

Molekulargenetische Analysen bei Myelodysplastischen
Syndromen (MDS)

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Astrid Eva Rong
aus Düsseldorf

April 2006

Aus dem Institut für Mikrobiologie / der Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinischen Immunologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. med. N. Gattermann
Coreferent: Prof. Dr. C. P. Hollenberg / Prof. Dr. J. Ernst
Tag der mündlichen Prüfung: 13. Dez. 2006

MEINER FAMILIE

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. MDS.....	1
1.2. Leukämien.....	4
1.3. Tumorgenese.....	7
1.4. Tumorsuppressorgene.....	8
1.5. Onkogene.....	9
1.6. <i>ras</i> -Gene.....	10
1.7. Aufgabenstellung.....	11
2. Material und Methoden	12
2.1. Bezugsquellen.....	12
2.2. Häufig verwendete Lösungen.....	14
2.3. Geräte.....	15
2.4. Software.....	15
2.5. Biologische Materialien.....	16
2.6. Selektion von Zell-Subpopulationen.....	19
2.6.1. Dichtegradientenzentrifugation.....	19
2.6.2. Magnetische Separation.....	20
2.7. Isolierung von Nukleinsäuren.....	21
2.7.1. Isolierung von RNA.....	21
2.7.2. DNA Isolierung aus Blut und Knochenmark.....	21
2.7.3. DNA Isolierung aus Material von gefärbten Objektträgern.....	21
2.8. Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	22
2.9. Amplifikation von Nukleinsäuren.....	23
2.9.1. Polymerase-Kettenreaktion.....	23
2.9.2. Reverse Transkription.....	26
2.10. Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren in Agarosegelen.....	28
2.11. Restriktionsverdauung von DNA.....	29
2.12. Fragmentlängen-Analyse im Rahmen der Klonalitätsanalyse (HUMARA).....	29
2.12.1. Gelkammern für A.L.F.-Gele.....	29
2.12.2. Herstellung eines A.L.F. Gels.....	30
2.13. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	31
2.14. Sequenzierung.....	31
2.14.1. Gelkammern für Sequenzierungsgele.....	31
2.14.2. Herstellung eines Sequenzierungsgeles.....	31
2.14.3. Sequenzierungsreaktion mit Thermo- Sequenase DNA Polymerase.....	32
2.14.4. Analytierte Sequenzen der <i>ras</i> -Gene.....	33
2.15. ATLAS-SMART™-Protokoll (Clontech).....	34
2.15.1. Erststrang cDNA-Synthese.....	34
2.15.2. cDNA Amplifikation mit Long Distance (LD)PCR.....	35
2.15.3. Spin Column Aufreinigung der PCR Produkte.....	36
2.15.4. Überprüfung der cDNA Synthese mit dem RNA/cDNA Inspector Kit (Sigma).....	36
2.15.5. SMART cDNA Proben Labelling.....	37
2.15.6. Proben Aufreinigung mit dem NucleoSpin Extraction Kit (Clontech).....	37
2.15.7. Array Hybridisierung mit ATLAS™ Human 1.2.Arrays (Clontech).....	38
2.15.8. Auswertung der Arrays.....	38
2.15.9. Qualitätskontrollen.....	39
2.16. LightCycler® Analysen/ „Real-Time“ PCR.....	40
2.16.1. Prinzip der DNA Detektion mit Hilfe des SYBR Green I Farbstoffs im LightCycler® System von Roche.....	40
2.16.2. „Real-Time“ PCR.....	41
2.16.3. Schmelzkurven Analyse.....	42
3. Ergebnisse	43
3.1. Klonalitätsanalysen.....	43
3.1.1. Knochenmark versus peripheres Blut.....	43
3.1.2. Überprüfung der Methodik und Bestimmung der Klonalität.....	44
3.1.3. Klonalitäten in der Gesamtanalyse.....	47
3.1.3.1. Subanalysen: RARS versus PSA.....	48
3.1.3.2. Subanalysen: RARS+RCMD versus PSA+PRA.....	48
3.1.3.3. Subanalysen: Knochenmarkblastenanteil kleiner oder gleich 10 %.....	49

3.1.3.4. Subanalysen: Knochenmarkblastenanteil 10 % bis 20 %.....	50
3.1.3.5. Subanalysen: Knochenmarkblastenanteil größer 20 % /High Score IPSS.....	50
3.1.3.6. Subanalysen: Patienten mit polyklonalen Inaktivierungsmustern.....	51
3.2. AISA-Analysen.....	53
3.2.1. Sequenzierungen.....	53
3.3. Array-Analysen.....	55
3.3.1. Überprüfung der cDNA Qualitäten.....	55
3.3.2. Ergebnisse der Genexpressionsanalysen.....	57
3.3.3. Anzahl der Transkriptionsunterschiede zwischen CD34+-Zellen von Patienten mit MDS und CD34+-Zellen gesunder Kontrollen.....	59
3.3.4. Unterschiede in der Genexpression zwischen CD34+-Zellen von MDS - Patienten und gesunden Kontrollen.....	65
3.3.5. Cluster Analysen.....	67
4. Diskussion	68
4.1. Klonalitätsanalysen.....	68
4.1.1. Methodik.....	68
4.1.2. Ergebnisse.....	70
4.1.2.1. Klonalitäts-Definition.....	70
4.1.2.2. Klonalitäten.....	71
4.1.2.3. Subanalysen.....	72
4.2. Differenzierung der AISA-Subgruppe mittels Sequenzierung.....	73
4.3. Array-Ergebnisse.....	75
5. Zusammenfassung	80
6. Literaturverzeichnis	82
7. Abkürzungsverzeichnis	95
8. Danksagung	97
9. Erklärung	98
10. Anhang	99

1. Einleitung

In den vergangenen 30 Jahren haben sich die Bedingungen zur Therapie schwerwiegender menschlicher Erkrankungen durch die neu gewonnenen Kenntnisse über deren Hintergründe massiv verändert. Die Erkenntnisse auf molekulargenetischer Ebene sind in diesem Zusammenhang von besonderer Bedeutung.

Viele Erkrankungen werden durch das Zusammentreffen von genetischen und nicht genetischen (z. B. Mutagenen in der Umwelt) Faktoren beeinflusst. Hierbei hängt die Schwere einer Erkrankung vom Zusammenspiel genetischer Polymorphismen, genetischer Veränderungen, sowie verschiedener Umweltfaktoren ab. Während Erkrankungen, die lediglich durch die genetische Veränderung eines einzelnen Gens (monogen) verursacht werden (z. B. die Sichelzellenanämie), relativ selten auftreten, machen Tumorerkrankungen aufgrund multifaktorieller Beeinflussungen den Hauptbestandteil an Krebserkrankungen aus. Familiäre Tumorerkrankungen werden mit unterschiedlichen Häufigkeiten (durchschnittlich 1-2 % aller malignen Erkrankungen) beobachtet (Wolf G., 2000). Die folgende Arbeit wird sich mit einer dieser schwerwiegenden Erkrankungen, die durch genetische Veränderungen gekennzeichnet sind beschäftigen, den Myelodysplastischen Syndromen (MDS).

1.1. Myelodysplastische Syndrome (MDS)

Myelodysplastische Syndrome (MDS) sind eine heterogene Gruppe klonaler, erworbener Knochenmark-Stammzellerkrankungen, die durch eine abnorme, ineffektive Hämatopoese mit unterschiedlich ausgeprägten Zytopenien und vermehrten Übergang in akute Leukämien charakterisiert sind (Vardiman, 2004). Die Häufigkeit der MDS-Erkrankungen ist vergleichbar mit akuten myeloischen Leukämien. Von 18.416 Patienten die zwischen 1975 und 1990 in Düsseldorf registriert wurden, zeigten 584 Patienten ein MDS (3.2%) und 506 Patienten eine akute myeloische Leukämie (AML) (2.8%) (Aul, 1992). Myelodysplastische Syndrome treten gehäuft bei älteren Patienten auf. Das mediane Alter bei Erstdiagnose beträgt etwa 70 Jahren (Abb. 1-1), wobei es einen leichten Überhang zugunsten männlicher Patienten (ca. 56 %) gibt (Greenberg et al., 2002, Aul et al. 1992, Sanz & Sanz, 1992).

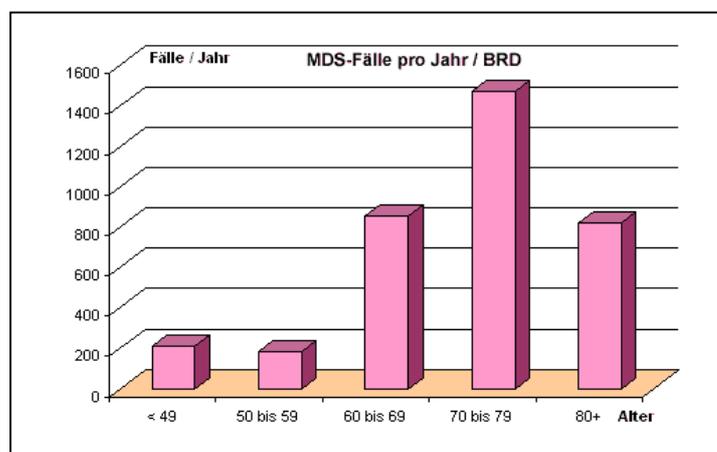


Abb. 1-1 Altersverteilung der MDS-Fälle in Deutschland
(Kompetenznetzwerk Leukämien, Informationen für Ärzte, Epidemiologie;
<http://www.kompetenznetz-leukaemie.de/>)

Bei myelodysplastischen Syndromen wird, ebenso wie bei soliden Tumoren, über ein Modell der Mehrschrittkarzinogenese nachgedacht. Dieses Modell wird von verschiedenen Punkten gestützt:

1. das Entstehen von AML und MDS in Familien mit vererbten Defekten der DNA-Reparatur vom Neurofibromatose Typ I; hierbei besteht ein Defekt des NF-1 Gens dessen Produkt normalerweise für die negative Regulation der ras-Gene verantwortlich ist (Basu et al. , 1992)
2. genetische „Mapping“ Studien in den wenigen Familien mit familiären MDS und AML, bei denen z.B. erst die Verbindung eines vererbten Gendefektes mit dem somatischen Verlust des q-Arms von Chromosom 5 (5q-) zum Ausbruch der Leukämie führte (Olopade et al., 1996); und
3. Studien über den Zusammenhang zwischen verschiedenen genetischen Polymorphismen des NAD(P)H: Quinon-Oxido-Reduktase (NQ01) Gens mit AML und MDS (Willman, 2000).

Als Ausgangspunkt der neoplastischen Transformationen wird eine unreife, myeloische, hämatopoetische Stammzelle angenommen. Zu den auftretenden Schäden gehören unter anderem RAS – Mutationen (Constantinidou et al., 1997; Hirai, 1987; Horijke, 1994), sowie andere genetische Aberrationen (Misawa, Horijke, Kaneko & Kashima, 1997) wie z.B. die Inaktivierung von p53 (Kanavaros et al., 1999). Chromosomale Verluste wie die Deletionen der Chromosomen 5, 7 und 20 gehören nach dem komplex veränderten Karyotyp zu den häufigsten karyotypischen Veränderungen in myelodysplastischen Syndromen. Eine weitere typische Schädigung der Zellen, die im Vergleich allerdings seltener in Erscheinung tritt, sind Deletionen der Chromosomen 11, 12, and 13 (Boulwood & Fidler, 1995). Diese eher heterogene Gruppe von Erkrankungen erfordert klare strukturelle Abgrenzungen als Basis für Analyse und Therapie. Innerhalb der letzten 23 Jahre haben sich verschiedene Klassifizierungssysteme etabliert. Die wichtigsten und international anerkannten Systeme sind die FAB = French - American -British - Klassifikation, deren Modifizierung durch die WHO, sowie das IPSS = International - Prognostic - Scoring - System.

Die FAB-Klassifikation (Tab.1-1) wurde 1982 von einer Gruppe kooperierender Wissenschaftler entwickelt. Sie basiert auf der Charakterisierung der Erkrankungen anhand morphologischer Unterschiede (Bennett et al., 1982). Diese Klassifikation teilt MDS in fünf Subgruppen ein: RA = refraktäre Anämie, RARS = refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten, RAEB = refraktäre Anämie mit Blastenexzess, RAEB-T = refraktäre Anämie mit Blastenexzess in Transformation und die CMML = chronisch myelomonozytäre Leukämie.

Klassifizierung	Morphologische Merkmale
RA = refraktäre Anämie	Zytopenie einer Zellreihe, normo- oder hyperzelluläres Knochenmark mit Dysplasien, < 1 % periphere Blasten und < 5 % Blasten im Knochenmark
RARS = refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten	Zytopenie, Dysplasien und identischer Blastenteil in Peripherie und Knochenmark wie bei der RA, >15 % Ringsideroblasten
RAEB = refraktäre Anämie mit Blastenexzess	Zytopenie von 2 oder mehr Zellreihen, Dysplasien aller 3 Zellreihen, < 5% periphere Blasten und 5 – 19 % Blasten im Knochenmark
RAEB-T = refraktäre Anämie mit Blastenexzess in Transformation	Hämatologie wie bei RAEB, > 5 % periphere Blasten und 20 –29 % Blasten im Knochenmark, Auerstäbchen
CMML = chronisch myelomonozytäre Leukämie	Monozytose in der Peripherie, >1000 Monozyten/µl im Blut, <5 % periphere Blasten und bis zu 20 % Blasten im Knochenmark

Tab. 1-1 FAB-Klassifikation

Da die einzelnen Erkrankungsgruppen selbst nach dieser Unterteilung noch immer ein heterogenes Bild innerhalb der einzelnen Subgruppen lieferten, veröffentlichte die WHO 2001 ein weiterentwickeltes Klassifizierungsschema für MDS (Jaffe, Harris, Stein & Vardiman (eds), 2001), bei der weiterhin morphologische Unterschiede zur Differenzierung genutzt werden.

Zur FAB-Klassifizierung ergeben sich vier wesentliche Unterschiede (Tab.1-2): Zum einen wurde der Schwellenwert der Blastenmenge im Knochenmark oder peripheren Blut, zur Definition einer AML (= akute myeloische Leukämie), von 30 % Blasten auf 20 % verringert, zum anderen wurde die FAB Kategorie RAEB-T gestrichen.

Parallel dazu wurde die CMML aus der Gruppe der myelodysplastischen Syndrome entfernt und stattdessen in die neue Gruppe der myelodysplastisch /myeloproliferativen Erkrankungen eingeordnet. Weiterhin erfolgte eine Aufteilung der Einordnungen RA und RARS in fünf Untergruppen in Abhängigkeit davon, ob es sich um Dysplasien einer oder mehrerer Linien handelt. Zusätzlich wurde die Klassifizierung RAEB in zwei Unterkategorien eingeteilt, abhängig von der Zahl der Blasten.

FAB	WHO
RA = refraktäre Anämie	RA = refraktäre Anämie
RARS = refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten	RARS = refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten RCMD = refraktäre Zytopenie mit multilinearen Dysplasien RCMD-RS = refraktäre Zytopenie mit multilinearen Dysplasien und Ringsideroblasten 5 q- Syndrome = MDS mit isolierter 5q Deletion
RAEB = refraktäre Anämie mit Blastenexzess	RAEB-1 = Zytopenien von 2 oder mehr Zellreihen, Dysplasien einer oder mehrerer Zellreihen, < 5% periphere Blasten und 5 –9 % Blasten im Knochenmark, keine Auerstäbchen RAEB-2 = Zytopenien von 2 oder mehr peripheren Linien, Dysplasien einer oder mehrerer Zellreihen, 5% - 19 % periphere Blasten und 10 – 19 % Blasten im Knochenmark, +/- Auerstäbchen
-	MDS – nicht klassifizierbar
RAEB-T = refraktäre Anämie mit Blastenexzess in Transformation	-
CMML = chronisch myelomonozytäre Leukämie	-

Tab. 1-2 Gegenüberstellung von FAB – und WHO-Klassifikation

Das IPSS ist ein Klassifizierungssystem, welches verschiedene prognostische Unterpunkte im Rahmen der Krankheitsentwicklung von MDS berücksichtigt und daraus eine Aussage bezüglich der Überlebenschancen bzw. der Entwicklung einer sekundären AML trifft (Tab.1-3).

Entwickelt wurde das IPSS durch die Analyse der Daten von mehr als 800 an de novo MDS erkrankter Patienten, die lediglich unterstützend behandelt wurden (List, 2004). Dabei wurden unterschiedliche prognostische Faktoren beobachtet und bewertet.

Überleben und AML Entwicklung - Score Werte					
Prognostische Variablen	0	0.5	1.0	1.5	2.0
Knochenmarksblasten (%)	< 5	5-10	—	11-20	21-30
Karyotyp	Gut	Intermediär	Schlecht	—	—
Zytopenien	0-1	2-3	—	—	—

Tab. 1-3 International Prognostic Scoring System (IPSS) für myelodysplastische Syndrome (MDS).
(Greenberg P, Cox C, Le Beau MM, et al. 1997)

Erläuterungen:

Karyotyp: Gut = normal, -Y, del(5q), del(20q)
Schlecht = komplex (≥ 3 Abnormitäten) oder Chromosom 7 Anomalien;
Intermediär = andere Abnormitäten.

Zytopenien: Neutrophile < 1800/ μ L, Hämoglobin < 10 g/dL, Thrombozyten < 100,000/ μ L.

Unter Berücksichtigung der oben genannten prognostischen Faktoren lassen sich die MDS - Patienten mit Hilfe des IPSS in vier Kategorien (Tab. 1-4), hinsichtlich ihrer mittleren Überlebensrate und der Wahrscheinlichkeit eine sekundäre AML zu entwickeln, einteilen (Greenberg et al. 1997).

Zeit bis zur Entwicklung einer AML bei Patienten mit einer mittleren Überlebensrate				
Numerischer Score	0	0.5-1.0	1.5-2.0	≥ 2.5
Klassifizierung	Low	Intermediate-1	Intermediate-2	High
Patienten (%)	31	39	22	8
Intervall bis zur AML (Jahre)	9.4	3.3	1.1	0.2
Mittleres Überleben (Jahre)	5.7	3.5	1.2	0.4

Tab. 1-4 Klassifikation der Patienten gemäß der prognostischen Score-Werte

1.2. Leukämien

Der Begriff "Leukämie" geht auf Rudolf Virchow zurück, dem die helle Blutfarbe ("Weißblütigkeit") der Patienten auffiel (Hochhaus et al., 2003).

Leukämien haben ihren Ursprung im Knochenmark und werden nach akuten und chronischen Verlaufsformen, sowie dem Befall unterschiedlicher Zellarten klassifiziert. Die Hauptentitäten – akute lymphatische Leukämie (ALL), akute myeloische Leukämie (AML), chronisch myeloische Leukämie (CML) und chronisch lymphatische Leukämie (CLL) – weisen wesentliche Unterschiede im Hinblick auf Epidemiologie, Erkrankungsbiologie und Prognose auf. Aufgrund aktueller molekularbiologischer

Erkenntnisse erfolgt nun eine Klassifizierung chronisch lymphatischer Leukämien als niedrig maligne, leukämisch verlaufende Lymphome mit dem Ergebnis einer Unschärfe in der Abgrenzung der Leukämien zu den Non-Hodgkin-Lymphomen (Krebs in Deutschland, 2004). Nach Einführung standardisierter Färbeverfahren bei der mikroskopischen Blutbilduntersuchung konnten bereits um die Jahrhundertwende akute myeloische (AML) und akute lymphatische (ALL) Leukämien voneinander abgegrenzt werden. Die akute myeloische Leukämie hat ihren Ursprung in einer Knochenmark Stamm- oder Vorläuferzelle, welche im gesunden Zustand sonst für die Entstehung der so genannten granulozytären und monozytären Abwehrzellen verantwortlich ist. Bei akuten lymphatischen Leukämien stammen die unreifen Vorläufer von einer lymphatischen Vorläuferzelle ab, die sich bei gesunder Entwicklung zu einer stärker spezialisierten Abwehrzelle (dem Lymphozyten) entwickelt hätte. Leukämien werden durch erworbene somatische Mutationen charakterisiert (Caligiuri, Strout & Gilliland, 1997).

In der folgenden Abbildung 1-1 sind einige grundsätzlichen Mechanismen der Leukämogenese zusammenfassend dargestellt.

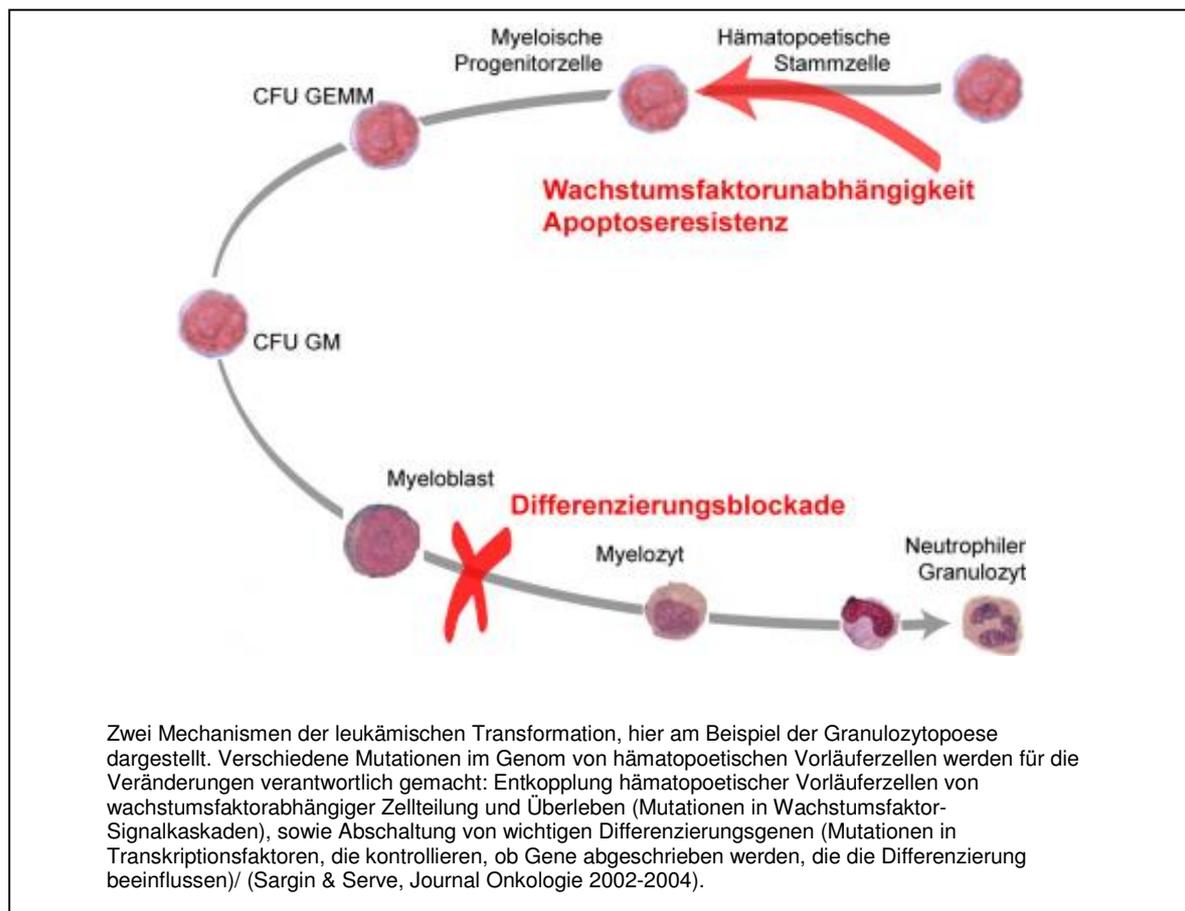


Abb.1-1 Grundsätzlichen Mechanismen der leukämischen Pathogenese

Die Mutationen können in Form von Deletionen, Translokationen oder Insertionen erfolgen und führen bei den Zellen über schrittweise Veränderungen, welche z.B. verstärkte Proliferation auslösen, zur Leukämogenese. (Gilliland, 1998)

In den achtziger Jahren wurde die erste Leukämie-assoziierte chromosomale Translokation, das Philadelphia-Chromosom, kloniert und auf molekularer Ebene vollständig charakterisiert. Das

Philadelphia-Chromosom, eine Translokation der Chromosomen 9 und 22 [t(9; 22)(q34; q22)] führt zu einem Tyrosinkinase – Fusionsprotein, dem Bcr/Abl-Transkript, welches als chimäres Onkogen fungiert. Dabei induziert der Bcr-Fusionspartner die Tyrosinkinase Aktivität von Abl, welches zu einer mitogenen Signalübertragung in den hämatopoetischen Zellen führt (Okuda et al. 1996).

Jährlich erkranken insgesamt etwas mehr als 10.800 Menschen in Deutschland (ca. 5.650 Männer und 5.150 Frauen) an Leukämien (Krebs in Deutschland, 2004). Das mittlere Erkrankungsalter liegt aufgrund der Altersverteilung mit zwei Gipfeln bei 60 Jahren für Männer und 65 Jahren für Frauen. Während chronische Leukämieformen fast nur im Erwachsenenalter vorkommen, tritt die ALL am häufigsten im Kindesalter auf. Die AML kommt in jedem Lebensalter vor, erreicht ihren Häufigkeitsgipfel aber erst im fortgeschrittenen Alter (Abb.1-2).

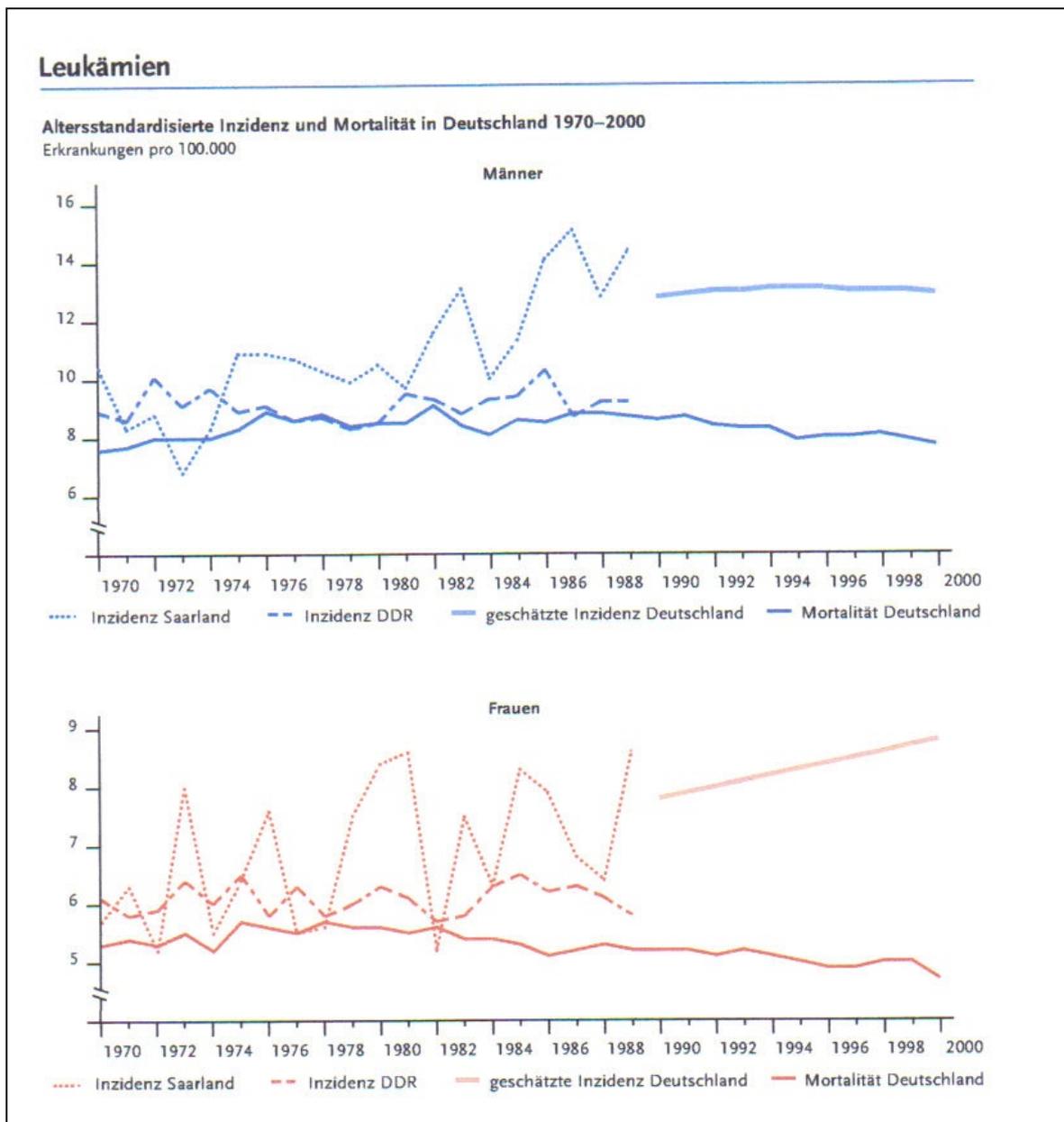


Abb.1-2 Leukämien in Deutschland/ Inzidenz und Mortalität (Krebs in Deutschland, 2004)

Die relative 5-Jahres-Überlebensrate beträgt mittlerweile (Stand 2004) für Männer 46 %, für Frauen 45 %, nachdem sie 5 bis 7 Jahre zuvor noch bei lediglich 42 % lag. Im Mittel sind die Überlebensaussichten von Kindern weit besser als von Erwachsenen. Die ungünstigsten Überlebensaussichten mit AML bestehen, statistisch gesehen, ab einem Alter über 65 Jahren (Krebs in Deutschland, 2004).

1.3. Tumorgenese

Die ersten Überlegungen, dass die Entstehung eines Tumors ein zumindest zweistufiger Prozess sein müsse, wurden bereits vor über 30 Jahren angestellt (Knudson, 1971).

Gegen Ende der achtziger Jahre erkannte man erstmals, dass Gendefekte Auslöser und Promotoren in der Entwicklung des Kolorektalkarzinoms sein können. Das erarbeitete genetische Modell der Tumorgenese zeigt die Entwicklung von der normalen Epithelzelle über mehrere Mutationsschritte bis zur Metastase (Fearon & Vogelstein, 1990). Später folgende Untersuchungen zeigten weitere Einzelschritte der Tumorgenese auf, u.a. die Inaktivierung des Tumorsuppressorgens p53 kombiniert mit einer Aktivierung von Onkogenen, gefolgt von weiteren Mutationen (Cho & Vogelstein, 1992).

Ausgangspunkt des Modells ist eine normale (= gesunde) Epithelzelle. Im Verlauf der Tumorgenese wird die weitere Entwicklung dieser Zelle durch verschiedene Faktoren beeinflusst. Zunächst fallen hier die verschiedenen Wachstumsfaktoren auf. In der Tumorgenese ist anscheinend der normale Weg der Signalübertragung für diese Wachstumsfaktoren so verändert, dass es zu malignem Wachstum kommen kann. Parakrine Aktionen der Wachstumsfaktoren und Zytokine können ebenfalls einen Einfluss auf die schrittweise genetischen Ereignisse haben, die schließlich zur Malignität führen. Eine besondere Rolle spielen hierbei diejenigen der Wachstumsfaktoren, die eine große Sequenz-Homologie mit Proto-Onkogenen aufweisen. Sequenzierungen ergaben z.B. eine hohe Ähnlichkeit zwischen der B-Kette des PDGF (platelet derived growth factor) und dem v-cis-Onkogen Produkt (Aaronson, 1991). In Übereinstimmung mit diesen Theorien zeigen einige Krebsarten, insbesondere Leukämien und Lymphome eine monoklonale Entwicklung in Folge dieser Mehrschrittkarzinogenese (Fearon & Vogelstein, 1985). Auch bei den Myelodysplastischen Syndromen wird die Mehrschrittkarzinogenese und klonale Evolution diskutiert (Germing, 2002).

Eine weitere Ursache für genetische Veränderungen können allerdings auch äußere Eingriffe, z.B. virales Eindringen sein. Dabei spielen das Papillomavirus (Zervixkarzinome) und das Hepatitis B Virus (Leberkrebs) eine besondere Rolle, ebenso das Epstein-Barr-Virus als Auslöser des Burkitt-Lymphoms (Weinberg, 1992).

Weitere Schritte in der Tumorgenese lassen sich mit einer gesteigerten Proliferation des Gewebes, verbunden mit einer schlechteren Differenzierung (=> Grading), einer Abnahme der genetischen Stabilität (LOH = Loss of Heterozygosity), sowie einer Steigerung des Metastasierungspotentials korrelieren. Die Schrittmacher der Tumorgenese sind genetische Veränderungen.

Die für die Tumorentstehung relevanten genetischen Veränderungen zeigen sich entweder in der Aktivierung eines normalen zellulären Proto-Onkogens zu einem Onkogen oder durch den Verlust eines Tumorsuppressorgens.

1.4. Tumorsuppressorgene

Tumorsuppressorgene (Tab.1-5) sind Gene, deren Genprodukte den Zellzyklus als negative Regulatoren beeinflussen. Dabei können sie auf verschiedene Weise auf den Zellzyklus einwirken. Einige Gene bzw. deren Genprodukte ermöglichen der Zelle den Zellzyklus zu stoppen und in die Differenzierung überzugehen, während andere Gene an der Einleitung der Zellalterung und der Apoptose beteiligt zu sein scheinen (Weinberg, 1991).

Tumorsuppressorgene

Gene für zytoplasmatische Proteine	
<i>APC</i>	beteiligt an Dickdarm und Magenkrebs
<i>DPC 4</i>	codiert für ein Übermittlungsprotein innerhalb eines Signalsystems, das die Zellteilung hemmt; beteiligt an Bauchspeicheldrüsenkrebs
<i>NF-1</i>	codiert für ein <i>Ras</i> hemmendes Protein; beteiligt an Neurofibrom; Tumoren des peripheren Nervensystems (Phäochromozytom) und myeloischer Leukämie; lokalisiert auf Chromosom 17q11.2
<i>NF-2</i>	beteiligt an Meningiomen und Ependymomen (Hirntumoren) und an Schwannom (Tumor der Schwann'schen Zellen)
Gene für Proteine im Zellkern	
<i>MTS 1</i>	codiert für p 16; beteiligt an vielen Tumoren
<i>RB</i>	codiert für das pRB Protein; beteiligt an Retinoblastom, an Knochen-, Brust- und Blasenkrebs, sowie kleinzelligem Lungenkarzinom; lokalisiert auf Chromosom 13q14
<i>p53</i>	codiert für das p53-Protein, welches die Zellteilung anhalten kann und Apoptose auslösen; beteiligt an vielen Tumoren; lokalisiert auf Chromosom 17q13.1
<i>WT 1</i>	beteiligt an Wilms Tumor; lokalisiert auf Chromosom 11 p 13

Tab.1-5 Aufstellung einiger bekannter Tumorsuppressorgene (Weinberg, 1996).

Im Allgemeinen wird ein Gen dann als Tumorsuppressorgen beschrieben, wenn sein Verlust als die Ursache für die Entstehung eines Tumors gilt. Eine genetische Veränderung dieser Tumorsuppressorgene ist rezessiv (Bishop, 1991). Die Wirkung der Tumorsuppressorgene im Zellzyklus geht also dann verloren, wenn beide Allele der Zelle von Punktmutation oder Deletion betroffen sind (Brach et al., 1995). Die Wahrscheinlichkeit der Elimination eines Wildtyp-Allels über Rekombination, Nondisjunction oder Gen Konversion liegt bei 10^{-3} bis 10^{-4} .

Die Häufigkeit des Verlustes des zweiten Allels liegt bei 10^{-6} pro Zellgeneration. Diese erhöhten Wahrscheinlichkeiten einer Mutation in Tumorsuppressorgenen gegenüber der "normalen" Wahrscheinlichkeit, dass zwei unabhängig voneinander stattfindende Ereignisse im gleichen Gen mit einer Wahrscheinlichkeit von 10^{-12} (Knudson, 1971) stattfinden, basiert vermutlich darauf, dass das zweite Allel durch eine duplizierte Kopie des mutierten ersten Allels ersetzt wird (Weinberg, 1991).

Daten die gegen Anfang der 90er Jahre erhoben wurden deuteten bereits daraufhin, dass Defekte in Tumorsuppressorgenen, speziell p53, die Entwicklung von Myelodysplastischen Syndromen begünstigen (Bartram, 1992).

1. 5. Onkogene

Onkogene entstehen z.B. durch retrovirale Insertion oder andere Mutationen aus Proto-Onkogenen. Proto-Onkogene (Tab.1-6) gehören zu den normalen wichtigen Regulatoren des Zellzyklus bzw. der Steuerung der Apoptose. Onkogene wurden erstmals in tumorauslösenden Retroviren nachgewiesen. Es konnte gezeigt werden, dass der Transfer eines solchen Onkogens in eine normale Zelle einen malignen Phänotyp induziert (Brach et al., 1995).

Die Entstehung eines Onkogens aus Proto-Onkogenen durch die Einwirkung von Retroviren ist nicht einheitlich. Entweder geschieht dies durch Veränderung der Sequenz, wobei ein Protein mit anormaler Aktivität entsteht, oder das Gen gerät unter die Kontrolle wirksamer Promotoren und Enhancer, mit folgender Überexpression des Genproduktes. Als letzte Möglichkeit bleiben die bereits oben genannten Insertionsmutationen des Gens durch Einbau von Virussequenzen.

Proto-/Onkogene

Gene für Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren	
<i>PDGF</i>	codiert für den von Plättchen abgeleiteten Wachstumsfaktor (platelet derived growth factor); beteiligt an gewissen Hirntumoren (Gliom)
<i>erb-B</i>	codiert für den Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors (<i>EGF</i>); beteiligt an gewissen Hirntumoren (Glioblastom) und Brustkrebs
<i>erb-B2</i>	auch <i>HER-2</i> oder <i>neu</i> genannt; codiert für einen Wachstumsfaktor-Rezeptor; beteiligt an Krebs von Brust, Speicheldrüsen und Eierstöcken
<i>RET</i>	codiert für einen Wachstumsfaktor-Rezeptor; beteiligt an Schilddrüsenkrebs
Gene für zytoplasmatische Übermittlerproteine innerhalb stimulatorischer Signalwege	
<i>Ki-ras</i>	beteiligt an Krebs von Lunge, Eierstöcken, Dickdarm und der Bauchspeicheldrüse
<i>N-ras</i>	beteiligt an Leukämien
Gene für Transkriptionsfaktoren, die wachstumsfördernde Gene aktivieren	
<i>c-myc</i>	beteiligt an Leukämien
<i>N-myc</i>	beteiligt am Neuroblastom und Glioblastom
<i>L-myc</i>	beteiligt an Lungenkrebs
Gene für andere Proteine	
<i>Bcl-2</i>	codiert für ein Protein, das den programmierten Zelltod (Apoptose) verhindert; beteiligt am follikulären B-Zell-Lymphom
<i>Bcl-1</i>	auch <i>PRAD 1</i> genannt; codiert für Cyclin D 1, eine stimulatorische Komponente des Zellzyklus
<i>MDM2</i>	codiert für einen Antagonisten des Tumorsuppressor-Proteins p53; beteiligt an Sarkomen und anderen Krebsarten

Tab. 1-6 Übersicht über einige Proto-/Onkogene (Weinberg, 1996)

Tumore enthalten entweder Onkogene, also Proto-Onkogene, die dominant verändert wurden, oder genetisch unveränderte Proto-Onkogene, die überexprimiert werden. Ohne die Beteiligung von Retroviren entstehen Onkogene auch durch Transposons, Punktmutationen oder Chromosomentranslokationen. Bei MDS finden sich Veränderungen in verschiedenen Onkogenen. Hierbei spielt die Aktivierung der RAS Onkogene eine besondere Rolle, insbesondere N-RAS findet sich bei ca. 35 % der MDS Patienten (Bartram, 1992).

1.6. *ras*-Gene

RAS-Gene gehören zu den Genen, welche am häufigsten in mutierter Form in menschlichen Tumoren anzutreffen sind. Das gilt sowohl für solide Tumoren, als auch für hämatopoetische Tumoren wie Leukämien und Lymphome. Zu den Genen der RAS-Familie gehören H-RAS (Harvey Rat Sarcoma), K-RAS (Kirsten Rat Sarcoma) und N-RAS. Letzteres verdankt seinen Namen der Homologie zu den vorgenannten Genen, sowie der Tatsache, dass es zuerst in Neuroblastomen entdeckt wurde.

Die *ras* Genfamilie codiert für 21-kD GTP-bindende Proteine, die auf der inneren Oberfläche der Zellmembran lokalisiert sind und eine wichtige Rolle bei der Signalübertragung spielen (Barbacid, 1987; Cantley et al., 1991).

Eine mutationsbedingte Aktivierung des N-RAS Gens wurde bereits häufiger in hämatologischen Erkrankungen nachgewiesen, wobei die Häufigkeit bei myelodysplastischen Syndromen (MDS), abhängig vom Subtyp mit 3 - 40 % (Liu et al., 1987; Hirai et al., 1987; Lyons et al., 1988; Yunis et al., 1989; Lubbert et al., 1992; Neubauer et al., 1994) der Fälle geringer ist als bei akuter myeloischer Leukämie (AML) mit 25-50 % (Janssen et al., 1987).

Bei den gefundenen Mutationen handelt es sich ausschließlich um Punktmutationen, die in den Codons 12,13 und 61 anzutreffen sind (Lyons et al., 1988). Diese Punktmutationen führen zu einer Störung der GTPase-Aktivität der betroffenen RAS-Proteine, welche die Signalübertragung von Tyrosinkinase blockiert. Dieses wiederum hat Störungen in der Wachstumskontrolle zum Ergebnis (Kolch, 2000). Gerade diese Mutation wird mit einer schlechten Prognose bzw. einer verkürzten Überlebenszeit und einer gesteigerten Wahrscheinlichkeit zur Transformation in eine sekundäre akute myeloische Leukämie (sAML) in Verbindung gebracht (Constantinidou et al., 1997). Ihr Auftreten korreliert mit einer schlechten Prognose und mit der Transformation von MDS in eine akute myeloische Leukämie (AML).

1.7. Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit ist, mit Hilfe verschiedener molekulargenetischer Methoden Analysen zur Grundlagenforschung durchzuführen, Ansatzpunkte für neue Therapieformen der verschiedenen MDS - Erkrankungen zu finden.

Aufgrund der bereits vorliegenden Klassifizierungen werden hierbei die unterschiedlichen Erkrankungstypen hinsichtlich ihrer molekulargenetischen Ausprägungen auf drei verschiedenen Ebenen miteinander verglichen.

Es werden unten beschriebene Methoden angewandt.

1. Mit Hilfe der Klonalitätsanalyse werden zunächst die X-chromosomalen Inaktivierungsmuster von insgesamt 139 Frauen untersucht. Es findet ein Vergleich zwischen Patientinnen verschiedener Erkrankungstypen untereinander, sowie mit gesunden Kontrollen statt. Hierzu wurden sowohl die prognostischen als auch die morphologischen Parameter verwendet.
2. Anschließend werden mittels eines ras-Mutationsscreenings innerhalb der MDS - Untergruppe der erworbenen idiopathischen sideroblastischen Anämien (AISA = acquired idiopathic sideroblastic anaemia) die Formen RSA (= refraktäre sideroblastische Anämie) versus RARS (= refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten) miteinander verglichen.
3. Vergleich der Genexpressionsdaten von CD34+ hämatopoetischen Stammzellen verschiedener Patienten, sowie gesunder Kontrollpersonen, da MDS auf neoplastische Stammzell-Veränderungen zurückgeht.

2. Material & Methoden

2.1. Bezugsquellen

Alle nicht gesondert genannten Produkte wurden in p.A. Qualität von den Firmen Merck eurolab GmbH, Darmstadt und Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim bezogen.

Acrylamid/bisAcrylamid (29:1 Ratio)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Acrylamid/bisAcrylamid (19:1 Ratio)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Advantage [®] 2 PCR Kit	BD Biosciences Clontech, Heidelberg
Advantage [®] 2 PCR Enzyme System	BD Biosciences Clontech, Heidelberg
Agarose, ultrapure	Gibco-BRL, Eggenstein
Amberlite plusone IRN-150L	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
APS	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Atlas [™] cDNA Human 1.2 Array	BD Biosciences Clontech, Heidelberg
Atlas [™] Gene Lists	BD Biosciences Clontech, Heidelberg
Atlas SMART [™] Probe Amplification Kit	BD Biosciences Clontech, Heidelberg
Bind Silane	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Blue/Orange 6x Loading Dye	Promega, Mannheim
BSA RNase/DNase free	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
CD34+-Antikörper (FITC-markiert)	BD Biosciences, Heidelberg
dATP Dinatriumsalz dCTP Dinatriumsalz dGTP Dinatriumsalz dTTP Tetranatriumsalz	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Dynabeads [®] M-450 CD3	Deutsche Dynal GmbH, Hamburg
Expositionskassette	Raytest, Straubenhardt
Filter	Sartorius AG, Göttingen
Harnstoff (Urea, Enzyme Grade)	Gibco BRL, Eggenstein
Hpa II Restriktionsendonuklease	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
HSA(5%)	Aventis Behring
λ-BstEII-DNA-Marker	Genecraft, Münster
LightCycler Capillaries	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
LightCycler Centrifuge Adapters	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
LightCycler DNA Master SYBR Green I Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Loading Dye, Formamide	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Lymphoprep™	Nycomed Pharma AS, Oslo
MACS CD34+ Progenitor Cell Isolation Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MACS CD3+ Cell Isolation Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MikroSpin S-300 HR Columns	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
MS Separation Columns	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
M-MLV Reverse Transcriptase	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein
M-MLV RT-Buffer	Gibco BRL Life Technologies , Eggenstein
NucleoSpin® Extraction Kit	BD Biosciences Clontech, Heidelberg
Oligo(dT) ₁₂₋₁₈ Primer	Gibco BRL Life Technologies , Eggenstein
pBS DNA Marker HpaII digest	Genecraft, Münster
10x PCR-Puffer	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Phosphoimager Screens	Fuji Film, Düsseldorf
Polymorphprep	Nycomed Pharma AS, Oslo
PowerScript™ Reverse Transcriptase	BD Biosciences Clontech, Heidelberg
Primer	Metabion, Martinsried; Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Qiamp DNA Blood Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Qiaquick Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Recombinant RNAsin	Promega, Mannheim
pd(N) ₆ Random-Primer	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Ready-Load 1Kb DNA Ladder	Gibco BRL Life Technologies , Eggenstein
Reverse Transkriptase (M-MuLV)	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Rneasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
RNA/cDNA Inspector Kit	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit	BD Biosciences Clontech, Heidelberg
Taq DNA Polymerase	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
TEMED	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
10x ThermoPol Reaction Buffer	New England Biolabs, Schwalbach/Taunus
Thermo Sequenase™ DNA Polymerase	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Thermo Sequenase™ Cycle Sequencing Kit	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Tris plusone	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg

Ultrapure dNTP Set
2'-Deoxynucleoside 5'-Triphosphate
Vent_R DNA Polymerase

Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH,
Freiburg
New England Biolabs, Schwalbach/Taunus

2. 2. Häufig verwendete Lösungen

TE-Puffer

10 mM Tris/HCl pH = 8,0
1 mM EDTA

5x TBE-Puffer (2 l)

108 g Tris/HCl
55 g Borsäure
9.3 g EDTA

20x SSC Stammlösung

NaCl 3 mol/l
Na-Citrat 0.3 mol/l
pH = 7.0

2x SSC, 0.1% (w/v) SDS

10 % SDS Stammlösung 10 ml/l
20x SSC Stammlösung 100 ml/l
steril

0.1 x SSC, 0.5 % (w/v) SDS

10 % SDS Stammlösung 50 ml/l
20x SSC Stammlösung 5 ml/l

MACS-Puffer

2 mM EDTA
0,5 % HSA
ad 100 ml in PBS Dulbecco w/o Ca Mg

2.3. Geräte

A.L.F. express® II DNA Sequenzer von Amersham Pharmacia Bioscience

Biofuge fresco; Heraeus Instruments GmbH, Hanau

Elektrophoresekammern: MWG Biotech Gelkammer

Eppendorf Biophotometer, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Köln

Eppendorf Mastercycler gradient und eppendorf Personal Cycler; Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Köln

FACScan; BD Biosciences, Heidelberg

Hybridisierungsöfen, ThermoHybaid, Heidelberg

Light Cycler; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

LS 9000 Beckmann Coulter, Beckmann, Fullerton, CA

MiniMACS; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

Netzgeräte: BioRad Power Pac 300

Phosphoimager FLA-3000, Fuji Film, Düsseldorf

Thermoblock TB1, Biometra

Zentrifugen: Eppendorf Centrifuge 5417R, Heraeus Biofuge 15

2.4. Software

ALFwin™ AlleleLocator 1.03 Software, Amersham Pharmacia Bioscience

ALFwin™ Sequence Analyzer 2.00 Software, Amersham Pharmacia Bioscience

AIDA™ Image Analyzer 3.20 Software, Raytest, Straubenhardt

BAS-Reader™ 3.01 Software, Raytest, Straubenhardt

CellQuest Software, BD Biosciences, Heidelberg

LightCycler Software 3.5

SPSS 10.1 für Windows

Alle statistischen Analysen wurden mit Hilfe und Unterstützung folgender Personen und Institute durchgeführt: Dr. med. Manuel Aivado

PD Dr. med. Ulrich Germing

Slawomir Kliszewski

Institut für Statistik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

2.5. Biologische Materialien

Für die Untersuchungen wurden Blut und Knochenmarkproben, von Patientinnen der Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie, sowie der Chirurgischen Klinik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf verwendet. Die Untersuchung der Proben erfolgte im Zeitraum von September 1998 bis Mai 2002. Es ergab sich eine Aufteilung des analysierten Materials in 82 (59 %) periphere Blutproben und 57 (41 %) Knochenmark-Proben (Abb.2-1).

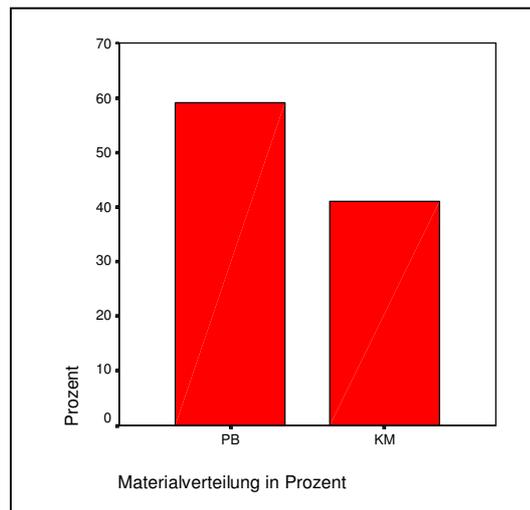


Abb. 2-1 Prozentuale Angaben zu verwendeten biologischen Materialien

Analysiert wurden insgesamt 139 Patientinnen im Alter von 17 - 98 Jahren, mit einem Alters - Median von 61 (Abb.2-2).

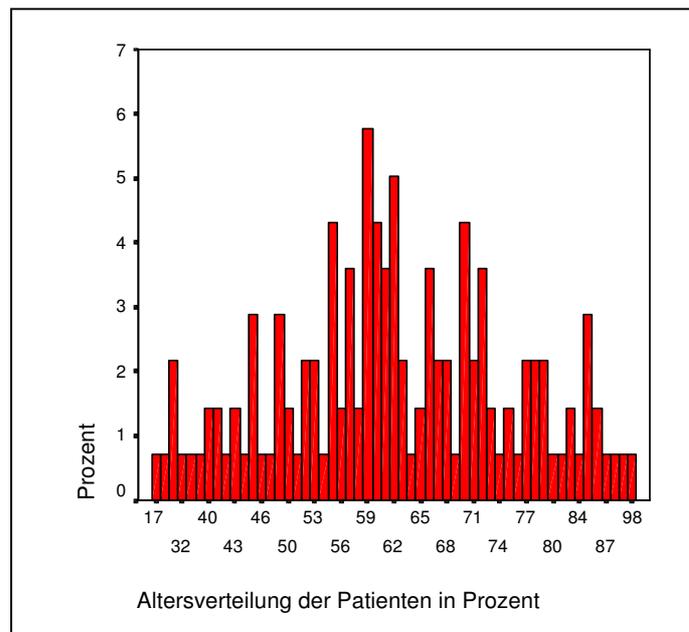


Abb.2-2 Prozentuale Altersverteilung

Die Daten von 30 der 139 Patienten stammen aus dem EORTC-Data Center in Brüssel. Sie wurden im Rahmen eines gemeinsamen EORTC-Forschungsprojektes über MDS erhoben, und vom Leiter des Projektes, Herrn Theo de Witte, zur Verfügung gestellt.

Als Kontrollkollektiv wurden zusätzlich 35 Personen untersucht, die keine klonale Grunderkrankung aufwiesen.

Die Patienten wurden gemäß FAB-Klassifikation (Tab. 2-1) bzw. gemäß WHO-Klassifikation (Tab.2-2) eingeteilt.

FAB MDS-Subtyp	Häufigkeit	Prozente
RA	34	24,5
RARS	39	28,1
RAEB	18	12,9
RAEB-T	35	25,2
CMML	5	3,6
sAML	7	5,0
nicht klassifizierbar	1	0,7
Gesamt	139	100,0

Tab.2-1 Einteilung der Patienten-Subtypen gemäß FAB-Klassifikation (Bennett et al., 1982)

WHO MDS-Subtyp	Häufigkeit	Prozente
RA (PRA/PSA)	19 (4/15)	13,7(2,9/10,8)
RARS	23	16,5
RCMD	13	9,4
5q-	15	10,8
AML	41	29,5
RAEBI	9	6,5
RAEBII	8	5,8
nicht klassifizierbar	11	7,9
Gesamt	139	100,0

Tab.2-2 Einteilung der analysierten angelehnt an der WHO-Klassifikation (Vardiman, Harris & Brunning , 2002)

Die unterschiedliche Einteilung (Abb.2-3) basiert auf der geänderten Definition der einzelnen Krankheits-Subtypen. CMML wird laut WHO-Klassifikation als eigenes Krankheitsbild geführt und erscheint somit in der WHO-Tabelle als nicht klassifizierbar. Ebenso werden die Patienten des FAB-Typs RAEB-T, bis auf eine Ausnahme, nach WHO ausnahmslos als AML-Patienten klassifiziert.

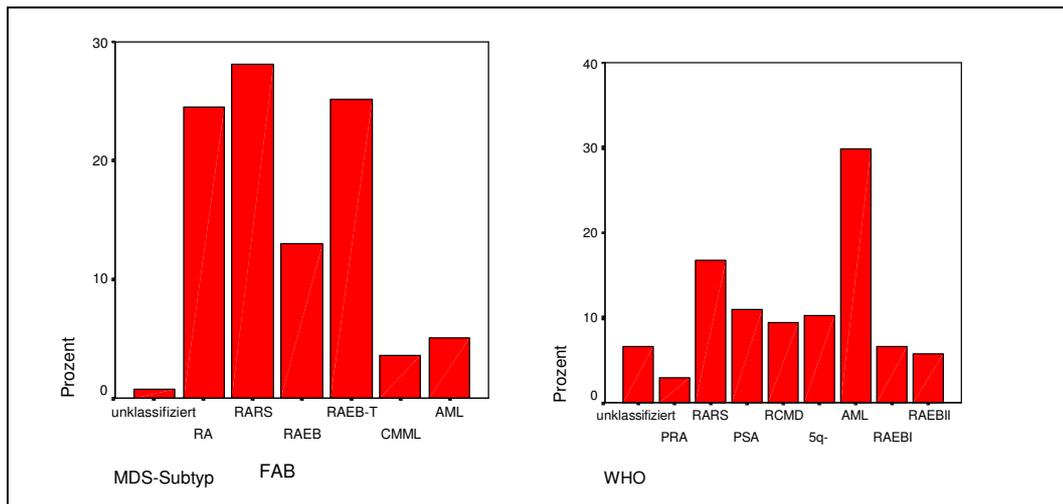


Abb. 2-3 Gegenüberstellung der Patientenverteilung gemäß der Klassifikationen nach FAB bzw. angelehnt an WHO

Bei der Knochenmarkanalyse der Patienten fand sich eine Verteilung der Blastenanteile im Knochenmark von 0-55 % (Abb.2-4).

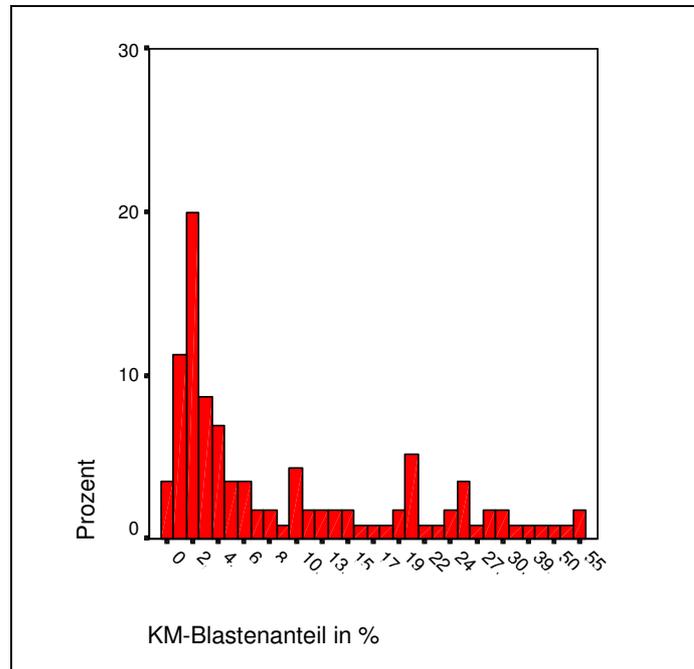


Abb.2-4 Prozentuale Häufigkeit der analysierten Patienten entsprechend des Blastenanteils im KM

Von den 139 untersuchten Patientinnen waren 99 bezüglich ihres Karyotyps auswertbar (Abb.2-5). Davon zeigten 28 (20,1 %) einen normalen Karyotyp, bei 15 Patientinnen (10,8 %) fand sich die 5q- Einzelaberrationen. Sieben (5 %) wiesen diverse Einzelaberrationen auf. Bei drei (2,2 %) fand sich die Veränderung Trisomie 8 und bei 10 Patientinnen (7,2 %) ließen sich komplexe Veränderungen des Karyotyps nachweisen. Von 48 (34,5 %) Patientinnen lag keine Karyotypanalyse vor.

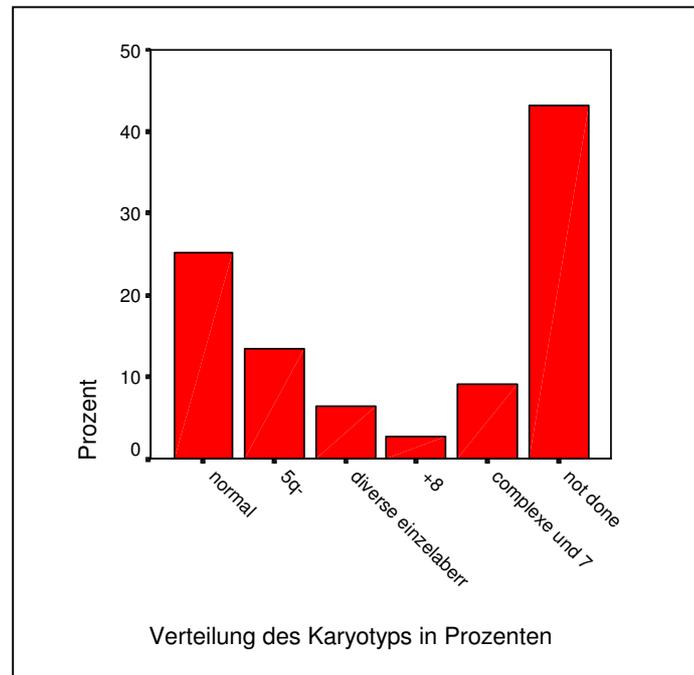


Abb.2-5 Prozentuale Verteilung nach der Karyotypanalyse

2.6. Selektion von Zell-Subpopulationen

2.6.1. Dichtegradientenzentrifugation

Grundlage für die Separation von Zellsubpopulationen ist eine Dichtegradientenzentrifugation, bei der zunächst Lymphoprep im Verhältnis 1:1 mit Blut, bzw. Knochenmark in PBS, in einem 50 ml Röhrchen überschichtet wird (Bøyum, 1964/1968).

