Aus dem Pathologischen Institut
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Thomas Kirchner

Vergleichende Proteomanalyse des Knochenmarks von Patienten mit Chronisch myeloischer Leukämie und Peripheren Blutstammzellen gesunder Spender

---

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

vorgelegt
von Katrin Susanne Schwab
aus Ostfildern-Ruit
2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. med.habil. Ralf Huss

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Hans-Jochen Kolb

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Petro E. Petrides

Mitbetreuung durch die

promovierten Mitarbeiter: **Dr.rer.nat. Evelyn Zeindl-Eberhart**

Dr.agr. Sibylle Liebmann

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 07.05.2009

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 6
1.1 Epidemiologie 6
1.2 Ätiologie 6
1.3 Stadieneinteilung 7
1.3.1 Chronische Phase 7
1.3.2 Akzelerationsphase 7
1.3.3 Blastenphase 7
1.4 BCR-ABL 8
1.4.1 Das BCR-ABL-Protein 8
1.4.2 BCR-ABL und der Zellzyklus 8
1.4.3 BCR-ABL und Apoptose 9
1.4.4 BCR-ABL und Adhäsionseigenschaften 9
1.5 Therapie 10
1.5.1 Vorgehen 10
1.5.2 Therapieoptionen 11
1.5.3 Allogene Stammzelltransplantation 11
1.5.4 Medikamentöse Therapie 12
1.5.4.1 Hydroxyurea 12
1.5.4.2 Interferon α 12
1.5.4.3 Imatinib 13
1.5.4.4 c-kit 14
1.6 Zielsetzung 16
2 Material und Methoden 17
2.1 Einfrieren von frisch entnommenem gesunden KM 17
2.1.1 Chemikalien, Geräte und Zubehör 17
2.1.1.1 Chemikalien 17
2.1.1.2 Geräte und Zubehör 17
2.2 Kryokonservierung des Knochenmarks der CML Patienten 18
2.2.1 Chemikalien, Geräte und Zubehör 18
2.2.1.1 Chemikalien 18
2.2.1.2 Geräte und Zubehör 18
2.2.2 Entfernen der Erythrozyten 19
2.2.3 Bestimmung von Zellkonzentration und Gesamtzellzahl 19
2.2.4 Entfernen des Plasmas und Einstellung der Zellkonzentration 19
2.2.5 Ansetzen der DMSO Lösung 20
2.2.6 Überführen des Präparates in den Kryobeutel 20
2.2.7 Einfriervorgang 20
2.3 Aufarbeitung der CML KM-Proben 21
2.3.1 Chemikalien, Geräte und Zubehör 21
2.3.1.1 Chemikalien 21

2.3.1.2 Geräte und Zubehör 21
2.4 Aufarbeitung der Peripheren Blutstammzellen (PBSC) und des frischen Knochenmarks 24
2.4.1 Chemikalien, Geräte und Zubehör 24
2.4.1.1 Chemikalien 24
2.4.1.2 Geräte und Zubehör 24
2.4.2 Stammzellspender 24
2.5 Zellzählung 26
2.5.1 Chemikalien, Geräte und Zubehör 26
2.5.1.1 Chemikalien 26
2.5.1.2 Geräte und Zubehör 26
2.6 Gesamtproteine Probenaufarbeitung 26
2.6.1 Chemikalien, Geräte und Zubehör 26
2.6.1.1 Chemikalien 26
2.6.1.2 Geräte und Zubehör 27
2.7 Quantitative Proteinbestimmung 28
2.7.1 Chemikalien, Geräte und Zubehör 28
2.7.1.1 Chemikalien 28
2.7.1.2 Geräte und Zubehör 28
2.8 Zweidimensionale Gelelektrophorese (2-DE) 29
2.8.1 Chemikalien, Geräte und Zubehör der 1. und 2. Dimension 29
2.8.1.1 Chemikalien für die 1. Dimension 29
2.8.1.2 Geräte und Zubehör für die 1. Dimension 29
2.8.1.3 Chemikalien für die 2. Dimension 31
2.8.1.4 Geräte und Zubehör für die 2. Dimension 32
2.9 Proteinanfärbung im Gel 33
2.9.1 Silberfärbung 33
2.9.1.1 Chemikalien 33
2.9.1.2 Geräte und Zubehör 33
2.9.2 Coomassie Brilliant-Blau (CBB) 34
2.9.2.1 Chemikalien 34
2.10 Proteinidentifizierung mit MALDI-TOF Massenspektrometrie 35
3 Ergebnisse 36
3.1 Vergleichende Proteomanalyse 36
3.1.1 Analyse der zweidimensionalen Gele 36
3.1.1.1 Knochenmark von gesunden Spendern 36
3.1.1.2 Knochenmark von CML-Patienten 37
3.1.1.3 Periphere Blutstammzellen gesunder Spender 37
3.1.2 Optische Auswertung 38
3.1.3 Auswertung mit Topspot 42
3.1.4 Identifizierung der Proteine durch Massenspektrometrie 43
3.2 Ergebnisse der Reihe A 44
3.2.1 Darstellung der Spots A1und A2 44

3.2.2 Darstellung des Spots A8 ... 47
3.2.3 Darstellung des Spots A11 ... 50
3.3 Ergebnisse der Reihe B ... 53
3.3.1 Darstellung der Spots B1 und B2 ... 53
3.3.2 Darstellung der Spots B3 und B4 ... 56
3.3.3 Darstellung des Spots B6 ... 59
3.4 Daten der Reihe A auf einen Blick ... 62
3.5 Daten der Reihe B auf einen Blick ... 63
3.6 Intensität und Proteine auf einen Blick ... 64
3.7 Quantitative Proteinbestimmung ... 65
3.7.1 BSA-Standard ... 65
3.7.2 Proteinbestimmung der Proben 5, 7 und 12 ... 66
4 Diskussion ... 67
4.1 Identifikation von Fibrinogen beta chain und Fibrinogen gamma chain ... 67
4.1.1 Struktur von Fibrinogen ... 67
4.1.2 Funktion von Fibrinogen ... 67
4.1.2.1 Zelluläre Blutstillung ... 67
4.1.2.2 Plasmatische Blutstillung (Blutgerinnung) ... 68
4.1.2.3 Die Fibrinolyse ... 68
4.1.3 Erniedrigte Konzentration der Fibrinogen beta Kette ... 68
4.1.3.1 Spot A1 ... 68
4.1.4 Erniedrigte Konzentration der Fibrinogen gamma Kette ... 69
4.1.4.1 Spot A8 ... 69
4.1.5 Störungen in der Hämostase der Patienten ... 69
4.1.6 Erniedrigte Konzentrationen von Fibrin(ogen) und Malignität ... 70
4.1.7 Erhöhte Konzentrationen von Fibrin(ogen) und Malignität ... 70
4.2 Identifikation der α-Enolase ... 72
4.2.1 α-Enolase ... 72
4.2.2 Erniedrigte Konzentration der Enolase und Tumorwachstum ... 72
4.2.2.1 Spot A2 ... 72
4.2.3 Enolase als DNA bindendes Protein ... 72
4.2.4 Erhöhte Konzentration der Enolase und Tumorprogression ... 73
4.2.4.1 Spot B3 ... 73
4.2.4.2 Spot B6 ... 73
4.2.5 Enolase als HAP (Hypoxie assoziiertes Protein)[73] ... 74
4.2.6 Erhöhte Konzentration der α-Enolase und Metastasierung ... 74
4.2.7 Enolase als Oberflächenprotein ... 75
4.2.8 Enolase als Tumormarker ... 75
4.3 Identifikation des NME1-NME2-Proteins ... 76
4.3.1 Das NME-Gen ... 76
4.3.2 Das NME1-Protein ... 76
4.3.3 Das NME2-Protein ... 76
4.3.4 Erniedrigte Konzentration des NME1-NME2-Proteins in Spot A11 ... 77

4.3.4.1 Spot A11 ... 77
4.3.5 Nm23 Proteine und ihre biochemischen Funktionen ... 77
4.3.5.1 Nm23 als Nukleosid Diphosphat Kinase ... 77
4.3.5.2 Nm23 als Phosphotransferase ... 77
4.3.5.3 Nm23 als Nuklease ... 78
4.3.6 Nm23 und Hämatopoese ... 78
4.3.7 Nm23 und Metastasierung ... 79
4.3.7.1 Melanom ... 79
4.3.7.2 Mammakarzinom ... 79
4.3.7.3 Ovarialkarzinom ... 79
4.3.7.4 Kolonkarzinom ... 80
4.3.7.5 Bronchialkarzinom ... 80
4.3.7.6 Prostatakarzinom ... 81
4.3.7.7 Neuroblastom ... 81
4.3.7.8 Leukämien ... 81
4.4 Identifikation von SAHMDI 1 ... 83
4.4.1 Analyse von Spot B1 und B2 ... 83
4.4.1.1 Spot B1 ... 83
4.4.1.2 Spot B2 ... 83
4.4.2 Interferon gamma ... 84
4.4.2.1 Wirkmechanismus von Interferon gamma ... 84
4.4.3 Interferon α ... 85
4.4.3.1 Interferon α in der Therapie der CML ... 85
4.4.3.2 Vortherapie der Patienten mit Interferon α ... 86
4.5 Identifikation von γ-Actin ... 87
4.5.1 γ-Actin ... 87
4.5.2 Erhöhte Konzentration von γ-Actin in Spot B4 ... 87
4.5.2.1 Spot B4 ... 87
4.5.3 γ-Actin und Migration ... 87
4.5.4 Erhöhte Konzentration von γ-Actin und gesteigerte Motilität ... 87
4.6 Offene Fragen ... 89
4.6.1 Schwierigkeiten in Aufarbeitung und Verarbeitung des Knochenmarks ... 89
4.6.1.1 Verarbeitung des frisch entnommenen gesunden Knochenmarks ... 89
4.6.1.2 Verarbeitung der Knochenmark Backups der CML Patienten ... 89
4.6.1.3 Lagerungszeit ... 89
4.6.1.4 Alter der Patienten ... 90
4.6.1.5 Zellzählung nach Aufarbeitung des Knochenmarks ... 90
5 Zusammenfassung ... 94
6 Literaturverzeichnis ... 96
7 Anhang ... 106
7.1 Abkürzungsverzeichnis ... 106
7.2 Danksagung ... 109

7.3 Lebenslauf 110
8 Ehrenwörtliche Erklärung 112

1 Einleitung

Die chronisch myeloische Leukämie (CML) ist eine myeloproliferative Erkrankung die erstmals 1845 von Virchow und Benett beschrieben wurde. Sie ist auf die klonale Expansion einer frühen hämatopoetischen Stammzelle zurückzuführen, da alle Reihen der Blutbildung, das heisst Zellen der Myelopoese, Megakaryopoese, Erythropoese und der lymphatischen Reihe, betroffen sind [3].

Zytogenetisch kann bei über 90 % der Patienten eine Chromosomenaberration nachgewiesen werden. Charakteristischerweise kommt durch eine reziproke Translokation der Chromosomen 9 und 22 t(9;22) ein verkürztes Chromosom 22, das sogenannte Philadelphia-Chromosom, zustande [4]. Diese Aberration ist nur in Zellen des hämatopoetischen Gewebes und der Gefäßendothelien nachzuweisen, Hautfibroblasten der Patienten entsprechen einem normalen Karyotyp [5].

1.1 Epidemiologie

Das mediane Erkrankungsalter zum Zeitpunkt der Diagnose liegt bei 53 Jahren [3], die Inzidenz steigt mit zunehmendem Alter, allerdings können alle Altersgruppen betroffen sein [6]. Die CML hat in Deutschland eine Inzidenz von 2/100000 (Statistisches Bundesamt 1997). Männer sind im Verhältnis 3:2 häufiger betroffen als Frauen.

1.2 Ätiologie

Die Mechanismen, die zur Entstehung der Philadelphia-Translokation führen, sind bis heute ungeklärt. Ätiologisch ist kein Zusammenhang mit einer infektiösen oder erblichen Genese bekannt.
Es gibt Hinweise, dass ionisierende Strahlung die Inzidenz der CML erhöht. So konnte bei den Überlebenden der Atombombenexplosion in Hiroshima und Nagasaki eine Häufung dieser Erkrankung festgestellt werden [7].

1.3 Stadieneinteilung

Die CML ist durch drei verschiedene Stadien charakterisiert.

1.3.1 Chronische Phase

Zum Zeitpunkt der Diagnose befinden sich die meisten Patienten in der chronischen Phase, die therapeutisch meist gut kontrollierbar ist und sich durch eine Expansion der Myelopoese auszeichnet. Patienten fallen durch unspezifische Symptome wie Müdigkeit, Leistungsknick, ungewollter Gewichtsverlust und durch Organomegalie bedingte Symptome wie Völlegefühl auf. In der körperlichen Untersuchung findet sich häufig eine leichte bis mäßige Splenomegalie. Hämatologisch steht eine Leukozytose mit Linksverschiebung und unreifen Vorstufen (Metamyelozyten, Myelozyten, Promyelozyten und Blasten) im Vordergrund.

1.3.2 Akzelerationsphase

Kommt es trotz erhöhter Medikamentendosen zu einer Progression der Erkrankung mit Verschlechterung der Allgemeinsymptome, zusätzlichen zytogenetischen Chromosomenaberrationen oder Verschlechterung der Laborparameter spricht man von einer Akzeleration. Häufig ist dieses Stadium der Erkrankung nicht zweifelsfrei von den anderen Phasen abzugrenzen, und kann auch im Sinne eines direkten Übergangs von der chronischen Phase in die Blastenphase übersprungen werden.

1.3.3 Blastenphase

In der Blastenphase steigt der Anteil der Blasten und Promyelozyten im peripheren Blut auf Werte über 30 %. Ein Nachweis von über 50 % Blasten und Promyelozyten im Knochenmark oder ein Auftreten extramedullärer leukämischer Infiltrate kennzeichnet ebenfalls einen Eintritt in die terminale Phase der Erkrankung, die auch als Blastenkrise bezeichnet wird.

1.4 BCR-ABL

Auf molekularer Ebene führt die Translokation zur Bildung eines bcr-abl-Gens, das aus der Fusion des c-Abl-Protoonkogens und des Breakpoint-Cluster-Region Gens zustande kommt.

Das c-Abl-Protoonkogen liegt physiologischerweise auf Chromosom 9 und kodiert für das P145ABL-Protein, eine ubiquitär exprimierte, im Zellkern lokalisierte Tyrosinkinase. Die Bruchstelle kann innerhalb eines 300 kb umfassenden Bereiches liegen.

Das Bcr-Gen ist auf dem langen Arm des Chromosoms 22 lokalisiert und die Strangbrüche treten in bestimmten „breakpoint cluster regions“ auf. Neben der am häufigsten betroffen 5,8 kb großen major-BCR existieren eine minor- und micro-BCR [8].

1.4.1 Das BCR-ABL-Protein

Die beschriebene Bildung des BCR-ABL-Gens führt folglich nicht zur Exprimierung des physiologischen P145-ABL-Proteins, sondern codiert für das BCR-ABL-Protein. Dieses Protein besitzt, abhängig vom Bruchpunkt auf dem BCR-Gen, eine Größe von 185-230 kDa [3], ist im Zytoplasma lokalisiert und weist eine konstitutive Aktivierung der Abl-Tyrosinkinase auf [9]. Diese Veränderungen in der leukämischen Zelle führen über verschiedene Signaltransduktionswege zu deregulierter Proliferation, gestörter Adhäsion und reduzierter Apoptose [10].

Auch wenn die genauen biologischen Mechanismen noch nicht bis ins Detail geklärt sind, gibt es Hinweise, dass BCR-ABL in wesentliche Signaltransduktionswege der leukämischen Zelle eingreift. Zur Vereinfachung dieser komplexen Abläufe wurde jeweils ein Beispiel herausgegriffen.

1.4.2 BCR-ABL und der Zellzyklus

Bei hämatopoetischen Vorläuferzellen, die in vitro durch Entzug von Wachstumsfaktoren in die G0-Phase des Zellzyklus versetzt wurden, gelang es, durch Expression von BCR-ABL den Übergang von der G1-Phase in die S-Phase zu induzieren. Es kam zur DNA-Synthese und zur Aktivierung der Cyclin-abhängigen Kinasen, die für den Verlauf der Mitose notwendig sind [11].

1.4.3 BCR-ABL und Apoptose

Bei der Initialisierung der Apoptose kommt es durch externe Stimuli zur Aktivierung von Signalproteinen, die die Stabilität der mitochondrialen Membran herabsetzen. Daraus resultiert eine Freisetzung von Cytochrom C, das eine Reihe von Caspasen aktiviert. Die Caspasen lösen wiederum eine Kaskade von proteolytischen Reaktionen und schließlich eine Fragmentierung der DNA aus.
Im Rahmen der CML verhindert BCR-ABL durch Phosphorylierung des proapoptotischen Signalproteins bad dessen Aktivierung [12]. Dieser Vorgang führt zu einer verminderten Freisetzung von Cytochrom C und folglich zur Unterdrückung der Apoptose in hämatopoetischen Zellen.

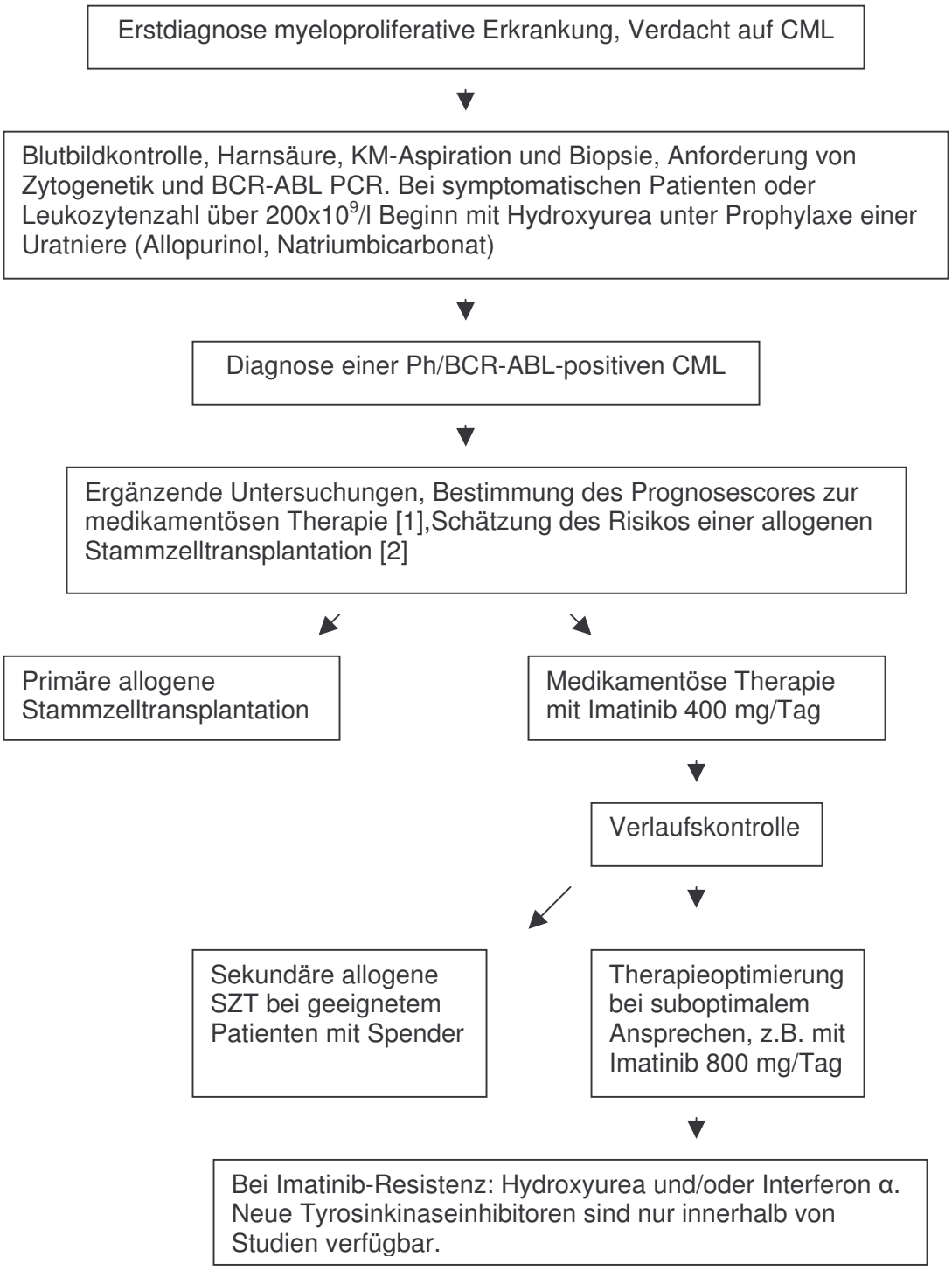
1.4.4 BCR-ABL und Adhäsionseigenschaften

Progenitorzellen sind über eine Vielzahl von Adhäsionsproteinen mit der Matrix des Knochenmarks verbunden. Eine charakteristische Eigenschaft der CML ist ein Übertreten von unreifen Vorstufen der Hämatopoese in das periphere Blut. BCR-ABL scheint in vitro zur Expression des defekten Zellahäsionsmoleküls ß-Integrin zu führen, das weitreichende Konsequenzen für die Adhäsionseigenschaften der Zellen hat. Die Vorläuferzellen lösen sich aus den Zell-Matrix Verbänden, gelangen undifferenziert aus dem Knochenmark in den Blutkreislauf und entziehen sich schließlich der Wirkung der Signaltransduktionswege, die physiologischerweise eine Hemmung der Proliferation auf die Zellen ausüben [13, 14].

1.5 Therapie

1.5.1 Vorgehen

Für das praktische Vorgehen bei Verdacht auf eine chronisch myeloische Leukämie gab die Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie im April 2006 den folgenden Algorithmus heraus.



1.5.2 Therapieoptionen

Zur Behandlung der chronisch myeloischen Leukämie gibt es verschiedene Therapieoptionen, die von vielen Faktoren abhängig sind. 1996 berief die American Society of Hematology ein Expertengremium ein, um Evidenz-basiert die Wirkung von Busulfan, Hydroxyurea, rekombinantem Interferon α und der Knochenmarktransplantation zu analysieren [15].

Aufgrund der guten Ergebnisse von Imatinib (STI571) existieren mittlerweile neben diesen klassischen Therapiestrategien auch weitere Optionen in der Behandlung der CML.

In den beiden folgenden Kapiteln 1.5.3 und 1.5.4 werden die verschiedenen Therapieoptionen erläutert.

1.5.3 Allogene Stammzelltransplantation

Eine kurative Therapie der CML kann nur durch eine allogene Stammzelltransplantation erzielt werden [16]. Diese ist aber nur unter bestimmten Voraussetzungen möglich und mit erheblichen Risiken verbunden [17].Mortalität und Morbidität sind besonders auf die akute und chronische Graft-Versus-Host-Erkrankung zurückzuführen. Das Risiko einer Transplantation kann mit dem Gratwohl-Score, der in Tabelle 1 dargestellt wird, abgeschätzt werden [2]. Es kann ein Score von 0-7 erreicht werden, wobei ein Score von 0 durch das niedrigste, ein Score von 7 durch das höchste Risiko gekennzeichnet ist. Demnach profitieren besonders junge Patienten, die innerhalb von 2 Jahren nach Diagnose transplantiert werden [15].

Score	0	1	2
Spendertyp	HLA-identischer Spender	HLA-kompatibler Unverwandter	-
Erkrankungsstadium	Erste chronische Phase	Akzelerierte Phase	Blastenkrise
Alter des Empfängers	< 20 Jahre	20-40 Jahre	> 40 Jahre
Geschlechtskombination	Alle ausser →	Männlicher Empfänger/ Weiblicher Spender	-
Zeit zwischen Diagnose und Transplantation	< 12 Monate	> 12 Monate	-

Tabelle 1: Gratwohl-Score

1.5.4 Medikamentöse Therapie

Ziel einer medikamentösen Therapie ist die Induktion einer hämatologischen Remission mit Normalisierung des Blutbilds, Reduktion einer Splenomegalie und Sistieren aller krankheitsspezifischen Symptome. Des Weiteren ist eine zytogenetische Remission mit einer Unterdrückung des Philadelphia-positiven Zellklons erstrebenswert. Der Therapiebeginn sollte unmittelbar an die Diagnosesicherung angeschlossen werden, da dies für Verlauf und Prognose der Erkrankung entscheidend ist.

1.5.4.1 Hydroxyurea

Hydroxyurea ist ein Ribonukleotidreduktasehemmer, der besonders in der initialen Behandlung und der Therapieeinleitung seinen Einsatz findet. Neben einer kurzen Halbwertszeit eignet sich HU aufgrund des raschen Wirkungseintritts zur Normalisierung des peripheren Bluts. Obgleich sich unter Behandlung mit HU in 90 % der Fälle hämatologische Remissionen erzielen lassen, gelingen dagegen mit dieser Therapie nur sehr selten zytogenetische Remissionen.

1.5.4.2 Interferon α

Interferon α ist befähigt, neben stabilen hämatologischen Remissionen auch komplette zytogenetische Remissionen auszulösen, deshalb ist es einer konventionellen Chemotherapie vorzuziehen. Das zytogenetische Ansprechen kann durch die Kombination von Interferon mit Ara-C (Arabinosyl-Cytosin) noch verstärkt werden [18]. Nach Diagnosestellung ist ein rascher Beginn der Therapie anzustreben, da besonders in der frühen chronischen Phase der Erkrankung ein Behandlungserfolg zu erzielen ist [19, 20].

Mit Hilfe des in Tabelle 2 dargestellten neuen IFN-Scores kann für einen Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose ein individuelles Risikoprofil erstellt werden. Der Score trifft eine Aussage über die Prognose der Erkrankung unter Interferon Therapie [1].

Prognose-Score	= (0,6666 x Alter (0, wenn Alter <50; sonst 1)
	+ 0,0420 x Milzgröße (cm unter dem Rippenbogen)
	+ 0,0584 x Blasten (%)
	+ 0,0413 x Eosinophile (%)
	+ 0,2039 x Basophile (0 wenn Basophile <3%; sonst 1))
	+ 1,0956 x Plättchenzahl (0 wenn <1500 x10^9/l; sonst 1)
	x1000
Niedriges Risiko	Score <780
Intermediäres Risiko	Score =780-1480
Hohes Risiko	Score >1480

Tabelle 2: Neuer IFN-Prognose-Score

1.5.4.3 Imatinib

Mit dem wachsenden Verständnis der Molekularbiologie wurde die zentrale Rolle der BCR-ABL-Tyrosinkinase erkannt. Eine Blockade dieser Kinase wurde Ziel vieler Forschungsbestrebungen und führte schließlich zur Entwicklung der Tyrosinkinaseinhibitoren mit dem wichtigsten Vertreter, dem selektiven Tyrosinkinaseinhibitor STI571 (Imatinib).
Neben einer hemmenden Wirkung auf den PDGF-Rezeptor und den Stammzellfaktor c-kit, der zusätzlich in Kapitel 1.5.4.4 erläutert wird, bindet das 2-Phenylaminopyrimidinderivat kompetitiv an die ATP-Bindungstellen der Tyrosinkinase, versetzt sie in einen inaktiven Zustand und verhindert auf diesem Wege die Phosphorylierung von Proteinen, die in Signaltransduktionwege eingreifen, die bei der CML betroffen sind [21]. So induziert Imatinib in vitro einen selektiven Wachstumsarrest bei BCR-ABL positiven Zellen, ohne das Wachstum normaler Zellen zu beeinflussen [22].
Aufgrund der exzellenten klinischen Ergebnisse, einer guten Verträglichkeit und tolerablen Nebenwirkungen scheint das therapeutische Potential so offensichtlich, dass die Therapie mit 400 mg Imatinib in der chronischen Phase der CML der klassischen Kombinationstherapie mit Interferon+Ara-C vorzuziehen ist. In einer randomisierten internationalen Studie (IRIS) zeigte sich die Überlegenheit des Tyrosinkinaseinhibitors in einer verbesserten Lebensqualität und einem höheren hämatologischen, zytogenetischen und molekularen Ansprechen [23, 24]. Allerdings können im Hinblick auf die begrenzten Erfahrungen noch immer keine evidenz-basierten Aussagen über das Überleben der Patienten getroffen werden.
Diesen guten klinischen Ergebnissen steht eine Imatinib-Resistenz gegenüber, die auf Mutationen der Tyrosinkinase, BCR-ABL Genamplifikationen oder auf pharmakologische Mechanismen zurückzuführen ist [25, 26]. Der Resistenzentwicklung ist durch eine strikte Vermeidung von Unterdosierung (nicht <

300 mg Imatinib/Tag) vorzubeugen. Bei Therapieresistenz kann auf weitere Tyrosinkinaseinhibitoren wie Dasatinib (BMS354825) und Nilotinib (AMN107) oder Farnesyltransferaseinhibitoren, die in klinischen Studien bereits ihre Anwendung finden, zurückgegriffen werden [27, 28].
Imatinib besitzt hohes therapeutisches Potential aber auch Schwächen, die eine Entwicklung von alternativen Therapiestrategien unerlässlich macht.

1.5.4.4 c-kit

Neben der selektiven Hemmung des katalytischen Zentrums der BCR-ABL-Tyrosinkinase unterdrückt Imatinib die Kinase Aktivität des PDGF-Rezeptors und des Tyrosinkinase-Rezeptors c-kit [21]. Bei c-kit handelt es sich um eine transmembrane 145-160 kDa Rezeptor-Tyrosinkinase, die in der CD-Nomenklatur (Cluster of Differentiation) als CD117 definiert ist. Das codierende Gen ist auf Chromosom 4 lokalisiert [29].

