

Aus der Klinik für Hämatologie, Onkologie und Klinische Immunologie der

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Prof. Dr. med. R. Haas

**Genexpressionsanalysen der gesunden hämatopoetischen Stamm- und
Progenitorzellen bei Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie
unter Therapie mit Imatinib**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Nathalie Kremer

2010

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
1. 1	Imatinib-Mesylat – ein Modelltherapeutikum in der Krebstherapie	1
1.2	CML – Klinik und Verlauf der Erkrankung	2
1.3	Die molekularen Mechanismen der CML	3
1.4	Diagnostik und Therapie	
1.4.1	Diagnostik	7
1.4.2	Therapie	8
1.5	Tyrosinkinasen – ein neuer Ansatzpunkt in der Krebstherapie	11
1.6	Resistenzen gegen Imatinib	13
1.7	Sekundäre chromosomale Aberrationen unter Imatinib	17
1.8	Zielsetzung der Arbeit	18
2.	PATIENTEN UND METHODEN	19
2.1	Patientenkollektiv und Kontrollpersonen	19
2. 2	Universell eingesetztes Material und Geräte	21
2.3	Gewinnung von CD34 positiven hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen aus Knochenmarkaspirat	23
2.4	Dichtegradientenzentrifugation	23
2.5	Immunmagnetische Isolation der CD34-positiven Zellen	24
2.6	Verarbeitung und Aufbewahrung der CD34-positiven-Zellen	25
2.7	Durchflusszytometrie	
2.7.1	Ein-Farben-Fluoreszenzmessung	26
2.7.2	Zwei-Farben-Fluoreszenzmessung	27
2.8	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung	27
2.9	Isolierung der gesamtzellulären RNA für die weitere Verarbeitung	30
2.10	Genexpressionsanalysen mittels des Affymetrix „Human Genome Focus Array“ – eine kurze Übersicht über die Vorgehensweise	32

2.11	cRNA-Synthese: Reverse Transkription in cDNA, In-Vitro- Transkription und Fragmentierung der cRNA mit dem „RiboAmp RNA Amplification Kit“ (Arcturus)	35
2.12	cDNA- und cRNA –Synthese mittels des “RiboAmp Oligo Array (OA) RNA Amplification Kit” von Arcturus	39
2.13	cDNA-Synthese und cRNA-Synthese nach dem Protokoll nach Angaben der Firma Affymetrix	40
2.14	Die „Microarray“-Analyse auf dem Human Genome Focus Array (Affymetrix)	42
2.15	Auswertung der Rohdaten aus den Messungen mit den Affymetrix Chips	43
2.16	Quantitative Real-Time PCR (RT-qPCR) mit der „TaqMan“- Technologie	48
2.17	Allgemein verwendete Software und statistische Analysen	50
3.	ERGEBNISSE	52
3.1	Qualitätskontrolle der immunmagnetischen CD-34-Zellseparation mittels der Einfarben-Fluoreszenz- Durchflusszytometrie	53
3.2	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung der CD34-positiven Zellen von Patienten unter Imatinib-Behandlung	54
3.3	Die Expression von CD117 auf Ph-negativen-CD34-positiven Zellen von Patienten mit CML während Imatinib-Behandlung im Vergleich zu gesunden Spenderzellen	55
3.4	RNA-Isolierung mit dem „RNeasy Micro Kit“, Qiagen	57
3.5	Evaluation und Vergleich verschiedener Methoden zur cRNA – Synthese für die Hybridisierung auf dem „Human Genome Focus Array“ von Affymetrix	58
3.5.1	cRNA – Synthese mit der Methode des „RiboAmp RNA Amplification Kit“, Arcturus	58
3.5.2	cRNA-Synthese mit der Methode des “RiboAmp Oligo Array RNA Amplification Kit”, Arcturus	59
3.5.3	cRNA-Synthese nach dem von Affymetrix vorgeschlagenen Protokoll	60

3.6	Genexpressionsanalysen mit dem „Human-Genome-Focus“-Chip von Affymetrix	62
3.6.1	Qualitätskontrolle und Normalisierung	62
3.7	Bioinformatische Auswertung der Daten	65
3.7.1	“Significance Analysis of Microarrays” (SAM)	65
3.7.2	Hierarchisches Clustering	68
3.8	Evaluation der Ergebnisse mittels der quantitativen „Real-Time“ RT-PCR	70
4.	DISKUSSION	71
4.1.	Methodische Aspekte	71
4.2.	Biomedizinische Aspekte	81
5.	SCHLUSSFOLGERUNGEN UND AUSBLICK	86
6.	LITERATURVERZEICHNIS	90
7.	LISTE DER ABKÜRZUNGEN	102
8.	DANKSAGUNG	106
9.	CURRICULUM VITAE	107

1. EINLEITUNG

1. 1 Imatinib-Mesylat – ein Modelltherapeutikum in der Krebstherapie

Die Geschichte der Entdeckung pathogenetischer Zusammenhänge bei der chronischen myeloischen Leukämie (CML) und die daraus resultierende Entwicklung des selektiven Tyrosinkinaseinhibitors Imatinib-Mesylat (Glivec®) stellen ein Beispiel für neue Therapieansätze innerhalb der Hämatologie und Onkologie dar.

Seit der Entdeckung des Philadelphia-Chromosoms (Ph-Chromosom) durch Nowell und Hungerford (1) sind über vierzig Jahre vergangen, wobei es zwanzig Jahre gedauert hat, die Lücke zwischen diesem Befund und dem Verständnis der Entstehung der CML zu schließen. Beim Ph-Chromosom handelt es sich um die erste Chromosomenanomalie, die mit einer malignen Erkrankung in direkten Zusammenhang gebracht werden konnte und bei über 90% der Patienten mit CML vorliegt. Ihr liegt die reziproke Translokation t(9;22) zugrunde, durch die es zu der Fusion von zwei Genen, BCR und ABL, kommt. (2,3)

Das Produkt dieses BCR-ABL Fusionsgens, eine fehlregulierte Tyrosinkinase, wurde in Folge als die molekulare Ursache der Entstehung der CML identifiziert.(4) Die logische Konsequenz daraus, nämlich diese Tyrosinkinase zu hemmen, fand erst viele Jahre später mit der Einführung von Imatinib ihre Erfüllung und führte damit gleichzeitig zu einem Paradigmenwechsel innerhalb des noch recht jungen Gebiets der zielgerichteten Therapien. Allerdings ist mit der Einführung des Medikaments diese Geschichte keineswegs beendet, sondern befindet sich noch ganz am Anfang, da bisher kaum Erkenntnisse über molekulare Interaktionen und Langzeiteffekte dieses Therapiemechanismus existieren und bereits sehr früh Fälle von Resistenzen gegen das Medikament erfasst worden sind. (5) Die weitere Erforschung der Therapieeffekte auf molekularer, zellulärer aber auch klinischer Ebene kann zahlreiche weitere Antworten liefern, z.B. auf Fragen über viele noch unklare Zusammenhänge der Pathogenese und Progression der CML und anderer maligner Erkrankungen, aber auch über die Wirkungsmechanismen von Imatinib selbst.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit einer dieser Fragen.

1.2 CML – Klinik und Verlauf der Erkrankung

Die CML ist eine maligne klonale Erkrankung der hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen und gehört zusammen mit der Polycythämia rubra vera, der Osteomyelofibrose und der essentiellen Thrombozythämie zu den myeloproliferativen Erkrankungen. Es gibt pro Jahr ca. 2 Neuerkrankungen pro 100.000 Personen und betrifft vor allem Patienten mittleren Lebensalters mit einem Median von 53 Jahren. Klinisch lässt sie sich in drei Phasen einteilen: die chronische Phase, die akzelerierte Phase, die auch fehlen kann, und die letztlich tödlich verlaufende Blastenkrise. Die chronische Phase dauerte vor der Einführung von Imatinib ca. 3-5 Jahre bis zur Transformation, die 5-Jahresüberlebensrate betrug zwischen 32% und 57%. (6) Studien, die sechs Jahre nach Einführen von Imatinib durchgeführt wurden, gaben ein progressionsfreies Überleben für 61% der Patienten an, die die Therapie mit Imatinib während der chronischen Phase begonnen haben. Die 6-Jahresüberlebensrate für die Patienten, die in chronischer Phase mit Imatinib begonnen haben und sich weiterhin in Therapie mit Imatinib befinden, beträgt jetzt 95%, die 6-Jahresüberlebensrate für alle Patienten beträgt 88%. (7).

Etwas weniger als die Hälfte der Patienten hat zum Zeitpunkt der Diagnosestellung keinerlei Beschwerden. Daher fällt die Erkrankung häufig im Rahmen von Routineuntersuchungen auf. Hierbei sind die typischen klinischen Zeichen Hepato- und vor allem Splenomegalie, bei symptomatischen Patienten unspezifische Symptome wie Leistungsabfall, Kopf- und vor allem auch Knochenschmerzen oder die klassischen Zeichen der so genannten „B-Symptomatik“ mit Fieber, Gewichtsverlust und Nachtschweiß. Labordiagnostisch finden sich Veränderungen des Blutbilds, typischerweise aller Blutzellreihen. Nicht selten stellen diese Veränderungen in Form einer massiven Leuko- oder Thrombozytose eine akute Bedrohung des Patienten im Sinne eines Risikos thromboembolischer Ereignisse dar. Im Differentialblutbild ist neben der pathologischen Linksverschiebung besonders in der akzelerierten Phase eine Basophilie aber auch Eosinophilie pathognomonisch für die Erkrankung. Zytogenetisch zeigen sich neben dem charakteristischen Philadelphia-

Chromosom besonders in den späteren Phasen der CML sekundäre Aberrationen wie Trisomie 8 oder doppelte Philadelphia-Chromsomen.

1.3 Die molekularen Mechanismen der CML

Das Ph-Chromosom wird in 90-95 % der CML Patienten, 20 % der adulten ALL- und 2-5 % der pädiatrischen ALL- sowie in knapp 2 % der AML - Patienten gefunden (8-11).

Dass das Ph-Chromosom das direkte pathogenetische Korrelat der CML ist, konnte erstmals im Tiermodell gezeigt werden. Transgene BCR-ABL-positive Mäuse, sowie gesunde erwachsene Mäuse nach retroviralem Transfer des BCR-ABL-Gens haben im Tierversuch eine AML oder eine CML entwickelt. Die Tiere mit AML wiesen jedoch zusätzliche chromosomale Aberrationen auf, während die Mäuse mit CML ausschließlich das Ph-Chromosom trugen. Da eine selektive Hemmung der BCR-ABL Tyrosinkinase durch Imatinib mesylat in kranken Mäusen eine Remission der CML induzierte, bestätigte sich das Postulat, dass die Translokation t(9;22) offenbar die alleinige Bedingung für die Ausbildung des Krankheitsbildes der CML ist. (12)

Die Ursachen der reziproken Translokation t(9;22) sind noch nicht geklärt. Ein wesentlicher Risikofaktor ist ionisierende Strahlenexposition. Auch eine spontane Translokation ist denkbar, da die Genloci unter physiologischen Bedingungen in räumlicher Nähe zueinander stehen (13-17). Durch die Translokation kommt es zu einer Anlagerung des 3'-Abschnitts des ABL-Gens von Chromosom 9 an den 5'-Abschnitt des BCR-Gens an Chromosom 22.

Das normale ABL – Gen ist das humane Äquivalent des viralen Onkogens v-ABL, das vermutlich ursprünglich vom Abelson murine leukemia virus in das Säugergenom übernommen worden ist. (18) Das entsprechende Protein, die ABL-Tyrosinkinase, hat im normalen Zellzyklus eine Fülle von Funktionen, die es sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus vornehmlich über Phosphorylierung von Substraten oder über Autophosphorylierung ausübt. (19) Darüber hinaus ist es in zahlreiche Signalkaskaden innerhalb der Zelle involviert. So spielt die ABL – Tyrosinkinase eine wichtige Rolle bei der Regulation des Zellzyklus, vor allem im Sinne einer hemmenden Wirkung auf das Zellwachstum. (20,21)

Aber auch Interaktionen mit Aktinfilamenten des Zytoskeletts, DNA-Reparaturmechanismen und Komplexbildungen mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren wurden beschrieben. (22-24)

Das physiologische Genprodukt von BCR ist ebenfalls nukleär und zytoplasmatisch nachweisbar. Im Nukleus ist es sowohl in der Interphase als auch in der Metaphase an die DNA gebunden. Es kann ebenfalls sich selbst oder andere Substrate phosphorylieren und ist damit in zahlreiche teilweise noch unbekannte Signalkaskaden involviert. Diese Beobachtung wird durch die Erkenntnis unterstützt, dass BCR auch im Stoffwechsel der G-Proteine eine Rolle zu spielen scheint (26). Es hat sowohl die Funktion eines GTPase-aktivierenden Proteins, das die G-Proteine inaktiviert, als auch die eines Guaninnukleotidaustauschfaktors, der die G-Proteine aktiviert. Dass BCR eine Rolle bei der DNA-Reparatur spielt, wurde erstmals nach der Entdeckung seiner Interaktion mit dem *Xeroderma pigmentosum* – Genprodukt vermutet. (27).

Innerhalb beider Gene gibt es unterschiedliche Bereiche, an denen es zu Brüchen kommen kann: Im ABL-Gen sind dies unspezifische Bereiche in der Nähe des 5'-Endes. Nach Splicing-Vorgängen fehlt in der mRNA der Fusionsprodukte immer das Exon a1 des ABL-Gens und der Anteil von ABL ist in der mRNA jedes Fusionsproduktes bei variierendem BCR-Anteil etwa gleich, was nahelegt, dass vor allem der ABL-Anteil des Fusionsproduktes wichtig für seine Funktion ist. (28)

Das BCR-Gen besitzt drei Regionen, in denen die Chromosomenbrüche auftreten können. Die am häufigsten betroffene Region ist die „major breakpoint cluster region“ (M-bcr), die zwischen den Exons 12-16, auch bezeichnet als Exons b1-b5, liegt. Ferner wurden auch die „minor – breakpoint cluster region“ (m-bcr) im Exon e2 und eine dritte, die „μ-bcr“ am Exon e19 beschrieben. (Abb. 1). Die daraus resultierenden unterschiedlichen Genprodukte sind mit voneinander abweichenden Krankheitsbildern assoziiert, u.a. z.B. mit der Ph-positiven chronischen neutrophilen Leukämie oder mit einer die pathologischen Blutbildveränderungen dominierenden Mastozytose. (29,30)

Die häufigsten BCR-ABL-Genvarianten in der CML sind die b2a2 und die b3a2 Fusionsgene, deren BCR-Bruchstellen in der M-BCR liegen. Das Produkt dieser Fusionsgene ist 210 kd groß. Andere bei der CML und der ALL gefundene Fusionsvarianten sind b2a3, b3a3, e1a3 und e2a2. Die Fusionsproteine können insgesamt zwischen 185 kd und 230 kd groß sein (6,28) (Abb.1)

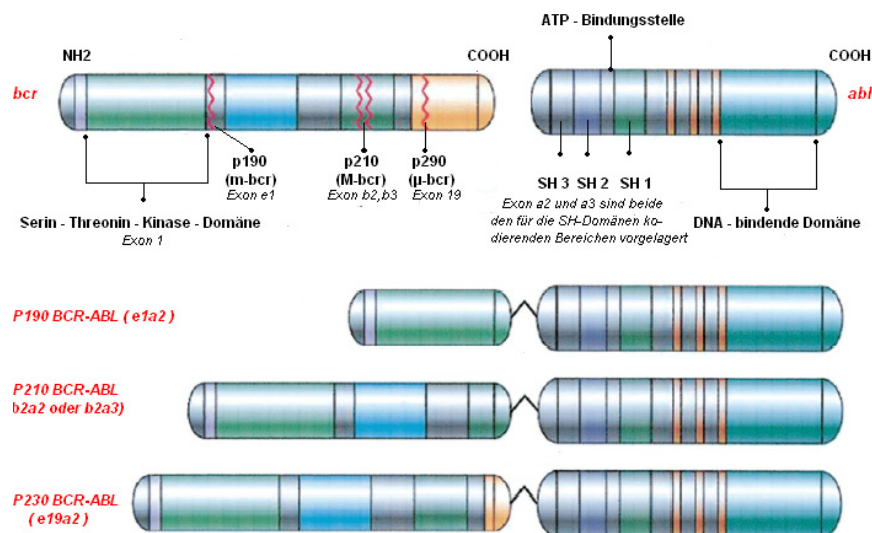


Abb1: Schematische Darstellung des ABL- und des BCR-Proteins sowie der drei häufigsten Fusionsprodukte des BCR-ABL-Gens. Die SH3-Domäne hemmt ABL, die SH2-Domäne aktiviert es. Durch die Fusion wird die Struktur der SH3-Domäne kompromittiert und es überwiegen die funktionellen Eigenschaften der SH2-Domäne. (8)

Die funktionelle Bedeutung der BCR-ABL-Translokation, die der Transformation zur CML zugrunde liegt, basiert nach heutiger Vorstellung auf drei sich addierenden Effekten. Im Gegensatz zur streng regulierten ABL-Tyrosinkinase werden diese Effekte durch das permanent aktivierte BCR-ABL Onkoprotein vermittelt. Die drei Effekte sind: Veränderungen der Zelladhäsionseigenschaften, die Stimulation der Proliferation sowie die Hemmung der Apoptose.

In der normalen Hämatopoese werden durch die Zelladhäsion im Stroma die Proliferation und Ausschwemmung der hämatopoetischen Zelle in die Peripherie direkt reguliert. Dieser Mechanismus wird vermittelt durch die Interaktion von Integrinrezeptoren mit Aktinfilamenten und intrazellulären Signalkaskaden, die Tyrosinkinasen wie FAK und SRC und den PI-3-Signalweg involvieren. (24,25) Die BCR-ABL-positiven Zellen scheinen von diesem

regulativen Effekt der Zelladhäsion unabhängig zu sein. (31-33) In diesem Zusammenhang wurden verschiedene transkriptionelle Veränderungen der leukämischen CD34-positiven Zellen beschrieben. (34). Hierbei fanden sich z.B. Expressionsveränderungen von Genen, die u.a. für Chemokinrezeptoren (CXCR4) und adhäsionsrelevante Proteine des Zytoskeletts und der Zelloberfläche kodieren (z.B. E-Cadherin) (39). Ebenso ließen sich überexprimierte Gene nachweisen, die für Proteine des PI-3-Signalwegs innerhalb der Zelle kodieren. (40)

Des Weiteren besteht eine Unabhängigkeit der Ph-positiven Zellen von Wachstumsfaktoren. So kommt es zu einer unkontrollierten Stimulation der Zellproliferation, indem u.a. die Progression des Zellzyklus von der G1-Phase in die S-Phase beschleunigt wird (35). Interaktionen mit den RAS- (36) und Mitogen-Activated-Protein-(MAP)-Kinase-Signalwegen (28) und den JAK-STAT- (37), und MYC-Signalkaskaden (38) sowie eine autonome Produktion von Wachstumsfaktoren durch die pathologischen Zellen selbst (41) wurden als Ursachen hierfür beschrieben.

Eine transkriptionelle Deregulation des MAP-Kinase-Signalwegs, im Sinne einer Überexpression Proliferations-assoziiierter Gene, wurde in unterschiedlichen Studien nachgewiesen (34,42).

Der dritte Effekt, der den transformierten Zellen einen Selektionsvorteil gegenüber den gesunden Zellen verschafft, ist die Hemmung der Apoptose durch die Interaktion mit den Proteinen BAD (46) und BCL-2 (45) sowie der Proteinkinase C (43) und dem BCL-XL-Gen. (44) Dieser Effekt ist jedoch pathogenetisch zumindest zu Beginn der Erkrankung von geringerer Bedeutung, da die antiapoptotische Aktivität der Ph-positiven Zellen erst mit steigender Expression von BCR-ABL und der damit verbundenen Krankheitsprogression charakteristisch für die malignen Zellen ist. (28).

Darüber hinaus beeinflusst BCR-ABL die DNA-Reparaturmechanismen, indem es die Zelle nach vorangegangener DNA-Schädigung nach der G2-Phase in ihrem Zyklus bremst (47)

und damit den Übergang der Zelle in die Apoptose verhindert. (48). Auch in diesem Zusammenhang konnten transkriptionelle Veränderungen in den Ph-positiven CD34-positiven Zellen in Form herunterregulierter proapoptotischer Gene aufgezeigt werden. (34).

1.4 Diagnostik und Therapie

1.4.1 Diagnostik

Um auf Basis der Anamnese, der körperlichen Untersuchung und einem auffälligen peripheren Differentialblutbild den Verdacht auf das Vorliegen einer CML zu bestätigen, sind einige zusätzliche Tests notwendig. Hierzu zählt nach der morphologischen Untersuchung des Knochenmarks auch die zytogenetische Untersuchung der hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen in Metaphase auf Vorliegen von Ph-Chromosomen, auch zusätzlich mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung. In den letzten Jahren kam standardmäßig die quantitative „real time“-PCR zur Bestimmung des BCR-ABL-Transkripts hinzu, für die aufgrund der relativ hohen Sensitivität des Verfahrens eine periphere Blutentnahme ausreichend ist. (49) Diese Verfahren eignen sich nach Diagnosesicherung auch zur Therapieverlaufskontrolle. Dementsprechend unterteilt man heute die Grade eines Ansprechens auf die Therapie auch in klinische bzw. hämatologische, zytogenetische und molekulare Remission.

Die hämatologische Remission richtet sich nach dem Rückgang der peripheren Leukozytenzahl auf unter 10.000/μl sowie der Thrombozytenzahl auf unter 450.000/μl, einer pathologischen Linksverschiebung im Differentialblutbild von weniger als 5% Myelo- und Metamyelozyten ohne Nachweis von Blasten und Promyelozyten sowie dem Fehlen einer Hepatosplenomegalie. (6,50)

Die zytogenetische Remission wird unterteilt in eine partielle und eine vollständige Remission und richtet sich nach der Anzahl nachweisbarer Ph-Chromosomen in Metaphasen der Zellen im Knochenmarkaspirat. Die partielle Remission ist definiert durch das Vorliegen

von maximal 35% Ph-positiven Metaphasen bei mindestens 20 untersuchten Zellen. Bei der vollständigen Remission darf kein Ph-Chromosom nachweisbar sein. (51)

Das molekulare Ansprechen wird standardmäßig alle 3 Monate ab dem ersten Nachweis einer vollständigen zytogenetischen Remission untersucht.

Als Parameter für ein molekulares Ansprechen wird die Reduktion des BCR-ABL-Transkripts in Bezug auf das Referenzgen, in unserem Labor G6PDH, in anderen auch andere Referenzgene wie z.B. β -Glucuronidase (GUSB), im Vergleich zum Wert vor Therapiebeginn in log-Stufen angegeben. Eine international gebräuchliche Skala, die die BCR-ABL PCR-Ergebnisse laborunabhängig angeben sollte, wurde 2006 eingeführt. Ihr zufolge besteht bei einer Reduktion des nachweisbaren BCR-ABL-Transkripts um 3-log-Stufen die sogenannte „Major molecular response“ (MMR), entsprechend einem Wert von $<0,1\%$. Ein Wert von $<1\%$ korreliert hierbei mit einer vollständigen zytogenetischen Remission. (52-54) Da Patienten mit einer MMR in der IRIS Studie (55) die beste Prognose für den weiteren Krankheitsverlauf zeigten, ist das molekulare Ansprechen ein wichtiger Parameter für die Verlaufsevaluation der Krankheit.

1.4.2 Therapie

Seit 2003 ist nach Abschluss der Phase-III-Studien die Standardtherapie der CML in chronischer Phase die Behandlung mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib (55). Sie löste die bis dahin eingesetzte Kombinationstherapie mit α -Interferon und Zytosinarabinosid (Ara-C) ab. Die Standarddosis Imatinib beträgt 400 mg pro Tag. Bei Patienten, die sich initial in einer fortgeschrittenen Phase der Erkrankung präsentieren, wird derzeit eine Kombinationstherapie von Imatinib und zytotoxischen Präparaten empfohlen. (56) Hierzu zählen weiterhin Ara-C und Interferon. Im Vordergrund dieser Therapie liegt die Zellreduktion bei Patienten mit CML in akzelerierter Phase oder in der Blastenkrise. Ziel ist dabei vor allem akute lebensgefährliche Komplikationen wie thromboembolische Ereignisse durch die hohen Zellzahlen im peripheren Blut zu verhindern. Alternativ werden bei Patienten in den späteren Stadien der CML auch neuere Tyrosinkinaseinhibitoren, wie z.B. Dasatinib angewendet.

Letzteres gilt auch für Patienten, die primär oder sekundär Resistenzen gegen Imatinib zeigen. Als kurativer Ansatz für diese Patienten existiert auch nach wie vor die Möglichkeit der allogenen Stammzelltransplantation. (56)

Letztere kann nur erfolgen, wenn keine weiteren Kontraindikationen wie zu hohes Alter oder eine hohe Komorbidität hinzukommen. Sobald ein HLA-identischer Spender gefunden worden ist, erhält der Patient eine Hochdosismchemotherapie, in deren Anschluss die Stammzelltransplantation erfolgt. Der Nutzen der Transplantation scheint hierbei vor allem im so genannten „Graft-versus-Leukemia“-Effekt zu liegen, wobei die immunkompetenten Spender-T-Zellen eine entscheidende Rolle spielen. Gleichzeitig basiert aber auch ein Problem, welches den Langzeiterfolg der Therapie reduziert, auf demselben Effekt: Die „Graft-versus-Host-disease“ (GvHD), bei der die Patienten unter schweren Immunreaktionen der Spenderzellen auf körpereigenes Gewebe leiden. Betroffen sind vor allem Gewebe mit einem hohen Zellumsatz wie Haut, Darm und Leber.

Nach Ablauf der ersten sechs Jahre der Standard- und Ersttherapie mit Imatinib zeigte sich in einer multizentrischen Studie (IRIS) ein Gesamtüberleben von 88% mit einem progressionsfreien Überleben von 83% für alle erfassten Patienten. Zu einer vollständigen hämatologischen Remission kam es in 97% der Fälle zu irgendeinem Zeitpunkt der Therapie. Eine vollständige zytogenetische Remission bestand nach sechs Jahren noch bei 63%. (57). Eine molekulare Remission (mit einer Reduktion des BCR-ABL Transkripts um mind. 3 log-Stufen) bestand im 7. Jahr bei diesen Patienten in 85-90% der Fälle (58) Die Patienten, die in der akzelerierten Phase mit Imatinib allein behandelt wurden, haben nur in 7% der Fälle eine Progression in die Blastenkrise gezeigt. (57).

Eine molekulare Remission mit einer Reduktion des BCR-ABL-Transkripts um mindestens 4-log-Stufen war innerhalb von 48 Monaten bei 80% der Patienten in kompletter zytogenetischer Remission nachweisbar. (51). Ausschlaggebend für die Überlebenswahrscheinlichkeit sind hier vor allem die Geschwindigkeit des Ansprechens auf die Therapie mit Imatinib und die Dauer der Remission in den ersten zwei Jahren. (7)

Bei Patienten, die sich in der akzelerierten Phase oder der Blastenkrise befanden, wurden Studien durchgeführt mit Dosissteigerungen bis 1000 mg pro Tag. Es fand sich bei einer Dosis von 600 mg in der akzelerierten Phase immerhin eine vollständige hämatologische Remission in 37% der Fälle über mindestens 1 Monat, sowie bei der Höchstdosis von 1000 mg pro Tag in der Blastenkrise immerhin in 8% der Fälle eine vollständige hämatologische Remission. Das Gesamtüberleben dieser Patienten war jedoch unverändert schlecht, so dass hier deutlich wurde, dass Imatinib als Einzeltherapeutikum für Patienten in fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung häufig nicht ausreichend ist. (59).

Auch durch die Therapie mit Interferon und Ara-C, die bis 2003 routinemäßig eingesetzt wurde, konnten hämatologische und zytogenetische Remissionen erreicht werden. Molekulare Remissionen beschränkten sich jedoch auf seltene Fälle, in den meisten Fällen lag nach Erreichen einer zumindest partiellen zytogenetischen Remission das Stadium einer „minimalen Resterkrankung“ vor, welches lebenslanger Kontrollen des peripheren Blutbilds und des Knochenmarks bedarf. (55).

Eine vergleichende Übersicht über die Effektivität der beiden Therapieregimes mit Imatinib auf der einen und Interferon/Ara-C auf der anderen Seite gibt Tab.1. Hier zeigt sich ein signifikanter Unterschied sowohl bezüglich des Gesamtüberlebens, als auch bezüglich des progressionsfreien Überlebens und der Remissionsraten.

Da Imatinib nach derzeitigem Kenntnisstand lebenslang eingenommen werden muss, hat die allogene Stammzelltransplantation aufgrund ihres kurativen Ansatzes nach wie vor einen Stellenwert bei der Therapie von sogenannten „Non-Respondern“ und z.B. sehr jungen, sonst gesunden Patienten. Die 5-Jahresüberlebensrate bei der allogenen Stammzelltherapie bei Patienten mit guten prognostischen Risikoscores (<2) nach der „European Group for Blood and Marrow Transplantation“ (EBMT) liegt zwischen 60 und 80% und besser, mit sehr geringen lebenslangen Rezidivraten bei Rezidivfreiheit innerhalb dieser fünf Jahre. Gleichzeitig liegt aber auch die Mortalitätsrate bei 15% aufgrund opportunistischer Infekte und der GvHD. (61-63)

Gesamtüberleben In %		Progressionsfreies Überleben in %		Komplette hämatolog.Remission In %		Komplette Zytogenetische Remission in %		Quelle
Imatinib	IFN/AraC	Imatinib	IFN/AraC	Imatinib	IFN/AraC	Imatinib	IFN/AraC	Präparat
97,2	95,1	92,1	73,5	95,3	55,5	73,8	8,5	O'Brien, IRIS NEJM 2003 Erhebungszeitraum: 18 Monate (55)
92	84	90	82	k.A.	k.A.	87	42	Roy, IRIS vs. CML91, Blood 2006 Erhebungszeitraum: 36 Monate (60)
88	-	83	-	97	-	63	-	Hochhaus, IRIS. Leukemia 2009 Erhebungszeitraum: 6 Jahre(57)
86		93						O'Brien, IRIS, ASH 2008 Erhebungszeitraum: 7 Jahre (58)

Tab. 1: Einzeluntersuchungen der IRIS Studie zum Vergleich der Therapie mit Imatinib vs. Interferon α plus Zytosinarabinosid. Die Studie von Hochhaus et al untersuchte lediglich die Langzeitergebnisse unter Ersttherapie mit Imatinib. Da in der IRIS Studie, die O'Brien et al präsentieren, ein Wechsel der Patienten von der „Interferongruppe“ in die „Imatinibgruppe“ („cross-over“) möglich war, fehlte der Vergleich der beiden Therapieansätze unter Ausschluss anderer vorausgegangener und Kombinationstherapien untereinander. Diesen lieferten Roy et al in ihrem Vergleich von Patienten unter Imatinibtherapie aus der IRIS - Studie mit Patienten aus einer älteren Studie, die Interferon als Ersttherapie erhalten haben.

1.5 Tyrosinkinasen – ein neuer Ansatzpunkt in der Krebstherapie

Nachdem bei der Entwicklung eines selektiven Inhibitors der BCR-ABL-Tyrosinkinase zunächst mit Tyrphostin (65) und Herbimycin A (64) nur partielle Erfolge erzielt werden konnten, hatte man mit Imatinib, einem Derivat aus der 2-Phenylaminopyrimidinklasse, schließlich eine Substanz gefunden, die in vitro und im Tierversuch die Tyrosinkinase inhibierte und somit zu einer Wachstumshemmung der Ph-positiven Zellen führte. (66)

Der Wirkmechanismus beruht auf einer stabilen Bindung zwischen dem relativ kleinen Imatinib-Molekül und der Kinasedomäne des BCR-ABL. Innerhalb dieser Kinasedomäne befinden sich zwei wichtige Regionen: die Adenosintriphosphat (ATP)-Bindungsstelle (P-loop) und die Aktivierungsschleife (A-loop), von deren Phosphorylierung die Aktivität der Tyrosinkinase abhängt. Imatinib bindet an die „A-loop“ der Tyrosinkinase im geschlossenen, inaktiven Zustand (Schindler et al, Science 2000), was eine Strukturveränderung des

Enzyms nach sich zieht, so dass sich die „P-loop“ um das Imatinibmolekül faltet und es über zahlreiche Wasserstoffbrücken so stabil bindet, dass eine Bindung von ATP an die Tyrosinkinase nicht mehr möglich wird und die Tyrosinkinase dadurch dauerhaft inaktiviert ist. (Abb. 2) (67)

Das Resultat ist eine Umkehr der Wirkungen der BCR-ABL-Tyrosinkinase, so dass antiapoptotische und proliferationsstimulierende Signalwege wie z.B. die Aktivierung des RAS-ERK-Signalwegs oder der PI3-Kinase gehemmt werden und die maligne Zelle in der Folge in den programmierten Zelltod übergeht. (68)

Trotz einer sehr hohen Spezifität werden neben der Hemmung der normalen ABL-Tyrosinkinase außerdem auch noch andere Tyrosinkinasen durch Imatinib gehemmt wie der Platelet-Derived-Growth-Factor-Rezeptor- α und β (PDGFR α , β), der Stammzellfaktorrezeptor c-KIT und die ARG (Abl-Related-Gene)-Tyrosinkinase, die strukturell sehr eng mit der ABL-Tyrosinkinase verwandt ist. (69)

Die Nebenwirkungen der Therapie mit Imatinib zeigten sich zunächst als verhältnismäßig mild, betreffen ca. 50% der Fälle (51) und umfassen unspezifische Beschwerden wie z.B. unter anderem periphere Ödeme, nur selten in Verbindung mit Aszites oder Pleuraergüssen. Diese Störungen der Gefäßpermeabilität lassen sich möglicherweise mit der Hemmung der PDGF-Rezeptoren erklären. Andere Nebenwirkungen wie Glieder- und Muskelschmerzen, Übelkeit, leichte Diarrhöen, Erytheme und Pigmentveränderungen (71), die wiederum ihrerseits auf die Inhibition von c-KIT zurückgeführt werden können, treten ebenfalls immer wieder auf. Die einzelnen Fälle von Leber-, sowie Kardiotoxizität (68,74) und Myelosuppression mit Anämien und Thrombozytopenien (70) sind seltenere aber schwerwiegende Komplikationen, die zu verhindern eine engmaschige Überwachung erfordert und deren Pathomechanismus noch nicht vollständig geklärt ist.