Da die Erythrozyten mit den hoch polymeren Komponenten der im Lymphoprep enthaltene Mischung aus Natrium-Diatrizoat (9,1 % w/v) und Polysacchariden (5,7 % w/v), aggregieren ermöglicht dies eine leichte Gewinnung der Leukozyten. So ergibt sich eine gute Auftrennung für die weitergehenden Untersuchungen.

Nach einer 30minütigen Zentrifugation bei RT und 1500 rpm haben sich 3 Phasen gebildet, zuunterst eine Schicht aus aggregierten Erythrozyten, darüber eine klare Phase aus Lymphoprep und schließlich die Serumphase. Der gut erkennbare, weißliche Ring aus mononukleären Zellen lässt sich leicht abnehmen. Nach dem fünfminütigen Waschen der so gewonnenen Zellen bei RT und 1500 rpm in PBS wird das erhaltene Pellet wiederum in 1 ml PBS aufgenommen und die Zellzahl bestimmt.

2.6.2. Magnetische Separation von Zell-Subpopulationen (MACS Kit)

Bei der Isolation der Zell-Sub-Populationen durch Positiv-Selektion (Miltenyi et al., 1994; Radbruch et al., 1994) werden die gewünschten Zellen mit Hilfe eines Hapten-konjugierten monoklonalen Erstantikörpers an magnetische, und Anti-Hapten konjugierte MACS MicroBeads gebunden.

Die so markierten Zellen werden dann im magnetischen Feld eines MiniMACS an Separationssäulen gebunden (Wynther, 1995). Die durch die Dichtegradientenzentrifugation erhaltenen Zellen werden nach der Bestimmung der Zellzahl mittels mehrerer Resuspendierungen und erneuter Zentrifugationen in MACS-Puffer gewaschen.

Das erhaltene Pellet wird in MACS-Puffer resuspendiert. Pro 10^8 Zellen werden jeweils FcR Blocking Reagenz und Hapten-Antikörper (CD34+ oder CD3+) hinzugefügt. Nach den anschließenden Inkubationszeiten und Waschschrritten werden Anti-Hapten MicroBeads zugefügt und erneut inkubiert und gewaschen. Vor dem Auftragen der Zellen auf eine Separationssäule, die sich im Magnetfeld eines MiniMACS befindet, ist eine Filterung zur Vorbeugung gegen Klumpenbildung erforderlich. Die Säule verbleibt zunächst im Magnetfeld und wird nach der Separation mehrfach mit MACS-Puffer gespült. In einem weiteren Schritt wird die Säule aus dem Magnetfeld entnommen, die positiv-selektierten Zellen zur erneuten Zellzahlbestimmung sowie eine Reinheitskontrolle der erhaltenen Zellpopulation am FACScan aus der Säule gespült und aufgefangen.

Die beschriebenen Proben von ca. 2×10^5 CD34+-Zellen werden mit einem FITC gekoppelten monoklonalen Antikörper (Klon 8G12) markiert. Die Reinheit der erhaltenen und in Abbildung 2-6 dargestellten Zellen beträgt ca. 97 %.

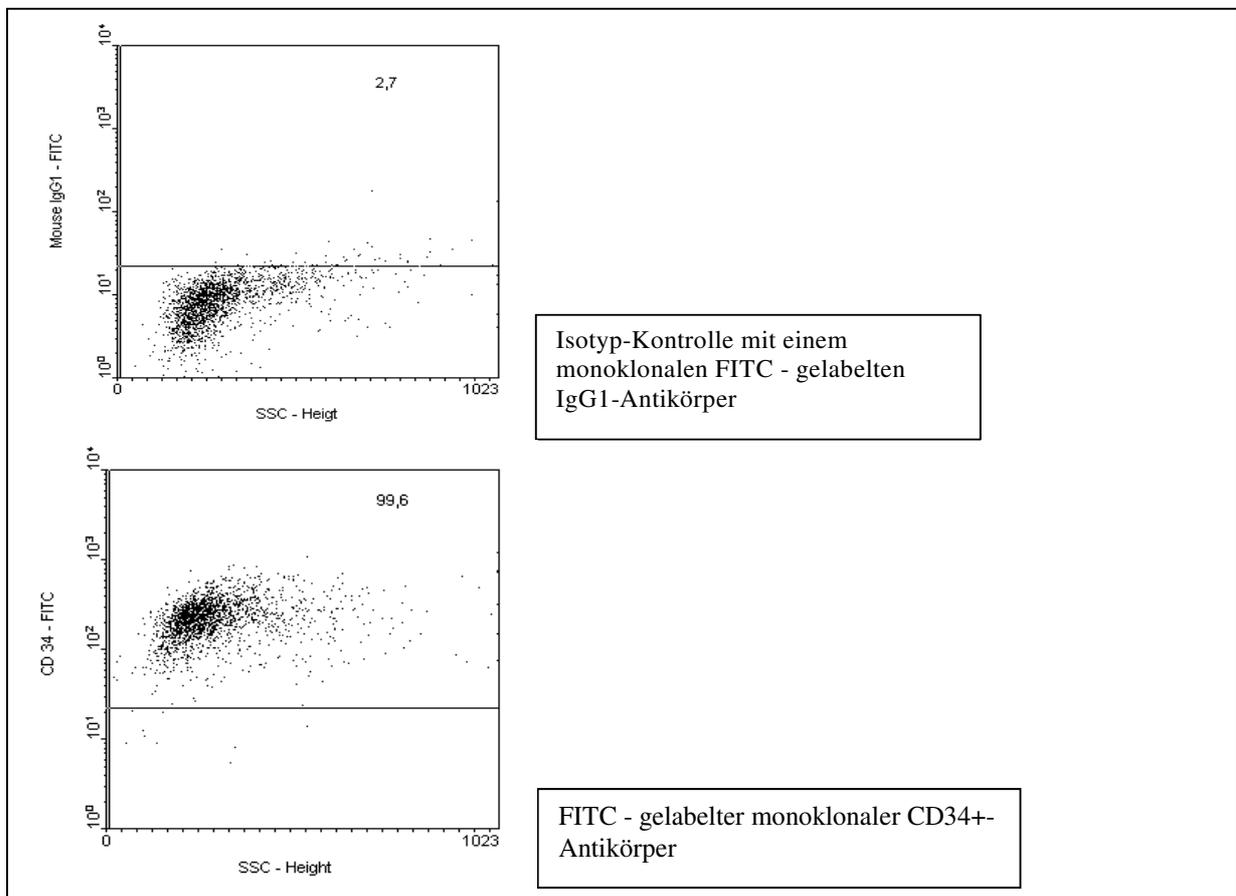


Abb. 2-6 Nachweis der Reinheit der Selektion von CD34+-Zellen im FACScan

2.7. Isolierung von Nukleinsäuren

2.7.1. Isolierung von RNA aus Zellen (RNeasy Kit: Qiagen)

Dieses Verfahren basiert auf einer Weiterentwicklung der Einzelschritt-RNA-Isolierung (Chomczynski und Sacchi, 1987). Der Lysepuffer dieses Kits enthält monophasische Lösungen mit Guanidiniumisothiocyanat und β -Mercaptoethanol, die im Verlauf der Homogenisierung und der Lyse der Zellen die Integrität der RNA schützen, während die Zellwände und Zellorganellen zerstört werden. Um die Dissoziation von Nukleoprotein-Komplexen zu ermöglichen, ist eine 2minütige Inkubationsphase bei RT erforderlich. Anschließend wird das Homogenisat auf eine spezielle Shredder-Säule gegeben und 2 min. bei RT mit maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der so erhaltene RNA-haltige farblose Durchtritt wird vorsichtig mit einem Volumen 70%iger Ethanol gemischt, auf eine weitere Säule pipettiert und erneut für 15 sec. mit $\geq 8000 \times g$ zentrifugiert. Nach mehrmaligem Waschen wird die an die Säule gebundene, aufgereinigte RNA anschließend mit 30-50 μ l Aqua dest. (DEPC behandelt) vorsichtig von der Membran gelöst und durch erneute Zentrifugation für 1 min. mit $\geq 8000 \times g$ in ein steriles Reaktionsgefäß überführt. Die so gewonnene RNA wird sofort auf Eis gesetzt, bevor die photometrische Konzentrationsbestimmung folgt.

2.7.2. DNA-Isolierung aus Blut und Knochenmark (DNA Blood Mini Kit; Qiagen)

Zunächst werden 200 μ l Patientenblut oder Knochenmark mit Protease und Lysepuffer vermischt und 10 min. bei 56°C inkubiert. Nach der Zugabe von 1 Volumen Ethanol absolut und einem intensiven Vortexen wird das Lysat auf eine Säule pipettiert und bei RT mit 6000 $\times g$ für 1 min. zentrifugiert. Der hierbei entstandene Durchfluss wird verworfen und die Säule auf ein neues Sammelröhrchen überführt. Nach zwei erneuten Waschschrritten mit verschiedenen Waschpuffern wird die Säule auf ein steriles Reaktionsgefäß gesetzt und die aufgereinigte DNA mit Hilfe von TE-Puffer (10 mM) und einer 1minütigen Zentrifugation bei RT von der Säule gewaschen. Es folgt die photometrische Konzentrationsbestimmung.

2.7.3. DNA-Isolierung aus Material von gefärbten Objektträgern

Zur Isolation von DNA aus gefärbtem Material (Vince et al. 1998) muss dieses zunächst mit Hilfe eines Tropfens ATL-Puffer (Gewebelysepuffer aus dem Qiagen Tissue Kit) auf dem Objektträger angefeuchtet und mit einem sterilen Skalpell entfernt werden, wobei möglichst das gesamte Material mit dem Puffer benetzt sein sollte um ein Stauben und damit den Verlust des Materials zu verhindern. Das abgekratzte Material wird vorsichtig in ein steriles Reaktionsgefäß überführt, mit weiterem ATL-Puffer versetzt und 1h bei 56°C inkubiert. Die weitere Prozedur erfolgt analog zum DNA-Isolationsprotokoll aus Blut (Vgl. Punkt 2.7.2), jedoch ohne die Zugabe von Protease.

2.8. Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren in Lösungen erfolgte zunächst eine spektral-photometrische Messung bei einer Absorption von 260 nm.

Hierzu wurde z.B. 1 µl RNA in 400 µl dH₂O verdünnt. Die Konzentration ergab sich dann wie folgt aus der Messung:

$$OD_{260\text{nm}} \times \text{Verdünnung} \times 0.04 = \text{mg RNA/ml}$$

Grundlage hierzu ist das *Bonguer-Lambert-Beer'sche Gesetz*:

$$\Delta E = \epsilon \times c \times d$$

ΔE = Extinktion

ϵ = molarer Extinktionskoeffizient

c = Konzentration der Lösung

d = Schichtdicke der Küvette

Der Absorptionskoeffizient ϵ ist 1000 cm²/mol. Mit einer standardmäßigen Schichtdicke d der Küvetten, ist die Extinktion E gleich der optischen Dichte.

Bei doppelsträngiger DNA entspricht eine optische Dichte (OD) von 1 einer Konzentration von ca. 50 µg/ml, bei einzelsträngiger RNA und einzelsträngiger DNA ca. 40 µg/ml und bei kleineren Oligonukleotiden 33 µg/ml.

Als Kontrolle, ob Verunreinigungen vorliegen, wurde die OD zusätzlich bei 280 nm gemessen, und die Ratio aus $OD_{260\text{nm}}/OD_{280\text{nm}}$ bestimmt. Die ideale Ratio für RNA liegt bei 1.8 - 2.0 und für DNA bei 1.8 - 1.95. Ist der Wert kleiner, so deutet dies auf eine mögliche Verunreinigung durch Proteine oder Phenol hin.

Ein höherer Wert bei einer DNA-Messung, ist ein Anzeichen für RNA oder DNA-Denaturierung.

2.9. Amplifikation von Nukleinsäuren

2.9.1. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction = PCR) dient zur *in vitro*-Vermehrung spezifischer Nukleotidsequenzen.

Isolierte DNA wird dabei zunächst auf 94 °C oder 95 °C erhitzt, und in ihre Einzelstränge zerlegt (Denaturierung). Diese Stränge lässt man dann bei einer Temperatur $T_m - 8^\circ\text{C}$ mit zwei im Überschuss vorhandenen, chemisch synthetisierten DNA-Oligonukleotiden (Primer) hybridisieren (Primer-Annealing). Der von den einzelnen Primern abhängige T_m -Wert errechnet sich nach der Formel: $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$.

Die Primer werden so gewählt, dass sie Sequenzbereichen aus der Umgebung des gewünschten DNA-Abschnitts, dessen äußere Enden sie später auch bilden, entsprechen.

Die Länge kann dabei variieren, liegt jedoch meistens bei ca. 20 Nukleotiden.

Es folgt die Polymerisation, bei der z.B. die Taq-Polymerase (hitzebeständige DNA-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*) Nukleotide aus den 4 Desoxyribonucleotid-Triphosphaten an das 3'-Ende der Primer anfügt.

Da die *Taq-Polymerase* im Vergleich zur normalen DNA-Polymerase keinen Korrekturlesemechanismus besitzt und daher häufiger Fehler einbaut, wurde Vent_R-DNA-Polymerase verwendet. Diese DNA-Polymerase besitzt eine 5-15fach höhere Genauigkeit als die Taq (Mattila et al., 1991; Eckerth und Kunkel, 1991), was zum Teil durch eine integrierte 3'=>5' proofreading Exonuclease Aktivität (Kong et al., 1993) erreicht wird.

Die Vent_R-DNA-Polymerase entstammt dem Archaeobakterium *Thermococcus litoralis* (Perler et al., 1992). Dieser Organismus ist in der Lage bei bis zu 98 °C zu existieren und wurde von einem submarinen Vulkan isoliert (Belkin und Jannasch, 1985).

Jeder PCR-Zyklus enthält die 3 oben genannten Schritte. Die meisten PCRs enthalten zwischen 25 und 35 Zyklen, wobei in jedem Zyklus die Menge der synthetisierten DNA des vorherigen Zyklus verdoppelt wird.

Bei den PCR-Bedingungen für den HUMARA sowie für KRAS1 handelt es sich um Short-Cycle PCR-Bedingungen (Mai et al., 1998)

PCR-Bedingungen und Primersequenzen

Primer	Initiale Denaturierung	Denaturierung	Primer-Annealing	Primer-Extension	Finale Extension	Zykluszahl
HUMARA	98°C 10min.	98°C 5 sec.	62°C 8 sec.	72°C 11 sec.	72°C 8 min.	35
HUMARA Cy5		95°C 30 sec.	66°C 30 sec.	72°C 30 sec.		6
NRAS 1	95°C 5 min.	94°C 1 min.	62°C 1 min.	72°C 1 min.	72°C 8 min.	35
NRAS 2	94°C 10 min.	94°C 1 min.	58°C 1 min.	72°C 1 min.	72°C 8 min.	35
KRAS 1	94°C 5 min.	94°C 1 min.	61°C 30 sec.	72°C 1.30 min.	72°C 8 min.	35
KRAS 2	94°C 10 min.	94°C 1 min.	53°C 1 min.	72°C 1 min.	72°C 8 min.	35

Tab.2-3 PCR-Bedingungen (Zyklussequenzen)

HUMARA

HUMARA 5'	5' CCG AGG AGC TTT CCA GAA TC 3'
HUMARA 3'	5' TAC GAT GGG CTT GGG GAG AA 3'
HUMARA 5' Cy5	5' TTC CAG AGC GTG CGC GAA G 3'

N-ras Exon 1

NRAS1 5'	5' CTA AAT CTG TCC AAA GCA GA 3'
NRAS1 3'	5' CTA TGG TGG GAT CAT ATT CA 3'

N-ras Exon 2

NRAS2 5'	5' GTT ATA GAT GGT GAA ACC TG 3'
NRAS2 3'	5' ATA CAC AGA GGA AGC CTT CG 3'

Ki-ras Exon 1:

KRAS1 5'	5' CAT GTT CTA ATA TAG TCA CA 3'
KRAS1 3'	5' TAA AAC AAG ATT TAC CTC 3'

Ki-ras Exon 2:

KRAS2 5'	5' TTC CTA CAG GAA GCA AGT AG 3'
KRAS2 3'	5' CAC AAA GAA AGC CCT CCC CA 3'

Die Reaktionsansätze wurden folgendermaßen zusammengestellt:

Mastermix (normale PCR):

19,5 µl	dH ₂ O (autoklaviert)
5 µl	10x Puffer
2 µl	dNTP's (je 10 mM)
4 µl	3'Primer (10 pmol/µl)
4 µl	5'Primer (10 pmol/µl)
<u>0,5µl</u>	<u>VentR-DNA-Polymerase</u>
<u>+ 15 µl</u>	<u>Template DNA (10ng/µl)</u>
Gesamtansatz = 50 µl	

Bei der Cy5 –Label-PCR handelt es sich um eine Semi-Nested-PCR.

Mastermix (Label-PCR/Cy5):

1,3 µl	dH ₂ O (autoklaviert)
1,5 µl	10x Puffer
2 µl	5'Primer Cy5 (10 pmol/µl)
<u>0,2 µl</u>	<u>VentR-DNA-Polymerase</u>
<u>+ 10 µl</u>	<u>Template PCR-Produkt</u>
Gesamtansatz = 15 µl	

Die Angaben in den Mastermixen beziehen sich jeweils auf eine Probe.

2.9.2. Reverse Transkription (RT)

Bei der RT wird RNA durch die Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Die Reverse Transkriptase stammt aus RNA-Viren, die dieses Enzym dazu verwenden, ihre eigenen Genome im Wirt in DNA umzuschreiben.

Der Template-Ansatz errechnet sich wie folgt:

$$\mu\text{l dH}_2\text{O} = 20 \mu\text{l} - 10.5 \mu\text{l} - x \mu\text{l RNA (max.5}\mu\text{g RNA in DEPC-H}_2\text{O)}$$

Die RNA wurde zunächst in dem Wasser 5 min. bei 90°C denaturiert, auf Eis gekühlt und abzentrifugiert, bevor sie dem Mastermix zugefügt wurde.

Der Mastermix der cDNA-Synthese setzte sich folgendermaßen zusammen:

cDNA- Mastermix

2.0 µl	10x Puffer
1.0 µl	MgCl ₂ (125 mM)
1.0 µl	dATP (10 mM)
1.0 µl	dCTP (10 mM)
1.0 µl	dGTP (10 mM)
1.0 µl	dTTP (10 mM)
0.75 µl	DTT (0.1 M)
1.0 µl	Random-Primer
0.7 µl	BSA (2.91mg/ml)
0.5 µl	RNAsin
0.5 µl	MMLV-RT

Pro Probe wurden 10,5 µl des Mastermixes eingesetzt.

Als einziger Zyklus ergab sich folgende Reihenfolge:

25°C	10 min.
42°C	45 min.
95°C	5 min.

Im Anschluss wurden die Proben sofort auf Eis gekühlt.

Die erhaltene cDNA wurde mit Hilfe der Amplifikation eines Referenzgens (β -Actin) auf DNA-Kontamination getestet.

β -Actin Primer: β -Actin-3' 5'ATT TGC GGT GGA CGA TGG AG 3'
 β -Actin -5' 5'AGA GAT GGC CAC GGC TGC TT 3'

Mastermix für β -Actin PCR:

2	μ l	cDNA (1 : 5 verdünnt in DEPC-H ₂ O)
2	μ l	dNTPs (10mM)
4	μ l	3'-Primer und 5'-Primer je(10 pmol/ μ l)
2,5	μ l	10x Puffer
0,5	μ l	Vent _R -DNA-Polymerase
12	μ l	dH ₂ O

PCR-Bedingungen:	94 °C	10 min.	
	94 °C	1 min.	} 35x
	62 °C	1 min.	
	72 °C	1 min.	
	72 °C	8 min.	

Die PCR wurde auf einem Agarosegel überprüft. Zeigt sich nur die β -Actin cDNA-Bande (446 bp), liegt keine Kontamination mit DNA (652 bp) vor.

2.10. Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren in Agarosegelen

Während bei Agarosegelen die Konzentration und damit die Viskosität verändert werden kann, besteht bei Polyacrylamidgelen die Möglichkeit die Porengröße zu variieren. (Sambrook et al. 1982)

Agarosekonzentration (%)	Trennbereich (kb)
0.3	5 - 60
0.6	1 - 20
0.7	0.8 - 10
0.9	0.5 - 7
1.2	0.4 - 6
1.5	0.2 - 4
2.0	0.1 - 3

Die Herstellung der gewünschten Gelkonzentration erfolgt durch Lösen der entsprechenden Menge Agarose in 1x TBE-Puffer mittels Aufkochen in der Mikrowelle. Nach kurzem Abkühlen wird die so entstandene klare Gellösung in eine entsprechende Gelkammer gegossen und erstarrt dort. Der aufzutrennenden Probe wird dann vor dem Auftragen die entsprechende Menge des Farbstoffs Blue/Orange 6x Loading Dye beigemischt. Er dient dem Markieren und Beschweren der Probe, damit diese in der Probentasche verbleibt und nicht heraus diffundiert.

Blue/Orange Loading Dye

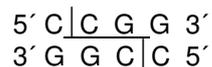
für DNA: 15 % Ficoll[®] 400, 50 mM EDTA, 10 mM Tris,
 0.03 % Bromphenolblau, 0,03 % Xylen Cyanol FF
 0,4 % Orange G

Dieser Marker ermöglicht mit den 3 Farbstoffen und ihren unterschiedliche Laufgeschwindigkeiten eine relativ genaue Überwachung der Proben-Auftrennung.

Der Lauf des Gels erfolgt ebenfalls in 1x TBE-Puffer. Um die Länge der erhaltenen DNA-Fragmente bestimmen zu können wird ein entsprechender Größenstandard ebenfalls auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung von DNA Fragmenten erfolgt in der Regel auf 1.5 %igen Agarosegelen bei 120 V, welche zu Dokumentationszwecken auf einer UV-Platte fotografiert werden.

2.11. Restriktionsverdauung von DNA (nach Sambrook et al., 1982)

Im Rahmen der Klonalitätsanalyse werden je 200 ng der Nukleinsäure mit 40U einer methylsensitiven Restriktionsendonuklease (*Hpa II* aus *Haemophilus parainfluenzae*) verdaut, um festzustellen, welches X-chromosomale Inaktivierungsmuster bei den MDS-Patientinnen vorliegt. Restriktionsenzyme besitzen die Fähigkeit an unterschiedlichen Ansatzpunkten zu schneiden. Sie können u.a. „sticky ends“, also überstehende Enden, ebenso wie „blunt ends“, also glatte Enden, produzieren. *Hpa II* erzeugt 5'kohäsive Enden (Garfin und Goodman, 1974).



Hierbei sind Schnitt- bzw. Erkennungsstellen immer palindromisch aufgebaut.

Die 4stündige Verdauung findet bei einer Temperatur von 37°C unter einer für das Enzym spezifischen Pufferbedingung statt, dieser spezifischen Puffer (20mM Tris-HCl, 50mM KCl, 0,5 mM EDTA, 5 mM 2-Mercaptoethanol, 50 % Glycerol (w/v), pH ca. 7,5 (bei 4°C)) wird von den Herstellerfirmen der Enzyme mitgeliefert.

2.12. Fragmentlängen-Analyse im Rahmen der Klonalitäts-Analyse (HUMARA)

Voraussetzung für die Analyse der X-chromosomalen Inaktivierungsmuster der MDS - Patientinnen ist ein direkter Vergleich der Fragmentlängen der verdauten und unverdauten DNA-Proben der Patientinnen mit Hilfe von A.L.F. (= Automated Laser Fluorescent - Sequencer) -Gelen. Dazu wird ein Verdau der DNA-Proben mit der methylsensitiven Restriktionsendonuklease *HpaII* wie unter 2.11. durchgeführt und anschließend parallel zu den unverdauten DNA-Proben der Patientinnen in einer spezifischen PCR-Reaktion wie unter 2.9.1 beschrieben vervielfältigt und mit einem Farbstoff (Cy5) markiert. Entsprechend der Lyon Hypothese wird eins der beiden X-Chromosomen in der weiblichen Embryogenese nach dem Zufallsprinzip inaktiviert. Dieses Inaktivierungsmuster wird an alle Tochterzellen weitervererbt (Delforge et al. 1995). Mit Hilfe von *Hpa II* werden die aktiven Bereiche verdaut was bedeutet, dass bei einer monoklonalen Entwicklung alle Zellen das gleiche Inaktivierungsmuster und damit auch die gleichen Fragmentlängen aufweisen während polyklonale Gewebe ein Mosaikmuster der gleichmäßigen Inaktivierung der beiden Allele etwa im Verhältnis von 50:50 im Gesamtverhältnis der Zellen zeigen.

2.12.1. Gelkammern für A.L.F.-Gele

Für die Klonalitäts-Analyse werden A.L.F.-Gele zwischen zwei Glasplatten gegossen. Die obere der beiden Platten erhält am oberen Rand, der später den Kamm für die Proben tragen wird, eine Behandlung mit BindSilane. Nach kurzem Einwirken wird das überschüssige BindSilane mit Ethanol wieder entfernt. Die beiden Platten werden nun zusammengebaut, wobei sie durch zwei dünne (0.5 mm) Glas-Spacer getrennt und an den Rändern mit Klammern fixiert werden.

2.12.2. Herstellen eines A.L.F.-Geles

Für die Herstellung eines 0.5 mm dicken, 6 %igen Polyacrylamidgels werden folgende Bestandteile benötigt:

6 ml 6xTBE	
25.2 g Harnstoff	
25.5 ml Aqua dest. (autoklaviert)	200µl Ammoniumpersulfat (APS) (10 %)
9 ml Acrylamid (40 % 29 : 1)	40 µl N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED)
1 Löffel Amberlite	

Zunächst wird das TBE mit Hilfe einer Vakuumpumpe durch einen sterilen 0.45µm Sartoriusfilter entgast. Anschließend wird ein Gemisch aus Harnstoff, Aqua dest., Acrylamid, sowie einem Löffel Amberlite nach 15minütigem Rühren durch den gleichen Filter 20 min. entgast. Nach einem weiteren kurzen Durchmischen werden der entgasten filtrierten Lösung das APS und das TEMED zugefügt und direkt im Anschluss gegossen. Dieses Gießen muss zügig und ohne Luftblasenbildung erfolgen, da ansonsten der Lauf behindert würde. Die anschließende Polymerisierung nimmt mindestens 2 Stunden in Anspruch. Die fertigen Gele werden aufrecht in den A.L.F.express II DNA Sequencer eingehängt, 0.6 x TBE-Puffer dient als Laufpuffer.

Die Laufbedingungen für die Klonalitäts-Analyse sind:

- 1500 Volt
- 34 mA
- 38 Watt
- Temperatur 40°C
- 300 min.
- Sample Intervall 2 sec.

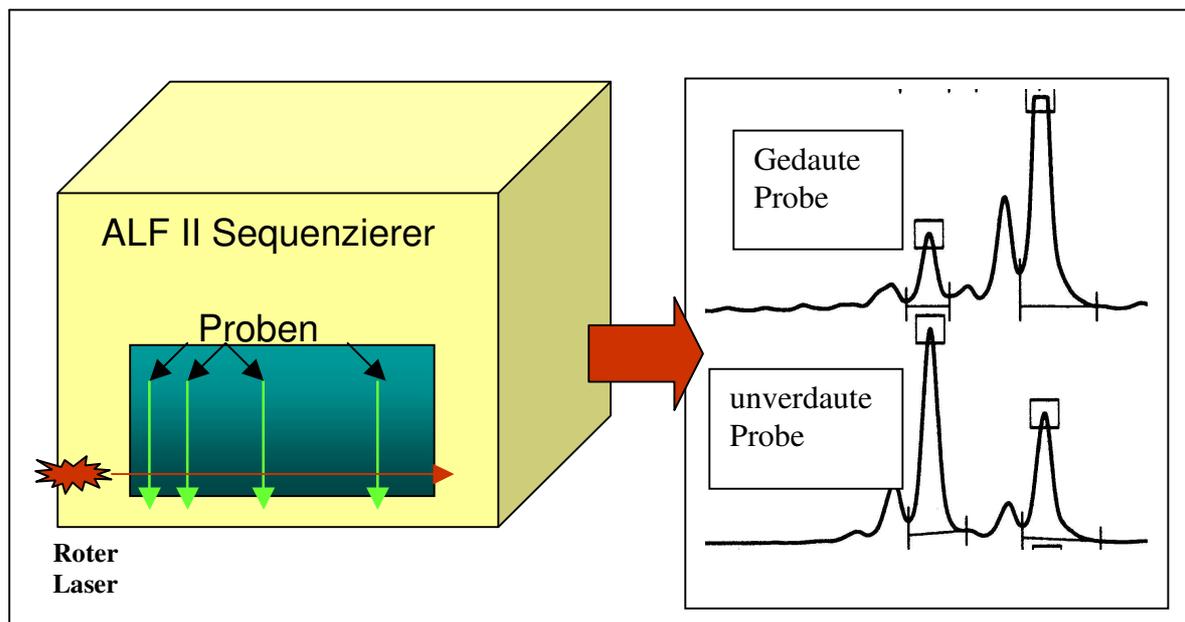


Abb.2.7. Beispiel der Fragmentanalyse im Rahmen des HUMARA mittels ALF II Sequencer

2.13. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten erfolgt im Rahmen der Sequenzierung von N-ras und Ki-ras PCR-Produkten im internen Vergleich der AISA-Patientinnen.

unter Verwendung eines Qiagen Gel Extraktions- Kit

Dieses Kit ist insbesondere geeignet, basierend auf pH-abhängiger Absorptionschromatografie, DNA Fragmente aus Agarosegelen zu extrahieren und aufzureinigen. Nachdem die gewünschte Bande mit einem Skalpell aus dem Agarosegel herausgeschnitten und gewogen wurde, erfolgt die Isolierung indem das Gelstück bis zur vollständigen Lyse bei 50 °C in einem äquivalenten Lysepuffer inkubiert wird. Nach Zugabe von einem Gelvolumen Isopropanol wird das Lysat auf die mitgelieferte Chromatographiesäule pipettiert und zentrifugiert. Es folgen 2 Waschschrte bevor das aufgereinigte PCR-Produkt von der Säule eluiert werden kann. Die Elution erfolgt mittels eines mitgelieferten Puffers über eine pH-Wert Änderung.

2.14. Sequenzierung

2.14.1. Gelkammern für Sequenzierungsgele

Bezüglich des Zusammenbaus der Gelkammern für die Sequenzierungsgele wird auf die Ausführungen unter Punkt 2.12.1. zum Zusammenbau der Gelkammern für die Klonalitäts-Analyse verwiesen, da die Gelkammern identisch sind.

2.14.2. Herstellen eines Sequenzierungsgeles

Die Herstellung eines Sequenzierungsgeles erfolgt analog zur Herstellung eines 0.5 mm dicken, 6 %igen Polyacrylamidgels für die Klonalitäts-Analyse, hierbei unterscheiden sich lediglich die Zusammensetzung des Gels sowie die Laufbedingungen wie folgt:

6 ml 6xTBE	
25.2 g Harnstoff	
25.5 ml Aqua dest. (autoklaviert)	200µl APS (10 %)
9 ml Acrylamid (40 % 19 : 1)	40 µl TEMED
1 Löffel Amberlite	

Die Laufbedingungen für die Sequenzierungs-Analyse sind:

1500 Volt
38 mA
30 Watt
Temperatur 50 °C

2.14.3. Sequenzierungsreaktion mit Thermo Sequenase DNA Polymerase

Hintergrund einer Sequenzierungsreaktion ist der nukleotidspezifische Kettenabbruch einer DNA-Polymerase-Reaktion. In diesem Fall handelte es sich um die Thermo Sequenase DNA Polymerase von Amersham. Thermo Sequenase ist eine hitzestabile, Exonuclease-freie DNA Polymerase.

Hierbei werden Didesoxy-Nukleotide verwendet denen die 3'-OH-Gruppe fehlt, so dass sie mit keinem weiteren Nukleotid eine Phosphatbrücke bilden können, d.h. ihr Einbau führt zum Kettenabbruch. Das hierfür verwendete Kit enthielt folgendes:

A Reagenz: Tris-HCl (pH = 9.5), Magnesiumchlorid, Tween™ 20, Nonidet™ P-40, 2-Mercaptoethanol, dATP, dCTP, 7-deaza-dGTP, dTTP, ddATP, thermostabile Pyrophosphatase und Thermo Sequenase DNA Polymerase

C Reagenz: Tris-HCl (pH = 9.5), Magnesiumchlorid, Tween™ 20, Nonidet™ P-40, 2-Mercaptoethanol, dATP, dCTP, 7-deaza-dGTP, dTTP, ddCTP, thermostabile Pyrophosphatase und Thermo Sequenase DNA Polymerase

G Reagenz: Tris-HCl (pH = 9.5), Magnesiumchlorid, Tween™ 20, Nonidet™ P-40, 2-Mercaptoethanol, dATP, dCTP, 7-deaza-dGTP, dTTP, ddGTP, thermostabile Pyrophosphatase und Thermo Sequenase DNA Polymerase

T Reagenz: Tris-HCl (pH = 9.5), Magnesiumchlorid, Tween™ 20, Nonidet™ P-40, 2-Mercaptoethanol, dATP, dCTP, 7-deaza-dGTP, dTTP, ddTTP, thermostabile Pyrophosphatase und Thermo Sequenase DNA Polymerase

Das in den einzelnen Reagenzien vorhandene 7-deaza-dGTP dient der Vermeidung von Kompressionsartefakten während der Gelelektrophorese.

Sequenzierungsprimer (Cy5 markiert)

M 13	Universal 5' TGT AAA ACG ACG GCC AGT 3'
M 13	Reversal 5' CAG GAA ACA GCT ATG ACG 3'

Folgender Ansatz wurde für die Sequenzierung gewählt:

5 µl aufgereinigtes PCR-Produkt
 1 µl Primer (Reversal oder Universal 1 pM/µl)
2 µl A-, C-, G- oder T-Mix
 8 µl gesamt

Bedingungen für die Sequenzierungsreaktionen sind wie folgt:

Bedingungen: <u>Reversal Primer</u>	<u>Universal Primer</u>
<u>95°C 5 min.</u>	<u>95°C 5 min.</u>
55°C 30 sec.	60°C 30 sec.
95°C 30 sec.	95°C 30 sec.
30 Zyklen	30 Zyklen

Nach 30 Zyklen wurde die Reaktion durch die Zugabe von 5 µl Stop-Lösung (ALF-Puffer) beendet.

A.L.F.-Puffer: 100 ml Formamid mit 5 g Amberlite deion. + 500 mg Dextranblau;
2 Std. mischen; durch 0.4 µm Filter filtrieren; + 4 ml 20 mM EDTA,
pH = 8.3

Zur Analyse der Proben auf einem A.L.F.express[®] ist zunächst eine Denaturierung bei (95°C) sowie eine anschließende Abkühlung auf Eis erforderlich, um Sekundärstrukturen zu verhindern.

Die Fluoreszenz der Cy5 markierten PCR-Produkte wird durch einen Laserstrahl im unteren Drittel des eingehängten Polyacrylamidgels angeregt. Die Detektion der emittierten Strahlung über Photodioden erfolgt senkrecht zum Laserstrahl (Helium-Laser, Wellenlänge 632.8 nm, Laserpower 7,5 mW). Den Detektoren sind hierbei optische Filter zum Eliminieren der Streustrahlung, sowie der Hintergrundstrahlung vorgeschaltet. Die während des Laufs ermittelten Werte werden gespeichert und im weiteren Verlauf mit Hilfe einer speziellen Software (Alfwin[™] Sequence Analyser 2.00, Pharmacia Amersham Bioscience) ausgewertet. Dabei wurden die gespeicherten Werte direkt prozessiert und in eine Sequenz "übersetzt".

2. 14. 4. Analytierte Sequenzen der ras-Gene

Die Analyse umfasst die Abschnitte des ersten und zweiten Exons der Gene N-ras und Ki-ras, da sich hier jeweils in den Bereichen der Codons 12 und 13 bzw. 61 die bekannten Hot Spots für Mutationen befinden (Lyons et al., 1988; Lowy und Willumsen, 1993; Constantinidou et al. 1997; Souza Fernandez et al. 1998). Die Wildtypsequenzen finden sich in Tabelle (X-1) im Anhang.

2.15. ATLAS-SMART™-Protokoll (Clontech)

Für die SMART™ Technologie (Barnes, 1994), die aus sehr geringen RNA-Ausgangsmengen ausreichende Mengen cDNA herstellt, ist bei der Verwendung der Clontech Arrays ein spezielles Protokoll vorgeschrieben, welches sich in mehreren Punkten von den Standard - Protokollen unterscheidet. Aus diesem Grund sind hier die cDNA-Synthese und die PCR-Protokolle gesondert aufgeführt.

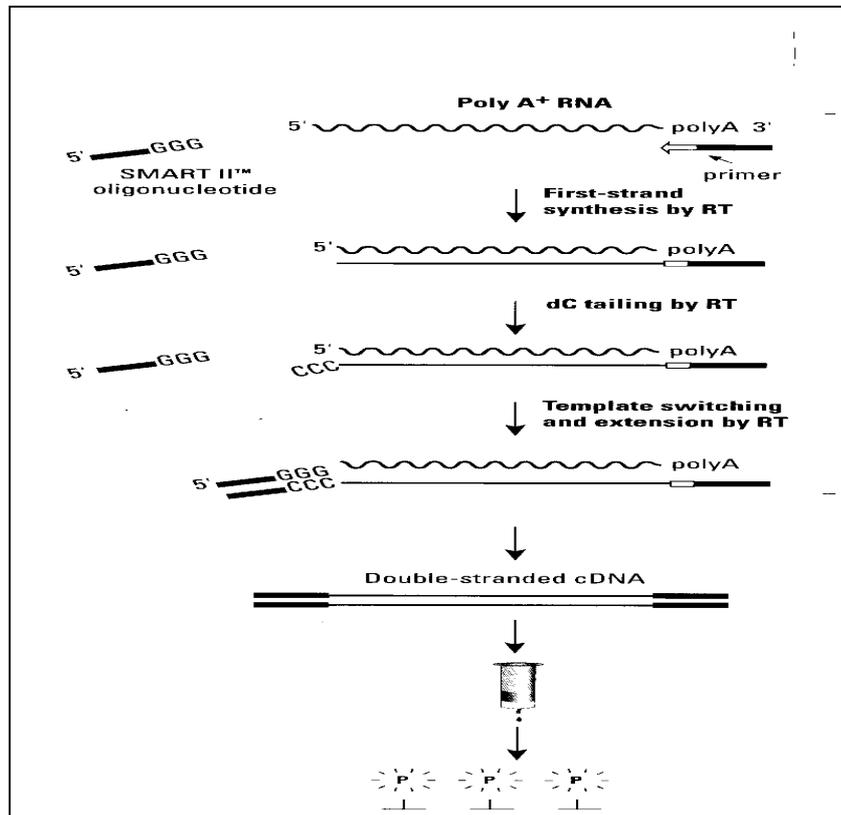


Abb.2-8 cDNA-Synthese mit SMART™ Technologie (CLONTECHniques January 2002, 27)

2.15.1. Erststrang cDNA Synthese:

Es werden 0,05-1 µg RNA in 1- max. 3,5 µl (Kontroll-RNA = 1µg/µl) verwendet, bei einer geringeren Konzentration der RNA muss zunächst das Volumen mit Hilfe einer Vakuumentrifuge auf den oben genannten Wert reduziert werden. Die RNA wird zusammen mit folgenden Zutaten in ein steriles 0,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und vorsichtig mit der Pipette gemischt, anschließend kurz abzentrifugiert und über 8 min. bei 70°C inkubiert.

1 µl CDS Primer (10µM)
 1 µl SMART II Oligos (10µM)
 und x µl dH₂O
 ges. 5,5 µl

In der Zwischenzeit wird der Master Mix wie folgt angesetzt:

5x First Strand Puffer	2 µl je Probe
DTT (20 mM)	1 µl
50x dNTP Mix (10 mM)	1 µl
ges. RevT Master Mix	4 µl je Probe

Nach der Inkubation werden die Proben 2 min. auf Eis gekühlt und kurz abzentrifugiert.

Anschließend durchlaufen die Proben eine weitere 2-3minütige Inkubation bei 42°C, bevor sie mit 4,5 µl, des pro rxn um 0,5 µl RNAse H⁻ MMLV Reverse Transkriptase (RevT = RT in der Abbildung 2.8) erweiterten, RevT Master Mix vermischt werden. Es schließt sich eine 1stündige Inkubation bei 42°C in einem Cycler an, bevor die Proben auf Eis gesetzt werden.

Das entstandene Produkt der Erststrang Synthese wird mit 40 µl TE-Puffer (10 mM Tris [pH 7,6], 1 mM EDTA) verdünnt bevor es, nach einer 7minütigen Erhitzung auf 72°C, für bis zu 3 Monate bei – 20°C aufbewahrt werden kann.

2.15.2. cDNA Amplifikation mit Long Distance (LD) PCR

Bei der cDNA Amplifikation mit Long Distance (LD) PCR handelt es sich um eine PCR die über eine Zyklenabhängigkeit optimiert wird, die Anzahl der PCR Zyklen hängt dabei wiederum von der Menge der Gesamt-RNA ab, die in die Erststrang-Synthese eingesetzt wurde. Im vorliegenden Fall wurden PCRs mit 15, 18, 21 und 24 Zyklen durchlaufen. Für jede Probe und Kontrolle wurde ein extra Gefäß verwendet.

RNA-Menge	<u>Tabelle für PCR</u>	Zyklenzahl
0,5 –1 µg		18-19
0,25-0,5 µg		19-20
0,1-0,25 µg		20-21
0,05-0,1 µg		21-22

Es wurden 5µl Erststrang cDNA mit 37 µl dH₂O in einem 0,5 ml Reaktionsgefäß gemischt, die Gefäße bei RT stehen gelassen und aus jeder Probe 2 Ansätze gefertigt.

Zusammensetzung des Master Mix ansetzen (je rxn):

5µl	10x Advantage 2 PCR Buffer
1µl	50x dNTP Mix (10 mM)
1µl	PCR Primer (10 µM)
1µl	50x Advantage 2 Polymerase Mix
8µl	Gesamtvolumen PCR Master Mix

Nachdem der Master Mix aus den o.g. Bestandteilen zusammengemischt, kurz gevortext und abzentrifugiert wurde, gibt man 8µl PCR Master Mix zu jeder Probe, die anschließend in den vorgeheizten Cycler gesetzt werden.

Zyklus-Parameter:	95 °C	1 min.
	95 °C	15 sec.
	65 °C	30 sec. x Zyklen (siehe Tabelle für PCR)
	68 °C	3 min.

Um die optimale Zyklenzahl herauszufinden wird eine extra Probe von jedem Ansatz genommen, indem man nach 15 Zyklen 10µl aus dem jeweiligen Ansatz in ein steriles Reaktionsgefäß überführt; die restlichen Proben werden im Kühlschrank aufbewahrt. Die verbleibenden 40µl durchlaufen die weiteren Zyklen bis zu einer Endzyklenzahl von 24, wobei nach jeweils 3 Zyklen weitere 10µl entnommen und in ein steriles Reaktionsgefäß überführt werden. Im Anschluss werden 5µl jedes PCR-Produktes auf einem

1,2 %igen Agarose Gel überprüft, wobei das Gel zu Dokumentationszwecken im Ethidiumbromid-Bad gefärbt und auf der UV-Platte fotografiert wird. Nach Feststellen der optimalen Zyklenzahl werden alle verbleibenden Proben aus dem Kühlschrank entnommen und bis zur gewünschten Zyklenzahl gefahren, bevor zu jeder PCR-Probe 2 µl 0,5M EDTA hinzugefügt werden, um die Reaktion zu stoppen.

2.15.3. Spin Column Aufreinigung der PCR-Produkte

Zur Aufreinigung müssen laut Hersteller die Säulen und Reagenzien aus dem Atlas SMART Probe Amplification Kit verwendet werden. Das Volumen der PCR-Produkte wird zunächst mit TE-Puffer, pH 7-7,5, auf ein Gesamtvolumen von 100 µl gebracht, bevor jeder Probe zusätzlich 400 µl Spezial-Puffer zugefügt werden. Die Proben werden auf den Filter der NucleoSpin Säule pipettiert und zentrifugiert. Es folgen 3 Waschschriffe. Ein Mal wird anschließend ohne Zusatz zentrifugiert um mögliche noch vorhandene Ethanolreste zu entfernen.

Die Elution der aufgereinigten Probe von der NucleoSpin Säule erfolgt nach einer Inkubation mit Spezial-Puffer durch eine letzte Zentrifugation. Es folgt die photometrische Konzentrationsbestimmung.

2.15.4. Überprüfung der cDNA Synthese mit dem RNA/cDNA Inspector Kit (Sigma)

Die 9 verschiedenen im Kit enthaltenen Primerpaare von 3 unterschiedlichen Housekeeping Genen dienen zur Überprüfung der Integrität und Qualität der RNA, sowie der cDNA Synthese Qualität. Bei den Housekeeping Genen handelt es sich um p619 (Rosa et al., 1996), β-Actin (Schliwa, 1986; Hermann, 1993) und GAPDH (Ishitani und Chung, 1996). Es können Transkripte von 1 kb bis 14 kb Länge nachgewiesen werden. Zu diesem Zweck sind die 7 Primer-Sets für p619 so gewählt, dass sie Bereiche im Abstand von 1-2 kb entlang der 15 kb langen codierenden Sequenz des p619 Gens amplifizieren. Mit β-Actin und GAPDH können DNA-Kontaminationen nachgewiesen werden. Bei einer optimalen cDNA-Synthese entsteht das Bild einer 100 bp Leiter auf dem Agarosegel.

2.15.5. SMART cDNA Proben Labeling

Die Umwandlung von 500 ng aufgereinigtem PCR-Produkt in ^{32}P – gelabelte cDNA, welche für die Array-Verwendung erforderlich ist, erfolgt wie folgt: 1,5 μl CDS™ Primer Mix werden mit 500 ng aufgereinigter SMART cDNA in einem 0,5-ml Reaktionsgefäß gemischt und bis zu einem Endvolumen von 34 μl Aqua dest. aufgefüllt. Es folgt eine Denaturierung der Proben, währenddessen der Master Mix angesetzt wird.

Dazu werden die folgenden Reagenzien in einem 0,5 ml Reaktionsgefäß bei RT (= Raumtemperatur) gemischt:

Je rxn:	10x Labeling Puffer	5 μl
	10x dNTP Mix (für dATP-Label)	5 μl
	<u>$(\alpha\text{-}^{32}\text{P})\text{dATP}$ (3000Ci/mmol, 10$\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$)</u>	5 μl
	Gesamtvolumen Master Labeling Mix	15 μl

Nach der Denaturierung folgt eine 2-3minütige Inkubation bei 50 °C. Im Anschluss werden jeder Probe 16 μl des mit 1 μl Klenow Enzym je rxn erweiterten Master Labeling Mix zugefügt und nach sofortigem Zurücksetzen weitere 30 min. bei 50 °C inkubiert.

Die Reaktion wird durch die Zugabe von 2 μl 0,5 M EDTA abgestoppt. Falls notwendig können die Proben jetzt ein paar Stunden bei 4 °C oder auf Eis gelagert werden.

2.15.6. Proben Aufreinigung mit dem NucleoSpin Extraction Kit (Clontech)

Um die gelabelten cDNA Proben von nicht aufgenommenen ^{32}P - Nukleotiden und kleinen (< 0,1 kb) cDNA Fragmenten zu reinigen werden sie bis zu einem Volumen von 400 μl mit Puffer aufgefüllt, und mit der Pipette gemischt.

Es folgt eine Zentrifugation der Proben auf NucleoSpin Extraction Säulen. Daran schließen sich drei 1minütige Waschschrte bei 13.000 rpm mit jeweils 350 μl Puffer an.

Die Elution der Probe erfolgt nach 2minütiger Inkubation bei RT durch erneute 1minütige Zentrifugation mit 100 μl Puffer.

Um die Radioaktivität der Proben über Szintillationsmessung zu bestimmen, werden jeweils 2 μl jeder gereinigten Probe separat in 5 ml Szintillationslösung gegeben und die Counts der einzelnen Proben gemessen. Die Radioaktivität der Proben sollte bei $>5 \times 10^6$ cpm liegen.

2.15.7. Array-Membran Hybridisierung bei Atlas™ Human 1.2 Arrays (Clontech)

Clontech Atlas™ Human 1.2 Arrays bestehen aus mit einer positiv geladenen Beschichtung versehenen Nylonmembran auf welche hunderte von cDNAs punktförmig aufgetragen sind. Diese vorgespotteten Membranen werden nun mit den aus den Patientenproben hergestellten Sonden hybridisiert.

Für jede Array-Membran wird aus ExpressHyb™ und SMART™ Blocking Solution eine niedrig-viskose Hybridisierungslösung vorbereitet, indem 5 ml ExpressHyb™ auf 68°C vorgewärmt, sowie 50µl 20x SSC und 50µl SMART™ Blocking Solution gemischt, 5 min. auf 95-100°C erhitzt und anschließend schnell auf Eis abgekühlt werden.

Die Mischung aus SMART™ Blocking Solution/20x SSC mit dem vorgewärmten ExpressHyb™ vermischen und bis zum Gebrauch bei 68°C lagern.

Währenddessen den Atlas Array in die Hybridisierungsflasche geben und mit 5 ml der vorher angefertigten Lösung 30 min. bei 68°C und konstanter Rotation prähybridisieren. 50µl 20x SSC und 50 µl SMART™ Blocking Solution zur aufgereinigten Probe geben, gut mischen und den Probenmix nach 5minütigem Aufkochen auf Eis setzen. Den Sondenmix dem Array und der Prähybridisierungslösung zufügen und 18 Stunden bei 68°C hybridisieren.

Am nächsten Tag die Waschlösungen auf 68°C vorwärmen. Die Hybridisierungslösung wird durch 200 ml vorgewärmte Waschlösung ersetzt. Den Atlas Array mehrmals 30 min. bei 68°C waschen. Abschließend einen letzten 5minütigen Waschschrift bei Raumtemperatur mit 200 ml 2x SSC durchführen.

Für 24-48 h den Array auf einen Phosphoimager Screen auflegen, in eine Expositionskassette legen, und in eine Schutzbox überführen, um die natürliche Hintergrundstrahlung abzuschirmen.

2.15.8. Auswertung der Arrays

Das Scannen der Screens erfolgt auf einem Phosphoimager mit einer Auflösung von 100 µm.

Die Ermittlung der Daten erfolgt mit Hilfe der BAS-Reader™ 3.01 Software und anschließender digitaler Auswertung durch das AIDA™ Image Analyzer 3.20 Programm, welches die Intensität von jeder der 1185 Genpositionen analysiert.

Dabei ist zu berücksichtigen, dass der Hintergrund jedes einzelnen Arrays regional variiert, die Subtraktion eines zu niedrigen Hintergrunds zur Überbewertung der Genexpression einzelner Gene führen kann, während die Subtraktion eines zu hohen Hintergrundwertes zum Wegfall der Auswertung bestimmter Gene führen würde. Um diese Fehlerquelle zu beheben wurde jeder Array in 6 Felder aufgeteilt, die jeweils 14x14 Gene, sowie eine Reihe mit 9 "Housekeeping" Genen enthalten.

In jedem Feld wurde nun der schwächste Expressionspunkt als visuelles Minimum festgelegt, sowie jeder Wert in diesem Feld, der unterhalb dieses visuellen Minimums liegt, gleich Null gesetzt.

Weiterhin beschränkt sich die Beurteilung auf Punkte, deren Bereich nicht von extremer Nachbarstrahlung überschattet wurde. Zuletzt wurde für jeden einzelnen Array jeweils die Intensität des schwächsten Punktes als minimaler Gesamt-Hintergrund abgezogen.

Mit Blick auf die Angaben des Herstellers, dass bei der Analyse menschlicher Zellen lediglich 25-40 % der dem Array vertretenen Gene exprimiert werden, ist die Verwendung der medianen Intensität aller

Gene auf dem Array zur Normalisierung der Daten nicht sinnvoll. Stattdessen wurde eine Reihenfolge der Expressionsintensitäten erstellt, die oberen 20 % wurden für die Kalkulation ihrer mittleren Intensität verwendet. Somit basiert die Normalisierung der Daten auf einer Berechnung der Ratio zwischen der um den Hintergrundwert korrigierten Intensität der Einzelpunkte und der oben erwähnten mittleren Intensität.

Da Genexpressionswerte nicht normal verteilt sind (Spanakis und Brouty-Boyé 1994), wurden die Unterschiede zwischen den normalisierten Expressionsdaten der 4 Patientengruppen mit Hilfe des U-Testes nach Mann, Whitney und Wilcoxon ermittelt. Bei einer Differenz des medianen Genexpressionswertes um den Faktor 2 und einem zweiseitigen p-Wert $<0,05$ gilt ein Gen zwischen zwei Gruppen als unterschiedlich exprimiert. Die abschließende Bündelung der Daten wurde mit Hilfe einer Cluster Software (Eisen et al., 1998) durchgeführt und als Dendrogramme dargestellt.

2.15.9. Qualitätskontrollen

Zusätzlich zu den erwähnten klassischen Kontrollen der cDNA-Qualität wurden intra- und inter-experimentelle Qualitätskontrollen durchgeführt, um zu kontrollieren und zu gewährleisten, dass die Ergebnisse reproduzierbar sind. Für die intra-experimentelle Kontrolle wurde eine cDNA-Probe aufgeteilt und simultan auf zwei verschiedenen Arrays hybridisiert.

Für die inter-experimentelle Kontrolle wurden sechs cDNA Proben von zwei Patienten an drei verschiedenen Tagen hybridisiert. Die daraus resultierenden Expressionswerte werden logarithmisch transformiert und in einem Streudiagramm gegeneinander aufgetragen. Zusätzlich wurden die Regressionsgrade und der Pearson's Korrelationskoeffizient kalkuliert. Abschließend wurde von jedem Gen der Variationskoeffizient von der Standardabweichung und der Mittelwert der Genexpression in der inter-experimentellen Kontrolle berechnet. Gene mit einem Variationskoeffizienten über 1,0 wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen.

2.16. LightCycler® Analysen / “Real - Time“ PCR

Zur Bestätigung der Ergebnisse der Array-Analysen auf DNA-Ebene wurden von der Arbeitsgruppe zusätzlich Analysen am LightCycler® durchgeführt.

2.16.1. Prinzip der DNA Detektion mit Hilfe des SYBR Green I Farbstoffs im LightCycler® System von Roche.

Der Fluoreszenz-Farbstoff SYBR Green I bindet an die schmalere Furche der DNA Doppelhelix. Im gelösten Zustand emittiert der Farbstoff nur eine geringe Fluoreszenz, diese wird aber durch die Bindung an die DNA verstärkt. SYBR Green I ist ein sehr stabiler Farbstoff (nur 6% Aktivitätsverlust in 30 Amplifikationszyklen) und die optischen Filter im LightCycler® Instrument sind speziell auf die emittierte Wellenlänge abgestimmt.

Die folgenden Abbildungen sollen die Technik verdeutlichen. Zu Beginn der Amplifikation, enthält der Reaktionsansatz die denaturierte DNA, die Primer, und den Farbstoff (Abb.2-9). Die ungebundenen Farbstoff-Moleküle geben nur eine sehr schwache Fluoreszenz ab, die lediglich eine minimale Hintergrund-Strahlung erzeugt, welche bei der abschließenden Computeranalyse subtrahiert wird.

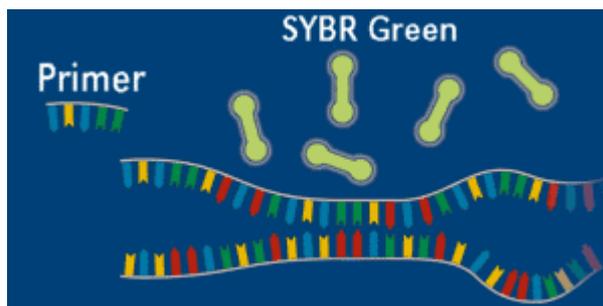


Abb.2-9 Beginn der Amplifikation (Quelle: <http://roche.com>)

Nach dem Annealing der Primer, binden sich einige Farbstoff-Moleküle an den Doppelstrang. Die DNA Bindung der SYBR Green I Moleküle führt zu einem Anstieg der Lichtemission bei Anregung (Abb.2-10).

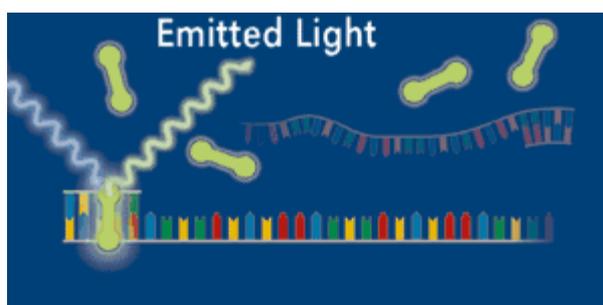


Abb. 2-10 Annealing mit Anstieg der Lichtemission (Quelle: <http://roche.com>)

Während der Elongation, binden sich immer mehr Farbstoff-Moleküle an die neu synthetisierte DNA. Die "Real-Time"-Überwachung der Reaktion zeigt einen kontinuierlichen Anstieg der Fluoreszenz (Abb.2-11). Bei der Denaturierung der DNA im nächsten Zyklus, werden die Farbstoff-Moleküle wieder freigesetzt und das Fluoreszenz-Signal fällt wieder ab.

Eine Überwachung des Anstiegs der amplifizierten DNA-Menge erfolgt durch die Messung der Fluoreszenz am Ende des Elongations-Schritts bei jedem Zyklus.

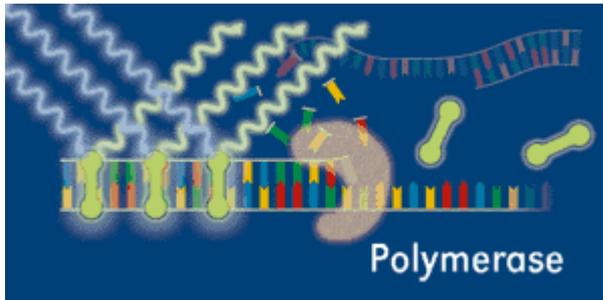


Abb.2.11 Anstieg der Fluoreszenz (Quelle: <http://roche.com>)

Zusammen mit einer Schmelzkurven - Analyse nach der PCR, ist SYBR Green I ein geeignetes Hilfsmittel für die spezifische Identifikation und Quantifizierung von PCR-Produkten.

2.16.2. "Real – Time" PCR

Die Analyse der folgenden Gene erfolgte mit Hilfe des LightCyclers®:

MMP11, CDKN1A, Cathepsin L, STK1, IEX-1L, XPB, TTP, MAD, GST, CXCR4, MCL, TIMP1, NM23B.

Als Kontrolle wurde das Housekeeping-Gen GAPDH verwendet.

Für den PCR-Ansatz wird die Template-DNA zunächst jeweils 1:5 und 1:10 verdünnt.