Im gesunden Knochenmark exprimieren etwa 4 % aller kernhaltigen Zellen den Rezeptor. Dabei handelt es sich um Stammzellen und frühe Vorläuferzellen. So zeigen unter den CD34+ Vorläuferzellen des Knochenmarks etwa 70 % den c-kit Rezeptor [30].
Auf reifen Zellen des peripheren Blutes kann der Rezeptor nicht nachgewiesen werden. Dagegen weisen physiologischerweise Mastzellen [31], Melanozyten, Zellen der Gametogenese und embryonale Zellen des zentralen Nervensystems eine Expression von CD117 auf [32, 33].
Pathogenetisch wird c-kit hinsichtlich der Expression auf leukämischen Zellen eine Rolle in der AML zugeschrieben [34]. Erhöhte Expressionsraten finden sich ebenfalls bei der CML in der Phase der Blastenkrise, nicht aber bei akuten lymphatischen Leukämien [35]. Beim kleinzelligen Bronchialkarzinom werden SCF und CD117 coexprimiert [36], gastrointestinale Stromatumoren (GIST) treten ebenfalls durch die Expression von CD117 in Erscheinung [37] und können mit Hilfe der Immunhistochemie bestimmt werden [38].

C-kit ist ein integrales Membranprotein und besteht aus einem extrazellulären und einem intrazellulären Anteil.
An die extrazelluläre Domäne des Rezeptors bindet der natürliche Ligand Stammzellfaktor (SCF), der beispielsweise von Fibroblasten [39] und Stromazellen des Knochenmarks gebildet wird [40].
SCF fördert Proliferation, Differenzierung, Adhäsion und funktionelle Aktivierung in der Hämatopoese und wirkt auf Mastzellen, Zellen der Erythropoese, multipotente Stammzellen, Megakaryozyten und bestimmte lymphoide Vorläuferzellen [41].

Der intrazelluläre Bereich des Rezeptors beinhaltet die Tyrosinkinase. Unter Berücksichtigung der Wirkung von Imatinib am c-kit Rezeptor wurde eine Homologie innerhalb der Kinasedomänen der beiden Tyrosinkinasen vermutet, die schließlich

in einem Aminosäurenvergleich der Kinaseregion von BCR-ABL und der Kinase c-kit Bestätigung fand. In der Behandlung der Gastrointestinalen Stromatumoren, die sich von mesenchymalen Zellen des Verdauungstraktes ableiten und eine hohe Expression von CD117 aufweisen, findet dieses Faktum bereits Anwendung. Man bedient sich der großen Übereinstimmung der beiden Rezeptoren und therapiert die Patienten erfolgreich mit Imatinib [37].
Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass BCR-ABL die Fähigkeit besitzt, c-kit mit Hilfe der abl-Kinase zu aktivieren. Dies könnte eine Basophilie oder den Anstieg der unreifen myeloischen Zellen innerhalb der chronischen Phase der CML erklären [42].

1.6 Zielsetzung

Bedeutend scheint im Hinblick auf neue Behandlungsoptionen ein genaueres Verständnis der Vorgänge im Knochenmark und im peripheren Blut der Patienten.
Ziel dieser Arbeit ist es, im Rahmen einer Proteomanalyse Knochenmark von CML Patienten mit Knochenmark gesunder Spender zu vergleichen. Die Analyse wurde mittels einer hochauflösenden zweidimensionalen Geleelektrophorese durchgeführt. Abweichungen zwischen den Proteinmustern könnten auf pathophysiologische Vorgänge im erkrankten Knochenmark hinweisen.

Obwohl die chronisch myeloische Leukämie durch den bekannten Genotyp mit Philadelphia-Translokation und dem daraus resultierenden Phänotyp mit ihrem stadienhaften Verlauf Modellcharakter für onkologische Erkrankungen und besonders die des leukämischen Formenkreises besitzt, sind bis heute noch nicht alle der wesentlichen Signaltransduktionswege erschlossen [43]. Im Fokus vieler Forschungsbestrebungen liegt das Verständnis der Vorgänge in der leukämischen Zelle und deren Umfeld, dem Knochenmark und dem peripheren Blut. Welche Einflüsse führen zum ungebremsten Wachstum der Zellen? Was verschafft den Zellen die Fähigkeit zu unreifer Migration?

Vorteil der zweidimensionale Gelelektrophorese gegenüber anderen Methoden ist, dass sie eine Momentaufnahme des Proteinstatus der Zelle liefert. Sie spiegelt zum einen den Aktivitätszustand der Zelle wieder, erfasst aber auch Einflüsse der Umgebung sowie Auswirkungen einer Vorbehandlung.

In Kombination mit MALDI-TOF ist eine Identifizierung von Proteinen möglich, die gehäuft oder vermindert im erkrankten Knochenmark exprimiert werden. Spezifische Proteine könnten Angriffspunkt für neue zielgerichtete Therapien (targeted therapies) sein und Hinweise über Prognose und Follow-up der Patienten geben.

2 Material und Methoden

2.1 Einfrieren von frisch entnommenem gesunden KM

2.1.1 Chemikalien, Geräte und Zubehör

2.1.1.1 Chemikalien

- 10 Vol.-% ACD-A (Baxter, Maurepas, Frankreich)
- Heparin (Heparin-Natrium, Braun, Melsungen)
- PBS
- Einfriermedium

90 % Fötales Kälberserum (FCS), 18 ml (PAN^{TM} Biotech, Aidenbach)
10 % DMSO, 2 ml (WAK-Chemie)
→ auf Eis lagern

2.1.1.2 Geräte und Zubehör

- Beckenkammkanüle (Durchmesser 2,5 mm; Ulrich, Ulm)
- 50 ml Tube
- Beckmann Zentrifuge
- Cryo 1°C Freezing Container

Die Entnahme des Knochenmarks der gesunden Spender aus dem Beckenkamm wurde in der Josė Carreras Transplantationseinheit des Klinikums Großhadern durchgeführt. Mittels einer Beckenkammbiopsiekanüle wurde das Knochenmark aspiriert und im Anschluss mit 10 Vol.-% ACD-A und 1000 IE Heparin versetzt. Danach folgte ein Filterung und ein Überführen des Knochenmarks in Tubes. Nach Erhalt des gesunden Knochenmarks wurde es 1:1 mit PBS gemischt und bei 4°C und 1200 Umdrehungen für 10 min zentrifugiert.
Im Anschluss wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 10 ml Einfriermedium resuspendiert und auf 1,5 ml Einfriertubes verteilt. Die Einfriertubes wurden im + 4°C vorgekühlten Cryo 1°C Freezing Container platziert und dieser in -80°C gelagert. Durch den Container wurde ein gleichmäßiges Herunterkühlen des Knochenmarks von jeweils 1°C pro Stunde gewährleistet.

2.2 Kryokonservierung des Knochenmarks der CML Patienten

Das Knochenmark wurde den sechs an chronisch myeloischer Leukämie erkrankten Patienten in der chronischen Phase ihrer Erkrankung und unter Vorbehandlung entnommen. Dieses sogenannte Backup wurde den Patienten abgenommen um es im Rahmen einer allogenen Knochenmarkstransplantation bei Komplikationen oder im Falle eines abspringenden Spenders als Ersatz zu infundieren
Das Knochenmark wurde nach Entnahme mit Hilfe von DMSO kryokonserviert und über Jahre bei – 196°C bis zu unserer Aufarbeitung gelagert.

2.2.1 Chemikalien, Geräte und Zubehör

2.2.1.1 Chemikalien

- Gelafundin 4 % (Braun)
- Plasma-Lyte A (Baxter)
- Humanes Serum Albumin (20 %)(Octapharma)
- Cryo-Sure DMSO (WAK-Chemie)

2.2.1.2 Geräte und Zubehör

- Transferbeutel (Baxter)
- Waage, Wiegebereich 1g-6000g (Genauigkeit: +/- 1g) (Kern)
- Schlauchschweißgerät Hematron III (Baxter)
- Blutbildautomat (Beckmann-Coulter ACT diff)
- Cryofuge 6000i GMP (Kendro)
- Plasmapresse (Fresenius)
- Benjamix (Baxter)
- Perfusorspritze (Nunc)
- Laminar Air Flow Werkbank Klasse II (Kendro)
- Sterile Glasflaschen (Apotheke Großhadern)
- Gefrierbeutel Cryocyte (Nexell)
- Einfrierkassette (Consarctic)
- Einfrierautomat Planer Kryo 10 Serie III (Messer-Griesheim)

Nach Entnahme des Knochenmarks wurde zunächst eine Zellzählung und Vitalitätsmessung des Präparates durchgeführt. Im Anschluss wurde das Knochenmark, wie in Kapitel 2.2.2-2.2.7 beschrieben, zum KM-Backup verarbeitet. Die Standardarbeitsanweisung wurde unter sterilen Bedingungen im Klinikum Großhadern durchgeführt und geht auf das Protokoll von Dr. Dusun Prevalsek zurück.

2.2.2 Entfernen der Erythrozyten

- Zunächst wurde die Hälfte des Gewichts des Knochenmark Präparates an Gelafundin 4 % zugesetzt, so dass das Präparat nun aus 2/3 Knochenmark und 1/3 Gelafundin 4 % bestand.
- Am Beutel des KM-Gelafundin-Gemisches wurde mittels eines Sterilschweißgerätes ein Transferbeutel angebracht und abgeklemmt. Daran schloss sich ein Sedimentationsvorgang der Erythrozyten von 80 min an.
- Durch das Lösen der Klemme am Beutel wurden die Erythrozyten soweit aus dem Beutel abgelassen, bis sich die Leukozytenschicht etwa 2 cm oberhalb des Beutelunterrandes befand. Es folgte eine Volumenbestimmung des Präparates (g = ml).

2.2.3 Bestimmung von Zellkonzentration und Gesamtzellzahl

- Die Anzahl der Leukozyten, Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten, Erythrozyten, Thrombozyten, der Hämoglobinwert in g/dl, der Hämatokrit, MCV, MCH und MCHC wurden mit Hilfe eines Blutbildautomaten bestimmt.
- Die Gesamtzellzahl ließ sich aus der Anzahl der Leukozyten/ml x Volumen (ml) des Präparates errechnen.

2.2.4 Entfernen des Plasmas und Einstellung der Zellkonzentration

- Die Zellkonzentration des Präparates sollte auf 1-2x10^8 nukleäre Zellen pro ml eingestellt sein. Nach Zugabe von DMSO sollte die Zellkonzentration 1x10^8/ml nicht überschreiten.
- Das Zielvolumen errechnete sich aus der Gesamtzellzahl dividiert durch 1x10^8/ml. Um dieses Volumen zu erreichen musste zunächst mittels Zentrifugation bei 600 x g über 15 min ohne Bremse Plasma abzentrigfugiert werden. Im Anschluss wurden die Beutel mit einem weiteren Transferbeutel in die Plasmapresse eingespannt. Daraufhin wurde das Plasma bis etwa 2 cm oberhalb der Leukozytenschicht abgepresst. Das verbliebene Transplantat wurde unter Schwenken durchmischt.
- Aus der Differenz des zuvor errechneten Zielvolumens und dem Gewicht des Transplantates, ließ sich die Menge an Plasma bestimmen, die per Benjamix und Perfusorspritze im Laminar Air Flow nun wieder zugegeben werden musste.

2.2.5 Ansetzen der DMSO Lösung

- Die Endkonzentration von DMSO sollte im Back-up zum Einfrieren 10 % betragen. So wurde eine DMSO Lösung mit 20 % in sterilen Glasflaschen angesetzt. Dabei richtete sich die Anzahl der benötigten Flaschen nach dem Volumen des Präparates. Für eine Flasche Einfrierlösung mischte man:

100 ml Plasmalyte, vorgekühlt bei 4°C
2,5 ml HSA 20 %
25,5 ml DMSO

- Die Lösung wurde bis zum Einfrieren bei 4°C zwischengelagert.

2.2.6 Überführen des Präparates in den Kryobeutel

- Das empfohlene Füllvolumen des 750 ml Kryobeutels umfasste ca. 80-190 ml, wobei die Beutel zur Sicherheit bis maximal 180 ml gefüllt wurden
- Alle nachfolgenden Schritte erfolgten unter Kühlung. Mit einer Perfusorspritze wurde zunächst das Knochenmark Präparat im Beutel vorgelegt und im Verhältnis 1:1 unter gleichmäßiger Bewegung des Beutels mit der DMSO Lösung gemischt. Hier war auf eine kontinuierliche Durchmischung zu achten, Luft musste aus dem Beutel entfernt werden.
- Zwischen Zugabe der Gefrierlösung und dem Einsetzen in die Gefrierkammer durften maximal 60 min vergehen.

2.2.7 Einfriervorgang

- Der Kryobeutel wurde in die Einfrierkassette gesetzt und schließlich in die Einfrierkammer des betriebsbereiten Gerätes überführt. Nach Beendigung des Programms „das Beste“ wurden die Kassetten bei Endtemperatur (-100°C) mittels einer Transporttonne in die Lagertonne verbracht.

2.3 Aufarbeitung der CML KM-Proben

2.3.1 Chemikalien, Geräte und Zubehör

2.3.1.1 Chemikalien

- RPMI 1640 Medium (Biochrom AG, Berlin)
- PBS
- Biocoll Separating Solution (Biochrom AG, Berlin)
- NaCl
- Flüssiger Stickstoff

2.3.1.2 Geräte und Zubehör

- 50 ml Tubes
- 15 ml Tubes
- Kleine Säge
- Haushaltssieb
- 5 und10 ml Pipetten
- Beckmann Zentrifuge

Tabelle 3 zeigt Daten der CML Patienten, deren Knochenmark in dieser Arbeit untersucht wurde. Zum einen werden Geschlecht, Alter des Patienten zum Zeitpunkt der Entnahme des Knochenmarks , das Stadium der Erkrankung zum Zeitpunkt der Entnahme und die Vorbehandlung des Patienten erläutert. Darüber hinaus wird Aussage über den Ph-Chromosom-Status und BCR-ABL Status des Patienten getroffen. In der letzten Spalte ist zusätzlich der Einfrierzeitpunkt des Knochenmarks dargelegt.

Tabelle 3: Knochenmark der Patienten mit CML

Knochenmark der Patienten mit CML							
	Geschlecht	Alter des Patienten zum Zeitpunkt der Entnahme	Stadium der Erkrankung zum Zeitpunkt der Entnahme	Vorbehandlung	Ph+ in FISH	BCR-ABL	Lagerungs-zeit der Knochenmark-probe bei -196 °C in Tagen
Probe 1	weiblich	47 Jahre	Chronische Phase	Imatinib	101/115	+	266
Probe 2	männlich	33 Jahre	Chronische Phase	Imatinib, Interferon α	27/100	+	455
Probe 5	männlich	39 Jahre	Chronische Phase	Imatinib, Hydroxyurea	74/100	+	1261
Probe 7	weiblich	61 Jahre	Chronische Phase	Imatinib, Interferon α, Hydroxyurea	32/100	+	1144
Probe 12	männlich	61 Jahre	Chronische Phase	Hydroxyurea	-		952
Probe 16	männlich	69 Jahre	unbekannt	unbekannt	unbe-kannt	un-be-kannt	2722

Ziel der Aufarbeitung war es, mit Hilfe eines Biocoll Gradienten mononukleäre Zellen von Erythrozyten, Thrombozyten und Granulozyten zu separieren. Darüber hinaus wurde das Knochenmark vom Einfriermedium DMSO und anderen störenden Bestandteilen wie Fett und Plasma befreit.
Das Knochenmark wurde bis zur Aufarbeitung in einem Kryobeutel gelagert, der mit einer einfachen Haushaltssäge geöffnet werden konnte. Das noch immer gefrorene Knochenmark, zwischen 10-20 g, wurde direkt in ein 50 ml Tube überführt, bis zur 30 ml Markierung mit PBS aufgefüllt und anschließend bei 4°C und 1000 Umdrehungen für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet bis zur 3 ml Markierung mit PBS aufgefüllt und resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde daraufhin durch ein Haushaltssieb in ein weiteres 50 ml Tube gegossen, um grobe Verunreinigungen und Zellschrott herauszufiltern. Des Weiteren wurde erneut ein Zentrifugationsschritt für 5 min bei 4°C und 1000 Umdrehungen vorgenommen und der Überstand verworfen.
In vier 15 ml Tubes wurden jeweils 9 ml Biocoll vorgelegt. Im Folgenden resuspendierte man das Pellet in 20 ml RPMI und überschichtete die Biocolllösung vorsichtig mit jeweils 5 ml des RPMI-Proben-Gemisches. Im nächsten Schritt wurde die Probe für 20 min bei 4°C und 2100 Umdrehungen ohne Bremse zentrifugiert.
Es entstand eine weiße Grenzschicht über der Biocolllösung, die vorsichtig mit einer 5 ml Pipette abgenommen werden konnte. Die abgenommenen Ringe der vier Tubes wurden in zwei 15 ml Röhrchen vereinigt und auf 10 ml mit PBS aufgefüllt.
Daran schloss sich eine Zentrifugation von mindestens 20 min bei 4°C und 1000 Umdrehungen an. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets in 7 ml PBS resuspendiert und nochmals für 5 min bei 4°C und 1000 Umdrehungen zentrifugiert.
Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1 ml NaCl resuspendiert. Dieser Schritt wurde vorgenommen, um jeweils 100 µl für eine Zellzählung, wie in Kapitel 2.5 beschrieben, und einen Ausstrich abnehmen zu können. Die restlichen 800 µl wurden bei 4°C und 1000 Umdrehungen für weitere 10 min einer Zentrifugation unterzogen, der Überstand wurde verworfen und das Pellet zunächst in flüssigem Stickstoff gefroren und im Anschluss bei -80°C bis zur Aufarbeitung der Gesamtproteine gelagert.

2.4 Aufarbeitung der Peripheren Blutstammzellen (PBSC) und des frischen Knochenmarks

Entsprach bis auf kleine Veränderungen der Aufarbeitung der KM-Backups.

2.4.1 Chemikalien, Geräte und Zubehör

2.4.1.1 Chemikalien

- RPMI 1640 Medium (Biochrom AG, Berlin)
- PBS
- Biocoll Separating Solution (Biochrom AG, Berlin)
- NaCl
- Flüssiger Stickstoff

2.4.1.2 Geräte und Zubehör

- 50 ml Tubes
- 15 ml Tubes
- Kleine Säge
- 5 und 10 ml Pipetten
- Beckmann Zentrifuge

2.4.2 Stammzellspender

Die peripheren Blutstammzellen wurden zwei gesunden Spendern nach Stimulation durch G-CSF entnommen und sollten ursprünglich einer allogenen Stammzelltransplantation dienen. Freundlicherweise wurden uns diese Proben von der II. Medizinischen Klinik und Poliklinik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf zur Verfügung gestellt.

Periphere Blutstammzellen gesunder Spender			
	Geschlecht	Alter des Spenders zum Zeitpunkt der Entnahme	Lagerungszeit der Peripheren Blutstammzellen bei –196 °C in Tagen
Probe 23	unbekannt	35 Jahre	37
Probe 24	unbekannt	53 Jahre	799

Tabelle 4: Spenderdaten der PBSC Gesund Spender

Ziel der Aufarbeitung war es mononukleäre Zellen mit Hilfe eines Biocoll Gradienten von Erythrozyten, Thrombozyten und Granulozyten aus den peripheren Blutstammzellen zu separieren. Darüber hinaus wurde sie von ihrem Einfriermedium DMSO befreit.
Die peripheren Blutstammzellen wurden bis zur Aufarbeitung in einem Kryobeutel gelagert, welcher mit einer einfachen Haushaltssäge geöffnet werden konnte. Die noch immer gefrorenen peripheren Blutstammzellen, zwischen 10-20 g, wurden direkt in ein 50 ml Tube überführt und bis zur 30 ml Markierung mit PBS aufgefüllt und anschließend bei 4°C und 1000 Umdrehungen für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen.
In vier 15 ml Tubes wurden jeweils 9 ml Biocoll vorgelegt. Im Folgenden resuspendierte man das Pellet in 20 ml RPMI und überschichtete die Biocolllösung vorsichtig mit jeweils 5 ml des RPMI-Proben-Gemisches. Im nächsten Schritt wurde die Probe für 20 min bei 4°C und 2100 Umdrehungen ohne Bremse zentrifugiert.

Es entstand eine weiße Grenzschicht über der Biocolllösung, die vorsichtig mit einer 5 ml Pipette abgenommen werden konnte. Die abgenommenen Ringe der vier Tubes wurden in zwei 15 ml Röhrchen vereinigt und auf 10 ml mit PBS aufgefüllt.
Daran schloss sich eine Zentrifugation von mindestens 20 min bei 4°C und 1000 Umdrehungen an. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets in 7 ml PBS resuspendiert und nochmals für 5 min bei 4°C und 1000 Umdrehungen zentrifugiert.
Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1 ml NaCl resuspendiert. Dieser Schritt wurde vorgenommen, um jeweils 100 µl für eine Zellzählung, wie in Kapitel 2.5 beschrieben, und für einen Ausstrich abnehmen zu können. Die restlichen 800 µl wurden bei 4°C und 1000 Umdrehungen für weitere 10 min einer Zentrifugation unterzogen, der Überstand wurde verworfen und das Pellet zunächst in flüssigem Stickstoff gefroren und im Anschluss bei -80°C bis zur Aufarbeitung der Gesamtproteine gelagert.

2.5 Zellzählung

2.5.1 Chemikalien, Geräte und Zubehör

2.5.1.1 Chemikalien

- Tryptenblau

2.5.1.2 Geräte und Zubehör

- Neubauer Zählkammer
- Lichtmikroskop
- Pipettenspitzen
- Pipette

Aus 100 µl Probe wurden 5 µl entnommen und mit 45 µl Tryptenblau gemischt. Daraus wurden nun wieder 5 µl entnommen und in die Neubauer Zählkammer überführt. Unter dem Lichtmikroskop konnte eine Zählung vorgenommen werden.

2.6 Gesamtproteine Probenaufarbeitung

2.6.1 Chemikalien, Geräte und Zubehör

2.6.1.1 Chemikalien

- CHAPS (Cholamidopropyldimethylammoniopropansulfat)-Lösung
  1. 900 µl Puffer B: 1,491 g KCl, 20 g Glycerin, 50 ml Phosphat Puffer (Phosphat Puffer: 33 ml 0,2 mol/l NaH_2PO_4 +67 ml 0,2 mol/l NaH_2PO_4 x 2 H_2O; pH 7,1) → ad 100 ml H_2O bidest
  2. 77 mg CHAPS (Serva, Heidelberg)
  → ad 1 ml H_2O bidest
- Puffer H1B: pro 2 ml Puffer wurde eine Tablette Complete™ (Protease Inhibitor Cocktail, Boehringer, Mannheim) verwendet
- Puffer H2
- Harnstoff (Biorad, München)
- 10% Dithiothreitol (DTT) (Biorad, München)
- Ampholyte (5-7)

2.6.1.2 Geräte und Zubehör

- Trockeneis
- Eiswasser
- Eppendorfcups
- Mini-Rührfische
- Glaspipetten
- Magnetrührer
- Zentrifuge

Mit den Proben aus aufgearbeitetem Knochenmark und PBSC wurde wie folgt verfahren:
Nach Zentrifugation wurde das Gewicht der Proben bestimmt, da sich das Volumen der weiteren Reagenzien daraus errechnet.
Das Volumen an benötigter CHAPS-Lösung in µl lies sich ermitteln, indem das Gewicht der Probe mit dem Faktor 1,4 multipliziert wurde. Die CHAPS-Reaktion lief in Eiswasser bei 4°C unter ständigem Rühren für 30 min ab.
Im nächsten Schritt fand für 45 min bei Raumtemperatur und ebenfalls unter ständigem Rühren nach Zugabe von Harnstoff eine Denaturierung der Proteine statt. Die Menge des Harnstoffs errechnete sich aus der Summe 1, die sich aus dem Probengewicht und dem Volumen der CHAPS-Lösung zusammensetzte. Die Summe 1 wurde dann mit dem Faktor 1,08 multipliziert.
Nach Beendigung der Reaktion wurden die Proben für 10 min bei 14000 Umdrehungen und Raumtemperatur zentrifugiert.
Der Überstand wurde abgenommen, dessen Gewicht bestimmt und anschließend in ein Eppendorfcup überführt. Das Pellet wurde verworfen.
Das Volumen des benötigten DTT in µl ergab sich aus dem Gewicht des Überstandes, das mit dem Faktor 0,1 multipliziert wurde.
Das Volumen der Ampholyte errechnete sich in selber Weise wie das Volumen des DTT.
Nach Zugabe des DTT und der Ampholyte wurde die Probe mit einem Plastikspatel durchmischt
Bis zur weiteren Verwendung in der 2-DE wurden die aufgearbeiteten Proteine bei -80°C eingefroren.

2.7 Quantitative Proteinbestimmung

2.7.1 Chemikalien, Geräte und Zubehör

2.7.1.1 Chemikalien

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

2.7.1.2 Geräte und Zubehör

- Vortex Genie 2^{TM} (Bender & Hobein, Zürich Schweiz)
- Kühlzentrifuge (Hettich EBA 12/R, Tuttlingen)
- Spectrophotometer DU-640 (Beckmann, USA)
- Küvetten aus Kunststoff (Schubert und Weiss, Schwandorf/München)
- 2 ml Eppendorf Cups (Eppendorf, Hamburg)

Prinzip der Proteinbestimmung war die Komplexbildung der Proteine mit Kupferionen, wobei mit Hilfe eines Farbreagenz die freien Kupferionen bestimmt wurden. So war der Proteingehalt der Probe umgekehrt proportional zur Farbintensität der Probe. Die Bestimmung erfolgte anhand einer Eichkurve mit einem BSA-Standard Protein, sowohl die BSA-Standard-Bestimmungen als auch die Bestimmungen der Proteinproben wurden zweifach durchgeführt.
Die Proteinbestimmung erfolgte mit dem Non-Interfering Protein Assay Kit nach Angaben des Herstellers. In ein Eppendorf Cup wurde jeweils 10 µl der Probe vorgelegt. Nach Zugabe von 500 µl UPPA-1 Lösung und Durchmischung auf dem Vortex erfolgte eine Inkubation für 2-3 min bei Raumtemperatur. Im Anschluss an die Zugabe von 500 µl UPPA-2 Lösung wurde eine Zentrifugation mit 10000 Umdrehungen für 5 min durchgeführt. Nach Verwerfen des Überstands wurden dem Präzipitat 100 µl Copper Solution Reagent-1 und 400 µl deionisiertes Wasser hinzugefügt und das Pellet resuspendiert. Darauf folgte eine Zugabe von 1 ml Reagent-2 und eine sofortige Durchmischung auf dem Vortex. Die Extinktion konnte nach 15-20 min im Photometer bei 480 nm mit Wasser als Referenz bestimmt werden.

2.8 Zweidimensionale Gelelektrophorese (2-DE)

2.8.1 Chemikalien, Geräte und Zubehör der 1. und 2. Dimension

2.8.1.1 Chemikalien für die 1. Dimension

- 5,4 g Harnstoff, Endkonzentration 9 mol/l (Bio-Rad, München)
- 250 µl APS, Endkonzentration 0,02%
- Ampholyte 1+1+4

1 Teil Pharmalyte, pH 3-10 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
1 Teil Ampholine, pH 3,5-9,5 (Amersham Phamacia Biotech, Freiburg)
4 Teile Servalyte, pH 5-7 (Serva, Heidelberg)

- 4,75 ml Gellösung (angegeben sind die Endkonzentrationen im fertigen Gel)

5% Glycerin
3,5% Acrylamid (Bio-Rad, München)
0,3% N,N`Methylenbisacrylamid (Bio-Rad,München)
0,06% TEMED

Laufpuffer

- Anodenpuffer: Puffer obere Kammer (3 mol/l Harnstoff)

45 g Harnstoff
12,5 ml H_3PO_4
→ ad 250 ml H_2O bidest

- Kathodenpuffer: Puffer untere Kammer (9 mol/l Harnstoff)

1620 g Harnstoff
120 ml Glycerin
150 ml Ethylendiamin
→ ad 3 l H_2O bidest

- 5 mol/l Harnstofflösung (zum Überschichten der aufgetragenen Proben)

Stammlösung aus 6 g Harnstoff und 1 g Glycerin (ad 19 ml H_2O bidest), davon wurden 3,8 ml abgenommen und mit 0,2 ml Ampholingemisch 1+1+4 versetzt

2.8.1.2 Geräte und Zubehör für die 1. Dimension

- Mikroliterspritze, 25 und 50 µl (neoLab Migge, Frickenhausen)
- Gewebekulturschalen, 60 mm (Greiner bio-one, Frickenhausen)
- Laufkammern für die 1. und 2. Dimension Iso-Dalt Elektrophoresis System
- Borsilikat-Glasröhrchen: 18, 20 cm Länge, innerer Durchmesser 1,5 mm
- Gießapparatur für die 1. Dimension
- Spannungsgerät Elektrophoresis Power Supply EPS 3500 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
- 4 ml Spritze

Die Auftrennung der Proteine in der 1. Dimension erfolgte nach ihrem isoelektrischen Punkt in Röhrchengelen. Mit Hilfe von Ampholyten wurde ein pH-Gradient aufgebaut. Darin wanderten die durch Harnstoff denaturierten Proteine, bis zu ihrem isoelektrischen Punkt. Eine anodische Fokussierung wurde vorgenommen.
Die Röhrchengele wurden in der Länge 15 cm in einer speziell dafür vorgesehenen Gießapparatur gegossen.
Harnstoff, die in 2.8.1.1 beschriebene Gellösung und die Ampholyte wurden unter Wärme aufgelöst und für 25 s entgast, um einer Bläschenbildung im Gel vorzubeugen. Das APS musste ebenfalls für eine min entgast werden. Nach Zugabe des APS wurde die Lösung zügig in der 4 ml Spritze aufgezogen und in die Gießapparatur überführt. Nach etwa 30 min konnten die nun auspolymerisierten Gele mit etwa 5 µl 5 mol/l Harnstofflösung überschichtet werden.
Daraufhin wurden die Röhrchengele in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur über Nacht gelagert.
Am darauffolgenden Tag wurde die Geloberfläche aller Röhrchengele mit H_2O bidest gespült und anschließend in die Iso-Dalt Laufkammmer eingesetzt.
Die untere Kammer enthielt einen Kathodenpuffer, eine 9 mol/l Harnstoff-Lösung.
Auf die Geloberfläche wurde nun mit einer Mikrolitерspritze eine definierte Menge der aufgearbeiten Gesamtproteinprobe aufgetragen. Daraufhin wurde die Probe zunächst mit etwa 5 µl 5 mol/l Harnstofflösung und schließlich mit dem Anodenpuffer überschichtet. Die obere Kammer wurde mit dem Anodenpuffer bis zum Bedecken aller Röhrchen befüllt.
Nach Anschluss an die Spannungsquelle wurde eine anodische Fokussierung, wie in Tabelle 4 dargestellt, durchgeführt.

