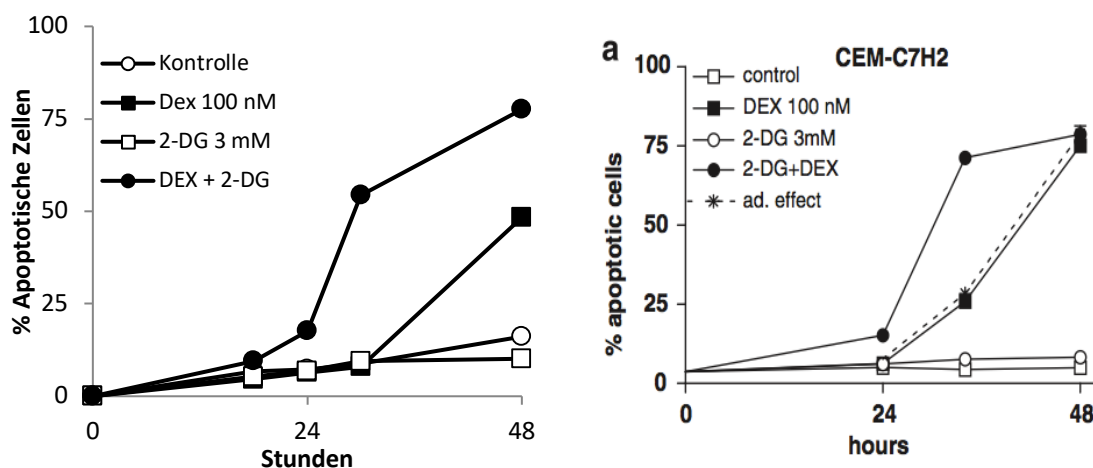


Abbildung 11: Anteil der apoptotischen Zellen zu den Zeitpunkten 18, 24, 32 und 48 h in der Kontrollgruppe sowie nach Behandlung mit 100 nM DEX, 3 mM 2-DG, bzw. einer Kombination aus 100 nM DEX und 3 mM 2-DG. (zum Vergleich Abbildung aus Eberhart *et al.*⁶ rechts)

Es zeigt sich eine zu den Vorarbeiten ähnliche Apoptoserate (*Abbildung 11*). Die alleinige Behandlung mit 2-DG wirkt nur gering apoptotisch. DEX führt erst nach 48 h zur Apoptose und die Kombination aus beiden führt synergistisch früher und stärker zur Apoptose der leukämischen Zellen.

4.1.2 Hochauflösende Respirometrie

Um eine Vergleichbarkeit der Daten zu gewährleisten, wurde die mitochondriale Aktivität in jenen Proben, die für die proteomischen Analysen verwendet wurden, bestimmt. Wie bereits publiziert war nach 18 h die Grundatmung durch die Einzelbehandlungen unverändert, in Zellen die mit der Kombination von DEX und 2-DG behandelt wurden aber erniedrigt (*Abbildung 13*). Nach Permeabilisierung zeigte sich bereits nach 18 h wiederum eine Instabilität der Atmung unter DEX und in der Kombination. Cytochrom *c* Zugabe führte nur zu einer leichten Stabilisation der Atmung (*Abbildung 12*). Durch die Instabilität waren auch die maximale Atmung sowohl im gekoppelt als auch im entkoppelten Zustand in allen mit DEX behandelten Zellen reduziert. Damit konnten die Daten aus den Publikationen Eberhart *et al.* 2009 und Eberhart *et al.* 2011 reproduziert werden.

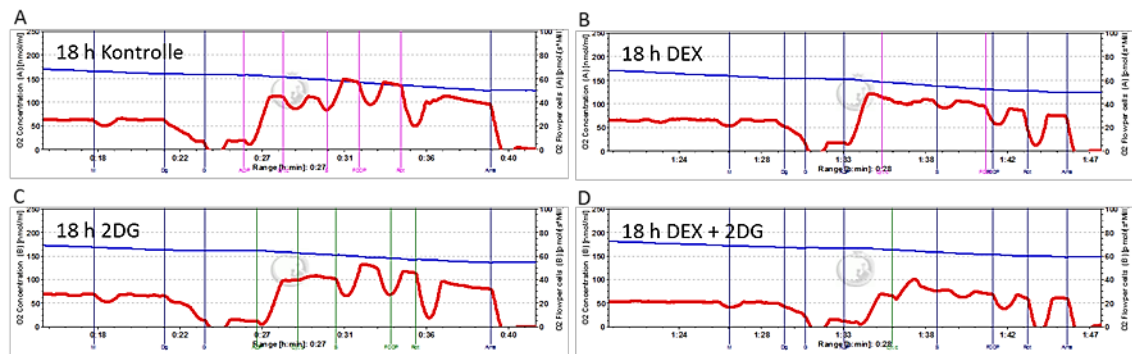


Abbildung 12: Hochauflösende Respirometrie von intakten C7H2 Zellen in MiR05-Medium nach 18 h in der Kontrollgruppe (A) sowie nach Behandlung mit 100 nM DEX (B), 3 mM 2-DG (C) sowie 100 nM DEX und 3 mM 2-DG (D). Zunächst Messung des Sauerstoffverbrauchs ohne Behandlung, dann Permeabilisierung mit Digitonin und schrittweise Zugabe von Glutamat und Malat, ADP, Cytochrom *c*, Succinat, FCCP, Rotenon sowie Antimycin A (jeweils durch vertikale Linien angezeigt).

4.2 Gekoppelte Massenspektrometrie

Durch eine Fehlfunktion des Chromatographen gingen von dem ersten Replikat bei der 30 h-Gruppe die kompletten Proben der zweidimensionalen Auftrennung verloren. Zur Auswertung der 30 h-Gruppe wurden daher von zwei Replikaten die Peptide nach zwei- und dreidimensionaler Auftrennung und von einem Replikat nur nach dreidimensionaler Auftrennung verwendet.

4.2.1 Anzahl regulierter Proteine

In der 18 h-Gruppe wurden bei einer „false discovery rate“ von 1 % insgesamt 831 Proteine identifiziert. In der 30 h-Gruppen wurden bei einer „false discovery rate“ von 1 % insgesamt 1023 einzelne Proteine identifiziert. 674 Proteine wurden in beiden Gruppen identifiziert.

Aus jeder Subgruppe wurden wie beschrieben alle im Vergleich zur Kontrolle zum Zeitpunkt 18 h und 30 h signifikant ($p < 0,05$) um einen Faktor größer 1,5-fach regulierten Proteine zur weiteren Analyse ausgewählt. Die Liste der signifikant regulierten Proteine für die einzelnen Gruppen findet sich in Anhang B.

Insgesamt finden sich in der mikrosomalen Fraktion neben Proteinen der Mitochondrien, Proteine anderer Organellen wie des Zellkerns (Histone und Transkriptionsfaktoren) und des endoplasmatischen Retikulums (ribosomale Proteine), sowie vereinzelt Proteine aus dem Zytosol.

Gegenüber der Kontrollgruppe waren zum Zeitpunkt 18 h in der DEX-Gruppe 34 Proteine, in der 2-DG-Gruppe 71 Proteine und in der Kombinations-Gruppe 40 Proteine signifikant reguliert.

Gegenüber der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt 30 h waren in der DEX-Gruppe 64 Proteine, in der 2-DG-Gruppe 61 Proteine und in der Kontrollgruppe des Zeitpunkts 18 h 20 Proteine signifikant reguliert.

Insgesamt zeigt sich in den Behandlungsgruppen eine größere Anzahl signifikant regulierter Proteine als im Vergleich der Kontrollgruppen untereinander.

Auch in der Gruppe der signifikant regulierten Proteine finden sich Proteine aus den verschiedenen Organellen.

4.2.2 Evaluierung der Chromatographie

Zur Evaluierung der Trennschärfe der unterschiedlichen eingesetzten chromatographischen Verfahren verglich ich exemplarisch die Anzahl identifizierter Proteine zum Zeitpunkt 18 h zwischen mittels zwei- oder dreidimensionaler Chromatographie aufgetrennter Proben. Weiterhin verglich ich auch einzelne Fraktionen unterschiedlicher Replikate der unterschiedlichen Trennmethoden. Alle Daten finden sich tabellarisch in Anhang B.

Mit den Daten beider Trennmethoden wurden insgesamt 831 Proteine identifiziert. Durch die zweidimensionale Trennung wurden 520 Proteine identifiziert. In jedem einzelnen Replikat fanden sich durchschnittlich pro Replikat 409 Proteine. Durch die dreidimensionale Trennung wurden 757 Proteine identifiziert, pro Replikat fanden sich einzeln durchschnittlich 509 identifizierte Proteine.

Es zeigte sich, dass eine dreidimensionale Trennung zu einer höheren Trennschärfe und damit zu einer größeren Anzahl an identifizierten Proteinen führte. So fanden sich mit der dreidimensionalen Trennung insgesamt 45 % mehr identifizierte Proteine als mit der zweidimensionalen.

Weiterhin verglich ich exemplarisch für die dreidimensionale Auftrennung die jeweils dritte Fraktion aller Replikate und alle Fraktionen des ersten Replikats der 18 h Gruppe. Im Vergleich aller dritten Fraktionen zeigt sich eine gewisse Schwankung der Anzahl an identifizierten Proteine mit maximal 273 und minimal 162 Identifizierungen. Im Vergleich aller Fraktionen eines Replikats zeigt sich eine gewisse ungleiche Verteilung mit zunehmend weniger identifizierten Proteinen in den letzten Fraktionen mit maximal 391 und minimal 106.

Es zeigte sich auch eine große Schwankung in der Übereinstimmung der Überlappung der identifizierten Proteine. So fanden sich zum Beispiel in der dritten Fraktion der dreidimensionalen Trennung pro Replikat durchschnittlich 225 Proteine, zwischen zwei

Replikaten überlappten aber durchschnittlich nur 135, also rund 60 % der identifizierten Proteine.

4.3 Regulierte Proteine

4.3.1 Enzyme der Glykolyse

In Vorarbeiten konnte im Rahmen einer Hemmung der Glykolyse durch DEX, 2-DG und der Kombination beider Wirkstoffe eine Reduktion der zellulären sowie der an der Mitochondrienmembran gebundenen Fraktion an HK II gezeigt werden.

In unseren Versuchen konnte nur HK I identifiziert werden, deren Gehalt in der mikrosomalen Fraktion in keiner Behandlung signifikant unterschiedlich war (Anhang B). Es zeigte sich jedoch eine signifikante Änderung der Proteinkonzentrationen anderer Enzyme der Glykolyse sowie der L-Laktat-Dehydrogenase in der mikrosomalen Fraktion (*Abbildung 13*).

Insgesamt zeigt sich eine ausgeprägte Abnahme der Enzyme der Glykolyse vor allem in den mit 2-DG behandelten Zellen zum Zeitpunkt 18 h mehr als zum Zeitpunkt 30 h. Im Vergleich ist die Reduktion der Enzyme der Glykolyse in der Kombinationsbehandlung und den mit DEX behandelten Zellen zum Zeitpunkt 18 h schwächer ausgeprägt. Für die mit DEX behandelten Zellen zum Zeitpunkt 30 h kann lediglich die Zunahme eines Enzyms der Glykolyse nachgewiesen werden.

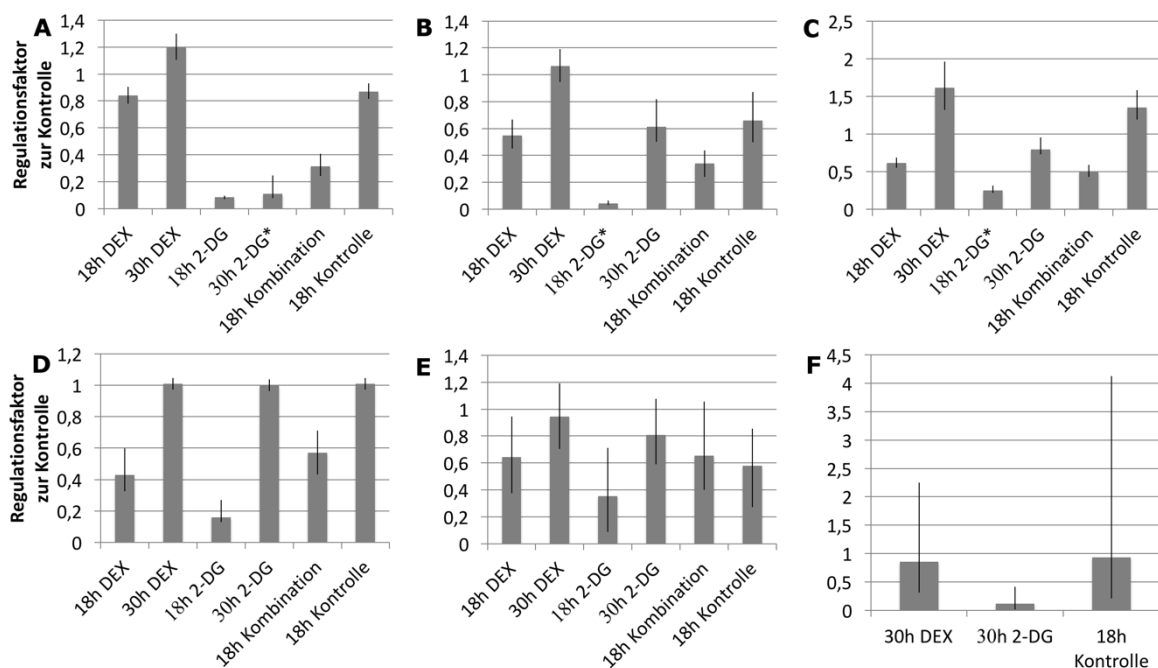


Abbildung 13: Regulationsfaktor der 18 h Kontrolle, DEX, 2-DG, Kombination sowie 30 h DEX und 2-DG Gruppe im Verhältnis zur 30 h Kontrolle der Fruktose-bisphosphat-

Aldolase A (A), Phosphoglyceratkinase 1 (B), Pyruvatkinase (C), L-Laktat-Dehydrogenase A (D), L-Laktat-Dehydrogenase B (E) und Glukose-6-phosphat-Isomerase (F). Für die Glukose-6-phosphat-Isomerase liegen nur Daten zum Zeitpunkt 30 h vor. (* $p < 0.05$ nach Benjamini-Hochberg-Korrektur)

4.3.2 Weitere Stoffwechselenzyme

Entsprechend der Hypothese einer metabolischen Regulierung der Apoptose war die Regulation weiterer Stoffwechselenzyme von Interesse (*Abbildung 14*).

Die Untereinheit alpha der ATP-Synthase war als einziges Enzym der oxidativen Phosphorylierung reguliert. In den mit DEX behandelten Zellen war sie zu beiden Zeitpunkten signifikant hochreguliert.

Hydroxyacyl-Coenzym-A-Dehydrogenase war als einziges Enzym der Beta-Oxidation reguliert. Es zeigte sich eine signifikante Reduktion zum Zeitpunkt 18 h in der mit 2-DG und der Kombination aus 2-DG und DEX behandelten Gruppe.

An Enzymen des Zitratzyklus waren die ATP-Zitrat-Synthase und die Malatdehydrogenase sowie die Glutamatdehydrogenase 1 als anapleoretische Proteine signifikant reguliert.

Die ATP-Zitrat-Synthase war in den mit 2-DG behandelten Zellen zu beiden Zeitpunkten signifikant reduziert, zum Zeitpunkt 18 h mehr als zum Zeitpunkt 30 h.

Bei der Malatdehydrogenase zeigte sich lediglich ein niedrigerer Gehalt der Kontrolle zum Zeitpunkt 18 h im Vergleich zum Zeitpunkt 30 h, in den behandelten Gruppen zeigte sich keine signifikante Regulation.

Die Glutamatdehydrogenase 1 zeigte eine signifikante erhöhte Expression zum Zeitpunkt 18 h in der mit DEX und in der mit der Kombination behandelten Gruppe.