Dann wird der Mastermix vorbereitet:

Ansatz je Probe:	11,6 µl	dH ₂ O steril PCR grade
	2,4 µl	MgCl ₂ 4 mM
	1 µl	Primer forward 10 µM
	1 µl	Primer reverse 10 µM
	<u>2 µl</u>	<u>SYBR Green I</u>
	18 µl	gesamt

Die Kapillaren werden in die vorgekühlten LightCycler® Zentrifugen Adapter gesteckt und der Mastermix in die Kapillaren pipettiert. Vom vorverdünnten Template werden 2 µl hinzugefügt. Anschließend müssen die Kapillaren 10 sec. bei 1000 rpm abzentrifugiert werden. Die Kapillaren werden mit dem Deckel verschlossen und vorsichtig in das Karussell eingesteckt. Das fertig bestückte Karussell wird in den LightCycler® eingesetzt und der Lauf wird gestartet. Nach dem Lauf erfolgt die Schmelzkurven - Analyse und Auswertung mit Hilfe der LightCycler® Software 3.5.

2.16.3. Schmelzkurven-Analyse

Die Quantifizierung des PCR-Produktes erfolgt bei der Schmelzkurven-Analyse im Gegensatz zu den herkömmlichen PCRs völlig anders. Hier wird nicht die absolute Menge des PCR-Produktes gemessen, sondern die Kinetik der PCR-Reaktion ausgenutzt. In den frühen PCR-Runden findet im Wesentlichen eine exponentielle Vermehrung der DNA-Fragmente statt. In den späteren PCR-Runden kommt es dagegen zu immer mehr störenden Einflüssen. Zum einen durch die zunehmende Verknappung der einzelnen Zutaten wie z.B. Primer und Nukleotide, zum anderen durch die Hemmung der Reaktion z.B. durch die Anhäufung von Pyrophosphaten. Bei einer zunehmenden Zyklenzahl kommt es zu einer Verlangsamung des PCR-Verlaufs bis zum völligen Stillstand. Aufgrund dessen wird die Berechnung der Schmelzkurven-Analyse der Bereich der PCR genommen, in dem die Zunahme des PCR-Produktes noch exponentiell ist. Theoretisch wäre es möglich daraus auf die ursprüngliche Templatemenge zu schließen, wäre die genaue Vermehrungsrate bekannt. Da aber die Amplifikation von PCR-Produkten so vielen Faktoren unterliegt ist es leichter parallel bekannte Templatemengen, z.B. vom zu untersuchenden Gen und einem "Housekeeping-Gen", zu amplifizieren und zu vergleichen welchen C_T -Wert man für welche Templatemenge erhält. Daraus lässt sich dann eine Standardkurve erstellen, aus welcher der Rückschluss vom C_T -Wert auf die Templatemenge möglich ist. Auf diese Weise lässt sich die Expression zweier Gene direkt vergleichen.

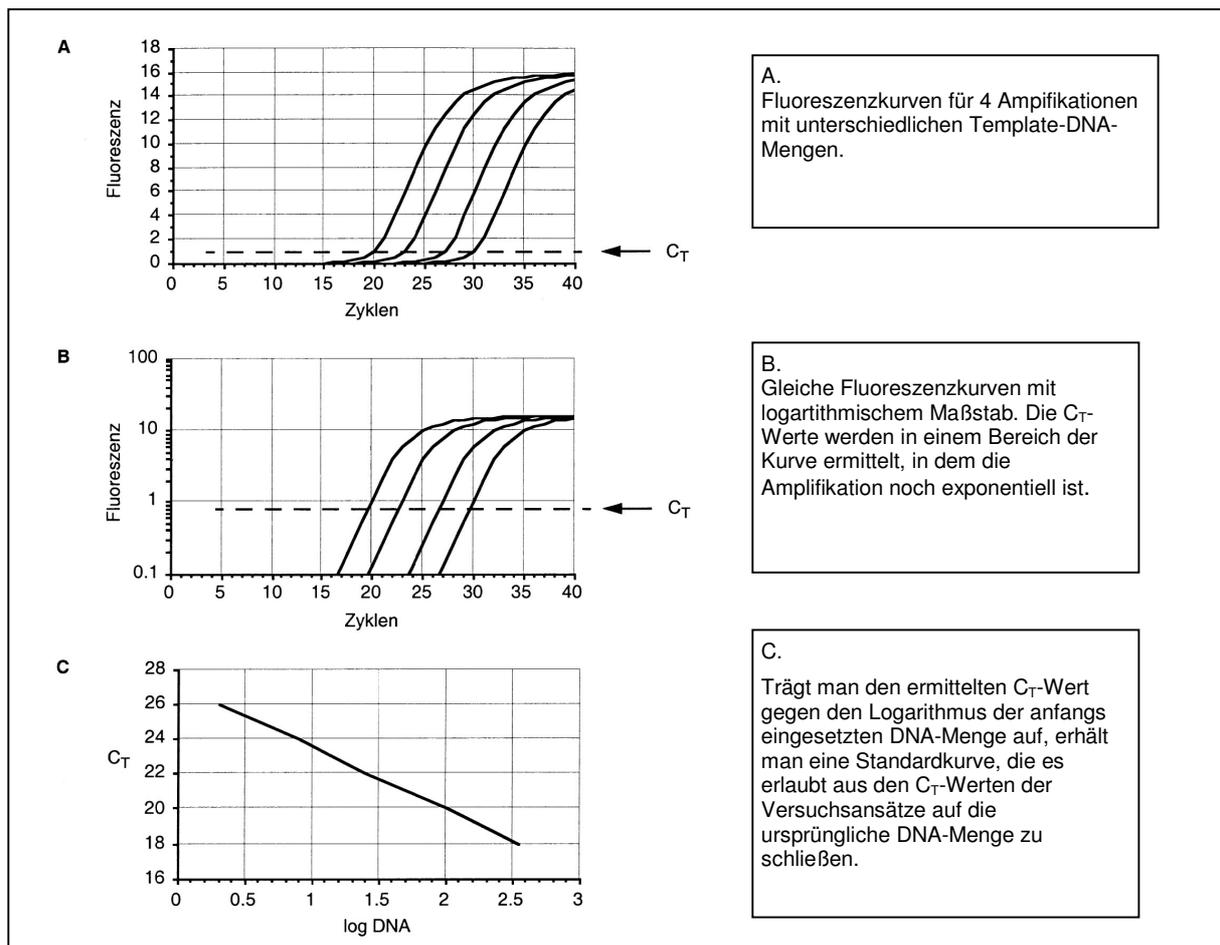


Abb. 2-12 Schmelzkurvenanalyse (aus: Der Experimentator: Molekularbiologie; Cornel Mülhardt; 2. Auflage; Spektrum Verlag)

3. Ergebnisse

3. 1. Klonalitätsanalysen

3. 1. 1. Heterozygotiefrequenzvergleich des humanen Androgenrezeptor (humAR)-Lokus für Knochenmark versus peripheres Blut

Für die Analyse der X-chromosomalen Inaktivierungsmuster (Lyon, 1961,1988) (XCIP = X-chromosome inactivation pattern) an Zellen der myeloischen Zellreihe wie z.B. Granulozyten, standen von 4 Patientinnen sowohl peripheres Blut als auch Knochenmark zur Verfügung. An diesen Proben wurden Paralleluntersuchungen (Tab.3-1) mit Hilfe des HUMARA = Human-Androgen-Receptor-Assay (Allen et al., 1992) durchgeführt (siehe Kapitel 2.11 + 2.12), ob sich ähnliche XCIP mit beiden Materialien nachweisen lassen.

Nr.	Material	CR-%	Klonalität
1	PMNC	64,00 %	Poly
	KM	53,95 %	Poly
2	PMNC	90,71 %	Mono
	KM	92,35 %	Mono
3	PMNC	89,05 %	Mono
	KM	97,72 %	Mono
4	PMNC	100,00 %	Mono
	KM	99,99 %	Mono

Tab.3-1 Ergebnisse der Klonalitätsanalysen im Vergleich zwischen peripherem Blut und Knochenmark

Bei allen Paralleluntersuchungen konnte eine hohe Übereinstimmung zwischen den Werten der Corrected Ratio (CR% = Ratio der verdauten Proben (Allel1/Allel 2) wird durch die Ratio der nativen Proben (Allel 1/Allel 2) geteilt) festgestellt werden. Das bedeutet die Vergleichsanalyse der XCIP-Muster zwischen Knochenmark und Zellen des peripheren Blutes ergab vergleichbare Ergebnisse.

humAR	Häufigkeit	Prozentanteil der analysierten Patientinnen mit entsprechendem Allelmuster
<i>Heterozygot</i>	120	86
<i>Homozygot</i>	19	14
<i>Gesamt</i>	139	100

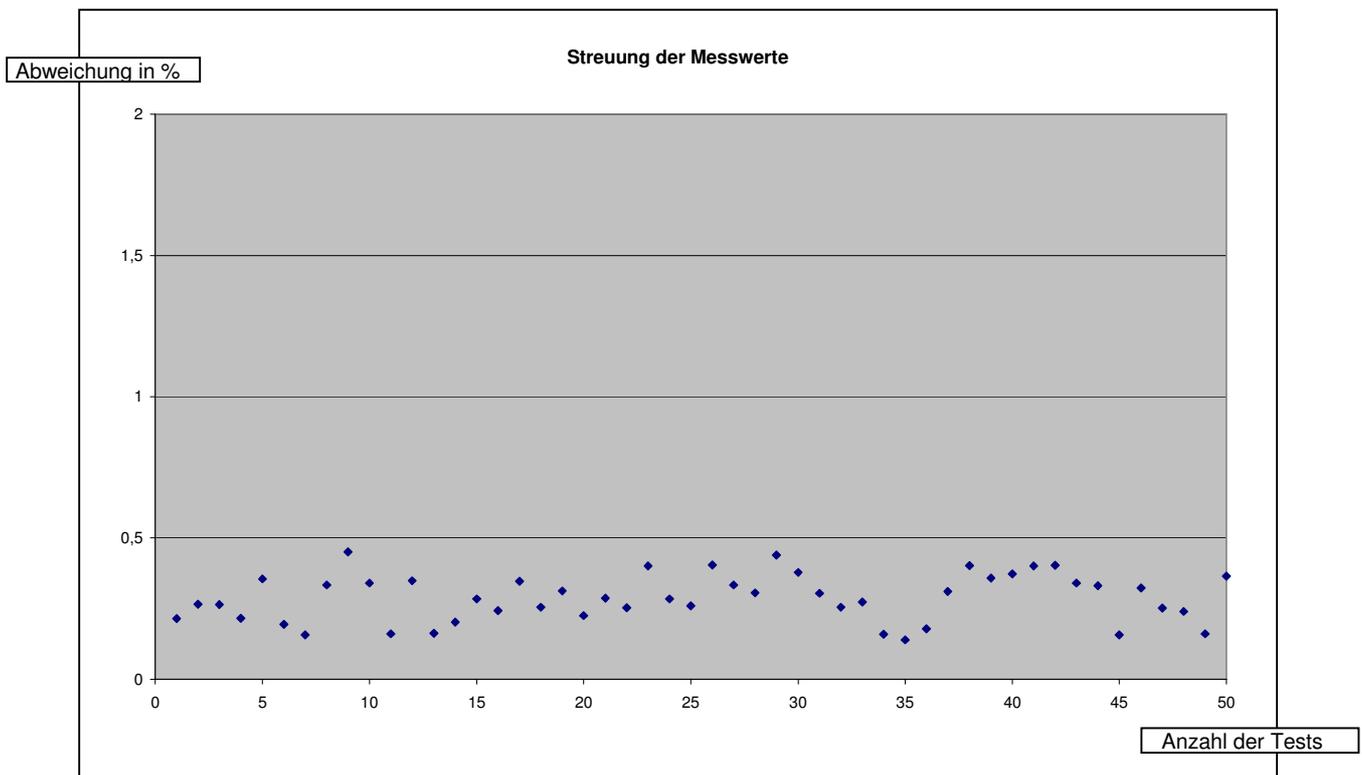
Tab. 3-2 Allelverteilung bei den analysierten Patientinnen

Für die Klonalitätsanalyse auswertbar sind lediglich die Patientinnen mit einer Heterozygotie für den humAR-Lokus (Tabelle 3-2), da sich bei einer Homozygotie die Signale der Allele überlagern würden. Das bedeutet 120 Patientinnen ließen sich für die Klonalitätsanalyse auswerten. Von diesen 120 Frauen wurden 10 von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Ausschlüsse erfolgten sicherheitshalber, wenn in den Rohdaten die Peakhöhe beider Signale mit einer "Area under Curve" <100 schlecht reproduzierbar war, oder wenn der Quotient der Allelsignale der Nativ- Proben >3 war. Ein derartiger Quotient ließ Störeinflüsse wie z.B. eine zu hohe Salzkonzentration in der PCR vermuten (van Dijk, 2002).

Aus der Gruppe der gesunden Kontrollen waren 28 (82,3 %) Frauen heterozygot. Von diesen wurden 12 aus den oben genannten Gründen von der weiteren Analyse ausgeschlossen.

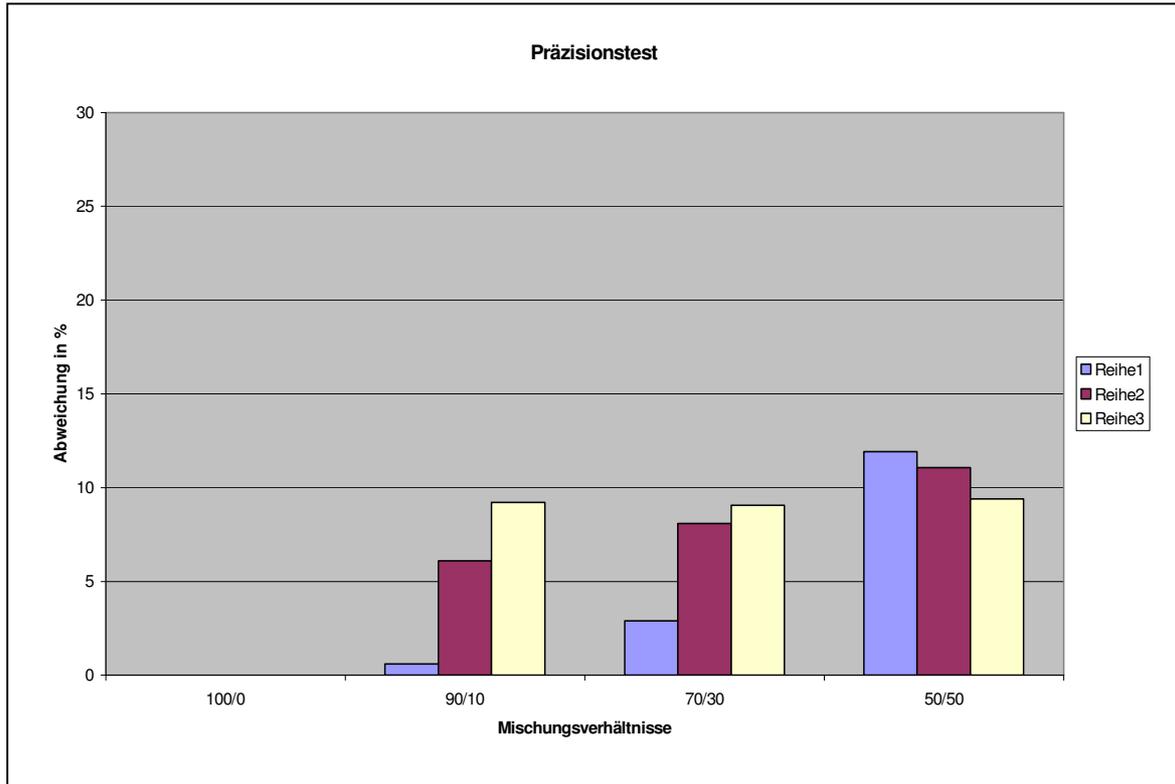
3. 1. 2. Überprüfen der Methodik und Bestimmung der Klonalität

Zum Nachweis der Reproduzierbarkeit der Klonalitätsanalyse wurde die DNA einer gesunden Person 50x getestet (Diagramm 3-1). Bei der Auswertung der Proben wurden jeweils die Ergebnisse der Peakhöhen bzw. der Area under Curve verglichen. Da die Proben in immer der gleichen Menge verwendet wurden sollten die Ergebnisse dies widerspiegeln. Die folgende Abbildung zeigt, dass die Streuung der Messwerte eine gute Reproduzierbarkeit erkennen lässt.



Diag. 3-1 Analyse zur Reproduzierbarkeit der Methode

Um die Präzision des HUMARA zu bestimmen wurden bei drei Testreihen bestehend aus jeweils 4-7 Proben (siehe Anhang Tabelle X5) die DNA von zwei gesunden Probanden unterschiedlichen Geschlechts (Homozygote Frau bzw. Mann) in verschiedenen Mischungsverhältnissen verwendet und analysiert. Bei diesen Tests zur Bestimmung der Präzision des HUMARA stellte sich heraus, dass keine einheitliche Präzisionsbestimmung möglich ist. Je näher sich das Mischungsverhältnis der DNA der Probanden einem Verhältnis von 1:1 näherte, desto ungenauer wurde der Test (Diagramm 3-2).



Diag. 3-2 Analyse zur Präzision der Methode in verschiedenen Mischungsverhältnissen

Des Weiteren wurde eine genaue vergleichende Analyse der Messergebnisse von 50 Proben im Bereich der „Area under Curve“, sowie unter Berücksichtigung und Berechnung der Problematik des durch die PCR-Methodik bedingten Entstehens einer Schulter vor dem eigentlichen Peak durchgeführt. Dazu wurden 50 verschiedene native Proben von heterozygoten Frauen aus verschiedenen PCR-Läufen betrachtet und hier jeweils das Verhältnis der Peaks der Allelvarianten zueinander, sowie der Peaks zu ihren Schultern berechnet. Dabei ergaben sich die folgenden Ergebnisse:

Die Schulter des Allels A verhält sich zu Allel A (Tab.3-3 + Tab.3-4) wie die Schulter von Peak B zu Allel B (Tab.3-5 + Tab.3-6). Die Peakhöhen des kürzeren Allels A sind durch die präferentielle Amplifikation während der PCR etwa 1,2fach größer als bei Allel B.

Anzahl N		VAR00001	VAR00002
Parameter der Normalverteilung	Mittelwert	50	50
	Standardabweichung	938,3800	4038,1799
Extremste Differenzen	Absolut	645,3029	2472,7881
	Positiv	0,151	0,137
	Negativ	0,151	0,137
		-0,122	-0,119
Kolmogorov-Smirnov-Z		1,070	0,968
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)		0,202	0,306
VAR00001	Werte der Schultern		
VAR00002	Werte der Peaks		

Tab.3-3 Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest für Schulter A zu Allel A

		VAR00001	VAR00002
VAR00001	Korrelation nach Pearson	1,000	0,707
	Signifikanz (2-seitig)	0	0
	N	50	50
VAR00002	Korrelation nach Pearson	0,707	1,000
	Signifikanz (2-seitig)	0	0
	N	50	50

Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.

Tab.3-4 Korrelationen von Schulter A zu Allel A

In Abbildung 3-1 sind die Problematik der Schulterbildung, als PCR- Artefakt (durch „Abrutschen“ der Polymerase), sowie die präferentielle Amplifikation des kürzeren Allels dargestellt. Auch hierbei handelt es sich um ein Problem der PCR-Methode. Das in der Abbildung dargestellte Allel A ist einige Triplets kürzer als das abgebildete Allel B und wird daher im Verlauf der PCR stärker amplifiziert als das längere Allel B. Der dargestellte Peak von Allel A ist stärker ausgeprägt und wird in der Elektrophorese zeitlich eher abgebildet als der Peak von Allel B. Bei einer Homozygotie würden diese beiden Peaks sich überlagern und wären damit nicht auswertbar, da keine Unterschiede mehr erkannt werden könnten.

Abb.3-1 Peakdarstellung in der Klonalitätsanalyse

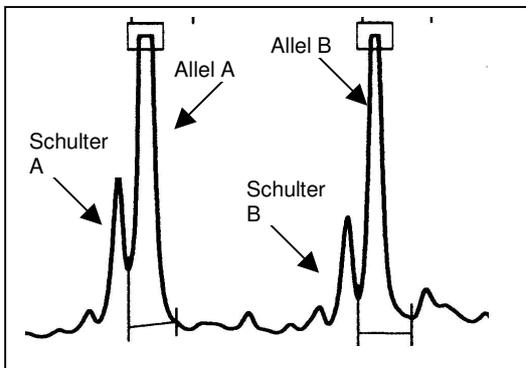
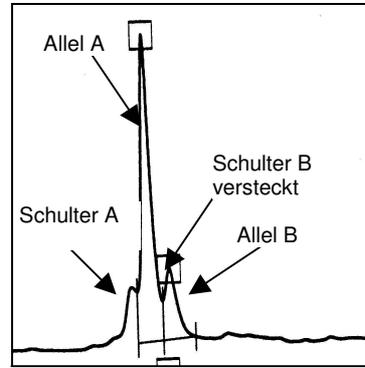


Abb.3-1.1 Peak mit versteckter Schulter



		VAR00001	VAR00002
N		50	50
Parameter der Normalverteilung	Mittelwert	804,6400	3275,1399
Extremste Differenzen	Standardabweichung	566,7004	2507,4753
	Absolut	0,148	0,178
	Positiv	0,148	0,178
	Negativ	-0,137	-0,152
Kolmogorov-Smirnov-Z		1,046	1,259
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)		0,224	0,084

VAR00001 = Werte der Schultern
VAR00002 = Werte der Peaks

Tab.3-5 Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest für Schulter B zu Allel B

		VAR00001	VAR00002
VAR00001	Korrelation nach Pearson	1,000	0,765
	Signifikanz (2-seitig)	0	0
	N	50	50
VAR00002	Korrelation nach Pearson	0,765	1,000
	Signifikanz (2-seitig)	0,000	0
	N	50	50
Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.			

Tab.3-6 Korrelationen von Schulter B zu Allel B

Somit lässt sich mathematisch die Höhe der Peaks bzw. die „Area under curve“ um die Höhe der versteckten Schulter korrigieren und die Ermittlung des Anteils klonaler Zellen kann mit Hilfe der korrigierten Peakhöhen berechnet werden.

3. 1. 3. Klonalitäten in der Gesamtanalyse

Von 110 auswertbaren Patientinnen wiesen 90 (81,8 %) ein klonales XCI – Muster der Granulozyten mit einem Klonprozentsatz größer 50% auf, während die übrigen 20 Patientinnen (18,2 %) einen Klonprozentsatz zwischen 0,01 und 47 % aufwiesen. Bei der Analyse der T-Lymphozyten zeigten 24 (21,8 %) der Patientinnen ein klonales Muster während 86 (78,2 %) der Patientinnen hier keine Klonalität aufwiesen. Die genannten 24 Patientinnen, die klonale XCI - Muster in den Lymphozyten aufwiesen, zeigten dies ebenfalls in den Granulozyten, so dass hier von einer „skewed Lyonisation“ (Gale et al.,1997; Tonon et al., 1998; Busque et al.,1996; Champion et al., 1997; Migeon et al., 1998), also einer angeborenen oder erworbenen Ungleichverteilung bei der X-Chromosomalen Inaktivierung, auszugehen ist.

3. 1. 3.1. Subanalysen: RARS (Uni-lineage Dysplasie der Erythrozyten mit Ringsideroblasten)

In der Gruppe der erworbenen idiopathischen sideroblastischen Anämien (AISA) lassen sich zwei Gruppen (nach WHO klassifiziert) unterscheiden, die Gruppe der RCMD +RS-Patientinnen (n = 19) und die Gruppe der RARS-Patientinnen (n = 14). In der Gruppe der RCMD +RS -Patientinnen finden sich Patientinnen mit einem Alter von 31-98 Jahren (Median = 72). Eine dieser Patientinnen weist in den Granulozyten ein polyklonales XCIP auf, während 18 Patientinnen ein klonales XCIP-Muster aufweisen. Bei neun der Patientinnen mit einem klonalen XCIP liegt eine "skewed Lyonisation" vor. Die RARS-Patientinnen haben ein Alter von 49-92 Jahren (Median = 76). Drei zeigen ein polyklonales Muster in den Granulozyten, während 11 eine "skewed Lyonisation" aufweisen.

3. 1. 3.2. Subanalysen: RCMD+RCMD+RS versus RA + RARS (multilineären Dysplasie ± Ringsideroblasten versus unilineären Dysplasie ± Ringsideroblasten)

Die RCMD +RS und die refraktäre Zytopenie mit multilineären Dysplasien, sowie die RARS und die reine refraktäre Anämie wurden zusammengefasst.

Es gibt insgesamt 19 Patientinnen die eine reine Anämie (RARS) haben. Bei den auswertbaren Patientinnen (49 - 92 Jahre) mit dem Altersmedian von 76 Jahren, finden sich zwei Patientinnen mit einer monoklonalen Granulozyten - Population. Drei Patientinnen sind polyklonal und 12 (70,6 %) Patientinnen weisen eine "skewed Lyonisation" auf.

In der Gruppe, der RCMD-Patienten (17 – 98 Jahre) mit einem Altersmedian von 72 Jahren, sind sechs von 36 Patientinnen nicht auswertbar. Von den auswertbaren Patientinnen zeigen 26 eine klonale Granulozyten - Population, wobei 14 von diesen ein Skewing der T-Zellen aufweisen. Bei den restlichen vier Patientinnen lässt sich keine Klonalität nachweisen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass von den 19 Patientinnen mit reiner Anämie (RA) 66,6 % ein Skewing aufweisen, während dies in der Gruppe der 36 Patienten mit RCMD bei 43,7 % der Fall ist. Alle RARS-Patientinnen ohne Skewing weisen Polyklonalität auf. Bei den RCMD-Patientinnen zeigen 13,3 % polyklonale X-Chromosomale Inaktivierungsmuster und 86,7 % klonale XCIP der Granulozyten.

3. 1. 3.3. Subanalysen: Knochenmarkblastenanteil kleiner oder gleich 10 %

58 der 110 auswertbaren Patientinnen weisen einen Blastenanteil von kleiner oder gleich 10 % auf (Tabelle 3-7), wobei 44 einen Anteil kleiner oder gleich 5 % haben. Das bedeutet, dass etwas über die Hälfte der untersuchten Patientinnen laut IPSS System in die Gruppe der Low oder Intermediate I Gruppe einzuteilen sind, und so gemäß der Definition signifikante Prognosevorteile bei den Überlebenswahrscheinlichkeiten haben.

Klonale Verteilung	n	[%]	RARS+RA	RCMD+RS	5q-	RAEB I
[%]			29,3	41,4	13,8	15,5
n	58	100	17	24	8	9
klonal	23	39,6	2 (11,8 %)	11 (45,8 %)	5 (62,5 %)	5 (55,5 %)
skewed	27	46,5	12 (70,6 %)	9 (37,5 %)	2 (25 %)	4 (44,5 %)
polyklonal	8	13,9	3 (17,6 %)	4 (16,7 %)	1 (12,5 %)	-

Tab.3-7 Patientenzahlen und Klonalitätsmuster der Patienten mit Blastenanteilen kleiner oder gleich 10%

Die beiden zuvor analysierten zusammengefassten Subgruppen der reinen Anämien und der RARS+RA machen über 70 % der Patienten mit den bereits erwähnten Klonalitätsmustern aus.

In der weiteren Analyse zeigte sich, dass in der Gruppe der 5q- Patienten, vier von 12 Patientinnen nicht auswertbar waren. Von den acht analysierbaren Patientinnen sind zwei Patientinnen (25 %) skewed, während fünf Patientinnen (62,5 %) ein klonales X-Chromosomales Inaktivierungsmuster der Granulozyten aufweisen. Eine Patientin zeigt ein nicht klonales Muster.

Von 11 Patientinnen mit RAEBI sind zwei Patientinnen nicht auswertbar. 44,5 % der Patientinnen weisen ein Skewing der X-Chromosomalen Inaktivierung auf und 55,5 % zeigen ein klonales XCIP in den Granulozyten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die Gruppe der 17 Patientinnen mit reiner Anämie (RARS+RA), bei den 58 Patientinnen die einen Blastenanteil im Knochenmark von kleiner oder gleich 10 % aufweisen, bezüglich der Klonalitätsmuster von den anderen Patientengruppen unterscheidet.

Der Anteil der Patienten mit einem Skewing liegt hier mit 70,6 % sehr hoch, während der Anteil der klonalen Patienten mit 11,8 % deutlich kleiner ist als in den anderen Patienten-Subgruppen.

Die Patientinnen der 5q- und RAEB I Subgruppen weisen zusammengenommen folgende Verteilungen auf: insgesamt fünf (22,7 %) von 22 Patientinnen waren nicht analysierbar. Sechs Patientinnen (35,3 %) weisen ein Skewing der X-Chromosomalen Inaktivierungsmuster auf. 10 (58,8 %) der Patientinnen zeigen ein monoklonales XCIP der Granulozyten und eine Patientin (5,9 %) zeigt kein klonales Inaktivierungsmuster.

3. 1. 3.4. Subanalysen: Knochenmarkblastenanteil 10 % bis 20 % /Intermediate II IPSS

Klonale Verteilung	n	[%]	sAML	RAEB II
[%]		-	45,4	54,6
n	22	100	10	12
klonal	20	90,9	9	11
skewed	2	9,1	1	1

Tab.3-8 Patientenzahlen und Klonalitätsmuster der Patienten mit Blastenanteilen 10 - 20%

22, und somit 20 % der auswertbaren Patientinnen, mit einem Alter von 29 – 79 Jahren (medianes Alter 57) weisen einen Blastenanteil von 10 - 20 % im Knochenmark (Tabelle 3-8) auf und gehören somit dem IPSS Intermediate II Score, also der Gruppe mit einer eher schlechten Prognose an. In dieser Gruppe befinden sich zu 45,5 % (n = 10) Patientinnen mit einer sAML und 12 Patientinnen (54,6 %) leiden an einer RAEB II. 20 Patientinnen (90,9 %) weisen ein klonales XCIP auf, zwei Patientinnen (9,1 %) sind Skewed. Vier (14,3 %) von 26 Patientinnen lassen sich nicht auswerten.

3. 1. 3.5. Subanalysen: Knochenmarkblastenanteil größer 20 % /High Score IPSS

Klonale Verteilung	n	[%]	sAML	RAEB II	CMML
[%]		-	75	12,5	12,5
n	24	100	18	3	3
klonal	16	66,7	11	2	3
skewed	5	20,8	4	1	-
polyklonal	3	12,5	3	-	-

Tab.3-9 Patientenzahlen und Klonalitätsmuster der Patienten mit Blastenanteilen größer oder gleich 20%

Vierundzwanzig, d.h. 21,8 % der insgesamt auswertbaren 110 Patientinnen, mit einem Alter von 29 - 79 Jahren (medianes Alter 54) weisen einen Blastenanteil von ≥ 20 % im Knochenmark auf (Tabelle 3-9) und gehören somit dem IPSS High-Score, also der Gruppe mit der schlechtesten Prognose an.

In dieser Gruppe befinden sich zu 75 % (n =18) Patientinnen mit einer sAML.

Drei Patientinnen (12,5 %) leiden an einer CMML, die nach WHO nicht mehr zur Gruppe der MDS-Erkrankungen gehört, sondern eine eigene Gruppe bildet, und drei Patientinnen (12,5 %) leiden an einer RAEB II. Nimmt man die WHO Kriterien genau gehören allerdings alle Patienten mit mehr als 20 % Blasten bereits der Kategorie AML an und nicht mehr der Gruppe der MDS-Patienten.

16 Patientinnen (66,7 %) weisen ein klonales XCIP auf, fünf Patientinnen (20,8 %) sind Skewed und drei Patientinnen (12,5 %) zeigen ein polyklonales Inaktivierungsmuster. Zwei von 26 Patientinnen sind nicht auswertbar.

3. 1. 3.6. Subanalysen: Patienten mit polyklonalem Inaktivierungsmuster

Von den insgesamt 110, im Rahmen der Klonalitätsanalyse, analysierbaren Patientinnen zeigten 20 (18,2 %) Patientinnen mit einem Alter von 17-98 Jahren (Medianes Alter 59 Jahre) ein polyklonales Inaktivierungsmuster.

Die Subanalyse dieser polyklonalen Patientinnen wurde unter anderem bezüglich des Karyotyps durchgeführt, um festzustellen, ob der Karyotyp und die Zeit seit der Diagnosestellung als Einflussgeber auf die Prognose der Krankheitsentwicklung auch die Klonalität beeinflussen (Tabelle 3-10). Grundlage für diese Überlegungen ist das IPSS welches neben anderen Kriterien wie dem Prozentsatz der Knochenmarkblasten und der Entwicklung der Zytopenien, den Zusammenhang zwischen der Wahrscheinlichkeit der Entwicklung einer AML und den Veränderungen des Karyotyps korreliert (Greenberg et al., 1997). In den 20 analysierten Proben mit polyklonalem Inaktivierungsmuster fanden sich neben 2 normalen Karyotypen die folgenden Karyotypveränderungen: 5q-: Hierbei handelt es sich um den Verlust des langen Arms des Chromosoms 5. Der Verlust ist normalerweise interstitiell; der distale Bruchpunkt liegt üblicherweise im Bereich q32 und der proximale Bruchpunkt im Bereich von q12 oder q14 (van den Berghe et al., 1985); Trisomie 8; Veränderungen am Chromosom 7, insbesondere Monosomie 7, sowie komplexe Chromosomenveränderungen. Darunter versteht man Veränderungen an 3 oder mehr Chromosomen die parallel gefunden wurden. Schließlich gibt es noch die Gruppe der diversen Einzelaberrationen in der Chromosomenveränderungen an Einzelchromosomen zusammengefasst werden (Tab.3-10). Bei 11 Patientinnen wurde kein Karyotyp bestimmt.

Karyotyp Subtyp	n	[%]	normal	5q-	diverse Einzel	Trisomie 8	komplex und 7	Nicht bestimmt
n	20	100	2	1	2	2	2	11
[%]	100	-	10	5	10	10	10	55
nicht klass.	1	5	-	-	-	1	-	-
RARS	4	20	2	-	-	-	-	2
RA	1	5	-	-	-	-	-	1
RCMD	4	20	-	-	1	-	1	2
5q-	2	10	-	1	-	-	-	1
sAML	7	35	-	-	1	1	1	4
RAEB I	1	5	-	-	-	-	-	1

Tab.3-10 Subanalysen der polyklonalen Patientinnen bzgl. Karyotyp

Vergleicht man die Häufigkeiten der einzelnen Karyotypen, so stellt man fest, dass der normale Karyotyp mit 10 % anteilmäßig bei den polyklonalen Patientinnen seltener vorkommt als im gesamten analysierbaren Kollektiv von 99 Patientinnen, wo er mit insgesamt 20,1 % vertreten ist (Abb.2-5).

Im Gesamtkollektiv der bezüglich des Karyotyps analysierbaren Patientinnen (Abbildung 2-5) bildet der 5q- Befund die zweitgrößte Gruppe mit 10,8 %, während im Subkollektiv der Patienten mit polyklonalen XCIP die Gruppe der Patienten mit 5q- mit einem Anteil von 5 % die kleinste Gruppe darstellt. Dagegen sind die diversen Einzelaberrationen mit 10 % bei den polyklonalen Patienten häufiger zu finden, als mit 6,3 % im Gesamtkollektiv.

Trisomie 8 findet sich in der polyklonalen Subgruppe mit 10 % häufiger als in der Analyse aller Patientinnen, wo diese Veränderung lediglich mit 2,7 % vertreten ist. Komplexe Aberrationen finden sich in etwa gleicher Häufigkeit (Subanalyse 10 % und Gesamtanalyse 9 %).

Betrachtet man nun den Zeitraum seit Diagnosestellung, so sind aus dem Gesamtkollektiv der untersuchten Patientinnen 96 Frauen mit Zeiträumen von 0 - 258 Monaten (Median 136 Monate) auswertbar. Für 43 Patientinnen (30,9 %) gibt es dazu keine Angaben. Bei den 20 polyklonalen Patientinnen fehlen bei vier (20 %) die Angaben über den Zeitpunkt der Diagnosestellung. Hier sind 16 Patientinnen mit Zeiträumen von 0-72 Monaten (Median 40 Monate) seit Diagnosestellung auswertbar.

Der normale Karyotyp fand sich im analysierten Gesamtkollektiv zwischen 0 und 199 Monaten (Median 96 Monate) nach Diagnosestellung. Im Subkollektiv der polyklonalen Patienten fand sich der normale Karyotyp bei zwei Patientinnen, zwischen 0 und 65 Monaten (Median 32,5 Monate) nach Diagnosestellung.

Der Karyotyp 5q- fand sich im Gesamtkollektiv zwischen 0 und 258 Monaten (Median 59 Monate) nach Diagnosestellung, während er in der Subgruppe der polyklonalen bei einer Patientin nach 62 Monaten nachweisbar war. Die diversen Einzelaberrationen fanden sich im Gesamtkollektiv zwischen 0 und 113 Monaten (Median 32 Monate) nach Diagnosestellung und in der Subgruppe zwischen 0 und 1 Monat nach Diagnosestellung.

Die Diagnose Trisomie 8 wurde im Gesamtkollektiv in einem Zeitraum zwischen einem und 27 Monaten (Median 4 Monate) gestellt und in der polyklonalen Subgruppe nach vier Monaten. Auch der komplexe Karyotyp fand sich im Gesamtkollektiv zwischen 0 und 179 Monaten (Median 14 Monate) nach Diagnosestellung, in der polyklonalen Subgruppe bei einer Patientin nach sechs Monaten.

3. 2. AISA-Analysen

Zusätzlich zu den Klonalitätsanalysen wurde bei 36 Patientinnen (Tabelle 3-11) aus der MDS-Subgruppe der erworbenen idiopathischen sideroblastischen Anämien (AISA) ein Mutationsscreening der ras-Gene mittels Sequenzierung durchgeführt. Die Gruppe der AISAs gehört in die Gruppe der unilineage Dysplasien ± Ringsideroblasten. Dabei lassen sich gemäß WHO nochmals zwei Gruppen unterscheiden, die Gruppe der reinen Anämien (RA bzw. RSA = reine sideroblastische Anämie), sowie die Gruppe der refraktären Anämie mit Ringsideroblasten (RARS).

3. 2. 1. Sequenzierungen

Es erfolgte eine Analyse des Mutationsstatus bezüglich der Codons 12 und 13 von Ki-ras und N-ras, sowie von Codons 61 des N-ras Gens der Patientinnen (medianes Alter 78, Spanne 41-99 Jahre).

ID	Alter	Diagnose	Humara	N-ras Exon 1	N-ras Exon 2	Ki-ras Exon 1
BM	79	RSA	homozygot	WT	WT	WT
CS	76	RSA	homozygot	WT	WT	WT
OA	50	RSA	S.L. B	WT	WT	WT
SM	73	RSA	S.L.A	WT	WT	WT
WH	66	RARS	Mono B	Codon 13 CCT	WT	WT
SS	74	RARS	Oligo B	n.d.	n.d.	WT
YM	56	RARS	Mono A	WT	WT	WT
WL	64	RARS	S.L.A	WT	WT	WT
MI	71	RSA	S.L.B	WT	WT	WT
SM2	88	RSA	S.L.B	WT	WT	WT
BM2	99	RARS	Polyklonal	WT	n.d.	WT
MH	85	RARS	S.L.A	WT	WT	WT
RJ	79	RARS	S.L.A	WT	WT	WT
ME	84	RARS	S.L.B	WT	WT	Codon 12GAT
PD	93	RSA	S.L.B	WT	WT	WT
KG	71	RARS	S.L.B	WT	WT	WT
GA	83	RARS	Homozygot	WT	WT	WT
HE	94	RARS	S.L.B	WT	WT	WT
UI	74	RSA	S.L.B	WT	WT	WT
BS	41	RARS	Mono B	WT	WT	WT
SL	87	RSA	S.L.A	WT	WT	WT
PM	67	RARS	Mono A	WT	WT	WT
BC	77	RSA	Polyklonal	WT	WT	WT
HL	67	RSA	S.L.A	WT	WT	WT
FK	77	RARS	Mono A	WT	n.d.	WT
WI	49	RSA	Polyklonal	WT	n.d.	WT
SH	78	RSA	Polyklonal	WT	n.d.	WT
GG	83	RSA	S.L.A	WT	WT	WT
SEG	78	RARS	Polyklonal	WT	n.d.	WT
BK	80	RSA	S.L.A	n.d.	n.d.	WT
TSL	86	RSA	Polyklonal	WT	WT	WT
CL	68	RSA	S.L. B	WT	WT	WT
GK	85	RSA	Oligo B	n.d.	n.d.	WT
BC	84	RARS	S.L.A	WT	n.d.	WT
KH	85	RSA	Polyklonal	WT	n.d.	WT
WR	66	RARS	Oligo A	WT	Codon 61 TAA (Stop)	n.d.

Tab.3-11 Ergebnisse der Mutationsanalyse mittels Sequenzierung in der AISA-Subgruppe

n.d. = nicht durchgeführt, WT = Sequenz entspricht Wildtyp, Mono = Monoklonalität des entsprechenden Allels
 S.L. = skewed Lyonisation für das entsprechende Allel
 ID = Identifizierungsmerkmal

Die Verteilung lautete 19x RSA (medianes Alter 78, Spanne 49-93 Jahre) und 17x RARS (medianes Alter 77, Spanne 41-99 Jahre).

Nur drei der 17 RARS-Patientinnen (17,6 %) zeigten *ras*-Mutationen:

- eine in N-ras Codon 13 (GGT => CCT),
- eine in N-ras Codon 61 (TAA = Stop)
- und eine in Ki-ras Codon 12 (GGT => GAT).

Bei den RSA Patientinnen konnten keine Mutationen nachgewiesen werden.

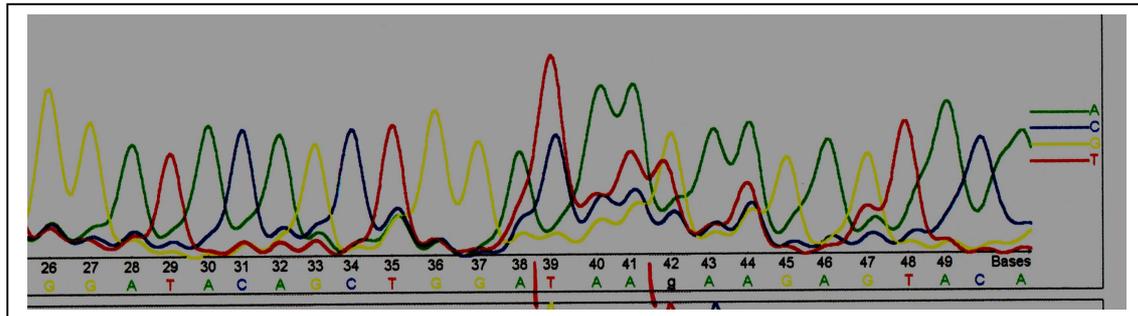


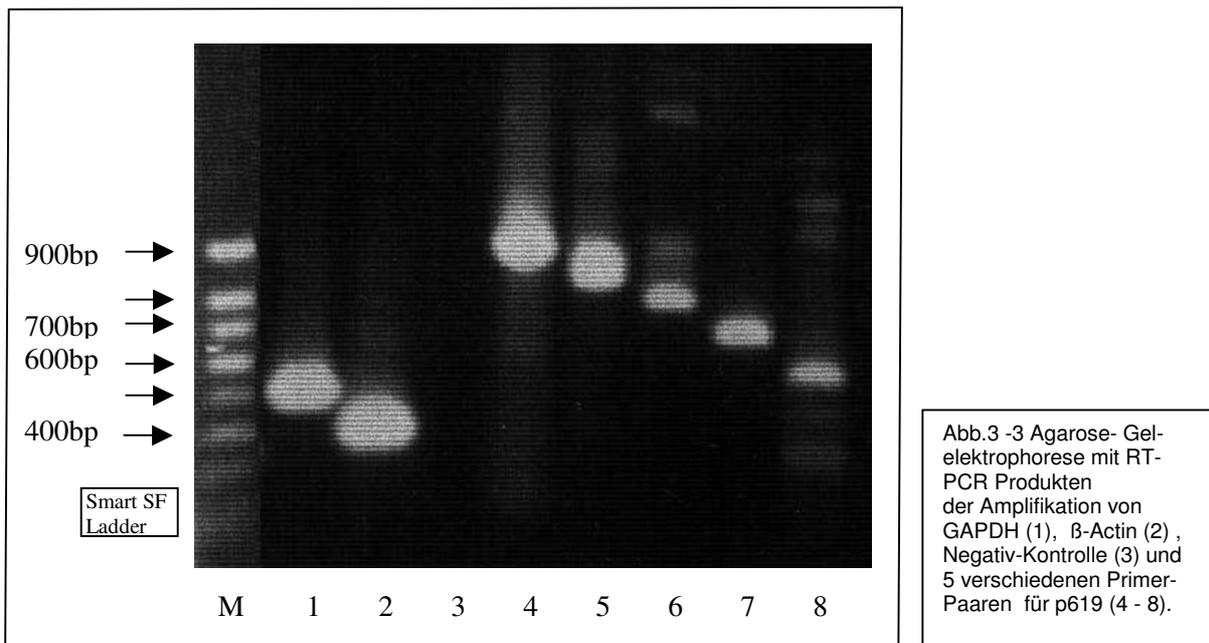
Abb. 3-2 Beispielhafter Ausschnitt der Mutationsanalyse für N-ras Exon 2 Codon 61.

Die Mutationsstelle befindet sich im gekennzeichneten Bereich und zeigt ein Stop-Codon statt Glutamin

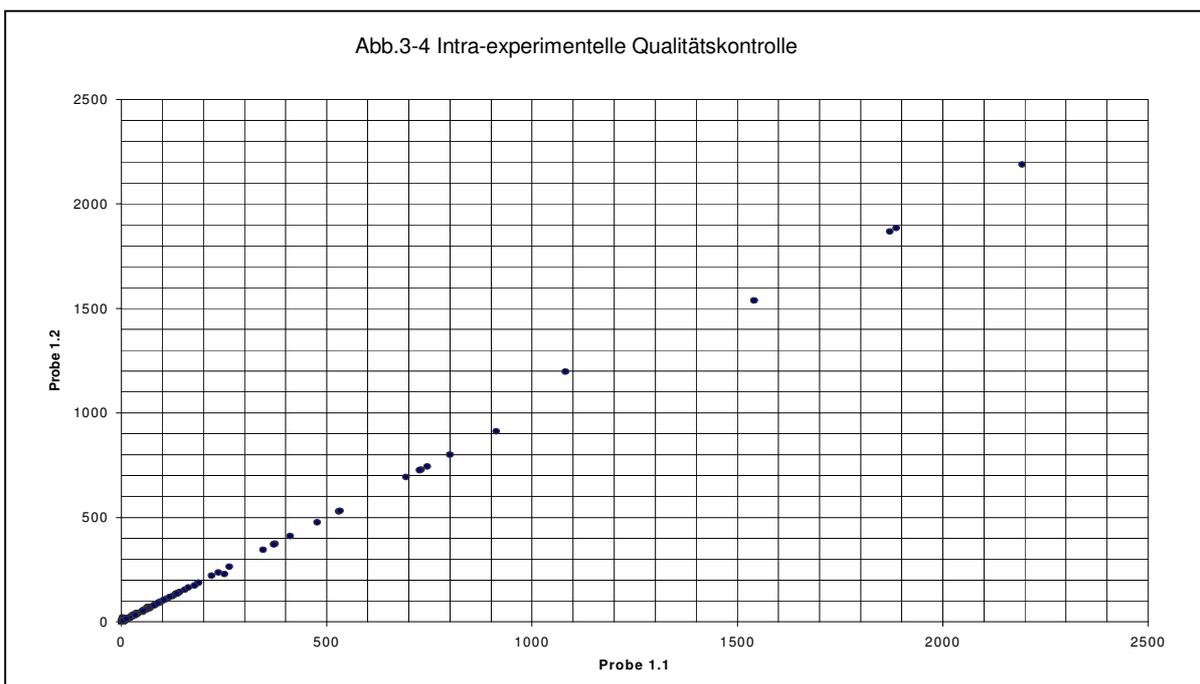
3. 3. Array-Analysen

3. 3. 1. Überprüfung der cDNA Qualitäten

Für die Array-Analyse wurden nur Proben mit überprüfter cDNA Qualität (Inspector Kit/ Sigma) verwendet. Die cDNAs zeigten in der p619-PCR mit den 5 Primerpaaren ein spezifisches PCR-Produkt (Abbildung 3-3). Die Amplifikation von p619 mit dem fünften Primerpaar entspricht cDNA mit einer Länge von 10.980 bp.



Die weiteren vergleichenden Analysen der intra- und inter-experimentellen Qualitätskontrollen zeigten eine positive Korrelation mit einem Pearson's Korrelationskoeffizienten von 0,9851 für die intra-experimentellen Kontrollen (Abb.3-4), und von 0,9171 (Abb.3-5) bis 0,9703 (Abb.3-6) für die inter-experimentellen Kontrollen.



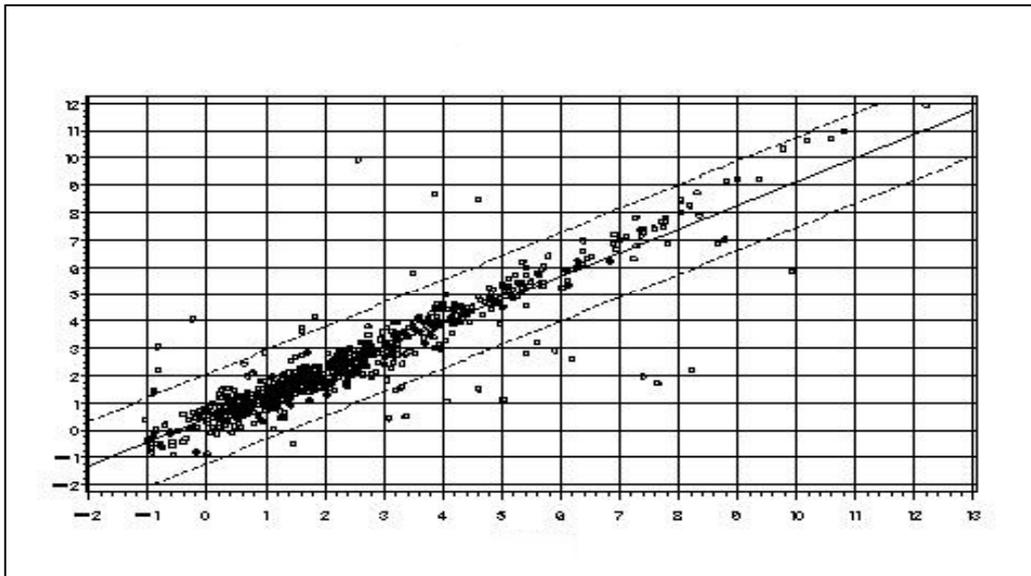


Abb. 3-5 Pearson's Korrelationskoeffizient = 0.9171

$$y = 0.41708 + .86932 * x$$

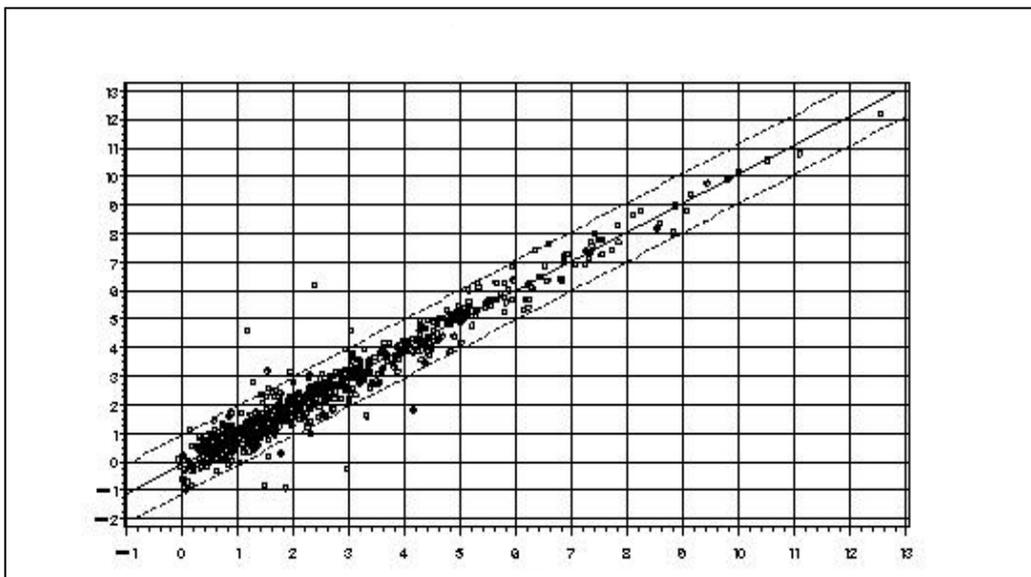


Abb. 3-6 Pearson's Korrelationskoeffizient = 0.9703

$$y = -0.0963 + 1.01864 * x$$

Es wurden 146 Gene von der Analyse ausgeschlossen deren Variationskoeffizient über 1,0 lag. Dieser wurde wie unter Punkt 2.15.9 beschrieben berechnet indem die Expressionswerte von sechs cDNA Proben zweier Patienten an drei verschiedenen Tagen hybridisiert und ausgewertet wurden. Diese Expressionswerte wurden in den oben gezeigten Streudiagrammen gegeneinander aufgetragen. Zusätzlich wurden die Regressionsgrade und der Pearson's Korrelationskoeffizient kalkuliert.

3.3.2. Ergebnisse der Genexpressionsanalysen

Untersucht wurden die Unterschiede der Genexpression bei CD34+-hämatopoetischen Stammzellen von gesunden Kontrollpersonen, Patienten mit RA, RAEB und RAEB –T (gemäß FAB-Klassifizierung), sowie von Patienten mit sAML/MDS.

Dabei galt das Interesse speziell den Genen, deren Expressionswerte sich durch die statistischen Parameter $p < 0,05$ und eine Ratio der Mediane > 2 unterschieden.

In der folgenden Tabelle (Tab.3-12) wird eine repräsentative Auswahl differentiell exprimierter Gene dargestellt.

Die Genexpressions - Werte der CD34+ Zellen von gesunden Kontrollen (A1-A7) wurden mit den Werten der Patienten mit RA (B1-B7), RAEB/t (C1-C7), und sAML/MDS (D1-D7) verglichen.

Es wurde eine Ratio der Mittelwerte berechnet und mit Hilfe des U-Tests von Mann & Whitney die statistische Signifikanz bestimmt.

Die detaillierten Ergebnisse der Genexpressionsmessung wurden entsprechend des kürzlich vorgestellten "Minimum information about a microarray experiment (MIAME)" Standards (Brazma et al., 2001) formatiert und sind auch auf der Homepage des Deutschen Ressourcen Zentrums für primäre Datenbanken (Berlin) unter <http://www.rzpd.de> abrufbar.

GenBank No.	Genes	A = normal							B = RA							C = RAEB-T							D = sAML/MDS							AvsB		AvsC		AvsD				
		1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7	Med	Med	Med	Med	Ratio	P	Ratio	P	Ratio
M81757	Cell Cycle 40S ribosomal protein S19 (RPS19)																												121,1	318,96	178,2	934,35	2,63	0,025	1,47		7,71	
U06579	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A																												85,89	35,29	19,09	10,95	2,43	0,009	4,50	0,006	7,61	0,002
M81934	CDC 25 homolog B																												4,71	8,20	10,75	9,09	1,74	0,025	2,28	0,047	1,83	0,025
U12979	DNA synthesis RPO2TC1																												45,60	101,3	50,53	100,85	2,22	0,013	1,11		2,21	0,018
L07493	replication protein A 14-kDa subunit																												14,27	36,82	18,62	28,20	2,58	0,013	1,30		1,98	0,009
M15796	PCNA																												11,79	29,96	31,50	31,06	2,54	0,025	2,57		2,63	0,009
D21063	MCM2																												5,88	12,48	13,14	10,74	2,12	0,009	2,23	0,047	1,83	0,009
M92843	Transcription tristetraprolin (TTP)																												47,35	11,03	10,73	7,63	4,29	0,002	4,41	0,002	6,20	0,002
L16785	NDKB																												34,09	70,37	69,62	107,57	2,08	0,025	2,94		3,16	0,003
K00650	c-fos proto-oncogene																												21,72	7,93	11,14	9,18	2,74	0,009	1,95	0,048	2,37	0,004
L06895	MAX dimerization protein (MAD)																												16,52	2,79	2,25	0,00	5,92	0,002	7,34	0,025		0,001
X16707	FOS-related antigen 1 (FRA1)																												6,25	1,61	4,63	3,76	3,88	0,028	1,35		1,68	
X03124	Growth factors, Cytokines, etc. erythroid potentiating activity (EPA)																												225,7	22,50	28,10	20,79	10,03	0,004	8,03	0,008	10,85	0,004
M24545	SCYA2																												163,4	25,32	6,49	6,21	6,45	0,005	25,17	0,034	26,32	0,025
D10924	CXCR4																												141,4	43,25	27,53	26,87	3,27		5,14	0,025	5,26	0,009
M23452	MIP1-alpha																												71,39	33,60	11,95	12,77	2,12	0,047	5,97	0,004	5,59	0,002
X59770	interleukin 1 receptor type II (IL1R2)																												30,32	4,39	4,01	3,66	6,90	0,002	7,56	0,013	8,28	0,002
X17648	GM-CSF receptor alpha																												12,05	4,10	4,58	5,95	2,94	0,025	2,63	0,048	2,03	0,025
D10202	PAFR																												10,94	4,36	4,52	2,81	2,51	0,035	2,42	0,013	3,89	0,006
U02687	FLT3																												1,14	11,24	11,68	16,96	5,65		10,24	0,034	14,88	0,018
U68162	myeloproliferative leukemia (MPL)																												0,00	0,00	6,13	5,93				0,01		0,034
U08839	ECM-related U-PAR (CD87)																												131,4	15,70	10,53	6,11	8,37	0,004	12,48	0,003	21,51	0,004
X12451	cathepsin L																												74,77	9,04	4,12	0,00	8,27	0,013	18,2	0,004		0,002
X07549	cathepsin H																												20,86	9,38	10,38	7,80	2,22	0,002	2,01	0,025	2,67	0,002
X15480	Stress-related glutathione S-transferase pi																												252,8	609,06	642,35	757,04	2,41	0,009	2,54	0,006	3,00	0,002
J03746	microsomal GST-1																												82,36	164,34	202,07	265,70	2,00	0,013	2,45	0,004	3,23	0,002
X54079	27-kDa heat shock protein																												79,34	122,85	185,82	108,29	1,55	0,013	2,34	0,002	1,36	0,002
X07270	90-kDa heat-shock protein A																												26,28	197,08	40,92	211,1	7,50	0,009	1,56		8,03	0,004
U77604	microsomal GST-II																												16,37	52,22	34,70	43,43	3,19	0,035	2,12		2,65	
X15722	glutathione reductase (GSR)																												6,23	10,39	12,29	16,97	1,67		1,97		2,72	0,006
U07418	DNA repair mutL protein homolog1																												218,7	386,71	438,97	482,75	1,77	0,048	2,01	0,009	2,21	0,002
M31899	xeroderma pigmentosum group B																												5,97	15,00	15,92	29,84	2,51	0,018	2,67	0,013	5,00	0,006
M18112	poly(ADP-ribose) polymerase																												4,43	10,17	8,17	11,06	2,30		1,84		2,50	0,013
AF071596	Anti-Apoptosis IEX-1L anti-death protein																												56,95	3,49	2,17	3,00	16,30	0,002	26,24	0,009	18,98	0,002
L08246	myeloid cell leukemia protein 1																												50,76	13,37	11,85	14,89	3,80	0,002	4,28	0,002	3,41	0,002
Z23115	apoptosis regulator bcl-x																												16,93	9,29	9,69	11,17	2,04	0,004	1,95	0,009	1,69	0,018
M32315	Pro-Apoptosis TNFR2																												31,30	11,71	7,10	7,56	2,67		4,41	0,004	4,14	0,004
U13737	caspase 3 (CASP3)																												6,83	11,87	13,63	17,71	1,74	0,025	2,00	0,025	2,59	0,018
U60520	caspase 8 (CASP8)																												6,42	9,86	7,44	15,16	1,54		1,16		2,36	0,018
M20681	Miscellaneous brain glucose transporter 3																												65,18	6,71	3,11	7,05	9,71	0,004	20,96	0,004	9,25	0,004
M36430	transducin beta 1																												64,26	14,10	13,35	9,44	4,56	0,006	4,81	0,035	6,81	0,003
M18391	ephrin type A receptor 1																												27,05	62,93	60,69	147,03	2,33	0,018	2,24	0,003	5,44	0,009
U18840	MOG																												16,84	3,04	2,79	2,91	5,54	0,018	6,04	0,003	5,78	0,003



Tab. 3-12 . Repräsentative Auswahl differentiell exprimierter Gene im Vergleich der CD34+ Zellen von gesunden Spendern (=A), Patienten mit RA (=B), RAEB/-T (=C), und Patienten mit sAML/MDS (=D). Die Ratio von Genen die in CD34+ Zellen von gesunden Spendern höher exprimiert wurden ist grün markiert, und jene die in CD34+ Zellen von Patienten mit MDS höher exprimiert wurden ist rot markiert. Die Farbcodierungen von grau nach lila entsprechen den ansteigenden Werten der Expressionsstärken der einzelnen Gene.

