Aus der Klinik für Hämatologie, Onkologie und Klinische Immunologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Rainer Haas

Prognostische Bedeutung von Änderungen der Gensignatur für Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie während Imatinib Therapie

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Nils Jansen

2014

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf.

gez.:

Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Dekan

Referent: Univ.-Prof. Dr. Haas

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Wesselborg

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
1. Einleitung	9
1.1. Definition der chronisch myeloischen Leukämie (CML)	9
1.2. Epidemiologie	9
1.3. Historischer Überblick	9
1.4. Klinik	10
1.4.1. Klinische Symptome	10
1.4.2. Stadien der CML	10
1.4.3. Laborwerte und Differenzialblutbild bei der CML	11
1.5. Molekularbiologie	11
1.5.1. Das <i>BCR</i> -Gen	11
1.5.2. Das <i>ABL</i> -Gen	12
1.5.3. Molekulare Grundlagen der Philadelphia-Chromosom-Translokation	on 12
1.5.4. Biologie des BCR-ABL Proteins	14
1.6. Diagnostik und Therapie	16
1.6.1. Diagnostik	16
1.6.2. Beurteilung des Therapieerfolgs	17
1.7. Therapie	19
1.7.1. Historische Therapie	19
1.7.2. Kurative Therapie (periphere Blutstammzelltransplantation)	19
1.7.3. Zielgerichtete Therapie (Tyrosinkinaseinhibitoren)	20
1.7.4. Alternative Therapien für Imatinibresistenz	21
1.8. Die atypische CML	23
1.9. Weitere Philadelphia-Chromosom positive Erkrankungen	23
1.10. Zielsetzung der Arbeit	24

2. Material/Methoden			
2.1. Material			
2.1.1. Geräte			
2.1.2. Verbrauchsmaterial	26		
2.1.3. Reagenzien	26		
2.1.4. molekularbiologische Testsysteme	27		
2.1.5. Primer	27		
2.1.5.1. Primerauswahl	27		
2.1.5.2. Primersequenzen	28		
2.1.6. Programme und Datenbanken	28		
2.1.7. Patientencharakteristika			
2.1.8. Die Zielgene			
2.1.8.1. Zellzyklusrelevante Gene	30		
2.1.8.1.1. cell division cycle 2 (CDC2)	30		
2.1.8.1.2. BTG family member 2 (BTG2)	31		
2.1.8.1.3. baculoviral IAP repeat-containing 5 (BIRC5)	31		
2.1.8.1.4. PIM1 Onkogen (PIM-1)	31		
2.1.8.2. DNA-Reparation und DNA-Replikation	32		
2.1.8.2.1. Topoisomerase II alpha (TOP2A)	32		
2.1.8.2.2. Ribonukleotid Reduktase M2 (RRM-2)	32		
2.1.8.2.3. proliferating cell nuclear antigen (PCNA)	32		
2.1.8.3. Zelladhäsion- und migrationsrelevante Gene	33		
2.1.8.3.1. Interleukin 18 (IL-18)	33		
2.1.8.3.2. L-Selektin (SELL)	33		
2.1.8.3.3. hyaluronan-mediated motility receptor (RHAMM)	33		
2.2. Methoden	34		
2.2.1. Isolierung von Leukozyten aus EDTA-Blut	34		
2.2.2. RNA-Extraktion	34		

		2.2.3. 8	Bestimmung des RNA-Gehaltes mit dem Spektralphotometer	35
		2.2.4. 0	cDNA-Synthese	35
		2.2.5. F	Primerherstellung	36
		2.2.6.0	Quantitative real-time PCR	36
		2.2.7.4	Auswahl des Referenzgens	38
		2.2.8. /	Agarosegelelektrophorese	38
		2.2.9. 8	Berechnung der Signifikanz	39
3. Erge	bnisse			40
	3.1. Du	rchschn	ittlicher mRNA-Gehalt	40
	3.2.	Refere	nzgenfindung	41
	3.3.	Ergebn	isse der untersuchten Laborparameter der Patienten	41
	3.4.	Quanti	tative real-time PCR Ergebnisse	42
		3.4.1.	Gene der DNA-Reparatur und der DNA-Replikation (TOP2A, RRM-2 und PCNA)	43
			3.4.1.1. Topoisomerase II alpha (TOP2A)	43
			3.4.1.2. Ribonukleotid Reduktase M2 (RRM-2)	47
			3.4.1.3. proliferating cell nuclear antigen (PCNA)	50
		3.4.2.	Zellzyklusrelevante Gene (BIRC5, BTG2, CDC2 und PIM-1)	50
			3.4.2.1. baculoviral IAP repeat-containing 5 (BIRC5)	50
			3.4.2.2. BTG family member 2 (BTG2)	52
			3.4.2.3. cell division cycle 2 (CDC2)	54
			3.4.2.4. PIM1 Onkogen (PIM-1)	56
		3.4.3. 0	Gene der Zelladhäsion und Migration (IL-18, SELL und RHAMM)	58
			3.4.3.1. Interleukin 18 (IL-18)	58
			3.4.3.2. L-Selektin (SELL)	59
			3.4.3.3. hyaluronan-mediated motility receptor (RHAMM)	61
	3.5. Zu	sammer	nfassung der Ergebnisse des Vergleiches der Genexpression	62
	3.6. Erg	gebnisse	e der Gelelektrophorese	64

4.	Disk	ussion
•••	0.010	1001011

4.1. Repräsentative Genauswahl	67
4.2. Einfluss der Imatinibtherapie auf den Zellzyklus	67
4.3. Einfluss der Imatinibtherapie auf die DNA-Replikation und DNA-Reparatur	69
4.4. Einfluss der Imatinibtherapie auf Zellmigration und Zelladhäsion	71
4.5. Genexpressionsverhalten während der Imatinibtherapie	74
4.6. Prognostische Bedeutung der Ergebnisse für den Patienten	76
4.7. Genexpression im Rezidivfall	77
4.8. Genexpression nach Absetzen der Imatinibtherapie	79
4.9. Fazit und Ausblick	80
5. Zusammenfassung	81
6. Tabellenverzeichnis	83
7. Abbildungsverzeichnis	84
8. Literaturverzeichnis	87
9. Danksagung	98
10. Eidesstattliche Versicherung	99

67

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	vollständige Erklärung		
μ-bcr	micro breakpoint cluster region		
Abi-1	ABL interactor protein 1		
Abi-2	ABL interactor protein 2		
ABL	c-abl oncogene		
ABL	c-abl oncogene		
ALL	akute lymphatische Leukämie		
AML	akute myeloische Leukämie		
ARG	abl-related-genes		
АТР	Adenosintriphoshat		
BCR	breakpoint cluster region		
BIRC5	baculoviral IAP repeat-containing 5		
BLAST	basic local alignment tool		
bp	Basenpaare		
BTG2	BTG family member 2		
BTG3	BTG family member 3		
CD 168	hyaluron-mediated motility receptor		
CD44	main hyaluronan receptor		
CDC	cell division cycle		
CDC2	cell division cycle 2		
СDК	cyclin-abhängige Kinase		
cDNA	complementary DNA (komplementäre DNA)		
CDS	coding sequenz		
c-KIT	v-kit sarcoma oncogene homolog		
CML	chronisch myeloische Leukämie		
CRKL	v-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog-Gen		

DNA	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetra-Acetat
G1-Phase	postmitotische Zellzyklusphase
G2-Phase	prämitotische Zellzyklusphase
G6PDH	Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
gCSF	granulocyte colony-stimulating factor
GVHD	graft-versus-host-disease
GVL	graft versus leukemia
HER-2	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2
HLA	humanes Leukozytenantigensystem
HMMR	hyaluron-mediated motility receptor
hOCT-1	human organic cation transporter 1
IAP	inhibitor of apoptosis
IL-18	Interleukin 18
IL-3	Interleukin 3
ЈАК	Januskinase
LDH	Laktat-Dehydrogenase
M-bcr	major breakpoint cluster region
m-bcr	minor breakpoint cluster region
M-Phase	Mitosephase des Zellzyklus
MPS	myeloproliferatives Syndrom
PBS	phosphate buffered saline (salzhaltiger Phosphatpuffer)
PBSZT	periphere Blutstammzelltransplantation
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)

PDGFR	plateled derived growth factor
Ph	Philadelphiachromosom
PI3	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIM1	PIM1 Onkogen
qRT-PCR	quantitative real-time Polymerasekettenreaktion
RHAMM	hyaluronan-mediated motility receptor
RLT	RNeasy lysis buffer
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RRM-2	Ribonukleotid Reduktase M2
SELL	L-Selektin
siRNA	small interfering Ribonukleinsäuren
S-Phase	Synthesephase des Zellzyklus
STAT	signal transducer and activator of transcription factor
STIM	Stopp Imatinib Multicenter Studie
ТВЕ	Tris-Borat-Puffer
ТОВ	transducer of ERBB2
ТОВ2	transducer of ERBB2-2
ΤΟΡ2Α	Topoisomerase II alpha
TRIS	Tris(hydrocymethyl)aminomethan
UV	ultraviolett
WHO	world health organisation

1. Einleitung

1.1. Definition der chronischen myeloischen Leukämie (CML)

Bei der CML handelt es sich um eine monoklonale hämatopoetische Stammzellerkrankung, die dem Formenkreis der myeloproliferativen Syndrome (MPS) zugeordnet wird und die durch die chromosomale Translokation t(9;22)(q34;q11) gekennzeichnet ist. Diese Translokation wird nach dem Ort der Erstbeschreibung der Entdecker Peter C. Nowell und David Hungerford auch als "Philadelphia-Chromosom" bezeichnet und ist ursächlich für die Entstehung des onkogenen Fusionsproteins p210^{BCR-ABL}, dessen gesteigerte Tyrosinkinaseaktivität die Entstehung der Erkrankung initiiert (1) (Nowell, 2007).

1.2. Epidemiologie

Die Inzidenz der CML liegt aktuell bei rund 1,5/100.000 (2) (SEER; U.S. *national cancer institute*) und steigt mit zunehmendem Lebensalter an. Das durchschnittliche Alter zum Zeitpunkt der Erstdiagnose beträgt 66 Jahre und das Verhältnis zwischen weiblichen und männlichen Erkrankten liegt bei rund 1:1,4 (3) (Hochhaus, 2010). Prädispositionierende geographische oder ethnische Risikofaktoren sind bislang nicht identifiziert worden. Allerdings kommt es bei Patienten, die therapiebedingt einer ionisierenden Strahlenexposition ausgesetzt waren, zu einer erhöhten Inzidenz der CML bei allerdings signifikant längerem Überleben nach dem Zeitpunkt der Erstdiagnose (4) (Corso *et al.*, 1995).

1.3. Historischer Überblick

Erstmalig wurde die chronische myeloische Leukämie im Jahr 1845 unabhängig voneinander von den drei Medizinern David Craigle, John H. Bennett und Rudolf Virchow im Rahmen von Einzelfallberichten beschrieben (5 und 6) (Craigle et Bennett, 1845; Virchow, 1845). Die Erkrankungen der Patienten bezeichneten sie jedoch zum damaligen Zeitpunkt noch nicht als CML. Beschriebene Symptome der Patienten waren Abgeschlagenheit, Fieber, zunehmender Bauchumfang und Bauchschmerzen (5) (Craigle, 1845) sowie Epistaxis (6) (Virchow, 1845). In der Autopsie zeigte sich jeweils eine massive Splenomegalie und eine Veränderungen des Blutbildes, die im Folgenden von Virchow als Leukämie, griechisch für weißes Blut (λ ευκον αιμα), beschrieben wurden (7) (Virchow, 1847). Die Erfindung neuartiger Färbetechniken durch Paul Ehrlich ermöglichte u.a. eine Unterscheidung zwischen Zellkern und Zytoplasma und damit die weitergehende Klassifikation der Leukämien (8) (Ehrlich, 1891).

Der Durchbruch bei der Erforschung der CML gelang Peter C. Nowell und David Hungerford 1960 mit der Beschreibung eines abnormalen, akrozentrischen Chromosoms, das nach dem Ort der Erstbeschreibung seither als "Philadelphia-Chromosom" bezeichnet wird (9) (Nowell *et* Hungerford, 1960).

Janet Rowley erkannte 1973, dass eine reziproke Translokation der langen Arme der Chromosomen 9 sowie 22 die chromosomale Aberration verursacht und bezeichnete sie folgerichtig mit (t9;22)(q34;q11) (10) (Rowley, 1973).

De Klein gelang 1982 erstmalig der Nachweis der an der Translokation beteiligten Gene *breakpoint cluster region* (BCR) und *c-abl oncogene* (ABL) (11) (de Klein *et al*, 1982). Im Anschluss an diese Arbeit wurde das Produkt des BCR-ABL Gens, ein 210 kD großes Protein, entdeckt und als p210^{BCR-ABL} benannt (12) (Ben-Neriah *et al.*, 1986).

Essentiell für die Therapie der CML war die Erkenntnis, dass das Fusionsprotein p210^{BCR-ABL} eine gesteigerte, dysregulierte Tyrosinkinaseaktivität besitzt (13) (Lugo *et al.*, 1990) und dieser Umstand als Ansatzpunkt für eine zielgerichtete Therapie genutzt werden kann.

1.4. Klinik

1.4.1. Klinische Symptome

Im Frühstadium der Erkrankung kommt es zunächst zum Auftreten uncharakteristischer Allgemeinsymptome wie Leistungsabfall, Gewichtsverlust sowie Infektneigung. Erste organische Manifestationen der CML können eine Hepatosplenomegalie sowie hämorrhagische Diathesen sein. Bleibt die Erkrankung unbehandelt, erfolgt ein Fortschreiten der Erkrankung über einen Zeitraum von drei bis fünf Jahren, wobei dabei drei charakteristische Stadien der Erkrankung durchlaufen werden (14) (Herold, 2011).

1.4.2. Stadien der CML

Der unbehandelte Krankheitsverlauf einer CML ist eine triphasische Progression der Erkrankung. Die Initialphase, als chronische Phase bezeichnet, kann oft über Jahre andauern und für den Patienten zunächst symptomlos erscheinen, ehe es zu einer Krankheitsprogression in das Intermediärstadium, die sog. akzellerierte Phase, kommt. Nach WHO-Klassifikation stellen sowohl ein Anteil von 10% – 19% Blasten im peripheren Blut bzw. im Knochenmark der Patienten als auch eine persistierende, therapierefraktäre Thrombozytose mit Thrombozytenzahlen >1x10¹²/l oder eine persistierende Splenomegalie sichere Kriterien für einen Krankheitsprogress hin zur akzellerierten Phase dar. Zusätzlich kommt es oft zum Auftreten einer therapieunabhängigen refraktären Thrombozytopenie. Nach einer Dauer von maximal einem Jahr folgt im unbehandelten Krankheitsverlauf der Übergang aus der akzellerierten Phase in das Terminalstadium der Erkrankung, das nach WHO-Definition durch einen Blastenanteil \geq 20% im peripheren Blut bzw. Knochenmark der Patienten definiert ist und als Blastenkrise bezeichnet wird (15) (Jaffe *et al.*, 2001) (16) (Lahaye *et al.*, 2005)

Neben der WHO-Einteilung existiert heute mit den sog. *Baccarani-Guidelines* noch eine weitere, weltweit anerkannte und oft zitierte Einteilung des triphasischen CML-Verlaufs. Diese Einteilung definiert den Übergang zur akzellerierten Phase beim Erreichen eines Blasten-Anteils von 15-29% im peripheren Blut oder im Knochenmark des Patienten. Alternative Kriterien stellen das Vorliegen einer Basophilie mit >20% basophilen Zellen im peripheren Blut sowie das Auftreten einer therapieunabhängigen refraktären Thrombozytopenie dar. Der Beginn der Blastenkrise wird durch das Erreichen eines Blastenanteils von >30% im Knochenmark oder peripheren Blut der Patienten definiert (17) (Baccarani *et al.*, 2006). In der akzellerierten Phase und vermehrt in der Phase der Blastenkrise kommt es ebenfalls zu einer erhöhten genomischen Instabilität, die durch neu erworbene chromosomale Aberrationen Ausdruck erlangt.

1.4.3. Laborwerte und Differenzialblutbild bei der CML

Der charakteristische Laborbefund bei der CML ist eine ausgeprägte Leukozytose (>5x10⁵/µl) im peripheren Blut bzw. Knochenmark der Patienten mit einer pathologischen Linksverschiebung im Differenzialblutbild, die sich durch den Nachweis granulozytärer Vorläuferzellen wie auch Myeloblasten im Differenzialblutbild ergibt.

Im Knochenmarkausstrich zeigt sich im Allgemeinen ein hyperzelluläres Mark mit einer Steigerung der Granulozytopoese, wobei das normale Verhältnis zwischen Granulozytopoese und Erythropoese von 3:1 auf ein Verhältnis von bis zu 10:1 gesteigert sein kann.

Unspezifische Laborparameter des erhöhten Zellumsatzes können ein LDH-Anstieg sowie eine Hyperurikämie sein (14) (Herold, 2011).

1.5. Molekularbiologie

1.5.1. Das BCR-Gen

Der *BCR*-Genlokus ist auf dem langen Arm des Chromosoms 22 (22q11) lokalisiert und wird in zwei Proteine mit einem Molekulargewicht von 160 kDa respektive 130 kDa translatiert. Das reguläre BCR- Protein befindet sich sowohl im nukleären als auch im zytoplasmatischen Zellkompartiment. Das BCR-Protein ist sowohl in der Interphase als auch in der Metaphase der Mitose mit kondensierter DNA assoziiert (18) (Wetzler *et al.*, 1995). Außerdem interagiert BCR mit G-Proteinen und beeinflusst über diesen Weg intrazelluläre Signalwege, die Organisation des Zytoskeletts sowie das normale Zellwachstum (19) (Diekmann *et al.*, 1991).

Das erste Exon des BCR-Gens besitzt eine Schlüsselrolle in der Onkogenese, denn es ist in allen BCR-ABL-Fusionsproteinen inkludiert (20) (Muller *et al.*, 1991). Es verfügt über eine Serin-Threonin-Enzymkinaseaktivität und ist damit in der Lage, sowohl sich selbst als auch andere Substrate zu phosphorylieren und Einfluss auf intrazelluläre Signalwege zu nehmen (21) (Arlinghaus *et al.*, 1998).

1.5.2. Das ABL-Gen

Das zelluläre *ABL*-Gen ist das menschliche Korrelat des viralen v-ABL Onkogens des Abelson Leukämie Virus (22) (Rosenberg *et al.*, 1988). Der Genlokus befindet sich auf Chromosom 9 (9q34). Das resultierende ABL-Protein ist ein *non-receptor* Tyrosinkinase-Enzym und besitzt die Fähigkeit, zwischen dem Nukleus und dem Zytoplasma der Zelle zu wandern. Zytoplasmatische Funktionen des ABL-Proteins betreffen vor allem das Zytoskelett der Zelle, denn ABL bindet an das Aktinzytoskelett (23) (van Etten *et al.*, 1999). Außerdem interagiert ABL mit zellzyklusregulierenden Genen an verschiedenen Übergangspunkten des Zellzyklus und beeinflusst so die zelluläre Proliferation (23) (van Etten *et al.*1999). Die nukleäre Funktion des ABL-Proteins hängt eng mit seiner Fähigkeit an DNA zu binden zusammen. Durch die DNA-Bindungsaktivität ist das ABL-Protein in den Start der Transkription von DNA zu RNA, in den Prozess der Meiose sowie in die Reparatur von DNA-Schäden eingebunden (24) (Miao *et al.*, 1996) (25); Yuan *et al.*, 1997).

Die ABL-Tyrosinkinaseaktivität ist im Regelfall durch N-terminale SH₃-Strukturen eng kontrolliert und inhibiert (26) (Mayer *et al.*, 1994). Ein Verlust dieser Regionen und damit der Autoregulation, wie er im Fall der BCR-ABL Translokation eintritt, führt zu einer konstitutiven Aktivierung der Tyrosinkinase und damit zur Autophosphorylierung des onkogenen BCR-ABL-Proteins. Er ist damit der Schlüsselfaktor des onkogenen Potentials der BCR-ABL Translokation. Die inhibitorische Funktion der SH₃-Strukturen kann auch durch interagierende Proteine wie das *ABL interactor protein 1* (Abi-1) und das *ABL interactor protein 2* (Abi-2) aktiviert werden (27) (Shi *et al.*, 1995) (28) (Dai *et al.*, 1995). Beim Vorliegen bereits aktivierter ABL-Proteine kommt es zum proteasomgesteuerten Abbau von Abi-1 und Abi-2 (29) (Dai *et al.*, 1998).

1.5.3. Molekulare Grundlagen der Philadelphia-Chromosom-Translokation

Bei der Entstehung des sog. Philadelphia Chromosoms kommt es zu einem DNA-Austausch zwischen den Chromosomen 9 und 22, wobei das 3'-Ende des ABL-Gens von Chromosom 9 an das proximale

Segment des getrennten *BCR*-Gens auf Chromosom 22 transloziert. Dabei bleiben der Translokation vorausgehende Vorgänge oder die Translokation begünstigende Faktoren bislang unbekannt. Das Ergebnis der Translokation ist ein chimäres *BCR-ABL* Gen, welches auf dem verkürzten Chromosom 22 liegt (30) (Groffen *et al.*, 1984). Während der Bruchpunkt des *ABL*-Gens immer konstant an einer Stelle des Gens auftritt, variieren die Bruchpunkte des *BCR*-Gens. In der Mehrzahl der Fälle liegt der Bruchpunkt zentral, d.h. zwischen den Exons 12 und 16 (auch als b₁ bis b₅ bezeichnet), in der sog. *major breakpoint cluster region* (M-bcr) des *BCR*-Gens. Bei einer Minderheit der Patienten kann es aber auch zum Auftreten des Bruchpunktes in einer weiter proximal auf dem *BCR*-Gen gelegenen Position genau distal des 1.Exons in der sog. *minor breakpoint cluster region* (m-bcr) kommen. Eine weitere noch seltenere Alternative ist ein Bruchpunkt zwischen den Exons 19 und 20 in der *micro breakpoint cluster region* (µ-bcr) (siehe Tabelle 1.1.).

Variante	Bruchpunkt	Erläuterung
e1a2	m-bcr	nur das erste Exon des BCR-Gens wird an das komplette ABL-Gen von Exon 2
		bis zum Ende angebunden
b2a2	M-bcr	das BCR-Gen wird bis einschließlich des 13. Exons (bekannt als b2) an das
		komplette ABL-Gen von Exon 2 bis zum Ende angebunden
b3a2	M-bcr	das BCR-Gen wird bis einschließlich des 14. Exons (bekannt als b3) an das
		komplette ABL-Gen von Exon 2 bis zum Ende angebunden
e19a2	µ-bcr	das BCR-Gen wird bis einschließlich des 19. Exons an das komplette ABL-Gen
		von Exon 2 bis zum Ende angebunden

Tabelle 1.1.: verschiedene Bruchpunkte des BCR-Gens (nach (31) Neumann et al., 2003)



Abbildung 1.1.: Bruchpunkt des ABL-Gens (rechts) und verschiedene Bruchpunkte des BCR-Gens (links) und sich daraus ergebende BCR-ABL-Genvarianten (vgl. Tabelle 1.1)(Figur 1 aus Kuzrock *et al.* (32))

Als Resultat der verschiedenen Bruchpunkte kommt es auf Proteinebene zur Expression unterschiedlich großer BCR-ABL Proteine, die ein Molekulargewicht von 190, 210 respektive 230 kDa aufweisen können und konsequenterweise als p190^{BCR-ABL}, p210^{BCR-ABL} bzw. p230^{BCR-ABL} bezeichnet werden. Das kleinste p190^{BCR-ABL} Protein enthält dabei einen kleineren Anteil des BCR-Gens als die größeren Proteine, wobei der Anteil des ABL Proteins stets konstant bleibt (siehe auch Abbildung 1.1).

1.5.4. Biologie des BCR-ABL Proteins

Eine Vielzahl unterschiedlicher durch p210^{BCR-ABL} beeinflusster Signaltransduktionswege sind in der Vergangenheit identifiziert worden. Hervorzuhebende involvierte Signaltransduktionswege sind hierbei der JAK-Signalweg, die Ras-Signalkaskade sowie die Phosphatidylinositol-3-Kinase-Kaskade.



Abbildung 1.2.: durch p210^{BCR-ABL} beeinflusste intrazelluläre Signaltransduktionswege Ras, JAK-STAT und PI3 und ausgelöste intrazelluläre Signalkaskaden (Figur 3 aus Kuzrock *et al.* (32))

Die in BRC-ABL positiven Zellen aktivierten Signaltransduktionswege lassen sich hinsichtlich ihrer Funktion in die Prozesse Apoptosehemmung (33) (Bedi *et al.*, 1994), gesteigerte Zellproliferation durch mitogene Signale sowie geänderte Interaktion mit extrazellulärer Matrix und somit veränderte Adhäsion zu Knochenmarkstromazellen einteilen (34) (Gordon *et al.*, 1987). Als vierter potentieller Mechanismus gilt der im Kapitel 1.5.2. dieser Arbeit angesprochene proteasom-gesteuerte Abbau von ABL-inhibierenden Proteinen (29) (Dai *et al.*, 1998) (siehe Abbildung 1.2).

Das Krankheitsbild der CML ist charakterisiert durch die gesteigerte Freisetzung unreifer Progenitorzellen aus dem Knochenmark. Ursächlich hierfür ist ein Defekt der adhäsiven Fähigkeiten der Progenitorzellen. Vor allem die Adhärenz von Progenitorzellen an die Stromazellen des Knochenmarks und die assoziierte extrazelluläre Matrix ist gestört. Somit wird die zytokinvermittelte Regulation der Freisetzung eingeschränkt. Als Folge der reduzierten adhäsiven Fähigkeit der Progenitorzellen gegenüber Stromazellen kommt es bei CML-Patienten zu einer verstärkten Ausschwemmung von Progenitorzellen aus dem Knochenmark (34) (Gordon *et al.*, 1987).

Das *v-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog-*Gen (*CRKL*) kodiert eine Proteinkinase, die ein Substrat der BCR-ABL-Tyrosinkinase und eines der, im Rahmen der BCR-ABL Transformation, meistuntersuchten, tyrosin-phosphorylierten Proteine ist (35) (Oda *et al.*, 1994). Sie scheint sowohl in die Regulation der zellulären Motilität als auch in die integrin-vermittelte Zelladhäsion eingebunden und steigert so die Zellmigration (36) (Uemura *et al.*, 1999).

Die p210^{BCR-ABL} vermittelte Aktivierung antiapoptotischer Effekte ist sowohl in Abhängigkeit vom Ras-Signalweg als auch vom Phosphatidylinositol-3-Kinase(PI3)-Signalweg in der Literatur beschrieben (37) (Sanchez-Garcia *et al.*, 1997) (38) (Skorski *et al.*, 1997). Die genauen intrazellulären Signalwege bleiben momentan unklar, aber eine Blockade intrazellulärer Caspasen ist mitverantwortlich für diesen Prozess (39) (Dubrez *et al.*, 1998). Außerdem sind BCR-ABL positive Zelllinien resistent gegenüber dem durch DNA-Schäden induzierten programmierten Zelltod (33) (Bedi *et al.*, 1994).

Eine weitere Folge der p210^{BCR-ABL} vermittelten Phosphorylierung ist die Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges, womit es zur wachstumsfaktorunabhängigen Zellproliferation durch Weiterleitung mitogener Signale in den Zellkern kommt (40) (Ilaria *et al.*, 1996) (41) (Chai *et al.*, 1997). Es erfolgt die konstitutive Phosphorylierung zweier *signal transducer and activator of transcription factors* (STAT1 und STAT5). Obwohl vor allem STAT5 diverse physiologische Funktionen besitzt (42) (Nosaka *et al.*, 1999), hat die Aktivierung von STAT5 in BCR-ABL transformierten Zellen in erster Linie antiapoptotische Funktionen (43) (Sillaber *et al.*, 2000). Zusätzlich kommt es zu einer gesteigerten Interaktion mit Wachstumsfaktorrezeptoren und zu einer gesteigerten Expression verschiedener Wachstumsfaktoren wie z.B. Interleukin-3 (IL-3) oder *granulocyte colony-stimulating factor* (gCSF) (44) (Jiang *et al.*, 1999).