Mittlerweile wurde auf Basis der Kenntnis des Einflusses von Imatinib auf c-KIT und PDGFR und die physiologische Tyrosinkinase ABL begonnen, Imatinib als mögliches Mono- und

Kombinationstherapeutikum bei anderen hämatologischen Erkrankungen einzusetzen, wie z.B. der Ph-positiven ALL, dem idiopathischen Hypereosinophiliesyndrom oder der Polycythämia rubra vera zu erforschen (72,73,75). Darüber hinaus wird seine Effektivität bei zahlreichen anderen malignen und nicht-malignen Erkrankungen anderer Organsysteme untersucht, bei deren Pathogenese eine oder mehrere der drei Tyrosinkinasen involviert sind. Zu den in diesem Kontext näher untersuchten malignen Erkrankungen zählen z.B. unter anderem die gastrointestinalen Stromatumoren sowie das kleinzellige Bronchialkarzinom (78), bei denen die c-KIT-Hemmung im Vordergrund steht, und rezidivierende Glioblastome (76), die über eine Hemmung des PDGFR in ihrem Wachstum aufgehalten werden. Seit Februar 2002 ist Imatinib für die Behandlung metastasierter oder nicht resezierbarer gastrointestinaler Stromatumoren zugelassen. (77). Zu den nicht malignen Erkrankungen, bei denen Imatinib als mögliches Kombinations- oder Einzeltherapeutikum untersucht wird, zählt z.B. die pulmonale Hypertension, bei der die Hauptwirkung von Imatinib auf der Hemmung des PDGFR beruht. (79)

1.6 Resistenzen gegen Imatinib

Ein zunächst unterschätztes, jedoch mittlerweile häufiges klinisches Problem bei der Therapie mit Imatinib ist die Resistenzentwicklung. Mittlerweile werden bei 35% der Patienten, die mit Imatinib in der chronischen Phase beginnen, Resistenzen oder Intoleranzen festgestellt. (56) Diese waren entweder präexistent im Sinne primärer Resistenzen, oder aber sie traten sekundär als erworbene Resistenzen unter Imatinib-Therapie auf und äußerten sich zunächst durch schlechteres Ansprechen der Patienten auf die Standarddosis Imatinib. (82)

Generell wird zwischen hämatologischen und zytogenetischen Resistenzen unterschieden:

Die primäre hämatologische Resistenz ist definiert als Ausbleiben eines hämatologischen Ansprechens auf die Standarddosis Imatinib innerhalb von 6 Monaten und taucht in 5% aller Fälle auf. (82) Die sekundäre hämatologische Resistenz im Sinne einer

Krankheitsprogression unter Imatinib tritt in 22% der Patienten in chronischer Phase, 41% der Patienten in akzelerierter Phase und bei 92% der Patienten in der Blastenkrise auf. (83)

Die primäre zytogenetische Resistenz ist definiert als Ausbleiben einer vollständigen zytogenetischen Remission innerhalb von 12 Monaten Imatinib-Therapie oder mehr als 35% Ph-positiver Metaphase-Chromosomen nach 6 Monaten Imatinib-Therapie mit 400 mg/Tag. (80) Der Anteil der Patienten mit CML in chronischer Phase mit primären zytogenetischen Resistenzen liegt bei 15-25% (84). Sekundäre zytogenetische Resistenzen in Form einer Zunahme der Ph-positiven Metaphase-Chromosomen nach initialem Ansprechen, treten innerhalb der ersten 4 Jahre einer Imatinib-Therapie bei bis zu 16% der Patienten in chronischer Phase der CML auf. (80,84)

Bei Patienten, die vor Imatinib bereits eine Therapie mit IFN- α und Ara-C erhalten hatten, liegt die sekundäre Resistenzrate mit bis zu 48% wesentlich höher. (80) Patienten, die in der akzelerierten Phase oder der Blastenkrise mit Imatinib behandelt werden, zeigen in 73% bzw. 80-95% der Fälle Resistenzen. (80,81)

Dies zeigt auch, dass die Resistenzen mit Krankheitsprogression häufiger werden, d.h. Patienten in früher chronischer Phase weisen seltener Resistenzen auf als Patienten in akzelerierter Phase.

Die Ursachen primärer Resistenzen basieren meistens auf verschiedensten, meist unspezifischen Punktmutationen, die die Aktivität von BCR-ABL verändern oder eine Bindung von Imatinib an BCR-ABL verhindern. (85) Die Mechanismen sekundärer Resistenzen sind weniger heterogen und spezifisch. Man unterscheidet hierbei die Mechanismen, die die BCR-ABL-Kinasedomäne involvieren, von denen, die unabhängig von BCR-ABL sind. (84) Letztere Mechanismen basieren auf Veränderungen der Imatinib-Konzentration (93) z.B. durch Störung seiner Transportmechanismen (87-91), der unspezifischen Bindung von Imatinib an andere Proteine innerhalb der Zellen (92) sowie epigenetischen Faktoren (94) oder Aktivierung alternativer Signaltransduktionswege. (95,96)

Resistenzmechanismen, die die BCR-ABL-Kinasedomäne involvieren, gehen entweder auf Mutationen innerhalb der Domäne (84) oder auf ganze Amplifikationen des Onkogens zurück. (86)

In den meisten Fällen (50-90% aller sekundären Resistenzen) handelt es sich bei den Mutationen um Punktmutationen der Kinasedomäne von BCR-ABL, so dass die Bindung von Imatinib an BCR-ABL verhindert oder destabilisiert wird. (84) Ein wesentlich kleinerer Anteil (knapp 10%) an sekundären Resistenzen beruht entweder auf dem Vorliegen von zwei Ph-Chromosomen pro Zelle, einer Amplifikation des zellulären BCR-ABL oder einer Überexpression des Transkripts des Fusionsgens, sowie auf klonaler Expansion der Ph-positiven Zellen. (86,97,98) In diesen Fällen wird vermutet, dass die intrazellulären Imatinib-Konzentrationen, die durch die Tagesdosis von 400 mg erreicht werden, nicht ausreichen, um einen Effekt zu erzielen. In diesen Fällen kann eine Dosissteigerung auf bis zu 800 mg/d einen therapeutischen Nutzen bringen. (81).

Bisher sind mehr als 40 unterschiedliche Punktmutationen innerhalb der Kinasedomäne beschrieben worden. (99) Häufig finden sich mehrere Mutationen bei einem Patienten, doch alle befinden sich im Bereich der Aminosäurestellen 244 bis 486 (99,100) (Nummerierung nach Shtivelman et al (101). Eine Übersicht gibt Abbildung 2.

Hierbei kann man unterschiedliche Hauptregionen oder „Hotspots“ innerhalb der Kinasedomäne von BCR-ABL unterscheiden, in denen die Mutationen auftreten: die „A-loop“ (Aminosäuren 381-402), die „P-loop“ (Aminosäuren 244-255), die SH2-Bindestelle (Aminosäure 351), sowie andere Bereiche, wo wichtige stabilisierende Wasserstoffbrückenbindungen eingegangen werden, oder van der Waals-Bindungen entstehen, z.B. Aminosäure 322 (67,99,100,102,103)

Dies zeigt, dass die Resistenzentwicklung sehr heterogen ist, wodurch auch das Ausmaß der Resistenz von Patient zu Patient sehr verschieden sein kann. Die häufigsten Mutationen treten jedoch im Bereich der „P-loop“ auf (100,102), wo die eigentliche Bindungsstelle zwischen Imatinib und BCR-ABL liegt. Eine weitere häufig beschriebene Mutation findet sich

im Bereich der Aminosäure T315 (86), wo bei Kontakt zwischen Imatinib und BCR-ABL eine stabilisierende Wasserstoffbrückenbindung eingegangen wird.

Die mittlere Hemmkonzentration von Imatinib (IC₅₀) liegt bei der T315-Mutation bei 16,99 µM im Vergleich zu einer IC₅₀ von 0,8 im Wildtyp BCR-ABL. (104). Gleichzeitig besteht nur ein sehr enger Spielraum für Mutationen zwischen einer Resistenzentwicklung von BCR-ABL und einer vollkommenen Inaktivierung des Proteins durch Mutationen innerhalb der „P-loop“ (84). Die Mutationen, die den Austausch strukturell ähnlicher Aminosäuren bewirken oder die etwas exzentrisch der funktionell entscheidenden Regionen des Proteins liegen, sind daher die für die Resistenzentwicklung wichtigen, während die Mutationen, die das Protein in seiner Struktur gravierend verändern, zur Apoptose der Zellen führen, da sie BCR-ABL komplett inaktivieren. Entsprechend dieser Beobachtungen haben die Mutationen auch unterschiedliche Auswirkungen auf die Prognose der Patienten. Bei einigen Mutationen reicht eine Dosissteigerung, um die Resistenz überwinden zu können, so z.B. bei den meisten der Mutationen, die außerhalb der „P-loop“ liegen. (81) Für die Patienten mit Mutationen innerhalb der „P-loop“ ist die Prognose äußerst schlecht. 92% der Patienten in chronischer und akzelerierter Phase, bei denen diese Mutationen detektiert wurden, starben innerhalb eines Jahres, im Mittel innerhalb von 5 Monaten, während nur 21% der Patienten mit Mutationen außerhalb der „P-loop“ starben, darunter befanden sich alle in akzelerierter Phase. (100)

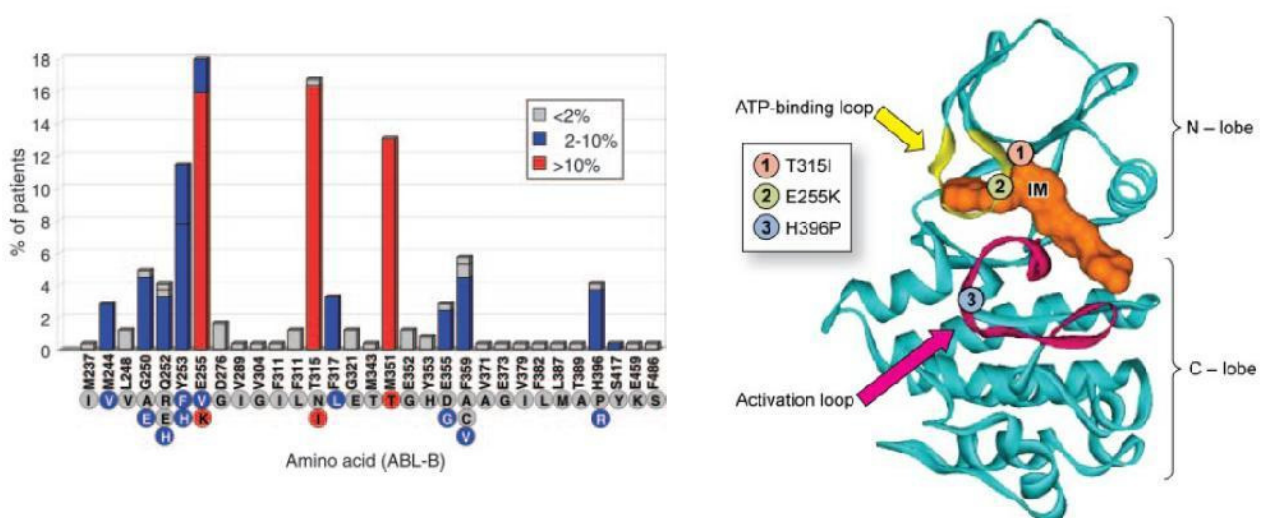


Abb 2: Die am häufigsten beschriebenen Punktmutationen bei sekundärer Resistenz gegen Imatinib (li) und ihre Lokalisationen am BCR-ABL Protein (re) (Goldman et al 2007, Hughes et al 2006, Branford et al, Blood 2003)

Die Ursachen für das Auftreten dieser Mutationen sind noch nicht geklärt. Eine Möglichkeit ist, dass es sich um primär existierende genetische Instabilitäten handelt, die mit dem Krankheitsverlauf der CML einhergehen und durch BCR-ABL induziert werden. Ebenso ist es möglich, dass es durch die Imatinib-Therapie zur Selektion eines primär resistenten, also präexistenten Zellklons kommt. Die andere Möglichkeit ist eine direkte sekundäre Induktion der Mutationen durch Imatinib.

1.7 Sekundäre chromosomale Aberrationen unter Imatinib

Unter der Therapie mit Imatinib als Erstmedikation bei der CML kommt es bei ca. 9% der Patienten zum Auftreten neuer, vor Therapiebeginn nicht nachweisbarer, zytogenetischer Aberrationen der Ph-negativen Zellen. (105,106) Großteils handelt es sich hierbei um Trisomien, Monosomien, Deletionen oder Y-Chromosomverluste (105, 107-110). Eine Übersicht gibt Tabelle 2.

Aberration	Anzahl der Fälle	Quelle
45 X; -Y	14	105,110, 111
46 XX / 46 XY; +8	7	105,107,111, 112
45 XX / 45 XY; -7	3	105,112
46 XX / 46 XY; del(20q)	3	105,111
46 XX / 46 XY; t(2;11)	1	113
46 XX / 46 XY; t(9;14)	1	107
46 XX / 46 XY; t(3;11)	1	111
46 XX / 46 XY; t(7;22)	1	111

Tab.2: Übersicht der bisher am häufigsten erfassten zytogenetischen Aberrationen Ph-negativer Zellen unter Imatinib-Therapie.

All dies sind Veränderungen, die auch im Rahmen des Krankheitsprogresses der CML, sowie bereits früher unter der Therapie mit Interferon- α und Hydroxyurea beschrieben worden sind. Interessanterweise treten die Veränderungen des Karyotyps häufig zeitgleich

mit der Entwicklung sekundärer Resistenzen auf. (114). Die Ursache der Resistenzen und zytogenetischen Aberrationen bei der Behandlung mit Imatinib selbst zu suchen liegt daher nahe. Doch die Beobachtung, dass Patienten unter Imatinib - Hochdosistherapie nicht mehr Aberrationen aufweisen als Patienten, die geringere Dosen erhielten (107), sondern oft sogar weniger, legt eine wesentlich komplexere Rolle der molekularen Wirkmechanismen von Imatinib bei der Entstehung dieser Probleme nahe.

Darüber hinaus ist nicht klar, welche Bedeutung die zytogenetischen Aberrationen für den Krankheitsverlauf der Patienten haben. Wie oben bereits angedeutet, scheinen die zytogenetischen Aberrationen mit einer schlechteren Gesamtprognose für die Erkrankung einherzugehen. Des Weiteren könnten die Aberrationen aber auch Anzeichen neuer von der CML unabhängiger Gesundheitsprobleme sein. Erst mit den kürzlich erschienen Langzeitstudien wurden Einzelfälle beschrieben, bei denen Patienten nach Ersttherapie mit Imatinib und bekannten sekundär aufgetretenen zytogenetischen Aberrationen myelodysplastische Syndrome, akute Leukämien oder ausgeprägte Myelosuppressionen entwickelten (115).

1.8 Zielsetzung der Arbeit

In dieser Arbeit wurden genomweite Genexpressionsprofile Ph-negativer CD34-positiver Zellen von Patienten mit CML in molekularer Remission, während der Therapie mit Imatinib mit den Genexpressionsprofilen Ph-negativer CD34-positiver Zellen von Gesunden verglichen.

Das Ziel war es, die Mechanismen der Wirkung von Imatinib auf molekularer Ebene, sowie mögliche indirekte Hinweise auf mutagene Effekte der Therapie mit Imatinib zu untersuchen. Zur Klärung dieser Fragestellung entschieden wir uns für die Verwendung von DNA-Oligoarrays der Firma Affymetrix, wodurch uns Daten über die Transkription und damit Expression von 8793 Genen der Ph-negativen Zellen zur Verfügung standen. Des Weiteren wollten wir die in der Literatur beschriebene in vitro Hemmung der c-KIT-Expression (69) auch in vivo untersuchen, um einen weiteren Teilaspekt der Wirkung von Imatinib auf die

molekularen Vorgänge in der normalen hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzelle zu beleuchten.

Zunächst musste eine geeignete Methode entwickelt werden, mithilfe derer sich aus Knochenmark von Patienten unter Imatinib-Therapie die Ph-negativen Zellen isolieren lassen. Aus diesen wiederum konnten nur geringe Mengen gesamtzellulärer RNA gewonnen werden, so dass ein wichtiger Teilaspekt der Arbeit die Methodenetablierung für die Aufarbeitung geringer RNA – Mengen für die Hybridisierung mit Oligoarrays ist.

Im Anschluss wurden verschiedene Analysemethoden für die Auswertung der Genexpressionsdaten evaluiert und verwendet.

Einzelne auf diese Weise ermittelte differentiell exprimierte Gene sollten daraufhin mittels quantitativer RT-PCR in ihrer Expression näher untersucht werden, einerseits um eine quantitative Aussage über die Expression machen zu können und um die Validität der zu diesem Zeitpunkt noch nicht weitverbreiteten Oligoarray-Analyse zu gewährleisten.

2. PATIENTEN UND METHODEN

2.1 Patientenkollektiv und Kontrollpersonen

Für die Genexpressionsanalysen mittels Affymetrixchips wurde frisch gewonnenes, mit Heparin antikoaguliertes Knochenmarkaspirat von 8 Patienten mit BCR-ABL-positiver CML in chronischer Phase mit gutem molekularen Ansprechen und von 5 gesunden freiwilligen Spendern verwendet. Für die quantitative „Real-Time“ RT-PCR zur Validierung der Ergebnisse aus den „Microarrays“ wurde außerdem das Knochenmark von 5 hämatologisch gesunden Patienten verwendet, die im Rahmen eines frischen Myokardinfarkts für eine Stammzelltherapie eine Knochenmarkentnahme durchführen ließen. Für die Durchflusszytometrie zur Untersuchung der c-KIT-Expression auf den Ph-negativen Zellen während Imatinibbehandlung wurden die Zellen von den o.g. 8 Patienten, sowie von 12 weiteren Patienten mit CML in Remission unter Imatinibtherapie verwendet, denen im

Rahmen einer Routineuntersuchung eine Knochenmarkspröbe entnommen worden war. Alle Patienten und Spender haben nach eingehender Aufklärung ihr schriftliches Einverständnis zur Verwendung ihres Knochenmarkmaterials für unsere Studie gegeben. Das gute molekulare Ansprechen wurde bei kompletter hämatologischer und zytogenetischer Remission definiert als ein BCR-ABL/G6PDH (Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase)-Quotient von <0,03 %, was in allen Fällen einer Reduktion des Quotienten um drei oder mehr log₁₀-Stufen im Vergleich zum Quotienten vor Therapiebeginn entspricht. Durch dieses Einschlusskriterium wurde sichergestellt, dass über 99% der untersuchten Zellen Ph-Chromosom negativ waren. Die molekularbiologischen Untersuchungen für die Patientenauswahl waren bereits im Vorfeld im Rahmen der Routinediagnostik mittels quantitativer „Real-Time“-RT-PCR unter Verwendung des Roche LightCyclers und eines kommerziellen RT-PCR-Kits (LightCycler-t(9;22)-Quantification Kit, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) entsprechend den Herstellerangaben erfolgt. Es wurden hierbei Primer und Hybridisierungssonden verwendet, die die drei häufigsten Bruchpunktvarianten des BCR-ABL-Fusionsgens mit einer Sensitivität von einer positiven Zelle in 1 x 10⁵ normalen Zellen detektieren können (49). Als internes Kontrollgen wurde G6PDH benutzt. Die relative BCR-ABL mRNA Menge wurde als BCR-ABL/G6PDH Quotient berechnet. Die Quotienten der Patienten lagen zum Zeitpunkt der Probenentnahme im Median bei 0,0048% (Bereich: negativ – 0,026 %).

Die tägliche Imatinib-Dosis der CML Patienten lag bei 400 mg und die Therapiedauer betrug zum Zeitpunkt der Knochenmarkspunktion im Mittel 25 Monate (Bereich: 10 – 38 Monate).

Die Charakteristika der Patienten und der gesunden Spender, deren Material für die Genexpressionsanalysen mittels der Affymetrix Chiptechnologie verwendet wurde, sind in Tab.3 aufgeführt.

Tab.3	Patientencharakteristika	Kontrollgruppe Gesunde
Gesamt	8	5
männlich	6	3
weiblich	2	2
Alter	25 – 68 (52)	22 – 35 (26)

(Bereich und Mittelwert)		
Dauer der Therapie in Monaten (Bereich und Mittelwert)	10 – 38 (25)	-
BCR-ABL/G6PDH- Quotient zum Zeitpunkt der Probenentnahme (Bereich und Median)	negativ – 0,026 % (0,0048 %)	-
BCR-ABL/G6PDH-Quotient zum Zeitpunkt der Erstdiagnose (Bereich und Median)	0,03 – 23,77 % (5,73 %)	-

2. 2 Universell eingesetztes Material und Geräte

- „Axioplan Imaging 2“ Mikroskop, Zeiss Microimaging, Göttingen, Deutschland
- „Axiovert 25“ Zeiss Mikroskop, Carl Zeiss Microimaging, Göttingen, Deutschland
- BD Falcon „Conical Centrifuge Tubes“ 50 ml, 15 ml, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
- beta-Mercaptoethanol, Sigma – Aldrich, Seelze, Deutschland
- Biophotometer eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Biozym „budget line SafeSeal Tips“: sterile Filter Spitzen DNase/RNase frei, 10,100 und 1000 µl, BioZym, Oldendorf, Deutschland
- Blutentnahmeröhrchen mit EDTA-Zusatz, 4ml, 8ml, BD „Vacutainer“, Becton Dickinson, CA, USA
- „Bosch automatic“ 4 °C Kühlschrank, Bosch, Stuttgart, Deutschland
- COULTER Ac-T diff, Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
- Durchflusszytometer, FACS Scan, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
- Eismaschine, Scotsman AF100, „Scotsman ice systems“, Mailand, Italien
- Elektrische Motorpipette, „Accu-Jet“ Wertheim, Deutschland
- Ethanol pro analysi, Methanol pro analysi, Essigsäure 100 %, Merck, Darmstadt, Deutschland

- Glaspipettenspitzen “Costar Stripette”, Corning Life Sciences, Shiphol-Rijk, Niederlande
- Heparin, Liquemin N, Roche Pharma, Grenzach, Deutschland
- Humanes Serum-Albumin, Humalbin, Aventis-Behring, Marburg, Deutschland
- Hybridisierungsöfen „HYBrite™“, Vysis/Abbott-GmbH & Co, Wiesbaden, Deutschland
- Kühlschrank -20°C, „Liebherr comfort“, Liebherr international, Bulle, Schweiz
- Luftinkubator, H.Saur, Reutlingen, Deutschland
- „Lymphoprep“, axis-shield, Oslo, Norwegen
- „Mastercycler gradient “ „Thermocycler“, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Mikrolitergefäße für 500µl, 1,5 ml und 2ml, Safe-Lock-Tube, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Mikrozentrifuge, „Biofuge fresco“, (Radius 5,9 cm, Kendro Laboratory products, Langenselbold, Deutschland
- Na₂EDTA , Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland
- PBS-Puffer, PBS-Dulbecco, Biochrom, Berlin, Deutschland
- Perfusorspritze, steril für bis zu 50ml, OPS, B. Braun, Melsungen, Deutschland
- Photometerküvetten „UVette“ , Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Puderfreie Latex-Handschuhe von Kimberly Clark, „Safe Skin Satin Plus“, Zaventem, Belgien
- „Research“ Pipetten 2,5, 10, 100 und 1000 µl, eppendorf, Hamburg, Deutschland
- „RNAse Zap“, Ambion, Huntingdon, Cambridgeshire, UK
- “Thermomixer comfort“ Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Tiefkälteschrank -80°C, „Heraeus (Relative Zentrifugalbeschleunigung 11,2g) Herafreeze HFU586 basic“, Heraeus, Hanau, Deutschland
- Vortexmixer, „neoLab“, Heidelberg, Deutschland
- Waage Mettler PL200, Mettler-Toledo, Giessen, Deutschland
- Wärmeplatte (Magnetrührer): Heidolph MR 3002, Kelheim, Deutschland

- Wasserbad, Köttermann, Uetze-Hänigsen, Deutschland
- Zellsieb, Nylon 40 µm, Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
- Zentrifuge, „Heraeus Multifuge“ 1 S-R, Heraeus, (Radius: 18,7 cm), Hanau, Deutschland

2.3 Gewinnung von CD34 positiven hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen aus dem Knochenmarkaspirat

Es wurden im Mittel 50 ml (Bereich 28-60 ml) Knochenmarkaspirat ohne Zusatz von Citrat gewonnen. Diese wurden bis zur weiteren Verarbeitung durch Dichtegradientenzentrifugation bei RT gelagert. Zwischen Knochenmarkentnahme und Verarbeitung lagen maximal 8h, was den Empfehlungen der European Leukemia Network Guidelines entspricht (116)

2.4 Dichtegradientenzentrifugation

Die Dichtegradientenzentrifugation wird angewandt, um die mononukleären Zellen von den übrigen Zellen des Knochenmarks zu trennen. Das Knochenmarkaspirat wird hierfür auf eine Natriumdiatrizoat – Polysaccharid - Lösung aufgetragen, deren Bestandteile sich an die Erythrozyten anlagern und so eine stärkere Sedimentation bewirken. Durch Zentrifugation lässt sich somit eine Auftrennung der zellulären Bestandteile des Knochenmarks erreichen, so dass die mononukleären Zellen als Ring zwischen den sedimentierten Erythrozyten und Granulozyten und dem Serum erscheinen und leicht mit einer Pipette abgetragen werden können.

Nach Gewinnung des Knochenmarks aus dem Beckenkamm der Patienten/Spender wurde dieses direkt durch ein 40 µm Nylon-Sieb, das vorher mit 1 ml PBS Puffer angefeuchtet wurde, in ein Polypropylengefäß pipettiert. Das somit von groben Knochenmarksbestandteilen und koaguliertem Blut befreite Aspirat wurde 1:1 mit PBS verdünnt und schließlich max. 35 ml der Suspension auf je 15 ml „Lymphoprep“ in je ein

neues Gefäß pipettiert. Anschließend wurde 30 Minuten mit 1600 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert.

Der nach der Zentrifugation sichtbare sog. Interphase Ring, der die mononukleären Zellen enthielt, wurde vorsichtig mittels automatischer Pipette aspiriert und in ein neues Gefäß überführt. Da die Verunreinigung durch Erythrozyten und Granulozyten nach der Dichtegradientenzentrifugation zwischen 1 und 5% schwankt und hier mit wenig Ausgangsmaterial gearbeitet wurde, erfolgten nun zwei Waschschrte. Hierfür wurde mit PBS 1:1 verdünnt. Nun wurde 10 Minuten lang erneut mit 1600 rpm zentrifugiert. Die Pellets, die nach Abnahme des Überstands übrig waren, wurden mit max. 10 – 15 ml PBS resuspendiert und genau so wie der entnommene Überstand nochmals für 10 min bei 1600 rpm zentrifugiert. Nach diesem letzten Waschgang wurden alle Überstände verworfen und die Pellets mit je 500 µl – 1 ml PBS resuspendiert und zusammengeführt. 30 µl wurden nach Resuspension hieraus entnommen für die Zellzahlmessung im „Coulter“-Zellzählgerät. Nach der Zellzählung wurden die Zellen erneut 5 min mit 1600 rpm zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen.

2.5 Immunmagnetische Isolation der CD34-positiven Zellen

Bei der immunmagnetischen Isolation werden die zu isolierenden CD34-positiven Zellen an hochspezifische monoklonale Maus-Antikörper gegen das menschliche CD34-Antigen gebunden, die wiederum an paramagnetische Eisenpartikel, sog. „MicroBeads“ (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland), gekoppelt sind. Durch den Fluss durch eine speziell beschichtete Säule, die in ein permanentes Magnetfeld eingespannt ist, werden die an die Antikörper gebundenen Zellen zurückgehalten und als Positivfraktion in der Säule gesammelt. Hierdurch kann laut Angaben des Herstellers der Anteil von CD34 exprimierenden Zellen im Knochenmarkaspirat von 0,5-3% auf 85-98 % gesteigert werden.

Das im letzten Waschschrte herunterzentrifugierte Pellet an mononukleären Zellen wurde dafür zunächst mit 300 µl MACS-Puffer pro 1×10^8 Zellen (Zusammensetzung des MACS -

Puffers: 450 ml PBS – Puffer mit 372 mg Na₂EDTA und 50 ml Humanalbumin) resuspendiert. Danach wurden pro 1×10^8 mononukleären Zellen je 100 μ l „FcR Blocking Reagent“ (Miltenyi Biotec) und je 100 μ l an CD34 Antikörper konjugierte „MicroBeads“ (Miltenyi Biotec) hinzupipettiert und mit den Zellen mittels Pipette vermischt. Es folgte eine 30minütige Inkubation bei 6-8°C. Im Anschluss an die Inkubation wurden 5-10 ml MACS-Puffer zu den Zellen gegeben und es wurde 5 min mit 1500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 500 μ l MACS-Puffer pro 1×10^8 Zellen resuspendiert. Für weniger als 1×10^8 MNC wurden kleine „MS“- und für darüber liegende Zellmengen große „LS“-Säulen in die dazugehörigen MACS Separatoren eingesetzt und mit 500 μ l (MS) bzw. 3 ml (LS) MACS-Puffer gespült. Die Zellen wurden in die Säulen pipettiert, und es wurde dreimal mit je 500 μ l (MS) bzw. 3 ml (LS) gespült, so dass die CD34 - Negativfraktion sich in einem Röhrchen unter der Säule sammeln konnte. Nach den drei Waschschritten wurden 1 ml (MS) bzw. 5 ml (LS) auf die Säule gegeben und unter Druck wurde die CD34-positive Fraktion in ein neues Sammelröhrchen aus den Säulen herausgepresst. Trotz möglicher Zellverluste wurde zugunsten einer größeren Reinheit der Probe die Säulenseparation über eine neue Säule wiederholt. Doch dieses Mal wurden nach den drei Waschschritten nicht 1 ml (MS) bzw. 5 ml (LS) sondern jeweils nur die Hälfte MACS-Puffer auf die Säule pipettiert und die CD34-positive Zellen wurden wieder in ein neues Röhrchen gedrückt, aus dem 30 μ l direkt für die automatische Zellzählung entnommen wurden.

2.6 Verarbeitung und Aufbewahrung der CD34-positiven-Zellen

Nach Abnahme der Zellen für die Durchflusszytometrie oder die FISH wurden die restlichen Zellen in Mikrolitergefäße überführt und 5 min mit 2400 rpm zentrifugiert. Die Zellpellets wurden bis zu einer Zellzahl von 5×10^6 CD34-positiven Zellen mit 600 μ l „Lysepuffer“ (1000 μ l RLT-Lysepuffer von Qiagen + 10 μ l β -Mercaptoethanol) lysiert und bei -80°C eingefroren. Lag die Zellzahl über 5×10^6 , wurde mit 1200 μ l lysiert.

2.7 Durchflusszytometrie

2.7.1 Ein-Farben-Fluoreszenzmessung

Zur Qualitätskontrolle der Selektion CD34-positiver Zellen mittels der oben beschriebenen immunmagnetischen Technik wurden von jeder Probe zwischen 5×10^4 und 5×10^5 Zellen aus der Positivfraktion entnommen und in einem Durchflusszytometer mittels Ein-Farbenfluoreszenz gemessen. Die Grundlage der Durchflusszytometrie besteht in einer Antigen-Antikörper-Reaktion mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern. Die Messung ermöglicht Aussagen über die Zellen selbst und dient der quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen und Proteinen. Hierfür werden die Zellen nach der Inkubation mit den Antikörpern in einer Einzelzellsuspension - durch hydrodynamische Fokussierung aneinandergereiht - an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet. Bei Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes durch den monochromatischen Laserstrahl wird dieser auf ein höheres Energieniveau gehoben und fällt unter Photonenemission auf sein Ursprungsniveau zurück. Die Frequenz der Photonen sowie die Konzentration werden innerhalb des Geräts detektiert und in elektrische Signale umgewandelt. Zusätzlich werden durch die Lichtbeugung und -streuung Informationen über die Größe und Granularität der Zelle gewonnen.

Verwendet wurden für die Messung ein monoklonaler Anti-CD34-Antikörper (Klon 8G12, BD Biosciences, Becton Dickinson Heidelberg, Deutschland) der an einem anderen Epitop bindet als die immunmagnetischen CD34-Antikörper, und ein Isotypen-identischer Maus-IgG1-Antikörper (BD Biosciences), an die der Farbstoff FITC (Fluoresceinthiocyanat) gekoppelt war. Es wurden je 10 μl der Antikörperlösung auf je 50 μl in PBS – Puffer resuspendiertes Eluat gegeben, 20 Minuten im Dunkeln bei 4-8 °C inkubiert und danach mit je 1 ml PBS-Puffer für 5 min mit 1600 rpm gewaschen. Nach Resuspension mit jeweils 300 μl PBS-Puffer wurde die Messung erst mit den unspezifisch an Maus-IgG1-Antikörper gebundenen Zellen und dann mit den spezifisch an Anti-CD34-Antikörper gebundenen Zellen durchgeführt.

Die Messung und Auswertung erfolgten an einem Durchflusszytometer mit einem 2 Watt Argonionenlaser mittels der „CellQuest“-Software. Die Reinheit wurde nach Gating im FSC/SSC-Scatter Plot bestimmt, so dass Zellbestandteile und abgestorbene Zellen nicht in die Reinheitsmessung einbezogen wurden.

2.7.2 Zwei-Farben-Fluoreszenzmessung

Parallel dazu wurden bei 20 Patienten mit CML in Remission unter Imatinibtherapie, deren Knochenmark ebenfalls im Rahmen von Routineuntersuchung entnommen worden war, die CD34-positiven Stammzellen auch noch mit einem Phycoerythrin (PE)-markierten Anti-CD117-ckit-Antikörper (BD Biosciences) und dem dazugehörigen Isotypen-identischen FITC/PE Mouse-IgG1/IgG2 Antikörper (BD Biosciences „Simultest™“ $\gamma 1/\gamma 2a$) für Zwei-Farbenmessungen wie oben beschrieben inkubiert und gemessen. Die Auswertung erfolgte auch hier unter Ausschluss von Zelldebris durch Gating im FSC/SSC Scatter Plot. Fünf dieser Patienten waren Teil der Kohorte für die Genexpressionsanalysen der Ph-negativen Zellen.

2.8 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Von insgesamt sechs Patienten wurden je 5×10^4 CD34-positive Zellen nach der immunmagnetischen Isolation abzentrifugiert und mit 1 ml „Ibrahim“-Lösung (Essigsäure und Aqua dest. im Verhältnis 1:19) resuspendiert. Das Gemisch wurde mit 2000 rpm 4 min zentrifugiert und das Pellet mit 1 ml „Carnoy's Fix“ (Essigsäure und Methanol im Mischverhältnis 1:3) resuspendiert. Es folgte eine zehnminütige Inkubation bei Raumtemperatur. Zum Schluss wurde noch einmal 4 min mit 2000 rpm zentrifugiert und es wurden erneut 200 μ l „Carnoy's Fix“ zum Pellet hinzu pipettiert. Diese Proben wurden bei -20°C für die spätere FISH – Analyse gelagert.