Weiterhin waren zwei Enzyme des folsäureabhängigen C1-Stoffwechsels reguliert. Die Serin-Hydroxymethyltransferase war zum Zeitpunkt 18 h in der mit 2-DG und in der mit der Kombination behandelten Gruppe signifikant runterreguliert. Die C-1-tetrahydrofolat-Synthase war zum Zeitpunkt 30 h in der mit 2-DG behandelten Gruppe signifikant weniger exprimiert.

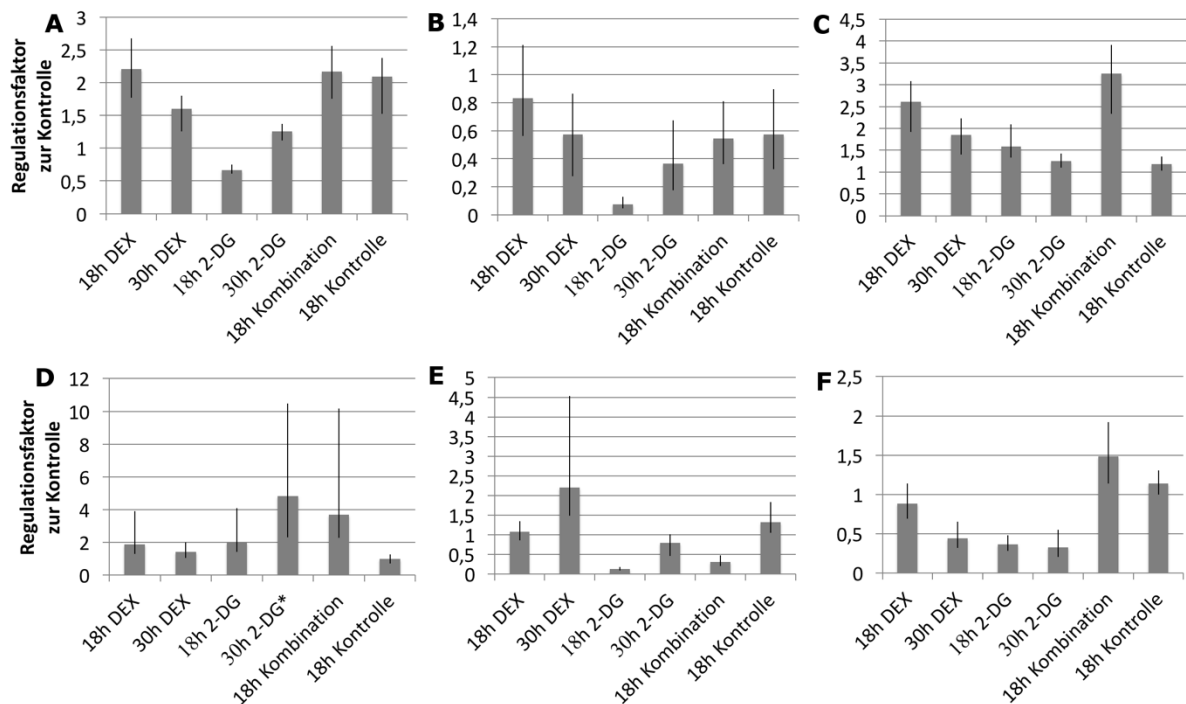


Abbildung 14: Regulationsfaktor der 18 h Kontrolle, DEX, 2-DG, Kombination sowie 30 h DEX und 2-DG Gruppe im Verhältnis zur 30 h Kontrolle der ATP-Synthase-Untereinheit alpha (A), ATP-Zitrat-Synthase (B), Glutamatdehydrogenase 1 (C), Serin-Hydroxymethyltransferase (D), Hydroxyacyl-Coenzym-A-Dehydrogenase (E) und C-1-tetrahydrofolat-Synthase (F). (* $p < 0.05$ nach Benjamini-Hochberg-Korrektur)

4.3.3 Mitochondriale Transportproteine

In den Vorarbeiten konnte eine genetische Regulation einer Vielzahl an Transportproteine der äußeren und inneren Mitochondrienmembran gezeigt werden. In dieser Arbeit konnte die signifikante Regulation nur eines Transportproteins der äußeren Mitochondrienmembran gezeigt werden: des Voltage-dependent anion-selective channel protein 1 (VDAC1).

Sowohl in der mit DEX behandelten Gruppe, sowie in der Kombinationsgruppe zeigte sich zum Zeitpunkt 18 h eine signifikante Reduktion des mikrosomalen Gehalts an VDAC1 um rund die Hälfte (Faktor 0,55 bzw. Faktor 0,49). In der 2-DG Gruppe zeigte sich eine Reduktion um das 25-fache zum Zeitpunkt 18 h (Faktor 0,04, p -Wert $5,81 \cdot 10^{-4}$).

Zum Zeitpunkt 30 h war VDAC1 nicht mehr signifikant reduziert (*Abbildung 15*).

Da VDAC eine Proteinfamilie mit drei Mitgliedern ist, suchte ich nach den anderen zwei Mitgliedern: VDAC2 zeigte in unseren Versuchen keine signifikante Regulation und VDAC3 wurde nicht identifiziert (Anhang B).

4.3.4 ER-Stress

Eine signifikante Hochregulierung des ER-Stress-Markers GRP78 zeigte sich in der mit 2-DG behandelten Gruppe zum Zeitpunkt 30 h und in der mit der Kombination behandelten Gruppe zum Zeitpunkt 18 h (*Abbildung 15*).

4.3.5 Sonstige Proteine

Weiterhin zeigte sich eine signifikante Regulation des zellulären Proliferationsmarkers Ki-67. Zum Zeitpunkt 18 h war in der 2-DG-Gruppe das Protein kaum mehr detektierbar (Faktor 0,01, p-Wert 0,01) (*Abbildung 15*).

Schließlich konnte ich eine Regulation der Glycylpeptid-N-tetradecanoyltransferase-1 nachweisen. Es zeigte sich eine signifikante Hochregulierung zum Zeitpunkt 18 h in der mit 2-DG bzw. 2-DG + DEX behandelten Gruppe behandelten Gruppe (*Abbildung 15*).

Die Konfidenzintervalle sind bei beiden Proteinen allerdings sehr weit, so dass über die Regulation in den anderen Behandlungen keine Aussage gemacht werden kann.

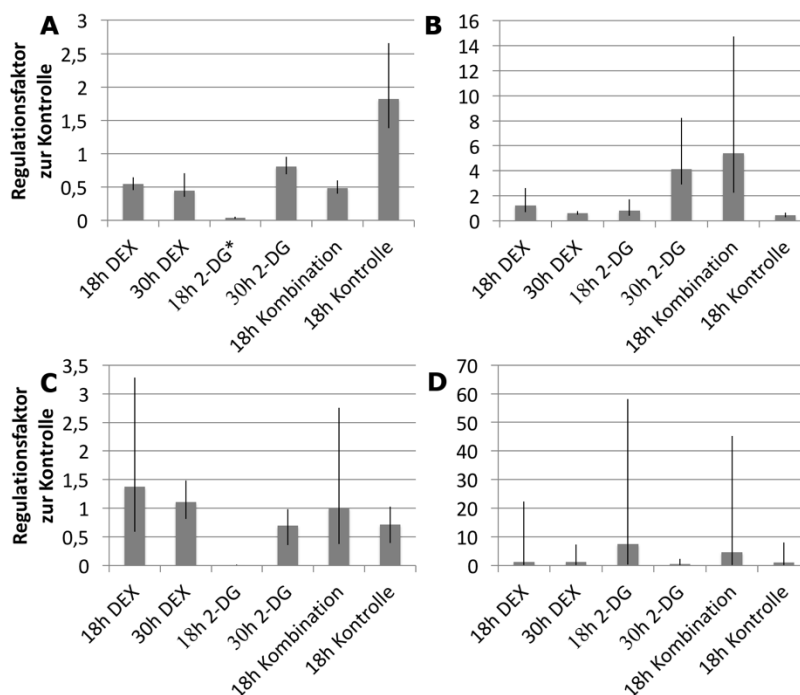


Abbildung 15: Regulationsfaktor der 18 h Kontrolle, DEX, 2-DG, Kombination sowie 30 h DEX und 2-DG Gruppe im Verhältnis zur 30 h Kontrolle von VDAC1 (A), GRP78 (B), KI-67 (C) und Glycylpeptide-N-tetradecanoyltransferase-1 (D). (* $p < 0.05$ nach Benjamini-Hochberg-Korrektur)

4.3.6 Statistische Güte der Daten

Ich errechnete das korrigierte Signifikanzniveau nach der Bonferroni-Korrektur. Bei einem gewünschtem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ und insgesamt $n = 1919$ Vergleichen

entspricht das korrigierte Signifikanzniveau $p < 2,61 \cdot 10^{-5}$. Dieses Signifikanzniveau wird lediglich in 4 Vergleichen erreicht. Keines der 4 Proteine erfüllt primär eine metabolische Funktion.

Tabelle 11: Nach der Bonferroni-Korrektur signifikante Regulationsfaktoren mit einem korrigierte Signifikanzniveau $p < 2,61 \cdot 10^{-5}$:

Protein	Vergleich	Faktor	p-Wert
Moesin	DEX 30h / Kontrolle 30h	10,568	$7,01 \cdot 10^{-11}$
Elongation factor 2	Kombination 18h / Kontrolle 18h	0,141	$3,77 \cdot 10^{-8}$
Transferrin receptor protein 1	2-DG 30h / Kontrolle 30h	0,184	$6,46 \cdot 10^{-6}$
Nucleolar RNA helicase 2	DEX 30h / Kontrolle 30h	0,105	$1,21 \cdot 10^{-5}$

Weiterhin untersuchten ich, welche Regulationsfaktoren in einer Benjamini-Hochberg-Korrektur bei einer „false discovery rate“ von 5 % als signifikant gelten. Dabei finden sich insgesamt 30 nach der Benjamini-Hochberg-Korrektur signifikante Regulationsfaktoren von insgesamt 24 unterschiedlichen Proteinen. Von den am Zellstoffwechsel beteiligten Proteinen sind die Abnahme von VDAC1, der Pyruvatkinase sowie der Phosphoglycerate kinase 1 in der 2-DG-Gruppe zum Zeitpunkt 18 h sowie die Zunahme der Serine-hydroxymethyltransferase und die Abnahme der Fructose-bisphosphate aldolase A in der 2-DG-Gruppe zum Zeitpunkt 30 h statistisch signifikant.

Tabelle 12: Nach der Benjamini-Hochberg-Korrektur bei einer „false discovery rate“ von 5 % signifikante Regulationsfaktoren:

Protein	Vergleich	Faktor	p-Wert
Moesin	DEX 30 h / Kontrolle 30 h	10,568	$7,01 \cdot 10^{-11}$
Elongation factor 2	Kombination 18 h / Kontrolle 18 h	0,141	$3,77 \cdot 10^{-8}$

Transferrin receptor protein 1	2-DG 30 h / Kontrolle 30 h	0,184	$6,46 \cdot 10^{-6}$
Nucleolar RNA helicase 2	DEX 30 h / Kontrolle 30 h	0,105	$1,21 \cdot 10^{-5}$
Myosin-9	DEX 30h / Kontrolle 30h	2,704	$1,02 \cdot 10^{-4}$
Ribosomal L1 domain-containing protein 1	2-DG 18 h / Kontrolle 18 h	0,058	$1,06 \cdot 10^{-4}$
Elongation factor 2	2-DG 18 h / Kontrolle 18 h	0,160	$1,23 \cdot 10^{-4}$
40S ribosomal protein S3	2-DG 30 h / Kontrolle 30 h	0,265	$1,26 \cdot 10^{-4}$
Elongation factor 2	2-DG 30 h / Kontrolle 30 h	0,093	$1,28 \cdot 10^{-4}$
Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1	2-DG 30 h / Kontrolle 30 h	2,754	$1,37 \cdot 10^{-4}$
Elongation factor 1-gamma	DEX 18 h / Kontrolle 18 h	0,461	$1,50 \cdot 10^{-4}$
Moesin	2-DG 30 h / Kontrolle 30 h	3,873	$1,60 \cdot 10^{-4}$
Calreticulin	2-DG 30 h / Kontrolle 30 h	4,831	$2,28 \cdot 10^{-4}$
Serine hydroxymethyltransferase, mitochondrial	2-DG 30 h / Kontrolle 30h	4,831	$2,53 \cdot 10^{-4}$
High mobility group protein B2	DEX 30 h / Kontrolle 30 h	7,586	$2,90 \cdot 10^{-4}$
60S ribosomal protein L3	2-DG 18 h / Kontrolle 18 h	0,111	$2,96 \cdot 10^{-4}$
Fructose-bisphosphate aldolase A	2-DG 30 h / Kontrolle 30 h	0,110	$3,25 \cdot 10^{-4}$

Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	2-DG 30 h / Kontrolle 30 h	2,831	$3,48 \cdot 10^{-4}$
Phosphoglycerate kinase 1	2-DG 18 h / Kontrolle 18 h	0,041	$4,07 \cdot 10^{-4}$
Vimentin	DEX 30 h / Kontrolle 30 h	0,445	$4,15 \cdot 10^{-4}$
Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein	2-DG 18 h / Kontrolle 18 h	0,100	$4,43 \cdot 10^{-4}$
Proactivator polypeptide	2-DG 18 h / Kontrolle 18 h	0,079	$4,68 \cdot 10^{-4}$
40S ribosomal protein SA	Kombination 18 h / Kontrolle 18 h	0,205	$4,71 \cdot 10^{-4}$
Polyadenylate-binding protein 1	DEX 18 h / Kontrolle 18 h	0,492	$5,41 \cdot 10^{-4}$
60S ribosomal protein L3	Kombination 18 h / Kontrolle 18 h	0,540	$5,68 \cdot 10^{-4}$
Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	2-DG 18 h / Kontrolle 18 h	0,036	$5,81 \cdot 10^{-4}$
Pyruvate kinase PKM	2-DG 18 h / Kontrolle 18 h	0,251	$6,01 \cdot 10^{-4}$
40S ribosomal protein S3	DEX 30 h / Kontrolle 30 h	0,288	$7,17 \cdot 10^{-4}$
60S ribosomal protein L7a	2-DG 18 h / Kontrolle 18 h	0,128	$7,62 \cdot 10^{-4}$
Elongation factor 2	DEX 18 h / Kontrolle 18 h	0,501	$7,71 \cdot 10^{-4}$

5 Diskussion

5.1 Chromatographie

Es zeigte sich, dass eine dreidimensionale Trennung zu einer höheren Trennschärfe und damit zu einer größeren Anzahl an identifizierten Proteinen führte. So fanden sich mit der dreidimensionalen Trennung insgesamt 45 % mehr identifizierte Proteine als mit der zweidimensionalen.

In der dreidimensionalen Trennung kam es zu einer großen Schwankung in der Überlappung der identifizierten Proteine der einzelnen Replikate. Diese liegt im Bereich von bereits publizierten Vergleichen der Überlappung einzelner Replikate in der proteomischen Analyse von komplexen Peptidgemischen. In einer Untersuchung von Tabb *et al.* waren Proteine betroffen, welche nur über ein Peptid nachgewiesen werden konnten bzw. durch Peptide repräsentiert waren, die eine niedrige Konzentration aufwiesen und gleichzeitig mit Peptiden mit hoher Konzentration eluierten⁷⁹.

Im exemplarischen Vergleich der dreidimensionalen Auftrennung aller Fraktionen des ersten Replikats zum Zeitpunkt 18 h zeigte sich eine ungleiche Verteilung der Anzahl der identifizierten Proteine auf alle Fraktionen. In der fünften Fraktion zeigte sich eine deutlich niedrigere Anzahl an identifizierten Proteinen. Durch eine Anpassung des Protokolls mit Weglassen des vierten Puffers könnten vier Fraktionen mit einer homogeneren Anzahl an identifizierten Proteinen pro Fraktion erreicht werden.

5.2 VADC1

Eine signifikante Regulierung konnte für nur ein mitochondriales Transportprotein gezeigt werden: VDAC1. Diese Regulierung war auch nach einer Benjamini-Hochberg-Korrektur statistisch signifikant.