Es wird deutlich, dass BCR-ABL das intrazelluläre Gleichgewicht hin zu Inhibition der Apoptose verschiebt und gleichzeitig proliferative Stimuli fördert.

1.6. Diagnostik und Therapiemanagement

1.6.1. Diagnostik

Essentiell für die Diagnose der CML ist neben der, wie bereits in Kapitel 1.4. angesprochenen, hämatologisch-internistischen Untersuchung der Nachweis des Philadelphiachromosoms (Ph⁺) mittels konventioneller Zytogenetik aus Knochenmarkpunktat des Patienten, der in 90% der Fälle auch gelingt (45) (Schoch *et al.*, 2002). Auch weitere chromosomale Abberationen, die im Krankheitsverlauf auftreten können und die Prognose der Erkrankung beeinträchtigen, können mit diesem Verfahren detektiert werden. Eine halbjährliche Kontrolle der Chromosomen wird durch die Baccarani-Leitlinien empfohlen (17) (Baccarani *et al.*, 2006).

Zur Diagnosestellung kann auch die quantitative Untersuchung von BCR-ABL mRNA mit Hilfe der quantitativen *real-time* PCR durchgeführt werden. Sie weist eine deutlich bessere Sensitivität von einer Leukämiezelle in $10^5 - 10^6$ gesunden Zellen auf und als Untersuchungsmaterial wird nur

peripheres Blut des Patienten benötigt (46) (Branford *et al.,* 1999) (47) (Emig *et al.,* 1999). Die Sensitivität der PCR-Untersuchung kann durch die *nested*-PCR noch um den Faktor 10 gesteigert werden (31) (Neumann *et al.,* 2003).

1.6.2. Beurteilung des Therapieerfolges

Zur Beurteilung der Effektivität der Therapie der CML kann der Grad des Ansprechens des Patienten auf die Therapie in verschiedene Stufen eingeteilt werden (siehe Tabelle 1.2.). Hierbei repräsentiert die hämatologische Remission die geringste mögliche Stufe des Therapieerfolges und die molekulare Remission stellt das eigentliche Ziel der Therapie dar.

Reduziert sich die Zahl der Leukozyten auf Werte unter 10x10⁹/ml im Differentialblutbild und sinkt die Thrombozytenzahl unter 450x10⁹/ml, spricht man bei symptomlosem Krankheitsverlauf von einer kompletten hämatologischen Remission. Je nach Ausmaß der Reduktion der Ph⁺-Metaphasen wird der Grad der zytogenetischen Remission in komplett-zytogenetisch (0% Ph⁺-Metaphasen), partiellzytogenetisch (bis 35% Ph⁺-Metaphasen) sowie minor-zytogenetisch (35%-95% Ph⁺-Metaphasen) eingeteilt (17) (Baccarani *et al.*, 2006).

Besonders geeignet erscheint das etablierte PCR-Verfahren zur Therapieüberwachung bei Patienten mit CML in chronischer Phase zur Überprüfung der molekularen Remission. Per Definition liegt diese vor, wenn die BCR-ABL/BCR-Ratio auf <0,1% des Ausgangswertes abgefallen ist oder das Ausmaß der Reduktion mindestens 3 log-Stufen beträgt (siehe Tabelle 1.2.).

Tabelle 1.2. :Definitionen des Ansprechens auf die Therapie bei Patienten mit CML in chronischerPhase; (Tabelle nach (17) Baccarani *et al.*, 2006)

Ansprechen	Definition
Hämatologisch	
	<10x10 ⁹ /ml Leukozyten mit normalem Differentialblutbild
	<450x10 ⁹ /ml Thrombozyten
	keine Symptome der Erkrankung nachweisbar
Zytogenetisch	
major	komplett: 0% Ph ⁺ Metaphasen
	partiell: bis 35% Ph ⁺ Metaphasen
	35% - 95% Ph ⁺ Metaphasen
minor	100% Ph ⁺ Metaphasen
kein	
Molekular	
BCR-ABL neg.	BCR-ABL/ABL Ratio <0,001% oder kein nachweisbares BCR-ABL-Transskript in der RT-PCR
major	BCR-ABL/ABL Ratio <0,10% oder 3-log-Stufen Reduktion vom Ausgangswert

Zur Beurteilung des Therapieerfolges wird das Erreichen der einzelnen Remissionsstufen zu festgelegten Zeitpunkten der Therapie als Maßstab angelegt (siehe Tabelle 1.3.). Nach drei Monaten Therapie entspricht ein optimaler Therapieverlauf einer Reduktion der BCR-ABL-Transkripte um 1-2 log-Stufen. Ein Ausbleiben einer hämatologischen Remission nach drei Monaten kann als Therapieversagen gewertet werden. Wird nach 12 Monaten keine partielle *major-*zytogenetische Remission erreicht, liegt ebenfalls ein Therapieversagen vor. Nach 12 Monaten Therapie muss bei optimalem Therapieverlauf eine zytogenetische und *major*-molekulare Remission erreicht werden. Wird dieses erst nach 18 Monaten erreicht, spricht man noch von suboptimalem Therapieerfolg. Bleibt nach 18 Monaten allerdings eine komplette *major-*zytogenetische Remission aus, muss vom Therapieversagen ausgegangen werden.

Tabelle 1.3.: Definitionen des Therapieversagens bzw. des optimalen Therapieerfolges bei Patienten mit CML in chronischer Phase; Tabelle nach (48) (Mauro *et al.*, 2006)

	3 Monate	6 Monate	12 Monate	18 Monate
Therapieversagen	kein	>95% Ph⁺	>35% Ph⁺	>0% Ph⁺
	hämatologisches	Metaphasen	Metaphasen	Metaphasen
	Ansprechen			
suboptimales	kein komplettes	35-95% Ph⁺	1-35% Ph ⁺	0% Ph ⁺ Metaphasen
Ansprechen	hämatologisches	Metaphasen	Metaphasen	<3 log-Stufen ↓ der
	Ansprechen			BCR-ABL
				Transskripte
optimaler	1-2 log-Stufen↓ der	<35% Ph [⁺]	0% Ph ⁺ Metaphasen	0% Ph ⁺ Metaphasen
Therapieverlauf	BCR-ABL	Metaphasen	≥3 log-Stufen ↓ der	≥3 log-Stufen ↓ der
	Transskripte		BCR-ABL	BCR-ABL
			Transskripte	Transskripte

1.7. Therapie

1.7.1. Historische Therapie

Die ersten Versuche einer Therapie der CML wurden zu Beginn des 20. Jahrhunderts durchgeführt, wobei nur unbefriedigende Ergebnisse, vor allem durch eine Therapie mit Arsenderivaten erzielt wurden (49) (Goldmann *et al.*, 2007). Mitte des vergangenen Jahrhunderts kam es zu ersten Therapieversuchen mit dem synthetischen Zytostatikum Busulfan, das v.a. DNA alkyliert, aber auf Grund der ausgeprägten Nebenwirkungen Anämie, Leukozytopenie sowie Thrombozytopenie bereits in den 1960er Jahren durch Hydroxyurea als Therapeutikum der Wahl ersetzt wurde. Die Therapie mit Hydroxyurea seinerseits wurde rund 20 Jahre später durch alpha-Interferon erweitert. Der Wirkmechanismus des alpha-Interferons lag dabei in der Wiederherstellung der adhäsiven Fähigkeiten der hämatopoetischen Progenitorzellen im Knochenmark, die durch die CML-Erkrankung gestört sind (50) (Bhatia *et al.*, 1994). Mit diesem therapeutischen Ansatz konnte erstmalig zumindest eine zytogenetische Remission erreicht werden (51) (Hehlmann *et al.*, 1994).

1.7.2. Kurative Therapie (periphere Blutstammzelltransplantation)

Der erste und bis heute einzige kurative Therapieansatz der CML gelang durch die Etablierung der allogenen Stammzelltherapie in den 70er Jahren des vergangenen Jahrhunderts. Diese Therapieoption basiert auf der Tatsache, dass es sich bei der CML um einen Stammzelldefekt handelt, und ist besonders bei jungen Patienten mit HLA-identischem Spender die Therapie der Wahl bei der Behandlung der CML (52) (Gratwohl *et al.*, 2002). Dennoch ist zu bedenken, dass es sich bei der peripheren Blutstammzelltransplantation (PBSZT) um ein Hochrisikoverfahren handelt. Neben der Akuttoxizität der Chemotherapie und Bestrahlung stellt auch die langfristige Toxizität im Rahmen einer möglichen immunologischen Reaktion der Spenderzelle gegen Gewebezellen des Empfängers, die sogenannte *graft-versus-host-disease*, ein wesentliches therapieassoziiertes Risiko für den Patienten dar. Heute ist die Unterdrückung der *graft-versus-host-disease*, kurz GvHD, durch Verabreichung von T-Zell depletierten CD34⁺ Stammzellen im Rahmen der allogenen Stammzelltherapie ein wesentlicher Therapiebaustein. Erst nach vollständiger hämatopoetischer Rekonstitution werden die zuvor separierten T-Lymphozyten dem Patienten zurückinfundiert und damit der gewünschte sog. *graft versus leukemia* (GvL) Effekt erzielt (53) (Kolb *et al.*, 1990).

1.7.3. Zielgerichtete Therapie (Tyrosinkinaseinhibitoren)

Den wichtigsten Meilenstein in der Therapie der CML stellt die Entwicklung des ersten selektiven Tyrosinkinaseinhibitors Imatinib (Glivec[®]) (siehe Abbildung 1.3) durch die Firma Novartis im Jahr 1998 dar, bei dessen Wirkprinzip es sich um eine selektive Hemmung des BCR-ABL Proteins handelt (54) (Druker *et al.*, 2001). Somit kann man erstmalig von einer zielgerichteten Therapie der CML sprechen. Zielführend bei der Entwicklung zielgerichteter Therapieverfahren war die Erkenntnis, dass das onkogene Fusionsprotein p210^{BCR-ABL} mit seiner Tyrosinkinaseaktivität bei nahezu allen Patienten mit CML nachweisbar ist, da es vom leukämischen Klon exprimiert wird und in der Pathogenese der Erkrankung eine kausale Bedeutung besitzt.



Abbildung 1.3.: Strukturformel Imatinib (nach (55) Weisberg et al., 2005)

Der Wirkmechanismus des selektiven Tyrosinkinaseinhibitors Imatinib besteht im Wesentlichen in einer selektiven, kompetitiven Blockade der ATP-Bindungsstelle verschiedener Tyrosinkinasen, wie p210^{BCR-ABL} in der inaktiven Form, aber auch des *abl-related-genes* (ARG) und c-ABL bzw. v-ABL. Die Bindung von ATP an die ATP-Bindungsstelle des BCR-ABL führt im unbehandelten Krankheitsfall der CML zur Phosphorylierung von Substraten. Damit kommt es zur Einleitung intrazellulärer Phosphorylierungskaskaden mit unter anderem aktiviertem Proliferationsreiz und verminderter Apoptosefähigkeit. Die durch Imatinib verhinderte ATP-vermittelte Aktivierung des onkogenen p210^{BCR-ABL} führt Fusionsproteins im Therapieverlauf zur Unterbrechung der Phosphorylierungskaskaden und somit zu einer Hemmung der zellulären Proliferation und einem Wiedererlangen der Apoptosefähigkeit der Zellen (56) (Goldman et Melo, 2003) (57) (Apperley et al., 2002).

Da der Wirkmechanismus von Imatinib auf einer kompetitiven Blockade der ATP-Bindungsstelle beruht, endet die therapeutische Wirkung von Imatinib mit dem Absetzen der Medikation. Es wurde postuliert, dass das Absetzen der Medikation zwangsläufig zu einem Rezidiv der CML-Erkrankung führen würde. Diesen Zusammenhang untersuchte die multizentrische Stop-Imatinib Studie (STIM). Patienten mit diagnostizierter CML und stabiler molekularer Remission über zwei Jahre unter Imatinib-Therapie wurden in die Studie eingeschlossen. Anschließend wurde bei allen die Therapie mit Imatinib unterbrochen. Bei 61% der untersuchten Patienten kam es nach Absetzen der Imatinib-Medikation zum erwarteten Rezidiv der Erkrankung. Alle betroffenen Patienten sprachen in diesem Fall aber auf eine erneute Therapie mit Imatinib an (58) (Mahon *et al.*, 2010). Dabei zeigte sich, dass Patienten, die beim Absetzen der Medikation ein geringeres Risiko eines Rezidives hatten, bereits mehr als 50 Monate mit Imatinib therapiert wurden. Auch ein prätherapeutisch niedriger Sokal-Score der Patienten war ein prognostisch günstiger Faktor für ein rezidivfreies Überleben nach Absetzen der Imatinibmedikation (58) (Mahon *el al.*, 2010).

Die Studie löste aber auch eine Diskussion aus, da immerhin 39% der untersuchten Patienten kein Rezidiv erlitten, obwohl die Therapie gestoppt wurde. Ob und wenn ja wie diese Patienten durch die Imatinib-Therapie eventuell sogar geheilt wurden, wird heute kontrovers diskutiert (59) (60) (Valent, 2010; Stagno *et al.*, 2011).

Allerdings treten im Therapieverlauf mit Imatinib bei rund 15% der Patienten primäre bzw. sekundäre Resistenzen auf (61) (Druker *et al.*, 2006), was die Entwicklung weitere selektiver Tyrosinkinaseinhibitoren erforderlich macht.

1.7.4. Alternative Therapien für Imatinibresistenz

Die häufigste Ursache für die Entwicklung sekundärer Resistenzen gegenüber einer Behandlung mit Imatinib sind Punktmutationen in der ABL-Kinase-Domäne des BCR-ABL-Fusionsproteins, deren Häufigkeit des Auftretens während einer Imatinibtherapie je nach Detektionsmethode in der Literatur mit 42% bis 90% angegeben werden. (62) (Hochhaus *et al.*, 2007)

21

Verschiedene alternative Therapiestrategien bei primärer Imatinibunverträglichkeit bzw. Imatinibresistenz werden in der Literatur diskutiert, wobei im Wesentlichen zwischen einer Dosissteigerung der täglichen Imatinibmedikation und einer Therapieumstellung auf einen Tyrosinkinaseinhibitor der zweiten Generation unterschieden werden kann. Eine Dosissteigerung auf eine Tagesdosis von 600mg bzw. 800mg Imatinib führt bei sekundärer Imatinibresistenz bei immerhin 56% der Patienten zu einer major-zytogenetischen Remission (63)(Kantarjian et al., 2003). Die alternative Therapieoption ist eine Umstellung der medikamentösen Therapie auf einen Tyrosinkinaseinhibitor der zweiten Generation, wie z.B. Dasatinib (Sprycel[®]). Dasatinib verfügt über eine rund 300-fach höhere Affinität wie Imatinib in vitro und zeichnet sich einerseits damit aus, dass es in der Lage ist, sowohl an die inaktive als auch an die aktive Form der BCR-ABL-Kinase zu binden und andererseits ein deutlich breiteres Kinase-Spektrum als Imatinib zu inhibieren (64) (Rix et al., 2007). Somit ist auch eine Effektivität gegenüber BCR-ABL Mutationen gewährleistet, die durch eine Destabilisierung der inaktiven Konfiguration der Tyrosinkinase zu einer sekundären Resistenz gegenüber Imatinib führen (65) (Jabbour et al., 2006). Mit diesem Wirkprinzip erreicht Dasatinib in klinischen Studien Ansprechraten von 90% kompletten hämatologischen Remissionen (CHR) sowie 52% major-zytogenetische Remissionen bei Patienten mit Imatinibunverträglichkeit bzw. sekundärer Imatinib-resistenter CML in der chronischen Phase (66) (Hochhaus et al., 2008).

Aber auch während der Dasatinib Therapie besteht die Möglichkeit einer Krankheitsprogression sowie des Auftretens neuer BCR-ABL Mutationen. Diese neu auftretenden Mutationen können zur sekundären Dasatinib-Resistenz führen. Dieser Fall macht dann eine Umstellung der Therapie auf einen weiteren Tyrosinkinaseinhibitor der neuen Generation, z.B. Nilotinib (früher AMN107) (Tasigna®) erforderlich.

Bei Nilotinib (Tasigna[®]) handelt es sich um einen Tyrosinkinaseinhibitor mit dem Imatinib ähnlichem Wirkspektrum gegenüber diversen Tyrosinkinasen (z.B. BCR-ABL, c-KIT, PDGFR) sowie der eingeschränkten Bindungsfähigkeit einzig an die inaktive Konformation der BCR-ABL Kinase. Allerdings besitzt Nilotinib eine deutlich höhere Bindungsaffinität zur BCR-ABL Kinase als Imatinib (67) (Kujawski *et al.*, 2007).

Nilotinib zeigt in Studien eine vorhandene Wirksamkeit auch bei Patienten mit CML in chronischer Phase nach unwirksamer Therapie mit Imatinib sowie Dasatinib, sodass es zum Auftreten einer *major*-zytogenetischen Remission unter Nilotinibtherapie bei 31% der Patienten mit sekundärer Imatinib- und Dasatinib-Resistenz kommt (68) (Giles *et al.*, 2007).

Alternativ untersucht wurde auch die Möglichkeit, bei Imatinib-Resistenz eine sekundäre Therapie mit Nilotinib anstelle der Therapie mit Dasatinib einzuleiten, was im Studiendesign zu einer *minor-*zytogenetischen Remission von 48% der Patienten mit Imatinibunverträglichkeit oder sekundärer Imatinibresistenz geführt hat (69) (Kantarjian *et al.*, 2007).

22

Zusammengefasst bieten sich bei primärer Imatinibunverträglichkeit oder –resistenz mit den *Secondline*-Medikamenten Dasatinib und Nilotinib mehrere, gleichwertige Therapieoptionen. Die Auswahl des adäquaten Therapeutikums wird unter anderem je nach vorliegender Punktmutation auch von den klinischen Symptomen, Vorerkrankungen und Nebenwirkungen des Patienten beeinflusst. Bekannte Nebenwirkungen einer Therapie sowohl mit Dasatinib als auch mit Nilotinib, die auch therapielimitierend auftreten können, sind Thrombozytopenie, Leukozytopenie, Anämie, Pankreatitis, Hyperglykämie sowie QT-Verlängerung (70) (le Coutre *et al.*, 2007).

1.8. Die atypische CML

Bei über 90% der Patienten mit einer CML ist das Philadelphia Chromosom zytogenetisch nachweisbar (71) (Shepherd *et al.*, 1995). Bei einer Minderheit von rund 5% der Patienten gelingt der Nachweis des Philadelphiachromosoms trotz moderner Untersuchungsmethoden nicht und man spricht in diesen Fällen von einer atypischen, d.h. Philadelphiachromosom negativen, CML. Auffällig dabei ist, dass diese Patienten einen ungünstigeren Krankheitsverlauf mit schnellerer Progression der Erkrankung und kürzere mediane Überlebenszeiträume aufweisen.

1.9. Weitere Philadelphia-Chromosom positive Erkrankungen

Neben der CML gibt es noch weitere hämatologisch-onkologische Erkrankungen, die, wenn auch seltener als die CML, mit der Entstehung eines Philadelphia-Chromosoms assoziiert sind. Bei rund 20% der Patienten, die an einer akuten lymphatischen Leukämie (ALL) erkrankt sind, ist mit zytogenetischen Untersuchungsmethoden ein Philadelphiachromosom nachweisbar. Der Bruchpunkt im BCR-Gen liegt dabei in der Mehrzahl der Fälle in der *major breakpoint cluster region* (M-bcr) des BCR-Gens, sodass es ebenfalls zur Bildung des p210^{BCR-ABL}-Fusionsproteins kommt (72) (Kurzrock *et al.*, 1987).

Eine weitere Erkrankung, in deren Verlauf ein Philadelphia-Chromosom nachweisbar sein kann, ist die akute myeloische Leukämie (AML). Allerdings kommt es nur bei rund 2% der Patienten mit einer AML zum zytogenetischen Nachweis eines Philadelphia-Chromosoms. In diesen seltenen Fällen findet man die Fusionsproteine p210^{BRC-ABL} und p190^{BRC-ABL} etwa zu gleichen Teilen vor (73) (Kurzrock *et al.*, 1987).

1.10. Zielsetzung der Arbeit

Brünnert *et al.* konnten frühe transkriptionelle Veränderungen auf Genexpressionsebene während einer Erstlinientherapie mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib zeigen (74) (Brünnert *et al.*, 2009). Der Beobachtungszeitraum betrug dabei allerdings nur sieben Tage. Eine Vielzahl verschiedener Gene wurde als differentiell exprimiert beschrieben. Die betroffenen Gene können zu verschiedenen pathophysiologisch relevanten funktionellen Gruppen zusammengefasst werden. Diese sind Zelladhäsion, Zellzyklus sowie DNA-Reparatur und DNA-Replikation.

Ziele dieser Arbeit sind die Auswahl repräsentativer Zielgene für die beteiligten funktionellen Gruppen und die Darstellung möglicher Veränderungen der Genexpression über einen längeren Therapieverlauf. Es soll evaluiert werden, ob im Therapieverlauf mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib noch größere Veränderungen auf Genexpressionsebene zu detektieren sind.

Zunächst muss ein Ausschluss interindividueller Unterschiede in der prätherapeutischen Genexpression der verschiedenen Zielgene erfolgen. Anschließend soll die Änderung der Genexpression mit dem Ansprechen auf die Therapie mit Imatinib korreliert werden. Hat die gefundene Änderung der Genexpression einen prognostischen Einfluss auf den Verlauf der Erkrankung? Ist sogar ein kommendes molekulares Krankheitsrezidiv durch unsere Untersuchungen zu prognostizieren?

2. Material/Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte

Tabelle 2.1.: Überblick über die verwendeten Geräte

Gerät	Hersteller und Ort
Sysmex Kx-21N	Sysmex, Norderstedt
Gefrierschrank -20°C	Liebherr, Biberach
Tiefkälteschrank -80°C "profiline"	Liebherr, Biberach
Kolbenhubpipetten 2,5 μ l und 10 μ l Eppendorf reference	Eppendorf, Hamburg
Kolbenhubpipetten 20 μl, 100 μl, 200 μl, 1 ml Eppendorf	Eppendorf, Hamburg
research	
Neo Accupette Motorpipette	NeoLab, Heidelberg
Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus, Osterode
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus, Osterode
Thermomixer comfort	Eppendorf , Hamburg
Nanodrop ND-1000	PeqLab Biotechnologie, Erlangen
Cycler Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg
LightCycler-System 1.2.	Roche, Mannheim
Geldokumentationssystem GelDoc 2000 mit digitaler	BioRad, München
Fluorchem Imaging Kamera	
Easycast [™] Model B2 Gelelektrophoresekammer	OWL Separation Systems, Portsmouth
	USA
Biorad powerpac 300	BioRad, München
Vortex Mixer 7-2020	NeoLab, Heidelberg
LightCycler sample Adapter	Roche, Mannheim

2.1.2. Verbrauchsmaterial

Tabelle 2.2.: Übersicht über die genutzten Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller und Ort		
5			
2,5 μl, 10 μl, 20 μl, 200 μl, 1 ml <i>safe seal tips</i> premium	Biozym, Hessisch Oldendorf		
Pipettenspitzen			
Costar Stripette 10 ml Pipettenspitzen für Motorpipetten	Corning Inc., Corning USA		
0,5 ml, 1,0 ml, 2,0 ml Mikrolitergefäße	Eppendorf, Hamburg		
50 ml Polypropylengefäß	Greiner Bio One, Frickenhausen		
20 μl LightCycler-Kapillaren	Roche, Mannheim		
Neolus Kanüle, 26 G 0,45 mm	Terumo, Eschborn		
Omnifix 40 Solo U-40 Insulinspritzen	Braun, Melsungen		

2.1.3. Reagenzien

Tabelle 2.3.: Auflistung der verwendeten Reagenzien

Reagenz	Hersteller und Ort
100 bp DNA Leiter	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
6X Ladepuffer für Agarosegele	Fermentas, Leon-Rot
Agarose	Gibco BRL, Paislay, Schottland
Aqua dest	Braun, Melsungen
Borsäure	Sigma, Deisenhofen
EDTA	Sigma, Deisenhofen
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Lymphoprep [™]	Axis Shield, Oslo, Norwegen
PBS Dulbecco w/o Ca ²⁺ /Mg ²⁺	Biochrom, Berlin
TRIS-Base	Sigma, Deisenhofen
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt

Puffer für die Gelelektrophorese:	1-fach TBE (1000 ml):	10,8 g (89 mM) TRIS-Base
		5,5 g (89 mM) Borsäure
		0,7 g (2 mM) EDTA-Na ₂
		ad 1000 ml aqua dest.
Lysepuffer:	pH 7,4 (1000 ml):	8,29 g (155 mM) NH₄Cl
		1,00 g (10 mM) KHCO ₃
		0,0375 g (0,1 mM) Na ₂ -EDTA
		ad 1000 ml aqua dest.

2.1.4. molekularbiologische Testsysteme

Tabelle 2.4.: Übersicht über die verwendeten molekularbiologischen Kits

Bezeichnung	Hersteller und Ort
ProtoScript M-MuLV First Strand cDNA synthesis kit	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I Kit	Roche, Mannheim
RNase-free DNase Set	Qiagen, Hilden
RNeasy Kit	Qiagen, Hilden

2.1.5. Primer

2.1.5.1. Primerauswahl

Durch Imatinib-Therapie ausgelöste transkriptionelle Veränderungen können wie in Kapitel 2.1.8. angesprochen in drei große pathophysiologisch relevante Gruppen eingeteilt werden: Zellzyklusassoziierte Gene, Gene der DNA-Reparatur und DNA-Replikation sowie Zelladhäsion und Migration (74) (Brünnert *et al.*). Für die Gruppe der zellzyklusrelevanten Gene wurden die repräsentativen, in der Voruntersuchung differenziell exprimierten Gene PIM1 Onkogen (PIM1), *baculoviral IAP repeatcontaining 5* (BIRC5), *BTG family member 2* (BTG2) und *cell division cycle* 2 (CDC2) ausgewählt. Die Gruppe der Gene der DNA-Reparation und der DNA-Replikation wurde durch die gewählten Gene Topoisomerase II alpha (TOP2A), Ribonukleotid Reduktase M2 (RRM-2) und *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) vertreten. Als repräsentativ für die Gruppe der zelladhäsion- und migrationsrelevanten Gene gelten Interleukin 18 (IL-18), L-Selektin (SELL) und das kodierende Gen für den *hyaluronan-mediated motility receptor* (RHAMM). Für die ausgewählten Gene wurden Primer hergestellt (siehe Kapitel 2.2.5.). Die einzelnen Primersequenzen sind der Tabelle 2.5. zu entnehmen.