Das Prinzip der FISH ist es, in den Ph-positiven Zellen mittels Fluoreszenzmarkierung der BCR und ABL Gene die BCR-ABL-Fusion unter einem speziellen Fluoreszenzmikroskop zu erkennen und quantitativ auszuwerten.

Für die FISH wurden Sonden und Farbstoffe von der Firma Vysis verwendet. Die Vysis „LSI BCR/ABL Dual Color Dual Fusion Translocation Probe“ setzt sich zusammen aus einer „SpectrumGreen“- für BCR und einer „SpectrumOrange“-markierten Sonde für ABL, die an die betreffenden Regionen binden. Der Hybridisierungsbereich der ABL-Sequenz umfasst ca. 650 kb beginnend am Argininosuccinat-Synthetase (ASS) - Gen bis zum letzten ABL-Exon auf Chromosom 9 reichend. Die BCR-Sequenz beginnt am „Lambda Light Chain Locus“ (IGLV) auf Chromosom 22 und reicht ca. 1500 kb bis zu einem Locus ca. 900 kb telomerisch der BCR-Region. Lediglich ein Bereich von repetitiven Sequenzen von ca. 300 kb zwischen den Translokationspunkten ist nicht über diese Sonde abgedeckt. Jedoch sind alle bisher beobachteten unterschiedlichen Bruchstellen erfasst. Während man in den Ph-negativen Zellen somit zwei orangefarbene und zwei grüne, also Signale der Chromosome 9 und 22 nachweisen kann, finden sich in den Ph-positiven Zellen ein oranges, ein grünes, sowie zwei gelb erscheinende Fusionssignale, die sich bei einer balancierten Translokation aus der Überlagerung der Farbstoffe an den Fusionsstellen ergeben.

Durch das zweifache Fusionssignal kann ausgeschlossen werden, dass Deletionen, die ebenfalls als anomales Bild präsentiert würden, irrtümlicherweise als Translokation mitgezählt werden und so die Fehlerquote im Sinne falsch-positiver Ergebnisse gering gehalten wird.

Das Protokoll für die weitere Vorbereitung der FISH – Proben basiert auf einem institutsintern etablierten Protokoll und setzt sich zusammen aus der Vorbereitung der Ziel-DNA in den Zellen, der Vorbereitung der Sonden und der Hybridisierung und Aufreinigung, sowie der Gegenfärbung mit dem 4,6-Diamidino-2-phenylindol-(DAPI)-Farbstoff, ebenfalls von der Firma Vysis.

Von den bei -20°C eingefrorenen Zellen wurden 10 µl zunächst auf einen sauberen Objektträger pipettiert und die überstehende Flüssigkeit auf dem Objektträger über einem

74°C warmen Wasserbad verdampft. Nach diesem Schritt wurde die Zelldichte unter einem Mikroskop („Axiovert 25“, Zeiss) kontrolliert und evtl. wurden erneut 10 µl der Zelllösung hinzu pipettiert und getrocknet, bis eine optimale Zelldichte erreicht war. Es folgte die Dehydrierung in Alkoholbädern aufsteigender Konzentration, 70 %, 85 % und 100 % Ethanol, für jeweils 1 Minute. Die Objektträger wurden dann in dem reinen Ethanol so lange aufbewahrt, bis die Sonden für die Hybridisierung vorbereitet waren.

Für jede Probe wurden 7 µl LSI/WCP Hybridisierungspuffer (Vysis), 1 µl LSI DNA Probe (Vysis) und 2 µl Aqua dest. gemischt und 1-3 sec abzentrifugiert, erneut gemischt und nochmals zentrifugiert.

Die Objektträger wurden nun auf einer Heizplatte bei 45-50 °C getrocknet, bis das restliche Ethanol verdampft war. 10 µl der vorbereiteten Sonde wurden auf die Zellen auf dem Objektträger pipettiert und mit einem Deckgläschen und Fixogum (Marabu, Tamm) abgedichtet. Nun wurde die DNA für 2 min bei 75 °C denaturiert und im Anschluss über Nacht, ca. 16-20 h bei 37 °C im Hybridisierungssofen mit den Sonden hybridisiert.

Am nächsten Morgen wurden zunächst 70 ml von je zwei Waschlösungen in Küvetten vorbereitet, und Waschlösung 1 wurde in einem Wasserbad auf 80 °C erhitzt. Waschlösung 1 setzte sich zusammen aus 20 ml 20x SSC (Sodium Saline Citrate - Puffer) (175 g NaCl + 88 g NaCitrat-2H₂O auf 1000 ml mit Aqua dest aufgefüllt und eingestellt auf einen pH von 5,3 entsprechen hierbei 20xSSC) gemischt mit 3 ml Nonidet-P-(NP)-40, einem nicht-ionischem Detergens, aufgefüllt auf 1 l mit Aqua dest, eingestellt auf einen pH von 7-7,5.

Waschlösung 2 setzte sich zusammen aus 100 ml 20x SSC mit 1 ml NP-40, aufgefüllt auf 1 l mit Aqua dest., eingestellt auf einen pH von 7-7,5.

Die Objektträger wurden aus dem Hybridisierungssofen entnommen und nach Entfernen der Deckgläschen im abgedunkelten Raum für 2 min in die auf 74 °C aufgewärmte Waschlösung 1 gestellt. Direkt danach wurde der Objektträger für 1 min in Waschlösung 2 auf Raumtemperatur eingestellt.

Zum Schluss wurde, um die Zellkörper sichtbar zu machen, mit 10 µl DAPI gegengefärbt. Danach wurde der Objektträger im Dunkeln eine halbe Stunde im Hybridisierungssofen

luftgetrocknet. Erneut wurde die Probe mit einem Deckglas und Fixogum luftdicht abgeschlossen und bei -20 °C im Dunkeln gelagert.

Für die Auswertung der FISH wurden das Mikroskop und die Farbfilter „Axioplan Imaging 2“ von Zeiss verwendet. Die Bilder wurden mit Hilfe der Software isis von der Firma MetaSystems (Altlussheim, Deutschland), Version 4.4.20, gespeichert und konnten dann unter Verrechnung der einzelnen Farbsignale ausgewertet werden. Es wurden – da schon initial sehr geringe Zellmengen vorlagen – immer 100 Zellen ausgezählt.

Vor der Auszählung der Proben erfolgte zur Ermittlung der Irrtumswahrscheinlichkeit, eine Ph-negative Zelle als falsch-positiv zu werten, eine Auszählung zweier sicher Ph-negativer Kontrollproben. Hierfür wurden jeweils 200 CD34-positive Zellen von Gesunden ausgezählt und alle aberranten Signale notiert, die von einer Philadelphia-Translokation nicht sicher zu unterscheiden sind. Die Standardabweichung für falsch-positive Signale betrug hierbei 3% (=cut off), d.h. nur wenn über 3% der Chromosomen in den später ausgezählten Proben das Signal der Philadelphia-Translokation trugen, konnten diese als sicher Ph-positiv gewertet werden.

2.9 Isolierung der gesamtzellulären RNA für die weitere Verarbeitung

Vor der Durchführung der Microarray-Analyse musste zunächst aus den eingefrorenen Zelllysaten die gesamtzelluläre RNA (Gesamt-RNA) isoliert werden und auf ihre Qualität untersucht werden. Hierfür wurde das RNA-Extraktions-Kit „RNeasy Micro Kit“ der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) verwendet, da es für kleinere Zellmengen bis zu 5×10^5 Zellen geeignet ist.

Das Extraktionsverfahren beruht auf der selektiven Bindung aller RNA – Moleküle, die größer als 200 Nukleotide sind, an eine Silica-Gel-Membran und der schrittweisen Reinigung der Gesamt-RNA von anderen intrazellulären Bestandteilen unter Verwendung einer Mikrozentrifuge. Eine optionale enzymatische DNA Verdauung („RNase free DNase Set“, Qiagen) wurde immer durchgeführt, ansonsten folgte das Prozedere den Angaben des Herstellers. Der Arbeitsplatz sowie alle Pipetten und Oberflächen, die während des

Protokolls berührt wurden, wurden mittels „RNase Zap“ (Ambion) durch einmaliges Aufsprühen und Wischen vorbehandelt.

Die bei -80°C gelagerten Lysate wurden auf Eis aufgetaut und in Volumina von max. 700 µl auf „QIAshredder“-Säulen (Qiagen, Hilden) aufgetragen. Diese Säulen enthalten eine Biopolymer-Membran und dienen in Kombination mit einer zweiminütigen Zentrifugation in einer Mikrozentrifuge bei maximaler Umdrehung der Homogenisierung der Lysate.

Die Säulen wurden nach diesem Schritt verworfen und das in einem 2-ml Sammelgefäß enthaltene Eluat jeweils mit dem gleichen Volumen 70%igen Ethanol vermischt. Danach wurde das Gemisch auf die „RNeasy MinElute Spin“ Säulen mit Silicagel-Membran aufgetragen und mit 10.000 rpm für 15 sec zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen und für einen ersten Waschschrift wurden 350 µl RW1 Puffer auf die Membran pipettiert, gefolgt von weiteren 15 sec Zentrifugation mit 10.000 rpm. Das Eluat wurde ebenfalls verworfen.

An dieser Stelle wurde laut Protokoll des Herstellers die optionale DNase - Verdauung eingefügt. Hierfür wurden 10 µl DNase-Stammlösung vermischt mit RNase freiem Wasser, mit 70 µl RDD – Puffer vorsichtig gemischt. 80 µl des Gemischs wurden auf die Silicagel-Membran pipettiert und anschließend für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurde erneut mit 350 µl RW1-Puffer mit 10.000 rpm für 15 sec gewaschen und das Sammelgefäß wurde mitsamt dem Durchfluss verworfen. Die Säule wurde in ein mitgeliefertes neues Sammelgefäß eingesetzt und es wurden 500 µl RPE Puffer auf die Membran pipettiert. Zum Waschen wurde nun 15 sec mit 10.000 rpm zentrifugiert und das Eluat wurde wieder verworfen. Ein letzter Waschschrift mit 500 µl 80%igem Ethanol für 2 min mit 10.000 rpm diente dazu, sämtliche Kontaminationen mit restlichem zellulären Material sowie eventuelle RW1- und RPE-Puffer-Rückstände zu beseitigen. Daher wurden nach dieser Zentrifugation erneut Sammelgefäß und Durchfluss verworfen und die Säule wieder in ein neues Sammelgefäß eingesetzt. Zum Trocknen wurden die Säulen anschließend ohne Deckel für 5 min mit Höchstgeschwindigkeit zentrifugiert und sowohl Sammelgefäß als auch Durchfluss verworfen. Nachdem die Säulen in 1,5 ml –

Mikrolitergefäße eingesetzt worden waren, wurden zur Lösung der RNA von der Silicagel-Membran 14 µl RNase freies Wasser aus dem Kit auf die Membran aufgetragen und für 1 min mit maximaler Geschwindigkeit (13.000 rpm) zentrifugiert. Abschließend wurde die Säule verworfen und die ca. 12 µl eluierte RNA in RNase freiem Wasser bei -80°C eingefroren.

Je 1 µl wurden für die photometrische Messung sowie die Qualitätskontrolle mittels des Agilent „Lab-On-A-Chip“-Systems entnommen. Die verwendete Hardware war der „2100 Bioanalyzer“, die dazugehörige „Bio Sizing“ – Software Version 02.12 (beides Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland) wurde für die Auswertung verwendet.

Die Funktionsweise des „Lab-on-A-Chips“ beruht auf dem Prinzip der Elektrophorese, bei dem durch elektrokinetische und rein mechanische Kräfte die in einer speziellen Lösung aufbereiteten und gefärbten Gesamt-RNA-Moleküle durch Kapillaren über eine Gelmatrix innerhalb eines Chips geschleust werden, dort elektrophoretisch aufgetrennt und mittels eines RNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoffes detektiert und auch quantifiziert werden.

Die Größenauftrennung der RNA ermöglicht dann die Qualitätsbestimmung der Gesamt-RNA. Die Hauptbestandteile der Gesamt-RNA sind die ribosomalen RNAs (18S- und 28S-rRNA). Die anderen RNA-Spezies machen nur einen geringen Prozentsatz der Gesamt-RNA aus, die mRNA z. B. nur ca. 1% – 5%. Im Falle einer qualitativ hochwertigen Probe ist die zelluläre RNA nicht degradiert, verunreinigt (z.B. durch DNA), partiell abgebaut oder anderweitig geschädigt.

2.10 Genexpressionsanalysen mittels des Affymetrix „Human Genome Focus Array“ – eine kurze Übersicht über die Vorgehensweise

Der „Human Genome Focus Array“ ermöglicht die Analyse der Genexpression von ca. 8400 Genen, die alle in der „RefSeq“-Datenbank notiert sind. Die Stärke der Genexpression korreliert mit der Menge an mRNA – Transkripten der Gene innerhalb einer Zelle. Die mit einer lichtsensiblen Substanz überzogene Quarzoberfläche dieser so genannten "High

Density „Microarrays“ wird dazu mit 8.793 verschiedenen „Probe Sets“ mit insgesamt bis zu 500.000 verschiedenen Oligonukleotiden in einem speziellen photolithographischen Verfahren beschichtet. Jedes Gen wird in seiner Sequenz dabei durch mindestens 11 bis 20 verschiedene 25 Basen lange Oligonukleotidsequenzen („Perfect-Match“-Sonden) repräsentiert. Diese können vom 3'-Ende zum 5'-Ende über das komplette Gen verteilt sein, mit einem größeren Anteil an Sequenzen der 3'-nahen Genabschnitte. Zusätzlich gibt es zu jeder Sonde eine „Mismatch“-Sonde, um unspezifische Hybridisierungssignale zu erkennen. Dabei ist jeweils die 13. Base durch die komplementäre Base ersetzt.

Wird dieser Chip nun mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antisense-RNA-Molekülen inkubiert, kommt es an den einzelnen Oligonukleotidsequenzen der Probe Sets zur spezifischen Hybridisierung, wodurch es nach Abwaschen unspezifischer Bindungen an den jeweiligen Punkten auf dem Array zur Fluoreszenz kommt. Dieses Signal wird vom Gerät detektiert.

Aus den ermittelten Signalstärken aller verwendeten „Perfect“- und „Mismatch“-Sonden, die pro Gen ein „Probe Set“ bilden, berechnet die Affymetrix-Software einen Wert für die Expressionsstärke des Gens.

Da die Oligonukleotide auf dem „Affymetrix Array“ die gleiche 5'/3'-Orientierung wie die vorliegenden zellulären totalen RNA-Transkripte haben (Abb.3), muss der mRNA-Anteil der gesamtzellulären RNA in Antisense-RNA umgeschrieben werden, um eine Bindung komplementärer Stränge auf den „Arrays“ zu ermöglichen. Dies geschieht über eine reverse Transkription mithilfe eines spezifischen T7-Primers, der an den Poly-A-Schwanz der mRNA bindet und die Sequenz des T7-Promotors enthält. Der entstehende antisense-DNA-Strang wird in einer Zweitstrang-Synthese repliziert. Wird nun mit Hilfe der T7-Polymerase eine in vitro Transkription (IVT) gestartet, findet diese an dem Zweitstrang statt, so dass die resultierende RNA eine Antisense-RNA ist und somit mit den Oligonukleotiden auf den „Arrays“ hybridisieren kann. Gleichzeitig kommt es durch die IVT zur linearen Amplifikation

der mRNA, was notwendig ist, um eine RNA-Konzentration zu erreichen, die ein messbares Signal bei der Hybridisierung auf den „Oligoarrays“ erzeugt.

Unter Verwendung eines Fragmentierungspuffers wird eine Metall-Ionen induzierte Hydrolyse der cRNA erreicht, mit Fragmentgrößen von ca. 40-150 Nukleotiden, die eine bestmögliche, die gesamte Gensequenz abdeckende Hybridisierung der cRNA mit den Sonden auf dem Chip sicherstellen. Erst dann kann die Hybridisierung der RNA mit den Oligonukleotiden des „Microarrays“ durchgeführt werden.

Diese Vorgehensweise setzt voraus, dass strenge Qualitätsstandards in der Aufbereitung der RNA eingehalten werden. Zur Kontrolle der Qualität dient erneut der Bioanalyser. Qualitätskriterien der RNA sind für die Hybridisierung auf den Arrays die Länge der mRNA Moleküle und die Menge der prozessierten mRNA.

Die Länge erlaubt hierbei Aussagen bezüglich der Integrität der cRNA, d.h. ob es während der Amplifikation zur Degradation gekommen ist.

Wenn die Menge der eingesetzten mRNA nicht ausreicht, ist das Signal auf den Arrays zu schwach, um für eine Auswertung verwendet werden zu können.

Als Maß für die Effizienz der Transkription sowie der Amplifikation der Antisense cRNA aus der cDNA werden nach dem Scannen der Arrays die Signalintensitäten der einzelnen Zellen, oder „Probe Sets“, auf den Arrays, in denen die Housekeeping Gene wie GAPDH oder Actin liegen am 5'-Ende – also im Bereich der Primingstelle - mit den Signalintensitäten am 3'-Ende des Housekeeping Gens verglichen. Bei optimaler Qualität der RNA liegt die 5'/3'-Ratio bei 1. Laut der European Leukemia Network Guidelines werden heute allerdings sogar Werte bis 3 akzeptiert.

Angeichts geringer Ausgangsmengen von Gesamt-RNA stellte sich die Synthese der cRNA aufgrund der Qualitätskriterien als Herausforderung dar, weshalb im Folgenden unterschiedliche Techniken vorgestellt werden, die für die Optimierung der cRNA-Synthese etabliert und evaluiert wurden u.a. mit Technologien, die speziell auf geringe Mengen

Gesamt-RNA ausgerichtet waren. Hierfür lieferte die Firma Arcturus (Hess, Oldendorf, Deutschland) das „RiboAmp RNA Amplification Kit“, sowie das „RiboAmp OA RNA Amplification Kit“.

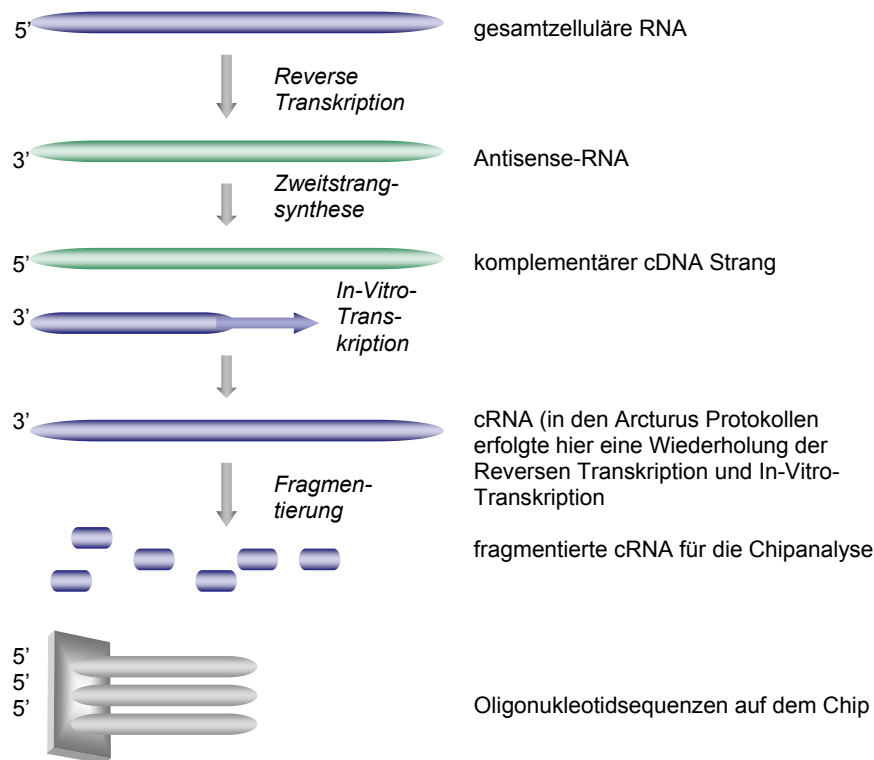


Abb.3: Prinzip der Antisense-RNA-Synthese ausgehend von gesamtzellulärer RNA

2.11 cRNA-Synthese: Reverse Transkription in cDNA, In-vitro-Transkription und Fragmentierung der cRNA mit dem „RiboAmp RNA Amplification Kit“ (Arcturus)

Laut Angaben des Herstellers bietet diese Technologie die Möglichkeit aus sehr geringen Mengen Gesamt-RNA, ausgehend von nur 10-30 ng, genügend cRNA zu amplifizieren, um diese für Genexpressionsanalysen mittels „Arrays“ zu verwenden.

Das Procedere, das hier wie vom Hersteller angegeben durchgeführt wurde, gliedert sich in die Synthese doppelsträngiger cDNA, gefolgt von einem Aufreinigungsschritt, um die Ausgangs-RNA zu beseitigen. Daran schließt sich eine IVT an, mit einem Aufreinigungsschritt zur Beseitigung der cDNA.

Daraufhin wird ein zweiter Durchlauf des Protokolls durchgeführt. Ausgehend von der cRNA erfolgt eine erneute cDNA-Synthese mit nochmaliger IVT. Die zweite IVT unterscheidet sich von der ersten dadurch, dass während der zweiten IVT RNA-Nukleotide des ENZO „BioArray High Yield Transcript Labeling Kits“ (T7) verwendet werden, die an zwei unterschiedliche Biotin-Moleküle gekoppelt sind, Biotin-CTP und Biotin-UTP. Die mit Biotin markierten RNA-Moleküle werden später bei der Hybridisierung an die DNA auf den „Arrays“ durch Streptavidin-gekoppelte Reportermoleküle detektiert. Sämtliche anderen Reagenzien und Puffer stammten jedoch aus dem oben genannten Kit der Firma Arcturus.

Reverse Transkription und Aufreinigung der cDNA

Die cDNA-Synthese wurde begonnen ausgehend von einem Startvolumen von 10 µl, in der die gesamtzelluläre RNA in RNase freiem Wasser vorlag. Wenn nicht gesondert erwähnt, wurde während des Pipettierens durchgehend auf Eis gearbeitet, die Enzyme wurden grundsätzlich auch während der Nutzung auf einem -20 °C kalten Kälteblock gehalten. Die verwendeten Primer waren Oligonukleotide mit einem Poly-T-Bereich, der selektiv an das Poly-A-Ende der mRNAs bindet, sowie einer „Sense-Sequenz“ des T7-Promotors, der für die spätere In-vitro-Transkription benötigt wird. Die genaue Zusammensetzung des Primers wird vom Hersteller nicht angegeben. Nach Hinzufügen von 1 µl Primer A aus dem o.g. Kit wurde 5 min bei 65 °C inkubiert. Während danach die Probe für mindestens 1 min auf Eis gekühlt wurde, wurden 7µl „First Strand Master Mix“ und 2 µl „First Strand Enzyme Mix“ gemischt und 9µl des Gemischs zu der Probe hinzugegeben. Es wurde 45 min bei 42 °C inkubiert und danach wieder für mindestens 1 min auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 2 µl „First Strand Nuclease Mix“ wurde 20 min bei 37 °C und 5 min bei 95 °C inkubiert und die Probe wurde auf Eis gekühlt. Damit war die Synthese der einsträngigen cDNA abgeschlossen und die Probe konnte optional über Nacht bei -20 °C gelagert werden.

Zu Beginn der Synthese des zweiten cDNA-Stranges wurde 1 µl des Primers B hinzugefügt und 2 min bei 95 °C inkubiert. In der Zeit, in der die Probe auf Eis gekühlt wurde, wurden 29 µl „Second Strand Master Mix“ und 1 µl „Second Strand Enzyme Mix“ gemischt und 30 µl

des Gemischs zu der Probe hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte für 5 min bei 25 °C, für 10 min bei 37 °C und für weitere 5 min bei 70 °C bevor die Probe wieder auf Eis gekühlt wurde. Damit war die cDNA – Synthese abgeschlossen und es erfolgte die Aufreinigung zur Beseitigung der RNA.

Eine mit einer Filter-Membran bestückte Aufreinigungssäule wurde hierfür zunächst fünf Minuten mit 250 µl „DNA Binding Buffer“ inkubiert und danach durch einminütige Zentrifugation mit 13.000 rpm in einer Mikrozentrifuge von überschüssigem Puffer befreit. 200 µl dieses Puffers wurden außerdem zu der cDNA-Probe hinzugefügt und das gesamte Gemisch wurde auf die Säule aufgetragen. Um die cDNA an die Membran zu binden, wurde mit 2000 rpm 2 min zentrifugiert und dann für 1 min mit 10.000 rpm, um die cDNA von übrigem Material zu trennen. Das Eluat wurde demnach verworfen. Zum Waschen der an die Membran gebundenen cDNA wurden nun 250 µl „DNA Wash Buffer“ auf die Säule aufgetragen und 2 min mit 13.000 rpm zentrifugiert. Dieses Mal wurden Eluat und Sammelröhrchen zusammen verworfen. Nachdem die Säule in ein neues Sammelgefäß gesetzt worden war, wurden 11 µl „DNA Elution Buffer“ hinzugegeben, für 1 min inkubiert, 1 min mit 2000 rpm und für die Elution schließlich noch 1 min mit 13.000 rpm zentrifugiert. Die Säule wurde entfernt und das Eluat mit der aufgereinigten cDNA wurde über Nacht bei -20 °C gelagert, bevor fortgefahren wurde.

In – Vitro – Transkription und Aufreinigung der cRNA

Für die In-Vitro-Transkription (IVT) wurden 8 µl IVT Puffer und 12 µl „IVT Master Mix“ mit 4 µl „IVT Enzyme Mix“ auf Raumtemperatur gemischt, 24 µl davon zur Probe gegeben und dann für 3 h bei 42°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Probe kurz auf 4 °C abgekühlt und mit 2 µl „DNase Mix“ versetzt, um restliche DNA zu verdauen. Nach 15 min Inkubation bei 37 °C wurde zügig die Aufreinigung der cRNA durchgeführt, um evtl. Degradation der RNA durch zu lange Standzeiten bei Raumtemperatur zu verhindern.

Hierfür wurde eine mit einem speziellen Filter ausgestattete Säule mit 250 µl „RNA Binding Buffer“ für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und danach 1 min mit 13000 rpm

zentrifugiert, um den überschüssigen Puffer zu entfernen. 200 µl des Puffers wurden zu der RNA-Probe gegeben und das Gemisch wurde auf die Säule pipettiert. Um die RNA an die Säule zu binden, wurde zunächst 2 min mit 2000 rpm und im Anschluss direkt 1 min mit 10.000 rpm zentrifugiert. Das Eluat mit evtl. Verunreinigungen und DNA Resten wurde verworfen. Es folgten zwei Waschschrte, bei denen jeweils 200 µl „RNA Wash Buffer“ auf die Säule pipettiert wurden und beim ersten Mal 1 min mit 10.000 rpm zentrifugiert wurde, das Eluat verworfen wurde und beim zweiten Mal 2 min mit 13.000 rpm zentrifugiert wurde, bis sämtliche Rückstände durchgeflossen waren und die Membran in der Säule trocken war. Das Eluat und das Sammelgefäß wurden verworfen und die Säule wurde in ein neues Eppendorf-Sammelgefäß eingesetzt und mit 12 µl „RNA Elution Buffer“ für 1 min inkubiert. Für die Elution wurde schließlich für eine weitere Minute mit 2000 rpm und dann für 1 min mit 13.000 rpm zentrifugiert. Die cRNA wurde damit von der Membran gelöst und die Säule konnte verworfen werden.

Amplifikation der cRNA durch erneute cDNA- und cRNA-Synthese

Für maximale Effizienz und Qualität wird von der Firma ein zweiter Durchlauf vorgeschlagen. Doch bevor die Entscheidung hierfür fallen konnte, wurden je 1 µl cRNA für die photometrische und die „Bioanalyzer“-Messung wie auf Seite 13 beschrieben entnommen. Somit konnten Qualität und Menge der cRNA überprüft werden, bevor der kostenaufwändige zweite Durchgang begonnen wurde. Bei zufriedenstellender Qualität der cRNA, ersichtlich anhand der Menge und der Molekülgrößen, wurde die zweite Amplifikationsrunde begonnen. Bei der zweiten Runde musste, da die vorliegende RNA ja nun nicht mehr mRNA war, die cDNA – Synthese mit 1 µl „Primer B“ aus dem Kit begonnen werden. Danach wurde die Probe 5 min bei 65°C inkubiert, zwei Minuten auf Eis gekühlt und mit 7 µl „First Strand Master Mix“ und 2µl „First Strand Enzyme Mix“ gemischt. Alles zusammen wurde 10 min bei 25°C und 45 min bei 37°C inkubiert und danach mind. 2 min auf Eis gekühlt. Zu Beginn der Synthese des zweiten cDNA – Strangs wurde nun 1µl „Primer A“ aus dem Kit hinzugefügt, 2 min bei 95 °C inkubiert, und im Anschluss wurde die Probe ca. 5 min auf Eis gekühlt. 29µl

„Second Strand Master Mix“ und 1 µl „Second Strand Enzyme Mix“ wurden hinzugegeben und gemischt und danach 15 min bei 37°C und 5 min bei 70°C inkubiert. Zum Schluss wurde wieder mind. 2 min auf Eis abgekühlt.

Die cDNA Aufreinigung erfolgte exakt wie im ersten Durchlauf, und die cDNA wurde über Nacht erneut bei -20°C gelagert.

Bei der darauffolgenden IVT wurden die Reagenzien des „BioArray High Yield Transcript Labeling Kit“ (T7) von ENZO benutzt, da die Firma Arcturus dieses Produkt für diese zweite IVT vorschlägt.

Hierfür werden der Reihe nach je 2 µl „HY Reaction Buffer“, „Biotin Labeled Ribonucleotides“, „DTT“, „RNase Inhibitor Mix“ und 1 µl T7 „RNA-Polymerase-Mix“ zu der aufgetauten cDNA hinzugegeben und für 5 h bei 37°C im Luftinkubator inkubiert. Alle 30-40 min wurde durch leichtes Schütteln der Mikrolitergefäße die Probe gemischt.

Die Aufreinigung der RNA erfolgte nahezu vollständig wie im ersten Durchlauf. Lediglich von dem „Binding Buffer RB“ wurden 200 statt 120 µl zur Probe pipettiert und am Ende wurde mit 30 µl Elutionspuffer eluiert statt mit 12 wie beim ersten Durchlauf.

Die RNA wurde bei -80°C gelagert und, nachdem das Ergebnis der „Bioanalyzer“-Messung bekannt war, fragmentiert, um die Probe dann mit dem Microarray zu hybridisieren.

2.12 cDNA- und cRNA –Synthese mittels des „RiboAmp Oligo Array (OA) RNA Amplification Kit“ von Arcturus

Da zur selben Zeit von der Firma Arcturus ein Kit speziell für geringste Mengen Gesamt-RNA entwickelt wurde, das „RiboAmp Oligo Array (OA) RNA Amplification Kit“, wurde dieses mit der technischen Unterstützung der Firma etabliert. Das Protokoll entspricht dem des „RiboAmp Kits“, mit dem Unterschied, dass von den Reagenzien die Hälfte eingesetzt wird. Alle anderen Schritte erfolgten genau wie oben beschrieben, die Reagenzien sind in beiden Kits identisch. Unterschiede, die jedoch seitens der Firma nicht bekannt gegeben werden, bestehen lediglich in der Zusammensetzung der Primer.

2.13 cDNA-Synthese und cRNA-Synthese nach dem Protokoll nach Angaben der Firma Affymetrix

Das von Affymetrix vorgeschlagene Procedere besteht aus der Verwendung des „Super Script Double Stranded cDNA Synthesis-Kits“ (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) für die cDNA Synthese, dem „BioArray High Yield RNA Transcript Labeling-Kit“ (T7), (ENZO, Farmingdale, NY, USA) und dem „GeneChipSample Cleanup Module“ (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) für die Aufreinigung der cRNA und cDNA sowie für die Fragmentierung.

Es ist laut Angaben des Herstellers erst für Ausgangsmengen gesamtzellulärer RNA von >2µg geeignet.

cDNA-Synthese und Aufreinigung

Auf Eis wurde hier zu max. 11 µl Gesamt-RNA 1 µl T7- Oligo dT-Primer hinzugegeben (Sequenz: 5'-GGC CAG TGA ATT GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG AGG CGG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT-3'; Metabion GmbH, Planegg-Martinsried, Deutschland).

Die Probe wurde im Anschluss mit diesem Primer 10 min bei 70 °C inkubiert. In dieser Zeit wurden auf Eis 4 µl „First Strand“ Puffer mit 2 µl Dithiothreitol (DTT) und 1 µl dNTP gemischt. Die RNA und das Gemisch wurden getrennt bei 42 °C im Luftinkubator für 2 min inkubiert und danach sofort zusammengefügt. 1 µl Reverse Transkriptase wurde hinzugegeben und das Gemisch bei 42 °C 1 Stunde inkubiert.

Auf Eis wurden für die Synthese des zweiten DNA-Strangs 91 µl DEPC-Wasser, 30 µl „Second Strand“ Puffer, 3 µl dNTP, 1 µl E.coli-DNA-Ligase, 4 µl E.coli-DNA-Polymerase, 1 µl „RNase H“ hinzugegeben und direkt nach dem Mischen 2 h bei 16 °C in der Zentrifuge bei einer dauernden Rotation von 2.000 Umdrehungen pro Minute inkubiert. Nach der Inkubation wurden 2 µl T4-DNA-Polymerase hineinpipettiert, um die Primersequenzen der cDNA zu synthetisieren, nachdem die Primer durch die „RNase H“ entfernt worden waren. Es wurde 5 min bei 16 °C in der Zentrifuge bei 2000 rpm inkubiert und die Reaktion wurde mit 10 µl NaEDTA auf Raumtemperatur gestoppt.