In unseren Versuchen zeigte sich eine Abnahme von VDAC1 in der 2-DG Gruppe nach 18 h um den Faktor 25. In den mit DEX und der Kombination behandelten Gruppen zeigte sich hingegen nur eine Halbierung. Damit konnte für VDAC1 kein synergistischer Effekt zwischen DEX und 2-DG gezeigt werden. Allerdings ist dies die erste Beschreibung einer ausgeprägten Regulation von VDAC1 durch 2-DG.

VDAC stellen die Haupttransporter der äußeren Mitochondrienmembran für ATP, ADP, metabolische Substrate und Ionen dar. Die Durchlässigkeit für Substrate wird sowohl anhand der Spannung über der Mitochondrienmembran als auch von weiteren Faktoren wie der Assoziation mit HK II reguliert.

Eine Beteiligung von VDAC1 sowohl in der Regulation des Zellstoffwechsels als auch der Apoptose wurde beschrieben. VDAC kann den Zellstoffwechsel bei Substratmangel

oder Hypoxie regulieren⁸⁰. Außerdem interagiert VDAC1 mit der BCL-2-Familie, ist an der Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran beteiligt und scheint proapoptotisch zu wirken⁸¹. Jedoch ist der Mechanismus noch unklar, sowohl eine Oligomerisierung, ein Öffnen sowie ein Schließen von VDAC1 werden diskutiert⁸². Ein Einfluss von GK auf die VDAC1-Expression ist in der Literatur bereits beschrieben worden⁸³.

5.3 Ki-67

Es zeigte sich in der 2-DG-Gruppe zum Zeitpunkt 18 h eine fast komplette Abnahme des zellulären Proliferationsmarkers Ki-67. Eine signifikante Regulation konnte in den anderen Gruppen und zu anderen Zeitpunkten nicht nachgewiesen werden. Allerdings sind die Konfidenzintervalle sehr groß, was die Aussagekraft dieser Beobachtung einschränkt.

Ki-67 kann nur in Zellen nachgewiesen werden, die sich in einer proliferativen Phase des Zellzyklus befinden (G1, S, G2 sowie Mitose), nicht jedoch in ruhenden Zellen (G0). Ki-67 findet sich im Zellkern, jedoch ändert sich die genaue Lokalisation beim Durchschreiten des Zellzyklus⁸⁴. Ob die Abnahme in der von uns gemessenen mikrosomalen Fraktion gut mit einer Abnahme der zellulären Proliferation korreliert bleibt deshalb unklar.

Interessanterweise tritt die signifikante Abnahme von Ki-67 in der Behandlungsgruppe mit der geringsten Apoptoserate auf. Da die ausgeprägte Abnahme von Ki-67 gleichzeitig mit der ausgeprägten Abnahme von VDAC1 auftritt scheint ein Zusammenhang möglich.

5.4 Glykolyse

Weiterhin zeigte sich eine ausgeprägte Regulation des mikrosomalen Anteils mehrerer Enzyme der Glykolyse. Insgesamt waren die Effekte der verminderten Expression in der 2-DG-Gruppe und zum Zeitpunkt 18 h am größten. Jedoch zeigten auch die DEX und Kombinationsgruppe vor allem nach 18 h eine niedrigere, jedoch teilweise signifikante Regulation der Enzyme der Glykolyse.

Da es sich um zytosolische Proteine handelt kommen für die Abnahme des mikrosomalen Anteils mehrere Erklärungen wie zum Beispiel eine absolute Reduktion der Gesamtmenge sowie eine Assoziation der Enzyme an bestimmte intrazelluläre Strukturen in Frage. Damit erscheint ihr Anteil an der mikrosomalen Fraktion als nicht aussagekräftig und aus der Regulation des mikrosomalen Anteils können keine validen Schlüsse gezogen werden.

Die Abnahme könnte auch im Zusammenhang mit VDAC1 stehen. Eine Assoziation von HK I und II an VDAC im Rahmen der Glykolyse ist beschrieben⁸⁵. Obwohl eine Assoziation weiterer glykolytischer Enzyme zu einem räumlich definiertem Komplex in menschlichen Zellen nicht bewiesen ist, wird sie von einigen Autoren vermutet⁸⁶. In

Pflanzen konnte eine dynamische, über VDAC1 vermittelte Assoziation glykolytischer Enzyme mit der Mitochondrienmembran je nach Bedarf der Zelle gezeigt werden⁸⁷.

5.5 NMT-1

Ich konnte eine erhöhte Expression der Acyltransferase Glycylpeptide-N-tetradecanoyltransferase-1 (NMT-1) in den mit 2-DG und 2-DG + DEX behandelten Gruppen nachweisen. Die N-Myristoylation des BCL-2-Proteins BID ist zur Integration in die äußere Mitochondrienmembran im Rahmen der Apoptose notwendig⁸⁸. Damit bietet NMT-1 eine potentielle Erklärung für den synergistischen Effekt zwischen 2-DG und DEX. Die Regulation der Expression von NMT-1 ist nicht gut erforscht und der Mechanismus über den 2-DG zu seiner Expression führt damit unklar.

Im Rahmen der Apoptose ist als früher Prozess eine Spaltung von NMT-1 durch Caspasen und eine nachfolgende Translokation von der Membran ins Zytosol in der T-ALL-Zelllinie Jurkat beschrieben⁸⁹. Dass der erhöhte Anteil in der mikrosomalen Fraktion jedoch ein Epiphänomen der Apoptose ist erscheint jedoch unwahrscheinlich, da sie auch in der 2-DG Gruppe auftritt.

5.6 Weitere Stoffwechselenzyme

In unserer Arbeit zeigte sich neben der Regulation der Glykolyse eine Regulation weiterer Stoffwechselwege.

Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der Hydroxyacyl-Coenzym-A-Dehydrogenase in der mit 2-DG behandelten und in der mit der Kombination behandelten Gruppe. Eine Regulation der Beta-Oxidation durch 2-DG ist bisher nicht beschrieben worden.

Die Untereinheit alpha der ATP-Synthase war in den mit DEX behandelten Zellen zu beiden Zeitpunkten signifikant hochreguliert. In der Kombinationsbehandlung erreichte die Zunahme keine statistische Signifikanz. Dies steht im Kontrast zu den Vorarbeiten, in denen eine genetische Repression der Untereinheiten E und C1 der ATP Synthase sowohl im Zellmodell als auch in Patientenproben nach einer Behandlung mit GK gezeigt worden war⁷¹.

5.7 ER-Stress

Es zeigte sich in der mit 2-DG behandelten Gruppe eine Hochregulierung des ER-Stress-Marker GRP78 erst zum Zeitpunkt 30 h, in der Kombinationsgruppe zum Zeitpunkt 18 h. Inwieweit dies mit den weiteren metabolischen Effekten zusammenhängt bleibt unklar. Über die von einigen Arbeitsgruppen postulierte Wirkung von 2-DG über ER-Stress lassen unsere Daten keine klare Aussage zu.

Der ER-Stress-Marker GRP78 zeigt eine vermehrte Expression zum Zeitpunkt 18 h in der mit der Kombination behandelten Gruppe. Dass er dem synergistischen Effekt zwischen 2-DG und DEX zugrunde liegt, scheint aus zweierlei Gründen unwahrscheinlich. Zum einen wird GRP78 in verschiedenen malignen Erkrankungen eine anti-apoptotische Wirkung zugeschrieben⁹⁰. Weiterhin ist eine Regulation von durch zellulären Mangel an Glukose beschrieben⁷⁰. Dies könnte auch die erhöhte Expression zum Zeitpunkt 30 h in der mit 2-DG behandelten Gruppe erklären. Über die von einigen Arbeitsgruppen postulierte Wirkung von 2-DG über ER-Stress lassen unsere Daten keine Aussage zu.

5.8 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war es, den synergistischen Effekt von 2-DG und GK in der Apoptoseinduktion auf leukämische Zellen genauer zu untersuchen. Der Hemmstoff der Glykolyse 2-DG macht ALL-Zellen für nicht-tödliche Dosen GK empfindlich und sensibilisiert GK-resistente Zellen gegen GK.

Ich konnte zeigen, dass 2-DG in der Monotherapie und Kombination mit DEX zu einer erhöhten Expression von NMT-1 und einer verringerten Expression von HADH führte. Nach Benjamini-Hochberg-Korrektur waren diese Ergebnisse jedoch nicht signifikant. Es ist eine Beteiligung von NMT-1 an der Induktion der Apoptose beschrieben worden. Eine Hemmung der Beta-Oxidation durch 2-DG ist bisher nicht berichtet worden.

Weiterhin zeigte sich in der Monotherapie mit 2-DG eine stark verminderte Expression des mitochondrialen Transportproteins VDAC1, welche auch nach Benjamini-Hochberg-Korrektur signifikant blieb. Es konnte kein synergistischer Effekt in der Kombinationsbehandlung mit DEX nachgewiesen werden, allerdings ist dieser Effekt bisher nicht beschrieben worden.

Anhang A: Methodenvalidierung

Fett gedruckte Zahlen sind die Gesamtmenge, kursiv gedruckte Zahlen sind die Schnittmenge.

Tabelle 13: Gemeinsame Proteine in der Gesamtgruppe sowie in der zwei- und dreidimensional Trennung aller Replikate zum Zeitpunkt 18 h

	Gesamt	2-dimensional	3-dimensional
Gesamt	831		
2-dimensional	<i>501</i>	520	
3-dimensional	<i>722</i>	<i>415</i>	757

Tabelle 14: Gemeinsame Proteine der Gesamtgruppe und der einzelne Replikate in der zweidimensionalen Trennung zum Zeitpunkt 18 h

	Gesamt	Replikat 1	Replikat 2	Replikat 3
Gesamt	520			
Replikat 1	<i>367</i>	394		
Replikat 2	<i>326</i>	<i>277</i>	340	
Replikat 3	<i>448</i>	<i>334</i>	<i>292</i>	493

Tabelle 15: Gemeinsame Proteine der Gesamtgruppe und der einzelne Replikate in der dreidimensionalen Trennung zum Zeitpunkt 18 h

	Gesamt	Replikat 1	Replikat 2	Replikat 3
Gesamt	757			
Replikat 1	<i>532</i>	555		
Replikat 2	<i>495</i>	<i>382</i>	532	
Replikat 3	<i>428</i>	<i>338</i>	<i>329</i>	441

Tabelle 16: Gemeinsame Proteine aller dritten Fraktionen der drei Replikate der dreidimensionalen Trennung zum Zeitpunkt 18 h

	Replikat 1	Replikat 2	Replikat 3
Replikat 1	273		
Replikat 2	<i>166</i>	241	
Replikat 3	<i>115</i>	<i>123</i>	162

Tabelle 17: Gemeinsame Proteine aller Fraktionen des ersten Replikats der dreidimensionalen Trennung zum Zeitpunkt 18 h

	Fraktion 1	Fraktion 2	Fraktion 3	Fraktion 4	Fraktion 5
Replikat 1	391	399	273	258	106

Anhang B: Regulierte Proteine

Aufgeföhrt sind alle signifikant ($p < 0,05$) um einen Faktor $> 1,5$ regulierten Proteine aus jeweiligen Subgruppen. Die Gennamen sind in Klammern aufgeföhrt. Zusätzlich sind die Regulationsfaktoren für die anderen Subgruppen aufgeföhrt.

Tabelle 18: Signifikant regulierte Proteine: 18 h DEX

Name	Faktor 18 h DEX / 18 h Kontrolle	p-Wert	95%-Ver- trauens- intervall	Faktor 18 h 2-DG / 18 h Kontrolle	p-Wert	95%-Ver- trauens- intervall	Faktor 18 h Kombina- tion / 18 h Kon- trolle	p-Wert	95%-Ver- trauensin- tervall
Ankyrin repeat and KH domain-containing protein 1 (<i>ANKHD1</i>)	0,096	0,034	0,021- 0,643	0,261	0,092	0,055 -1,330	1,057	0,835	0,614- 1,837
Elongation factor 1-delta (<i>EEF1D</i>)	0,344	0,002	0,278- 0,417	0,217	0,012	0,172- 0,270	0,457	0,007	0,387- 0,581
Multifunctional protein ADE2 (<i>PAICS</i>)	0,353	0,032	0,249- 0,497	0,305	0,180	0,198- 0,479	0,520	0,055	0,356- 0,759
Elongation factor 1-beta (<i>EEF1B2</i>)	0,402	0,014	0,347- 0,466	0,094	0,019	0,079- 0,126	0,773	0,084	0,705- 0,839
L-lactate dehydrogenase A chain (<i>LDHA</i>)	0,429	0,026	0,325- 0,597	0,158	0,100	0,127- 0,270	0,570	0,095	0,433- 0,711

Name	Faktor	p-Wert	95%-Ver- trauens- intervall	Faktor	p-Wert	95%-Ver- trauens- intervall	Faktor	p-Wert	95%-Ver- trauensin- tervall
	18 h DEX / 18 h Kontrolle			18 h 2-DG / 18 h Kontrolle			18 h Kombina- tion / 18 h Kon- trolle		
40S ribosomal protein S17-ilike (RPS17L)	0,449	0,023	0,366- 0,545	0,107	0,193	0,084- 0,139	0,497	0,147	0,409- 0,608
Elongation factor 1-gamma (EEF1G)	0,461	1,50* 10 ⁻⁴	0,387- 0,535	0,328	0,020	0,302- 0,437	1,028	0,032	0,929- 1,148
40S ribosomal protein S20 (RPS20)	0,474	0,015	0,366- 0,625	0,773	0,241	0,718- 0,879	0,802	0,225	0,718- 0,904
60S ribosomal protein L24 (RPL24)	0,479	0,023	0,425- 0,545	0,050	0,040	0,043- 0,061	0,497	0,038	0,437- 0,565
Polyadenylate-binding protein 1 (PABPC1)	0,492	5,41* 10 ⁻⁴	0,380- 0,603	0,550	0,018	0,497- 0,614	0,904	0,007	0,824- 0,991
Elongation factor 2 (EEF2)	0,501	7,71* 10 ⁻⁴	0,437- 0,581	0,160	1,23* 10 ⁻⁴	0,128- 0,213	0,141	3,77* 10 ⁻⁸	0,108- 0,191
T-complex protein 1 subunit eta (CCT7)	0,525	0,043	0,417- 0,631	0,288	0,158	0,249- 0,340	0,545	0,205	0,461- 0,637
Voltage-dependent anion-selective channel protein 1 (VDAC1)	0,545	0,015	0,453- 0,631	0,036	5,81* 0,026-	0,488		0,049	0,402-

Name	Faktor 18 h DEX / 18 h Kontrolle	p-Wert	95%-Ver- trauens- intervall	Faktor 18 h 2-DG / 18 h Kontrolle	p-Wert	95%-Ver- trauens- intervall	Faktor 18 h Kombina- tion / 18 h Kon- trolle	p-Wert	95%-Ver- trauensin- tervall
			0,649		10 ⁻⁴	0,059			0,597
Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1 (<i>GNB2L1</i>)	0,545	0,017	0,470- 0,619	0,067	0,006	0,052- 0,093	0,391	0,058	0,305- 0,479
Phosphoglycerate kinase 1 (<i>PGK1</i>)	0,550	0,012	0,453- 0,667	0,041	4,07* 10 ⁻⁴	0,030- 0,063	0,340	0,001	0,240- 0,437
40S ribosomal protein S6 (<i>RPS6</i>)	0,550	0,046	0,470- 0,614	0,121	0,035	0,100- 0,151	0,575	0,234	0,492- 0,637
Eukaryotic translation initiation factor 3 sub- unit H (<i>EIF3H</i>)	0,555	0,040	0,331- 0,802	1,047	0,770	0,483- 2,249	0,655	0,047	0,308- 1,318
Heat shock protein HSP 90-beta (<i>HSP90AB1</i>)	0,560	0,027	0,445- 0,692	0,185	0,014	0,118- 0,356	0,525	0,080	0,370- 0,685
40S ribosomal protein S4, X isoform (<i>RPS4X</i>)	0,565	0,002	0,506- 0,625	0,081	0,001	0,070- 0,110	0,425	0,003	0,356- 0,488
40S ribosomal protein S16 (<i>RPS16</i>)	0,586	0,003	0,520- 0,679	0,350	0,079	0,328- 0,398	0,667	0,010	0,597- 0,752