2.1.5.2. Primersequenzen

Die Primer wurden von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) unter Verwendung der vorgegebenen Primersequenzen hergestellt.

	forward Sequenz	reverse Sequenz
BIRC5	AGAGTCCCTGGCTCCTCTA	CCCGTTTCCCCAATGACTTA
BTG2	TCCATCTGCGTCTTGTACGA	GTTGTCACGGCAGCATGAG
CDC2	GGAGAAGGTACCTATGGAGT	ATAAGCACATCCTGAAGACTG
GAPDH	TCCATGACAACTTTGGTATCG	GTCGCTGTTGAAGTCAGAGGA
IL-18	TGTAGAGATAATGCACCCCG	TCAGGAGGATTCATTTCCTTAA
PCNA	CCTCACCAGTATGTCCAAAAT	TACTCCTGTTCTGGAATTCCA
PIM1	ACTTCGATGGGACCCGAGT	AGATGCTGACATTCTGAAGAG
RHAMM	AGCTGAAAGGGAAGGAGGC	AGCTTTCAAATTGAGCAGTAAC
RRM-2	GCTACCTATGGTGAACGTGT	GTGTAAACCCTCATCTCTGC
SELL	CCAGTGTCAGTTTGTGATTCA	GAATCACTTGACAGGTTGGTT
TOP2A	GTCACAATTGATCCGGAAAAC	CATTTCGACCACCTGTCACT

Tabelle 2.5.: Oligonukleotide für die quantitative real-time PCR

2.1.6. Programme und Datenbanken

Tabelle 2.6.: Während der Durchführung der Versuche verwendete Programme

Programm	Hersteller und Ort	
Alpha Ease fluor chem software	Biozym, Hessisch Oldendorf	
ApE Plasmid editor	W. Davis, Utah, USA	
Nanodrop 1000 V3.7 Software	PeqLab Biotechnologie, Erlangen	

Tabelle 2.7.: Zur Planung der Methoden genutzte Datenbanken

Datenbank	Internetressource
Human Genome Server - The Sanger Centre	http://www.ensembl.org
Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes	http://www.genome.jp/kegg
PubMed, Gene, Nucleotide, BLAST	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
Jena Bioscience	http://www.jenabioscience.com

2.1.7. Patientencharakteristika

Zur Untersuchung diente mit EDTA gerinnungsgehemmtes peripheres Blut der Patienten, das innerhalb von 24 Stunden weiterverarbeitet wurde. Bei den Patientenproben handelte es sich um Material, welches zur Routinediagnostik bei CML (BCR-ABL/G6PDH in %, Bruchpunktbestimmung) im molekularbiologischen Labor der Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie der Universitätsklinik Düsseldorf eingegangen war. Die Proben fanden nur dann für diese wissenschaftliche Arbeit Verwendung, wenn für die angeforderte Routinediagnostik ebenfalls noch genügend Material zur Verfügung stand.

Zur Durchführung der Experimente wurden Proben von Patienten mit neu diagnostizierter und BCR-ABL positiver CML in der chronischen Phase (n=11, davon 5 weiblich und 6 männlich) verwendet. Zum Zeitpunkt der ersten Probengewinnung war die Erkrankung der Patienten noch unbehandelt. Erst im Anschluss an die Erstdiagnose wurde bei allen Patienten eine Therapie mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib (Glivec[®]) mit einer Dosis von 400 mg/Tag eingeleitet. Somit handelt es sich bei der Glivec-Therapie aller Patienten um eine sog. *first-line* Therapie.

Die Patienten wurden nach molekularbiologischen Kriterien (BCR-ABL/G6PDH in %) in zwei unterschiedliche Gruppen eingeteilt, wobei zwischen Therapieversagern und Patienten, die adäquat auf die Therapie mit Imatinib reagieren, unterschieden wurde. Zur Gruppe der Therapieansprecher (n=4) wurden diejenigen Patienten eingeteilt, die im Verlauf der Behandlung mit Imatinib negative BCR-ABL/G6PDH-Werte aufwiesen. Der Gruppe Therapieversager (n=7) wurden Patienten zugeteilt, wenn während der Imatinibtherapie ein Anstieg des BCR-ABL/G6PDH-Quotienten zu verzeichnen war. Eine klare Trennung zwischen primären und sekundären Therapieversagern wurde nicht vorgenommen, sodass es sich damit bei der Gruppe der Therapieversager um ein heterogen zusammengesetztes Patientenkollektiv handelt.

Wichtige Patientencharakteristika sind in Tabelle 2.8. und Tabelle 2.9. zusammengestellt. Das durchschnittliche Alter der Patienten lag bei 56 Jahren. In der Gruppe der Therapieversager gab es im Median 2,57 *follow-up*-Untersuchungen (nach dem Zeitpunkt der Erstdiagnose) und der durchschnittliche Behandlungszeitraum lag bei 13 Monaten. Die Gruppe der *Responder* wies im Schnitt 2,25 Kontrolluntersuchungen auf und der durchschnittliche Behandlungszeitraum lag hier bei 16,75 Monaten.

Patient	Alter	Hb	Leukozyten	Leukozyten	Thrombo-	BCR-ABL	Bruchvariante
	bei ED	(g/dl)	(/µl) bei ED	(/µl) Rezidiv	zyten (/μl)	/G6PDH (in%)	
BH	51	8,5	448	8,5	177	7,96	b2a2
ТМ	71	16	17,7	5,98	213	23,7	e1a2
RM	47	12,5	106,6	7,4	438	17,73	b2a2
PT	57	12,5	18,2	13	774	5,11	b3a2
MA	65	11,5	19,5	5,2	395	19,5	b2a2
FA	70	11,5	215	7,9	895	19,75	b3a2
KR	60	9,7	393	10,3	463	11,9	b2a2

Tabelle 2.8.: Laborparameter der Therapieversager

Tabelle 2.9.: Laborparameter der Therapieansprecher

Patient	Alter	Hb	Leukozyten	Leukozyten	Thrombo-	BCR-ABL	Bruchvariante
	bei ED	(g/dl)	(/µl) bei ED	(/µl) bei Th.	zyten (/μl)	/G6PDH (in%)	
PE	55	9,7	117	6,8 6,2	616	13,77	b3a2 + b2a2
KN	55	10,1	157	6,3 3,9	258	25,23	b2a2
KU	59	12,7	40,7	5,3 3,8	272	21,79	b2a2
RO	27	12,8	44,1	3,2 3,7	505	22,49	b2a2

2.1.8. Die Zielgene

2.1.8.1. Zellzyklusrelevante Gene

2.1.8.1.1. CDC2

Der Zellzyklus einer Zelle durchläuft kreisförmig verschiedene Phasen, die in ihrer Reihenfolge des Erreichens mit G₁-Phase, S-Phase, G₂-Phase und M-Phase bezeichnet werden. Der Zellzyklus reguliert das Wachstum und die Proliferation der Zelle. Der Übertritt in die jeweils nächste Zellzyklusphase wird dabei durch externe Signale reguliert. Dabei handelt es sich um Proteine, sogenannte Cycline, und cyclin-abhängige Kinasen (CDK's), die Substratproteine in den einzelnen Zellzyklusphasen phosphorylieren und den Übertritt in die nächste Zellzyklusphase ermöglichen. Zusätzlich existieren weitere Gene, welche die Zellteilung regulieren und als *cell division cycle genes* (CDC) bezeichnet werden (75) (Doree *et* Galas, 1994).

Aus dieser großen Gruppe der zellzyklus- und zellteilungsrelevanten Gene wurde für diese wissenschaftliche Arbeit das Gen *cell division cycle two* (CDC2) repräsentativ ausgewählt und

untersucht, da in früheren Untersuchungen ein großer Genexpressionsunterschied nach Beginn einer Imatinibtherapie für dieses Gen beschrieben ist (74) (Brünnert *et al.*). Die Expression von CDC2 in der Zelle ist vor allem für den Übergang von der S-Phase zur G₂-Phase des Zellzyklus notwendig.

2.1.8.1.2. BTG2

Das Gen BTG2 ist Bestandteil einer ganzen Familie von strukturell verwandten Genen, der sogenannten *BTG-family*, bestehend aus den Genen BTG2, *BTG family member 3* (BTG3), *transducer of ERBB2* (TOB) sowie *transducer of ERBB2-2* (TOB2), die allesamt antiproliferative Eigenschaften aufweisen und die Differenzierung der Zellen fördern. Als einer der Schlüsselfaktoren der Pathogenese der Leukämien wird der Defekt des Differenzierungsprozesses der hämatopoetischen Zellen angesehen, der vor allem durch einen Mangel an antiproliferativen Genen der BTG-Familie erklärt wird (76) (Cho *et al.*, 2008).

Die Expression von BTG-Genen ist während der Zellzyklus strikt reguliert und durch antiproliferative Faktoren induziert (77) (Duriez *et al.*, 2004). BTG2 wird bevorzugt in der frühen G₁-Phase des Zellzyklus exprimiert. In einigen Arbeiten wird die BTG-Expression als unterdrückt während der Karzinogenese beschrieben (77) (Duriez *et al.*, 2004).

2.1.8.1.3. BIRC-5

Das Gen BIRC5 codiert im menschlichen Organismus ein Protein, das oft als *survivin* bezeichnet wird. Survivin ist ein Mitglied der sogennanten *inhibitor of apoptosis* (IAP) Proteinfamilile (78) (Olie *et al.*, 2000). Die funktionelle Aufgabe des Proteins ist eine Inhibition der Kaspasenaktivierung und folglich eine Inhibition von Apoptose und programmiertem Zelltod (79) (Tamm *et al.*, 1996).

Das Survivin-Protein wird im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden bei vielen hämatologischen Tumorentitäten stärker exprimiert (80) (Schmidt *et al.*, 2003) und fehlt bei allen terminal differenzierten Zellen (81) (Sah *et al.*, 2006). Die Survivin-Expression ist strikt durch den Zellzyklus reguliert und ist beim Übergang von der G₂-Phase zur M-Phase des Zellzyklus von entscheidenden Bedeutung (82) (Altieri *et al.*, 2003).

2.1.8.1.4. PIM-1

Das Zielgen PIM-1 kodiert eine gleichnamige eine Serin-Threonin-Kinase mit protoonkogenem Potential. Sie weist regulatorische Funktionen in den Bereichen Zellzyklus, Proliferation und Apoptose auf. Die Zellzyklusregulation wird durch eine 33 kDa große Untereinheit von PIM-1 initiiert (83) (Xie *et al.*, 2005). Die synergistische Rolle von PIM-1 für die Zellzyklusprogression wird über den *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3)-Signalweg vermittelt (84) (Shirogane *et al.*,

1999). In unbehandelten CML-positiven Zellen der K562-Zelllinie zeigte sich PIM-1 als im Vergleich zu Gesundkontrollen vermindert exprimiert (74) (Brünnert *et al.*, 2009).

2.1.8.2. DNA-Reparation und DNA-Replikation

2.1.8.2.1. TOP2A

Das TOP2A-Gen kodiert mit der DNA-Topoisomerase-2-alpha ein Enzym, das in verschiedene Prozesse während der Transkription der DNA eingebunden ist. Die DNA-Topoisomerase-2-alpha wird während der Kondensation von Chromosomen und unterstützend zur Linderung des Scherstresses während der DNA-Transkription und DNA-Replikation in der S-Phase des Zellzyklus benötigt (85) (Watt *et al.*, 1994). Zusätzlich katalysiert die Topoisomerase-2-alpha die Öffnung des DNA-Doppelstranges zur Transkription (86) (Wang *et al.*, 1991).

In vielen wissenschaftlichen Arbeiten wird TOP2A heute in Zusammenhang mit dem Onkogen *v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2*, oder auch HER-2 genannt, bei der Erforschung des Mammakarzinoms untersucht, da beide Gene benachbart auf Chromosom 17 lokalisiert sind (87) (Järvinen *et* Liu, 2003).

2.1.8.2.2. RRM-2

Das humane RRM-2-Gen kodiert die Ribonukleotid-Reduktase-Untereinheit M2, welche die Reduktion von Ribonukleotiden zu Desoxyribonukleotiden katalysiert (88) (Pavloff *et al.*, 1992). Die Desoxyribonukleotide werden während der DNA-Replikation weiterverwendet. Die Synthese des kodierten Proteins wird dabei zellzyklusabhängig reguliert, da bei hohem Zellumsatz ein erhöhter intrazellulärer Bedarf an Desoxyribonukleotiden besteht.

Während einer antiproliferativen Therapie mit künstlichen *small interfering* RNAs (siRNA), die gegen RRM-2 gerichtet sind, kommt es im Tiermodell zur teilweisen Ausschaltung von RRM-2, was die Proliferationsrate von Malignomzellen senkt (89) (Heidel *et al.*, 2007).

2.1.8.2.3. PCNA

Das durch das PCNA-Gen kodierte Protein ist nukleär lokalisiert und ein Cofaktor der DNA-Polymerase δ (90) (Travali *et al.*, 1989). PCNA induziert die DNA-Synthese einer Zelle durch Komplexbildung mit der Polymerase δ (91) (Rössig *et al.*, 2001). Bei auftretenden DNA-Schäden fördert PCNA die DNA-Reparatur durch verstärkte Komplexbildung mit der DNA Polymerase δ (92) (Essers *et al.*, 2005) (93) (Shivji *et al.*, 1992). Brünnert *et al.* konnten mit ihren Versuchen zur frühen Genexpressionsanalyse bei Imatinibtherapie zeigen, dass auf molekularer Ebene eine Herunterregulierung des Gens PCNA durch Imatinib stattfindet und unter anderem damit die DNA-Synthese konstitutiv gehemmt wird.

2.1.8.3. Zelladhäsion- und migrationsrelevante Gene

2.1.8.3.1. IL-18

Das Gen IL-18 kodiert in menschlichen Zellen das gleichnamige Protein Interleukin 18 (94) (Nolan *et al.*, 1998). Die Rolle des Interleukin-18 in Bezug auf die Zelladhäsion wurde vor allem durch Morel et al. geprägt, da in diesem Untersuchungen IL-18 eine wichtige Rolle bei der Induktion von Adhäsionsmolekülen durch Phosphatidylinositol-3-Kinase-abhängige Signaltransduktionswege zukommt (95) (Morel *et al.*, 2001). Außerdem zeigte sich IL-18 bei Patienten mit CML und einer Imatinibtherapie von 7 Tagen signifikant hochreguliert nach Einleitung der Therapie (74) (Brünnert *et al.*, 2009).

Zusätzlich dazu übernimmt Interleukin-18 auch wichtige Funktionen im Rahmen der zellulären Immunabwehr, denn IL-18 induziert die zelluläre Immunabwehr beim Auftreten von bakteriellen Lipopolysacchariden. Durch die Stimulation mit IL-18 kommt es zur Freisetzung von Interferongamma (INF-γ) aus T-Zellen (96) (Okamura *et al.*, 1995), was zur Aktivierung von Makrophagen führt und IL-18 die weitere Bezeichnung *interferon-gamma-inducing factor* einbringt.

2.1.8.3.2. SELL

Das SELL-Gen kodiert mit L-Selektin ein Zelloberflächenadhäsionsmolekül. Das Genprodukt wird unter anderem zur Migration von Leukozyten aus dem Knochenmark in das periphere Blut benötigt. Die Expression des Gens führt zur gesteigerten Adhäsion von Leukozyten, was wiederum eine verlangsamte Zellmigration aus dem Knochenmark auslöst und durch eine längere Verweildauer der Zellen im Knochenmark den Differenzierungsprozess der Zellen fördert. Philadelphiachromosompositive CML-Zellen besitzen eine reduzierte Fähigkeit zur Adhäsion an Knochenmarkstromazellen (97) (Gordon *et al.*, 1987), da bei Patienten mit unbehandelter CML ist das Gen für L-Selektin herunter reguliert ist (98) (Diaz-Blanco *et al.*, 2007).

2.1.8.3.3. RHAMM

Das RHAMM-Gen kodiert den *hyaluron-mediated motility receptor* (HMMR), der anschließend als CD 168 benannt wurde und neben dem *main hyaluronan receptor* CD44 für die Zellmigration und die Bindung an Hyaluron-Oberflächen verantwortlich ist (99) (Turley, 1982). Diverse Arbeiten zeigen eine Überexpression von RHAMM verglichen mit gesunden Kontrollgruppen beim multiplen Myelom (100) (Crainie *et al.*, 1999) und bei metastasierten, soliden Tumorformen im Fachgebiet der Gynäkologie (101) (Rein *et al.*, 2003). Auch im Krankheitsverlauf der unbehandelten akuten myeloischen Leukämie (AML) und der CML wurde RHAMM bereits als leukämieassoziiert hochexprimiert beschrieben (102) (Greiner *et al.*, 2002).

2.2. Methoden

2.2.1. Isolierung von Leukozyten aus EDTA-Blut

Als Ausgangsmaterial für die Versuche diente jeweils 20 ml peripheres Blut der Patienten mit CML vor Einleitung einer Erstlinientherapie, welches mit EDTA (Ethylen-Diamin-Tetra-Acetat) als Antikoagulanz versetzt und innerhalb von 24 Stunden nach der Entnahme verarbeitet wurde.

Um die Gesamtheit der weißen Blutkörperchen aus dem EDTA-Blut der Patienten zu extrahieren und die Erythrozyten zu lysieren, wurden zunächst maximal 20 ml EDTA-Blut der Patienten in ein 50 ml Polypropylengefäß gefüllt. Anschließend wurde dieses mit Lysepuffer auf ein Gesamtvolumen von 50 ml aufgefüllt. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten und nach Abschluss der kompletten Lyse wurde, wie bei allen weiteren Zentrifugationsschritten, für 5 Minuten bei 1600 rpm zentrifugiert. Nach vorsichtigem Abkippen des wässrigen Überstandes verbleibt nur ein Zellpelett im Polypropylengefäß. Das durch erneute Zugabe von 50 ml Lyse-Puffer gelöste Zellpelett wurde anschließend, nach erneuter Inkubationszeit von 5 Minuten, zentrifugiert und der Überstand abgekippt. Nach einem Waschschritt mit 50 ml PBS und Zentrifugation im Anschluss wurde das Pelett in 1000 μ l PBS suspendiert. Die Messung der Zellzahl der Suspension erfolgte am Sysmex[®]-Messgerät. Anschließend wurde ein Volumen, welches einer Zellzahl von 1x10⁷ Zellen entspricht, in ein steriles 2,0 ml Eppendorf-Gefäß abgefüllt. Abschließend wurde erneut für 5 Minuten zentrifugiert und das entstandene Zellpelett in 600 μ l RLT-Puffer, der 1% ig mit β -Mercaptoethanol versetzt wurde, resuspendiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C im Gefrierschrank gelagert.

2.2.2. RNA-Extraktion

Die RNA-Extraktion erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden). Alle im Folgenden beschriebenen Zentrifugationsschritte wurden bei 13.000 rpm durchgeführt.

Nach Wiederauftauen des im RLT-Puffer gelösten Zellpellets wurde zur Extraktion der Gesamt-RNA zunächst die Suspension auf die QiaShredder[®]-Säule aufgetragen und zwei Minuten zentrifugiert. Dem Eluat wurde hiernach eine dem Ausgangsvolumen entsprechende Menge 70%-iger Ethanol zugefügt. Das Gemisch aus Ethanol und Eluat wurde anschließend auf eine RNeasy-Spin[®]-Säule

verbracht, 15 Sekunden zentrifugiert und dann mit 350 µl RW1-Puffer durch erneute Zentrifugation über 15 Sekunden gewaschen. Auf die Säulenmembran wurde danach das vorher vorbereitete Enzym zum DNase-Verdau, bestehend aus 10 µl DNase-Stock-Solution und 70 µl RDD-Puffer, aufpippetiert. Nach 15 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Säule erneut mit 350 µl RW1-Puffer beschichtet und für 15 Sekunden zentrifugiert. Diesem Schritt folgend wurde zweimalig je 500 µl RPE-Puffer auf die Säule gegeben und die Säule für 15 Sekunden bzw. zwei Minuten zentrifugiert. Ein weiterer Zentrifugationsschritt für eine Minute zum Trocknen der Säulenmembran schloss sich an. Abschließend wurde die Gesamt-RNA durch 40 µl RNase-freies Wasser von der Säulenmembran eluiert. Dabei destabilisierte das Wasser die Wechselwirkung zwischen RNA und Säulenmembran, sodass die Gesamt-RNA eluiert werden konnte.

2.2.3. Bestimmung des RNA-Gehaltes mit dem Spektralphotometer

Direkt im Anschluss an die Extraktion der RNA schloss sich die Bestimmung der RNA-Konzentration im Eluat an. Diese Messung wurde photometrisch im UV-Bereich mit einem Eluatvolumen von 2 µl am Nanodrop[®] 1000 (PeqLab Biotechnologie) durchgeführt. Hierbei galt, dass die Menge der von der RNA-Lösung absorbierten ultravioletten Strahlung ihrem RNA-Gehalt direkt proportional war und bei einer Wellenlänge von 260 nm eine Extinktion von 1,0 einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml entsprach.

Gleichzeitig erhält man mit diesem Verfahren eine indirekte Qualitätskontrolle der extrahierten RNA, denn das Verhältnis der Extinktion bei 260/280 nm muss zwischen 1,8 und 2,0 liegen (103) (Barker, 2006). Liegt der Quotient außerhalb dieses Rahmens, ist die Qualität der extrahierten RNA zu schlecht und die Probe kann nicht verwendet werden.

Nach der photometrischen Bestimmung des Gesamt-RNA-Gehaltes wurde die gewonnene RNA sofort revers transkribiert oder bei -80°C im Gefrierschrank bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

2.2.4. cDNA-Synthese

Die cDNA wurde durch reverse Transkription mit Hilfe des ProtoScript[®] M-MuLV *first strand* cDNA *synthesis kit (New England Biolabs)* hergestellt. Alle im Folgenden genannten Komponenten waren Bestandteil dieses Kits.

Die zur reversen Transkription eingesetzte Menge Gesamt-RNA betrug jeweils 100 ng. Das dieser RNA-Menge entsprechende Volumen Gesamt-RNA-Lösung wurde mit jeweils 2 µl d(T)23VN Primer versetzt und mit nukleasefreiem Wasser auf 8 µl aufgefüllt. Diesem Ansatz wurden anschließend 10 µl M-MuLV Reaktionsmix, bestehend aus dNTPs und optimierendem Puffer, sowie 2 µl M-MuLV Enzymmix mit reverser Transskriptase und murinem RNase Inhibitor zugegeben.
Das gesamte Probenvolumen von 20 µl wurde hiernach für eine Stunde bei 42°C inkubiert, damit die Reaktion der cDNA-Synthese ablaufen konnte. Abschließend erfolgte die Inaktivierung der Enzyme durch 5-minütiges Erhitzen auf 80°C.

Das Probenvolumen der reversen Transkription wurde mit $30 \,\mu$ l PCR-geeignetem Wasser auf ein Gesamtvolumen von $50 \,\mu$ l verdünnt und anschließend bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C im Gefrierschrank gelagert.

2.2.5. Primerherstellung

Die Primer wurden von der Firma Invitrogen nach den unten beschriebenen Vorgaben synthetisiert und kamen bei der Durchführung der quantitativen real-time PCR zum Einsatz.

Die zur Herstellung der Primer von jedem Gen nötige *coding sequenz* (CDS) kann auf der Internetseite http://www.ncbi.nlm.nih.gov eingesehen werden. Die Länge der Primer sollte dabei näherungsweise 20 Basenpaare betragen, um einen adäquaten Kompromiss zwischen der effizienten Bindungsaffinität kurzer Primersequenzen und der hohen Spezifität langer Primersequenzen zu erreichen. Die Primer wurden exonübergreifend konstruiert, um zu gewährleisten, dass die Primer spezifisch für die gewünschte mRNA sind. Außerdem wurde auf einen ausgeglichenen Guanin-Cytosin-Gehalt der Primer und das Umgehen von replikativen Domänen zur Vermeidung von unspezifischen Bindungen ein besonderer Wert gelegt. Die näherungsweise Bestimmung der Schmelztemperatur erfolgte nach der "4+2 Regel" unter zur Hilfenahme der Internetpräsenz der Firma Jenabioscience (siehe Tabelle 2.7.). Dabei galt die Annahme, dass sich der Schmelzpunkt pro Cytosin- oder Guanin-Nukleotid um je 4°C und pro Adenin und Thymin um je 2°C erhöht. Für alle zu quantifizierenden Gene wurden Primer gewählt, die eine einheitliche Schmelztemperatur besitzen, um einen vergleichbaren Ablauf des PCR-Programms zu gewährleisten.

Außerdem wurden die Primer durch das *basic local alignment tool* (BLAST) (siehe Tabelle 2.7.) überprüft, um die Spezifität der Primer für das jeweils untersuchte Zielgen sicherzustellen. Eine weitere abschließende Überprüfung der Spezifität der Primer erfolgte durch DNA-Gelelektrophorese (siehe Kapitel 3.5.) der Proben, um die DNA-Fragmentgröße zu bestimmen.

2.2.6. Quantitative *real-time* PCR

Für die quantitative *real-time* PCR (qRT-PCR) wurde das Fast Start DNA Master SYBRGreen[®] Kit (Roche) verwendet. Im Folgenden genannte Komponenten waren, sofern nicht anders vermerkt, Bestandteil des Kits bzw. notwendiges Zubehör.

Durch die qRT-PCR sollten die Genexpressionsdaten für jedes der zu untersuchenden Gene erhoben werden.

Für jedes zu untersuchende Gen wurde pro Untersuchungszeitpunkt eine Stammlösung bestehend aus 11,9 μ l PCR-geeignetem Wasser, 2,4 μ l (4 mM) Magnesiumchlorid-Lösung, 1 μ l (10pM) *forward* Primerlösung (Invitrogen), 1 μ l (10pM) *reverse* Primerlösung (Invitrogen) sowie 2 μ l SYBRGreen-Reaktionsmix, hergestellt nach Herstellerangabe, angefertigt.

Während die Stammlösung lichtgeschützt auf Eis zwischenlagerte, wurden für jedes zu untersuchende Gen zwei Reaktionsgefäße im Kühlblock vorbereitet und mit jeweils 18 µl der o.g. Stammlösung befüllt. Anschließend wurden jedem Reaktionsansatz 2 µl cDNA-Lösung (eines Untersuchungszeitpunktes) zugegeben und die Reaktionsgefäße nach kurzer Zentrifugation verschlossen in den LightCycler[®] zur Durchführung des PCR-Programms gestellt. Das Programm für die qRT-PCR ist Tabelle 2.10. zu entnehmen.

Programm-Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklenzahl	
Denaturierung	95°C	5 min	1	
	95°C	30 sek		
Amplifikation	60°C	30 sek	40	
	72°C	30 sek		
finale Flongation und	72°C	5 min		
Schmelzkurvenanalvse	40°C	5 sec	1	
	96°C	0 sek		
Kühlung	40°C	30 sek	1	

Tabelle 2.10.: Programm für die quantitative *real-time* PCR.

Während der Durchführung der PCR wurde die Zunahme der SYBR-Green-Fluoreszenz, die der vorhandenen Menge doppelsträngiger DNA in der Probe entspricht, durch die LightCycler-Software 3.5 (Roche) gemessen und als CT-Wert angegeben. Der CT-Wert bezeichnet dabei den Schwellenwert bei der Durchführung der PCR, an dem die PCR in die exponentielle Phase übergeht.

Ein kleinerer CT-Wert ist also gleichbedeutend mit einem früheren Erreichen des Schwellenwertes und damit einer größeren Menge vorhandener doppelsträngiger DNA des untersuchten Zielgens. Damit ergibt sich für die Bestimmung des Expressionsniveaus des Zielgens, dass ein kleinerer CT-Wert direkt mit einem höheren Expressionsniveau des Zielgens in der untersuchten Probe in Zusammenhang steht.