Die Aufreinigung erfolgte bei Raumtemperatur mit dem „GeneChip Sample Cleanup Module“ der Firma Affymetrix. Das Prinzip entspricht dem des Aufreinigungskits der Firma Arcturus. Zu Beginn wurden 600 µl „cDNA-Binding“ Puffer zur Probe gegeben und vorsichtig gemischt bzw. kurz auf dem Vortexmixer geschüttelt. Auf die Säule wurden max. 500 µl dieses Gemischs pipettiert und je 1 min mit 13.000 rpm zentrifugiert. Das Eluat wurde im Ganzen noch einmal auf die Säule aufgetragen und erneut mit 13.000 rpm zentrifugiert. Erst dann wurde das Eluat verworfen und 750 µl Waschpuffer für die eigentliche Aufreinigung auf die Säule aufgetragen. Nach einer einminütigen Zentrifugation mit 13.000 rpm und Verwerfen des Eluats wurde die Säule nochmals ohne Deckel zur Verdampfung des restlichen Ethanol mit 13.000 rpm für 5 min zentrifugiert und im Anschluss in ein neues mitgeliefertes „Eppendorf Tube“ eingesetzt. Die Elution erfolgte mit auf 50°C erwärmtem Elutionspuffer in zwei Schritten, einmal mit 14 µl, und im zweiten Schritt mit 11 µl, jedes Mal mit einer Inkubationszeit von einer Minute auf 50°C im Thermoblock gefolgt von einer einminütigen Zentrifugation mit 13.000 rpm.

In-Vitro-Transkription zu cRNA und Aufreinigung

Bei diesem Protokoll war ein zweiter Durchlauf generell nicht nötig, so dass bereits in diesem Durchlauf die IVT mit den Reagenzien des „BioArray HighYield Transcript Labeling Kit“ (T7) (ENZO) wie schon oben beschrieben, durchgeführt wurde. Nach der 5-stündigen Inkubation bei 37°C im Luftinkubator folgte ein weiterer Aufreinigungsschritt mit dem „GeneChip Sample Cleanup Module“ (Affymetrix). Zu der cRNA wurden dafür zunächst 80 µl RNase freies Wasser hinzugegeben, kurz mit dem Vortexmixer gemischt, 350 µl IVT cRNA Binding Puffer hinzugegeben, erneut kurz auf dem Vortexmixer gemischt und schließlich mit 250 µl 100%igem Ethanol gemischt und auf die Säule pipettiert. Nach 20 Sekunden Zentrifugation mit 13.000 rpm wurde das Eluat wieder eingefüllt und nochmals mit 13.000 rpm für 20 s zentrifugiert, ehe das Eluat verworfen wurde. Im Anschluss wurden 500 µl IVT cRNA Waschpuffer hinzugegeben und 1 min mit 13.000 rpm zentrifugiert, der Durchfluss wurde verworfen, und das Prozedere wurde mit der gleichen Menge an 80 %igem Ethanol

wiederholt. Am Ende wurde 5 min mit offenem Deckel mit 13.000 rpm zentrifugiert, um das restliche Ethanol verdampfen zu lassen, und die Säule wurde in ein neues mitgeliefertes Sammelgefäß gesetzt. Die Elution erfolgte in zwei Schritten mit auf 50°C erwärmtem RNase freiem Wasser, einmal mit 17 µl, dann mit 11 µl, beide Male in Verbindung mit einer einminütigen Inkubation auf dem Thermoblock bei 50 °C und einer einminütigen Zentrifugation mit 13.000 rpm.

Vor der Fragmentierung erfolgte die Messung mit dem Photometer und die Qualitätskontrolle wurde mit dem „Bioanalyzer“ durchgeführt.

Fragmentierung der cRNA für die Hybridisierung

Für den Fragmentierungsschritt wurden max. 24 µl cRNA mit 6 µl Fragmentierungspuffer der Firma Affymetrix (finale Konzentration: 40 mM Tris-Acetat, pH 8,1; 100 mM Kalium-Acetat; 30 mM Magnesium-Acetat aus dem „GeneChip Sample Cleanup Module“, Affymetrix) vermischt und 35 min bei 94°C im Thermoblock inkubiert. Da die RNA nach diesem Schritt sehr stabil ist, konnte sie nach erneuter Qualitätskontrolle im „Bioanalyzer“ auf Eis bis zur Hybridisierung gelagert werden.

2.14 Die „Microarray“-Analyse auf dem Human Genome Focus Array (Affymetrix)

Die eigentliche „Microarray“-Analyse umfasste die Arbeitsschritte der Hybridisierung der Proben mit den „Microarrays“, das Waschen, Färben und Scannen der „Arrays“, sowie die abschließende Auswertung der generierten Expressionsdaten. Die Hybridisierung und das Auslesen der Arrays erfolgten in der interdisziplinären „Affymetrix-Core-Lab-Facility“ der Medizinischen Fakultät am Institut für Onkologische Chemie der Universität Düsseldorf.

Diese Schritte erfolgten alle laut Protokoll des Herstellers Affymetrix.

Die Auswertung der Genexpressionsdaten erfolgte in Zusammenarbeit mit der Abteilung für Bioinformatik (iBioS) des deutschen Krebsforschungszentrums in Heidelberg.

2.15 Auswertung der Rohdaten aus den Messungen mit den Affymetrix Chips

Nach dem Scannen der Arrays wurden die Rohdaten gespeichert, die für die Auswertung wichtigste Datei ist hierbei die *.CEL-Datei. In dieser werden die von der Affymetrix Software „Microarray Suite“ (Version 5.0) umgewandelten Bilddaten, also die Signalintensitäten aller „Probe Sets“ und ihre Lokalisationen auf dem „Array“, gespeichert. Somit kann man auch umgekehrt aus dieser Datei wieder die Bilddaten ermitteln, wobei hier jede Oligonukleotidsequenz von nur einem Pixel repräsentiert wird. Für eine bessere Auflösung, die zur groben Kontrolle des Hybridisierungserfolges notwendig ist, wird daher die *.DAT-Datei verwendet. Die Rohwerte der Signalintensitäten ohne Bildinformationen sind in der *.CHP-Datei gespeichert.

Vorher berechnet die Affymetrix Software aus den Signalintensitäten aller Probe Sets auf Basis der „Perfect“ und „Mismatch“-Signale den Anteil der statistisch signifikanten Signale, d.h. die Software filtert bereits jene Signale heraus, die aus einer unspezifischen Bindung an die Nukleotide auf dem Array resultieren. Den Anteil dieser statistisch signifikanten Signale gibt die Software in Form der „Present Calls“ vs. „Absent Calls“ an. Die „Marginal Calls“ sind jene Signale, die die Software nicht sicher zuordnen kann.

Die *.DAT- und die so genannte *.RPT-Datei enthalten technische Informationen über die Messung, die Informationen über die Qualität des Hybridisierungsvorgangs liefern. Nach Kontrolle der RNA-Integrität über den bereits erwähnten 5'/3'-Quotienten der Gene GAPDH und Actin, muss die Qualität des Arrays und der Hybridisierung selbst überprüft werden. Ein wichtiges Maß für die Qualität der Hybridisierung ist die Angabe der „Present Calls“, sowie der „Background Noise“, ein Marker für die Störfluoreszenz durch Verunreinigungen des Arrays und Autofluoreszenz des Materials. Diese Störfluoreszenz sollte zwischen den Werten von 50 und 130 liegen. Die „Present Calls“ sind ein Marker für die Spezifität der Hybridisierung und werden vom Gerät selbst berechnet, sie sollten laut European Leukemia Network Guidelines bei mindestens 25% liegen.

Zur Kontrolle der Vergleichbarkeit der einzelnen Arrays untereinander dient der Scaling Factor. Er wird von den Geräten eingesetzt, um die mittlere Signalintensität jedes Arrays um den Faktor zu erhöhen oder zu verringern, der nötig ist, damit die Signalintensität der durchschnittlichen Signalintensität von Microarrays entspricht. D.h. ein Scaling Factor von 1,0 gibt an, dass die mittlere Signalintensität des Arrays der durchschnittlichen Signalintensität von Microarrays entspricht. Daher sollten die Scaling Faktoren der einzelnen Arrays sich auch nicht zu sehr voneinander unterscheiden, angegeben wird ein maximaler Unterschied um den Faktor 3.

Voraussetzung ist auch, dass die Referenz- oder „Housekeeping“-Gene überhaupt nachgewiesen wurden. Unter der Annahme, dass diese Gene in allen menschlichen Zellen exprimiert werden, dienen sie der internen Qualitätskontrolle der Hybridisierung. Zusätzlich kann mittels der Bilddatei der Chipoberfläche anhand spezifischer Indikatorsignale eine generelle Aussage über die Signalstärke und Verwendbarkeit der Daten gemacht werden, sowie über offensichtliche mechanische Störungen wie z.B. Kratzer auf der Chipoberfläche.

Die Auswertung der Chipdaten gliedert sich zunächst in vier wesentliche Schritte, die notwendig sind, um die Daten zum Vergleich untereinander verwenden zu können.

Diese Schritte beinhalten

- die Korrektur nichtbiologischer Störsignale **innerhalb** eines Chips
- die Normalisierung, die nichtbiologische Störfaktoren im Vergleich aller Chips **untereinander** eliminiert und
- das Errechnen einer mittleren Signalintensität aus den 11-20 Oligonukleotidsequenzen pro Gen.

Für die Qualitätskontrolle der Messungen, die Normalisierung und Datenanalyse wurde das affy-Paket der „R“-Software, die frei über das Internet verfügbar ist, verwendet (<http://www.bioconductor.org/>). Für die Normalisierung der Rohdaten wurde die VSN-Methode („Variance stabilization normalization“) verwendet. (117)

Anhand der Rohdaten aus der *.CEL-Datei wurden nach Abschluss der oben genannten Schritte zusätzlich noch 5'/3'-RNA-Degradationsplots für eine zusätzliche Qualitätsüberprüfung und Histogramme („Density Plots“) der „Perfect-Match“-Intensitäten vor und nach Normalisierung erstellt, um den Erfolg der von uns verwendeten Normalisierungsmethode zu überprüfen.

In einem Vergleich von je zwei „Arrays“ untereinander wurden die so genannten „MA-Plots“ (oder „MvA“ für „M versus A“ – Plots) in Form von Bland-Altman-Diagrammen erstellt. Hierbei wurden die Differenzen der Logarithmen der Signalintensitäten zweier Chips als Ausdruck der Variabilität der Daten (M) gegen den Mittelwert der Logarithmen der Signalintensitäten der beiden Chips als (A) aufgetragen.

Hierdurch konnten die Arrays auf die Qualität ihrer Signalstärken untersucht werden und es wurde die Reproduzierbarkeit der Daten kontrolliert. So konnten Unterschiede in der Signalintensität, die auf eine schlechte interne Qualität einzelner Chips zurückzuführen waren, von den Signalintensitätsunterschieden differenziert werden, die auf eine veränderte Genexpression rückschließen ließen.

Erst mit Abschluss dieser Schritte konnte die eigentliche Analyse der möglichen Genexpressionsunterschiede erfolgen. Die beim Vergleich der zwei Probengruppen differentiell exprimierten Gene wurden mittels des SAM („Significance-Analysis for Microarrays“)-Algorithmus v1.21 identifiziert (<http://www-stat.stanford.edu/tibs/SAM/>). (118) SAM implementiert verschiedene Permutationstests, in diesem Fall wurde ein ungepaarter Zweiklassen-Permutationstest angewandt, der eine t-Statistik verwendet, um signifikante Veränderungen der Genexpression zu identifizieren. SAM errechnet dabei für jedes Gen einen bestimmten Wert (Score, $d(i)$), der anzeigt, in welchem Maße die Genexpression dieses Gens relativ zur Standardabweichung verändert ist. Gene, die einen Wert zugeteilt bekommen, der höher liegt als ein bestimmter Schwellenwert (δ), werden potentiell als signifikant differentiell exprimiert angesehen. Mit diesen Genen führt SAM einen Permutationstest durch, der die Anzahl der Gene abschätzt, die per Zufall als differentiell

exprimiert identifiziert wurden. Diese Abschätzung wird ausgedrückt mittels der „False Discovery Rate“ (FDR). Die FDR ist definiert als die erwartete Höhe falsch positiver Ergebnisse, ausgedrückt über den Quotienten aus der Zahl an falsch-positiven Genen / Anzahl positiver i.e. signifikanter Gene. Sie gibt somit die Signifikanzschwelle für den Test an und reduziert die Wahrscheinlichkeit für den Fehler erster Art. Anders ausgedrückt, gibt die FDR an, wieviel Prozent der angegebenen differentiell exprimierten Gene zufällig ausgewählt wurden, jedoch ohne Angabe darüber zu machen, welche Gene zufällig ausgewählt wurden. Die niedrigste FDR, bei der ein Gen noch als signifikant differentiell exprimiert gilt, bezeichnet man hierbei als den q-Wert. Optimalerweise sollte die FDR somit gering gehalten werden.

Mittels der Software kann man zusätzlich bestimmte Rahmenparameter verändern, so wie z.B. den oben erwähnten Schwellenwert mit Hilfe des so genannten „delta-sliders“. Man kann auch nur die Gene auswählen, deren differenzielle Expression ein bestimmtes Ausmaß („fold-change“) hat und man kann die Anzahl der Permutationen in 100-er Schritten variieren. Der Vorteil dieser Flexibilität liegt darin, dass auf diese Weise aus einer unter Umständen extrem großen Anzahl statistisch ermittelter Genexpressionsunterschiede eine zusätzliche manuelle Selektion mit Hinblick auf die biologische Relevanz möglich ist, indem man z.B. nur Gene betrachtet, deren Genexpression mindestens um das Zweifache abweicht.

Mittels eines Streudiagramms („scatter plot“) kann man das Verhältnis des beobachteten relativen Unterschieds der Genexpression zum erwarteten relativen Unterschied visuell darstellen. Der erwartete relative Unterschied für ein Gen ergibt sich aus dem Mittelwert aller in jeder einzelnen Permutation ermittelten relativen Unterschiede für dieses Gen, bezogen auf die Standardabweichung. Im Normalfall sind beobachteter und erwarteter relativer Unterschied in etwa gleich, es ergibt sich eine Gerade auf diesem Diagramm. Differentiell exprimierte Gene fallen aus dieser Gerade heraus.

Unabhängig von dieser Methode wurde eine weitere Auswertung in Form der hierarchischen „Cluster“-Analyse durchgeführt. Hierbei wurde die Software des „Bioconductor“-Projektes

des Fred Hutchinson Cancer Research Centers, Seattle, WA. (www.bioconductor.org) verwendet.

Das Ziel dieses multivariaten Analyseverfahrens ist, festzustellen, ob es in der Gesamtpopulation aller untersuchten Proben Gruppen gibt, die sich ähneln und sich damit von anderen Elementen in der Gruppe unterscheiden. Somit wird dieses Verfahren durchgeführt, ohne dass bereits bestehendes Wissen über mögliche funktionelle Zusammenhänge von Genen die Analyse beeinflussen kann. Im Gegenteil werden sogar durch die ähnlichen Expressionsmuster unter Umständen neue funktionelle Gruppen von Genen identifiziert.

Für die Identifikation und nähere funktionelle Klassifikation solcher mittels des Clustering ermittelten Gengruppen wurde die "Pathways Tools Software" in Kombination mit "GeneMAPP" oder "Cytoscape" verwendet.

Durchgeführt wurde die „unsupervised“ hierarchische Cluster-Analyse mittels der „hclust“ – Funktion der statistischen Programmiersprache „R“, ebenfalls über „Bioconductor“.

Basierend auf statistischen Algorithmen, die die Ähnlichkeiten der Genexpression der miteinander verglichenen Gene berechnen, werden beim „Clustern“ die ermittelten Ähnlichkeitswerte auf einer Matrix in Form von Vektoren eingetragen. Der größte Vektor bezeichnet hierbei die größte Ähnlichkeit und geringste Distanz zwischen zwei Genen auf der Matrix. „Unsupervised“ bezeichnet in diesem Fall, dass es keine Referenzvektoren gibt, da es in der Biologie derzeit noch keine Normwerte für die Expressionsunterschiede oder – Ähnlichkeiten ganzer Gengruppen gibt.

Die beiden Gene mit der größten Distanz, also die mit der geringsten Ähnlichkeit in ihrer Expression, werden in der Matrix durch einen Link miteinander verknüpft und der Berechnungsvorgang wird erneut durchgeführt, bis alle Gene miteinander verlinkt wurden.

Für das Erstellen von Clustern wird somit ein mathematisches Maß für die Ähnlichkeit zweier Werte benötigt. Dies wird ermittelt über die Distanz zweier Werte zueinander, definiert in diesem Fall durch die Manhattan-Metrik oder die Manhattan-Distanzfunktion. Die eigentliche Clusterentstehung geschieht mithilfe der Verlinkungskriterien, dargestellt als die Funktionen

der Distanzen von jeweils untereinander verglichenen Datenpaaren, in diesem Fall „complete linkage“, bei der die jeweils maximale Distanz zweier Datensets verwendet wird.

Durch die Verlinkung der Gene aller Proben entstehen sogenannte Cluster, die wiederum mit anderen Clustern zusammengefasst werden, so dass sich in der visuellen Darstellung ein Dendrogramm ergibt. Je größer die Distanz innerhalb des Dendrogramms zwischen zwei Clustern ist, also je länger ein Arm des Dendrogramms, desto größer auch die funktionelle Distanz dieser Gengruppen zueinander. Dies ist z.B. vergleichbar mit den hierarchischen Stammbäumen in der Phylogenetik.

2.16 Quantitative Real-Time PCR (RT-qPCR) mit der „TaqMan“- Technologie

Die in den Microarray-Analysen identifizierte differenzielle Expression ausgewählter Gene, musste mittels der RT-qPCR bestätigt werden. Das hierfür eingesetzte „ABI PRISM 7900HT“ Sequenz-Detektionssystem ist ein „high-throughput“ „Real-Time“ PCR-System, mit welchem Nukleinsäuresequenzen während der exponentiellen Phase der Amplifikation detektiert und quantifiziert werden können.

Die RNA aus Ph-negativen und CD34-positiven Zellen von insgesamt 5 Personen ohne hämatologische Erkrankung und von 5 Patienten mit CML in molekularer Remission wurde hierfür zunächst in einer reversen Transkription in cDNA umgeschrieben. Unter den 5 Patienten mit CML befanden sich 3, deren RNA auch für die Microarray-Genexpressionsanalysen verwendet worden war.

Als Reaktionsgefäß wurde ein „MicroAmp Optical 96-well Reaction Plate“ (Applied Biosystems, Darmstadt) verwendet. Als Referenzgen wurde Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase (GAPDH) eingesetzt, und es wurde zusätzlich in jeden PCR- Lauf eine Negativkontrolle mit RNase freiem Wasser durchgeführt. Jede Probe wurde doppelt angesetzt.

Zunächst musste die mRNA über reverse Transkription in cDNA umgeschrieben werden, wofür die Produkte der Firma Invitrogen verwendet wurden, die im Folgenden näher

bezeichnet werden. Das Protokoll, dem hier gefolgt wurde, ist zuvor bereits von Cross et al beschrieben worden. (119)

Zu Beginn mischte man 52,78 µl Gibco M-MLV Puffer, 10,56 µl dNTPs, 5,56 µl N6 Primer, 2,64 µl Gibco DDT und 51,67 µl RNase freies Wasser und entnahm aus dieser Lösung 105,57 µl. Dazu fügte man 6,67 µl M-MLV Reverse Transkriptase und 3,33 µl RNasin. Parallel wurden 19 µl der RNA der zu transkribierenden Probe 5 min bei 65 °C im „Thermal Cycler“ erhitzt und danach 7 min auf Eis gekühlt. Von der vorbereiteten Lösung wurden nun 21 µl zu der RNA hinzugefügt und 2 Stunden bei 37 °C im „Thermal Cycler“ erhitzt, gefolgt von 10 min bei 65 °C. Im Anschluss verdünnte man die Proben mit RNase freiem Wasser auf eine definierte Konzentration, so dass man von ca. 20 ng cDNA pro Ansatz ausgehen konnte.

Für die PCR selbst wurden pro Reaktionsansatz 12,5 µl „TaqMan Universal PCR Master Mix“ mit „AmpErase UNG“, 1,25 µl des „Assay-on-demand Gene Expression Products“ (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) und 11,25 µl der cDNA in RNase freiem Wasser pipettiert, so dass sich ein Gesamtvolumen von 25 µl pro Ansatz ergab. Das „Assay-on-Demand Gene Expression Product“ enthielt den für das zu untersuchende Gen spezifischen Primer, die 6-FAM markierte „TaqMan MGB Probe“ für die Detektion der amplifizierten Sequenz sowie zwei weitere Moleküle, den „Non-fluorescent Quencher“ (NFQ) und den „minor-groove-binder“ (MGB). Die PCR erfolgte in dem o.g. „ABI PRISM 7900 HT Sequence Detector“ (Applied Biosystems) und beinhaltete drei Schritte: Beginnend mit der zweiminütigen „AmpErase UNG“-Aktivierung bei 50 °C, gefolgt von der zehnminütigen „AmpliTaq Gold“-Enzymaktivierung bei 95°C und der eigentlichen Polymerasekettenreaktion bestehend aus 40 Zyklen, die je 1 min und 15 Sekunden dauerten und sich in einen 15 sekündigen Denaturierungsschritt bei 95 °C und einen einminütigen Syntheseschritt bei 60°C aufteilte.

Entsprechend den zu untersuchenden Genen wurden folgende „Assay-on-Demand“ Produkte verwendet:

GAPDH (Hs99999905_m1), PCDH9 (Hs00276627_m1), TAP2 (Hs00241066_m1), TAP2B (Hs00251569_m1), KPNB2 (Hs00541858_m1), CXCL2 (Hs00601975_m1), C1QB (Hs00608019_m1), SCGF (Hs00161544_m1), NPL (Hs00229179_m1) und ID2 (Hs00747379_m1). Nähere Angaben zu diesen untersuchten Genen finden sich in Kapitel 3. Nach abgeschlossener Messung konnten die Daten mittels der „ABI PRISM Software SDS 2.01“ (Applied Biosystems) eingesehen und ausgewertet werden. Die SDS-Software ermittelt die Cycle Threshold (CT), die invers mit der Ausgangsmenge der Target-Sequenz korreliert und den PCR-Zyklus innerhalb eines Laufs angibt, in welchem die Fluoreszenz erstmals über einen vorgegebenen Grenzwert ansteigt, der oberhalb vom unspezifischen Hintergrundsignal liegt. Die Auswertung der relativen Genexpressionsstärken erfolgte über die Mittelwerte der CT-Werte der untersuchten Proben. Durch Subtraktion des CT-Wertes des Referenzgens GAPDH von den CT-Werten der Zielgene erhielt man die Δ CT-Werte. Je kleiner diese Werte, desto größer die relative Expression und umgekehrt. Anschließend berechneten wir zur Normalisierung der Daten die Differenz der Δ CT-Werte der Testgruppe, in unserem Fall die Patienten mit CML, und der Kontrollgruppe, die hämatologisch gesunden Personen. Setzte man unter der Annahme, dass die PCR-Effizienz 100% ist, diese Differenzen ($\Delta\Delta$ CT) in den Exponenten zur Basis 2, um den exponentiellen Verlauf der Amplifikation zu berücksichtigen, erhielt man das relative Expressionsverhältnis zwischen den beiden Gruppen. Die Signifikanz wurde daraufhin über den Mann-Whitney-U-Test für unverbundene Stichproben getestet.

Da es sich immer um doppelte Ansätze handelte, wurden jeweils die Mittelwerte der Differenzen verwendet.

2.17 Allgemein verwendete Software und statistische Analysen

Zu den für die Verarbeitung der Daten notwendigen Programme wurden neben den bereits erwähnten Programmen für die RNA-Analysen, die FISH, die Durchflusszytometrie und die Auswertung der PCR-Messungen die Software von Microsoft Office 2000 mit Microsoft Word 2000, Microsoft Excel 2000 und Microsoft Power Point 2000 verwendet unter den

Betriebssystemen Windows 98, 2000 und XP sowie Macintosh. Die Bildbearbeitung erfolgte über WinMDI (Howard Scripps Institute, LaJolla, CA) und Microsoft Paint. Der Mann-Whitney-U-Test wurde als statistisches Testverfahren für zweiseitige unverbundene Stichproben angewendet, hierfür wurde die Software SPSS (Version 13) von IBM verwendet. Ein p-Wert von $<0,05$ (Signifikanzniveau 95%) wurde als signifikant angesehen.

3. ERGEBNISSE

Der Versuchsaufbau für die Genexpressionsanalysen von CD34 positiven, Ph- negativen Zellen von Patienten während der Imatinibtherapie im Vergleich zu Kontrollen ist schematisch in Abb. 4 dargestellt. Zunächst wurden die CD34-positiven Zellen durch immunmagnetische Zellisolation aus Knochenmarkaspiraten gewonnen. Nach Isolation der gesamtzellulären RNA wurde eine cRNA-Synthese und –Markierung durchgeführt, die markierte cRNA mit den Microarrays hybridisiert und die Daten bioinformatisch ausgewertet. Parallel dazu erfolgten eine durchflusszytometrische Reinheitsbestimmung der CD34-positiven Zellen und eine FISH-Analyse zum Ausschluss von Ph-Chromosomen in der CD34-positiven Zellpräparation. Die Qualität der gesamtzellulären RNA sowie der cRNA wurde mittels Bioanalyzer kontrolliert. Im Anschluss an die Microarray-basierte Genexpressionsanalyse wurden für einzelne differenziell exprimierte Kandidatengene Bestätigungsexperimente mit quantitativer Real-Time PCR durchgeführt. Zusätzlich erfolgte die durchflusszytometrische Messung von c-KIT (CD 117) auf stichprobenartig ausgewählten Proben von Patienten und Gesunden.

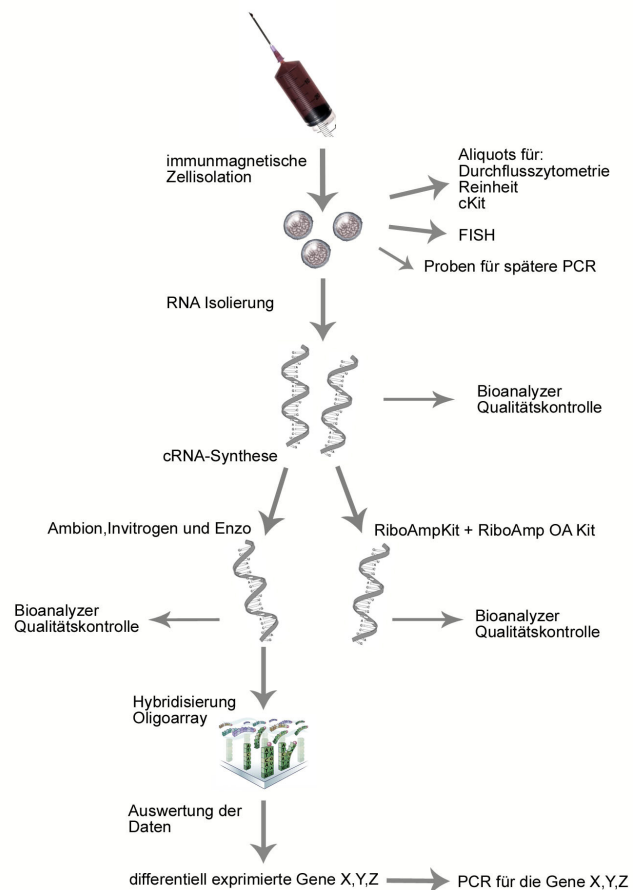


Abb.4: Schematischer Versuchsaufbau der Genexpressionsanalysen

Insgesamt wurden von 13 Patienten und 6 freiwilligen Gesundspendern, sowie 10 hämatologisch gesunden Herzinfarktpatienten im Mittel 1×10^6 CD-34-positive Zellen nach der immunmagnetischen Anreicherung aus dem Knochenmark gewonnen (Bereich: 1×10^5 – $4,5 \times 10^6$). Hiervon wurden je nach Zellausbeute Aliquots (max. 5×10^5 Zellen) für FACS-Messung, FISH-Analyse und PCR entnommen. Von den 13 Patientenproben kamen 8 für die Chipanalyse in Frage. Von diesen 8 wiederum konnten 3 für die anschließende PCR verwendet werden, so dass 2 der Proben, die für die PCR verwendet wurden, nicht auch mittels der Oligoarrays untersucht wurden. Zusätzlich wurde von den 8 Proben, die für die Chipanalyse eingesetzt wurden, 6 FISH –Analysen durchgeführt. Von den 6 Proben von Gesundspendern wurden 5 für die Chipanalysen verwendet, von den 10 Herzinfarktpatienten konnten 5 Proben für die PCR verwendet werden. Die Proben, die weder in der PCR noch in der Chipanalyse verwendet wurden, wurden ausschließlich für die durchflusszytometrische c-KIT-Analyse eingesetzt.

Eine Übersicht der eingesetzten Proben gibt Tabelle 4.

Tab.4					
Probe	Verwendung Chip	Verwendung PCR	Verwendung FACS c-KIT	Reinheitsmessung FACS	Verwendung FISH
Patienten N=13	8	5	11	13	6
Gesunde N=6	5	0	3	6	0
Herz N=10	0	5	9	10	0

3.1 Qualitätskontrolle der immunmagnetischen CD-34-Zellseparation mittels der Einfarben-Fluoreszenz-Durchflusszytometrie

Nach der immunmagnetischen Isolierung der CD34-positiven Zellen aus dem Knochenmark von Patienten und freiwilligen Gesundspendern wurde der Anteil von CD34-positiven an den Gesamtzellen als Maß für die Qualität der Isolierung durchflusszytometrisch bestimmt. Als

Voraussetzung für die weitere Verwendung galt eine Reinheit von mindestens 95%. Im Mittel lag die Reinheit bei 96,9% (Bereich: 91,4% - 99,7%). (s.Abb.5). Laut European Leukemia Network Guidelines reicht eine Reinheit von > 90% aus.

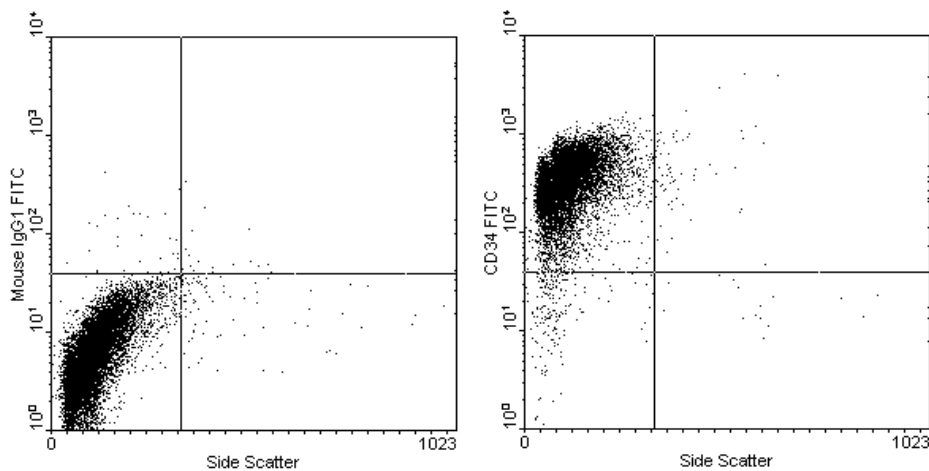


Abb. 5: Repräsentative graphische Darstellung der durchflusszytometrischen Messung zur Qualitätskontrolle der immunmagnetischen Anreicherung von CD34-positiven Zellen. Das Kreuz markiert die Positivitätsgrenzen, die auf der Grundlage der Isotypen-Kontrolle festgelegt wurden. Verwendet wurden ein FITC (CD34)- Antikörper und ein Isotypen-identischer IgG1-Mausantikörper.
Links: Isotypen – Kontrolle mit einem Anteil unspezifisch bindender Zellen von 0,4 %
Rechts: CD34-positive Zellen mit einem Anteil von 99,4 %

3.2 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung der CD34-positiven Zellen von Patienten unter Imatinib-Behandlung

Um zu gewährleisten, dass die Genexpressionsanalysen repräsentativ für die Ph-negative Zelle sind, wurden für das Projekt einerseits nur Patientenproben ausgewählt, die in der „Real-Time“- PCR einen Quotienten von GAPDH/BCR-ABL bis maximal 0,026% aufwiesen. Zusätzlich wurde in sechs der Patientenproben, die auch für die Genexpressionsanalysen verwendet wurden, mittels der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung das Vorliegen des Philadelphia-Chromosoms ausgeschlossen. Die PCR hatte in den CD34-positiven Zellen desselben Knochenmarkmaterials, das auch hier verwendet wurde, BCR-ABL-Werte von im Median 0,0048% (Bereich: negativ – 0,026 %) ermittelt. Von den sechs Proben konnten vier ausgewertet werden und unter den jeweils 100 beurteilten Zellen war bei einem „cut-off“ von 3 % in keiner der vier Proben ein Ph-Chromosom nachzuweisen (Abb. 6).

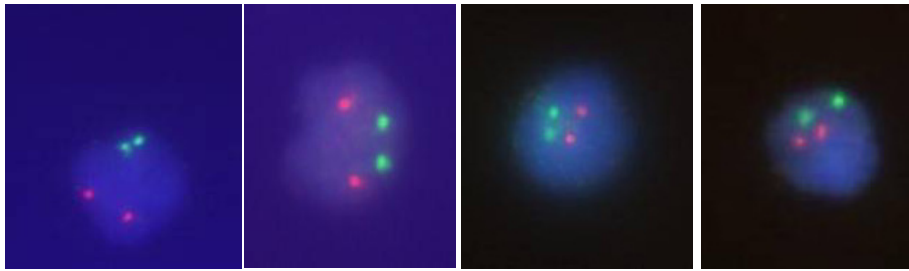


Abb.6: Repräsentative FISH-Bilder der CD34-positiven Zellen von 4 CML-Patienten unter Imatinib-Therapie ohne Hinweis auf das Vorliegen der Translokation t(9;22). Zu sehen sind je zwei einzelne BCR- (SpectrumGreen) und ABL- (SpectrumOrange) – Sondensignale

3.3 Die Expression von CD117 auf Ph-negativen-CD34-positiven Zellen von Patienten mit CML während Imatinib-Behandlung im Vergleich zu gesunden Spenderzellen

In der Literatur wurde eine Imatinib-vermittelte Hemmung von c-KIT-abhängigen Signaltransduktionswegen *in vitro* beobachtet, vor allem mit messbarer Aktivitätsminderung von Enzymen, die innerhalb der Signalkaskade der Tyrosinkinase c-KIT nachgeschaltet waren. (69,120) Um herauszufinden, ob sich eine direkte Veränderung der Expression von c-KIT *in vivo* beobachten lässt, wurde mittels der Zwei-Farben-Immunfluoreszenz die Koexpression von c-KIT (=CD117) auf den CD34-positiven Zellen von 16 Patienten mit CML in Remission unter Imatinib-Therapie gemessen, sowie im Vergleich dazu von 11 hämatologisch gesunden Patienten.

