

AUS DER
KLINIK FÜR HÄMATOLOGIE, ONKOLOGIE UND KLINISCHE IMMUNOLOGIE
DER HEINRICH-HEINE-UNIVERSITÄT DÜSSELDORF
DIREKTOR: UNIVERSITÄTS-PROFESSOR DR. MED. R. HAAS

**Molekular zielgerichtete Therapie
der Chronisch Myeloischen Leukämie**

Habilitationsschrift

zur Erlangung der Venia legendi für das Fach
Innere Medizin
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Dr. med. Frank Neumann
aus Bonn

2008

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
1. Einleitung	2
2. Blutstammzelltherapie der chronisch myeloischen Leukämie.....	6
2.1 Optimierung der „Graft Versus Host Disease“ Prophylaxe (Ref. A).....	6
2.2 Nicht myeloablative periphere allogene Blutstammzelltransplantation (Ref. B).....	8
2.3 Chancen und Risiken der allogenen peripheren Blutstammzell-Transplantation - Risikostratifizierung mit Hilfe des Sepsis Related Organ Failure Assessment (SOFA) Score (Ref. C).....	10
3. Bcr-abl Inhibition zur Therapie der chronisch myeloischen Leukämie	17
3.1 Molekulares Monitoring von bcr-abl mRNA (Ref. D).....	17
3.2 Therapieentscheidung basierend auf molekularem Monitoring („molecular response adapted therapy“) (Ref. E).....	20
3.3 Einfluss der bcr-abl Blockade durch Imatinib auf normale Hämatopoiese (Ref. F)	24
3.4 Imatinib zur Therapie von Patienten mit atypischer chronischer myeloischer Leukämie (Ref. G).....	26
3.5 Molekulare Veränderungen in vivo während der Therapie mit Imatinib.....	28
4. Schlussfolgerung und Ausblick	39
5. Literaturverzeichnis	41
6. Abkürzungsverzeichnis	52
7. Danksagung.....	54
8. Zusammengefasste Publikationen.....	55

Anhang: Sonderdrucke der zusammengefassten Publikationen

Zusammenfassung

Die chronische myeloische Leukämie (CML) ist eine maligne Stammzellerkrankung, deren charakteristisches Merkmal eine reziproke Translokation der Chromosomen 9 und 22 ist und so zur Entstehung des Philadelphiachromosoms (Ph) führt. Durch diese Translokation kommt es zur Bildung des bcr-abl Onkogens, welches aufgrund einer gesteigerten Tyrosinkinaseaktivität die pathophysiologisch entscheidende Rolle bei der leukämischen Transformation der Blutstammzelle spielt.

Die allogene periphere Blutstammzelltransplantation (PBSZT) nach myeloablativer Konditionierung gilt als kurativ bei der Behandlung von Patienten mit CML. Dabei handelt es sich um eine risikoreiche Therapie mit lebensbedrohlichen Nebenwirkungen. Im ersten Teil meiner Arbeit stelle ich unsere Untersuchungen zur Risikosenkung der allogenen PBSZT dar. Hierzu gehören die Verwendung von Cyclosporin A (CSA) in Kombination mit Mycophenolat-Mofetil (MMF) anstelle von Methotrexat (MTX) zur Prophylaxe einer „Graft versus host disease“ (GvHD) sowie die nicht myeloablative Konditionierung zur Reduktion der therapieassoziierten Toxizität. Des Weiteren beleuchte ich den Wert des Sepsis Related Organ Failure Assessment (SOFA) "Score" zur Abschätzung der Überlebenswahrscheinlichkeit nach allogener PBSZT, in deren Verlauf es zu einer intensivmedizinischen Intervention mit mechanischer Beatmung gekommen ist.

Der zweite Schwerpunkt meiner Arbeit handelt von Untersuchungen zur Therapie der CML mit Imatinib (Glivec, STI 571), einem molekular zielgerichteten Tyrosinkinaseinhibitor des bcr-abl Proteins. Nach Einführung dieses Medikamentes ist die allogene PBSZT in der Therapie der CML immer mehr in den Hintergrund gerückt. Ein Aspekt betrifft dabei eine Methode zur quantitativen Beurteilung der bcr-abl mRNA mit dem Ziel der Überwachung und Anpassung der Therapie. Darüber hinaus haben wir die molekularen Signalwege und deren Veränderung während der Therapie mit Imatinib untersucht. Ergänzend stelle ich die Ergebnisse unserer Analysen zum Einfluss von Imatinib auf die molekulare Signatur von gesunden CD 34 positiven hämatopoietischen Stamm- und Progenitorzellen dar sowie die Behandlungsergebnisse von Imatinib bei Patienten mit atypischer CML.

1. Einleitung

Die chronisch myeloische Leukämie (CML) ist eine maligne Erkrankung der blutbildenden Stammzelle und wurde erstmals 1845 von Rudolf Virchow als „weißes Blut“ beschrieben¹. Über ein Jahrhundert später entdeckten Nowell und Hungerford die für die CML charakteristische Chromosomenaberration, die sie als Philadelphiachromosom bezeichneten^{2,3}. Im Jahr 1973 entdeckte Jane Rowley, dass diese chromosomale Aberration aus einer reziproken Translokation der Chromosomen 9 (abl) und 22 (bcr) resultiert⁴. Diese Translokation führt zur Bildung des bcr-abl Onkogens, welches durch eine gesteigerte Tyrosinkinaseaktivität die entscheidende Rolle bei der leukämischen Transformation einer Blutstammzelle spielt⁴. In vitro Untersuchungen und Experimente am Mausmodell haben gezeigt, dass bcr-abl alleine ausreicht, die maligne Transformation zur CML zu induzieren⁵⁻⁸. Diese molekulare Alteration tritt in einer pluripotenten hämatopoietischen Stammzelle auf, die hierdurch einen Proliferationsvorteil gegenüber normalen hämatopoietischen Zellen gewinnt und als Ph positiver Klon die normale Hämatopoiese verdrängt⁹. Die Therapie von Patienten mit CML im neunzehnten Jahrhundert war äußerst unbefriedigend, wobei insbesondere Versuche mit Arsenderivaten zu nennen sind¹⁰. 1950 erfolgten die ersten Therapien mit Busulfan, welches in der Folge durch Hydroxyharnstoff und zu Beginn der achtziger Jahre durch Interferon (INF) ergänzt bzw. abgelöst wurde. Mit alpha INF war es erstmals möglich zytogenetische Remissionen zu induzieren. Seit Einführung der allogenen PBSZT stellt diese bis heute die einzig kurative Therapieoption für Patienten mit einem passenden HLA identischen Spender dar. Eine Transplantation mit den Blutstammzellen eines HLA-identischen Geschwisterspenders kommt für Patienten bis zum 60. Lebensjahr infrage, während eine Transplantation mit Zellen eines Fremdspenders bis zum 50. Lebensjahr als möglich gilt. Im Jahre 1990 war die CML die häufigste Erkrankung weltweit, bei der eine allogene PBSZT durchgeführt wurde¹¹. Ungeachtet dessen handelt es sich bei dieser Therapie um einen Hochrisikoverfahren. Neben der Akuttoxizität durch die Chemotherapie und die Bestrahlung spielt eine langfristige Toxizität in Form einer immunologischen Reaktion der Spenderzellen gegen Gewebe respektive Organe des Empfängers, die GvHD eine wesentliche Rolle. Zur Reduktion der medikamentös bzw. strahlenbedingten Toxizität werden dosisreduzierte oder nicht-myeloablative Konditionierungen mit einer gering dosierten Ganzkörperbestrahlung von zwei Gy in Kombination mit einem lymphotoxischen Purinanalogon wie z.B. Fludarabin eingesetzt, die insbesondere für ältere Patienten oder Patienten mit Vorerkrankungen eine mögliche Therapieoption darstellen. Ein fester Bestandteil dieser allogenen Stammzelltherapiekonzepte ist die Unterdrückung der GvHD bei maximaler Ausnutzung des so genannten „graft versus leukemia“ (GvL) Effektes.

Eine Möglichkeit hierfür besteht darin, den Patienten mit CML anstelle des kompletten Transplantates zunächst nur T-Zell depletierte CD 34 positive Blutstammzellen zu verabreichen, wodurch das Risiko einer GvHD verringert wird. Nach der hämatopoetischen Rekonstitution werden dann die zuvor separierten T-Zellen zurückgegeben. Durch dieses von Kolb et al. erstmals 1990 durchgeführte Verfahren kann die Immunkompetenz des Patienten verbessert werden und gleichzeitig der letztlich gewünschte GvL-Effekt provoziert werden¹². Entscheidend nach einer allogenen PBSZT und insbesondere nach Donorlymphozytenverabreichung ist das Verhältnis zwischen gewünschter GvL und GvHD Reaktion. Hierbei hat die adäquate Titration von T-Zell inhibierenden Medikamenten eine essentielle Bedeutung. Zum Einsatz kommen Calcineurin Inhibitoren wie CSA oder Tacrolimus, klassische Chemotherapeutika wie Methotrexat, Steroide sowie MMF und der mTor Inhibitor Sirolimus. Ein Konsens hinsichtlich des am Besten geeigneten Immunsuppressivums ist Gegenstand laufender Studien.

Eine neue Ära in der Therapie der CML, in welcher das allogene PBSZT-Konzept zunehmend in den Hintergrund rückt, begann 1998 mit der Einführung eines neuen molekularen Wirkprinzips, der Hemmung des bcr-abl Proteins durch den Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib. Das Medikament führte in klinischen Phase I-III Studien zu hämatologischem und zytogenetischem Ansprechen bei Patienten mit CML in allen Krankheitsstadien¹³⁻¹⁶. Bei Patienten in später chronischer Phase zum Beispiel, bei denen eine vorausgehende Interferontherapie versagt hatte, konnte durch Imatinib bei 60 % der Patienten ein komplettes zytogenetisches Ansprechen und in 95 % der Fälle eine komplette hämatologische Remission erreicht werden¹⁴. Der direkte Vergleich zwischen Imatinib und der bisherigen Standardtherapie bei Patienten mit neu diagnostizierter CML in chronischer Phase (CP) zeigte eine signifikante Überlegenheit des neuen Medikamentes hinsichtlich zytogenetischer, hämatologischer und molekularbiologischer Ansprechraten¹⁶. Der molekulare Wirkmechanismus des Imatinibs basiert im Wesentlichen auf einer kompetitiven Hemmung der Tyrosinkinasen bcr-abl, c-kit, „platelet derived growth factor -receptor“ (PDGF-R) und des „abl related gene“ (ARG). In der Folge dieser Hemmung kommt es zu zahlreichen „downstream“-Veränderungen von intrazellulären Wachstums-kaskaden, die letztlich in der CML-Zelle eine Verminderung von Apoptoseschutz und einen Proliferationsreiz induzieren (Abbildung 1)¹⁷⁻²³.

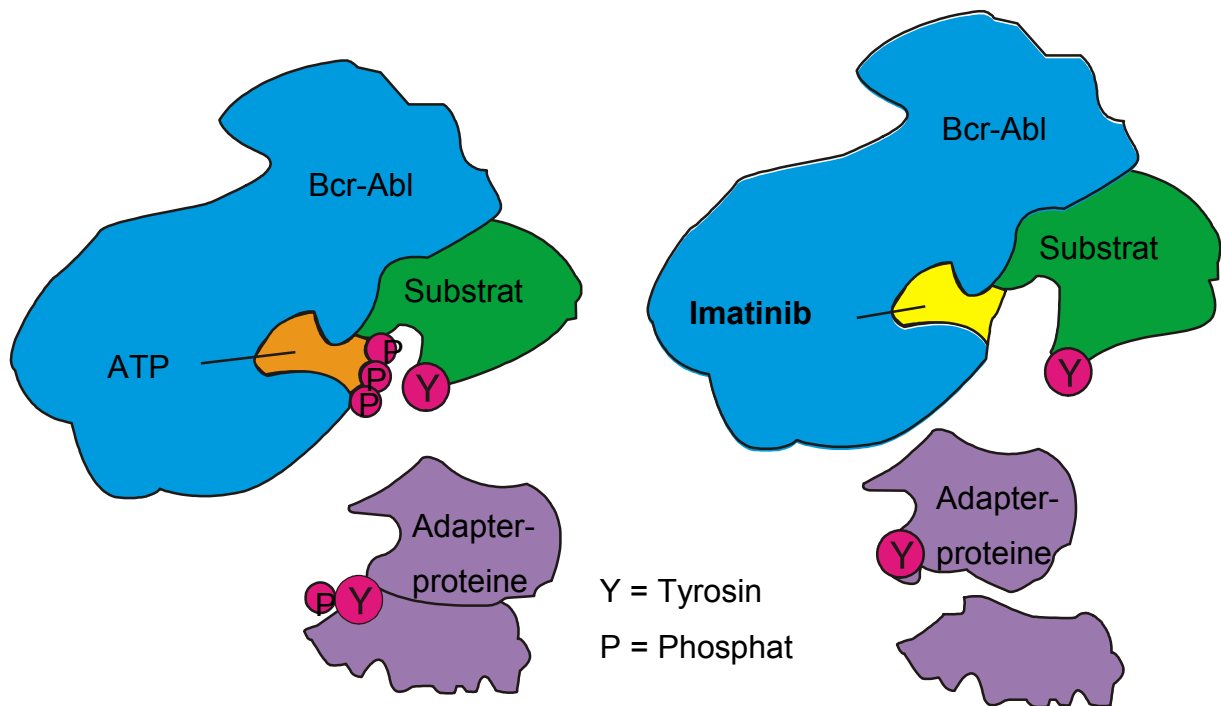


Abbildung 1: Molekularer Wirkmechanismus des Imatinibs.

Imatinib bindet an der ATP Bindungsstelle des bcr-abl Proteins und verhindert so die Phosphorylierung der nachfolgenden Signalkaskaden, die im phosphorylierten Zustand zu einer verminderten Apoptose und vermehrten Proliferation der CML Zelle führen.

Die Vielzahl der durch Imatinib inhibierten Tyrosinkinasen erklärt, warum das Medikament auch bei anderen Erkrankungen erfolgreich ist, die durch eine Überaktivität dieser Proteine ganz oder teilweise bedingt ist. Zu nennen sind vor allem c-kit positive gastrointestinale Stromatumoren und atypische chronische myeloische Leukämien mit einer Überexpression des PDGF-R^{24, 25}. Die Inhibition der oben genannten Tyrosinkinasen birgt allerdings auch potentielle Gefahren. Das ABL interagiert mit mehreren Proteinen wie z.B. dem p73 oder RAD 51^{26, 27}, die eine wesentliche Funktion bei DNA Reparaturmechanismen haben. Das c-kit ist von zentraler Bedeutung für die Differenzierung und Proliferation hämatopoietischer Stammzellen²⁸ und PDGF-R wird von Knochenmarkstromazellen exprimiert, welche wesentliche Bestandteile des hämatopoietischen „microenvironment“ darstellen. Eine Hemmung von ABL, c-KIT oder PDGF-R wurde daher als ursächlich für funktionelle Störungen der Hämatopoiese oder für sekundäre Karyotypabnormalitäten während der Therapie mit Imatinib angesehen^{29, 30}.

Die Effizienz der Therapie mit dem oralen Tyrosinkinaseinhibitor wird bisher durch zytogenetische Analysen und dem Nachweis eines hämatologischen Ansprechens gemessen. Hinzu kommt allerdings seit jüngster Zeit die Quantifizierung der bcr-abl mRNA im peripheren Blut oder Knochenmark durch quantitative „real time“ RT-PCR (qPCR) Techniken, die

eine erheblich genauere Messung des molekularen Ansprechens erlauben. Hierbei korrelieren die Ergebnisse der qPCR hervorragend mit dem Krankheitsstadium sowie dem zytogenetischen Ansprechen bei Patienten, die mit Interferon, Imatinib oder allogener PBSZT behandelt wurden³¹⁻⁴³.

Im Rahmen dieser Arbeit werden unsere Analysen hinsichtlich der Optionen zur Risikominimierung der allogenen PBSZT bei der CML dargestellt. Im zweiten Teil werden die Ergebnisse unserer Untersuchungen zur Therapie der CML mit Imatinib und zum molekularen Monitoring erläutert. Des Weiteren werden CML typische molekulare Signalwege in CD 34 positiven Ph positiven hämatopoietischen Stamm- und Progenitorzellen und deren Veränderung während der Therapie mit Imatinib beschrieben. In Ergänzung hierzu werden die Ergebnisse unserer Untersuchungen des Einflusses von Imatinib auf die molekulare Signatur von gesunden CD 34 positiven hämatopoietischen Stamm- und Progenitorzellen aufgezeigt sowie die Wirkung von Imatinib bei der Behandlung von Patienten mit atypischer CML geschildert.

2. Blutstammzelltherapie der chronisch myeloischen Leukämie

2.1 Optimierung der „Graft Versus Host Disease“ Prophylaxe (Ref. A)

Obgleich die allogene periphere Blutstammzelltransplantation bei der Behandlung der CML grundsätzlich kurativer Natur ist, birgt dieses Therapieverfahren ein nicht unerhebliches, teilweise lebensbedrohliches Risiko: Die immunologische Reaktion des Spendermarkes gegen Gewebe respektive Organe des Empfängers, die so genannte GvHD. Diese Komplikation stellt den Hauptgrund für transplantationsbedingte Morbidität und Mortalität dar⁴⁴. Eine intensive immunsuppressive Behandlung durch T-Zell depletierende Medikamente kann das Risiko einer GvHD zwar reduzieren, führt jedoch auf der anderen Seite zu einer höheren Rate an Versagen des Transplantates oder einem Rückfall der Erkrankung⁴⁵⁻⁵⁰. Eine Kombination aus CSA und MTX ist aktuell die Standardtherapie zur GvHD Prophylaxe⁵¹⁻⁵³. Mycophenolat-Mofetil (MMF) ist ein Inhibitor der Synthese von Purin Nukleotiden, der zu einer verminderten Proliferation von aktivierten Lymphozyten führt und zunächst erfolgreich zur Abstoßungsprophylaxe nach allogener Nierentransplantation eingesetzt wurde⁵⁴. In der Folge wurde MMF dann auch alleine oder in Kombination mit anderen Immunsuppressiva für die Behandlung akuter oder chronischer GvHD nach allogener Knochenmark- oder peripherer Blutstammzelltransplantation verwendet⁵⁵⁻⁵⁸. Auch nach einer nicht myeloablativen Konditionierung und anschließender allogener PBSZT ist diese Form der Immunsuppression wirksam⁵⁹.