Im Anschluss an die qRT-PCR wurde für die Normierung der Probe zunächst für jede Probe die Differenz zwischen Ziel- und Referenzgen gebildet (ΔCT-Wert). Hiernach wurde von dieser Differenz die von den Werten vor Therapiebeginn nach demselben Prinzip gebildete Differenz zwischen Zielund Referenzgen subtrahiert, sodass galt:

$\Delta\Delta CT = \Delta CT$ unter Therapie – ΔCT vor Therapie

Das Endergebnis der Expressionsänderung in entlogarithmierter Form, als *fold change* bezeichnet, wurde abschließend wie folgt gebildet:

fold change = $2^{\Delta\Delta CT} = 2^{\Delta CT \text{ unter Therapie} - \Delta CT \text{ vor Therapie}}$

Zur Etablierung der PCR und der neuen Primer wurde die Spezifität des entstandenen PCR-Produktes mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese überprüft. Sofern hierbei der Nachweis des gewünschten Produktes gelang, genügte bei den folgenden Versuchen mit dem jeweiligen Gen ein gleiches Aussehen der Schmelzkurve als hinreichender Beweis für das Vorliegen des spezifischen PCR-Produktes.

2.2.7. Auswahl des Referenzgens

Bei der Durchführung der qRT-PCR wird ein konstant exprimiertes Referenzgen benötigt, um die Ergebnisse der verschiedenen Zielgene miteinander zu vergleichen und den ΔCT-Wert zu jedem Untersuchungszeitpunkt bilden zu können. In der Literatur wurden wiederholt verschiedene gängige Referenzgene genutzt, sodass bei der Planung dieser Arbeit zunächst die Identifikation des, für die hier genutzten Methoden, idealen Referenzgenes im Vordergrund stand.

Mehrere Arbeiten zum Thema BCR-ABL-Quantifikation mittels qRT-PCR kommen zum Ergebnis, dass ABL das am besten geeignete Kontrollgen für PCR-basierte Diagnostikverfahren darstellt (104) (Beillard *et al.*, 2003). Andere Arbeiten hingegen ergaben, dass die ABL-Expression in CML-Zellen nicht vergleichbar ist mit normalen hämatopoetischen Zellen (105) (Wang *et al.*, 2006), sodass mit GAPDH ein weiteres, in der Literatur verbreitetes Referenzgen (106) (Elmaagacli *et al.*, 2001) (107) (Gutiérrez M *et al.*, 2005) (108) (Jones *et al.*, 2003) parallel zu ABL untersucht wurde.

Zur Etablierung des besten Referenzgenes wurde die Genexpression der gewählten möglichen Referenzgene ABL und GAPDH bei 20 zufällig ausgesuchten Patientenproben miteinander verglichen. Erst anschließend wurden die Versuche zur Genexpressionsanalyse der Zielgene mit dem Referenzgen, welches die geringste Standardabweichung und ein adäquates Expressionsniveau aufwies, durchgeführt.

2.2.8. Agarosegelelektrophorese

Die Größe der PCR-Produkte wurde durch eine Agarosegelelektrophorese unter Mitführung eines Längenstandards überprüft.

Die Herstellung der Lösung für das 2%-ige Agarosegel erfolgte durch Mischen von 2,5 g Agarose mit 125 ml 1-fach TBE-Puffer und anschließendes Erhitzen, bis die Agarose vollständig gelöst und die Lösung klar war. Hiernach wurden 3 µl Ethidiumbromid-Lösung aus einer vorbereiteten Ethidiumbromid-Stock-Lösung mit einer Ethidiumbromid-Konzentration von 10mg/ml zur Agaroselösung zugegeben. Anschließend wurde die noch warme Flüssigkeit in die vorbereitete Form gegossen und ein Pippetierkamm zum Formen von Taschen eingesetzt. Nach dem Erkalten des Gels wurde der Kamm entfernt und die Gelelektrophoresekammer mit 1-fachem TBE-Puffer gefüllt. Anschließend wurden je 10 µl der DNA-Proben mit jeweils 3 µl Ladepuffer versetzt und ebenso in die Taschen versenkt wie der mitzuführende Längenstandard. Die Elektrophorese wurde mit 100 V für 10 Minuten gestartet, damit die Proben in das Gel "einlaufen" können und anschließend für 30 Minuten bei 130 V fortgesetzt.

Der dem Gel zugefügte Farbstoff Ethidiumbromid ist interkalierend, bindet spezifisch an DNA-Doppelstränge und fluoresziert im UV-Licht bei 254 nm. Diese Fluoreszenz kann mit einem Transilluminator sichtbar gemacht werden. Die Gele wurden mittels geeigneter Kamera betrachtet und fotografiert sowie die Länge der PCR-Produkte ausgewertet.

2.2.9. Berechnung der Signifikanz

Die aus den Ergebnissen der PCR-Reaktionen ermittelten Δ CT-Werte dienten zum Einen als Grundlage für die Berechnung, ob ein Gen im Therapieverlauf im Vergleich zum Zeitpunkt der unbehandelten Erstdiagnose als signifikant differenziell exprimiert anzusehen war. Zum Anderen zur Klärung der Frage, ob sich zwischen den zwei unterschiedlichen Patientengruppen signifikante Unterschiede im Genexpressionsprofil nachweisen ließen. Wenn p<0,05 betrug, wurden Gene als signifikant differenziell exprimiert angesehen, lag p<0,001 als hoch signifikant betrachtet.

Die Berechnung erfolgte mit Hilfe des zweiseitigen, homoskedastischen (zwei Stichproben mit gleicher Varianz) *students T-Tests* für ungepaarte Proben.

Auch signifikante Unterschiede bezüglich der Patientencharakteristika zwischen beiden Gruppen des Patientenkollektivs wurden mit Hilfe dieses Tests eruiert.

3. Ergebnisse

3.1. Durchschnittlicher mRNA-Gehalt

Nach Abschluss der mRNA-Extraktion aus dem EDTA-Blut der Patienten konnte festgestellt werden, dass sich der mittlere mRNA-Gehalt der Patientenproben zwischen den Patientenkollektiven der Therapieversager und der Patienten, die effektiv auf die Therapie mit Imatinib angesprochen haben, nicht signifikant unterscheidet. Der mittlere mRNA Gehalt wurde mit Hilfe des Nanodrop[®]-Verfahrens gemessen und betrug 59,86 ng/µl respektive 64,24 ng/µl je extrahierter Patientenprobe (siehe Tabelle 3.1.). Die Gesamtzahl der Patientenproben ergibt sich dabei aus der Anzahl Erstuntersuchungen der Patienten vor Beginn der Therapie mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib addiert mit den jeweiligen Kontrolluntersuchungen während des Therapieverlaufes.

Tabelle 3.1.: durchschnittlicher gemessener mRNA-Gehalt der Patientenproben im jeweiligen Patientenkollektiv.

Patientenkollektiv	Anzahl Patientenproben	durchschnittlicher mRNA Gehalt (ng/µl)
Therapieversager	n=26	64,24
Therapieansprecher	n=18	59,86

Als Qualitätsüberprüfung der extrahierten mRNA diente der gebildete Quotient der Extinktion bei einer UV-Wellenlänge von 260nm zu 280nm (260/280nm) (vgl. Kapitel 2.2.3. und siehe Abbildung 3.1). Proben, die durch Kontamination nicht den erforderlichen Quotienten aufwiesen, wurden nicht für Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit verwendet.

Sample ID	User ID	Date	Time	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230	Constant	Cursor Pos.	Cursor abs.	340 raw
h2o	Default	10/7/2009	10:36 AM	0.57	0.014	0.009	1.66	0.52	40.00	230	0.027	-0.008
6433	Default	10/7/2009	10:37 AM	80.16	2.004	0.968	2.07	1.11	40.00	230	1.805	0.041
6433	Default	10/7/2009	10.38 AM	79.99	2.000	0.985	2.03	1.10	40.00	230	1.812	-0.009
h2o	Default	10/7/2009	10.38 AM	0.23	0.006	0.003	2.26	-0.18	40.00	230	-0.031	-0.022
6926	Default	10/7/2009	10.39 AM	55.73	1.393	0.683	2.04	0.58	40.00	230	2.393	-0.009
6926	Default	10/7/2009	10:40 AM	56.27	1.407	0.696	2.02	0.58	40.00	230	2.445	0.002
h2o	Default	10/7/2009	10:40 AM	-0.07	-0.002	0.004	-0.49	0.04	40.00	230	-0.043	-0.024

Abbildung 3.1.: Exemplarische Abbildung für die zur Auswertung des mRNA-Gehaltes erstellte Tabelle im Anschluss an die Messung am Nanodrop[®]. Die im roten Kasten hervorgehobenen Extintionsquofizienten der Wellenlänge 260/280nm liegen im Zielbereich, sodass die gemessenen Patientenproben verwendet werden können.

3.2. Referenzgenfindung

Für die Wahl des Referenzgenes wurden die Expressionsniveaus der zwei möglichen Referenzgene *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH) und *c-abl oncogene* (ABL) mit 20 zufällig ausgewählten Patientenproben ermittelt und miteinander verglichen. Die Patientenproben wurden nicht für weitere Versuche dieser Arbeit verwendet.

Bei der Durchführung der Versuche zeigte sich, dass die Expression sowohl von GAPDH als auch von ABL ein detektierbares und adäquates Niveau erreicht, allerdings GAPDH stärker exprimiert wird als ABL, da der CT-Wert früher erreicht wird. Vergleicht man aber die Ergebnisse der CT-Werte der jeweils 20 Patientenproben miteinander, so stellt man fest, dass die Standardabweichung bei GAPDH nur rund 0,55 beträgt, während sie bei ABL 0,64 groß ist (siehe Tabelle 3.2.).

Tabelle 3.2.: Vergleich der ermittelten Ergebnisse der möglichen Referenzgene bei 20 Patientenproben.

Gen	Patientenproben	Minimaler CT-Wert	Maximaler CT-Wert	Mittelwert	Standardabweichung
ABL	n = 20	25,68	27,78	26,5789474	0,64810746
GAPDH	n = 20	22,48	24,33	23,6668421	0,55153375

Weiterhin wichtig zu erwähnen ist dabei, dass kein signifikanter Unterschied beim Vergleich der prätherapeutischen CT-Werte mit den CT-Werten während der Therapie sowohl für GAPDH als auch für ABL detektiert werden konnte.

Somit wurde GAPDH für diese Versuche als das von äußeren Einflüssen und der möglichen Therapie unabhängigere Referenzgen angesehen und für die weitere Durchführung der Versuche als Referenzgen verwendet.

3.3. Ergebnisse der untersuchten Laborparameter der Patienten

Untersucht man die Laborparameter der in diese Arbeit eingeschlossenen Patienten, so sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Patientengruppen hinsichtlich der Laborparameter objektivierbar. Die Ausnahme bildet aber die Leukozytenzahl im Rezidivfall, die in der Gruppe der Therapieversager signifikant höher war als die Leukozytenzahl während der Therapie in der Gruppe der optimal therapierten Patienten (t=0,012) (siehe Abbildung 3.2).



Abbildung 3.2.: Vergleich der Leukozytenzahl in Tsd./µl im Rezidivfall bei Versagen der Imatinibtherapie (links) und während effektiver Imatinib-Therapie ohne Hinweis auf ein molekulares Rezidiv (rechts).

3.4. Quantitative *real-time* PCR Ergebnisse

Die Darstellung der Ergebnisse der qRT-PCR-Versuche erfolgt, nach funktionellen Gruppen der Zielgene geordnet, für jedes Zielgen einzeln. Sich ergebende Zusammenhänge der Ergebnisse werden im Diskussionsteil dieser Arbeit weitergehend behandelt.

Außerdem wird bei der Auswertung analog zur Fragestellung dieser Arbeit zwischen den verschiedenen Patientengruppen der Therapieversager und den Patienten, die adäquat auf die Therapie mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib reagieren, unterschieden. Ziel war es dabei, mögliche Unterschiede der Genexpression abhängig vom molekularen Ansprechen auf die Therapie mit Imatinib aufzudecken.

3.4.1.1. TOP2A

Tabelle 3.3.: BCR-ABL/G6PDH-Ratio, CT-Wert sowie ∆CT-Wert für das Gen TOP2A in der Gruppe der Therapieversager an den gewählten Untersuchungszeitpunkten.

Gen	Patienten	Therapiedauer	BCR-ABL /G6PDH	rtPCR CT-Wert	ΔCT-Wert
		(Monate)			
TOP2A	Patient 1	0	7,96	28,76	7,04
		5	10,15	29,94	8,265
		11	70,69	32,35	9,565
		17	21,57	31,89	9,74
	Patient 2	0	23,7	27,085	4,73
		7	0,55	30,01	6,775
		10	2,01	31,245	8,32
		12	1,38	30,445	7,305
	Patient 3	0	17,73	27,99	6,18
		3	15,89	30,705	8,34
		6	0,67	31,225	8,125
		7	26,19	31,055	8,845
	Patient 4	0	3,34	27,42	5,715
		13	4,64	31,76	10,05
		19	8,9	31,745	9,835
	Patient 5	0	19,5	28,435	6,305
		9	10,35	31,8	9,18
		12	40,39	32,565	9,54
	Patient 6	0	19,75	27,53	6,12
		3	11,85	31,83	9,67
		9	1,5	31,82	9,33
		21	4,75	31,11	9,19
	Patient 7	0	11,9	27,235	6,015
		2	7,55	32,165	9,72
		3	19,7	31,7	9,285

Jede Zeile der Tabelle 3.3. repräsentiert einen eingeschlossenen Untersuchungszeitpunkt für das gewählte Zielgen TOP2A im Patientenkollektiv der Therapieversager vor Beginn der Therapie mit Imatinib (entspricht Therapiedauer 0 Monate) sowie während der Therapie im Rahmen der Therapieüberwachung. Die Messwerte der BCR-ABL/G6PDH-Ratio stammen aus den PCR-Routineuntersuchungen, die im Rahmen des Therapiemonitorings der Patienten im hämatologischen Labor der Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie der Universitätsklinik Düsseldorf zum gewählten Untersuchungszeitpunkt durchgeführt wurden (31) (Neumann *et al.*, 2003).

Des Weiteren sind in der Tabelle die Daten der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten qRT-PCR-Untersuchungen für das Zielgen, hier das Gen TOP2A, dargestellt.

Zur besseren Visualisierung der Ergebnisse sind die ermittelten qRT-PCR-Daten und die BCR-ABL/G6PDH-Ratio vergleichend über die Therapiemonate in Abbildung 3.3. aufgetragen.



Abbildung 3.3.: Verlauf der BCR-ABL/G6PDH-Ratio (Y_1 -Achse) an den Untersuchungszeitpunkten während des Therapieverlaufs (X-Achse) sowie gemessene CT-Werte (Y_2 -Achse) zum gleichen Therapiezeitpunkt in der Gruppe der Therapieversager für das Gen TOP2A.

Beim Auftragen des BCR-ABL/G6PDH-Verlaufs (Y₁-Achse) über die Dauer der Therapie mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib (X-Achse). Bei den Patienten der Gruppe der primären und sekundären Therapieversager besteht unter Therapie ein fehlendes Absinken der BCR-ABL/G6PDH-Ratio während der Therapie oder ein erneutes Ansteigen der BCR-ABL/G6PDH-Ratio im Therapieverlauf als Zeichen eines molekularen Rezidives. Im Diagramm eingetragen sind die

Messwerte aller Patienten, die zur Gruppe der *non-responder* gezählt werden, an verschiedenen Therapiezeitpunkten sowie vor Beginn der Therapie (0 Monate).

Zusätzlich sind im Diagramm die Daten der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten qRT-PCR-Untersuchungen für die Bestimmung des Expressionsniveaus eines Zielgens, in Abbildung 3.3. TOP2A, aufgetragen. Dabei ist das Expressionsniveau durch den erreichten CT-Wert der Proben dargestellt. Hierbei bleibt zu bedenken, dass ein kleinerer CT-Wert einem früheren Erreichen des Schwellenwertes und damit einer größeren vorhandenen Menge doppelsträngiger DNA des Zielgens entspricht. Um diesem Zusammenhang Rechnung zu tragen, ist die Y₂-Achse umgekehrt beschriftet, sodass ein größeres gemessenes Expressionsniveau einem größeren Betrag der Entfernung des Punktes von der X-Achse entspricht. Durch das Auftragen der Ergebnisse über die Therapiedauer ist der Verlauf der CT-Werte vor und während der Therapie mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib sowie im Verhältnis zum molekularen Ansprechen auf die Therapie im Diagramm abzulesen.

Bei der Analyse des Verlaufs der CT-Werte für das Gen TOP2A in der Gruppe der Therapieversager fällt auf, dass vor Beginn der Therapie ein CT-Wert zwischen 27,09 und 28,76 erreicht wird und im frühen Therapieverlauf ein signifikantes Absinken der CT-Werte und damit des Expressionsniveaus des Gens TOP2A auf CT-Werte zwischen 29,94 und 32,65 erkennbar ist. Im Verlauf der Therapie ändert sich das Expressionsniveau auch im Fall eines Rezidivs nicht mehr. Die ersten Laborkontrollen im Rahmen des Therapiemonitorings wurden frühestens nach zwei bis drei Monaten Therapiedauer durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt hatte das Absinken des Expressionsniveaus bereits stattgefunden, sodass sich eine definitive Aussage, wann das initiale Absinken der Genexpression stattfindet, nur eingeschränkt treffen lässt. Weiterhin fällt auf, dass bei wieder steigender BCR-ABL/G6PHD-Ratio im Rahmen eines molekularen Rezidivs keine Annäherung der CT-Werte an das prätherapeutische Niveau stattfindet. Tabelle 3.4.: BCR-ABL/G6PDH-Ratio, CT-Wert sowie ΔCT-Wert für das Gen TOP2A in der Gruppe der Patienten, die adäquat auf die Therapie mit Imatinib ansprechen, an den gewählten Untersuchungszeitpunkten.

Gen	Patienten	Therapiedauer	BCR-ABL /G6PDH	rtPCR-	ΔCT-Wert
		(Monate)		CP-Wert	
TOP2A	Patient 1	0	13,77	27,88	7,025
		12	negativ	31,66	10,28
		15	negativ	31,33	8,88
	Patient 2	0	25,23	27,77	7,48
		16	negativ	32,04	9,12
		22	0,042	31,55	9,7
	Patient 3	0	21,79	27,66	7,345
		8	negativ	32,275	10,505
		15	0,023	32,1	10,035
	Patient 4	0	22,49	27,3	5,095
		6	negativ	32,715	10,59
		9	negativ	31,27	8,995
		15	negativ	31,255	9,19



Abbildung 3.4.: Verlauf der BCR-ABL/G6PDH-Ratio an den Untersuchungszeitpunkten während des Therapieverlaufs bei Patienten, die adäquat auf die Therapie mit Imatinib reagieren, sowie gemessene CT-Werte zum gleichen Therapiezeitpunkt für das Gen TOP2A. Beim Auftragen des BCR-ABL/G6PDH-Verlaufs (Y₁-Achse) über die Dauer der Therapie mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib (X-Achse) wird für die Patienten, die adäquat auf die Therapie mit Imatinib reagieren, deutlich, dass nach Einleitung der Therapie die BCR-ABL/G6PDH-Ratio als Zeichen der molekularen Remission unter die Nachweisgrenze absinkt. Auch im Therapieverlauf kommt es nicht zum Wiederanstieg, sodass kein molekulares Rezidiv vorliegt. Zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten sind ebenfalls die ermittelten CT-Werte für das Gen TOP2A über den zeitlichen Verlauf der Therapie aufgetragen (siehe Abbildung 3.4).

Vor der Therapie liegt das Niveau der gemessenen CT-Werte zwischen 27,30 und 27,88 (vergleiche auch Tabelle 3.4). Im frühen Verlauf der Therapie während der ersten Monate der Therapie kommt es zum Absinken des Expressionsniveaus des Gens TOP2A, ausgedrückt durch gemessene CT-Werte zwischen 31,27 und 32,72. Das Expressionsniveau während der effektiven Therapie stellt sich konstant dar. Eine Annäherung des Expressionsniveaus an prätherapeutische Messwerte findet nicht statt.

Das signifikante Absinken des Expressionsniveaus für TOP2A während der Therapie mit Imatinib ist in beiden Patientenkollektiven zu beobachten und das Ausmaß der Absenkung unterscheidet sich nicht signifikant voneinander. Damit bleibt festzustellen, dass es unabhängig von der BCR-ABL/G6PDH-Ratio zur Verringerung des Expressionsniveaus des Gens TOP2A während der Therapie mit Imatinib kommt (siehe Kapitel 3.5.).

3.4.1.2. RRM-2

Die Ergebnisse der BCR-ABL/G6PDH-Ratio, CT-Werte sowie ΔCT-Werte für das Gen RRM-2 in beiden Patientengruppen finden sich, so wie alle weiteren relevanten Tabellen mit den Ergebnissen der einzelnen Zielgene, im Anhang dieser Arbeit. Im folgenden Ergebnisteil dieser Arbeit sind nur die aus den Tabellendaten erstellten Diagramme abgebildet, welche die relevanten Zusammenhänge der *real-time* PCR-Untersuchungen visualisieren.



Abbildung 3.5.: Verlauf der BCR-ABL/G6PDH-Ratio an den Untersuchungszeitpunkten während des Therapieverlaufs sowie gemessene CT-Werte zum gleichen Therapiezeitpunkt in der Gruppe der Therapieversager für das Gen RRM-2.

Bei der Auswertung der BCR-ABL/G6PDH-Ratio für die Patienten der Gruppe der Therapieversager für das Gen RRM-2 kommt das vorbeschriebene Ausbleiben des adäquaten Absinkens der BCR-ABL/G6PDH-Ratio während der Therapie mit Imatinib zum Ausdruck (siehe Abbildung 3.5). Bei der Auswertung der Ergebnisse der qRT-PCR-Durchgänge für das Gen RRM-2 ist in der Gruppe der Therapieversager ein signifikanter Abfall der ermittelten CT-Werte von 25,49 bis 27,98 prätherapeutisch auf CT-Werte von 29,55 bis 31,80 während der Imatinib-Therapie zu erkennen. Dieser Zusammenhang war auch bei der Auswertung des Zielgens TOP2A in diesem Ausmaß zu beobachten.

Somit sinkt das Expressionsniveau für das Gen RRM-2 vom Beginn der Imatinibtherapie an ab und erreicht innerhalb der ersten Therapiemonate ein konstantes Niveau. Auch beim Gen RRM-2 stellt sich dieses erreichte Niveau als unabhängig vom Anstieg der BCR-ABL/G6PDH-Ratio im Rezidivfall oder beim primären Versagen der Imatinibtherapie dar.



Abbildung 3.6.: Verlauf der BCR-ABL/G6PDH-Ratio an den Untersuchungszeitpunkten während des Therapieverlaufs bei Patienten, die adäquat auf die Therapie mit Imatinib reagieren, sowie gemessene CT-Werte zum gleichen Therapiezeitpunkt für das Gen RRM-2.

Auch in der Gruppe der Therapieansprecher ist ein Anstieg der CT-Werte und damit ein Abfall des Expressionsniveaus für das Gen RRM-2 nach Einleitung der Therapie mit Imatinib bei zeitgleich suffizienter Therapie mit Imatinib zu verzeichnen, wobei prätherapeutisch die CT-Werte zwischen 26,96 und 27,845 liegen. Während der Therapie erfolgt wahrscheinlich innerhalb der ersten Therapiemonate ein Anstieg der CT-Werte auf ein über die gesamte Therapiedauer konstantes Niveau zwischen 30,45 und 31,695. Ein erneuter signifikanter Anstieg des Expressionsniveaus tritt im Therapieverlauf ebenso nicht auf wie ein weiteres Absinken des Expressionsniveaus, sodass man von einem stabilen Expressionsniveau des Gens RRM-2 im gesamten Therapieverlauf während der Therapie mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib sprechen kann (siehe Abbildung 3.6).

Vergleicht man das Expressionsniveau des Gens RRM-2 während der Therapie mit Imatinib in den beiden Patientengruppen der Therapieversager und der Therapieansprecher, stellt man fest, dass das Expressionsniveau in beiden Gruppen während der Therapie auf ein vergleichbares Niveau absinkt. Dieses Niveau wird unabhängig vom Ansprechen des Patienten auf die Therapie und in beiden Patientenkollektiven unabhängig von externen Faktoren erreicht. Als Ausdruck dieses Zusammenhangs liegen die CT-Werte in der Gruppe des Therapieversager während der Therapie zwischen 29,55 und 31,80, während in der Gruppe der Patienten, die adäquat auf die Therapie mit Imatinib reagieren, vergleichbare CT-Werte zwischen 30,45 und 31,695 erreicht werden.

3.4.1.3. PCNA

Die geplante Genexpressionsanalyse für das Gen PCNA war in der Durchführung nicht möglich, da sich das Expressionsniveau des Gens bei Patienten unter Imatinib-Therapie als bis nahe an die Nachweisgrenze der qRT-PCR erniedrigt darstellte. In der Analyse der Schmelzkurven zeigten sich zwar die erwartete, für das Gen spezifische Schmelzkurve nach Durchführung der PCR, allerdings war der von der LightCycler 3.5 Software (Roche) mit >36,00 angegebene CT-Wert nicht verwertbar. Auf die Analyse der Genexpression vor Einleitung der Therapie mit Imatinib wurde im Anschluss daran verzichtet, da kein aussagekräftiger Wert während der Imatinib-Therapie zum Vergleich zu ermitteln war. Somit reduziert sich die Anzahl den analysierten Gene in der Gruppe der Gene der DNA-Represtur und der DNA-Replikation auf TOP2A und RRM-2.

3.4.2. Zellzyklusrelevante Gene (BIRC5, BTG2, CDC2 und PIM-1)



3.4.2.1. BIRC5

Abbildung 3.7.: Verlauf der BCR-ABL/G6PDH-Ratio an den Untersuchungszeitpunkten während des Therapieverlaufs sowie gemessene CT-Werte zum gleichen Therapiezeitpunkt in der Gruppe der Therapieversager für das Gen BIRC5.

Die CT-Werte der durchgeführten qRT-PCR-Untersuchungen des Gens BIRC5 im Patientenkollektiv der Therapieversager zum Zeitpunkt der Erstdiagnose der CML, vor Beginn der Therapie mit

Imatinib, liegen im Bereich von 24,125 und 26,515. Betrachtet man den Expressionsverlauf unter eingeleiteter Therapie mit Imatinib, stellt man fest, dass das Expressionsniveau des Gens BIRC5 signifikant absinkt. Das Expressionsniveau unter Therapie erreicht ein, von äußeren Einflüssen und dem molekularen Ansprechen auf die Therapie unabhängiges, konstantes Niveau mit CT-Werten zwischen 29,465 und 31,755. Wie auch bei den bereits vorher betrachteten Genen kommt es im Verlauf der Therapie auch im Rezidivfall nicht zum erneuten Ansteigen des Expressionsniveaus.





Das prätherapeutische Expressionsniveau für das Gen BIRC5 liegt in den durchgeführten qRT-PCR-Untersuchungen im Patientenkollektiv der Therapieansprecher bei CT-Werten zwischen 25,68 und 27,33 (siehe Abbildung 3.8).

Bei einem Patienten wurde ein CT-Wert von 29,42 prätherapeutisch gemessen, was einem deutlich verminderten Expressionsniveau im Vergleich zu den anderen Patienten des Kollektivs entspricht, ohne dass eine Ursache dafür zu eruierten ist. Nach der Normierung der CT-Werte durch den Vergleich der gemessenen CT-Werte für das Zielgen mit dem Kontrollgen GAPDH und der in diesem Zusammenhang notwendigen Berechnung des Δ CT-Wertes, lag der ermittelte Δ CT-Wert bei 28,44. Im Vergleich zu den weiteren prätherapeutischen Δ CT-Werten des Patientenkollektivs lag auch dieser Wert oberhalb des durchschnittlichen bestimmten Δ CT-Wertes. Das im Vergleich zu den weiteren Patienten niedrigere prätherapeutische Expressionsniveau für BIRC5 stellte sich auch während der

Imatinibtherapie weiterhin dar, sodass auch hier ein im Vergleich zum restlichen Patientenkollektiv höherer CT-Wert von 33,68 während der Therapie gemessen wurde.