Durch die statistische Auswertung mit Hilfe des Mann-Whitney-Rangsummentests für zweiseitig unverbundene Stichproben bei nicht normalverteilten Werten ließ sich eine grenzwertig signifikante homogene 10%ige Verminderung der Expression von c-KIT auf CD34-positiven Zellen von Patienten unter Imatinib-Therapie nachweisen (p-Wert: 0,059). Einzelne Patienten wiesen eine stark herabgesetzte Expression von CD117 auf, bei der lediglich 50% aller CD34-positiven Zellen auch CD117-positiv waren, während dieser Anteil bei Gesunden in allen Fällen immer über 60% lag (Abb. 7A&B). Im Mittel zeigten die Kontrollproben in 81,1% eine c-KIT/CD34-Koexpression, die Proben der Patienten mit CML zeigten im Mittel in 72,9% eine Koexpression (Abb. 7C).

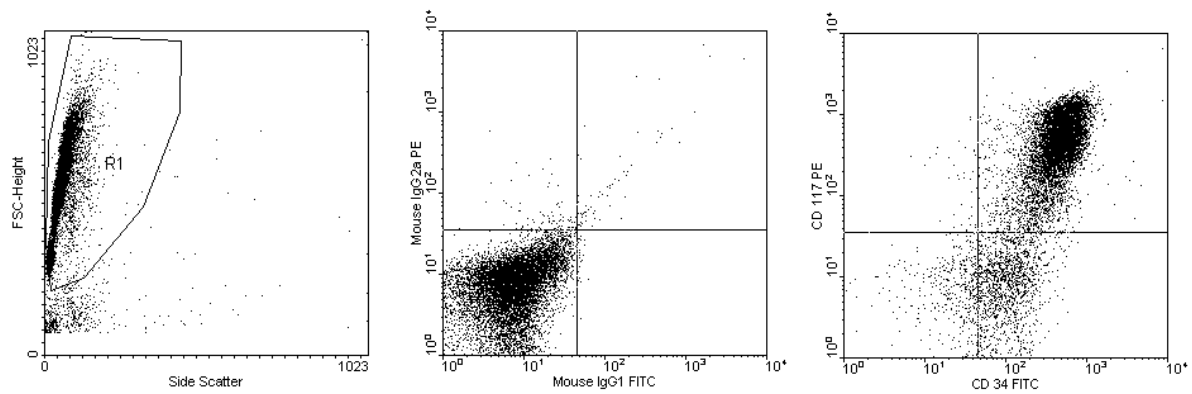


Abb.7 A: Hämatologisch gesunder Patient:

Links: Gate im FSC/SSC Plot - Mitte: Isotypen – Kontrolle mit dem IgG1/IgG2-Mausantikörper und einem Anteil unspezifisch bindender Zellen von 0,58% - Rechts: Messung der Expression von CD34 und CD117. Der Anteil CD34-positiver Zellen (Reinheit) beträgt 97,28%, Koexpression CD117/CD34: 84,89%

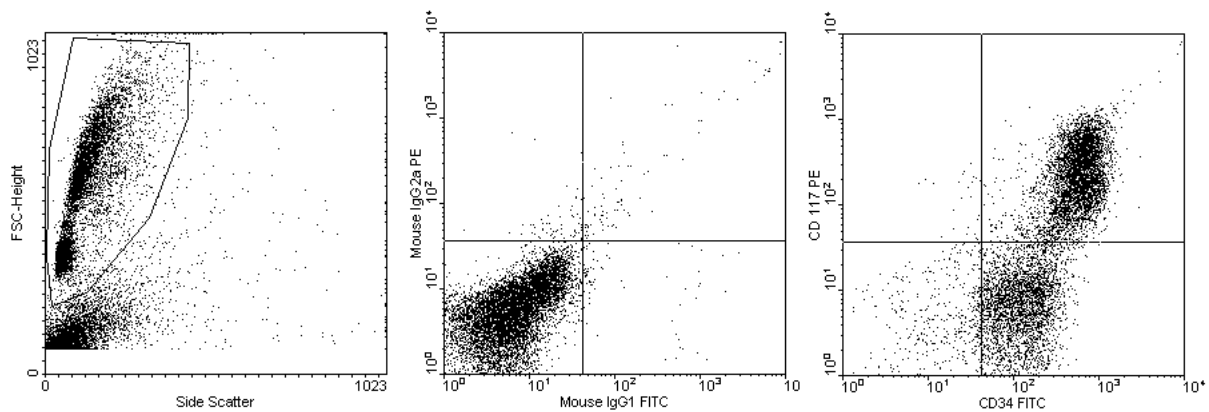


Abb.7 B: CML-Patient in Remission unter Imatinib-Therapie

Links: Gate im FSC/SSC Plot – Mitte: Isotypen – Kontrolle mit dem IgG1/IgG2-Mausantikörper mit einem Anteil unspezifisch bindender Zellen von 1,18 % - Rechts: Messung der Expression von CD34 und CD117. Der Anteil CD34-positiver Zellen (Reinheit) beträgt 97,99%, Koexpression CD117/CD34: 63,21%

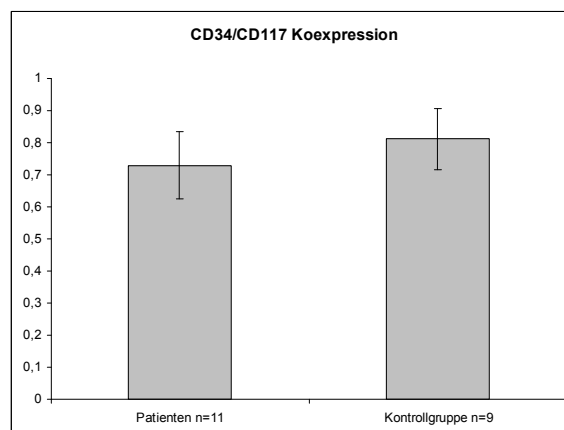


Abb. 7 C: Vergleich der CD117/CD34-Koexpression in den Zellen der Patienten (n=11) vs. der Kontrollgruppe (n=9). Mittlere Koexpression (Patientenkollektiv): 72,9% Mittlere Koexpression(Kontrollgruppe): 1,1% (p=0,059)

3.4 RNA-Isolierung mit dem „RNeasy Micro Kit“, Qiagen

Für die folgenden Genexpressionsanalysen und Methodenetablierungen wurden RNA-Isolationen mit dem RNeasy Micro Kit durchgeführt. Hierfür wurden sowohl CD34-positive Zellen des oben genannten Kollektivs verwendet, aber auch CD-34-negative Zellen dieses Kollektivs, die für die reine Methodenetablierung verwahrt worden waren und hier zum Einsatz kamen.

Durch das „RNeasy Micro Kit“, das auch bei weniger als 5×10^5 Zellen verwendbar ist, konnten bei insgesamt 38 Proben im Mittel 814 ng Gesamt-RNA (Bereich 55 ng – 6 µg) gewonnen werden. Die photometrische Messung ergab einen durchschnittlichen 260/280 Quotienten von 2,0 (Bereich: 1,67 – 2,24) für diese Proben. Die Guidelines der European Leukemia Networks sehen einen Quotienten von $>1,8$ als optimal an.

Ausschlaggebend für die Akzeptanz einer Probe war jedoch nicht der 260/280-Quotient, sondern das Ergebnis der Qualitätskontrolle des Agilent „Lab-on-a-Chip“-Systems durch den „Bioanalyzer 2100“. Die European Leukemia Network Guidelines empfehlen, sich vor allem an der Lage und Größe der 28S und 18S Peaks zu orientieren, sowie an Hinweisen für Degradation oder DNA-Verunreinigungen durch zusätzliche Peaks. Hiernach konnten 34 Proben für die cRNA-Synthese verwendet werden (Abb.8). Die übrigen 4 Proben wurden verworfen.

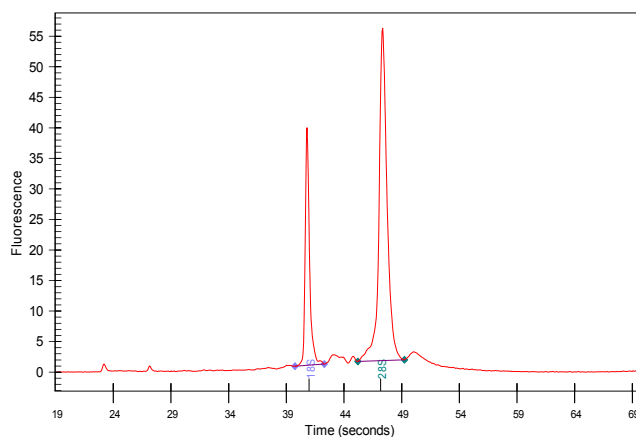


Abb.8: Repräsentatives Ergebnis der Qualitätskontrolle mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer. Es wurde die Gesamt-RNA aus CD34-positiven Zellen untersucht. Die 18S- und 28S-rRNA sind als diskrete Banden deutlich voneinander und dem Hintergrundsignal abgehoben und die 28S-rRNA liefert ein ca. doppelt so starkes Signal wie die 18S-rRNA. Die RNA ist intakt und nicht degradiert, Verunreinigungen durch DNA sind ebenfalls nicht sichtbar.

3.5 Evaluation und Vergleich verschiedener Methoden zur cRNA – Synthese für die Hybridisierung auf dem „Human Genome Focus Array“ von Affymetrix

Laut Angabe der Firma Affymetrix müssen für eine suffiziente Hybridisierung mind. 5 µg cRNA synthetisiert werden bei einer vorgeschlagenen Ausgangsmenge von nicht unter 3 µg totalzellulärer RNA. Mittlerweile sind auch Mengen von 1 µg einsetzbar.

Außerdem ist eine optimale Qualität der gesamtzellulären wie auch der cRNA notwendig, die vor der Hybridisierung auf den Arrays nur über die Größe der RNA-Moleküle im Bioanalyser überprüft werden kann. Durch die Messung mittels des "Lab-on-a-Chip-Systems" konnte gezeigt werden, dass bei optimaler Qualität der Ausgangs- RNA die cRNA nach der Amplifikation keine Spuren der Degradation aufwies. Die mittlere Moleküllänge der cRNA vor Fragmentierung liegt bei ca. 2 kb (Bereich: 100 Basen-4400

Aufgrund dieser strengen Qualitätskriterien und der hohen notwendigen Mengen an cRNA musste eine Methode gefunden werden, die aus den geringen Mengen gesamtzellulärer RNA, die im Mittel etwa 800 ng betragen, quantitativ und qualitativ ausreichende cRNA synthetisieren konnte. Im Folgenden werden die Ergebnisse mit drei unterschiedlichen Methoden vorgestellt. Für die Methodenetablierung wurde Material von 27 Patienten mit CML in Remission unter Imatinib sowie von 5 Gesunden verwendet. Von den 32 Proben wurden 8 Proben mit dem RiboAmp RNA Amplification Kit, 4 Proben mit dem RiboAmp OA RNA Amplification Kit und 20 Proben nach dem Protokoll von Ambion, Invitrogen und Enzo verarbeitet. Unter den 20 zuletzt genannten Proben befanden sich auch die für die spätere Genexpressionsanalyse eingesetzten.

3.5.1 cRNA – Synthese mit der Methode des „RiboAmp RNA Amplification Kit“, Arcturus

Die Ausgangsmenge an gesamtzellulärer RNA betrug im Mittel 394 ng (Bereich: 130 – 900 ng). Die im Mittel gewonnene Menge an cRNA aus 8 Proben mit diesem Kit lag bei 2,36 µg (Bereich: 165 ng – 5,4 µg) nach der ersten Runde. Mit 3 der 8 Proben konnte bei

zufriedenstellender Qualität der cRNA aus der ersten Runde eine zweite Runde durchgeführt werden. Die cRNA-Menge hiernach war im Mittel 19,53 µg (Bereich: 5-45,1 µg) (Tab. 5)

Die Qualitätskontrolle im Bioanalyzer zeigte, dass die Nukleotidlängen der cRNA – Moleküle bei den 3 weiterverwendeten Proben im Schnitt bei 589 Nukleotiden (Bereich: 500-750 nt) nach der 1. Runde lagen. Nach der 2. Runde betrug die mittlere Länge 623,67 Nukleotide (Bereich: 471-700 nt). Von der Firma Affymetrix wurden wie bereits erwähnt durchschnittlich 2000 Nukleotide Länge als die optimale Voraussetzung genannt (Abb.9).

Dieses Protokoll wurde aufgrund der ungenügenden Nukleotidlängen verworfen.

3.5.2 cRNA-Synthese mit der Methode des “RiboAmp Oligo Array RNA Amplification Kit”, Arcturus

Die Ausgangsmenge an gesamtzellulärer RNA betrug 808,75 ng (Bereich 440 ng – 1,4 µg). Bei diesem Kit lag die aus 4 Proben gewonnene cRNA – Menge nach der ersten Runde im Mittel bei 4,6 µg (Bereich: 385 ng – 16 µg). Es wurde lediglich die Probe mit 16 µg RNA weiterverwendet, da dieses Protokoll nach Vorliegen der Ergebnisse der Testhybridisierung verworfen wurde (s.u.). Nach der zweiten Runde lagen 132 µg vor (Tab. 5).

Die Länge der RNA-Moleküle lag nach einer Runde im Schnitt bei 826 Nukleotiden (Bereich: 685 – 955 nt). Die weiter verwendete Probe mit 16 µg zeigte nach der ersten Runde Moleküllängen von 800 nt und nach der zweiten Runde von 527 nt Nukleotiden. (Abb. 10). Da bis zu diesem Zeitpunkt noch keine Probe generiert werden konnte, in der die Moleküllänge den von Affymetrix angegebenen 2000 nt entsprachen, entschieden wir uns für einen Affymetrixchip-Testlauf mit dieser zuletzt verarbeiteten Probe, die zwar ausreichende Mengen an RNA enthielt, jedoch eine deutlich geringere Moleküllänge aufwies.

Die *.rpt-Datei einer Hybridisierung ist der Bericht über die Effizienz der Hybridisierung und die Signalstärke, sowie die RNA-Qualität. Der Report dieses Testlaufs zeigte, dass nur 14,7% der auf dem Chip befindlichen Gene oder Probe Sets ein verwertbares Signal aufwiesen.

In diesem Testlauf zeigte sich eine Degradation der RNA anhand des 3'/5'-Signalverhältnisses mit Werten von 2,22 für GAPDH, 39,41 für ISGF-3 und 87,72 für β -Actin. Dieses Protokoll wurde danach nicht weiter verwendet.

3.5.3 cRNA-Synthese nach dem von Affymetrix vorgeschlagenen Protokoll

Weder in unserem Institut noch in der mit uns zusammenarbeitenden „Affymetrix – Core – Lab – Facility“ des Instituts für Onkologische Chemie bestanden etablierte Protokolle für Einsatzmengen von weniger als – wie im Protokoll vorgeschlagen – 2 μ g Gesamt-RNA für die Verwendung dieser Reagenzien und Materialien.

Mit der im Folgenden beschriebenen Methode ließen sich jedoch auch bei einer Ausgangsmenge von weit unter 3 μ g (minimal 55 ng - maximal 990 ng) gesamtzellulärer RNA in nur einer Amplifikationsrunde durchschnittlich 13,45 μ g (Bereich: 3 – 55 μ g) amplifizieren (Tab. 5). Die RNA-Moleküle waren im Mittel 1546 Nukleotide lang (Bereich: 993-2000 nt) (Abb 11). Diese Moleküllängen entsprachen zwar ebenfalls nicht den von Affymetrix empfohlenen Voraussetzungen für die erfolgreiche Hybridisierung auf dem Chip. Da sich jedoch ein deutlicher Unterschied im Vergleich zu den anderen Protokollen abzeichnete, wurde nach erfolgreicher Fragmentierung (Abb.12) ein Probelauf mit einem Testchip durchgeführt. Dieser erzeugte mit 42% „Present Calls“, sowie einer 3'/5'-Ratio für GAPDH und Actin von 1,04 bzw. 1,19 ein auswertbares Ergebnis. Somit stellte sich diese Methode für die Amplifikation und Markierung der RNA aus CD34-positiven Zellen als zuverlässig und effektiv heraus. Daher wurden für die Hauptstudie die RNA-Proben von CD34-positiven Zellen mit diesem Protokoll für die Microarray-Hybridisierung vorbereitet.

Tabelle 5.:					
Methode	Menge Ausgangs-RNA	Länge 1.Runde (nt)	Menge 1.Runde	Länge 2.Runde (nt)	Menge 2.Runde
RiboAmp Kit					
Mittelwert	394 ng	589	2,36 μ g	624	19,53 μ g
Bereich	130-900 ng	500-750	165 ng - 5,4 μ g	471-700	5 μ g – 45,1 μ g

RiboAmpOA Kit					
Mittelwert	808,75 ng	826	4,6 µg	527	132µg
Bereich	440 ng-1,4 µg	685-955	385 ng – 16 µg	527	132 µg
Ambion Kit					
Mittelwert	428,2 ng	1546	13,45 µg	-	-
Bereich	55-990 ng	993-2000	3µg -55 µg	-	-

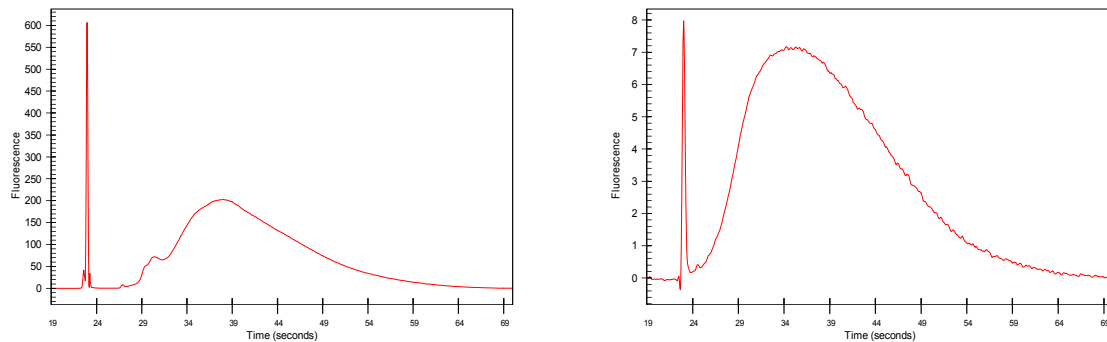


Abb 9: Ergebnisse der cRNA-Qualitätskontrolle mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer nach der ersten Amplifikationsrunde mit dem RiboAmp RNA Amplification Kit (links) und nach der zweiten Runde (rechts). Dargestellt ist die elektrophoretische Auftrennung der cRNA-Nukleotide nach Molekülgröße. Je kürzer das Molekül, desto schneller passiert es den Fluoreszenzdetektor des Agilent Chips. Mittlere Moleküllängen links 794, rechts 676 nt

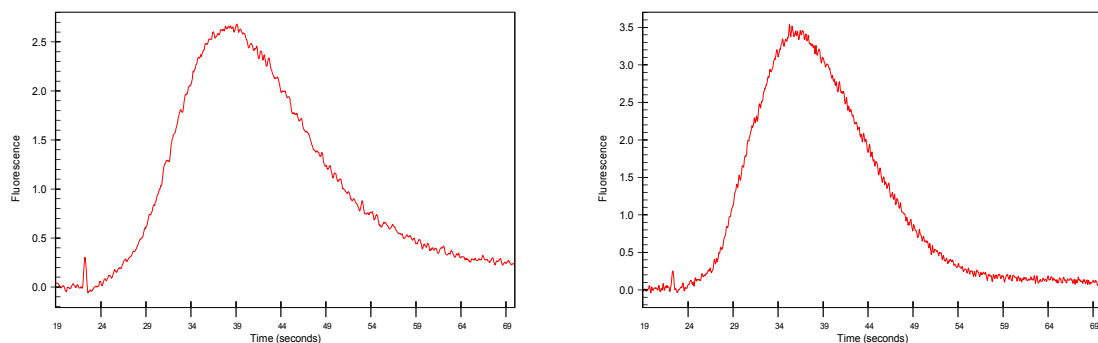


Abb. 10: cRNA-Qualitätskontrolle mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer nach der ersten Amplifikationsrunde (links) mit dem RiboAmp OA RNA Amplification Kit und nach der zweiten Runde (rechts) Mittlere Moleküllänge links: 798 nt, rechts: 493 nt

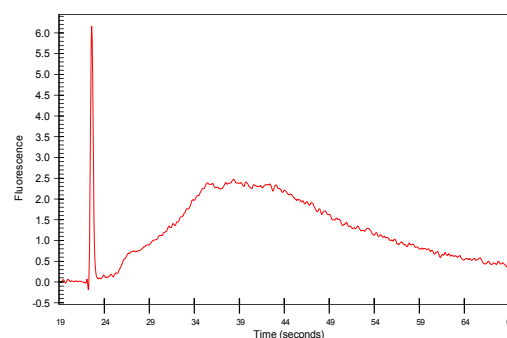


Abb.11: cRNA-Qualitätskontrolle mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer nach der cRNA-Synthese mittels des von Affymetrix vorgeschlagenen Verfahrens: Neben guten quantitativen Resultaten entsprechen die RNA-Moleküle nun den Hersteller-Empfehlungen für die Hybridisierung auf den Affymetrix-Chips. Mittlere Moleküllänge 1337 nt.

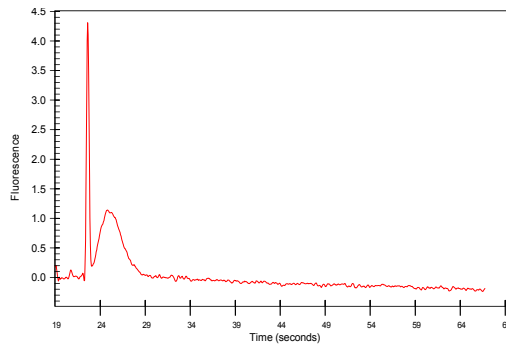


Abb.12 : cRNA-Qualitätskontrolle mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer fertiger für die Hybridisierung auf den Human Genome Focus Arrays fragmentierter cRNA (90 nt)

Die Moleküllängen wurden von der Software des Bioanalyzers ermittelt und angegeben.

3.6 Genexpressionsanalysen mit dem „Human Genome Focus Chip “ von Affymetrix

Es wurden 13 RNA-Proben von CD34-positiven Zellen mit dem oben beschriebenen Affymetrix-Protokoll amplifiziert, markiert und mit den Microarrays hybridisiert.

3.6.1 Qualitätskontrolle und Normalisierung

Alle Arrays zeigten auswertbare Signalintensitäten ohne Hinweise auf Kratzer oder Verunreinigungen. Die Charakteristika bezüglich der Qualitätssicherung der 13 Analysen finden sich in Tab.6.

Tab.6: Charakteristika der 13 Oligoarrayanalysen

	Background Noise	Present Calls in %	3'/5'-Ratio Actin	3'/5'-Ratio GAPDH
Sollwert		min 20%	1,1-1,2	0,8-1,2
Mittelwert	58,24	46,35	1,42	1,02
Bereich	43,4-88,6	41,4-51,1	0,99-2,52	0,84-1,21

Nach Abschluss der Messung der Hybridisierungssignale konnte mittels der *.rpt-Datei, die über die Affymetrix Microarray Suite 5.0 erstellt werden konnten, die Signalqualität überprüft werden. Hierfür ausreichend sind in der Regel die Kontrolle der

Hintergrundfluoreszenzwerte, sowie der Anteil der Present Calls, wie bereits in Kap. 2 beschreiben. In der Regel gibt es keine klar definierten Grenzwerte für die Qualitätskontrolle, da viele der Werte laborabhängig schwanken. Man orientiert sich für die Hintergrundfluoreszenz an Richtwerten von 50 bis maximal 130, sowie für die Present Calls an mindestens 25%. Ausschlaggebend für die Verwertung der Chips ist vor allem, dass die Signale in Form von Density Plots auswertbar sind. Somit sind in der Literatur auch Analysen beschrieben worden, bei denen mit 20% „Present Calls“ bereits valide Ergebnisse generiert werden konnten. (121) Es waren bei den 13 hier vorliegenden Proben im Mittel 45,4% „Present Calls“ zu messen (Bereich: 35,6-51,1) und die Hintergrundfluoreszenz lag durchschnittlich bei 63,18 (Bereich: 43,38-128,14). Der Scaling Factor lag im Mittel bei 2,1 (Bereich: 1,7-5,1). Der maximale Faktor zwischen zwei Arrays betrug hierbei exakt 3. Die bereits in Kap. 3.1 beschriebene 3'/5'-Ratio als Marker für die Qualität der eingesetzten RNA lag für GAPDH im Mittel bei 1,04 (Bereich: 0,84-1,49) und für β – Actin bei 1,42 (Bereich: 0,99-2,52). Idealerweise schlägt Affymetrix Werte von 0,8-1,2 für GAPDH und 1,1-1,2 für β -Actin vor. Dies in Verbindung mit den aus den Daten der *.CEL-Datei erstellten 5'/3'-Degradationsplots (Abb.13) wies auf eine

durchschnittlich gute Qualität der verwendeten cRNA hin, obwohl eine mindestens 50%ige Degradation der RNA in allen Fällen zu erkennen ist. Jedoch war die Hybridisierung in allen Fällen so weit erfolgt, dass über den Großteil der Gensequenzen ein auswertbares Signal nachzuweisen war. Dadurch, dass die Degradation der RNA in allen Fällen ungefähr in gleichem Maße vorlag, wirkte sich diese auch nicht auf die Vergleichbarkeit der Proben untereinander aus.

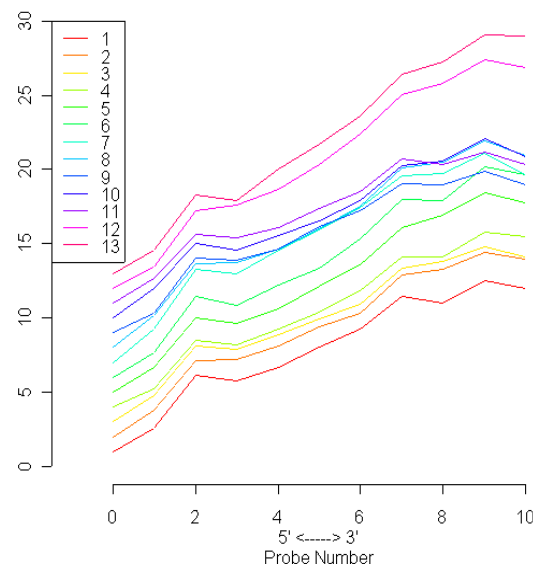


Abb.13: RNA-Degradationsplot : Dargestellt sind die Signalintensitäten der an die Housekeepinggene hybridisierenden cRNA der 13 untersuchten Proben im Verlauf vom 5' bis zum 3'-Ende

Nach der Qualitätsanalyse folgten die in Kap.3.1 beschriebenen vier Schritte, die der Analyse vorgeschaltet sind, um eine Datenverwertung möglich zu machen:

Die Hintergrundkorrektur, die Normalisierung nach der „VSN-Methode“, der Abgleich des „Perfect-Match-Mismatch“-Verhältnisses und die Berechnung einer mittleren Signalintensität für die 11-20 Oligonukleotidsequenzen für jedes einzelne Gen pro „Array“. Um den Erfolg der Normalisierung zu veranschaulichen, wurden

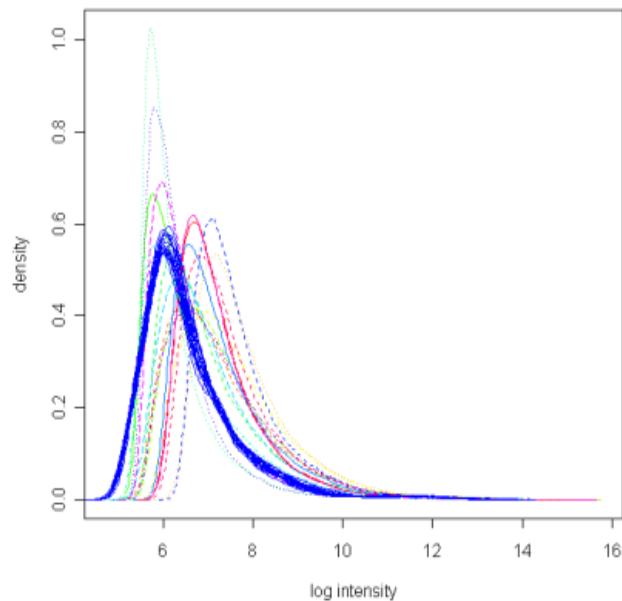


Abb.14: Density plots: Signalintensitäten der 13 Proben gegen die Häufigkeit, vor Normalisierung (farbige Kurven) und nach Normalisierung (blaue Kurven) mit der VSN-Methode

im Anschluss die so genannten „Density Plots“ (Abb.14) miteinander verglichen, die die Signaldichte der 13 Proben im Vergleich zueinander zeigten. Während vor der Normalisierung jede der 13 Proben eine eigene mittlere Signaldichte hatte, waren diese Durchschnittswerte nun für alle Proben auf gleichem Niveau. Nun konnte mit der eigentlichen Auswertung der Daten begonnen werden.

Es wurden die Signalintensitäten, d.h. die Genexpressionswerte der Proben der 5 Gesunden mit den Werten der Proben der 8 Patienten mit CML in Remission unter Imatinib verglichen. Um unter allen Expressionswerten jene herauszufiltern, welche sich signifikant in den beiden Gruppen voneinander unterschieden, verwendeten wir zwei verschiedene Methoden, die in Kapitel 2.15 bereits erläutert wurden. Zunächst wurde die Auswertung mit dem SAM-Algorithmus durchgeführt, unabhängig davon fand eine Analyse mithilfe eines multivariaten Testverfahrens (hierarchisches Clustering) statt.

3.7 Bioinformatische Auswertung der Daten

3.7.1 "Significance Analysis of Microarrays" (SAM)

Die Auswertung der Daten fand nach der Normalisierung mittels des SAM-Algorithmus statt. Die Daten unterliefen 1000 Permutationszyklen unter Verwendung des Zwei-Klassen-Modus für unverbundene Daten des Algorithmus. Die Input-Parameter für den Algorithmus sind in Tab. 7 aufgelistet.

Tab.7	
Input Parameter	
Data type	Two class unpaired
Δ	0.20391417
Arrays centered	FALSCH
Minimum fold change	0
Test statistic	Standard
Are data all log scale ?	WAHR
Number of Permutations	1000
Input percentile for exchangeability factor s_0	Automatic choice
Number of neighbors for KNN	10
Seed for Random number generator	1234567

Um ein Gen als differentiell exprimiert zu betrachten, setzten wir einen cut-off von 1,15. D.h. um als differentiell exprimiert gewertet zu werden, musste mindestens eine Über- oder Unterexpression um den Faktor 1,15 vorliegen. Des Weiteren wurde eine maximale False-Discovery-Rate von 50% akzeptiert.

Interessanterweise ermittelte SAM nur zwei (FDR 0%) bzw. drei (FDR 28.7%) differenziell exprimierte Gene in Ph-negativen CD34-positiven Vorläuferzellen unter Imatinibtherapie im Vergleich zu den CD34-positiven Stammzellen von Gesunden (Abb 15). Bei diesen Genen handelte es sich um: Protocadherin 9 (PCDH9), Chemokine CXC-Motif Ligand 2 oder auch Macrophage Inflammatory Protein 2 (CXCL2) und Inhibitor of DNA Binding 2 (ID2). Für ID2 lag ein q-Wert von 28,7% vor. Die differenzielle Expression bestand bei allen drei Genen in einer Überexpression um den Faktor 1,6 (Tab 8.) Unter Berücksichtigung von Genen mit deutlich höheren q-Werten wurden weitere 6 Gene als grenzwertig signifikant eingestuft, die jedoch hinsichtlich ihrer biologischen Funktionen interessant waren, so dass diese in die weitere Auswertung miteinbezogen wurden.

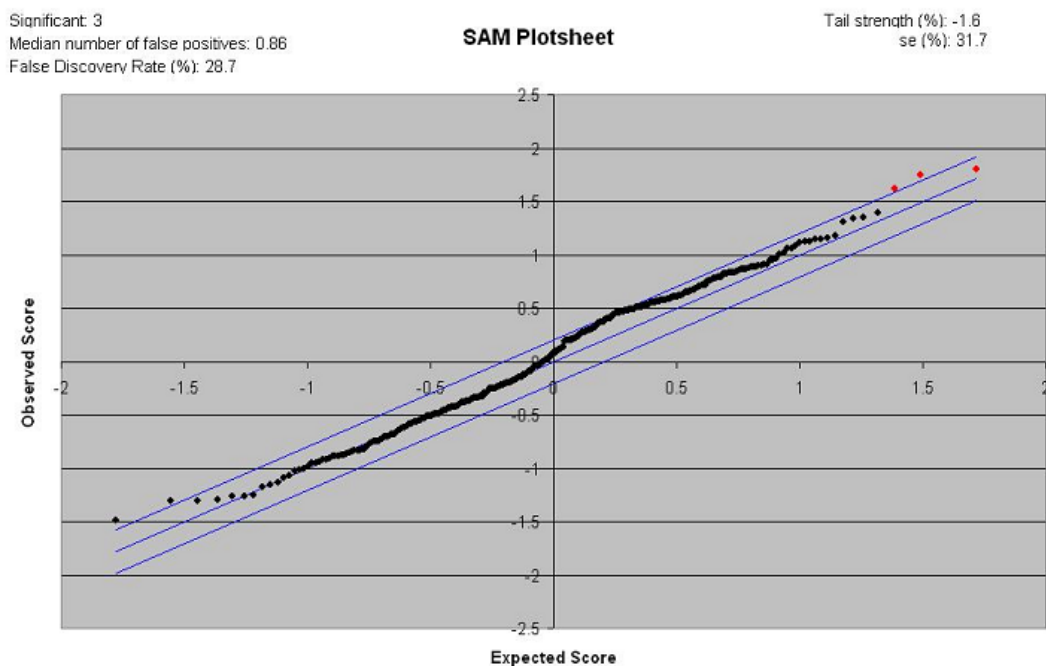


Abb.15: Scatter Plot: Darstellung der beobachteten Genexpressionsunterschiede aller Proben bezogen auf die erwarteten Expressionsunterschiede mittels SAM. In Rot finden sich die drei signifikant differenziell exprimierten Gene, die SAM identifiziert hat.

Eine Übersicht, über die ausgewählten Gene und ihre Parameter findet sich in Tab. 8. Die Rohdaten der ausgewählten Gene nach Normalisierung finden sich ebenfalls nachfolgend im Vergleich dargestellt. (Abb. 16) Die Daten der gesamten Genexpressionsanalyse sind in der

Gene Expression Omnibus Datenbank (www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/, Zugangsnummer: GSE1418) vollständig einsehbar.