Wir haben in einer retrospektiven „Single Center“ Analyse die Kombinationen von CSA/MTX und CSA/MMF hinsichtlich ihres Potentials als GvHD Prophylaxen miteinander verglichen. Insgesamt wurden 93 Patienten untersucht, die alle Zellen eines HLA-identischen Geschwisters nach myeloablativer Konditionierung erhalten hatten. Das mediane Alter der Patienten lag bei 35 Jahren (17–59). Achtundvierzig Patienten waren männlich und 45 weiblich. Sechsenddreißig Patienten hatten eine akute myeloische Leukämie (AML) oder ein myelodysplastisches Syndrom (MDS), 20 eine akute lymphatische Leukämie (ALL) und 37 eine CML. Von 1989 bis 2003 erhielten 26 Patienten CSA in Kombination mit MMF und 67 Patienten CSA mit MTX als GvHD Prophylaxe nach Hochdosischemotherapie alleine (n = 31) oder in Kombination mit Ganzkörperbestrahlung (TBI) (n = 67). Der Zeitpunkt der letzten Nachsorgeuntersuchung war Juni 2004. Zum Zeitpunkt der Transplantation waren alle Patienten in kompletter Remission (CR) oder chronischer Phase (CP). Das mediane „Follow-up“ nach Transplantation bei den Patienten, die mit CSA/MMF behandelt wurden, betrug 17 Monate (2-65) und in der CSA/MTX Gruppe 39 Monate (1-173).

Die GvHD Prophylaxe in der CSA/MTX Gruppe bestand aus einer Kombination von intravenösem CSA in einer Dosierung von 3 mg/kg/Tag sowie intravenösem MTX in einer Dosierung von 15 mg/m² an Tag eins gefolgt von 10 mg an Tag drei und sechs. Im Anschluss wurde das CSA dem Blutspiegel angepasst, der zwischen 200 und 300 ng/dl liegen sollte. Patienten in der CSA/MMF Gruppe erhielten MMF in einer Dosierung von 1000 mg zwei bis drei Mal täglich anstelle von MTX. MMF wurde oral oder intravenös abhängig von Übelkeit, Erbrechen oder Mukositis des Patienten verabreicht.

Nach uni- und multivariater Analyse zeigte sich weder ein signifikanter Unterschied im Gesamtüberleben der beiden Gruppen mit 2-Jahres Überlebensraten von 55% (CSA/MTX) und 76% (CSA/MMF) noch in der Rezidivrate oder der therapieassoziierten Mortalität. Des Weiteren fand sich auch kein statistisch signifikanter Unterschied in der Inzidenz von akuter bzw. chronischer GvHD. Akute GvHD II-IV Grades trat bei 61% der Patienten die mit CSA/MTX und bei 38% der Patienten, die mit CSA/MMF behandelt wurden auf. Eine chronische GvHD trat bei 45% (CSA/MTX) bzw. 50% (CSA/MMF) der Patienten auf.

Der einzige Unterschied lag in der Zeit bis zur Leukozytenrekonstitution ($P < 0.0001$, log rank test; hazard ratio 5.46; 95%-Konfidenzintervall 2.94–10.14). Patienten in der CSA/MMF Gruppe erreichten eine Leukozytenzahl von über 1000/μl nach einem Median von 12 Tagen (7–19) im Vergleich zu 18 Tagen (11–62) für Patienten in der CSA/MTX Gruppe. Obgleich sich die Ergebnisse für das Gesamtüberleben, die Rezidivrate und die therapieassoziierte Mortalität statistisch nicht signifikant unterschieden, zeigte sich für die Patienten, die mit CSA/MMF behandelt wurden, jeweils zumindest ein Trend in Richtung eines besseren Ergebnisses als für die Gruppe der Patienten, die CSA/MTX erhalten hatten (Abbildung 2).

In der Zusammenschau der Ergebnisse ist die Kombination aus CSA/MMF zur GvHD Prophylaxe daher mindestens genauso gut wie das CSA/MTX Regime mit allerdings weniger hämatopoietischer Toxizität. Dies hat dazu geführt, dass diese Kombination heute als Standard zur GvHD Prophylaxe nach allogener PBSZT mit Zellen eines HLA identischen Geschwisters verabreicht wird.

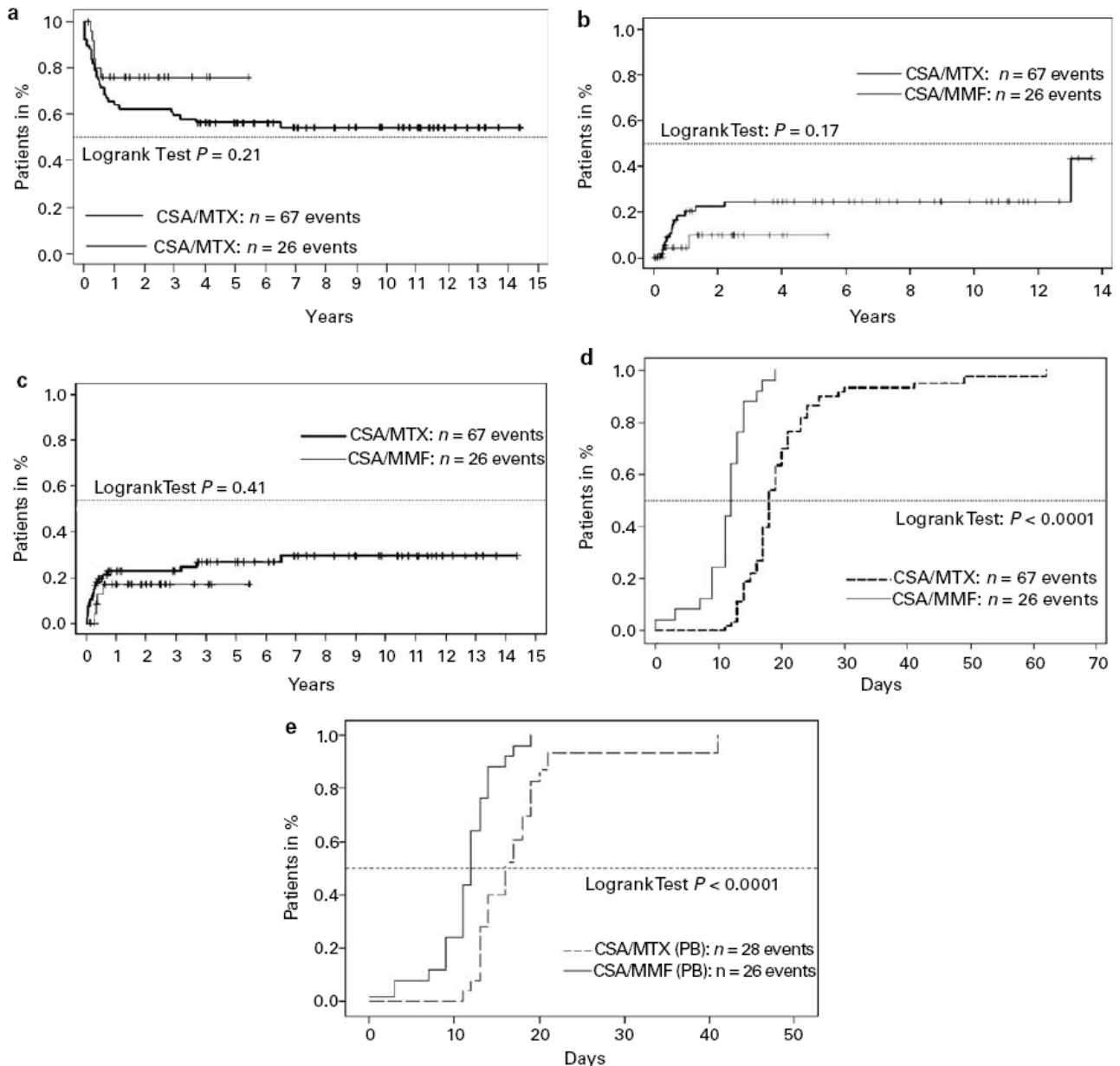


Abbildung 2: Überlebenswahrscheinlichkeit (a), Rezidivrate (b), therapieassoziierte Mortalität (c), Zeit bis zur hämatopoietischen Rekonstitution von allen Patienten, die mit CSA/MMF versus CSA/MTX behandelt wurden (d) sowie von den Patienten, die periphere Blutstammzellen erhalten hatten und mit CSA/MMF versus CSA/MTX behandelt wurden (e).

2.2 Nicht myeloablative periphere allogene Blutstammzelltransplantation (Ref. B)

Angesichts der Toxizität, die mit einer Hochdosischemotherapie und allogener PBSZT einhergeht, stellt diese eine Therapie dar, welche lediglich für Patienten unter fünfzig Jahren ohne relevante Nebenerkrankungen in Frage kommt⁶⁰. Für Patienten über 60 Jahre oder solche mit erheblicher Komorbidität wurden dosisreduzierte Konditionierungsverfahren entwickelt, die hinsichtlich ihres Nebenwirkungsprofils verträglicher sind als die klassischen myeloablativen Therapien. Hierbei wird die „Graft versus Leukemia“ Reaktion, welche erst-

mals 1950 beschrieben wurde genutzt⁶¹⁻⁶⁴. Storb et al. beschrieben als Erste die minimale zytotoxische immunsuppressive Therapie, die notwendig war, um bei Hunden ein dauerhaftes Anwachsen einer Spenderhämatopoiese zu gewährleisten⁶⁵. Eine einzelne Dosis von 200 cGy TBI gefolgt von CSA und MMF erwies sich hierbei als ausreichend, um das Anwachsen HLA identischer Donorzellen zu ermöglichen. Bei der ersten Anwendung an Menschen in einer „Multi Center“ Studie, die 45 Patienten umfasste, führte dieses Therapieverfahren bei allen Patienten mit minimaler Toxizität zu einem permanenten gemischten bzw. teilweise kompletten Donor-Chimärismus⁶⁶. Da es im weiteren Verlauf dennoch bei 20 % der Patienten zu einem Versagen des Transplantates kam verwendeten Storb et al. daraufhin eine Kombination aus Fludarabin und niedrig dosierter TBI. Im Rahmen einer „Single Center“ Studie haben wir die Ergebnisse und Komplikationen dieses Verfahrens zwischen September 1999 und September 2001 bei 34 Patienten, die nicht für eine myeloablative Konditionierung geeignet waren, evaluiert. Das Konditionierungsregime bestand aus Fludarabin in einer Dosierung von $3 \times 30 \text{ mg/m}^2$ in Kombination mit einer TBI von 200 cGy. Acht Patienten waren älter als 55 Jahre und 19 Patienten litten an Organfunktionseinschränkungen, die eine myelobalative Therapie verboten. Die restlichen sieben Patienten wurden nicht myeloablativ behandelt, da sie ein myeloablatives Verfahren nicht wünschten. Das mediane „Follow up“ lag bei 325 Tagen (100–844). Die peripheren Donor-Blutstammzellen stammten in 28 Fällen von HLA-identischen Geschwistern und bei sechs Patienten von nicht verwandten passenden Spendern. Das mediane Alter der Patienten lag bei 47 Jahren (26–68). Es handelte sich um 22 männliche und 12 weibliche Patienten, von denen 91% zuvor bereits zytotoxische Therapien erhalten hatten.

Ein Patient entwickelte eine Niereninsuffizienz III Grades nach WHO während ein anderer Patient Zeichen einer Leberschädigung III Grades aufwies. Hinweise für eine „Veno-Occlusive Disease“ (VOD) traten bei keinem der Patienten auf. Bei 18 Patienten trat eine akute GvHD nach einem Median von 79 Tagen (16–228) auf. Bei 30 Patienten sprach die GvHD auf eine Therapie mit Calcineurininhibitoren an, vier Patienten benötigten zusätzlich eine Therapie mit Infliximab bzw. ATG⁶⁷. Zwei Patienten hatten eine therapierefraktäre GvHD und verstarben. Fünfundvierzig Prozent der Patienten entwickelten eine chronische GvHD.

Unter den untersuchten Patienten waren vier Patienten mit CML, wobei sich zwei dieser Patienten in einer CP und zwei in einer akzelerierten Phase befanden. Beide Patienten, die in CP behandelt wurden, entwickelten einen kompletten Donorchimerismus und wurden negativ in der bcr-abl nested RT-PCR. Erwähnenswert erscheint hier die Tatsache, dass einer dieser Patienten spontan 57 Tage nach der Transplantation eine molekulare Remission erreichte, der

Zweite jedoch erst nach Infusion von Donorlymphozyten an Tag 154. Beide Patienten entwickelten eine milde akute GvHD Grad I und leben aktuell mit chronischer GvHD (limited) im einen und ohne jegliche Zeichen einer GvHD im anderen Fall. Von den beiden Patienten, die in akzelerierter Phase transplantiert wurden, transformierte die Erkrankung bei einem Patienten in einen Blastenschub und wurde im Anschluss erfolgreich mit Imatinib behandelt. Bei dem anderen Patienten trat ein zunehmender Donorchimerismus bis zum Tag 100 nach Transplantation auf, bis die CML erneut progredient war und das Transplantat trotz zweimaliger Donorlymphozyteninfusionen abgestoßen wurde. Der Patient wurde daraufhin ebenfalls erfolgreich mit Imatinib behandelt. Neben dem therapeutischen Erfolg dieses Transplantationsverfahrens insbesondere für die Patienten in CP war das minimale Nebenwirkungsprofil von entscheidender Bedeutung, welches lediglich minimale Übelkeit und Erbrechen im Anschluss an die Bestrahlung umfasste.

In der Zusammenschau der Ergebnisse stellt die nicht myeloablative Konditionierung für Patienten mit CML in CP, die für eine klassische myeloablative Konditionierung nicht in Frage kommen, eine geeignete alternative Therapieoption dar.

2.3 Chancen und Risiken der allogenen peripheren Blutstammzell-Transplantation - Risikostratifizierung mit Hilfe des Sepsis Related Organ Failure Assessment (SOFA) Score (Ref. C)

Eine Hochdosischemotherapie gefolgt von allogener PBSZT ist ein potentiell kurativer Ansatz bei der Behandlung der CML⁶⁸. Ungeachtet dessen ist diese Therapieform häufig mit lebensbedrohlichen Komplikationen wie z.B. schweren Infektionen oder GvHD assoziiert⁶⁹. Dies hat zur Folge, dass bei einer nicht unerheblichen Anzahl von Patienten im Anschluss an eine Hochdosischemotherapie mit anschließender allogener PBSZT eine Verlegung auf die Intensivstation (IS) mit Beatmung erforderlich ist⁷⁰⁻⁷³. Obgleich insgesamt die Überlebenschancen für Patienten, die nach allogener PBSZT auf eine IS verlegt werden zugenommen hat, ist es insbesondere bei transplantierten Patienten, die beatmet werden müssen in den letzten zehn Jahren nicht zu einer signifikanten Verbesserung der Überlebensraten gekommen^{74, 75}. So beschrieben Rubenfeld und Crawford 1996 für diese Patienten eine Überlebenswahrscheinlichkeit von sechs Prozent⁷⁶ und in einer jüngeren Veröffentlichung aus dem Jahr 2006 Pene et al. eine 1-Jahres Überlebenswahrscheinlichkeit von elf Prozent⁷⁵.

Hinsichtlich prognostischer Parameter zur Abschätzung des Ausgangs eines solchen Intensiv Aufenthaltes finden sich eine Vielzahl teils widersprüchlicher Veröffentlichungen⁷⁷. Huaranga et al.⁷⁸ berichten über 60 Patienten, die nach allogener Stammzelltransplantation beatmungspflichtig wurden. Sie fanden heraus, dass das Auftreten einer GvHD, der Zeitraum zwi-

schen Transplantation und Verlegung auf die IS sowie die zugrunde liegende Erkrankung hinsichtlich des Überlebens relevante unabhängige Variablen darstellten. Jackson et al. schildern, dass in einer vergleichbaren Gruppe von Patienten der Bedarf an Katecholaminen sowie der Bilirubinwert prädiktiv für das Überleben seien⁷⁰. Andere Arbeitsgruppen fanden heraus, dass intensivmedizinische „Scoring“-Verfahren wie z.B. der APACHE (Acute Physiology and Chronic Health Evaluation) und der SAPS Score (Simplified Acute Physiology Score) nicht geeignet sind für Patienten mit CML oder anderen hämatologischen Erkrankungen, die mit einer allogenen PBSZT behandelt wurden und in deren Folge auf eine Intensivstation verlegt werden mussten^{79, 80}. Um für diese Patienten Kriterien zu definieren, die zwischen Überleben und nicht Überleben eines Intensivaufenthaltes nach allogener PBSZT differenzieren können, haben wir eine retrospektive „Single-Center“-Studie durchgeführt, innerhalb der Patienten erfasst wurden, welche in unserer Klinik ateminsuffizient nach allogener PBSZT auf die IS verlegt wurden. Ziel der Untersuchung war eine Erleichterung des Entscheidungsprozesses hinsichtlich der Fortführung bzw. der Intensität der Intensivbehandlung in dieser speziellen Gruppe von Patienten. Zwischen Januar 1999 und Februar 2006 wurden 64 von 319 Patienten mit hämatologischen Grunderkrankungen, die in unserer Klinik eine Hochdosismotherapie mit anschließender allogener PBSZT (myeloablative Konditionierung = 209; nicht myeloablative Konditionierung = 110) erhalten haben in diese Studie inkludiert. Die Kriterien auf die IS verlegt zu werden entsprachen hierbei denen des American College of Critical Care Medicine und der Society of Critical Medicine⁸¹. Es handelt sich um eine IS, die kontinuierlich von Ärzten der Abteilung für Kardiologie, Pulmonologie und Angiologie sowie von Ärzten unserer Transplantationseinheit betreut wird. Folgende Daten wurden in die Analyse einbezogen: Alter, Geschlecht, Diagnose, Status der Erkrankung zum Zeitpunkt der Transplantation, Zeitraum der Diagnosestellung bis zur Transplantation, Konditionierung, Quelle der Stammzellen und Typ des Spenders. Wir erfassten des Weiteren die Indikationen für die IS Behandlung, die Länge des IS-Aufenthaltes, die Zeit von der Transplantation bis zur Aufnahme auf der IS, die Dauer der Beatmung sowie das Vorhandensein von GvHD oder einer VOD. Die Indikationen für die IS Aufnahme und die Todesursachen wurden in Lungenkomplikationen, Sepsis, Blutung, Nierenversagen, Status epilepticus und andere unterteilt. Die GvHD wurde unter Verwendung von Standardkriterien klassifiziert⁸². Die Diagnose der VOD beruhte auf klinischen und Ultraschall-Untersuchungen. Außerdem registrierten wir die Notwendigkeit einer Dialyse und Tracheotomie. In Ergänzung hierzu haben wir die den SAPS II und den SOFA Score definierenden Variablen sowie den Blut PH, den Glukosespiegel als auch den Hämatokrit erfasst. Für die statistischen Analysen verwendeten wir Excel (Micro-

soft) und SPSS für Windows (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). Kontinuierliche Variablen wurden als Mediane angegeben, kategorische Variablen als Zahlen und Prozentsätze. Zur Analyse der Normalverteilung der Variablen wurde der Kolmogorow Smirnow-Test verwendet. Alle oben erwähnten Variablen wurden eingeschlossen. In Bezug auf den prognostischen Einfluss für das Überleben des IS Aufenthaltes wurden kontinuierliche Variablen mit dem Mann-Whitney U-Test verglichen, wenn sie nicht normal und mit dem Student T-Test wenn sie normal verteilt waren. Kategorische Variablen wurden mit dem Chi-Quadrat Test verglichen. Alle univariat signifikanten Parameter wurden in eine multivariate logistische Regressions-Analyse eingeschlossen. Der Log Rank Test wurde verwendet, um die mittels Kaplan Meier Analysen ermittelten Überlebenswahrscheinlichkeiten zu vergleichen.