3.3.3. Anzahl der Transkriptionsunterschiede zwischen CD34+-Zellen von Patienten mit MDS und CD34+-Zellen gesunder Kontrollen

Beim Vergleich der CD34+-Zellen von gesunden Spendern mit den CD34+-Zellen von Patienten mit RA, RAEB/-T, und sAML/MDS gliedern sich die Unterschiede wie folgt: zwischen gesunden Kontrollen und Patienten mit refraktärer Anämie finden sich 52 unterschiedlich exprimierte Gene(Tabelle 3-13).

Gene	Signifikanz 2-seitig	Ratio(log2) A versus B	Mediane B RA	Mediane A Normal
intercellular adhesion molecule 1 (ICAM1)	0,030	2,21	4	19
beta 1 catenin (CTNNB)	0,006	1,89	5	17
IEX-1L anti-death protein	0,002	4,03	3	57
myeloid cell leukemia protein 1 (MCL1)	0,002	1,93	13	51
apoptosis regulator bcl-x	0,004	1,03	9	19
cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (CDKN1A)	0,009	1,28	35	86
40S ribosomal protein S19 (RPS19)	0,025	-1,40	319	121
ubiquitin-conjugating enzyme E2 H10	0,048	-1,48	40	14
xeroderma pigmentosum group B complementing protein (XPB)	0,018	-1,33	15	6
MCM2 DNA replication licensing factor	0,009	-1,09	12	6
activated RNA polymerase II transcriptional coactivator p15 (RPO2TC1)	0,013	-1,15	101	46
proliferating cyclic nuclear antigen (PCNA)	0,025	-1,35	30	12
replication protein A 14-kDa subunit (RP-A) (RF-A)	0,013	-1,37	37	14
interleukin 8 (IL8)	0,003	3,68	24	307
small inducible cytokine subfamily A member 2 (SCYA2)	0,035	2,69	25	163
macrophage inflammatory protein 2 alpha (MIP2-alpha; MIP2A)	0,002	2,46	13	72
interleukin 1 beta (IL1-beta ; IL1B)	0,003	1,37	21	55
macrophage inflammatory protein 1 alpha (MIP1-alpha)	0,047	1,09	34	71
G protein-coupled receptor HM74	0,014	3,32	1	10
guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) beta 1 subunit (GNB1)	0,006	2,19	14	64
ras-related protein RAB7	0,025	1,11	6	14
urokinase-type plasminogen activator receptor GPI-anchored form (U-PAR; PLAUR)	0,004	3,07	16	131
serum- & glucocorticoid-regulated serine/threonine protein kinase (SGK)	0,018	2,05	3	12
ephrin type A receptor 1 (EPHA1)	0,018	-1,22	63	27
interleukin 1 receptor type II (IL1R2)	0,002	2,79	4	30
granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor alpha (GM-CSFR-alpha)	0,025	1,56	4	12
platelet-activating factor receptor (PAFR)	0,035	1,33	4	11
nucleoside diphosphate kinase B (NDP kinase B; NDKB); NM23B	0,025	-1,05	70	34
matrix metalloproteinase 11 (MMP11)	0,004	3,40	16	169
glutathione S-transferase pi (GSTP1)	0,009	-1,27	609	253
phospholipase A2	0,018	1,78	19	66
early response protein NAK1	0,003	A	0	3
EGF response factor 1 (ERF1)	0,008	A	0	5
interferon consensus sequence-binding protein (ICSBP)	0,017	A	0	4
MAX dimerization protein (MAD)	0,002	2,57	3	17
activating transcription factor 3 (ATF3)	0,012	2,28	4	21
tristetraproline (TTP)	0,002	2,10	11	47
FOS-related antigen 1 (FRA1)	0,028	1,96	2	6
early growth response protein 1 (EGR1)	0,013	1,87	6	23
c-fos proto-oncogene	0,009	1,45	8	22
nucleoside diphosphate kinase A (NDKA)	0,048	-1,18	40	17
MYB-related protein B (B-MYB)	0,035	-2,62	16	3
tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP1);EPA	0,004	3,33	23	226
brain glucose transporter 3 (GTR3)	0,004	3,28	7	65
cathepsin L	0,013	3,05	9	75
protease inhibitor 1 (PI1)	0,009	2,46	31	171
cathepsin H (CTSH)	0,002	1,15	9	21
proteasome (prosome, macropain) subunit alpha type 2 (PSMA2)	0,048	-1,12	81	37
90-kDa heat-shock protein A (HSP90A)	0,009	-2,91	197	26
myelin-oligodendrocyte glycoprotein (MOG)	0,018	2,47	3	17
CD25 protein	0,003	2,43	2	12

Tab. 3-13 Gene mit Expressionsunterschieden zwischen CD34+-Zellen gesunder Kontrollen und RA Patienten

Zwischen gesunden Kontrollen und Patienten mit RAEB/-T lassen sich 55 differentiell exprimierte Gene nachweisen (Tabelle 3-14).

Gene	Signifikanz 2-seitig	Ratio(log2) A versus C	Mediane C RAEB/-t	Mediane A Normal
osteoblast specific factor 2 (OSF2)	0,03	C	2,51	0
IEX-1L anti-death protein	0,032	4,71	?	56,95
myeloid cell leukemia protein 1 (MCL1)	0,007	2,10	11,85	50,76
FAN protein	0,046	-1,26	13,82	5,78
tumor necrosis factor receptor superfamily member 1B (TNFRSF1B)	0,007	2,14	7,10	31,3
caspase 10 (CASP10)	0,022	1,36	208,43	536,03
growth arrest & DNA damage-inducible protein 153 (GADD153)	0,022	1,23	15,67	36,76
cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (CDKN1A)	0,032	2,17	19,09	85,89
cell division cycle 25 homolog B (CDC25B)	0,032	-1,19	10,75	?
v-fos transformation effector protein 1 (FTE1)	0,01	-1,37	1011,89	390,84
MAP/microtubule affinity-regulating kinase 3 (MARK3)	0,031	-2,29	6,78	?
xeroderma pigmentosum group B complementing protein (XPB)	0,032	-1,41	15,92	5,97
MCM4 DNA replication licensing factor	0,016	C	4,04	0
replication factor C 38-kDa subunit (RFC38)	0,046	-1,39	10,62	4,05
CXC chemokine	0,043	C	4,65	0
monocyte chemotactic protein 1 (MCP1)	0,022	4,65	?	163,35
macrophage inflammatory protein 2 alpha (MIP2-alpha; MIP2A)	0,004	3,54	6,20	72,22
macrophage inflammatory protein 1 beta (MIP1-beta)	0,015	2,64	6,23	38,88
eosinophil granule major basic protein (MBP)	0,046	1,06	14,53	30,21
G protein-coupled receptor HM74	0,043	A	0	10,18
guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) beta 1 subunit (GNB1)	0,046	2,27	13,35	64,26
urokinase-type plasminogen activator receptor GPI-anchored form (U-PAR; PLAUR)	0,01	3,64	10,53	131,4
serum- & glucocorticoid-regulated serine/threonine protein kinase (SGK)	0,038	2,71	1,90	12,43
mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8 (MAPKKK8; MAP3K8)	0,031	2,58	?	10,46
Bruton's tyrosine kinase (BTK)	0,046	-1,10	16,73	7,82
ephrin type A receptor 1 (EPHA1)	0,007	-1,17	60,69	27,05
mitogen-activated protein kinase 9 (MAP kinase 9; MAPK9; PRKM9)	0,015	-1,45	12,12	4,42
myeloproliferative leukemia protein (MPL)	0,016	C	6,13	0
interleukin 1 receptor type II (IL1R2)	0,046	2,92	4,01	30,32
platelet-activating factor receptor (PAFR)	0,022	1,28	4,52	10,94
nucleoside diphosphate kinase B (NDP kinase B; NDKB)	0,032	-1,03	69,62	34,09
matrix metalloproteinase 11 (MMP11)	0,032	3,20	18,41	168,96
heme oxygenase 1 (HO1; HMOX1)	0,015	1,75	4,86	16,37
microsomal glutathione S-transferase II (microsomal GSTII)	0,032	-1,08	34,70	16,37
microsomal glutathione S-transferase 1 (MGST1)	0,01	-1,29	202,07	82,36
glutathione S-transferase pi (GSTP1)	0,022	-1,35	642,35	252,76
neurotrophin 3 (NT3); nerve growth factor 2 (NGF2)	0,022	-1,72	505,43	153,73
PTPCAAX1 nuclear tyrosine phosphatase (PRL-1)	0,046	1,02	5,44	11,05
tristetraproline (TTP)	0,007	2,14	10,73	47,35
inhibitor of DNA binding 2 protein (ID2)	0,046	1,54	10,00	28,99
transcription factor ZFM1	0,032	-1,07	22,04	10,47
translin; recombination hotspot binding protein	0,022	-1,27	33,73	14
jun activation domain binding protein	0,032	-1,57	62,82	21,19
guanine nucleotide-binding protein alpha stimulating activity polypeptide 1 (GNAS1)	0,015	-1,73	808,99	243,95
zinc-finger DNA-binding protein	0,015	-1,77	20,91	?
brain glucose transporter 3 (GTR3)	0,007	4,39	3,11	65,18
cathepsin L	0,004	4,18	?	74,77
tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP1)EPA	0,032	3,01	28,10	225,66
heat shock 70-kDa protein 6	0,045	1,20	?	9,08
cathepsin H (CTSH)	0,046	1,01	10,38	20,86
27-kDa heat shock protein (HSP27)	0,022	-1,23	185,82	79,34
proteasome beta 1 subunit (PSMB1)	0,022	-1,54	101,35	34,74
acrosin-trypsin inhibitor II	0,01	-2,97	61,27	7,81
peripheral myelin protein 22 (PMP22)	0,006	3,17	?	11,62
myelin-oligodendrocyte glycoprotein (MOG)	0,003	2,59	2,79	16,84

Tab. 3-14 Gene mit Expressionsunterschieden zwischen CD34+-Zellen gesunder Kontrollen und Patienten mit RAEB/-T

Die größten Unterschiede beinhaltet der Vergleich zwischen den Kontrollen und den Patienten mit sekundärer AML aus MDS. Hier sind 93 unterschiedlich exprimierte Gene belegbar (Tabelle 3-15).

Gene	Signifikanz 2-seitig	Ratio(log2) AvsD	Mediane D sAML/MDS	Mediane A Normal
intercellular adhesion molecule 2 (ICAM2)	0,003	-1,063	46,620	22,320
intercellular adhesion molecule 1 (ICAM1)	0,025	2,229	4,010	18,800
CD44 antigen (CD44)	0,048	-1,233	36,970	15,730
IEX-1L anti-death protein; PRG-1; DIF-2	0,002	4,247	3,000	56,950
myeloid cell leukemia protein 1 (MCL1)	0,002	1,769	14,891	50,760
FAN protein	0,009	-1,940	22,180	5,780
poly(ADP-ribose) synthetase	0,013	-1,320	11,060	4,430
caspase 4 (CASP4);	0,018	-1,260	160,856	67,150
tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2)	0,006	2,050	7,560	31,300
ALG-2 calcium-binding protein	0,035	-1,009	25,156	12,500
caspase 3 (CASP3)	0,018	-1,375	17,710	6,830
caspase 8 (CASP8)	0,018	-1,240	15,161	6,420
adenylate cyclase VII	0,014	-1,816	6,900	1,960
cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (CDKN1A);	0,002	2,972	10,950	85,890
special AT-rich sequence-binding protein 1 (SATB1)	0,009	-1,873	12,858	3,510
cyclin-dependent kinase 10 (CDK10)	0,009	-1,687	10,140	3,150
colon cancer nonpolyposis type 2 protein (COCA2)	0,002	-1,142	482,750	218,700
70-kDa thyroid autoantigen (TLAA)	0,013	-1,129	117,169	53,560
xeroderma pigmentosum group B complementing protein (XPB)	0,006	-2,321	29,840	5,970
deoxyribonuclease II (DNase II)	0,014	-1,448	7,476	2,740
activated RNA polymerase II transcriptional coactivator p15 (RPO2TC1); PC4	0,018	-1,145	100,850	45,600
proliferating cyclic nuclear antigen (PCNA); cyclin activator 1 37-kDa subunit; replication factor C 37-kDa subunit (RFC37)	0,009	-1,398	31,064	11,790
activator 1 37-kDa subunit; replication factor C 37-kDa subunit (RFC37)	0,002	-2,347	48,790	9,590
migration inhibitory factor-related protein 8 (MRP8)	0,006	5,411	44,250	1882,510
interleukin 8 (IL8)	0,002	4,901	10,284	307,370
monocyte chemotactic protein 1 (MCP1)	0,025	4,718	6,205	163,350
macrophage inflammatory protein 2 alpha (MIP2-alpha; MIP2A)	0,006	1,945	18,760	72,220
macrophage inflammatory protein 1 alpha (MIP1-alpha)	0,002	2,483	12,766	71,390
interleukin 1 beta (IL1-beta ; IL1B); catabolin	0,003	1,265	23,042	55,380
macrophage inflammatory protein 1 beta (MIP1-beta)	0,004	4,224	2,080	38,880
eosinophil granule major basic protein (MBP)	0,025	2,741	4,520	30,210
small inducible cytokine subfamily B member 10 (SCYB10)	0,047	1,151	4,310	9,570
INT-2 proto-oncogene protein (fibroblast growth factor-3)	0,005	A	0,000	6,770
guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) beta 1 subunit (GNB1)	0,003	2,767	9,440	64,260
urokinase-type plasminogen activator receptor GPI-anchored form (U-PAR; PLAUR)	0,004	4,427	6,110	131,400
ephrin type A receptor 1 (EPHA1)	0,009	-2,442	147,035	27,050
B-cell progenitor kinase (BPK)	0,048	-1,528	22,547	7,820
TGF-beta signaling protein 1 (BSP1)	0,006	-2,379	34,597	6,650
mitogen-activated protein kinase 9 (MAP kinase 9; MAPK9; PRKM9)	0,004	-1,671	14,070	4,420
CXC chemokine receptor type 4 (CXCR4)	0,009	2,396	26,870	141,440
interleukin 1 receptor type II (IL1R2); IL1R-beta	0,002	3,050	3,660	30,320
granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor alpha (GM-CSFR-alpha)	0,025	1,018	5,950	12,050
platelet-activating factor receptor (PAFR)	0,006	1,961	2,810	10,940
interferon gamma (IFN-gamma) receptor beta subunit	0,034	1,004	3,510	7,040
erbB3 proto-oncogene; HER3	0,014	-2,169	6,340	1,410
stem cell tyrosine kinase 1 (STK1)	0,018	-3,895	16,960	1,140
myeloproliferative leukemia protein (MPL)	0,034	D	5,930	0,000
hint protein; protein kinase C inhibitor 1 (PKC11)	0,018	-1,324	239,997	95,830
nucleoside diphosphate kinase B (NDP kinase B; NDKB)	0,003	-1,658	107,570	34,090
58-kDa inhibitor of the RNA-activated protein kinase	0,017	D	4,140	0,000
matrix metalloproteinase 11 (MMP11); stromelysin 3	0,003	3,371	16,330	168,960
glutathione S-transferase pi (GSTP1)	0,002	-1,583	757,040	252,760
microsomal glutathione S-transferase 1 (MGST1)	0,002	-1,690	265,700	82,360
heme oxygenase 1 (HO1; HMOX1)	0,003	2,396	3,111	16,370
phospholipase A2	0,002	1,595	21,731	65,650
acyl-CoA-binding protein (ACBP)	0,002	-1,320	207,651	83,150
serine/threonine protein phosphatase PP2A-alpha catalytic subunit	0,013	1,437	6,550	17,730

Fortsetzung Tab. 3-15

serine/threonine protein phosphatase alpha 1 catalytic subunit (PP1CA; PPP1A; PP1A)	0,025	-1,042	25,643	12,450
tristetraproline (TTP)	0,002	2,633	7,635	47,350
early growth response protein 1 (EGR1)	0,047	2,443	4,200	22,840
c-fos proto-oncogene; G0S7 protein	0,004	1,242	9,180	21,720
activating transcription factor 3 (ATF3)	0,004	1,570	7,180	21,320
26S protease regulatory subunit 6A	0,048	-1,028	34,390	16,870
recombination hotspot binding protein	0,003	-1,765	47,567	14,000
TRAF-interacting protein (I-TRAF)	0,021	-1,023	18,170	8,940
cAMP-response element binding protein 1 (CREB1)	0,025	-1,045	18,280	8,860
nucleobindin 1 (NUCB1)	0,018	1,333	3,248	8,180
YL-1 protein	0,003	-1,244	14,231	6,010
zinc finger protein 161 (ZNF161)	0,021	-1,396	14,660	5,570
SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A member 2 (SMARCA2)	0,021	-1,515	13,375	4,680
signal transducer and activator of transcription 1 alpha/beta (STAT1)	0,018	-1,736	12,060	3,620
transcriptional repressor NF-X1	0,014	-2,162	9,670	2,160
GA-binding protein transcription factor alpha subunit (GABPA)	0,039	-1,764	6,080	1,790
fli1 proto-oncogene	0,014	-2,187	6,830	1,500
erythroid potentiating activity protein (EPA)	0,004	3,440	20,789	225,660
protease inhibitor 1 (PI1); alpha-1-antitrypsin (AAT)	0,002	4,439	7,867	170,590
23-kDa highly basic protein	0,013	-1,279	282,850	116,570
proteasome activator HPA28 subunit beta	0,002	-1,580	234,922	78,570
brain glucose transporter 3 (GTR3)	0,004	3,210	7,045	65,180
proteasome alpha 1 subunit (PSMA1)	0,018	-1,003	107,934	53,860
proteasome (prosome, macropain) subunit alpha type 2 (PSMA2)	0,006	-1,299	91,040	37,000
glutathione S-transferase mu1 (GSTM1; GST1)	0,048	-1,232	72,276	30,760
90-kDa heat-shock protein A (HSP90A)	0,004	-3,006	211,120	26,280
methionine aminopeptidase 2 (METAP2)	0,002	-1,317	55,330	22,210
cathepsin H (CTSH)	0,002	1,419	7,800	20,860
placental plasminogen activator inhibitor 2 (PAI-2; PLANH2)	0,002	2,954	2,500	19,370
transferrin receptor (TFRC); CD71 antigen	0,025	1,051	9,210	19,080
proteasome inhibitor subunit 1 (PSMF1)	0,025	-1,464	25,430	9,220
heat shock 70-kDa protein	0,013	1,396	3,450	9,080
MPV17 protein	0,018	-1,076	8,520	4,040
quinone oxidoreductase	0,039	-2,452	14,450	2,640
myelin-oligodendrocyte glycoprotein (MOG)	0,003	2,531	2,913	16,840
cytoplasmic dynein light chain 1 (hdLC1; DLC1)	0,018	-2,516	53,877	9,420

Tab. 3-15 Gene mit Expressionsunterschieden zwischen CD34+-Zellen von gesunden Kontrollen und Patienten mit sAML/MDS

Vergleicht man die Erkrankungen untereinander so lassen sich auch hier Unterschiede in der Genexpression zwischen den einzelnen Patientengruppen nachweisen (Abbildung 3-7 und 3-8).

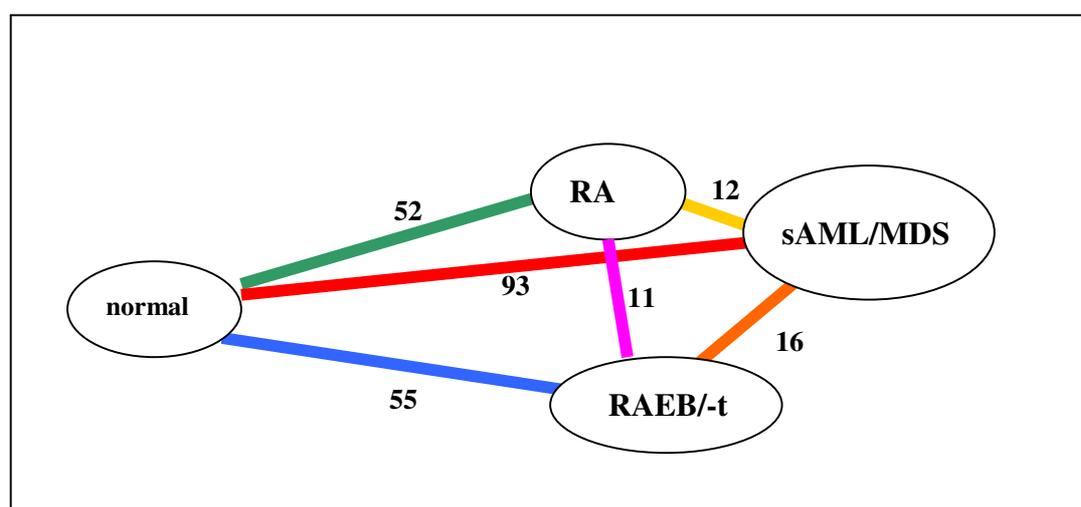


Abb. 3-7 Differenziell exprimierte Gene zwischen den einzelnen Erkrankungsformen

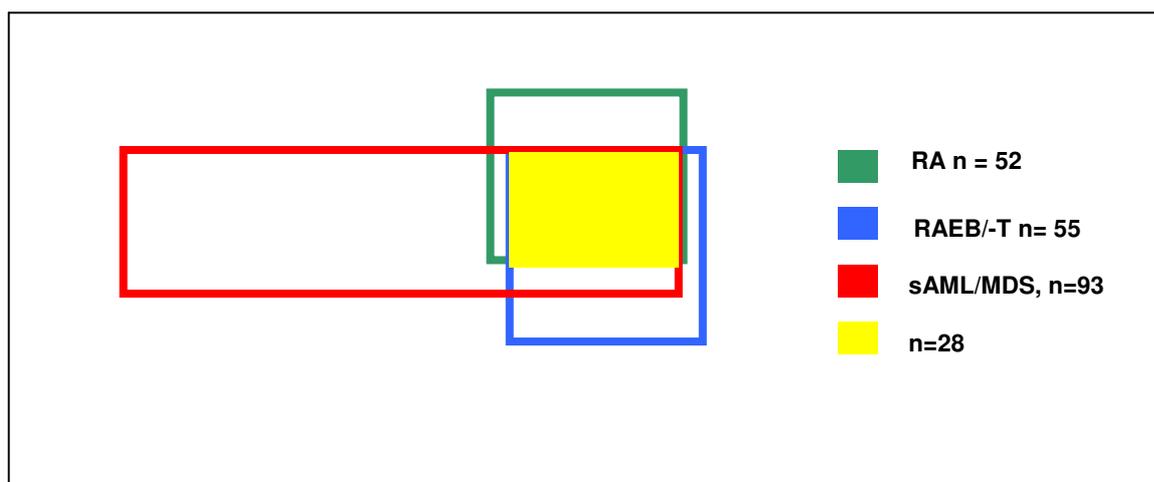


Abb.3-8 Übereinstimmende Genexpression der einzelnen Erkrankungsformen

Während sich zwischen den Patienten mit RA und denen mit RAEB/-T elf (Tabelle 3-16), und zu den Patienten mit sAML/MDS zwölf (Tabelle 3-17) unterschiedlich exprimierte Gene finden, lassen sich zwischen der RAEB/-T Gruppe und der sAML/MDS Gruppe sechzehn (Tabelle 3-18) Unterschiede ausmachen.

Gene	Signifikanz 2-seitig	Ratio(log2) BvsC	Mediane C RAEB/-T	Mediane B RA
cyclin-dependent kinase regulatory subunit (CKS2)	0,048	1,34	34,65	27,86
MAPKAP kinase (3pK)	0,018	-1,34	11,72	6,48
CDC-like kinase 2 (CLK2)	0,047	-1,56	4,38	2,53
macrophage inflammatory protein 1 beta (MIP1-beta)	0,047	2,25	?	29,62
RalB GTP-binding protein	0,047	-1,58	?	3,02
tyrosine kinase receptor tie-1	0,025	-2,25	?	3,42
inhibitor of DNA binding 2 protein (ID2)	0,018	2,25	24,21	47,46
ZFM1 protein [alternatively spliced]	0,035	1,09	6,35	6,08
guanine nucleotide-binding protein alpha stimulating activity polypeptide 1 (GNAS1)	0,018	-1,09	180,82	380,42
SPT3-like protein	0,025	-1,26	?	2,46
ets domain protein elk-3	0,025	-1,49	6,05	2,52

Tab. 3-16 Gene mit Expressionsunterschieden zwischen CD34+-Zellen von Patienten mit RA oder RAEB/-T

Gene	Signifikanz 2-seitig	Ratio(log2) BvsD	Mediane D sAML/MDS	Mediane B RA
beta 1 catenin (CTNNB)	0,025	-1,20	10,51	4,58
integrin alpha 6 (ITGA6)	0,021	-1,79	15,88	4,59
FAN protein	0,013	-1,30	22,18	9,01
caspase 2 (CASP2)	0,014	-1,46	9,70	3,53
calgranulin A (CALA)	0,018	4,26	44,25	848,81
macrophage inflammatory protein 1 beta (MIP1-beta)	0,006	3,83	2,08	29,62
TGF-beta signaling protein 1 (BSP1)	0,048	-1,41	34,60	12,99
putative src-like adapter protein (SLAP)	0,025	-2,00	7,15	1,79
granulocyte colony stimulating factor receptor (GCSF-R)	0,048	-1,26	63,48	26,49
YL-1 protein	0,004	-1,41	14,23	5,34
protease inhibitor 1 (PI1)	0,025	1,98	7,87	31,09
transferrin receptor (TFRC)	0,025	1,07	9,21	19,32

Tab. 3-17 Gene mit Expressionsunterschieden zwischen CD34+-Zellen von Patienten mit RA oder sAML/MDS

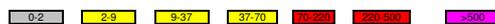
Gene	Signifikanz 2-seitig	Ratio(log2) CvsD	Mediane D sAML/MDS	Mediane C RAEB/-T
caspace 8 (CASP8)	0,018	-1,03	15,16	7,44
ribosomal protein S6 kinase II alpha 1 (S6KII-alpha 1)	0,048	1,13	7,85	17,15
cyclin-dependent kinase regulatory subunit (CKS2)	0,048	-1,65	34,65	11,01
CDK-activating kinase assembly factor (CAK assembly factor)	0,035	-1,75	19,85	5,92
delta-like protein (DLK)	0,018	1,52	2,89	8,31
putative src-like adapter protein (SLAP)	0,035	-1,49	7,15	2,55
TGF-beta signaling protein 1 (BSP1)	0,018	-2,12	34,60	7,97
natural killer cell enhancing factor (NKEFB)	0,025	1,71	100,41	329,41
phospholipase A2	0,002	1,17	21,73	48,99
serine/threonine protein phosphatase PP2A-alpha catalytic subunit	0,004	1,26	6,55	15,70
60S ribosomal protein L6 (RPL6)	0,047	1,34	913,44	2316,20
transcription factor E2-alpha (E2A)	0,009	1,33	3,72	9,37
YL-1 protein	0,048	-1,28	14,23	5,87
transferrin receptor (TFRC); CD71 antigen	0,004	1,36	9,21	23,61
thymosin beta 4 X chromosome (TMSB4X)	0,035	-2,37	1278,60	247,83
90-kDa heat-shock protein A (HSP90A)	0,009	-2,37	211,12	40,92

Tab. 3-18 Gene mit Expressionsunterschieden zwischen CD34+-Zellen von Patienten mit RAEB/-T oder sAML/MDS

3. 3. 4. Unterschiede in der Genexpression zwischen CD34+-Zellen von MDS-Patienten und gesunden Kontrollen

Beim Vergleich der Expressionstabellen lassen sich in allen drei Patientengruppen übereinstimmend insgesamt 28 Gene nachweisen, die sich in der Expression von den gesunden Kontrollen unterscheiden. Diese Gene lassen sich keiner bestimmten Genfamilie zuordnen sondern sind über die gesamte Breite der Genfamilien verteilt (Tabelle 3-19). Es finden sich u.a. Gene zur Zellzykluskontrolle, Wachstumsfaktoren, Gene der Transkriptionskontrolle, sowie Gene zur Regulation der Apoptose.

GenBank No.	Genes	A = normal							B = RA							C = RAEB-t							D = sAML/MDS				Med	Med	Med	Med	AvsB		AvsC		AvsD		
		1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7	A	B	C	D	Ratio	P	Ratio	P
U09579	Cell Cycle cyclin-dependent kinase inhibitor 1A	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	85,89	35,29	19,09	10,95	2,43	0,009	4,50	0,006	7,84	0,002								
M81934	CDC 25 homolog B	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	4,71	8,20	10,75	9,09	1,74	0,025	2,28	0,047	1,93	0,025
D21063	DNA synthesis MCM2	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	5,88	12,48	13,14	10,74	2,12	0,009	2,23	0,047	1,83	0,009
M92843	Transcription tristetraprolin (TTP)	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	47,35	11,03	10,73	7,63	4,29	0,002	4,41	0,002	6,20	0,002
K00650	c-fos proto-oncogene	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	21,72	7,93	11,14	9,18	2,74	0,009	1,95	0,048	2,37	0,004
L06895	MAX dimerization protein (MAD)	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	16,52	2,79	2,25	0,00	5,92	0,002	7,34	0,025		0,001
X03124	Growth factors, Cytokines, etc. erythroid potentiating activity (EPA)	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	225,7	22,50	28,10	20,79	10,03	0,004	8,03	0,008	10,85	0,004								
M24545	SCYA2	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	163,4	25,32	6,49	6,21	6,45	0,035	25,17	0,034	26,32	0,025								
M23452	MIP1-alpha	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	71,39	33,60	11,95	12,77	2,12	0,047	5,97	0,004	5,59	0,002								
X59770	Interleukin 1 receptor type II (IL1R2)	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	30,32	4,39	4,01	3,66	6,90	0,002	7,56	0,013	8,28	0,002								
X17648	GM-CSF receptor alpha	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	12,05	4,10	4,58	5,95	2,94	0,025	2,63	0,048	2,03	0,025
D10202	PAFR	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	10,94	4,36	4,52	2,81	2,51	0,035	2,42	0,013	3,89	0,006
U08839	ECM-related U-PAR (CD87)	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	131,4	15,70	10,53	6,11	9,37	0,004	12,48	0,003	21,51	0,004								
X12451	cathepsin L	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	74,77	9,04	4,12	0,00	6,27	0,013	18,2	0,004		0,002								
X07549	cathepsin H	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	20,86	9,38	10,38	7,80	2,22	0,002	2,01	0,025	2,67	0,002								
X15480	Stress-related glutathione S-transferase pi	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	252,8	609,06	642,35	757,04	2,41	0,009	2,54	0,006	3,00	0,002								
J03746	microsomal GST-1	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	82,36	164,34	202,07	265,70	2,00	0,013	2,45	0,004	3,23	0,002								
X54079	27-kDa heat shock protein	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	79,34	122,85	185,82	108,29	1,55	0,013	2,34	0,002	1,36	0,002								
U07418	DNA repair mutL protein homolog1	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	218,7	386,71	438,97	482,75	1,77	0,048	2,01	0,009	2,21	0,002								
M31699	xeroderma pigmentosum group B	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	5,97	15,00	15,92	29,84	2,51	0,018	2,67	0,013	5,09	0,006								
AF071596	Anti-Apoptosis IEX-1L anti-death protein	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	56,95	3,49	2,17	3,00	16,30	0,002	26,24	0,009	18,98	0,002								
L08246	myeloid cell leukemia protein 1	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	50,76	13,37	11,85	14,89	3,80	0,002	4,28	0,002	3,41	0,002								
Z23115	apoptosis regulator bcl-x	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	16,93	9,29	9,69	11,17	2,04	0,004	1,95	0,009	1,69	0,018
U13737	Pro-Apoptosis caspase 3 (CASP3)	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	6,83	11,87	13,63	17,71	1,74	0,025	2,00	0,025	2,59	0,018
M20681	Miscellaneous brain glucose transporter 3	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	65,18	6,71	3,11	7,05	9,71	0,004	20,96	0,004	9,25	0,004								
M36430	transducin beta 1	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	64,26	14,10	13,35	9,44	4,56	0,006	4,81	0,035	6,81	0,003
M18391	ephrin type A receptor 1	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	27,05	62,93	60,69	147,03	2,33	0,018	2,24	0,003	5,44	0,009
U18840	MOG	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	16,84	3,04	2,79	2,91	5,54	0,018	6,04	0,003	5,78	0,003



Tab. 3-19 Differenziell exprimierte Gene die sich in allen 3 Patientengruppen von den gesunden Kontrollen unterscheiden

18 Wachstumsfaktoren zeigen im Vergleich der CD34+-Zellen von MDS-Patienten und gesunden Kontrollen signifikante Expressionsunterschiede. Dabei handelt es sich z.B. um eine signifikant 2,4 - 7,8fach verringerte Expression des Wachstumshemmenden CDKN1A (Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 1A) Gens in CD34+-Zellen von MDS-Patienten, während das PCNA (proliferating cell nuclear antigen) Gen eine signifikant (p = 0,01) um das 2,6fach erhöhte Expression bei MDS-Patienten aufweist (Tabelle 3-19).

Bei der Analyse von 155 Transkriptionsfaktoren und assoziierten Genen fanden sich 26 signifikante Unterschiede. Das MAD (MAX dimerization protein) Gen zeigte, ebenso wie das p55-c-FOS Proto-Onkogen (FOS), in den gesunden Kontrollen eine signifikant höhere Expression als bei MDS-Patienten, deren Expression lediglich knapp über dem "Hintergrund-Rauschen" lag.

Bei MIP-1- α (macrophage inflammatory protein 1- α), konnte eine um das 2.1 – 6fach verringerte Expression bei MDS-Patienten nachgewiesen werden. Hierbei handelt es sich um ein multifunktionales Chemokin, welches an CCR1 und CCR5 bindet (Czaplewski et al., 1999), und die Proliferation hämatopoietischer Stammzellen in vivo hemmt (Cook, 1996). Der Transkriptionsfaktor Tristetraprolin (TTP) zeigte in allen MDS-Patienten eine signifikant ($p = 0.002$) niedrigere Expression. Der für die Nucleosid Diphosphat Kinase B (NDKB) codierende Transkriptionsfaktor NM23-H2, zeigte eine signifikant mindestens um das zweifache erhöhte Expression in den CD34+-Zellen aller MDS-Patienten (Tabelle 3-12).

Sechs von 157 mit dem cDNA Array überprüfaren Genen für Wachstumsfaktoren, Chemokine, Zytokine und ihre Rezeptoren zeigten in CD34+-Zellen der gesunden Spender eine signifikant höhere Expression als in CD34+-Zellen von MDS-Patienten. Die Expression von GM-CSFR- α war bei den MDS-Patienten signifikant um das zwei- bis dreifache verringert, bei EPA ließ sich eine signifikant ($p = 0,004 - 0,008$) um das acht- bis zehnfach erniedrigte Expression nachweisen. MPL fand sich nur in Patienten mit RAEB/T ($p = 0.01$) und mit sAML/MDS ($p = 0,034$). FLT3 war in den CD34+ Zellen der beiden gerade erwähnten Patientengruppen signifikant ($p = 0.034$ und 0.018) um das 10.2 - 14.9fache überexprimiert.

Drei Glutathion-S-Transferasen fanden sich bei den 16 Genen die für Stress-assoziierte Proteine kodieren signifikant ($p = 0.002 - 0.0004$) um das 2.5 - 2.7fache in der Expression bei MDS Patienten erhöht. Entsprechend dazu fand sich eine um das 1.7 - 2.7fach erhöhte Expression der Glutathion-Reduktase (GSR), dem Enzym, welches die S-Transferasen mit reduziertem Glutathion versorgt, wobei sich hier eine statistische Signifikanz lediglich im Vergleich von Gesunden mit sAML/MDS Patienten nachweisen ließ (Tabelle 3 -12).

Bei den DNA-Reparaturenzymen fanden sich 2 signifikante Veränderungen. Xeroderma Pigmentosum Komplementierung Gruppe B (XPB) ist dabei um das dreifache und Poly-(ADP-)-Ribose-Polymerase (PARP) um das 2.3fache höher exprimiert.

Drei von 18 Genen die am Aufbau der extrazellulären Matrix beteiligt sind zeigten Expressionsunterschiede. Die Cathepsine H und L und der Urokinase Plasminogen Aktivator Rezeptor (U-PAR). Cathepsin L war signifikant ($p = 0.013$) um das 8.3fache in den CD34+ Zellen von RA Patienten erniedrigt und in den Zellen der RAEB/T ($p = 0.004$) und sAML/MDS ($p = 0.002$) Patienten kaum noch nachweisbar. Die Expression von Cathepsin H war in den Zellen aller MDS Patienten signifikant erniedrigt. Das dritte Gen mit einer signifikanten ($p = 0.003$) 12.5fachen Verringerung war der Urokinase-Plasminogen-Aktivator Oberflächen-Rezeptor (U-PAR) in den CD34+-Zellen der MDS-Patienten.

Bei 64 der Apoptose zugeordneten Genen zeigten die zwei anti-apoptotischen Gene IEX-1L (IEX-1L anti-death protein) eine um das 19fach signifikant ($p = 0.0002$) erniedrigte Expression, und MCL1 (myeloid cell leukemia protein 1) eine signifikant ($p = 0.0001$) um das 3.7fach verringerte Expression bei den MDS-Patienten gegenüber den gesunden Kontrollen.

Bei den pro-apoptotischen Genen Caspase 3 und Caspase 8 ließ sich eine 1.7 - 2.6fache bzw. 1.2 - 2.4fach erhöhte Expression bei den MDS-Patienten nachweisen. Bei den pro-apoptotischen Genen Caspase 10 und Tumor Nekrose Faktor Rezeptor 2 (TNFR2) zeigte sich eine 2.6 - 4.4fach erniedrigte Expression bei den MDS-Patienten im Vergleich zu den gesunden Kontrollen (Tabelle 3-12).

3.3.5. Cluster Analysen

Beim Vergleich der Genexpressions - Analysen der CD34+-Zellen von MDS - Patienten und den gesunden Kontrollen wurde ein Algorithmus gewählt, der eine Unterscheidung zwischen gesunden Kontrollen und Patienten (RA) mit weniger als 5% Blasten zulässt.

Es wurde schließlich ein Set aus sieben differentiell exprimierten Genen gewählt (Abb.3-8), welches eine klare Unterscheidung zwischen den gesunden Kontrollen und den RA-Patienten aber auch jeder anderen MDS-Subgruppe zulässt. Da normalerweise die Differentialdiagnose zwischen MDS und anderen Erkrankungen bei dieser Patientengruppe mit weniger als 5% Blasten extrem schwierig ist wurde hierin eine weitere Methode zur differentiellen Diagnostik erkannt.

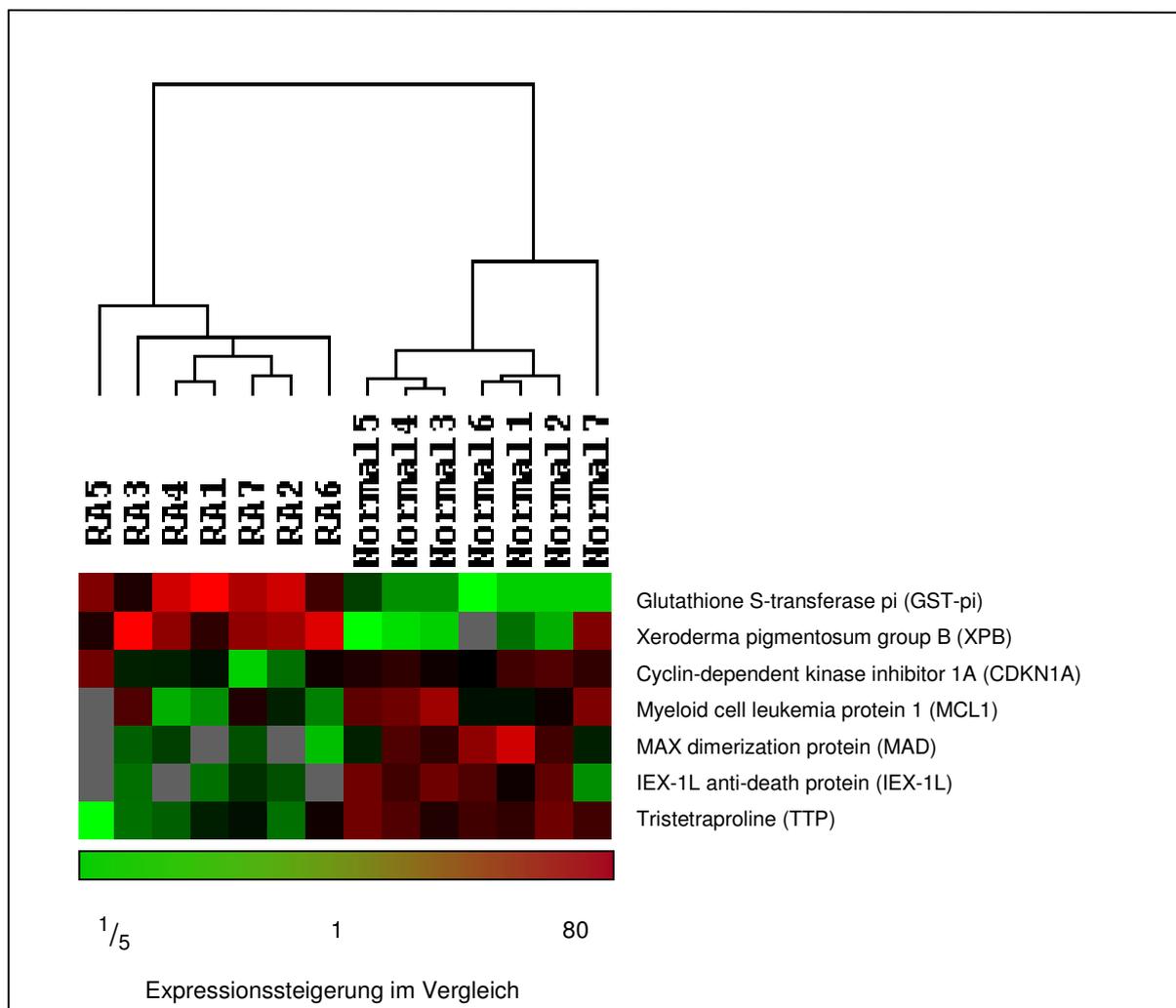


Abb. 3-8 Dendrogramm der hierarchischen Cluster-Analyse

Gesteigerte Expression (>1) ist hier rot dargestellt, verringerte Expression (<1) ist hier hellgrün dargestellt. Eine gleichwertige Expression ($= 1$) ist grau abgebildet. RA 1-7 sind die 7 Patienten mit refraktärer Anämie welche hier als Vergleichsgruppe zu den 7 Proben der gesunden/normalen Kontrollgruppe analysiert wurden.

4. Diskussion

4. 1. Klonalitätsanalysen

4. 1. 1. Methodik

Da bei MDS als Ausgangspunkt der neoplastischen Transformationen eine unreife, myeloische, hämatopoetische Stammzelle angenommen wird, wird zunächst eine Analyse der X-chromosomalen Inaktivierungs-Muster (Lyon, 1961,1988) (XCIP = X-chromosome inactivation pattern) durchgeführt.

Für die Klonalitätsanalyse bei Myelodysplastischen Syndromen sind verschiedene Methoden beschrieben worden. Die meisten Methoden basieren auf Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismen (RFLP). Dabei werden am häufigsten die Gene Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PD), Phospho-Glycerat-Kinase 1 (PGK1), der Lokus DXS255 und Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT) verwendet. PGK1 wird zwar als schnell durchführbare Methode beschrieben, um die Klonalität und die Methylierungsmuster von Zellpopulationen festzustellen (van Kamp et al., 1992), gleichzeitig besteht hier aber die Einschränkung das lediglich ca. 33 % aller Patientinnen für dieses Gen heterozygot und damit analysierbar sind (Vogelstein et al.,1987; Gale, Wheadon & Linch, 1991).

Ähnliche Probleme wurden für den Einsatz des Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PD) Gens beschrieben. Hier ist der begrenzende Faktor ebenfalls die geringe Variabilität des Polymorphismus bei G6PD (San Miguel et al., 1996), so dass nur ein geringer Prozentsatz (24 %) der Patientinnen analysierbar ist (Mortazavi, Chopra, Gordon-Smith & Rutherford, 2000).

Dies gilt ebenso für das HPRT-Gen (18 %) (Allen et al., 1992), wobei hier wie für den Lokus DXS255 (M27 β) Probleme bei der Reproduzierbarkeit von Ergebnissen beschrieben wurden (Mortazavi, Chopra, Gordon-Smith & Rutherford, 2000).

Der für diese Arbeit gewählte humane Androgen Rezeptor Lokus, ein Short Tandem Repeat Marker auf dem X-Chromosom in Exon 1, ist dagegen mit einer 90 %igen Heterozygotie für kaukasische Frauen beschrieben (Allen et al., 1992; Gale, Mein & Linch, 1996) und ist mit 20 möglichen Allelen hoch polymorph. Eine Homozygotie führt allerdings auch hier zum Ausschluss von Patientinnen.

Fluoreszenz-markierte Primer in einer Semi-nested PCR, in Verbindung mit der direkten Aufzeichnung der Elektrophorese während des Laufs auf dem ALF II express DNA Sequenzierer, zeigen eine hohe Sensitivität (Maes et al., 1997; El Kassar, Hetet, Brière & Grandchamp, 1998).

Trotz der erwähnten Vorteile des HUMARA ist diese Methode als semiquantitativ zu betrachten. Probleme traten wie in Abschnitt 3.1.2 gezeigt bezüglich der Präzision der Analyse, z.B. beim Mischen zweier DNAs auf, wobei sich hier keine einheitliche Aussage treffen lässt, da die Genauigkeit von verschiedenen Faktoren, wie z.B. der Größe des einzelnen Allels, sowie dem Abstand der Allele zueinander, abhängig zu sein scheint. Bei Unterschieden von einem oder zwei Triplets können Probleme bei der Darstellung und Berechnung der Peakgrößen entstehen, da zu geringe Abstände sich als Schulterbande (Abb.4-3) darstellen, und damit die tatsächliche Größe verfälschen können.

Ein weiteres Problem ist die präferentielle Amplifikation des kürzeren Fragments, die sich aber mittels einer mathematischen Gleichung heraus rechnen lässt (siehe Ergebnisteil Abschnitt 3.1.2.).

Bei der Berechnung der "Corrected Ratio" wird die Ratio der verdauten Proben (Allel 1 / Allel 2) durch die Ratio der nativen Proben (Allel 1 / Allel 2) geteilt (Willman et al., 1994).

MDS ist wie bereits oben erwähnt eine klonale Erkrankung, die aus myeloischen Knochenmarkzellen hervorgeht. Nur wenige Autoren (Culligan et al., 1992; Janssen et al., 1989) vermuten eine gemeinsame myelo-lymphatische Ursprungszelle. Die Tatsache, dass immerhin 18,2 % (Tabelle 3-10) der untersuchten Patientinnen nicht klonale Inaktivierungsmuster aufweisen, lässt sich auf unterschiedliche Weise erklären.

Zum Ersten wäre ein inkompletter Verdau durch das Restriktionsenzym HpaII möglich. Um dies auszuschließen, wurde bei jeder Restriktionsreaktion eine Qualitätskontrolle mitgeführt. Es wurden nur Proben ausgewertet, bei denen die Qualitätskontrolle einen ausreichenden Verdau aufwies. Somit kann diese Möglichkeit als eher unwahrscheinlich eingeschätzt werden.

Zum Zweiten wäre die Hypermethylierung (Jang & Mao, 2000) der HpaII Schnittstellen eine Erklärung, so dass kein Verdau stattfinden kann, und so eine polyklonale Population "vorgetäuscht" wird. Hypermethylierung ist in vielen Krebserkrankungen eine bekannte Ursache der Tumorsuppressorgen-Inaktivierung (Santourlidis et al. 2001; Kimura et al. 2001; Leone et al. 2002).

Mit Hypermethylierung wird die vermehrte Methylierung der CpG-reichen Regionen beschrieben, welche normalerweise unmethyliert wären. Dieser Prozess ist durch einen Transfer von Methylgruppen an die C5-Position des Cytosins charakterisiert und wird durch Mitglieder der Protein Familie der DNA Methyltransferasen katalysiert (Espada et al. 2004). DNA-Methylierungsmuster in Tumorzellen unterscheiden sich von denen in normalen Zellen. Häufig wird das Wildtyp-Gen durch Hypermethylierung ausgeschaltet während die zweite Kopie fehlt oder in mutierter Form vorliegt, was als einer der Schritte im Mehrschritt-Karzinogenese-Modell von Knudson gewertet werden kann (Robertson & Jones, 2000).

Auch MDS ist durch die Hypermethylierung und das damit verbundene Stummschalten verschiedener Gene charakterisiert. Die verstärkte Hypermethylierung wird hier, obwohl auch im frühen Stadium in Erscheinung tretend, üblicherweise mit einem Krankheitsprogress assoziiert (Claus & Lubbert, 2003). Eine dritte Möglichkeit der Erklärung wäre, dass in einigen Fällen der MDS-Klon bei den Patientinnen "zu klein" ist (Aivado et al., 2002) um mit dieser Methode detektiert zu werden, und durch die Überzahl der polyklonalen gesunden Zellen der kranke Klon verdeckt wird.

Sowohl die zweite als auch die dritte Alternative sind mögliche Erklärungen der nicht klonalen Inaktivierungsmuster. Wobei sich die zweite Alternative als mögliche Erklärung für fortgeschrittenere MDS-Erkrankungen anbieten würde, während das dritte Erklärungsmodell einen Ansatz bei den Patientinnen bieten würde, deren Erkrankung sich in einem "Low-Risk" Stadium befindet.

4. 1. 2. Diskussion der Ergebnisse der Klonalitätsanalysen

4.1.2.1. Klonalitäts-Definition

Zur Definition, wann ein Zellverhältnis als klonal zu gelten hat, gibt es verschiedene Thesen.

Die Mehrheit der Autoren vertritt jedoch die Meinung, dass ein klonales Verhältnis dann gegeben ist, wenn das X-Chromosomale Inaktivierungsmuster der Granulozyten eine Verteilung der inaktivierten X-Chromosomen in einem Verhältnis von größer oder gleich 3:1 und damit eine monoklonale Entwicklung zeigt (Willmann et al. 1994; Cazzola et al. 2001; Busque et al. 1996).

Diese Definition geht davon aus, dass die T-Zellen nicht Bestandteil des malignen Klons bei MDS sind und das X-chromosomale Inaktivierungsverhältnis zwischen maternalem und paternalem X-Chromosom einem Verhältnis von annähernd 1:1 entspricht (Lyon 1961). Mit dieser Auslegung ergeben sich jedoch Probleme bei Patientinnen, deren T-Zellen von Natur aus (angeboren oder erworben, z.B. durch Alter) ein verschobenes, unbalanciertes (=skewed) Verhältnis der X-chromosomalen Inaktivierung haben. Legt man die alte, oben genannte Definition bei diesen Patientinnen zugrunde, so tritt folgendes Problem auf: eine Patientin deren T-Zellen ein Verhältnis von 70:30 haben, würde mit einem Granulozyten-Verhältnis von 76:24 bereits als monoklonal gewertet. Wohingegen eine Patientin deren T-Zellen ein Verhältnis von 26:74 haben mit einem Granulozyten-Verhältnis von 74:26 (Abb. 4-1) als polyklonal gelten würde (Aivado, Rong et al., 2002).

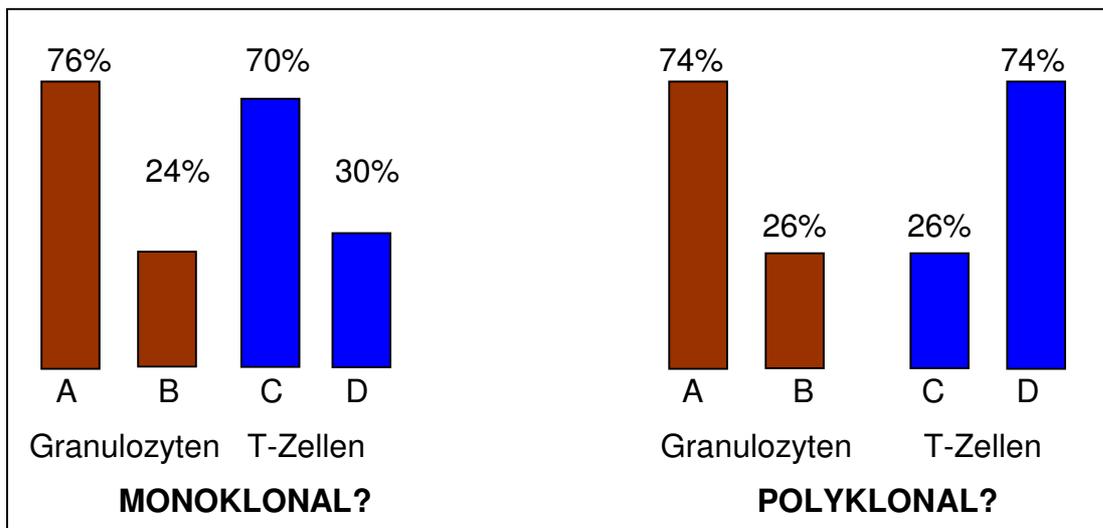


Abb. 4 –1 Darstellung der Verhältnisse von T-Zellen zu Granulozyten

Aus diesem Grund wurde ein neuer Algorithmus aufgestellt, der ein unbalanciertes XCIP der T-Zellen berücksichtigt.

Verhältnisse:

Granulozyten (PMNC): Allel A : Allel B

T-Zellen: Allel C : Allel D

I. wenn $PMNC_A > T-Zell_C$ dann gilt:

$$\%Klon = \left[\frac{A \times D}{B} \right] - C$$

II. wenn $PMNC_A < T-Zell_C$ dann gilt:

$$\%Klon = \left[\frac{B \times C}{A} \right] - D$$

Dieser Algorithmus kalkuliert mathematisch den Anteil der klonalen Zellen.

Dabei gilt: $R_T = \text{Allel C} : \text{Allel D}$ und $R_G = \text{Allel A} : \text{Allel B}$

Wenn $R_T > R_G$ gilt: Gesamt Clonal (GC) $= [(R_T - R_G) / R_T (R_G + 1)] \times 100\%$

Wenn $R_G > R_T$ gilt: GC $= [(R_G - R_T) / R_G + 1] \times 100\%$

Klonalität liegt vor wenn GC $> 50\%$ $\Rightarrow R_G < 0,33$ und $R_T \sim 1$

Polyklonalität liegt vor wenn GC $< 50\%$ und $R_T > 0,33$

Unklar bleibt es wenn GC $< 50\%$ und $R_T < 0,33$

Die frühere, oben genannte Definition von Klonalität erlaubt mathematisch gesehen, nur die Detektion eines Klons der über 50 % der untersuchten Zellen ausmacht.

Daher wurde diese, vielen Publikationen zugrunde liegende, Überlegung aufgegriffen, und auch hier erst von einem klonalen XCIP gesprochen wenn die mathematisch ermittelte Zahl der klonalen Zellen 50 % überschreitet.

Mit zunehmender unbalancierter XCIP der T-Zellen wird die Detektion klonaler Zellen immer schwieriger, so dass fast alle Autoren bei ihrer XCIP-Analyse Patienten mit gleichermaßen unbalancierten XCIPs von Granulozyten und T-Zellen als "skewed Lyonization" definierten und von der weiteren Analyse ausschlossen (Okada, M et al. 1999). Auch dieser Auffassung wurde in der Analyse gefolgt.

Ein weiteres Problem stellt die Analyse von Proben dar, deren Peaks durch ähnliche Triplettlängen so dicht beieinander liegen, dass die Schulter des zweiten Peaks vom ersten Peak überlagert wird, was zu einer Verfälschung der Peakhöhen und somit zu Fehlanalysen führt (Abb.4-2 und 4-3).

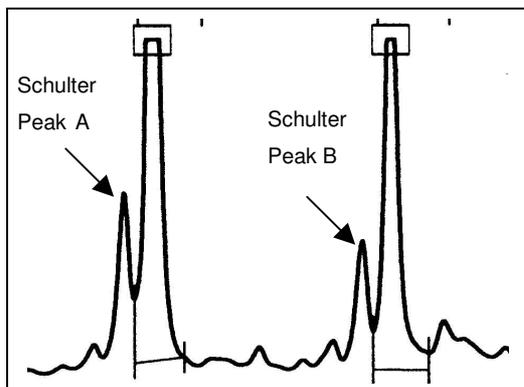


Abb.4-2 Verhältnis der AUC der Peaks jeweils mit Schulter

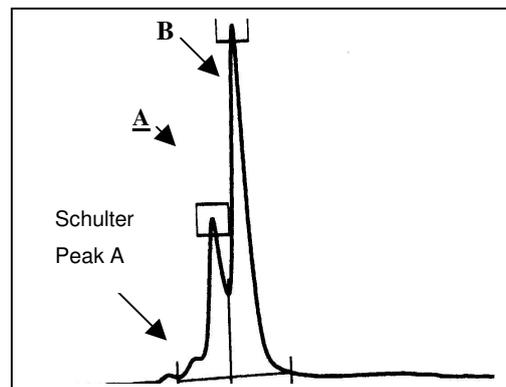


Abb. 4-3 Überlagerung der Schulter von Peak B durch Peak A

4.1.2.2. Klonalitäten im Materialvergleich von Knochenmark und peripherem Blut

Die Vergleichsanalyse der X-chromosomalen Inaktivierungsmuster von Knochenmark und Blutproben zeigte, dass beide Gewebearten sich im Wesentlichen vergleichbar gut zur Analyse eignen.

Hauptsächlich liegen die Probleme in der Auswertbarkeit der Analysen, wie oben beschrieben, in der Methodik begründet.

4.1.2.3. Subanalysen

Die Unterschiede in den X-chromosomalen Inaktivierungsmustern beim Vergleich der AISA-Patienten (RSA versus RARS – Ergebnisteile 3.1.4 und 3.1.5) scheinen die grundsätzlichen Differenzen dieser beiden Erkrankungsformen wiederzuspiegeln. Beide Formen der Erkrankung zeigen ein ähnliches zytomorphologisches Bild unterscheiden sich jedoch in ihren prognostischen Werten bezüglich des Fortschreitens der Erkrankung (Hast, 1986; Gattermann et al., 1990).

Bei den RSA-Patienten finden sich lediglich polyklonale oder „Skewed Lyonization“-Muster, wobei die letzteren mit 66,6% überwiegen, während die RARS-Patienten zu 86,7% (Ergebnisse 3.1.5) klonale Inaktivierungsmuster zeigen.

Bei den Erkrankungen manifestiert sich die Dysplasie in der RSA lediglich in den erythropoietischen Zellen, während sich bei der RARS zusätzliche dysplastische Formen in der Granulopoese und/oder der Megakaryopoese finden. Diese Abweichungen zeigen sich ebenfalls in Überlebenszeiten und dem Risiko einer Transformation zur AML (Germing et al. 2000).