Bei den weiteren Patienten der Gruppe der Therapieansprecher kam es nach Einleitung der Therapie mit Imatinib zum Absinken des Expressionsniveaus des Gens BIRC5, ausgedrückt durch die ermittelten CT-Werte zwischen 29,59 und wie oben angesprochen 33,68. Auch in der Gruppe der Therapieansprecher ändert sich das Expressionsniveau unter fortgesetzter Imatinibtherapie nicht signifikant, sodass auch hier von einem, wie bereits mehrfach vorbeschriebenen, konstanten Expressionsniveau des Gens ausgegangen werden kann. Somit liegt auch das Expressionsniveau des Gens BIRC5 unter Imatinib-Therapie niedriger als vor Einleitung der Therapie zum Zeitpunkt der Erstdiagnose.



3.4.2.2. BTG2

Abbildung 3.9.: Verlauf der BCR-ABL/G6PDH-Ratio an den Untersuchungszeitpunkten während des Therapieverlaufs sowie gemessene CT-Werte zum gleichen Therapiezeitpunkt in der Gruppe der Therapieversager für das Gen BTG2.

Die prätherapeutisch in den qRT-PCR-Untersuchungen gemessenen CT-Werte des Gens BTG2 lagen zwischen 26,44 und 29,59 (siehe Abbildung 3.9); einem niedrigeren Expressionsniveau des Gens im Vergleich zu den bisher analysierten Genen entsprechend. Nach Einleitung der Therapie mit Imatinib kommt es, im Vergleich zu den bislang analysierten Genen, zu einer verstärkten Expression des Gens BTG2 im Patientenkollektiv der Therapieversager. Dieses ist durch sinkende CT-Werte auf ein Niveau von 24,245 bis 26,625 erkennbar. Dabei ist zu beachten, dass beim gemessenen maximalen CT-Wert von 26,625 die Expression des Kontrollgens GAPDH im Vergleich zu den anderen Messwerten des Kollektivs leicht erniedrigt erscheint. Somit liegt der ermittelte ΔCT-Wert wieder innerhalb der Varianz der weiteren Messwerte dieses Patientenkollektivs.

Auch hier liegt der Anstieg des Expressionsniveaus bereits vor dem Zeitpunkt der ersten Kontrolluntersuchung, die im Rahmen des Therapiemonitorings der Patienten durchgeführt wurde. Das Expressionsniveau stellt sich als unabhängig vom molekularen Ansprechen der Patienten und dem eventuellen Rezidivfall dar und liegt bei jeder Messung während der Therapie konstant über dem prätherapeutischen Expressionsniveau des Gens beim jeweiligen Patienten.



Abbildung 3.10.: Verlauf der BCR-ABL/G6PDH-Ratio an den Untersuchungszeitpunkten während des Therapieverlaufs bei Patienten, die adäquat auf die Therapie mit Imatinib reagieren, sowie gemessene CT-Werte zum gleichen Therapiezeitpunkt für das Gen BTG2.

Im Patientenkollektiv der Patienten, die adäquat auf die Therapie mit Imatinib reagieren, liegen die vor Beginn der Imatinibtherapie gemessenen CT-Werte zwischen 26,285 und 27,810. Somit befindet sich das prätherapeutische Expressionsniveau des Gens in einem ähnlichen Bereich wie im Patientenkollektiv der Therapieversager und deutlich unter dem ermittelten prätherapeutischen Expressionsniveau der bisher betrachteten Gene. Während der suffizienten Therapie mit Imatinib kommt es zur Steigerung der Expression des Gens BTG2, was durch fallende CT-Werte, die konstant im Bereich von 24,55 bis 25,59 liegen, ausgedrückt wird. Auch in dieser Patientengruppe bleibt die Änderung des Expressionsniveaus im Therapieverlauf auf Grund von externen Faktoren aus, sodass

auch hier während der fortgesetzten Imatinib-Therapie ein *steady-state*-Niveau der Genexpression erreicht wird (siehe Abbildung 3.10).



3.4.2.3. CDC2

Abbildung 3.11.: Verlauf der BCR-ABL/G6PDH-Ratio an den Untersuchungszeitpunkten während des Therapieverlaufs sowie gemessene CT-Werte zum gleichen Therapiezeitpunkt in der Gruppe der Therapieversager für das Gen CDC2.

Auch bei der Betrachtung der Genexpressionsdaten für das Gen CDC2 ist im Patientenkollektiv der Therapieversager nach der Einleitung der Therapie mit Imatinib ein Abfall der CDC2-Genexpression zu beobachten. Vergleichbar zu den bisher analysierten Genen kommt es im frühen Therapieverlauf zum Absinken des Expressionsniveaus auf ein im weiteren Therapieverlauf konstantes Expressionsniveau. Dieser Zusammenhang wird durch prätherapeutische CT-Werte zwischen 25,135 und 28,745 sowie den Anstieg der CT-Werte nach eingeleiteter Imatinibtherapie auf CT-Werte zwischen 30,26 und 33,16 ausgedrückt. Der Abfall des Expressionsniveaus ist auch für das Gen CDC2 signifikant. Das konstante Expressionsniveau während der Imatinibtherapie ist, für alle bisher betrachteten Gene vergleichbar, durch eine Ausgleichsgrade der CT-Werte in Abbildung 3.11. verdeutlicht.



Abbildung 3.12.: Verlauf der BCR-ABL/G6PDH-Ratio an den Untersuchungszeitpunkten während des Therapieverlaufs bei Patienten, die adäquat auf die Therapie mit Imatinib reagieren, sowie gemessene CT-Werte zum gleichen Therapiezeitpunkt für das Gen CDC2.

Im Patientenkollektiv der Therapieansprecher tritt eine, im Ausmaß mit dem Kollektiv der Therapieversager vergleichbare, signifikante Änderung des Expressionsniveaus des Gens CDC2 auf. Nachdem die gemessenen CT-Werte prätherapeutisch zwischen 26,805 und 29,155 schwankten, stiegen die ermittelten CT-Werte nach Einleitung der Imatinibtherapie auf ein Niveau von 31,20 bis 33,45. Für die Genexpressionsanalyse bedeutet dies einen signifikanten Abfall der Genexpression des Gens CDC2 während der Therapie mit Imatinib verglichen zum prätherapeutischen Niveau. Allerdings ist, wie in Abbildung 3.12. dargestellt, auch hier ein konstantes Genexpressionsniveau während der Therapie mit Imatinib erkennbar, welches sich als unabhängig von äußeren Faktoren darstellt.

Vergleicht man auch hier beide Patientenkollektive miteinander, stellt man fest, dass es in beiden Gruppen zu einem, in ähnlichen Maßen, signifikanten Abfall der Genexpression des Gens CDC2 nach Einleitung der Therapie mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib kommt.



Abbildung 3.13.: Verlauf der BCR-ABL/G6PDH-Ratio an den Untersuchungszeitpunkten während des Therapieverlaufs sowie gemessene CT-Werte zum gleichen Therapiezeitpunkt in der Gruppe der Therapieversager für das Gen PIM-1.

Bei der Analyse der Genexpression des Zielgens PIM-1 liegen die prätherapeutisch ermittelten CT-Werte in der qRT-PCR zwischen 27,09 und 28,36. Bereits kurz nach Beginn der Therapie mit Imatinib innerhalb der ersten Therapiemonate kommt es zu einer gemessenen, signifikanten Steigerung der Genexpression des Gens PIM-1. Die dabei ermittelten CT-Werte während der Therapie befinden sich im Bereich von 23,61 bis 25,96. Der Anstieg der Genexpression ist bei allen Patienten des Kollektivs gleichermaßen zu beobachten und im Ausmaß als signifikant anzusehen. Während der fortgesetzten Imatinib-Therapie kommt es im weiteren Therapieverlauf auch für die Genexpression des Gens PIM-1 zu keiner erneuten Änderung der Genexpression, sodass auch bei diesem Zielgen ein *steady-state* des Expressionsniveaus erreicht wird (siehe Abbildung 3.13).



Abbildung 3.14.: Verlauf der BCR-ABL/G6PDH-Ratio an den Untersuchungszeitpunkten während des Therapieverlaufs bei Patienten, die adäquat auf die Therapie mit Imatinib reagieren, sowie gemessene CT-Werte zum gleichen Therapiezeitpunkt für das Gen PIM-1.

Auch im Patientenkollektiv der Therapieansprecher kommt es nach Einleitung der Imatinibtherapie zu einer signifikant gesteigerten Genexpression des Zielgens PIM-1 im Vergleich zum prätherapeutischen Niveau. Während vor Einleitung der Therapie die CT-Werte zwischen 27,82 und 29,27 liegen, kommt es unter suffizienter Therapie zu einem Abfall der CT-Werte auf ein konstantes, von äußeren Faktoren unabhängiges, Niveau von CT-Werten zwischen 24,86 und 26,79 (siehe Abbildung 3.14). Auch im Patientenkollektiv der *responder* ist der signifikante Anstieg der Genexpression bei allen Patienten des Kollektivs zu beobachten und im Betrag der Änderungen vergleichbar.

3.4.3. Gene der Zelladhäsion und Migration(IL-18, SELL und RHAMM)



3.4.3.1. IL-18

Abbildung 3.15.: Verlauf der BCR-ABL/G6PDH-Ratio an den Untersuchungszeitpunkten während des Therapieverlaufs sowie gemessene CT-Werte zum gleichen Therapiezeitpunkt in der Gruppe der Therapieversager für das Gen IL-18.

Bei der Auswertung der Ergebnisse der qRT-PCR-Durchgänge für das Zielgen IL-18 ist in der Gruppe der Therapieversager wiederholt ein signifikanter Abfall der ermittelten CT-Werte vom prätherapeutischen Niveau zwischen 26,60 und 27,76 auf CT-Werte nach Einleitung der Therapie von 29,44 bis 30,79 zu erkennen (siehe Abbildung 3.15). Gleichbedeutend sinkt das Expressionsniveau für das Gen IL-18 vom Beginn der Imatinibtherapie an ab und erreicht innerhalb der ersten Therapiemonate ein konstantes Niveau. Auch beim Gen IL-18 stellt sich dieses erreichte Niveau als unabhängig vom Anstieg der BCR-ABL/G6PDH-Ratio im Rezidivfall dar und ist bei allen Patienten des Kollektivs gleichermaßen nachweisbar.



Abbildung 3.16.: Verlauf der BCR-ABL/G6PDH-Ratio an den Untersuchungszeitpunkten während des Therapieverlaufs bei Patienten, die adäquat auf die Therapie mit Imatinib reagieren, sowie gemessene CT-Werte zum gleichen Therapiezeitpunkt für das Gen IL-18.

Auch in der Gruppe der Therapieansprecher ist ein Anstieg der CT-Werte und damit ein Abfall des Expressionsniveaus für das Gen II-18 nach Einleitung der hier suffizienten Therapie mit Imatinib zu verzeichnen, wobei prätherapeutisch die CT-Werte zwischen 27,28 und 28,63 liegen. Während der Therapie erfolgt, wie bereits bei den vorher analysierten Zielgenen beschrieben, innerhalb der ersten Therapiemonate ein Anstieg der CT-Werte auf ein über die gesamte Therapiedauer konstantes Niveau von CT-Werten zwischen 30,49 und 31,13 (siehe Abbildung 3.16). Ein erneuter signifikanter Anstieg des Expressionsniveaus tritt im Therapieverlauf ebenso nicht auf wie ein weiteres Absinken des Expressionsniveaus. Damit kann man auch hier von einem stabilen Expressionsniveau des Zielgens im gesamten Therapieverlauf während der Therapie mit Imatinib sprechen.

3.4.3.2. SELL

Bei der Analyse des Genexpressionsverhaltens für L-Selektin (SELL) kommen bereits prätherapeutisch auffällig große interindividuelle Unterschiede sowohl im Vergleich der CT-Werte der prätherapeutischen Messwerte untereinander als auch im Vergleich CT-Werte mit dem Referenzgen GAPDH zum Ausdruck.

Bei der Auswertung der Ergebnisse der qRT-PCR für das Patientenkollektiv der Therapieversager liegen die CT-Werte für SELL in der qRT-PCR vor Beginn der Therapie zwischen 22,57 und 27,165.

Auch nach Vergleich mit dem Referenzgen GAPDH durch Bildung des ΔCT-Wertes jedes Messpunktes kommt dieses variable Verteilungsbild zum Ausdruck.

Bedingt durch die große interindividuelle Verteilungsbreite ist es für das Gen SELL scheinbar nicht möglich, die Genexpression für das gesamte Patientenkollektiv gemeinsam auszudrücken, sondern ein individueller Vergleich des Expressionsniveaus jedes Patienten ist notwendig. Aus diesem Grund wird auch auf die Darstellung des Genexpressionsverlaufs in einem Diagramm wie bei den vorherig analysierten Genen verzichtet.

Nach Einleitung der Therapie mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib kommt es bei individueller Betrachtung des Genexpressionsprofils bei 5 von 7 Patienten des Patientenkollektivs zu einem moderaten Anstieg der Genexpression des Gens SELL, der allerdings nicht als signifikant betrachtet werden kann. Der Anstieg des Genexpressionsniveaus wird auch durch sinkende Δ CT-Werte nach Einleitung der Therapie bei den betroffenen Patienten ausgedrückt. Bei den restlichen zwei Patienten des Kollektivs der Therapieversager bleibt eine Änderung des Genexpressionsverhaltens nach Beginn der Therapie mit Imatinib aus und die gemessenen Δ CT-Werte pendeln um das individuelle prätherapeutische Niveau herum.

Im Patientenkollektiv der Patienten, die adäquat auf die Therapie mit Imatinib reagieren, findet sich eine ähnlich große interindividuelle Verteilungsbreite der CT-Werte in der qRT-PCR. Der Schwankungsbereich der CT-Werte lag prätherapeutisch zwischen 23,07 und 26,285. Auch hier wurde zur weiteren Auswertung der Ergebnisse die Berechnungen des Δ CT-Wertes durchgeführt, die den Trend dieser Ergebnisse bestätigte.

Nach der Einleitung der Therapie mit Imatinib ergibt sich ebenfalls dieses interindividuell-variable Ergebnisprofil. Die ermittelten CT-Werte schwanken zwischen 22,56 und 26,395. Betrachtet man das Genexpressionsverhalten der Patienten individuell, kommt es auch bei allen Patienten dieser Gruppe zu einem moderaten Anstieg des Expressionsniveaus für SELL, allerdings ohne dass eine signifikante Änderung erreicht wird (siehe Kapitel 3.5.).

Auffällig bei der Auswertung des Genexpressionsverhaltens für L-Selektin ist das Fehlen einer vorher bei den anderen Genen beobachteten, signifikanten Änderung des Genexpressionsniveaus nach Einleitung der Therapie mit Imatinib in beiden Patientenkollektiven sowie die große interindividuelle Schwankungsbreite der Genexpression. Allerdings setzt sich auch bei der Analyse der Genexpressionsdaten für L-Selektin fort, dass zwischen den Patientenkollektiven keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Genexpressionsänderung nach Einleitung der Therapie mit Imatinib des gewählten Gens bestehen.

3.4.3.3. RHAMM



Abbildung 3.17.: Verlauf der BCR-ABL/G6PDH-Ratio an den Untersuchungszeitpunkten während des Therapieverlaufs sowie gemessene CT-Werte zum gleichen Therapiezeitpunkt in der Gruppe der Therapieversager für das Gen RHAMM.

Bereits bei der Auswertung der prätherapeutischen Ergebnisse der qRT-PCR für das Gen RHAMM in der Gruppe der Therapieversager kommt eine mäßige Verteilungsbreite der gemessenen CT-Werte, die zwischen 26,235 und 28,385 liegen, zum Ausdruck. Nach Beginn der Therapie mit Imatinib ändert sich das gemessene Niveau der CT-Werte, welche nun zwischen 30,815 und 33,005 liegen, sodass nach Beginn der Imatinibtherapie von einer verminderten Genexpression für das Gen RHAMM ausgegangen werden muss (siehe Abbildung 3.17). Der Rückgang des Genexpressionsniveaus erreicht in den ersten Monaten der Therapien ein konstantes Niveau. Dieses Niveau stellt sich auch bei RHAMM als unabhängig von äußeren molekularbiologischen Faktoren, wie z.B. einem molekularbiologischen Rezidiv, dar.



Abbildung 3.18.: Verlauf der BCR-ABL/G6PDH-Ratio an den Untersuchungszeitpunkten während des Therapieverlaufs bei Patienten, die adäquat auf die Therapie mit Imatinib reagieren, sowie gemessene CT-Werte zum gleichen Therapiezeitpunkt für das Gen RHAMM.

Im Patientenkollektiv der Therapieresponder liegen die prätherapeutischen CT-Werte zwischen 27,935 und 29,52 und sind somit nicht signifikant unterschiedlich im Vergleich zu den Ergebnissen des Patientenkollektivs der Therapieversager für dieses Zielgen. Nach Einleitung der Therapie mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib kommt es zum Anstieg der CT-Werte auf ein Niveau zwischen 31,57 und 33,125, sodass auch hier von einer signifikant verminderten Genexpression des Gens RHAMM unter suffizienter Imatinibtherapie auszugehen ist (siehe Abbildung 3.18). Eine erneute Änderung des Genexpressionsprofils während der Therapie ist nicht zu beobachten, sodass auch hier ein konstantes Genexpressionsniveau während der Therapie mit Imatinib anzunehmen ist.

3.5. Zusammenfassung der Ergebnisse zum Vergleich der Genexpression

Es wurden für alle Therapiezeitpunkte die $\Delta\Delta$ CT-Werte der Zielgene ermittelt und nach Patientenkollektiv getrennt für jedes Zielgen zusammengefasst in Abbildung 3.19 bzw. Abbildung 3.20 dargestellt. Dabei wurde angenommen, dass das Genexpressionsverhalten aller Zielgene während der Therapie mit Imatinib einem konstanten Niveau entspricht. Der $\Delta\Delta$ CT-Wert gibt die Differenz zwischen dem Δ CT-Wert während der Therapie und dem prätherapeutischem Δ CT-Wert wieder (Definition siehe Kapitel 2.2.6.).



Abbildung 3.19.: Darstellung der errechneten ΔΔCT-Werte für alle Zielgene im Patientenkollektiv der Therapieversager.



Abbildung 3.20.: Darstellung der errechneten ΔΔCT-Werte für alle Zielgene im Patientenkollektiv der Patienten, die adäquat auf eine Therapie mit Imatinib ansprechen.

Als Endergebnis der Berechnung der Expressionsänderung kann das Genexpressionsniveau während der Therapie im Vergleich zu prätherapeutischen Niveau für jedes Zielgen auch als *fold change* angegeben werden, um das Ausmaß der Veränderung deutlich zu machen. Dabei ist ein *fold change* <1 Ausdruck einer unter Therapie verminderten Genexpression, während ein *fold change* >1 einer unter Therapie verstärkten Genexpression des jeweiligen Zielgens entspricht (vgl. Tabelle 3.5.).

Tabelle 3.5.: durchschnittlicher *fold change* als Endergebnis der Berechnung der Expressionsänderung der beiden Patientenkollektive im Vergleich

untersuchtes	durchschnittlicher <i>fold change</i>					
Zielgen	$(=2^{\Delta\Delta CT-Wert}=2^{\Delta CT \text{ unter Therapie - }\Delta CT \text{ vor Therapie}})$					
	Therapieversager	Therapieansprecher				
TOP2A	0,151789719	0,147910794				
RRM-2	0,140941003	0,178028602				
RHAMM	0,145895526	0,196646689				
SELL	2,374592888	2,883051038				
IL-18	0,203324464	0,271194781				
BIRC5	0,131455366	0,141055188				
BTG2	12,20561898	8,954309775				
CDC2	0,096856175	0,119559671				
PIM-1	11,31041651 18,02524888					

Auch beim Ausdruck der Genexpression durch Berechnung des *fold changes* kommt die, mit Ausnahme von L-Selektin, signifikant verminderte Genexpression der untersuchten Zielgene TOP2A, RRM-2, RHAMM, IL-18, BIRC5 und CDC2 bei gleichzeitig signifikant gesteigerter Genexpression der Gene BTG2 und PIM-1 nach Beginn der Therapie mit Imatinib zum Ausdruck.

3.6. Ergebnisse der Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der Größe der durch die Durchführung der qRT-PCR erhaltenen PCR-Produkte wurde eine Gelelektrophorese unter Mitführung eines 1kb-Längenstandards, entsprechend 1000 Basenpaaren (bp), für alle in den Genexpressionsversuchen verwendeten Gene durchgeführt. Die zu erwartende, genspezifische Größe der PCR-Produkte lässt sich durch Addition der Nukleotide der Primer sowie der Nukleotide, die sich zwischen den Primern in der *coding sequence* der jeweiligen Gene befinden, ermitteln.

Exemplarisch für alle Gene sind in Abbildung 3.21. die Ergebnisse der Gelelektrophorese für die Gene BTG2, CDC2 sowie RHAMM dargestellt. Außerdem sind in Abbildung 3.22. die Größen der PCR-Produkte der möglichen Referenzgene GAPDH und ABL abzulesen, für die diese Untersuchungen ebenfalls vor Beginn der Genexpressionsversuche durchgeführt wurden.

Die zu erwartende errechnete Fragmentgröße beträgt für BTG2 177 bp, für CDC2 182 bp sowie für RHAMM 129 bp. Somit liegen die in der Gelelektrophorese dargestellten qRT-PCR-Fragmente erwartungsgemäß für BTG2 und CDC2 leicht unterhalb der 200bp-Markierung des Längenstandards. und die Fragmentgrößen für RHAMM annähernd an der 100bp-Markierung des Längenstandards.



Abbildung 3.21.: Ergebnisse der Gelelektrophorese der Zielgene BTG2, CDC2 und RHAMM sowie Vergleich mit dem mitgeführten Längenstandard.



GAPDH

ABL

Abbildung 3.22.: Ergebnisse der Gelelektrophorese für die möglichen Referenzgene GAPDH und ABL sowie Vergleich mit dem mitgeführten Längenstandard.

Beim Vergleich der zu erwartenden Fragmentgröße mit dem mitgeführten Längenstandard kommt zum Ausdruck, dass die nach der Gelelektrophorese abgelesene Größe der PCR-Fragmente für die hier exemplarisch ausgewählten Gene mit der zuvor ermittelten rechnerisch theoretischen Größe der PCR-Fragmente übereinstimmt. Somit ist die Gewissheit gegeben, dass während der Durchführung der PCR für das jeweilige Gen spezifische, gewünschte Fragmente entstanden sind.

4. Diskussion

4.1. Repräsentative Genauswahl

Bereits in der von Brünnert *et al.* publizierten Arbeit konnten unterschiedlichste Gene identifiziert werden, die nach Einleitung einer *firstline* Therapie mit Imatinib eine signifikante Änderung der Genexpression aufwiesen. Die Vielzahl dieser Gene kann funktionellen Gruppen zugeordnet werden. Wir wählten unserer Meinung nach relevante Zielgruppen aus und konzentrierten uns auf den Zellzyklus, die DNA-Replikation und Reparatur sowie Adhäsionsprozesse. Wir wählten in diesen Gruppen die Zielgene aus, die ein signifikant verändertes Genexpressionsprofil in den Untersuchungen von Brünnert *et al.* aufwiesen. Diese Gene untersuchten wir durch Literaturrecherche zusätzlich hinsichtlich einer möglichen relevanten Position im Ablauf von intrazellulären Prozessen und Signalwegen. Beispielsweise konzentrierten wir uns auf Zielgene, die den Übergang in die folgende Zellzyklusphase initiieren und wählten diese aus. Zusätzlich wurden einige der untersuchten Gene bereits in der Literatur als differentiell exprimiert im Rahmen der CML beschrieben und aus diesem Grund ausgewählt.

4.2. Einfluss der Imatinibtherapie auf den Zellzyklus

Um den Einfluss der Imatinibtherapie auf den Zellzyklus beurteilen zu können, sind repräsentative Gene für verschiedene Zellzyklusphasen ausgewählt worden. Dann ist es möglich den Ablauf des Zellzyklus nach Einleitung der Imatinibtherapie zu untersuchen. Unterschiede in der Genexpression von hier ausgewählten Schlüsselgenen für den Übertritt in die nächste Zellzyklusphase sind dabei in der Vergangenheit untersucht worden. Das repräsentativ ausgewählte Zielgen CDC2 codiert ein essentielles Protein für den Übergang von der G₂- in die S-Phase des Zellzyklus (109) (Norbury *et* Nurse, 1992). Eine Überexpression von CDC2 führt zur Überwindung eines chemotherapie-induzierten G₂-Phasen-Arrests des Zellzyklus bei Leukämiezellen. Als Folge dessen kommt es zu einer Chemotherapieresistenz der untersuchten Zellen, da die gewünschte chemotherapie-induzierte Wirkung, G₂-Zyklusarrest und folgende Apoptose der Zelle, überwunden wird (110) (Valdez *et al.*, 2008). Auch Diaz-Blanco *et al.* konnten eine signifikant höhere Expression von *cell division cycle genes* im Rahmen der unbehandelten CML-Erkrankung verglichen mit Proben gesunder Patienten in ihrer Arbeit feststellen (98) (Diaz-Blanco *et al.*, 2007).

Im Rahmen der Untersuchung der frühen Einflüsse einer Imatinibtherapie auf das Genexpressionsprofil eines an CML erkrankten Patienten beschreiben Brünnert *et al.* in ihrer Arbeit eine signifikante Senkung der CDC2-Expression im Rahmen der frühen Tyrosinkinaseinhibitortherapie

(74) (Brünnert *et al.*, 2009). Dieser Zusammenhang lässt sich auch im Rahmen dieser Arbeit nachweisen. Der maximale Betrag der Genexpressionsänderung während der Therapie wird bereits in der sehr frühen Phase der Therapie erreicht. Während der fortgesetzten Therapie verbleibt die Genexpression auf einem konstanten Niveau. Die festgestellte signifikante Abnahme der CDC2-Genexpresion drückt eine Verlangsamung des Zellzyklus nach Beginn der Therapie mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib aus. Der Übergang zwischen den einzelnen Phasen des Zellzyklus wird durch eine Verminderung der stimulativen Faktoren für einen voranschreiten in die nächste Zyklusphase erschwert. Stellvertretend für diese Schlussfolgerung kommt es durch die signifikanten Abschwächung der Genexpression des Zielgens CDC2 nach Beginn der Imatinibtherapie intrazellulär zu einem verzögerten Übergang von der S-Phase in die G₂-Phase des Zellzyklus (75) (Doree et Gallas, 1994) (74) (Brünnert et al., 2009).

Das Zielgen BTG2, als Mitglied der antiproliferativen BTG-Genfamilie, weist bei einer Expression vor allem antiproliferative Eigenschaften auf. Es sorgt bei gesteigerter Expression für eine Verlangsamung des Zellzyklus und zwar vor allem in der G₁-Phase (77) (Duriez *et al.*, 2004). Die im Rahmen dieser Arbeit gemessene BTG2-Expression steigt nach Beginn der Imatinibtherapie signifikant an, sodass durch die Therapie mit Imatinib eine Verlangsamung des Zellzyklus erreicht wird.

Als Schlüsselfaktor in der Pathogenese der Leukämie gilt, dass im Rahmen der Leukämieentstehung ein Mangel an antiproliferativen Faktoren ätiologisch wegweisend ist (76) (Cho *et al.*, 2008). Es ist davon auszugehen, dass im Rahmen der Therapie dieser Mangel abgebaut und die Expression antiproliferativer Faktoren gesteigert wird. Dieser Zusammenhang wird durch die signifikant gesteigerte Expression des antiproliferativen Zielgens BTG2 nach Beginn der Imatinibtherapie untermauert.