Von 319 Patienten, bei denen eine allogene PBSZT durchgeführt wurde, mussten 64 (20%) im Mittel nach 56 Tagen (0-631) im Anschluss an die Hochdosistherapie auf die IS verlegt werden. Erwähnenswert erscheint hier die Tatsache, dass sich der jährliche Anteil von im Mittel neun Patienten, die auf die IS verlegt wurden während der Beobachtungsperiode nicht änderte. Bei den Patienten handelte es sich um 24 Frauen und 40 Männer. Ihr mittleres Alter war 47 Jahre (17-162). Neunundvierzig Patienten hatten eine myeloablative Konditionierung und 15 eine nicht myeloablative Konditionierung erhalten. Die Charakteristika dieser Patienten sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Hauptgründe für die Aufnahme auf die IS waren Lungenkomplikationen (53 %), Sepsis (22 %), Nierenversagen (9 %) sowie Status epilepticus und Blutungen in jeweils drei Prozent der Fälle. Alle Patienten benötigten maschinelle Beatmung für einen medianen Zeitraum von elf Tagen (1-84). Neunzehn von 49 Patienten (39%), die eine myeloablative Konditionierung erhalten hatten, überlebten den IS-Aufenthalt im Durchschnitt neun Monate (2-29). In der Gruppe der 15 Patienten, bei denen eine nicht myeloablative Konditionierung und anschließend eine allogene PBSZT durchgeführt wurde, konnten drei (20 %), mit einer Überlebens-Zeit von vier, fünf und zwölf Monaten von der IS entlassen werden. Das spiegelt einen Überlebens-Vorteil für die Patienten nach myeloablativer Konditionierung wieder, der allerdings nicht statistisch signifikant war. Sepsis war die Todessursache von 56% der Patienten gefolgt von Lungenkomplikationen bei 16% der Patienten. Die verbleibenden Patienten (27%) entwickelten eine Vielfalt von tödlichen Organ-Komplikationen wie Leber-, Nieren- oder Herzversagen. Alle zuvor erwähnten Parameter wurden mittels univariater und multivariater Analyse hinsichtlich ihrer prognostischen Bedeutung evaluiert. Die in der univariaten Analyse ermittelten Parameter, die mit einer besseren Prognose bezüglich des IS Überlebens assoziiert waren, waren ein SOFA Score <12 - wobei es sich hier um den mittleren SOFA Score am Tag der Aufnahme der kompletten

Gruppe von Patienten handelte-, ein Serum-Harnstoff-Wert ≤ 60 mg/dl und das Fehlen einer VOD. Betrachtete man die Ergebnisse der multivariaten Analyse so unterschieden nur der SOFA Score <12 und der Serum-Harnstoff-Wert ≤ 60 mg/dl zwischen Überlebenden und nicht Überlebenden. Dies spiegelte sich in der Tatsache wieder, dass überhaupt nur zwei Patienten mit einem SOFA Score ≥ 12 den Intensivaufenthalt überlebten (Abbildung 3 und 4). Es muss hierbei natürlich berücksichtigt werden, dass der SOFA Score durch die „Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine“ entwickelt wurde, um Organdysfunktionen bei Intensivpatienten besser zu beschreiben und nicht um Überlebenswahrscheinlichkeiten zu ermitteln. Nicht desto trotz erscheint der SOFA Score zu diesem Zwecke geeignet, da einer der Hauptgründe für die Verlegung auf die IS und die Haupttodesursache in unserer speziellen Patientengruppe eine Sepsis war. Ein Nachteil dieses Scores ist sicherlich, dass nicht unterschieden werden kann, ob z.B. ein Score von vier aus einer schweren Störung in einem Organsystem oder von einer moderaten Störung in vier Organsystemen resultiert.

Ungeachtet dessen konnten wir feststellen, dass der SOFA Score prädiktiv für das Überleben von Patienten mit hämatologischen Erkrankungen wie z.B. der CML nach allogener Stammzelltransplantation ist. Obgleich natürlich auch die kleinste Chance auf Überleben in eine Entscheidung für ein maximales therapeutisches Vorgehen resultiert, ist der SOFA Score dennoch eine Erleichterung für Ärzte den erwarteten Ausgang eines solchen IS Aufenthaltes einzuschätzen und den Angehörigen zu vermitteln sowie letztlich auch Schritte in Richtung einer eskalierten Organunterstützung zu überdenken.

	Alle Patienten (n=64)	Überlebende (n=22)	Nicht-Überlebende (n=42)
Alter (Jahre, Median, Range)	47.4 (17.2 -65.1)	45 (17.2 – 58.3)	50.1 (24.3 – 65.1)
Geschlecht			
Weiblich	24	7	17
Männlich	40	15	25
Indikation für PBSZT			
CML	9	4	5
AML/ALL/MDS	37	12	25
NHL/M. Hodgkin	5	1	4
Andere	13	5	8
Erkrankungsstaus bei PBSZT			
CR oder chronische Phase	35	14	21
Progredient	29	8	21
Konditionierung			
Myeloablativ	49	19	30
Non-Myeloablativ	15	3	12
HLA Matching status			
Geschwister	18	5	13
Matched unverwandt	46	17	29
GvHD bei IS Verlegung	30	13	17
Mediane Zeit von PBSZT bis IS Verlegung (Tage)	56	70	50
Indikation für IS Verlegung			
Pulmonal	34	13	21
Sepsis	11	2	9
Nierenversagen	6	1	5
Blutung	2	0	2
Status epilepticus	2	2	0
Andere	9	4	5

Tabelle 1: Patienten Charakteristika SOFA Score (CML = Chronisch myeloische Leukämie; AML = Akute myeloische Leukämie; ALL = Akute lymphatische Leukämie; MDS = Myelodysplastisches Syndrom; NHL = Non Hodgkin Lymphom; CR = komplette Remission).

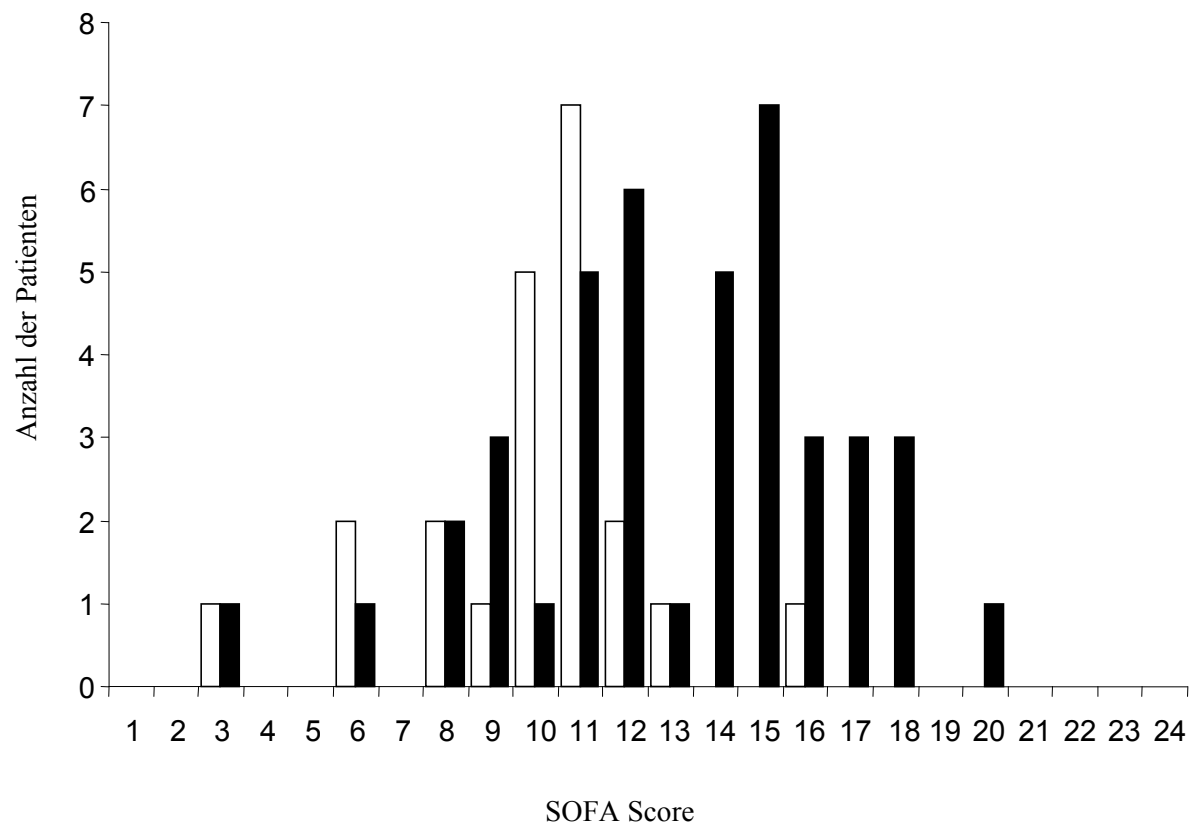


Abbildung 3: Individuelle SOFA (Sepsis-Related Organ Failure Assessment) Scores und Überleben auf der IS; leere Säulen: lebend nach IS; schwarze Säulen: verstorben nach IS.

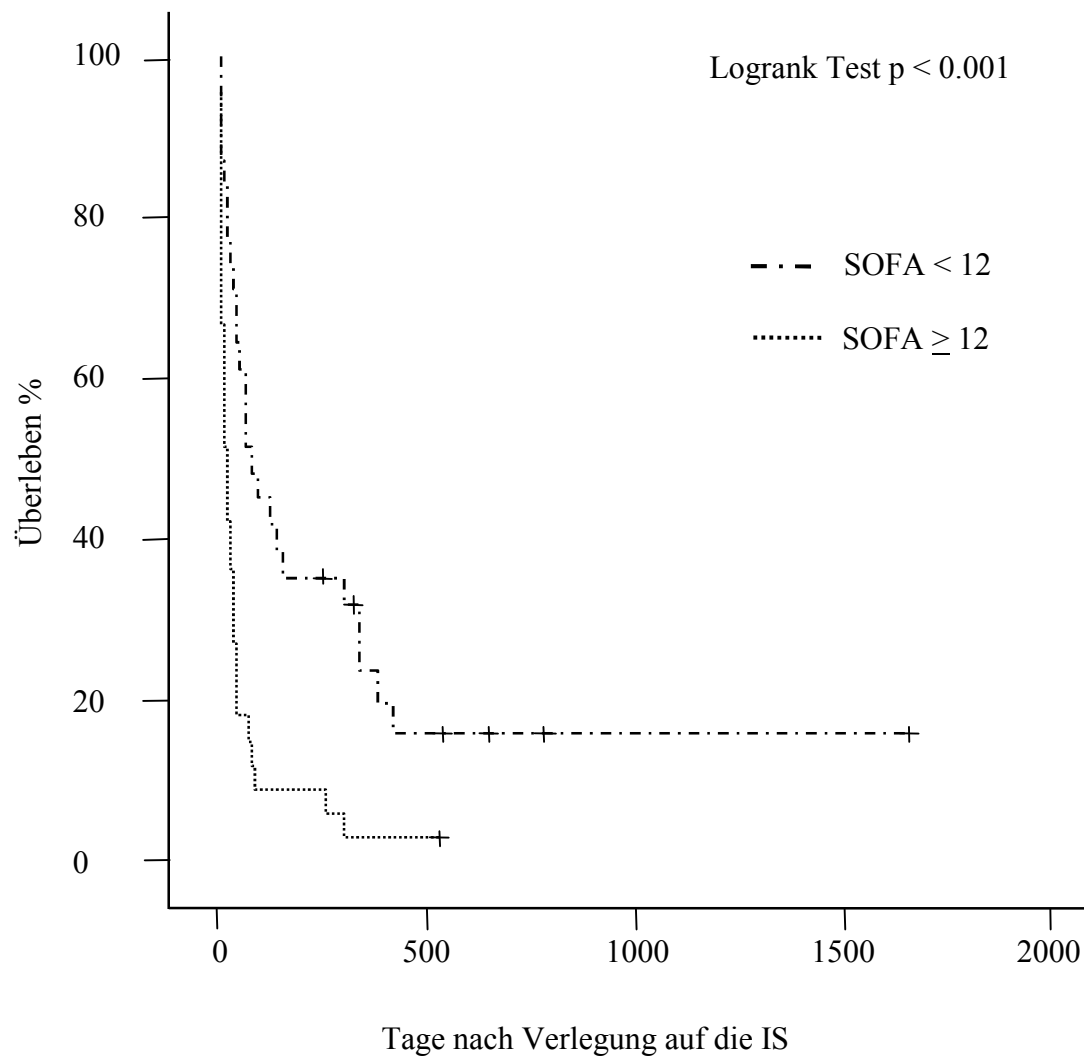


Abbildung 4: Überlebenswahrscheinlichkeit hinsichtlich des SOFA Scores am Tag der Intensivverlegung.

3. Bcr-abl Inhibition zur Therapie der chronisch myeloischen Leukämie

3.1 Molekulares Monitoring von bcr-abl mRNA (Ref. D)

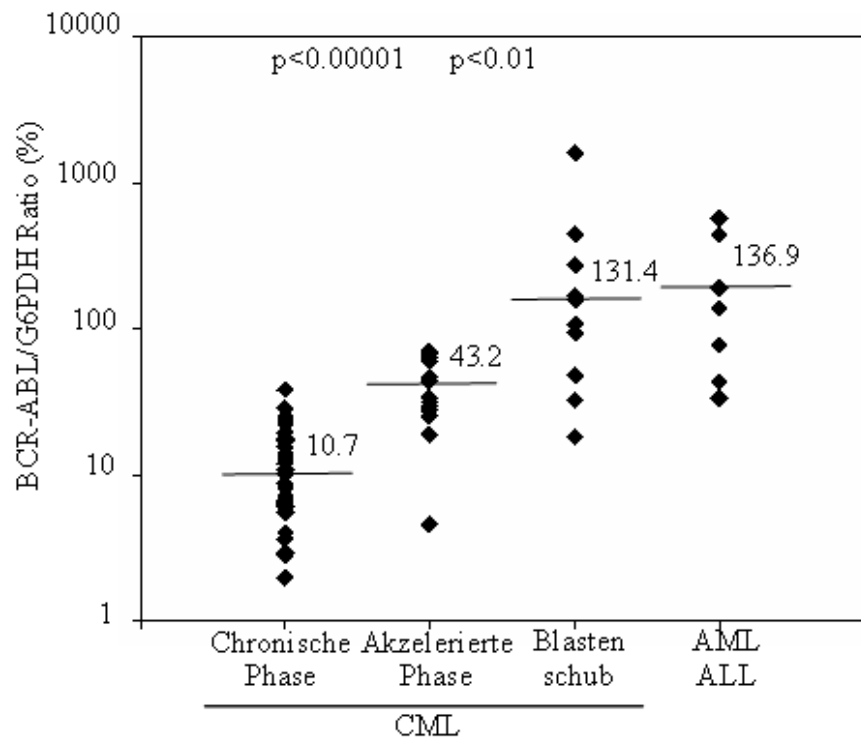
Der quantitative molekularbiologische Nachweis der bcr-abl mRNA ist neben der konventionellen Zytogenetik ein Verfahren zur Diagnostik der CML. Zunächst konnte mit Hilfe sogenannter kompetitiver Polymerasetechniken gezeigt werden, dass eine Übereinstimmung zwischen den semiquantitativ gemessenen bcr-abl mRNA Mengen und dem zytogenetischen Ansprechen auf eine Therapie mit Interferon bei Patienten mit CML vorliegt^{83, 84}. Die bcr-abl mRNA Menge korreliert mit der Wahrscheinlichkeit eines Progresses während der Behandlung mit Interferon³⁶. Ebenso konnte gezeigt werden, dass das molekulare Monitoring der bcr-abl Transkripte bei Patienten mit CML nach allogener PBSZT von prognostischer Relevanz hinsichtlich eines Rezidives ist und auch als Grundlage für therapeutische Interventionen wie z.B. die Verabreichung von Donor-Lymphozyten dient. Die semiquantitativen Techniken sind inzwischen von qPCR Techniken abgelöst, die auf der Verwendung von LightCycler oder Taqman Technologien basieren^{33-35, 85-88}. Um ein valides, international kompetitives molekulares Monitoring in unserer Klinik durchführen zu können, haben wir eine Untersuchung zur Bestimmung der quantitativen bcr-abl mRNA mit Hilfe der LightCycler Technologie durchgeführt. In dieser Studie haben wir eine qPCR verwendet, die in der Lage ist, die häufigsten Bruchpunkte von bcr-abl (b2a2, b3a2, b2a3, b3a3, e19a2, und e1a2) aus peripherem Blut in einem Analyseansatz bei Patienten mit CML in CP, akzelerierter Phase und im Blastenschub sowie bei Patienten mit ALL zu verschiedenen Therapiezeitpunkten quantitativ zu bestimmen. Darüber hinaus haben wir diese Methode verwendet, um „Follow-up“ Untersuchungen bei Patienten nach allogener PBSZT im Anschluss an eine myeloablative oder nicht myeloablative Konditionierung durchzuführen. Hierbei haben wir die Ergebnisse unserer Untersuchungen auch mit denen der Chimerismusanalysen verglichen. Insgesamt wurden von 95 Patienten mit Ph positiver CML, ALL und AML insgesamt 326 Proben von peripherem Blut mittels qualitativer und qPCR untersucht. Die Proben wurden vor Therapiebeginn und zu verschiedenen Zeitpunkten während der Therapie analysiert. Für die Quantifizierung der bcr-abl mRNA wurde die Roche LightCycler Technologie (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) verwendet und der LightCycler t(9; 22) Quantification Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) gemäß den Herstellerangaben benutzt. Drei Primer und zwei Hybridisierungsproben wurden verwendet, um die b2a2, b3a2, b2a3, b3a3, e19a2, und e1a2 Varianten zu detektieren. Die Vorwärtsprimer hybridisierten am BCR Exon e1 und b2, die Rückwärtsprimer am ABL Exon a4. Das Hybridisierungsprobenpaar band am ABL Exon a3. Die Größe des PCR-

Produktes war 671 Basenpaare (BP) für b3a2, 596 BP für b2a2, und 540 BP für e1a2. Als Qualitätskontrolle für die Effizienz der RT-PCR und als Referenz für die Quantifizierung verwendeten wir das „Housekeeping“ Gen Glukose-6-phosphat Dehydrogenase (G6PDH). Verdünnte Standards von G6PDH mRNA wurden bei jeder Untersuchung mitgeführt, um eine Standardkurve für die Quantifizierung der einzelnen Patientenprobe zu erhalten. Der relative Anteil an bcr-abl mRNA in einer Probe wurde als Quotient bcr-abl/G6PDH in Prozent erfasst. Die Sensitivität der qPCR untersuchten wir mit Hilfe von „Spiking“-Experimenten, bei denen wir in 10^7 Leukozyten aus peripherem Blut gesunder Spender 10-fach Verdünnungen der bcr-abl positiven Zell-Linien K562 (b3a2), BV173 (b2a2), und SD-1 (e1a2) durchführten. In drei voneinander unabhängigen Experimenten konnten wir 100 K562 oder BV173 bzw. 1000 SD-1 Zellen in 10^7 normalen Zellen nachweisen. Dies bedeutet eine Sensitivität von einer b3a2 oder b2a2 positiven Zelle in 10^5 bzw. einer e1a2 positiven Zelle in 10^4 normalen Zellen.