Name	Faktor	p-Wert	95%-Ver- trauens- intervall	Faktor	p-Wert	95%-Ver- trauens- intervall	Faktor	p-Wert	95%-Ver- trauensin- tervall
	18 h DEX / 18 h Kontrolle			18 h 2-DG / 18 h Kontrolle			18 h Kombina- tion / 18 h Kon- trolle		
Pyruvate kinase PKM (<i>PKM</i>)	0,614	0,014	0,550- 0,685	0,251	0,001	0,217- 0,316	0,497	0,004	0,433- 0,592
60S ribosomal protein L3 (<i>RPL3</i>)	0,619	0,017	0,525- 0,718	0,111	2,96* 10 ⁻⁴	0,083- 0,185	0,540	0,001	0,417- 0,637
T-complex protein 1 subunit delta (<i>CCT4</i>)	0,625	0,004	0,555- 0,724	0,429	0,347	0,380- 0,515	0,637	0,001	0,570- 0,705
Splicing factor 3B subunit 2 (<i>SF3B2</i>)	1,644	0,024	1,306- 2,228	0,535	0,581	0,433- 0,685	1,528	0,171	1,236- 2,051
ATP-dependent RNA helicase A (<i>DHX9</i>)	1,820	0,027	1,486- 2,070	1,472	0,651	1,225- 1,820	1,803	0,074	1,472- 2,128
Non-POU domain-containing octamer-bind- ing protein (<i>NONO</i>)	2,032	0,017	1,600- 2,780	1,028	0,887	0,855- 1,472	1,959	0,091	1,528- 2,489
ATP synthase subunit alpha, mitochondrial (<i>ATP5A1</i>)	2,208	0,045	1,770- 2,679	0,667	0,883	0,608- 0,752	2,168	0,063	1,754- 2,559
Histone H1x (<i>H1FX</i>)	2,270	0,012	1,542- 0,402	0,402	0,225	0,288- 1,086	1,086	0,018	0,766- 0,766

Name	Faktor 18 h DEX / 18 h Kontrolle	p-Wert	95%-Ver- trauens- intervall	Faktor 18 h 2-DG / 18 h Kontrolle	p-Wert	95%-Ver- trauens- intervall	Faktor 18 h Kombina- tion / 18 h Kon- trolle	p-Wert	95%-Ver- trauensin- tervall
			3,565			0,560			1,542
Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial (<i>GLUD1</i>)	2,606	0,047	1,923- 3,076	1,585	0,281	1,330- 2,089	3,251	0,003	2,333- 3,908
RNA-binding protein with serine-rich domain 1 (<i>RNPS1</i>)	3,837	0,035	1,355- 6,081	3,342	0,030	1,600- 6,252	6,668	0,032	1,754- 15,560
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U- like protein 1 (<i>HNRNPUL1</i>)	4,365	0,042	2,559- 7,244	21,878	0,037	11,803- 38,726	10,864	0,045	5,546- 19,770
Heterochromatin protein 1-binding protein 3 (<i>HP1BP3</i>)	10,471	0,017	2,831- 26,546	8,091	0,381	2,754- 20,893	7,244	0,329	2,582- 12,706
Translocon-associated protein subunit gamma (<i>SSR3</i>)	11,272	0,044	0,356- 63,096	1,000	0,061	0,053- 18,880	5,012	0,050	0,160- 44,463

Tabelle 19: Signifikant regulierte Proteine: 18 h 2-DG

Name	Faktor 18 h 2-DG / 18 h Kontrolle	p-Wert	95%-Ver- trauens- intervall	Faktor 18 h DEX / 18 h Kontrolle	p-Wert	95%-Ver- trauens- intervall	Faktor 18 h Kombina- tion / 18 h Kon- trolle	p-Wert	95%-Ver- trauensin- tervall
Antigen KI-67 OS=Homo sapiens (<i>MKI67</i>)	0,010	0,011	0,010- 0,014	1,380	0,328	0,586- 3,281	1,009	0,597	0,370- 2,754
Actin-related protein 2/3 complex subunit 5 (<i>ARPC5</i>)	0,012	0,013	0,010- 0,045	0,855	0,719	0,398- 1,820	0,625	0,226	0,350- 1,086
Splicing factor 3B subunit 5 (<i>SF3B5</i>)	0,014	0,024	0,010- 0,082	0,738	0,527	0,530- 1,028	0,698	0,422	0,575- 0,839
Histone H1.3 (<i>HIST1H1D</i>)	0,021	0,023	0,019- 0,023	0,655	0,378	0,614- 0,705	0,331	0,158	0,308- 0,356
High mobility group protein B1 (<i>HMGBl</i>)	0,022	0,010	0,017- 0,032	0,724	0,316	0,667- 0,787	0,350	0,025	0,288- 0,398
Histone H2A.x OS=Homo sapiens (<i>H2AFX</i>)	0,022	0,017	0,020- 0,025	0,871	0,658	0,817- 0,929	0,581	0,231	0,535- 0,625
60S ribosomal protein L29 (<i>RPL29</i>)	0,025	0,023	0,020- 0,035	0,441	0,323	0,363- 0,520	0,356	0,218	0,296- 0,433
Exportin-2 OS=Homo sapiens (<i>CSE1L</i>)	0,027	0,021	0,013- 0,077	0,474	0,188	0,215- 1,067	0,802	0,964	0,433- 1,472

Name	Faktor 18 h 2-DG / 18 h Kontrolle	p-Wert	95%-Ver- trauens- intervall	Faktor 18 h DEX / 18 h Kontrolle	p-Wert	95%-Ver- trauens- intervall	Faktor 18 h Kombina- tion / 18 h Kon- trolle	p-Wert	95%-Ver- trauensin- tervall
Tubulin beta-4B chain (<i>TUBB4B</i>)	0,029	0,024	0,018- 0,045	0,649	0,181	0,445- 0,938	0,745	0,582	0,511- 1,067
GTP-binding nuclear protein Ran (<i>RAN</i>)	0,030	0,009	0,021- 0,103	0,643	0,418	0,483- 0,824	0,433	0,158	0,294- 0,603
Voltage-dependent anion-selective channel protein 1 (<i>VDAC1</i>)	0,036	5,81* 10 ⁻⁴	0,026- 0,059	0,545	0,015	0,453- 0,649	0,488	0,049	0,402- 0,597
Eukaryotic translation elongation factor 1 ep- silon-1 (<i>EEF1E1</i>)	0,037	0,046	0,021- 0,072	0,466	0,743	0,308- 0,711	0,294	0,543	0,182- 0,474
High mobility group protein B2 (<i>HMGB2</i>)	0,039	0,001	0,034- 0,049	1,148	0,579	1,057- 1,236	0,643	0,181	0,575- 0,711
Phosphoglycerate kinase 1 (<i>PGK1</i>)	0,041	4,07* 10 ⁻⁴	0,030- 0,063	0,550	0,012	0,453- 0,667	0,340	0,001	0,240- 0,437
Non-histone chromosomal protein HMG-14 (<i>HMGN1</i>)	0,044	0,002	0,036- 0,052	0,863	0,309	0,752- 0,982	0,270	0,007	0,223- 0,319
60S ribosomal protein L23a (<i>RPL23A</i>)	0,045	0,002	0,039- 0,057	0,794	0,368	0,738- 0,855	0,515	0,179	0,453- 0,565

Name	Faktor 18 h 2-DG / 18 h Kontrolle	p-Wert	95%-Ver- trauens- intervall	Faktor 18 h DEX / 18 h Kontrolle	p-Wert	95%-Ver- trauens- intervall	Faktor 18 h Kombina- tion / 18 h Kon- trolle	p-Wert	95%-Ver- trauensin- tervall
40S ribosomal protein S24 (<i>RPS24</i>)	0,045	0,029	0,036- 0,058	0,449	0,103	0,370- 0,540	0,535	0,157	0,441- 0,649
Eukaryotic translation initiation factor 3 sub- unit G (<i>EIF3</i>)	0,047	0,012	0,013- 0,213	0,530	0,141	0,118- 2,355	0,794	0,497	0,278- 2,270
40S ribosomal protein S29 (<i>PS29</i>)	0,047	0,035	0,039- 0,070	0,597	0,248	0,525- 0,685	0,501	0,284	0,433- 0,586
60S ribosomal protein L24 (<i>RPL24</i>)	0,050	0,040	0,043- 0,061	0,479	0,023	0,425- 0,545	0,497	0,038	0,437- 0,565
40S ribosomal protein S11 (<i>RPS11</i>)	0,050	0,046	0,037- 0,074	0,466	0,646	0,391- 0,565	0,461	0,868	0,391- 0,575
Eukaryotic translation initiation factor 1A, X- chromosomal (<i>EIF1AX</i>)	0,054	0,011	0,033- 0,096	0,501	0,195	0,391- 0,637	0,366	0,244	0,283- 0,466
Ribosomal L1 domain-containing protein 1 (<i>RSL1D1</i>)	0,058	1,06* 10 ⁻⁴	0,026- 0,141	0,692	0,005	0,515- 0,938	0,673	0,009	0,501- 0,904
Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1 (<i>GNB2L1</i>)	0,067	0,006	0,052- 0,093	0,545	0,017	0,470- 0,619	0,391	0,058	0,305- 0,479

Name	Faktor 18 h 2-DG / 18 h Kontrolle	p-Wert	95%-Ver- trauens- intervall	Faktor 18 h DEX / 18 h Kontrolle	p-Wert	95%-Ver- trauens- intervall	Faktor 18 h Kombina- tion / 18 h Kon- trolle	p-Wert	95%-Ver- trauensin- tervall
Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor (<i>MANF</i>)	0,069	0,023	0,046- 0,104	0,492	0,358	0,337- 0,718	1,009	0,299	0,711- 1,419
Clathrin heavy chain 1 (<i>CLTC</i>)	0,072	0,025	0,050- 0,113	0,530	0,348	0,373- 0,766	0,724	0,211	0,525- 1,009
ATP-citrate synthase (<i>ACLY</i>)	0,075	0,012	0,046- 0,129	0,832	0,690	0,565- 1,213	0,545	0,247	0,363- 0,809
60S ribosomal protein L10 (<i>RPL10</i>)	0,076	0,005	0,067- 0,095	0,661	0,258	0,575- 0,731	0,483	0,348	0,429- 0,560
Proactivator polypeptide (<i>PSAP</i>)	0,079	4,67* 10 ⁻⁴	0,067- 0,099	0,625	0,771	0,560- 0,698	0,525	0,110	0,449- 0,603
40S ribosomal protein S4, X isoform (<i>RPS4X</i>)	0,081	0,001	0,070- 0,110	0,565	0,002	0,506- 0,625	0,425	0,003	0,356- 0,488
Fructose-bisphosphate aldolase A (<i>ALDOA</i>)	0,083	0,037	0,071- 0,118	0,839	0,822	0,780- 0,904	0,313	0,015	0,242- 0,406
Elongation factor 1-beta (<i>EEF1B2</i>)	0,094	0,019	0,079- 0,126	0,402	0,014	0,347- 0,466	0,773	0,084	0,705- 0,839

Name	Faktor	p-Wert	95%-Ver- trauens- intervall	Faktor	p-Wert	95%-Ver- trauens- intervall	Faktor	p-Wert	95%-Ver- trauensin- tervall
	18 h 2-DG / 18 h Kontrolle			18 h DEX / 18 h Kontrolle			18 h Kombina- tion / 18 h Kon- trolle		
Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-bin- ding protein (<i>SERBP1</i>)	0,100	4,43* 10 ⁻⁴	0,086- 0,120	0,586	0,080	0,511- 0,679	0,483	0,121	0,413- 0,560
40S ribosomal protein S27 (<i>RPS27</i>)	0,100	0,009	0,078- 0,164	0,429	0,158	0,294- 0,570	0,283	0,086	0,213- 0,394
5'-3' exoribonuclease 2 (<i>XRN2</i>)	0,101	0,029	0,024- 0,457	0,211	0,053	0,045- 1,009	0,384	0,241	0,080- 1,786
pre-rRNA processing protein FTSJ3 (<i>FTSJ3</i>)	0,106	0,028	0,017- 0,441	0,474	0,099	0,187- 0,929	0,429	0,083	0,124- 1,236
60S ribosomal protein L12 (<i>RPL12</i>)	0,108	0,029	0,088- 0,143	0,794	0,943	0,718- 0,879	0,535	0,723	0,453- 0,614
60S ribosomal protein L3 (<i>RPL3</i>)	0,111	2,96* 10 ⁻⁴	0,083- 0,185	0,619	0,017	0,525- 0,718	0,540	0,001	0,417- 0,637
40S ribosomal protein S6 (<i>RPS6</i>)	0,121	0,035	0,100- 0,151	0,550	0,046	0,470- 0,614	0,575	0,234	0,492- 0,637
60S acidic ribosomal protein P0 (<i>RPLP0</i>)	0,125	0,010	0,115- 0,141	0,938	0,109	0,871- 1,000	0,938	0,214	0,871- 1,000

Name	Faktor 18 h 2-DG / 18 h Kontrolle	p-Wert	95%-Ver- trauens- intervall	Faktor 18 h DEX / 18 h Kontrolle	p-Wert	95%-Ver- trauens- intervall	Faktor 18 h Kombina- tion / 18 h Kon- trolle	p-Wert	95%-Ver- trauensin- tervall
60S ribosomal protein L7a (<i>RPL7A</i>)	0,128	0,001	0,115- 0,171	0,685	0,181	0,631- 0,738	0,525	0,069	0,479- 0,586
Calcyclin-binding protein (<i>CACYBP</i>)	0,129	0,026	0,077- 0,238	0,575	0,165	0,457- 0,711	0,492	0,019	0,387- 0,619
Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mi- tochondrial (<i>HADH</i>)	0,129	0,048	0,086- 0,180	1,076	0,803	0,863- 1,343	0,310	0,027	0,211- 0,474
Proteasome subunit alpha type-4 (<i>PSMA4</i>)	0,131	0,010	0,063- 0,437	0,586	0,069	0,377- 0,832	0,511	0,098	0,310- 0,773
40S ribosomal protein S18 (<i>RPS18</i>)	0,132	0,018	0,111- 0,182	0,488	0,198	0,429- 0,570	0,331	0,008	0,265- 0,433
X-ray repair cross-complementing protein 6 (<i>XRCC6</i>)	0,156	0,011	0,136- 0,200	1,660	0,362	1,368- 1,888	1,318	0,949	1,148- 1,486
Elongation factor 2 (<i>EEF2</i>)	0,160	1,23* 10 ⁻⁴	0,128- 0,213	0,501	0,001	0,437- 0,581	0,141	3,77* 10 ⁻⁸	0,108- 0,191
60S ribosomal protein L35a (<i>RPL35A</i>)	0,160	0,013	0,138- 0,231	0,863	0,228	0,802- 0,929	0,461	0,012	0,391- 0,535

Name	Faktor 18 h 2-DG / 18 h Kontrolle	p-Wert	95%-Ver- trauens- intervall	Faktor 18 h DEX / 18 h Kontrolle	p-Wert	95%-Ver- trauens- intervall	Faktor 18 h Kombina- tion / 18 h Kon- trolle	p-Wert	95%-Ver- trauensin- tervall
60S ribosomal protein L5 (<i>RPL5</i>)	0,175	0,013	0,160- 0,223	1,271	0,343	1,138- 1,445	0,871	0,271	0,809- 0,938
Peroxisredoxin-1 (<i>PRDX1</i>)	0,185	0,010	0,161- 0,242	0,824	0,180	0,773- 0,887	0,325	0,020	0,221- 0,417
Heat shock protein HSP 90-beta (<i>HSP90AB1</i>)	0,185	0,014	0,118- 0,356	0,560	0,027	0,445- 0,692	0,525	0,080	0,370- 0,685
60S ribosomal protein L8 (<i>RPL8</i>)	0,198	0,036	0,185- 0,231	0,780	0,038	0,731- 0,832	0,570	0,133	0,525- 0,619
Elongation factor 1-delta (<i>EEF1D</i>)	0,217	0,012	0,172- 0,270	0,344	0,002	0,278- 0,417	0,457	0,007	0,387- 0,581
40S ribosomal protein S4 (<i>RPS4</i>)	0,223	0,045	0,191- 0,356	0,685	0,376	0,603- 0,780	0,205	4,71* 10 ⁻⁴	0,150- 0,331
N-acetyltransferase 10 (<i>NAT10</i>)	0,240	0,039	0,053- 1,067	0,425	0,097	0,104- 1,706	0,738	0,412	0,316- 1,738
40S ribosomal protein S2 (<i>RPS2</i>)	0,247	0,038	0,223- 0,310	0,692	0,235	0,643- 0,752	0,550	0,227	0,479- 0,631