Die besondere Position der Patienten mit RSA/RRA lässt sich wie vorher ebenfalls im Vergleich der Gruppe der Patienten mit einem Knochenmarkblastenanteil von kleiner oder gleich 10 % wieder finden. Hier ist der Anteil der RSA/RRA Patienten mit einem klonalen Inaktivierungsmuster mit 11,8 % deutlich kleiner als bei den anderen Patienten dieser Gruppe, obwohl die RSA/RRA Patienten mit einem Anteil von 17 Personen die zweitgrößte Patientengruppe nach den RARS Patienten ausmachen. Diese bilden mit 24 Personen die größte Gruppe zeigen allerdings einen Anteil mit klonalen Inaktivierungsmustern von 45,8%.

Auffällig ist hier auch die Gruppe der Patienten mit einem 5q- Syndrom. In dieser Gruppe der Patienten findet sich innerhalb der Vergleichsgruppe der höchste Anteil (62,5 % - Tab.3-7) mit einem klonalen Inaktivierungsmuster. Die Patienten mit einem 5q- Syndrom wurde 2001 von der WHO als eigene Gruppe innerhalb der MDS-Erkrankungen definiert. Bei diesen Patienten liegt eine isolierte Deletion im Bereich der Banden q31 bis q32 auf Chromosom 5 vor, wobei der betroffene Genbereich sich von anderen 5q-Deletionen z.B. bei AML unterscheidet (Lai et al. 2001; Boulwood et al 2000).

Der Blastenanteil dieser Patienten, in Blut und Knochenmark, liegt per Definition bei < 5 % (Vardiman, Harris & Brunning 2002). Der größere Anteil klonaler Inaktivierungsmuster lässt sich hier nicht durch eine schwerere Erkrankung erklären, da alle hier analysierten Patienten gemäß IPSS Score der Gruppe Low-Intermediate I angehören. Eventuell liegt hier ein Erklärungsansatz für die vermehrt nachgewiesene Klonalität in der, durch die 5q-Deletion bedingten Möglichkeit, dass zwei potentielle Tumorsuppressorgene (FMS (Boulwood et al. 1991) und EGR1 (Le Beau et al. 1989)) verloren gegangen sind (San Miguel, 1996).

Bei den Subanalysen der Intermediate II und High Score IPSS Patienten, mit einem Knochenmarkblastenanteil von 10 % – größer 20 % zeigen sich Anteile an klonalen Inaktivierungsmustern zwischen 66,7 % (Tab. 3-9) und 90,9 % (Tab. 3-8). Hier spiegelt sich der bereits mikroskopisch sichtbare hohe Blastenanteil in den Klonalitätsmustern wieder. Das Auftreten polyklonaler Inaktivierungsmuster bei den AML Patienten ist hier möglicherweise mit den bereits im Methodikteil erwähnten Hypermethylierungen zu erklären. Das bedeutet, dass die hier erscheinende Polyklonalität ein falsches Bild der tatsächlichen klonalen Gegebenheiten wiedergibt.

Betrachtet man die Gruppe der Patienten mit polyklonalen Inaktivierungsmustern separat, so lassen sich weder in der Verteilung der Karyotypen, noch in Unterschieden bezüglich des Zeitraums nach der Diagnosestellung eine ausreichende Begründung für die gefundenen XCIP- Muster finden.

4. 2. Differenzierung der AISA-Subgruppe mittels Sequenzierung

Mutationen der *ras* Genfamilie, speziell der N-*ras* (Paquette et al., 1993; Horijke et al., 1994) und Ki-*ras* (Padua et al., 1998; Gallagher et al., 1997) Onkogene, sind die häufigsten Mutationen in Blut- und Knochenmarkzellen von Patienten mit Myelodysplastischen Syndromen (MDS). Punktmutationen dieser Genfamilie treten besonders an Hotspots in den Codons 12, 13 und 61 auf. Verschiedene Studien bei MDS-Patienten machen jedoch unterschiedliche Angaben zwischen 3 % und 42 % speziell zur Häufigkeit der Mutation im Codon 12 des N-*ras* Gens (Lyons et al., 1988; Padua et al., 1988; Van Kamp et al., 1992; Souza-Fernandez et al., 1998).

Das Vorliegen einer N-*ras* Mutation wird, unabhängig vom Prozentsatz der Blasten im Knochenmark und dem Vorhandensein anderer zytogenetischer Veränderungen, als signifikant schlechtes prognostisches Merkmal gewertet (Paquette et al. 1993).

Der MDS-Subtyp der erworbenen idiopathischen sideroblastischen Anämie (AISA) wurde durch die FAB-Klassifizierungs-Gruppe als refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten (RARS) eingestuft (Bennett et al., 1982). Das bedeutet eine Anämie (= Blutarmut: Hämoglobin und/oder Hämatokrit Gehalt liegen unterhalb des alters- oder geschlechtsspezifischen Referenzwertes) bei der sich ringförmige um den Zellkern angeordnete Eisenablagerungen in den Mitochondrien der Erythrozytenvorläuferzellen, den Erythroblasten, finden (Definitionen aus dem Pschyrembel).

Eine Unterteilung in eine myelodysplastische Form (RARS im Folgenden) und eine reine sideroblastische Anämie (RSA) wurde vorgeschlagen (Cazzola et al. 1982), da es sich zytomorphologisch bei der RSA um eine rein erythrozytopoietische Erkrankung zu handeln scheint, während bei der RARS zusätzliche dysplastische Veränderungen innerhalb der Granulozytopoiese und Megakaryozytopoiese bestehen (Gattermann et al., 1990).

Patienten mit RSA weisen in ihren Knochenmark-Zellen regelhaft einen normalen Karyotyp auf und unterscheiden sich durch eine deutlich bessere Prognose als Patienten mit RARS (Hast, 1986; Gattermann et al., 1990).

In Studien die ebenfalls das Vorliegen einer N-*ras* Mutation bei MDS-Patienten untersuchten (Constantinidou et al. 1997; Antilla et al., 1995; Souza-Fernandez et al., 1998; Hirai et al. 1987; Janssen et al. 1987; Lyons et al., 1988; Misawa, Horiike, Kaneko & Kashima, 1997; Paquette et al. 1993) wurde mit Patientenzahlen zwischen 8 und 252 Patienten gearbeitet, wobei der Anteil der untersuchten RARS-Patienten (FAB) jeweils zwischen 4 und maximal 46 Patienten lag. Bei diesen Studien wurden Mutationsraten zwischen 0 und 50 % der untersuchten RARS-Patienten festgestellt. Vergleiche wurden in den oben angegebenen Studien angestellt mit den FAB-Typisierungsgruppen RA, RAEB, RAEB-T und CMML. Da alle diese Studien lediglich die FAB-Typisierung angeben, ist unklar wie viele der analysierten Patienten der Gruppe der RSA-Patienten zuzurechnen wären.

Das in dieser Arbeit nachgewiesene Fehlen von *ras*- Mutationen bei den untersuchten 19 Frauen mit einer RSA passt somit zum Überlebensvorteil und zur quasi fehlenden Transformation in eine AML bei diesen Patientinnen.

Die Ergebnisse (Tabelle 3-11) zeigen ferner, dass *ras*-Mutationen bei den untersuchten 17 RARS-Patientinnen mit einer Mutationsrate von 17,6 % im Gegensatz zu anderen Myelodysplastischen Syndromen, die bis zu 75 % aufweisen können, weniger häufig sind.

Fasst man alle hier untersuchten 36 Patientinnen der AISA-Subgruppe, gemäß FAB-Typisierung zur RARS-Gruppe zusammen, so kommt man zu einer Mutationsrate von lediglich 8,3 %.

Das Fehlen von *ras*-Genmutationen in den hier analysierten Patientinnen kann somit nicht als differentialdiagnostisches Merkmal für die Unterscheidung einer RSA von einer RARS verwendet werden.

Der Frage, ob die RSA und die RARS weiterhin in die gleiche Subgruppe der myelodysplastischen Syndrome einzuordnen sind, oder ob die RSA eine eigenständige Subgruppe bildet, wurde mit der neuen WHO Einteilung (Bennett, Brunning & Vardiman, 2002), bereits dahingehend Rechnung getragen, dass die refraktären Anämien (RA) und die refraktären Anämien mit Ringsideroblasten (RARS) in 2 separate Kategorien getrennt wurden, basierend auf der Präsenz von Dysplasien welche eine (nur die erythroide Reihe = RA) oder mehrere (2 oder 3 myeloide Zellreihen = RARS) Zellreihen betreffen.

4. 3. Array-Ergebnisse

Beim Vergleich der drei untersuchten MDS-Patientengruppen finden sich in den CD34+ Knochenmarkzellen Gene, die sich grundsätzlich in ihrer Expression von den gesunden Kontrollen unterscheiden. Darunter sind 28 Gene allen 3 untersuchten MDS Gruppen gemein. Diese lassen sich keiner bestimmten Genfamilie zuordnen sondern sind über die gesamte Breite der Genfamilien verteilt. Offensichtlich sind diese Expressionsunterschiede unabhängig vom Grad der malignen Transformation und repräsentieren grundsätzliche Veränderungen der Genexpression bei MDS (Tabelle 3-19).

Die Untersuchungen der CD34+ hämatopoietischen Stamm- und Progenitorzellen von MDS-Patienten haben Genexpressions-Profile ergeben, die mit den für MDS typischen Zeichen gesteigerter Proliferation, beeinträchtigter Reifung und gesteigerter Veranlagung zur Apoptose übereinstimmen.

Die gesteigerte Proliferation der veränderten hämatopoietischen Stammzellen im Knochenmark, die durch klonale Vermehrung zum meist hyperzellulären Knochenmark führt, lässt sich einerseits durch die statistisch signifikante Verringerung ($p = 0,002 - 0,009$) der Expression von CDKN1A (Cyclin dependent Kinase Inhibitor 1 A) um das 2,43 – 7,84fache erklären. Das CDKN1A Gen (Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 1A) kodiert für das p21^{WAF1} Protein, welches Cyclin-Kinase-abhängige Aktivitäten hemmt und die über p53 gesteuerte Unterdrückung des Wachstums von Tumorzellen (Zakut & Givol, 1995; El-Deiry et al. 1993) vermittelt. p21^{WAF1} induziert normalerweise einen Arrest des Zellzyklus in der G1-Phase und verhindert, durch die Inaktivierung Cyclin-abhängiger Kinasen oder durch die Hemmung von PCNA (Warbrick 1998), einen Eintritt in die G2/M-Phase (Bunz et al.1998; Gartel et al., 1996). Durch die verringerte Expression kommt es weder zu einer normalen Kontrolle des Zellzyklus durch p21^{WAF1} noch zur Unterdrückung des übermäßigen Wachstums durch p53. Die Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit einem Bericht über den, in diesem Fall immun-histochemisch, nachgewiesenen Mangel von CDKN1A in den Knochenmark-Biopsien von MDS – Patienten (Kanavaros et al. 1999).

Andererseits fand sich bei den Zellen der MDS – Patienten eine um das zweieinhalbfache gesteigerte Expression von PCNA. PCNA ist essentiell für die Replikation der DNA (Bravo 1986), da es als Co-Faktor für die DNA- Polymerase Delta fungiert. Die funktionelle Relevanz dieses Gens für das veränderte Proliferationsverhalten der CD34+-Zellen lässt sich durch die Korrelation zwischen der PCNA - Expression und der Zellularität des Knochenmarks von MDS-Patienten belegen (Kitagawa et al., 1993).

Eine gesteigerte Expression des Thrombopoietin Rezeptors (MPL) und von FLT3 (FMS related Tyrosine Kinase 3 – ein Mitglied der Wachstumsfaktor Tyrosinkinase Rezeptoren), wie sie in den CD34+-Zellen der Patienten mit RAEB/-t und sAML/MDS gefunden wurde, konnte in den mononukleären Zellen des Knochenmarks von Patienten der oben genannten Subtypen nachgewiesen werden (Vigon et al., 1993; Matsumura et al., 1996). MPL unterstützt das Überleben primitiver hämatopoetischer Progenitorzellen und verkürzt die Zeit die für den Zellzyklus erforderlich ist, während FLT3 den Mitogen-Signalweg über STAT5a (Signal Transducer and Activator of Transcription) aktiviert (Zhang et al., 2000). Ein gezielter FLT3 Tyrosinkinase Inhibitor wurde als zytotoxisch für Leukämiezellen beschrieben (Levis et al., 2002), daher findet sich hier ein möglicher neuer Ansatz für die Behandlung von MDS.

Die höchste Expression von STK1 (Stammzell Tyrosinkinase 1), ist mit einer 16fach gesteigerten Expressionsrate, innerhalb der von uns untersuchten Patientengruppen in den CD34+-Zellen von MDS-Patienten bei den sAML/MDS-Patienten zu finden. Eine Steigerung des mRNA Levels von STK1 dem humanen Homolog zu Flk-2/Flt-3, welches sich selektiv in CD34+-Knochenmarkzellen findet (Small et al., 1994) und an der Proliferation früher Stamm- und Progenitorzellen beteiligt ist konnte bereits früher gezeigt werden (Allampallam et al., 1999).

Die signifikant ($p = 0,002$) um das 4,2 - 6,2fach verringerte Expression des Transkriptionsfaktors Tristetraprolin (TTP) bei den MDS-Patienten könnte eine Erklärung für die häufig erhöhten $TNF\alpha$ Spiegel im Knochenmark dieser Patienten sein (Kitagawa et al., 1997). Tristetraprolin ist ein Transkriptionsfaktor (Taylor et al., 1995), der zudem durch seine Bindung an AU-reiche Elemente in der mRNA von $TNF\alpha$ für eine Destabilisierung derselben und damit für eine Regulation des $TNF\alpha$ Levels sorgt (Carballo et al., 1998).

Das Genprodukt des Transkriptions-Regulators NM23-H2 (Nonmetastatic Protein 23, Homolog 2), welches als einziges Transkriptions-assoziiertes Gen bei allen MDS-Patienten überexprimiert wird, bindet normalerweise DNA und aktiviert die Transkription über c-MYC Promotor Elemente (Postel, Berberich, Flint & Ferrone, 1993). NM23-H2 wurde als Inhibitor der Differenzierung bei myeloischen Leukämiezellen von Mäusen identifiziert (Okabe-Kado et al. 1992), und die Zugabe von rekombinantem NM23-H2 zu humanen CD34+CD38+ Progenitorzellen in CFU (Colony-forming-units) Assays führt zu einer Vermehrung der "erythroid burst-forming units" und zu einer Verringerung der Makrophagen Kolonien (Willems et al., 2002).

Das Knochenmark von MDS-Patienten ist durch verschiedene dysplastische Veränderungen charakterisiert. Insbesondere lässt sich, als eine Folge der Genexpressions-Änderungen bei den für die Differenzierung von Progenitorzellen zuständigen Genen, eine schwächere Ausreifung der Zellen feststellen. Beispielsweise werden die Gene die für MAD (Max dimerization protein – Transkriptionsrepressor / Tumorsuppressorgen) und das p55-c-FOS Proto-Onkogen (FOS – Transkriptionsfaktor / und eine Hauptkomponente des Aktivator Protein-1 (AP-1) Transkriptionsfaktorkomplex) kodieren in den CD34+- Zellen von MDS-Patienten in signifikant verringertem Maße ($p = 0,001 - 0,025$ für MAD und $p = 0,004 - 0,009$ für c-FOS) exprimiert. Beide Proteine sind dafür bekannt die zelluläre Differenzierung zu unterstützen: MAD als Antagonist zum c-MYC Onkogen (Chen et al., 1995) und p55-c-FOS durch seine Verbindung mit c-JUN zum Transkriptionsfaktor-Komplex AP-1 (Liebermann, Gregory & Hoffman, 1998). Der Differenzierungs-induzierende Effekt von MAD und FOS führt gleichzeitig zu einer Wachstumshemmung. Wie groß der Einfluss einer verringerten FOS-Expression auf die verminderte Ausreifung der Knochenmarkzellen von MDS-Patienten ist, lässt sich allerdings schwer sagen, da hämatopoietische Stammzellen von FOS-defizienten Mäusen normal erscheinen (Okada et al., 1994).

Eine Erklärung für das schlechte, lediglich vorübergehende klinische Ansprechen bei der Behandlung mit GM-CSF (Gradishar et al., 1992) könnte die verringerte Expression der Alpha-Kette des Granulozyten-Makrophagen Kolonie-Stimulierenden-Faktor Rezeptors (GM-CSF-R α) bei MDS-Patienten sein. GM-CSF vermittelt, neben anderen myeloischen Wachstumsfaktoren, die Proliferation und Differenzierung myeloischer Progenitor- und Vorläuferzellen (Crosier, Hall, Vitas & Crosier, 1997).

Bei Neutrophilen von MDS – Patienten konnte ebenfalls eine verminderte Expression des GM-CSF-Rezeptors nachgewiesen werden (Shikama et al., 2000).

Bei der Analyse der Genexpressions-Level fällt auf, dass die Expression von 19 der 28 signifikant differentiell exprimierten Wachstumsfaktoren, Zytokinen und deren Rezeptoren übereinstimmend bei allen hier analysierten Gruppen von MDS – Patienten gegenüber der Expression bei gesunden Kontrollpersonen herunter reguliert sind. Besonders auffällig ist hier EPA (erythroid-potentiating activity gene) ein Glycoprotein, welches speziell die Bildung von erythroiden „burst-forming“ und „colony-forming“ Einheiten stimuliert (Gasson et al., 1985). Seine genaue Aktivität ist bisher unklar, aber die Unterdrückung der Apoptose scheint eine Rolle zu spielen. Diese Schlussfolgerung lässt sich aus in-vitro Studien mit Burkitt Lymphom-Zelllinien ziehen, die zeigten, dass sich die Apoptose durch die retrovirale Induktion von EPA hemmen ließ. Erklärt wurde die Hemmung mit der EPA-induzierten Expression von BCL-X_L und der Reduktion der Aktivität von NF-κB (Guedez et al., 1998). Die reduzierte Expression von EPA in den CD34+-Zellen der MDS-Patienten ist also möglicherweise eine Erklärung sowohl für die verminderte Ausreifung als auch für die gesteigerte Apoptose der erythroiden Zellen.

Ein weiterer möglicher Grund für die gestörte Ausreifung der CD34+-Zellen von MDS-Patienten könnte die verringerte Expression von Genen sein, die für Enzyme codieren, welche am Aufbau der extrazellulären Matrix beteiligt sind. Die beiden Cathepsine H und L sind signifikant erniedrigt, wobei Cathepsin H in allen 3 Gruppen der MDS-Subtypen erniedrigt ist, während sich bei Cathepsin L die stärkste Verringerung in der Gruppe der RA-Patienten zeigt. Cathepsin L spaltet Elastin und Collagen (Ishidoh & Kominami, 1998). Cathepsin H ist bekannt dafür, im Nieren-Kortex glomeruläres, Heparan-Sulfat-reiches Proteoglycan zu hydrolysieren (Thomas & Davies, 1989). Dies könnte ein wichtiger Punkt sein, da Heparan-Sulfat-reiche Proteoglycane im Knochenmark die Hämatopoiese durch die Bildung einer multimolekularen Stammzell-Nische unterstützen (Gupta et al., 1998). Neben dieser Funktion bei der Adhärenz der Stammzellen spielen die Proteoglykane durch ihre Fähigkeit zur Aufnahme und Einteilung der löslichen hämatopoietischen Wachstumsfaktoren auch eine wichtige Rolle innerhalb des Knochenmarkstromas (Gordon, Riley, Watt & Greaves, 1987; Gordon, Riley & Clarke, 1988).

Die signifikante Expressions-Verringerung ($p = 0,003 - 0,004$) des Urokinase-Plasminogen-Aktivator Oberflächen-Rezeptors (U-PAR) in den CD34+-Zellen der MDS-Patienten könnte ebenfalls eine wichtige Rolle beim veränderten Zusammenwirken zwischen Matrix und Stammzellen spielen. Urokinase Plasminogen Aktivator (U-PA), welches Plasminogen zu Plasmin spaltet, wird über die Bindung an den U-PAR aktiviert. Plasmin und U-PA setzen Zytokine wie z.B. TGF-β, IL-1 oder den Fibroblasten Wachstumsfaktor (FGF) frei, welche an die extrazelluläre Matrix des Knochenmarks gebunden sind (Plesner, Behrendt & Ploug, 1997). Unsere Expressionsdaten lassen vermuten, dass t bei MDS-Patienten das Zusammenspiel der medullären CD34+-Zellen und ihres Stromas, welches das Wachstum und die Differenzierung steuert, durch die verringerte Expression der genannten Gene gestört ist.

Die Unterschiede die sich im Transkriptom der CD34+-Zellen finden lassen, weisen darauf hin, dass diese Zellen von MDS-Patienten im Vergleich zu den Zellen gesunder Spender einem größeren oxidativen Stress ausgesetzt sind. Diese Schlussfolgerung lässt sich aus der Tatsache ableiten, dass

die Gene für Gluthation S-Transferasen (GST) 1,2 und pi in CD34+-Zellen von MDS-Patienten signifikant 2,4-3fach höher ($p = 0,002-0,009$) exprimiert werden. Diese kodieren Enzyme, welche für die Verbindung von reduziertem Gluthation und freien Radikalen sorgen. Außerdem fand sich eine signifikante Erhöhung der Expression der Gluthation Reduktase (GSR), die für die ausreichende Versorgung mit reduziertem Gluthation zuständig ist.

Die niedrige Rate von kompletten Remissionen bei Patienten mit MDS in Folge einer intensiven Chemotherapie, im Vergleich zu Patienten mit de novo AML wurde zum Teil mit der gesteigerten Expression des MDR1 Gens (Multidrug resistance gene 1) erklärt (Wattel & Lepelley, 1997). Da eine gesteigerte Expression von GST und GSR Genen ebenfalls mit der Entwicklung einer Resistenz gegen zytotoxische Medikamente in Verbindung gebracht wird, ohne dass der Mechanismus abschließend geklärt werden konnte (Katagiri et al., 1993; Muller et al., 1993), und sich dies im Falle der CD34+-Zellen der MDS-Patienten nachweisen ließ, scheint dies eine schlüssige Erklärung für das verminderte Ansprechen auf intensive Chemotherapien zu sein.

Dem durch oxidativen Stress erhöhten Bedarf an DNA-Reparatur (Mitra, Boldogh, Izumi & Hazra, 2001) wird mit der signifikanten ($p = 0.002$ und 0.02) Steigerung der Expression von zwei DNA-Reparatur-Enzymen begegnet. Es handelt sich um Xeroderma Pigmentosum Komplementierung Gruppe B (XPB) und Poly-(ADP-)-Ribose-Polymerase (PARP) (Tabelle 3-19). Während es sich bei XPB um eine Helikase mit essentieller Endonuklease-Aktivität handelt vermittelt PARP den Transfer von ADP-Ribose Einheiten von NAD^+ zu den nukleären Proteinen (Schaeffer et al., 1993; Love, Barber & Wilcock, 1999).

Als weiteres Kennzeichen von MDS gilt die große Anzahl apoptotischer Zellen im Knochenmark der Patienten. Dieses gilt auch für die CD34+-Zellen, wobei dies hier eher für RA-Patienten als für die anderen Subgruppen beschrieben wurde (Berger et al., 2001; Yoshida & Mufti, 1999).

Die in den CD34+-Zellen der MDS-Patienten festgestellte, mit RA ($p = 0.025$), RAEB/-T ($p = 0.025$) und sAML/MDS ($p = 0.018$), signifikant erhöhte Expression von Caspase 3 (Tabelle 3-19), und in der Gruppe der sAML/MDS Patienten ($p = 0.018$) die gesteigerte Expression von Caspase 8 (Tabelle 3-18) scheinen dieses zu bestätigen. Beide Caspasen gehören zum extern gesteuerten Aktivierungsweg für die Apoptose (Salvesen & Dixit, 1997). Caspase 8 ist die Apikal-Caspase des "TNF family death receptor pathway" (Varfolomeev et al. 1998; Juo et al., 1998) und aktiviert ihrerseits Caspase 3 welche wiederum so genannte Todes-Substrate wie z.B. Gelsolin spaltet (Kothakota et al., 1997). In mononukleären Zellen des Knochenmarks von RA-Patienten konnte mit Hilfe der Western-Blot Analyse eine Hochregulation von Caspase 3 nachgewiesen werden (Boudard et al., 2000), wobei dies mit einer gesteigerten Enzymaktivität korrelierte (Bouscary et al., 2000).

Zusätzlich zur erhöhten Expression der Caspasen konnte eine signifikant verringerte Expression der anti - apoptotischen Gene IEX-1L (immediate-early response gene) und MCL1 (myeloid cell leukemia) in den CD34+-Zellen der MDS-Patienten nachgewiesen werden (Tabelle 3-19). IEX-1L schützt Zellen vor der, durch die Rezeptoren von FAS-Ligand und $TNF\alpha$, induzierten Apoptose (Wu et al., 1998). Das MCL1 Protein hat die Funktion, in den Mitochondrien die Freisetzung von Cytochrom C zu reduzieren (Wang & Studzinski, 1997). Der mögliche Grund für die bei RAEB/-T und sAML/MDS reduzierte Apoptose liegt in der verringerten Expression der beiden pro-apoptotischen Gene Caspase 10 und $TNF\alpha$ -Rezeptor 2 (TNFR2). Caspase 10 zeigte lediglich in den Patienten-Gruppen mit

RAEB/-T und sAML/MDS eine signifikante Verringerung der Expression. Für TNF α -Rezeptor 2 (TNFR2) konnte nur bei RAEB/-T und sAML/MDS eine verringerte Expression nachgewiesen werden.

Um die Ergebnisse der Array - Untersuchungen zu bestätigen wurden von der Arbeitsgruppe zusätzliche Experimente auf DNA-Basis am LightCycler[®] durchgeführt. Dabei wurden jeweils die Array - Daten als Ausgangsbasis betrachtet. Die LightCycler[®]- Läufe wurden mit GAPDH als Kontroll-Gen durchgeführt. Alle Proben liefen als Doppelansatz und alle Experimente wurden reproduziert. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen wurden freundlicherweise von Frau B. Junge zusammengestellt. Bis auf MMP11 ließen sich die Array - Daten bei allen untersuchten Genen durch den LightCycler[®] bestätigen.

Insgesamt lässt sich sagen, dass die erhaltenen Genexpressionsprofile der CD34+-Zellen zum besseren Verständnis der charakteristischen Merkmale der Myelodysplastischen Syndrome beitragen. Die unvollständige Ausreifung scheint die Folge einer verringerten Transkription von Wachstumsfaktoren, Zytokinen, Chemokinen und deren Rezeptoren, gepaart mit einer reduzierten Ausbildung von Enzymen zu sein, die am Aufbau der extrazellulären Matrix beteiligt sind. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass dies alles zum Verlust der Kommunikation führt die für die physiologische Interaktion zwischen den CD34+-Zellen und ihrer Umgebung notwendig ist. Da sich mehr transkriptionelle Unterschiede zwischen den CD34+-Zellen der MDS-Patienten und den CD34+-Zellen der gesunden Spender, als zwischen den einzelnen MDS-Subgruppen finden ließen, legt dies den Schluss nahe, dass der Schritt von einer normalen Hämatopoiese zum MDS größer ist als der Schritt vom MDS zur Leukämie.

5. Zusammenfassung

Myelodysplastische Syndrome sind eine heterogene Gruppe klonaler Erkrankungen. Mit Hilfe verschiedener molekulargenetischer Methoden wurden im Rahmen dieser Arbeit Möglichkeiten zur molekularen Differenzierung der einzelnen Krankheitsformen gesucht.

Bei der Klonalitätsanalyse der Blut- und Knochenmarkproben von 139 Patientinnen, mit Hilfe X-Chromosomaler Inaktivierungsmuster, stellte sich heraus, dass diese Methode lediglich eine Möglichkeit der semi-quantitativen Auswertbarkeit bietet. Obwohl der gewählte Marker, der Humane Androgen Rezeptor mit 20 Allelen hoch polymorph ist, und er mit einer 90 %igen Heterozygotie für kaukasische Frauen beschrieben wurde ist diese Analyse mit Problemen behaftet.

Es zeigte sich bei einigen Patientinnen trotz einer gesicherten Diagnose ein polyklonales Inaktivierungsmuster, für welches verschiedene Erklärungsansätze zu Verfügung stehen. Hierbei scheint die Möglichkeit der Hypermethylierung von Schnittstellen des verwendeten Restriktionsenzym bei Hochrisiko-Patienten einen brauchbaren Ansatz zu bieten, während für Patienten mit einem günstiger Prognose die Annahme favorisiert wird, dass der Klon durch die noch überwiegende Zahl von gesunden Zellen maskiert wird.

Bei einer anschließenden Sequenzanalyse von 36 Patientinnen der AISA-Subgruppe (AISA = Acquired idiopathic sideroblastic anaemia / erworbene idiopathische sideroblastische Anämie), zur Feststellung von Mutationen der ras-Genfamilie, wurden Unterschiede zwischen den beiden Formen RSA (= reine sideroblastische Anämie) und RARS (refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten) gefunden. Keine der 19 analysierten RSA-Patientinnen wies eine Mutation auf, während bei den RARS - Patienten eine Mutationsrate von 17,6 % nachgewiesen werden konnte. Diese Mutationsrate ist im Gegensatz zu den sonst bei MDS beschriebenen Raten von bis zu 75 %, relativ gering. Als differentialdiagnostische Methode um eine RSA von einer RARS zu unterscheiden ist das Fehlen von ras - Mutationen aufgrund der geringen Mutationsrate der RARS-Patientinnen demnach nicht aussagesicher.

Letztendlich bestätigen unsere Ergebnisse die neue WHO (= World Health Organization)-Klassifikation hinsichtlich der Unterscheidung von RSA und RARS in zwei unterschiedliche Gruppen des MDS.

Die durchgeführte Analyse von 21 Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen, mit Hilfe der cDNA Microarrays zeigte deutliche Expressionsunterschiede zwischen den Arrays der Patienten und den gesunden Kontrollen. Diese Auffälligkeiten in der Expression sind unabhängig vom Grad der Transformation. Allerdings ist die Anzahl der unterschiedlich exprimierten Gene zwischen den beiden MDS-Formen RA (= refraktäre Anämie) (52 Gene) und RAEB/T (= refraktäre Anämie mit Blastenexzess/in Transformation)(55 Gene) zu den gesunden Kontrollen geringer als die Anzahl der unterschiedlich exprimierten Gene zwischen MDS/sAML (= sekundäre akute myeloische Leukämie)(93 Gene) und den gesunden Kontrollen. Alle drei Patientengruppen zeigen jedoch übereinstimmend Expressionsunterschiede in 28 Genen, die sich klar von den Gesunden unterscheiden. Diese Gene reflektieren die grundsätzlichen Veränderungen bei MDS nämlich gesteigerte Proliferation, beeinträchtigte Reifung und gesteigerte Apoptose wieder finden.

Einige der hier gefundenen Veränderungen, wie die gesteigerte Expression von FLT3 (FMS related Tyrosine Kinase 3 – ein Mitglied der Wachstumsfaktor Tyrosinkinase Rezeptoren) bieten einen Ansatz für eine neue Therapiestrategie, da der Einsatz eines Tyrosinkinase Inhibitors zur Hemmung von

FLT3 bereits als eine mögliche Behandlungsoption für Leukämien diskutiert wurde (Tse et al., 2002; Giles et al., 2003). Weitere Kandidaten für Therapieansätze sind IEX-1, EPA, sowie Tristetraprolin. Eine Therapie zum Anheben des signifikant erniedrigten Transkriptionsfaktors Tristetraprolin (TTP) könnte bei den MDS-Patienten zur Senkung der häufig erhöhten TNF α Spiegel im Knochenmark und damit zu einer Verringerung der Entzündungsreaktionen beitragen. Eine andere Möglichkeit wäre der Versuch die Hemmung der Apoptose durch die retrovirale Induktion von EPA einzuleiten, wie dies bereits bei in-vitro Studien mit Burkitt Lymphom-Zelllinien gezeigt werden konnte. Einen ähnlichen Ansatz würde hier IEX-1 bieten dessen therapeutisch induzierte Erhöhung ebenfalls zu einem Schutz der Zellen vor Apoptose beitragen könnte.

Die nachgewiesenen gesteigerten Werte für die Expression von GST (Gluthation S-Transferase) und GSR (Gluthation S - Reduktase) könnten eine mögliche Erklärung für das schlechte Ansprechen von MDS-Patienten auf Chemotherapien sein. Die signifikant erhöhten Werte von Caspase 3 und Caspase 8 schließlich bieten einen Erklärungsansatz für die bei MDS-Patienten beobachtete gesteigerte Apoptoserate im Knochenmark.

Die Differentialdiagnose MDS ist für die Patientengruppe mit einem Blastenanteil von kleiner als 5% nicht leicht zu treffen. Beim Vergleich der Genexpressions - Analysen der CD34+-Zellen von MDS - Patienten und den der CD34+-Zellen der gesunden Kontrollen wurde darum ein Algorithmus gewählt, der eine Unterscheidung zwischen gesunden Kontrollen und Patienten (RA) mit weniger als 5% Blasten zulässt. Es wurde schließlich ein Set aus sieben differentiell exprimierten Genen gewählt (Abb.3-8), welches eine klare Unterscheidung zwischen den gesunden Kontrollen und den RA-Patienten aber auch jeder anderen MDS-Subgruppe zulässt. Auf diese Weise konnte eine weitere Möglichkeit der Differentialdiagnostik genutzt werden.

Abschließend lässt sich sagen, dass die gefundenen Unterschiede in den Expressionsmustern zum besseren Verständnis der molekularen Pathologie bei MDS beigetragen haben.

6. Literaturverzeichnis

Aaronson, Stuart A. (1991)
Growth factors and cancer
Science, Vol. 254, 1146 – 1160

Aivado, M., Rong A. et al. (2002)
Favourable response to antithymocyte or antilymphocyte globulin in low-risk myelodysplastic syndrome patients with a `non-clonal` pattern of X-chromosome inactivation in bone marrow cells
Eur J Haematol 68, 210 – 216

Allampallam, K. et al. (1999)
Measurement of mRNA expression for a variety of cytokines and its receptors in bone marrow of patients with myelodysplastic syndromes
Anticancer Res. 19, 5323 – 5328

Allen, R.C. et al. (1992)
Methylation of HpaII and HhaI sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor gene correlates with X-chromosome inactivation
Am J Hum Genet 51, 1229 – 1239

Antilla, P. et al. (1995)
Idiopathic macrocytic anaemia in the aged: molecular and cytogenetic findings
British Journal of Haematology 90, 797 – 803

Aul, C. et al. (1992)
Myelodysplastische Syndrome
Dtsch. Med.Wschr. 117, 1223

Aul, C., Gattermann N., Heyll A. et al. (1992)
Primary myelodysplastic syndromes: analysis of prognostic factors in 235 patients and proposals for an improved scoring system
Leukemia 6, 52

Barbacid, M. (1987)
Ras gene
Ann Rev Biochem 56, 779 – 827

Barnes, W.M. (1994)
PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from λ bacteriophage templates
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 2216 – 2220

Bartram, C.R. (1992)
Molecular genetic aspects of myelodysplastic syndromes
Hematol Oncol Clin North Am. 1992 Jun;6(3):557-70

Basu, T.N. et al. (1992)
Aberrant regulation of ras proteins in malignant tumour cells from type 1 neurofibromatosis patients
Nature, 1992 Apr 23;356(6371):713-5

Belkin, S. & Jannasch, H.W. (1985)
Arch. Microbiol., 141, 181 – 186

Bennett, J.M. et al. (1982)
The French-American-British cooperative group. Proposals for the classification of myelodysplastic syndromes
Br J Haematol 51, 189 – 199

- Berghe van den, H. et al. (1985)
The 5q- anomaly
Cancer Genet Cytogenet. 1985 Jul;17(3):189-255. Review.
- Berger, G. et al. (2001)
Increased apoptosis in mononucleated cells but not in CD34+ cells in blastic forms of myelodysplastic syndromes
The Hematology Journal 2, 87 – 96
- Bishop, J. Michael (1991)
Molecular themes in Oncogenesis
Cell, Vol. 64, 235-248
- Boudard, D. et al. (2000)
Expression and activity of caspases 1 and 3 in myelodysplastic syndromes
Leukemia 14, 2045 – 51
- Boultwood, J. et al. (1991)
Loss of both CSF1R(FMS)alleles in patients with myelodysplasia and a chromosome 5 deletion
PNAS 88:6176-6180
- Boultwood J. & Fidler C. (1995)
Chromosomal deletions in myelodysplasia
Leuk Lymphoma. Mar;17(1-2):71-8.
- Boultwood, J. et al. (2000)
Physical mapping of the human ATX1 homologue (HAH1) to the critical region of the 5q- syndrom within 5q32, and immediately adjacent to the SPARC gene
Hum Genet 106:127-129
- Bouscary, D. et al. (2000)
Activity of the caspase-3/ CPP32 enzyme is increased in “early stage“ myelodysplastic syndromes with excessive apoptosis, but caspase inhibition does not enhance colony formation in vitro
Exp Hematol 28, 784 – 791
- Bøyum, A., (1964)
Separation of white blood cells
Nature 204, 793
- Bøyum, A., (1968)
Separation of leukocytes from blood and bone marrow
Scand J Clin Lab Invest 21, Suppl. 97
- Brach, M. A., Scott, C., Belka, C. und Hermann, F.(1995)
Molekulare Grundlagen der Tumorentstehung
Dtsch Med Wochenschr. 1995 Jan 20;120(3):73-9
- Bravo, R. (1986)
Synthesis of the nuclear protein cyclin (PCNA) and its relationship with DNA replication
Exp Cell Res 163, 287 - 293
- Brazma, A., Hingamp, P., Quackenbush, J. et al. (2001)
Minimum information about microarray experiment (MIAME) – towards standards for microarray data
Nat Genet 29, 365-371
- Bunz, F. et al. (1998)
Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage
Science 282, 1497 - 1501
- Busque, L., Mio, R., Mattiolo, J. et al.(1996)
Nonrandom X-inactivation patterns in normal females: lyonization ratios vary with age
Blood 88, 55 – 65

- Caligiuri, M.A., Strout, M.P. & Gilliland, D.G. (1997)
Molecular biology of acute myeloid leukemia
Semin Oncol 24, 32-44
- Cantley, L.C. et al. (1991)
Oncogenes and signal transduction
Cell 64, 281 – 302
- Carballo, E. et al. (1998)
Feedback inhibition of macrophage tumor necrosis factor-alpha production by tristetrapoline
Science 281, 1001 – 1005
- Cazzola, M. et al. (1982)
Quantitative evaluation of erythropoietic activity in dysmyelopoietic syndromes
Br J Haematol 50, 55 – 62
- Cazzola, M. et al. (2001)
X-chromosome inactivation ratios in female carriers of X-linked sideroblastic anemia
Blood Vol.97 No.12, 4001-4002
- Champion, K.M. et al. (1997)
Clonal haemopoiesis in normal elderly women: implications for the myeloproliferative disorders and myelodysplastic syndromes
Br J Haematol 97, 920 – 926
- Chen, J. et al. (1995)
Effects of the MYC oncogene antagonist, MAD, on proliferation, cell cycling and the malignant phenotype of human brain tumour cells
Nat Med. 1, 638 – 643
- Cho, Kathleen R., Vogelstein, Bert (1992)
Genetic alterations in the adenoma-carcinoma sequence
Cancer, 70, No.6, 1727-1731
- Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1987)
Single step method of RNA isolation by acid guanidiniumisothiocyanat - phenol - chloroform extraction
Anal. Biochem., 162, 156-159
- Claus, R. & Lubbert, M. (2003)
Epigenetic targets in hematopoietic malignancies
Oncogene 22:6489-6496
- Constantinidou, M. et al. (1997)
Codon 12 ras mutations in patients with myelodysplastic syndrome: incidence and prognostic value
Ann Hematol 74, 11 – 14
- Cook, D.N. (1996)
The role of MIP-1 alpha in inflammation and hematopoiesis
J Leukoc Biol. 59, 61 – 66
- Crosier, K.E., Hall, L.R., Vitas, M.R. & Crosier P.S. (1997)
Expression and functional analysis of two isoforms of the human GM-CSF receptor alpha chain in myeloid development and leukemia
Br J Haematol 98, 540 – 548
- Czaplewski, L.G et al. (1999)
Identification of amino acid residues critical for aggregation of human CC chemokines macrophage inflammatory protein (MIP)-1alpha, MIP-1beta and RANTES. Characterization of active disaggregated chemokine variants
J Biol Chem. 274, 16077 – 16084

- Delforge, M. et al. (1995)
Polyclonal Primitive Hematopoietic Progenitors Can Be Detected in Mobilized Peripheral Blood From Patients With High-Risk Myelodysplastic Syndromes
Blood, Vol.86, No10 (Nov.15) 3660-3667
- van Dijk, J.P. (2002)
Acquired skewing of Lyonization remains stable for a prolonged period in healthy blood donors
Leukemia 16, 362 – 367
- Eckerth, K.A. & Kunkel, T.A. (1991)
DNA polymerase fidelity and the polymerase chain reaction.
PCR Methods Appl. Aug;1(1):17-24. Review.
- Eisen, M.B. et al. (1998)
Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 14863-14868
- El-Deiry, W.S. et al. (1993)
WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression
Cell 75, 817 – 825
- El Kassar, N., Hetet, G., Brière, J. & Grandchamp, B. (1998)
X-Chromosome inactivation in healthy females: incidence of excessive lyonization with age and comparison of assays involving DNA methylation and transcript polymorphisms
Clinical Chemistry 44:1, 61 – 67
- Espada, J. et al. (2004)
Human DNA Methyltransferase 1 is required for maintenance of the Histone H3 modification pattern
J Biol Chem. 2004 Aug 27;279(35):37175-84
- Fearon, Eric R. & Vogelstein, Bert (1990)
Use of Restriction Fragment Length Polymorphisms to determine the clonal origin of human tumors
Science, Vol.227, 642-645
- Fearon, Eric R. & Vogelstein, Bert (1985)
A Genetic Model for Colorectal Tumorigenesis
Cell, Vol.61, 759-767
- Gale R.E., Wheadon, H. & Linch, D.C. (1991)
X-chromosome inactivation patterns using HPRT and PgK polymorphisms in haematologically normal and post-chemotherapy females
Br J Haemat 79, 193
- Gale, R.E., Mein, C.A. & Linch, D.C. (1996)
Quantification of X-chromosome inactivation patterns in haematological samples using the DNA PCR-based HUMARA assay
Leukemia 10, 362 – 367
- Gale, R.E., Fielding, A.K., Harrison, C.N. & Linch, D.C. (1997)
Acquired skewing of X-chromosome inactivation patterns in myeloid cells of elderly suggests stochastic clonal loss with age
Br J Haematol 98, 512 – 519
- Gallagher, A. et al. (1997)
The molecular basis of myelodysplastic syndromes
Hematologica 82, 191 - 204
- Gambke, C., Hall, A. & Moroni, C. (1985)
Activation of an N-ras gene in acute myeloblastic leukemia through somatic mutation in the first exon
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82 (3), 879-882

- Garfin, D.E. & Goodman, H.M. (1974)
Nucleotide sequences at the cleavage sites of two restriction endonucleases from *Hemophilus parainfluenzae*
Biochem Biophys Res Commun. Jul 10;59(1):108-16.
- Gartel, A.L. et al. (1996)
p21 – negative regulator of the cell cycle
Proc Soc Exp Biol Med 213, 138 - 149
- Gasson, J.C. et al. (1985)
Molecular characterization and expression of the gene encoding human erythroid-potentiating activity
Nature 315, 768 – 71
- Gattermann, N. et al. (1990)
Two types of acquired sideroblastic anaemia (AISA)
Br J Haematol 74, 45 – 52
- Germing, U. et al. (2000)
Two types of acquired idiopathic sideroblastic anaemia (AISA): a time-tested distinction.
Br J Haematol. 2000 Mar;108(4):724-8.
- Germing, U.(2002)
Myelodysplastische Syndrome: Epidemiologie, Reklassifizierung, Prognose und Therapie
Berichte aus der Medizin, 2002 ; Shaker Verlag
- Giles, F.J. et al. (2003)
SU5416, a small molecule tyrosine kinase receptor inhibitor, has biologic activity in patients with refractory acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndromes.
Blood. Aug 1; 102(3):795-801. Epub 2003 Mar 20.
- Gilliland, D.G. (1998)
Molecular Genetics of Human Leukemia
Leukemia 12, Suppl.1, S7-S12
- Gordon, M.Y., Riley, G.P., Watt, S.M. & Greaves, M.F. (1987)
Compartmentalization of a hematopoietic growth factor (GM-CSF) by glycosaminoglycans in the bone marrow microenvironment
Nature 326, 403 – 405
- Gordon, M.Y., Riley, G.P. & Clarke, D. (1987)
Heparan sulfate is necessary for adhesive interactions between human early hemopoietic progenitor cells and the extracellular matrix of the marrow microenvironment
Leukemia 2, 804 – 809
- Gradishar, W.J. et al. (1992)
Clinical and cytogenetic responses to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in therapy-related myelodysplasia
Blood 80, 2463 – 2470
- Greenberg P, Cox C, Le Beau, M.M., et al. (1997)
International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes.
Blood 89:2079-2088.
- Greenberg, P.L., Young, N.S. & Gattermann, N. (2002)
Myelodysplastic Syndromes
Hematology 1, 136-161
- Guedez, L. et al. (1998)
In vitro suppression of programmed cell death of B-cells by tissue inhibitor of metalloproteinases-1
J Clin Invest 102, 2002 – 2010

- Gupta et al. (1998)
Structurally specific heparan sulfates support primitive human hematopoiesis by formation of a multimolecular stem cell niche
Blood 92, 4641 – 4651
- Hast, R. (1986)
Sideroblasts in myelodysplasia: their natural and clinical significance
Scand J Haematol 36 (Suppl 45), 53 – 55
- Herman, I.M. (1993)
Actin isoforms.
Curr Opin Cell Biol. Feb;5(1):48-55. Review.
- Hirai, H. et al. (1987)
A point mutation at codon 13 of the N-ras oncogene in myelodysplastic syndrome
Nature 327, 430 – 432
- Hochhaus, A ; Berger, U, Hehlmann,R. (2003)
Historischer Überblick über das Krankheitsbild der chronischen myeloischen Leukämie
http://www.onkodin.de/zms/content/e2/e13145/e13184/e13465/index_ger.html
- Horijke, S. et al. (1994)
N-ras mutation and karyotypic evolution are closely associated with leukemic transformation in myelodysplastic syndrome
Leukemia 8, 1331 – 1336
- Ishidoh, K. & Kominami, E. (1998)
Gene regulation and extracellular functions of procathepsin L
Biol Chem 379, 131 – 135
- Ishitani, R & Chung, DM (1996)
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase antisense oligodeoxynucleotides protect against cytosine arabinonucleoside-induced apoptosis in cultured cerebellar neurons.
Proc Natl Acad Sci U S A. Sep 3;93(18):9937-41.
- Jaffe ES, Harris NL, Stein H & Vardiman JW (eds) (2001)
World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Hematopoietic and Lymphoid Tissues
IARC Press: Lyon 2001
- Jang, SJ & Mao, L. (2000)
Methylation patterns in human androgen receptor gene and clonality analysis
Cancer Res 60, 864 – 866
- Janssen, J.W.G. et al. (1987)
RAS gene mutations in acute and chronic myelocytic leukemias, chronic myeloproliferative disorders, and myelodysplastic syndromes
Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol.84, 9228 – 9232
- Juo, P. et al. (1998)
Essential requirement for caspase-8/FLICE in the initiation of the FAS-induced apoptotic cascade
Curr Biol 8, 1001 – 1008
- van Kamp, H. et al. (1992)
Longitudinal analysis of point mutations of the N-ras proto-oncogene in patients with myelodysplasia using archived blood smears
Blood 79, 1266 – 1270
- van Kamp, H et al. (1992)
Clonal involvement of Granulocytes and Monocytes, but not of T and B Lymphocytes and Natural Killer Cells in Patients with Myelodysplasia: Analysis by X-linked restriction fragment length polymorphisms and polymerase chain reaction of the phosphoglycerate kinase gene.

Blood 80, No 7, 1774 – 1780

Kanavaros, P. et al. (1999)

Immunohistochemical detection of p53, mdm2, waf1/p21 and Ki67 proteins in bone marrow biopsies in myelodysplastic syndromes, acute myelogenous leukaemias and chronic myeloproliferative disorders
Clin Exp Pathol 47, 231 – 238

Katagiri, A. et al. (1993)

Immunohistochemical detection of P-glycoprotein and GSTP1-1 in testis cancer
Br J Cancer 68, 125 – 129

Kimura, F. et al. (2001)

Polymorphic methyl group metabolism genes in patients with transitional cell carcinoma of the urinary bladder
Mut. Res. Genomics 458, 49-54

Kitagawa, M. et al. (1993)

Expression of the proliferating cell nuclear antigen in bone marrow cells from patients with myelodysplastic syndromes and aplastic anemia
Hum Pathol 24, 359 – 363

Kitagawa, M. et al. (1997)

Overexpression of tumor necrosis factor (TNF)- alpha and interferon (IFN)-gamma by bone marrow cells from patients with myelodysplastic syndromes
Leukemia 11, 2049 – 2054

Kolch, Walter (2000)

Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions
Biochem.J 351, 289-305

http://www.kompetenznetz-leukaemie.de/kn_home/InfoAerzte/epidemiologie.htm#524

Häufigkeit von Leukämien bei Erwachsenen in Deutschland

A. Hellenbrecht, D. Messerer, N. Gökbuget

Krebs in Deutschland. 4. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe. Arbeitsgemeinschaft
Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland. Saarbrücken, 2004

Knudson, Alfred G., Jr. (1971)

Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Vol. 68, No.4, 820-823

Kong, H.M., Kucera, R.B. & Jack, W.E. (1993)

Characterization of a DNA polymerase from the hyperthermophile archaea *Thermococcus litoralis*.
Vent DNA polymerase, steady state kinetics, thermal stability, processivity, strand displacement, and
exonuclease activities.
J Biol Chem. Jan 25;268(3):1965-75.

Kothakota, S. et al. (1997)

Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis
Science 278, 294 – 298

Lai F et al. (2001)

Transcript map and comparative analysis of the 1.5-Mb commonly deleted segment of human 5q31 in
malignant myeloid diseases with a del(5q)
Genomics 71:235-245

Le Beau MM et al. (1989)

Interleukin-4 and Interleukin-5 map to human chromosome 5 in a region encoding growth factors and
receptors and are deleted in myeloid leukaemia with a del(5q)
Blood 73: 647-650

- Leone, G. et al. (2002)
DNA methylation and demethylation drugs in myelodysplastic syndromes and secondary leukemias
Haematologica 2002 Dec;87 (12):1324-41
- Levis, M. et al. (2002)
A FLT3-targeted tyrosine kinase inhibitor is cytotoxic to leukemia cells in vitro and in vivo. *Blood*, 99:
3885-3891
- Liebermann, DA., Gregory, B. & Hoffman, B. (1998)
AP-1 (FOS/JUN) transcription factors in hematopoietic differentiation and apoptosis
*Int J Oncol.*12, 685 – 700
- List, A. (2004)
II. Novel Therapeutics for an Orphan Disease
In: *Myelodysplastic Syndromes*; List, Vardiman, Issa & DeWitte
Hematology, ASH Papers 2004, 297 - 317
- Liu, E. et al. (1987)
Mutations of the Kirsten-ras proto-oncogene in human pre-leukemia
Nature 330, 186 – 188
- Love, S. ,Barber, R. & Wilcock,GK. (1999)
Increased poly(ADP-ribosyl)ation of nuclear proteins in Alzheimer´s disease
Brain 122, 247 – 253
- Lowy, DR & Willumsen, BM (1993)
Function and regulation of ras
Annual Review of Biochemistry 62, 851 – 891
- Lubbert, M. et al. (1992)
Prevalence of N-RAS mutations in children with myelodysplastic syndromes and acute myeloid
leukemia
Oncogene 7, 263 – 268
- Lyon, MF (1961)
Gene Action in the X-chromosome of the mouse (*Mus Musculus* L.)
Nature Vol.190, No 4773, 272 – 273
- Lyon, MF (1988)
X-chromosome inactivation and the location and expression of X-linked genes
Am J Hum Genet 42, 8 – 16
- Lyons, J. et al. (1988)
Mutation of Ki-RAS and N- RAS oncogenes in myelodysplastic syndromes
Blood 71, 1707 - 1712
- Maes, N. et al. (1997)
Rapid and accurate identification of *Staphylococcus* Species by tRNA intergenic spacer length
polymorphism analysis
J. Clin. Microbiol. 35, 2477 – 2481
- Mai, M, et al. (1998)
Shortened PCR Cycles in a Conventional Thermal Cycler
BioTechniques 25, 208-210
- Marcelli, M. et al. (1990)
Definition of the human androgen receptor gene structure permits the identification of mutations that
cause androgen resistance: premature termination of the receptor protein at amino acid residue 588
causes complete androgen resistance
Mol.Endocrinol. 4(8), 1105-1116

- Matsumura, I. et al. (1996)
The effects of thrombopoietin on the growth of acute myeloblastic leukemia cells
Leuk Lymphoma 23, 533 – 538
- Mattila, P. et al. (1991)
Fidelity of DNA synthesis by the *Thermococcus litoralis* DNA polymerase - an extremely heat stable enzyme with proofreading activity.
Nucleic Acids Res. Sep 25;19(18):4967-73.
- McKinzie, P.B. & Parsons, B.L. (2002)
Detection of rare K-ras codon 12 mutations using allele-specific competitive blocker PCR
Mutat. Res. 517 (1-2), 209-220
- Migeon, BR (1998)
Non-random X-chromosome inactivation in mammalian cells
Cytogenet Cell Genet 80, 142 – 148
- Miltenyi, S. et al. (1994)
Isolation of CD34+ Hematopoietic Progenitor Cells by High-Gradient Magnetic Cell Sorting (MACS)
Hematopoietic Stem Cells: The Mulhouse Manual 1994: 201-213
- Misawa S, Horiike S, Kaneko H & Kashima K. (1997)
Genetic aberrations in the development and subsequent progression of myelodysplastic syndrome.
Leukemia Apr;11 Suppl 3:533-5.
- Mitra, S., Boldogh, I., Izumi, T. & Hazra, TK. (2001)
Complexities of the DNA base excision repair pathway for repair of oxidative DNA damage
Environ Mol Mutagen 38, 180 – 190
- Mortazavi, Y., Chopra, R., Grodon-Smith, E.C. & Rutherford, T.R. (2000)
Clonal patterns of X-chromosome inactivation in female patients with aplastic anaemia studied using novel reverse transcription polymerase chain reaction method
Eur J Haematol 64, 385 – 395
- Muller, JG et al. (1993)
Gluthathione reductase in human and murine lung tumors: high levels of mRNA and enzymatic activity
Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) 39, 389 – 396
- Neubauer, A. et al. (1994)
Mutations at the RAS proto-oncogenes in patients with myelodysplastic syndromes
Leukemia 8, 638 - 641
- Okabe-Kado, J. et al. (1992)
Identity of a differentiation inhibiting factor for mouse myeloid leukemia cells with NM23/nucleoside diphosphate kinase.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 182: 987-994
- Okada, M. et al. (1999)
Function and X-chromosome inactivation analysis of B-Lymphocytes in myelodysplastic syndromes with immunological abnormalities
Acta Haematol. 102:124-130
- Okada, S. et al. (1994)
Mice lacking c-fos have normal hematopoietic stem cells but exhibit altered B-cell differentiation due to an impaired bone marrow environment
Mol Cell Biol 14, 382 – 390
- Olopade OI et al. (1996)
Familial myeloid leukemia associated with loss of the long arm of chromosome 5
Leukemia. 1996 Apr;10(4):669-74
- Padua, RA et al. (1988)

Ras mutations in myelodysplasia detected by amplification oligonucleotide hybridization and transformation
Leukemia 2, 503 – 510

Padua , RA et al. (1998)
RAS, FMS and p53 mutations and poor clinical outcome in myelodysplasias: a 10-year follow-up
Leukemia 12, 887 – 892

Paquette, RL et al. (1993)
N-ras mutations are associated with poor prognosis and risk of leukemic transformation in myelodysplastic syndrome
Blood 82, 590 – 599

Perler, F. et al. (1992)
Intervening sequences in an Archaea DNA polymerase gene.
Proc Natl Acad Sci U S A. Jun 15;89(12):5577-81.

Plesner, T., Behrendt, N. & Ploug, M. (1997)
Structure, function and expression on blood and bone marrow cells of the urokinase-type plasminogen activator receptor, uPAR
Stem Cells 15, 398 – 408

Postel, E. H., Berberich, S. J., Flint & S. J., Ferrone, C. (1993)
Human c-myc transcription factor PuF identified as nm23-H2 nucleoside diphosphate kinase, a candidate suppressor of tumor metastasis.
Science, 261: 478-480

Pschyrembel – Klinisches Wörterbuch
257.Auflage
Verlag de Gruyter 1994

Radbruch, A. et al. (1994)
High-Gradient Magnetic Cell Sorting
Methods in Cell Biology Vol.42, 387-403

Robertson KD & Jones PA (2000)
DNA methylation : past, present and future directions
Carcinogenesis Vol.21, No.2, 461-467

Rosa, JL et al. (1996)
p619, a giant protein related to the chromosome condensation regulator RCC1, stimulates guanine nucleotide exchange on ARF1 and Rab proteins.
EMBO J. Aug 15;15(16):4262-73.

Salvesen, GS & Dixit, VM (1997)
Caspases: intracellular signalling by proteolysis
Cell 91, 443 – 446

Sambrook, J.; Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1982)
Molecular cloning. A laboratory manual. 3 Bände. Cold Spring Harbor Laboratory Press

San Miguel, F. et al.(1996)
Myelodysplastic syndromes
Critical Reviews in Oncology/Haematology 23, 57-93

Santourlidis, S. et al. (2001)
Hypermethylation of the APT1 (FAS,CDp5/Apo-1)gene promotor at rel/NFkB sites in prostatic carcinoma
Mol. Carcinogen.32,36-43

Sanz GF & Sanz MA (1992)
Prognostic factors in myelodysplastic syndromes

Leukemia Research 16, 77

Sargin, Bülent & Serve, Hubert (2002-2004)
AML und ALL des Erwachsenen – Neues aus Pathogenese, Diagnostik und Therapie
Medizinische Klinik A, Hämatologie & Onkologie, Münster
Journal Onkologie 2002-2004

Schaeffer, L. et al. (1993)
DNA repair helicase: a component of BTF2 (THFIIH) basic transcription factor
Science 260, 58 – 63

Schliwa, M. (1986)
„The Cytoskeleton, an Introductory Survey“
Cell Biology Monographs, Vol.13, Springer-Verlag

Shikama, Y. et al. (2000)
Neutrophil-specific reduction in the expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
receptor subunits in myelodysplastic syndromes
Br J Haematol 111, 863 – 872

Small, D. et al. (1994)
STK1, the human homolog of Flk-2/Flt-3, is selectively expressed in CD34+ human bone marrow cells
and is involved in the proliferation of early progenitor/stem cells
Proc Natl Acad Sci USA 91, 459 – 463

Souza Fernandez, T. et al. (1998)
Correlation of N-ras point mutations with specific chromosomal abnormalities in primary
myelodysplastic syndrome
Leukemia Research Vol.22, No 2, 125 - 134

Spanakis, E. & Brouty-Boyé, D. (1994)
Evaluation of quantitative variation in gene expression
Nucleic Acids Research 22, 799-806

Taparowsky, E., Shimizu, K., Goldfarb, M. & Wigler, M. (1983)
Structure and activation of the human N-ras gene
Cell 34 (2), 581-586

Taylor, GA et al. (1995)
Phosphorylation of tristetrapolin, a potential zinc finger transcription factor, by mitogen stimulation in
intact cells and by mitogen-activated protein kinase in vitro
J Biol Chem 270, 13341 – 13347

Thomas, GJ., Davies, M. (1989)
The potential role of human kidney cortex cysteine proteinases in glomerular basement membrane
degradation
Biochem Biophys Acta 990, 246 – 253

Tilley, W.D. et al. (1989)
Characterization and expression of a cDNA encoding the human androgen receptor
Proc Natl Acad Sci U S A., 86 (1), 327-331

Tonon, L., Bergamaschi, G., Dellavecchia, C. et al. (1998)
Unbalanced X-chromosome inactivation in haematopoietic cells from normal woman
Br J Haematol 102, 996 – 1003

Tse KF, Allebach J, Levis M, Smith BD, Bohmer FD & Small D (2002)
Inhibition of the transforming activity of FLT3 internal tandem duplication mutants from AML patients
by a tyrosine kinase inhibitor.
Leukemia. Oct;16(10):2027-36.