Des Weiteren besteht eine Verbindung zwischen den Zielgenen BTG2 und CDC2.Die intrazelluläre, antiproliferative Wirkung einer erhöhten BTG2-Expression wird durch eine Aktivitätsminderung der cyklin-abhängigen Kinasen ausgedrückt. Somit kommt es auch zu einer indirekte Wirkung auf die CDC2-Expression. Dieser Zusammenhang deckt sich gut mit den gefundenen Ergebnissen der signifikant verringerten CDC2-Expression im Therapieverlauf der Imatinibtherapie (111) (Ryu *et al.*, 2004).

Das anti-apoptotisch wirkende Protein Survivin, codiert durch das untersuchte Zielgen BIRC5, wird intrazellulär vor allem zur Überwindung des Übergangspunktes von der G_2 -Phase in die M-Phase des Zellzyklus benötigt. Die apoptosehemmende Funktion des Proteins wird dabei intrazellulär durch Interaktion mit dem Spindelapparat vermittelt (112) (Li *et al.*, 1998). Eine Überexpression des

68

Proteins Survivin wurde als schlechter Prognosefaktor, der mit einem signifikant kürzeren Überleben der Patienten assoziiert ist, in der Pathogenese verschiedener hämatologischer Malignome identifiziert und beschrieben (113) (Adida *et al.*, 2000) (114) (Kamihira *et al.*, 2001).

Auch im Rahmen der CML-Erkrankung wurde eine signifikant erhöhte Survivinexpression im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe bereits beschrieben. Außerdem ist eine nochmals signifikante Steigerung der Proteinexpression zu beobachten, wenn die CML-Erkrankung des Patienten von der chronischen Phase in die Phase der Blastenkrise fortschreitet (115) (Hernandez-Boluda *et al.*, 2005). Der Survivin-Überexpression wird somit eine pathogenetische Rolle in der Progression der CML-Erkrankung zugeschrieben.

Vor dem Hintergrund der beschriebenen Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen und im Vergleich zu den anderen untersuchten Zielgenen kann von einer erhöhten Expression des Zielgens BIRC5 zum Zeitpunkt der Erstdiagnose der CML ausgegangen werden. Bei allen im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Patienten kommt es nach Einleitung der Imatinibtherapie zu einer signifikanten Abnahme der Expression des Gens BIRC-5. Die prätherapeutische anti-apoptotische Wirkung wird durch die Einleitung der Therapie verringert. Eine zellulär induzierte Apoptose wird wieder besser möglich. Während der Tyrosinkinaseinhibitortherapie bleibt das Niveau des BIRC5- konstant niedrig. Eine erneut erhöhte BIRC5-Expression, die möglicherweise ein Fortschreiten der CML-Erkrankung zum Stadium der Blastenkrise ausdrücken würde, ist bei allen Patienten nicht zu detektieren. Dieses Ergebnis findet sich bei allen Patienten unabhängig von ihrer BCR-ABL-Ratio. Es finden sich keine Hinweise für die naheliegende Vermutung, dass, im Falle eines molekularen Rezidives, die BIRC5-Expression bei den betroffenen Patienten wieder ansteigt.

Es bleibt eine konstante Expression bei allen untersuchten Genen, die den Zellzyklus und Apoptose betreffen während der Therapie mit Imatinib erhalten. Es finden sich keine Anhaltspunkte für einen kompletten Stopp des Zellzyklus. Man kann aber von einer Verlangsamung des Zellzyklus ausgehen, was auch durch die Ergebnisse der Arbeit von Brünnert *et al.* so dargestellt wird (74) (Brünnert *et al.*, 2009).

4.3. Einfluss der Imatinibtherapie auf die DNA-Replikation und DNA Reparatur

Das untersuchte Zielgen TOP2A kodiert das Enzym DNA-Topoisomerase 2 α . Es trägt bei der DNA-Transkription zur Verminderung des Scherstresses und zur Öffnung des DNA-Doppelstrangs bei und ist so von eminenter Bedeutung für den Ablauf der DNA-Replikation (85) (Watt *et al.,* 1994). Als Bausteine der neu entstehenden DNA-Stränge dienen Desoxyribonukleotide. Sie werden unter anderem durch die Ribonukleotid-Reduktase-Untereinheit M2 aus in der Zelle vorhandenen Ribonukleotiden durch Reduktion hergestellt (88) (Pavloff *et al.,* 1992). Die Ribonukleotid-Reduktase-Untereinheit M2 wird bekanntermaßen durch das Zielgen RRM-2 kodiert.

Bei hohem Zellumsatz und erhöhtem intrazellulären Enzymbedarf im Falle eines Malignoms erhöht sich der Bedarf an Desoxyribonukleotiden durch die erhöhte DNA-Replikation. Somit müssen sowohl die Ribonukleotid-Reduktase-Untereinheit M2 als auch das Enzym Topoisomerase 2 α stärker exprimiert vorliegen.

Um den erhöhten Anforderungen der Malignomzellen folgen zu können, muss die gesamte intrazelluläre Maschinerie der DNA-Replikation und auch der Zellteilung hoch exprimiert und jederzeit bereit zur Arbeit zur Verfügung stehen (116) (Bhatia *et al.*, 2000). Passenderweise findet im Fall der CML-Erkrankung eine Hochregulation der Expression unter anderem der Gene RRM-2 und TOP2A statt (117) (Affer *et al.*, 2011).

Die Experimente dieser Arbeit zeigen, dass es nach Einleitung der Imatinibtherapie eines an CML erkrankten Patienten zu einem signifikanter Rückgang der Genexpression der Zielgene TOP2A und RRM-2 kommt. Vorausgesetzt es liegt ein pathologisch erhöhtes Expressionsniveau zum Zeitpunkt der Erstdiagnose der CML-Erkrankung bei allen Patienten vor, passt sich das Expressionsniveau nach Einleitung der Therapie dem verlangsamten Zellzyklus an.

Das Verharren der Genexpression der Zielgene TOP2A und RRM-2 auf einem konstanten Niveau während der Imatinibtherapie deutet an, dass der Zellumsatz und die DNA-Replikation dauerhaft verlangsamt sind und Bedarf an Desoxyribonukleotiden in der Zelle gleichfalls geringer ist.

Bemerkenswert bleibt die Tatsache, dass sowohl im Patientenkollektiv der auf die Therapie ansprechenden Patienten als auch bei den Therapieversagern dieses konstant signifikant geringere Expressionsniveaus auftritt. Ein Rückschluss auf das Ansprechen auf die Therapie allein durch die Untersuchung des Expressionsverhaltens dieser replikationsrelevanten Zielgene ist nicht möglich.

Auch im Fall des nachgewiesenen molekularen Rezidives der Erkrankung bleibt das Expressionsniveau der Zielgenen TOP2A und RRM-2 im Patientenkollektiv der Therapieversager konstant. Möglicherweise führen andere bislang unbekannte Mechanismen im Rezidivfall zu pathologischen intrazellulären Veränderungen im Zusammenhang mit der Bereitstellung von Desoxyribonukleotiden und der Verminderung des Scherstresses bei der DNA-Replikation.

70

4.4. Einfluss der Imatinibtherapie auf Zellmigration und Zelladhäsion

Das durch das Gen IL-18 kodierte Protein ist in erster Linie ein proinflammatorisches Zytokin. Zudem wird IL-18 eine modulierende Rolle bei der Zellmigration und –adhäsion zugesprochen, da es die Expression von Adhäsionsmolekülen induziert, wenn es selbst exprimiert wird (95) (Morel *et al.*, 2001).

In der Lymphom- und Leukämie-Forschung korreliert ein erhöhter IL-18-Serumspiegel mit einer schlechteren Prognose für den Patienten bezogen auf das generelle Überleben und das progressionsfreie Überleben (118) (Goto *et al.*, 2011) (119) (Zhang *et al.*, 2002).

Auch eine Beteiligung von IL-18 an pathologischen Prozessen im Rahmen der CML-Erkrankung wurde in der Vergangenheit identifiziert. Arbeiten verschiedener Arbeitsgruppen stellten erhöhte IL-18-Spiegel sowohl bei Patienten mit unbehandelter CML (120) (Taniguchi *et al.*, 1997) als auch bei Versuchen mit der CML-Zelllinie K562 fest (121) (Zhang *et al.* 2003). Als identifizierter zusätzlicher Einflussfaktor auf den IL-18-Spiegel gilt auch eine Apo-Transferrin-Therapie im Rahmen der supportiven CML-Therapie. Eine vorherige Apo-Transferrin-Therapie führt zu einer gesteigerten IL-18-Sekretion. Diese Untersuchungen wurde bislang allerdings nur mit Zellen der K562-Zellinie durchgeführt (122) (Park *et al.*, 2009).

In den letzten Monaten werden von verschiedenen Arbeitsgruppen vor allem externe Beeinflussungsfaktoren der IL-18 Expression, die nicht CML-assoziiert sind, diskutiert. Im Rahmen des metabolischen Syndroms ist ein erhöhter Serumspiegel der zirkulierenden IL-18 assoziiert mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko (123) (Jefferis *et al.*, 2011).

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Patientenproben weisen vor allem bei IL-18 verglichen mit den weiteren untersuchten Zielgenen prätherapeutisch ein höheres Expressionsniveau auf. Eine Beeinflussung des Expressionsniveaus durch die erstdiagnostizierte CML-Erkrankung scheint durchaus plausibel. Es ist nicht zu eruieren, welcher Einflussfaktor maßgeblich dazu geführt hat, das Expressionsniveau auf ein pathologisch höheres Level zu verschieben. Da allerdings prätherapeutisch keine großen interindividuellen Unterschiede bezüglich der IL-18-Genexpression zwischen den untersuchten Patientenproben bestehen, erscheint unwahrscheinlich, dass einige Proben in größerem Ausmaß durch äußere Einflüsse verändert wurden als andere untersuchte Proben.

Bei den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Patientenproben sinkt die gemessene IL-18-Expression bei beiden Patientenkollektiven nach Einleitung der Therapie mit Imatinib signifikant ab. Ein eventuell erhöhtes prätherapeutisches Expressionsniveau wird durch den Beginn der Tyrosinkinaseinhibitor-Therapie gesenkt und die IL-18 Expression durch die Therapie dauerhaft

71
vermindert. Die gefundenen Ergebnisse stehen dabei im Widerspruch zu den von Brünnert *et al.* beschriebenen Veränderungen nach Einleitung der Imatinibtherapie (74) (Brünnert *et al.*, 2009). Die ursächlichen Faktoren für diesen Zusammenhang bleiben leider unidentifiziert. Es ist möglich zu spekulieren, dass weitere, bislang nicht beschriebene Einflussfaktoren die unterschiedlichen Ergebnisse bedingen. Möglicherweise begründet sich die Differenz der gefundenen Genexpression aber auch im unterschiedlichen Untersuchungsmaterial, da bei Brünnert *et al.* nur CD34⁺-Zellen untersucht wurden, während im Rahmen dieser Untersuchung die Gesamtzahl der *whole white blood cells* der Patientenproben untersucht wurde.

Die im Rahmen dieser Arbeit für das Zielgen SELL gefundenen Ergebnisse zu interpretieren, fällt vor allem durch die gemessenen großen interindividuellen Unterschiede im Genexpressionsverhalten schwer. Die bereits prätherapeutisch vorliegenden Differenzen im Genexpressionsprofil setzen sich vor allem im Patientenkollektiv der Therapieversager während der Therapie fort. Zusätzlich ist SELL das einzige Zielgen, das in beiden untersuchten Patientenkollektiven keine Signifikanz der Änderung des Genexpressionsverhaltens nach Einleitung der Imatinibtherapie zeigt. Es fällt schwer, definitive Erkenntnisse aus dem veränderten Expressionsverhalten zu ziehen, da der Betrag der Genexpressionsänderung geringer ist.

Frühere Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen der Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie des Universitätsklinikums Düsseldorf beschreiben eine signifikant reduzierte Expression von Adhäsionsmolekülen, unter anderem auch von L-Selektin, im Rahmen der unbehandelten CML-Erkrankung (98) (Diaz-Blanco *et al.*, 2007). Im Vergleich zu den weiteren im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Zielgenen ist das durchschnittliche L-Selektin Expressionsniveau vor Beginn der Tyrosinkinaseinhibitortherapie geringer als das Expressionsniveau anderer ausgewählter Zielgene. Nach Einleitung der Therapie kommt es bei beiden hier untersuchten Patientenkollektiven zu einem moderaten Anstieg der Genexpression.

Es kommt durch die gesteigerte Expression des Adhäsionsmoleküls L-Selektin zu einer gesteigerten Adhäsion der Leukozyten, unter anderem an Matrixstrukturen des Knochenmarks. Durch die erhöhte Verweildauer im Knochenmark erfolgt ein verbesserter Differenzierungsprozess der Zellen. Vermutlich hat die gestartete Imatinibtherapie einen Einfluss auf die Auslösung dieses Zusammenhanges und es findet eine Angleichung des SELL-Expressionsverhaltens an ein nicht pathologisches Niveau statt.

Durch die Pathogenese der unbehandelten CML-Erkrankung unterliegt auch das Genexpressionsniveau des Zielgens RHAMM, das den *hyaluron-mediated motility receptor* (HMMR) kodiert, einem pathologischen Einfluss. Im Rahmen mehrerer Leukämieerkrankungen, unter anderem auch der CML, wird RHAMM als signifikant hochexprimiert beschrieben (102) (Greiner *et al.*, 2002).

Aus diesem Zusammenhang heraus werden in neuen Arbeiten vermehrt Therapiemöglichkeiten untersucht, weil RHAMM als immunogenes Antigen und somit als Zielstruktur bei der Entstehung der Leukämie beteiligt ist. Die potentielle Zielstruktur wäre für eine immunologische Therapie oder eine Antikörpertherapie zur Behandlung der verschiedenen Leukämieformen verwendbar (124) (Greiner *et al.*, 2005). Neben RHAMM wurden bis heute auch weitere leukämie-assoziierte Antigene identifiziert, die Zielstrukturen für eine immunologische Therapie darstellen können (125) (Greiner *et al.*, 2008) (126) (Hofmann *et al.*, 2010). Dazu zählt auch das durch das Zielgen BIRC5 kodierte Protein Survivin, das in dieser Arbeit untersucht wird (80) (Schmidt *et al.*, 2003).

Diskutiert wird weiterhin eine Eignung der Höhe der individuellen RHAMM-Expression als Marker für das *Outcome* des Patienten. Vor allem vor dem Hintergrund des Ziels dieser Arbeit, für den Patienten prognostisch relevante Faktoren zu identifizieren, handelt es sich dabei um einen interessanten Ansatz. Leider sind die bislang gefundenen Ergebnisse uneinheitlich. Im Rahmen der AML-Erkrankung ist ein hohes RHAMM-Expressionsniveau mit einem verbesserten Überleben der Patienten korreliert. Bei soliden Karzinomen ist eine schlechtere Prognose für das Überleben der Patienten mit hoher RHAMM-Expression festgestellt worden (125) (Greiner *et al.*, 2008).

Von einer prognostischen Relevanz der RHAMM-Expression auszugehen, ist momentan somit eindeutig nicht möglich. Auch, da die CML-Erkrankung noch nicht zu den in diesem Zusammenhang untersuchten Leukämieformen gehört. Dies ist eine Schlussfolgerung, die durch die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigt wird. Auch hier kann keine Korrelation zwischen der Höhe des RHAMM-Expressionsniveaus und dem klinischem *Outcome* des Patienten gezogen werden kann. Es ist kein Unterschied des Betrags der Genexpressionsänderung zwischen beiden hier untersuchten Patientenkollektiven festzustellen. Auch im Rezidivfall sind keine vorher detektierbaren, unterschiedlichen Genexpressionsmuster bei den untersuchten Patientengruppen nachweisbar.

Verursacht durch die Einleitung der Therapie mit Imatinib kommt es bei allen im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Patientenproben zu einer signifikanten Abnahme der RHAMM-Expression in den ersten Monaten der Therapie. Damit ist davon auszugehen, dass das prätherapeutisch pathologisch erhöhte RHAMM-Expressionsniveau in Folge der Therapie in beiden Patientenkollektiven gesenkt wird.

73

4.5. Genexpressionsverhalten während der Imatinibtherapie; Vergleich der Patientenkollektive

Es wurde bereits durch Untersuchungen der Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie des Universitätsklinikums Düsseldorf festgestellt und publiziert, dass Imatinib einen Einfluss auf die Genexpression ausübt und es bereits im frühen Therapieverlauf zu Veränderungen in der Genexpression kommt. (74) (Brünnert *et al.*, 2009). Da der Beobachtungszeitraum nur sieben Tage betrug, evaluierten wir durch diese Arbeit die Veränderungen über einen längeren Therapieverlauf. Wann kommt es im Therapieverlauf zur maximalen Genexpressionsänderung? Findet eine asymptotische Annäherung an einen Minimal- oder Maximalwert oder abrupter Abfall bzw. Anstieg der Genexpression statt?

Auch im Rahmen der Untersuchungen dieser Arbeit ist ein eindeutiger Einfluss des Tyrosinkinaseinhibitors Imatinib auf die Genexpression der behandelten Patienten erkennbar. Die Genexpression verändert sich bei allen Patienten bereits in der Frühphase der Therapie mit Imatinib signifikant. Bereits am ersten regulären Kontrolltermin der Patienten im Rahmen des Therapiemonitorings der CML scheint der Betrag der Expressionsänderung bereits annähernd sein Maximum erreicht zu haben. Dies lässt auf eine schnelle Änderung der Genexpression nach eingeleiteter Imatinibtherapie schließen.

Vor Beginn der Arbeit sind interindividuelle Unterschiede in der prätherapeutischen Genexpression diskutiert worden. Sie würden eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse deutlich erschweren. Bei den untersuchten Zielgenen sind interindividuelle Unterschiede im Betrag der Genexpressionsänderung nach Einleitung der Therapie nicht erkennbar. Somit ergibt sich die Möglichkeit, die Veränderung der Expression der Zielgene zusammengefasst im Patientenkollektiv zu beurteilen. In Teilbereichen stellt das Zielgen für L-Selektin bei einigen der untersuchten Patienten eine Ausnahme dar. Bei der Analyse der Genexpressionsänderung beim Gen SELL kommt es zum Auftreten von geringen interindividuellen Unterschieden in der (prä-)therapeutischen Genexpression.

Da das Genexpressionsverhalten aller untersuchten Zielgene entspricht während der Therapie mit Imatinib einem konstanten Niveau. Somit wurden alle untersuchten Therapiezeitpunkte der Zielgene zusammengefasst und für jedes Zielgen nach Patientenkollektiv getrennt im Vergleich zum prätherapeutischen Expressionsniveau betrachtet. Wie bereits im Ergebnisteil angesprochen, wird zwischen dem Patientenkollektiv der Therapieversager und adäquat auf eine Imatinibtherapie reagierenden Patienten unterschieden.

Bei der Auswertung der PCR-Daten für das Patientenkollektiv der Therapieversager wird ein signifikantes Absinken der Genexpression im Vergleich zum prätherapeutischen Niveau der Gene der DNA-Replikation und der DNA-Reparatur (TOP2A, RRM-2) deutlich.

74

Ein etwas inhomogeneres Bild ergibt sich in der Gruppe der Gene der Zelladhäsion und Migration (IL-18, SELL und RHAMM). Hier kommt es zum signifikanten Abfall der Genexpression der Zielgene IL-18 und RHAMM. Zusätzlich ist sowie ein moderater, zusammengefasst aber nicht signifikanter Anstieg der Genexpression des Zielgens SELL während der Therapie zu beobachten.

In der Gruppe der zellzyklusrelevanten Gene (BIRC5, BTG2, CDC2, PIM-1) zeigt sich ein signifikanter Rückgang der Genexpression der Gene BIRC5 und CDC2 nach Einleitung der Therapie mit Imatinib. Zeitgleich kommt es zum signifikanten Anstieg der Expression der Gene BTG2 und PIM-1 verglichen zum prätherapeutischen Expressionsniveau.

Auch bei der Bestimmung der zusammengefassten ΔΔCT-Werte für das Patientenkollektiv der Therapieansprecher zeigt sich ein signifikanter Abfall des Genexpressionsniveaus der Gene der DNA-Replikation und der DNA-Reparatur (TOP2A und RRM-2). Ein identisches Bild zeigt sich in der Gruppe der Gene der Zelladhäsion und Migration (IL-18 und RHAMM). Beim L-Selektin (SELL) kommt es zu einer durchschnittlichen Zunahme der Genexpression während der Therapie mit Imatinib. Sie ist bei allen Patienten der Gruppe zu beobachten. Allerdings ist das Ausmaß der Veränderung im Vergleich zum prätherapeutischen Niveau nicht signifikant.

Bei den zellzyklusrelevanten Genen zeigt sich sowohl eine signifikante Zunahme der Genexpression der Gene BTG2 und PIM-1 als auch eine signifikante Abnahme der Genexpression der Gene BIRC5 und CDC2 nach Beginn der Imatinibtherapie (siehe Abbildung 4.1).



Abbildung 4.1.: Vergleich der errechneten $\Delta\Delta$ CT-Werte beider Patientenkollektive.

4.6. Prognostische Bedeutung der Ergebnisse für den Patienten

Bereits gut erforscht sind Faktoren, die im Rahmen der Imatinibtherapie eines an CML erkrankten Patienten zu einem Sekundärversagen führen. Besonders häufig sind dabei Punktmutationen im BCR-ABL-Genlokus Auslöser des Sekundärversagens der Therapie (127) (Nicolini *et al.*, 2006) (128) (Branford *et al.*, 2003) (129) (Koptyra *et al.*, 2006).

Allerdings ist ein Vorhersehen des Therapieversagens mit dem heutigen Wissen nicht möglich. Es besteht der dringende Bedarf, grundlegende prognostische Faktoren zu identifizieren, die das *Outcome* des Patienten beeinflussen (130) (Hernandez-Boluda *et al.*, 2009).

Zu den wichtigsten heute etablierten Prognoseparametern gehört das vom Patienten durch die Therapie erreichte Ausmaß der Remission zu bestimmten Therapiezeitpunkten (131) (Baccarani *et al.*, 2009) (132) (Baccarani *et al.*, 2009). Den bekanntesten Parameter für ein zukünftiges remissionsfreies Überleben des Patienten stellt momentan weiterhin der Sokal-Score dar (133) (Sokal *et al.*, 1984) (134) (Druker *et al.*, 2006). Es existieren neue Überlegungen, diesen Prognoseparameter durch weitere, das remissionsfreie Überleben des Patienten beeinflussende Faktoren zu aktualisieren. Neue Daten belegen, dass der genetische Hintergrund der CML-Patienten einen Einfluss auf die Effizienz der Imatinib-Therapie besitzt und dieser möglicherweise in das *scoring system* aufzunehmen ist (135) (Guillem *et al.*, 2011). Ob durch neue Verfahren die prognostische Relevanz von Scoring Systemen wirklich effektiv gesteigert werden kann und damit etablierte System wie der Sokal-Score abgelöst werden, muss in Zukunft noch bewiesen werden.

Ein möglicher Prognoseparameter für die Effizienz einer Imatinib-Therapie ist der *human organic cation transporter* 1 (hOCT-1), der durch aktuelle Untersuchungen diverser Arbeitsgruppen in den Fokus gerückt ist. Dabei handelt es sich um einen Membrantransporter, der die Kationenaufnahme aus dem Blut in die Zellen reguliert. Er spielt dabei auch eine entscheidende Rolle bei der Aufnahme von Arzneimitteln aus dem Körperkreislauf (136) (Shu *et al.*, 2003). Auch der aktive Transport des Wirkstoffes Imatinib in die CML-Zelle ist durch hOCT-1 beeinflusst (137) (Engler *et al.*, 2010). Patienten mit einer hohen intrinsischen hOCT-1-Aktivität erreichen mit größerer Wahrscheinlichkeit eine *major* molekulare Remission (138) (White *et al.*, 2007). Eine hohe hOCT-1-Aktivität wird daher von mehreren Arbeitsgruppen als ein Schlüsselfaktor für das remissionsfreie Überleben primär mit Imatinib therapierter CML-Patienten angesehen. Nachteilig für die Eignung des hOCT-1 als Prognosefaktor ist sowohl die hohe interindividuelle Variabilität der hOCT-1-Aktivität als auch die Tatsache, dass es sich hierbei nicht um einen krankheitsassoziierten Prognosefaktor handelt (139) (White *et al.*, 2010).

Folglich scheint ein Instrument zur zufriedenstellenden sicheren Prognosebildung aktuell trotz des Arbeitsaufwandes diverser Arbeitsgruppen nicht gefunden. Wir versuchen, im Rahmen dieser Arbeit, auf Ebene der Genexpression mögliche prognostisch relevante Faktoren für das spätere *Outcome* des Patienten während einer Imatinib-Therapie zu erforschen. Prognostisch relevant insofern, dass eine frühe atypische Änderung der Genexpression ein erster Hinweis auf ein späteres Rezidiv ist oder ein kommendes Primärversagen der Therapie beim Patienten ankündigt.

Es wird den *early response genes* im Rahmen einer Imatinib-Therapie das Potential zugeschrieben, eine prognostische Relevanz zu besitzen (74) (Brünnert *et al.*). Aus der großen Menge an differentiell exprimierten Genen dieser Arbeit sind hier repräsentative Zielgene entnommen. Die gewählten Gene besetzen jeweils Schlüsselpositionen in ihrem jeweiligen Aufgabenfeld. Wenn Gene eine prognostische Relevanz für den weiteren Therapieverlauf und das remissionsfreie Überleben des Patienten besitzen, hoffen wir, diese in unserer Auswahl inkludiert zu haben.

Nach Zusammenschau der Ergebnisse muss man allen untersuchten Zielgenen dieses Potential aus zwei Gründen absprechen. Erstens kommt es sowohl im Kollektiv der primär gut auf die Therapie mit Imatinib ansprechenden Patienten als auch in der Patientengruppe der Therapieversager zu einer signifikanten Änderung der Genexpression annähernd gleichen Betrages. Eine Unterscheidung zwischen den Patientenkollektiven nur anhand der Genexpressionsanalysen ist unmöglich. Zweitens kann auch ein späteres Rezidiv bei Sekundärversagen der Therapie bei den in Frage kommenden Patienten nicht durch eine atypische Änderung der Genexpression prognostiziert werden. Allein auf Grundlage der hier untersuchten Zielgene kann ohne Kenntnis der zugehörigen BCR-ABL/G6PDH-Ratio des Patienten kein Rückschluss auf den aktuellen und zukünftigen Therapieverlauf des Patienten gezogen werden.

Das gewünschte Ziel, durch die Genexpressionsanalyse ausgewählter Zielgene einen prognostischen Hinweis auf das molekulare Ansprechen des Patienten auf die Therapie zu erhalten, kann nicht weiter verfolgt werden. Allerdings lässt sich diese Schlussfolgerung nur für die im Rahmen dieser Untersuchung repräsentativ ausgewählten Zielgene stellen.

4.7. Genexpression im Rezidivfall

Im Patientenkollektiv der Therapieversager sind auch sekundäre Therapieversager als Patienten eingeschlossen. Bei diesen Patienten kommt es bekanntermaßen während der Therapie mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib nach initial erfolgreicher Therapie zu einem molekularen Rezidiv. Dies ist verbunden mit einem Anstieg der BCR-ABL/G6PDH-Ratio während der Therapieüberwachung.

Wie in Kapitel 4.3. angesprochen ist zu Beginn der Imatinib-Therapie das Genexpressionsprofil der Zielgene TOP2A und RRM-2, durch die Auswirkungen der unbehandelten BCR-ABL-Translokation verursacht (117) (Affer *et al.*, 2011). Nach der Einleitung der Imatinibtherapie kommt es im frühen Therapieverlauf zum Verschwinden des pathologischen Genexpressionsmusters.