1 h bei 100 V
1 h bei 200 V
18 h bei 450 V
30 min bei 600 V
30 min bei 900 V
5 min bei 1400 V

Tabelle 5: Bedingungen der anodischen Fokussierung

Nach Beendigung des Laufs wurden die Röhrchengele mittels einer mit H_2O bidest gefüllten Spritze in Gewebekulturschalen gedrückt und das basische Ende darauf markiert. Die Röhrchengele wurden nun bei -80° C bis zu ihrer Verwendung in der 2. Dimension gelagert.

2.8.1.3 Chemikalien für die 2. Dimension

- Puffer D

272,5 g Tris Base, ad 1,5 l H_2O bidest, pH mit HCl auf 8,6 eingestellt, für das Spülen der Geloberfläche 1:4 verdünnt

- Äquilibrierungspuffer pH 6,8

25 ml Glycerin
0,33 g DTT
0,5 g SDS
3,8 g Tris Base
Spatelspitze Bromphenolblau
→ ad 250 ml H_2O bidest

- Agarose

0,725 g Tris Base
3,75 g Glycin
0,25 g SDS
1,25 g Agarose (Biorad, München)
→ ad 250 ml H_2O bidest
→ Die Lösung wurde aufgekocht, aliquotiert und bei -20°C eingefroren

- Polyacrylamidlösung 10 %

227,3 ml 30 %ige Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung, 37, 5:1 (Serva; Heidelberg)
175 ml Puffer D
7 ml 10 %ige SDS-Lösung
1,2 ml 10 %iges TEMED
7 ml 10 %iges APS
282,53 ml H_2O bidest

- Polyacrylamidlösung 16 %

363,64 ml 30 %ige Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung, 37, 5:1 (Serva; Heidelberg)
175 ml Puffer D
7 ml 10 %ige SDS-Lösung
0,25 ml 10 %iges TEMED
3,5 ml 10 %iges APS
94,61 ml H_2O bidest
56 ml Glycerin

- Laufpuffer

44,9 g Tris Base
232,3 g Glycin
15,5 g SDS
→ ad 15 l H_2O bidest

2.8.1.4 Geräte und Zubehör für die 2. Dimension

- Laufkammer für die 2. Dimension Iso-Dalt Elektrophoresis System (Hoefer Scientific Instruments, CA, USA)
- Iso-Dalt Gradientenmischer
- Gelkassetten, 16x16x0,15 cm
- Gelkassettenständer
- Spannungsgerät Elektrophoresis Power Supply EPS 3500 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)

In der 2. Dimension wurden die Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Das elektrische Feld befand sich senkrecht zum Feld der isoelektrischen Fokussierung.
Das Gießen der Gele fand mit Hilfe des Iso-Dalt Gradientenmischers statt, der ein Polyacrylamidverhältnis von 10-16 % in den Gelen erzeugte. Die Flachgele wurden aus dem Gelkassettenständer befreit und anschließend von sämtlichen Acrylamidresten gesäubert.
Bevor das Röhrchengel der 1. Dimension auf die obere Längsseite des Flachgels aufgebracht werden konnte, musste die Oberfläche jeweils zweimal mit Puffer D gespült werden. Die Röhrchengele wurden noch in der Gewebekulturschale vollständig mit dem Äquilibrierungspuffer bedeckt und für 5 min inkubiert. Der Puffer wurde daraufhin mit einer Pipette abgesaugt. Im nächsten Schritt wurde das Röhrchengel mit dem sauren Ende beginnend von links nach rechts blasenfrei auf das Flachgel aufgetragen. Mit der flüssigen, etwa 60°C warmen Agarose konnte eine Fixierung des Röhrchengels erreicht werden.
In die Laufkammer der 2. Dimension wurde der gelöste Laufpuffer gefüllt, die Gummidichtungseinsätze an der roten Markierung und darauffolgend die Gelkassetten mit der festen Agarose eingesetzt. Dann wurde die Iso-Dalt Laufkammer an das Spannungsgerät angeschlossen und pro Gel etwa 20 mA Stromstärke angelegt. Zudem kühlte die Kammer den Laufpuffer auf etwa 12°C. Ein Lauf in der 2. Dimension dauerte etwa 18 h, variierte aber in Abhängigkeit von der Anzahl der Gele.
Nach Beendigung des Laufs wurden die Gele vorsichtig aus ihren Kassetten befreit und direkt in die Fixierlösung der jeweiligen Färbemethode überführt.

2.9 Proteinanfärbung im Gel

2.9.1 Silberfärbung

2.9.1.1 Chemikalien

Für 3 Gele

- Fixierlösung

50 % Ethanol, 1000 ml
10 % Eisessig, 200 ml
40 % H_2O bidest, 800 ml

- Inkubationslösung

30 % Ethanol, 300 ml
0,5 mol/l Natriumacetat, 41 g
0,5 % Glutaraldehyd, 20 ml
0,2 % Natriumthiosulfat 2 g
→ ad 1000 ml H_2O bidest

- Silberlösung

0,1 % Silbernitrat, 1 g
0,01 % Formaldehyd (37 %), 288 µl

- Entwicklerlösung

2,5 % Natriumcarbonat, 25 g
0,05 mmol/l Natriumthiosulfat, 12 mg
0,01 % Formaldehyd (37 %), 288 µl
→ Die Lösung wurde mit H_2O bidest auf 1000 ml aufgefüllt und mit Natriumhydrogencarbonat auf pH 11,3 eingestellt

- Stopplösung

0,5 mol/l EDTA, 37,2 g
0,02% Thimerosal (Sigma- Aldrich, Deisenhofen), 400 mg
→ ad 2000 ml H_2O bidest

2.9.1.2 Geräte und Zubehör

- Schüttler

Nach der 2. Dimension wurden die Gele direkt in Fixierlösung überführt und über Nacht bei 4°C gelagert. An die Fixierung schloss sich eine Inkubation der Gele mit 300 ml Inkubationslösung für zwei h auf dem Schüttler an. Der Inkubation folgten drei Waschschritte mit 500 ml H_2O bidest für jeweils 20 min. Im Anschluss folgte die Färbung der Gele in 300 ml Silberlösung für 30 min in abgedunkelten Schalen, um ein zu starkes Nachdunkeln der Gele zu vermeiden.
Außerdem folgte ein Spülvorgang mit 500 ml H_2O bidest für maximal 30 s.
Die Entwicklung der Gele wurde unter Sichtkontrolle und leichtem Schwenken vorgenommen. Die Entwicklungszeit war stark abhängig von der aufgetragenen

Proteinmenge und der Dicke des Gels, lag aber meist zwischen zwei bis fünf min. Nach gewünschter Farbintensität konnten die Gele für 15 min in 250 ml Stopplösung überführt werden, wobei darin ein leichtes Nachdunkeln der Gele die Regel war.
Nach einem Wechsel der Stopplösung wurden die Gele für weitere 60 min inkubiert. Im letzten Schritt wurden die Gele für fünf min in H_2O bidest auf dem Schüttler gewaschen und daraufhin über Nacht in frischem H_2O bidest bei Raumtemperatur aufbewahrt. Am nächsten Tag wurden die Gele in Schlauchfolie luftdicht verschweißt und konnten so bei 4°C dauerhaft gelagert werden.

2.9.2 Coomassie Brilliant-Blau (CBB)

2.9.2.1 Chemikalien

Fixierlösung
- 400 ml H_2O bidest
- 500 ml Methanol
- 100 ml Eisessig

Färbelösung
- 0,5 g = 20 Tabletten Coomassie Brilliant Blue R250 (Merck 102085)
- 500 ml Methanol
- 400 ml H_2O bidest
- 100 ml Eisessig

→ Die Tabletten wurden unter Rühren in Methanol gelöst und anschließend filtriert. Nach Zugabe von H_2O bidest und Eisessig wurde die Lösung ein zweites Mal durch das selbe Filter filtriert.

Entfärberlösung
- 250 ml Ethanol
- 4125 ml H_2O bidest
- 625 ml Eisessig

Nach dem Lauf der 2. Dimension wurden die Gele in die Fixierlösung überführt und darin fünf h inkubiert. Anschließend wurden die Gele über Nacht auf dem Schüttler in der Färbelösung gefärbt.
Bei der Entfärbung der Gele wurde 4-5 x die Entfärberlösung ausgetauscht und jeweils ein Liter der Lösung verwendet. Ziel der Entfärbung war, dass sich keinerlei Farbwolken mehr von der Oberfläche lösten. Dies beanspruchte sechs h.
Im letzen Schritt schüttelte man die Gele für 30 min in 7 % Eisessiglösung und lies diese über Nacht einwirken. Am nächsten Tag konnten die Gele in Schlauchfolie luftdicht verschweißt werden.

2.10 Proteinidentifizierung mit MALDI-TOF Massenspektrometrie

Eine etablierte Methode zur Identifizierung von Proteinspots stellte die MALDI (matrix-assisted laser desorption ionization) -TOF (time of flight) Massenspektrometrie dar. In der zweidimensionalen Gelelektrophorese wurden die Proteine separiert und mit Hilfe der Coomassie-Brilliant-Blau Färbung gefärbt. Im Anschluss wurden die selektierten Proteinspots aus dem CBB-Gel ausgestanzt und in ein Eppendorf-Cup überführt.
Die Aufbereitung der Proben für die MALDI-TOF Massenspektrometrie, also eine Fragmentierung des Proteins durch Trypsin, und die massenspektrometrische Analyse übernahm freundlicherweise das Zentrallabor für Proteinanalytik des Adolf-Butenandt-Instituts in München.
In der MALDI-TOF Massenspektrometrie wurden die tryptischen Peptide des Proteinspots zunächst mittels eines Laserpulses ionisiert[44]. Durch Anlegen einer Spannung wurde sie nun in Richtung eines Detektors beschleuningt. Aus der Flugzeit der einzelnen Peptide konnte ein Massenfingerabdruck abgeleitet werden, der über eine Sequenzdatenbank zur Identifzierung des Proteins führte.

3 Ergebnisse

3.1 Vergleichende Proteomanalyse

3.1.1 Analyse der zweidimensionalen Gele

3.1.1.1 Knochenmark von gesunden Spendern

Es wurde Knochenmark von drei gesunden Spendern wie in Kapitel 2.4 beschrieben für die Elektrophorese aufgearbeitet und mit der Silberfärbung (siehe Kapitel 2.9.1) gefärbt. Allerdings konnten trotz intensiver Bemühungen mit verschiedenen Serien keine verwertbaren Ergebnisse erzielt werden. Aufgrund der schwach ausgeprägten Proteinmuster war eine Analyse und ein Vergleich mit anderen Gelen nicht durchführbar. Wie auf Abbildung 1 ersichtlich, sind auf dem Gel nur wenige Proteinspots zu erkennen, die auch in ihrer Intensität nur schwach ausgeprägt sind. Der Pfeil markiert einen Bereich, in dem Proteine mit niedrigem Molekulargewicht zu liegen kommen. In diesem Gel sind an der markierten Stelle keine Spots vorhanden.

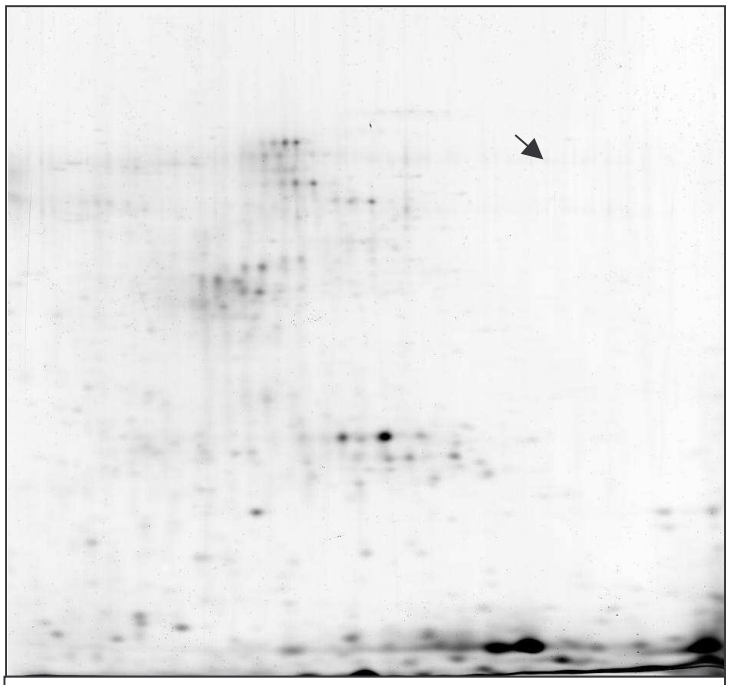


Abbildung 1: Probe 34.1, KM-Gesund

3.1.1.2 Knochenmark von CML-Patienten

Zunächst wurde Knochenmark von 15 Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie wie in Kapitel 2.3 beschrieben für die Elektrophorese aufgearbeitet. Mit Hilfe der 2-DE wurden die Proteine der Proben aufgetrennt und schließlich mit einer Silberfärbung (siehe Kapitel 2.9.1) bearbeitet. Die Separation dieser 15 Proben gestaltete sich äußerst schwierig. In Tabelle 23 des Kapitels 4.6.1 sind die neun Proben dargestellt, die aufgrund minderwertiger Ergebnisse, nicht in die Auswertung mit einbezogen werden konnten. Welche Faktoren dazu beigetragen haben könnten, wird in Kapitel 4.6.1 erörtert. Bei sechs der fünfzehn Proben, dargestellt in Tabelle 3 des Kapitels 2.3, gelang es aber, verwertbare Gele zu produzieren, die eine vergleichende Analyse zuließen. Diese waren schließlich Grundlage der vergleichenden Proteomanalyse.

3.1.1.3 Periphere Blutstammzellen gesunder Spender

Aufgrund der mangelhaften Beurteilbarkeit der in Kapitel 3.1.1.1 erwähnten gesunden KM-Gele musste das Konzept neu überarbeitet werden. Anstelle der gesunden Knochenmarksproben wurde auf gesunde periphere Blutstammzellen zurückgegriffen. Diese ließen sich problemlos in der 2-DE auftrennen und zwei Proben entsprachen in der Verteilung der Proteinspots dem Muster des CML-Knochenmarks. Eine Vergleichbarkeit der Gele konnte somit gewährleistet werden.

3.1.2 Optische Auswertung

Nach Auftrennung der Proteine mittels der zweidimensionalen Gelelektrophorese konnte jedem durch Silberfärbung sichtbar gemachten Spot ein isoelektrischer Punkt und sein entsprechendes Molekulargewicht zugeordnet werden. Des Weiteren wurde die Größe und die Intensität der Proteinspots beurteilt und in drei Kategorien eingeteilt: erhöht, erniedrigt oder unverändert im Vergleich zum Gesunden. Dies geschah unter Berücksichtigung des sogenannten Backgrounds, der durch die Silberfärbung zustande kam und auf den Gelen unterschiedlich ausgeprägt war.
In Abbildung 2 sind die nach isoelektrischem Punkt (pI) und Molekulargewicht (MW) aufgetrennten Proteine der Probe 24 PBSC Gesund zu erkennen. Das Molekulargewicht, angegeben in kDa, nimmt von oben nach unten ab, der isoelektrische Punkt steigt von links nach rechts.

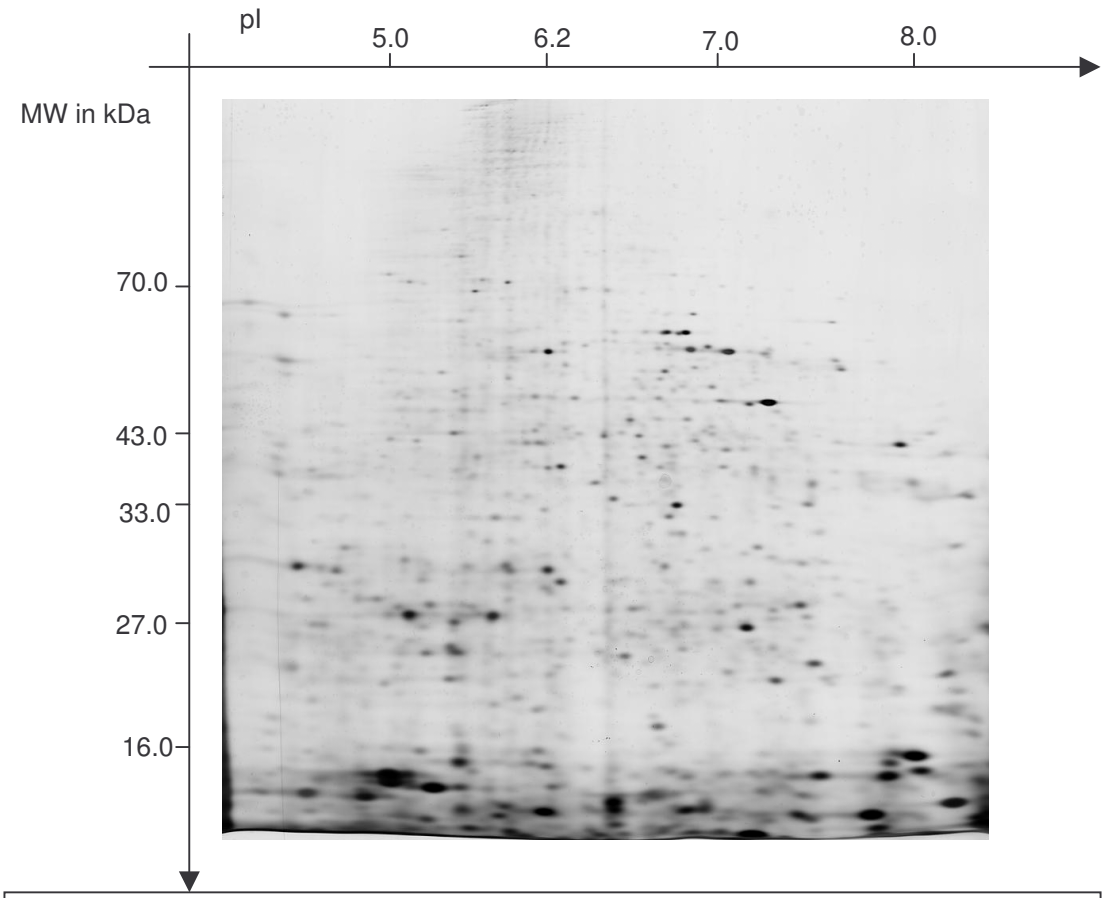
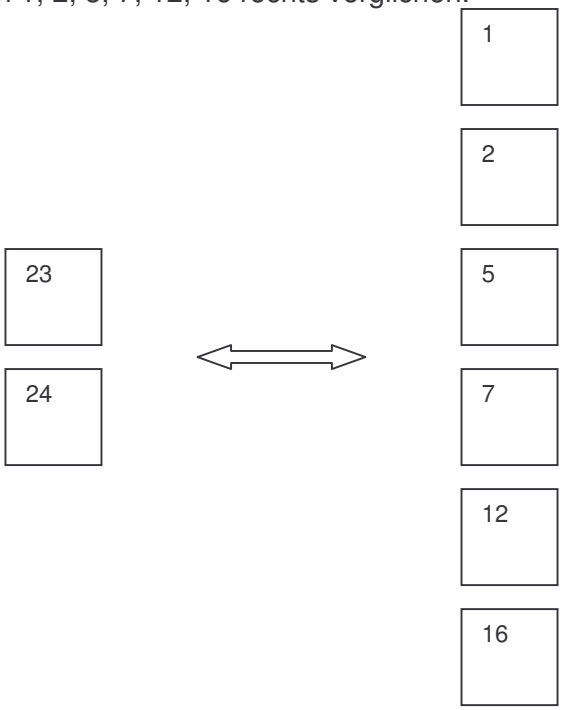


Abbildung 2: Probe 24.1, PBSC-Gesund. Zweidimensionales Gel nach Silberfärbung

Voraussetzung für die optische Auswertung ist neben der Vergleichbarkeit der Proteinmuster eine ähnliche Konzentration der Proteine, die sich in der Intensität der Gele widerspiegelt. Diesen Voraussetzungen entsprachen sechs Gele der CML-Reihe, sowie zwei Gele der gesunden PBSCs.

Im nächsten Schritt wurden die gesunden PBSC-Gele 23 und 24 links mit den CML-Gelen 1, 2, 5, 7, 12, 16 rechts verglichen.



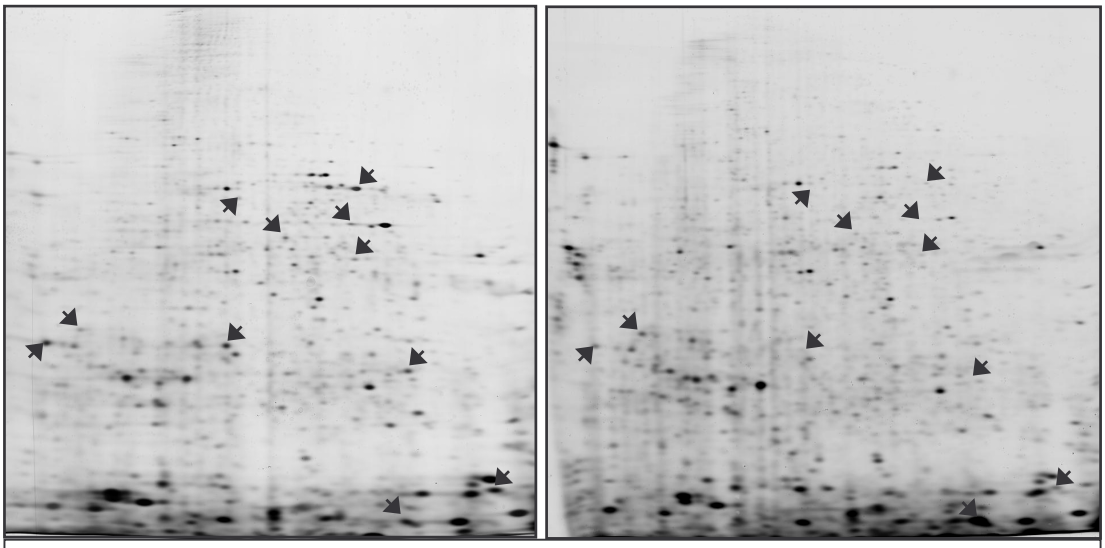


Abbildung 3: Vergleich des PBSC Gels 24 (links) mit dem CML Gel 5 (rechts). Die mit Pfeilen markierten Spots fallen durch eine veränderte Konzentration auf.

Daran schloss sich ein Quervergleich der CML-Gele 1, 2, 5, 7, 12, 16 an. Dabei wurden alle CML Gele miteinander verglichen. Nur Proteinspots, die in mindestens fünf der sechs CML Gelen Veränderungen aufwiesen, wurden in die computergestützte Auswertung mit Topspot miteinbezogen.

3.1.3 Auswertung mit Topspot

In der optischen Auswertung, siehe Kapitel 3.1.2, wurden Spots selektiert, deren Intensität nun mit Hilfe des Programms Topspot auf allen Gelen bestimmt werden konnte. In Abbildung 4 ist das Gel der Probe 24 PBSC Gesund nach Bearbeitung mit Topspot dargestellt. Die Intensität bezeichnet das Spotvolume, das sich aus der Summe der Grauwerte aller zum Spot gehörenden Pixel errechnen lässt.

Um alle Gele miteinander vergleichen zu können, wurden sie normalisiert, also anhand von 15 Kontrollspots auf ein Mastergel angeglichen. Aufgrund der mittleren Proteinkonzentration auf dem CML-Gel 5.1 wurde es als Mastergel ausgewählt.

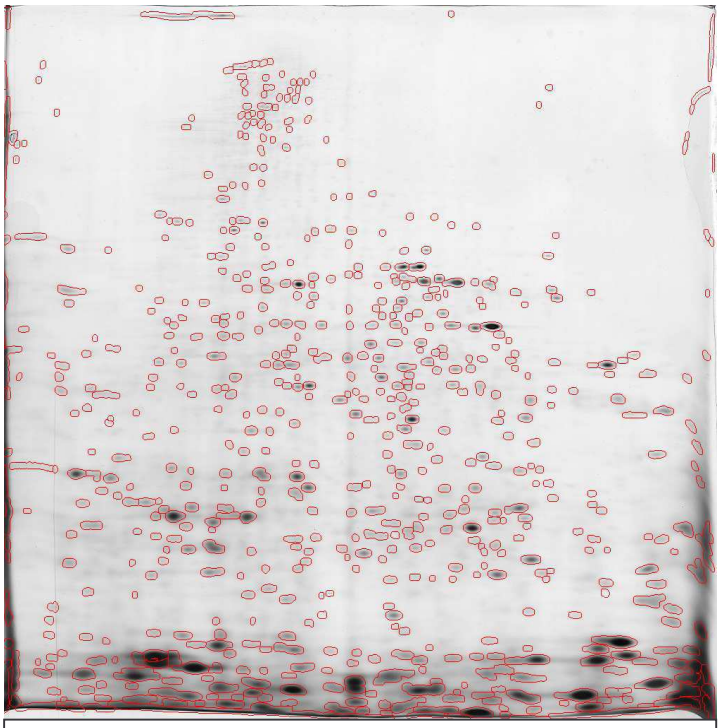


Abbildung 4: 2-DE-Gel der Probe 24 PBSC Gesund nach Scannen mit Topspot

Ausgewählte Spots, die sich in allen sechs CML Gelen in veränderter Konzentration zu den beiden gesunden Gelen zeigten, wurden der Reihe A zugeordnet. Spots, die auf fünf der sechs Gele veränderte Konzentrationen aufwiesen, wurden der Reihe B zugeordnet.

3.1.4 Identifizierung der Proteine durch Massenspektrometrie

Um eine massenspektrometrische Analyse durchführen zu können mussten die Gele mit der in Kapitel 2.9.2 beschriebenen Coomassie Färbung bearbeitet werden. Die Anfärbung der Gele mit CBB erfordert höhere Proteinkonzentrationen, folglich wurde ein Probenauftrag von 50 µl vorgenommen. Um eine möglichst eindeutige Identifizierung der Spots gewährleisten zu können, stammten die Gele aus dem selben Lauf der zweidimensionalen Gelelektrophorese wie die in der optischen Auswertung verwendeten Silbergele. Die zu untersuchenden Spots der Reihe A und B wurden aus Gelen ausgestanzt. Die Analyse der identifizierten Spots erfolgte freundlicherweise im Butenandt Institut, Zentrallabor für Proteinanalytik in München.

Die Proteinidentifizierung erfolgte anhand der jeweiligen Massenspektren (siehe Abbildung 5) über das Mascot databank Research Software Programm. Die Verteilung des Peptidmuster wurde mit Hilfe von Datenbanken abgeglichen und eine Identifizierung wurde bei einem Score von über 71 als sicher angenommen.

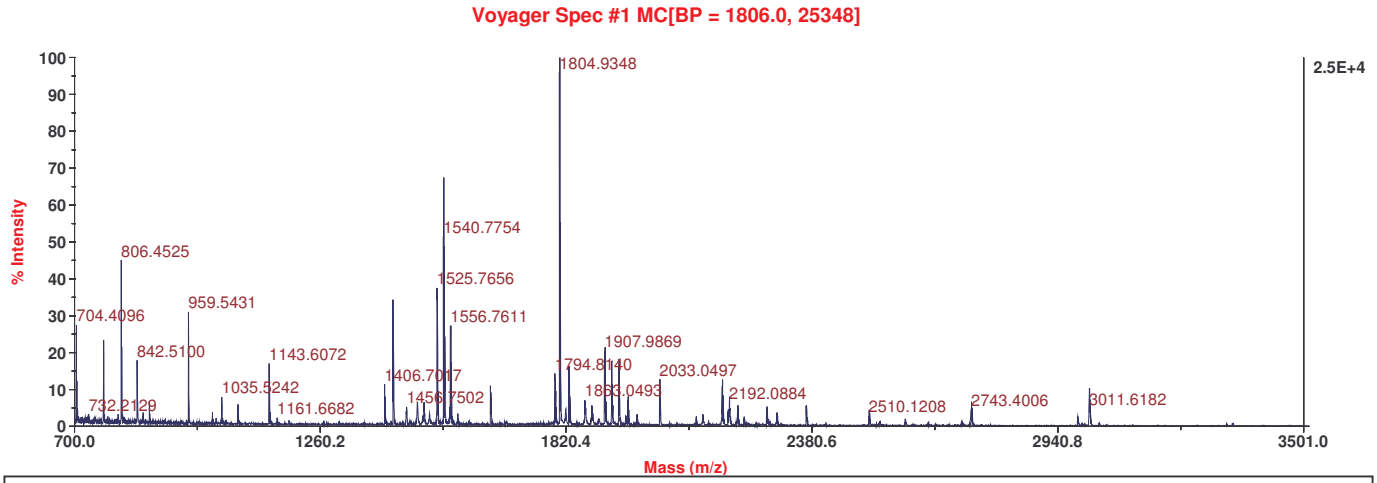


Abbildung 5: MALDI-Massenspektrum nach tryptischem Verdau am Beispiel des Spots A2, der α-Enolase. Jeder Peak kennzeichnet ein Peptid mit einer bestimmten Molekülmasse. Die Größe des Peaks gibt Aufschluss über das quantitative Vorkommen des Peptids im zu untersuchenden Protein. Die x-Achse kennzeichnet Masse zu Ladung in m/z, die y-Achse die Intensität in Prozent.

