

Aus der III. Medizinischen Klinik
der Medizinischen Fakultät Mannheim
(Direktor: Prof. Dr. med. Wolf-Karsten Hofmann)

ESPL1, *PTTG1* und *PTTG1IP* Transkriptspiegel als molekulare Marker
für das Ansprechverhalten von Patienten mit chronischer myeloischer
Leukämie auf Therapie mit Tyrosinkinaseinhibitoren

Inauguraldissertation
zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der
Medizinischen Fakultät Mannheim
der Ruprecht-Karls-Universität
zu
Heidelberg

vorgelegt von
Eva Louise Christiani

aus
Mönchengladbach
2023

Dekan: Herr Prof. Dr. med. Sergij Goerd
Referent: Herr Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Wolfgang Seifarth

Dem Andenken
meines Großvaters
Hermann-Josef

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
1 EINLEITUNG	3
1.1 Chronische myeloische Leukämie	3
1.1.1 Klinisches Bild	4
1.1.2 Diagnostik	5
1.1.3 Zytogenetik	8
1.1.4 Molekularbiologie	9
1.1.5 Prognose	11
1.1.6 Therapie, Ansprechen und Resistenzentwicklung	11
1.2 Zellzyklus, Zentrosomen und Zentrosomenzyklus	17
1.3 Zentrosomale Aberrationen und Schlüsselproteine	18
1.3.1 Separase	19
1.3.2 Securin/ <i>PTTG1</i>	20
1.3.3 <i>PTTG1 Interacting Protein/PTTG1IP</i>	21
1.4 Zielsetzung	22
2 MATERIAL UND METHODEN	23
2.1 Studiendesign	23
2.2 Patienten	24
2.2.1 Patientenmaterial	24
2.2.2 Patientenauswahl	25
2.3 Material	27
2.3.1 Chemikalien und Lösungen	27
2.3.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien	27
2.3.3 Zelllinien	29
2.4 Zellbiologie/Zellkultur	30
2.5 Gesamt-RNA-Extraktion aus Blutzellen	31
2.6 cDNA-Synthese	32
2.7 Vervielfältigung der DNA	33
2.7.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	33
2.7.2 Quantitative Reverse-Transkriptase-PCR (qRT-PCR)	33
2.7.3 Quantitative Auswertung der qRT-PCR	35
2.8 Gelelektrophorese	36
2.9 Statistik	36

3	ERGEBNISSE.....	39
3.1	Untersuchung von humanen leukämischen Zelllinien.....	39
3.2	Zuordnung zu den Kohorten	41
3.3	Untersuchung von CML-Patienten.....	43
3.3.1	Transkriptspiegel von <i>ESPL1</i> , <i>PTTG1</i> und <i>PTTG1IP</i>	43
3.3.2	<i>ESPL1</i> /Separase.....	46
3.3.3	<i>PTTG1</i> /Securin.....	47
3.3.4	<i>PTTG1IP</i>	48
3.3.5	Korrelation der Genexpressionen	49
3.3.6	Räumliche Abstände der Expressionswerte	54
3.4	Ausreißer und die schnellsten <i>Responder</i>	58
3.5	Klinische Parameter der <i>Non-Responder</i> und <i>Responder</i>	70
3.6	Zusammenhang zwischen „Zeit bis MMR“ und klinischen Parametern	75
3.6.1	Geschlecht <i>versus</i> „Zeit bis MMR“	75
3.6.2	Alter <i>versus</i> „Zeit bis MMR“	75
3.6.3	Bruchpunktvariante <i>versus</i> „Zeit bis MMR“	75
3.6.4	TKI-Therapie korreliert mit „Zeit bis MMR“ bei <i>Respondern</i>	75
3.6.5	<i>BCR-ABL1</i> -Quotient korreliert mit „Zeit bis MMR“ bei CML-Patienten....	77
3.6.6	Leukozytenzahl korreliert mit „Zeit bis MMR“ bei CML-Patienten	78
3.6.7	<i>ESPL1</i> korreliert mit „Zeit bis MMR“ bei CML-Patienten	79
3.6.8	<i>PTTG1</i> korreliert mit „Zeit bis MMR“ bei <i>Respondern</i>	80
3.6.9	<i>PTTG1IP</i> korreliert mit „Zeit bis MMR“ bei <i>Respondern</i>	81
3.6.10	Gemessener 3D-Abstand <i>versus</i> „Zeit bis MMR“	82
4	DISKUSSION.....	83
4.1	<i>ESPL1</i> , <i>PTTG1</i> und <i>PTTG1IP</i> als molekulare Marker.....	85
4.2	3D-Abstand als prädiktiver molekularer Marker	91
4.3	Korrelation von klinischen Parametern mit dem Therapieansprechen	93
4.4	Schlussfolgerung.....	95
5	ZUSAMMENFASSUNG	96
6	LITERATURVERZEICHNIS	98
6.1	Literaturverzeichnis	98
6.2	Eigene Veröffentlichung	111
7	TABELLARISCHER ANHANG	112
8	LEBENS LAUF.....	114
	DANKSAGUNG	115