Tab.8

Gensymbol und -Name	Array ID	Fold-Change	q-Wert	Funktion (wie in der OMIM-Datenbase beschrieben)
CXCL2 Chemokine CXC-Motif Ligand 2	209774_x_at	1,6	0	Chemokin, u.a. bei der Entwicklung von Sepsis beteiligt
PCDH9 Protocadherin 9	219737_s_at	1,6	0	Ca-abhängiges Membranprotein, Zelladhäsion
ID2 Inhibitor of DNA Binding 2	201565_s_at	1,6	28,7	bindet an Helix-loop-helix Transkriptionsfaktoren, fördert die Zellproliferation durch Hemmung der Wirkung der RB-Tumorsuppressorproteine, noch unklare Rolle bei der Differenzierung dendritischer Zellen und der Pathologie des Hodgkin Lymphoms
C1QB Complement component 1	202953_at	2,06	51,8	Unklare Rolle bei der Immunantwort
TAP2 TAP2B (2 Splicevarianten) Transporter ATP-Binding Cassette Major Histocompatibility Complex, 2	204769_s_at	0,83	84,2	Transportiert Peptide vom Zytosol zu MHC I Molekülen im ER
KPNB2 =TNPO1 Transportin 1	221829_s_at	0,86	84,2	Intrazelluläres Transportin, das mit den Nucleoporinen interagiert
SCGF Stem Cell Growth Factor	205131_x_at	0,72	80,2	Wachstumsfaktor der hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen
NPL N-Acetylneuraminate Pyruvate Lyase	221210_s_at	1,42	51,8	Kontrolliert die intrazelluläre Konzentration von Sialinsäure

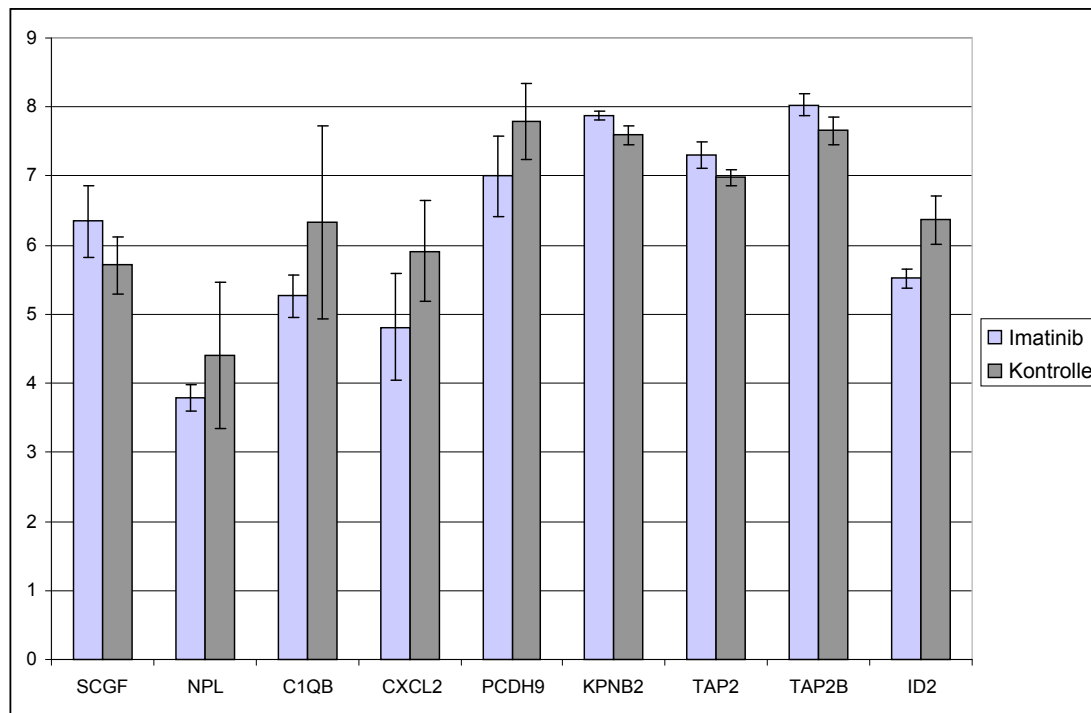


Abb. 16: Die Rohdaten der Genexpressionsanalysen nach Normalisierung. Die Werte entsprechen den Signalstärken auf dem Human Genome Focus Chip im Vergleich Gesund vs. CML Patienten unter Imatinib.

3.7.2 Hierarchisches Clustering

Da die Auswertung mittels SAM nur eine Möglichkeit ist, die Werte zu analysieren, hier aber vor allem die biologischen Aspekte unberücksichtigt bleiben, haben wir über die zusätzliche Auswertung der Daten mittels hierarchischer Clusteranalysen, einer Analyse des „unsupervised learning“, einen Vergleich der Genexpression der beiden Gruppen durchgeführt. Der Vorteil dieses Verfahrens ist, dass der Computer versucht, anhand der Expressionsdaten Muster zu erkennen. An der Länge der einzelnen Abzweigungen der Dendrogramme kann man direkt ablesen, ob und welche Gene in ihrem Expressionsmuster in einem Zusammenhang zu einander stehen und welche Proben dadurch zueinander und in Gruppen einzuordnen sind. Für die Entscheidung, ob die in den Dendrogrammen nah zueinander stehenden Gruppen in einen funktionellen Zusammenhang einzuordnen sind, haben wir uns der Datenbanken GeneMapp und Cytoscape bedient.

Die Kriterien für die Auswahl der Gene, die in die Clusteranalyse eingehen, sind im Folgenden aufgelistet. Es wurden dabei drei Analysen durchgeführt (Abb.17). Wie an den

Abbildungen zu erkennen ist, lassen sich hier zwar vor allem in Liste 1 Cluster ermitteln, die ähnliche Genexpressionen aufweisen, jedoch gibt es keine Hinweise darauf, dass sich biologisch plausible Ähnlichkeiten zeigen. D.h. es ist weder eine klare Trennung der Kontrollgruppe von der Patientengruppe zu erkennen, noch lassen sich die Gene, die ähnliche Expressionen zeigen, in funktionell zusammengehörende Gruppen einordnen. Auch bei anderen Distanzfunktionen oder Clusteralgorithmen ergab sich kein wesentlich anderes Bild.

Liste 1 (criterion 1, 4771 ProbeSets) bestand aus Genen, die in zwei oder mehr Experimenten einen Expressionswert höher als das 5%-Quantil in diesem Experiment zeigen (unterer Schwellwert) und in mindestens einem Experiment mindestens 1.96 Standardabweichungen (95%-Konfidenzintervall) vom Mittelwert abweichen.	Liste 2 (criterion 2, 271 ProbeSets) bestand aus Genen, die in zwei oder mehr Experimenten einen Expressionswert höher als das 5%-Quantil in diesem Experiment zeigen (unterer Schwellwert) in mindestens zwei Experimenten mindestens 1.96 Standardabweichungen (95%-Konfidenzintervall) vom Mittelwert abweichen.	Liste 3 (criterion 4, 527 ProbeSets) bestand aus Genen, die in zwei oder mehr Experimenten einen Expressionswert höher als das 5%-Quantil in diesem Experiment zeigen (unterer Schwellwert) in mindestens zwei Experimenten um einen Faktor von mindestens 1.5 vom Mittelwert abweichen.
--	--	---

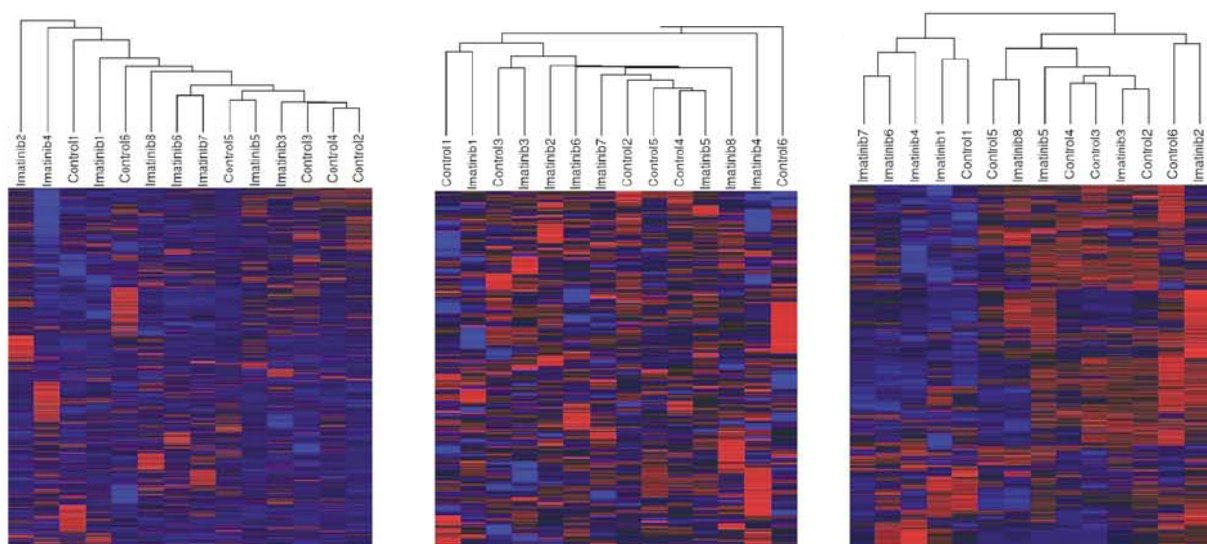


Abb.17: Unüberwachte hierarchische Clusteranalysen: Die Dendrogramme visualisieren die Ähnlichkeit der Expressionsmuster verschiedener Proben, je länger die Verzweigung, desto kleiner ist die Ähnlichkeit zwischen den Proben hierbei. Die darunter abgebildeten sog. „Heatmaps“ zeigen in Säulen die Gene, die biologisch funktionellen Gruppen zugeordnet werden können, die Reihen enthalten Gene, die in ihrer Expressionsstärke ähnlich sind. Die roten Felder repräsentieren Signalstärken oberhalb des Mittelwerts, die blauen Felder diejenigen unterhalb des Mittelwerts.

3.8 Evaluation der Ergebnisse mittels der quantitativen „Real-Time“ RT-PCR

Einige der Gene, die mittels SAM als möglicherweise differenziell exprimiert identifiziert wurden, waren aus funktionellen Gesichtspunkten besonders interessant. Diese Gene waren vor allem hinsichtlich einer möglichen Bedeutung für die unter Imatinib-Therapie beobachteten Nebenwirkungen relevant. So wäre eine Rolle von PCDH9, CXCL2 und C1QB bei der Entwicklung möglicher Störungen des Immunsystems, wie sie z.B. von Appel et al (130, 131, 133) beschrieben wurden, denkbar. Ebenso hätte die Hochregulation von ID2 einen Erklärungsansatz zum Pathomechanismus möglicher sekundärer maligner hämatopoetischen Erkrankungen, wie sie in der Literatur einzeln beschrieben wurden (115, 132), liefern können. Darüber hinaus hätte die Herunterregulation von SCGF pathophysiologisch zumindest mitursächlich für die in Einzelfällen auftretende Myelosuppression unter Imatinib (70, 133) sein können.

Da die Oligoarrayanalysen ein relativ wenig standardisiertes Verfahren sind, musste die möglicherweise differenzielle Expression dieser Gene entsprechend den Guidelines der European Leukemia Networks (116) mithilfe einer anderen etablierten Methode verifiziert und quantifiziert werden. Es wurden daher 8 der von uns ausgewählten Gene, sowie eine zusätzliche Splicevariante von TAP2 mit Hilfe der quantitativen „Real-Time“ RT-PCR untersucht, um die Ergebnisse hinsichtlich ihrer Signifikanz weiter evaluieren zu können. Diese Gene wurden aufgrund ihrer funktionellen Eigenschaften, ihrer Signifikanz laut SAM und den „fold-change“ Werten wie oben beschrieben ausgewählt.

Es wurde die RNA aus den CD34-positiven, Ph-negativen Stammzellen von 5 CML-Patienten in guter Remission nach Imatinib-Therapie verwendet und für die Kontrollgruppe die RNA der CD34-positiven Stammzellen von 5 hämatologisch gesunden Patienten. Die Auswertung erfolgte wie in Kap. 2.16 beschrieben. Mit der PCR-Analyse konnte für keines der 8 untersuchten Gene eine signifikante Veränderung der Expression zwischen den beiden Gruppen gezeigt werden ($p > 0,05$). Lediglich für das Gen ID2 bestand mit einem p-Wert von 0,056 eine grenzwertige Signifikanz. (Abb.18)

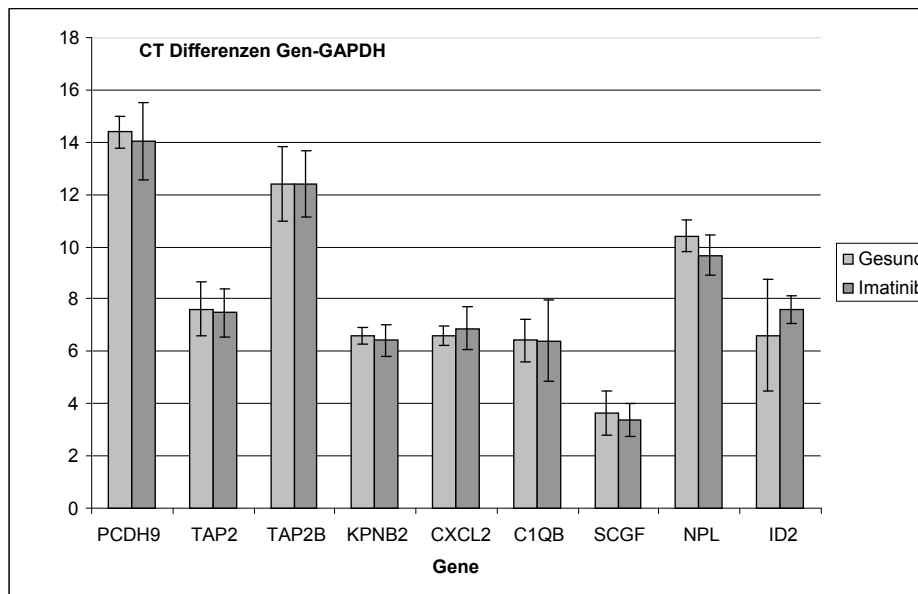


Abb.18: Ergebnisse der quantitativen realtime RT-PCR im Vergleich zu den Ergebnissen der Genexpressionsanalysen auf den „Oligoarrays“. Verglichen wurden einerseits die mittleren PCR-ermittelten Expressionswerte in log2-Skala ($2^{\Delta\Delta\text{CT}}$) und die mittlere Signalintensität auf dem „Oligoarray“ nach Normalisierung.

4. DISKUSSION

In dieser Arbeit haben wir das genomweite Genexpressionsprofil Philadelphia-Chromosom negativer CD34-positiver Zellen von 8 Patienten mit CML in Remission unter Imatinib mit dem Expressionsprofil CD34-positiver Zellen von 5 gesunden Probanden verglichen. Hierbei ließ sich kein signifikanter Unterschied in der Expression der ca. 8400 untersuchten Gene feststellen. Es lagen bis zu diesem Zeitpunkt noch keine Daten zu dieser Fragestellung weder *in vitro* noch *in vivo* vor, so dass diese Arbeit einen wichtigen Beitrag zu der Frage nach den Wirkmechanismen und Sicherheit der Tyrosinkinaseinhibitoren liefern kann.

4. 1 Methodische Aspekte

Gewinnung und Qualität des Ausgangszellmaterials

Zur Sicherstellung, dass die Daten der Genexpression repräsentativ waren für die CD34- positive Zellfraktion, wurden nur Proben mit einer durchflusszytometrisch bestimmten Reinheit von mindestens 95% verwendet.

Des Weiteren musste sichergestellt sein, dass in den verwendeten Zellen von Patienten mit CML kein Philadelphia-Chromosom mehr nachweisbar ist, da wir den Einfluss von Imatinib auf die gesunde hämatopoetische Stamm- und Progenitorzelle untersuchen wollten. Dies wurde durch die initiale Patientenauswahl gewährleistet. Es wurden nur Imatinib-behandelte Patienten in die Studie eingeschlossen, die zum Entnahmezeitpunkt der Zellen ein BCR-ABL-Transkriptlevel in der quantitativen „Real-Time“-PCR von unter 0,026% hatten. Dies entspricht einer Reduktion des initialen Transkriptlevels um mindestens 3-log Stufen im Vergleich zum Wert bei Erstdiagnose im Sinne einer molekularen Remission. Es ist dennoch auch ein Hinweis dafür, dass residuale Leukämiezellen vorhanden sein können. Deshalb musste mit einem zweiten Verfahren bestätigt werden, dass in der isolierten CD34-positiven Zellprobe kein wesentlicher Anteil an Ph-Chromosom positiven Zellen vorhanden war. Daher wurden stichprobenartig einige der Patientenproben ausgewählt und mittels FISH auf das Vorliegen eines Ph-Chromosoms untersucht. Auch hierbei waren bei guter Zelldichte und ausreichender Signalintensität keine Zellen mit dem für die Philadelphia-Translokation typischen Signal zu sehen.

Ausgangs-RNA-Menge und lineare Amplifikationstechniken

Ein limitierender Faktor für die Anwendbarkeit der Genexpressionsanalysen mit den Affymetrixchips war die Mindestmenge von mindestens 3 µg cRNA. Ein zweiter limitierender Faktor war die Qualität der eingesetzten RNA. Dadurch, dass es sich um Proben handelte, die von Patienten und Gesundspendern entnommen worden waren, lagen in der Regel nicht mehr als maximal 60 ml Knochenmarkaspirat vor, bei einem Anteil von CD34-positiven Zellen im Knochenmark von durchschnittlich 1,5% (122).

Die immunmagnetische Anreicherung stellt neben dem durchflusszytometrischen „Cell Sorting“ eine der häufig angewandten Methoden für die Selektion geringer Zellmengen dar. Die immunmagnetische Anreicherung wird jedoch in der Literatur als die zuverlässigere Methode mit einer größeren Reinheit beschrieben (116). Ein zu berücksichtigender Aspekt ist allerdings, dass bei der Anreicherung mithilfe von CD34-Antikörpern eine Hochregulation

der Oberflächenantigene auftreten kann, so dass davon auszugehen ist, dass auch die Genexpression in diesen Zellen durch die Anreicherungs-methode beeinflusst werden kann. In unserer Studie, in der relative Unterschiede zwischen zwei Populationen, die mit denselben Methoden aufbereitet wurden, untersucht wurden, ist dieser mögliche Störfaktor allerdings nur von untergeordneter Bedeutung, was auch andere Studien zeigten. (116). Ein Nachteil der immunmagnetischen Anreicherung ist jedoch, dass z.B. ein geringer Anteil von CD34-positiven Zellen aus rein mechanischen Gründen in den Selektionssäulen verbleibt bzw. es bei ineffizienter Antikörperbindung auch zum Verlust von Zellen kommt, die durch den Selektionsprozess zusammen mit den CD34-negativen Zellen verworfen werden.

Somit standen für die Qualitätskontrolle im Mittel nicht mehr als 5×10^5 Zellen zur Verfügung. Nach der Isolierung der RNA aus diesen Zellen, bei der es durch Degradation, mechanische Irritation durch das Filtern der Aufreinigungssäulen und das Mischen mit der Pipette, zu einem weiteren Materialverlust kam, lagen schließlich bis zu minimal 55 ng und maximal 990 ng gesamtzellulärer RNA vor.

Für die Verwendung auf den Affymetrix Arrays war es nötig, diese gesamtzelluläre RNA in cRNA umzuschreiben, damit diese mit den Oligonukleotidsequenzen hybridisieren können. Außerdem gewährleistet die cRNA-Synthese eine Maximierung des mRNA – Anteils in der Probe und ermöglicht eine Detektion sogar geringer Expressionsunterschiede. Zu dem damaligen Zeitpunkt lag für die cRNA-Synthese solch geringer Mengen gesamtzellulärer RNA noch keine standardisierte Methodik vor, so dass ein Amplifikationsverfahren speziell für geringe Ausgangsmengen an gesamtzellulärer RNA entwickelt werden musste.

Wichtig ist hierbei, dass man dasselbe Protokoll der RNA-Isolierung und cRNA-Synthese auf alle Proben anwendet, da unterschiedliche Protokolle zu unterschiedlichen Genexpressionsprofilen auf den Oligoarrays führen können (116). Daher musste also das Protokoll nicht nur für geringe Mengen an gesamtzellulärer RNA geeignet sein, sondern auch für die Proben, aus denen sich größere Mengen RNA isolieren ließen.

Die drei von uns verwendeten Methoden wurden hinsichtlich Effizienz und Qualität der Amplifikation, Hybridisierungsqualität auf den Arrays und praktische Anwendbarkeit miteinander verglichen.

Sowohl was die Amplifikationsrate, als auch die Qualität der cRNA anging, lieferte das von Affymetrix vorgeschlagene Protokoll reproduzierbare und vergleichsweise homogene Ergebnisse. Darüber hinaus stellte sich dieses Protokoll als das zügigste und einfachste Protokoll heraus, das zudem nur eine Amplifikationsrunde erforderte.

Für die Probleme mit den Kits und Protokollen von Arcturus gibt es unterschiedliche mögliche Gründe, die die Komplexität der cRNA-Synthese exemplarisch verdeutlichen.

Da die Ausgangs-RNA in allen Fällen qualitativ gleichwertig war und auch ein Versuch mit einer von Arcturus mitgelieferten Test-RNA durchgeführt wurde, der zwar ausreichende Mengen, jedoch ungenügende cRNA-Längen lieferte, muss die Kompromittierung der cRNA-Qualität im Rahmen der Protokolle der Arcturus-Produkte aufgetreten sein. Dies kann einerseits an einer mechanischen Irritation liegen, die in der Tatsache begründet wäre, dass das Protokoll von Arcturus komplexer und aufwändiger ist und mehr Reagenzien beinhaltet. Andererseits kann die Qualitätseinbuße auch durch logistische Ursachen bedingt sein, die durch die häufige Bewegung der Proben durch den unreinen Raum mit sich bringt. Andererseits ist ein Grund auch das Design des Kits selbst.

Laut der Firma Arcturus waren die Protokolle und Reagenzien speziell so generiert worden, dass die durchschnittliche Länge der synthetisierten cRNA bis maximal 1 kb betrug, was für die Hybridisierung mit den Microarrays von Affymetrix jedoch nicht optimal ist. (134) Zum Zeitpunkt unserer Methodenetablierung hatte die Firma noch keine ausreichende Erfahrung mit der Arbeit mit Affymetrixchips. Mittlerweile hat die Firma Arcturus jedoch ein Kit herausgebracht, welches cRNA synthetisiert, die bis 4 kb lang ist. (123).

Des Weiteren ist bereits mehrfach beschrieben worden, dass eine zweite Amplifikationsrunde aufgrund des zusätzlichen mechanischen Stresses generell zwar größere Mengen an cRNA generiert, aber dies grundsätzlich zu Lasten der Moleküllänge

geht. (123) Die Effizienz des Arcturus-Kits reichte jedoch nicht aus, um sich auf eine Runde zu beschränken. Ein Grund mag darin liegen, dass für die RNA – Isolierung vor der Weiterverarbeitung mit dem Arcturus-Kit ein Produkt einer anderen Firma verwendet wurde. Arcturus selbst schlägt vor, bei Mengen unter 100 ng gesamtzellulärer RNA, die mit einem anderen Kit als dem von Arcturus produzierten Isolationskit gewonnen wurde, eine Nukleinsäureträgersubstanz zum Ansatz zu geben. Dies wurde aber nicht versucht, da unsere RNA-Mengen in allen Fällen bis auf einen über 100 ng lagen.

Aber es gibt noch eine Reihe weiterer Störfaktoren, die die Qualität der cRNA mindern können.

In der Literatur finden sich einige Publikationen von Arbeitsgruppen, die mit ebenso geringen Mengen Ausgangs-RNA gearbeitet haben wie wir. Ein Großteil der Arbeitsgruppen arbeitete mit dem von uns verwendeten Protokoll, das in seiner ursprünglichen Form von der Arbeitsgruppe um Eberwine entwickelt wurde (124). Es handelt sich hierbei um eine lineare Amplifikation im Gegensatz zu der logarithmischen Amplifikation wie z.B. mit Hilfe der PCR. Letztere ist zwar effizient was die Menge der RNA angeht, hat sich aber als weniger zuverlässig erwiesen, was die Qualität der RNA betrifft. (123).

Die Arbeitsgruppe von Nygaard et al (134) hat sich mit verschiedenen Ergebnissen und Methoden der RNA-Amplifikation für die Genexpressionsanalysen mit Microarrays beschäftigt. Sie geben einen Amplifikationsfaktor von 1.000 bis 10.000 nach zwei Runden Amplifikation an, somit ist unser Amplifikationsfaktor von 600 – 3.700 nach einer Runde vergleichbar. Des Weiteren beschrieben Nygaard et al auch durchschnittliche cRNA-Moleküllängen von 200 – 1.000 bp nach zwei Amplifikationsrunden mit diversen kommerziellen Kits und bestätigten, dass diese Moleküllängen je nach Array unter Umständen nicht ausreichend sein können. Seshi et al (135) haben jedoch mit amplifizierter RNA aus einzelnen Knochenmarksstromazellen unter Verwendung des Arcturus RiboAmp Kits erfolgreich Hybridisierungen mit Microarrays von Affymetrix durchgeführt. Leider liegen in dieser Publikation keine spezifischen Angaben zu den eingesetzten Mengen RNA vor. Die

5'/3' – Ratio für GAPDH war in den Genexpressionsanalysen dieser Proben im Mittel 6,76 und für Actin 57,92 bei durchschnittlich 33,93% Present Calls. Im Vergleich dazu lagen in unseren Experimenten die 5'/3'-Ratios für RNA, die ohne Amplifikation auf den Arrays hybridisiert wurde, bei 0,89 und 1,23 für GAPDH und bei 1,44 und 2,29 für Actin, mit durchschnittlich 46% Present Calls. Ohne nähere Kenntnis der Daten weist dies zumindest darauf hin, dass Seshi et al mit dem Arcturus Kit cRNA synthetisiert haben, die nach den heute vorliegenden Richtlinien zur Qualitätssicherung von Genexpressionsanalysen ebenfalls nicht alle Standards erfüllten.

Eine der ersten Arbeitsgruppen, die zu diesem Thema publiziert haben, ist die von Baugh et al (136), die mit einer Menge gesamtzellulärer RNA von 2 bis 500 ng gearbeitet hat. Sie haben die Methode von Eberwine et al verwendet. Während Eberwine et al mit 10µg Gesamt-RNA gearbeitet haben und eine hohe Effizienz und Qualität der Amplifikation erzielen konnten, hatten Baugh et al bei den geringeren Mengen von Ausgangs-RNA, ähnlich wie wir, vor allem mit der Qualität der generierten cRNA Schwierigkeiten. Es wurde beschrieben, dass mit abnehmender Menge an Ausgangs-RNA die Hybridisierung auf den Arrays ineffizienter wurde, zudem waren die beobachteten Genexpressionsunterschiede der verglichenen Proben im Mittel geringer ausgeprägt. Die Arbeitsgruppe zeigte in diesem Zusammenhang, dass Anteile auffallend großer rRNA-Moleküle in den Proben nachzuweisen waren, trotz Verwendung eines Oligo (dT)-Primers. Dies ist ein Zeichen dafür, dass neben der cRNA-Synthese auch andere RNA-Anteile mit amplifiziert werden.

Geht man davon aus, dass ähnliche Nebenreaktionen auch in den von uns verwendeten Protokollen aufgetreten sind, ist es möglich, dass bei den geringen Mengen eingesetzter cRNA durch die Störsignale, die durch den rRNA – Anteil auf dem Array entstanden, die mittlere Signalintensität des Arrays erhöht und somit die Sensitivität der Detektoren verringert wurden. Somit konnten kleinere Transkriptlevel nicht detektiert werden und daher wurden auch geringe Differenzen in der Genexpression nicht erfasst.

Lang et al 2009 haben ebenfalls mit den Produkten von Arcturus gearbeitet. Ihnen zufolge lieferte das RiboAmp Plus Kit von Arcturus die beste Methode für die Synthese von cRNA

aus geringsten (500 pg) Mengen Ausgangs-RNA. Allerdings hat die Arbeitsgruppe, ähnlich wie die Arbeitsgruppe um Peterkova et al (122) ebenfalls starke Qualitäts- und Effektivitätsschwankungen festgestellt wenn Proben geringerer Mengen aber guter Qualität mit denselben Reagenzien und nach identischen Protokollen aufbereitet wurden.

Zusätzlich wurden auch unterschiedliche Erfahrungen gemacht, wenn die RNA aus Zellen stammte, die mit anderen Verfahren isoliert worden waren. So entstanden große Unterschiede in der Amplifikationseffizienz, wenn RNA aus Zelllinien, klinischen Proben oder Gewebeverbänden gewonnen wurde. Aber selbst bei Material aus denselben Zellpopulationen, gleich guter Qualität der Ausgangs-RNA und gleichen Amplifikationsraten und cRNA-Molekülen schwankten die 5'/3'-Ratios nach Durchführung der Microarrayanalysen erheblich. (125)

Dies lässt unter anderem den Rückschluss zu, dass die vor der Hybridisierung angewandten Qualitätskontrollen womöglich nicht ausreichend sein könnten, um qualitative Mängel von cRNA-Proben zu detektieren, oder dass die Performance auf den Oligoarrays bei guter cRNA starken Schwankungen unterlegen ist. Unter anderem ergibt sich daraus die Schlussfolgerung, dass das von Arcturus verwendete Kit damals in der von der Firma vorgeschlagenen Vorgehensweise nicht optimal für die Verwendung von *in vivo*-gewonnenen CD-34-positiven Zellen war. Es wird aber auch deutlich, dass man für jeden Versuchsaufbau die Methode erneut evaluieren und anpassen sollte und dass selbst kleinste Abweichungen in den Protokollen Konsequenzen für die Qualität der Arrayanalysen haben können.

Zusammenfassend haben viele publizierte Arbeitsgruppen, die mit Ausgangsmengen von 100 ng – 5 µg gesamtzellulärer RNA gearbeitet haben, mit dem von Affymetrix vorgeschlagenen Kit nach dem (modifizierten) Eberwine-Protokoll cRNA synthetisiert und damit Ergebnisse erzielt, die mit unseren sowohl was die Amplifikationsrate angeht als auch die Qualität der cRNA vergleichbar sind.

Insgesamt gilt offenbar, dass geringe Mengen Ausgangs-RNA zu Lasten der Qualität der Ergebnisse geht, da bis heute das Problem besteht, dass üblicherweise zu vernachlässigende Störfaktoren bei sehr geringen Mengen eingesetzter cRNA einen relativ gesehen großen Einfluss auf die Signalqualität haben können und dies zu Lasten der Sensitivität und Validität der Oligoarrayanalysen geht. Umso wichtiger ist die Einhaltung der erwähnten Qualitätsrichtlinien für solch geringe Mengen RNA. Dies ist von großer Bedeutung für die Reliabilität und Validität der Genexpressionsanalysen.

Internationale Qualitätsstandards für Genexpressionsanalysen mit Microarrays

Soweit technisch realisierbar haben wir uns an alle international gültigen Standards gehalten. Dies gilt einerseits für die Veröffentlichung der minimal notwendigen Daten der Microarrayanalyse entsprechend der MIAME-Kriterien (126), die vor allem gewährleisten sollen, dass die Daten laborunabhängig interpretierbar werden. Enthalten sind u.a. Angaben zum Experimentendesign, zu den Hybridisierungsprotokollen, den technischen und biochemischen Daten der Hybridisierungen auf den einzelnen Arrays, sowie den verwendeten bioinformatischen Auswertungsmethoden.

Außerdem hielten wir strengste Qualitätsstandards ein, die erst 2006 im Rahmen der „Consensus guidelines“ des European leukemia networks for Microarray Analysis (116) allgemeingültig festgelegt wurden. Hierzu zählt, dass die Proben nach Entnahme innerhalb von 24 h verarbeitet werden sollten, dass die Reinheit der Proben ausreichend war ($>90\%$). Es gelten aber auch klare Richtlinien für die RNA-Qualität selbst ($260/280$ – Ratio $>1,8$; Qualitätsmessung mittels „Lab-on-a-Chip“- System auf dem Bioanalyzer mit klar definierten 18S/28s-Peaks) und die Qualität der eigentlichen Arrayanalysen (GAPDH 5'/3'-Ratio < 3 , Present Calls $>25\%$, für alle Proben ähnliche Backgroundwerte, sowie ein Scaling-Faktor, in dem sich die Proben nicht um das 3-fache voneinander unterscheiden). Für die Analyse der Daten wird in diesen Guidelines vorgeschlagen, dass man, sollte man mit SAM arbeiten, eine FDR wählt, die unter 50% liegt.

Es wird außerdem empfohlen eine RT-PCR aus nicht amplifizierter RNA der Proben parallel durchzuführen, um eine Alteration der Genexpressionslevel durch die lineare Amplifikation selbst auszuschließen. Dieses Problem wurde in der Literatur bereits mehrfach beschrieben und stellt einen wichtigen Faktor in der Interpretation von Genexpressionsdaten aus amplifizierter RNA dar. (116) Verschiedene Studien haben nachgewiesen, dass durch die Amplifikation die Relationen der Genexpressionslevel nicht vollständig beibehalten werden (134). So werden Gene mit einer hohen Anzahl an Transkripten im Vergleich zu Genen mit einer geringen Anzahl nicht im ursprünglichen Verhältnis zueinander amplifiziert. (141) Dies stellt besonders bei Proben mit geringen Ausgangsmengen an RNA ein Problem dar, da dieser „Fehler“ oder Amplifikationsbias dann in Relation eine größere Bedeutung hat.

Das Problem ist jedoch, dass eine Entnahme eines weiteren Aliquots für eine PCR mit der Ausgangs-RNA die einzusetzende Menge für die Amplifikation noch weiter verringert hätte. Somit haben wir auf diesen Schritt verzichtet, haben jedoch durch die Durchführung der RT-PCR der Gene, die wir exemplarisch zur weiteren Untersuchung ausgewählt hatten, eine Methode gefunden, diesen Amplifikationsbias zumindest für die relevanten Gene auszuschließen.

Limitationen bei Microarray-Analysen

Ein Problem der Microarrayanalysen bis heute ist, dass es für die Genexpressionslevel keine Standardreferenz oder absolute Werte gibt, sondern die Genexpressionsanalysen immer nur relative Veränderungen innerhalb der untersuchten Population angeben. (126) Bis vor einigen Jahren war ein weiteres Problem dieser Methodik, dass die Daten interinstitutionell schlecht vergleichbar waren, was auch gut an dem Beispiel der im Folgenden vorgestellten drei Studien von Neumann et al, Sanchez-Guijo et al und Balabanov et al deutlich wird. Durch die Vielzahl an Arrays, Amplifikationsprodukten sowie die unterschiedlichen möglichen bioinformatischen Auswertungsverfahren sind die Daten nur schwerlich reproduzierbar bei jedoch sehr guter interner Reproduzierbarkeit. Dieser Aspekt tritt sicherlich mit zunehmender Routine und besserer Datenlage der Genexpressionsanalysen heute mehr und mehr in den

Hintergrund unter anderem auch aufgrund der oben beschriebenen Qualitätsstandards, Standardisierungen der bioinformatischen Auswertung sowie der Datenbanken (Geo Database), derer sich die meisten Labore bei ihrer Auswertung bedienen.