Allerdings ändert sich das Genexpressionsmuster ausgesuchter Zielgene zum Zeitpunkt des molekularen Rezidives während der Therapie nicht. Die gemessene Genexpression nähert sich nicht, äquivalent zur BCR-ABL/G6PDH-Ratio, erneut dem prätherapeutischen Niveau. Im Rezidivfall tritt ein durch die Pathogenese der CML-Erkrankung verursachtes, in Grundzügen pathologisches Genexpressionsmuster wie zu Beginn der Erkrankung nicht auf. Dieses Genexpressionsmuster würde mit einer Hochregulation der Zielgene BIRC5, TOP2A und RRM-2 sowie einer verminderten Genexpressionsanalysen auch im Rezidivfall ein unverändertes Expressionsniveau bei allen untersuchten Patienten des Kollektivs (siehe Abbildung 4.2). Möglicherweise sind im Rahmen des CML-Rezidives andere intrazelluläre Mechanismen, die nicht durch die Therapie mit Imatinib tangiert werden, von entscheidender Bedeutung für die erneute Progression der Erkrankung. Dafür spricht, dass sich das Expressionsmuster der untersuchten *early response genes* im Rahmen der erneuten malignen Transformation der Erkrankung und der intrazellulären Signalwege nicht ändert.



Abbildung 4.2.: Beispielhafte Abbildung des Therapieverlaufs mit BCR-ABL/G6PDH-Ratio und korrespondierendem CT-Wert zu den Untersuchungszeitpunkten des Patientenkollektivs der Therapieversager mit dem Zielgen CDC2. Die graue Gerade gibt den initial erwarteten Verlauf der CT-Werte im Rezidivfall an während die blaue Ausgleichsgrade den tatsächlichen Verlauf der CT-Werte im Rezidivfall ausdrückt.

Im Falle eines möglichen Rezidives können andere Mechanismen Auslöser der molekularen Veränderungen sein als zum Zeitpunkt der Erstdiagnose. Welche Mechanismen bei diesem Prozess eine Rolle spielen, lässt sich allein durch diese Untersuchung aktuell nicht zeigen. Allerdings kommt den untersuchten Zielgenen bei der Auslösung pathologischer Signalkaskaden im Rezidivfall nach diesen Erkenntnissen nur eine untergeordnete Bedeutung zu.

In zukünftigen Untersuchungen muss man sich der Frage nähern, welche weiteren Mechanismen im Rezidivfall der Erkrankung während der Imatinibtherapie ursächliche Rollen spielen. Ob den bisher bekannten *early response genes* dabei eine Schlüsselrolle zukommt ist unklar.

Bei der Untersuchung der Mechanismen im Rezidivfall wird sich aber vor allem die Akquirierung von adäquatem Patientenmaterial schwierig gestalten. Durch die heutigen optimalen Therapiemonitoringstrategien kommt es nur noch in seltenen Fällen zu einem ausgeprägten, klinisch diagnostizierbaren Rezidiv. Häufig wird bereits vorher die Diagnose eines molekularen Rezidivs der Erkrankung gestellt. Die Therapie der Patienten wird dann auf einen alternativen Tyrosinkinaseinhibitor der zweiten Generation, wie Dasatinib oder Nilotinib, umgestellt (131) (Baccarani *et al.*, 2009).

4.8. Genexpression nach Absetzen der Imatinibtherapie

Schwierig zu beantworten bleibt die Fragestellung, was passiert, wenn bei einem an CML erkrankten Patienten die Therapie mit Imatinib ersatzlos wieder abgesetzt wird. In der Literatur ist beschrieben, dass es bei der Mehrzahl der Patienten nach Absetzen der Therapie zu einem Rezidiv der Erkrankung kommt (142) (Dingli *et al.*, 2006).

Neue Daten belegen allerdings auch, dass es nicht zwangsläufig alle Patienten ein Rezidiv der Erkrankung nach Absetzen der Therapie erleiden. Im Rahmen der STIM-Studie erlitten immerhin 39% der untersuchten Patienten kein Rezidiv, auch wenn die Imatinibmedikation abgesetzt wurde (58) (Mahon *et al.*, 2010). Allerdings werden die Ergebnisse der Studie heute oft diskutiert und eine schlüssige Erklärung der gefundenen Ergebnisse steht noch aus (59) (60) (Valent, 2010; Stagno *et al.*, 2011).

Möglich bleibt, dass auch eine geänderte Genexpression bislang nicht identifizierter Zielgene einen Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit des rezidivfreien Überlebens nach Absetzen der Imatinibmedikation hat. Ob und in welchem Ausmaß eine erneute Änderung der Genexpression eintritt, wenn die Imatinib-Therapie unterbrochen wird, ist bislang nicht untersucht worden. Aber die verbleibende Möglichkeit, dass es durch Absetzen der Imatinibtherapie zu einem Krankheitsrezidiv kommt, macht eine Untersuchung dieses Sachverhaltes allein aus ethischen Gesichtspunkten nur schwer durchführbar.

4.9. Ausblick

Die Analyse der Untersuchungen zur veränderten Genexpression bei einer *firstline* Imatinib-Therapie im Rahmen der CML-Erkrankung ergibt durch diese Arbeit, dass, zumindest für die ausgewählten Zielgene, keine prognostische Relevanz der Genexpressionsänderung für den Patienten detektierbar ist. Nur durch Analyse der Genexpression wird es also auch in Zukunft zunächst nicht möglich sein, während einer suffizienten Tyrosinkinaseinhibitortherapie ein mögliches Therapieversagen im Voraus anhand der Genexpressionsdaten zu erkennen. Natürlich kann diese Aussage nur für die hier untersuchten 10 Zielgene definitiv getroffen werden. Allerdings erscheint unwahrscheinlich, dass eine andere Auswahl der Zielgene eine prognostische Relevanz der Genexpression erkennbar machen würde, zu eindeutig sind die gleichsam gefundenen Ergebnisse bei allen untersuchten Zielgenen.

Mögliche Anknüpfungspunkte für zukünftige Untersuchungen sind eher die gefundenen Veränderungen des Genexpressionsprofils im Rezidivfall während der Therapie im Vergleich zum prätherapeutischen Genexpressionsmuster. Eventuell verbergen sich hier neue Erkenntnisse zur Ursache der Rezidiventstehung, da möglicherweise andere Faktoren ursächlich für das Auftreten des Rezidivs sind, als zum Zeitpunkt der Erstdiagnose der Erkrankung, was durch das Genexpressionsmuster im Rezidivfall angedeutet wird.

Außerdem sind bislang die Auswirkungen neuer Tyrosinkinaseinhibitoren der "zweiten Generation" und ihre Auswirkungen auf das Genexpressionsprofil der Patienten nicht untersucht. Die Frage bleibt, ob es auch bei der Therapie der CML mit neueren Tyrosinkinaseinhibitoren sog. *early response genes* gibt, die noch detektiert werden müssen und eventuell dort prognostische Relevanz besitzen.

5. Zusammenfassung

Die *first-line* Therapie mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib im Rahmen der CML-Erkrankung führt nach Einleitung der Therapie bei den insgesamt elf untersuchten und behandelten Patienten zu signifikanten Veränderungen der Expression der untersuchten zehn Zielgene. Meine Arbeit fußt auf zwei Gruppen von vier bzw. sieben Patienten. Eine Gruppe besteht aus vier Patienten, die klinisch und molekular adäquat auf eine Therapie mit Imatinib reagieren. Die zweite Gruppe beinhaltet sieben Patienten, die im Rahmen der *first-line* Therapie mit Imatinib laborchemisch ein molekular nachweisbares Rezidiv der Erkrankung erleiden. Der durchschnittliche *follow-up* Zeitraum aller Patienten lag bei 16,75 respektive 13 Monaten, wobei im Schnitt 2,25 bzw. 2,57 Kontrolluntersuchungen nach Beginn der Therapie stattfanden.

Bereits in der Frühphase der Therapie mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib setzt das maximale Ausmaß der gefundenen Genexpressionsänderung ein. Die Ergebnisse der Arbeit von Brünnert *et al.* zu *early-response genes* bei der Tyrosinkinaseinhibitortherapie konnten im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden.

Die durch meine Untersuchung gefundenen Ergebnisse lassen Rückschlüsse auf den Einfluss der Imatinibtherapie auf den Zellumsatz und die DNA-Replikation zu, die durch die eingeleitete Therapie verlangsamt werden. Auch die Migration von Zellen, unter anderem aus dem Knochenmark, wird therapiebedingt gehemmt. Dies bedingt unter anderem eine verbesserte Reifung der Zellen im Knochenmark. Der Zellzyklus wird im Zuge der Imatinibtherapie gebremst, proliferative Faktoren geringer exprimiert und gleichzeitig zusätzlich antiproliferative Faktoren verstärkt exprimiert.

Zudem zeigt sich bei kontinuierlich fortgesetzter Tyrosinkinaseinhibitortherapie die Ausbildung eines *steady-state* Expressionsniveaus jedes der untersuchten zehn Zielgene. Dieses Ergebnis ist aber in beiden Patientenkollektiven, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, im gleichen Ausmaß nachweisbar. Die gefundene Genexpressionsänderung weist in beiden untersuchten Patientenkollektiven den gleichen Betrag auf und auch im molekular nachgewiesenen Rezidivfall findet keine Änderung der Genexpression vor Eintritt des Rezidives statt. Ebenso findet keine Annäherung der Genexpression an das prätherapeutische pathologische Expressionsniveau eines Zielgens im Rahmen des Rezidivs statt. Ohne Betrachtung der molekularen BCR-ABL/G6PDH-Ratio ist, nur anhand der Genexpressionsdaten, keine Aussage zum Ansprechen des Patienten auf die eingeleitete Therapie möglich. Somit kann das Ziel dieser Untersuchung, eine mögliche prognostische Relevanz der gefundenen Genexpression für den Patienten zu detektieren, nicht weiter verfolgt werden.

Die zum Zeitpunkt der Erstdiagnose der CML-Erkrankung, gemessenen pathologischen Veränderungen der Genexpression sind im Rahmen des Rezidives nicht erneut detektierbar. So schließen wir, dass im Falle eines Rezidives der CML-Erkrankung andere Faktoren von pathogenetisch wichtiger Bedeutung sind. Welche anderen Faktoren bei der Entstehung eines molekularen Rezidives ursächlich beteiligt sind, kann durch diese Untersuchung aber nicht gezeigt werden.

6. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1.: verschiedene Bruchpunkte des BCR-Gens (nach (31) Neumann et al., 2003)

Tabelle 1.2. : Definitionen des Ansprechens auf die Therapie bei Patienten mit CML in chronischer Phase; Tabelle nach (17) Baccarani *et al.*, 2006

Tabelle 1.3.: Definitionen des Therapieversagens bzw. des optimalen Therapieerfolges bei Patienten mit CML in chronischer Phase; Tabelle nach (48) Mauro, 2006

Tabelle 2.1.: Überblick über die verwendeten Geräte

Tabelle 2.2.: Übersicht über die genutzten Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.3.: Auflistung der verwendeten Reagenzien

Tabelle 2.4.: Übersicht über die verwendeten molekularbiologischen Kits

Tabelle 2.5.: Oligonukleotide für die quantitative real-time PCR

Tabelle 2.6.: Während der Durchführung der Versuche verwendete Programme

Tabelle 2.7.: zur Planung der Methoden genutzte Datenbanken

Tabelle 2.8.: Laborparameter der Therapieversager

Tabelle 2.9.: Laborparameter der Therapieansprecher

Tabelle 2.10.: Programm für die quantitative real-time PCR.

Tabelle 3.1.: durchschnittlicher gemessener mRNA-Gehalt der Patientenproben im jeweiligen Patientenkollektiv

Tabelle 3.2.: Vergleich der ermittelten Ergebnisse der möglichen Referenzgene bei 20 Patientenproben

Tabelle 3.3.: BCR-ABL/G6PDH-Ratio, CT-Wert sowie ΔCT-Wert für das Gen TOP2A in der Gruppe der Therapieversager an den gewählten Untersuchungszeitpunkten

Tabelle 3.4.: BCR-ABL/G6PDH-Ratio, CT-Wert sowie ΔCT-Wert für das Gen TOP2A in der Gruppe der Patienten, die adäquat auf die Therapie mit Imatinib ansprechen, an den gewählten Untersuchungszeitpunkten

Tabelle 3.5.: durchschnittlicher *fold change* als Endergebnis der Berechnung der Expressionsänderung der beiden Patientenkollektive im Vergleich

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1.: verschiedene Bruchpunkte des BCR-Gens (modifizierte Figur 1 aus (32) Kurzrock *et al.*, 2003)

Abbildung 1.2.: durch p210^{BCR-ABL} beeinflusste Signaltransduktionswege (modifizierte Figur 3 aus (32) Kurzrock *et al.*, 2003)

Abbildung 1.3.: Strukturformel Imatinib (nach (55) Weisberg et al., 2005)

Abbildung 3.1.: Exemplarische Abbildung für die zur Auswertung des mRNA-Gehaltes erstellte Tabelle im Anschluss an die Messung am Nanodrop[®]

Abbildung 3.2.: Vergleich der Leukozytenzahl im Rezidivfall während effektiver Imatinibtherapie

Abbildung 3.3.: Verlauf der BCR-ABL/G6PDH-Ratio (Y₁-Achse) an den Untersuchungszeitpunkten während des Therapieverlaufs (X-Achse) sowie gemessene CT-Werte (Y₂-Achse) zum gleichen Therapiezeitpunkt in der Gruppe der Therapieversager für das Gen TOP2A.

Abbildung 3.4.: Verlauf der BCR-ABL/G6PDH-Ratio an den Untersuchungszeitpunkten während des Therapieverlaufs bei Patienten, die adäquat auf die Therapie mit Imatinib reagieren, sowie gemessene CT-Werte zum gleichen Therapiezeitpunkt für das Gen TOP2A.

Abbildung 3.5.: Verlauf der BCR-ABL/G6PDH-Ratio an den Untersuchungszeitpunkten während des Therapieverlaufs sowie gemessene CT-Werte zum gleichen Therapiezeitpunkt in der Gruppe der Therapieversager für das Gen RRM-2.

Abbildung 3.6.: Verlauf der BCR-ABL/G6PDH-Ratio an den Untersuchungszeitpunkten während des Therapieverlaufs bei Patienten, die adäquat auf die Therapie mit Imatinib reagieren, sowie gemessene CT-Werte zum gleichen Therapiezeitpunkt für das Gen RRM-2.

Abbildung 3.7.: Verlauf der BCR-ABL/G6PDH-Ratio an den Untersuchungszeitpunkten während des Therapieverlaufs sowie gemessene CT-Werte zum gleichen Therapiezeitpunkt in der Gruppe der Therapieversager für das Gen BIRC5.

Abbildung 3.8.: Verlauf der BCR-ABL/G6PDH-Ratio an den Untersuchungszeitpunkten während des Therapieverlaufs bei Patienten, die adäquat auf die Therapie mit Imatinib reagieren, sowie gemessene CT-Werte zum gleichen Therapiezeitpunkt für das Gen BIRC5.

Abbildung 3.9.: Verlauf der BCR-ABL/G6PDH-Ratio an den Untersuchungszeitpunkten während des Therapieverlaufs sowie gemessene CT-Werte zum gleichen Therapiezeitpunkt in der Gruppe der Therapieversager für das Gen BTG2.

Abbildung 3.10.: Verlauf der BCR-ABL/G6PDH-Ratio an den Untersuchungszeitpunkten während des Therapieverlaufs bei Patienten, die adäquat auf die Therapie mit Imatinib reagieren, sowie gemessene CT-Werte zum gleichen Therapiezeitpunkt für das Gen BTG2. Abbildung 3.11.: Verlauf der BCR-ABL/G6PDH-Ratio an den Untersuchungszeitpunkten während des Therapieverlaufs sowie gemessene CT-Werte zum gleichen Therapiezeitpunkt in der Gruppe der Therapieversager für das Gen CDC2.

Abbildung 3.12.: Verlauf der BCR-ABL/G6PDH-Ratio an den Untersuchungszeitpunkten während des Therapieverlaufs bei Patienten, die adäquat auf die Therapie mit Imatinib reagieren, sowie gemessene CT-Werte zum gleichen Therapiezeitpunkt für das Gen CDC2.

Abbildung 3.13.: Verlauf der BCR-ABL/G6PDH-Ratio an den Untersuchungszeitpunkten während des Therapieverlaufs sowie gemessene CT-Werte zum gleichen Therapiezeitpunkt in der Gruppe der Therapieversager für das Gen PIM-1.

Abbildung 3.14.: Verlauf der BCR-ABL/G6PDH-Ratio an den Untersuchungszeitpunkten während des Therapieverlaufs bei Patienten, die adäquat auf die Therapie mit Imatinib reagieren, sowie gemessene CT-Werte zum gleichen Therapiezeitpunkt für das Gen PIM-1.

Abbildung 3.15.: Verlauf der BCR-ABL/G6PDH-Ratio an den Untersuchungszeitpunkten während des Therapieverlaufs sowie gemessene CT-Werte zum gleichen Therapiezeitpunkt in der Gruppe der Therapieversager für das Gen IL-18.

Abbildung 3.16.: Verlauf der BCR-ABL/G6PDH-Ratio an den Untersuchungszeitpunkten während des Therapieverlaufs bei Patienten, die adäquat auf die Therapie mit Imatinib reagieren, sowie gemessene CT-Werte zum gleichen Therapiezeitpunkt für das Gen IL-18.

Abbildung 3.17.: Verlauf der BCR-ABL/G6PDH-Ratio an den Untersuchungszeitpunkten während des Therapieverlaufs sowie gemessene CT-Werte zum gleichen Therapiezeitpunkt in der Gruppe der Therapieversager für das Gen RHAMM.

Abbildung 3.18.: Verlauf der BCR-ABL/G6PDH-Ratio an den Untersuchungszeitpunkten während des Therapieverlaufs bei Patienten, die adäquat auf die Therapie mit Imatinib reagieren, sowie gemessene CT-Werte zum gleichen Therapiezeitpunkt für das Gen RHAMM.

Abbildung 3.19.: Darstellung der errechneten ΔΔCT-Werte für alle Zielgene im Patientenkollektiv der Therapieversager.

Abbildung 3.20.: Darstellung der errechneten ΔΔCT-Werte für alle Zielgene im Patientenkollektiv der Patienten, die adäquat auf eine Therapie mit Imatinib ansprechen.

Abbildung 3.21.: Ergebnisse der Gelelektrophorese der Zielgene BTG2, CDC2 und RHAMM sowie Vergleich mit dem mitgeführten Längenstandard

Abbildung 3.22.: Ergebnisse der Gelelektrophorese für die möglichen Referenzgene GAPDH und ABL sowie Vergleich mit dem mitgeführten Längenstandard

Abbildung 4.1.: Vergleich der errechneten ΔΔCT-Werte beider Patientenkollektive

Abbildung 4.2.: Beispielhafte Abbildung des Therapieverlaufs des Patientenkollektivs der Therapieversager mit dem Zielgen CDC2

8. Literaturverzeichnis

1. **Nowell, PC.** Discovery of the Philadelphia chromosome: a personal perspective. *J Clin Invest.* 2007;117(8):2033-2035.

2. **SEER, surveillance epidemiology and end results.** http://seer.cancer.gov. *"incidence of CML".* [Online] U.S. national cancer institute.

3. **Hochhaus, A.** *Chronische myeloische Leukämie Empfehlungen zur Diagnostik und Therapie.* Bremen : Uni-Med Verlag, 2. Auflage, 2010.

4. **Corso A, Lazzarino M, Morra E, Merante S, Astori C, Bernasconi P, Boni M, Bernasconi C.** Chronic myelogenous leukemia and exposure to ionizing radiation--a retrospective study of 443 patients. *Ann Hematol.* 1995;70(2):79-82.

5. **Craigie, D. et Bennett, J.H.** Case of disease of spleen, in which death took place in consequence of the presence of purulent matter in the blood. *Edinburgh Medical and Surgical Journal*. 1845;64:400-412; 413-423.

6. Virchow, R. Weisses Blut. *Neue Notizen aus dem Gebiete der Natur- und Heilkunde, Vol. 36, (ed. by L. F. v. Froriep & R. Froriep) Berlin.* 1845;151-156.

7. Virchow, R. Weisses Blut (Leukaemie). *Virchow Archives of Pathology and Anatomy*. 1847;1,563-569.

8. Ehrlich, P. Farbenanalytische Untersuchungen Zur Histologie und Klinik Des Blutes. s.l. : Hirschwald, Berlin, 1891.

9. Nowell PC, Hungerford DA. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science*. 1960;132:1497.

10. **Rowley, J.D.** A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature.* 1973;243:290–293.

11. de Klein A, van Kessel AG, Grosveld G, Bartram CR, Hagemeijer A, Bootsma D, Spurr NK, Heisterkamp N, Groffen J, Stephenson JR. A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature*. 1982;300:765–767.

12. Ben-Neriah Y, Daley GQ, Mes-Masson AM, Witte ON, Baltimore D. The chronic myelogenous leukemia-specific P210 protein is the product of the bcr/abl hybrid gene. *Science*. 1986;233(4760):212-214.

13. Lugo TG, Pendergast AM, Muller AJ, Witte ON. Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. *Science*. 1990;247(4946):1079-1082.

14. Herold, G. Innere Medizin - Eine vorlesungsorientierte Darstellung. 2011, S.84ff.

15. **Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW.** World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics. Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. *IARC Press.* 2001;17-31,47-52.

16. Lahaye T, Riehm B, Berger U, Paschka P, Müller MC, Kreil S, Merx K, Schwindel U, Schoch C, Hehlmann R, Hochhaus A. Response and resistance in 300 patients with BCR-ABL-positive leukemias treated with imatinib in a single center: a 4.5-year follow-up. *Cancer.* 2005;103(8):1659-1669.

17. Baccarani M, Saglio G, Goldman J, Hochhaus A, Simonsson B, Appelbaum F, Apperley J, Cervantes F, Cortes J, Deininger M, Gratwohl A, Guilhot F, Horowitz M, Hughes T, Kantarjian H, Larson R, Niederwieser D, Silver R, Hehlmann R. 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.

18. Wetzler M, Talpaz M, Yee G, Stass SA, Van Etten RA, Andreeff M. Cell cycle-related shifts in subcellular localization of BCR: association with mitotic chromosomes and with heterochromatin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92:3488-3492.

19. Diekmann D, Brill S, Garrett MD, Totty N, Hsuan J, Monfries C. Bcr encodes a GTPase-activating protein for p21rac. *Nature*. 1991;351:400-402.

20. **Muller AJ, Young JC, Pendergast AM, Pondel M, Landau NR, Littman DR.** BCR first exon sequences specifically activate the BCR/ABL tyrosine kinase oncogene of Philadelphia chromosome-positive human leukemias. *Mol Cell Biol.* 1991;11:1785-1792.

21. Arlinghaus, RB. The involvement of Bcr in leukemias with the Philadelphia chromosome. *Crit Rev Oncog.* 1998;9:1-18.

22. **Rosenberg N, Witte ON.** The viral and cellular forms of the Abelson (abl) oncogene. *Adv Virus Res.* 1988;35:39-81.

23. van Etten, RA. Cycling, stressed-out and nervous: cellular functions of c-Abl. *Trends Cell Biol.* 1999;9:179-186.

24. **Miao YJ, Wang JY.** Binding of A/T-rich DNA by three high mobility group-like domains in c-Abl tyrosine kinase. *J Biol Chem.* 1996;271:22823-22830.

25. **Yuan ZM, Huang Y, Ishiko T, Kharbanda S, Weichselbaum R, Kufe D.** Regulation of DNA damageinduced apoptosis by the c-Abl tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94:1437-1440.

26. **Mayer BJ, Baltimore D.** Mutagenic analysis of the roles of SH2 and SH3 domains in regulation of the Abl tyrosine kinase. *Mol Cell Biol.* 1994;14(5):2883-2894.

27. **Shi Y, Alin K, Goff SP.** Abl-interactor-1, a novel SH3 protein binding to the carboxy-terminal portion of the Abl protein, suppresses v-abl transforming activity. *Genes Dev.* 1995;9(21):2583-2597.

28. **Dai Z, Pendergast AM.** Abi-2, a novel SH3-containing protein interacts with the c-Abl tyrosine kinase and modulates c-Abl transforming activity. *Genes Dev.* 1995;9(21):2569-2582.

29. Dai Z, Quackenbush RC, Courtney KD, Grove M, Cortez D, Reuther GW, Pendergast AM.

Oncogenic Abl and Src tyrosine kinases elicit the ubiquitin-dependent degradation of target proteins through a Ras-independent pathway. *Genes Dev.* 1998;12(10):1415-1424.

30. **Groffen J, Stephenson JR, Heisterkamp N, de Klein A, Bartram CR, Grosveld G.** Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell.* 1984;36:93-99.

31. **Neumann F, Herold C, Hildebrandt B, Kobbe G, Aivado M, Rong A 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: 1-10.

32. **Kurzrock R, Kantarjian HM, Druker BJ, Talpaz M.** Philadelphia Chromosome–Positive Leukemias: From Basic Mechanisms to Molecular Therapeutics. *Ann Intern Med.* 2003;138:819-830.

33. Bedi A, Zehnbauer BA, Barber JP, Sharkis SJ, Jones RJ. Inhibition of apoptosis by BCR-ABL in chronic myeloid leukemia. *Blood.* 1994;83:2038-2044.

34. Gordon MY, Dowding CR, Riley GP, Goldman JM, Greaves MF. Altered adhesive interactions with marrow stroma of haematopoietic progenitor cells in chronic myeloid leukaemia. *Nature*. 1987;328(6128):342-344.

35. Oda T, Heaney C, Hagopian JR, Okuda K, Griffin JD, Druker BJ. Crkl is the major tyrosinephosphorylated protein in neutrophils from patients with chronic myelogenous leukemia. *J Biol Chem.* 1994;269(37):22925-22928.

36. **Uemura N, Griffin JD.** The adapter protein Crkl links Cbl to C3G after integrin ligation and enhances cell migration. *J Biol Chem.* 1999;274(53):37525-37532.

37. **Sánchez-García I, Martín-Zanca D.** Regulation of Bcl-2 gene expression by BCR-ABL is mediated by Ras. *J Mol Biol.* 1997;267(2):225-228.

38. Skorski T, Bellacosa A, Nieborowska-Skorska M, Majewski M, Martinez R, Choi JK, Trotta R, Wlodarski P, Perrotti D, Chan TO, Wasik MA, Tsichlis PN, Calabretta B. Transformation of hematopoietic cells by BCR/ABL requires activation of a PI-3k/Akt-dependent pathway. *EMBO J.* 1997;16(20):6151-6161.

39. **Dubrez L, Eymin B, Sordet O, Droin N, Turhan AG, Solary E.** BCR-ABL delays apoptosis upstream of procaspase-3 activation. *Blood.* 1998;91(7):2415-2422.

40. **Ilaria RL Jr, Van Etten RA.** P210 and P190(BCR/ABL) induce the tyrosine phosphorylation and DNA binding activity of multiple specific STAT family members. *J Biol Chem.* 1996;271:31704-31710.

41. **Chai SK, Nichols GL, Rothman P.** Constitutive activation of JAKs and STATs in BCR-Abl-expressing cell lines and peripheral blood cells derived from leukemic patients. *J Immunol.* 1997;159(10):4720-4728.

42. Nosaka T, Kawashima T, Misawa K, Ikuta K, Mui AL, Kitamura T. STAT5 as a molecular regulator of proliferation, differentiation and apoptosis in hematopoietic cells. *EMBO J.* 1999;18(17):4754-4765.

43. **Sillaber C, Gesbert F, Frank DA, Sattler M, Griffin JD.** STAT5 activation contributes to growth and viability in Bcr/Abl-transformed cells. *Blood.* 2000;95(6):2118-2125.