Name	Faktor 18 h 2-DG / 18 h Kontrolle	p-Wert	95%-Ver- trauens- intervall	Faktor 18 h DEX / 18 h Kontrolle	p-Wert	95%-Ver- trauens- intervall	Faktor 18 h Kombina- tion / 18 h Kon- trolle	p-Wert	95%-Ver- trauensin- tervall
Pyruvate kinase PKM (<i>PKM</i>)	0,251	0,001	0,217- 0,316	0,614	0,014	0,550- 0,685	0,497	0,004	0,433- 0,592
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP3 (<i>FKBP3</i>)	0,251	0,013	0,200- 0,350	1,343	0,347	1,096- 1,675	0,731	0,074	0,608- 0,912
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5 (<i>DDX5</i>)	0,299	0,016	0,278- 0,328	0,698	0,121	0,631- 0,759	0,461	0,006	0,413- 0,511
Elongation factor 1-gamma (<i>EEF1G</i>)	0,328	0,020	0,302- 0,437	0,461	1,50* 10 ⁻⁴	0,387- 0,535	1,028	0,032	0,929- 1,148
L-lactate dehydrogenase B chain (<i>LDHB</i>)	0,353	0,043	0,089- 0,711	0,643	0,184	0,377- 0,946	0,655	0,369	0,402- 1,057
Transferrin receptor protein 1 (<i>TFRC</i>)	0,363	0,030	0,302- 0,466	1,600	0,769	1,355- 1,905	0,879	0,012	0,752- 1,047
Polyadenylate-binding protein 1 (<i>PABPC1</i>)	0,550	0,018	0,497- 0,614	0,492	0,001	0,380- 0,603	0,904	0,007	0,824- 0,991
Endoplasmin (<i>HSP90B1</i>)	2,228	0,028	1,067- 6,486	1,019	0,297	0,525- 1,995	1,600	0,121	0,802- 4,055

Name	Faktor	p-Wert	95%-Ver- trauens- intervall	Faktor	p-Wert	95%-Ver- trauens- intervall	Faktor	p-Wert	95%-Ver- trauensin- tervall
	18 h 2-DG / 18 h Kontrolle			18 h DEX / 18 h Kontrolle			18 h Kombina- tion / 18 h Kon- trolle		
RNA-binding protein with serine-rich domain 1 (<i>RNPS1</i>)	3,342	0,030	1,600- 6,252	3,837	0,035	1,355- 6,081	6,668	0,032	1,754- 15,560
Proteasome activator complex subunit 2 (<i>PSME2</i>)	3,467	0,044	1,837- 7,047	2,512	0,273	1,343- 4,285	1,923	0,169	1,038- 3,698
Apoptosis inhibitor 5 (<i>API5</i>)	4,487	0,022	2,780- 8,710	2,109	0,492	1,500- 2,911	4,699	0,076	2,655- 10,000
Protein transport protein Sec61 subunit alpha isoform 1 (<i>SEC61A1</i>)	4,786	0,027	1,871- 31,333	2,805	0,099	1,259- 24,434	1,028	0,090	0,483- 3,311
Glycylpeptide N-tetradecanoyltransferase 1 (<i>NMT1</i>)	7,516	0,039	0,213- 58,076	1,202	0,056	0,059- 22,284	4,571	0,043	0,139- 45,290
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U- like protein 1 (<i>HNRNPUL1</i>)	21,878	0,037	11,803- 38,726	4,365	0,042	2,559- 7,244	10,864	0,045	5,546- 19,770

Tabelle 20: Signifikant regulierte Proteine: 18 h Kombination

Name	Faktor 18 h Kombination / 18 h Kontrolle	p-Wert	95%-Ver- trauens- intervall	Faktor 18 h DEX / 18 h Kontrolle	p-Wert	95%-Ver- trauens- intervall	Faktor 18 h 2-DG / 18 h Kontrolle	p-Wert	95%-Ver- trauensin- tervall
Annexin A6 (<i>ANXA6</i>)	0,098	0,042	0,058- 0,182	0,643	0,507	0,421- 0,973	0,056	0,202	0,035- 0,112
Elongation factor 2 (<i>EEF2</i>)	0,141	3,77* 10 ⁻⁸	0,108- 0,191	0,501	0,001	0,437- 0,581	0,160	1,23* 10 ⁻⁴	0,128- 0,213
40S ribosomal protein SA (<i>RPSA</i>)	0,205	4,71* 10 ⁻⁴	0,150- 0,331	0,685	0,376	0,603- 0,780	0,223	0,045	0,191- 0,356
Actin-related protein 2/3 complex subunit 2 (<i>ARPC2</i>)	0,236	0,038	0,118- 0,560	0,794	0,386	0,506- 1,236	0,090	0,217	0,052- 0,391
DNA topoisomerase 2-alpha (<i>TOP2A</i>)	0,244	0,022	0,163- 0,515	1,500	0,891	1,086- 2,051	0,429	0,283	0,313- 0,745
Integral membrane protein 2A (<i>ITM2A</i>)	0,261	0,018	0,171- 0,360	0,938	0,464	0,832- 1,057	0,221	0,171	0,146- 0,380
Non-histone chromosomal protein HMG-14 (<i>HMGN1</i>)	0,270	0,007	0,223- 0,319	0,863	0,309	0,752- 0,982	0,044	0,002	0,036- 0,052
Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial (<i>HADH</i>)	0,310	0,027	0,211- 0,474	1,076	0,803	0,863- 1,343	0,129	0,048	0,086- 0,180

Name	Faktor	p-Wert	95%-Ver- trauens- intervall	Faktor	p-Wert	95%-Ver- trauens- intervall	Faktor	p-Wert	95%-Ver- trauensin- tervall
	18 h Kombination / 18 h Kontrolle			18 h DEX / 18 h Kontrolle			18 h 2-DG / 18 h Kontrolle		
Fructose-bisphosphate aldolase A (<i>ALDOA</i>)	0,313	0,015	0,242- 0,406	0,839	0,822	0,780- 0,904	0,083	0,037	0,071- 0,118
Peroxiredoxin-1 (<i>PRDX1</i>)	0,325	0,020	0,221- 0,417	0,824	0,180	0,773- 0,887	0,185	0,010	0,161- 0,242
40S ribosomal protein S18 (<i>RPS18</i>)	0,331	0,008	0,265- 0,433	0,488	0,198	0,429- 0,570	0,132	0,018	0,111- 0,182
Phosphoglycerate kinase 1 (<i>PGK1</i>)	0,340	0,001	0,240- 0,437	0,550	0,012	0,453- 0,667	0,041	4,07* 10 ⁻⁴	0,030- 0,063
High mobility group protein B1 (<i>HMGBl</i>)	0,350	0,025	0,288- 0,398	0,724	0,316	0,667- 0,787	0,022	0,010	0,017- 0,032
40S ribosomal protein S4, X isoform (<i>RPS4X</i>)	0,425	0,003	0,356- 0,488	0,565	0,002	0,506- 0,625	0,081	0,001	0,070- 0,110
Nucleolar RNA helicase 2 (<i>DDX21</i>)	0,429	0,003	0,316- 0,614	0,637	0,078	0,511- 0,773	0,356	0,126	0,288- 0,520
Elongation factor 1-delta (<i>EEF1D</i>)	0,457	0,007	0,387- 0,581	0,344	0,002	0,278- 0,417	0,217	0,012	0,172- 0,270
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5 (<i>DDX5</i>)	0,461	0,006	0,413- 0,511	0,698	0,121	0,631- 0,759	0,299	0,016	0,278- 0,328

Name	Faktor 18 h Kombination / 18 h Kontrolle	p-Wert	95%-Ver- trauens- intervall	Faktor 18 h DEX / 18 h Kontrolle	p-Wert	95%-Ver- trauens- intervall	Faktor 18 h 2-DG / 18 h Kontrolle	p-Wert	95%-Ver- trauensin- tervall
60S ribosomal protein L35a (<i>RPL35A</i>)	0,461	0,012	0,391- 0,535	0,863	0,228	0,802- 0,929	0,160	0,013	0,138- 0,231
Voltage-dependent anion-selective channel protein 1 (<i>VDAC1</i>)	0,488	0,049	0,402- 0,597	0,545	0,015	0,453- 0,649	0,036	5,81* 10 ⁻⁴	0,026- 0,059
Calcyclin-binding protein (<i>CACYBP</i>)	0,492	0,019	0,387- 0,619	0,575	0,165	0,457- 0,711	0,129	0,026	0,077- 0,238
Pyruvate kinase PKM (<i>PKM</i>)	0,497	0,004	0,433- 0,592	0,614	0,014	0,550- 0,685	0,251	0,001	0,217- 0,316
60S ribosomal protein L24 (<i>RPL24</i>)	0,497	0,038	0,437- 0,565	0,479	0,023	0,425- 0,545	0,050	0,040	0,043- 0,061
60S ribosomal protein L3 (<i>RPL3</i>)	0,540	0,001	0,417- 0,637	0,619	0,017	0,525- 0,718	0,111	2,96* 10 ⁻⁴	0,083- 0,185
T-complex protein 1 subunit delta (<i>CCT4</i>)	0,637	0,001	0,570- 0,705	0,625	0,004	0,555- 0,724	0,429	0,347	0,380- 0,515
Eukaryotic translation initiation factor 3 sub- unit H (<i>EIF3H</i>)	0,655	0,047	0,308- 1,318	0,555	0,040	0,331- 0,802	1,047	0,770	0,483- 2,249
Vesicle-fusing ATPase (<i>NSF</i>)	1,644	0,036	0,429- 6,368	0,824	0,405	0,238- 2,805	0,920	0,166	0,207- 4,093

Name	Faktor	p-Wert	95%-Ver- trauens- intervall	Faktor	p-Wert	95%-Ver- trauens- intervall	Faktor	p-Wert	95%-Ver- trauensin- tervall
	18 h Kombination / 18 h Kontrolle			18 h DEX / 18 h Kontrolle			18 h 2-DG / 18 h Kontrolle		
Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1 (IQGAP1)	1,690	0,049	1,294- 2,911	0,637	0,661	0,497- 0,847	0,575	0,477	0,449- 0,738
Ezrin (EZR)	1,770	0,041	1,486- 2,148	1,191	0,529	1,038- 1,355	0,501	0,924	0,441- 0,592
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 (HNRNPA3)	2,535	0,020	1,995- 3,251	2,355	0,089	1,854- 2,938	0,322	0,665	0,275- 0,387
Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1 (SND1)	2,858	0,019	1,888- 3,664	2,630	0,058	1,770- 3,404	2,399	0,160	1,614- 3,373
Lamin-B1 (LMNB1)	3,076	0,035	2,512- 4,093	2,679	0,066	2,270- 3,162	1,028	0,196	0,855- 1,225
Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial (GLUD1)	3,251	0,003	2,333- 3,908	2,606	0,047	1,923- 3,076	1,585	0,281	1,330- 2,089
Serine hydroxymethyltransferase, mito- chondrial (SHMT2)	3,698	0,037	2,270- 10,186	1,888	0,787	1,294- 3,908	2,014	0,417	1,419- 4,093
Glycylpeptide N-tetradecanoyltransferase 1 (NMT1)	4,571	0,043	0,139- 45,290	1,202	0,056	0,059- 22,284	7,516	0,039	0,213- 58,076
Translocon-associated protein subunit gamma (SSR3)	5,012	0,050	0,160- 44,463	11,272	0,044	0,356- 63,096	1,000	0,061	0,053- 18,880

Name	Faktor 18 h Kombination / 18 h Kontrolle	p-Wert	95%-Ver- trauens- intervall	Faktor 18 h DEX / 18 h Kontrolle	p-Wert	95%-Ver- trauens- intervall	Faktor 18 h 2-DG / 18 h Kontrolle	p-Wert	95%-Ver- trauensin- tervall
78 kDa glucose-regulated protein (<i>HSPA5</i>)	5,395	0,043	2,249- 14,723	1,225	0,198	0,679- 2,606	0,839	0,063	0,406- 1,706
RNA-binding protein with serine-rich domain 1 (<i>RNPS1</i>)	6,668	0,032	1,754- 15,560	3,837	0,035	1,355- 6,081	3,342	0,030	1,600- 6,252
Titin (<i>TTN</i>)	8,954	0,034	1,754- 17,539	9,120	0,059	1,528- 21,281	4,365	0,345	1,644- 7,798
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U- like protein 1 (<i>HNRNPUL1</i>)	10,864	0,045	5,546- 19,770	4,365	0,042	2,559- 7,244	21,878	0,037	11,803- 38,726

Tabelle 21: Signifikant regulierte Proteine: 18 h Kontrolle

Name	Faktor	p-Wert	95%- Vertrauens- intervall	Faktor	p-Wert	95%-Ver- trauens- intervall	Faktor	p-Wert	95%-Ver- trauensin- tervall
DnaJ homolog subfamily B member 1 OS=Homo sapiens (<i>DNAJB1</i>)	0,221 18 h Kontrolle / 30 h Kontrolle	0,013	0,119- 0,457	0,433 30 h DEX / 30 h Kontrolle	0,308	0,254- 0,685	0,525 30 h 2-DG / 30 h Kontrolle	0,864	0,270- 0,787
Heat shock cognate 71 kDa protein (<i>HSPA8</i>)	0,296	0,002	0,233- 0,409	0,614	0,347	0,555- 0,724	0,425	0,018	0,360- 0,545
DNA replication licensing factor MCM6 (<i>MCM6</i>)	0,328	0,021	0,112- 0,794	1,028	0,704	0,506- 1,905	1,368	0,707	0,731- 2,606
Thyroid hormone receptor-associated pro- tein 3 (<i>THRAP3</i>)	0,394	0,025	0,227- 0,724	0,673	0,350	0,445- 0,938	1,067	0,257	0,817- 1,393
Bifunctional glutamate/proline--tRNA ligase (<i>EPRS</i>)	0,461	0,012	0,146- 0,745	0,692	0,351	0,441- 1,000	1,038	0,585	0,766- 1,419
Malate dehydrogenase, mitochondrial (<i>MDH2</i>)	0,483	0,009	0,384- 0,673	0,982	0,913	0,794- 1,202	0,711	0,283	0,515- 0,982
X-ray repair cross-complementing protein 6 (<i>XRCC6</i>)	0,488	0,048	0,409- 0,692	1,127	0,892	1,047- 1,202	0,871	0,273	0,809- 0,946
Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1 (<i>IQGAP1</i>)	0,492	0,027	0,294- 0,685	2,070	0,294	1,432- 2,704	1,644	0,246	1,271- 2,032