3.2 Ergebnisse der Reihe A

3.2.1 Darstellung der Spots A1und A2

In Abbildung 6 sind die Spots A1und A2 auf den Gelen der Probe 23 und 24 der PBSCs Gesund den Spots A1 und A2 auf den Gelen der Proben 5 und 7 der KM CML gegenüber gestellt. Dies geschieht zur Vereinfachung anhand derselben Gele für den Spot A8 in Kapitel 3.2.2 und den Spot A11 in Kapitel 3.2.3.

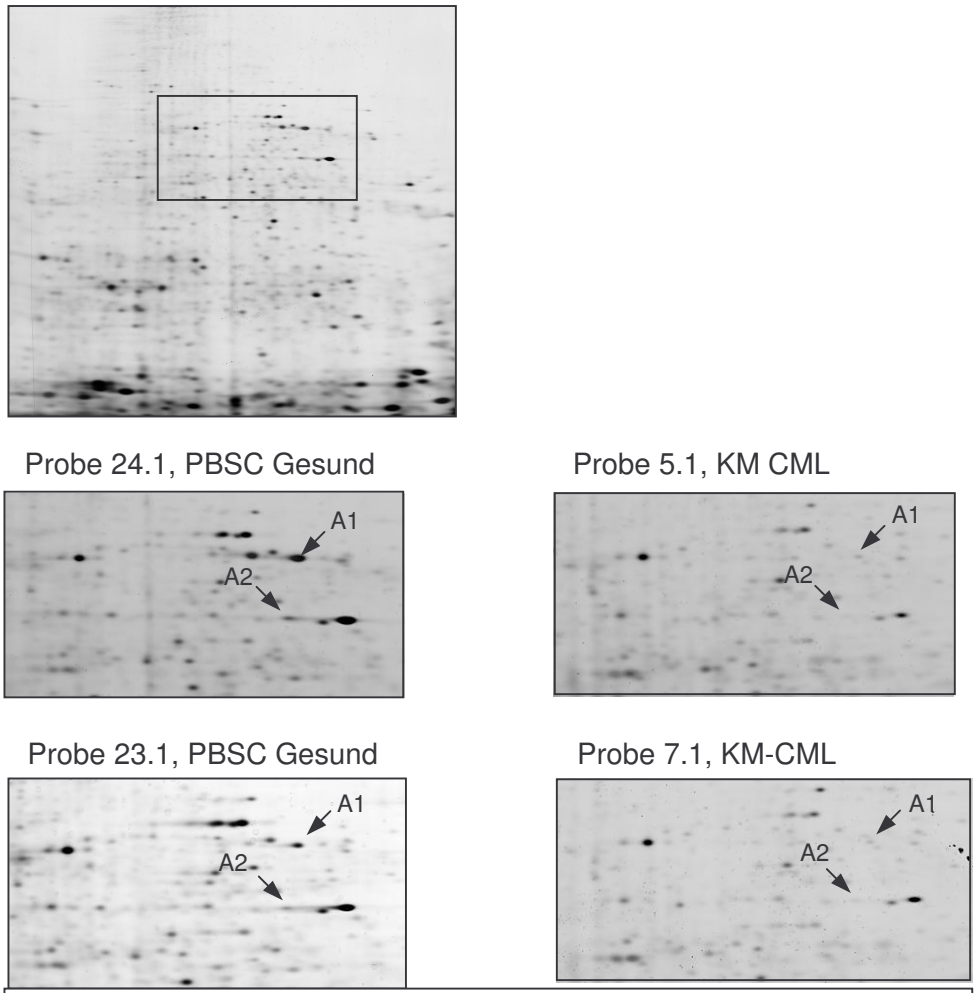


Abbildung 6: Oben links: Probe 24.1, PBSC Gesund. Unten: Ausschnitte der Gele 24.1, 23.1, 5.1, 7.1. In den Gelen 5.1 und 7.1 sind die Spots A1 und A2 im Vergleich zu den gesunden Kontrollen in erniedrigter Konzentration zu erkennen.

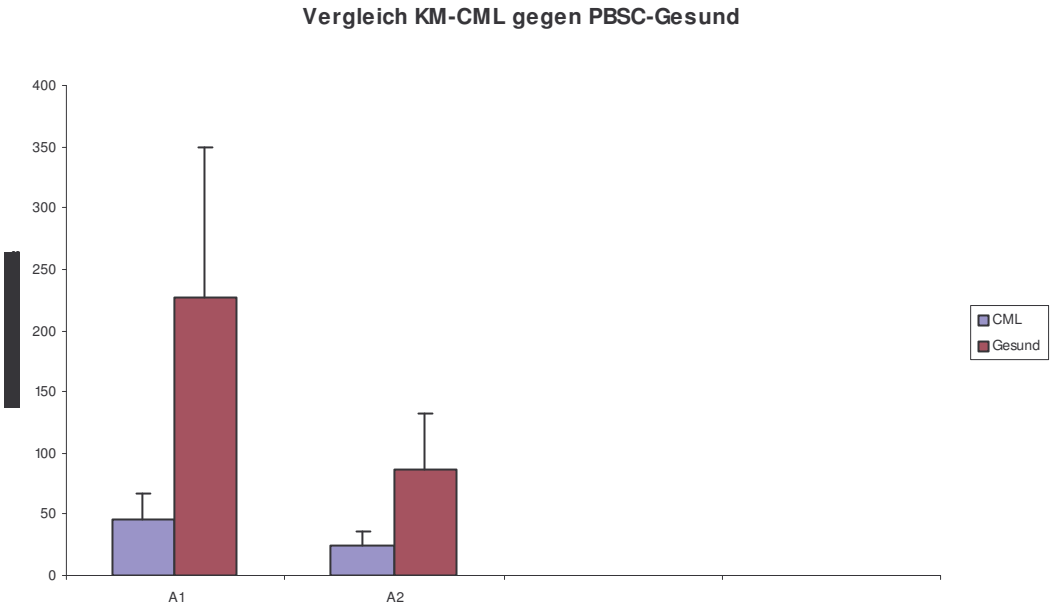


Abbildung 7: Darstellung der relativen Intensität (y-Achse) der Spots A1und A2 auf den zwei Gelen der gesunden PBSCs (jeweils rechter Balken) im Vergleich zu den sechs KM CML Gelen (jeweils linker Balken)

Spotnr.	Intensität des Spots auf Gel								
	KM CML 1.3	KM CML 2.1	KM CML 5.1	KM CML 7.1	KM CML 12.2	KM CML 16.1		PBSC gesund 24.1	PBSC gesund 23.1
A1	85.6	44.7	27.2	27.9	42.2	48.2		313.2	141.7
A2	21.3	18.2	18.5	17.1	42.4	34.1		118.6	53.1

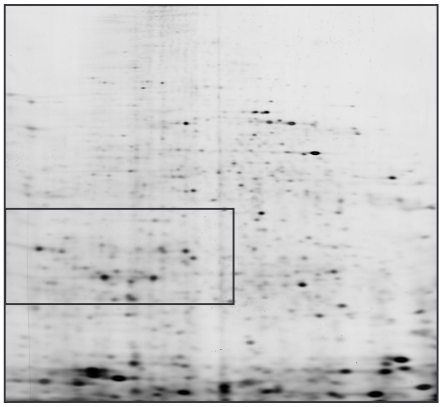
Tabelle 6: Intensität (Topspot) der Spots A1 und A2 auf den KM CML Gelen auf der linken und den PBSC Gesund Gelen auf der rechten Seite.

Tabelle 7 zeigt unter Daten der 2-DE die Ergebnisse der optischen Auswertung der Gele für Spot A1 und A2 auf der linken Seite. Auf der rechten Seite sind die Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse der Spots A1 und A2 dargelegt. Spot A1 wurde als Fibrin beta, Spot A2 als α-Enolase identifiziert.

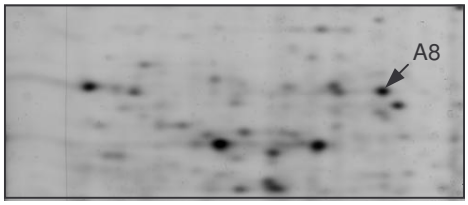
Daten 2-DE			Massenspektrometrische Daten			
Spotnr.	MW [kDa]/ pI des Spots	Intensität im Vergleich zum Gesunden	Identifiziertes Protein	Score	MW [kDa]/ pI berechnet	Accession (Swissprot)
A1	57 /7.1	Erniedrigt in 6/6 Gelen	Fibrin beta	182	50.7/7.95	P02675
A2	45 /7.0	Erniedrigt in 6/6 Gelen	α-Enolase	185	42.4/6.97	P06733

Tabelle 7: Identifizierte Proteine der Spots A1 und A2

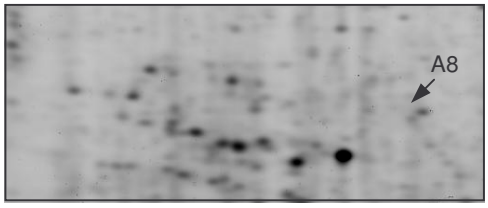
3.2.2 Darstellung des Spots A8



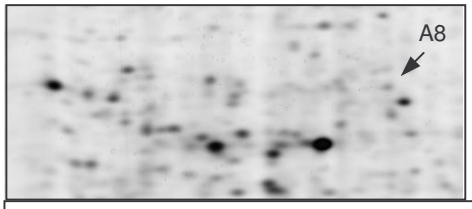
Probe 24.1, PBSC Gesund



Probe 5.1, KM CML



Probe 23.1, PBSC Gesund



Probe 7.1, KM CML

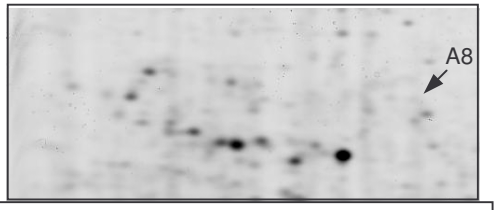


Abbildung 8: Oben links: Probe 24.1, PBSC Gesund. Unten: Ausschnitte der Gele 24.1, 23.1, 5.1, 7.1. In den Gelen 5.1 und 7.1 ist der Spot A8 im Vergleich zu den gesunden Kontrollen in erniedrigter Konzentration zu erkennen.

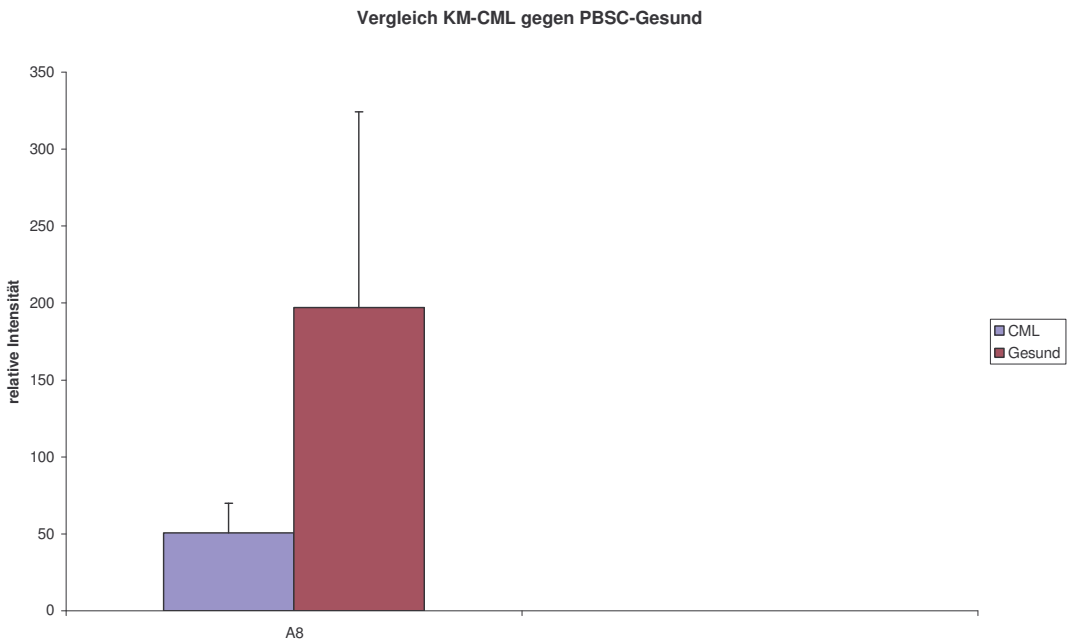


Abbildung 9: Darstellung der relativen Intensität (y-Achse) des Spots A8 auf den zwei Gelen der gesunden PBSCs (rechter Balken) im Vergleich zu den sechs KM CML Gelen (linker Balken).

Spotnr.	Intensität des Spots auf Gel								
	KM CML 1.3	KM CML 2.1	KM CML 5.1	KM CML 7.1	KM CML 12.2	KM CML 16.1		PBSC gesund 24.1	PBSC gesund 23.1
A8	49.4	60.9	28.3	51.8	81.1	32.9		287.0	107.1

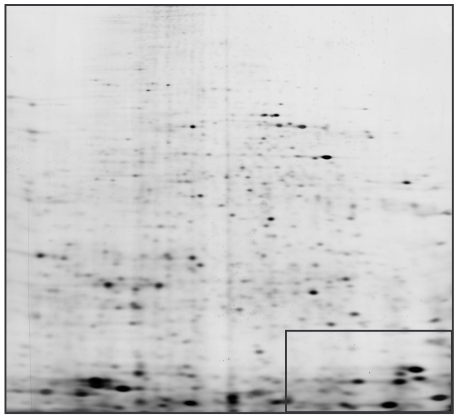
Tabelle 8: Intensität (Topspot) des Spots A8 auf den KM CML Gelen auf der linken und den PBSC Gesund Gelen auf der rechten Seite.

Der Spot A8 wurde als Fibrinogen Gamma Chain identifiziert.

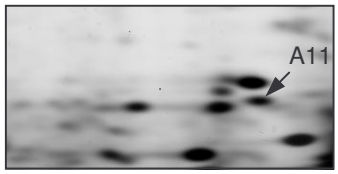
Daten 2-DE			Massenspektrometrische Daten			
Spotnr.	MW [kDa]/ pI des Spots	Intensität im Vergleich zum Gesunden	Identifiziertes Protein	Score	MW [kDa]/ pI berechnet	Accession (Swissprot)
A8	29.5/6.2	Erniedrigt in 6/6 Gelen	Fibrinogen gamma chain (partial) (212AA)	79	24.1/6.49	P02679

Tabelle 9: Identifiziertes Protein des Spots A8

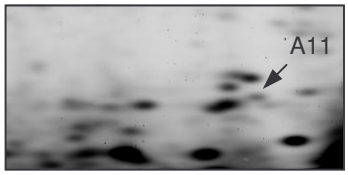
3.2.3 Darstellung des Spots A11



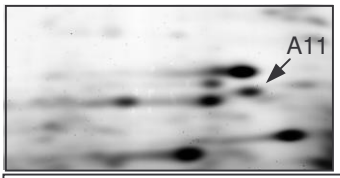
Probe 24.1, PBSC Gesund



Probe 5.1, KM CML



Probe 23.1, PBSC Gesund



Probe 7.1, KM CML

Abbildung 10: Oben Probe 24.1, PBSC Gesund. Unten Ausschnitte der Gele 24.1, 23.1, 5.1, 7.1. In den Gelen 5.1 und 7.1 zeigte der Spot A11 eine erniedrigte Konzentration im Vergleich zum Gesunden.

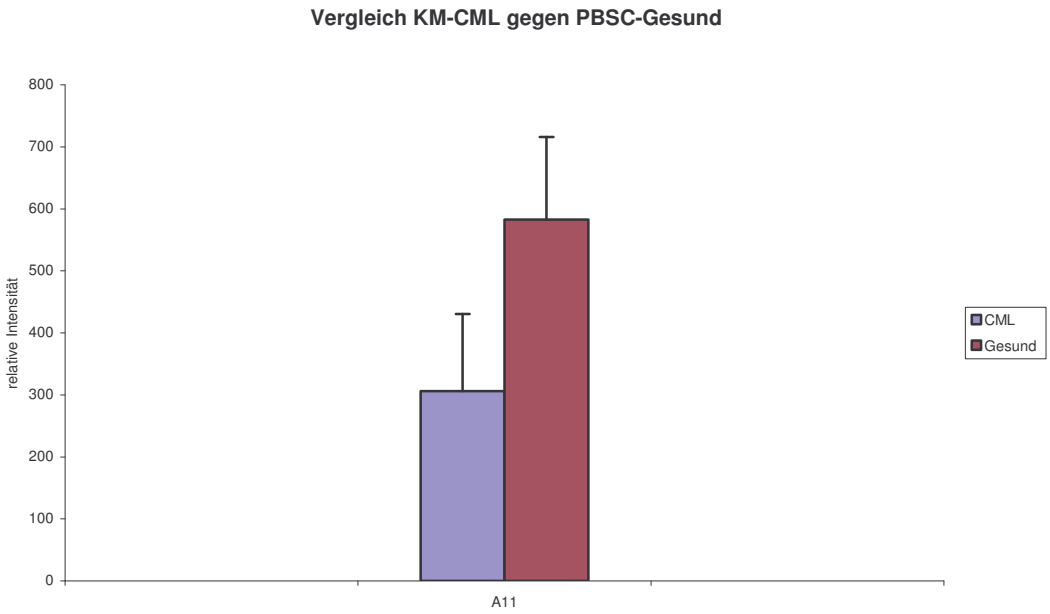


Abbildung 11: Darstellung der relativen Intensität (y-Achse) des Spots A11 auf den zwei Gelen der gesunden PBSCs (rechter Balken) im Vergleich zu den fünf KM CML Gelen (linker Balken).

Nach Überarbeitung konnte gezeigt werden, dass Spot A11 nur in fünf der sechs Gelen eine erniedrigte Konzentration aufwies. Aufgrund des bereits zugeordneten Namens A11 befindet sich A11 noch immer in der Reihe A.

Spotnr.	Intensität des Spots auf Gel								
	KM CML 1.3	KM CML 2.1	KM CML 5.1	KM CML 7.1	KM CML 12.2	KM CML 16.1		PBSC gesund 24.1	PBSC gesund 23.1
A11	233.1	502.2	282.6	400.8	158.6	260.4		676.7	488.6

Tabelle 10: Intensität (Topspot) des Spots A11 auf den KM CML Gelen auf der linken und den PBSC Gesund Gelen auf der rechten Seite.

Der Spot A11 wurde als NME1-NME2-Protein identifiziert.

Daten 2-DE			Massenspektrometrische Daten			
Spotnr.	MW [kDa]/ pI des Spots	Intensität im Vergleich zum Gesunden	Identifiziertes Protein	Score	MW [kDa]/ pI berechnet	Accession (Swissprot)
A11	15.3/8.1	Erniedrigt in 5/6 Gelen	NME1-NME2 Protein	71	30.1/9.01	Q32Q12

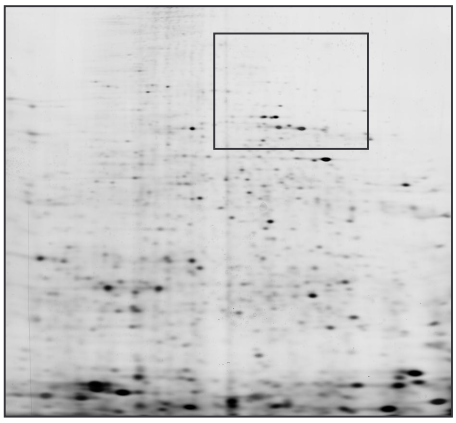
Tabelle 11: Identifiziertes Protein des Spots A11

3.3 Ergebnisse der Reihe B

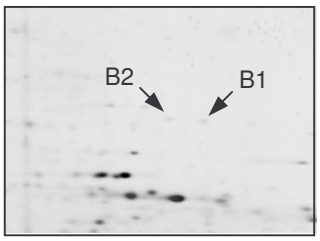
Die Reihe B beinhaltet Spots, die sich in fünf der sechs CML Gele als erhöht oder erniedrigt darstellten.

3.3.1 Darstellung der Spots B1 und B2

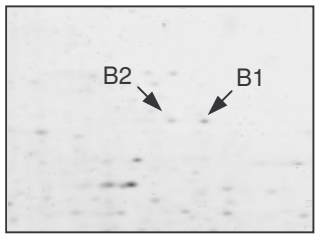
Die Darstellung der Spots B1 und B2 wird wie für Reihe A anhand der PBSC Gesund Gele 23 und 24 und der CML Gele 5 und 7 vorgenommen. In ähnlicher Weise wird für die Spots B3 und B4 in Kapitel 3.3.2 und den Spot B6 in Kapitel 3.3.3 vorgegangen.



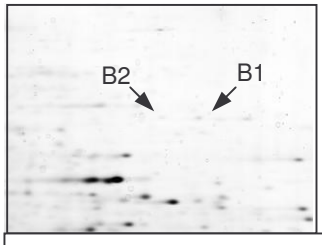
Probe 24.1, PBSC Gesund



Probe 5.1, KM CML



Probe 23.1, PBSC Gesund



Probe 7.1, KM CML

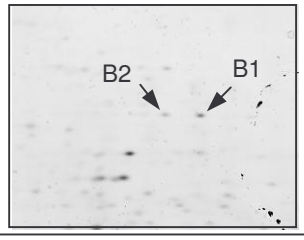


Abbildung 12: Oben Probe 24.1, PBSC Gesund. Unten Ausschnitte der Gele 24.1, 23.1, 5.1, 7.1. In den Gelen 5.1 und 7.1 sind die Spots B1 und B2 im Vergleich zu den gesunden Kontrollen in erhöhter Konzentration zu erkennen.

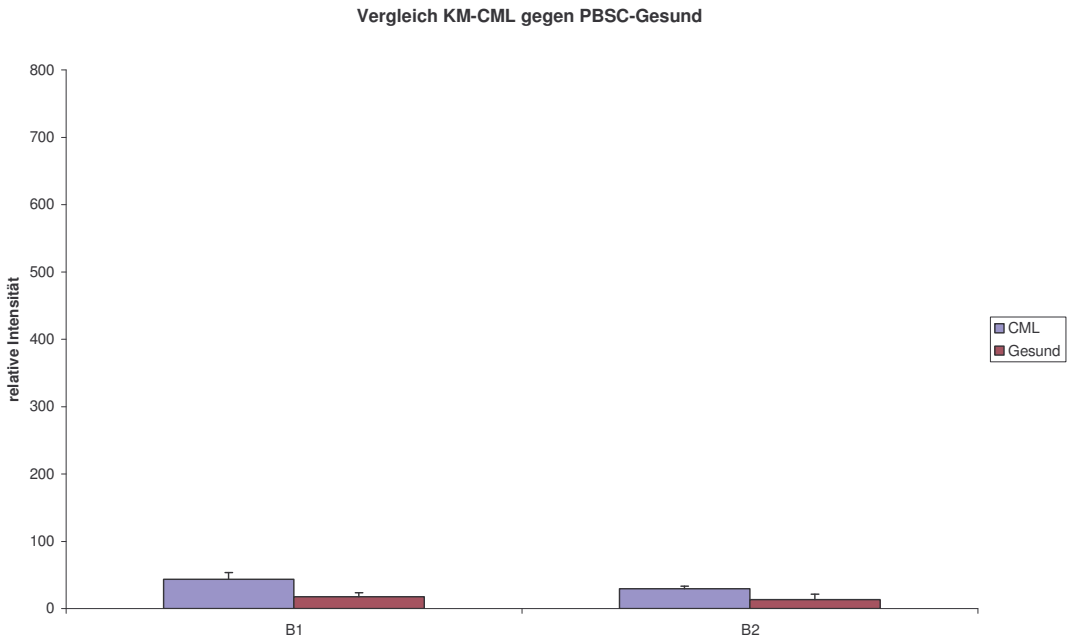


Abbildung 13: Darstellung der relativen Intensität (y-Achse) der Spots B1 und B2 auf den zwei Gelen der gesunden PBSCs (jeweils rechter Balken) im Vergleich zu den fünf KM CML Gelen (jeweils linker Balken).

Spotnr.	Intensität des Spots auf Gel								
	KM CML 1.3	KM CML 2.1	KM CML 5.1	KM CML 7.1	KM CML 12.2	KM CML 16.1		PBSC gesund 24.1	PBSC gesund 23.1
B1	54.6	45.3	32.1	52.7	33.0	6.7		21.8	13.2
B2	34.0	33.5	23.8	31.6	23.5	7.1		19.0	7.4

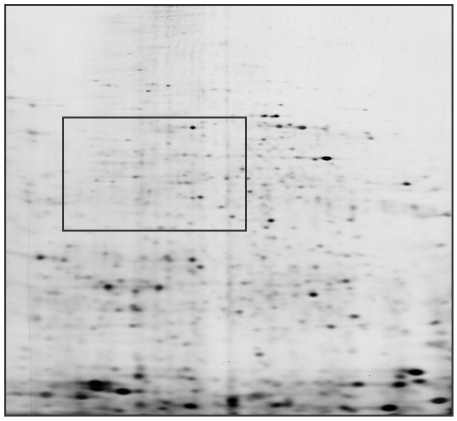
Tabelle 12: Intensität (Topspot) der Spots B1 und B2 auf den KM CML Gelen auf der linken und den PBSC Gesund Gelen auf der rechten Seite.

Die massenspektrometrische Analyse der Spots B1 und B2 ergab für beide Spots das Protein SAMHD1.

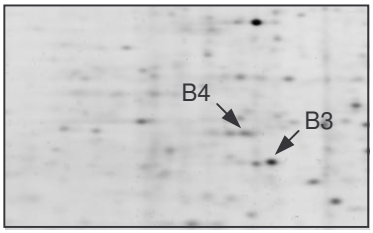
Daten 2-DE			Massenspektrometrische Daten			
Spotnr.	MW [kDa]/ pI des Spots	Intensität im Vergleich zum Gesunden	Identifiziertes Protein	Score	MW [kDa]/ pI berechnet	Accession (Swissprot)
B1	70/7.2	Erhöht in 5/6 Gelen	SAMHD1	190	72.2/6.69	Q9Y3Z3
B2	70/7.0	Erhöht in 5/6 Gelen		169	72.2/6.69	Q9Y3Z3

Tabelle 13: Identifiziertes Protein der Spots B1 und B2

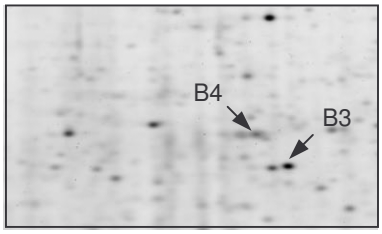
3.3.2 Darstellung der Spots B3 und B4



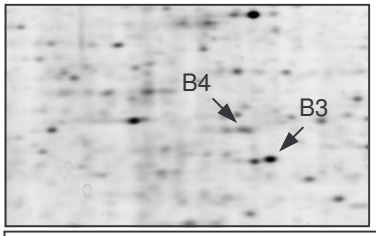
Probe 24.1, PBSC Gesund



Probe 5.1, KM CML



Probe 23.1, PBSC Gesund



Probe 7.1, KM CML

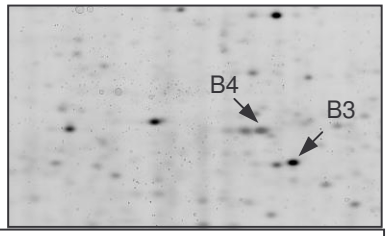


Abbildung 14: Oben Probe 24.1, PBSC Gesund. Unten Ausschnitte der Gele 24.1, 23.1, 5.1, 7.1. In den Gelen 5.1 und 7.1 wiesen die Spots B3 und B4 im Vergleich zu den gesunden Kontrollen erhöhte Konzentration auf. Dies war besonders in der Kontrolle 23.1 schlecht zu erkennen, da das Proteinmuster generell etwas stärker ausgeprägt war.

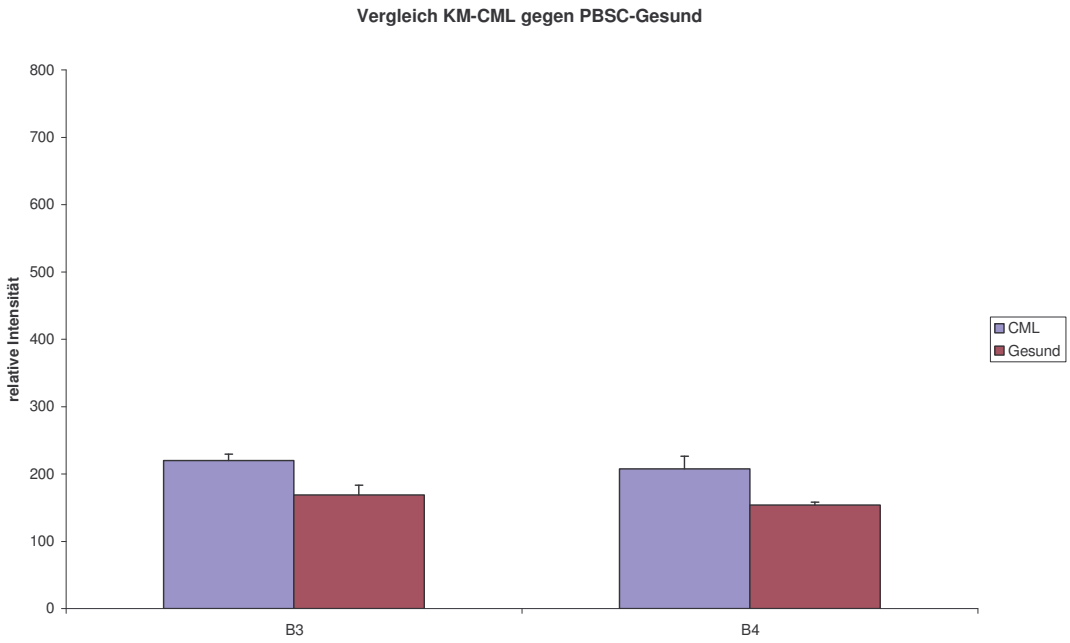


Abbildung 15: Darstellung der relativen Intensität (y-Achse) der Spots B3 und 42 auf den zwei Gelen der gesunden PBSCs (jeweils rechter Balken) im Vergleich zu den fünf KM CML Gelen (jeweils linker Balken).