44. **Jiang X, Lopez A, Holyoake T, Eaves A, Eaves C.** Autocrine production and action of IL-3 and granulocyte colony-stimulating factor in chronic myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96:12804-12809.

45. **Schoch C, Schnittger S, Bursch S, Gerstner D, Hochhaus A, Berger U.** Comparison of chromosome banding analysis, interphase- and hypermetaphase-FISH, qualitative and quantitative PCR for diagnosis and for follow-up in chronic myeloid leukemia: a study on 350 cases. *Leukemia*. 2002;16:53-59.

46. **Branford S, Hughes TP, Rudzki Z.** Monitoring chronic myeloid leukaemia therapy by real-time quantitative PCR in blood is a reliable alternative to bone marrow cytogenetics. *Br J Haematol.* 1999;107: 587-599.

47. Emig M, Saussele S, Wittor H, Weisser A, Reiter A, Willer A 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;13:1825-1832.

48. **MauroMJ.** Defining and managing imatinib resistance. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2006:219-225.

49. **Goldmann JM.** How I treat chronic myeloid leukemia in the imatinib era. *Blood.* 2007;110(8):2828-2837.

50. **Bhatia R, Wayner EA, McGlave PB, Verfaillie CM.** Interferon-alpha restores normal adhesion of chronic myelogenous leukemia hematopoietic progenitors to bone marrow stroma by correcting impaired beta 1 integrin receptor function. *J Clin Invest.* 1994;94(1):384-391.

51. Hehlmann R, Heimpel H, Hasford J, Kolb HJ, Pralle H, Hossfeld DK, Queißer W, Löffler H, Hochhaus A, Heinze B, Georgii A, Bartram CR, Grießhammer M, Bergmann L, Essers U, Falge C, Queißer U, Meyer P, Schmitz N, Eimermacher H, Walther F, Fett W et al. Randomized Comparison of Interferon-α With Busulfan and Hydroxyurea in Chronic Myelogenous Leukemia. *Blood.* 1994;84(12):4064-4077.

52. **Gratwohl A, Baldomero H, Horisberger B, Schmid C, Passweg J, Urbano-Ispizua A.** Current trends in hematopoietic stem cell transplantation in Europe. *Blood.* 2002;100(7):2374-2386.

53. Kolb HJ, Mittermuller J, Clemm C. Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. *Blood.* 1990;76(12):2462-2465.

54. Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, Peng B, Buchdunger E, Ford JM, Lydon NB, Kantarjian H, Capdeville R, Ohno-Jones S, Sawyers CL. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2001;344(14):1031-1037.

55. Weisberg E, Manley PW, Breitenstein W, Brüggen J, Cowan-Jacob SW, Ray A, Huntly B, Fabbro D, Fendrich G, Hall-Meyers E, Kung AL, Mestan J, Daley GQ, Callahan L, Catley L, Cavazza C, Azam M, Neuberg D, Wright RD, Gilliland DG, Griffin JD. Characterization of AMN107, a selective inhibitor of native and mutant Bcr-Abl. *Cancer Cell*. 2005;7(2):129-141.

56. **Goldman JM, Melo JV.** Chronic myeloid leukemia - advances in biology and new approaches to treatment. *N Engl J Med.* 2003;349:1451-1464.

57. Apperley JF, Gardembas M, Melo JV, Russell-Jones R, Bain BJ, Baxter EJ, Chase A, Chessells JM, Colombat M, Dearden CE, Dimitrijevic S, Mahon FX, Marin D, Nikolova Z,Olavarria E, Silberman S, Schultheis B, Cross NCP, Goldman JM. 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;347:481-487.

58. Mahon FX, Réa D, Guilhot J, Guilhot F, Huguet F, Nicolini F, Legros L, Charbonnier A, Guerci A, Varet B, Etienne G, Reiffers J, Rousselot P. Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained complete molecular remission for at least 2 years: the prospective, multicentre Stop Imatinib (STIM) trial. *Lancet Oncol.* 2010;11(11):1029-1035.

59. **Valent P.** Exploring the curative potential of BCR-ABL1-targeting drugs for chronic myeloid leukaemia. *Lancet Oncol.* 2010;11(11):1010-1011.

60. **Stagno F, Vigneri P, Di Raimondo F.** Imatinib discontinuation: realistic for patients with chronic myeloid leukaemia achieving complete molecular remission? *Lancet Oncol.* 2011;12(2):118.

61. **Druker J, O'Brien S, Larson RA.** Long-term benefits of imatinib for patients newly diagnosed with chronic myelogenous leukemia in chronic phase: The 5-year update from the IRIS study. *J Clin Oncol.(Meeting Abstracts).* 2006;24(18S P1): Abstract 6506.

62. Hochhaus A, Erben P, Ernst T, Mueller MC. Resistance to targeted therapy in chronic myelogenous leukemia. *Semin Hematol.* 2007;44(1 Suppl 1):15-24.

63. Kantarjian HM, Talpaz M, O'Brien S, Giles F, Garcia-Manero G, Faderl S, Thomas D, Shan J, Rios MB, Cortes J. Dose escalation of imatinib mesylate can overcome resistance to standard-dose therapy in patients with chronic myelogenous leukemia. *Blood.* 2003;101(2):473-475.

64. Rix U, Hantschel O, Dürnberger G, Remsing Rix LL, Planyavsky M, Fernbach NV, Kaupe I, Bennett KL, Valent P, Colinge J, Köcher T, Superti-Furga G. Chemical proteomic profiles of the BCR-ABL inhibitors imatinib, nilotinib, and dasatinib reveal novel kinase and nonkinase targets. *Blood*. 2007;110(12):4055-4063.

65. Jabbour E, Cortes J, Giles F, O'Brien S and Kantarjian H. The clinical challenge of imatinib resistance in chronic myeloid leukaemia: emerging strategies with new targeted agents. *Targeted Oncology*. 2006;1:186-196.

66. Hochhaus A, Baccarani M, Deininger M, Apperley JF, Lipton JH, Goldberg SL, Corm S, Shah NP, Cervantes F, Silver RT, Niederwieser D, Stone RM, Dombret H, Larson RA, Roy L, Hughes T, Müller MC, Ezzeddine R, Countouriotis AM, Kantarjian HM. Dasatinib induces durable cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in chronic phase with resistance or intolerance to imatinibLong-term follow-up of dasatinib in chronic-phase CML. *Leukemia*. 2008;22,1200-1206.

67. **Kujawski L, Talpaz M.** Strategies for overcoming imatinib resistance in chronic myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2007;48(12):2310-2322.

68. Giles FJ, le Coutre P, Bhalla K, Rosti G, Ossenkoppele G, Alimena G, Weitzman A, Zheng M, Kantarjian HM. A phase II study of nilotinib administered to patients with imatinib resistant or intolerant chronic myelogenous leukemia (CML) in chronic phase (CP), accelerated phase (AP) or blast crisis (BC) who also failed dasatinib. *Journal of Clinical Oncology, ASCO Annual Meeting Proceedings Part I.* 2007;25,18suppl:abstract7038.

69. Kantarjian HM, Giles F, Gattermann N, Bhalla K, Alimena G, Palandri F, Ossenkoppele GJ, Nicolini FE, O'Brien SG, Litzow M, Bhatia R, Cervantes F, Haque A, Shou Y, Resta DJ, Weitzman A, Hochhaus A, le Coutre P. Nilotinib (formerly AMN107), a highly selective BCR-ABL tyrosine kinase inhibitor, is effective in patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia in chronic phase following imatinib resistance and intolerance. *Blood.* 2007;110(10):3540-3546.

70. **le Coutre P, Gattermann N, Hochhaus A, Larson R, Weitzman A, Haque A, Giles F, O'Brien SG, Kantarjian HM.** A phase II study of nilotinib administered to imatinib resistant or intolerant patients with chronic myelogenous leukemia (CML) in accelerated phase (AP). *Journal of Clinical Oncology, 2007 ASCO Annual Meeting Proceedings Part I.* 2007;25,18suppl:abstract7026.

71. **Shepherd P, Suffolk R, Halsey J, Allan N.** Analysis of molecular breakpoint and m-RNA transcripts in a prospective randomized trial of interferon in chronic myeloid leukemia: no correlation with clinical features, cytogenetic response, duration of chronic phase, or survival. *Br J Haematol.* 1995;89(3):546-554.

72. **Kurzrock R, Shtalrid M, Gutterman JU, Koller CA, Walters R, Trujillo JM, Talpaz M.** Molecular analysis of chromosome 22 breakpoints in adult Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol.* 1987;67(1):55-59.

73. **Kurzrock R, Shtalrid M, Talpaz M, Kloetzer WS, Gutterman JU.** Expression of c-abl in Philadelphia-positive acute myelogenous leukemia. *Blood.* 1987;70(5):1584-1588.

74. Bruennert D, Czibere A, Bruns I, Kronenwett R, Gattermann N, Haas R, Neumann F. Early in vivo changes of the transcriptome in Philadelphia chromosome-positive CD34+ cells from patients with chronic myelogenous leukaemia following imatinib therapy. *Leukemia*. 2009;23(5):983-985.

75. **Dorée M, Galas S.** The cyclin-dependent protein kinases and the control of cell division. *FASEB J.* 1994;8(14):1114-1121.

76. Cho BO, Jeong YW, Kim SH, Park K, Lee JH, Kweon GR, Park JC. Up-regulation of the BTG2 gene in TPA- or RA-treated HL-60 cell lines. *Oncol Rep.* 2008;19(3):633-637.

77. Duriez C, Moyret-Lalle C, Falette N, El-Ghissassi F, Puisieux A. BTG2, its family and its tutor. *Bull Cancer*. 2004;91(7-8):242-253.

78. Olie RA, Simões-Wüst AP, Baumann B, Leech SH, Fabbro D, Stahel RA, Zangemeister-Wittke U. A novel antisense oligonucleotide targeting survivin expression induces apoptosis and sensitizes lung cancer cells to chemotherapy. *Cancer Res.* 2000;60(11):2805-2809.

79. Tamm I, Wang Y, Sausville E, Scudiero DA, Vigna N, Oltersdorf T, Reed JC. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Res.* 1998;58(23):5315-5320.

80. Schmidt SM, Schag K, Müller MR, Weck MM, Appel S, Kanz L, Grünebach F, Brossart P. Survivin is a shared tumor-associated antigen expressed in a broad variety of malignancies and recognized by specific cytotoxic T cells. *Blood.* 2003;102(2):571-576.

81. Sah NK, Khan Z, Khan GJ, Bisen PS. Structural, functional and therapeutic biology of survivin. *Cancer Lett.* 2006;244(2):164-171.

82. Altieri DC. Validating survivin as a cancer therapeutic target. Nat Rev Cancer. 2003;3(1):46-54.

83. Xie Y, Xu K, Dai B, Guo Z, Jiang T, Chen H, Qiu Y. The 44 kDa Pim-1 kinase directly interacts with tyrosine kinase Etk/BMX and protects human prostate cancer cells from apoptosis induced by chemotherapeutic drugs. *Oncogene*. 2006;25(1):70-78.

84. **Shirogane T, Fukada T, Muller JM, Shima DT, Hibi M, Hirano T.** Synergistic roles for Pim-1 and c-Myc in STAT3-mediated cell cycle progression and antiapoptosis. *Immunity*. 1999;11(6):709-719.

85. Watt PM, Hickson ID. Structure and function of type II DNA topoisomerases. *Biochem J.* 1994;303:681-695.

86. Wang JC. DNA topoisomerases: why so many? J Biol Chem. 1991;266(11):6659-6662.

87. **Järvinen TA, Liu ET.** Topoisomerase IIalpha gene (TOP2A) amplification and deletion in cancer--more common than anticipated. *Cytopathology*. 2003;14(6):309-313.

88. **Pavloff N, Rivard D, Masson S, Shen SH, Mes-Masson AM.** Sequence analysis of the large and small subunits of human ribonucleotide reductase. *DNA Seq.* 1992;2(4):227-234.

89. Heidel JD, Liu JY, Yen Y, Zhou B, Heale BS, Rossi JJ, Bartlett DW, Davis ME. Potent siRNA inhibitors of ribonucleotide reductase subunit RRM2 reduce cell proliferation in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res.* 2007;13(7):2207-2215.

90. Travali S, Ku DH, Rizzo MG, Ottavio L, Baserga R, Calabretta B. Structure of the human gene for the proliferating cell nuclear antigen. *J Biol Chem.* 1989;264(13):7466-7472.

91. **Rössig L, Jadidi AS, Urbich C, Badorff C, Zeiher AM, Dimmeler S.** Akt-dependent phosphorylation of p21(Cip1) regulates PCNA binding and proliferation of endothelial cells. *Mol Cell Biol.* 2001;21(16):5644-5657.

92. Essers J, Theil AF, Baldeyron C, van Cappellen WA, Houtsmuller AB, Kanaar R, Vermeulen W. Nuclear dynamics of PCNA in DNA replication and repair. *Mol Cell Biol.* 2005;25(21):9350-9359.

93. **Shivji KK, Kenny MK, Wood RD.** Proliferating cell nuclear antigen is required for DNA excision repair. *Cell.* 1992;69(2):367-374.

94. Nolan KF, Greaves DR, Waldmann H. The human interleukin 18 gene IL18 maps to 11q22.2q22.3, closely linked to the DRD2 gene locus and distinct from mapped IDDM loci. *Genomics*. 1998;51(1):161-163. 95. **Morel JC, Park CC, Woods JM, Koch AE.** A novel role for interleukin-18 in adhesion molecule induction through NF kappa B and phosphatidylinositol (PI) 3-kinase-dependent signal transduction pathways. *J Biol Chem.* 2001;276(40):37069-37075.

96. Okamura H, Tsutsi H, Komatsu T, Yutsudo M, Hakura A, Tanimoto T, Torigoe K, Okura T, Nukada Y, Hattori K. Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. *Nature*. 1995;378(6552):88-91.

97. Gordon MY, Dowding CR, Riley GP, Goldman JM, Greaves MF. Altered adhesive interactions with marrow stroma of haematopoietic progenitor cells in chronic myeloid leukaemia. *Nature.* 1987 Jul 23-29;328(6128):342-4.

98. Diaz-Blanco E, Bruns I, Neumann F, Fischer JC, Graef T, Rosskopf M, Brors B, Pechtel S, Bork S, Koch A, Baer A, Rohr UP, Kobbe G, Haeseler A, Gattermann N, Haas R, Kronenwett R. Molecular signature of CD34(+) hematopoietic stem and progenitor cells of patients with CML in chronic phase. *Leukemia*. 2007;21(3):494-504.

99. **Turley EA.** Purification of a hyaluronate-binding protein fraction that modifies cell social behavior. *Biochem Biophys Res Commun.* 1982;108(3):1016-1024.

100. **Crainie M, Belch AR, Mant MJ, Pilarski LM.** Overexpression of the receptor for hyaluronanmediated motility (RHAMM) characterizes the malignant clone in multiple myeloma: identification of three distinct RHAMM variants. *Blood.* 1999;93(5):1684-1696.

101. **Rein DT, Roehrig K, Schöndorf T, Lazar A, Fleisch M, Niederacher D, Bender HG, Dall P.** Expression of the hyaluronan receptor RHAMM in endometrial carcinomas suggests a role in tumour progression and metastasis. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2003;129(3):161-164.

102. Greiner J, Ringhoffer M, Taniguchi M, Schmitt A, Kirchner D, Krähn G, Heilmann V, Gschwend J, Bergmann L, Döhner H, Schmitt M. Receptor for hyaluronan acid-mediated motility (RHAMM) is a new immunogenic leukemia-associated antigen in acute and chronic myeloid leukemia. *Exp Hematol.* 2002;30(9):1029-1035.

103. **Barker, K.** *Das Cold Spring Harbor Laborhandbuch für Einsteiger.* s.l. : Spektrum Akademischer Verlag, 1. Auflage, 2006.

104. Beillard E, Pallisgaard N, van der Velden VH, Bi W, Dee R, van der Schoot E, Delabesse E, Macintyre E, Gottardi E, Saglio G, Watzinger F, Lion T, van Dongen JJ, Hokland P, Gabert J. Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) - a Europe against cancer program. *Leukemia*. 2003;17(12):2474-2486.

105. **Wang YL, Lee JW, Cesarman E, Jin DK, Csernus B.** Molecular monitoring of chronic myelogenous leukemia: identification of the most suitable internal control gene for real-time quantification of BCR-ABL transcripts. *Journal of Molekular Diagnostics.* 2006;8(2):231-239.

106. Elmaagacli AH, Freist A, Hahn M, Opalka B, Seeber S, Schaefer UW, Beelen DW. 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. *Br J Haematol.* 2001;113(4):1072-1075.

107. **Gutiérrez MI, Timson G, Siraj AK, Bu R, Barbhaya S, Banavali S, Bhatia K.** Single monochrome real-time RT-PCR assay for identification, quantification, and breakpoint cluster region determination of t(9;22) transcripts. *J Mol Diagn.* 2005;7(1):40-47.

108. Jones CD, Yeung C, Zehnder JL. Comprehensive validation of a real-time quantitative bcr-abl assay for clinical laboratory use. *Am J Clin Pathol.* 2003;120(1):42-48.

109. Norbury C, Nurse P. Animal cell cycles and their control. Annu Rev Biochem. 1992;61:441-470.

110. Valdez BC, Murray D, Ramdas L, de Lima M, Jones R, Kornblau S, Betancourt D, Li Y, Champlin RE, Andersson BS. Altered gene expression in busulfan-resistant human myeloid leukemia. *Leuk Res.* 2008;32(11):1684-1697.

111. **Ryu MS, Lee MS, Hong JW, Hahn TR, Moon E, Lim IK.** TIS21/BTG2/PC3 is expressed through PKC-delta pathway and inhibits binding of cyclin B1-Cdc2 and its activity, independent of p53 expression. *Exp Cell Res.* 2004;299(1):159-170.

112. Li F, Ambrosini G, Chu EY, Plescia J, Tognin S, Marchisio PC, Altieri DC. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature*. 1998;396(6711):580-584.

113. Adida C, Haioun C, Gaulard P, Lepage E, Morel P, Briere J, Dombret H, Reyes F, Diebold J, Gisselbrecht C, Salles G, Altieri DC, Molina TJ. Prognostic significance of survivin expression in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood.* 2000;96(5):1921-1925.

114. Kamihira S, Yamada Y, Hirakata Y, Tomonaga M, Sugahara K, Hayashi T, Dateki N, Harasawa H, Nakayama K. Aberrant expression of caspase cascade regulatory genes in adult T-cell leukaemia: survivin is an important determinant for prognosis. *Br J Haematol.* 2001;114(1):63-69.

115. Hernández-Boluda JC, Bellosillo B, Vela MC, Colomer D, Alvarez-Larrán A, Cervantes F. Survivin expression in the progression of chronic myeloid leukemia: a sequential study in 16 patients. *Leuk Lymphoma*. 2005;46(5):717-722.

116. **Bhatia R, Munthe HA, Williams AD, Zhang F, Forman SJ, Slovak ML.** Chronic myelogenous leukemia primitive hematopoietic progenitors demonstrate increased sensitivity to growth factor-induced proliferation and maturation. *Exp Hematol.* 2000;28(12):1401-1412.

117. Affer M, Dao S, Liu C, Olshen AB, Mo Q, Viale A, Lambek CL, Marr TG, Clarkson BD. Gene Expression Differences between Enriched Normal and Chronic Myelogenous Leukemia Quiescent Stem/Progenitor Cells and Correlations with Biological Abnormalities. *J Oncol.* 2011:798592.

118. Goto N, Tsurumi H, Kasahara S, Kanemura N, Hara T, Yasuda I, Shimizu M, Murakami N, Sawada M, Yamada T, Takemura M, Seishima M, Kito Y, Takami T, Moriwaki H. Serum interleukin-18 level is associated with the outcome of patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with CHOP or R-CHOP regimens. *Eur J Haematol.* 2011;87(3):217-227.

119. Zhang B, Wang Y, Zheng GG, Ma XT, Li G, Zhang FK, Wu KF. Clinical significance of IL-18 gene over-expression in AML. *Leuk Res.* 2002;26(10):887-892.

120. **Taniguchi M, Nagaoka K, Kunikata T, Kayano T, Yamauchi H, Nakamura S, Ikeda M, Orita K, Kurimoto M.** Characterization of anti-human interleukin-18 (IL-18)/interferon-gamma-inducing factor (IGIF) monoclonal antibodies and their application in the measurement of human IL-18 by ELISA. *J Immunol Methods*. 1997;206(1-2):107-113.

121. **Zhang B, Ma XT, Zheng GG, Li G, Rao Q, Wu KF.** Expression of IL-18 and its receptor in human leukemia cells. *Leuk Res.* 2003;27(9):813-822.

122. Park S, Kim TS, Kim C, Kim S, Bang SI, Park H, Cho DH. Transferrin induces interleukin-18 expression in chronic myeloid leukemia cell line, K-562. *Leuk Res.* 2009;33(2):315-320.

123. Jefferis BJ, Papacosta O, Owen CG, Wannamethee SG, Humphries SE, Woodward M, Lennon LT, Thomson A, Welsh P, Rumley A, Lowe GD, Whincup PH. Interleukin 18 and coronary heart disease: prospective study and systematic review. *Atherosclerosis.* 2011;217(1):227-233.

124. Greiner J, Li L, Ringhoffer M, Barth TF, Giannopoulos K, Guillaume P, Ritter G, Wiesneth M, Döhner H, Schmitt M. Identification and characterization of epitopes of the receptor for hyaluronic acid-mediated motility (RHAMM/CD168) recognized by CD8+ T cells of HLA-A2-positive patients with acute myeloid leukemia. *Blood.* 2005;106(3):938-945.

125. **Greiner J, Bullinger L, Guinn BA, Döhner H, Schmitt M.** Leukemia-associated antigens are critical for the proliferation of acute myeloid leukemia cells. *Clin Cancer Res.* 2008;14(22):7161-7166.

126. **Hofmann S, Greiner J.** Immunogenic antigens as therapeutic targets against myeloid leukaemic cells. *Leuk Res.* 2010;34(7):850-851.

127. Nicolini FE, Corm S, Lê QH, Sorel N, Hayette S, Bories D, Leguay T, Roy L, Giraudier S, Tulliez M, Facon T, Mahon FX, Cayuela JM, Rousselot P, Michallet M, Preudhomme C, Guilhot F, Roche-Lestienne C. Mutation status and clinical outcome of 89 imatinib mesylate-resistant chronic myelogenous leukemia patients: a retrospective analysis from the French intergroup of CML (Fi(phi)-LMC GROUP). *Leukemia*. 2006;20(6):1061-1066.

128. Branford S, Rudzki Z, Walsh S, Parkinson I, Grigg A, Szer J, Taylor K, Herrmann R, Seymour JF, Arthur C, Joske D, Lynch K, Hughes T. Detection of BCR-ABL mutations in patients with CML treated with imatinib is virtually always accompanied by clinical resistance, and mutations in the ATP phosphate-binding loop (P-loop) are associated with a poor prognosis. *Blood.* 2003;102(1):276-283.

129. Koptyra M, Falinski R, Nowicki MO, Stoklosa T, Majsterek I, Nieborowska-Skorska M, Blasiak J, Skorski T. BCR/ABL kinase induces self-mutagenesis via reactive oxygen species to encode imatinib resistance. *Blood.* 2006;108(1):319-327.

130. Hernández-Boluda JC, Cervantes F. Prognostic factors in chronic myeloid leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2009;22(3):343-353.

131. Baccarani M, Cortes J, Pane F, Niederwieser D, Saglio G, Apperley J, Cervantes F, Deininger M, Gratwohl A, Guilhot F, Hochhaus A, Horowitz M, Hughes T, Kantarjian H, Larson R, Radich J, Simonsson B, Silver RT, Goldman J, Hehlmann R. Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. *J Clin Oncol.* 2009;27(35):6041-6051.

132. Baccarani M, Castagnetti F, Gugliotta G, Palandri F, Soverini S. Response definitions and European Leukemianet Management recommendations. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2009;22(3):331-341.

133. Sokal JE, Cox EB, Baccarani M, Tura S, Gomez GA, Robertson JE, Tso CY, Braun TJ, Clarkson BD, Cervantes F. Prognostic discrimination in "good-risk" chronic granulocytic leukemia. *Blood.* 1984;63(4):789-799.

134. Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, Gathmann I, Kantarjian H, Gattermann N, Deininger MW, Silver RT, Goldman JM, Stone RM, Cervantes F, Hochhaus A, Powell BL, Gabrilove JL, Rousselot P, Reiffers J, Cornelissen JJ, Hughes T, Agis H, Fischer T, Verhoef G. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2006;355(23):2408-2417.

135. Guillem V, Amat P, Cervantes F, Alvarez-Larrán A, Cervera J, Maffioli M, Bellosillo B, Collado M, Marugán I, Martínez-Ruiz F, Hernández-Boluda JC. Functional polymorphisms in SOCS1 and PTPN22 genes correlate with the response to imatinib treatment in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *Leuk Res.* 2011;36(2):174-181.

136. Shu Y, Leabman MK, Feng B, Mangravite LM, Huang CC, Stryke D, Kawamoto M, Johns SJ, **DeYoung J, Carlson E, Ferrin TE, Herskowitz I, Giacomini KM.** Evolutionary conservation predicts function of variants of the human organic cation transporter, OCT1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100(10):5902-5907.

137. Engler JR, Frede A, Saunders VA, Zannettino AC, Hughes TP, White DL. Chronic myeloid leukemia CD34+ cells have reduced uptake of imatinib due to low OCT-1 activity. *Leukemia*. 2010;24(4):765-770.

138. White DL, Saunders VA, Dang P, Engler J, Venables A, Zrim S, Zannettino A, Lynch K, Manley PW, Hughes T. Most CML patients who have a suboptimal response to imatinib have low OCT-1 activity: higher doses of imatinib may overcome the negative impact of low OCT-1 activity. *Blood*. 2007;110(12):4064-4072.

139. White DL, Dang P, Engler J, Frede A, Zrim S, Osborn M, Saunders VA, Manley PW, Hughes TP. Functional activity of the OCT-1 protein is predictive of long-term outcome in patients with chronic-phase chronic myeloid leukemia treated with imatinib. *J Clin Oncol.* 2010;28(16):2761-2767.

140. Wang L, Giannoudis A, Lane S, Williamson P, Pirmohamed M, Clark RE. Expression of the uptake drug transporter hOCT1 is an important clinical determinant of the response to imatinib in chronic myeloid leukemia. *Clin Pharmacol Ther.* 2008;83(2):258-264.

141. Bazeos A, Marin D, Reid AG, Gerrard G, Milojkovic D, May PC, de Lavallade H, Garland P, Rezvani K, Apperley JF, Goldman JM, Foroni L, Khorashad JS. hOCT1 transcript levels and single nucleotide polymorphisms as predictive factors for response to imatinib in chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2010;24(6):1243-1245.

142. **Dingli D, Michor F.** Successful therapy must eradicate cancer stem cells. *Stem Cells*. 2006;24(12):2603-2610.

9. Danksagung

Heel hartelijk bedankt voor de ondersteuning lieve Kiki!

Meinen Eltern vielen Dank für die Ermutigung zum Schreiben dieser Arbeit; sonst wäre das Ergebnis nicht entstanden!

Merci à la Martinique, Fleur des Caraibes für eine traumhafte Umgebung beim Erstellen des Textes!

Ich möchte mich auch bei Herrn Prof. Haas, Herrn Dr. Neumann, Frau Brünnert und bei allen Mitarbeitern des hämato-onkologischen Forschungslabors bedanken, die mich bei meinen Bemühungen, Ergebnisse zu erzielen jederzeit sehr zielgerichtet und umfassend unterstützt haben und nicht zuletzt durch Ihre Förderung diese Arbeit überhaupt erst ermöglicht haben. 10. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Datum, Vor- und Nachname

Unterschrift