Name	Faktor 18 h Kontrolle / 30 h Kontrolle	p-Wert	95%- Vertrau- ensinter- vall	Faktor 30 h DEX / 30 h Kontrolle	p-Wert	95%-Ver- trauens- intervall	Faktor 30 h 2-DG / 30 h Kontrolle	p-Wert	95%-Ver- trauensin- tervall
Paraspeckle component 1 (<i>PSPC1</i>)	0,501	0,011	0,240- 0,766	1,213	0,688	0,938- 1,600	1,706	0,174	1,225- 2,466
26S protease regulatory subunit 7 (<i>PSMC2</i>)	0,515	0,039	0,179- 1,019	1,738	0,619	1,047- 3,565	0,667	0,201	0,302- 1,076
Phosphoglycerate kinase 1 (<i>PGK1</i>)	0,661	0,009	0,497- 0,871	1,067	0,605	0,946- 1,191	0,614	0,029	0,501- 0,817
Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1 (<i>SND1</i>)	1,585	0,046	1,127- 2,089	1,600	0,023	1,191- 2,249	2,754	1,37* 10 ⁻⁴	1,556- 4,285
Prohibitin-2 (<i>PHB2</i>)	1,786	0,041	1,213- 2,754	1,000	0,694	0,802- 1,236	1,191	0,550	0,955- 1,472
Voltage-dependent anion-selective channel protein 1 (<i>VDAC1</i>)	1,820	0,047	1,380- 2,655	0,445	0,214	0,356- 0,705	0,809	0,510	0,692- 0,955
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L (<i>HNRNPL</i>)	1,959	0,048	1,343- 2,312	2,559	0,085	1,542- 3,281	2,831	3,48* 10 ⁻⁴	1,614- 3,733
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0 (<i>HNRNPD</i>)	2,938	0,048	1,738- 3,565	3,221	0,156	1,995- 4,246	2,249	0,116	1,556- 2,559

Name	Faktor	p-Wert	95%- Vertrauens- intervall	Faktor	p-Wert	95%-Ver- trauens- intervall	Faktor	p-Wert	95%-Ver- trauensin- tervall
	18 h Kontrolle / 30 h Kontrolle			30 h DEX / 30 h Kontrolle			30 h 2-DG / 30 h Kontrolle		
Multifunctional protein ADE2 (<i>PAICS</i>)	3,281	0,026	1,770-6,730	0,929	0,957	0,731-1,169	1,247	0,840	0,929-1,738
Annexin A2 (<i>ANXA2</i>)	7,178	8,60* 10 ⁻⁵	3,837-15,136	4,920	0,020	2,938-8,790	0,887	0,503	0,540-1,138
Annexin A6 (<i>ANXA6</i>)	9,120	0,009	5,012-30,200	7,447	0,018	4,246-23,121	0,597	0,506	0,356-0,863

Tabelle 22: Signifikant regulierte Proteine: 30 h DEX

Name	Faktor 30 h DEX / 30 h Kontrolle	p-Wert	95%- Vertrau- ensinter- vall	Faktor 30 h 2-DG / 30 h Kontrolle	p-Wert	95%-Ver- trauens- intervall	Faktor 18 h Kontrolle / 30 h Kontrolle	p-Wert	95%-Ver- trauensin- tervall
DNA-binding protein SATB1 (<i>SATB1</i>)	0,064	0,026	0,026- 0,433	0,608	0,399	0,391- 0,809	0,839	0,570	0,667- 1,047
Caprin-1 OS=Homo sapiens (<i>CAPRIN1</i>)	0,082	0,002	0,045- 0,211	0,520	0,318	0,398- 0,711	1,067	0,351	0,904- 1,259
Integral membrane protein (<i>ITM2A</i>)	0,093	0,005	0,038- 0,402	1,038	0,979	0,895- 1,202	0,887	0,771	0,745- 1,038
Nucleolar RNA helicase 2 (<i>DDX21</i>)	0,105	1,21* 10 ⁻⁵	0,080- 0,219	0,631	0,043	0,515- 0,745	0,973	0,927	0,879- 1,086
Eukaryotic initiation factor 4A-I (<i>EIF4A1</i>)	0,160	0,001	0,085- 0,406	0,413	0,027	0,268- 0,619	0,679	0,091	0,525- 0,809
Basic leucine zipper and W2 domain-containing protein 2 (<i>BZW2</i>)	0,172	0,021	0,078- 0,530	1,047	0,467	0,832- 1,318	1,019	0,682	0,832- 1,247
Translationally-controlled tumor protein (<i>TPT1</i>)	0,172	0,023	0,062- 0,366	0,141	0,006	0,053- 0,328	0,738	0,562	0,597- 0,904
40S ribosomal protein SA (<i>RPSA</i>)	0,211	0,001	0,149- 0,449	0,273	0,004	0,215- 0,497	0,964	0,248	0,887- 1,047

Name	Faktor	p-Wert	95%- Vertrauensinter- vall	Faktor	p-Wert	95%-Ver- trauens- intervall	Faktor	p-Wert	95%-Ver- trauensin- tervall
Ras GTPase-activating protein-binding protein 1 (<i>G3BP1</i>)	0,213 30 h DEX / 30 h Kontrolle	0,004	0,092- 0,497	0,425 30 h 2-DG / 30 h Kontrolle	0,048	0,233- 0,655	0,643 18 h Kontrolle / 30 h Kontrolle	0,354	0,488- 0,879
60S ribosomal protein L7a (<i>RPL7A</i>)	0,215	0,001	0,189- 0,344	0,449	0,024	0,409- 0,575	0,982	0,733	0,920- 1,047
40S ribosomal protein S13 (<i>RPS13</i>)	0,223	0,008	0,172- 0,429	0,631	0,139	0,545- 0,787	0,991	0,685	0,929- 1,057
40S ribosomal protein S2 (<i>RPS2</i>)	0,240	0,034	0,185- 0,409	0,334	0,031	0,270- 0,474	0,863	0,880	0,809- 0,929
Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein (<i>SERBP1</i>)	0,249	0,001	0,184- 0,421	0,391	0,033	0,310- 0,535	0,991	0,748	0,904- 1,076
60S ribosomal protein L15 (<i>RPL15</i>)	0,258	0,042	0,177- 0,540	0,398	0,133	0,265- 0,619	1,096	0,935	0,982- 1,236
Myb-binding protein 1A (<i>MYBBP1A</i>)	0,281	0,023	0,101- 0,560	0,421	0,014	0,221- 0,685	0,745	0,702	0,535- 0,982
ATP-dependent RNA helicase DDX3X (<i>DDX3X</i>)	0,281	0,024	0,215- 0,492	0,973	0,822	0,887- 1,057	0,946	0,507	0,871- 1,028
40S ribosomal protein S3 (<i>RPS3</i>)	0,288	0,001	0,249- 0,387	0,265	1,26* 10 ⁻⁴	0,217- 0,360	0,724	0,260	0,667- 0,780

Name	Faktor 30 h DEX / 30 h Kontrolle	p-Wert	95%- Vertrau- ensinter- vall	Faktor 30 h 2-DG / 30 h Kontrolle	p-Wert	95%-Ver- trauens- intervall	Faktor 18 h Kontrolle / 30 h Kontrolle	p-Wert	95%-Ver- trauensin- tervall
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5 (<i>DDX5</i>)	0,296	0,011	0,225- 0,515	0,711	0,285	0,608- 0,824	1,038	0,994	0,973- 1,107
Polyadenylate-binding protein 1 (<i>PABPC1</i>)	0,296	0,018	0,211- 0,625	1,009	0,874	0,895- 1,148	1,019	0,791	0,904- 1,148
Elongation factor Tu, mitochondrial (<i>TUFM</i>)	0,299	0,043	0,167- 0,655	1,542	0,171	1,067- 3,076	0,955	0,728	0,705- 1,282
60S ribosomal protein L5 (<i>RPL5</i>)	0,337	0,012	0,244- 0,608	0,429	0,010	0,325- 0,673	1,038	0,977	0,964- 1,107
40S ribosomal protein S3a (<i>RPS3A</i>)	0,340	0,003	0,270- 0,506	0,461	0,010	0,406- 0,592	1,057	0,225	1,000- 1,107
Ribosomal L1 domain-containing protein 1 (<i>RSL1D1</i>)	0,347	0,028	0,233- 0,655	0,724	0,617	0,597- 0,904	1,127	0,717	0,938- 1,355
40S ribosomal protein S23 (<i>RPS23</i>)	0,366	0,040	0,265- 0,649	0,466	0,355	0,366- 0,711	0,955	0,285	0,879- 1,028
40S ribosomal protein S4, X isoform (<i>RPS4X</i>)	0,380	0,007	0,340- 0,470	0,347	0,022	0,302- 0,449	1,047	0,925	0,991- 1,117
Eukaryotic translation initiation factor 3 sub- unit C (<i>EIF3C</i>)	0,380	0,023	0,281- 0,679	0,520	0,053	0,328- 0,738	0,863	0,898	0,698- 1,009

Name	Faktor	p-Wert	95%- Vertrauensinter- vall	Faktor	p-Wert	95%-Ver- trauens- intervall	Faktor	p-Wert	95%-Ver- trauensin- tervall
	30 h DEX / 30 h Kontrolle			30 h 2-DG / 30 h Kontrolle			18 h Kontrolle / 30 h Kontrolle		
Elongation factor 1-delta (<i>EEF1D</i>)	0,391	0,025	0,316- 0,625	0,328	0,080	0,263- 0,570	0,453	0,057	0,325- 0,655
Elongation factor 1-gamma (<i>EEF1G</i>)	0,391	0,046	0,258- 0,625	0,492	0,041	0,377- 0,692	0,920	0,987	0,847- 1,000
Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1 (<i>EIF4G1</i>)	0,394	0,032	0,337- 0,603	0,655	0,139	0,530- 0,832	1,138	0,986	0,982- 1,294
40S ribosomal protein S18 (<i>RPS18</i>)	0,402	0,034	0,319- 0,661	0,409	0,022	0,261- 0,649	1,000	0,266	0,904- 1,096
DnaJ homolog subfamily A member 1 (<i>DNAJA1</i>)	0,406	0,032	0,141- 0,592	0,497	0,244	0,231- 0,692	1,000	0,656	0,802- 1,225
40S ribosomal protein S9 (<i>RPS9</i>)	0,417	0,014	0,328- 0,679	0,334	0,015	0,283- 0,619	0,946	0,188	0,839- 1,067
Vimentin (<i>VIM</i>)	0,445	4,15* 10 ⁻⁴	0,391- 0,511	1,500	0,001	1,419- 1,600	0,603	0,072	0,560- 0,643
T-complex protein 1 subunit theta (<i>CCT8</i>)	0,457	0,002	0,328- 0,649	0,649	0,088	0,555- 0,817	0,773	0,149	0,692- 0,879
T-complex protein 1 subunit delta (<i>CCT4</i>)	0,483	0,037	0,337- 0,649	0,391	0,003	0,296- 0,586	0,904	0,776	0,824- 0,991

Name	Faktor 30 h DEX / 30 h Kontrolle	p-Wert	95%- Vertrau- ensinter- vall	Faktor 30 h 2-DG / 30 h Kontrolle	p-Wert	95%-Ver- trauens- intervall	Faktor 18 h Kontrolle / 30 h Kontrolle	p-Wert	95%-Ver- trauensin- tervall
Nucleophosmin (<i>NPM1</i>)	0,565	0,016	0,433- 0,685	1,236	0,560	1,148- 1,330	0,649	0,130	0,614- 0,711
Eukaryotic translation initiation factor 3 sub- unit A (<i>EIF3A</i>)	0,608	0,011	0,453- 0,759	0,535	0,117	0,353- 0,731	0,794	0,848	0,649- 0,929
Alpha-taxilin (<i>TXLNA</i>)	1,556	0,022	0,794- 3,837	1,271	0,023	0,322- 5,200	1,355	0,166	0,794- 2,780
26S proteasome non-ATPase regulatory sub- unit 13 (<i>PSMD13</i>)	1,585	0,021	1,159- 3,105	0,817	0,977	0,586- 1,096	1,148	0,335	0,863- 1,644
Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1 (<i>SND1</i>)	1,600	0,023	1,191- 2,249	2,754	1,37* 10 ⁻⁴	1,556- 4,285	1,585	0,046	1,127- 2,089
ATP synthase subunit alpha, mitochondrial (<i>ATP5A1</i>)	1,600	0,035	1,259- 1,803	1,259	0,637	1,117- 1,368	2,089	0,055	1,528- 2,377
Pyruvate kinase PKM (<i>PKM</i>)	1,614	0,018	1,318- 1,959	0,794	0,877	0,731- 0,955	1,355	0,030	1,191- 1,585
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17 (<i>DDX17</i>)	1,803	0,004	1,318- 2,729	1,047	0,933	0,920- 1,202	0,809	0,878	0,643- 0,964
Interleukin enhancer-binding factor 3 (<i>ILF3</i>)	1,837	0,026	1,330- 2,208	1,057	0,970	0,964- 1,148	0,982	0,738	0,895- 1,076

Name	Faktor 30 h DEX / 30 h Kontrolle	p-Wert	95%- Vertrau- ensinter- vall	Faktor 30 h 2-DG / 30 h Kontrolle	p-Wert	95%-Ver- trauens- intervall	Faktor 18 h Kontrolle / 30 h Kontrolle	p-Wert	95%-Ver- trauensin- tervall
Heterochromatin protein 1-binding protein 3 (HP1BP3)	1,854	0,004	1,343- 3,981	1,690	0,107	1,225- 3,837	0,794	0,213	0,565- 1,019
Proteasome subunit alpha type-6 (PSMA6)	1,854	0,044	1,247- 4,920	1,355	0,191	1,000- 2,312	1,236	0,317	0,912- 2,535
Ezrin (EZR)	1,977	0,003	1,556- 2,535	1,614	0,003	1,380- 1,837	0,718	0,674	0,625- 0,855
Coronin-1A (CORO1A)	2,089	0,021	1,600- 3,251	1,959	0,228	1,445- 2,679	0,421	0,082	0,313- 0,698
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U (HNRNPU)	2,249	0,011	1,803- 2,535	1,675	0,160	1,432- 1,837	1,585	0,235	1,343- 1,722
Far upstream element-binding protein 1 (FUBP1)	2,606	0,014	1,500- 9,290	1,722	0,293	1,117- 3,342	2,270	0,178	1,318- 6,668
Myosin-9 (MYH9)	2,704	1,02* 10 ⁻⁴	1,660- 3,837	0,608	0,170	0,466- 0,847	0,964	0,816	0,817- 1,148
Structural maintenance of chromosomes pro- tein 4 (SMC4)	2,704	0,006	1,528- 6,668	2,032	0,136	1,236- 3,945	0,946	0,726	0,724- 1,191
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U- like protein 2 (HNRNPUL2)	2,858	0,001	1,706- 6,368	2,805	0,071	1,644- 6,194	0,863	0,552	0,679- 1,127

Name	Faktor 30 h DEX / 30 h Kontrolle	p-Wert	95%- Vertrau- ensinter- vall	Faktor 30 h 2-DG / 30 h Kontrolle	p-Wert	95%-Ver- trauens- intervall	Faktor 18 h Kontrolle / 30 h Kontrolle	p-Wert	95%-Ver- trauensin- tervall
Histone H1x (<i>H1FX</i>)	2,965	0,020	1,803- 6,427	1,959	0,171	1,282- 4,055	0,649	0,948	0,453- 0,912
High mobility group protein B1 (<i>HMGB1</i>)	3,048	0,030	2,109- 4,446	1,117	0,503	1,019- 1,213	0,711	0,916	0,619- 0,824
Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2 (<i>HNRNPC</i>)	3,105	0,007	2,443- 3,597	2,884	0,030	2,249- 3,532	1,888	0,366	1,600- 2,070
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP3 (<i>FKBP3</i>)	3,162	0,038	1,754- 6,026	1,722	0,421	1,225- 2,559	0,920	0,787	0,614- 1,086
Septin-9 (<i>SEPT9</i>)	4,786	0,003	2,559- 7,311	4,130	0,015	2,168- 6,194	1,514	0,227	1,127- 2,070
Annexin A2 (<i>ANXA2</i>)	4,920	0,020	2,938- 8,790	0,887	0,503	0,540- 1,138	7,178	8,60* 10 ⁻⁵	3,837- 15,136
Annexin A6 (<i>ANXA6</i>)	7,447	0,018	4,246- 23,121	0,597	0,506	0,356- 0,863	9,120	0,009	5,012- 30,200
High mobility group protein B2 (<i>HMGB2</i>)	7,586	2,90* 10 ⁻⁴	4,055- 14,588	2,938	0,120	1,941- 4,742	0,824	0,535	0,752- 0,938