Bei der Untersuchung der Patientenproben zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied in den Ergebnissen hinsichtlich der Gruppierung der Patienten analog des CML Stadiums und der Grunderkrankung. Der bcr-abl/G6PDH Wert für Patienten mit CML in CP variierte von 1.96 bis 38.66% (Median 10.71%), wohingegen der Median der bcr-abl Transkript-Level für Patienten im Blastenschub 12-fach höher war. Die mediane bcr-abl/G6PDH Ratio für Patienten in akzelerierter Phase lag zwischen diesen beiden Werten, was einen klaren Zusammenhang zwischen den bcr-abl Transkript Mengen und dem Stadium der Erkrankung zeigte. Kein signifikanter Unterschied zeigte sich zwischen den Patienten im Blastenschub und den Patienten, die an einer akuten Leukämie litten (Abbildung 5 A).

Um die Ergebnisse der qPCR mit den zytogenetischen Daten zu vergleichen, haben wir von 60 Patienten insgesamt 131 periphere Blutproben untersucht, zu denen zum Zeitpunkt der bcr-abl Bestimmung zeitgleich eine Zytogenetik vorlag. Die mit Hilfe der qPCR bestimmten Ergebnisse spiegelten die Ergebnisse der zytogenetischen Untersuchungen wieder. So hatten z.B. Patienten mit partiellem gegenüber komplettem zytogenetischem Ansprechen eine mediane bcr-abl/G6PDH Ratio von 0.53% (0.0473–10.38%) bzw. 0.057% (0–0.56%) (Abbildung 5 B).

A



B

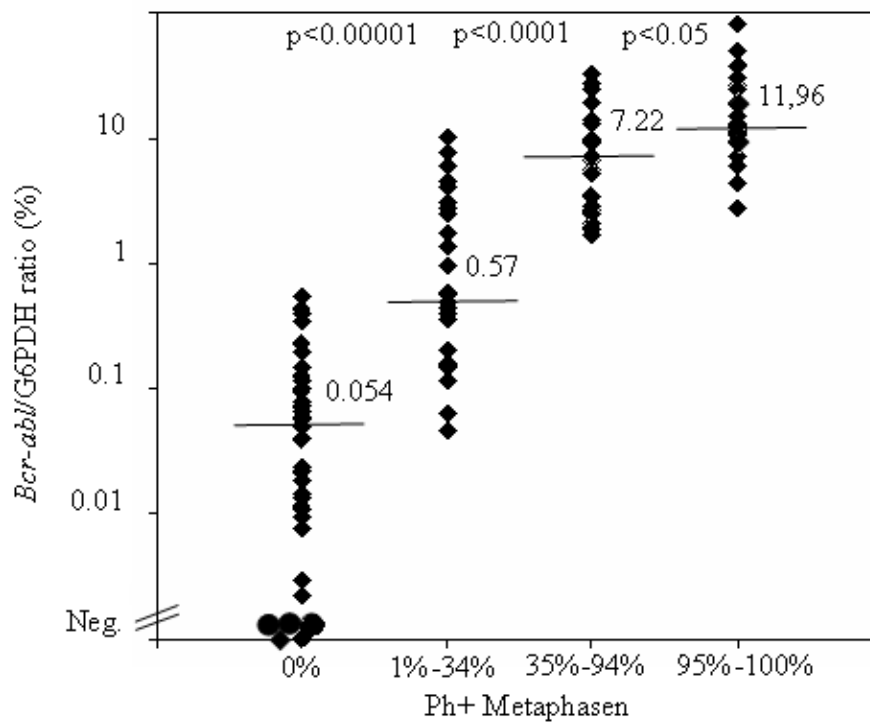


Abbildung 5: Bcr-abl/G6PDH Ratio im Verhältnis zum Krankheitsstadium (A) sowie zum zytogenetischen Stadium (B).

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass die quantitative Messung von bcr-abl mRNA mit Hilfe der qPCR eine Einschätzung des Krankheitsstadiums und des Verlaufes bei Patienten mit CML erlaubt, was uns dazu veranlasste eine Studie zur Therapie von Patienten mit CML basierend auf molekularen Therapieentscheidungen zu initiieren.

3.2 Therapieentscheidung basierend auf molekularem Monitoring („molecular response adapted therapy“) (Ref. E)

Die zytogenetische Untersuchung von Knochenmark mittels konventioneller Bänderungstechnik gilt bis heute als das Standardverfahren zur Beurteilung des Ansprechens von Patienten mit CML auf eine Therapie mit Imatinib. Hierfür ist eine Knochenmarkpunktion erforderlich. Untersuchungen der Chromosomen werden analog den Baccarani Richtlinien in sechsmonatigen Abständen empfohlen⁸⁹. Die Sensitivität dieser Untersuchung liegt beim Nachweis etwa einer Leukämiezelle in 100 gesunden Zellen. Dem gegenüber existiert seit ca. fünf Jahren eine weitaus sensitivere Technik, für die als Untersuchungsmaterial lediglich peripheres Blut erforderlich ist. Es handelt sich hierbei um die quantitative Untersuchung von bcr-abl mRNA mittels qPCR. Hinsichtlich der Evaluation und technischen Details dieser Methode sei auf den Abschnitt 3.1. verwiesen. Angesichts der hervorragenden Korrelation zwischen Krankheitsstadium bzw. zytogenetischer Phase und quantitativer bcr-abl Bestimmung^{31, 90} haben wir eine monozentrische Studie initiiert, bei der die Therapieentscheidung über die Dosierung von Imatinib oder die Umstellung auf eine andere Therapie nur vom Ergebnis der molekularen Analysen des bcr-abl/G6PDH Quotienten abhängig gemacht wurde. Therapeutisches Ziel war das Erreichen des international anerkannten Standards einer Reduktion der bcr-abl mRNA um mindestens 3 Log-Stufen bezogen auf den Wert vor Therapie⁹¹. Zwischen Juni 2003 und Juni 2006 haben wir 33 Patienten mit „de novo“ CML in CP innerhalb dieser Studie behandelt. Zwölf der Patienten waren weiblich und 21 männlich. Die Patientencharakteristika sind in der Tabelle 2 zusammengefasst. Der mediane Beobachtungszeitraum war 30 Monate (12-34). Die letzte Untersuchung erfolgte im Januar 2008.

Das Therapieprotokoll, genehmigt durch die Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf, ist in Abbildung 6 dargestellt. Die Therapie wurde bei allen Patienten mit 400 mg Imatinib täglich begonnen. Falls der initial gemessene bcr-abl mRNA Wert nicht um eine Log-Stufe nach sechs Monaten bzw. um zwei Log Stufen nach neun Monaten bzw. in allen folgenden drei-monatlichen Kontrollen abfiel, wurde die Dosierung auf 800 mg täglich erhöht. Falls hierdurch wiederum kein ausreichendes molekulares Ansprechen gemäß unseren Kriterien erreicht werden konnte, erhielten die Patienten andere Therapien, wie den Zweitgenerations- Tyrosinkinaseinhibitor Nilotinib oder für den Fall eines verfügbaren HLA identi-

schen Spenders eine allogene PBSZT nach myeloablativer Konditionierung. Insgesamt haben wir 277 Proben von peripherem Blut untersucht, was sich in einer medianen Probenzahl von zehn Proben pro Patient (3-13) widerspiegelte. Bei Patienten, die einen nicht ausreichenden Therapieeffekt zeigten, haben wir zusätzlich eine Mutationsanalyse der Imatinib Bindungsstelle mittels DNA Sequenzierung durchgeführt⁹⁰. Unser molekulares Kriterium einer Reduktion der bcr-abl mRNA um eine Log-Stufe nach sechs Monaten wurde von 66% (22/33) der Patienten erreicht. Bis auf einen Patienten erfüllten diese Patienten im weiteren Verlauf unsere molekularen Zielwerte und wurden weiter mit 400 mg Imatinib täglich behandelt. Eine Dosisescalation war bei 33% der Patienten (11/33) erforderlich. Von diesen Patienten hatten 54 % (6/11) eine stabile Reduktion der bcr-abl mRNA von ≥ 2 log (n = 3) oder ≥ 3 log (n = 3) mit 800 mg Imatinib täglich. Die restlichen fünf dieser Patienten (45%; 5/11) wurden zunächst zwölf Monate mit 800 mg Imatinib und im Anschluss aufgrund fehlenden molekularen Ansprechens mit Nilotinib behandelt. Zwei dieser Patienten sprachen auf Nilotinib an, während drei eine allogene PBSZT nach myeloablativer Konditionierung benötigten, in deren Folge eine molekulare Remission erreicht werden konnte. Keiner der zuletzt genannten elf Patienten wies eine Mutation in der Imatinib-Bindungsstelle auf.

Alleine durch dieses auf molekularen Blutanalysen basierendes Verfahren konnten nach zwei Jahren 65% (20/31) der Patienten eine „major molecular remission“, d.h. eine Reduktion der initialen bcr-abl Menge um mehr als 3 Log-Stufen erreichen (Abbildung 7). Diese ist verglichen mit internationalen Studien wie der IRIS Studie oder Studien, bei denen eine Dosisescalation erfolgte⁹² ein vergleichbar gutes Ergebnis.

Zusammenfassend hat diese Studie gezeigt, dass eine dem molekularen Ansprechen angepasste Therapie, mit Therapieentscheidungen basierend auf technisch leicht durchführbaren Untersuchungen der bcr-abl mRNA im peripheren Blut möglich ist und bei einem Großteil der Patienten zu einer „major molecular remission“ führt.

	Imatinib 400 mg	Imatinib 800 mg	total
Anzahl Patienten	22	11	33
männlich	14	7	21
weiblich	8	4	12
Alter (Jahre)			
Median	50	49	50
Bereich	23-71	38-66	23-71
Follow up (Monate)			
Median	30	33	30
Bereich	18-33	12-34	12-34
Anzahl Proben	181	96	277
Hasford Score (Median)	691	719	691
Sokal Score (Median)	0.8	1.1	0.9

Tabelle 2: Patientencharakteristika Düsseldorfer Studie „molecular response adapted therapy“.

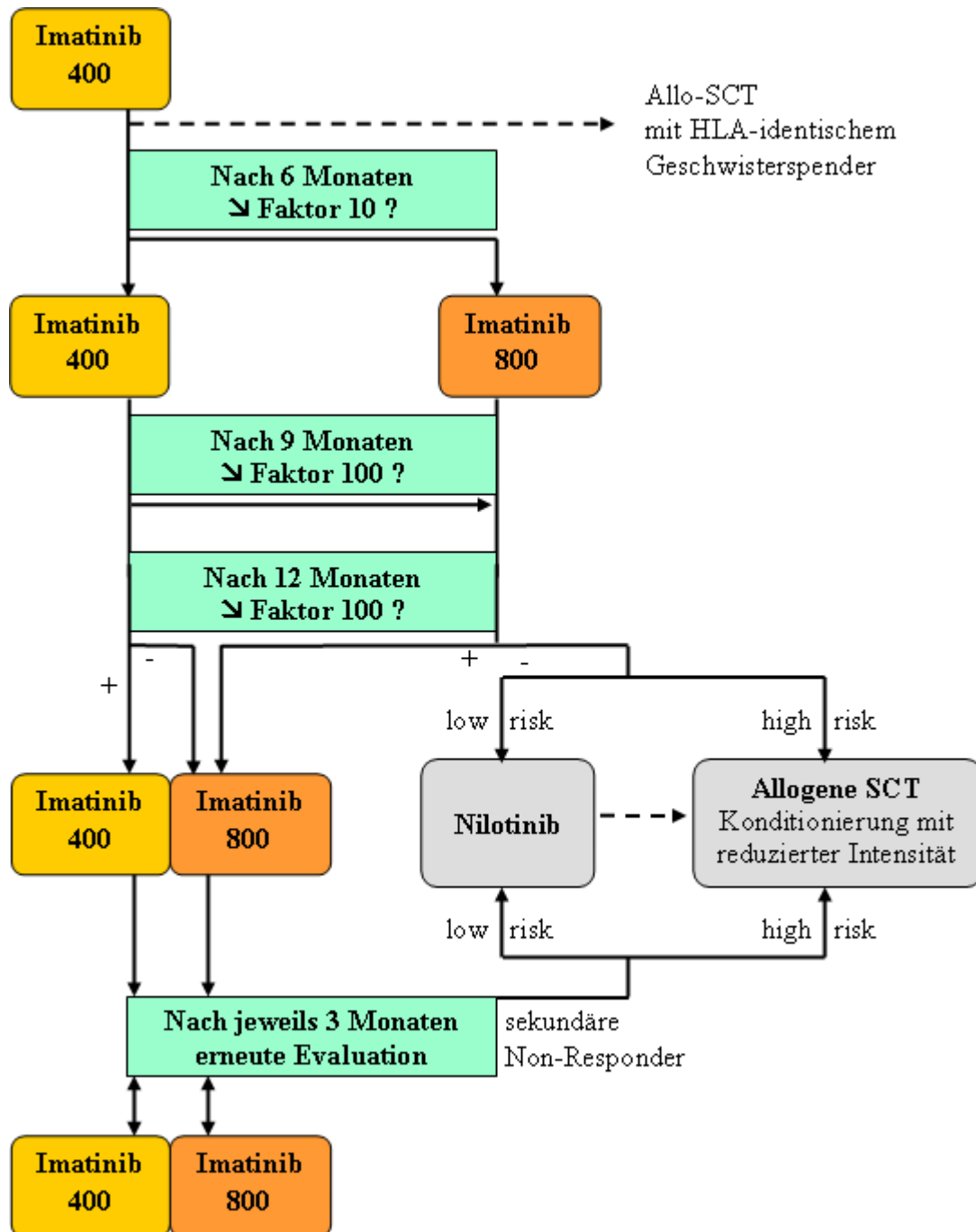


Abbildung 6: Therapieprotokoll Düsseldorf Studie „molecular response adapted therapy“.

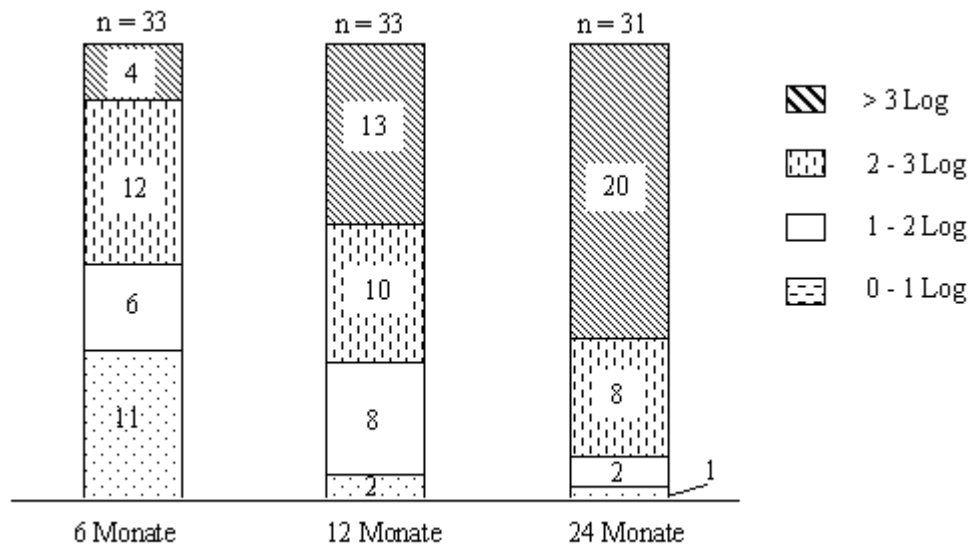


Abbildung 7: Molekulares Ansprechen auf Imatinib. Nach zwei Jahren Therapie hatten 65% (20/31) der in der Studie „molecular response adapted therapy“ behandelten Patienten eine „major molecular remission“, d.h. eine Reduktion der initialen bcr-abl Menge um mehr als 3 Log-Stufen erreicht.

3.3 Einfluss der bcr-abl Blockade durch Imatinib auf normale Hämatopoiese (Ref. F)

Neben der therapeutisch wirksamen Inhibition des bcr-abl Proteins hat Imatinib auch inhibitorische Effekte auf andere Tyrosinkinasen wie z.B. den Wildtyp ABL, c-kit sowie die PDGF-R alpha und beta. Das ABL interagiert mit verschiedenen Proteinen, die in den DNA Reparaturmechanismus involviert sind wie z.B. p73, DNA-PK und RAD 51^{26, 27}. C-Kit spielt eine essentielle Rolle bei der Differenzierung und Proliferation von hämatopoietischen Stammzellen²⁸. PDGF-R wird in Knochenmarkstromazellen exprimiert, die für das hämatopoietische Mikromilieu notwendig sind und spielt ebenfalls eine Rolle im Kontext Stammzelldifferenzierung. Eine Inhibition dieser Tyrosinkinasen kann daher möglicherweise in eine funktionelle Störung der Hämatopoiese resultieren, wie sie sich in mehreren Veröffentlichungen, die das Auftreten sekundärer Karyotypanomalien in Ph negativer Hämatopoiese während Imatinibtherapie beschreiben, widerspiegelt^{29, 30}. Um der Frage eines möglichen mutagenen Einflusses von Imatinib nachzugehen, haben wir Genexpressionsprofile von immunmagnetisch angereicherten CD 34 positiven Knochenmarkzellen, stammend von sechs freiwilligen gesunden Spendern mit CD34 positiven Knochenmarkzellen von acht Patienten mit initial Ph positiver CML in CP, die eine „major molecular remission“ während der Therapie mit Imatinib erreicht hatten, verglichen. Ziel der Untersuchung war es, den Einfluss des Tyrosinkinaseinhibitors auf die gesunde Hämatopoiese zu untersuchen und transkriptionelle Veränderungen in vivo zu detektieren, die das Auftreten sekundärer Aberrationen fördern könnten. Bei den Patienten, die im Rahmen dieser Studie untersucht wurden,

handelte es sich um zwei Frauen und sechs Männer, deren medianes Alter bei 52 Jahren (25-68) lag. Alle Patienten erhielten 400 mg Imatinib täglich als erste Therapie ihrer CML in erster CP. Die mediane Therapiedauer von Imatinib lag bei 28 Monaten (11-39). Die zytogenetische Untersuchungen sowie die qPCR zeigte, dass alle Patienten keine sekundären Aberrationen hatten und dass alle Patienten eine komplette zytogenetische und „major molecular“ Remission zum Zeitpunkt der Untersuchung erreicht hatten. Die „major molecular remission“ hatten wir analog den Daten von Hughes et al.⁹¹ als eine Reduktion des initialen bcr-abl/G6PDH Quotienten um drei Log-Stufen im Vergleich zum Ausgangswert definiert. In Median 5×10^5 CD 34 positive Zellen (2×10^5 - $1,8 \times 10^6$) wurden immunmagnetisch mit dem MACS System (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) aus den Knochenmarkern mit einer Reinheit von mindestens 98% isoliert⁹³. Von den isolierten CD34 positiven Zellen der Patienten haben wir dann Fluoreszenz in vitro Hybridisierungen (FISH) (LSI BCR/ABL Dual Color, Dual Fusion Translocation Probes Vysis, Bergisch-Gladbach, Germany) durchgeführt, die keinen Hinweis für das Vorliegen einer t(9;22) Translokation zeigten. Die Gesamt-RNA (median: 550 ng; 130–990 ng) aus den isolierten CD34 positiven Zellen wurde daraufhin verwendet, um mit dem Enzo BioArray HighYield RNA Transcript Labelling Kit (Affymetrix Ltd, UK) Biotin markierte cRNA (median: 7.5 mg; 2.6–12.3 mg) zu generieren. Die markierte cRNA wurde im Anschluss auf den Affymetrix HG-Focus Gen Chip der 8793 Gene umfasst, hybridisiert. Diese Gene repräsentieren ein breites Spektrum an verschiedenen funktionellen Gruppen wie z.B. Zellzyklus oder DNA Replikation. Für die Qualitätskontrolle, Normalisierung und Daten Analyse verwendeten wir das „Affy package of functions of statistical scripting language ‘R’ integrated into the Bioconductor project“ (<http://www.bioconductor.org/>). Um die Daten zu normalisieren verwendeten wir die Methode der „variance stabilizing transformations (VSN)“⁹⁴. Für den Vergleich der Daten der Patienten, die mit Imatinib behandelt wurden, mit den Ergebnissen der gesunden Spender benutzten wir den „Significance Analysis of Microarrays (SAM)“ Algorithmus v1.21. Interessanterweise fanden sich bei diesem Vergleich keinerlei differentiell exprimierte Gene zwischen den beiden Gruppen (Abbildung 8). Dieses Ergebnis zeigte, dass die tägliche Dosis von 400 mg Imatinib keinerlei Einfluss auf CD34 positive hämatopoietische Stamm- und Progenitorzellen bezogen auf das Expressionsprofil von 8793 Genen zeigte.