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

(q)RT-PCR	(qualitative/quantitative) Real-Time-PCR
2GTKI	TKIs der zweiten Generation
3GTKI	TKI der dritten Generation
ACA	zusätzliche chromosomale Aberrationen (<i>additional chromosomal abnormalities</i>)
ALL	Akute lymphatische Leukämie
allo	allogen
AP	Akzelerierte Phase
APC/C	Anaphase fördernder Komplex / Cyclosom (<i>Anaphase-promoting Complex / cyclosome</i>)
APL	Akute Promyelozytenleukämie
Ara-C	Ara-C
BCR-ABL	<i>Breakpoint Cluster Region</i> -Abelson Proteinkinase
bFGF	basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor (<i>basic fibroblast growth factor</i>)
bp	Basenpaar (<i>base pair</i>)
BP	Blastenphase
CDK	Cyclin abhängige Kinase (<i>cyclin depending kinase</i>)
cDNA	komplementäre DNA
CHR	komplette hämatologische Remission (<i>complete hematologic response</i>)
CIN	Zentrosomale Instabilität (<i>centrosomal instability</i>)
CLIP	Correlation by Individual Level Product
CML	Chronische myeloische Leukämie
CMoIR	komplette molekulare Remission (<i>complete molecular response</i>)
CP	Chronische Phase
C _t -Wert	Fluoreszenz Schwellenwert (<i>Threshold-Cycle Wert</i>)
CYP3A4	Cytochrom P450 3A4
DEPC	Diethyldicarbonat
ds	Doppelstrang
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EKG	Elektrokardiogramm
ELN	European LeukemiaNet
ELTS	EUTOS-Long Term Survival Score
EUTOS	European Treatment and Outcome Study
FKS	Fetales Kälberserum
G	<i>Gap</i>
GIT	Guanidin Thiocyanat
GTPasen	Guaninnucleotid-bindende Proteine
GUSB	β-Glucuronidase
HLA	Humane Leukozytenantigene
HSZ	hämatopoetische Stammzelle
HU	Hydroxyurea
IFN α	Interferon-alpha
IM	Imatinib
IRIS	International Randomized Study of Interferon and STI571
IS	Internationale Skala
KD	<i>kinase domain</i>