Name	Faktor	p-Wert	95%- Vertrauensinter- vall	Faktor	p-Wert	95%-Ver- trauens- intervall	Faktor	p-Wert	95%-Ver- trauensin- tervall
	30 h DEX / 30 h Kontrolle			30 h 2-DG / 30 h Kontrolle			18 h Kontrolle / 30 h Kontrolle		
Receptor-type tyrosine-protein phosphatase C (<i>PTPRC</i>)	7,798	0,048	3,133- 23,121	2,109	0,665	0,973- 3,767	4,093	0,122	1,770- 8,166
Moesin (<i>MSN</i>)	10,568	7,01* 10 ⁻¹¹	5,808- 16,904	3,873	1,60* 10 ⁻⁴	2,421- 5,495	1,159	0,746	1,057- 1,271

Tabelle 23: Signifikant regulierte Proteine: 30 h 2-DG

Name	Faktor	p-Wert	95%- Vertrauensinter- vall	Faktor	p-Wert	95%- Vertrauensinter- vall	Faktor	p-Wert	95%-Ver- trauensin- tervall
	30 h 2-DG / 30 h Kontrolle			30 h DEX / 30 h Kontrolle			18 h Kontrolle / 30 h Kontrolle		
Coiled-coil domain-containing protein 124 (<i>CCDC124</i>)	0,042	0,030	0,016- 0,402	0,673	0,874	0,421- 1,107	0,773	0,748	0,479- 1,213
Elongation factor 2 (<i>EEF2</i>)	0,093	1,28* 10 ⁻⁴	0,059- 0,242	0,698	0,031	0,560- 0,809	1,259	0,067	1,159- 1,355
Fructose-bisphosphate aldolase A (<i>ALDOA</i>)	0,110	3,25* 10 ⁻⁴	0,079- 0,244	1,202	0,628	1,107- 1,282	0,871	0,832	0,817- 0,929

Name	Faktor 30 h 2-DG / 30 h Kontrolle	p-Wert	95%- Vertrau- ensinter- vall	Faktor 30 h DEX / 30 h Kontrolle	p-Wert	95%- Vertrau- ensinter- vall	Faktor 18 h Kontrolle / 30 h Kontrolle	p-Wert	95%-Ver- trauensin- tervall
Glucose-6-phosphate isomerase (<i>GPI</i>)	0,113	0,044	0,010- 0,413	0,855	0,724	0,313- 2,249	0,929	0,951	0,211- 4,130
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A (<i>PPIA</i>)	0,137	0,013	0,090- 0,313	1,148	0,592	1,038- 1,271	1,028	0,950	0,955- 1,107
Translationally-controlled tumor protein (<i>TPT1</i>)	0,141	0,006	0,053- 0,328	0,172	0,023	0,062- 0,366	0,738	0,562	0,597- 0,904
Transferrin receptor protein 1 (<i>TFRC</i>)	0,184	6,46* 10 ⁻⁶	0,125- 0,360	1,614	0,183	1,393- 1,959	1,086	0,363	0,973- 1,236
DNA topoisomerase 2-alpha (<i>TOP2A</i>)	0,244	0,001	0,046- 0,515	1,419	0,324	1,057- 1,888	0,863	0,392	0,608- 1,138
Ras GTPase-activating protein-binding pro- tein 2 (<i>G3BP2</i>)	0,247	0,041	0,133- 0,479	0,149	0,186	0,051- 0,409	0,817	0,498	0,540- 1,236
40S ribosomal protein S3 (<i>RPS3</i>)	0,265	1,26* 10 ⁻⁴	0,217- 0,360	0,288	0,001	0,249- 0,387	0,724	0,260	0,667- 0,780
40S ribosomal protein SA (<i>RPSA</i>)	0,273	0,004	0,215- 0,497	0,211	0,001	0,149- 0,449	0,964	0,248	0,887- 1,047

Name	Faktor	p-Wert	95%- Vertrau- ensinter- vall	Faktor	p-Wert	95%- Vertrau- ensinter- vall	Faktor	p-Wert	95%-Ver- trauensin- tervall
	30 h 2-DG / 30 h Kontrolle			30 h DEX / 30 h Kontrolle			18 h Kontrolle / 30 h Kontrolle		
DnaJ homolog subfamily A member 2 (DNAJA2)	0,302	0,030	0,044- 0,655	0,437	0,060	0,196- 0,766	0,545	0,284	0,192- 1,500
ATP synthase subunit O, mitochondrial (ATP5O)	0,316	0,039	0,160- 0,649	0,685	0,311	0,457- 1,019	0,879	0,554	0,625- 1,236
C-1-tetrahydrofolate synthase, cytoplasmic (MTHFD1)	0,325	0,001	0,207- 0,550	0,445	0,242	0,319- 0,655	1,138	0,200	1,000- 1,306
40S ribosomal protein S9 (RPS9)	0,334	0,015	0,283- 0,619	0,417	0,014	0,328- 0,679	0,946	0,188	0,839- 1,067
40S ribosomal protein S2 (RPS2)	0,334	0,031	0,270- 0,474	0,240	0,034	0,185- 0,409	0,863	0,880	0,809- 0,929
40S ribosomal protein S4, X isoform (RPS4X)	0,347	0,022	0,302- 0,449	0,380	0,007	0,340- 0,470	1,047	0,925	0,991- 1,117
Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1 (GNB2L1)	0,350	0,020	0,263- 0,535	0,398	0,063	0,288- 0,592	0,991	0,830	0,904- 1,086
ATP-citrate synthase (ACLY)	0,366	0,030	0,175- 0,673	0,575	0,052	0,275- 0,863	0,575	0,184	0,325- 0,895
60S ribosomal protein L10 (RPL10)	0,373	0,010	0,299- 0,545	0,445	0,059	0,384- 0,586	0,929	0,618	0,879- 0,991

Name	Faktor 30 h 2-DG / 30 h Kontrolle	p-Wert	95%- Vertrau- ensinter- vall	Faktor 30 h DEX / 30 h Kontrolle	p-Wert	95%- Vertrau- ensinter- vall	Faktor 18 h Kontrolle / 30 h Kontrolle	p-Wert	95%-Ver- trauensin- tervall
T-complex protein 1 subunit delta (<i>CCT4</i>)	0,391	0,003	0,296- 0,586	0,483	0,037	0,337- 0,649	0,904	0,776	0,824- 0,991
Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-bin- ding protein (<i>SERBP1</i>)	0,391	0,033	0,310- 0,535	0,249	0,001	0,184- 0,421	0,991	0,748	0,904- 1,076
40S ribosomal protein S18 (<i>RPS18</i>)	0,409	0,022	0,261- 0,649	0,402	0,034	0,319- 0,661	1,000	0,266	0,904- 1,096
Eukaryotic initiation factor 4A-I (<i>EIF4A1</i>)	0,413	0,027	0,268- 0,619	0,160	0,001	0,085- 0,406	0,679	0,091	0,525- 0,809
Myb-binding protein 1A (<i>MYBBP1A</i>)	0,421	0,014	0,221- 0,685	0,281	0,023	0,101- 0,560	0,745	0,702	0,535- 0,982
Heat shock cognate 71 kDa protein (<i>HSPA8</i>)	0,425	0,018	0,360- 0,545	0,614	0,347	0,555- 0,724	0,296	0,002	0,233- 0,409
Ras GTPase-activating protein-binding pro- tein 1 (<i>G3BP1</i>)	0,425	0,048	0,233- 0,655	0,213	0,004	0,092- 0,497	0,643	0,354	0,488- 0,879
60S ribosomal protein L5 (<i>RPL5</i>)	0,429	0,010	0,325- 0,673	0,337	0,012	0,244- 0,608	1,038	0,977	0,964- 1,107
60S ribosomal protein L7a (<i>RPL7A</i>)	0,449	0,024	0,409- 0,575	0,215	0,001	0,189- 0,344	0,982	0,733	0,920- 1,047

Name	Faktor	p-Wert	95%- Vertrau- ensinter- vall	Faktor	p-Wert	95%- Vertrau- ensinter- vall	Faktor	p-Wert	95%-Ver- trauensin- tervall
	30 h 2-DG / 30 h Kontrolle			30 h DEX / 30 h Kontrolle			18 h Kontrolle / 30 h Kontrolle		
40S ribosomal protein S3a (<i>RPS3A</i>)	0,461	0,010	0,406- 0,592	0,340	0,003	0,270- 0,506	1,057	0,225	1,000- 1,107
Elongation factor 1-gamma (<i>EEF1G</i>)	0,492	0,041	0,377- 0,692	0,391	0,046	0,258- 0,625	0,920	0,987	0,847- 1,000
40S ribosomal protein S11 (<i>RPS11</i>)	0,560	0,023	0,474- 0,780	0,550	0,073	0,437- 0,752	1,009	0,971	0,920- 1,107
ELAV-like protein 1 (<i>ELAVL1</i>)	0,570	0,050	0,483- 0,745	0,637	0,141	0,535- 0,773	0,724	0,272	0,643- 0,817
Phosphoglycerate kinase 1 (<i>PGK1</i>)	0,614	0,029	0,501- 0,817	1,067	0,605	0,946- 1,191	0,661	0,009	0,497- 0,871
60S ribosomal protein L37 (<i>RPL37</i>)	0,631	0,022	0,511- 0,824	0,614	0,099	0,483- 0,863	0,794	0,131	0,679- 0,946
Nucleolar RNA helicase 2 (<i>DDX21</i>)	0,631	0,043	0,515- 0,745	0,105	1,21* 10 ⁻⁵	0,080- 0,219	0,973	0,927	0,879- 1,086
DNA topoisomerase 1 (<i>TOP1</i>)	1,585	0,031	1,191- 1,941	1,117	0,648	1,000- 1,271	0,752	0,670	0,673- 0,920
Ezrin (<i>EZR</i>)	1,614	0,003	1,380- 1,837	1,977	0,003	1,556- 2,535	0,718	0,674	0,625- 0,855

Name	Faktor 30 h 2-DG / 30 h Kontrolle	p-Wert	95%- Vertrau- ensinter- vall	Faktor 30 h DEX / 30 h Kontrolle	p-Wert	95%- Vertrau- ensinter- vall	Faktor 18 h Kontrolle / 30 h Kontrolle	p-Wert	95%-Ver- trauensin- tervall
SAP domain-containing ribonucleoprotein (<i>SARNP</i>)	1,820	0,033	1,169- 2,884	1,786	0,189	1,138- 3,192	1,690	0,489	1,076- 2,606
Talin-1 (<i>TLN1</i>)	1,905	0,023	1,306- 3,467	1,459	0,156	1,117- 2,168	1,169	0,912	0,929- 1,500
ADP-ribosyl cyclase 1 (<i>CD38</i>)	1,959	0,029	1,368- 2,754	1,000	0,060	0,759- 1,294	1,380	0,323	1,067- 1,754
Spectrin alpha chain, non-erythrocytic 1 (<i>SPTAN1</i>)	2,168	0,008	1,528- 2,884	0,673	0,728	0,560- 0,879	1,067	0,466	0,879- 1,271
Protein ERGIC-53 (<i>LMAN1</i>)	2,270	0,036	1,472- 3,802	1,000	0,302	0,802- 1,271	1,000	0,314	0,787- 1,271
Dynamin-2 (<i>DNM2</i>)	2,333	0,039	1,107- 17,219	1,127	0,856	0,511- 2,679	1,888	0,081	0,912- 13,677
Protein disulfide-isomerase (<i>P4HB</i>)	2,443	0,004	0,586- 14,859	0,855	0,006	0,177- 3,908	1,486	0,306	0,718- 8,872
Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1 (<i>SND1</i>)	2,754	1,37* 10 ⁻⁴	1,556- 4,285	1,600	0,023	1,191- 2,249	1,585	0,046	1,127- 2,089
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L (<i>HNRNPL</i>)	2,831	3,48*	1,614- 3,733	2,559	0,085	1,542- 3,281	1,959	0,048	1,343- 2,312

Name	Faktor	p-Wert	95%- Vertrau- ensinter- vall	Faktor	p-Wert	95%- Vertrau- ensinter- vall	Faktor	p-Wert	95%-Ver- trauensin- tervall
	30 h 2-DG / 30 h Kontrolle			30 h DEX / 30 h Kontrolle			18 h Kontrolle / 30 h Kontrolle		
		10 ⁻⁴							
4F2 cell-surface antigen heavy chain (SLC3A2)	2,831	0,016	1,754- 4,786	0,643	0,238	0,535- 0,832	1,786	0,712	1,236- 2,333
Protein disulfide-isomerase A3 (PDI A3)	2,884	0,025	1,854- 6,138	1,528	0,596	1,159- 2,443	0,982	0,531	0,802- 1,202
Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2 (HNRNPC)	2,884	0,030	2,249- 3,532	3,105	0,007	2,443- 3,597	1,888	0,366	1,600- 2,070
Mesencephalic astrocyte-derived neu- rotrophic factor (MANF)	3,048	0,016	1,959- 5,248	0,409	0,644	0,302- 0,711	0,839	0,686	0,637- 1,067
Septin-6 (SEPT6)	3,281	0,031	1,923- 6,194	1,009	0,455	0,802- 1,282	1,294	0,490	1,009- 2,128
Moesin (MSN)	3,873	1,60* 10 ⁻⁴	2,421- 5,495	10,568	7,01* 10 ⁻¹¹	5,808- 16,904	1,159	0,746	1,057- 1,271
Calnexin (CANX)	3,873	0,002	1,923- 6,252	2,228	0,103	1,368- 2,805	1,330	0,268	1,086- 1,570
Endoplasmmin (HSP90B1)	3,908	0,013	1,754- 11,803	1,306	0,572	0,667- 2,729	0,479	0,476	0,240- 0,964

Name	Faktor 30 h 2-DG / 30 h Kontrolle	p-Wert	95%- Vertrau- ensinter- vall	Faktor 30 h DEX / 30 h Kontrolle	p-Wert	95%- Vertrau- ensinter- vall	Faktor 18 h Kontrolle / 30 h Kontrolle	p-Wert	95%-Ver- trauensin- tervall
78 kDa glucose-regulated protein (<i>HSPA5</i>)	4,130	0,006	2,911- 8,241	0,631	0,650	0,511- 0,780	0,453	0,166	0,302- 0,655
Septin-9 (<i>SEPT9</i>)	4,130	0,015	2,168- 6,194	4,786	0,003	2,559- 7,311	1,514	0,227	1,127- 2,070
Calreticulin (<i>CALR</i>)	4,831	2,28* 10 ⁻⁴	3,020- 7,798	1,038	0,335	0,912- 1,169	0,394	0,135	0,149- 0,625
Serine hydroxymethyltransferase, mito- chondrial (<i>SHMT2</i>)	4,831	2,53* 10 ⁻⁴	2,312- 10,471	1,419	0,243	1,057- 1,995	0,982	0,997	0,698- 1,271
Plastin-2 (<i>LCP1</i>)	4,966	0,027	1,675- 20,137	4,285	0,160	1,459- 13,305	1,086	0,518	0,466- 2,512

Literaturverzeichnis

1. Greten, H. *Innere Medizin*. Georg Thieme Verlag (Hrsg), (2005).
2. McDonough, A. K., Curtis, J. R. & Saag, K. G. The epidemiology of glucocorticoid-associated adverse events. *Curr Opin Rheumatol* **20**, 131–137 (2008).
3. Tivey, H. The natural history of untreated acute leukemia. *Annals of the New York Academy of Sciences* **60**, 322–358 (1954).
4. Redaelli, A., Laskin, B. L., Stephens, J. M., Botteman, M. F. & Pashos, C. L. A systematic literature review of the clinical and epidemiological burden of acute lymphoblastic leukaemia (ALL). *European journal of cancer care* **14**, 53–62 (2005).
5. Krebs in Deutschland für 2011/2012. 10. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin, (2015).
6. Eberhart, K. *et al.* Low doses of 2-deoxy-glucose sensitize acute lymphoblastic leukemia cells to glucocorticoid-induced apoptosis. *Leukemia* **23**, 2167–2170 (2009).
7. Haut, A., Altman, S. J., Wintrobe, M. M. & Cartwright, G. E. The influence of chemotherapy on survival in acute leukemia; comparison of cases treated during 1954 to 1957 with those treated during 1947 to 1954. *Blood* **14**, 828–847 (1959).
8. Pui, C. H., Mullighan, C. G., Evans, W. E. & Relling, M. V. Pediatric acute lymphoblastic leukemia: where are we going and how do we get there? *Blood* **120**, 1165–1174 (2012).
9. Ries, L. *et al.* *SEER Survival Monograph: Cancer Survival Among Adults: U.S. SEER Program, 1988-2001, Patient and Tumor Characteristics*. SEER Program (Hrsg), (2007).
10. Hunger, S. P. *et al.* Improved Survival for Children and Adolescents With Acute Lymphoblastic Leukemia Between 1990 and 2005: A Report From the Children's Oncology Group. *Journal of Clinical Oncology* **30**, 1663–1669 (2012).
11. Schrappe, M. *Akute lymphoblastische (ALL) und akute myeloische (AML) Leukämie im Kindesalter*. AWMF (Hrsg), (2008).
12. Dördelmann, M. *et al.* Prednisone response is the strongest predictor of treatment outcome in infant acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **94**, 1209–1217 (1999).
13. Mortuza, F. Y. *et al.* Minimal residual disease tests provide an independent predictor of clinical outcome in adult acute lymphoblastic leukemia. *J. Clin. Oncol.* **20**, 1094–1104 (2002).
14. Brisco, M. J. *et al.* Outcome prediction in childhood acute lymphoblastic leukaemia by molecular quantification of residual disease at the end of induction. *Lancet* **343**, 196–200 (1994).
15. Bruggemann, M., Raff, T. & Kneba, M. Has MRD monitoring superseded other prognostic factors in adult ALL? *Blood* **120**, 4470–4481 (2012).
16. Bassan, R. & Hoelzer, D. Modern Therapy of Acute Lymphoblastic Leukemia. *Journal of Clinical Oncology* **29**, 532–543 (2011).
17. Mateos, M. K. *et al.* Transplant-related mortality following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for pediatric acute lymphoblastic leukemia: 25-year retrospective review. *Pediatr Blood Cancer* **60**, 1520–1527 (2013).