Das Ausbleiben von transkriptionellen Veränderungen auf RNA-Ebene unterstützt die Ansicht, dass die bei Patienten während Imatinibtherapie auftretenden sekundären chromosomalen Veränderungen nicht ursächlich durch den Tyrosinkinaseinhibitor bedingt sind, dieser also kein mutagenes Potential hat.

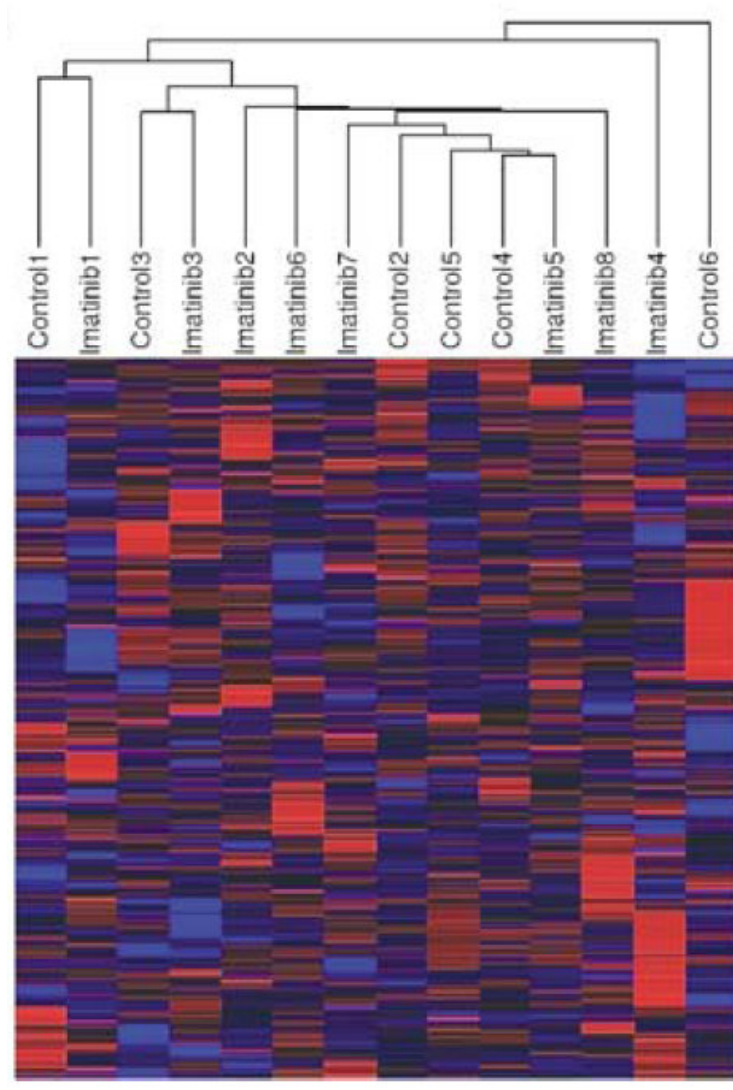


Abbildung 8: Die hierarchische Clusteranalyse zeigte keine Unterschiede zwischen dem Genexpressionsprofil gesunden und mit Imatinib behandelten CD34 positiver Zellen.

3.4 Imatinib zur Therapie von Patienten mit atypischer chronischer myeloischer Leukämie (Ref. G)

Die Hemmung von anderen Tyrosinkinase als bcr-abl birgt allerdings nicht nur Risiken, sondern auch potentiell therapeutische Möglichkeiten. Im Jahre 2002 wurde erstmals bei einem Patienten mit Ph negativer CML eine t(4;22)(q12;q11) Translokation beschrieben, die BCR mit dem PDGF-R alpha fusionierte²⁶. Aufgrund der Tatsache, dass zum Zeitpunkt der Diagnose dieser seltenen Translokation noch kein Imatinib zur Verfügung stand, führte man bei diesem Patienten erfolgreich eine allogene PBSZT durch. Kurze Zeit später wurde dieselbe Translokation dann bei einem weiteren Patienten mit Ph negativer CML detektiert, und angesichts der Hemmung von PDGF-R durch Imatinib erfolgreich mit dem

Tyrosinkinaseinhibitor behandelt²⁷⁻²⁹. In unserer Klinik haben wir dann einen dritten Patienten behandeln und beschreiben können, der diese seltene zytogenetische Aberration aufwies und eine hämatologische, zytogenetische und molekulare Langzeitremission mit Imatinib erreichen konnte:

Im Jahr 2004 stellte sich ein 35 Jahre alter Mann in unserer Klinik vor, der über ausgeprägten Nachtschweiß, Appetit- und Gewichtsverlust von sechs Kilogramm klagte. Diese Symptome waren bei ihm innerhalb der letzten zwei Monate aus völliger Gesundheit aufgetreten. Zusätzlich litt er an rezidivierenden Nasen- sowie petechialen Hautblutungen. Er hatte mehrere Jahre in einer Lederwarenfabrik gearbeitet, in der er Farbstoffen und aromatischen Säuren ausgesetzt war. Innerhalb der letzten zwei Jahre war er als LKW Fahrer tätig.

Die körperliche Untersuchung hatte eine Splenomegalie ohne Lymphadenopathie ergeben. Betrachtete man die Laborparameter, so zeigte sich eine Leukozytose von 58.000/ μ l sowie eine pathologische Linksverschiebung. Der Hämoglobingehalt betrug 12.8 g/dl und die Thrombozytenzahl 140.000/ μ l. Erwähnenswert ist die Tatsache, dass die LDH mit 570 U/l erhöht war. Die zytomorphologische Untersuchung des Knochenmarkes war vereinbar mit einer CML, allerdings zeigte die molekularbiologische Untersuchung keinen Hinweis auf bcr-abl mRNA. Die zytogenetische Untersuchung zeigte entsprechend kein Ph, aber eine Translokation t(4;22)(q12;q11) in 18 von 22 untersuchten Metaphasen. Diese Aberration konnte mittels FISH bestätigt werden. Nachdem hierdurch die Beteiligung des PDGF-R alpha evident war, erhielt der Patient ab Oktober 2004 Imatinib in einer Dosierung von 100 mg pro Tag. Zwei Monate nach Beginn der Therapie zeigte sich erfreulicherweise eine Normalisierung der Leukozytenzahl und der LDH, was mit einem kompletten Abklingen der klinischen Beschwerden und einer kompletten zytogenetischen Remission einherging (Abbildung 9). Hinzu kam, dass keinerlei Blutungsepisoden mehr auftraten. Dies ist möglicherweise erklärbar durch die Tatsache, dass PDGF-R Thrombin und die Plättcheninhibition hemmt, so dass eine Hemmung des überaktivierten PDGF-R diese Hemmung unterdrücken und damit die Blutungsneigung vermindern kann^{94, 95}. Zusammenfassend ist Imatinib eine wirksame Therapie für Erkrankungen, die molekularbiologisch durch eine Überaktivierung von anderen Tyrosinkinasen als bcr-abl wie z.B. des PDGF-R ausgelöst werden.

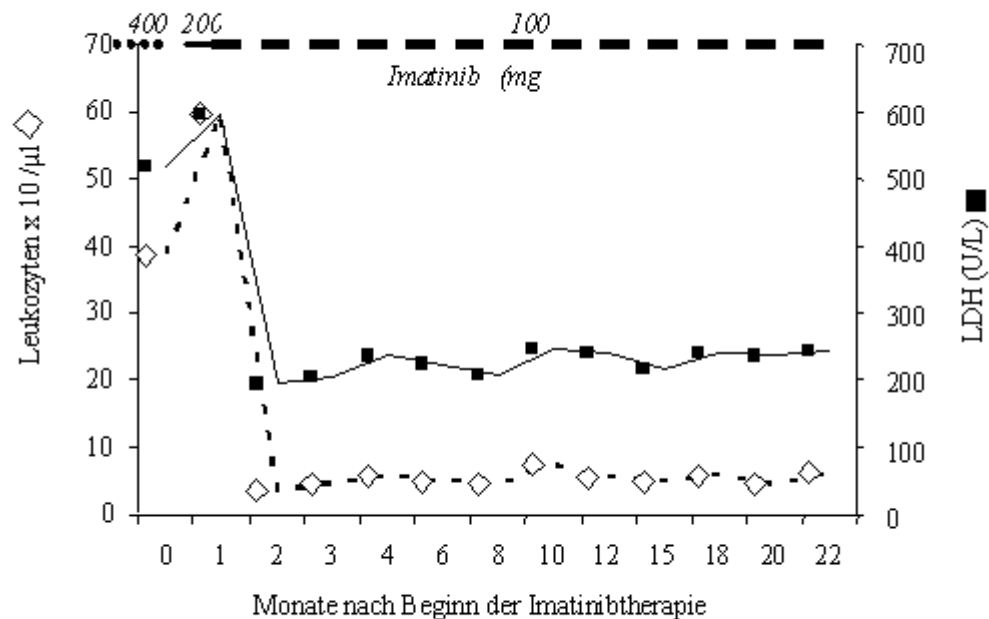


Abbildung 9: Leukozyten und LDH-Verlauf während Therapie eines Patienten mit atypischer, t(4;22)(q12;q11) CML.

3.5 Molekulare Veränderungen in vivo während der Therapie mit Imatinib

Der molekulare Wirkmechanismus des Imatinibs basiert im Wesentlichen auf einer kompetitiven Hemmung der Tyrosinkinase bcr-abl aber auch c-kit, PDGF-R und ARG. In der Folge dieser Hemmung kommt es zu einer Vielzahl von „downstream“-Veränderungen intrazellulärer Wachstumskaskaden, die letztlich in der CML-Zelle eine Verminderung von Apoptoseschutz und einen Proliferationsreiz induzieren¹⁷⁻²³. Während die direkt durch Imatinib blockierten Proteine vielfach untersucht sind, finden sich in der Literatur wenige Angaben über Untersuchungen bezüglich der dadurch induzierten intrazellulären Veränderungen von Signalkaskaden. Als Hauptwege, die durch das bcr-abl aktiviert werden, gelten Pfade, die das Grb2-Ras und die p42/44 Mitogen Activiated Proteinkinase (MAPK), die Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K), den Nuclear Factor- κ B (NF κ B) und die Signal Transducers and Activators (STAT) 1/5⁹⁶ betreffen. Aichberger et al. konnten in Untersuchungen an bcr-abl positiven murinen pro B-Zellen (BA/F3 Zellen) zeigen, dass der proapoptotische „Bcl-2-interacting Mediator“ (BIM) eine Rolle als Tumorsuppressor in bcr-abl positiven Zellen spielt, dass diese Zellen nur eine geringe Menge von diesem „Zelltod-

Aktivator“ exprimieren und dass die BIM Expression intrazellulär in vitro durch die Therapie mit Imatinib gesteigert wird⁹⁷. Chu et al. konnten mit funktionellen Tests und Westernblotanalysen zeigen, dass die Behandlung von CD34 positiven Zellen von Patienten mit CML mit Imatinib in vitro zu einer gesteigerten Aktivität der MAPK und zu einer verringerten Aktivität des Phosphatidylinositol-3 (PI-3) Kinase Inhibitors führt⁹⁸. Kawauchi et al. demonstrierten, dass die Therapie mit Imatinib eine Inhibierung von AKT, einem „Downstream“ Ziel von PI3K nach sich zieht⁹⁶.

Mit dem Ziel Gene zu detektieren, deren Veränderungen ein Ansprechen auf die Therapie mit Imatinib widerspiegeln und für das bessere Verständnis der bcr-abl assoziierten Pathophysiologie der CML während der Therapie mit Imatinib haben wir das Transkriptom CD34 positiver Zellen von Patienten mit „de novo“ CML vor Beginn der Therapie mit Imatinib und nach sieben Tagen Behandlung mit dem Tyrosinkinaseinhibitor untersucht und miteinander verglichen.

Hierfür haben wir zwischen November 2006 und Juli 2007 sechs Patienten mit neu diagnostizierter Ph positiver CML in CP untersucht. Von diesen Patienten wurden zunächst 20 ml EDTA Blut vor und eine Woche nach Therapie mit 400 mg Imatinib täglich gewonnen. Die Proben wurden innerhalb von zwei Stunden nach Gewinnung bearbeitet. Die mononukleären Zellen (MNC) wurden mittels einer Dichtegradientenzentrifugation über einen Ficoll Gradienten mit einer Dichte von 1.077 ± 0.001 g/ml gewonnen. Die Proben enthielten eine mediane Anzahl von 6×10^7 MNC/ml ($2 \times 10^7 - 13 \times 10^7$) zum Zeitpunkt der Diagnose und 6×10^7 MNC/ml ($1 \times 10^7 - 12 \times 10^7$) sieben Tage nach Beginn der Therapie mit Imatinib. Für die Untersuchung des Transkriptom der CD34 positiven Zellen wurde der „Human CD34 Selection Kit“ (StemCell Technologies, Vancouver, Canada) und das Robosep System (StemCell Technologies) verwendet. Nach der Separation hatten die angereicherten CD34 positiven Zellen eine Reinheit von 96% (92 - 98%).

Um den Anteil an Ph positiven Zellen in dieser CD34 positiver Population zu messen, haben wir mit jeweils 5000 Zellen von drei Patienten FISH Analysen analog der Dual Colour Dual Fusion BCR-ABL Methode (Abott Molecular, Wiesbaden-Delkenheim, Germany) durchgeführt.

Aus im Median 1×10^6 ($3,5 \times 10^5$ bis 1×10^7) isolierten CD34 positiven Zellen haben wir mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen AG, Hilden, Germany) gesamt RNA isoliert. Die Menge an gewonnener RNA wurde mit dem NanoDrop Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Welmington, DE, USA) gemessen. Hundertzwanzig Nanogramm isolierte RNA wurde verwendet, um markierte cRNA MesageAmp™ II-Biotin Enhanced Kit (Ambion, Austin, Te-

xas, USA) zu generieren. Nach Fragmentierung wurden fünf µg markierte cRNA auf den Affymetrix Chip U133 A2.0 hybridisiert. Die Qualität der isolierten RNA und der cRNA wurden mit dem Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) kontrolliert.

Die Ergebnisse der Array-Untersuchungen wurden mit der „dCHIP“ Software ausgewertet („smoothing spline normalization“, „perfect match-mismatch difference model algorithm“). Ein Gen wurde als differentiell exprimiert angesehen, wenn der Transkriptionslevel als Vielfaches der Kontrolle > 1.5 mit einem p-Wert < 0.05 war und der „lower confidence bound“ (LCB) > 1.2 betrug⁹⁹. Hierarchische Cluster Analysen wurden mittels des „Correlation-based centroid-linkage“ Algorithmus durchgeführt (dChip).

Mit qPCR unter Verwendung des LightCycler® DNA Master SYBR Green I Kit (Roche Applied Systems, Mannheim, Germany) haben wir die differentielle Expression von acht Genen (BTG family, member 2 (BTG2), budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog beta (yeast) (BUB1B), cell division cycle 2 (CDC2), maternal embryonic leucine zipper kinase (MELK), minichromosomal maintenance complex (MCM) 4, ras homolog gene family, member B (RHOB), heat shock 70kDa protein 8 (HSPA8) und baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin) (BIRC5)) bestätigt (Abbildung 10). Die Primerliste ist der Tabelle 3 zu entnehmen. Bei allen Patienten wurde ein molekulares Monitoring wie unter 3.1 beschrieben durchgeführt.

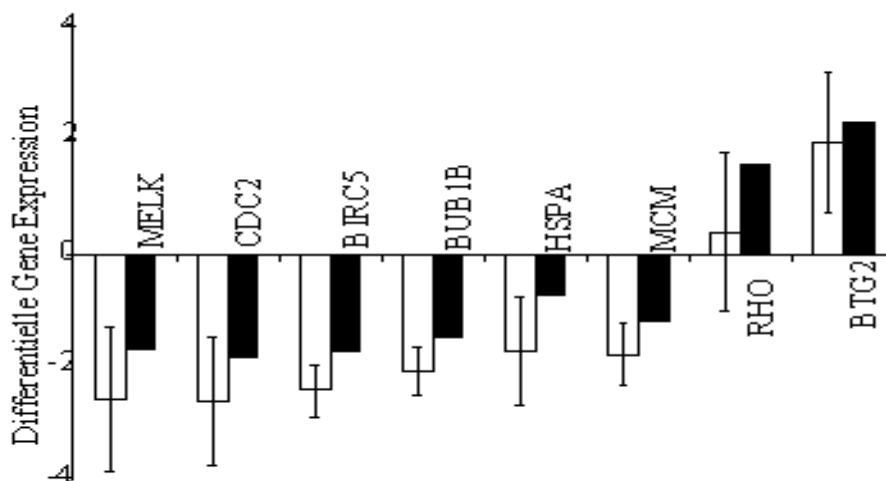


Abbildung 10: Die Expressionsstärke der differentiell exprimierten Gene gemessen mit qPCR sind in weiß dargestellt, gemessen auf den Affymetrix Arrays in schwarz. Veränderungen > 0 bedeuten höhere Expression in CD34 positiven Ph positiven CML Zellen nach sieben Tagen Therapie mit Imatinib, Veränderungen < 0 bedeuten höhere Expression in unbehandelten CD34 positiven Ph positiven CML Zellen.