Spotnr.	Intensität des Spots auf Gel								
	KM CML 1.3	KM CML 2.1	KM CML 5.1	KM CML 7.1	KM CML 12.2	KM CML 16.1		PBSC gesund 24.1	PBSC gesund 23.1
B3	189.5	181.5	206.2	229.1	230.8	243.8		158.8	179.1
B4	211.2	112.9	243	182.3	181.1	219.5		150.9	157.0

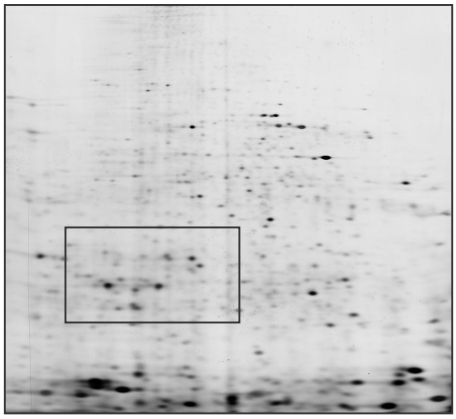
Tabelle 14: Intensität (Topspot) der Spots B3 und B4 auf den KM CML Gelen auf der linken und den PBSC Gesund Gelen auf der rechten Seite.

Spot B3 wurde wie Spot A2 als α-Enolase identifiziert. Bei Spot B4 handelt es sich um Actin cytoplasmic 2.

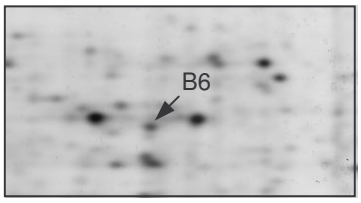
Daten 2-DE			Massenspektrometrische Daten			
Spotnr.	MW [kDa]/ pI des Spots	Intensität im Vergleich zum Gesunden	Identifiziertes Protein	Score	MW [kDa]/ pI berechnet	Accession (Swissprot)
B3	38/6.3	Erhöht in 6/6 Gelen	α-Enolase	148	47.1/7.01	P06733
B4	40/6.0	Erhöht in 5/6 Gelen	Actin cytoplasmic 2	79	41.8/5.31	P63261

Tabelle 15: Identifizierte Proteine der Spots B3 und B4

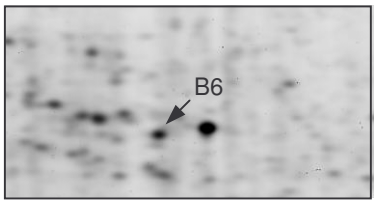
3.3.3 Darstellung des Spots B6



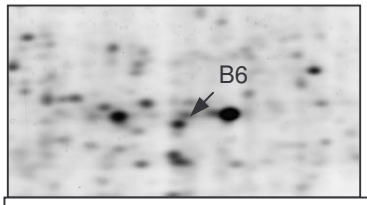
Probe 24.1, PBSC Gesund



Probe 5.1, KM CML



Probe 23.1, PBSC



Probe 7.1, KM CML

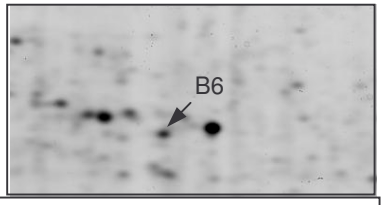


Abbildung 16: Oben Probe 24.1, PBSC Gesund. Unten Ausschnitte der Gele 24.1, 23.1, 5.1, 7.1. In den Gelen 5.1 und 7.1 war der Spot B6 im Vergleich zu den gesunden Kontrollen erhöht. Dies war besonders in der Kontrolle 23.1 nur schlecht zu erkennen, da das Proteinmuster generell etwas stärker ausgeprägt war.

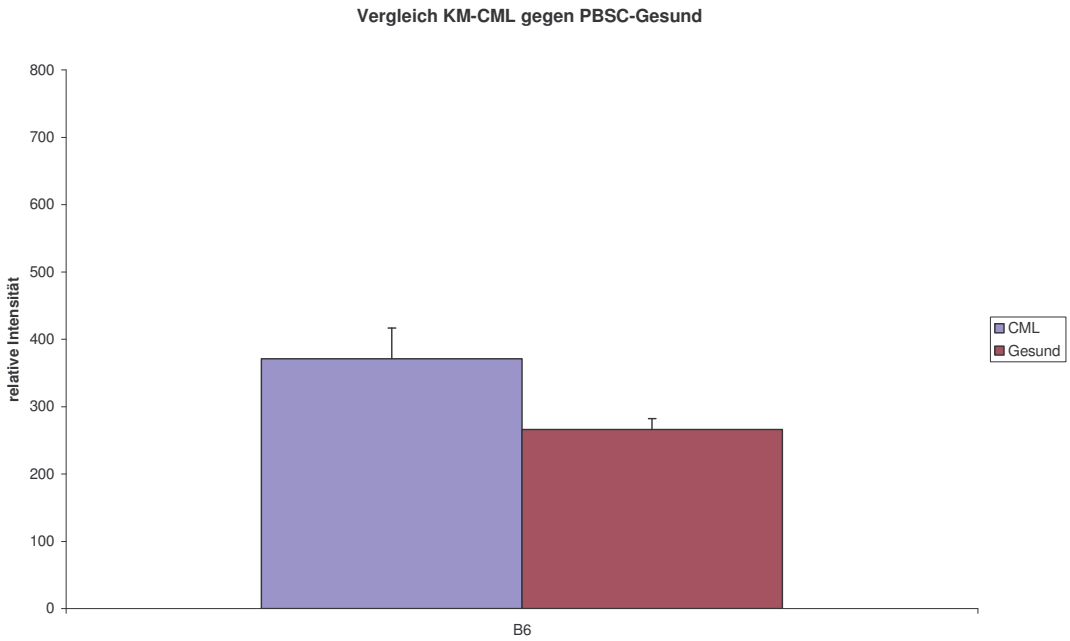


Abbildung 17: Darstellung der relativen Intensität (y-Achse) des Spots B6 auf den zwei Gelen der gesunden PBSCs (rechter Balken) im Vergleich zu den fünf KM CML Gelen (linker Balken).

Spotnr.	Intensität des Spots auf Gel								
	KM CML 1.3	KM CML 2.1	KM CML 5.1	KM CML 7.1	KM CML 12.2	KM CML 16.1		PBSC gesund 24.1	PBSC gesund 23.1
B6	326.5	331.0	420.3	307.9	345.1	433.1		254.5	277.4

Tabelle 16: Intensität (Topspot) des Spots B6 auf den KM CML Gelen auf der linken und den PBSC Gesund Gelen auf der rechten Seite.

Spot B6 wurde wie Spot A2 und Spot B3 als α-Enolase identifiziert.

Daten 2-DE			Massenspektrometrische Daten			
Spotnr.	MW [kDa]/ pI des Spots	Intensität im Vergleich zum Gesunden	Identifiziertes Protein	Score	MW [kDa]/ pI berechnet	Accession (Swissprot)
B6	27/5.4	Erhöht in 6/6 Gelen	α-Enolase	123	36.3/6.53	P06733

Tabelle 17: Identifiziertes Protein des Spots B6

3.4 Daten der Reihe A auf einen Blick

Spot	Daten der 2-DE		Massenspektrometrische Daten				
	MW [kDa] /pI des Spots in der optischen Auswertung	Intensität im Vergleich zum Gesunden	Identifiziertes Protein	Score	MW [kDa] /pI in der MALDI-TOF bestimmt	Accession (Swissprot)
A1	57 /7.1	Erniedrigt in 6/6 Gelen	Fibrin beta	182	50.7/7.95	P02675
A2	45 /7.0	Erniedrigt in 6/6 Gelen	Enolase α	185	42.4/6.97	P06733
A8	29.5 /6.2	Erniedrigt in 6/6 Gelen	Fibrinogen gamma chain (partial) (212AA)	79	24.1/6.49	P02679
A11	15.3 /8.1	Erniedrigt in 5/6 Gelen	NME1-NME2 Protein	71	30.1/9.06	Q32Q12

Tabelle 18: Daten aus der optischen Auswertung unter Daten der 2-DE und aus der massenspektrometrischen Analyse der Reihe A für die Spots A1, A2, A8, A11.

3.5 Daten der Reihe B auf einen Blick

Spot	Daten der 2-DE		Massenspektrometrische Daten			
	MW [kDa] /pI des Spots in der optischen Auswertung	Intensität im Vergleich zum Gesunden	Identifiziertes Protein	Score	MW [kDa] /pI in der MALDI-TOF bestimmt	Accession (Swissprot)
B1	70/7.2	Erhöht in 5/6 Gelen	SAMHD1	190	72.2/6.69	Q9Y3Z3
B2	70/7.0	Erhöht in 5/6 Gelen		169	72.2/6.69	
B3	38/6.3	Erhöht in 5/6 Gelen	Enolase α	148	47.1/7.01	P06733
B4	40/6.0	Erhöht in 5/6 Gelen	Actin cytoplasmic 1	79	41.8/5.31	P63261
B6	27/5.4	Erhöht in 5/6 Gelen	Enolase α	123	36.3/6.53	P06733

Tabelle 19: Daten aus der optischen Auswertung unter Daten der 2-DE und aus der massenspektrometrischen Analyse der Reihe B für die Spots B1, B2, B3, B4, B6.

3.6 Intensität und Proteine auf einen Blick

Spot	Protein	Intensität des Spots auf Gel								
		KM CML 1.3	KM CML 2.1	KM CML 5.1	KM CML 7.1	KM CML 12.2	KM CML 16.1		PBSC gesund 24.1	PBSC gesund 23.1
A1	Fibrin beta	↓ 85.6	↓ 44.7	↓ 27.2	↓ 27.9	↓ 42.2	↓ 48.2		313.2	141.7
A2	α-Enolase	↓ 21.3	↓ 18.2	↓ 18.5	↓ 17.1	↓ 42.4	↓ 34.1		118.6	53.1
A8	Fibrinogen gamma chain partial (212 AA)	↓ 49.4	↓ 60.9	↓ 28.3	↓ 51.8	↓ 81.1	↓ 32.9		287.0	107.1
A11	NME1-NME2 Protein	↓ 233.1	↑ 502.2	↓ 282.6	↓ 400.8	↓ 158.6	↓ 260.4		676.7	488.6
B1	SAMHD1	↑ 54.6	↑ 45.3	↑ 32.1	↑ 52.7	↑ 33.0	↓ 6.7		21.8	13.2
B2		↑ 34.0	↑ 33.5	↑ 23.8	↑ 31.6	↑ 23.5	↓ 7.1		19.0	7.4
B3	α-Enolase	↑ 189.5	↑ 181.5	↑ 206.2	↑ 229.1	↑ 230.8	↑ 243.8		158.8	179.1
B4	Actin cytoplasmic 2	↑ 211.2	↓ 112.9	↑ 243.0	↑ 182.3	↑ 181.1	↑ 219.5		150.9	157.0
B6	α-Enolase	↑ 326.5	↑ 331.0	↑ 420.3	↑ 307.9	↑ 345.1	↑ 433.1		254.5	277.4

Tabelle 20: Intensität (Topspot) der Spots A1, A2, A8, A11, B1, B2, B3, B4, B6 auf den KM CML Gelen auf der linken und den PBSC Gelen auf der rechten Seite. Die Pfeile geben an, ob sich die Intensität im Vergleich zum Gesunden als erhöht oder erniedrigt zeigt. Den Spots wurden, die in der massenspektrometrischen Analyse identifizierten Proteine, zugeordnet.

3.7 Quantitative Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration verhält sich umgekehrt proportional zur Farbintensität der Probe. Anhand einer Eichkurve des BSA-Standards konnten die Proteinkonzentrationen errechnet werden.

3.7.1 BSA-Standard

Die Werte der BSA-Standarkurve wurden zweifach bestimmt und jeweils gemittelt. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 19.

2 mg/ml BSA-Standard in µl	Optische Dichte	Proteinkonzentration in µg/µl
0	0	0
4	-0,0738	8
8	-0,1070	16
12	-0,1669	24
20	-0,2649	40
25	-0,3000	50

Tabelle 21: BSA-Standardkurve. Bei bekannter Proteinkonzentration (rechts) wurde für jede Konzentration die optische Dichte bestimmt.

Abbildung 18: BSA-Standarkurve, ermittelt durch bekannte Proteinkonzentration in µg/µl (x-Achse) und optische Dichtemessungen (y-Achse).

3.7.2 Proteinbestimmung der Proben 5, 7 und 12

Eine Proteinbestimmung wurde für die Proben 5, 7 und 12 durchgeführt. Die Werte wurden für die Proben 5 und 7 zweifach bestimmt und gemittelt. Probe 12 konnte aufgrund mangelnder Probe nur einfach bestimmt werden. Anhand der Eichkurve des BSA-Standards konnten mit Hilfe der gemessenen Werte der optischen Dichte die Proteinkonzentrationen bestimmt werden. Tabelle 21 zeigt die Proteinkonzentrationen der Proben 5, 7 und 12.

Probe	Optische Dichte	Proteinkonzentration in µg/µl
5	-0,1114	16,588
7	-0,1186	17,549
12	-0,0712	7,718

Tabelle 22: Anhand der BSA-Standarkurve bestimmte Proteinkonzentrationen für die Proben 5, 7 und 12

4 Diskussion

Mit Hilfe der vergleichenden Proteomanalyse sollten Unterschiede im Expressionsmuster von CML Knochenmark und gesunden peripheren Blutstammzellen erarbeitet werden. Ziel der Diskussion ist es, die Funktion der massenspektrometrisch identifizierten Proteine zu beleuchten und einen möglichen Zusammenhang zwischen diesen Eigenschaften und der Pathogenese der Erkrankung herzustellen. Dies soll zu einem besseren Verständnis zellulärer Vorgänge im Rahmen der CML beitragen. In den folgenden Kapiteln 4.1, 4.2, 4.3, 4.4 und Kapitel 4.5 werden die analysierten Proteine näher beschrieben.

4.1 Identifikation von Fibrinogen beta chain und Fibrinogen gamma chain

4.1.1 Struktur von Fibrinogen

Fibrinogen, das in der Leber synthetisiert wird, setzt sich aus zwei identischen Untereinheiten mit jeweils drei Polypeptidketten (α-, β-, χ-Kette) zusammen, die an ihrem N-terminalen Ende über coiled-coil an einer zentralen Domäne gebunden sind. Das kovalente Dimer besteht aus einer zentralen Domäne, die als Fragment E und zwei randständigen Domänen, die als Fragment D bezeichnet werden.
Fragment E besteht aus den N-terminalen Enden der sechs Polypeptidketten und macht nur 15 % des Fibrinogen-Moleküls aus.
Fragment D beinhaltet neben einem Anteil der coiled-coil Struktur die drei Polypeptidketten α, β, χ, die untereinander über drei interchain und fünf intrachain Disulfidbrücken verbunden sind [45, 46].
Die Gene der Polypeptidketten α, β, χ sind auf Chromosom 4 lokalisiert.

4.1.2 Funktion von Fibrinogen

Die Blutstillung wird durch vaskuläre, zelluläre und plasmatische Vorgänge gewährleistet. Sowohl innerhalb der zellulären Blutstillung als auch der plasmatischen Blutstillung, der Blutgerinnung, nimmt Fibrinogen eine bedeutsame Rolle ein.

4.1.2.1 Zelluläre Blutstillung

Kommt es zur Verletzung des Endothels treffen Thrombozyten auf das Subendothel des geschädigten Gefäßes. Der von Willebrand Faktor verbindet über den Plättchen

Rezeptor GP1b das Subendothel, also die Matrixproteine Kollagen, Laminin und Fibronektin, mit den Thrombozyten. Fibrinogen bindet an den GP2b/GP3a-Rezeptor auf den Blutplättchen und führt zur Plättchenaggregation.

4.1.2.2 Plasmatische Blutstillung (Blutgerinnung)

Ziel der Gerinnungskaskade ist eine Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin, das die aggregierten Thrombozyten zu einem stabilen Thrombus vernetzt. Die gemeinsame Endstrecke der extrinsischen und intrinsischen Gerinnung sind die aktivierten Faktoren X und V, die gemeinsam mit Calciumionen und Phospholipiden die Prothrombinase bilden. Mit Hilfe der Prothrombinase wird Prothrombin (Faktor III) zu Thrombin aktiviert [47]. Die Protease Thrombin spaltet an der α-Kette das Fibrinopeptid A und an der β-Kette das Fibrinopeptid B ab und überführt Fibrinogen in ein Fibrinmonomer. Bei der Abspaltung des Fibrinopeptids A wird an der α-Kette eine Sequenz freigelegt, die mit den Aminosäuren Gly-Pro-Arg beginnt. Diese als Knöpfchen bezeichnete Sequenz bindet an eine Sequenz am Carboxyl-terminalen Ende der χ-Kette eines weiteren Fibrin-Moleküls [46]. Mit Hilfe dieser Seit-zu-Seit-Anlagerung der Fibrinmonomere kommt es zu Polymerisierung und zur Enstehung eines Protofibrils. Faktor XIII (FSF, Fibrin stabilisierender Faktor), eine Transglutaminase, stabilisiert den Thrombus durch Bildung kovalenter Bindungen zwischen Lysyl- und Glutamylresten benachbarter Fibrinmonomere [48]. Dies führt zu einer Quervernetzung des Polymers.

4.1.2.3 Die Fibrinolyse

Plasminogen wird durch Plasminogenaktivatoren wie t-PA (tissue-Plasminogenaktivator) über limitierte Proteolyse zu Plasmin aktiviert. Plasmin spaltet Fibrin in Fibrinspaltprodukte (FDP) und D-Dimere. Einer vorzeitigen Fibrinolyse wirken der Plasmininhibitor, PAI-1 und TAFI (thrombin activatable fibrinolysis inhibitor) entgegen.

4.1.3 Erniedrigte Konzentration der Fibrinogen beta Kette

4.1.3.1 Spot A1

In der massenspektrometrischen Analyse wurde Spot A1 mit einem Score von 182 als Fibrinogen beta chain (SWISSPROT accession number: P02675; FIBB_HUMAN) identifiziert. Der Analyse zufolge handelt es sich um ein Protein mit einem Molekulargewicht von 50.7 kDa und einem daraus kalkulierten

isoelektrischen Punkt von 7.95. In der Literatur ist es bei 447 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 55.9 kDa und einem isoelektrischen Punkt von 8.54 angegeben. Die Fibrinogen beta chain ist ein Fragment des Fibrinogen Dimers. Es liegt in einer verkürzten Form vor, das Fibrinopeptid B mit 14 Aminosäuren ist bereits abgespalten. Spot A1 zeigt sich in den CML-Gelen in sechs von sechs Gelen erniedrigt.

4.1.4 Erniedrigte Konzentration der Fibrinogen gamma Kette

4.1.4.1 Spot A8

In der massenspektrometrischen Analyse wurde Spot A8 mit einem Score von 79 als ein Fragment der Fibrinogen gamma Kette (SWISSPROT: P02679; FIBG_HUMAN) mit 212 Aminosäuren, einem Molekulargewicht von 24.1 kDa und einem daraus kalkulierten isoelektrischen Punkt von 6.49, identifiziert. Die gesamte Fibrinogen gamma chain beinhaltet 453 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von 51.5 kDa und einen isoelektrischen Punkt von 5.37. Spot A8 zeigt sich in den CML-Gelen in sechs von sechs Gelen erniedrigt. Das Gen, das für Fibrinogen codiert, befindet sich auf dem langen Arm von Chromosom 4.

4.1.5 Störungen in der Hämostase der Patienten

Myeloproliferative Erkrankungen, die chronisch myeloische Leukämie eingeschlossen, weisen häufig eine Störung der Hämostase auf.

Im Unterschied zu Patienten mit soliden Tumoren, die eher unter thromboembolischen Ereignissen leiden, können Patienten mit myeloproliferativen Erkrankungen sowohl mit Blutungskomplikationen als auch mit Zwischenfällen thromboembolischer Art auffallen. Charakteristischerweise kann dies sogar im Krankheitsverlauf variieren. Dies weist auf eine komplexe Störung des Gerinnungssystems hin, die auf viele Faktoren zurückzuführen ist. Speziell Patienten mit CML erleiden zwar eher selten derartige Komplikationen, gleichwohl scheint die Hämostase der Patienten beeinträchtigt [49].
Zunächst führte man thromboembolische Ereignisse auf eine Hyperviskosität des Blutes der Patienten zurück, die auf die erhöhten Zellzahlen, die im Verlauf der Erkrankung auftreten können, begründet schien. Inzwischen vermutet man, dass nicht zwingend die abweichende Thrombozytenzahl, sondern eher die veränderten Eigenschaften der Plättchen die Störung der Hämostase verursacht. Thrombozyten von Patienten mit myeloproliferativen Syndromen weisen eine niedrigere Anzahl von GP1b/ GP3a-Komplexen auf, was mit einer verringerten Bindungsfähigkeit von Fibrinogen an die Blutplättchen einhergeht [50].

4.1.6 Erniedrigte Konzentrationen von Fibrin(ogen) und Malignität

Die Analyse des Spot A1 und des Spots A8 ergaben erniedrigte Konzentrationen der Fibrinogen alpha und gamma Kette. In Blutproben HER2-positiver Brustkrebs Patientinnen konnte ebenfalls ein Fragment des Fibrinogen Moleküls in erniedrigter Konzentration identifiziert werden. Es handelte sich um ein Fragment der Fibrinogen alpha Kette mit den Resten der Aminosäuren 605-629. Es präsentierte sich im Plasma der Patientinnen verglichen mit der Kontrollgruppe in erniedrigter Konzentration. In einer sich anschließenden Longitudinalstudie, die prä- und postoperative Plasmalevel gegenüber stellte, stabilisierten sich die Werte dieses Fragments nach der erfolgreichen Brust Operation [51]. Entgegen dieser Untersuchung weisen Tumorerkrankungen eher erhöhte Fibrinogen Konzentrationen auf.

4.1.7 Erhöhte Konzentrationen von Fibrin(ogen) und Malignität

Erhöhte Konzentrationen von Fibrinogen, Fibrin und FDPs scheinen dem Tumor ein Umfeld zu verschaffen, das Wachstum und Progression des Tumors zulässt. Dies basiert möglicherweise auf der Fähigkeit der Tumorzellen Fibrin zu lysieren und damit einen Vorteil gegenüber normalen Zellen zu gewinnen.

Ein Nachweis der Fibrin lysierenden Aktivität gelang an blastären AML Blutzellen und an einer polymorphonukleären Fraktion des Blutes von CML- Patienten. Die Zellen exprimierten den Plasminogenaktivator u-PA. Die mononukleären Zellen der CML Patienten zeigten hingegen keine lysierende Aktivität [52].

Ähnlich stellte sich dies in einer Untersuchung an Ovarialkarzinomzellen dar. Sie synthetisierten uPA, das in inaktiver Form sezerniert wird und an Rezeptoren auf der Tumoroberfläche bindet. [53]. Dort scheinen auch niedrige Mengen an Plasmin auszureichen, um uPA in einen aktiven Zustand zu überführen. Dies führt zu einer Aktivierung der Protease Plasmin, die nun Proteine wie Fibrin oder Fibronektin degradiert. In malignen Aszitesexsudaten von Ovarialkarzinom Patientinnen konnte im Vergleich zu Aszites von Leberzirrhose Patienten erhöhte Konzentrationen von FDPs nachgewiesen werden. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Protease Plasmin entscheidend am Abbau von Fibrin beteiligt ist [54].

Gerinnungsfaktoren nehmen an fundamentalen Mechanismen teil, die dem Schutz, der Erneuerung und der Reparatur von Gewebe dienen. Darüber hinaus sind sie an transendothelialer Migration und Angiogenese beteiligt. Der Tumor bemächtigt sich dieser Eigenschaften und nützt sie zum Zwecke der Progression des Primärtumors [55].
Anhand Fibrin defizienter Mäuse wurde die Rolle von Fibrinogen in der Progression des Lewis Lungenkarzinoms verdeutlicht. Fibrin defiziente Mäuse zeigten im

Vergleich mit den Kontrollmäusen ein vermindertes Potential spontaner Metastasierungen. Dies beruht auf der Annahme, dass Fibrinogen die Adhäsion der zirkulierenden Tumorzellen vereinfacht, indem es eine Verbindung zwischen ihnen, den Thrombozyten und dem Endothel ermöglicht. Darüber hinaus fungiert Fibrinogen als Matrix, die eine Passage der Tumorzellen aus dem Gefäßbett ins Gewebe erleichtert. Das Wachstum der Tumoren selbst scheint durch die Abwesenheit von Fibrin unbeeinflusst [56].

Analysen von Pankreas Karzinom Patienten lassen ebenso eine Verbindung zwischen einer erhöhten Fibrinogen gamma chain Expression und dem Pankreas Karzinom vermuten. Sowohl im Serum Betroffener als auch in immunhistochemischen Untersuchungen von erkranktem Gewebe konnten im Vergleich zum Gesunden erhöhte Konzentrationen nachgewiesen werden [57]. Die Degradation der extrazellulären Matrix könnte in diesem Zusammenhang auf der proteolytischen Aktivität von Plasmin basieren.

Überdies scheint Fibrinogen im Rahmen der Plättchenaggregation in die Abwehrfunktion des Körpers einzugreifen. Mikrothromben, zusammengesetzt aus Fibrin und Thrombozyten, dienen zirkulierenden Tumorzellen als physikalische Barrieren und verhindern den direkten Kontakt von Natural Killer Zellen. Dies erschwert eine Eliminierung der neoplastischen Zellen in erheblichen Maße [58].

Zudem stimuliert Fibrinogen die Proliferation verschiedene Zelltypen des hämatopoetischen Systems. Derselbe Effekt konnte sogar für Fragmente des Moleküls (z. B. Fragment D) nachgewiesen werden [59].

4.2 Identifikation der α-Enolase

4.2.1 α-Enolase

Die α-Enolase wird in der Literatur mit einem Molekulargewicht von 47 kDa und einem isoelektrischen Punkt von 6.99 angegeben und wurde 1934 erstmals von Lohman und Mayerhof beschrieben.
Die Enolase ist ein Metalloenzym, das für seine Aktivität seinen natürlichen Cofaktor Magnesium benötigt [60]. Sie besteht aus zwei identischen Untereinheiten, die sich antiparallel gegenüberstehen. Des Weiteren besteht jede Untereinheit aus einer kleinen N-terminalen und einer größeren C-terminalen Domäne [61].
Es handelt sich um ein Enzym, das im Cytosol lokalisiert ist, in der Glykolyse die Dehydratation von 2-Phosphoglycerat (PGA) zu Phosphoenolpyruvat (PEP) und in der anabolen Gluconeogenese die Hydratation von PEP zu PGA katalysiert.

Im menschlichen Körper existieren drei Isoenzyme der Enolase, die α-Enolase, die in vielen Geweben exprimiert wird, die β-Enolase, die hauptsächlich in Muskelzellen zu finden ist und schließlich die χ-Enolase, die spezisch für Zellen neuronalen Gewebes ist.

4.2.2 Erniedrigte Konzentration der Enolase und Tumorwachstum

4.2.2.1 Spot A2

In der massenspektrometrischen Analyse wurde der Spot A2 mit einem Score von 185 als α–Enolase (SWISSPROT accession number: P06733; ENOA_HUMAN) identifiziert. Der massenspektrometrischen Analyse zufolge handelt es sich um ein Protein mit einem Molekulargewicht von 42.4 kDa und einem daraus kalkulierten isoelektrischen Punkt von 6.97. Spot A2 zeigt sich in den CML-Gelen in sechs von sechs Gelen erniedrigt.

4.2.3 Enolase als DNA bindendes Protein

Die α-Enolase besitzt 97% Sequenzhomologie zum c-myc-binding Protein (MBP-1) [62], das mit der N- terminalen Region an die TATA-Box des c-myc P2 Promotors bindet und dessen Aktivität unterdrückt. Es supprimiert die Expression des Protoonkogens c-myc, das eine wichtige Rolle in Wachstum, Differenzierung Transformation [63] und Apoptose spielt [64-66]. Am wahrscheinlichsten handelt es sich bei MBP-1 um ein alternatives Translationsprodukt des α-Enolase Gens [67], das aufgrund seiner Funktion im Nukleus lokalisiert ist [67, 68]. .

In vitro bindet auch die α-Enolase mit ihrem N-terminalen Ende am c-myc Promotor und reguliert vermutlich auch in vivo dessen Aktivität. Das Protein hemmt den c-myc Promotor und unterdrückt die Transkription des Onkogens. Eine erniedrigte Konzentration der α-Enolase im Knochenmark der CML Patienten müsste demnach eine erhöhte Transkription des c-myc Protoonkogens nach sich ziehen, da die inhibierenden Eigenschaften des Proteins am Promotor ausbleiben.
In vielen Karzinomen ist eine erhöhte c-myc Expression zu finden, bei der CML kann diese hinweisend auf die Progredienz der Erkrankung, also beispielsweise ein Übergang von der chronischen Phase in die Blastenkrise, darstellen [66, 69-71].