18. Löffler, G., Petrides, P. E. & Heinrich, P. C. Biochemie und Pathobiochemie. (2007).
19. Erickson, K., Drevets, W. & Schulkin, J. Glucocorticoid regulation of diverse cognitive functions in normal and pathological emotional states. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* **27**, 233–246 (2003).
20. van Raalte, D. H., Ouwens, D. M. & Diamant, M. Novel insights into glucocorticoid-mediated diabetogenic effects: towards expansion of therapeutic options? *European Journal of Clinical Investigation* **39**, 81–93 (2009).
21. Baschant, U. & Tuckermann, J. The role of the glucocorticoid receptor in inflammation and immunity. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **120**, 69–75 (2010).
22. MD, D. H. I. & MD, P. C.-H. P. Glucocorticoid use in acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet Oncology* **11**, 1096–1106 (2010).
23. Oakley, R. H. & Cidlowski, J. A. Cellular Processing of the Glucocorticoid Receptor Gene and Protein: New Mechanisms for Generating Tissue-specific Actions of Glucocorticoids. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 3177–3184 (2011).
24. Giguère, V., Hollenberg, S. M., Rosenfeld, M. G. & Evans, R. M. Functional domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell* **46**, 645–652 (1986).
25. Ratman, D. *et al.* How glucocorticoid receptors modulate the activity of other transcription factors: a scope beyond tethering. *Molecular and Cellular Endocrinology* **380**, 41–54 (2013).
26. Grad, I. & Picard, D. The glucocorticoid responses are shaped by molecular chaperones. *Molecular and Cellular Endocrinology* **275**, 2–12 (2007).
27. Pratt, W., Galigniana, M., Morishima, Y. & Murphy, P. Role of molecular chaperones in steroid receptor action. *Essays Biochem* **40**, 41–58 (2004).
28. La Baer, J. & Yamamoto, K. R. Analysis of the DNA-binding affinity, sequence specificity and context dependence of the glucocorticoid receptor zinc finger region. *J. Mol. Biol.* **239**, 664–688 (1994).
29. Hudson, W. H., Youn, C. & Ortlund, E. A. The structural basis of direct glucocorticoid-mediated transrepression. *Nat Struct Mol Biol* **20**, 53–58 (2012).
30. Rogatsky, I. *et al.* Target-specific utilization of transcriptional regulatory surfaces by the glucocorticoid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 13845–13850 (2003).
31. Wu, J. & Bresnick, E. H. Glucocorticoid and Growth Factor Synergism Requirement for Notch4 Chromatin Domain Activation. *Molecular and Cellular Biology* **27**, 2411–2422 (2007).
32. Malkoski, S. P. & Dorin, R. I. Composite glucocorticoid regulation at a functionally defined negative glucocorticoid response element of the human corticotropin-releasing hormone gene. *Mol. Endocrinol.* **13**, 1629–1644 (1999).
33. Doppler, W. *et al.* Expression Level-Dependent Contribution of Glucocorticoid Receptor Domains for Functional Interaction with STAT5. *Molecular and Cellular Biology* **21**, 3266–3279 (2001).
34. Bachmann, P. S. *et al.* Divergent Mechanisms of Glucocorticoid Resistance in Experimental Models of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Res.* **67**, 4482–4490 (2007).
35. Borski, R. J. Nongenomic membrane actions of glucocorticoids in vertebrates. *Trends Endocrinol. Metab.* **11**, 427–436 (2000).
36. Jiang, C.-L., Liu, L. & Tasker, J. G. Why do we need nongenomic glucocorticoid mechanisms? *Front Neuroendocrinol* **35**, 72–75 (2014).

37. Maier, C. G-protein-coupled glucocorticoid receptors on the pituitary cell membrane. *Journal of Cell Science* **118**, 3353–3361 (2005).
38. Bartholome, B. *et al.* Membrane glucocorticoid receptors (mGCR) are expressed in normal human peripheral blood mononuclear cells and up-regulated after in vitro stimulation and in patients with rheumatoid arthritis. *FASEB J.* **18**, 70–80 (2004).
39. Tasker, J. G., Di, S. & Malcher-Lopes, R. Rapid Glucocorticoid Signaling via Membrane-Associated Receptors. *Endocrinology* **147**, 5549–5556 (2006).
40. Elmore, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Path.* **35**, 495–516 (2007).
41. Saelens, X. *et al.* Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* **23**, 2861–2874 (2004).
42. Juin, P., Geneste, O., Gautier, F., Depil, S. & Campone, M. Decoding and unlocking the BCL-2 dependency of cancer cells. *Nature Reviews Cancer* **13**, 455–465 (2013).
43. Martinou, J.-C. & Youle, R. J. Mitochondria in Apoptosis: Bcl-2 Family Members and Mitochondrial Dynamics. *Developmental Cell* **21**, 92–101 (2011).
44. Holleman, A. *et al.* Gene-expression patterns in drug-resistant acute lymphoblastic leukemia cells and response to treatment. *N. Engl. J. Med.* **351**, 533–542 (2004).
45. Foley, G. E. *et al.* Continuous culture of human lymphoblasts from peripheral blood of a child with acute leukemia. *Cancer* **18**, 522–529 (1965).
46. Geley, S. *et al.* The interleukin 1 β -converting enzyme inhibitor CrmA prevents Apo1/Fas- but not glucocorticoid-induced poly(ADP-ribose) polymerase cleavage and apoptosis in lymphoblastic leukemia cells. *FEBS Letters* **402**, 36–40 (1997).
47. Hartmann, B. L. *et al.* Bcl-2 interferes with the execution phase, but not upstream events, in glucocorticoid-induced leukemia apoptosis. *Oncogene* **18**, 713–719 (1999).
48. Ploner, C. *et al.* Glucocorticoid-induced apoptosis and glucocorticoid resistance in acute lymphoblastic leukemia. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **93**, 153–160 (2005).
49. Heidari, N., Miller, A. V., Hicks, M. A., Marking, C. B. & Harada, H. Glucocorticoid-mediated BIM induction and apoptosis are regulated by Runx2 and c-Jun in leukemia cells. *Cell Death and Disease* **3**, e349–e349 (2012).
50. Jing, D. *et al.* Opposing regulation of BIM and BCL2 controls glucocorticoid-induced apoptosis of pediatric acute lymphoblastic leukemia cells. *Blood* **125**, 273–283 (2015).
51. Kaspers, G. J., Pieters, R., Klumper, E., De Waal, F. C. & Veerman, A. J. Glucocorticoid resistance in childhood leukemia. *Leuk Lymphoma* **13**, 187–201 (1994).
52. Schlossmacher, G., Stevens, A. & White, A. Glucocorticoid receptor-mediated apoptosis: mechanisms of resistance in cancer cells. *Journal of Endocrinology* **211**, 17–25 (2011).
53. Irving, J. A. E. Loss of Heterozygosity and Somatic Mutations of the Glucocorticoid Receptor Gene Are Rarely Found at Relapse in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia but May Occur in a Subpopulation Early in the Disease Course. *Cancer Res.* **65**, 9712–9718 (2005).
54. Tissing, W. J. E. Genetic Variations in the Glucocorticoid Receptor Gene Are Not Related to Glucocorticoid Resistance in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Clinical Cancer Research* **11**, 6050–6056 (2005).

55. Haarman, E. G., Kaspers, G. J. L., Pieters, R., Rottier, M. M. A. & Veerman, A. J. P. Glucocorticoid receptor alpha, beta and gamma expression vs in vitro glucocorticoid resistance in childhood leukemia. *Leukemia* **18**, 530–537 (2004).
56. Beesley, A. H. *et al.* Glucocorticoid resistance in T-lineage acute lymphoblastic leukaemia is associated with a proliferative metabolism. *Br. J. Cancer* **100**, 1926–1936 (2009).
57. Hulleman, E. *et al.* Inhibition of glycolysis modulates prednisolone resistance in acute lymphoblastic leukemia cells. *Blood* **113**, 2014–2021 (2009).
58. Samuels, A. L., Heng, J. Y., Beesley, A. H. & Kees, U. R. Bioenergetic modulation overcomes glucocorticoid resistance in T-lineage acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* **165**, 57–66 (2014).
59. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
60. Warburg, O. Über den stoffwechsel der carcinomzelle. *Naturwissenschaften* **12**, 1131–1137 (1924).
61. Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C. & Thompson, C. B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* **324**, 1029–1033 (2009).
62. Vander Heiden, M. G. Targeting cancer metabolism: a therapeutic window opens. *Nat Rev Drug Discov* **10**, 671–684 (2011).
63. Schmidt, S. *et al.* Glucocorticoid resistance in two key models of acute lymphoblastic leukemia occurs at the level of the glucocorticoid receptor. *The FASEB Journal* **20**, 2600–2602 (2006).
64. Tissing, W. J. E. *et al.* Genomewide identification of prednisolone-responsive genes in acute lymphoblastic leukemia cells. *Blood* **109**, 3929–3935 (2007).
65. Barban, S. & Schulze, H. O. The effects of 2-deoxyglucose on the growth and metabolism of cultured human cells. *Journal of Biological Chemistry* **236**, 1887–1890 (1961).
66. Aft, R. L., Zhang, F. W. & Gius, D. Evaluation of 2-deoxy-D-glucose as a chemotherapeutic agent: mechanism of cell death. *Br. J. Cancer* **87**, 805–812 (2002).
67. Kurtoglu, M., Maher, J. C. & Lampidis, T. J. Differential Toxic Mechanisms of 2-Deoxy-D-Glucose versus 2-Fluorodeoxy-D -Glucose in Hypoxic and Normoxic Tumor Cells. *Antioxidants & Redox Signaling* **9**, 1383–1390 (2007).
68. DeSalvo, J. *et al.* Inhibition of Akt Potentiates 2-DG-Induced Apoptosis via Downregulation of UPR in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Molecular Cancer Research* **10**, 969–978 (2012).
69. Coe, E. L. Inhibition of glycolysis in ascites tumor cells preincubated with 2 - deoxy- 2-fluoro- D -glucose. *Biochim. Biophys. Acta* **264**, 319–327 (1972).
70. Lee, A. S. GRP78 Induction in Cancer: Therapeutic and Prognostic Implications. *Cancer Res.* **67**, 3496–3499 (2007).
71. Eberhart, K. *et al.* Glucocorticoid-induced alterations in mitochondrial membrane properties and respiration in childhood acute lymphoblastic leukemia. *BBA - Bioenergetics* **1807**, 719–725 (2011).
72. Garcia-Ruiz, C. *et al.* Mitochondrial cholesterol in health and disease. *Histol. Histopathol.* **24**, 117–132 (2009).
73. Strasser-Wozak, E. M. *et al.* Splice site mutation in the glucocorticoid receptor gene causes resistance to glucocorticoid-induced apoptosis in a human acute leukemic cell line. *Cancer Res.* **55**, 348–353 (1995).
74. Imai, Y., Ito, A. & Sato, R. Evidence for biochemically different types of vesicles in the hepatic microsomal fraction. *J. Biochem.* **60**, 417–428 (1966).

75. Ross, P. L. Multiplexed Protein Quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* Using Amine-reactive Isobaric Tagging Reagents. *Molecular & Cellular Proteomics* **3**, 1154–1169 (2004).
76. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685 (1970).
77. Blum, H., Beier, H. & Gross, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *ELECTROPHORESIS* **8**, 93–99 (1987).
78. Benjamini, Y., Hochberg, Y. 1995. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *JSTOR*
79. Delmotte, N. *et al.* Repeatability of peptide identifications in shotgun proteome analysis employing off-line two-dimensional chromatographic separations and ion-trap MS. *J. Sep. Sci.* **32**, 1156–1164 (2009).
80. Lemasters, J. J. & Holmuhamedov, E. Voltage-dependent anion channel (VDAC) as mitochondrial governor—Thinking outside the box. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **1762**, 181–190 (2006).
81. Shoshan-Barmatz, V., Keinan, N. & Zaid, H. Uncovering the role of VDAC in the regulation of cell life and death. *J Bioenerg Biomembr* **40**, 183–191 (2008).
82. McCommis, K. S. & Baines, C. P. The role of VDAC in cell death: Friend or foe? *BBA - Biomembranes* **1818**, 1444–1450 (2012).
83. Jiang, N. *et al.* Identification of prognostic protein biomarkers in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Journal of Proteomics* **74**, 843–857 (2011).
84. Scholzen, T. & Gerdes, J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *Journal of cellular physiology* (2000).
85. Pastorino, J. G. & Hoek, J. B. Regulation of hexokinase binding to VDAC. *J Bioenerg Biomembr* **40**, 171–182 (2008).
86. Menard, L., Maughan, D. & Vigoreaux, J. The Structural and Functional Coordination of Glycolytic Enzymes in Muscle: Evidence of a Metabolon? *Biology* **3**, 623–644 (2014).
87. Graham, J. W. A. *et al.* Glycolytic Enzymes Associate Dynamically with Mitochondria in Response to Respiratory Demand and Support Substrate Channeling. *THE PLANT CELL ONLINE* **19**, 3723–3738 (2007).
88. Zha, J., Weiler, S., Oh, K. J., Wei, M. C. & Korsmeyer, S. J. Posttranslational N-myristoylation of BID as a molecular switch for targeting mitochondria and apoptosis. *Science* **290**, 1761–1765 (2000).
89. Perinpanayagam, M. A. *et al.* Regulation of co- and post-translational myristoylation of proteins during apoptosis: interplay of N-myristoyltransferases and caspases. *The FASEB Journal* **27**, 811–821 (2013).
90. Li, J. & Lee, A. S. Stress induction of GRP78/BiP and its role in cancer. *Curr. Mol. Med.* **6**, 45–54 (2006).

Danksagung

Für meine Eltern.

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ort, Datum

Unterschrift