18s rRNA

Forward Primer: 5'- ATT AGA GTG TTC AAA GCA GGC CCG AGC -3'

Reverse Primer: 5' – CGT CCC TCT TAA TCA TGG CCT CAG TTC – 3'

BIRC5 (survivin)

Forward Primer: 5' – AGA GTC CCT GGC TCC TCT A – 3'

Reverse Primer: 5' – CCC GTT TCC CCA ATG ACT TA – 3'

BTG2:

Forward Primer: 5' – TCC ATC TGC GTC TTG TAC GA – 3'

Reverse Primer: 5 – GTT GTC ACG GCA GCA TGA G – 3'

BUB1B

Forward Primer: 5'- TAG GTA TAT CAG CTG GAC AGA – 3'

Reverse Primer: 5' – CGC CCT AAT TTA AGC CAG AG – 3'

CDC2 Primer

Forward Primer: 5' – GGA GAA GGT ACC TAT GGA GT – 3'

Reverse Primer: 5' – ATA AGC ACA TCC TGA AGA CTG – 3'

HSPA8

Forward Primer: 5' – CCT TGG GAA GAC TGT TAC CA – 3'

Reverse Primer: 5' – GTT TCT TTC TGC TCC AAC CTT – 3'

MCM4

Forward Primer: 5' – CTT TCA GAG ATT TCT TCA GCG – 3'

Reverse Primer: 5' – TCA CCA ATA ACA TTA ATC TCC C – 3'

MELK

Forward Primer: 5' – TTC TTG AGT ACT GCC CTG GA - 3'

Reverse Primer: 5' – TCT GGC TTG AGG TCC CTG T – 3'

RHOB

Forward Primer: 5' – ACC GAC GTC ATT CTC ATG TG – 3'

Reverse Primer: 5' – ATG ATG GGC ACA TTG GGA CA – 3'

Tabelle 3: Primer Sequenzen.

Die FISH-Analyse zeigte einen medianen Anteil von 87% (85%-89%) CD34 positiven Zellen mit einem typischen bcr-abl positiven Signalmuster. Erwähnenswert erscheint hier die Tatsache, dass offensichtlich eine nicht unerhebliche Zahl an bcr-abl negativen Zellen vorlag, d.h. normale hämatopoietische Stamm- und Progenitorzellen vorhanden sind, die bei unbehandelten Patienten im peripheren Blut zirkulieren. Betrachtet man die isolierten CD34 positiven Zellen aus peripherem Blut nach sieben Tagen Therapie mit Imatinib in einer Dosierung von 400 mg täglich, zeigt sich ein ähnliches Verhältnis von 85% (84% - 87%).

Nach einer medianen Zeit von 0.9 Monaten (0.9 – 3) nach Beginn der Therapie mit Imatinib hatten alle Patienten eine komplette hämatologische Remission erreicht. Hinsichtlich des molekularen Ansprechens fanden wir bei allen Patienten im Median eine Reduktion der bcr-abl Transkripte um drei Log-Stufen (1.5 – 3) nach im Median zehn Monaten (6 – 13). Alle Patienten vertrugen das Imatinib sehr gut ohne relevante Nebenwirkungen.

Die hierarchische Clusteranalyse der CD34 positiven Zellen, gewonnen vor und sieben Tage nach Beginn der Imatinibtherapie, zeigte eine Reihe von Genen, die eine klare Differenzierung zwischen den Proben beider Patientengruppen erlaubte. Betrachtete man die gesamte Zahl von zirka 14000 Genen, die auf den Array gespottet wurden, unterschied sich insgesamt nur die Expressionsstärke von lediglich 303 Genen, wovon 183 mit einem LCB von mindestens 1.2 herunter reguliert und 120 herauf reguliert waren (Tabelle 4). Diese differentiell exprimierten Gene ließen sich drei Gruppen zuordnen. Auf der einen Seite waren Gene, die den Zellzyklus und die DNA Replikation steuern herunter reguliert. Auf der anderen Seite fand sich bei Genen, die adhaesive Interaktionen der Zelle steuern, nach der Behandlung mit dem Tyrosinkinaseinhibitor eine gesteigerte Expression. Die relevanten Gene der Gruppen sind zum einen in Tabelle 4 fett gedruckt, zum anderen in Abbildung 11 dargestellt.

Gene symbol	Gene title	lower bound
Cell cycle		
AURKB	aurora kinase B	-1.68
BIRC5	baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin)	-2.29
BTG1	B-cell translocation gene 1, anti-proliferative	1.66
BUB1B	BUB1 budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog beta (yeast)	-1.84
CCNB1	cyclin B1	-1.98
CCNB2	cyclin B2	-1.81
CCNG2	cyclin G2	1.55
CDC2	cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M	-2.19
CDC20	cell division cycle 20 homolog (S. cerevisiae)	-2.23
CDC25A	cell division cycle 25 homolog A (S. pombe)	-1.39
CDC45L	CDC45 cell division cycle 45-like (S. cerevisiae)	-1.76
CDKN1C	cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57, Kip2)	1.22
CENPF	centromere protein F, 350/400ka (mitosin)	-1.79
CENPM	centromere protein M	-2.06
CLK1	CDC-like kinase 1	1.66
DTL	denticless homolog (Drosophila)	-1.56
GMNN	geminin, DNA replication inhibitor	-1.56
GSPT1	G1 to S phase transition 1	-1.31
MCM2	minichromosome maintenance complex component 2	-1.35
MCM3	minichromosome maintenance complex component 3	-1.23
MCM4	minichromosome maintenance complex component 4	-1.72
MCM6	minichromosome maintenance complex component 6	-1.42
MCM7	minichromosome maintenance complex component 7	-1.23
NCAPG2	non-SMC condensin II complex, subunit G2	-1.57
PIM1	pim-1 oncogene	-1.80
POLE2	polymerase (DNA directed), epsilon 2 (p59 subunit)	-1.63
PRC1	protein regulator of cytokinesis 1	-1.58

RHOB	ras homolog gene family, member B	1.70
TOP2A	topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa	-2.03
ZWINT	ZW10 interactor	-1.79
DNA replication, DNA repair		
BLM	Bloom syndrome	-1.33
CDC45L	CDC45 cell division cycle 45-like (S. cerevisiae)	-1.76
CHAF1A	chromatin assembly factor 1, subunit A (p150)	-1.28
DUT	dUTP pyrophosphatase	-1.31
FANCI	Fanconi anemia, complementation group I	-1.80
FEN1	flap structure-specific endonuclease 1	-1.73
GIN5/12	GIN5 complex subunit 12 (Psf1/2 homolog)	-1.69
GMNN	geminin, DNA replication inhibitor	-1.56
HMMR	hyaluronan-mediated motility receptor (RHAMM)	-1.98
MCM2	minichromosome maintenance complex component 2	-1.35
MCM3	minichromosome maintenance complex component 3	-1.23
MCM4	minichromosome maintenance complex component 4	-1.72
MCM6	minichromosome maintenance complex component 6	-1.42
MCM7	minichromosome maintenance complex component 7	-1.23
NASP	nuclear autoantigenic sperm protein (histone-binding)	-1.28
NUSAP1	nucleolar and spindle associated protein 1	-1.45
PCNA	proliferating cell nuclear antigen	-1.32
PHB	prohibitin	-1.26
POLE2	polymerase (DNA directed), epsilon 2 (p59 subunit)	-1.63
PTTG1	pituitary tumor-transforming 1	-1.45
RAD51	RAD51 homolog (RecA homolog, E. coli) (S. cerevisiae)	-1.75
RFC3	replication factor C (activator 1) 3, 38kDa	-1.30
RFC4	replication factor C (activator 1) 4, 37kDa	-1.32
RPA3	replication protein A3, 14kDa	-1.44
RRM1	ribonucleotide reductase M1 polypeptide	-1.46
RRM2	ribonucleotide reductase M2 polypeptide	-2.52
TIMELESS	timeless homolog (Drosophila)	-1.49

TIPIN	TIMELESS interacting protein	-1.44
TK1	thymidine kinase 1, soluble	-1.51
TOP2A	topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa	-2.03
TYMS	thymidylate synthetase	-1.41
Adhesion, Cytoskeleton		
ADAM8	ADAM metallopeptidase domain 8	1.31
CCT5	chaperonin containing TCP1, subunit 5 (epsilon)	-1.35
CCT7	chaperonin containing TCP1, subunit 7 (eta)	-1.25
CD44	CD44 molecule (Indian blood group)	1.26
CFL1	cofilin 1 (non-muscle)	-1.22
CSF3R	colony stimulating factor 3 receptor (granulocyte)	1.36
ELMO1	engulfment and cell motility 1	1.24
FXYD5	FXYD domain containing ion transport regulator 5	1.47
RHAMM	hyaluronan-mediated motility receptor (RHAMM)	-1.98
IL18	interleukin 18 (interferon-gamma-inducing factor)	1.43
JUP	junction plakoglobin	1.40
MCAM	melanoma cell adhesion molecule	-1.37
MDK	midkine (neurite growth-promoting factor 2)	1.25
OIP5	Opa interacting protein 5	-1.57
PPM1F	protein phosphatase 1F (PP2C domain containing)	1.25
RHOB	ras homolog gene family, member B	1.70
SELL	selectin L (lymphocyte adhesion molecule 1)	1.57
STAT3	signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor)	1.33
TUBA1B	tubulin, alpha 1b	-1.26
TUBA1C	tubulin, alpha 1c	-1.20
TUBB2C	tubulin, beta 2C	-1.22
TUBB3	tubulin, beta 3	-1.23
TUBB6	tubulin, beta 6	-1.27

Tabelle 4: Liste differentiell exprimierter Gene.

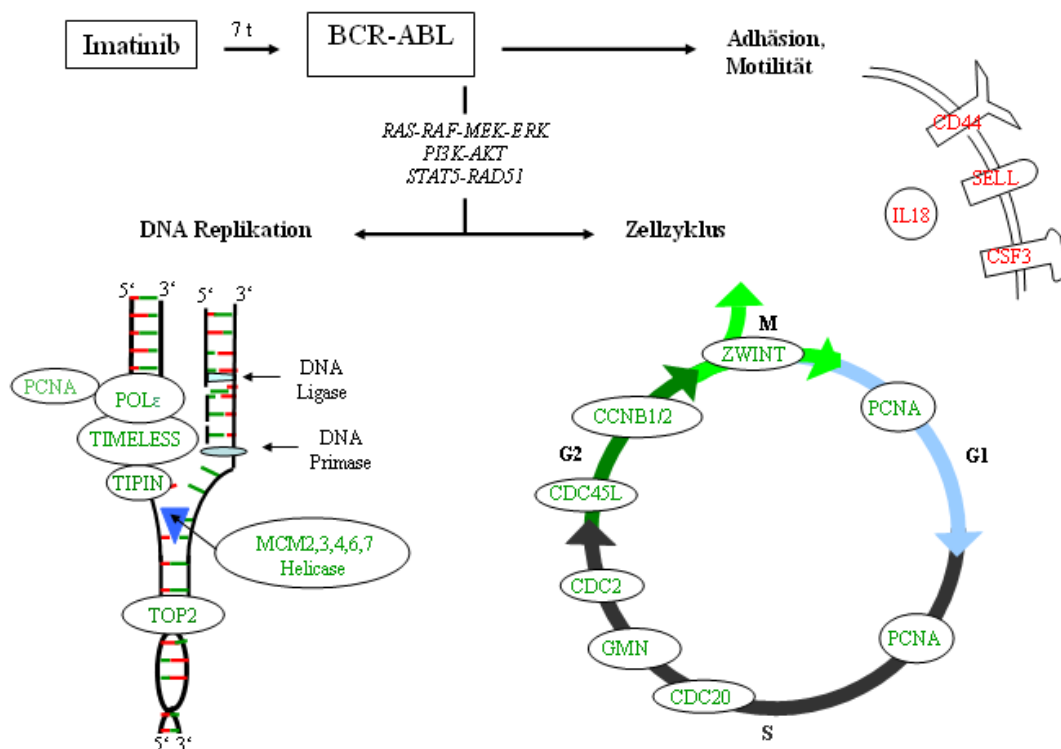


Abbildung 11: Funktionelle Signale, die sich durch die Therapie mit Imatinib in den ersten sieben Tagen verändern.

Obgleich sich in der ersten Therapiewoche keine signifikante Veränderung hinsichtlich der Anzahl Ph positiver CD34 positiver Zellen bzw. der Leukozyten bei den Patienten zeigte, haben alle Patienten im Verlauf eine hämatologische und zytogenetische als auch eine molekulare Remission erreichen können. Dies bedeutet, dass in der ersten Woche der Therapie die molekularen Weichen gestellt werden, die eine Umwandlung einer überwiegend aus Ph CD34 positiven Progenitor Zellen bestehenden Hämatopoiese in eine normale Blutbildung bewirken.

Betrachtet man zunächst die Gene, die den Zellzyklus betreffen, so zeigt sich das Imatinib Hauptregulatoren der verschiedenen Phasen des Zellzyklus beeinflusst. Was die S-Phase betrifft sind CDC 2 und cell division cycle 20 (CDC20), Geminin (GMNN) und Minichromosomal Maintenance Complex Component 4 (MCM) betroffen¹⁰⁰⁻¹⁰³, wobei der größte Unterschied mit einer 3.5 fachen Regulation nach unten das CDC2 betraf. Für den Übergang in die G2 Phase des Zellzyklus werden CDC2 und Cell division cycle 45 like (CDC45L) benötigt, welche ebenfalls nach der Therapie mit Imatinib herunterreguliert waren¹⁰⁴. Weiter entlang des Zellzykluspfades in Richtung Mitose sind Gene wie das Cyclin B1 und B2 (CCNB1, CCNB2) aktiv¹⁰⁵, die ebenfalls herunterreguliert wurden. Dies spricht also

zusammengefasst eher für eine Verlangsamung der mitotischen „Uhr“ als einen Arrest. Diese Verlangsamung auf Genexpressionsebene steht im Einklang mit der aktuellen, die bcr-abl gesteuerten Proteine betreffenden Literatur. Als Beispiel sei das c-Myb Protein benannt, welches für Proliferation und Überleben von myeloiden Progenitorzellen und leukämischen CML-Blasten benötigt wird¹⁰⁶. Eines der c-Myb assoziierten Proteine ist das CCNB1, welches ebenfalls in unserer Analyse herunter reguliert war. In Ergänzung hierzu ist der RAS/RAF/MEK/ERK Pfad oder MAPK Pfad¹⁰⁷ bekannt als intrazelluläre Signalkaskade, die eine wesentliche Rolle bei der Regulation von Zellzyklus und Proliferation in der CML Zelle spielt. Da wesentliche Teile dieser Signalkaskade durch Imatinib betroffen sind, ist eine verminderte Expression von zellzyklusassoziierten Genen nicht unerwartet¹⁰⁸⁻¹¹⁰. Als Beispiel aktivieren die RAF Proteine cyclic AMP-responsive element-binding protein, welches wiederum Cyclin A aktiviert, das in der S- und G2 Phase aktiv ist¹¹¹. Cyclin A wiederum bildet mit CDC 2, welches wie bereits erwähnt in unserer Analyse herunterreguliert war, einen Komplex. Unser Ergebnis einer verminderten Expression des RRM2 (ribonucleotide reductase M2 polypeptide) Genes nach Behandlung mit Imatinib spiegelt sich ebenfalls auf Proteinebene wieder. Heidel et al. konnten zeigen, dass ein „knockdown“ von RRM2 die Proliferationsrate von leukämischen Zellen¹¹² via NF- κ B¹¹³ in der späten G1 und S-Phase¹¹⁴ reduziert.

Wenden wir uns nun der Gruppe der Gene zu, die mit DNA Replikation assoziiert sind. Ein maßgeblicher früher Schritt innerhalb der S-Phase ist die DNA Replikation. Im Hinblick auf die Gene, die hierbei involviert sind, fanden wir wiederum Gene, welche während der Therapie mit Imatinib herunterreguliert wurden. Die Entfaltung der DNA, ein unumgänglicher Schritt bei der DNA Replikation, benötigt zwei Komplexe genannt Topoisomerase 2 alpha (TOP2A) und MCM Helicase complex^{115, 116}. Unter den Genen, die diesen Komplex bilden, war die Expressionsstärke der Komponenten MCM 2, 3, 4, 6 und 7 signifikant höher in den CD 34 positiven Zellen vor der Therapie mit Imatinib verglichen mit der Expressionsstärke nach sieben Tagen Therapie. Eine signifikante Abnahme der Expression fand sich auch für die Gene TIMELESS und TIPIN, welche für Proteine entlang der Replikationsgabel kodieren¹¹⁷. Dies wiederum steht im Einklang mit der Tatsache, dass es ebenfalls zu einer verminderten Expression des Replikationsproteines RPA3¹¹⁸ sowie der Replikationsaktivierungsfaktoren RFC3 und vier nach einer Woche Therapie kommt. Die Expression von Pole 2 sowie der DNA Polymerase ϵ , welche für die Synthese des neuen DNA Stranges notwendig sind, war ebenfalls vermindert^{119, 120}. Als letztes sei das Gen kodierend für PCNA (proliferation cell nuclear antigen), ein Kofaktor der Polymerase δ ¹²¹ erwähnt, welches als zweites Enzym der

DNA Strang Synthese¹¹⁷ herunterreguliert war. Diese Veränderung spiegelt sich auch auf Proteinebene wieder.

Bei der dritten Gruppe von Genen, die durch die Behandlung mit Imatinib betroffen sind, handelt es sich um Gene, die für Proteine kodieren, die in Adhäsionsfähigkeit und Motilität der Zellen involviert sind. Als Beispiel fanden wir eine signifikant höhere Expression für das CD44 Gen. Bei CD44 handelt es sich um ein Protein, welches die Bindung von CD34 positiven Zellen an Hyaluronsäure, einer Komponente der Knochenmarkmatrix, vermittelt¹²². Dasselbe ließ sich für den Zelloberflächenrezeptor L-Selectin (SELL) zeigen, welcher bekanntermaßen¹²³ bei Patienten mit neu diagnostizierter CML herunterreguliert ist. In diesem Kontext sind auch Interleukin 18, RHOB und CSF3R (colony stimulating factor 3 receptor)¹²⁴⁻¹²⁶ zu nennen, die ebenfalls nach der Therapie mit Imatinib höher exprimiert wurden. In der Summe führt die Hochregulation der Adhäsions-assoziierten Gene wahrscheinlich zu einer verringerten Motilität einhergehend mit einer gesteigerten Adhäsion der CD34 positiven Zellen, was zu einer verminderten Migration aus dem Knochenmark und Zirkulieren im peripheren Blut führt.