Dennoch gibt es auch weiterhin Grenzen der Analysen mit Microarrays, die besonders in der zukünftigen Verwendung dieser Methode für diagnostische Zwecke von Bedeutung sind.

Die Grenzen werden vor allem bei der Beurteilung der Sensitivität, intermethodischen Reproduzierbarkeit und Spezifität der Oligoarrayanalysen deutlich.

Bezüglich der Sensitivität beschreiben Draghici et al (127), dass im Mittel 70-90% aller Veränderungen detektiert werden. Generell gilt, dass mit zunehmender Länge der DNA-Nukleotidsequenzen auf den Arrays zwar die Sensitivität steigt, aber die Spezifität abnimmt. Affymetrix gehört hier mit einer durchschnittlichen Länge von Oligonukleotiden von 25mer zu den Herstellern mit kleinen DNA-Molekülen. Die Schwelle für die Detektion einer Veränderung liegt bei 1-10 mRNA-Kopien, so dass die Methode im Vergleich zur PCR schon eine höhere Sensitivität aufweist.

Aufgrund der noch bestehenden Mängel in der Sensitivität ist es aber möglich, dass Transkripte, die grundsätzlich in geringen Mengen vorliegen (wie z.B. Transkriptionsfaktoren) im Fall einer differentiellen Expression nicht erfasst werden. Dies gilt auch für seltene Splicevarianten eines Gens. Hinzu kommt, dass die DNA-RNA-Bindung noch weitgehend unerforscht und im Detail unverstanden ist. Bezüglich der Hybridisierungseffizienz lässt sich somit nicht sagen, wie spezifisch und stark die DNA-RNA-Bindungen wirklich sind, weil über die Affinität der Moleküle unter bestimmten thermischen und chemischen Bedingungen zueinander noch nicht genügend Daten vorliegen, und es sogar Daten gibt, die zeigen konnten, dass "Mismatch"-Bindungen mit punktuellen Sequenzunterschieden stärker sein können, als die "Perfect-Match"-Bindungen. (127) Es ist bereits mehrfach beschrieben worden, dass es zu Hybridisierungen zwischen nicht 100% zueinander passenden Molekülen auf den Oligoarrays kommt. Diese Fehler werden jedoch von den Geräten oft aufgrund ungenügender Sensitivität nicht detektiert. (127).

Des Weiteren wurde festgestellt, dass einzelne Proben innerhalb eines „Probe Sets“ für gemeinsame überlappende Sequenzen bei Hybridisierung unterschiedlich intensive Signale aussenden. Zwar wird vom Gerät ein Mittelwert für die Signalstärke aus einem „Probe Set“ ermittelt, jedoch ist dies ein Hinweis darauf, dass auf Basis des Fluoreszenzsignals selbst sich noch keine Rückschlüsse auf die tatsächliche Konzentration eines Transkripts ziehen lassen. Bestenfalls sind somit zum jetzigen Zeitpunkt nur die relativen Genexpressionsunterschiede erfassbar, und selbst diese sind erst ab einem gewissen Ausmaß messbar. Wobei hier auffallend ist, dass Genexpressionsunterschiede quantitativ in PCR-Kontrollen starke Unterschiede zu den Werten aufweisen, die die Analyse der Microarrays ergeben. Dies ließ sich in unserem Fall nicht bestätigen, was aber darauf zurückzuführen ist, dass die von uns ermittelten Unterschiede innerhalb eines Bereichs von unter 2-fach differentieller Expression lagen.

Abschließend wird ersichtlich, dass die Genexpressionsanalysen mittels der Oligoarrays weder biochemisch noch biomathematisch voll ausgereift sind und dementsprechend eine Reliabilität der Ergebnisse noch nicht vollkommen sichergestellt ist. Die genomweiten Expressionsanalysen sollten somit in den Kontext diverser Untersuchungsmethoden zu einer bestimmten Fragestellung eingebaut werden und nicht als für sich alleinstehend betrachtet werden.

4. 2. Biomedizinische Aspekte

Veränderungen der Genexpression durch Imatinib

Insgesamt identifizierten wir mittels Oligoarrayanalyse acht Gene, die in CD34 positiven Zellen während der Imatinibtherapie eine grenzwertig signifikante differentielle Expression zeigten. Zu diesen Genen zählten fünf überexprimierte Gene (PCDH9, ID2, C1QB, NPL, CXCL2), sowie drei unterexprimierte Gene (SCGF, TAP2, KPNB2). Funktionell lassen sich die Gene in vier Gruppen einteilen: Proliferation, Adhäsion, Transkription und Immunantwort.

Es wird hierbei deutlich, dass die Verwendung von Genexpressionsanalysen nicht für eine dichotome Fragestellung geeignet ist, da es eine Vielzahl von noch nicht durchschauten Variablen in der Genexpression selbst, sowie in der Methodik und Auswertung der Oligoarrayanalysen gibt.

Die Bedeutung unserer Ergebnisse ist unter der Berücksichtigung der Komplexität der Oligoarrayanalysen nicht minder vielschichtig. So konnten wir zwar nur grenzwertig signifikante Unterschiede in der Genexpression der beiden Gruppen feststellen. Jedoch fiel auf, dass es innerhalb der Gruppen einzelne Proben gab, die bezüglich der Genexpression im Vergleich zu den homogenen anderen Proben der Gruppe herausstachen.

So gab es ein Gen, das ID2, welches mit einer grenzwertigen Signifikanz in der Patientenpopulation überexprimiert wurde. Dies ließ sich zwar nicht mittels der RT-PCR bestätigen, jedoch fiel bei der Auswertung der PCR-Daten auch eine Probe auf, die anders als die anderen eine fast 2,5-fach höhere Expression von ID2 zeigte. Interessant ist dieses Ergebnis vor dem Hintergrund, dass ID2 zu einer Gruppe von Transkriptionsfaktoren, in die mit dem ID1 ein anderer Vertreter gehört, von dem bekannt ist, dass er in der Ph-positiven hämatopoetischen Zelle durch Imatinib herunterreguliert wird. (128). Dies kann ein Hinweis darauf sein, dass Imatinib selbst mit Transkriptionsfaktoren interagiert. Es ist aber wahrscheinlicher, dass die differentielle Expression dieser Transkriptionsfaktoren sekundär durch Imatinib vermittelt wird, z.B. durch Signalkaskaden, die durch die Bindung von Imatinib und intrazellulären Proteinen beeinflusst werden. Dafür spricht die Tatsache, dass Imatinib im Fall von ID2 eine Überexpression und im anderen Fall von ID1 eine Unterexpression von Vertretern derselben Transkriptionsfaktorgruppe bewirkt.

Aber neben ID2, welches homogen von der gesamten Patientenpopulation tendenziell eher überexprimiert wurde, fielen noch die beiden Gene C1QB und NPL auf, die nur bei einem Patienten in den Oligoarrayanalysen eine fast zweifach bzw. 1,5-fach erhöhte Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe aufwiesen.

Über das Gen C1QB, welches eine Proteinkomponente des Komplementsystems darstellt, ist noch verhältnismäßig wenig bekannt. Jedoch ist im Zusammenhang mit einem Fehlen

dieses Proteins die Entwicklung von Autoimmunnephritiden beschrieben worden, so dass im Umkehrschluss die Herunterregulation des Gens mit einer Hemmung bestimmter Funktionen des Immunsystems einhergehen könnte. (138, 139)

Das Gen NPL ist bisher nur im Zusammenhang mit seiner Überexpression in Prostatagewebe bei Prostatakarzinom-Patienten beschrieben worden. (140)

Die Probe dieses Patienten unterschied sich sonst in keinem Punkt von den anderen Proben, so dass nicht davon ausgegangen werden kann, dass z.B. eine größere Ausgangszellmenge oder eine andere Methodik ursächlich für diese Expressionsveränderungen sind. Klinisch lässt sich dieser Patient ebenfalls nicht von den anderen unterscheiden, insbesondere die Anamnese und Familienanamnese für ein Prostatakarzinom sind ebenfalls unauffällig. Dennoch wird die Frage aufgeworfen, inwiefern individuelle Unterschiede in der Suszeptibilität der Zellen auf Störungen des Stoffwechsels oder der Genregulation durch Imatinib eine Rolle spielen.

Im Langzeitverlauf zeigte dieser Patient ebenfalls keine Auffälligkeiten. Dasselbe gilt für die anderen Patienten, von denen alle auch 6 Jahre nach dieser Untersuchung noch in Behandlung mit Imatinib sind. Sie alle zeigen weder eine Resistenzentwicklung, noch ein Rezidiv. Lediglich in einem Fall liegt eine fragliche Myelosuppression mit einer leichten Anämie vor. Auch hier findet sich kein Korrelat im Genexpressionsprofil. Andere Nebenwirkungen wie Pruritus, Wadenkrämpfe oder Kopfschmerzen sind ebenfalls eher unspezifischer Natur.

In keinem der Fälle kam es zu sekundären zytogenetischen Aberrationen.

Vergleich mit anderen ähnlichen Studien

Kurz nach Veröffentlichung unserer Studie publizierten Balabanov et al (137) eine Studie, bei der sie derselben Fragestellung wie wir nachgingen. Sie konnten hierbei zehn differentiell exprimierte Gene identifizieren, was zunächst im Widerspruch zu unserer Beobachtung steht, dass die Genexpression durch Imatinib nicht signifikant verändert wird. Zu diesen Genen gehören NCOA3, CCNG2, YPEL5, CYPAB1, LAT, ECP, DHRS9, „Clone RP1-

221C16“, „Competitive HGF antagonist“ und „Proteolytic serine esterase-like protein“. Keines dieser Gene stimmte mit denen überein, die wir als potentiell differentiell exprimiert identifiziert haben. Jedoch fand sich unter den gefundenen Genen YPEL5, welches im Zusammenhang mit Transkription beschrieben wurde, sowie überwiegend Proteine, die in Verbindung mit Zellzyklusregulation und –Proliferation gebracht werden konnten (ECP, LAT, DHRS9 und „competitive HGF antagonist“). Diese Beobachtung lässt sich mit unserer zumindest insofern in korrelieren, als dass eines der von uns ermittelten Gene, SCGF, ebenfalls wesentlich an der Proliferation hämatopoetischer Vorläuferzellen beteiligt ist, und auch in unserem Fall eine Unterexpression vorlag, ebenso wie bei Balabanov et al und den von ihnen identifizierten Genen. Das unterstreicht die Vermutung, dass Imatinib nicht nur die pathologische CD34-positive Zelle in ihrer Proliferation hemmt, sondern womöglich auch die gesunde Zelle.

Ein wesentlicher Unterschied zu unserer Studie ist jedoch, dass die Arbeitsgruppe CD34-positive Zellen von vier gesunden freiwilligen Spendern *in vitro* mit Imatinib behandelt hat. Im Rahmen dieser Zellkulturversuche kamen dabei auch rekombinante Interleukine, Stem Cell Factor, Granulocyte-colony-simulating factor und andere Reagenzien zum Einsatz. Des Weiteren wurden ein anderes RNA-Isolierungskit und ein anderer Affymetrix Array (HG-U133A) verwendet. Die bioinformatische Auswertung erfolgte ausschließlich über Hierarchische Clusteranalysen. In diesen wesentlichen methodischen Unterschieden können Gründe für die Genexpressionsunterschiede in den von Balabanov et al untersuchten Zellen gefunden werden, da allein die Behandlung mit Zytokinen, das Alter und die Aufbewahrung der Zellen, sowie die RNA-Isolierungsmethode die Genexpression verändern können. Zusätzlich sollte man bei der Interpretation der Ergebnisse die geringen Stichprobenzahlen sowohl der Arbeitsgruppe von Balabanov et al, als auch der unseren berücksichtigen.

Sanchez-Guijo et al präsentierten 2009 ihre Genexpressionsergebnisse von 20 Patienten mit CML in vollständiger zytogenetischer Remission unter Imatinib Therapie und von 6 freiwilligen Gesundspendern. Sie verwendeten ebenfalls ein anderes Produkt zur RNA-Aufbereitung und hybridisierten die cRNA auf dem HG-U133A-Array von Affymetrix, wie

auch Balabanov et al. Nach Anwendung des hierarchischen Clusters identifizierten sie zwei Proben-Gruppen: In die eine Gruppe fielen alle Proben der Gesundspender, sowie 7 Proben von Patienten mit CML. Die andere Gruppe setzte sich ausschließlich aus Patienten mit CML zusammen. Zwischen diesen Gruppen fanden Sanchez-Guijo et al 102 differentiell exprimierte Gene. Nach dem Vergleich der Genexpressionsprofile von unbehandelten CD34-positiven Zellen mit denen, die mit Imatinib behandelt worden waren, ermittelte SAM 472 differentiell exprimierte Gene, die durch das Clustering nicht ermittelt worden waren. Eines von diesen Genen kodiert für den Erythropoietin-Rezeptor (EPO-R). Einzig die differentielle Expression dieses Gens wurde mittels PCR bestätigt. Ein Ausmaß der differentiellen Expression wird in der Publikation für keines der Gene angegeben. Interessanterweise findet sich jedoch kein einziges der von uns mittels SAM ermittelten Gene unter den von Sanchez-Guijo et al identifizierten Gene. Dennoch beschrieb diese Arbeitsgruppe eine differentielle Expression von CXCL10 und KPNA3, während wir in unseren Proben eine differentielle Expression der beiden funktionell ähnlichen Gene CXCL2 und KPNB2 fanden. Unterschiede zwischen den Studien liegen darin, dass bei Sanchez-Guijo et al eine größere Stichprobe verwendet wurde, sowie ein anderer Oligoarray zum Einsatz kam, auf dem über 14.500 Gene untersucht werden konnten. Von den bei Sanchez-Guijo als differentiell exprimiert identifizierten Genen sind mindestens 80%, basierend auf einem exemplarischen Abgleich der Daten für ca. 50 Gene, unter anderem auch EPO-R nicht auf dem von uns verwendeten Array (HG-Focus). Der HG-Focuschip untersucht mit ca. 8400 Genen nur etwas mehr als die Hälfte der Gene, die auf dem HG-U133A repräsentiert sind. Des Weiteren wurde in dieser Studie keine Validierung der Ergebnisse mittels PCR - außer für den erwähnten Fall des EPO-R - durchgeführt, so dass nicht klar ist, wie viele der insgesamt 574 differentiell exprimierten Gene auch in der PCR eine differentielle Expression zeigen würden. Des Weiteren geht die Arbeitsgruppe nicht auf Qualitätskontrollen ihrer Experimente oder andere methodische Einzelheiten ein. Demzufolge ist eine Vergleichbarkeit dieser Studie mit der unseren nur bedingt vorhanden, da keine Aussage gemacht werden kann, ob die Genexpression durch die Amplifikation oder Probenverarbeitung alteriert sein könnte. Ein

weiterer wesentlicher Faktor ist, dass vier der Patienten in der Publikation von Sanchez-Guijo et al initial mit Interferon behandelt worden waren und die Patienten erst im Mittel 12 Monate Imatinib einnahmen. Eine mögliche Veränderung der Genexpression durch Interferon in den 4 erwähnten Fällen könnte bei einer verhältnismäßig kleinen Stichprobe von 20 Patienten zu falsch-positiven Ergebnissen führen. Des Weiteren kann es sein, dass der Effekt von Imatinib auf die gesunde Stammzelle sich im Laufe der Zeit verändert, z.B. im Sinne einer kompensatorischen Desensibilisierung der gesunden Zelle gegen die Wirkung von Imatinib. Im Mittel haben unsere Patienten Imatinib doppelt so lange erhalten wie die Patienten von Sanchez-Guijo et al.

5. SCHLUSSFOLGERUNGEN UND AUSBLICK

Um die Frage zu beantworten, ob Imatinib zytogenetische Aberrationen, Störungen der Hämatopoese oder Immunantwort direkt auslösen kann, sowie ob es vielleicht sogar ursächlich an der Resistenzentwicklung beteiligt ist, sind sicherlich noch weitere Untersuchungen nötig.

Allerdings sprechen unsere Ergebnisse gegen eine allgemeingültige Rolle von Imatinib in diesem Kontext, ohne dass auszuschließen ist, dass Imatinib aus noch unbekannten Gründen bei einzelnen Patienten teilweise oder auch vollständig für einige der beschriebenen Komplikationen verantwortlich sein kann. Hierbei spielt die erwähnte unterschiedliche Suszeptibilität von Individuen auf verschiedene äußere Umweltfaktoren, inklusive der Therapie mit Imatinib, eine große Rolle.

Die Tatsache, dass in vielen Fällen die für Resistenzen ursächlichen Mutationen bereits vor Therapiebeginn mit Imatinib vorliegen, unterstützt jedoch zumindest die Annahme, dass Imatinib bei der Resistenzentwicklung nicht direkt beteiligt ist.

Die Ursache der zytogenetischen Aberrationen, die in gesunden CD34-positiven Zellen unter Imatinib gefunden wurden, ist somit weiterhin nicht geklärt. Es ist jedoch möglich, dass es sich bei jenen gesunden CD34-positiven Zellen um Vorläufer der malignen Zellen handelt,

die durch den Rückgang der Ph-positiven Zellen unter Imatinib-Therapie erstmals gesehen wurden. Über den Pathomechanismus der malignen Entartung der CD34-positiven Zellen ist noch vieles unklar, so dass es möglich ist, dass es vor der Ph-Translokation bereits Klone gibt, die erste Malignitätskriterien wie unspezifische zytogenetische Aberrationen aufweisen. Unsere Beobachtungen stützen zumindest die Vermutung, dass diese zytogenetischen Aberrationen nicht im Zusammenhang mit der Therapie stehen, sondern womöglich ein neuer Teilaspekt der Pathophysiologie der CML sind.

Dem entgegen steht eine Beobachtung von Fabarius et al (129). Sie haben bei humanen Hautfibroblasten von hämatologisch gesunden Personen nach *in vitro* Behandlung mit Imatinib zytogenetische Aberrationen in 58% der Fälle beobachtet. Sie stützen sich in der Erklärung dieser Beobachtung auf die Vermutung, dass hierfür die Imatinib vermittelte Hemmung der normalen ABL-Kinase ursächlich ist. ABL ist über seine Interaktion mit Proteinen wie p73 oder RAD51 in die DNA Reparatur involviert, so dass seine Hemmung durch Imatinib eine Störung dieser Reparaturmechanismen bedeuten kann. Unter den 574 ermittelten differentiell exprimierten Genen von Sanchez-Guijo et al. befanden sich auch 7 Gene, die für Proteine kodieren, die für die DNA-Reparatur zuständig sind, was die Theorie von Fabarius unterstützt. Jedoch handelt es sich hierbei um *in vitro*-Experimente, bei denen eine erhöhte Vulnerabilität der Zellen durch den chemischen und mechanischen Stress über mehrere Wochen und somit eine erhöhte genetische Instabilität nicht auszuschließen sind.

Gerade vor dem Hintergrund dieser Studie von Sanchez-Guijo et al ist unser Ergebnis überraschend, auch hinsichtlich der großen Effizienz der Therapie mit Imatinib.

Während aber einerseits die relative Selektivität und damit Sicherheit der Wirkung des Tyrosinkinaseinhibitors durch unsere Untersuchungen bestätigt zu sein scheint, ist dennoch die Frage nach der langfristigen Sicherheit von Imatinib ungeklärt. Ein weiterer möglicher Erklärungsansatz für die beobachteten Veränderungen unter Imatinibtherapie ist der, dass sich die Wirkung ausschließlich auf der posttranskriptionalen Ebene vollzieht und dass

dadurch gehemmte Signalkaskaden, z.B. die Hemmung von ABL und den nachgeschalteten Enzymen, durch redundante alternative Signalwege kompensiert werden können. Allerdings wäre auch in dem Fall anzunehmen, dass sich diese Kompensation auf Genexpressionsebene nachweisen lässt. Besonders in dem Fall, in dem es zu zygotischen Veränderungen kommt. Somit stellt unsere Untersuchung transkriptionaler Veränderungen der Zelle durch Imatinib nur einen Teilaspekt der möglichen funktionellen Auswirkungen der Therapie dar. Dies ist folglich eine weitere Limitierung unseres Studiendesigns, zusätzlich zu den beschriebenen technischen und molekulargenetischen Limitierungen der Oligoarrayanalysen.

Um der Fragestellung der posttranskriptionalen Wirkung von Imatinib exemplarisch nachzugehen, haben wir die Oberflächenexpression von CD117, welches nachweislich *in vitro* durch Imatinib gehemmt wird, durchflusszytometrisch untersucht und festgestellt, dass zumindest eine grenzwertig signifikante differentielle Expression von CD117 an der Oberfläche der gesunden CD34-positiven Zellen besteht. Erwartungsgemäß war CD117 an der Oberfläche der Zellen von Patienten herunterreguliert. Auch hier fiel auf, dass es interindividuelle Schwankungen gab, mit einem Patienten, der durch eine 50%ige Reduktion der CD117-Proteinexpression auffiel. Auch hier fand sich jedoch kein klinisches Korrelat, und es handelte sich nicht um denselben Patienten, der auch in den Genexpressionsanalysen auffallende Ergebnisse gezeigt hatte.

Die Untersuchung der Expression von Oberflächenmarkern ist *eine* Methode, die posttranslationalen Auswirkungen der Imatinib-Therapie auf die gesunde Zelle zu untersuchen. Interessant wäre es jedoch auch, die eigentlichen Enzymaktivitäten bestimmter Signalkaskaden, z.B. der für die DNA-Reparatur zuständigen Proteingruppen, zu untersuchen. In diesem Kontext hätte man z.B. durch Proteomics solche Veränderungen der Enzymaktivitäten untersuchen können. Bisher liegen zu dieser Fragestellung für die gesunde hämatopoetische Stamm- und Progenitorzelle keine Daten vor.

Zusammenfassend muss man feststellen, dass die Oligoarrayanalysen zwar noch weiterer Erforschung und Optimierung in der Standardisierung der technischen Durchführung sowie ihres Designs bedürfen, aber aufgrund ihres genomweiten Spektrums eine sehr gute Methode im Sinne eines Suchtests darstellen. Eine solche Screeningmethode kann man wie in unserem Fall an den Anfang einer spezifischen Fragestellung setzen, um auf der Basis der gefundenen Unterschiede weitere Untersuchungen anzuschließen, die die funktionelle Bedeutung der detektierten Genexpressionsunterschiede analysieren. Somit ist unsere Untersuchung eine Antwort auf die Frage nach der Sicherheit der Therapie mit Imatinib, aber sicherlich nicht die letzte und einzige Antwort. Langzeitstudien auch bezüglich der Sicherheit von Imatinib z.B. bei Einnahme während der Schwangerschaft, sowie die Wirkung von Imatinib auf andere gesunde Zellen des Körpers, werden notwendig sein, um diese Fragen zu beantworten. Auch ist über die eigentlichen Wirkmechanismen der Tyrosinkinaseinhibitoren noch vieles nicht bekannt.

Unsere Arbeit, als eine der ersten Untersuchungen über transkriptionelle Veränderungen in hämatopoetischen Progenitorzellen bei Imatinib-Therapie, konnte ausschließen, dass es durch die Behandlung mit Imatinib zu schweren uniformen Störungen der Genexpression mit möglicherweise fatalen Folgen für die Patienten im Sinne sekundärer myelodysplastischer oder anderer maligner Erkrankungen kommt. Somit stehen für die Zukunft vor allem noch jene Untersuchungen aus, die zum Verständnis der Wirkung von Tyrosinkinasen auf zellulärer und molekularer Ebene notwendig sind.

Bezüglich ihrer unmittelbaren Sicherheit sind jedoch die dringlichsten Zweifel zunächst gemildert.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Nowell, Hungerford A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia, Science 1960; 132:1497
2. [No authors listed] Third International Workshop on Chromosomes in Leukemia: Chromosomal abnormalities and their clinical significance in acute lymphoblastic leukemia. Cancer Res 1983 Feb;43(2):868-73.
3. Ribeiro RC, Abromowitch M, Raimondi SC, Murphy SB, Behm F, Williams DL: Clinical and biologic hallmarks of the Philadelphia-Chromosome in ALL, Blood. 1987 Oct;70(4):948-53.
4. Rowley JD, The Philadelphia chromosome translocation. A paradigm for understanding leukemia. Cancer. 1990 May 15;65(10):2178-84
5. Druker BJ, Sawyers CL, Capdeville R, Ford JM, Baccarani M, Goldman JM. Chronic myelogenous leukemia Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2001:87-112.
6. Sawyers CL; Chronic myeloid leukemia. N Engl J Med. 1999 Apr 29;340(17):1330-40.
7. Hochhaus A, Druker B, Sawyers C, Guilhot F, Schiffer CA, Cortes J, Niederwieser DW, Gambacorti-Passerini C, Stone RM, Goldman J, Fischer T, O'Brien SG, Reiffers JJ, Mone M, Krahnke T, Talpaz M, Kantarjian HM, Favorable long-term follow-up results over 6 years for response, survival, and safety with imatinib mesylate therapy in chronic-phase chronic myeloid leukemia after failure of interferon-alpha treatment. Blood. 2008 Feb 1;111(3):1039-43.
8. Kurzrock R, Gutterman JU, Talpaz M. The molecular genetics of Philadelphia chromosome-positive leukemias. N Engl J Med. 1988 Oct 13;319(15):990-8.
9. Kurzrock R, Shtalrid M, Gutterman JU, Koller CA, Walters R, Trujillo JM, Talpaz M. Molecular analysis of chromosome 22 breakpoints in adult Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukaemia. Br J Haematol. 1987 Sep;67(1):55-9.
10. Kurzrock R, Shtalrid M, Talpaz M, Kloetzer WS, Gutterman JU Blood. Expression of c-abl in Philadelphia-positive acute myelogenous leukemia. 1987 Nov;70(5):1584-8.
11. Crist W, Carroll A, Shuster J, Jackson J, Head D, Borowitz M, Behm F, Link M, Steuber P, Ragab A, et al. Philadelphia chromosome positive childhood acute lymphoblastic leukemia: clinical and cytogenetic characteristics and treatment outcome. A Pediatric Oncology Group study. Blood. 1990 Aug 1;76(3):489-94.
12. le Coutre P, Mologni L, Cleris L, Marchesi E, Buchdunger E, Giardini R, Formelli F, Gambacorti-Passerini C. In vivo eradication of human BCR/ABL-positive leukemia cells with an ABL kinase inhibitor. J Natl Cancer Inst. 1999 Jan 20;91(2):163-8.
13. Tanaka K, Tacechi M, Hong J et al, 9;22 translocation and bcr rearrangements in chronic myelocytic leukemia patients among atomic bomb survivors. J Radiat Res. 1989; 30:352-358
14. Corso A, Lazzarino M, Morra E et al. chronic myelogenous leukemia and exposure to ionizing radiation – a retrospective study of 443 patients. Ann Hematol. 1995; 70:79-82

15. Deininger MW, Bose S, Gora-Tybor J, Yan XH, Goldman JM, Melo JV, Selective induction of leukemia –associated fusion genes by high-dose ionizing radiation. *Cancer Res.* 1998; 58:421-425
16. Kozubek S, Lukasova E, Ryznar L, et al. Distribution of ABL and BCR genes in cell nuclei of normal and irradiated lymphocytes. *Blood* 1997; 89: 4537-4545
17. Neves H, Ramos C, da Silva MG, Parreira A, Parreira L. The nuclear topography of ABL, BCR, PML and RAR α genes: evidence for gene proximity in specific phases of the cell cycle and stages of hematopoietic differentiation. *Blood* 1999;93: 1197-1207
18. Abelson HT, Rabstein LS. Lymphosarcoma: virus-induced thymic-independent disease in mice. *Cancer Res.* 1970;30:2213-2222
19. Van Etten RA, Jackson P, Baltimore D The mouse type IV c-abl gene product is a nuclear protein, and activation of transforming ability is associated with cytoplasmic localization. *Cell.* 1989 Aug 25;58(4):669-78.
20. Wang JY. Abl tyrosine kinase in signal transduction and cell-cycle regulation. *Curr Opin Genet Dev.* 1993 Feb;3(1):35-43
21. Sawyers CL, McLaughlin J, Goga A, Havlik M, Witte O. The nuclear tyrosine kinase c-Abl negatively regulates cell growth *Cell.* 1994 Apr 8;77(1):121-31.
22. Birchenall-Roberts MC, Yoo YD, Bertolette DC 3rd, Lee KH, Turley JM, Bang OS, Ruscetti FW, Kim SJ. The p120-v-Abl protein interacts with E2F-1 and regulates E2F-1 transcriptional activity. *J Biol Chem.* 1997 Apr 4;272(14):8905-11.
23. Birchenall-Roberts MC, Ruscetti FW, Kasper JJ, Bertolette DC 3rd, Yoo YD, Bang OS, Roberts MS, Turley JM, Ferris DK, Kim SJ. Nuclear localization of v-Abl leads to complex formation with cyclic AMP response element (CRE)-binding protein and transactivation through CRE motifs. *Mol Cell Biol.* 1995 Nov;15(11):6088-99.
24. van Etten R, Cycling, stressed-out and nervous: cellular functions of cAbl; *Trends Cell Biol.* 1999 May;9(5):179-86.
25. Cheng K, Kurzrock R, Qiu X, Estrov Z, Ku S, Dulski KM et al. Reduced focal adhesion kinase and paxillin phosphorylation in BCR-ABL-Transfected cells. *Cancer* 2002;95:440-50
26. Diekmann D, Brill S, Garrett MD, Totty N, Hsuan J, Monfries C, Hall C, Lim L, Hall A. Bcr encodes a GTPase-activating protein for p21rac. *Nature.* 1991 May 30;351(6325):400-2.
27. Maru Y, Kobayashi T, Tanaka K, Shibuya M. BCR binds to the xeroderma pigmentosum group B protein *Biochem Biophys Res Commun.* 1999 Jul 5;260(2):309-12.
28. Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood.* 2000 Nov 15;96(10):3343-56.
29. Melo JV The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. *Blood.* 1996 Oct 1;88(7):2375-84

30. Pane F, Figeri F, Sindona M et al. Neutrophilic – chronic myeloid leukemia : a distinct disease with a specific molecular marker (BCR/ABL with C3/A2 junction). *Blood* 1996;88:2410-2414
31. Guinebault C, Payrastre B, Racaud-Sultan C, Mazarguil H, Breton M, Mauco G, Plantavid M, Chap H. Integrin-dependent translocation of phosphoinositide 3-kinase to the cytoskeleton of thrombin-activated platelets involves specific interactions of p85 alpha with actin filaments and focal adhesion kinase. *J Cell Biol.* 1995 May;129(3):831-42
32. Bazzoni G, Carlesso N, Griffin JD, Hemler ME. Bcr/Abl expression stimulates integrin function in hematopoietic cell lines. *J clin Invest* 1996; 98:521-8
33. Verfaillie CM, Hurley R, Zhao RC, Prosper F, Delforge M, Bhatia R. 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 Jun;129(6):584-91.
34. Diaz-Blanco E, Bruns I, Neumann F, Fischer JC, Graef T, Roskopf M, Brors B, Pechtel S, Bork S, Koch A, Baer A, Rohr UP, Kobbe G, Haeseler A, Gattermann N, Haas R, Kronenwett R. Molecular signature of CD34(+) hematopoietic stem and progenitor cells of patients with CML in chronic phase. *Leukemia.* 2007 Mar;21(3):494-504. Epub 2007 Jan 25.
35. Cortez D, Reuther GW, Pendergast AM. The BCR-ABL tyrosine kinase activates mitotic signaling pathways and stimulates G1-to-S phase transition in hematopoietic cells. *Oncogene.* 1997;15:2333-2342
36. Cortez D, Stoica G, Pierce JH, Pendergast AM. The BCR-ABL tyrosine kinase inhibits apoptosis by activating a Ras-dependent signaling pathway. *Oncogene.* 1996 Dec 19;13(12):2589-9
37. Chai SK , Nichols GL, Rothman P. Constitutive activation of JAKs and STATs in BCR-Abl-expressing cell lines and peripheral blood cells derived from leukemic patients. *J Immunol.* 1997;159:4720-4728
38. Zou X, Rudchenko S, Wong K, Calame K. Induction of c-myc transcription by the v-Abl tyrosine kinase requires Ras,Raf1 and cyclin-dependent kinases. *Genes Dev.*1997;11:654-662
39. Ptasznik A, Urbanowska E, Chinta S, Costa MA, Katz BA, Stanislaus MA, Demir G, Linnekin D, Pan ZK, Gewirtz AM. Crosstalk between BCR/ABL oncoprotein and CXCR4 signaling through a Src family kinase in human leukemia cells. *J Exp Med.* 2002 Sep 2;196(5):667-78.
40. Sattler M, Salgia R, Okuda K, et al. The proto-oncogene product p120 CBL and the adaptor proteins CRKL and c-CRK link c-ABL, l p190BCR/ABL and p210BCR/ABL to the phosphatidylinositol-3 kinase pathway. *Oncogene* 1996; 12:839-846
41. Zhang X, Ren R. Bcr-Abl efficiently induces a myeloproliferative disease and production of excess interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in mice: a novel model for chronic myelogenous leukemia. *Blood.* 1998 Nov 15;92(10):3829-40
42. Kronenwett R, Butterweck U, Steidl U, Kliszewski S, Neumann F, Bork S, Blanco ED, Roes N, Gräf T, Brors B, Eils R, Maercker C, Kobbe G, Gattermann N, Haas R.

Distinct molecular phenotype of malignant CD34(+) hematopoietic stem and progenitor cells in chronic myelogenous leukemia. *Oncogene*. 2005 Aug 11;24(34):5313-24.