4.2.4 Erhöhte Konzentration der Enolase und Tumorprogression

4.2.4.1 Spot B3

Im Spot B3 ließ sich mit einem Score von 142 bei einem Molekulargewicht von 47.1 kDa und einem daraus resultierenden isoelektrischen Punkt von 7.01 ebenfalls α-Enolase identifizieren. Allerdings zeigt sie sich in allen sechs CML-Gelen im Vergleich zu den gesunden Kontrollproben in erhöhter Konzentration.

4.2.4.2 Spot B6

In gleicher Weise zeigt sich Spot B6 verändert. Er zeigt sich in allen CML-Gelen in erhöhter Konzentration und konnte in der massenspektrometrischen Analyse mit einem Score von 123 ebenfalls als α-Enolase identifiziert werden. Aufgrund des niedrigen Molekulargewichts von 36.3 kDa und dem isoelektrischen Punkt von 6.53 handelt es sich am wahrscheinlichsten um ein Fragment dieses Enzyms.

Der Tatsache ungeachtet, dass ein sicherer Zusammenhang zwischen erhöhter Expression der α-Enolase und Tumorwachstum noch nicht hergestellt werden konnte, gibt es deutliche Hinweise, dass die Enolase in der Progression und Metastasierung vieler Tumoren eine Rolle spielt [72]. Charakteristischerweise zeigen Tumoren eine gesteigerte Glykolyse, die auf den erhöhten Energieumsatz der Zelle zurückzuführen ist.

4.2.5 Enolase als HAP (Hypoxie assoziiertes Protein)[73]

In einer Studie, die HER-2/neu positiven Brusttumoren HER-2/neu negative Mammakarzinome gegenüber stellte, ließ sich eine erhöhte Expression der glykolytischen Enzyme α-Enolase, Phoshoglycerat Kinase (PGA) und Triose Phosphat Isomerase (TPI) bei den aggressiveren HER-2/neu positiven Tumoren nachweisen [74]. Hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) scheint die Transkription dieser Enzyme zu regulieren, indem es an einem sogenannten Hypoxia response Element dieser Gene bindet, wenn die Zelle Sauerstoff armer Umgebung ausgesetzt ist [75]. Demnach wird eine Aktivierung von Genen gewährleistet, die für glykolytische Enzyme codieren. So bedient sich die Zelle bei chronisch hypoxischen Bedingungen unter Umgehung der oxidativen Phosphorylierung der alternativen Energiegewinnung durch die Glykolyse [76].
Anhaltende hypoxische Voraussetzungen könnten sowohl in einem aggressiv wachsenden Tumor oder einem hyperzellulären Knochenmark gegeben sein.

In einer Untersuchung von hepatozellulären Karzinomen wiesen die tumorösen Proben im Vergleich zu den gesunden Kontrollproben eine erhöhte Konzentration der α-Enolase auf. Darüberhinaus korrelierte die Proteinkonzentration positiv mit dem Grad der Dedifferenzierung des Gewebes, der Tumorgröße und der venösen Invasion des hepatozellulären Karzinoms. Eine erhöhte Konzentration der α-Enolase könnte also mit der Progression des Tumors in Zusammenhang stehen.[77].

Eine Überexpression der α-Enolase konnte auch bei Zelllinien des Mammakarzinoms, Zervixkarzinoms und Kolonkarzinoms nachgewiesen werden [78-81].
Innerhalb einer Studie konnten in einer Proteomanalyse von Gewebeproben eines Patienten mit squamösem Larynxkarzinom ebenfalls erhöhte Proteinkonzentrationen der α-Enolase nachgewiesen werden [82].

4.2.6 Erhöhte Konzentration der α-Enolase und Metastasierung

In einer Untersuchung zweier Kolonkarzinom Zelllinien wurde der Zelllinie des Primärtumors (SW480) die Zelllinie einer Lymphknotenmetastase (SW620) desselben Patienten gegenübergestellt. Es zeigte sich eine erhöhte Konzentration der α-Enolase in der metastatischen Läsion. Die α-Enolase scheint mit zunehmender Progression des Tumors an Bedeutung zu gewinnen [72].

Inwieweit Eigenschaften der α-Enolase, die nicht die glykolytische Aktivität betreffen, mit einer Progression und Metastasierung des Tumors einhergehen, kann an dieser Stelle nur spekuliert werden.

4.2.7 Enolase als Oberflächenprotein

Neben seiner zytosolischen Lokalisation besitzt das Protein eine weitere Funktion als Plasminogen Oberflächenrezeptor auf Endothelien und hämatopoetischen Zellen [83-86].
Das Carboxy-terminale Lysin der Enolase dient dabei als Bindungsstelle für Plasminogen. Gebundenes Plasminogen wird über die Plasminogenaktivatoren schneller zu Plasmin aktiviert und verbleibt länger in seiner aktiven Form, da es am Rezeptor vor seinem Abbau durch α2-Antithrombin geschützt wird [86].
Eine Aktivierung von Plasmin führt einerseits zur Fibrinolyse und damit zum Abbau von Fibrin und Fibrinogen.
Darüber hinaus dient die Serinprotease Plasmin Tumorzellen zum Abbau von Bestandteilen der extrazellulären Matrix. Plasmin führt zu einem proteolytischen Verdau extrazellulärer Matrixproteine wie Fibronektin, Laminin oder Vitronectin und vereinfacht den transformierten Zellen die Migration durch die extrazelluläre Matrix und eine Überwindung von Membranbarrieren. Zusätzlich aktiviert Plasmin weitere Matrix degradierende Proteinasen, die eine Invasion in fremdes Gewebe erleichtern [87, 88].
Besitzt eine Zelle eine hohe Anzahl diese Oberflächenrezeptoren, also eine hohe Kapazität Plasmin(ogen) zu binden, kommt es lokal zu gesteigerter proteolytischer Aktivität, die eine Migration der Zellen durch die extrazelluläre Matrix und deren Barrieren vereinfacht. Dies konnte bereits für Melanomzellen, Kolonkarzinomzellen und Osteosarkomzellen nachgewiesen werden [89-91].
Spekulativ erhöht also eine gesteigerte Anzahl der Plasminogen Rezeptoren auf den Vorläuferzellen deren Migrationsfähigkeit, was einen Übertritt der unreifen Zellen aus dem Knochenmark ins periphere Blut zur Folge haben könnte.

Darüber hinaus scheint Plasmin die Aktivierung inaktiver Wachstumsfaktoren auszulösen und nimmt demnach indirekt Einfluss auf die Proliferation der Zellen [92, 93]

4.2.8 Enolase als Tumormarker

Unter den drei Isoenzymen aus der Enolase Familie gilt die χ-Enolase, besser bekannt als Neuronen spezifische Enolase (NSE), bereits als Tumormarker. Sie katalysiert die Umwandlung von PGA zu PEP in neuronalen Zellen. Es handelt sich dabei entweder um ein Homodimer bestehend aus zwei χ-Untereinheiten, oder einem Heterodimer, dass sich aus einer χ- und einer δ-Untereinheit zusammensetzt.
Die NSE gilt beim kleinzelligen Bronchialkarzinom und neuroendokrinen Tumoren als prognostischer Marker und gibt Auskunft über die Progression des Tumors [94, 95]. Auch bei adulter T-Zell-Leukämie konnten erhöhte Konzentrationen der NSE im Serum festgestellt werden [96].

4.3 Identifikation des NME1-NME2-Proteins

4.3.1 Das NME-Gen

Das NME Gen wurde erstmals in einem Versuch an einer murinen Melanom Zelllinie beschrieben. Es ließ sich in Zellen mit hohem metastatischem Potential als schwächer exprimiert nachweisen und gilt demzufolge als Metastasen Suppressor Gen [97]. Sowohl das humane Nm23-H1-Gen [98] als auch das NM23-H2-Gen [99] sind auf Chromosom 17q21.3 lokalisiert [100]. Darüber hinaus konnten bislang sechs weitere Gene entdeckt werden, die für Nukleosid Diphosphat Kinasen codieren[101].

4.3.2 Das NME1-Protein

Das NME1-Protein (Nm23-H1) besteht mit einem Molekulargewicht von 17.1 kDa und einem isoelektrischen Punkt von 5.83 aus einer Sequenz von 152 Aminosäuren. Aufgrund starker Homologie mit dem bereits bekannten Enzym gip17 aus Dictyostelium discoideum konnte Nm23-H1 als NDP Kinase identifiziert werden [102].

4.3.3 Das NME2-Protein

Das NME2-Protein besteht ebenso aus 152 Aminosäuren bei einem Molekulargewicht von 17.3 kDa und einem isoelektrischen Punkt von 8.5. Die beiden Proteine stimmen in ihrer Sequenz zu 88 % überein.
Das NME2-Protein konnte in der NDP Kinase von Erythrozyten als Kette B identifiziert werden. Bei der Kette A handelt sich es um das bereits erwähnte NME1-Protein [103].
NDP Kinasen sind hexamere Enzyme, die sich in verschiedener Relation aus den Ketten A und B zusammensetzen und ubiquitär exprimiert werden [103]. NME1 und NME2 sind im Zytosol lokalisiert, darüber hinaus kann NME2 außerdem im Nukleus vorliegen, wo es als ein Transkriptionsfaktor für c-myc agiert [104]. Neben NME1 (Nm23-H1) und NME2 (Nm23-H2) sind bislang sechs weitere dieser Kinasen bekannt, die als Nm23-H3 bis Nm23-H8 bezeichnet werden [101]. Interessanterweise sind alle Aminosäuren, die sich innerhalb der beiden Isoformen unterscheiden, auf der Oberfläche der Hexamere lokalisiert. Dies scheint für die Erkennung der Kinasen durch weitere Proteine ausschlaggebend zu sein [104].

4.3.4 Erniedrigte Konzentration des NME1-NME2-Proteins in Spot A11

4.3.4.1 Spot A11

In der massenspektrometrischen Analyse wurde der Spot A11 mit einem Score von 71 als NME1-NME2 Protein (SWISSPROT: Q32Q12; Q32Q12_HUMAN) identifiziert. Es handelt sich um ein Protein mit dem Molekulargewicht von 30.1 kDa und einem daraus kalkulierten isoelektrischen Punkt von 9.06. Spot A11 zeigt sich in den CML-Gelen in fünf von sechs Gelen erniedrigt. In der Literatur wird das Protein bei 292 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 32.6 kDa und einem isoelektrischen Punkt von 8.70 angegeben. Es besteht aus den fusionierten Proteinen NME1 und NME2, die zur Familie der Nukleosid Diphosphat Kinasen gehören.

4.3.5 Nm23 Proteine und ihre biochemischen Funktionen

4.3.5.1 Nm23 als Nukleosid Diphosphat Kinase

Sowohl Nm23-H1 als auch Nm23-H2 besitzen NDP Kinase Aktivität. Sie katalysieren die Phosphorylierung eines Nukleotiddiposphates zu einem Nukletidtriphosphat und sind ubiquitär exprimiert.
Nm23-Proteine übertragen das terminale Phosphat eines Nukleotidtriphosphats an das eigene Histidin 118, und wandeln mit Hilfe dieses phosphorylierten Zwischenprodukts ein weiteres NDP zu einem NTP um [102]. Histidin 118 ist an der Nukleotidbindungsstelle lokalisiert und dient dort als Phosphatdonor und –akzeptor. Es gilt als wichtigster Bestandteil der NDP Kinase Aktivität.
Hartsough et al. identifizierten in vitro einen komplexen Histidin zu Serin Protein Kinase Signalweg, der denkbar mit Signaltransduktion und Metastasierung in Verbindung steht. Es handelt sich um eine Interaktion von Nm23-H1 mit KSR (Kinase Suppressor of Ras), das schließlich an Raf-1, MEK1/2, Erk1/2 und Hsp90 binden kann [105].

4.3.5.2 Nm23 als Phosphotransferase

Nm23-H1 ist in der Lage mit NADPH einen Komplex zu bilden, der die Aktivität einer Phosphotransferase besitzt. Folglich ist der Komplex imstande, Serin oder Threonin Reste zu phosphorylieren und in die Signaltransduktion einzugreifen [106]. Des Weiteren scheint Nm23-H1 die Fähigkeit zu besitzen, Aspartat und Glutamat Reste anderer Proteine zu phosphorylieren, was die Zellmotilität herabsetzt [107].

4.3.5.3 Nm23 als Nuklease

Nm23-H2 fungiert als Transkriptions Regulator und bindet in dieser Funktion an den Promotor für c-myc und aktiviert dessen Transkription [108].
Zum einen besitzt Nm23-H2 eine Sequenz-abhängige DNA Bindungsfähigkeit, die unabhängig von der Nukleotidbindungsstelle mit den Resten Arg34, Asn69 und Lys134 am Äquator des Proteins assoziiert ist [109].

Darüber hinaus konnte allerdings noch eine weitere DNA Bindungsstelle identifiziert werden, in der eine kovalente reversible Bindung des Proteins an die DNA entsteht. Dieser Bereich liegt innerhalb der Nukleotid-bindenden Region der NDP Kinase und bindet die Aminosäure Lys12 mit ein, die an Bindung der DNA und Spaltung von der DNA beteiligt ist. Dies deutet auf ein gemeinsames katalytisches Zentrum der Nuklease und der NDP Kinase Aktivitäten des Proteins hin [109].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Nm23 in komplexe biochemische Mechanismen involviert ist und diese noch nicht bis ins Detail verstanden sind. Gleichwohl lässt sich ein Zusammenhang mit Entwicklung, Differenzierung [110], Kanzerogenese und Metastasierung nicht von der Hand weisen.
Nm23-H2 beeinträchtigt möglicherweise Zelladhäsion und Migration. Neben Effekten auf die Zell Adhäsion, die über eine Regulation der Expression von Integrin Rezeptoren auf der Zelloberfläche und Metallo-Proteasen der Matrix zurückzuführen ist, scheint Nm23 mit ICAP-1, einem negativen Regulator der beta 1 Integrin vermittelten Zelladhäsion, in Interaktion zu treten. Dieser Komplex könnte Einfluss auf den Integrin vermittelten Signalweg und folglich die Fortbewegung und Migration der Tumorzellen haben [111].

4.3.6 Nm23 und Hämatopoese

In einer differenzierungsresistenten murinen myeloiden Leukämie M1 Zelllinie konnte ein sogenannter I-Faktor identifiziert werden, der mit dem Nm23-M2 Protein übereinstimmt [112]. Darüber hinaus gelang es mit nativer Erythrozyten NDP Kinase auch humane leukämische Zelllinien (HEL, KU812 and K562) an einer induzierten Differenzierung der Erythrozyten zu hemmen. Allerdings ließ sich kein inhibierender Effekt bei der Differenzierung der Monozyten und Granulozyten der HL-60, U937 and HEL/S Zellen nachweisen [113]. Willems et al. zeigten eine hohe Expression des nm23 Gens in CD34+ Knochenmark Zellen, die mit der Differenzierung der Zellen abnahm. Demnach wiesen reifere Knochenmark Zellen bereits niedrigere Konzentration von nm23 auf. Die schwächste Expression zeigten Lymphozyten aus dem peripheren Blut [114].

4.3.7 Nm23 und Metastasierung

4.3.7.1 Melanom

Das NME1- Gen wurde erstmals innerhalb eines Modells mit murinen Melanomzellen beschrieben. Eine Zelllinie mit geringem metastatischen Potential wies eine höhere NME1-m-RNA Expression auf als Zelllinien mit hohem metastatischen Potential [97]. Auf Proteinbasis zeigte sich gleichermaßen, dass metastatische Tumorzellen eine erniedrigte Expression des Proteins aufweisen [98].

In einer Gegenüberstellung von gutartigen Naevi mit malignen Melanomen, Lymphknoten- und Fernmetastasen zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der nm23 Protein Expression von Naevi und Melanomen. Des Weiteren konnte in den Metastasen ein erniedrigtes Protein Level von nm23 beobachtet werden. Interessanterweise konnte sogar eine niedrige nm23 Expression mit der Gegenwart von Metastasen und einer schlechten Prognose der Patienten korreliert werden [115].

4.3.7.2 Mammakarzinom

In ähnlicher Weise zeigten sich die Ergebnisse beim Mammakarzinom. Eine mit nm23-H1 c-DNA transfizierte humane Mammakarzinom Zelllinie ließ eine niedrigere Metastasierungsrate beobachten als die Kontrollgruppe [116]. Eingebracht in Brustgewebe oder subkutan injiziert in Mäuse, aber gleichfalls in vitro, konnte eine geringere Absiedelungs- oder Kolonisierungsrate nachgewiesen werden.

Darüber hinaus konnte bei Brustkrebs Patientinnen in einer Kohortenstudien eine hohe Expression des nm23-Gens mit einer besseren Prognose und einer höheren Überlebensrate in Zusammenhang gebracht werden. Gut differenzierte Tumoren wiesen eine höhere Nm23 m-RNA Expression auf. In gleicher Weise verhielt es sich mit den nodalen Befunden, eine erhöhte Expression ließ einen guten Lymphknotenstatus beobachten [117].

4.3.7.3 Ovarialkarzinom

In einer Untersuchung an Ovarialkarzinomen zeigte sich zum einen eine erhöhte Expression des nm23-H1 Gens in muzinösen Ovarialkarzinomen im Vergleich mit serösen, endometrioiden und Adenokarzinomen des Ovars. Darüber hinaus wiesen Metastasen im Omentum eine niedrigere Expression von nm23-H1 auf als im Primärtumor derselben Patientin. Daraus schlossen die Autoren, dass das nm23-H1

Gen in den Prozess eingreift, der den Tumor an der Invasion in fremdes Gewebe hindert [118].

4.3.7.4 Kolonkarzinom

Dahingehend gehen auch die Überlegungen einer Untersuchung an Kolonkarzinomen. Die humane Kolonkarzinom Zelllinie HT-29, die mit Nm23-H1 transfiziert wurde, wies eine Suppression von Lebermetastasen in Mäusen auf. Zellen, die nm23-H1 überexprimierten, besaßen eine verringerte Anzahl aktiver MAP Kinasen und eine erniedrigte Rate aktiver MLC Kinasen. Nm23-H1 scheint Einfluss auf die Anzahl phosphorylierter und dephosphorylierter MAP Kinasen (mitogen-activated protein) und MLC (myosin light chain) Kinasen zu besitzen. Liegen diese in dephosphoryliertem Zustand, also in inaktiver Form vor, sind sie nicht in der Lage,n die regulierenden Leichtketten zu phosphorylieren, die die Funktion von Myosin II steuern. Myosin übernimmt Aufgaben innerhalb des Actin-Myosin Zytoskeletts die zur Kontraktion und Motilität der Zelle beitragen und folglich auch die Migration der Zelle beeinflussen. Dies könnte ein Mechanismus sein, der zu weniger Absiedelungen der Tumorzellen und zu erniedrigter gerichteter Migration innerhalb dieser Untersuchung führte [119].
Da in den Transfektionsexperimenten die Größe des Primärtumors durch eine Expression von Nm23 jedoch nahezu unbeeinflusst blieb, spricht man nicht von einem Tumor Suppressor Gen, sondern von einem Metastasen Suppressor Gen [120].
Eine Mutation des nm23-Gens konnte bei kolorektalen Karzinomen mit Metastasen in Lymphknoten, Leber und Lunge assoziiert werden. Zwölf weitere Karzinome, die noch nicht metastasiert waren, wiesen im nm23-Gen keine genetischen Alterationen auf[121]. Dies unterstreicht den Stellenwert des Gens, den es in der Entstehung von Metastasen vermuten lässt.
Hinsichtlich der therapeutischen Optionen birgt das NME-Protein wenig Nutzen im Bezug auf den Primärtumor. Allerdings scheint bedeutsam zu erwähnen, dass die Mortalität des Patienten nicht aufgrund des Primärtumors steigt, sondern durch sekundäre Läsionen des Primärtumors. Folglich sind grundlegende Erkenntnisse im Bereich des Metastasierungsprozesses wichtig, um eine Absiedelung und Invasion in fremdes Gewebe zu verhindern.

4.3.7.5 Bronchialkarzinom

Sowohl drei Zelllinien kleinzelliger Bronchialkarzinome als auch sechs weitere Zelllininen nicht kleinzelliger Bronchialkarzinome ließen im Vergleich zu Zelllinien gesunder Lungengewebe eine erhöhte Expression der nm23-H1 mRNA erkennen [122].

In Bronchiallavagen von Patienten mit squamösen Bronchialkarzinomen ließen sich aus den Lavagen des erkrankten Bronchus höhere Konzentrationen des nm23 Proteins nachweisen als aus der nicht betroffenen kontralateralen Lunge [123].
Diese Erkenntnisse stehen der Annahme gegenüber, dass die niedrige Expression des Proteins mit erhöhter Malignität und aggressivem Tumorwachstum in Verbindung steht. Erdenklich wäre, dass sowohl eine erniedrigte Expression als auch eine Überexpression mit Malignität einhergehen.

4.3.7.6 Prostatakarzinom

Beim Prostatakarzinom konnte bislang noch kein eindeutiger Zusammenhang hergestellt werden. So wiesen sowohl Lymphknotenmetastasen des Prostatakarzinoms, als auch der Primärtumor eine erhöhte Expression des NME-Gens im Vergleich zum gesunden Gewebe auf [124].
In einem Versuch an immun inkompetenten Mäusen, die mit Prostatakarzinomzellen xenotransplantiert wurden, konnte nm23 im Serum der Mäuse identifiziert werden. Dies impliziert eine Produktion von nm23 durch den Tumor, da eine Immunantwort der Maus nicht Ausgangspunkt für die Expression der Kinase sein kann [125].
Dem gegenüber stehen Ergebnisse einer Studie, in der eine niedrige Expression des nm23-Gens mit schlechtem klinischen Staging und hohem Tumor Grading einherging [126].

Bei weiteren Tumorerkrankungen sind die Ergebnisse ähnlich widersprüchlich. In einigen Fällen ist gar kein Zusammenhang herzustellen. In anderen Fällen zeigt sich wiederum eine positive Assoziation, das heißt eine erhöhte Tumor Aggressivität geht mit einer erhöhte Expression der Nm23/NDP Kinase einher.

4.3.7.7 Neuroblastom

Beim Neuroblastom korreliert ein aggressiver Tumor (Stage III, IV) mit erhöhter Expression und folglich auch mit einer schlechten Prognose der Patienten[127].
In einer weiteren Studie an Neuroblastomen konnte ein Zusammenhang zwischen nm23 RNA Überexprimierung und schlechter Prognose und einem niedrigen Rezidiv-freien Überleben der Patienten hergestellt werden [128].

4.3.7.8 Leukämien

An einer murinen myeloischen Leukämie Zelllinie M1 ließ sich ein sogenannter I-Faktor identifizieren (differentiation inhibiting factor), bei dem es sich um Nm23/NDP-Kinase handelt. Mit Hilfe von M1 Zellen, die auf Induktion der

Differenzierung zu Monocyten/Makrophagen durch Induktoren wie Dexamethason resistent reagierten, produzierten höhere Konzentration des I-Faktors (Nm23/NDP Kinase). Die Autoren schließen daraus, dass es sich bei diesem Protein um einen Faktor handelt, der die Differenzierung in leukämischen Zellen unterdrückt. [112].

Mit Hilfe der ELISA Technik ließ sich in einer weiteren Studie ein Nachweis erhöhter Serum Konzentrationen des Nm23-H1 Proteins bei hämatologischen Erkrankungen wie AML, CML, ALL, MDS und malignen Lymphomen treffen [129].
In einer Untersuchung von Blut- und Knochenmarksproben von 110 AML Patienten zeigte sich eine gesteigerte mRNA Expression von nm23-H1und nm23-H2 im Vergleich zu normalen Blutzellen. Eine erhöhte nm23-H1 Expression korrelierte mit schlechter Prognose und reduziertem Gesamtüberleben [130].

Diese Erkenntnisse stehen unseren Beobachtungen gegenüber, da das NME1-NME2-Protein in unseren Untersuchungen erniedrigt ist.

4.4 Identifikation von SAHMDI 1

4.4.1 Analyse von Spot B1 und B2

4.4.1.1 Spot B1

In der massenspektrometrischen Analyse wurde der Spot B1 mit einem Score von 190 als SAMHDI 1 identifiziert (SWISSPROT: Q9Y3Z3, SAMH1_HUMAN). Gemäß der Auswertung handelt es sich um ein Protein mit einem Molekulargewicht von 72.2 kDa und einem daraus kalkulierten isoelektrischen Punkt von 6.69. Spot B1 zeigt sich in 5 der 6 CML-Gelen in erhöhter Konzentration.

4.4.1.2 Spot B2

In der massenspektrometrischen Analyse wurde der Spot B2 mit einem Score von 169 als SAMHDI 1 identifiziert (SWISSPROT: Q9Y3Z3, SAMH1_HUMAN). Entsprechend handelt es sich um dasselbe Protein mit einem Molekulargewicht von 72.2 kDa und einem daraus kalkulierten isoelektrischen Punkt von 6.69. Spot B2 zeigt sich ebenfalls in 5 der 6 CML-Gelen in erhöhter Konzentration. Im Gel waren die Spots B1 und B2 direkt nebeneinander lokalisiert, dementsprechend überrascht die Tatsache, dass es sich um ein identisches Protein handelt, nur gering. In der Literatur ist es bei 626 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 72.2 kDa und einem isoelektrischen Punkt von 6.69 angegeben.

In einem großangelegten Screening, das auf die Expression neuartiger cDNA von humanen dendritischen Zellen des peripheren Blutes angelegt war, ließ sich ein Protein mit 626 Aminosäuren identifizieren. Aufgrund der signifikanten Homologie zu MG11, einem durch Interferon gamma induzierten Protein der Maus [131], sprachen die Autoren schließlich von DCIP (dendritic cell-derived IFN-χ induced protein). Eine mRNA Expression ließ sich unter anderem in den Zelllinien K562 (CML), HL60 (Promyelozyten Leukämie) und THP-1(Monozyten Leukämie) nachweisen. Darüber hinaus konnte eine mRNA Expression von DCIP ebenfalls in Herz, Skelettmuskel, Milz, Leber, Dünndarm, Plazenta, Lunge und Leukozyten des peripheren Bluts festgestellt werden. In Kolon und Niere war eine Expression der mRNA nur geringfügig ausgeprägt, in Thymus und Gehirn konnte keine DCIP mRNA gefunden werden [132].
Bei DCIP handelt es sich um SAMHDI 1, dessen Name sich aus der Gegebenheit zusammensetzt, dass das Protein eine SAM-Domäne und eine HD-Domäne enthält. Die SAM (sterile α motif) Domäne stellt vermutlich eine Bindungdomäne dar, die mit der Regulation von Wachstumsprozessen in Verbindung steht [133].
Das SAMHDI 1 Protein ist bislang nahezu unerforscht. Man geht davon aus, dass die Expression des Proteins ähnlich wie bei MG11 durch Interferon gamma induziert werden kann.

4.4.2 Interferon gamma

Es handelt sich hierbei um ein Typ II Interferon, das von mitogen- oder antigen-stimulierten T-Lymphozyten oder natürlichen Killerzellen sezerniert wird [134, 135]. Interferon gamma ist ein Homodimer, das sich aus zwei identischen Polypeptidketten zusammensetzt. Mit einer Größe von 20-25 kDa, abhängig vom Glykosylierungsgrad, besitzen die einzelnen Ketten 143 Aminosäuren [136] und sind über eine nicht kovalente Bindung miteinander verbunden [137]. Das biologisch aktive Dimer besitzt eine alpha helikale Struktur mit sechs Helices in jeder Untereinheit, die antiparall ineinander greifen [138]. Aufgrund der homodimeren Struktur zeigt sich das aktive Interferon gamma als säureempfindlich und hitzelabil [139].

4.4.2.1 Wirkmechanismus von Interferon gamma

Interferon gamma bindet als Dimer an einen Rezeptorkomplex, der aus einer α- und β-Untereinheit besteht und auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert wird. Bindet Interferon gamma an die α-Untereinheit des Rezeptors kommt es zur Dimerisierung des Rezeptors und über Transphosphorylierung der Tyrosinreste der Janus Kinasen (JAK) I und II und zu deren Aktivierung. Die aktivierten JAKs phosphorylieren Tyrosinreste der α-Rezeptoruntereinheiten und formen Bindungsstellen für STAT1. Der Transkriptionsfaktor STAT1 wird am Tyrosinrest 701 phosphoryliert, dissoziiert und homodimerisiert und formt somit das sogenannte GAF (gamma-interferon activation factor) und transloziert in den Nukleus. Dort bindet es an GAS-Elemente (gamma activated site) der DNA und stimuliert oder supprimiert die Transkription einer Vielzahl von Zielgenen [140].

Gegebenenfalls könnte die Gegenwart der proliferierenden Zellklone im Knochenmark der Betroffenen eine antigen-stimulierte Reaktion der T-Lymphozyten und NK-Zellen auslösen, an die sich eine verstärkte Produktion von Interferon gamma anschliesst. Interferon gamma wies auf eine Reihe von murinen Tumorzelllinien zytotoxische Wirkung auf. [141] und obgleich Interferon alpha und gamma in ihrer Sequenz und in ihrem Bindungsverhalten entscheidend voneinander abweichen, zeigten sich in vitro für beide Präparate ähnliche Ergebnisse in der Suppression myeloider Zellen [142-144]. Diese Resultate wurden zum Anlass genommen, Patienten mit neudiagnostizierter Ph-positiver CML Interferon gamma in der Dosis von 0.25-0.5 mg/m^2/Tag intramuskulär zu applizieren. Sechs der 26 auswertbaren Patienten wiesen eine komplette hämatologische Remission auf, vier weitere Patienten erreichten immerhin eine partielle hämatologische Remission [145]. Mit einer solchen Reaktion, also einer Induktion der Synthese von Interferon gamma durch Mitogen- oder Antigen-stimulierte T-Lymphozyten oder natürliche Killerzellen wäre ein durch Interferon gamma induzierter Konzentrationsanstieg des Proteins SAMHDI 1 zu erklären.