Es steht außer Frage, dass wir durch unsere Untersuchungen kein klares Bild der Sequenzen der einzelnen molekularen Ereignisse haben, da wir hierfür Expressionsanalysen zu verschiedenen Zeitpunkten benötigen würden. Dennoch ist anzunehmen, dass die initial bessere Adhäsion der Ph positiven CD34 positiven Zellen an den Komponenten der Knochenmarkmatrix mit einem verminderten Zellzyklus inklusive einer verminderten DNA Replikation und mitotischer Aktivität einhergeht. Dies wiederum zieht eine verminderte Proliferation, Expansion und Produktion leukämischer Stammzellen nach sich. Die von uns gefundenen „Early Response“ Gene werden hinsichtlich ihres prädiktiven Potentials in Bezug auf das Ansprechen auf eine Imatinibtherapie mit Hilfe eines Microarrays im Rahmen eines Folgeprojektes validiert werden.

4. Schlussfolgerung und Ausblick

Seit der Erstbeschreibung der CML im Jahre 1845 durch Rudolf Virchow konnten bis heute wesentliche Aspekte der Pathophysiologie dieser Erkrankung aufgeklärt werden, wodurch die Grundlage einer molekularen Charakterisierung der an der Translokation beteiligten Gene gelegt wurde. So ist eine tödlich verlaufende Leukämie durch eine "targeted therapy" mit nur einer Tablette therapierbar geworden. Meilensteine auf diesem Weg waren neben der Erstbeschreibung des Philadelphia Chromosoms die Entwicklung einer spezifischen PCR zur Quantifizierung der bcr-abl mRNA. Auf diesem diagnostischen Boden ist der Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib zur Standardtherapie für Patienten mit CML geworden. Die Therapie richtet sich nach molekularen Kriterien, die auf Messungen der bcr-abl mRNA in peripherem Blut fußen. Ein Risiko zusätzlicher genetischer Veränderungen des Genoms durch die Therapie mit Imatinib ist angesichts des nicht beeinflussten Genexpressionsprofils unwahrscheinlich. Gleichwohl werden jährliche zytogenetische Untersuchungen analog den Baccarani Richtlinien⁸⁹ empfohlen, da während der Einnahme die Entstehung zusätzlicher chromosomaler Aberrationen in den Ph positiven Zellen bzw. neuer chromosomaler Anomalien in den Ph negativen Zellen nicht auszuschließen sind. Neben Patienten mit bcr-abl positiver CML sprechen auch Patienten mit atypischen chronisch myeloproliferativen Erkrankungen auf eine Therapie mit Imatinib an, wenn andere Tyrosinkinasen wie c-kit oder PDGF pathophysiologisch eine Rolle spielen. Der molekulare Wirkmechanismus des Tyrosinkinaseinhibitors basiert in der Frühphase der Therapie auf Veränderungen innerhalb der Ph positiven Stammzelle, die eine Entwicklung in Richtung gesunder Stammzelle induzieren. In erster Linie kommt es dabei zu einer Verlangsamung der Zellproliferation und erhöhten Zelladhäsion. Nach wie vor ist die allogene Blutstammzelltransplantation allerdings die bis heute einzige kurative Behandlung. Als Risikoscore für die Einschätzung der Prognose von transplantierten Patienten dient der SOFA-Score. Die Verwendung von CSA in Kombination mit MMF stellt bei Transplantationen HLA identischer Geschwisterzellen die GvHD-Prophylaxe der Wahl dar, da es hierdurch zu einer kürzeren Aplasiezeit als mit anderen Immunsuppressiva kommt. Die nicht-myeloablative Konditionierung ist eine Therapiealternative für Patienten mit CML, bei denen eine myeloablative Hochdosistherapie oder eine Behandlung mit einem Tyrosinkinaseinhibitor kontraindiziert sind.

Die primäre oder sekundäre Resistenz gegen Imatinib ist das Hauptproblem bei der Behandlung von Patienten mit CML. In der IRIS Studie zeigte sich nach einer Beobachtungszeit von 42 Monaten, dass 16 % der Patienten in chronischer Phase, nachdem sie zunächst eine hämatologische bzw. zytogenetische Remission erreicht hatten, im Verlauf der Erkrankung eine

Resistenz und damit eine erneute Krankheitsaktivität entwickelten¹²⁷. Für diese Resistenzen sind zum größten Teil die bcr-abl abhängigen Resistenzmechanismen verantwortlich, wobei Mutationen in der Kinase-Domäne des bcr-abl Proteins eine Rolle spielen. Aktuell sind in der Literatur 40 verschiedene Mutationen beschrieben, die dazu führen, dass bcr-abl an der Bindungsstelle des Imatinib eine Konformation annimmt, die es dem Tyrosinkinaseinhibitor nicht erlaubt zu binden. Ein ebenfalls bcr-abl abhängiger Resistenzmechanismus, der bei zehn Prozent der Patienten auftritt, ist eine Überexpression des bcr-abl Proteins. Die bcr-abl abhängige Resistenz ist in der Regel durch eine Dosissteigerung des Imatinib zunächst therapierbar^{42, 95, 128-133}. Im weiteren Verlauf ist zumeist dann jedoch die Verabreichung eines Nachfolgepräparates wie Dasatinib oder Nilotinib erforderlich, die aufgrund ihres gegenüber Imatinib unterschiedlichen Bindungsverhalten und unterschiedlicher Zielyrosinkinasen diese Resistenzen überwinden können. Neue Möglichkeiten bietet die Inhibition bisher unbekannter intrazellulärer Signalkaskaden wie zum Beispiel den PI3K/AKT/PIM1 Weg. Ziel wird es sein das individuelle Ansprechen auf einen der zur Verfügung stehenden Tyrosinkinaseinhibitoren vor Behandlungsbeginn durch charakteristische Genexpressionsprofile zu ermitteln und die therapeutische Wirksamkeit durch PCR- und Mutationsanalysen zu überprüfen.

Ein weiteres Problem ist die Persistenz bcr-abl positiver Blutstammzellen trotz einer äußerst wirksamen Therapie mit Imatinib. So erreichten nur fünf Prozent aller Patienten, die in der IRIS Studie mit Imatinib behandelt wurden eine komplette molekulare Remission. Bei diesen Patienten war mit Methoden, die eine Leukämiezelle in 1×10^6 gesunden Zellen im Sinne einer "minimal residual disease" detektieren, keine bcr-abl positive Zelle mehr nachweisbar⁹². Die Persistenz Ph positiver Zellen bzw. der konstante Nachweis von sehr geringen Mengen an bcr-abl mRNA ist nach derzeitigem Kenntnisstand nicht von prognostischer Relevanz. Ungeachtet dessen ist das Rezidivrisiko nach Absetzen der Therapie mit Imatinib hoch, weshalb die Therapie lebenslang fortgeführt werden sollte. Im Mittelpunkt zukünftiger Projekte steht daher die Aufklärung der Mechanismen, welche die persistierenden bcr-abl positive Blutstammzellen in ihrer hämatopoietischen "Knochenmarknische" halten und vor dem Einfluss der Tyrosinkinaseinhibitoren schützen. Das Aufbrechen dieser Schutzfunktion zum Beispiel durch die Induktion einer verminderten Adhäsion der Ph positiven Zellen in der Nische durch Blockade von CD44 oder Selektin könnte diese vulnerabler machen und ggf. Apoptose induzieren. Dies könnte in Zukunft ein Absetzen der Therapie und eine Heilung der CML ermöglichen.

5. Literaturverzeichnis

1. Virchow R. Weisses Blut. *Frorieps Notizen*. 1845;36:151-156.
2. Geary CG. The story of chronic myeloid leukaemia. Historical review. *British Journal of Haematology*. 2000;110(1):2-11.
3. Nowell P, Hungerford D. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science*. 1960;132:1497.
4. Rowley J. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature*. 1973;243(5405):290-293.
5. Daley G, Van Etten R, Baltimore D. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Science*. 1990;247(4944):824-830.
6. Kelliher MA, McLaughlin J, Witte ON, et al. Induction of a chronic myelogenous leukemia-like syndrome in mice with v-abl and BCR/ABL. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1990;87(17):6649-6653.
7. Heisterkamp N, Jenster G, ten Hoeve J, et al. Acute leukaemia in bcr/abl transgenic mice. *Nature*. 1990;344(6263):251-253.
8. Lugo T, Pendergast A, Muller A, et al. Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. *Science*. 1990;247(4946):1079-1082.
9. Goldman JM, Melo JV. Chronic myeloid leukemia - advances in biology and new approaches to treatment. *N Engl J Med*. 2003;349(15):1451-1464.
10. Goldman J. Unraveling CML phase by phase. *Blood*. 2007;109(8):3128-.
11. Gratwohl A, Baldomero H, Horisberger B, et al. Current trends in hematopoietic stem cell transplantation in Europe. *Blood*. 2002;100(7):2374-2386.
12. Kolb HJ, Mittermuller J, Clemm C, et al. Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. *Blood*. 1990;76(12):2462-2465.
13. Talpaz M, Silver RT, Druker BJ, et al. Imatinib induces durable hematologic and cytogenetic responses in patients with accelerated phase chronic myeloid leukemia: results of a phase 2 study. *Blood*. 2002;99(6):1928-1937.
14. Kantarjian H, Sawyers C, Hochhaus A, et al. Hematologic and cytogenetic responses to Imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. *N Engl J Med*. 2002;346(9):645-652.

15. Kantarjian HM, Cortes J, O'Brien S, et al. Imatinib mesylate (STI571) therapy for Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia in blast phase. *Blood*. 2002;99(10):3547-3553.
16. O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA, et al. Imatinib compared with Interferon and low-dose Cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2003;348(11):994-1004.
17. Buchdunger E, Zimmermann J, Mett H, et al. Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylaminopyrimidine derivative. *Cancer Res*. 1996;56(1):100-104.
18. 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(5):561-566.
19. Buchdunger E, Cioffi CL, Law N, et al. Abl protein-tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-Kit and platelet-derived growth factor receptors. *J Pharmacol Exp Ther*. 2000;295(1):139-145.
20. Heinrich MC, Griffith DJ, Druker BJ, et al. Inhibition of c-kit receptor tyrosine kinase activity by STI 571, a selective tyrosine kinase inhibitor. *Blood*. 2000;96(3):925-932.
21. Apperley JF, Gardembas M, Melo JV, et al. Response to Imatinib Mesylate in Patients with Chronic Myeloproliferative Diseases with Rearrangements of the Platelet-Derived Growth Factor Receptor Beta. *N Engl J Med*. 2002;347(7):481-487.
22. Okuda K, Weisberg E, Gilliland DG, et al. ARG tyrosine kinase activity is inhibited by STI571. *Blood*. 2001;97(8):2440-2448.
23. Schindler T, Bornmann W, Pellicena P, et al. Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase. *Science*. 2000;289:1938-1942.
24. Demetri GD, von Mehren M, Blanke CD, et al. Efficacy and safety of Imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors. *N Engl J Med*. 2002;347(7):472-480.
25. Neumann F, Poelitz A, Hildebrandt B, et al. The tyrosine-kinase inhibitor Imatinib induces long-term remission in a patient with chronic myelogenous leukemia with translocation t(4;22). *Leukemia*. 2007;21(4):836-837.
26. Bumm T, Muller C, Al-Ali H-K, et al. 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;101(5):1941-1949.
27. Yuan Z-M, Shioya H, Ishiko T, et al. p73 is regulated by tyrosine kinase c-Abl in the apoptotic response to DNA damage. *Nature*. 1999;399(6738):814-817.
28. Lyman SD, Jacobsen SEW. c-kit ligand and Flt3 ligand: stem/progenitor cell factors with overlapping yet distinct activities. *Blood*. 1998;91(4):1101-1134.

29. Andersen M, Pedersen-Bjergaard J, Kjeldsen L, et al. Clonal Ph-negative hematopoiesis in CML after therapy with imatinib mesylate is frequently characterized by trisomy 8. *Leukemia*. 2002;16(7):1390-1393.
30. Terre C, Eclache V, Rousselot P, et al. Report of 34 patients with clonal chromosomal abnormalities in Philadelphia-negative cells during imatinib treatment of Philadelphia-positive chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2004;18(8):1340-1346.
31. Neumann F, Herold C, Hildebrandt B, et al. Quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction for diagnosis of BCR-ABL positive leukemias and molecular monitoring following allogeneic stem cell transplantation. *European Journal of Haematology*. 2003;70(1):1-10.
32. Merx K, Müller M, Kreil S, et al. Early reduction of BCR-ABL mRNA transcript levels predicts cytogenetic response in chronic phase CML patients treated with imatinib after failure of interferon alpha. *Leukemia*. 2002;16(9):1579-1583.
33. Elmaagacli AH, Beelen DW, Opalka B, et al. The amount of BCR-ABL fusion transcripts detected by the real-time quantitative polymerase chain reaction method in patients with Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukemia correlates with the disease stage. *Annals of Hematology*. 2000;79(8):424-431.
34. Kreuzer K-A, Lass U, Bohn A, et al. LightCycler technology for the quantitation of bcr/abl fusion transcripts. *Cancer Res*. 1999;59(13):3171-3174.
35. Emig M, Saussele S, Wittor H, et al. Accurate and rapid analysis of residual disease in patients with CML using specific fluorescent hybridization probes for real time quantitative RT-PCR. *Leukemia*. 1999;13(11):1825-1832.
36. Hochhaus A, Reiter A, Reichert SSA, et al. Molecular heterogeneity in complete cytogenetic responders after interferon-alpha therapy for chronic myelogenous leukemia: low levels of minimal residual disease are associated with continuing remission. *Blood*. 2000;95(1):62-66.
37. Olavarria E, Kanfer E, Szydlo R, et al. Early detection of BCR-ABL transcripts by quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction predicts outcome after allogeneic stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2001;97(6):1560-1565.
38. Stentoft J, Pallisgaard N, Kjeldsen E, et al. Kinetics of BCR-ABL fusion transcript levels in chronic myeloid leukemia patients treated with STI571 measured by quantitative real-time polymerase chain reaction. *European Journal of Haematology*. 2001;67(5-6):302-308.
39. Wang L, Pearson K, Pillitteri L, et al. Serial monitoring of BCR-ABL by peripheral blood real-time polymerase chain reaction predicts the marrow cytogenetic response to imatinib mesylate in chronic myeloid leukaemia. *British Journal of Haematology*. 2002;118(3):771-777.

40. Hughes TP, Kaeda J, Branford S, et al. Frequency of major molecular responses to Imatinib or Interferon alfa plus Cytarabine in newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2003;349(15):1423-1432.
41. Cross N, Melo J, Feng L, et al. An optimized multiplex polymerase chain reaction (PCR) for detection of BCR-ABL fusion mRNAs in haematological disorders. *Leukemia.* 1994;8(1):186-189.
42. Branford S, Rudzki Z, Walsh S, et al. High frequency of point mutations clustered within the adenosine triphosphate-binding region of BCR/ABL in patients with chronic myeloid leukemia or Ph-positive acute lymphoblastic leukemia who develop imatinib (STI571) resistance. *Blood.* 2002;99(9):3472-3475.
43. Kantarjian H, Talpaz M, O'Brien S, et al. High-dose imatinib mesylate therapy in newly diagnosed Philadelphia chromosome-positive chronic phase chronic myeloid leukemia. *Blood.* 2004;103(8):2873-2878.
44. Kiehl MG, Schäfer-Eckart K, Kröger M, et al. Mycophenolate mofetil for the prophylaxis of acute graft-versus-host disease in stem cell transplant recipients. *Transplantation Proceedings.* 2002;34(7):2922-2924.
45. Michallet M, Perrin M, Belhabri A, et al. Impact of cyclosporine and methylprednisolone dose used for prophylaxis and therapy of graft-versus-host disease on survival and relapse after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 1999;23(2):145-150.
46. Zikos P, Van Lint MT, Frassoni F, et al. Low transplant mortality in allogeneic bone marrow transplantation for acute myeloid leukemia: A randomized study of low-dose Cyclosporin versus low-dose Cyclosporin and low-dose Methotrexate. *Blood.* 1998;91(9):3503-3508.
47. Byrne J, Stainer C, Hyde H, et al. Low incidence of acute graft-versus-host disease and recurrent leukaemia in patients undergoing allogeneic haemopoietic stem cell transplantation from sibling donors with methotrexate and dose-monitored cyclosporin A prophylaxis. *Bone Marrow Transplant.* 1998;22(6):541-545.
48. Deeg HJ, Lin D, Leisenring W, et al. Cyclosporine or Cyclosporine plus Methylprednisolone for prophylaxis of graft-versus-host disease: a prospective, randomized trial. *Blood.* 1997;89(10):3880-3887.
49. Hale G, Zhang M-J, Bunjes D, et al. Improving the outcome of bone marrow transplantation by using CD52 monoclonal antibodies to prevent graft-versus-host disease and graft rejection. *Blood.* 1998;92(12):4581-4590.
50. Ho VT, Soiffer RJ. The history and future of T-cell depletion as graft-versus-host disease prophylaxis for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood.* 2001;98(12):3192-3204.
51. Storb R, Deeg H, Whitehead J, et al. Methotrexate and cyclosporine compared with cyclosporine alone for prophylaxis of acute graft versus host disease after marrow transplantation for leukemia. *N Engl J Med.* 1986;314(12):729-735.

52. Storb R, Deeg H, Pepe M, et al. Graft-versus-host disease prevention by methotrexate combined with cyclosporin compared to methotrexate alone in patients given marrow grafts for severe aplastic anaemia: long-term follow-up of a controlled trial. *Br J Haematol.* 1989;72(4):567-572.
53. Storb R, Deeg HJ, Pepe M, et al. Methotrexate and cyclosporine versus cyclosporine alone for prophylaxis of graft-versus-host disease in patients given HLA-identical marrow grafts for leukemia: long-term follow-up of a controlled trial. *Blood.* 1989;73(6):1729-1734.
54. Sollinger H. Mycophenolate mofetil for the prevention of acute rejection in primary cadaveric renal allograft recipients. U.S. Renal Transplant Mycophenolate Mofetil Study Group. *Transplantation.* 1995;60(3):225-232.
55. Mookerjee B, Altomonte V, Vogelsang G. Salvage therapy for refractory chronic graft-versus-host disease with mycophenolate mofetil and tacrolimus. *Bone Marrow Transplant.* 1999;24(5):517-520.
56. Vogelsang GB. How I treat chronic graft-versus-host disease. *Blood.* 2001;97(5):1196-1201.
57. Buscam A, Saroglia E, Lanino E, et al. Mycophenolate mofetil (MMF) as therapy for refractory chronic GVHD (cGVHD) in children receiving bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2000;25(10):1067-1071.
58. Basara N, Blau W, Kiehl M, et al. Efficacy and safety of mycophenolate mofetil for the treatment of acute and chronic GVHD in bone marrow transplant recipient. *Bone Marrow Transplant.* 1998;30(8):4087-4089.
59. Mielcarek M, Martin PJ, Leisenring W, et al. Graft-versus-host disease after nonmyeloablative versus conventional hematopoietic stem cell transplantation. *Blood.* 2003;102(2):756-762.
60. Thomas E, Storb R, Clift R, et al. Bone marrow transplantation. *N Engl J Med.* 1975;292(17):832.
61. Barnes D, Corp M, Loutit J, et al. Treatment of murine leukaemia with X rays and homologous bone marrow; preliminary communication. *Br Med J.* 1956;2(4993):626-627.
62. Weiden P, Flournoy N, Thomas E, et al. Antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic-marrow grafts. *N Engl J Med.* 1979;300(19):1068-1073.
63. Weiden P, Sullivan K, Flournoy N, et al. Antileukemic effect of chronic graft-versus-host disease: contribution to improved survival after allogeneic marrow transplantation. *N Engl J Med.* 1981;304(25):1529-1533.
64. Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, et al. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood.* 1990;75(3):555-562.