43. Evans CA, Lord JM, Owen-Lynch PJ, Johnson G, Dive C, Whetton AD. Suppression of apoptosis by v-ABL protein tyrosine kinase is associated with nuclear translocation and activation of protein kinase C in an interleukin-3-dependent haemopoietic cell line. *J Cell Sci*. 1995 Jul;108 (Pt 7):2591-8.
44. Horita M, Andreu EJ, Benito A et al. Blockade of the Bcr-Abl kinase activity induces apoptosis of chronic myelogenous leukemia cells by suppressing signal transducer and activator of transcription 5-dependent expression of Bcl-XL. *J Exp Med*. 2000;191:977-984
45. Sanchez Garcia I, Martin Zanca D. Regulation of Bcl-2 gene expression by BCR-ABL is mediated by Ras. *J Mol Biol*. 1997;267:225-228
46. Neshat MS, Raitano AB, Wang HG, Reed JC, Sawyers CL. 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: 1179-1186
47. Bedi A, Barber JP, Bedi GC et al. BCR-ABL-mediated inhibition of apoptosis with delay of G2/M transition after DNA damage: a mechanism of resistance to multiple anticancer agents. *Blood* 1995;86:1148-1158
48. Bedi A, Zehnbauser BA, Barber JP, Sharkis SJ, Jones RJ. Inhibition of apoptosis by BCR-ABL in chronic myelogenous leukemia. *Blood* 1994;83:2038-2044
49. Neumann F, Herold C, Hildebrandt B, Kobbe G, Aivado M, Rong A, Free M, Rössig R, Fenk R, Schneider P, Gattermann N, Royer-Pokora B, Haas R, Kronenwett R. Quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction for diagnosis of BCR-ABL positive leukemias and molecular monitoring following allogeneic stem cell transplantation. *Eur J Haematol*. 2003 Jan;70(1):1-10.
50. Kantarjian HM, Deisseroth A, Kurzrock R, Estrov Z, Talpaz M. Chronic myelogenous leukemia: a concise update. *Blood*. 1993 Aug 1;82(3):691-703.
51. Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, Gathmann I, Kantarjian H, Gattermann N, Deininger MW, Silver RT, Goldman JM, Stone RM, Cervantes F, Hochhaus A, Powell BL, Gabrilove JL, Rousselot P, Reiffers J, Cornelissen JJ, Hughes T, Agis H, Fischer T, Verhoef G, Shepherd J, Saglio G, Gratwohl A, Nielsen JL, Radich JP, Simonsson B, Taylor K, Baccarani M, So C, Letvak L, Larson RA; IRIS Investigators: Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2006 Dec 7;355(23):2408-17.
52. Hughes T, Deininger M, Hochhaus A, Branford S, Radich J, Kaeda J, Baccarani M, Cortes J, Cross NC, Druker BJ, Gabert J, Grimwade D, Hehlmann R, Kamel-Reid S, Lipton JH, Longtine J, Martinelli G, Saglio G, Soverini S, Stock W, Goldman JM. Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results, *Blood*. 2006 Jul 1;108(1):28-37.
53. Branford S, Fletcher L, Cross NC, Müller MC, Hochhaus A, Kim DW, Radich JP, Saglio G, Pane F, Kamel-Reid S, Wang YL, Press RD, Lynch K, Rudzki Z, Goldman JM, Hughes T. Desirable performance characteristics for BCR-ABL measurement on

an international reporting scale to allow consistent interpretation of individual patient response and comparison of response rates between clinical trials. *Blood*. 2008 Oct 15;112(8):3330-8.

54. Hughes TP, Branford S. Monitoring disease response to tyrosine kinase inhibitor therapy in CML. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2009:477-87.
55. O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA, Gathmann I, Baccarani M, Cervantes F, Cornelissen JJ, Fischer T, Hochhaus A, Hughes T, Lechner K, Nielsen JL, Rousselot P, Reiffers J, Saglio G, Shepherd J, Simonsson B, Gratwohl A, Goldman JM, Kantarjian H, Taylor K, Verhoef G, Bolton AE, Capdeville R, Druker BJ; IRIS Investigators. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2003 Mar 13;348(11):994-1004.
56. Goldman JM Initial treatment for patients with CML. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2009:453-60.
57. Hochhaus A, O'Brien SG, Guilhot F, Druker BJ, Branford S, Foroni L, Goldman JM, Müller MC, Radich JP, Rudoltz M, Mone M, Gathmann I, Hughes TP, Larson RA; IRIS Investigators. Six-year follow-up of patients receiving imatinib for the first-line treatment of chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2009 Jun;23(6):1054-61.
58. O'Brien SG, Guilhot F, Goldman JM, Hochhaus A, Hughes TP, Radich JP, Rudoltz M, Filian J, Gathmann I, Druker BJ, Larson RA. International Randomized Study of Interferon Versus STI571 (IRIS) 7-Year Follow-up: Sustained Survival, Low Rate of Transformation and Increased Rate of Major Molecular Response (MMR) in Patients (pts) with Newly Diagnosed Chronic Myeloid Leukemia in Chronic Phase (CMLCP) Treated with Imatinib (IM). *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*, Nov 2008; 112: 186.
59. Sawyers CL, Hochhaus A, Feldman E, Goldman JM, Miller CB, Ottmann OG, Schiffer CA, Talpaz M, Guilhot F, Deininger MW, Fischer T, O'Brien SG, Stone RM, Gambacorti-Passerini CB, Russell NH, Reiffers JJ, Shea TC, Chapuis B, Coutre S, Tura S, Morra E, Larson RA, Saven A, Peschel C, Gratwohl A, Mandelli F, Ben-Am M, Gathmann I, Capdeville R, Paquette RL, Druker BJ. Imatinib induces hematologic and cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in myeloid blast crisis: results of a phase II study. *Blood*. 2002 May 15;99(10):3530-9.
60. Roy L, Guilhot J, Krahnke T, Guerci-Bresler A, Druker BJ, Larson RA, O'Brien S, So C, Massimini G, Guilhot F. Survival advantage from imatinib compared with the combination interferon-alpha plus cytarabine in chronic-phase chronic myelogenous leukemia: historical comparison between two phase 3 trials. *Blood*. 2006 Sep 1;108(5):1478-84.
61. Gratwohl A, Hermans J, Goldman JM, Arcese W, Carreras E, Devergie A, Frassoni F, Gahrton G, Kolb HJ, Niederwieser D, Ruutu T, Vernant JP, de Witte T, Apperley J. 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 Oct 3;352(9134):1087-92.
62. Passweg JR, Walker I, Sobocinski KA, Klein JP, Horowitz MM, Giralto SA; Chronic Leukemia Study Writing Committee of the International Bone Marrow Transplant Registry. Validation and extension of the EBMT Risk Score for patients with chronic myeloid leukaemia (CML) receiving allogeneic haematopoietic stem cell transplants. *Br J Haematol*. 2004 Jun;125(5):613-20.

63. Mughal TI, Yong A, Szydlo RM, Dazzi F, Olavarria E, van Rhee F, Kaeda J, Cross NC, Craddock C, Kanfer E, Apperley J, Goldman JM. Molecular studies in patients with chronic myeloid leukaemia in remission 5 years after allogeneic stem cell transplant define the risk of subsequent relapse. *Br J Haematol.* 2001 Dec;115(3):569-74.
64. Uehara Y, Murakami Y, Mizuno S, Kawai S et al; Inhibition of transforming activity of tyrosine kinase oncogenes by herbimycin A. *Virology* 1988; 164:294-298
65. Anafi M, Gazit A, Zehavi A, Ben Neriah Y, Levitzki et al; Tyrphostin-induced inhibition of p210bcr-abl tyrosine kinase activity induces K562 to differentiate. *Blood* 1993; 82:3524-2529
66. Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E et al. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med.* 1996;2:561-6
67. Schindler T, Bornmann W, Pellicena P, Miller WT, Clarkson B, Kuriyan J. Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase. *Science.* 2000 Sep 15;289(5486):1938-42.
68. Force T, Krause DS, Van Etten RA. Molecular mechanisms of cardiotoxicity of tyrosine kinase inhibition. *Nat Rev Cancer.* 2007 May;7(5):332-44.
69. Buchdunger E, O'Reilly T, Wood J. Pharmacology of imatinib (STI571) *Eur J Cancer.* 2002 Sep;38 Suppl 5:S28-36
70. Sneed TB, Kantarjian HM, Talpaz M, O'Brien S, Rios MB, Bekele BN, Zhou X, Resta D, Wierda W, Faderl S, Giles F, Cortes JE. The significance of myelosuppression during therapy with imatinib mesylate in patients with chronic myelogenous leukemia in chronic phase. *Cancer.* 2004 Jan 1;100(1):116-21.
71. Tsao AS, Kantarjian H, Cortes J, O'Brien S, Talpaz M. Imatinib mesylate causes hypopigmentation in the skin. *Cancer.* 2003 Dec 1;98(11):2483-7.
72. Jones CM, Dickinson TM, Salvado A. Phase II open label trial of imatinib in polycythemia rubra vera. *Int J Hematol.* 2008 Dec;88(5):489-94.
73. Jain N, Cortes J, Quintás-Cardama A, Manshouri T, Luthra R, Garcia-Manero G, Kantarjian H, Verstovsek S. Imatinib has limited therapeutic activity for hypereosinophilic syndrome patients with unknown or negative PDGFRalpha mutation status. *Leuk Res.* 2009 Jun;33(6):837-9.
74. Tonyali O, Coskun U, Yildiz R, Karakan T, Demirci U, Akyurek N, Benekli M, Buyukberber S. Imatinib mesylate-induced acute liver failure in a patient with gastrointestinal stromal tumors. *Med Oncol.* 2009 Aug 7
75. Ottmann OG, Pfeifer H First-line treatment of Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia in adults; *Curr Opin Oncol.* 2009 Jun;21 Suppl 1:S43-6.
76. Razis E, Selvaridis P, Labropoulos S, Norris JL, Zhu MJ, Song DD, Kalebic T, Torrens M, Kalogera-Fountzila A, Karkavelas G, Karanastasi S, Fletcher JA, Fountzilas G. Phase II study of neoadjuvant imatinib in glioblastoma: evaluation of clinical and molecular effects of the treatment. *Clin Cancer Res.* 2009 Oct 1;15(19):6258-66.

77. Quek R, George S. Update on the treatment of gastrointestinal stromal tumors (GISTs): role of imatinib. *Biologics*. 2010 Feb 4;4:19-31.
78. Krug LM, Crapanzano JP, Azzoli CG, Miller VA, Rizvi N, Gomez J, Kris MG, Pizzo B, Tyson L, Dunne M, Heelan RT. Imatinib mesylate lacks activity in small cell lung carcinoma expressing c-kit protein: a phase II clinical trial. *Cancer*. 2005 May 15;103(10):2128-31
79. Chhina MK, Nargues W, Grant GM, Nathan SD. Evaluation of imatinib mesylate in the treatment of pulmonary arterial hypertension. *Future Cardiol*. 2010 Jan;6(1):19-35.
80. Shah NP. Loss of response to imatinib: mechanisms and management. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2005:183-7.
81. Kantarjian HM, Talpaz M, O'Brien S, Giles F, Garcia-Manero G, Faderl S, Thomas D, Shan J, Rios MB, Cortes J. Dose escalation of imatinib mesylate can overcome resistance to standard-dose therapy in patients with chronic myelogenous leukemia. *Blood*. 2003 Jan 15;101(2):473-5.
82. Shah NP. Medical management of CML. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2007:371-5.
83. Lahaye T, Riehm B, Berger U, Paschka P, Müller MC, Kreil S, Merx K, Schwindel U, Schoch C, Hehlmann R, Hochhaus A. Response and resistance in 300 patients with BCR-ABL-positive leukemias treated with imatinib in a single center: a 4.5-year follow-up. *Cancer*. 2005 Apr 15;103(8):1659-69.
84. Bixby D, Talpaz M. Mechanisms of resistance to tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia and recent therapeutic strategies to overcome resistance. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2009:461-76.
85. Roche-Lestienne C, Soenen-Cornu V, Grardel-Duflos N, Laï JL, Philippe N, Facon T, Fenaux P, Preudhomme C. Several types of mutations of the Abl gene can be found in chronic myeloid leukemia patients resistant to STI571, and they can pre-exist to the onset of treatment. *Blood*. 2002 Aug 1;100(3):1014-8.
86. Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K, et al. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science* 2001;293:876-880
87. Che XF, Nakajima Y, Sumizawa T et al. Reversal of P-glycoprotein mediated multidrug resistance by a newly synthesized 1,4-benzothiazepine derivative. *JTV-519. Cancer Lett.*2002;187:111-119
88. Kotaki M, Motoji T, Takanashi M, Wang YH, Mizoguchi H. Anti-proliferative effect of the abl tyrosine kinase inhibitor STI571 on the P-glycoprotein positive K562/ADM cell line. *Cancer Lett.*2003;199:61-68
89. Thomas J, Wang L, Clark RE, Pirmohamed M. Active transport of imatinib into and out of cells: implications for drug resistance. *Blood* 2004;104:3739-3745
90. Wang L, Giannoudis A, Lane S, Williamson P, Pirmohamed M, Clark RE. Expression of the uptake drug transporter hOCT1 is an important clinical determinant of the response to imatinib in chronic myeloid leukemia. *Clin Pharmacol Ther.* 2008;83:258-264

91. White DL, Saunders VA, Dang P et al. CML patients with low OCT-1 activity achieve better molecular responses on high dose imatinib than on standard dose. Those with high Oct-1 activity have excellent responses on either dose: a TOPS correlative study [Abstract]. *Blood* 2008;112:3187
92. Gambacorti-Passerini C, Zucchetti M, Russo D et al. Alpha1 acid glycoprotein binds to imatinib and substantially alters its pharmacokinetics in chronic myeloid leukemia patients. *Clin Cancer Res.* 2003;9:625-632
93. Picard S, Titier K, Etienne G, et al. Trough imatinib plasma levels are associated with both cytogenetic and molecular responses to standard-dose imatinib in chronic myeloid leukemia. *Blood* 2007;109:3496-3499
94. Lee SM, Bae Jh, Kim MJ, et al. Bcr-Abl-independent imatinib-resistant K562 cells show aberrant protein acetylation and increased sensitivity to histone deacetylase inhibitors. *J Pharmacol Exp ther.* 2007;322:1084-1092
95. Aceves-Luquero CI, Agarwal A, Callejas-Valera JL, et al. ERK2, but not ERK1, mediates acquired and “de novo” resistance to imatinib mesylate: implication for CML therapy. *PloS One.* 2009;4:e6124.
96. Donato NJ, Wu JY, Stapley J, et al. BCR-ABL independence and LYN kinase overexpression in chronic myelogenous leukemia cells selected for resistance to STI571. *Blood* 2003;101:690-698
97. le Coutre P, Tassi E, Varella-Garcia M, et al. Induction of resistance to the Abelson inhibitor STI571 in human leukemic cells through gene amplification. *Blood* 2000;95:1758-1766
98. Mahon FX, Deininger MW, Schultheis B, et al. Selection and characterization of BCR-ABL positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor STI571: diverse mechanisms of resistance. *Blood* 2000;96:1070-1079
99. Hughes T, Deininger M, Hochhaus A, et al. Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors. Review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. *Blood* 2006;108:28-37
100. Branford S, Rudzki Z, Walsh S, Parkinson I, Grigg A, Szer J, Taylor K, Herrmann R, Seymour JF, Arthur C, Joske D, Lynch K, Hughes T. Detection of BCR-ABL mutations in patients with CML treated with imatinib is virtually always accompanied by clinical resistance, and mutations in the ATP phosphate-binding loop (P-loop) are associated with a poor prognosis. *Blood.* 2003 Jul 1;102(1):276-83.
101. Shtivelman E, Lifshitz B, Gale RP, Roe BA, Canaani E Alternative splicing of RNAs transcribed from the human abl gene and from the bcr-abl fused gene.. *Cell.* 1986 Oct 24;47(2):277-84.
102. Deininger M, Buchdunger E, Druker BJ. The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia. *Blood* 2005;105:2640-2653
103. Shah NP, Nicoll JM, Nagar B, Gorre ME, Paquette RL, Kuriyan J, Sawyers CL. Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia. *Cancer Cell.* 2002 Aug;2(2):117-25.

104. Roumiantsev S, Shah NP, Gorre ME, Nicoll J, Brasher BB, Sawyers CL, Van Etten RA. Clinical resistance to the kinase inhibitor STI-571 in chronic myeloid leukemia by mutation of Tyr-253 in the Abl kinase domain P-loop. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Aug 6;99(16):10700-5.
105. Jabbour E, Kantarjian HM, Abruzzo LV, O'Brien S, Garcia-Manero G, Verstovsek S, Shan J, Rios MB, Cortes J. Chromosomal abnormalities in Philadelphia chromosome negative metaphases appearing during imatinib mesylate therapy in patients with newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic phase. *Blood*. 2007 Oct 15;110(8):2991-5.
106. Abruzzese E, Gozzetti A, Galimberti S, Trawinska MM, Caravita T, Siniscalchi A, Cervetti G, Mauriello A, Coletta AM, De Fabritiis P. Characterization of Ph-negative abnormal clones emerging during imatinib therapy. *Cancer*. 2007 Jun 15;109(12):2466-72.
107. Medina J, Kantarjian H, Talpaz M, O'Brien S, Garcia-Manero G, Giles F, Rios MB, Hayes K, Cortes J. Chromosomal abnormalities in Philadelphia chromosome-negative metaphases appearing during imatinib mesylate therapy in patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia in chronic phase. *Cancer*. 2003 Nov 1;98(9):1905-11.
108. O'Dwyer ME, Gatter KM, Loriaux M, Druker BJ, Olson SB, Magenis RE, Lawce H, Mauro MJ, Maziarz RT, Brazier RM. Demonstration of Philadelphia chromosome negative abnormal clones in patients with chronic myelogenous leukemia during major cytogenetic responses induced by imatinib mesylate. *Leukemia*. 2003 Mar;17(3):481-7.
109. Brazier RM, Launder TM, Druker BJ, Olson SB, Magenis RE, Mauro MJ, Sawyers CL, Paquette RL, O'Dwyer ME. Hematopathologic and cytogenetic findings in imatinib mesylate-treated chronic myelogenous leukemia patients: 14 months' experience. *Blood*. 2002 Jul 15;100(2):435-41.
110. Bumm T, Müller C, Al-Ali HK, Krohn K, Shepherd P, Schmidt E, Leiblein S, Franke C, Hennig E, Friedrich T, Krah R, Niederwieser D, Deininger MW. Emergence of clonal cytogenetic abnormalities in Ph- cells in some CML patients in cytogenetic remission to imatinib but restoration of polyclonal hematopoiesis in the majority. *Blood*. 2003 Mar 1;101(5):1941-9.
111. Terre C, Eclache V, Rousselot P, Imbert M, Charrin C, Gervais C, Mozziconacci MJ, Maarek O, Mossafa H, Auger N, Dastugue N, Talmant P, Van den Akker J, Leonard C, N'Guyen Khac F, Mugneret F, Viguié F, Lafage-Pochitaloff M, Bastie JN, Roux GL, Nicolini F, Maloisel F, Vey N, Laurent G, Recher C, Vigier M, Yacouben Y, Giraudier S, Vernant JP, Salles B, Roussi J, Castaigne S, Leymarie V, Flandrin G, Lessard M; France Intergroupe pour la Leucemie Myeloide Chronique. Report of 34 patients with clonal chromosomal abnormalities in Philadelphia-negative cells during imatinib treatment of Philadelphia-positive chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2004 Aug;18(8):1340-6.
112. McMullin MF, Humphreys M, Byrne J, Russell NH, Cuthbert RJ, O'Dwyer ME. Chromosomal abnormalities in Ph- cells of patients on imatinib. *Blood*. 2003 Oct 1;102(7):2700-1
113. Royer-Pokora B, Hildebrandt B, Redmann A, Herold C, Kronenwett R, Haas R, Drechsler M, Wieland C. Simultaneous occurrence of a t(9;22) (Ph) with a t(2;11) in a

patient with CML and emergence of a new clone with the t(2;11) alone after imatinib mesylate treatment. *Leukemia*. 2003 Apr;17(4):807-10.

114. Hochhaus A, Kreil S, Corbin AS, La Rosée P, Müller MC, Lahaye T, Hanfstein B, Schoch C, Cross NC, Berger U, Gschaidmeier H, Druker BJ, Hehlmann R. Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (STI571) therapy. *Leukemia*. 2002 Nov;16(11):2190-6.
115. Kovitz C, Kantarjian H, Garcia-Manero G, Abruzzo LV, Cortes J. Myelodysplastic syndromes and acute leukemia developing after imatinib mesylate therapy for chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2006 Oct 15;108(8):2811-3.
116. Staal FJ, Cario G, Cazzaniga G, Haferlach T, Heuser M, Hofmann WK, Mills K, Schrappe M, Stanulla M, Wingen LU, van Dongen JJ, Schlegelberger B. Consensus guidelines for microarray gene expression analyses in leukemia from three European leukemia networks. *Leukemia*. 2006 Aug;20(8):1385-92.
117. Huber W, von Heydebreck A, Sueltmann H, Poustka A, Vingron M. Parameter estimation for the calibration and variance stabilization of microarray data. *Stat Appl Genet Mol Biol*. 2003;2:Article3.
118. Tusher VG, Tibshirani R, Chu G Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Apr 24;98(9):5116-21
119. Cross NC, Hughes TP, Feng L, O'Shea P, Bungey J, Marks DI, Ferrant A, Martiat P, Goldman JM. Minimal residual disease after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myeloid leukaemia in first chronic phase: correlations with acute graft-versus-host disease and relapse. *Br J Haematol*. 1993 May;84(1):67-74.
120. Heinrich MC, Griffith DJ, Druker BJ, Wait CL, Ott KA, Zigler AJ. Inhibition of c-kit receptor tyrosine kinase activity by STI 571, a selective tyrosine kinase inhibitor. *Blood*. 2000 Aug 1;96(3):925-32.
121. Ross ME, Zhou X, Song G, Shurtleff SA, Girtman K, Williams WK, Liu HC, Mahfouz R, Raimondi SC, Lenny N, Patel A, Downing JR. Classification of pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Blood*. 2003 Oct 15;102(8):2951-9.
122. Peterková M, Koutná I, Tesarová L, Potesilová M, Kozubek M, Hrabčáková V, Klabusay M, Doubek M, Mayer J. Microarray analysis using a limited amount of cells. *Folia Biol (Praha)*. 2009;55(2):53-60.
123. Lang JE, Magbanua MJ, Scott JH, Makrigiorgos GM, Wang G, Federman S, Esserman LJ, Park JW, Haqq CM. A comparison of RNA amplification techniques at sub-nanogram input concentration. *BMC Genomics*. 2009 Jul 20;10:326.
124. Van Gelder RN, von Zastrow ME, Yool A, Dement WC, Barchas JD, Eberwine JH. Amplified RNA synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 Mar;87(5):1663-7.
125. Dumur CI, Nasim S, Best AM, Archer KJ, Ladd AC, Mas VR, Wilkinson DS, Garrett CT, Ferreira-Gonzalez A. Evaluation of quality-control criteria for microarray gene expression analysis. *Clin Chem*. 2004 Nov;50(11):1994-2002.
126. Brazma A, Hingamp P, Quackenbush J, Sherlock G, Spellman P, Stoeckert C, Aach J, Ansorge W, Ball CA, Causton HC, Gaasterland T, Glenisson P, Holstege FC, Kim

- IF, Markowitz V, Matese JC, Parkinson H, Robinson A, Sarkans U, Schulze-Kremer S, Stewart J, Taylor R, Vilo J, Vingron M. Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. *Nat Genet.* 2001 Dec;29(4):365-71.
127. Draghici S, Khatri P, Eklund AC, Szallasi Z. Reliability and reproducibility issues in DNA microarray measurements. *Trends Genet.* 2006 Feb;22(2):101-9
 128. Tam WF, Gu TL, Chen J, Lee BH, Bullinger L, Fröhling S, Wang A, Monti S, Golub TR, Gilliland DG. Id1 is a common downstream target of oncogenic tyrosine kinases in leukemic cells. *Blood.* 2008 Sep 1;112(5):1981-92.
 129. Fabarius A, Giehl M, Frank O, Duesberg P, Hochhaus A, Hehlmann R, Seifarth W. Induction of centrosome and chromosome aberrations by imatinib in vitro. *Leukemia.* 2005 Sep;19(9):1573-8.
 130. Appel S, Rupf A, Weck MM, Schoor O, Brümmendorf TH, Weinschenk T, Grünebach F, Brossart P. Effects of imatinib on monocyte-derived dendritic cells are mediated by inhibition of nuclear factor-kappaB and Akt signaling pathways. *Clin Cancer Res.* 2005 Mar 1;11(5):1928-40.
 131. Sadanaga A, Nakashima H, Masutani K, Miyake K, Shimizu S, Igawa T, Sugiyama N, Niino H, Hirakata H, Harada M. Amelioration of autoimmune nephritis by imatinib in MRL/lpr mice. *Arthritis Rheum.* 2005 Dec;52(12):3987-96.
 132. Pitini V, Arrigo C, Sauta MG, Altavilla G. Myelodysplastic syndrome appearing during imatinib mesylate therapy in a patient with GIST. *Leuk Res.* 2009 Sep;33(9):e143-4.
 133. Appel S, Balabanov S, Brümmendorf TH, Brossart P. Effects of imatinib on normal hematopoiesis and immune activation. *Stem Cells.* 2005 Sep;23(8):1082-8.
 134. Nygaard V, Hovig E. Options available for profiling small samples: a review of sample amplification technology when combined with microarray profiling. *Nucleic Acids Res.* 2006 Feb 9;34(3):996-1014.
 135. Seshi B, Kumar S, King D. Multilineage gene expression in human bone marrow stromal cells as evidenced by single-cell microarray analysis. *Blood Cells Mol Dis.* 2003 Sep-Oct;31(2):268-85.
 136. Baugh LR, Hill AA, Brown EL, Hunter CP. Quantitative analysis of mRNA amplification by in vitro transcription. *Nucleic Acids Res.* 2001 Mar 1;29(5):E29.
 137. Balabanov S, Bartolovic K, Komor M, Kanz L, Hofmann WK, Brümmendorf TH. Gene expression profiling of normal hematopoietic progenitor cells under treatment with imatinib in vitro. *Leukemia.* 2005 Aug;19(8):1483-5.
 138. Hannema, A. J.; Kluin-Nelemans, J. C.; Hack, C. E.; Eerenberg-Belmer, A. J. M.; Mallee, C.; van Helden, H. P. T. : SLE like syndrome and functional deficiency of C1q in members of a large family. *Clin. Exp. Immun.* 55: 106-114, 1984
 139. Topaloglu, R.; Bakaloglu, A.; Slingsby, J. H.; Mihatsch, M. J.; Pascual, M.; Norsworthy, P.; Morley, B. J.; Saatci, U.; Schifferli, J. A.; Walport, M. J. : Molecular basis of hereditary C1q deficiency associated with SLE and IgA nephropathy in a Turkish family. *Kidney Int.* 50: 635-642, 199

140. Sood R, Bonner TI, Makalowska I, Stephan DA, Robbins CM, Connors TD, Morgenbesser SD, Su K, Faruque MU, Pinkett H, Graham C, Baxevanis AD, Klinger KW, Landes GM, Trent JM, Carpten JD. Cloning and characterization of 13 novel transcripts and the human RGS8 gene from the 1q25 region encompassing the hereditary prostate cancer (HPC1) locus. *Genomics*. 2001 Apr 15;73(2):211-22.
141. Nygaard V, Loland A, Holden M, Langaas M, Rue H, Liu F, Myklebost O, Fodstad O, Hovig E, Smith-Sorensen B: Effects of mRNA amplification on gene expression ratios in cDNA experiments estimated by analysis of variance. *BMC Genomics* 2003, 4:11

7. LISTE DER ABKÜRZUNGEN

µM	micromol
6-FAM	6-Carboxyfluorescein
ALL	Akute Lymphoblastische Leukämie
AML	Akute Myeloische Leukämie
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
Ara-C	Zytosinarabinosid
ARG	“Abl-related Gene”
ATP	Adenosintriphosphat
BAD	„BCL2-Antagonist of Cell Death“
BCL2	„B-Cell Lymphoma 2“
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	Copy-DNA
CML	Chronische Myeloische Leukämie
cRNA	Copy-RNA
CT	Cycle threshold
CTP	Cytidintriphosphat
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E.coli	Escherichia coli
EBMT	European Group for Blood and Marrow Transplantation
EPO-R	Erythropoietin-Rezeptor
FAK	„Focal Adhesion Kinase“

FDR	“False Discovery Rate”
FISH	Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung
FITC	Fluoreszeinthiocyanat
FSC	“Forward Scatter”
G6PDH	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
GAPDH	Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase
GTP	Guanosintriphosphat
GUSB	β -Glucoronidase
GvHD	„Graft versus Host Disease“
HLA	„Human Leukocyte Antigen“
IC50	Mittlere Hemmkonzentration
IFN	Interferon
IGLV	Lambda Light Chain Locus
IRIS	„International Randomized Study of Interferon versus STI571“
ISGF-3	“Interferon-stimulated gene factor 3”
IVT	In Vitro Transkription
JAK	Janus-Kinase
kb	Kilobasen
kD	kiloDalton
LSI	Locus Specific Identifier
MAP	Mitogen-Activated-Protein
M-bcr	Major breakpoint cluster region
m-bcr	Minor breakpoint cluster region
MGB	Minor groove binder
MIAME	“Minimum Information about a Microarray Experiment”
MM	“Mismatch”

MMR	„Major molecular response“
MNC	Mononukleäre Zellen
mRNA	Messenger-RNA
Na2EDTA	Dinatriummethyldiamintetraacetat
Na-Citrat-2H2O	Natriumcitrat-Dihydrat
NaCl	Natriumchlorid
NaEDTA	Natriummethyldiamintetraacetat
NFQ	“Non-fluorescent Quencher”
NP	Nonidet-P
nt	Nukleotide
OA	Oligoarray
PBS	“Phosphate buffered saline”
PCR	„Polymerase Chain Reaction“
PDGFR	“Platelet Derived Growth Factor Receptor”
PE	Phycoerythrin
Ph-Chromosom	Philadelphia-Chromosom
PI-3	Phosphatidylinosintriphosphat
PM	“Perfect Match”
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	“rotations per minute”
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
RT-PCR	“Real Time Polymerase Chain Reaction”
RT-qPCR	“Real Time quantitative Polymerase Chain Reaction”
SAM	Significance Analysis for Microarrays
SH-	Sulfonylharnstoff-
SSC (s. Kontext)	“Side Scatter”
SSC (s. Kontext)	“Sodium Saline Citrate”

STAT

“Signal Transducers and Activators of
Transcription”

vs

versus

VSN

“Variance Stabilization Normalization”

8. DANKSAGUNG

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Haas dafür danken, dass mir die Gelegenheit gegeben wurde, an seiner Klinik zu forschen und den Doktorgrad zu erreichen.

Mein Dank für die hilfreiche wissenschaftliche und moralische Unterstützung bei der Erstellung meiner Doktorarbeit geht vor allem an meinen Doktorvater Herrn Priv.-Doz. Ralf Kronenwett, sowie meinen Betreuer Herrn Priv.-Doz. Frank Neumann.

Ebenso möchte ich mich bedanken bei allen Mitarbeitern, Mitdoktoranden und – Diplomanden des hämatologischen Forschungslabors, die mir in fachlichen und organisatorischen Fragen jederzeit hilfsbereit zur Seite standen. Insbesondere gilt dies für Frau Dipl.-Biol. Simone Bork, Herrn Dr. Ulf Butterweck, Frau Bärbel Junge, Frau Anke Boeckmann und Frau Elke Rosenbaum-König. Herrn Dipl.-Math. Slawomir Kliszewski möchte ich danken für seine Hilfe und geduldigen Erklärungen der biomathematischen Aspekte dieses Projektes.

Auch möchte ich mich bei meiner Familie für ihre jahrelange Unterstützung bedanken. Dies gilt ganz besonders meinem Ehemann für sein grenzenloses Verständnis und seine Motivation.

Diese Arbeit wurde außerdem durchgeführt mit Hilfe der freundlichen Unterstützung der Leukämie Liga e.V.

9. CURRICULUM VITAE

Persönliche Angaben

Name	Nathalie Kremer geb. Teutsch
Adresse	Columbusstrasse 52 40549 Düsseldorf
e-Mail	NTeutsch1981@aol.com
Geburtstag und –Ort	16.03.1981 in Stuttgart
Familienstand	verheiratet

Schulische Laufbahn

1987 – 1991	St.Mauritius-Grundschule, Meerbusch
1991 – 2000	St.Ursula-Gymnasium, Düsseldorf

Studium

2000 – 2007	Studium der Humanmedizin, Heinrich – Heine – Universität Düsseldorf (Physikum 2002)
-------------	--

zusätzliche

Qualifikationen/Abschlüsse

September 2007	Bestehen der United States Medical Licensing Examination (USMLE) Step 2 CK
April 2008	Bestehen der USMLE Step 2 CS in Philadelphia, PA, USA
Oktober 2008	Bestehen der USMLE Step 1
Oktober 2009	Bestehen der USMLE Step 3 in Philadelphia, PA, USA

Promotion

Seit 2002: Genexpressionsprofile der gesunden hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen bei Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie unter Imatinib-Therapie

Veröffentlichungen:

Leukemia 2005, Mar; 19(3) 458-60, Neumann F, Teutsch N, Kliszewski S, Bork S, Steidl U, Brors B, Schimkus N, Roes N, Germing U, Hildebrandt B, Royer-Pokora B, Eils R, Gattermann N, Haas R, Kronenwett R: Gene expression profiling of Ph-chromosome

negative CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells of patients with Ph-positive CML in major molecular remission during therapy with imatinib

Praktische Tätigkeiten

Famulaturen

Anästhesie 02/2004	Dominikuskrankenhaus, Düsseldorf
Unfallchirurgie 08/2004	Florence-Nightingale-Krankenhaus, Düsseldorf
Allgemeine internistische und chirurgische Notfallambulanz 03/2005	Department of Emergency Medicine, Hospital of St.Raphael's, New Haven, USA
pädiatrische Neurochirurgie 08/2005	Universitätsklinikum, Düsseldorf
Kardiologie/Herzchirurgie 10/2005	Adult Congenital Heart Unit, Royal Brompton Hospital, London, England

Praktisches Jahr (14.02.2006 – 15.12.2006)

1. Tertial: Innere Medizin	Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie, Universitätsklinikum Düsseldorf
2. Tertial: Chirurgie	Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie Klinik für Gefäßchirurgie Universitätsklinikum Düsseldorf
3. Tertial: Wahlfach Neurochirurgie	Hospital of Mount Sinai, New York, NY, USA

Weiterbildung

10/2007 – 09/2009	Weiterbildungsassistentin in der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie des Universitätsklinikums Düsseldorf, Prof. Knoefel
12.06.-19.06.2009	Teilnahme am Einführungskurs Intensivmedizin Arnsberg
05.02.-12.02.2010	Teilnahme am Einführungskurs Notfallmedizin Arnsberg

Sonstige ärztliche Tätigkeiten

Seit 05/09	Teilnahme am ärztlichen Dienst der Johanniter und des Arbeiter-Samariter-Bundes
Seit 11/09	Selbständige Tätigkeit als Honorarärztin