- Vardiman J. (2004)
I. Characterization and Classification of myelodysplastic syndromes – from morphology to cytogenetics
In: Myelodysplastic Syndromes; List, Vardiman, Issa & DeWitte
Hematology, ASH Papers 2004, 297 - 317
- Vardiman J., Harris NL & Brunning RD (2002)
The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms
Blood Vol. 100, No.7, 2292-2302
- Varfolomeev, E. et al. (1998)
Targeted disruption of the mouse caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, FAS/APO1, and DR3 and is lethal prenatally
Immunity 9, 267 – 276
- Vigon, I. et al. (1993)
Expression of the c-mpl proto-oncogene in human hematologic malignancies
Blood 82, 877 – 883
- Vince, A. et al (1998)
DNA extraction from archival Giemsa-stained bone-marrow slides: comparison of six rapid methods
British Journal of Haematology 101, 349-351
- Vogelstein, B. et al (1987)
Clonal analysis using recombinant DNA probes from the X-chromosome
Cancer Res 47, 4806
- Wang, X. & Studzinski, GP (1997)
Antiapoptotic action of 1,25-dihydroxyvitamin D3 is associated with increased mitochondrial MCL1 and RAF-1 proteins and reduced release of cytochrome c
Exp Cell Res 235, 210 – 217
- Warbrick, E. (1998)
PCNA binding through a conserved motif
Bioessays 20, 195 - 199
- Wattel, E. & Lepelley, P. (1997)
Multi-drug resistance and myelodysplastic syndromes: a possible role for remission inducing agents?
Pathol Biol (Paris) 45, 637 – 642
- Weinberg, Robert A. (1991)
Tumor Suppressor Genes
Science, Vol. 254, 1138-1145
- Weinberg, Robert A. (1992)
The integration of molecular genetics into cancer management
Cancer Supplement, Vol.70, No.6, 1653 - 1658
- Weinberg, Robert A. (1996)
Wie Krebs entsteht
Spektrum der Wissenschaft, Spezial 5: Krebsmedizin, 7-17
- Willems, R. et al. (2002)
Extracellular nucleoside diphosphate kinase NM23/NDPK modulates normal hematopoietic differentiation.
Exp. Hematol., 30: 640-648, 2002.
- Willman, CL et al. (1994)
Langerhans'-cell histiocytosis (histiocytosis X) – a clonal proliferative disease
N Engl J Med 331, 154 – 160
- Willman, CL (2000)

I. Biologic and genetic features of the myelodysplastic syndromes

In: Achievements in understanding and treatment of myelodysplastic syndromes

Hellström-Lindberg, E, Willman, CL, Barrett AJ & Sauntharajah, Y

ASH Papers 2000, 110 –117

Wolf G. (2000)

Genetische Beratung. In: Handbuch der Molekularen Medizin. Bd. 7, Monogene Erbkrankheiten 2.

Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 2000.

Wu, MX et al. (1998)

IEX-1L, an apoptosis inhibitor involved in NF-kappaB-mediated cell survival

Science 281, 998 – 1001

de Wynthier, EA et al. (1995)

Comparison of Purity and Enrichment of CD34+ Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord and Peripheral Blood (Primed for Apharesis) Using Five Separation Systems

Stem Cells 13 (144) 524-532

Yamamoto, F. & Perucho, M. (1984)

Activation of a human c-K-ras oncogene

Nucleic Acids Res. 12 (23), 8873-8885

Yoshida, Y. & Mufti, GJ. (1999)

Apoptosis and its significance in MDS: controversies revisited

Leuk Res 23, 777 – 785

Yunis, JJ et al. (1989)

Mechanisms of RAS mutation in myelodysplastic syndrome

Oncogene 4, 609 – 614

Zakut, R. & Givol, D. (1995)

The tumour suppression function of p21(WAF) is contained in its N-terminal half ('half-WAF')

Oncogene 11, 393 – 395

Zhang, S. et al. (2000)

Essential role of signal transducer and activator of transcription (Stat)5a but not Stat5b for Flt3-dependent signalling.

J. Exp. Med., 192: 719-728

7. Abkürzungen

A	Adenosin
AISA	Acquired idiopathic sideroblastic anemia
A.L.F.	Automated Laser Fluorescent DNA Sequencer
AML	akute myeloische Leukämie
APS	Ammoniumpersulfat
AUC	Area under Curve
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
C	Cytosin
CD	Cluster of Differentiation (Klassifizierungssystem von Oberflächenmarkern)
CDKN	Cyclin dependent kinase Inhibitor
cDNA	copy DNA
CMML	chronische myelomonozytäre Leukämie
CP	crossing point (Schnittpunkt der LightCycler® Kurve)
dATP	Desoxy-Adenosintriphosphat
dCTP	Desoxy-Cytosintriphosphat
Del.	Deletion
DEPC	Diethyl-pyro-carbonat
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DNA	Desoxyrinonucleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxy-Thymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat, Na-Salz
EtBr	Ethidiumbromid
FAB	French-American-British (Klassifizierungs-System)
FCS	Fötales Kälber Serum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
G	Guanosin
g	Gramm
GAPDH	Glyceraldehyd 3-Phosphat Dehydrogenase
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
HSA	humanes Serum Albumin
HUMARA	Humaner Androgen Rezeptor Assay
IPSS	International prognostic scoring system (Prognose-Klassifikations-System)
kb	Kilobasen
KM	Knochenmark
M	Molar
mA	Milli Ampere
MACS	Magnetic associated Cell Sorting
MAD	MAX dimerization protein
MCL1	myeloid cell leukemia protein 1
MDS	Myelodysplastische Syndrome
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
M-MLV	Moloney Murine Leukemia Virus
MMP11	Matrix-Metallo-Proteinase11
μ	Mikro
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
ng	Nanogramm
NM23B	Nucleoside Diphosphate Kinase B
OD	Optische Dichte
p619	humaner Guanin Nucleotid Austausch Faktor
p.B.	peripheres Blut

PBS	Phosphat gepufferte Saline
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PCR	Polymerase Chain Reaction
pH	„potentia hydrogenii“
pmol	picomol
PRA	pure refraktäre Anämie
PSA	pure sideroblastische Anämie
RA	refraktäre Anämie
RAEB	refraktäre Anämie mit Vermehrung von Blasten
RAEB-T	refraktäre Anämie mit Vermehrung von Blasten in Transformation
RARS	refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten
RCMD	refraktäre Zytopenie mit multilineären Dysplasien
RNA	Ribonucleinsäure
RNAse	Ribonuclease
RNAsin	RNAse-Inhibitor
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
rxn	Reaktion
sAML	selundäre AML
sAML/MDS	sekunäre AML aus MDS
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfate
sec	Sekunde
SSC	Standard Saline Citrate
STK1	Stammzell-Tyrosinkinase 1
T	Thymidin
TBE	Tris/Borat/EDTA
TE	Tris/EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TIMP1	Tissue Inhibitor of metalloproteinase 1
Tm	melting Temperature
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-methylamin
TTP	Tristetrapolin
U	Unit
UV	Ultraviolett
V	Volt
WAF1	Wildtype p53-activated fragment 1
WHO	World Health Organization
w/v	weight per volume
z.B.	zum Beispiel

8. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr.med. R. Haas für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im molekulargenetischen Labor der Klinik für Hämatologie und Onkologie der medizinischen Einrichtungen der Heinrich Heine Universität Düsseldorf.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Gattermann für die Übernahme des Referats und die angenehme Zusammenarbeit.

Ich danke Herrn Prof.Hollenberg und Herrn Prof. Ernst für das Engagement und die Übernahme des Koreferats dieser Arbeit.

Ich danke Herrn Dr. med. M. Aivado für die vielen bedeutsamen Diskussionen und die maßgebliche Unterstützung bei der Bearbeitung dieses Themas, insbesondere auch bei den statistischen Auswertungen der Daten dieser Arbeit. Ohne ihn wäre diese Arbeit so nicht entstanden.

Des Weiteren danken möchte ich Herrn PD Dr. med. U.Germing für die vielen wertvollen Tipps, die nette Zusammenarbeit und die ebenfalls gewährte Unterstützung bei Problemen mit dem Programm SPSS.

Ferner danke ich allen anderen Kollegen und Kolleginnen der Klinik für Hämatologie und Onkologie für die nette und kollegiale Zusammenarbeit.

Mein besonderer Dank gilt außerdem Frau Dipl. Biol. Susanne Stahn für ihre besondere Hilfe und Unterstützung, sowie insbesondere Frau B.Junge und allen anderen Mitarbeiterinnen des Labors für Durchflusszytometrie für die Hilfe und Unterstützung bei der Aufarbeitung des Zellmaterials.

9. Erklärung

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt.

Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den

(Astrid Rong)

10. Anhang

Tabelle Gensequenzen der analysierten ras-Exons

<p>K-ras Exon 1 Genbank Nr. AF285779 McKinzie, P.B. and Parsons, B.L. (2002) Homo sapiens cell line TK-6 K-ras protein gene, partial cds</p> <p>bp 401 - 576 catgttctaa tatatgcaca ttttcattat ttttattata aggcctgctg aaaatgactg aatataaact tgtgtagt ggagctggtg gcgtaggcaa gattgccttg acgatacagc taattcagaa tcatitttg gacgaatag atccaacaat agaggtaaat cttgtttt</p>
<p>K-ras Exon 2 Genbank Nr. X02825 (Yamamoto,F. and Perucho,M., 1984) Human c-k-ras oncogene exon 2</p> <p>bp 166 - 283 aagca agtagtaatt gatggagaaa cctgtctctt ggatattctc gacacagcag gtcaagagga gtacagtgca atgagggacc agtacatgag gactggggag ggctttctt gtg</p>
<p>N-ras Exon 1 Genbank Nr. NM_002524 Gambke C, Hall A and Moroni C. (1985); Taparowsky,E., Shimizu,K., Goldfarb,M. and Wigler,M. (1983) Homo sapiens neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog (NRAS), mRNA.</p> <p>bp 201 - 363 ctaaatctgt ccaaagcaga ggcagtggag ctgagggtc ttgctggtg gaaatgactg agtacaaact ggtggtggtt ggagcaggtg gtgttggaa aagcgcactg acaatccagc taatccagaa ccacttcta gatgaatag atcccacat aqa</p>
<p>Genbank Nr. NM_002524 Hirai H, Kobayashi Y, Mano H, Hagiwara K, Maru Y, Omine M, Mizoguchi H, Nishida J and Takaku F (1987) Homo sapiens neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog (NRAS), mRNA.</p> <p>bp 386 – 497 gttat agatggtgaa acctgtttgt tggacatact ggatacagct ggacaagaag agtacagtgc catgagagac caatacatga ggacagggca aggcttctc tqtgtat</p>

Tab. X-1

Beispiel einer Sequenzierung N-ras Exon 1 reversal

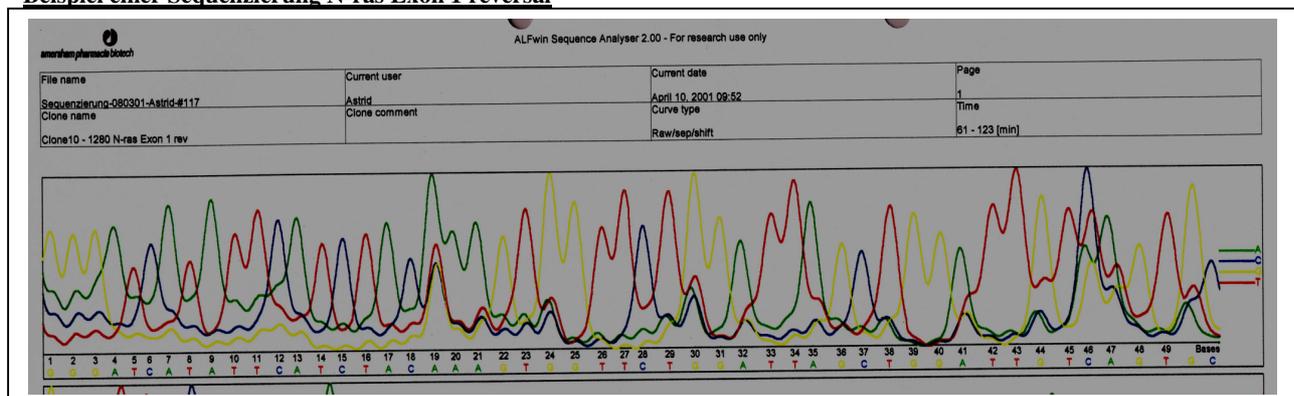


Abb. X-1

Tab. X2 Rohdaten der Klonalitätsanalysen der Kontrollpersonen ohne klonale Erkrankung

Nr.	Probe	dig A	dig B	nativ A	nativ B	nat A/B	nat A/B	CR	CR-%	PA CR	PA nat	delta CR%	Z%	Z	Klon%
1	p.B.	98	0,1	3314	1161	2,8544	2,8544	343,33	99,71%	A	A 74,1 %				
	CD3+	283	92	1249	638	1,9577	1,9577	1,57	61,11%	A	A 66,2 %	38,60%	13291,14%	13291,14	99,25
3	p.B.	3320	167	1597	1202	1,3286	1,3286	14,96	93,74%	A	A 57,1 %				
	CD3+	1814	765	4364	2809	1,5536	1,5536	1,53	60,42%	A	A 60,8 %	33,32%	531,87%	531,87	84,17
5	p.B.	791	76	1943	1764	1,1015	1,1015	9,45	90,43%	A	A 52,4 %				
	CD3+	112	47	5065	3674	1,3786	1,3786	1,73	63,35%	A	A 57,9 %	27,08%	282,95%	282,95	73,89
6	p.B.	412	872	688	211	3,2607	3,2607	0,14	12,66%	B	A 76,5 %				
	CD3+	577	528	193	90	2,1444	2,1444	0,51	33,76%	B	A 68,2 %	21,10%	166,72%	166,72	62,51
7	p.B.	1849	924	3473	3561	0,9753	1,0253	2,05	67,23%	A	B 50,6 %				
	CD3+	2445	1677	6539	1714	3,8151	3,8151	0,38	27,65%	B	A 79,2 %	39,58%	120,80%	120,80	54,71
8	p.B.	1512	6330	4011	2754	1,4564	1,4564	0,16	14,09%	B	A 59,3 %				
	CD3+	1960	4734	3683	3923	0,9388	1,0652	0,44	30,60%	B	B 51,6 %	16,51%	117,21%	117,21	53,96
9	p.B.	5819	4721	6705	5698	1,1767	1,1767	1,05	51,16%	A	A 54,1 %				
	CD3+	40	1781	612	137	4,4672	4,4672	0,01	0,50%	B	A 81,7 %	50,66%	103,72%	103,72	50,91
10	p.B.	317	184	2762	2619	1,0546	1,0546	1,63	62,03%	A	A 51,3 %				
	CD3+	33	27	2179	822	2,6509	2,6509	0,46	31,56%	B	A 72,6 %	30,47%	80,25%	80,25	44,52
11	p.B.	696	314	2812	2600	1,0815	1,0815	2,05	67,21%	A	A 51,9 %				
	CD3+	2209	2462	4726	4115	1,1485	1,1485	0,78	43,86%	B	A 53,4 %	23,35%	71,20%	71,20	41,59
12	p.B.	4186	915	5900	3571	1,6522	1,6522	2,77	73,47%	A	A 62,3 %				
	CD3+	2443	1208	6434	4282	1,5026	1,5026	1,35	57,37%	A	A 60 %	16,09%	60,66%	60,66	37,76
13	p.B.	665	1017	2968	1736	1,7097	1,7097	0,38	27,67%	B	B 58,1 %				
	CD3+	178	207	1203	862	1,3956	1,3956	0,62	38,12%	B	B 52,5 %	10,40%	37,81%	37,81	27,44
14	p.B.	660	204	2241	2222	1,0086	1,0086	3,21	76,23%	A	A 50,2 %				
	CD3+	315	161	6290	6744	0,9327	1,0722	2,10	67,72%	A	B 51,7 %	8,52%	35,84%	35,84	26,38
15	p.B.	60	37	2546	1637	1,5553	1,5553	1,04	51,04%	A	A 60,9 %				
	CD3+	1289	465	2309	1805	1,2792	1,2792	2,17	68,42%	A	A 56,1 %	17,38%	34,05%	34,05	25,40
16	CD3-	5555	3148	4756	2774	1,7145	1,7145	1,03	50,72%	A	A 63,2 %				
	CD3+	6134	4933	7974	4326	1,8433	1,8433	0,67	40,28%	B	A 64,8 %	10,44%	21,18%	21,18	17,48

17	p.B.	967	312	5068	3170	1,5987	1,5987	1,94	65,97%	A	A 61,5 %				
	CD3+	62	24	1155	691	1,6715	1,6715	1,55	60,72%	A	A 62,6 %	5,26%	15,44%	15,44	13,38
18	p.B.	26	24	417	315	1,3238	1,3238	0,82	45,00%	B	A 56,9 %				
	CD3+	272	232	2713	2485	1,0918	1,0918	1,07	51,78%	A	A 52,2 %	6,78%	15,06%	15,06	13,09
19	p.B.	4649	6820	153	135	1,1333	1,1333	0,60	37,56%	B	A 53,1 %				
	CD3+	2594	5275	5981	4890	1,2231	1,2231	0,40	28,68%	B	A 55 %	8,88%	14,22%	14,22	12,45
20	p.B.	591	272	4684	2434	1,9244	1,9244	1,13	53,03%	A	A 65,8 %				
	CD3+	1225	246	3588	1089	3,2948	3,2948	1,51	60,18%	A	A 76,7 %	7,15%	13,48%	13,48	11,88
21	p.B.	270	498	3525	2242	1,5723	1,5723	0,34	25,64%	B	A 61,1 %				
	CD3+	1409	830	14583	3487	4,1821	4,1821	0,41	28,87%	B	A 80,7 %	0,23%	12,60%	12,60	11,19
22	p.B.	2724	1085	7794	3851	2,0239	2,0239	1,24	55,37%	A	A 66,9 %				
	CD3+	2654	758	7352	3463	2,123	2,123	1,65	62,25%	A	A 67,9 %	6,89%	12,44%	12,44	11,06
24	p.B.	1068	444	2306	712	3,2388	3,2388	0,74	42,62%	B	A 76,4 %				
	CD3+	4412	3955	6378	5030	1,268	1,268	0,88	46,80%	B	A 55,9 %	4,18,%	9,82%	9,82	8,94
26	p.B.	6737	6134	14583	3487	4,1821	4,1821	1,89	65,40%	A	A 80,7 %				
	CD3+	80	41	1514	1752	0,8642	1,1572	2,26	69,31%	A	B 53,6 %	3,91%	5,98%	5,98	5,64
27	p.B.	2410	1716	5903	4439	1,3298	1,3298	1,06	51,36%	A	A 57,1 %				
	CD3+	4757	3502	6260	4541	1,3786	1,3786	0,99	49,63%	B	A 57,9 %	1,73%	3,56%	3,56	3,44
29	p.B.	132	538	2473	6751	0,3663	2,7299	0,67	40,11%	B	B 73,2 %				
	CD3+	1693	5552	4024	8816	0,4564	2,1909	0,67	40,05%	B	B 68,7 %	0,06%	0,10%	0,10	0,10
2	p.B.	0,1	50	1987	1153	1,7233	1,7233	0,00	0,12%	B	A 63,3 %				
	CD3+	343	1487	4686	3328	1,4081	1,4081	0,16	14,08%	B	A 58,5 %	13,96%	12042,86%	12042,86	99,18
4	p.B.	0,1	322	1937	5076	0,3816	2,6205	0,00	0,08%	B	B 72,4 %				
	CD3+	0,1	62	706	2230	0,3166	3,1586	0,01	0,51%	B	B 75,9 %	0,43%	523,33%	523,33	83,96
23	p.B.	1449	455	7412	8964	0,8269	1,2094	3,85	79,39%	A	B 54,7 %				
	CD3+	2374	643	1363	2742	0,4971	2,0117	7,43	88,13%	A	B 66,8 %	8,75%	11,02%	11,02	9,92
25	p.B.	209	55	1799	1863	0,9656	1,0356	3,94	79,74%	A	B 50,9 %				
	CD3+	133	23	862	874	0,9863	1,0139	5,86	85,43%	A	B 50,3 %	5,69%	7,14%	7,14	6,66
28	p.B.	4941	163	6825	6516	1,0474	1,0474	28,94	96,66%	A	A 51,2 %				
	CD3+	5285	0,1	6515	5827	1,1181	1,1181	47268,91	100,00%	A	A 52,8 %	3,34%	3,45%	3,45	3,34

+ 6 homozygote Patientinnen

Rohdaten für Standardtest Interexperimentelle Kontrollen Tab.X3 zu Diag.3-1

Nr.	Dig B	Nat A	Nat B			Analyse 1		Analyse 2		PCR-Nr
1	551	454	210	0,46	2,16	0,21490762		0,26487377		96
2	2949	2599	1596	0,43	1,63	0,26487377		0,26408818		97
3	691	1427	782	0,48	1,82	0,26408818		0,21598341		100b
4	3213	1413	614	0,50	2,30	0,21598341		0,35528463		109
5	224	2561	1521	0,60	1,68	0,35528463		0,19431701		111
6	392	2827	901	0,61	3,14	0,19431701		0,15703335		131
7	5869	5718	3434	0,81	1,67	0,48574827		0,33335569		132
8	4456	7109	3789	0,63	1,88	0,33335569		0,44994236		134
9	4002	6992	5118	0,61	1,37	0,44994236		0,34050272		135
10	7114	6739	5423	0,72	1,24	0,57972784		0,16036118		139
11	2634	1017	572	0,29	1,78	0,16036118		0,34891367		219
12	2564	1825	1444	0,66	1,26	0,52553416		0,16159038		215
13	2166	4205	1185	0,57	3,55	0,16159038		0,20236185		209
14	1545	2083	808	0,52	2,58	0,20236185		0,28390375		200
15	1142	1637	863	0,54	1,90	0,28390375		0,24232636		199
16	4193	8815	3854	0,55	2,29	0,24232636		0,34748696		194
17	1405	1898	1188	0,56	1,60	0,34748696		0,25521242		192
18	3208	4771	2271	0,54	2,10	0,25521242		0,31192978		191
19	2702	4085	1981	0,64	2,06	0,31192978		0,22546579		180
20	4189	5375	5315	0,77	1,01	0,76198771		0,28694092		178
21	677	3942	2053	0,55	1,92	0,28694092		0,25278515		175
22	489	603	246	0,62	2,45	0,25278515		0,40047013		172
23	251	2083	983	0,85	2,12	0,40047013		0,28355264		171
24	159	4666	2418	0,55	1,93	0,28355264		0,26046161		169
25	3246	5334	2295	0,61	2,32	0,26046161		0,40540541		166
26	192	777	576	0,55	1,35	0,40540541		0,33428117		162
27	2676	7002	4863	0,48	1,44	0,33428117		0,30580769		161
28	2260	8765	6297	0,43	1,39	0,30580769		0,43915184		160
29	2913	6459	3602	1,13	1,79	0,63118532		0,37823988		156

30	3225		4762	2192	0,82	2,17	0,37823988		0,30428596		155
31	2343		1276	654	0,59	1,95	0,30428596		0,25497683		151
32	1230		5210	3242	0,41	1,61	0,25497683		0,27374537		150
33	3187		5665	2349	0,66	2,41	0,27374537		0,15904074		150
34	1812		2233	634	0,56	3,52	0,15904074		0,13974645		149
35	1162		5335	2759	0,27	1,93	0,13974645		0,17806987		147
36	2948		7476	2641	0,50	2,83	0,17806987		0,3110261		143
37	9065		6080	6706	0,61	0,91	0,67455192		0,40183825		136
38	2295		4653	3241	0,58	1,44	0,40183825		0,35836437		130
39	2826		5151	2644	0,70	1,95	0,35836437		0,37208338		129
40	3852		8157	5112	0,59	1,60	0,37208338		0,40048178		127
41	2916		5781	3990	0,58	1,45	0,40048178		0,40306667		126
42	561		3178	1386	0,78	2,29	0,34050272		0,34050272		125
43	78		294	190	0,51	1,55	0,33141462		0,33141462		139
44	155		829	342	0,38	2,42	0,15703335		0,15703335		103
45	2181		472	209	0,73	2,26	0,32260606		0,32260606		132a
46/47	232		991	305	0,82	3,25	0,25205296		0,25205296		118/119
48	165		428	229	0,45	1,87	0,23996035		0,23996035		116
49	2634		1017	572	0,29	1,78	0,16036118		0,16036118		105
50	684		3297	1898	0,63	1,74	0,36526738		0,36526738		219

Tabelle X 4.1 Rohdaten für Intratest zu Abb. 3-4

Index	Label	HH I	Quantilsrang	20%Quantil...	Norm.	*100	HH II	Quantilsrang	20%Quantil...	Norm.	*100
1	A01a	10,3	0,518	X	0,0288	2,8757	10,3	0,491	X	0,03	2,8703
2	A01b	8,5	0,389	X	0,0237	2,3732	8,5	0,362	X	0,02	2,3687
3	A01c	6,8	0,221	X	0,0190	1,8985	6,8	0,216	X	0,02	1,8949
4	A01d	10	0,499	X	0,0279	2,7920	10,2	0,486	X	0,03	2,8424
5	A01e	12,2	0,627	X	0,0341	3,4062	12,2	0,597	X	0,03	3,3998
6	A01f	20,6	0,796	X	0,0575	5,7514	21,8	0,794	X	0,06	6,0750
7	A01g	220,7	0,954	220,7	0,6162	61,6187	220,7	0,954	220,7	0,62	61,5021
8	A01h	14,4	0,697	X	0,0402	4,0204	14,4	0,674	X	0,04	4,0128
9	A01i	9	0,437	X	0,0251	2,5128	9	0,411	X	0,03	2,5080
10	A01j	10,7	0,549	X	0,0299	2,9874	10,7	0,518	X	0,03	2,9818
11	A01k	13,3	0,669	X	0,0371	3,7133	13,4	0,648	X	0,04	3,7342
12	A01l	29,2	0,853	29,2	0,0815	8,1525	26,4	0,837	26,4	0,07	7,3568
13	A01m	49,7	0,891	49,7	0,1388	13,8761	49,7	0,89	49,7	0,14	13,8498
14	A01n	8,2	0,372	X	0,0229	2,2894	8	0,324	X	0,02	2,2293
15	A02a	8,3	0,378	X	0,0232	2,3173	8,3	0,349	X	0,02	2,3129
16	A02b	7,6	0,31	X	0,0212	2,1219	7,6	0,286	X	0,02	2,1179
17	A02c	16,8	0,745	X	0,0469	4,6905	16,8	0,728	X	0,05	4,6816
18	A02d	5,2	0,069	X	0,0145	1,4518	5,3	0,07	X	0,01	1,4769
19	A02e	8	0,354	X	0,0223	2,2336	8	0,324	X	0,02	2,2293
20	A02f	8,5	0,389	X	0,0237	2,3732	8,6	0,375	X	0,02	2,3965
21	A02g	15,5	0,724	X	0,0433	4,3275	16,3	0,719	X	0,05	4,5423
22	A02h	52,1	0,893	52,1	0,1455	14,5461	52,1	0,891	52,1	0,15	14,5186
23	A02i	12,7	0,643	X	0,0355	3,5458	12,7	0,613	X	0,04	3,5391
24	A02j	14,6	0,701	X	0,0408	4,0763	8,3	0,349	X	0,02	2,3129
25	A02k	9,6	0,478	X	0,0268	2,6803	12,3	0,6	X	0,03	3,4276
26	A02l	13,2	0,668	X	0,0369	3,6854	13,5	0,653	X	0,04	3,7620
27	A02m	66,6	0,911	66,6	0,1859	18,5945	66,5	0,91	66,5	0,19	18,5315
28	A02n	9,4	0,468	X	0,0262	2,6244	9,6	0,448	X	0,03	2,6752
29	A03a	8,9	0,429	X	0,0248	2,4848	8,8	0,395	X	0,02	2,4523
30	A03b	10	0,499	X	0,0279	2,7920	9,8	0,464	X	0,03	2,7310
31	A03c	7,6	0,31	X	0,0212	2,1219	8,6	0,375	X	0,02	2,3965
32	A03d	7,1	0,256	X	0,0198	1,9823	7,3	0,259	X	0,02	2,0343
33	A03e	8,6	0,397	X	0,0240	2,4011	8,6	0,375	X	0,02	2,3965
34	A03f	9,6	0,478	X	0,0268	2,6803	8,5	0,362	X	0,02	2,3687

35	A03g	12,6	0,64	X	0,0352	3,5179	12,4	0,601	X	0,03	3,4555
36	A03h	10,9	0,565	X	0,0304	3,0432	11,2	0,554	X	0,03	3,1211
37	A03i	16	0,73	X	0,0447	4,4671	16	0,713	X	0,04	4,4587
38	A03j	12,5	0,637	X	0,0349	3,4900	7,1	0,238	X	0,02	1,9785
39	A03k	9,2	0,454	X	0,0257	2,5686	8,6	0,375	X	0,02	2,3965
40	A03l	1896,7	0,989	1896,7	5,2955	529,5519	1896,7	0,989	1896,7	5,29	528,5505
41	A03m	8,5	0,389	X	0,0237	2,3732	9,4	0,437	X	0,03	2,6195
42	A03n	8,6	0,397	X	0,0240	2,4011	8,7	0,385	X	0,02	2,4244
43	A04a	6,7	0,208	X	0,0187	1,8706	5,9	0,126	X	0,02	1,6441
44	A04b	13,9	0,685	X	0,0388	3,8808	14,2	0,67	X	0,04	3,9571
45	A04c	78,3	0,92	78,3	0,2186	21,8611	78,3	0,92	78,3	0,22	21,8197
46	A04d	7,7	0,324	X	0,0215	2,1498	7,4	0,272	X	0,02	2,0621
47	A04e	10	0,499	X	0,0279	2,7920	10	0,47	X	0,03	2,7867
48	A04f	7,5	0,296	X	0,0209	2,0940	7,3	0,259	X	0,02	2,0343
49	A04g	8,8	0,421	X	0,0246	2,4569	8,8	0,395	X	0,02	2,4523
50	A04h	23,7	0,825	23,7	0,0662	6,6170	23,7	0,815	23,7	0,07	6,6044
51	A04i	33,3	0,861	33,3	0,0930	9,2972	33,4	0,86	33,4	0,09	9,3075
52	A04j	21,5	0,807	21,5	0,0600	6,0027	21,9	0,795	X	0,06	6,1028
53	A04k	8,9	0,429	X	0,0248	2,4848	12,5	0,606	X	0,03	3,4834
54	A04l	21,9	0,81	21,9	0,0611	6,1144	10,9	0,535	X	0,03	3,0375
55	A04m	10,3	0,518	X	0,0288	2,8757	9,2	0,425	X	0,03	2,5637
56	A04n	8,7	0,41	X	0,0243	2,4290	8,8	0,395	X	0,02	2,4523
57	A05a	10,2	0,512	X	0,0285	2,8478	10,2	0,486	X	0,03	2,8424
58	A05b	12	0,619	X	0,0335	3,3504	12	0,594	X	0,03	3,3440
59	A05c	12,5	0,637	X	0,0349	3,4900	12,7	0,613	X	0,04	3,5391
60	A05d	10,4	0,526	X	0,0290	2,9036	10,4	0,497	X	0,03	2,8982
61	A05e	7,2	0,266	X	0,0201	2,0102	7,1	0,238	X	0,02	1,9785
62	A05f	9	0,437	X	0,0251	2,5128	8,8	0,395	X	0,02	2,4523
63	A05g	12,5	0,637	X	0,0349	3,4900	11,5	0,567	X	0,03	3,2047
64	A05h	13,9	0,685	X	0,0388	3,8808	13,3	0,643	X	0,04	3,7063
65	A05i	40	0,875	40	0,1117	11,1679	40	0,873	40	0,11	11,1467
66	A05j	11,5	0,591	X	0,0321	3,2108	11,5	0,567	X	0,03	3,2047
67	A05k	25,7	0,838	25,7	0,0718	7,1753	25,7	0,83	25,7	0,07	7,1618
68	A05l	21,6	0,808	21,6	0,0603	6,0306	21,1	0,787	X	0,06	5,8799
69	A05m	10,6	0,536	X	0,0296	2,9595	11,5	0,567	X	0,03	3,2047
70	A05n	5,5	0,092	X	0,0154	1,5356	5,6	0,094	X	0,02	1,5605
71	A06a	6	0,131	X	0,0168	1,6752	6,1	0,143	X	0,02	1,6999

72	A06b	7,5	0,296	X	0,0209	2,0940	7,2	0,247	X	0,02	2,0064
73	A06c	5,3	0,075	X	0,0148	1,4797	5,3	0,07	X	0,01	1,4769
74	A06d	6,3	0,157	X	0,0176	1,7589	5,8	0,113	X	0,02	1,6163
75	A06e	11,3	0,581	X	0,0315	3,1549	11,3	0,56	X	0,03	3,1490
76	A06f	8,6	0,397	X	0,0240	2,4011	8,6	0,375	X	0,02	2,3965
77	A06g	10,1	0,507	X	0,0282	2,8199	10	0,47	X	0,03	2,7867
78	A06h	14,6	0,701	X	0,0408	4,0763	14,6	0,678	X	0,04	4,0686
79	A06i	40,3	0,877	40,3	0,1125	11,2516	40,3	0,875	40,3	0,11	11,2303
80	A06j	13,4	0,674	X	0,0374	3,7412	13,4	0,648	X	0,04	3,7342
81	A06k	13,3	0,669	X	0,0371	3,7133	8,7	0,385	X	0,02	2,4244
82	A06l	22,7	0,817	22,7	0,0634	6,3378	11,4	0,563	X	0,03	3,1768
83	A06m	10,7	0,549	X	0,0299	2,9874	12,8	0,623	X	0,04	3,5670
84	A06n	7,4	0,286	X	0,0207	2,0661	8	0,324	X	0,02	2,2293
85	A07a	2,4	0,008	X	0,0067	0,6701	2,9	0,012	X	0,01	0,8081
86	A07b	39,6	0,873	39,6	0,1106	11,0562	39,6	0,872	39,6	0,11	11,0353
87	A07c	2,6	0,009	X	0,0073	0,7259	2,5	0,01	X	0,01	0,6967
88	A07d	4,4	0,021	X	0,0123	1,2285	4,5	0,028	X	0,01	1,2540
89	A07e	8,4	0,384	X	0,0235	2,3453	8,5	0,362	X	0,02	2,3687
90	A07f	5,7	0,107	X	0,0159	1,5914	5,9	0,126	X	0,02	1,6441
91	A07g	57,6	0,901	57,6	0,1608	16,0817	57,6	0,899	57,6	0,16	16,0513
92	A07h	17,3	0,758	X	0,0483	4,8301	16,8	0,728	X	0,05	4,6816
93	A07i	9,1	0,447	X	0,0254	2,5407	9,1	0,421	X	0,03	2,5359
94	A07j	33	0,859	33	0,0921	9,2135	32,3	0,857	32,3	0,09	9,0010
95	A07k	227,6	0,957	227,6	0,6355	63,5451	251,5	0,959	251,5	0,70	70,0851
96	A07l	2666,7	0,994	2666,7	7,4453	744,5331	2666,7	0,994	2666,7	7,43	743,1252
97	A07m	6,9	0,232	X	0,0193	1,9265	6,8	0,216	X	0,02	1,8949
98	A07n	3,3	0,012	X	0,0092	0,9213	3,3	0,014	X	0,01	0,9196
99	A08a	7,5	0,296	X	0,0209	2,0940	7,1	0,238	X	0,02	1,9785
100	A08b	14,4	0,697	X	0,0402	4,0204	14,1	0,667	X	0,04	3,9292
101	A08c	13,4	0,674	X	0,0374	3,7412	12,7	0,613	X	0,04	3,5391
102	A08d	20	0,79	X	0,0558	5,5839	20	0,775	X	0,06	5,5734
103	A08e	6,3	0,157	X	0,0176	1,7589	6,3	0,162	X	0,02	1,7556
104	A08f	9,4	0,468	X	0,0262	2,6244	9,4	0,437	X	0,03	2,6195
105	A08g	9,4	0,468	X	0,0262	2,6244	9,3	0,431	X	0,03	2,5916
106	A08h	17,3	0,758	X	0,0483	4,8301	17,6	0,745	X	0,05	4,9046
107	A08i	9,2	0,454	X	0,0257	2,5686	13,9	0,661	X	0,04	3,8735
108	A08j	13,3	0,669	X	0,0371	3,7133	13,6	0,655	X	0,04	3,7899

109	A08k	88,6	0,924	88,6	0,2474	24,7368	89,1	0,924	89,1	0,25	24,8294
110	A08l	7	0,243	X	0,0195	1,9544	5,8	0,113	X	0,02	1,6163
111	A08m	6,8	0,221	X	0,0190	1,8985	4,6	0,034	X	0,01	1,2819
112	A08n	20,7	0,797	X	0,0578	5,7794	20,7	0,783	X	0,06	5,7684
113	A09a	13,1	0,665	X	0,0366	3,6575	13,6	0,655	X	0,04	3,7899
114	A09b	254	0,96	254	0,7092	70,9159	254	0,96	254	0,71	70,7818
115	A09c	28,8	0,852	28,8	0,0804	8,0409	27,6	0,844	27,6	0,08	7,6912
116	A09d	9	0,437	X	0,0251	2,5128	8,7	0,385	X	0,02	2,4244
117	A09e	7,7	0,324	X	0,0215	2,1498	7,6	0,286	X	0,02	2,1179
118	A09f	13	0,659	X	0,0363	3,6296	13,3	0,643	X	0,04	3,7063
119	A09g	13,5	0,678	X	0,0377	3,7692	13,3	0,643	X	0,04	3,7063
120	A09h	6758,7	0,999	6758,7	18,8700	1887,0049	6758,7	0,999	6758,7	18,83	1883,4365
121	A09i	19,2	0,784	X	0,0536	5,3606	18,5	0,762	X	0,05	5,1554
122	A09j	19,3	0,785	X	0,0539	5,3885	19	0,768	X	0,05	5,2947
123	A09k	52,5	0,894	52,5	0,1466	14,6578	52,5	0,892	52,5	0,15	14,6301
124	A09l	32,7	0,859	32,7	0,0913	9,1297	33	0,859	33	0,09	9,1961
125	A09m	7	0,243	X	0,0195	1,9544	7,1	0,238	X	0,02	1,9785
126	A09n	7,1	0,256	X	0,0198	1,9823	7,1	0,238	X	0,02	1,9785
127	A10a	11,6	0,599	X	0,0324	3,2387	11,9	0,589	X	0,03	3,3162
128	A10b	135,4	0,941	135,4	0,3780	37,8032	135,4	0,939	135,4	0,38	37,7317
129	A10c	20,2	0,793	X	0,0564	5,6398	19,7	0,773	X	0,05	5,4898
130	A10d	8,5	0,389	X	0,0237	2,3732	8,5	0,362	X	0,02	2,3687
131	A10e	5,8	0,117	X	0,0162	1,6193	5,8	0,113	X	0,02	1,6163
132	A10f	9,3	0,462	X	0,0260	2,5965	9,5	0,442	X	0,03	2,6474
133	A10g	9,3	0,462	X	0,0260	2,5965	9,7	0,459	X	0,03	2,7031
134	A10h	20,9	0,8	20,9	0,0584	5,8352	21,9	0,795	X	0,06	6,1028
135	A10i	286,7	0,962	286,7	0,8005	80,0456	288,7	0,962	288,7	0,80	80,4516
136	A10j	17,5	0,763	X	0,0489	4,8859	17,5	0,745	X	0,05	4,8767
137	A10k	23,3	0,821	23,3	0,0651	6,5053	23,3	0,812	23,3	0,06	6,4930
138	A10l	11	0,572	X	0,0307	3,0712	11	0,542	X	0,03	3,0654
139	A10m	6,1	0,141	X	0,0170	1,7031	5,7	0,103	X	0,02	1,5884
140	A10n	5,4	0,082	X	0,0151	1,5077	4,8	0,043	X	0,01	1,3376
141	A11a	6,8	0,221	X	0,0190	1,8985	7,6	0,286	X	0,02	2,1179
142	A11b	25,9	0,842	25,9	0,0723	7,2312	26,3	0,835	26,3	0,07	7,3290
143	A11c	73,5	0,917	73,5	0,2052	20,5209	73,5	0,916	73,5	0,20	20,4821
144	A11d	10	0,499	X	0,0279	2,7920	9,8	0,464	X	0,03	2,7310
145	A11e	4,5	0,032	X	0,0126	1,2564	5	0,053	X	0,01	1,3933

146	A11f	10,3	0,518	X	0,0288	2,8757	10,3	0,491	X	0,03	2,8703
147	A11g	55,9	0,899	55,9	0,1561	15,6071	55,9	0,897	55,9	0,16	15,5776
148	A11h	21,3	0,805	21,3	0,0595	5,9469	21,9	0,795	X	0,06	6,1028
149	A11i	21,8	0,81	21,8	0,0609	6,0865	21,8	0,794	X	0,06	6,0750
150	A11j	25,2	0,836	25,2	0,0704	7,0358	24	0,817	24	0,07	6,6880
151	A11k	9,3	0,462	X	0,0260	2,5965	9,3	0,431	X	0,03	2,5916
152	A11l	62,4	0,904	62,4	0,1742	17,4219	62,4	0,903	62,4	0,17	17,3889
153	A11m	7,6	0,31	X	0,0212	2,1219	7,7	0,301	X	0,02	2,1457
154	A11n	6,9	0,232	X	0,0193	1,9265	6,9	0,224	X	0,02	1,9228
155	A12a	10,9	0,565	X	0,0304	3,0432	11,1	0,549	X	0,03	3,0932
156	A12b	12,5	0,637	X	0,0349	3,4900	12,9	0,627	X	0,04	3,5948
157	A12c	107,7	0,932	107,7	0,3007	30,0695	107,7	0,931	107,7	0,30	30,0126
158	A12d	9,6	0,478	X	0,0268	2,6803	9,4	0,437	X	0,03	2,6195
159	A12e	14,8	0,709	X	0,0413	4,1321	14,8	0,688	X	0,04	4,1243
160	A12f	7,5	0,296	X	0,0209	2,0940	7,5	0,28	X	0,02	2,0900
161	A12g	8,6	0,397	X	0,0240	2,4011	8,6	0,375	X	0,02	2,3965
162	A12h	11,8	0,605	X	0,0329	3,2945	11,8	0,582	X	0,03	3,2883
163	A12i	9,1	0,447	X	0,0254	2,5407	8,8	0,395	X	0,02	2,4523
164	A12j	14,3	0,694	X	0,0399	3,9925	14,3	0,672	X	0,04	3,9850
165	A12k	7,3	0,277	X	0,0204	2,0381	7,6	0,286	X	0,02	2,1179
166	A12l	17,6	0,766	X	0,0491	4,9139	17,6	0,745	X	0,05	4,9046
167	A12m	7,7	0,324	X	0,0215	2,1498	7,7	0,301	X	0,02	2,1457
168	A12n	6,3	0,157	X	0,0176	1,7589	6,3	0,162	X	0,02	1,7556
169	A13a	13,4	0,674	X	0,0374	3,7412	13,4	0,648	X	0,04	3,7342
170	A13b	7	0,243	X	0,0195	1,9544	7,4	0,272	X	0,02	2,0621
171	A13c	12,4	0,632	X	0,0346	3,4620	13,2	0,64	X	0,04	3,6784
172	A13d	10,4	0,526	X	0,0290	2,9036	10,4	0,497	X	0,03	2,8982
173	A13e	6,3	0,157	X	0,0176	1,7589	6,3	0,162	X	0,02	1,7556
174	A13f	9	0,437	X	0,0251	2,5128	9	0,411	X	0,03	2,5080
175	A13g	7,3	0,277	X	0,0204	2,0381	7,2	0,247	X	0,02	2,0064
176	A13h	11,6	0,599	X	0,0324	3,2387	11,7	0,577	X	0,03	3,2604
177	A13i	21,9	0,81	21,9	0,0611	6,1144	22,4	0,802	22,4	0,06	6,2422
178	A13j	145,5	0,943	145,5	0,4062	40,6231	145,5	0,942	145,5	0,41	40,5463
179	A13k	14,7	0,707	X	0,0410	4,1042	14,7	0,684	X	0,04	4,0964
180	A13l	20,3	0,794	X	0,0567	5,6677	20,3	0,779	X	0,06	5,6570
181	A13m	7,1	0,256	X	0,0198	1,9823	7,2	0,247	X	0,02	2,0064
182	A13n	10,5	0,531	X	0,0293	2,9316	10,5	0,503	X	0,03	2,9260

183	A14a	6	0,131	X	0,0168	1,6752	6	0,135	X	0,02	1,6720
184	A14b	5,7	0,107	X	0,0159	1,5914	5,4	0,078	X	0,02	1,5048
185	A14c	7,4	0,286	X	0,0207	2,0661	6,8	0,216	X	0,02	1,8949
186	A14d	5	0,053	X	0,0140	1,3960	4,6	0,034	X	0,01	1,2819
187	A14e	4,9	0,046	X	0,0137	1,3681	4,9	0,047	X	0,01	1,3655
188	A14f	5,4	0,082	X	0,0151	1,5077	5,4	0,078	X	0,02	1,5048
189	A14g	8,3	0,378	X	0,0232	2,3173	8,3	0,349	X	0,02	2,3129
190	A14h	10,4	0,526	X	0,0290	2,9036	10,4	0,497	X	0,03	2,8982
191	A14i	43,5	0,882	43,5	0,1215	12,1450	43,9	0,881	43,9	0,12	12,2335
192	A14j	325,7	0,965	325,7	0,9093	90,9343	325,7	0,965	325,7	0,91	90,7623
193	A14k	18	0,77	X	0,0503	5,0255	17,4	0,742	X	0,05	4,8488
194	A14l	25,9	0,842	25,9	0,0723	7,2312	25,9	0,832	25,9	0,07	7,2175
195	A14m	6,9	0,232	X	0,0193	1,9265	7	0,234	X	0,02	1,9507
196	A14n	4,1	0,016	X	0,0114	1,1447	4,1	0,018	X	0,01	1,1425
197	B01a	5,5	0,092	X	0,0154	1,5356	5,6	0,094	X	0,02	1,5605
198	B01b	10,2	0,512	X	0,0285	2,8478	10,2	0,486	X	0,03	2,8424
199	B01c	6,3	0,157	X	0,0176	1,7589	5,6	0,094	X	0,02	1,5605
200	B01d	6,8	0,221	X	0,0190	1,8985	6,8	0,216	X	0,02	1,8949
201	B01e	16,9	0,747	X	0,0472	4,7184	16,9	0,731	X	0,05	4,7095
202	B01f	19,9	0,789	X	0,0556	5,5560	20,4	0,78	X	0,06	5,6848
203	B01g	6,5	0,183	X	0,0181	1,8148	6,4	0,172	X	0,02	1,7835
204	B01h	17,7	0,767	X	0,0494	4,9418	17,7	0,748	X	0,05	4,9324
205	B01i	10,7	0,549	X	0,0299	2,9874	10,7	0,518	X	0,03	2,9818
206	B01j	6,7	0,208	X	0,0187	1,8706	6,7	0,202	X	0,02	1,8671
207	B01k	4,6	0,035	X	0,0128	1,2843	4,3	0,022	X	0,01	1,1983
208	B01l	6,3	0,157	X	0,0176	1,7589	6,4	0,172	X	0,02	1,7835
209	B01m	6,9	0,232	X	0,0193	1,9265	7,3	0,259	X	0,02	2,0343
210	B01n	30,3	0,854	30,3	0,0846	8,4597	30,3	0,854	30,3	0,08	8,4437
211	B02a	5,6	0,102	X	0,0156	1,5635	5,6	0,094	X	0,02	1,5605
212	B02b	8	0,354	X	0,0223	2,2336	8,5	0,362	X	0,02	2,3687
213	B02c	84,7	0,923	84,7	0,2365	23,6479	84,7	0,923	84,7	0,24	23,6032
214	B02d	9,1	0,447	X	0,0254	2,5407	8,5	0,362	X	0,02	2,3687
215	B02e	8,1	0,364	X	0,0226	2,2615	8,1	0,332	X	0,02	2,2572
216	B02f	7,8	0,337	X	0,0218	2,1777	8,1	0,332	X	0,02	2,2572
217	B02g	14,8	0,709	X	0,0413	4,1321	14,7	0,684	X	0,04	4,0964
218	B02h	5,6	0,102	X	0,0156	1,5635	6,7	0,202	X	0,02	1,8671
219	B02i	6,3	0,157	X	0,0176	1,7589	6,3	0,162	X	0,02	1,7556

220	B02j	10,9	0,565	X	0,0304	3,0432	10,8	0,53	X	0,03	3,0096
221	B02k	10	0,499	X	0,0279	2,7920	10	0,47	X	0,03	2,7867
222	B02l	7,2	0,266	X	0,0201	2,0102	7,2	0,247	X	0,02	2,0064
223	B02m	6,4	0,173	X	0,0179	1,7869	6,6	0,194	X	0,02	1,8392
224	B02n	37,6	0,869	37,6	0,1050	10,4978	37,6	0,869	37,6	0,10	10,4779
225	B03a	4,8	0,043	X	0,0134	1,3401	5,6	0,094	X	0,02	1,5605
226	B03b	4,9	0,046	X	0,0137	1,3681	4,7	0,04	X	0,01	1,3097
227	B03c	12,1	0,625	X	0,0338	3,3783	12,1	0,595	X	0,03	3,3719
228	B03d	6,1	0,141	X	0,0170	1,7031	6,1	0,143	X	0,02	1,6999
229	B03e	6,5	0,183	X	0,0181	1,8148	5,9	0,126	X	0,02	1,6441
230	B03f	5,9	0,125	X	0,0165	1,6473	7,2	0,247	X	0,02	2,0064
231	B03g	13,7	0,681	X	0,0382	3,8250	13,7	0,657	X	0,04	3,8178
232	B03h	5,9	0,125	X	0,0165	1,6473	6,1	0,143	X	0,02	1,6999
233	B03i	6,7	0,208	X	0,0187	1,8706	6,7	0,202	X	0,02	1,8671
234	B03j	34,5	0,865	34,5	0,0963	9,6323	34,5	0,864	34,5	0,10	9,6141
235	B03k	8,6	0,397	X	0,0240	2,4011	8,6	0,375	X	0,02	2,3965
236	B03l	19,6	0,787	X	0,0547	5,4723	19,6	0,772	X	0,05	5,4619
237	B03m	7,6	0,31	X	0,0212	2,1219	7,9	0,318	X	0,02	2,2015
238	B03n	14,3	0,694	X	0,0399	3,9925	15	0,694	X	0,04	4,1800
239	B04a	6,5	0,183	X	0,0181	1,8148	6,7	0,202	X	0,02	1,8671
240	B04b	5,5	0,092	X	0,0154	1,5356	6,8	0,216	X	0,02	1,8949
241	B04c	7,2	0,266	X	0,0201	2,0102	7,2	0,247	X	0,02	2,0064
242	B04d	9,5	0,474	X	0,0265	2,6524	9,5	0,442	X	0,03	2,6474
243	B04e	7,7	0,324	X	0,0215	2,1498	7,7	0,301	X	0,02	2,1457
244	B04f	6,6	0,196	X	0,0184	1,8427	6,6	0,194	X	0,02	1,8392
245	B04g	9,4	0,468	X	0,0262	2,6244	9,3	0,431	X	0,03	2,5916
246	B04h	8,7	0,41	X	0,0243	2,4290	8,9	0,403	X	0,02	2,4801
247	B04i	10,7	0,549	X	0,0299	2,9874	10,5	0,503	X	0,03	2,9260
248	B04j	7	0,243	X	0,0195	1,9544	6,8	0,216	X	0,02	1,8949
249	B04k	6,3	0,157	X	0,0176	1,7589	5,5	0,087	X	0,02	1,5327
250	B04l	6,8	0,221	X	0,0190	1,8985	6,8	0,216	X	0,02	1,8949
251	B04m	6,6	0,196	X	0,0184	1,8427	6,9	0,224	X	0,02	1,9228
252	B04n	8,1	0,364	X	0,0226	2,2615	8,1	0,332	X	0,02	2,2572
253	B05a	4,1	0,016	X	0,0114	1,1447	4,1	0,018	X	0,01	1,1425
254	B05b	4,6	0,035	X	0,0128	1,2843	4,4	0,024	X	0,01	1,2261
255	B05c	9,7	0,486	X	0,0271	2,7082	9,7	0,459	X	0,03	2,7031
256	B05d	12,7	0,643	X	0,0355	3,5458	12,7	0,613	X	0,04	3,5391

257	B05e	6,5	0,183	X	0,0181	1,8148	6,2	0,154	X	0,02	1,7277
258	B05f	5,8	0,117	X	0,0162	1,6193	5,7	0,103	X	0,02	1,5884
259	B05g	6,4	0,173	X	0,0179	1,7869	7,7	0,301	X	0,02	2,1457
260	B05h	25,7	0,838	25,7	0,0718	7,1753	25,7	0,83	25,7	0,07	7,1618
261	B05i	12,1	0,625	X	0,0338	3,3783	12,5	0,606	X	0,03	3,4834
262	B05j	25,7	0,838	25,7	0,0718	7,1753	25,7	0,83	25,7	0,07	7,1618
263	B05k	4,9	0,046	X	0,0137	1,3681	4,9	0,047	X	0,01	1,3655
264	B05l	9	0,437	X	0,0251	2,5128	9	0,411	X	0,03	2,5080
265	B05m	6,2	0,147	X	0,0173	1,7310	6,2	0,154	X	0,02	1,7277
266	B05n	13,9	0,685	X	0,0388	3,8808	14,4	0,674	X	0,04	4,0128
267	B06a	4,1	0,016	X	0,0114	1,1447	4,5	0,028	X	0,01	1,2540
268	B06b	5	0,053	X	0,0140	1,3960	4,7	0,04	X	0,01	1,3097
269	B06c	5,3	0,075	X	0,0148	1,4797	5,3	0,07	X	0,01	1,4769
270	B06d	14,6	0,701	X	0,0408	4,0763	14,6	0,678	X	0,04	4,0686
271	B06e	5,2	0,069	X	0,0145	1,4518	5,2	0,062	X	0,01	1,4491
272	B06f	6	0,131	X	0,0168	1,6752	6	0,135	X	0,02	1,6720
273	B06g	10,6	0,536	X	0,0296	2,9595	10,5	0,503	X	0,03	2,9260
274	B06h	12,8	0,649	X	0,0357	3,5737	12,8	0,623	X	0,04	3,5670
275	B06i	5	0,053	X	0,0140	1,3960	5,1	0,055	X	0,01	1,4212
276	B06j	6,4	0,173	X	0,0179	1,7869	6,5	0,182	X	0,02	1,8113
277	B06k	10,6	0,536	X	0,0296	2,9595	10,4	0,497	X	0,03	2,8982
278	B06l	5,3	0,075	X	0,0148	1,4797	5,6	0,094	X	0,02	1,5605
279	B06m	5,7	0,107	X	0,0159	1,5914	5,5	0,087	X	0,02	1,5327
280	B06n	8,9	0,429	X	0,0248	2,4848	9,2	0,425	X	0,03	2,5637
281	B07a	4,4	0,021	X	0,0123	1,2285	4,5	0,028	X	0,01	1,2540
282	B07b	6	0,131	X	0,0168	1,6752	6	0,135	X	0,02	1,6720
283	B07c	5,3	0,075	X	0,0148	1,4797	5,3	0,07	X	0,01	1,4769
284	B07d	4,1	0,016	X	0,0114	1,1447	4,6	0,034	X	0,01	1,2819
285	B07e	4,4	0,021	X	0,0123	1,2285	4,2	0,021	X	0,01	1,1704
286	B07f	7,3	0,277	X	0,0204	2,0381	6,2	0,154	X	0,02	1,7277
287	B07g	8,2	0,372	X	0,0229	2,2894	8,2	0,34	X	0,02	2,2851
288	B07h	11	0,572	X	0,0307	3,0712	11	0,542	X	0,03	3,0654
289	B07i	4,7	0,04	X	0,0131	1,3122	5,1	0,055	X	0,01	1,4212
290	B07j	6,5	0,183	X	0,0181	1,8148	6,5	0,182	X	0,02	1,8113
291	B07k	10,4	0,526	X	0,0290	2,9036	10,4	0,497	X	0,03	2,8982
292	B07l	6,2	0,147	X	0,0173	1,7310	6,1	0,143	X	0,02	1,6999
293	B07m	10,9	0,565	X	0,0304	3,0432	10,9	0,535	X	0,03	3,0375

294	B07n	6,2	0,147	X	0,0173	1,7310	6,2	0,154	X	0,02	1,7277
295	B08a	4,4	0,021	X	0,0123	1,2285	5,6	0,094	X	0,02	1,5605
296	B08b	6,6	0,196	X	0,0184	1,8427	6,5	0,182	X	0,02	1,8113
297	B08c	4,1	0,016	X	0,0114	1,1447	4	0,017	X	0,01	1,1147
298	B08d	6,4	0,173	X	0,0179	1,7869	6,3	0,162	X	0,02	1,7556
299	B08e	24,5	0,83	24,5	0,0684	6,8403	24,5	0,821	24,5	0,07	6,8274
300	B08f	5,5	0,092	X	0,0154	1,5356	5,4	0,078	X	0,02	1,5048
301	B08g	19,1	0,783	X	0,0533	5,3327	19,1	0,769	X	0,05	5,3226
302	B08h	7,7	0,324	X	0,0215	2,1498	7,7	0,301	X	0,02	2,1457
303	B08i	5,4	0,082	X	0,0151	1,5077	5,4	0,078	X	0,02	1,5048
304	B08j	6,2	0,147	X	0,0173	1,7310	6,1	0,143	X	0,02	1,6999
305	B08k	8,6	0,397	X	0,0240	2,4011	8,2	0,34	X	0,02	2,2851
306	B08l	7,5	0,296	X	0,0209	2,0940	6,9	0,224	X	0,02	1,9228
307	B08m	9,9	0,495	X	0,0276	2,7640	8,5	0,362	X	0,02	2,3687
308	B08n	10,6	0,536	X	0,0296	2,9595	10,6	0,511	X	0,03	2,9539
309	B09a	5,1	0,059	X	0,0142	1,4239	5,1	0,055	X	0,01	1,4212
310	B09b	6	0,131	X	0,0168	1,6752	6,1	0,143	X	0,02	1,6999
311	B09c	6,2	0,147	X	0,0173	1,7310	6,2	0,154	X	0,02	1,7277
312	B09d	7,8	0,337	X	0,0218	2,1777	8	0,324	X	0,02	2,2293
313	B09e	10,7	0,549	X	0,0299	2,9874	11	0,542	X	0,03	3,0654
314	B09f	5,1	0,059	X	0,0142	1,4239	4,9	0,047	X	0,01	1,3655
315	B09g	4,7	0,04	X	0,0131	1,3122	5,1	0,055	X	0,01	1,4212
316	B09h	6,1	0,141	X	0,0170	1,7031	6,1	0,143	X	0,02	1,6999
317	B09i	6,6	0,196	X	0,0184	1,8427	6,6	0,194	X	0,02	1,8392
318	B09j	11,2	0,578	X	0,0313	3,1270	11,2	0,554	X	0,03	3,1211
319	B09k	7,1	0,256	X	0,0198	1,9823	6,4	0,172	X	0,02	1,7835
320	B09l	7,8	0,337	X	0,0218	2,1777	6,9	0,224	X	0,02	1,9228
321	B09m	7,2	0,266	X	0,0201	2,0102	6,5	0,182	X	0,02	1,8113
322	B09n	13	0,659	X	0,0363	3,6296	13	0,631	X	0,04	3,6227
323	B10a	8,4	0,384	X	0,0235	2,3453	8,5	0,362	X	0,02	2,3687
324	B10b	6	0,131	X	0,0168	1,6752	6,1	0,143	X	0,02	1,6999
325	B10c	5,2	0,069	X	0,0145	1,4518	5,2	0,062	X	0,01	1,4491
326	B10d	6,5	0,183	X	0,0181	1,8148	6,5	0,182	X	0,02	1,8113
327	B10e	7,2	0,266	X	0,0201	2,0102	7,2	0,247	X	0,02	2,0064
328	B10f	4,9	0,046	X	0,0137	1,3681	5,4	0,078	X	0,02	1,5048
329	B10g	10,6	0,536	X	0,0296	2,9595	10,7	0,518	X	0,03	2,9818
330	B10h	10,9	0,565	X	0,0304	3,0432	11,1	0,549	X	0,03	3,0932