65. Storb R, Yu C, Wagner JL, et al. Stable mixed hematopoietic chimerism in DLA-identical littermate dogs given sublethal total body irradiation before and pharmacological immunosuppression after marrow transplantation. *Blood*. 1997;89(8):3048-3054.
66. McSweeney PA, Niederwieser D, Shizuru JA, et al. Hematopoietic cell transplantation in older patients with hematologic malignancies: replacing high-dose cytotoxic therapy with graft-versus-tumor effects. *Blood*. 2001;97(11):3390-3400.
67. Kobbe G, Schneider P, Rohr U, et al. Treatment of severe steroid refractory acute graft-versus-host disease with infliximab, a chimeric human/mouse antiTNFalpha antibody. *Bone Marrow Transplantation*. 2001;28(1):47-49.
68. Cornelissen JJ, van der Holt B, Petersen EJ, et al. A randomized multicenter comparison of CD34+-selected progenitor cells from blood vs from bone marrow in recipients of HLA-identical allogeneic transplants for hematological malignancies. *Experimental Hematology*. 2003;31(10):855-864.
69. Stem Cell Trialists' Collaborative G. Allogeneic peripheral blood stem-cell compared with bone marrow transplantation in the management of hematologic malignancies: an individual patient data meta-analysis of nine randomized trials. *J Clin Oncol*. 2005;23(22):5074-5087.
70. Jackson S, Tweeddale M, Barnett M, et al. Admission of bone marrow transplant recipients to the intensive care unit: outcome, survival and prognostic factors. *Bone Marrow Transplant*. 1998;21(7):697-704.
71. Khassawneh BY, White P, Jr., Anaissie EJ, et al. Outcome from mechanical ventilation after autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Chest*. 2002;121(1):185-188.
72. Shorr AF, Moores LK, Edenfield WJ, et al. Mechanical ventilation in hematopoietic stem cell transplantation: can we effectively predict outcomes? *Chest*. 1999;116(4):1012-1018.
73. Soubani AO, Miller KB, Hassoun PM. Pulmonary complications of bone marrow transplantation. *Chest*. 1996;109(4):1066-1077.
74. Naeem N, Reed MD, Creger RJ, et al. Transfer of the hematopoietic stem cell transplant patient to the intensive care unit: does it really matter? *Bone Marrow Transplant*. 2005;37(2):119-133.
75. Pene F, Aubron C, Azoulay E, et al. Outcome of critically ill allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation recipients: a reappraisal of indications for organ failure supports. *J Clin Oncol*. 2006;24(4):643-649.
76. Rubenfeld GD, Crawford SW. Withdrawing life support from mechanically ventilated recipients of bone marrow transplants: a case for evidence-based guidelines. *Ann Intern Med*. 1996;125(8):625-633.

77. Soubani AO, Kseibi E, Bander JJ, et al. Outcome and prognostic factors of hematopoietic stem cell transplantation recipients admitted to a medical ICU. *Chest*. 2004;126(5):1604-1611.
78. Huaranga A, Leyva F, Giralt S, et al. Outcome of bone marrow transplantation patients requiring mechanical ventilation. *Crit Care Med*. 2000;28(4):1014-1017.
79. Afessa B, Tefferi A, Dunn W, et al. Intensive care unit support and Acute Physiology and Chronic Health Evaluation III performance in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Crit Care Med*. 2003;31(6):1715-1721.
80. Kim S, Kami M, Urahama N, et al. Feasibility of acute physiology and chronic health evaluation (APACHE) II and III score-based screening in patients receiving allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation. *Transplantation*. 2003;75(4):566-570.
81. Task Force of the American College of Critical Care Medicine SoCCM. Guidelines for intensive care unit admission, discharge, and triage. Task Force of the American College of Critical Care Medicine, Society of Critical Care Medicine. *Crit Care Med*. 1999;27(3):633-638.
82. Glucksberg H, Storb R, Fefer A, et al. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplantation*. 1974;18(4):295-304.
83. Hochhaus A, Lin F, Reiter A, et al. Quantification of residual disease in chronic myelogenous leukemia patients on interferon-alpha therapy by competitive polymerase chain reaction. *Blood*. 1996;87(4):1549-1555.
84. Martinelli G, Testoni N, Amabile M, et al. Quantification of BCR-ABL transcripts in CML patients in cytogenetic remission after interferon-alpha-based therapy. *Bone Marrow Transplant*. 2000;25(7):729-736.
85. Preudhomme C, Révillion F, Merlat A, et al. Detection of BCR-ABL transcripts in chronic myeloid leukemia (CML) using a 'real time' quantitative RT-PCR assay. *Leukemia*. 1999;13(6):957-964.
86. Menskin, Van De L, Schattenberg, et al. Quantitation of minimal residual disease in Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukaemia patients using real-time quantitative RT-PCR. *British Journal of Haematology*. 1998;102(3):768-774.
87. Elmaagacli AH, Freist A, Hahn M, et al. Estimating the relapse stage in chronic myeloid leukaemia patients after allogeneic stem cell transplantation by the amount of BCR-ABL fusion transcripts detected using a new real-time polymerase chain reaction method. *British Journal of Haematology*. 2001;113(4):1072-1075.
88. Branford, Hughes, Rudzki. Monitoring chronic myeloid leukaemia therapy by real-time quantitative PCR in blood is a reliable alternative to bone marrow cytogenetics. *British Journal of Haematology*. 1999;107(3):587-599.

89. Baccarani M, Saglio G, Goldman J, et al. Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*. 2006;108(6):1809-1820.
90. Neumann F, Markett J, Fenk R, et al. Therapy adapted to molecular response in patients with chronic myelogenous leukaemia in first chronic phase: results of the Dueseldorf study. *Hematol Oncol*. 2008;DOI: 10.1002/hon.860.
91. 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(1):28-37.
92. Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, et al. Five-year follow-up of patients receiving Imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. December 7, 2006 2006;355(23):2408-2417.
93. Steidl U, Kronenwett R, Rohr U-P, et al. Gene expression profiling identifies significant differences between the molecular phenotypes of bone marrow-derived and circulating human CD34+ hematopoietic stem cells. *Blood*. 2002;99(6):2037-2044.
94. Huber W, von Heydebreck A, Sultmann H, et al. Variance stabilization applied to microarray data calibration and to the quantification of differential expression. *Bioinformatics*. 2002;18(suppl_1):96-104.
95. 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(5531):876-880.
96. Kawauchi K, Ogasawara T, Yasuyama M, et al. Involvement of Akt kinase in the action of STI571 on chronic myelogenous leukemia cells. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. 2003;31(1):11-17.
97. Aichberger KJ, Mayerhofer M, Krauth M-T, et al. Low-level expression of proapoptotic Bcl-2-interacting mediator in leukemic cells in patients with chronic myeloid leukemia: role of BCR/ABL, characterization of underlying signaling pathways, and reexpression by novel pharmacologic compounds. *Cancer Res*. 2005;65(20):9436-9444.
98. Chu S, Holtz M, Gupta M, et al. BCR/ABL kinase inhibition by imatinib mesylate enhances MAP kinase activity in chronic myelogenous leukemia CD34+ cells. *Blood*. 2004;103(8):3167-3174.
99. Li C, Hung Wong W. Model-based analysis of oligonucleotide arrays: model validation, design issues and standard error application. *Genome Biol*. 2001;2(8):research0032.0031-0032.0011.
100. Doree M, Galas S. The cyclin-dependent protein kinases and the control of cell division. *FASEB J*. 1994;8(14):1114-1121.

101. Goh P-Y, Lim HH, Surana U. Cdc20 protein contains a destruction-box but, unlike Clb2, its proteolysis is not acutely dependent on the activity of anaphase-promoting complex. *Eur J Biochem.* 2000;267(2):434-449.
102. Seo S, Kroll K. Geminin's double life: chromatin connections that regulate transcription at the transition from proliferation to differentiation. *Cell Cycle.* 2006;5(4):374-379.
103. Zhou B, Liao Y, Xia W, et al. Cytoplasmic localization of p21^{Cip1/WAF1} by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. *Nat Cell Biol.* 2001;3:245-252.
104. Bauerschmidt C, Pollok S, Kremmer E, et al. Interactions of human Cdc45 with the Mcm2-7 complex, the GINS complex, and DNA polymerases delta and epsilon and during S phase. *Genes to Cells.* 2007;12(6):745-758.
105. Bellanger S, de Gramont A, Sobczak-Thépot J. Cyclin B2 suppresses mitotic failure and DNA re-replication in human somatic cells knocked down for both cyclins B1 and B2. *Oncogene.* 2007;26(51):7175-7184.
106. Lidonnici MR, Corradini F, Waldron T, et al. Requirement of c-Myb for p210BCR/ABL-dependent transformation of hematopoietic progenitors and leukemogenesis. *Blood.* 2008;111(9):4771-4779.
107. Steelman LS, Pohnert SC, Shelton JG, et al. JAK//STAT, Raf//MEK//ERK, PI3K//Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. *Leukemia.* 2004;18(2):189-218.
108. Chang F, Lee J, Navolanic P, et al. Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy. *Leukemia.* 2003;17(3):590-603.
109. Chang F, Steelman L, Shelton J, et al. Regulation of cell cycle progression and apoptosis by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway. *Int J Oncol.* 2003;22(3):469-480.
110. Chang F, Steelman LS, Lee JT, et al. Signal transduction mediated by the Ras//Raf//MEK//ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: potential targeting for therapeutic intervention. *Leukemia.* 2003;17(7):1263-1293.
111. Bottazzi ME, Buzzai M, Zhu X, et al. Distinct effects of mitogens and the actin cytoskeleton on CREB and pocket protein phosphorylation control the extent and timing of cyclin A promoter activity. *Mol Cell Biol.* 2001;21(22):7607-7616.
112. Heidel JD, Liu JY-C, Yen Y, et al. Potent siRNA inhibitors of ribonucleotide reductase subunit RRM2 reduce cell proliferation *In vitro* and *In vivo*. *Clin Cancer Res.* 2007;13(7):2207-2215.
113. Duxbury MS, Whang EE. RRM2 induces NF- κ B-dependent MMP-9 activation and enhances cellular invasiveness. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2007;354(1):190-196.

114. Engstrom Y, Eriksson S, Jildevik I, et al. Cell cycle-dependent expression of mammalian ribonucleotide reductase. Differential regulation of the two subunits. *J Biol Chem*. 1985;260:9114-9116.
115. Davey MJ, Indiani C, O'Donnell M. Reconstitution of the Mcm2-7p Heterohexamer, Subunit Arrangement, and ATP Site Architecture. *J Biol Chem*. 2003;278(7):4491-4499.
116. Wang JC. DNA topoisomerases: why so many? *J Biol Chem*. 1991;266(11):6659-6662.
117. Gotter AL, Suppa C, Emanuel BS. Mammalian TIMELESS and Tipin are Evolutionarily Conserved Replication Fork-associated Factors. *J Mol Biol*. 2007;366(1):36-52.
118. Lin Y-L, Chen C, Keshav KF, et al. Dissection of functional domains of the human DNA replication protein complex replication protein A. *J Biol Chem*. 1996;271(29):17190-17198.
119. Venclovas C, Colvin ME, Thelen MP. Molecular modeling-based analysis of interactions in the RFC-dependent clamp-loading process. *Protein Sci*. 2002;11(10):2403-2416.
120. Fuss J, Linn S. Human DNA polymerase epsilon colocalizes with proliferating cell nuclear antigen and DNA replication late, but not early, in S phase. *J Biol Chem*. 2002;277(10):8658-8666.
121. Travali S, Ku D, Rizzo M, et al. Structure of the human gene for the proliferating cell nuclear antigen. *J Biol Chem*. 1989;264(13):7466-7472.
122. Gotte M, Yip GW. Heparanase, hyaluronan, and CD44 in cancers: a breast carcinoma perspective. *Cancer Res*. 2006;66(21):10233-10237.
123. Diaz-Blanco E, Bruns I, Neumann F, et al. Molecular signature of CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells of patients with CML in chronic phase. *Leukemia*. 2007;21(3):494-504.
124. Morel JCM, Park CC, Woods JM, et al. A novel role for Interleukin-18 in adhesion molecule induction through NFkappa B and Phosphatidylinositol (PI) 3-kinase-dependent signal transduction pathways. *J Biol Chem*. 2001;276(40):37069-37075.
125. Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science*. 1998;279(5350):509-514.
126. Jilma B, Hergovich N, Homoncik M, et al. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) downregulates its receptor (CD114) on neutrophils and induces gelatinase B release in humans. *Br J Haematol*. 2000;111(1):314-320.
127. Shah NP. Loss of response to Imatinib: mechanisms and management. *Hematol*. 2005;2005(1):183-187.

128. von Bubnoff N, Schneller F, Peschel C, et al. BCR-ABL gene mutations in relation to clinical resistance of Philadelphia-chromosome-positive leukaemia to STI571: a prospective study. *Lancet*. 2002;359(9305):487-491.
129. Hofmann W-K, de Vos S, Elashoff D, et al. Relation between resistance of Philadelphia-chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia to the tyrosine kinase inhibitor STI571 and gene-expression profiles: a gene-expression study. *Lancet*. 2002;359(9305):481-486.
130. Roche-Lestienne C, Soenen-Cornu V, Grardel-Duflos N, et al. Several types of mutations of the Abl gene can be found in chronic myeloid leukemia patients resistant to STI571, and they can pre-exist to the onset of treatment. *Blood*. 2002;100(3):1014-1018.
131. Shah NP, Nicoll JM, Nagar B, et al. Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia. *Cancer Cell*. 2002;2(2):117-125.
132. Hochhaus A, Kreil S, Corbin AS, et al. Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (STI571) therapy. *Leukemia*. 2002;16(11):2190-2196.
133. Al-Ali H, Heinrich M, Lange T, et al. High incidence of BCR-ABL kinase domain mutations and absence of mutations of the PDGFR and KIT activation loops in CML patients with secondary resistance to imatinib. *Hematol J*. 2004;5(1):55-60.

6. Abkürzungsverzeichnis

AML	Akute myeloische Leukämie
ALL	Akute lymphatische Leukämie
APACHE	Acute Physiology and Chronic Health Evaluation
ARG	Abl related gene
ATG	Antithymozytenglobulin
BIM	bcl-2-interacting mediator
CCNB1	Cyclin B1
CCNB2	Cyclin B2
CDC2	cell division cycle 2
CDC20	cell division cycle 20
CDC45L	Cell division cycle 45 like
CML	Chronisch myeloische Leukämie
CP	chronische Phase
CR	komplette Remission
CSA	Cyclosporin A
CSF3R	colony stimulating factor 3 receptor
FISH	Fluoreszenz in vitro Hybridisierung
GMNN	Geminin
GvHD	Graft versus Host Disease
GvL	Graft versus Leukemia Effekt
G6PDH	Glukose-6-phosphat Dehydrogenase
IS	Intensivstation
LCB	lower confidence bound
MAPK	p42/44 mitogen activated proteinkinase

MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MMF	Mycophenolat Mofetil
MNC	Mononukleären Zellen
MTX	Methotrexat
NFκB	nuclear factor-κ B
PBSZT	periphere Blutstamzelltransplantation
PDGF-R	Platelet Derived Growth Factor Rezeptoren
Ph	Philadelphia Chromosom
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
qPCR	quantitative „real time“ RT-PCR
RRM2	ribonucleotide reductase M2 polypeptide
SAPS	Simplified Acute Physiology Score
SELL	L-Selectin
SOFA	Sepsis Related Organ Failure Assessment
STAT 1/5	Signal transducers and activators
TBI	Ganzkörperbestrahlung (Total body Irradiation)
TOP2A	Topoisomerase 2 alpha
TRM	treatment related mortality
VOD	Veno Occlusive Disease

7. Danksagung

An erster Stelle danke ich meinem Mentor Herrn Professor Dr. med. Rainer Haas, Direktor der Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf für die beständige Unterstützung und Förderung. Durch seine Anregungen, seine Diskussionsbereitschaft und konstruktive Kritik hat er maßgeblich zum Erfolg meiner wissenschaftlichen Arbeiten beigetragen. Ich danke ihm für das Vertrauen, das er mir in der Übertragung der Funktion als Oberarzt geschenkt hat.

Außerdem danke ich Herrn Professor Dr. med. Michael Giesing, der mir durch seine freundschaftliche Aufnahme in seinem Labor in Recklinghausen und durch seine stets bereitwillige Unterstützung und Diskussionsbereitschaft die Welt der molekularen Medizin eröffnet hat.

Besonders danke ich Herrn PD Dr. med. Ralf Kronenwett für die hervorragende Zusammenarbeit und seine freundschaftliche Gesprächsbereitschaft.

Des Weiteren danke ich allen Mitarbeitern und Doktoranden der Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf für die Mitarbeit, Diskussionsbereitschaft und Unterstützung.

Schließlich danke ich der Leukämie Liga e.V. Düsseldorf für die finanzielle Unterstützung unserer Forschungsprojekte.

8. Zusammengefasste Publikationen

Ref. A

Neumann F, Graef T, Tapprich C et al. Cyclosporine A and mycophenolate mofetil vs cyclosporine A and methotrexate for graft-versus-host disease prophylaxis after stem cell transplantation from HLA-identical siblings. *Bone Marrow Transplant.* 2005;35(11):1089-93.

Ref. B

Kobbe G, Neumann F et al. Reliable engraftment, low toxicity, and durable remissions following allogeneic blood stem cell transplantation with minimal conditioning. *Exp Hematol.* 2002;30(11):1346-53.

Ref. C

Neumann F, Lobitz O, Fenk R et al. The sepsis-related Organ Failure Assessment (SOFA) score is predictive for survival of patients admitted to the intensive care unit following allogeneic blood stem cell transplantation. *Ann Hematol.* 2008;87(4):299-304.

Ref. D

Neumann F, Herold C, Hildebrandt B et al. 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;70(1):1-10.

Ref. E

Neumann F, Markett J, Fenk R et al. Therapy adapted to molecular response in patients with chronic myelogenous leukaemia in first chronic phase: results of the Duesseldorf study. *Hematol Oncol.* 2008 May 1. [Epub ahead of print]

Ref. F

Neumann F, Teutsch N, Kliszewski S, et al. Gene expression profiling of Philadelphia chromosome (Ph)-negative CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells of patients with Ph-positive CML in major molecular remission during therapy with imatinib. *Leukemia.* 2005;19(3):458-460.

Ref. G

Neumann F, Poelitz A, Hildebrandt B, et al. The tyrosine-kinase inhibitor Imatinib induces long-term remission in a patient with chronic myelogenous leukemia with translocation t(4;22). *Leukemia.* 2007;21(4):836-837.