4.4.3 Interferon α

4.4.3.1 Interferon α in der Therapie der CML

In der Therapie der CML stellte Interferon α vor Beginn der Behandlung mit selektiven Tyrosinkinaseinhibitoren das Mittel der Wahl zur Behandlung der chronischen Phase der Erkrankung dar.
Interferon alpha gehört zu den Typ I Interferonen, die sich durch eine hohe Temperatur- und Säurestabilität auszeichnen. Kommt es im Körper zu einer viralen oder bakteriellen Infektion, besitzen insbesondere infizierte T- und B-Lymphozyten und Makrophagen die Fähigkeit, Interferon alpha zu synthetisieren. Es handelt sich um eine Familie ähnlicher Proteine, die sich aus monomeren Polypeptidketten mit jeweils 165 oder 166 Aminosäuren zusammensetzen und ein Gewicht von 18-21 kDa besitzen [146].
Interferon alpha bindet an einen Rezeptor, der zur Familie der Typ II Zytokin Rezeptoren gehört [147]. Er besteht aus zwei Transmembranproteinen IFNAR-1 und IFNAR-2, die sich jeweils aus einer extrazellulären Domäne, einer Transmembrandomäne und einer intrazellulären Domäne zusammensetzen. Dabei ist im Fall der IFNAR-1 Untereinheit die intrazelluläre Domäne mit der Janus-Kinase Tyk2 und bei der IFNAR-2 Untereinheit die intrazelluläre Domäne mit der Janus-Kinase JAK1 assoziiert. Vereinfacht kommt es nach Ligandenbindung zur Tyrosinphosphorylierung von IFNAR1 durch die assoziierten Janus-Kinasen, im Anschluss werden STAT1/STAT2 Komplexe phosphoryliert, die sich vom Rezeptor lösen, daraufhin p48 binden und schließlich als Transkriptionsfaktor ISGF3 in den Zellkern translozieren [148, 149]. Dort aktiviert er durch Bindung an interferon stimulated regulatory elements (ISRE) die Transkription interferon stimulated genes (ISGs) [150, 151].

Interferon α besitzt immunomodulatorische Eigenschaften, die sich in antiviraler Aktivität und der Stimulation der Antigen-Präsentation durch MHC 1- und MHC 2-Moleküle widerspiegeln. Darüber hinaus erhöht es die Aktivität der Phagozyten und trägt demnach auch zur Abwehr von Bakterien bei. In der Behandlung der CML beinflusst es vermutlich den Verlauf der chronischen Phase durch seine antiproliferativen Eigenschaften. Darüber hinaus induziert es die Zelldifferenzierung [152, 153] und stellt die beta 1 Integrin vermittelte Adhäsion der Progenitorzellen am Stroma des Knochenmarks wieder her. Die Hemmung eines unkontrollierten Wachstums der Vorläuferzellen, die physiologischerweise ebenfalls durch beta 1 Integrine vermittelt wird, stellt sich durch Wirkung von Interferon α wieder ein [154].

4.4.3.2 Vortherapie der Patienten mit Interferon α

Die Patienten der Probe 2, Probe 7 und Probe 16 sind vor Entnahme des Knochenmarks mit Interferon α therapiert worden. Nun könnte in Annahme einer Überschneidung der intrazellulären Signalwege [150] ein Zusammenhang zwischen dem Konzentrationsanstieg des SAMHDI 1 Proteins und der Interferon alpha Gabe vermutet werden. Aufgrund der unterschiedlichen Struktur der beiden Interferone, verschiedenen Rezeptorensystemen, divergierender Signaltransduktionwege und anderen Zielgenen scheint dies äußerst unwahrscheinlich. Dagegen spricht außerdem, dass sich in der mit Interferon alpha vortherapierten Probe 16 keine erhöhte Konzentration des Proteins nachweisen ließ. Hier zeigte sich eine erniedrigte Konzentration von SAMHDI 1 im Vergleich zu den gesunden Kontrollen.
Probe 1, Probe 5 und Probe 12, die in der Vorgeschichte nicht mit Interferon vortherapiert wurden, wiesen aber dennoch erhöhte Konzentrationen des Proteins auf. Demzufolge kann aus den Ergebnissen keine sichere Aussage über die Auswirkungen der Interferontherapie auf die Induktion des Proteins im Knochenmark der CML Patienten getroffen werden.

4.5 Identifikation von γ-Actin

4.5.1 γ-Actin

Im Gegensatz zu α-Aktin, dass sich ausschließlich in Muskelzellen findet, werden β- und γ-Actin in allen Zellen des menschlichen Körpers exprimiert [155, 156]. Sie sind Bestandteil des Zytoskeletts und sind entscheidend an Phagozytose, Mitose und Motilität der Zelle beteiligt. β- und γ-Actin, die aufgrund ihrer geringen Größe auch als Mikrofilamente bezeichnet werden, unterscheiden sich nur in 1 % der Aminosäurensequenzen. Das β-Actin-Gen ist auf Chromosom 7, das γ-Actin-Gen auf Chromosom 17 lokalisiert [157].

4.5.2 Erhöhte Konzentration von γ-Actin in Spot B4

4.5.2.1 Spot B4

In der massenspektrometrischen Analyse ließ sich Spot B4 mit einem Score von 96 als gamma-Actin (Actin cytoplasmic 2, SWISSPROT: P63261; ACTG_HUMAN) identifizieren. Es handelt es sich um ein 375 Aminosäuren umfassendes Protein mit einem Molekulargewicht von 41.8 kDa und einem isoelektrischen Punkt von 5.31. Die Konzentration von gamma-Actin stellt sich in 5 der 6 CML-Gelen im Vergleich zum Gesunden als erhöht dar.

4.5.3 γ-Actin und Migration

Die Zellmigration ist an eine Neuorganisation des Aktin Zytoskeletts gebunden [158]. Intrazellulär kommt es zu einer Aktivierung der Rho-like GTPasen Rac und Cdc42, die eine Reorganisation des Aktinskeletts und die Ausbildung der sogenannten Filopodien und Lamellipodien ermöglichen. Filopodien und Lamellipodien dienen der Zelle zur Fortbewegung [159].

Die chronisch myeloische Leukämie ist durch einen Übertritt unreifer Vorläuferzellen vom Knochenmark ins periphere Blut gekennzeichnet. BCR-ABL steht im Verdacht die Motilitäts- und Adhäsionseigenschaften der Zellen zu verändern.

4.5.4 Erhöhte Konzentration von γ-Actin und gesteigerte Motilität

BCR-ABL konnte mit erhöhter spontaner Motilität, vermehrter Bildung von Filopodien und einer erhöhten Rate von Protrusionen und Retraktionen assoziiert werden [160]. Dies ist möglicherweise auf eine deregulierte Aktivierung der Rho-like GTPasen zurückzuführen. Physiologischerweise wird deren Aktivität nämlich von

BCR reguliert [161]. In vitro konnte, ausgelöst durch die Bildung der Fusionsproteine ABL-BCR und BCR-ABL, bereits eine deregulierte Aktivierung der GTPasen beobachtet werden [162].

Darüber hinaus besitzt das BCR-ABL-Protein eine Actin-bindende Domäne [163, 164] und ist zu 70 % am Zytoskelett lokalisiert [165]. Sind die erkrankten Zellen aufgrund der pathologischen Interaktion mit gesteigerten Migrationseigenschaften ausgestattet, erlangen sie einen deutlichen Vorteil gegenüber gesunden Zellen. Sie sind in der Lage, in unreifem Zustand das Knochenmark zu verlassen und über die Blutbahn in extramedulläre Gewebe vorzudringen. Dies führt zu leukämischer Infiltration und zur Progression der Erkrankung.

4.6 Offene Fragen

4.6.1 Schwierigkeiten in Aufarbeitung und Verarbeitung des Knochenmarks

4.6.1.1 Verarbeitung des frisch entnommenen gesunden Knochenmarks

Bei den Proben 20, 34, 35 handelt es sich um Knochenmarkproben von gesunden Spendern. Nach Entnahme aus dem Beckenkamm wurden sie sofort antikoaguliert und gefiltert. Nach Erhalt der gekühlten Proben wurden sie, wie in Kapitel 2.1 beschrieben, verarbeitet. Um die Proben in der zweidimensionalen Gelelektrophorese untersuchen zu können, schloss sich die Aufarbeitung der Proben, wie in Kapitel 2.4 beschrieben, an. Sowohl der Einfriervorgang als auch die Aufarbeitung blieben komplikationslos. So zeigte beispielsweise Probe 20 in der Zellzählung $3{,}2 \times 10^6$/800 µl. Nach Gesamt-Protein Aufarbeitung (siehe Kapitel 2.6) konnten die Proben die zweidimensionale Gelelektrophorese durchlaufen, allerdings zeigten sie nach der Silberfärbung alle ein anderes Verteilungsmuster und eine stark abgeschwächte Intensität der Proteinspots. Auch ein erneuter Versuch mit erhöhten Protein Konzentrationen zeigte nicht den gewünschten Erfolg. Aufgrund der wiederholten eingeschränkten Beurteilbarkeit der Gele wurde das frische gesunde Knochenmark gegen gesunde periphere Blutstammzellen ausgetauscht. Diese Gele zeigten ein ähnliches Verteilungsmuster der Proteinspots wie die Gele der CML Knochenmark Proben und ließen sich diesen in der Auswertung gegenüber stellen.

4.6.1.2 Verarbeitung der Knochenmark Backups der CML Patienten

Unter den 15 untersuchten CML Proben und den dazugehörigen Gelen zeigten sich außergewöhnlich große Schwankungen in Hinblick auf die Qualität der 2-DE Gele. Eine hohe Qualität ist durch ein ausgeglichenes Verteilungsmuster, eine hohe Intensität der Proteinspots und einen möglichst minimalen Background charakterisiert. Im Folgenden soll erarbeitet werden, welche Faktoren Einfluss auf die Beschaffenheit der Gele genommen haben könnten.

4.6.1.3 Lagerungszeit

Zunächst musste angenommen werden, dass trotz der DMSO Kryokonservierung bei –196°C die Lagerungszeit die Eigenschaften der KM-Backups beeinträchtigt. Allerdings konnte erstaunlicherweise kein sicherer Zusammenhang zwischen

Einfrierdatum und Qualität der Proben hergestellt werden. Die sechs in die Auswertung eingeschlossenen Proben wiesen eine durchschnittliche Lagerungszeit von 1133 Tagen auf (siehe Tabelle 22). Im Mittel liegt die Lagerungszeit der neun nicht zu verwertenden Proben mit 1431 Tagen (siehe Tabelle 23) deutlich höher. Dabei verdeutlichen allerdings die guten Ergebnisse der Probe 16 mit 2722 Tagen unter Kryokonservierung, dass keine kausale Beziehung zwischen Alter und Lagerung der Probe hergestellt werden kann.

4.6.1.4 Alter der Patienten

Im Mittel lag das Alter der Patienten der zufriedenstellenden Gele in Tabelle 22 bei 50 Jahren. Das Durchschnittsalter der ungeeigneten Proben stellte sich in Tabelle 23 mit 39, 9 Jahren als niedriger dar. Inwiefern das jüngere Erkrankungsalter Einfluss auf die Knochenmarksproben besitzt, kann an dieser Stelle abermals nur spekuliert werden.

4.6.1.5 Zellzählung nach Aufarbeitung des Knochenmarks

Bevor Patienten kryokonserviertes Knochenmark erneut zugeführt werden kann, muss eine Zellzählung erfolgen um die Viabilität der Zellen zu erfassen. Zur Überprüfung unserer KM-Aufarbeitung führten wir diese erst im Anschluss an die Aufarbeitung der Zellen durch. Der Durchschnitt der Zellzählung der guten Proben, zu entnehmen aus Tabelle 22, lag bei $2{,}49X10^6$/800 µl. Vier der nicht auszuwertenden Proben zeigten in der Zellzählung höhere Zellzahlen (siehe Tabelle 23), drei Proben lagen mit $2{,}4x10^6$/800 µl etwa im Rahmen des Mittelwerts der positiven Vergleichsproben und eine Probe wies mit $0{,}64x10^6$/800 µl deutlich niedrigere Zellzahlen auf. An Probe 6 wurde keine Zellzählung durchgeführt.
Hinsichtlich dieser Ergebnisse bleibt eine Einschätzung schwierig. Zwar ist davon auszugehen, das gute Ergebnisse mit extrem geringen Zellzahlen nahezu unmöglich sind. Darüber hinaus ist aber keine Tendenz erkennbar. Hohe und niedrige Zellzahlen sind in beiden Gruppen eher zufällig verteilt und es fällt auf, dass hohe Zellzahlen keine gute Qualität zu sichern scheinen. Erstaunlicherweise konnte ein eindeutiger Zusammenhang zwischen hoher Zellzahl und guten Ergebnissen nicht hergestellt werden.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass bis jetzt nicht nachvollziehbar ist, wo die Störfaktoren in der Aufarbeitung und Verarbeitung des Knochenmarks zu suchen sind. Unverkennbar waren Unterschiede zwischen den Knochenmark Backups. Besonders ausgeprägt waren die Qualitätsunterschiede zwischen Knochenmark und Peripheren Blutstammzellen. In Tabelle 21 sind die CML-KM Proben aufgelistet, die schließlich in die Untersuchungen mit einbezogen wurden. Tabelle 22 zeigt die

KM-CML Proben, die aufgrund nicht verwertbarer 2-DE Gele nicht in die Auswertung miteinbezogen werden konnten. In Tabelle 21 und 22 sind Lagerungszeit des Knochenmarks, das Alter und Geschlecht der Patienten, die Vorbehandlung der Patienten bis zur Entnahme des Knochenmarks, sowie die Zellzählung, die nach der Aufarbeitung des Knochenmarks, wie im Kapitel 2.3 beschrieben, durchgeführt wurde, dargestellt.

Tabelle 23: KM-CML Proben, die aufgrund verwertbarer Ergebnisse in die Auswertung mit einbezogen wurden.

Probe	Qualität der Gele	Kryokonservierung bei -196 °C		Alter des Patienten bei Entnahme	Therapie vor Entnahme	Geschlecht	Zellzählung nach Aufarbeitung $gx10^6$ Zellen/ 800 µl Probe
		Zeitraum	In Tagen				
KM CML 1	+	29.04.2005-20.01.2006	266	47 Jahre	Hydroxyurea Imatinib	w	1,44
KM CML 2	+	26.10.2004-24.01.2006	455	33 Jahre	Hydroxyurea Imatinib Interferon α	m	1,76
KM CML 5	+	14.08.2002-26.01.2006	1261	39 Jahre	Hydroxyurea Imatinib	m	2,4
KM CML 7	+	13.02.2002-30.01.2006	1144	61 Jahre	Hydroxyurea Imatinib Interferon α	w	4,0
KM CML 12 Ph -	+	24.06.2003-31.01.2006	952	61 Jahre	Hydroxyurea	m	1,76
KM CML 16	+	20.08.1998-01.02.2006	2722	59 Jahre	Hydroxyurea Interferon α	m	3,6
			Im Durchschnitt 1133 Tage	Alter im Durchschnitt 50 Jahre		Verhältnis männlich zu weiblich 2:1	Im Durchschnitt 2,49

Probe	Qualität der Gele	Kryokonservierung bei -196 °C		Alter des Patienten bei Entnahme	Therapie vor Entnahme	Geschlecht	Zellzählung nach Aufarbeitungx 10^6 Zellen/ 800 µl Probe
		Zeitraum	In Tagen				
KM CML 3	-	06.02.2003-25.01.2006	1084	42 Jahre	Hydroxyurea	w	6,4
KM CML 4	-	24.10.2001-25.01.2006	1554	41 Jahre	Hydroxyurea	m	4,4
KM CML 6	-	07.05.1999-26.01.2006	2456	47 Jahre	unbekannt	m	unbekannt
KM CML 8	-	23.04.2001-30.01.2006	1743	36 Jahre	Hydroxyurea	w	4,0
KM CML 9	-	08.11.2002-30.01.2006	1179	44 Jahre	Hydroxyurea Imatinib	m	4,4
KM CML 10	-	16.07.2001-30.01.2006	1659	58 Jahre	Hydroxyurea Interferon α Ara C/ Idarubicin	m	2,4
KM CML 11	-	12.12.2003-31.01.2006	781	36 Jahre	Hydroxyurea Imatinib	m	0,64
KM CML 13	-	27.09.2002-31.01.2006	1222	38 Jahre	Hydroxyurea Imatinib	m	2,4
KM CML 14	-	11.10.2002-31.01.2006	1208	17 Jahre	unbekannt	m	2,4
			Im Durchschnitt 1431 Tage	Alter im Durchschnitt 39,9 Jahre		Verhältnis männlich zu weiblich 7:2	

Tabelle 24: KM-CML Proben, die aufgrund nicht verwertbarer Ergebnisse nicht in die Auswertung mit einbezogen werden konnten.

5 Zusammenfassung

Die chronisch myeloische Leukämie besitzt aufgrund des Genotyps mit Philadelphia-Translokation Modellcharakter in der Onkologie. Nahezu regelhaft findet sich zytogenetisch die Translokation der Chromosomen 9 und 22, die auf molekularer Ebene in der Fusion eines BCR-ABL-Gens resultiert. Mit Bildung des BCR-ABL Proteins entsteht eine konstitutiv aktivierte Tyrosinkinase, die in wesentliche Signaltransduktionswege eingreift und zu einer stadienhaft verlaufenden Erkrankung führt.

In der Behandlung der chronisch myeloischen Leukämie ist es gelungen, basierend auf der Kenntnis der molekularen Zusammenhänge einen selektiven Tyrosinkinase Inhibitor Imatinib zu entwickeln, der die gezielte Therapie der Erkrankung ermöglicht.

Obgleich die molekulare Pathogenese der Erkrankung bekannt ist, bleiben viele Vorgänge im Knochenmark der Patienten unverstanden. Daraus ergab sich die Notwendigkeit, mit Hilfe einer Proteomanalyse Knochenmark erkrankter Patienten mit peripheren Blutstammzellen gesunder Spender zu vergleichen. Es konnte kein Nachweis eines für die CML spezifischen Proteins getroffen werden, allerdings ließen sich Unterschiede hinsichtlich der Intensität der Proteinspots darstellen. Eine Identifizierung der Spots gelang mit der hochauflösenden zweidimensionalen Geleelektrophorese, die durch MALDI-TOF ergänzt wurde. Diese Methode ermöglicht eine Momentaufnahme der Zellen und zeigt den exakten Proteinstatus des Gewebes.

Unter den identifizierten Proteinen findet sich die α-Enolase, die sich in den CML Gelen sowohl in erniedrigter und erhöhter Konzentration zu den gesunden Kontrollen zeigte. Die α-Enolase ist ein Protein der Glykolyse, das mit Tumorwachstum, Progression und Metastasierung in Zusammenhang gebracht wird. Ein Isoenzym, die Neuronen spezifische Enolase, gilt bereits als etablierter Tumormarker.

Mit dem Nachweis des NME1-NME2-Proteins konnte eine Nukleotid Diphosphat Kinase identifiziert werden, die mit Entwicklung, Differenzierung und Metastasierung in Zusammenhang steht. Das NME Gen wird als Metastasen Suppressor Gen betrachtet. In dieser Untersuchung wies das NME1-NME2-Protein im Vergleich zu den gesunden PBSC Gelen erniedrigte Konzentrationen auf.

Darüber hinaus konnte eine erniedrigte Konzentration der Fibrinogen beta und Fibrinogen gamma Kette festgestellt werden. Diese Veränderung ist möglicherweise hinweisend auf eine Störung der Hämostase der Patienten. Außerdem konnten veränderte Fibrinogen Konzentrationen mit einer Progression von Tumorerkrankungen in Verbindung gebracht werden.

Als weiteres Protein konnte γ-Actin bestimmt werden. γ-Actin ist Bestandteil des Zytoskeletts. Eine erhöhte Konzentration gibt Hinweis auf eine erhöhte Motilität und Migrationsfähigkeit und veränderte Adhäsionseigenschaften der leukämischen Zellen.

Mit der Analyse von SAHMDI 1 stellte sich ein nahezu unerforschtes Protein dar, dessen Expression durch Interferon gamma induziert werden kann. Inwiefern es mit der Behandlung der CML in Zusammenhang steht kann nur spekuliert werden und erfordert darum weitere Untersuchungen.

6 Literaturverzeichnis

1. Hasford, J., et al., *A new prognostic score for survival of patients with chronic myeloid leukemia treated with interferon alfa. Writing Committee for the Collaborative CML Prognostic Factors Project Group.* J Natl Cancer Inst, 1998. **90**(11): p. 850-8.
2. Gratwohl, A., et al., *Risk assessment for patients with chronic myeloid leukaemia before allogeneic blood or marrow transplantation. Chronic Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation.* Lancet, 1998. **352**(9134): p. 1087-92.
3. Sawyers, C.L., *Chronic myeloid leukemia.* N Engl J Med, 1999. **340**(17): p. 1330-40.
4. Nowell, P.C. and D.A. Hungerford, *Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes.* J Natl Cancer Inst, 1960. **25**: p. 85-109.
5. Gunsilius, E., et al., *Evidence from a leukaemia model for maintenance of vascular endothelium by bone-marrow-derived endothelial cells.* Lancet, 2000. **355**(9216): p. 1688-91.
6. Finch, S.C. and M.S. Linet, *Chronic leukaemias.* Baillieres Clin Haematol, 1992. **5**(1): p. 27-56.
7. Tanaka, K., et al., *9;22 translocation and bcr rearrangements in chronic myelocytic leukemia patients among atomic bomb survivors.* J Radiat Res (Tokyo), 1989. **30**(4): p. 352-8.
8. Groffen, J., et al., *Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22.* Cell, 1984. **36**(1): p. 93-9.
9. Konopka, J.B., S.M. Watanabe, and O.N. Witte, *An alteration of the human c-abl protein in K562 leukemia cells unmasks associated tyrosine kinase activity.* Cell, 1984. **37**(3): p. 1035-42.
10. Di Bacco, A., et al., *Molecular abnormalities in chronic myeloid leukemia: deregulation of cell growth and apoptosis.* Oncologist, 2000. **5**(5): p. 405-15.
11. Cortez, D., G. Reuther, and A.M. Pendergast, *The Bcr-Abl tyrosine kinase activates mitogenic signaling pathways and stimulates G1-to-S phase transition in hematopoietic cells.* Oncogene, 1997. **15**(19): p. 2333-42.
12. Neshat, M.S., et al., *The survival function of the Bcr-Abl oncogene is mediated by Bad-dependent and -independent pathways: roles for phosphatidylinositol 3-kinase and Raf.* Mol Cell Biol, 2000. **20**(4): p. 1179-86.
13. Verfaillie, C.M., et al., *Pathophysiology of CML: do defects in integrin function contribute to the premature circulation and massive expansion of the BCR/ABL positive clone?* J Lab Clin Med, 1997. **129**(6): p. 584-91.
14. Verfaillie, C.M., *Chronic myelogenous leukemia: from pathogenesis to therapy.* J Hematother, 1999. **8**(1): p. 3-13.
15. Silver, R.T., et al., *An evidence-based analysis of the effect of busulfan, hydroxyurea, interferon, and allogeneic bone marrow transplantation in treating the chronic phase of chronic myeloid leukemia: developed for the American Society of Hematology.* Blood, 1999. **94**(5): p. 1517-36.

16. Thomas, E.D. and R.A. Clift, *Indications for marrow transplantation in chronic myelogenous leukemia.* Blood, 1989. **73**(4): p. 861-4.
17. Gratwohl, A., et al., *Current trends in hematopoietic stem cell transplantation in Europe.* Blood, 2002. **100**(7): p. 2374-86.
18. Guilhot, F., et al., *Interferon alfa-2b combined with cytarabine versus interferon alone in chronic myelogenous leukemia. French Chronic Myeloid Leukemia Study Group.* N Engl J Med, 1997. **337**(4): p. 223-9.
19. *Interferon alfa-2a as compared with conventional chemotherapy for the treatment of chronic myeloid leukemia. The Italian Cooperative Study Group on Chronic Myeloid Leukemia.* N Engl J Med, 1994. **330**(12): p. 820-5.
20. Hehlmann, R., et al., *Randomized comparison of interferon-alpha with busulfan and hydroxyurea in chronic myelogenous leukemia. The German CML Study Group.* Blood, 1994. **84**(12): p. 4064-77.
21. Buchdunger, E., et al., *Abl protein-tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors.* J Pharmacol Exp Ther, 2000. **295**(1): p. 139-45.
22. Druker, B.J., et al., *Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells.* Nat Med, 1996. **2**(5): p. 561-6.
23. O'Brien, S.G., et al., *Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia.* N Engl J Med, 2003. **348**(11): p. 994-1004.
24. Hahn, E.A., et al., *Quality of life in patients with newly diagnosed chronic phase chronic myeloid leukemia on imatinib versus interferon alfa plus low-dose cytarabine: results from the IRIS Study.* J Clin Oncol, 2003. **21**(11): p. 2138-46.
25. Gorre, M.E., et al., *Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification.* Science, 2001. **293**(5531): p. 876-80.
26. Branford, S., et al., *High frequency of point mutations clustered within the adenosine triphosphate-binding region of BCR/ABL in patients with chronic myeloid leukemia or Ph-positive acute lymphoblastic leukemia who develop imatinib (STI571) resistance.* Blood, 2002. **99**(9): p. 3472-5.
27. Cortes, J., et al., *Dasatinib induces complete hematologic and cytogenetic responses in patients with imatinib-resistant or -intolerant chronic myeloid leukemia in blast crisis.* Blood, 2006.
28. Radujkovic, A., et al., *Combination treatment of imatinib-sensitive and -resistant BCR-ABL-positive CML cells with imatinib and farnesyltransferase inhibitors.* Anticancer Res, 2006. **26**(3A): p. 2169-77.
29. Yarden, Y., et al., *Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand.* Embo J, 1987. **6**(11): p. 3341-51.
30. Ashman, L.K., et al., *Expression of the YB5.B8 antigen (c-kit proto-oncogene product) in normal human bone marrow.* Blood, 1991. **78**(1): p. 30-7.
31. Mayrhofer, G., et al., *Specificity of a mouse monoclonal antibody raised against acute myeloid leukaemia cells for mast cells in human mucosal and connective tissues.* Immunol Cell Biol, 1987. **65 (Pt 3)**: p. 241-50.

32. Galli, S.J., M. Tsai, and B.K. Wershil, *The c-kit receptor, stem cell factor, and mast cells. What each is teaching us about the others.* Am J Pathol, 1993. **142**(4): p. 965-74.
33. Galli, S.J., K.M. Zsebo, and E.N. Geissler, *The kit ligand, stem cell factor.* Adv Immunol, 1994. **55**: p. 1-96.
34. Lerner, N.B., et al., *Monoclonal antibody YB5.B8 identifies the human c-kit protein product.* Blood, 1991. **77**(9): p. 1876-83.
35. Buhring, H.J., et al., *The product of the proto-oncogene c-kit (P145c-kit) is a human bone marrow surface antigen of hemopoietic precursor cells which is expressed on a subset of acute non-lymphoblastic leukemic cells.* Leukemia, 1991. **5**(10): p. 854-60.
36. Hibi, K., et al., *Coexpression of the stem cell factor and the c-kit genes in small-cell lung cancer.* Oncogene, 1991. **6**(12): p. 2291-6.
37. Dagher, R., et al., *Approval summary: imatinib mesylate in the treatment of metastatic and/or unresectable malignant gastrointestinal stromal tumors.* Clin Cancer Res, 2002. **8**(10): p. 3034-8.
38. de Silva, C.M. and R. Reid, *Gastrointestinal stromal tumors (GIST): C-kit mutations, CD117 expression, differential diagnosis and targeted cancer therapy with Imatinib.* Pathol Oncol Res, 2003. **9**(1): p. 13-9.
39. Anderson, D.M., et al., *Molecular cloning of mast cell growth factor, a hematopoietin that is active in both membrane bound and soluble forms.* Cell, 1990. **63**(1): p. 235-43.
40. Aye, M.T., et al., *Expression of stem cell factor and c-kit mRNA in cultured endothelial cells, monocytes and cloned human bone marrow stromal cells (CFU-RF).* Exp Hematol, 1992. **20**(4): p. 523-7.
41. Ashman, L.K., *The biology of stem cell factor and its receptor C-kit.* Int J Biochem Cell Biol, 1999. **31**(10): p. 1037-51.
42. cHallek, M., et al., *Interaction of the receptor tyrosine kinase p145c-kit with the p210bcr/abl kinase in myeloid cells.* Br J Haematol, 1996. **94**(1): p. 5-16.
43. Hehlmann, R., U. Berger, and A. Hochhaus, *Chronic myeloid leukemia: a model for oncology.* Ann Hematol, 2005. **84**(8): p. 487-97.
44. Yates, J.R., 3rd, *Mass spectrometry. From genomics to proteomics.* Trends Genet, 2000. **16**(1): p. 5-8.
45. Spraggon, G., S.J. Everse, and R.F. Doolittle, *Crystal structures of fragment D from human fibrinogen and its crosslinked counterpart from fibrin.* Nature, 1997. **389**(6650): p. 455-62.
46. Everse, S.J., et al., *Crystal structure of fragment double-D from human fibrin with two different bound ligands.* Biochemistry, 1998. **37**(24): p. 8637-42.
47. Dahlback, B., *Blood coagulation.* Lancet, 2000. **355**(9215): p. 1627-32.
48. Davie, E.W., *Biochemical and molecular aspects of the coagulation cascade.* Thromb Haemost, 1995. **74**(1): p. 1-6.
49. Landolfi, R., B. Rocca, and C. Patrono, *Bleeding and thrombosis in myeloproliferative disorders: mechanisms and treatment.* Crit Rev Oncol Hematol, 1995. **20**(3): p. 203-22.
50. Mazzucato, M., et al., *Platelet membrane abnormalities in myeloproliferative disorders: decrease in glycoproteins Ib and IIb/IIIa complex is associated with deficient receptor function.* Br J Haematol, 1989. **73**(3): p. 369-74.