331	B10i	22,1	0,813	22,1	0,0617	6,1702	22,1	0,798	X	0,06	6,1586
332	B10j	10	0,499	X	0,0279	2,7920	10	0,47	X	0,03	2,7867
333	B10k	11,8	0,605	X	0,0329	3,2945	11,7	0,577	X	0,03	3,2604
334	B10l	8,4	0,384	X	0,0235	2,3453	8,4	0,356	X	0,02	2,3408
335	B10m	12,4	0,632	X	0,0346	3,4620	12,4	0,601	X	0,03	3,4555
336	B10n	10,8	0,56	X	0,0302	3,0153	10,1	0,476	X	0,03	2,8146
337	B11a	6,9	0,232	X	0,0193	1,9265	6,9	0,224	X	0,02	1,9228
338	B11b	5,9	0,125	X	0,0165	1,6473	6,5	0,182	X	0,02	1,8113
339	B11c	6,3	0,157	X	0,0176	1,7589	5,8	0,113	X	0,02	1,6163
340	B11d	11	0,572	X	0,0307	3,0712	11	0,542	X	0,03	3,0654
341	B11e	6,4	0,173	X	0,0179	1,7869	6,4	0,172	X	0,02	1,7835
342	B11f	5,1	0,059	X	0,0142	1,4239	5,1	0,055	X	0,01	1,4212
343	B11g	8,1	0,364	X	0,0226	2,2615	7,9	0,318	X	0,02	2,2015
344	B11h	7,2	0,266	X	0,0201	2,0102	7,2	0,247	X	0,02	2,0064
345	B11i	8	0,354	X	0,0223	2,2336	8	0,324	X	0,02	2,2293
346	B11j	7,5	0,296	X	0,0209	2,0940	7,6	0,286	X	0,02	2,1179
347	B11k	7,4	0,286	X	0,0207	2,0661	7,4	0,272	X	0,02	2,0621
348	B11l	10	0,499	X	0,0279	2,7920	9,6	0,448	X	0,03	2,6752
349	B11m	15,3	0,718	X	0,0427	4,2717	14,4	0,674	X	0,04	4,0128
350	B11n	20	0,79	X	0,0558	5,5839	20,1	0,777	X	0,06	5,6012
351	B12a	5,4	0,082	X	0,0151	1,5077	5,4	0,078	X	0,02	1,5048
352	B12b	6,7	0,208	X	0,0187	1,8706	6,7	0,202	X	0,02	1,8671
353	B12c	12,9	0,654	X	0,0360	3,6016	12,6	0,61	X	0,04	3,5112
354	B12d	9	0,437	X	0,0251	2,5128	8,7	0,385	X	0,02	2,4244
355	B12e	6,3	0,157	X	0,0176	1,7589	6,1	0,143	X	0,02	1,6999
356	B12f	6,5	0,183	X	0,0181	1,8148	5,5	0,087	X	0,02	1,5327
357	B12g	11,7	0,602	X	0,0327	3,2666	10,8	0,53	X	0,03	3,0096
358	B12h	8,8	0,421	X	0,0246	2,4569	8,9	0,403	X	0,02	2,4801
359	B12i	8,6	0,397	X	0,0240	2,4011	8,7	0,385	X	0,02	2,4244
360	B12j	8,2	0,372	X	0,0229	2,2894	8,1	0,332	X	0,02	2,2572
361	B12k	7,2	0,266	X	0,0201	2,0102	6,7	0,202	X	0,02	1,8671
362	B12l	15,9	0,729	X	0,0444	4,4392	17,6	0,745	X	0,05	4,9046
363	B12m	224,5	0,956	224,5	0,6268	62,6796	224,5	0,956	224,5	0,63	62,5611
364	B12n	16,7	0,744	X	0,0466	4,6626	16,1	0,715	X	0,04	4,4866
365	B13a	5,3	0,075	X	0,0148	1,4797	5,3	0,07	X	0,01	1,4769
366	B13b	5,7	0,107	X	0,0159	1,5914	5,7	0,103	X	0,02	1,5884
367	B13c	5,7	0,107	X	0,0159	1,5914	6	0,135	X	0,02	1,6720

368	B13d	81,8	0,921	81,8	0,2284	22,8383	78,7	0,921	78,7	0,22	21,9312
369	B13e	6,7	0,208	X	0,0187	1,8706	6,1	0,143	X	0,02	1,6999
370	B13f	6,6	0,196	X	0,0184	1,8427	6,7	0,202	X	0,02	1,8671
371	B13g	8,1	0,364	X	0,0226	2,2615	8	0,324	X	0,02	2,2293
372	B13h	8,6	0,397	X	0,0240	2,4011	8,6	0,375	X	0,02	2,3965
373	B13i	17,7	0,767	X	0,0494	4,9418	17,7	0,748	X	0,05	4,9324
374	B13j	44,4	0,883	44,4	0,1240	12,3963	44,4	0,882	44,4	0,12	12,3729
375	B13k	11,2	0,578	X	0,0313	3,1270	11,2	0,554	X	0,03	3,1211
376	B13l	9,8	0,491	X	0,0274	2,7361	10,6	0,511	X	0,03	2,9539
377	B13m	28,5	0,848	28,5	0,0796	7,9571	29,9	0,852	29,9	0,08	8,3322
378	B13n	11,8	0,605	X	0,0329	3,2945	11,8	0,582	X	0,03	3,2883
379	B14a	9,6	0,478	X	0,0268	2,6803	9,6	0,448	X	0,03	2,6752
380	B14b	7,1	0,256	X	0,0198	1,9823	7,3	0,259	X	0,02	2,0343
381	B14c	7	0,243	X	0,0195	1,9544	12,8	0,623	X	0,04	3,5670
382	B14d	1340,4	0,987	1340,4	3,7423	374,2349	1340,4	0,987	1340,4	3,74	373,5272
383	B14e	17,1	0,754	X	0,0477	4,7743	6	0,135	X	0,02	1,6720
384	B14f	17	0,75	X	0,0475	4,7463	17,3	0,74	X	0,05	4,8210
385	B14g	15,5	0,724	X	0,0433	4,3275	15	0,694	X	0,04	4,1800
386	B14h	9,6	0,478	X	0,0268	2,6803	9,6	0,448	X	0,03	2,6752
387	B14i	9,1	0,447	X	0,0254	2,5407	8,5	0,362	X	0,02	2,3687
388	B14j	14,9	0,713	X	0,0416	4,1600	15,5	0,706	X	0,04	4,3194
389	B14k	17,6	0,766	X	0,0491	4,9139	18,9	0,767	X	0,05	5,2668
390	B14l	7	0,243	X	0,0195	1,9544	6,6	0,194	X	0,02	1,8392
391	B14m	6,3	0,157	X	0,0176	1,7589	6,7	0,202	X	0,02	1,8671
392	B14n	4,4	0,021	X	0,0123	1,2285	5,4	0,078	X	0,02	1,5048
393	C01a	7,3	0,277	X	0,0204	2,0381	7,3	0,259	X	0,02	2,0343
394	C01b	15,4	0,723	X	0,0430	4,2996	15,4	0,702	X	0,04	4,2915
395	C01c	11,6	0,599	X	0,0324	3,2387	11,6	0,572	X	0,03	3,2326
396	C01d	17,4	0,762	X	0,0486	4,8580	17,4	0,742	X	0,05	4,8488
397	C01e	48,5	0,89	48,5	0,1354	13,5410	48,5	0,889	48,5	0,14	13,5154
398	C01f	12,9	0,654	X	0,0360	3,6016	12,9	0,627	X	0,04	3,5948
399	C01g	11,8	0,605	X	0,0329	3,2945	11,8	0,582	X	0,03	3,2883
400	C01h	14,7	0,707	X	0,0410	4,1042	14,7	0,684	X	0,04	4,0964
401	C01i	9,1	0,447	X	0,0254	2,5407	9,5	0,442	X	0,03	2,6474
402	C01j	15,8	0,729	X	0,0441	4,4113	15,8	0,71	X	0,04	4,4030
403	C01k	12,9	0,654	X	0,0360	3,6016	12,9	0,627	X	0,04	3,5948
404	C01l	14,8	0,709	X	0,0413	4,1321	14,8	0,688	X	0,04	4,1243

405	C01m	30,4	0,855	30,4	0,0849	8,4876	30,4	0,854	30,4	0,08	8,4715
406	C01n	76,8	0,919	76,8	0,2144	21,4423	76,8	0,919	76,8	0,21	21,4017
407	C02a	20,9	0,8	20,9	0,0584	5,8352	20,9	0,784	X	0,06	5,8242
408	C02b	9,2	0,454	X	0,0257	2,5686	9,2	0,425	X	0,03	2,5637
409	C02c	10,1	0,507	X	0,0282	2,8199	10,1	0,476	X	0,03	2,8146
410	C02d	11,5	0,591	X	0,0321	3,2108	11,8	0,582	X	0,03	3,2883
411	C02e	11,3	0,581	X	0,0315	3,1549	11,3	0,56	X	0,03	3,1490
412	C02f	7,5	0,296	X	0,0209	2,0940	7,6	0,286	X	0,02	2,1179
413	C02g	10,2	0,512	X	0,0285	2,8478	10,2	0,486	X	0,03	2,8424
414	C02h	8,3	0,378	X	0,0232	2,3173	8,6	0,375	X	0,02	2,3965
415	C02i	54,8	0,897	54,8	0,1530	15,3000	54,8	0,896	54,8	0,15	15,2710
416	C02j	7,4	0,286	X	0,0207	2,0661	12,5	0,606	X	0,03	3,4834
417	C02k	8,9	0,429	X	0,0248	2,4848	13,1	0,636	X	0,04	3,6506
418	C02l	8,8	0,421	X	0,0246	2,4569	8,8	0,395	X	0,02	2,4523
419	C02m	8,9	0,429	X	0,0248	2,4848	9	0,411	X	0,03	2,5080
420	C02n	8,7	0,41	X	0,0243	2,4290	9,1	0,421	X	0,03	2,5359
421	C03a	9,2	0,454	X	0,0257	2,5686	9,2	0,425	X	0,03	2,5637
422	C03b	8,8	0,421	X	0,0246	2,4569	8,9	0,403	X	0,02	2,4801
423	C03c	9,9	0,495	X	0,0276	2,7640	9,5	0,442	X	0,03	2,6474
424	C03d	39,6	0,873	39,6	0,1106	11,0562	37,3	0,868	37,3	0,10	10,3943
425	C03e	11,4	0,588	X	0,0318	3,1828	11,3	0,56	X	0,03	3,1490
426	C03f	7,6	0,31	X	0,0212	2,1219	7,5	0,28	X	0,02	2,0900
427	C03g	11,1	0,576	X	0,0310	3,0991	11,1	0,549	X	0,03	3,0932
428	C03h	27,4	0,846	27,4	0,0765	7,6500	27,4	0,843	27,4	0,08	7,6355
429	C03i	12,8	0,649	X	0,0357	3,5737	12,8	0,623	X	0,04	3,5670
430	C03j	6,2	0,147	X	0,0173	1,7310	12,7	0,613	X	0,04	3,5391
431	C03k	667,8	0,979	667,8	1,8645	186,4474	667,8	0,979	667,8	1,86	186,0948
432	C03l	9,1	0,447	X	0,0254	2,5407	8,9	0,403	X	0,02	2,4801
433	C03m	28,4	0,848	28,4	0,0793	7,9292	28,3	0,847	28,3	0,08	7,8863
434	C03n	38,2	0,87	38,2	0,1067	10,6653	38,2	0,87	38,2	0,11	10,6451
435	C04a	12,7	0,643	X	0,0355	3,5458	12,9	0,627	X	0,04	3,5948
436	C04b	28,6	0,849	28,6	0,0799	7,9850	28,6	0,848	28,6	0,08	7,9699
437	C04c	13,9	0,685	X	0,0388	3,8808	13,9	0,661	X	0,04	3,8735
438	C04d	14,2	0,692	X	0,0396	3,9646	13,8	0,659	X	0,04	3,8456
439	C04e	1234,7	0,984	1234,7	3,4472	344,7238	1234,7	0,984	1234,7	3,44	344,0719
440	C04f	7,2	0,266	X	0,0201	2,0102	10	0,47	X	0,03	2,7867
441	C04g	7,3	0,277	X	0,0204	2,0381	7,8	0,309	X	0,02	2,1736

442	C04h	11,8	0,605	X	0,0329	3,2945	11,8	0,582	X	0,03	3,2883
443	C04i	12,7	0,643	X	0,0355	3,5458	12,7	0,613	X	0,04	3,5391
444	C04j	24,8	0,832	24,8	0,0692	6,9241	25,4	0,828	25,4	0,07	7,0782
445	C04k	11,4	0,588	X	0,0318	3,1828	7,5	0,28	X	0,02	2,0900
446	C04l	9,1	0,447	X	0,0254	2,5407	14,1	0,667	X	0,04	3,9292
447	C04m	9,3	0,462	X	0,0260	2,5965	9	0,411	X	0,03	2,5080
448	C04n	9	0,437	X	0,0251	2,5128	8,9	0,403	X	0,02	2,4801
449	C05a	13,3	0,669	X	0,0371	3,7133	13,3	0,643	X	0,04	3,7063
450	C05b	9,9	0,495	X	0,0276	2,7640	10,1	0,476	X	0,03	2,8146
451	C05c	10,9	0,565	X	0,0304	3,0432	11,2	0,554	X	0,03	3,1211
452	C05d	11	0,572	X	0,0307	3,0712	11,2	0,554	X	0,03	3,1211
453	C05e	9,7	0,486	X	0,0271	2,7082	9,3	0,431	X	0,03	2,5916
454	C05f	10,4	0,526	X	0,0290	2,9036	9,7	0,459	X	0,03	2,7031
455	C05g	7,2	0,266	X	0,0201	2,0102	10,5	0,503	X	0,03	2,9260
456	C05h	41,8	0,881	41,8	0,1167	11,6704	42,9	0,88	42,9	0,12	11,9549
457	C05i	17,1	0,754	X	0,0477	4,7743	17,1	0,735	X	0,05	4,7652
458	C05j	11,4	0,588	X	0,0318	3,1828	11,4	0,563	X	0,03	3,1768
459	C05k	178,2	0,945	178,2	0,4975	49,7528	178,2	0,945	178,2	0,50	49,6587
460	C05l	15,2	0,717	X	0,0424	4,2438	15,7	0,708	X	0,04	4,3751
461	C05m	39,4	0,871	39,4	0,1100	11,0003	40,3	0,875	40,3	0,11	11,2303
462	C05n	107,6	0,931	107,6	0,3004	30,0415	107,6	0,93	107,6	0,30	29,9847
463	C06a	22,6	0,816	22,6	0,0631	6,3098	22,6	0,809	22,6	0,06	6,2979
464	C06b	11,7	0,602	X	0,0327	3,2666	11,7	0,577	X	0,03	3,2604
465	C06c	16,1	0,733	X	0,0450	4,4951	16,1	0,715	X	0,04	4,4866
466	C06d	11,7	0,602	X	0,0327	3,2666	11,7	0,577	X	0,03	3,2604
467	C06e	9,7	0,486	X	0,0271	2,7082	9,6	0,448	X	0,03	2,6752
468	C06f	10,1	0,507	X	0,0282	2,8199	10,1	0,476	X	0,03	2,8146
469	C06g	28,6	0,849	28,6	0,0799	7,9850	28,8	0,848	28,8	0,08	8,0257
470	C06h	553	0,977	553	1,5440	154,3956	553	0,977	553	1,54	154,1037
471	C06i	7,5	0,296	X	0,0209	2,0940	26,5	0,838	26,5	0,07	7,3847
472	C06j	7,5	0,296	X	0,0209	2,0940	7,6	0,286	X	0,02	2,1179
473	C06k	14,3	0,694	X	0,0399	3,9925	14,3	0,672	X	0,04	3,9850
474	C06l	114,2	0,934	114,2	0,3188	31,8842	114,2	0,933	114,2	0,32	31,8239
475	C06m	10,3	0,518	X	0,0288	2,8757	13	0,631	X	0,04	3,6227
476	C06n	2483,4	0,991	2483,4	6,9336	693,3564	2483,4	0,991	2483,4	6,92	692,0453
477	C07a	11,5	0,591	X	0,0321	3,2108	11,5	0,567	X	0,03	3,2047
478	C07b	12,7	0,643	X	0,0355	3,5458	13,4	0,648	X	0,04	3,7342

479	C07c	12,9	0,654	X	0,0360	3,6016	10,9	0,535	X	0,03	3,0375
480	C07d	10,6	0,536	X	0,0296	2,9595	11,5	0,567	X	0,03	3,2047
481	C07e	14,6	0,701	X	0,0408	4,0763	14,6	0,678	X	0,04	4,0686
482	C07f	7,9	0,351	X	0,0221	2,2057	7,9	0,318	X	0,02	2,2015
483	C07g	23,3	0,821	23,3	0,0651	6,5053	22,8	0,81	22,8	0,06	6,3536
484	C07h	6,7	0,208	X	0,0187	1,8706	28,1	0,846	28,1	0,08	7,8306
485	C07i	6,2	0,147	X	0,0173	1,7310	10,8	0,53	X	0,03	3,0096
486	C07j	6,2	0,147	X	0,0173	1,7310	6,2	0,154	X	0,02	1,7277
487	C07k	8	0,354	X	0,0223	2,2336	6,6	0,194	X	0,02	1,8392
488	C07l	8,8	0,421	X	0,0246	2,4569	12,6	0,61	X	0,04	3,5112
489	C07m	10,6	0,536	X	0,0296	2,9595	6,8	0,216	X	0,02	1,8949
490	C07n	10,6	0,536	X	0,0296	2,9595	12,7	0,613	X	0,04	3,5391
491	C08a	12	0,619	X	0,0335	3,3504	12,7	0,613	X	0,04	3,5391
492	C08b	16,3	0,737	X	0,0455	4,5509	16,6	0,725	X	0,05	4,6259
493	C08c	8,7	0,41	X	0,0243	2,4290	8,7	0,385	X	0,02	2,4244
494	C08d	8,6	0,397	X	0,0240	2,4011	8,5	0,362	X	0,02	2,3687
495	C08e	9,9	0,495	X	0,0276	2,7640	9,9	0,469	X	0,03	2,7588
496	C08f	9,6	0,478	X	0,0268	2,6803	9,6	0,448	X	0,03	2,6752
497	C08g	6,5	0,183	X	0,0181	1,8148	7,7	0,301	X	0,02	2,1457
498	C08h	11,3	0,581	X	0,0315	3,1549	10,8	0,53	X	0,03	3,0096
499	C08i	6,2	0,147	X	0,0173	1,7310	7,3	0,259	X	0,02	2,0343
500	C08j	10	0,499	X	0,0279	2,7920	10	0,47	X	0,03	2,7867
501	C08k	29,8	0,854	29,8	0,0832	8,3201	29,8	0,851	29,8	0,08	8,3043
502	C08l	193,1	0,949	193,1	0,5391	53,9128	193,1	0,948	193,1	0,54	53,8109
503	C08m	65,8	0,91	65,8	0,1837	18,3711	65,8	0,908	65,8	0,18	18,3364
504	C08n	10,6	0,536	X	0,0296	2,9595	10,6	0,511	X	0,03	2,9539
505	C09a	13,8	0,682	X	0,0385	3,8529	13,2	0,64	X	0,04	3,6784
506	C09b	39,4	0,871	39,4	0,1100	11,0003	39,4	0,871	39,4	0,11	10,9795
507	C09c	13,3	0,669	X	0,0371	3,7133	14,1	0,667	X	0,04	3,9292
508	C09d	44,9	0,885	44,9	0,1254	12,5359	44,9	0,884	44,9	0,13	12,5122
509	C09e	5,9	0,125	X	0,0165	1,6473	5,9	0,126	X	0,02	1,6441
510	C09f	6,4	0,173	X	0,0179	1,7869	5,5	0,087	X	0,02	1,5327
511	C09g	8,8	0,421	X	0,0246	2,4569	8,9	0,403	X	0,02	2,4801
512	C09h	24,3	0,827	24,3	0,0678	6,7845	24,4	0,82	24,4	0,07	6,7995
513	C09i	18	0,77	X	0,0503	5,0255	18	0,755	X	0,05	5,0160
514	C09j	10,3	0,518	X	0,0288	2,8757	10,1	0,476	X	0,03	2,8146
515	C09k	8,5	0,389	X	0,0237	2,3732	8,4	0,356	X	0,02	2,3408

516	C09l	8,7	0,41	X	0,0243	2,4290	16,4	0,722	X	0,05	4,5702
517	C09m	8,7	0,41	X	0,0243	2,4290	15,1	0,697	X	0,04	4,2079
518	C09n	8,4	0,384	X	0,0235	2,3453	8,5	0,362	X	0,02	2,3687
519	C10a	15,3	0,718	X	0,0427	4,2717	16,3	0,719	X	0,05	4,5423
520	C10b	18,1	0,773	X	0,0505	5,0535	19,4	0,772	X	0,05	5,4062
521	C10c	14,6	0,701	X	0,0408	4,0763	14,6	0,678	X	0,04	4,0686
522	C10d	16,2	0,735	X	0,0452	4,5230	18,5	0,762	X	0,05	5,1554
523	C10e	12,8	0,649	X	0,0357	3,5737	13,7	0,657	X	0,04	3,8178
524	C10f	12,9	0,654	X	0,0360	3,6016	13,4	0,648	X	0,04	3,7342
525	C10g	8,6	0,397	X	0,0240	2,4011	5,7	0,103	X	0,02	1,5884
526	C10h	7,2	0,266	X	0,0201	2,0102	5,6	0,094	X	0,02	1,5605
527	C10i	7,1	0,256	X	0,0198	1,9823	5,8	0,113	X	0,02	1,6163
528	C10j	7	0,243	X	0,0195	1,9544	5,6	0,094	X	0,02	1,5605
529	C10k	14,6	0,701	X	0,0408	4,0763	14,6	0,678	X	0,04	4,0686
530	C10l	24,9	0,832	24,9	0,0695	6,9520	24,7	0,822	24,7	0,07	6,8831
531	C10m	222,9	0,955	222,9	0,6223	62,2329	222,9	0,955	222,9	0,62	62,1152
532	C10n	18,1	0,773	X	0,0505	5,0535	18,1	0,757	X	0,05	5,0439
533	C11a	25,7	0,838	25,7	0,0718	7,1753	25,5	0,829	25,5	0,07	7,1060
534	C11b	27,5	0,847	27,5	0,0768	7,6779	27,5	0,843	27,5	0,08	7,6634
535	C11c	19,5	0,786	X	0,0544	5,4443	20,4	0,78	X	0,06	5,6848
536	C11d	19,1	0,783	X	0,0533	5,3327	18,8	0,766	X	0,05	5,2390
537	C11e	10,6	0,536	X	0,0296	2,9595	9,8	0,464	X	0,03	2,7310
538	C11f	12,6	0,64	X	0,0352	3,5179	41,6	0,878	41,6	0,12	11,5926
539	C11g	400,2	0,97	400,2	1,1173	111,7344	400,2	0,97	400,2	1,12	111,5231
540	C11h	1335,2	0,986	1335,2	3,7278	372,7831	1335,2	0,986	1335,2	3,72	372,0781
541	C11i	13	0,659	X	0,0363	3,6296	74,9	0,918	74,9	0,21	20,8723
542	C11j	13	0,659	X	0,0363	3,6296	10,7	0,518	X	0,03	2,9818
543	C11k	25,2	0,836	25,2	0,0704	7,0358	25,2	0,827	25,2	0,07	7,0224
544	C11l	16,9	0,747	X	0,0472	4,7184	16,5	0,724	X	0,05	4,5980
545	C11m	47	0,888	47	0,1312	13,1222	47,2	0,887	47,2	0,13	13,1532
546	C11n	7,4	0,286	X	0,0207	2,0661	7,4	0,272	X	0,02	2,0621
547	C12a	55,7	0,898	55,7	0,1555	15,5512	55,7	0,897	55,7	0,16	15,5218
548	C12b	19,8	0,789	X	0,0553	5,5281	20,2	0,778	X	0,06	5,6291
549	C12c	34,5	0,865	34,5	0,0963	9,6323	34,5	0,864	34,5	0,10	9,6141
550	C12d	22,3	0,815	22,3	0,0623	6,2261	22,3	0,801	22,3	0,06	6,2143
551	C12e	40,3	0,877	40,3	0,1125	11,2516	40,3	0,875	40,3	0,11	11,2303
552	C12f	39,9	0,875	39,9	0,1114	11,1399	29,4	0,85	29,4	0,08	8,1929

553	C12g	16,1	0,733	X	0,0450	4,4951	15	0,694	X	0,04	4,1800
554	C12h	50,3	0,891	50,3	0,1404	14,0436	57,8	0,9	57,8	0,16	16,1070
555	C12i	16,3	0,737	X	0,0455	4,5509	10,9	0,535	X	0,03	3,0375
556	C12j	187,7	0,945	187,7	0,5241	52,4052	187,7	0,946	187,7	0,52	52,3061
557	C12k	15	0,714	X	0,0419	4,1879	15,4	0,702	X	0,04	4,2915
558	C12l	7,4	0,286	X	0,0207	2,0661	7,4	0,272	X	0,02	2,0621
559	C12m	13,4	0,674	X	0,0374	3,7412	13,4	0,648	X	0,04	3,7342
560	C12n	8	0,354	X	0,0223	2,2336	8	0,324	X	0,02	2,2293
561	C13a	12	0,619	X	0,0335	3,3504	12,4	0,601	X	0,03	3,4555
562	C13b	15,3	0,718	X	0,0427	4,2717	15,3	0,701	X	0,04	4,2636
563	C13c	23,7	0,825	23,7	0,0662	6,6170	23,7	0,815	23,7	0,07	6,6044
564	C13d	17,3	0,758	X	0,0483	4,8301	17,7	0,748	X	0,05	4,9324
565	C13e	8,1	0,364	X	0,0226	2,2615	8,2	0,34	X	0,02	2,2851
566	C13f	7,6	0,31	X	0,0212	2,1219	7,3	0,259	X	0,02	2,0343
567	C13g	15,7	0,727	X	0,0438	4,3834	15,1	0,697	X	0,04	4,2079
568	C13h	10,9	0,565	X	0,0304	3,0432	10,7	0,518	X	0,03	2,9818
569	C13i	16,3	0,737	X	0,0455	4,5509	16	0,713	X	0,04	4,4587
570	C13j	113,8	0,933	113,8	0,3177	31,7726	112,4	0,932	112,4	0,31	31,3223
571	C13k	25,1	0,835	25,1	0,0701	7,0078	25,2	0,827	25,2	0,07	7,0224
572	C13l	22,5	0,816	22,5	0,0628	6,2819	22,5	0,805	22,5	0,06	6,2700
573	C13m	13,3	0,669	X	0,0371	3,7133	13,3	0,643	X	0,04	3,7063
574	C13n	7,3	0,277	X	0,0204	2,0381	7,5	0,28	X	0,02	2,0900
575	C14a	8,9	0,429	X	0,0248	2,4848	9,2	0,425	X	0,03	2,5637
576	C14b	13,1	0,665	X	0,0366	3,6575	13,2	0,64	X	0,04	3,6784
577	C14c	23,5	0,824	23,5	0,0656	6,5611	23,5	0,814	23,5	0,07	6,5487
578	C14d	16,4	0,74	X	0,0458	4,5788	16,7	0,727	X	0,05	4,6538
579	C14e	13,8	0,682	X	0,0385	3,8529	13,8	0,659	X	0,04	3,8456
580	C14f	8	0,354	X	0,0223	2,2336	7,3	0,259	X	0,02	2,0343
581	C14g	13	0,659	X	0,0363	3,6296	13	0,631	X	0,04	3,6227
582	C14h	10,3	0,518	X	0,0288	2,8757	10,1	0,476	X	0,03	2,8146
583	C14i	11,9	0,616	X	0,0332	3,3224	11,7	0,577	X	0,03	3,2604
584	C14j	9,4	0,468	X	0,0262	2,6244	9,3	0,431	X	0,03	2,5916
585	C14k	10,6	0,536	X	0,0296	2,9595	10,6	0,511	X	0,03	2,9539
586	C14l	73,6	0,918	73,6	0,2055	20,5489	73,6	0,917	73,6	0,21	20,5100
587	C14m	12,4	0,632	X	0,0346	3,4620	13	0,631	X	0,04	3,6227
588	C14n	13	0,659	X	0,0363	3,6296	13	0,631	X	0,04	3,6227
589	D01a	8	0,354	X	0,0223	2,2336	8	0,324	X	0,02	2,2293

590	D01b	11,9	0,616	X	0,0332	3,3224	11,9	0,589	X	0,03	3,3162
591	D01c	5,7	0,107	X	0,0159	1,5914	5,7	0,103	X	0,02	1,5884
592	D01d	6,3	0,157	X	0,0176	1,7589	6,3	0,162	X	0,02	1,7556
593	D01e	4,6	0,035	X	0,0128	1,2843	4,6	0,034	X	0,01	1,2819
594	D01f	4,4	0,021	X	0,0123	1,2285	4,4	0,024	X	0,01	1,2261
595	D01g	4,4	0,021	X	0,0123	1,2285	4,4	0,024	X	0,01	1,2261
596	D01h	5	0,053	X	0,0140	1,3960	5	0,053	X	0,01	1,3933
597	D01i	4,6	0,035	X	0,0128	1,2843	4,6	0,034	X	0,01	1,2819
598	D01j	5,4	0,082	X	0,0151	1,5077	5,4	0,078	X	0,02	1,5048
599	D01k	5,8	0,117	X	0,0162	1,6193	5,8	0,113	X	0,02	1,6163
600	D01l	8,8	0,421	X	0,0246	2,4569	8,8	0,395	X	0,02	2,4523
601	D01m	9	0,437	X	0,0251	2,5128	8,9	0,403	X	0,02	2,4801
602	D01n	10,7	0,549	X	0,0299	2,9874	8,5	0,362	X	0,02	2,3687
603	D02a	6,8	0,221	X	0,0190	1,8985	6,5	0,182	X	0,02	1,8113
604	D02b	13	0,659	X	0,0363	3,6296	13	0,631	X	0,04	3,6227
605	D02c	5,7	0,107	X	0,0159	1,5914	5,7	0,103	X	0,02	1,5884
606	D02d	9	0,437	X	0,0251	2,5128	8,9	0,403	X	0,02	2,4801
607	D02e	5,2	0,069	X	0,0145	1,4518	5,2	0,062	X	0,01	1,4491
608	D02f	5,3	0,075	X	0,0148	1,4797	5,3	0,07	X	0,01	1,4769
609	D02g	5,1	0,059	X	0,0142	1,4239	5,1	0,055	X	0,01	1,4212
610	D02h	4,8	0,043	X	0,0134	1,3401	4,8	0,043	X	0,01	1,3376
611	D02i	7	0,243	X	0,0195	1,9544	7	0,234	X	0,02	1,9507
612	D02j	8,5	0,389	X	0,0237	2,3732	8,2	0,34	X	0,02	2,2851
613	D02k	9	0,437	X	0,0251	2,5128	9	0,411	X	0,03	2,5080
614	D02l	10,3	0,518	X	0,0288	2,8757	10,3	0,491	X	0,03	2,8703
615	D02m	10,6	0,536	X	0,0296	2,9595	10,4	0,497	X	0,03	2,8982
616	D02n	2614,1	0,993	2614,1	7,2985	729,8474	2614,1	0,993	2614,1	7,28	728,4672
617	D03a	7,3	0,277	X	0,0204	2,0381	7,3	0,259	X	0,02	2,0343
618	D03b	6,9	0,232	X	0,0193	1,9265	6,9	0,224	X	0,02	1,9228
619	D03c	7,7	0,324	X	0,0215	2,1498	7,7	0,301	X	0,02	2,1457
620	D03d	8,6	0,397	X	0,0240	2,4011	8,6	0,375	X	0,02	2,3965
621	D03e	5,2	0,069	X	0,0145	1,4518	5,2	0,062	X	0,01	1,4491
622	D03f	4,9	0,046	X	0,0137	1,3681	4,9	0,047	X	0,01	1,3655
623	D03g	6,6	0,196	X	0,0184	1,8427	6,6	0,194	X	0,02	1,8392
624	D03h	5,7	0,107	X	0,0159	1,5914	5,1	0,055	X	0,01	1,4212
625	D03i	11	0,572	X	0,0307	3,0712	11	0,542	X	0,03	3,0654
626	D03j	22,2	0,814	22,2	0,0620	6,1982	22,2	0,8	22,2	0,06	6,1864

627	D03k	23,3	0,821	23,3	0,0651	6,5053	23,3	0,812	23,3	0,06	6,4930
628	D03l	11,8	0,605	X	0,0329	3,2945	11,8	0,582	X	0,03	3,2883
629	D03m	12,2	0,627	X	0,0341	3,4062	11,9	0,589	X	0,03	3,3162
630	D03n	380,3	0,969	380,3	1,0618	106,1784	380,3	0,969	380,3	1,06	105,9776
631	D04a	13,9	0,685	X	0,0388	3,8808	13,9	0,661	X	0,04	3,8735
632	D04b	5,8	0,117	X	0,0162	1,6193	5,9	0,126	X	0,02	1,6441
633	D04c	6,5	0,183	X	0,0181	1,8148	6,5	0,182	X	0,02	1,8113
634	D04d	4,8	0,043	X	0,0134	1,3401	5,5	0,087	X	0,02	1,5327
635	D04e	7,1	0,256	X	0,0198	1,9823	6,3	0,162	X	0,02	1,7556
636	D04f	6,7	0,208	X	0,0187	1,8706	6,7	0,202	X	0,02	1,8671
637	D04g	7,5	0,296	X	0,0209	2,0940	7,5	0,28	X	0,02	2,0900
638	D04h	5,3	0,075	X	0,0148	1,4797	5,3	0,07	X	0,01	1,4769
639	D04i	4,2	0,021	X	0,0117	1,1726	5,3	0,07	X	0,01	1,4769
640	D04j	7,6	0,31	X	0,0212	2,1219	7,6	0,286	X	0,02	2,1179
641	D04k	6,5	0,183	X	0,0181	1,8148	6,5	0,182	X	0,02	1,8113
642	D04l	7,3	0,277	X	0,0204	2,0381	7,3	0,259	X	0,02	2,0343
643	D04m	6	0,131	X	0,0168	1,6752	4,9	0,047	X	0,01	1,3655
644	D04n	7,7	0,324	X	0,0215	2,1498	21,1	0,787	X	0,06	5,8799
645	D05a	23,4	0,823	23,4	0,0653	6,5332	23,2	0,81	23,2	0,06	6,4651
646	D05b	6	0,131	X	0,0168	1,6752	6	0,135	X	0,02	1,6720
647	D05c	4,4	0,021	X	0,0123	1,2285	4,3	0,022	X	0,01	1,1983
648	D05d	6,3	0,157	X	0,0176	1,7589	6,3	0,162	X	0,02	1,7556
649	D05e	4,9	0,046	X	0,0137	1,3681	4,9	0,047	X	0,01	1,3655
650	D05f	8,3	0,378	X	0,0232	2,3173	8,3	0,349	X	0,02	2,3129
651	D05g	5,7	0,107	X	0,0159	1,5914	5,8	0,113	X	0,02	1,6163
652	D05h	4,7	0,04	X	0,0131	1,3122	4,7	0,04	X	0,01	1,3097
653	D05i	5,1	0,059	X	0,0142	1,4239	5,1	0,055	X	0,01	1,4212
654	D05j	4,4	0,021	X	0,0123	1,2285	4,4	0,024	X	0,01	1,2261
655	D05k	8,1	0,364	X	0,0226	2,2615	8,1	0,332	X	0,02	2,2572
656	D05l	15,3	0,718	X	0,0427	4,2717	15,3	0,701	X	0,04	4,2636
657	D05m	4,9	0,046	X	0,0137	1,3681	4,8	0,043	X	0,01	1,3376
658	D05n	7,8	0,337	X	0,0218	2,1777	8,2	0,34	X	0,02	2,2851
659	D06a	124,4	0,937	124,4	0,3473	34,7320	124,4	0,937	124,4	0,35	34,6664
660	D06b	13	0,659	X	0,0363	3,6296	11,8	0,582	X	0,03	3,2883
661	D06c	6,7	0,208	X	0,0187	1,8706	6,7	0,202	X	0,02	1,8671
662	D06d	5,1	0,059	X	0,0142	1,4239	6,4	0,172	X	0,02	1,7835
663	D06e	5,8	0,117	X	0,0162	1,6193	5,7	0,103	X	0,02	1,5884

664	D06f	6,3	0,157	X	0,0176	1,7589	6,5	0,182	X	0,02	1,8113
665	D06g	8,1	0,364	X	0,0226	2,2615	8,1	0,332	X	0,02	2,2572
666	D06h	4,5	0,032	X	0,0126	1,2564	4,5	0,028	X	0,01	1,2540
667	D06i	4,5	0,032	X	0,0126	1,2564	4,5	0,028	X	0,01	1,2540
668	D06j	4,6	0,035	X	0,0128	1,2843	4,6	0,034	X	0,01	1,2819
669	D06k	2,8	0,011	X	0,0078	0,7818	2,8	0,011	X	0,01	0,7803
670	D06l	5,2	0,069	X	0,0145	1,4518	5,2	0,062	X	0,01	1,4491
671	D06m	10,1	0,507	X	0,0282	2,8199	10,1	0,476	X	0,03	2,8146
672	D06n	15,5	0,724	X	0,0433	4,3275	15,4	0,702	X	0,04	4,2915
673	D07a	7,5	0,296	X	0,0209	2,0940	7,4	0,272	X	0,02	2,0621
674	D07b	2,3	0,007	X	0,0064	0,6422	2,1	0,007	X	0,01	0,5852
675	D07c	0,1	0	X	0,0003	0,0279	0,1	0	X	0,00	0,0279
676	D07d	0,7	0,002	X	0,0020	0,1954	1,4	0,005	X	0,00	0,3901
677	D07e	2	0,005	X	0,0056	0,5584	1,7	0,005	X	0,00	0,4737
678	D07f	3,6	0,014	X	0,0101	1,0051	3,5	0,016	X	0,01	0,9753
679	D07g	1,5	0,005	X	0,0042	0,4188	1,3	0,004	X	0,00	0,3623
680	D07h	0,2	0,001	X	0,0006	0,0558	0,1	0	X	0,00	0,0279
681	D07i	1,2	0,004	X	0,0034	0,3350	1,1	0,003	X	0,00	0,3065
682	D07j	2,2	0,006	X	0,0061	0,6142	2,2	0,009	X	0,01	0,6131
683	D07k	0	0	X	0,0000	0,0000	0	0	X	0,00	0,0000
684	D07l	0,8	0,003	X	0,0022	0,2234	0,8	0,002	X	0,00	0,2229
685	D07m	2,7	0,01	X	0,0075	0,7538	2,7	0,01	X	0,01	0,7524
686	D07n	2,7	0,01	X	0,0075	0,7538	1,8	0,006	X	0,01	0,5016
687	D08a	5,2	0,069	X	0,0145	1,4518	5,2	0,062	X	0,01	1,4491
688	D08b	4,6	0,035	X	0,0128	1,2843	4,6	0,034	X	0,01	1,2819
689	D08c	5,2	0,069	X	0,0145	1,4518	5,8	0,113	X	0,02	1,6163
690	D08d	8,7	0,41	X	0,0243	2,4290	10,9	0,535	X	0,03	3,0375
691	D08e	5,5	0,092	X	0,0154	1,5356	2,1	0,007	X	0,01	0,5852
692	D08f	8,6	0,397	X	0,0240	2,4011	3	0,013	X	0,01	0,8360
693	D08g	6,6	0,196	X	0,0184	1,8427	6,4	0,172	X	0,02	1,7835
694	D08h	6,4	0,173	X	0,0179	1,7869	6,5	0,182	X	0,02	1,8113
695	D08i	9,4	0,468	X	0,0262	2,6244	9,4	0,437	X	0,03	2,6195
696	D08j	22,8	0,819	22,8	0,0637	6,3657	23,2	0,81	23,2	0,06	6,4651
697	D08k	5,9	0,125	X	0,0165	1,6473	5,9	0,126	X	0,02	1,6441
698	D08l	9,6	0,478	X	0,0268	2,6803	9,6	0,448	X	0,03	2,6752
699	D08m	6,9	0,232	X	0,0193	1,9265	6,9	0,224	X	0,02	1,9228
700	D08n	9,6	0,478	X	0,0268	2,6803	9,6	0,448	X	0,03	2,6752

701	D09a	6,6	0,196	X	0,0184	1,8427	6,2	0,154	X	0,02	1,7277
702	D09b	3,6	0,014	X	0,0101	1,0051	3,4	0,015	X	0,01	0,9475
703	D09c	4,5	0,032	X	0,0126	1,2564	4,2	0,021	X	0,01	1,1704
704	D09d	8,4	0,384	X	0,0235	2,3453	8,7	0,385	X	0,02	2,4244
705	D09e	120,7	0,935	120,7	0,3370	33,6990	119,4	0,934	119,4	0,33	33,2730
706	D09f	943,8	0,983	943,8	2,6351	263,5056	943,8	0,983	943,8	2,63	263,0073
707	D09g	4,4	0,021	X	0,0123	1,2285	4,5	0,028	X	0,01	1,2540
708	D09h	4,4	0,021	X	0,0123	1,2285	4,5	0,028	X	0,01	1,2540
709	D09i	11,9	0,616	X	0,0332	3,3224	12	0,594	X	0,03	3,3440
710	D09j	71,2	0,913	71,2	0,1988	19,8788	71,2	0,913	71,2	0,20	19,8412
711	D09k	10,7	0,549	X	0,0299	2,9874	10,5	0,503	X	0,03	2,9260
712	D09l	15,1	0,716	X	0,0422	4,2159	15,1	0,697	X	0,04	4,2079
713	D09m	15	0,714	X	0,0419	4,1879	15	0,694	X	0,04	4,1800
714	D09n	12,7	0,643	X	0,0355	3,5458	12,7	0,613	X	0,04	3,5391
715	D10a	3,3	0,012	X	0,0092	0,9213	3,4	0,015	X	0,01	0,9475
716	D10b	7	0,243	X	0,0195	1,9544	7	0,234	X	0,02	1,9507
717	D10c	7,8	0,337	X	0,0218	2,1777	7,8	0,309	X	0,02	2,1736
718	D10d	7,5	0,296	X	0,0209	2,0940	7,8	0,309	X	0,02	2,1736
719	D10e	7,6	0,31	X	0,0212	2,1219	8,2	0,34	X	0,02	2,2851
720	D10f	353,3	0,967	353,3	0,9864	98,6401	353,3	0,967	353,3	0,98	98,4536
721	D10g	7,8	0,337	X	0,0218	2,1777	7,6	0,286	X	0,02	2,1179
722	D10h	7,7	0,324	X	0,0215	2,1498	7,8	0,309	X	0,02	2,1736
723	D10i	5,5	0,092	X	0,0154	1,5356	5,8	0,113	X	0,02	1,6163
724	D10j	18,5	0,778	X	0,0517	5,1651	18,5	0,762	X	0,05	5,1554
725	D10k	8,7	0,41	X	0,0243	2,4290	8,7	0,385	X	0,02	2,4244
726	D10l	8,1	0,364	X	0,0226	2,2615	8	0,324	X	0,02	2,2293
727	D10m	14,1	0,691	X	0,0394	3,9367	14,4	0,674	X	0,04	4,0128
728	D10n	10,7	0,549	X	0,0299	2,9874	10,7	0,518	X	0,03	2,9818
729	D11a	7	0,243	X	0,0195	1,9544	7	0,234	X	0,02	1,9507
730	D11b	5,1	0,059	X	0,0142	1,4239	5,2	0,062	X	0,01	1,4491
731	D11c	5,3	0,075	X	0,0148	1,4797	5,2	0,062	X	0,01	1,4491
732	D11d	5	0,053	X	0,0140	1,3960	4,9	0,047	X	0,01	1,3655
733	D11e	5	0,053	X	0,0140	1,3960	4,8	0,043	X	0,01	1,3376
734	D11f	10,7	0,549	X	0,0299	2,9874	24,9	0,825	24,9	0,07	6,9388
735	D11g	10,5	0,531	X	0,0293	2,9316	13,1	0,636	X	0,04	3,6506
736	D11h	9,7	0,486	X	0,0271	2,7082	9,3	0,431	X	0,03	2,5916
737	D11i	10,4	0,526	X	0,0290	2,9036	10,4	0,497	X	0,03	2,8982

738	D11j	15,7	0,727	X	0,0438	4,3834	15,7	0,708	X	0,04	4,3751
739	D11k	10,2	0,512	X	0,0285	2,8478	10	0,47	X	0,03	2,7867
740	D11l	34,9	0,867	34,9	0,0974	9,7440	34,9	0,866	34,9	0,10	9,7255
741	D11m	66,9	0,912	66,9	0,1868	18,6782	66,9	0,911	66,9	0,19	18,6429
742	D11n	30,4	0,855	30,4	0,0849	8,4876	30	0,853	30	0,08	8,3601
743	D12a	5,6	0,102	X	0,0156	1,5635	5,6	0,094	X	0,02	1,5605
744	D12b	5,8	0,117	X	0,0162	1,6193	5,8	0,113	X	0,02	1,6163
745	D12c	6,7	0,208	X	0,0187	1,8706	6,7	0,202	X	0,02	1,8671
746	D12d	6	0,131	X	0,0168	1,6752	6,7	0,202	X	0,02	1,8671
747	D12e	14,4	0,697	X	0,0402	4,0204	14,4	0,674	X	0,04	4,0128
748	D12f	10,6	0,536	X	0,0296	2,9595	10,8	0,53	X	0,03	3,0096
749	D12g	18	0,77	X	0,0503	5,0255	18	0,755	X	0,05	5,0160
750	D12h	7,2	0,266	X	0,0201	2,0102	7,2	0,247	X	0,02	2,0064
751	D12i	21,4	0,805	21,4	0,0597	5,9748	21,5	0,791	X	0,06	5,9914
752	D12j	9,8	0,491	X	0,0274	2,7361	9,8	0,464	X	0,03	2,7310
753	D12k	4,9	0,046	X	0,0137	1,3681	5,3	0,07	X	0,01	1,4769
754	D12l	11,5	0,591	X	0,0321	3,2108	11,5	0,567	X	0,03	3,2047
755	D12m	7,7	0,324	X	0,0215	2,1498	7,6	0,286	X	0,02	2,1179
756	D12n	16,2	0,735	X	0,0452	4,5230	16,2	0,717	X	0,05	4,5144
757	D13a	6,8	0,221	X	0,0190	1,8985	6,8	0,216	X	0,02	1,8949
758	D13b	10,3	0,518	X	0,0288	2,8757	10,3	0,491	X	0,03	2,8703
759	D13c	5,1	0,059	X	0,0142	1,4239	4,7	0,04	X	0,01	1,3097
760	D13d	7,1	0,256	X	0,0198	1,9823	7,1	0,238	X	0,02	1,9785
761	D13e	5,6	0,102	X	0,0156	1,5635	5,9	0,126	X	0,02	1,6441
762	D13f	6,9	0,232	X	0,0193	1,9265	6,5	0,182	X	0,02	1,8113
763	D13g	7,3	0,277	X	0,0204	2,0381	7,3	0,259	X	0,02	2,0343
764	D13h	6,3	0,157	X	0,0176	1,7589	6,4	0,172	X	0,02	1,7835
765	D13i	9,5	0,474	X	0,0265	2,6524	10,1	0,476	X	0,03	2,8146
766	D13j	20,7	0,797	X	0,0578	5,7794	22,4	0,802	22,4	0,06	6,2422
767	D13k	5,1	0,059	X	0,0142	1,4239	9,3	0,431	X	0,03	2,5916
768	D13l	6,7	0,208	X	0,0187	1,8706	5,7	0,103	X	0,02	1,5884
769	D13m	7,5	0,296	X	0,0209	2,0940	7,5	0,28	X	0,02	2,0900
770	D13n	6,7	0,208	X	0,0187	1,8706	6,7	0,202	X	0,02	1,8671
771	D14a	17,7	0,767	X	0,0494	4,9418	17,7	0,748	X	0,05	4,9324
772	D14b	6,9	0,232	X	0,0193	1,9265	6,9	0,224	X	0,02	1,9228
773	D14c	6	0,131	X	0,0168	1,6752	6	0,135	X	0,02	1,6720
774	D14d	5,7	0,107	X	0,0159	1,5914	5,8	0,113	X	0,02	1,6163

775	D14e	5,4	0,082	X	0,0151	1,5077	5,4	0,078	X	0,02	1,5048
776	D14f	5,5	0,092	X	0,0154	1,5356	5,2	0,062	X	0,01	1,4491
777	D14g	5,4	0,082	X	0,0151	1,5077	5,4	0,078	X	0,02	1,5048
778	D14h	6,5	0,183	X	0,0181	1,8148	6,3	0,162	X	0,02	1,7556
779	D14i	6,7	0,208	X	0,0187	1,8706	6,7	0,202	X	0,02	1,8671
780	D14j	494,1	0,975	494,1	1,3795	137,9510	494,1	0,975	494,1	1,38	137,6901
781	D14k	28,6	0,849	28,6	0,0799	7,9850	28,8	0,848	28,8	0,08	8,0257
782	D14l	7,8	0,337	X	0,0218	2,1777	7,9	0,318	X	0,02	2,2015
783	D14m	5,9	0,125	X	0,0165	1,6473	6	0,135	X	0,02	1,6720
784	D14n	5,8	0,117	X	0,0162	1,6193	5,8	0,113	X	0,02	1,6163
785	E01a	331,3	0,966	331,3	0,9250	92,4978	331,3	0,966	331,3	0,92	92,3229
786	E01b	41,4	0,88	41,4	0,1156	11,5587	42,6	0,879	42,6	0,12	11,8713
787	E01c	7,6	0,31	X	0,0212	2,1219	7,5	0,28	X	0,02	2,0900
788	E01d	6,8	0,221	X	0,0190	1,8985	6,9	0,224	X	0,02	1,9228
789	E01e	9,9	0,495	X	0,0276	2,7640	10,1	0,476	X	0,03	2,8146
790	E01f	9,1	0,447	X	0,0254	2,5407	9,1	0,421	X	0,03	2,5359
791	E01g	9,7	0,486	X	0,0271	2,7082	9,6	0,448	X	0,03	2,6752
792	E01h	18,8	0,78	X	0,0525	5,2489	18,8	0,766	X	0,05	5,2390
793	E01i	9	0,437	X	0,0251	2,5128	9	0,411	X	0,03	2,5080
794	E01j	10,7	0,549	X	0,0299	2,9874	10,7	0,518	X	0,03	2,9818
795	E01k	63,5	0,905	63,5	0,1773	17,7290	63,7	0,905	63,7	0,18	17,7512
796	E01l	295,6	0,963	295,6	0,8253	82,5305	295,6	0,963	295,6	0,82	82,3744
797	E01m	6,9	0,232	X	0,0193	1,9265	16,5	0,724	X	0,05	4,5980
798	E01n	6,7	0,208	X	0,0187	1,8706	6,6	0,194	X	0,02	1,8392
799	E02a	11,8	0,605	X	0,0329	3,2945	14,9	0,693	X	0,04	4,1522
800	E02b	11,9	0,616	X	0,0332	3,3224	11,8	0,582	X	0,03	3,2883
801	E02c	7	0,243	X	0,0195	1,9544	6,9	0,224	X	0,02	1,9228
802	E02d	30,4	0,855	30,4	0,0849	8,4876	30,4	0,854	30,4	0,08	8,4715
803	E02e	101,5	0,928	101,5	0,2834	28,3384	101,5	0,927	101,5	0,28	28,2848
804	E02f	9,8	0,491	X	0,0274	2,7361	9,6	0,448	X	0,03	2,6752
805	E02g	6,2	0,147	X	0,0173	1,7310	6,2	0,154	X	0,02	1,7277
806	E02h	6,6	0,196	X	0,0184	1,8427	6,8	0,216	X	0,02	1,8949
807	E02i	18,2	0,775	X	0,0508	5,0814	18,2	0,758	X	0,05	5,0718
808	E02j	8,9	0,429	X	0,0248	2,4848	8,9	0,403	X	0,02	2,4801
809	E02k	10,5	0,531	X	0,0293	2,9316	10,3	0,491	X	0,03	2,8703
810	E02l	31,7	0,858	31,7	0,0885	8,8505	31,4	0,856	31,4	0,09	8,7502
811	E02m	16	0,73	X	0,0447	4,4671	16	0,713	X	0,04	4,4587

812	E02n	9,2	0,454	X	0,0257	2,5686	9,2	0,425	X	0,03	2,5637
813	E03a	38,4	0,87	38,4	0,1072	10,7211	38,4	0,87	38,4	0,11	10,7009
814	E03b	12,3	0,632	X	0,0343	3,4341	12,4	0,601	X	0,03	3,4555
815	E03c	7,7	0,324	X	0,0215	2,1498	14,7	0,684	X	0,04	4,0964
816	E03d	215,5	0,952	215,5	0,6017	60,1668	215,5	0,952	215,5	0,60	60,0531
817	E03e	7,9	0,351	X	0,0221	2,2057	17,2	0,737	X	0,05	4,7931
818	E03f	44,4	0,883	44,4	0,1240	12,3963	44,5	0,883	44,5	0,12	12,4007
819	E03g	7,3	0,277	X	0,0204	2,0381	7,3	0,259	X	0,02	2,0343
820	E03h	10,8	0,56	X	0,0302	3,0153	10,7	0,518	X	0,03	2,9818
821	E03i	54,2	0,896	54,2	0,1513	15,1324	54,2	0,895	54,2	0,15	15,1038
822	E03j	10,6	0,536	X	0,0296	2,9595	10,3	0,491	X	0,03	2,8703
823	E03k	64,9	0,908	64,9	0,1812	18,1198	64,9	0,907	64,9	0,18	18,0856
824	E03l	9,3	0,462	X	0,0260	2,5965	9	0,411	X	0,03	2,5080
825	E03m	7	0,243	X	0,0195	1,9544	7	0,234	X	0,02	1,9507
826	E03n	18,8	0,78	X	0,0525	5,2489	18,5	0,762	X	0,05	5,1554
827	E04a	15,3	0,718	X	0,0427	4,2717	14,8	0,688	X	0,04	4,1243
828	E04b	144,8	0,942	144,8	0,4043	40,4276	144,8	0,941	144,8	0,40	40,3512
829	E04c	40,2	0,876	40,2	0,1122	11,2237	40,2	0,874	40,2	0,11	11,2025
830	E04d	7,7	0,324	X	0,0215	2,1498	11,3	0,56	X	0,03	3,1490
831	E04e	10,3	0,518	X	0,0288	2,8757	11	0,542	X	0,03	3,0654
832	E04f	13,7	0,681	X	0,0382	3,8250	13,7	0,657	X	0,04	3,8178
833	E04g	6,8	0,221	X	0,0190	1,8985	7,1	0,238	X	0,02	1,9785
834	E04h	6,9	0,232	X	0,0193	1,9265	7,4	0,272	X	0,02	2,0621
835	E04i	8,8	0,421	X	0,0246	2,4569	8,2	0,34	X	0,02	2,2851
836	E04j	6,5	0,183	X	0,0181	1,8148	6,5	0,182	X	0,02	1,8113
837	E04k	6,8	0,221	X	0,0190	1,8985	7,1	0,238	X	0,02	1,9785
838	E04l	8,2	0,372	X	0,0229	2,2894	8,2	0,34	X	0,02	2,2851
839	E04m	5,7	0,107	X	0,0159	1,5914	5,7	0,103	X	0,02	1,5884
840	E04n	6,1	0,141	X	0,0170	1,7031	6,2	0,154	X	0,02	1,7277
841	E05a	16,6	0,742	X	0,0463	4,6347	16,4	0,722	X	0,05	4,5702
842	E05b	59,5	0,902	59,5	0,1661	16,6122	60,5	0,902	60,5	0,17	16,8594
843	E05c	72,9	0,916	72,9	0,2035	20,3534	72,9	0,915	72,9	0,20	20,3149
844	E05d	7,8	0,337	X	0,0218	2,1777	7,9	0,318	X	0,02	2,2015
845	E05e	21,4	0,805	21,4	0,0597	5,9748	21,5	0,791	X	0,06	5,9914
846	E05f	7,4	0,286	X	0,0207	2,0661	7,2	0,247	X	0,02	2,0064
847	E05g	7,7	0,324	X	0,0215	2,1498	7,7	0,301	X	0,02	2,1457
848	E05h	53,1	0,895	53,1	0,1483	14,8253	53,1	0,893	53,1	0,15	14,7973

849	E05i	5,8	0,117	X	0,0162	1,6193	5,8	0,113	X	0,02	1,6163
850	E05j	26,7	0,845	26,7	0,0745	7,4545	26,7	0,841	26,7	0,07	7,4404
851	E05k	6,6	0,196	X	0,0184	1,8427	7,1	0,238	X	0,02	1,9785
852	E05l	13,9	0,685	X	0,0388	3,8808	14	0,664	X	0,04	3,9014
853	E05m	6,4	0,173	X	0,0179	1,7869	6,4	0,172	X	0,02	1,7835
854	E05n	7,4	0,286	X	0,0207	2,0661	7,4	0,272	X	0,02	2,0621
855	E06a	13,5	0,678	X	0,0377	3,7692	13,5	0,653	X	0,04	3,7620
856	E06b	12,4	0,632	X	0,0346	3,4620	12,7	0,613	X	0,04	3,5391
857	E06c	7,7	0,324	X	0,0215	2,1498	7,8	0,309	X	0,02	2,1736
858	E06d	7,6	0,31	X	0,0212	2,1219	7,6	0,286	X	0,02	2,1179
859	E06e	45,4	0,886	45,4	0,1268	12,6755	45,3	0,885	45,3	0,13	12,6237
860	E06f	7,8	0,337	X	0,0218	2,1777	11,6	0,572	X	0,03	3,2326
861	E06g	7,8	0,337	X	0,0218	2,1777	11,2	0,554	X	0,03	3,1211
862	E06h	7,3	0,277	X	0,0204	2,0381	7,7	0,301	X	0,02	2,1457
863	E06i	4,1	0,016	X	0,0114	1,1447	4,1	0,018	X	0,01	1,1425
864	E06j	6,6	0,196	X	0,0184	1,8427	5,7	0,103	X	0,02	1,5884
865	E06k	5	0,053	X	0,0140	1,3960	5	0,053	X	0,01	1,3933
866	E06l	6,8	0,221	X	0,0190	1,8985	6,3	0,162	X	0,02	1,7556
867	E06m	4,4	0,021	X	0,0123	1,2285	4,4	0,024	X	0,01	1,2261
868	E06n	6,5	0,183	X	0,0181	1,8148	6,5	0,182	X	0,02	1,8113
869	E07a	8,4	0,384	X	0,0235	2,3453	8,5	0,362	X	0,02	2,3687
870	E07b	8,2	0,372	X	0,0229	2,2894	18,5	0,762	X	0,05	5,1554
871	E07c	9,5	0,474	X	0,0265	2,6524	9,6	0,448	X	0,03	2,6752
872	E07d	11,3	0,581	X	0,0315	3,1549	11,4	0,563	X	0,03	3,1768
873	E07e	40,9	0,879	40,9	0,1142	11,4191	41,5	0,877	41,5	0,12	11,5647
874	E07f	41,8	0,881	41,8	0,1167	11,6704	43	0,881	43	0,12	11,9827
875	E07g	225,6	0,956	225,6	0,6299	62,9867	225,6	0,956	225,6	0,63	62,8676
876	E07h	6,2	0,147	X	0,0173	1,7310	14,6	0,678	X	0,04	4,0686
877	E07i	6,3	0,157	X	0,0176	1,7589	6,9	0,224	X	0,02	1,9228
878	E07j	5,6	0,102	X	0,0156	1,5635	5,2	0,062	X	0,01	1,4491
879	E07k	6,1	0,141	X	0,0170	1,7031	6,1	0,143	X	0,02	1,6999
880	E07l	33,2	0,86	33,2	0,0927	9,2693	33,2	0,859	33,2	0,09	9,2518
881	E07m	7,8	0,337	X	0,0218	2,1777	7,6	0,286	X	0,02	2,1179
882	E07n	8,7	0,41	X	0,0243	2,4290	8,4	0,356	X	0,02	2,3408
883	E08a	25	0,834	25	0,0698	6,9799	23,7	0,815	23,7	0,07	6,6044
884	E08b	474,8	0,972	474,8	1,3256	132,5625	474,8	0,972	474,8	1,32	132,3118
885	E08c	10,9	0,565	X	0,0304	3,0432	26,6	0,839	26,6	0,07	7,4126