51. Shi, Q., et al., *Declining plasma fibrinogen alpha fragment identifies HER2-positive breast cancer patients and reverts to normal levels after surgery.* J Proteome Res, 2006. **5**(11): p. 2947-55.
52. Robbie, L., et al., *Myeloid leukaemic cells can lyse fibrin directly.* Br J Haematol, 2000. **111**(2): p. 524-9.
53. Astedt, B. and L. Holmberg, *Immunological identity of urokinase and ovarian carcinoma plasminogen activator released in tissue culture.* Nature, 1976. **261**(5561): p. 595-7.
54. Wilhelm, O., et al., *Role of plasmin in the degradation of the stroma-derived fibrin in human ovarian carcinoma.* Blood, 1990. **75**(8): p. 1673-8.
55. Dvorak, H.F., et al., *Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis.* Am J Pathol, 1995. **146**(5): p. 1029-39.
56. Palumbo, J.S., et al., *Spontaneous hematogenous and lymphatic metastasis, but not primary tumor growth or angiogenesis, is diminished in fibrinogen-deficient mice.* Cancer Res, 2002. **62**(23): p. 6966-72.
57. Bloomston, M., et al., *Fibrinogen gamma overexpression in pancreatic cancer identified by large-scale proteomic analysis of serum samples.* Cancer Res, 2006. **66**(5): p. 2592-9.
58. Palumbo, J.S., et al., *Platelets and fibrin(ogen) increase metastatic potential by impeding natural killer cell-mediated elimination of tumor cells.* Blood, 2005. **105**(1): p. 178-85.
59. Hatzfeld, J.A., A. Hatzfeld, and J. Maigne, *Fibrinogen and its fragment D stimulate proliferation of human hemopoietic cells in vitro.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79**(20): p. 6280-4.
60. Zhang, E., et al., *Catalytic metal ion binding in enolase: the crystal structure of an enolase-Mn2+-phosphonoacetohydroxamate complex at 2.4-A resolution.* Biochemistry, 1994. **33**(20): p. 6295-300.
61. Pancholi, V., *Multifunctional alpha-enolase: its role in diseases.* Cell Mol Life Sci, 2001. **58**(7): p. 902-20.
62. Feo, S., et al., *ENO1 gene product binds to the c-myc promoter and acts as a transcriptional repressor: relationship with Myc promoter-binding protein 1 (MBP-1).* FEBS Lett, 2000. **473**(1): p. 47-52.
63. Spencer, C.A. and M. Groudine, *Control of c-myc regulation in normal and neoplastic cells.* Adv Cancer Res, 1991. **56**: p. 1-48.
64. Shi, Y., et al., *Role for c-myc in activation-induced apoptotic cell death in T cell hybridomas.* Science, 1992. **257**(5067): p. 212-4.
65. Evan, G.I. and T.D. Littlewood, *The role of c-myc in cell growth.* Curr Opin Genet Dev, 1993. **3**(1): p. 44-9.
66. Oster, S.K., et al., *The myc oncogene: Marvelously Complex.* Adv Cancer Res, 2002. **84**: p. 81-154.
67. Subramanian, A. and D.M. Miller, *Structural analysis of alpha-enolase. Mapping the functional domains involved in down-regulation of the c-myc protooncogene.* J Biol Chem, 2000. **275**(8): p. 5958-65.
68. Giallongo, A., et al., *Isolation and partial characterization of a 48-kDa protein which is induced in normal lymphocytes upon mitogenic stimulation.* Biochem Biophys Res Commun, 1986. **134**(3): p. 1238-44.

69. Nesbit, C.E., J.M. Tersak, and E.V. Prochownik, *MYC oncogenes and human neoplastic disease.* Oncogene, 1999. **18**(19): p. 3004-16.
70. Blick, M., et al., *Molecular characteristics of chronic myelogenous leukemia in blast crisis.* Cancer Genet Cytogenet, 1987. **27**(2): p. 349-56.
71. Jennings, B.A. and K.I. Mills, *c-myc locus amplification and the acquisition of trisomy 8 in the evolution of chronic myeloid leukaemia.* Leuk Res, 1998. **22**(10): p. 899-903.
72. Katayama, M., et al., *Protein pattern difference in the colon cancer cell lines examined by two-dimensional differential in-gel electrophoresis and mass spectrometry.* Surg Today, 2006. **36**(12): p. 1085-93.
73. Graven, K.K., et al., *Endothelial cell hypoxia associated proteins are cell and stress specific.* J Cell Physiol, 1993. **157**(3): p. 544-54.
74. Zhang, D., et al., *Proteomic study reveals that proteins involved in metabolic and detoxification pathways are highly expressed in HER-2/neu-positive breast cancer.* Mol Cell Proteomics, 2005. **4**(11): p. 1686-96.
75. Semenza, G.L., et al., *Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1.* J Biol Chem, 1996. **271**(51): p. 32529-37.
76. Webster, K.A., et al., *Coordinate reciprocal trends in glycolytic and mitochondrial transcript accumulations during the in vitro differentiation of human myoblasts.* J Cell Physiol, 1990. **142**(3): p. 566-73.
77. Takashima, M., et al., *Overexpression of alpha enolase in hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma: association with tumor progression as determined by proteomic analysis.* Proteomics, 2005. **5**(6): p. 1686-92.
78. Somiari, R.I., et al., *High-throughput proteomic analysis of human infiltrating ductal carcinoma of the breast.* Proteomics, 2003. **3**(10): p. 1863-73.
79. Lee, K.A., et al., *Protein profiling and identification of modulators regulated by the E7 oncogene in the C33A cell line by proteomics and genomics.* Proteomics, 2004. **4**(3): p. 839-48.
80. Stierum, R., et al., *Proteome analysis reveals novel proteins associated with proliferation and differentiation of the colorectal cancer cell line Caco-2.* Biochim Biophys Acta, 2003. **1650**(1-2): p. 73-91.
81. Tomonaga, T., et al., *Identification of altered protein expression and post-translational modifications in primary colorectal cancer by using agarose two-dimensional gel electrophoresis.* Clin Cancer Res, 2004. **10**(6): p. 2007-14.
82. Sewell, D.A., C.X. Yuan, and E. Robertson, *Proteomic signatures in laryngeal squamous cell carcinoma.* ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec, 2007. **69**(2): p. 77-84.
83. Dudani, A.K., et al., *Isolation of a novel 45 kDa plasminogen receptor from human endothelial cells.* Thromb Res, 1993. **69**(2): p. 185-96.
84. Miles, L.A., et al., *Role of cell-surface lysines in plasminogen binding to cells: identification of alpha-enolase as a candidate plasminogen receptor.* Biochemistry, 1991. **30**(6): p. 1682-91.
85. Redlitz, A., et al., *The role of an enolase-related molecule in plasminogen binding to cells.* Eur J Biochem, 1995. **227**(1-2): p. 407-15.

86. Plow, E.F., et al., *The plasminogen system and cell surfaces: evidence for plasminogen and urokinase receptors on the same cell type.* J Cell Biol, 1986. **103**(6 Pt 1): p. 2411-20.
87. Wong, A.P., S.L. Cortez, and W.H. Baricos, *Role of plasmin and gelatinase in extracellular matrix degradation by cultured rat mesangial cells.* Am J Physiol, 1992. **263**(6 Pt 2): p. F1112-8.
88. Vassalli, J.D. and M.S. Pepper, *Tumour biology. Membrane proteases in focus.* Nature, 1994. **370**(6484): p. 14-5.
89. Meissauer, A., et al., *Generation of cell surface-bound plasmin by cell-associated urokinase-type or secreted tissue-type plasminogen activator: a key event in melanoma cell invasiveness in vitro.* Exp Cell Res, 1992. **199**(2): p. 179-90.
90. Kobayashi, H., et al., *Inhibition of the soluble and the tumor cell receptor-bound plasmin by urinary trypsin inhibitor and subsequent effects on tumor cell invasion and metastasis.* Cancer Res, 1994. **54**(3): p. 844-9.
91. Kariko, K., et al., *Overexpression of urokinase receptor increases matrix invasion without altering cell migration in a human osteosarcoma cell line.* Cancer Res, 1993. **53**(13): p. 3109-17.
92. Taipale, J., K. Koli, and J. Keski-Oja, *Release of transforming growth factor-beta 1 from the pericellular matrix of cultured fibroblasts and fibrosarcoma cells by plasmin and thrombin.* J Biol Chem, 1992. **267**(35): p. 25378-84.
93. Falcone, D.J., et al., *Macrophage and foam cell release of matrix-bound growth factors. Role of plasminogen activation.* J Biol Chem, 1993. **268**(16): p. 11951-8.
94. Eriksson, B., K. Oberg, and M. Stridsberg, *Tumor markers in neuroendocrine tumors.* Digestion, 2000. **62 Suppl 1**: p. 33-8.
95. Karnak, D., et al., *Neuron-specific enolase and lung cancer.* Am J Clin Oncol, 2005. **28**(6): p. 586-90.
96. Fujiwara, H., et al., *Clinical significance of serum neuron-specific enolase in patients with adult T-cell leukemia.* Am J Hematol, 2002. **71**(2): p. 80-4.
97. Steeg, P.S., et al., *Evidence for a novel gene associated with low tumor metastatic potential.* J Natl Cancer Inst, 1988. **80**(3): p. 200-4.
98. Rosengard, A.M., et al., *Reduced Nm23/Awd protein in tumour metastasis and aberrant Drosophila development.* Nature, 1989. **342**(6246): p. 177-80.
99. Stahl, J.A., et al., *Identification of a second human nm23 gene, nm23-H2.* Cancer Res, 1991. **51**(1): p. 445-9.
100. Varesco, L., et al., *The NM23 gene maps to human chromosome band 17q22 and shows a restriction fragment length polymorphism with BglII.* Genes Chromosomes Cancer, 1992. **4**(1): p. 84-8.
101. Lacombe, M.L., et al., *The human Nm23/nucleoside diphosphate kinases.* J Bioenerg Biomembr, 2000. **32**(3): p. 247-58.
102. Wallet, V., et al., *Dictyostelium nucleoside diphosphate kinase highly homologous to Nm23 and Awd proteins involved in mammalian tumor metastasis and Drosophila development.* J Natl Cancer Inst, 1990. **82**(14): p. 1199-202.
103. Gilles, A.M., et al., *Nucleoside diphosphate kinase from human erythrocytes. Structural characterization of the two polypeptide chains responsible for*

heterogeneity of the hexameric enzyme. J Biol Chem, 1991. **266**(14): p. 8784-9.
104. Pinon, V.P., et al., *Cytoskeletal association of the A and B nucleoside diphosphate kinases of interphasic but not mitotic human carcinoma cell lines: specific nuclear localization of the B subunit.* Exp Cell Res, 1999. **246**(2): p. 355-67.
105. Hartsough, M.T., et al., *Nm23-H1 metastasis suppressor phosphorylation of kinase suppressor of Ras via a histidine protein kinase pathway.* J Biol Chem, 2002. **277**(35): p. 32389-99.
106. Engel, M., et al., *A novel serine/threonine-specific protein phosphotransferase activity of Nm23/nucleoside-diphosphate kinase.* Eur J Biochem, 1995. **234**(1): p. 200-7.
107. Wagner, P.D., P.S. Steeg, and N.D. Vu, *Two-component kinase-like activity of nm23 correlates with its motility-suppressing activity.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(17): p. 9000-5.
108. Postel, E.H., *Cleavage of DNA by human NM23-H2/nucleoside diphosphate kinase involves formation of a covalent protein-DNA complex.* J Biol Chem, 1999. **274**(32): p. 22821-9.
109. Postel, E.H., et al., *Structure-based mutational and functional analysis identify human NM23-H2 as a multifunctional enzyme.* Biochemistry, 2002. **41**(20): p. 6330-7.
110. Lombardi, D., et al., *The association of the Nm23-M1 protein and beta-tubulin correlates with cell differentiation.* Exp Cell Res, 1995. **217**(2): p. 267-71.
111. Fournier, H.N., C. Albiges-Rizo, and M.R. Block, *New insights into Nm23 control of cell adhesion and migration.* J Bioenerg Biomembr, 2003. **35**(1): p. 81-7.
112. Okabe-Kado, J., et al., *Identity of a differentiation inhibiting factor for mouse myeloid leukemia cells with NM23/nucleoside diphosphate kinase.* Biochem Biophys Res Commun, 1992. **182**(3): p. 987-94.
113. Okabe-Kado, J., et al., *Inhibitory action of nm23 proteins on induction of erythroid differentiation of human leukemia cells.* Biochim Biophys Acta, 1995. **1267**(2-3): p. 101-6.
114. Willems, R., et al., *Decrease in nucleoside diphosphate kinase (NDPK/nm23) expression during hematopoietic maturation.* J Biol Chem, 1998. **273**(22): p. 13663-8.
115. Betke, H., et al., *The role of nm23 in melanoma progression and its prognostic significance.* Pol J Pathol, 1998. **49**(2): p. 93-6.
116. Leone, A., et al., *Transfection of human nm23-H1 into the human MDA-MB-435 breast carcinoma cell line: effects on tumor metastatic potential, colonization and enzymatic activity.* Oncogene, 1993. **8**(9): p. 2325-33.
117. Hennessy, C., et al., *Expression of the antimetastatic gene nm23 in human breast cancer: an association with good prognosis.* J Natl Cancer Inst, 1991. **83**(4): p. 281-5.
118. Qian, M., et al., *Expression of antimetastatic gene nm23-H1 in epithelial ovarian cancer.* Chin Med J (Engl), 1997. **110**(2): p. 142-4.

119. Suzuki, E., et al., *nm23-H1 reduces in vitro cell migration and the liver metastatic potential of colon cancer cells by regulating myosin light chain phosphorylation.* Int J Cancer, 2004. **108**(2): p. 207-11.
120. Ouatas, T., et al., *Basic and translational advances in cancer metastasis: Nm23.* J Bioenerg Biomembr, 2003. **35**(1): p. 73-9.
121. Wang, L., et al., *Mutation in the nm23 gene is associated with metastasis in colorectal cancer.* Cancer Res, 1993. **53**(4): p. 717-20.
122. Manda, R., et al., *Identification of genes (SPON2 and C20orf2) differentially expressed between cancerous and noncancerous lung cells by mRNA differential display.* Genomics, 1999. **61**(1): p. 5-14.
123. Huwer, H., et al., *Expression of the candidate tumor suppressor gene nm23 in the bronchial system of patients with squamous cell lung cancer.* Eur J Cardiothorac Surg, 1997. **11**(2): p. 206-9.
124. Jensen, S.L., et al., *Increased levels of nm23 H1/nucleoside diphosphate kinase A mRNA associated with adenocarcinoma of the prostate.* World J Urol, 1996. **14 Suppl 1**: p. S21-5.
125. van den Bemd, G.J., et al., *Mass spectrometric identification of human prostate cancer-derived proteins in serum of xenograft-bearing mice.* Mol Cell Proteomics, 2006. **5**(10): p. 1830-9.
126. Stravodimos, K., et al., *Immunohistochemical expression of transforming growth factor beta 1 and nm-23 H1 antioncogene in prostate cancer: divergent correlation with clinicopathological parameters.* Anticancer Res, 2000. **20**(5C): p. 3823-8.
127. Hailat, N., et al., *High levels of p19/nm23 protein in neuroblastoma are associated with advanced stage disease and with N-myc gene amplification.* J Clin Invest, 1991. **88**(1): p. 341-5.
128. Leone, A., et al., *Evidence for nm23 RNA overexpression, DNA amplification and mutation in aggressive childhood neuroblastomas.* Oncogene, 1993. **8**(4): p. 855-65.
129. Okabe-Kado, J., *Serum nm23-H1 protein as a prognostic factor in hematological malignancies.* Leuk Lymphoma, 2002. **43**(4): p. 859-67.
130. Okabe-Kado, J., T. Kasukabe, and Y. Honma, *Differentiation inhibitory factor Nm23 as a prognostic factor for acute myeloid leukemia.* Leuk Lymphoma, 1998. **32**(1-2): p. 19-28.
131. Lafuse, W.P., et al., *Cloning and characterization of a novel cDNA that is IFN-gamma-induced in mouse peritoneal macrophages and encodes a putative GTP-binding protein.* J Leukoc Biol, 1995. **57**(3): p. 477-83.
132. Li, N., W. Zhang, and X. Cao, *Identification of human homologue of mouse IFN-gamma induced protein from human dendritic cells.* Immunol Lett, 2000. **74**(3): p. 221-4.
133. Schultz, J., et al., *SAM as a protein interaction domain involved in developmental regulation.* Protein Sci, 1997. **6**(1): p. 249-53.
134. Biron, C.A., *Activation and function of natural killer cell responses during viral infections.* Curr Opin Immunol, 1997. **9**(1): p. 24-34.
135. Marcucci, F., et al., *Production of immune interferon by murine T-cell clones from long-term cultures.* Nature, 1981. **291**(5810): p. 79-81.

136. Gray, P.W. and D.V. Goeddel, *Structure of the human immune interferon gene.* Nature, 1982. **298**(5877): p. 859-63.
137. Nagata, K., et al., *Oligomeric structure of recombinant human and murine immune interferons by means of sedimentation equilibrium.* J Interferon Res, 1987. **7**(3): p. 313-20.
138. Ealick, S.E., et al., *Three-dimensional structure of recombinant human interferon-gamma.* Science, 1991. **252**(5006): p. 698-702.
139. Pace, J.L., et al., *Comparative effects of various classes of mouse interferons on macrophage activation for tumor cell killing.* J Immunol, 1985. **134**(2): p. 977-81.
140. Boehm, U., et al., *Cellular responses to interferon-gamma.* Annu Rev Immunol, 1997. **15**: p. 749-95.
141. Tyring, S., et al., *Direct cytolysis by partially-purified preparations of immune interferon.* Int J Cancer, 1982. **30**(1): p. 59-64.
142. McGlave, P., et al., *Effect of recombinant gamma interferon on chronic myelogenous leukemia bone marrow progenitors.* Exp Hematol, 1987. **15**(4): p. 331-5.
143. Raefsky, E.L., et al., *Studies of interferon as a regulator of hematopoietic cell proliferation.* J Immunol, 1985. **135**(4): p. 2507-12.
144. Klimpel, G.R., W.R. Fleischmann, Jr., and K.D. Klimpel, *Gamma interferon (IFN gamma) and IFN alpha/beta suppress murine myeloid colony formation (CFU-C)N: magnitude of suppression is dependent upon level of colony-stimulating factor (CSF).* J Immunol, 1982. **129**(1): p. 76-80.
145. Kurzrock, R., et al., *Therapy of chronic myelogenous leukemia with recombinant interferon-gamma.* Blood, 1987. **70**(4): p. 943-7.
146. Zoon, K.C., et al., *Purification and characterization of multiple components of human lymphoblastoid interferon-alpha.* J Biol Chem, 1992. **267**(21): p. 15210-6.
147. Bazan, J.F., *Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(18): p. 6934-8.
148. Uze, G., G. Lutfalla, and K.E. Mogensen, *Alpha and beta interferons and their receptor and their friends and relations.* J Interferon Cytokine Res, 1995. **15**(1): p. 3-26.
149. Novick, D., B. Cohen, and M. Rubinstein, *The human interferon alpha/beta receptor: characterization and molecular cloning.* Cell, 1994. **77**(3): p. 391-400.
150. Stark, G.R., et al., *How cells respond to interferons.* Annu Rev Biochem, 1998. **67**: p. 227-64.
151. Platanias, L.C. and E.N. Fish, *Signaling pathways activated by interferons.* Exp Hematol, 1999. **27**(11): p. 1583-92.
152. Talpaz, M., et al., *Leukocyte interferon-induced myeloid cytoreduction in chronic myelogenous leukemia.* Blood, 1983. **62**(3): p. 689-92.
153. Talpaz, M., et al., *Chronic myelogenous leukaemia: haematological remissions with alpha interferon.* Br J Haematol, 1986. **64**(1): p. 87-95.
154. Bhatia, R. and C.M. Verfaillie, *The effect of interferon-alpha on beta-1 integrin mediated adhesion and growth regulation in chronic myelogenous leukemia.* Leuk Lymphoma, 1998. **28**(3-4): p. 241-54.

155. Garrels, J.I. and W. Gibson, *Identification and characterization of multiple forms of actin.* Cell, 1976. **9**(4 PT 2): p. 793-805.
156. Vandekerckhove, J. and K. Weber, *Mammalian cytoplasmic actins are the products of at least two genes and differ in primary structure in at least 25 identified positions from skeletal muscle actins.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1978. **75**(3): p. 1106-10.
157. Erba, H.P., et al., *Structure, chromosome location, and expression of the human gamma-actin gene: differential evolution, location, and expression of the cytoskeletal beta- and gamma-actin genes.* Mol Cell Biol, 1988. **8**(4): p. 1775-89.
158. Pollard, T.D. and G.G. Borisy, *Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments.* Cell, 2003. **112**(4): p. 453-65.
159. Raftopoulou, M. and A. Hall, *Cell migration: Rho GTPases lead the way.* Dev Biol, 2004. **265**(1): p. 23-32.
160. Salgia, R., et al., *BCR/ABL induces multiple abnormalities of cytoskeletal function.* J Clin Invest, 1997. **100**(1): p. 46-57.
161. Van Aelst, L. and C. D'Souza-Schorey, *Rho GTPases and signaling networks.* Genes Dev, 1997. **11**(18): p. 2295-322.
162. Zheng, X., et al., *BCR and its mutants, the reciprocal t(9;22)-associated ABL/BCR fusion proteins, differentially regulate the cytoskeleton and cell motility.* BMC Cancer, 2006. **6**: p. 262.
163. Van Etten, R.A., et al., *The COOH terminus of the c-Abl tyrosine kinase contains distinct F- and G-actin binding domains with bundling activity.* J Cell Biol, 1994. **124**(3): p. 325-40.
164. McWhirter, J.R. and J.Y. Wang, *An actin-binding function contributes to transformation by the Bcr-Abl oncoprotein of Philadelphia chromosome-positive human leukemias.* Embo J, 1993. **12**(4): p. 1533-46.
165. McWhirter, J.R. and J.Y. Wang, *Activation of tyrosinase kinase and microfilament-binding functions of c-abl by bcr sequences in bcr/abl fusion proteins.* Mol Cell Biol, 1991. **11**(3): p. 1553-65.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

2-DE	Zweidimensionale Gelelektrophorese
ABL	Abelson Onkogen
ad	bis, auf
AML	Akute Myeloische Leukämie
AMN107	Nilotinib
ALL	Akute Lymphatische Leukämie
APS	Ammoniumpersulfat
Ara-C	Arabinosyl-Cytosin
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
ATP	Adenosintriphosphat
BCR	Breakpoint Cluster Region
BMS354825	Dasatinib
BSA	Bovines Serum Albumin
C	Celsius
CBB	Coomassie Brilliant-Blau
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	complementary DNA
CHAPS	Cholamidopropyldimethylammoniopropansulfat
CO_2	Kohlenstoffdioxid
cm	Zentimeter
CML	Chronisch Myeloische Leukämie
DCIP	dendritic cell-derived IFN-χ induced protein
D-Dimer	Spaltprodukt des Fibrins
dl	Deziliter
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme linked Immunosorbent Assay
et al.	et aliter, und andere
FCS	Fötales Kälberserum
FDP	Fibrinspaltprodukte
FSF	Fibrin stabilisierender Faktor
g	Gramm
GAF	gamma-interferon activation factor
GAS	gamma activated site
G-CSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor
GIST	Gastrointestinale Stromatumoren
Gly	Glycin

G0-Phase	Gap 0 Phase
G1-Phase	Gap 1 Phase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HAP	Hypoxie assoziiertes Protein
HCl	Chlorwasserstoff
HIF-1	Hypoxia inducible factor 1
H_2O	Wasser
HLA	Human Leucocyte Antigen
HSA	Humanes Serumalbumin
HU	Hydroxyurea
IE	Internationale Einheit
I-Faktor	differentiation inhibiting Faktor
IFN	Interferon
IRIS	International Randomized Study of Interferon and STI571
ISG	interferon stimulated gene
ISRE	interferon stimulated regulatory element
JAK	Janus Kinasen
kb	Kilobyte
kDa	Kilodalton
KM	Knochenmark
KSR	Kinase Suppressor of Ras
µl	Mikroliter
l	Liter
Lys	Lysin
m	männlich
m^2	Quadratmeter
mA	Milliampere
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time-Of-Flight
MAP	mitogen-activated protein
MBP-1	c-myc-binding Protein
MCV	Mittleres Erythrozyten Volumen
MCH	Mittleres Korpuskuläres Hämoglobin
MCHC	Mittlere Korpuskuläre Hämoglobinkonzentration
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
MLC	myosin light chain
mm	Millimeter
mmol	Millimol
mol	Mol
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MW	Molekulargewicht

NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotiddiphosphat
NaH_2PO_4	Natriumdihydrogenphosphat
NDP	Nukleosid Diphosphat
NK-Zellen	Natural Killer Zellen
nm	Nanometer
NSE	Neuronen spezifische Enolase
N-terminal	Amino terminal
NTP	Nukleosid Triphosphat
PBS	Phosphate –Buffered Saline
PBSC	Periphere Blutstammzellen
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PEP	Phosphoenolpyruvat
PGA	2-Phosphoglycerat
pI	Isoelektrischer Punkt
Ph	Philadelphia Chromosom
pH	pH-Wert, pondus Hydrogenii
Pro	Prolin
RPMI	Zellkulturmedium 1640, entwickelt am Roswell Park Memorial Institute
s	Sekunde
SAM	sterile α motif
SCF	Stem Cell Factor
SDS	Sodiumdecylsulfat
S-Phase	Synthesephase
STI571	Imatinib
SZT	Stammzelltransplantation
TAFI	thrombin activatable fibrinolysis inhibitor
TEMED	Tetramethylethylendiamin
t-PA	tissue-Plasminogenaktivator
TPI	Triose Phosphat Isomerase
V	Volt
Vol.-%	Volumenprozent
w	weiblich
z. B.	zum Beispiel

7.2 Danksagung

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

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Thomas Kirchner für die Aufnahme am Pathologischen Institut danken.

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. Ralf Huss für die Überlassung des interessanten Themas und seine Unterstützung in fachlichen Fragen.

Frau Dr. Evelyn Zeindl-Eberhart und Frau Dr. Sibylle Liebmann möchte ich für die Einarbeitung in das Thema, die technische Unterstützung und die intensive persönliche Betreuung während der Entstehung dieser Dissertation danken.

Des Weiteren danke ich Frau Dr. Claudia Lange vom Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf und der Medizinischen Klinik III im Klinikum der Universität München-Großhadern und insbesondere Herrn Dr. Georg Ledderose für die freundliche Unterstützung.

Nicht zuletzt möchte ich allen Mitarbeitern des Pathologischen Instituts für die freundliche Zuasmmenarbeit danken.

7.3 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name:	Katrin Susanne Schwab
Geburtsdatum:	03.11.1981
Geburtsort:	Ostfildern-Ruit
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	ledig
Vater:	Dr. med. vet Helmut Schwab Ehemaliger Direktor des Veterinäramtes Schwäbisch Hall
Mutter:	Erika Schwab, Lehrerin
Geschwister:	Florian Schwab, geb. 1977

Schulausbildung:

1987-1991	Grund- und Hauptschule Stuttgart Plieningen
1991/1992	5. Klasse auf dem Paracelsus Gymnasium Stuttgart
1992-2001	Klasse 6-13 auf dem Erasmus Widmann Gymnasium Schwäbisch Hall
2001	Abitur

Hochschulstudium:

seit SS 2002	Humanmedizin Ludwig-Maximilians-Universität München
2004	Ärztliche Vorprüfung
2008	Staatsexamen Humanmedizin nach der neuen Approbationsordnung

Wissenschaftliche Tätigkeit:

2005	Experimentelle Doktorarbeit am Pathologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München Thema: „Vergleichende Proteomanalyse des Knochenmarks von Patienten mit Chronisch Myeloischer Leukämie und Peripheren Blutstammzellen gesunder Spender“

Praktika und Famulaturen:

2001	Krankenpflegepraktikum Diakonie-Krankenhaus Schwäbisch Hall	
2004	Famulatur Innere Medizin mit Schwerpunkt Gastroenterologie, Hepatologie und Diabetologie im Diakonie-Krankenhaus Schwäbisch Hall	
2005	Famulatur Traumatologie und Wiederherstellungschirurgie im Kreiskrankenhaus Backnang	
2005	Famulatur in der Pathologie des Pathologischen Instituts der Ludwig-Maximilians-Universität München	
2006	Famulatur Gynäkologie und Geburtshilfe in der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe	
2007	Praktisches Jahr:	
	Chirurgie:	Viszeralchirurgie, Neurochirurgie, Unfallchirurgie, Chirurgische Notfallstation Städtisches Krankenhaus München Schwabing
	Innere Medizin:	Klinik für Nieren-, Hochdruckerkrankungen und Klinische Immunologie Städtisches Krankenhaus München Harlaching
	Gynäkologie:	Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe Klinikum Großhadern der LMU München

8 Ehrenwörtliche Erklärung

Diese Dissertation wurde selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt.

München, den .....

.....
(Katrin Susanne Schwab)

Dissertation eingereicht am: .....