886	E08d	11,4	0,588	X	0,0318	3,1828	22,5	0,805	22,5	0,06	6,2700
887	E08e	511,1	0,976	511,1	1,4270	142,6973	511,1	0,976	511,1	1,42	142,4274
888	E08f	189,3	0,947	189,3	0,5285	52,8519	194,5	0,949	194,5	0,54	54,2010
889	E08g	7,7	0,324	X	0,0215	2,1498	21,7	0,793	X	0,06	6,0471
890	E08h	45,6	0,886	45,6	0,1273	12,7314	45,6	0,886	45,6	0,13	12,7073
891	E08i	10,2	0,512	X	0,0285	2,8478	10,2	0,486	X	0,03	2,8424
892	E08j	6,4	0,173	X	0,0179	1,7869	6,3	0,162	X	0,02	1,7556
893	E08k	9,3	0,462	X	0,0260	2,5965	9,3	0,431	X	0,03	2,5916
894	E08l	13,4	0,674	X	0,0374	3,7412	14,2	0,67	X	0,04	3,9571
895	E08m	8	0,354	X	0,0223	2,2336	7,3	0,259	X	0,02	2,0343
896	E08n	8	0,354	X	0,0223	2,2336	8,1	0,332	X	0,02	2,2572
897	E09a	33,6	0,862	33,6	0,0938	9,3810	32,7	0,858	32,7	0,09	9,1125
898	E09b	54,9	0,897	54,9	0,1533	15,3279	53,2	0,894	53,2	0,15	14,8252
899	E09c	11,6	0,599	X	0,0324	3,2387	14,1	0,667	X	0,04	3,9292
900	E09d	26,4	0,844	26,4	0,0737	7,3708	26,4	0,837	26,4	0,07	7,3568
901	E09e	8,6	0,397	X	0,0240	2,4011	27,6	0,844	27,6	0,08	7,6912
902	E09f	7,2	0,266	X	0,0201	2,0102	20,2	0,778	X	0,06	5,6291
903	E09g	10,8	0,56	X	0,0302	3,0153	11,1	0,549	X	0,03	3,0932
904	E09h	8,7	0,41	X	0,0243	2,4290	8,2	0,34	X	0,02	2,2851
905	E09i	18,2	0,775	X	0,0508	5,0814	18,2	0,758	X	0,05	5,0718
906	E09j	10,2	0,512	X	0,0285	2,8478	11,2	0,554	X	0,03	3,1211
907	E09k	11,3	0,581	X	0,0315	3,1549	10,5	0,503	X	0,03	2,9260
908	E09l	69,1	0,913	69,1	0,1929	19,2925	69,1	0,912	69,1	0,19	19,2560
909	E09m	9,3	0,462	X	0,0260	2,5965	10,1	0,476	X	0,03	2,8146
910	E09n	11,5	0,591	X	0,0321	3,2108	12,7	0,613	X	0,04	3,5391
911	E10a	16,4	0,74	X	0,0458	4,5788	17,3	0,74	X	0,05	4,8210
912	E10b	10,8	0,56	X	0,0302	3,0153	10,6	0,511	X	0,03	2,9539
913	E10c	8,9	0,429	X	0,0248	2,4848	8,7	0,385	X	0,02	2,4244
914	E10d	73,6	0,918	73,6	0,2055	20,5489	73,6	0,917	73,6	0,21	20,5100
915	E10e	8,5	0,389	X	0,0237	2,3732	8,4	0,356	X	0,02	2,3408
916	E10f	7,4	0,286	X	0,0207	2,0661	7,6	0,286	X	0,02	2,1179
917	E10g	7,6	0,31	X	0,0212	2,1219	7,8	0,309	X	0,02	2,1736
918	E10h	6,9	0,232	X	0,0193	1,9265	6,4	0,172	X	0,02	1,7835
919	E10i	10,7	0,549	X	0,0299	2,9874	11	0,542	X	0,03	3,0654
920	E10j	5	0,053	X	0,0140	1,3960	5,9	0,126	X	0,02	1,6441
921	E10k	6,1	0,141	X	0,0170	1,7031	6,6	0,194	X	0,02	1,8392
922	E10l	11,8	0,605	X	0,0329	3,2945	11,6	0,572	X	0,03	3,2326

923	E10m	9,6	0,478	X	0,0268	2,6803	9,7	0,459	X	0,03	2,7031
924	E10n	131,6	0,94	131,6	0,3674	36,7423	149,3	0,944	149,3	0,42	41,6052
925	E11a	21	0,802	21	0,0586	5,8631	21	0,785	X	0,06	5,8520
926	E11b	16,9	0,747	X	0,0472	4,7184	16,9	0,731	X	0,05	4,7095
927	E11c	8,2	0,372	X	0,0229	2,2894	8,1	0,332	X	0,02	2,2572
928	E11d	15,6	0,726	X	0,0436	4,3555	15,4	0,702	X	0,04	4,2915
929	E11e	17,2	0,756	X	0,0480	4,8022	17,2	0,737	X	0,05	4,7931
930	E11f	8	0,354	X	0,0223	2,2336	7,8	0,309	X	0,02	2,1736
931	E11g	7,5	0,296	X	0,0209	2,0940	7,1	0,238	X	0,02	1,9785
932	E11h	6,1	0,141	X	0,0170	1,7031	6,1	0,143	X	0,02	1,6999
933	E11i	7,8	0,337	X	0,0218	2,1777	7,9	0,318	X	0,02	2,2015
934	E11j	6,4	0,173	X	0,0179	1,7869	6,4	0,172	X	0,02	1,7835
935	E11k	5,8	0,117	X	0,0162	1,6193	5,8	0,113	X	0,02	1,6163
936	E11l	13,8	0,682	X	0,0385	3,8529	11,9	0,589	X	0,03	3,3162
937	E11m	249,8	0,959	249,8	0,6974	69,7433	232,3	0,957	232,3	0,65	64,7347
938	E11n	1331,3	0,985	1331,3	3,7169	371,6942	1331,3	0,985	1331,3	3,71	370,9913
939	E12a	6,2	0,147	X	0,0173	1,7310	6,1	0,143	X	0,02	1,6999
940	E12b	6,5	0,183	X	0,0181	1,8148	6,3	0,162	X	0,02	1,7556
941	E12c	6,6	0,196	X	0,0184	1,8427	6,7	0,202	X	0,02	1,8671
942	E12d	13,5	0,678	X	0,0377	3,7692	12,2	0,597	X	0,03	3,3998
943	E12e	121,8	0,936	121,8	0,3401	34,0061	121,8	0,935	121,8	0,34	33,9418
944	E12f	12,4	0,632	X	0,0346	3,4620	13,1	0,636	X	0,04	3,6506
945	E12g	5,1	0,059	X	0,0142	1,4239	5,5	0,087	X	0,02	1,5327
946	E12h	8,3	0,378	X	0,0232	2,3173	8,8	0,395	X	0,02	2,4523
947	E12i	7,7	0,324	X	0,0215	2,1498	8,2	0,34	X	0,02	2,2851
948	E12j	9,5	0,474	X	0,0265	2,6524	9,8	0,464	X	0,03	2,7310
949	E12k	5,5	0,092	X	0,0154	1,5356	5,9	0,126	X	0,02	1,6441
950	E12l	11,5	0,591	X	0,0321	3,2108	9,5	0,442	X	0,03	2,6474
951	E12m	11,3	0,581	X	0,0315	3,1549	9,4	0,437	X	0,03	2,6195
952	E12n	3873,1	0,996	3873,1	10,8136	1081,3557	4294,4	0,996	4294,4	11,97	1196,7138
953	E13a	5,1	0,059	X	0,0142	1,4239	5,7	0,103	X	0,02	1,5884
954	E13b	7,6	0,31	X	0,0212	2,1219	7,4	0,272	X	0,02	2,0621
955	E13c	9,2	0,454	X	0,0257	2,5686	9,2	0,425	X	0,03	2,5637
956	E13d	16,1	0,733	X	0,0450	4,4951	15,7	0,708	X	0,04	4,3751
957	E13e	10,8	0,56	X	0,0302	3,0153	10,1	0,476	X	0,03	2,8146
958	E13f	17,2	0,756	X	0,0480	4,8022	16,9	0,731	X	0,05	4,7095
959	E13g	26	0,843	26	0,0726	7,2591	25,9	0,832	25,9	0,07	7,2175

960	E13h	7,9	0,351	X	0,0221	2,2057	24,5	0,821	24,5	0,07	6,8274
961	E13i	97,2	0,926	97,2	0,2714	27,1379	105,2	0,928	105,2	0,29	29,3159
962	E13j	5,7	0,107	X	0,0159	1,5914	5,6	0,094	X	0,02	1,5605
963	E13k	5,6	0,102	X	0,0156	1,5635	5,9	0,126	X	0,02	1,6441
964	E13l	10	0,499	X	0,0279	2,7920	8,3	0,349	X	0,02	2,3129
965	E13m	10,2	0,512	X	0,0285	2,8478	7,2	0,247	X	0,02	2,0064
966	E13n	900,3	0,983	900,3	2,5136	251,3606	821,6	0,982	821,6	2,29	228,9540
967	E14a	16,6	0,742	X	0,0463	4,6347	16,6	0,725	X	0,05	4,6259
968	E14b	8,7	0,41	X	0,0243	2,4290	8,7	0,385	X	0,02	2,4244
969	E14c	5,8	0,117	X	0,0162	1,6193	5,8	0,113	X	0,02	1,6163
970	E14d	7,5	0,296	X	0,0209	2,0940	7,8	0,309	X	0,02	2,1736
971	E14e	8,7	0,41	X	0,0243	2,4290	8,7	0,385	X	0,02	2,4244
972	E14f	6,6	0,196	X	0,0184	1,8427	6,6	0,194	X	0,02	1,8392
973	E14g	11,2	0,578	X	0,0313	3,1270	10,5	0,503	X	0,03	2,9260
974	E14h	11,8	0,605	X	0,0329	3,2945	25,9	0,832	25,9	0,07	7,2175
975	E14i	2603,2	0,992	2603,2	7,2680	726,8042	2603,2	0,992	2603,2	7,25	725,4297
976	E14j	10,8	0,56	X	0,0302	3,0153	10,1	0,476	X	0,03	2,8146
977	E14k	10,3	0,518	X	0,0288	2,8757	10,7	0,518	X	0,03	2,9818
978	E14l	11,5	0,591	X	0,0321	3,2108	10,9	0,535	X	0,03	3,0375
979	E14m	24,3	0,827	24,3	0,0678	6,7845	21,3	0,789	X	0,06	5,9356
980	E14n	24,3	0,827	24,3	0,0678	6,7845	10,9	0,535	X	0,03	3,0375
981	F01a	12,2	0,627	X	0,0341	3,4062	11,8	0,582	X	0,03	3,2883
982	F01b	20,4	0,795	X	0,0570	5,6956	20,5	0,782	X	0,06	5,7127
983	F01c	17	0,75	X	0,0475	4,7463	17	0,734	X	0,05	4,7374
984	F01d	7,6	0,31	X	0,0212	2,1219	7,6	0,286	X	0,02	2,1179
985	F01e	9,1	0,447	X	0,0254	2,5407	9,1	0,421	X	0,03	2,5359
986	F01f	18	0,77	X	0,0503	5,0255	18	0,755	X	0,05	5,0160
987	F01g	36,9	0,868	36,9	0,1030	10,3023	34,4	0,864	34,4	0,10	9,5862
988	F01h	16,5	0,741	X	0,0461	4,6067	15,9	0,711	X	0,04	4,4308
989	F01i	9,8	0,491	X	0,0274	2,7361	9,8	0,464	X	0,03	2,7310
990	F01j	10,5	0,531	X	0,0293	2,9316	10,5	0,503	X	0,03	2,9260
991	F01k	7	0,243	X	0,0195	1,9544	22,1	0,798	X	0,06	6,1586
992	F01l	335	0,967	335	0,9353	93,5308	335	0,967	335	0,93	93,3539
993	F01m	7	0,243	X	0,0195	1,9544	16,2	0,717	X	0,05	4,5144
994	F01n	6,9	0,232	X	0,0193	1,9265	7,3	0,259	X	0,02	2,0343
995	F02a	94,4	0,925	94,4	0,2636	26,3561	93,6	0,925	93,6	0,26	26,0834
996	F02b	205,2	0,951	205,2	0,5729	57,2911	205,2	0,951	205,2	0,57	57,1828

997	F02c	6	0,131	X	0,0168	1,6752	9,5	0,442	X	0,03	2,6474
998	F02d	5,9	0,125	X	0,0165	1,6473	6,4	0,172	X	0,02	1,7835
999	F02e	8,5	0,389	X	0,0237	2,3732	8,3	0,349	X	0,02	2,3129
1000	F02f	9,6	0,478	X	0,0268	2,6803	9,6	0,448	X	0,03	2,6752
1001	F02g	65	0,908	65	0,1815	18,1478	66,3	0,909	66,3	0,18	18,4757
1002	F02h	483,3	0,974	483,3	1,3494	134,9356	483,3	0,974	483,3	1,35	134,6805
1003	F02i	22,7	0,817	22,7	0,0634	6,3378	22,5	0,805	22,5	0,06	6,2700
1004	F02j	17,4	0,762	X	0,0486	4,8580	17,4	0,742	X	0,05	4,8488
1005	F02k	7,1	0,256	X	0,0198	1,9823	24,8	0,824	24,8	0,07	6,9110
1006	F02l	373,4	0,968	373,4	1,0425	104,2519	373,4	0,968	373,4	1,04	104,0548
1007	F02m	8	0,354	X	0,0223	2,2336	16,8	0,728	X	0,05	4,6816
1008	F02n	6,7	0,208	X	0,0187	1,8706	7,5	0,28	X	0,02	2,0900
1009	F03a	5,5	0,092	X	0,0154	1,5356	10,6	0,511	X	0,03	2,9539
1010	F03b	71,3	0,914	71,3	0,1991	19,9067	71	0,913	71	0,20	19,7855
1011	F03c	6,6	0,196	X	0,0184	1,8427	11,1	0,549	X	0,03	3,0932
1012	F03d	6,9	0,232	X	0,0193	1,9265	7,3	0,259	X	0,02	2,0343
1013	F03e	82	0,922	82	0,2289	22,8941	82	0,922	82	0,23	22,8508
1014	F03f	12,2	0,627	X	0,0341	3,4062	12,3	0,6	X	0,03	3,4276
1015	F03g	12,2	0,627	X	0,0341	3,4062	17,7	0,748	X	0,05	4,9324
1016	F03h	127,1	0,938	127,1	0,3549	35,4859	129,1	0,938	129,1	0,36	35,9761
1017	F03i	21,9	0,81	21,9	0,0611	6,1144	22,4	0,802	22,4	0,06	6,2422
1018	F03j	241,5	0,958	241,5	0,6743	67,4259	241,5	0,958	241,5	0,67	67,2984
1019	F03k	6,5	0,183	X	0,0181	1,8148	19,2	0,771	X	0,05	5,3504
1020	F03l	134,5	0,94	134,5	0,3755	37,5519	135,4	0,939	135,4	0,38	37,7317
1021	F03m	7,5	0,296	X	0,0209	2,0940	12,5	0,606	X	0,03	3,4834
1022	F03n	6,7	0,208	X	0,0187	1,8706	6,9	0,224	X	0,02	1,9228
1023	F04a	5,4	0,082	X	0,0151	1,5077	10,6	0,511	X	0,03	2,9539
1024	F04b	787,8	0,981	787,8	2,1995	219,9510	792,6	0,981	792,6	2,21	220,8726
1025	F04c	7,7	0,324	X	0,0215	2,1498	7,7	0,301	X	0,02	2,1457
1026	F04d	7,8	0,337	X	0,0218	2,1777	7,8	0,309	X	0,02	2,1736
1027	F04e	8,8	0,421	X	0,0246	2,4569	9	0,411	X	0,03	2,5080
1028	F04f	11,3	0,581	X	0,0315	3,1549	11,4	0,563	X	0,03	3,1768
1029	F04g	12	0,619	X	0,0335	3,3504	26,6	0,839	26,6	0,07	7,4126
1030	F04h	12	0,619	X	0,0335	3,3504	12,1	0,595	X	0,03	3,3719
1031	F04i	13,1	0,665	X	0,0366	3,6575	13,1	0,636	X	0,04	3,6506
1032	F04j	12	0,619	X	0,0335	3,3504	12,4	0,601	X	0,03	3,4555
1033	F04k	17,5	0,763	X	0,0489	4,8859	18,2	0,758	X	0,05	5,0718

1034	F04l	188,4	0,946	188,4	0,5260	52,6006	172,8	0,945	172,8	0,48	48,1539
1035	F04m	10,1	0,507	X	0,0282	2,8199	9,9	0,469	X	0,03	2,7588
1036	F04n	11,1	0,576	X	0,0310	3,0991	11	0,542	X	0,03	3,0654
1037	F05a	64,8	0,907	64,8	0,1809	18,0919	63	0,904	63	0,18	17,5561
1038	F05b	587,5	0,978	587,5	1,6403	164,0279	587,5	0,978	587,5	1,64	163,7177
1039	F05c	5,4	0,082	X	0,0151	1,5077	5,5	0,087	X	0,02	1,5327
1040	F05d	5,5	0,092	X	0,0154	1,5356	5,5	0,087	X	0,02	1,5327
1041	F05e	8,6	0,397	X	0,0240	2,4011	8,6	0,375	X	0,02	2,3965
1042	F05f	6,3	0,157	X	0,0176	1,7589	12,2	0,597	X	0,03	3,3998
1043	F05g	447,2	0,972	447,2	1,2486	124,8566	442,5	0,972	442,5	1,23	123,3108
1044	F05h	7,8	0,337	X	0,0218	2,1777	6	0,135	X	0,02	1,6720
1045	F05i	7,8	0,337	X	0,0218	2,1777	7,6	0,286	X	0,02	2,1179
1046	F05j	8,5	0,389	X	0,0237	2,3732	8,5	0,362	X	0,02	2,3687
1047	F05k	57,2	0,9	57,2	0,1597	15,9700	57,2	0,898	57,2	0,16	15,9398
1048	F05l	60,4	0,903	60,4	0,1686	16,8635	60,8	0,902	60,8	0,17	16,9430
1049	F05m	11,8	0,605	X	0,0329	3,2945	11,9	0,589	X	0,03	3,3162
1050	F05n	65,1	0,909	65,1	0,1818	18,1757	65,1	0,908	65,1	0,18	18,1413
1051	F06a	5,5	0,092	X	0,0154	1,5356	8,2	0,34	X	0,02	2,2851
1052	F06b	9,2	0,454	X	0,0257	2,5686	8,5	0,362	X	0,02	2,3687
1053	F06c	86,4	0,924	86,4	0,2412	24,1226	86,4	0,924	86,4	0,24	24,0770
1054	F06d	9,2	0,454	X	0,0257	2,5686	8,9	0,403	X	0,02	2,4801
1055	F06e	14,6	0,701	X	0,0408	4,0763	14,6	0,678	X	0,04	4,0686
1056	F06f	7	0,243	X	0,0195	1,9544	9,6	0,448	X	0,03	2,6752
1057	F06g	3269	0,995	3269	9,1269	912,6931	3269	0,995	3269	9,11	910,9672
1058	F06h	7,8	0,337	X	0,0218	2,1777	10,7	0,518	X	0,03	2,9818
1059	F06i	12	0,619	X	0,0335	3,3504	11,6	0,572	X	0,03	3,2326
1060	F06j	7,1	0,256	X	0,0198	1,9823	7,2	0,247	X	0,02	2,0064
1061	F06k	7,4	0,286	X	0,0207	2,0661	13,5	0,653	X	0,04	3,7620
1062	F06l	6,7	0,208	X	0,0187	1,8706	10,9	0,535	X	0,03	3,0375
1063	F06m	7,1	0,256	X	0,0198	1,9823	7,9	0,318	X	0,02	2,2015
1064	F06n	6,8	0,221	X	0,0190	1,8985	6,7	0,202	X	0,02	1,8671
1065	F07a	674,5	0,98	674,5	1,8832	188,3180	674,5	0,98	674,5	1,88	187,9619
1066	F07b	285,6	0,962	285,6	0,7974	79,7385	285,2	0,962	285,2	0,79	79,4762
1067	F07c	8,3	0,378	X	0,0232	2,3173	10,7	0,518	X	0,03	2,9818
1068	F07d	20,8	0,799	X	0,0581	5,8073	20,8	0,783	X	0,06	5,7963
1069	F07e	147,8	0,944	147,8	0,4127	41,2652	147,8	0,943	147,8	0,41	41,1872
1070	F07f	7,4	0,286	X	0,0207	2,0661	8,3	0,349	X	0,02	2,3129

1071	F07g	202,8	0,95	202,8	0,5662	56,6210	202,8	0,95	202,8	0,57	56,5140
1072	F07h	11,8	0,605	X	0,0329	3,2945	9	0,411	X	0,03	2,5080
1073	F07i	21	0,802	21	0,0586	5,8631	21	0,785	X	0,06	5,8520
1074	F07j	12,6	0,64	X	0,0352	3,5179	12,4	0,601	X	0,03	3,4555
1075	F07k	60,2	0,902	60,2	0,1681	16,8076	60,2	0,901	60,2	0,17	16,7758
1076	F07l	45,9	0,887	45,9	0,1282	12,8151	45,7	0,886	45,7	0,13	12,7351
1077	F07m	6	0,131	X	0,0168	1,6752	6	0,135	X	0,02	1,6720
1078	F07n	4,7	0,04	X	0,0131	1,3122	5,7	0,103	X	0,02	1,5884
1079	F08a	424,2	0,971	424,2	1,1844	118,4351	424,2	0,971	424,2	1,18	118,2112
1080	F08b	218	0,953	218	0,6086	60,8648	218	0,953	218	0,61	60,7497
1081	F08c	7,6	0,31	X	0,0212	2,1219	10,9	0,535	X	0,03	3,0375
1082	F08d	8,8	0,421	X	0,0246	2,4569	8,7	0,385	X	0,02	2,4244
1083	F08e	11,8	0,605	X	0,0329	3,2945	11,7	0,577	X	0,03	3,2604
1084	F08f	5,4	0,082	X	0,0151	1,5077	11,6	0,572	X	0,03	3,2326
1085	F08g	12,7	0,643	X	0,0355	3,5458	26,3	0,835	26,3	0,07	7,3290
1086	F08h	483,2	0,973	483,2	1,3491	134,9077	483,2	0,973	483,2	1,35	134,6526
1087	F08i	33,7	0,864	33,7	0,0941	9,4089	33,4	0,86	33,4	0,09	9,3075
1088	F08j	9,8	0,491	X	0,0274	2,7361	9,7	0,459	X	0,03	2,7031
1089	F08k	20	0,79	X	0,0558	5,5839	21,2	0,789	X	0,06	5,9078
1090	F08l	203,7	0,951	203,7	0,5687	56,8723	203,7	0,951	203,7	0,57	56,7648
1091	F08m	11,5	0,591	X	0,0321	3,2108	11,1	0,549	X	0,03	3,0932
1092	F08n	9	0,437	X	0,0251	2,5128	9	0,411	X	0,03	2,5080
1093	F09a	8,3	0,378	X	0,0232	2,3173	8,4	0,356	X	0,02	2,3408
1094	F09b	17,2	0,756	X	0,0480	4,8022	22,2	0,8	22,2	0,06	6,1864
1095	F09c	11,3	0,581	X	0,0315	3,1549	10,7	0,518	X	0,03	2,9818
1096	F09d	8,6	0,397	X	0,0240	2,4011	8,6	0,375	X	0,02	2,3965
1097	F09e	11,7	0,602	X	0,0327	3,2666	10,7	0,518	X	0,03	2,9818
1098	F09f	5,4	0,082	X	0,0151	1,5077	12,7	0,613	X	0,04	3,5391
1099	F09g	12,9	0,654	X	0,0360	3,6016	12,8	0,623	X	0,04	3,5670
1100	F09h	20,8	0,799	X	0,0581	5,8073	8,8	0,395	X	0,02	2,4523
1101	F09i	20,3	0,794	X	0,0567	5,6677	8,3	0,349	X	0,02	2,3129
1102	F09j	8,3	0,378	X	0,0232	2,3173	8,3	0,349	X	0,02	2,3129
1103	F09k	8	0,354	X	0,0223	2,2336	8,1	0,332	X	0,02	2,2572
1104	F09l	13,9	0,685	X	0,0388	3,8808	14	0,664	X	0,04	3,9014
1105	F09m	9,4	0,468	X	0,0262	2,6244	9	0,411	X	0,03	2,5080
1106	F09n	10,7	0,549	X	0,0299	2,9874	10,4	0,497	X	0,03	2,8982
1107	F10a	8,2	0,372	X	0,0229	2,2894	8,4	0,356	X	0,02	2,3408

1108	F10b	8,6	0,397	X	0,0240	2,4011	8,5	0,362	X	0,02	2,3687
1109	F10c	10,5	0,531	X	0,0293	2,9316	10,2	0,486	X	0,03	2,8424
1110	F10d	105,3	0,929	105,3	0,2940	29,3994	106,6	0,929	106,6	0,30	29,7061
1111	F10e	1908,9	0,99	1908,9	5,3296	532,9581	1908,9	0,99	1908,9	5,32	531,9502
1112	F10f	12,8	0,649	X	0,0357	3,5737	17,2	0,737	X	0,05	4,7931
1113	F10g	34	0,864	34	0,0949	9,4927	33,9	0,863	33,9	0,09	9,4469
1114	F10h	19,7	0,788	X	0,0550	5,5002	19,7	0,773	X	0,05	5,4898
1115	F10i	284,3	0,961	284,3	0,7938	79,3755	284,3	0,961	284,3	0,79	79,2254
1116	F10j	21,1	0,804	21,1	0,0589	5,8910	20	0,775	X	0,06	5,5734
1117	F10k	6,4	0,173	X	0,0179	1,7869	6,3	0,162	X	0,02	1,7556
1118	F10l	6,3	0,157	X	0,0176	1,7589	6,6	0,194	X	0,02	1,8392
1119	F10m	7,5	0,296	X	0,0209	2,0940	7,6	0,286	X	0,02	2,1179
1120	F10n	14,1	0,691	X	0,0394	3,9367	13,9	0,661	X	0,04	3,8735
1121	F11a	7,6	0,31	X	0,0212	2,1219	7,8	0,309	X	0,02	2,1736
1122	F11b	7,2	0,266	X	0,0201	2,0102	7,2	0,247	X	0,02	2,0064
1123	F11c	7,6	0,31	X	0,0212	2,1219	7,6	0,286	X	0,02	2,1179
1124	F11d	8,1	0,364	X	0,0226	2,2615	7,2	0,247	X	0,02	2,0064
1125	F11e	14,2	0,692	X	0,0396	3,9646	16,3	0,719	X	0,05	4,5423
1126	F11f	17,3	0,758	X	0,0483	4,8301	17,7	0,748	X	0,05	4,9324
1127	F11g	16,8	0,745	X	0,0469	4,6905	17,2	0,737	X	0,05	4,7931
1128	F11h	106,5	0,93	106,5	0,2973	29,7344	106,5	0,929	106,5	0,30	29,6782
1129	F11i	22,8	0,819	22,8	0,0637	6,3657	22,5	0,805	22,5	0,06	6,2700
1130	F11j	18,4	0,778	X	0,0514	5,1372	19,1	0,769	X	0,05	5,3226
1131	F11k	11,1	0,576	X	0,0310	3,0991	10,7	0,518	X	0,03	2,9818
1132	F11l	9,5	0,474	X	0,0265	2,6524	10,7	0,518	X	0,03	2,9818
1133	F11m	12,8	0,649	X	0,0357	3,5737	13,2	0,64	X	0,04	3,6784
1134	F11n	190,8	0,948	190,8	0,5327	53,2707	190,8	0,947	190,8	0,53	53,1699
1135	F12a	10,5	0,531	X	0,0293	2,9316	10,6	0,511	X	0,03	2,9539
1136	F12b	25,6	0,837	25,6	0,0715	7,1474	27,2	0,842	27,2	0,08	7,5798
1137	F12c	7,1	0,256	X	0,0198	1,9823	7,3	0,259	X	0,02	2,0343
1138	F12d	17	0,75	X	0,0475	4,7463	14,8	0,688	X	0,04	4,1243
1139	F12e	130,1	0,939	130,1	0,3632	36,3235	138,5	0,94	138,5	0,39	38,5956
1140	F12f	16,8	0,745	X	0,0469	4,6905	17,7	0,748	X	0,05	4,9324
1141	F12g	17	0,75	X	0,0475	4,7463	17	0,734	X	0,05	4,7374
1142	F12h	17	0,75	X	0,0475	4,7463	17,1	0,735	X	0,05	4,7652
1143	F12i	6,4	0,173	X	0,0179	1,7869	16,8	0,728	X	0,05	4,6816
1144	F12j	17,5	0,763	X	0,0489	4,8859	21,3	0,789	X	0,06	5,9356

1145	F12k	104,2	0,929	104,2	0,2909	29,0923	123,1	0,936	123,1	0,34	34,3041
1146	F12l	6,3	0,157	X	0,0176	1,7589	15,6	0,707	X	0,04	4,3472
1147	F12m	8,9	0,429	X	0,0248	2,4848	10,5	0,503	X	0,03	2,9260
1148	F12n	16	0,73	X	0,0447	4,4671	16,2	0,717	X	0,05	4,5144
1149	F13a	18,9	0,782	X	0,0528	5,2768	17,9	0,754	X	0,05	4,9882
1150	F13b	320,9	0,964	320,9	0,8959	89,5941	320,9	0,964	320,9	0,89	89,4247
1151	F13c	14,4	0,697	X	0,0402	4,0204	14	0,664	X	0,04	3,9014
1152	F13d	14,9	0,713	X	0,0416	4,1600	14,8	0,688	X	0,04	4,1243
1153	F13e	14,8	0,709	X	0,0413	4,1321	15,2	0,7	X	0,04	4,2358
1154	F13f	7854,5	1	7854,5	21,9295	2192,9484	7854,5	1	7854,5	21,89	2188,8014
1155	F13g	24,9	0,832	24,9	0,0695	6,9520	24	0,817	24	0,07	6,6880
1156	F13h	24,5	0,83	24,5	0,0684	6,8403	24,9	0,825	24,9	0,07	6,9388
1157	F13i	10,7	0,549	X	0,0299	2,9874	24,7	0,822	24,7	0,07	6,8831
1158	F13j	6701,8	0,998	6701,8	18,7112	1871,1187	6701,8	0,998	6701,8	18,68	1867,5803
1159	F13k	639,3	0,978	639,3	1,7849	178,4903	622,2	0,978	622,2	1,73	173,3875
1160	F13l	9,2	0,454	X	0,0257	2,5686	36,2	0,867	36,2	0,10	10,0878
1161	F13m	24,2	0,827	24,2	0,0676	6,7566	24,2	0,819	24,2	0,07	6,7438
1162	F13n	11,5	0,591	X	0,0321	3,2108	11,5	0,567	X	0,03	3,2047
1163	F14a	10,6	0,536	X	0,0296	2,9595	9,5	0,442	X	0,03	2,6474
1164	F14b	64,5	0,906	64,5	0,1801	18,0082	64,5	0,906	64,5	0,18	17,9741
1165	F14c	7,9	0,351	X	0,0221	2,2057	7,8	0,309	X	0,02	2,1736
1166	F14d	12,7	0,643	X	0,0355	3,5458	12,6	0,61	X	0,04	3,5112
1167	F14e	15,3	0,718	X	0,0427	4,2717	12,6	0,61	X	0,04	3,5112
1168	F14f	18,2	0,775	X	0,0508	5,0814	14,8	0,688	X	0,04	4,1243
1169	F14g	100,5	0,927	100,5	0,2806	28,0592	95,8	0,926	95,8	0,27	26,6964
1170	F14h	52	0,892	52	0,1452	14,5182	52	0,891	52	0,14	14,4908
1171	F14i	14,7	0,707	X	0,0410	4,1042	15,9	0,711	X	0,04	4,4308
1172	F14j	21,6	0,808	21,6	0,0603	6,0306	22,4	0,802	22,4	0,06	6,2422
1173	F14k	14,5	0,7	X	0,0405	4,0483	14,7	0,684	X	0,04	4,0964
1174	F14l	72	0,915	72	0,2010	20,1021	72	0,914	72	0,20	20,0641
1175	F14m	10,1	0,507	X	0,0282	2,8199	9,7	0,459	X	0,03	2,7031
1176	F14n	12,1	0,625	X	0,0338	3,3783	13,1	0,636	X	0,04	3,6506
1184	G09	5,4	0,082	X	0,0151	1,5077	5,4	0,078	X	0,02	1,5048
1186	G11	847,5	0,982	847,5	2,3662	236,6190	847,5	0,983	847,5	2,36	236,1715
1188	G13	33,6	0,862	33,6	0,0938	9,3810	33,6	0,862	33,6	0,09	9,3633
1190	G15	18,5	0,778	X	0,0517	5,1651	18,4	0,761	X	0,05	5,1275
1200	G27	5517,9	0,997	5517,9	15,4058	1540,578	5517,9	0,997	5517,9	15,38	1537,665

1202	G29	1707,6	0,989	1707,6	4,7676	476,7558	1707,6	0,989	1707,6	4,76	475,8543
1204	G31	120,6	0,935	120,6	0,3367	33,6711	120,6	0,935	120,6	0,34	33,6074
1214	G42	47,4	0,889	47,4	0,1323	13,2339	47,4	0,888	47,4	0,13	13,2089
1216	G44	2866,6	0,994	2866,6	8,0034	800,3445	2866,6	0,994	2866,6	7,99	798,8310
1218	G46	1471,8	0,988	1471,8	4,1092	410,9213	1471,8	0,988	1471,8	4,10	410,1442
1177	G02	217	0,953			0,0000	217	0,953			0,0000
1191	G18	229,8	0,957			0,0000	229,8	0,957			0,0000
1205	G34	240,4	0,958			0,0000	240,4	0,958			0,0000

N= 236
Summe= 84528,3
Q-Mean= 358,170763

N= 237
Summe= 85047,3
Q-Mean= 358,8493671

Tabelle X 4.2 Rohdaten Auswertung Direktvergleich für Intratest Abb.3-4

*100	HH1	*100	HH2
	2,88		2,87
	2,37		2,37
	1,90		1,89
	2,79		2,84
	3,41		3,40
	5,75		6,07
	61,62		61,50
	4,02		4,01
	2,51		2,51
	2,99		2,98
	3,71		3,73
	8,15		7,36
	13,88		13,85
	2,29		2,23
	2,32		2,31
	2,12		2,12
	4,69		4,68
	1,45		1,48
	2,23		2,23
	2,37		2,40
	4,33		4,54
	14,55		14,52
	3,55		3,54
	4,08		2,31
	2,68		3,43
	3,69		3,76
	18,59		18,53
	2,62		2,68
	2,48		2,45
	2,79		2,73
	2,12		2,40
	1,98		2,03
	2,40		2,40
	2,68		2,37
	3,52		3,46
	3,04		3,12
	4,47		4,46
	3,49		1,98
	2,57		2,40
	529,55		528,55
	2,37		2,62
	2,40		2,42
	1,87		1,64
	3,88		3,96
	21,86		21,82
	2,15		2,06
	2,79		2,79
	2,09		2,03

2,46	2,45
6,62	6,60
9,30	9,31
6,00	6,10
2,48	3,48
6,11	3,04
2,88	2,56
2,43	2,45
2,85	2,84
3,35	3,34
3,49	3,54
2,90	2,90
2,01	1,98
2,51	2,45
3,49	3,20
3,88	3,71
11,17	11,15
3,21	3,20
7,18	7,16
6,03	5,88
2,96	3,20
1,54	1,56
1,68	1,70
2,09	2,01
1,48	1,48
1,76	1,62
3,15	3,15
2,40	2,40
2,82	2,79
4,08	4,07
11,25	11,23
3,74	3,73
3,71	2,42
6,34	3,18
2,99	3,57
2,07	2,23
0,67	0,81
11,06	11,04
0,73	0,70
1,23	1,25
2,35	2,37
1,59	1,64
16,08	16,05
4,83	4,68
2,54	2,54
9,21	9,00
63,55	70,09
744,53	743,13
1,93	1,89
0,92	0,92

2,09	1,98
4,02	3,93
3,74	3,54
5,58	5,57
1,76	1,76
2,62	2,62
2,62	2,59
4,83	4,90
2,57	3,87
3,71	3,79
24,74	24,83
1,95	1,62
1,90	1,28
5,78	5,77
3,66	3,79
70,92	70,78
8,04	7,69
2,51	2,42
2,15	2,12
3,63	3,71
3,77	3,71
1887,00	1883,44
5,36	5,16
5,39	5,29
14,66	14,63
9,13	9,20
1,95	1,98
1,98	1,98
3,24	3,32
37,80	37,73
5,64	5,49
2,37	2,37
1,62	1,62
2,60	2,65
2,60	2,70
5,84	6,10
80,05	80,45
4,89	4,88
6,51	6,49
3,07	3,07
1,70	1,59
1,51	1,34
1,90	2,12
7,23	7,33
20,52	20,48
2,79	2,73
1,26	1,39
2,88	2,87
15,61	15,58
5,95	6,10

6,09	6,07
7,04	6,69
2,60	2,59
17,42	17,39
2,12	2,15
1,93	1,92
3,04	3,09
3,49	3,59
30,07	30,01
2,68	2,62
4,13	4,12
2,09	2,09
2,40	2,40
3,29	3,29
2,54	2,45
3,99	3,98
2,04	2,12
4,91	4,90
2,15	2,15
1,76	1,76
3,74	3,73
1,95	2,06
3,46	3,68
2,90	2,90
1,76	1,76
2,51	2,51
2,04	2,01
3,24	3,26
6,11	6,24
40,62	40,55
4,10	4,10
5,67	5,66
1,98	2,01
2,93	2,93
1,68	1,67
1,59	1,50
2,07	1,89
1,40	1,28
1,37	1,37
1,51	1,50
2,32	2,31
2,90	2,90
12,15	12,23
90,93	90,76
5,03	4,85
7,23	7,22
1,93	1,95
1,14	1,14
1,54	1,56
2,85	2,84

1,76	1,56
1,90	1,89
4,72	4,71
5,56	5,68
1,81	1,78
4,94	4,93
2,99	2,98
1,87	1,87
1,28	1,20
1,76	1,78
1,93	2,03
8,46	8,44
1,56	1,56
2,23	2,37
23,65	23,60
2,54	2,37
2,26	2,26
2,18	2,26
4,13	4,10
1,56	1,87
1,76	1,76
3,04	3,01
2,79	2,79
2,01	2,01
1,79	1,84
10,50	10,48
1,34	1,56
1,37	1,31
3,38	3,37
1,70	1,70
1,81	1,64
1,65	2,01
3,82	3,82
1,65	1,70
1,87	1,87
9,63	9,61
2,40	2,40
5,47	5,46
2,12	2,20
3,99	4,18
1,81	1,87
1,54	1,89
2,01	2,01
2,65	2,65
2,15	2,15
1,84	1,84
2,62	2,59
2,43	2,48
2,99	2,93
1,95	1,89

1,76	1,53
1,90	1,89
1,84	1,92
2,26	2,26
1,14	1,14
1,28	1,23
2,71	2,70
3,55	3,54
1,81	1,73
1,62	1,59
1,79	2,15
7,18	7,16
3,38	3,48
7,18	7,16
1,37	1,37
2,51	2,51
1,73	1,73
3,88	4,01
1,14	1,25
1,40	1,31
1,48	1,48
4,08	4,07
1,45	1,45
1,68	1,67
2,96	2,93
3,57	3,57
1,40	1,42
1,79	1,81
2,96	2,90
1,48	1,56
1,59	1,53
2,48	2,56
1,23	1,25
1,68	1,67
1,48	1,48
1,14	1,28
1,23	1,17
2,04	1,73
2,29	2,29
3,07	3,07
1,31	1,42
1,81	1,81
2,90	2,90
1,73	1,70
3,04	3,04
1,73	1,73
1,23	1,56
1,84	1,81
1,14	1,11
1,79	1,76

6,84	6,83
1,54	1,50
5,33	5,32
2,15	2,15
1,51	1,50
1,73	1,70
2,40	2,29
2,09	1,92
2,76	2,37
2,96	2,95
1,42	1,42
1,68	1,70
1,73	1,73
2,18	2,23
2,99	3,07
1,42	1,37
1,31	1,42
1,70	1,70
1,84	1,84
3,13	3,12
1,98	1,78
2,18	1,92
2,01	1,81
3,63	3,62
2,35	2,37
1,68	1,70
1,45	1,45
1,81	1,81
2,01	2,01
1,37	1,50
2,96	2,98
3,04	3,09
6,17	6,16
2,79	2,79
3,29	3,26
2,35	2,34
3,46	3,46
3,02	2,81
1,93	1,92
1,65	1,81
1,76	1,62
3,07	3,07
1,79	1,78
1,42	1,42
2,26	2,20
2,01	2,01
2,23	2,23
2,09	2,12
2,07	2,06
2,79	2,68

4,27	4,01
5,58	5,60
1,51	1,50
1,87	1,87
3,60	3,51
2,51	2,42
1,76	1,70
1,81	1,53
3,27	3,01
2,46	2,48
2,40	2,42
2,29	2,26
2,01	1,87
4,44	4,90
62,68	62,56
4,66	4,49
1,48	1,48
1,59	1,59
1,59	1,67
22,84	21,93
1,87	1,70
1,84	1,87
2,26	2,23
2,40	2,40
4,94	4,93
12,40	12,37
3,13	3,12
2,74	2,95
7,96	8,33
3,29	3,29
2,68	2,68
1,98	2,03
1,95	3,57
374,23	373,53
4,77	1,67
4,75	4,82
4,33	4,18
2,68	2,68
2,54	2,37
4,16	4,32
4,91	5,27
1,95	1,84
1,76	1,87
1,23	1,50
2,04	2,03
4,30	4,29
3,24	3,23
4,86	4,85
13,54	13,52
3,60	3,59

3,29	3,29
4,10	4,10
2,54	2,65
4,41	4,40
3,60	3,59
4,13	4,12
8,49	8,47
21,44	21,40
5,84	5,82
2,57	2,56
2,82	2,81
3,21	3,29
3,15	3,15
2,09	2,12
2,85	2,84
2,32	2,40
15,30	15,27
2,07	3,48
2,48	3,65
2,46	2,45
2,48	2,51
2,43	2,54
2,57	2,56
2,46	2,48
2,76	2,65
11,06	10,39
3,18	3,15
2,12	2,09
3,10	3,09
7,65	7,64
3,57	3,57
1,73	3,54
186,45	186,09
2,54	2,48
7,93	7,89
10,67	10,65
3,55	3,59
7,99	7,97
3,88	3,87
3,96	3,85
344,72	344,07
2,01	2,79
2,04	2,17
3,29	3,29
3,55	3,54
6,92	7,08
3,18	2,09
2,54	3,93
2,60	2,51
2,51	2,48

3,71	3,71
2,76	2,81
3,04	3,12
3,07	3,12
2,71	2,59
2,90	2,70
2,01	2,93
11,67	11,95
4,77	4,77
3,18	3,18
49,75	49,66
4,24	4,38
11,00	11,23
30,04	29,98
6,31	6,30
3,27	3,26
4,50	4,49
3,27	3,26
2,71	2,68
2,82	2,81
7,99	8,03
154,40	154,10
2,09	7,38
2,09	2,12
3,99	3,98
31,88	31,82
2,88	3,62
693,36	692,05
3,21	3,20
3,55	3,73
3,60	3,04
2,96	3,20
4,08	4,07
2,21	2,20
6,51	6,35
1,87	7,83
1,73	3,01
1,73	1,73
2,23	1,84
2,46	3,51
2,96	1,89
2,96	3,54
3,35	3,54
4,55	4,63
2,43	2,42
2,40	2,37
2,76	2,76
2,68	2,68
1,81	2,15
3,15	3,01

1,73	2,03
2,79	2,79
8,32	8,30
53,91	53,81
18,37	18,34
2,96	2,95
3,85	3,68
11,00	10,98
3,71	3,93
12,54	12,51
1,65	1,64
1,79	1,53
2,46	2,48
6,78	6,80
5,03	5,02
2,88	2,81
2,37	2,34
2,43	4,57
2,43	4,21
2,35	2,37
4,27	4,54
5,05	5,41
4,08	4,07
4,52	5,16
3,57	3,82
3,60	3,73
2,40	1,59
2,01	1,56
1,98	1,62
1,95	1,56
4,08	4,07
6,95	6,88
62,23	62,12
5,05	5,04
7,18	7,11
7,68	7,66
5,44	5,68
5,33	5,24
2,96	2,73
3,52	11,59
111,73	111,52
372,78	372,08
3,63	20,87
3,63	2,98
7,04	7,02
4,72	4,60
13,12	13,15
2,07	2,06
15,55	15,52
5,53	5,63

9,63	9,61
6,23	6,21
11,25	11,23
11,14	8,19
4,50	4,18
14,04	16,11
4,55	3,04
52,41	52,31
4,19	4,29
2,07	2,06
3,74	3,73
2,23	2,23
3,35	3,46
4,27	4,26
6,62	6,60
4,83	4,93
2,26	2,29
2,12	2,03
4,38	4,21
3,04	2,98
4,55	4,46
31,77	31,32
7,01	7,02
6,28	6,27
3,71	3,71
2,04	2,09
2,48	2,56
3,66	3,68
6,56	6,55
4,58	4,65
3,85	3,85
2,23	2,03
3,63	3,62
2,88	2,81
3,32	3,26
2,62	2,59
2,96	2,95
20,55	20,51
3,46	3,62
3,63	3,62
2,23	2,23
3,32	3,32
1,59	1,59
1,76	1,76
1,28	1,28
1,23	1,23
1,23	1,23
1,40	1,39
1,28	1,28
1,51	1,50

1,62	1,62
2,46	2,45
2,51	2,48
2,99	2,37
1,90	1,81
3,63	3,62
1,59	1,59
2,51	2,48
1,45	1,45
1,48	1,48
1,42	1,42
1,34	1,34
1,95	1,95
2,37	2,29
2,51	2,51
2,88	2,87
2,96	2,90
729,85	728,47
2,04	2,03
1,93	1,92
2,15	2,15
2,40	2,40
1,45	1,45
1,37	1,37
1,84	1,84
1,59	1,42
3,07	3,07
6,20	6,19
6,51	6,49
3,29	3,29
3,41	3,32
106,18	105,98
3,88	3,87
1,62	1,64
1,81	1,81
1,34	1,53
1,98	1,76
1,87	1,87
2,09	2,09
1,48	1,48
1,17	1,48
2,12	2,12
1,81	1,81
2,04	2,03
1,68	1,37
2,15	5,88
6,53	6,47
1,68	1,67
1,23	1,20
1,76	1,76

1,37	1,37
2,32	2,31
1,59	1,62
1,31	1,31
1,42	1,42
1,23	1,23
2,26	2,26
4,27	4,26
1,37	1,34
2,18	2,29
34,73	34,67
3,63	3,29
1,87	1,87
1,42	1,78
1,62	1,59
1,76	1,81
2,26	2,26
1,26	1,25
1,26	1,25
1,28	1,28
0,78	0,78
1,45	1,45
2,82	2,81
4,33	4,29
2,09	2,06
0,64	0,59
0,03	0,03
0,20	0,39
0,56	0,47
1,01	0,98
0,42	0,36
0,06	0,03
0,34	0,31
0,61	0,61
0,00	0,00
0,22	0,22
0,75	0,75
0,75	0,50
1,45	1,45
1,28	1,28
1,45	1,62
2,43	3,04
1,54	0,59
2,40	0,84
1,84	1,78
1,79	1,81
2,62	2,62
6,37	6,47
1,65	1,64
2,68	2,68

1,93	1,92
2,68	2,68
1,84	1,73
1,01	0,95
1,26	1,17
2,35	2,42
33,70	33,27
263,51	263,01
1,23	1,25
1,23	1,25
3,32	3,34
19,88	19,84
2,99	2,93
4,22	4,21
4,19	4,18
3,55	3,54
0,92	0,95
1,95	1,95
2,18	2,17
2,09	2,17
2,12	2,29
98,64	98,45
2,18	2,12
2,15	2,17
1,54	1,62
5,17	5,16
2,43	2,42
2,26	2,23
3,94	4,01
2,99	2,98
1,95	1,95
1,42	1,45
1,48	1,45
1,40	1,37
1,40	1,34
2,99	6,94
2,93	3,65
2,71	2,59
2,90	2,90
4,38	4,38
2,85	2,79
9,74	9,73
18,68	18,64
8,49	8,36
1,56	1,56
1,62	1,62
1,87	1,87
1,68	1,87
4,02	4,01
2,96	3,01

5,03	5,02
2,01	2,01
5,97	5,99
2,74	2,73
1,37	1,48
3,21	3,20
2,15	2,12
4,52	4,51
1,90	1,89
2,88	2,87
1,42	1,31
1,98	1,98
1,56	1,64
1,93	1,81
2,04	2,03
1,76	1,78
2,65	2,81
5,78	6,24
1,42	2,59
1,87	1,59
2,09	2,09
1,87	1,87
4,94	4,93
1,93	1,92
1,68	1,67
1,59	1,62
1,51	1,50
1,54	1,45
1,51	1,50
1,81	1,76
1,87	1,87
137,95	137,69
7,99	8,03
2,18	2,20
1,65	1,67
1,62	1,62
92,50	92,32
11,56	11,87
2,12	2,09
1,90	1,92
2,76	2,81
2,54	2,54
2,71	2,68
5,25	5,24
2,51	2,51
2,99	2,98
17,73	17,75
82,53	82,37
1,93	4,60
1,87	1,84

3,29	4,15
3,32	3,29
1,95	1,92
8,49	8,47
28,34	28,28
2,74	2,68
1,73	1,73
1,84	1,89
5,08	5,07
2,48	2,48
2,93	2,87
8,85	8,75
4,47	4,46
2,57	2,56
10,72	10,70
3,43	3,46
2,15	4,10
60,17	60,05
2,21	4,79
12,40	12,40
2,04	2,03
3,02	2,98
15,13	15,10
2,96	2,87
18,12	18,09
2,60	2,51
1,95	1,95
5,25	5,16
4,27	4,12
40,43	40,35
11,22	11,20
2,15	3,15
2,88	3,07
3,82	3,82
1,90	1,98
1,93	2,06
2,46	2,29
1,81	1,81
1,90	1,98
2,29	2,29
1,59	1,59
1,70	1,73
4,63	4,57
16,61	16,86
20,35	20,31
2,18	2,20
5,97	5,99
2,07	2,01
2,15	2,15
14,83	14,80

1,62	1,62
7,45	7,44
1,84	1,98
3,88	3,90
1,79	1,78
2,07	2,06
3,77	3,76
3,46	3,54
2,15	2,17
2,12	2,12
12,68	12,62
2,18	3,23
2,18	3,12
2,04	2,15
1,14	1,14
1,84	1,59
1,40	1,39
1,90	1,76
1,23	1,23
1,81	1,81
2,35	2,37
2,29	5,16
2,65	2,68
3,15	3,18
11,42	11,56
11,67	11,98
62,99	62,87
1,73	4,07
1,76	1,92
1,56	1,45
1,70	1,70
9,27	9,25
2,18	2,12
2,43	2,34
6,98	6,60
132,56	132,31
3,04	7,41
3,18	6,27
142,70	142,43
52,85	54,20
2,15	6,05
12,73	12,71
2,85	2,84
1,79	1,76
2,60	2,59
3,74	3,96
2,23	2,03
2,23	2,26
9,38	9,11
15,33	14,83

3,24	3,93
7,37	7,36
2,40	7,69
2,01	5,63
3,02	3,09
2,43	2,29
5,08	5,07
2,85	3,12
3,15	2,93
19,29	19,26
2,60	2,81
3,21	3,54
4,58	4,82
3,02	2,95
2,48	2,42
20,55	20,51
2,37	2,34
2,07	2,12
2,12	2,17
1,93	1,78
2,99	3,07
1,40	1,64
1,70	1,84
3,29	3,23
2,68	2,70
36,74	41,61
5,86	5,85
4,72	4,71
2,29	2,26
4,36	4,29
4,80	4,79
2,23	2,17
2,09	1,98
1,70	1,70
2,18	2,20
1,79	1,78
1,62	1,62
3,85	3,32
69,74	64,73
371,69	370,99
1,73	1,70
1,81	1,76
1,84	1,87
3,77	3,40
34,01	33,94
3,46	3,65
1,42	1,53
2,32	2,45
2,15	2,29
2,65	2,73

1,54	1,64
3,21	2,65
3,15	2,62
1081,36	1196,71
1,42	1,59
2,12	2,06
2,57	2,56
4,50	4,38
3,02	2,81
4,80	4,71
7,26	7,22
2,21	6,83
27,14	29,32
1,59	1,56
1,56	1,64
2,79	2,31
2,85	2,01
251,36	228,95
4,63	4,63
2,43	2,42
1,62	1,62
2,09	2,17
2,43	2,42
1,84	1,84
3,13	2,93
3,29	7,22
726,80	725,43
3,02	2,81
2,88	2,98
3,21	3,04
6,78	5,94
6,78	3,04
3,41	3,29
5,70	5,71
4,75	4,74
2,12	2,12
2,54	2,54
5,03	5,02
10,30	9,59
4,61	4,43
2,74	2,73
2,93	2,93
1,95	6,16
93,53	93,35
1,95	4,51
1,93	2,03
26,36	26,08
57,29	57,18
1,68	2,65
1,65	1,78

2,37	2,31
2,68	2,68
18,15	18,48
134,94	134,68
6,34	6,27
4,86	4,85
1,98	6,91
104,25	104,05
2,23	4,68
1,87	2,09
1,54	2,95
19,91	19,79
1,84	3,09
1,93	2,03
22,89	22,85
3,41	3,43
3,41	4,93
35,49	35,98
6,11	6,24
67,43	67,30
1,81	5,35
37,55	37,73
2,09	3,48
1,87	1,92
1,51	2,95
219,95	220,87
2,15	2,15
2,18	2,17
2,46	2,51
3,15	3,18
3,35	7,41
3,35	3,37
3,66	3,65
3,35	3,46
4,89	5,07
52,60	48,15
2,82	2,76
3,10	3,07
18,09	17,56
164,03	163,72
1,51	1,53
1,54	1,53
2,40	2,40
1,76	3,40
124,86	123,31
2,18	1,67
2,18	2,12
2,37	2,37
15,97	15,94
16,86	16,94

3,29	3,32
18,18	18,14
1,54	2,29
2,57	2,37
24,12	24,08
2,57	2,48
4,08	4,07
1,95	2,68
912,69	910,97
2,18	2,98
3,35	3,23
1,98	2,01
2,07	3,76
1,87	3,04
1,98	2,20
1,90	1,87
188,32	187,96
79,74	79,48
2,32	2,98
5,81	5,80
41,27	41,19
2,07	2,31
56,62	56,51
3,29	2,51
5,86	5,85
3,52	3,46
16,81	16,78
12,82	12,74
1,68	1,67
1,31	1,59
118,44	118,21
60,86	60,75
2,12	3,04
2,46	2,42
3,29	3,26
1,51	3,23
3,55	7,33
134,91	134,65
9,41	9,31
2,74	2,70
5,58	5,91
56,87	56,76
3,21	3,09
2,51	2,51
2,32	2,34
4,80	6,19
3,15	2,98
2,40	2,40
3,27	2,98
1,51	3,54

3,60	3,57
5,81	2,45
5,67	2,31
2,32	2,31
2,23	2,26
3,88	3,90
2,62	2,51
2,99	2,90
2,29	2,34
2,40	2,37
2,93	2,84
29,40	29,71
532,96	531,95
3,57	4,79
9,49	9,45
5,50	5,49
79,38	79,23
5,89	5,57
1,79	1,76
1,76	1,84
2,09	2,12
3,94	3,87
2,12	2,17
2,01	2,01
2,12	2,12
2,26	2,01
3,96	4,54
4,83	4,93
4,69	4,79
29,73	29,68
6,37	6,27
5,14	5,32
3,10	2,98
2,65	2,98
3,57	3,68
53,27	53,17
2,93	2,95
7,15	7,58
1,98	2,03
4,75	4,12
36,32	38,60
4,69	4,93
4,75	4,74
4,75	4,77
1,79	4,68
4,89	5,94
29,09	34,30
1,76	4,35
2,48	2,93
4,47	4,51

5,28	4,99
89,59	89,42
4,02	3,90
4,16	4,12
4,13	4,24
2192,95	2188,80
6,95	6,69
6,84	6,94
2,99	6,88
1871,12	1867,58
178,49	173,39
2,57	10,09
6,76	6,74
3,21	3,20
2,96	2,65
18,01	17,97
2,21	2,17
3,55	3,51
4,27	3,51
5,08	4,12
28,06	26,70
14,52	14,49
4,10	4,43
6,03	6,24
4,05	4,10
20,10	20,06
2,82	2,70
3,38	3,65
1,51	1,50
236,62	236,17
9,38	9,36
5,17	5,13
1540,58	1537,66
476,76	475,85
33,67	33,61
13,23	13,21
800,34	798,83
410,92	410,14
44,87	45,29
44,91	45,33
44,95	45,37

Rohdaten zur Reproduzierbarkeit - Tabelle X5 zu Diagramm 3-2

Verhältnis	PatientA	PatientB	Anteil PatientA%	Abweichung
Test 1				
100/0	921	0	100,00%	0
90/10	1320	137	90,60%	0,6
80/20	486	96,2	83,48%	3,48
75/25	500	202	71,23%	3,8
70/30	587	288	67,09%	2,9
60/40	408	257	61,35%	1,35
50/50	449	276	61,93%	11,93
Test 2				
100/0	9481	0	100,00%	0
90/10	6304	1209	83,90%	6,09
70/30	5687	1595	78,09%	8,09
50/50	4817	3070	61,07%	11,07
Test 3				
100/0	2505	0	100,00%	0
90/10	1038	247	80,80%	9,2
70/30	5269	1395	79,06%	9,06
50/50	2384	1629	59,40%	9,4