KM	Knochenmark
FC	<i>Fold change</i>
LSC	leukämische Stammzelle (<i>leukemic stem cell</i>)
M	Mitose
m-BCR	<i>minor breakpoint cluster region</i>
M-BCR	<i>major breakpoint cluster region</i>
MC	Mutterzentriol
MCgR	gute zytogenetische Remission (<i>major cytogenetic response</i>)
MDR	<i>multidrug resistance</i>
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
minCgR	kleine zytogenetische Remission (<i>minimal cytogenetic response</i>)
MMR	gute molekulare Remission (<i>major molecular remission</i>)
MR4, MR4.5	tiefe molekulare Remission
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NHEJ	Nichthomologe Endverknüpfung (<i>non-homologous end-joining</i>)
NLS	Kernlokalisierungssignal (<i>Nuclear Localisation Signal</i>)
noCgR	keine zytogenetische Remission (<i>no cytogenetic response</i>)
OH	Hydroxidion
OS	Gesamtüberleben (<i>overall survival</i>)
PBF	PTTG1 bindender Faktor
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCgR	partielle zytogenetische Remission (<i>partial cytogenetic response</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDGFR	<i>Platelet-derived growth factor receptor</i>
PEG	Polyethylenglykol
PFS	progressionsfreies Überleben (<i>progression free survival</i>)
Ph Chromosom	Philadelphia Chromosom
Ph+	Ph positiv
PI3	Phosphoinositid-3
PTTG1	<i>Pituitary tumor-transforming gene-1</i>
PTTG1IP	PTTG1IP interagierendes Protein (<i>PTTG1 interacting Protein</i>)
RNA	Ribonukleinsäure
ROC	Receiver Operating Characteristic
S	Synthese
SMC3	<i>Structural Maintenance of Chromosomes Protein 3</i>
SZT	Stammzelltransplantation
TBE	Trisborat-EDTA
TC	Tochterzentriol
TFR	Therapie-freie Remission
TKI	Tyrosinkinaseinhibitor
ZA	Zentrosomenamplifikation
μ-BCR	<i>mikro breakpoint cluster region</i>

1 EINLEITUNG

„Alles Wissen und alles Vermehren unseres Wissens endet nicht mit einem Schlußpunkt, sondern mit einem Fragezeichen.“ – Hermann Hesse

So ist es nicht verwunderlich, dass trotz des imposanten Wissenszuwachses seit Erstbeschreibung im Jahre 1845 durch Rudolf Virchow¹ und der therapeutischen Revolution um die Jahrtausendwende grundlegende Fragen zu Ursachen und Behandlung der chronischen myeloischen Leukämie (CML) nach wie vor einer Antwort bedürfen.

Als Weißblütigkeit, später „Leukämie“ (von altgriechisch λευκός *leukós* „weiß“ sowie αἷμα *haima* „Blut“) diagnostizierte Virchow die starke Vermehrung der weißen Blutzellen einer Patientin.² Die Leukämie umfasst eine Gruppe von Krebserkrankungen des blutbildenden Systems, wobei Blutzellen der myeloischen oder der lymphatischen Reihe betroffen sein können.

1.1 Chronische myeloische Leukämie

Als CML wird eine maligne Erkrankung der menschlichen Hämatopoese bezeichnet. Kennzeichnend für diese myeloproliferative Krankheit ist eine ineffektive Blutzellbildung mit gesteigerter Produktion von Zellen mit überwiegend myeloischer Differenzierung. Ursächlich für die Erkrankung ist das durch eine chromosomale Translokation entstehende Philadelphia Chromosom (Ph Chromosom), welches das Fusionsgen *BCR-ABL* (*Breakpoint Cluster Region-Abelson* Proteinkinase) trägt.³⁻⁵ Das *BCR-ABL* Gen codiert für eine Tyrosinkinase, welche durch ihre gesteigerte Aktivität zu der ungehemmten Produktion von Blutzellen der myeloiden Reihe führt.^{3, 6-8} Unbehandelt geht die zunächst langsam progrediente Erkrankung nach einigen Jahren in eine schneller verlaufende Phase über und endet in einer, der akuten Leukämie ähnelnden, tödlichen Blastenkrise mit myeloischer und lymphoider Differenzierung.^{9, 10} Sowohl die Ätiologie als auch auslösende Faktoren sind bis dato weitgehend unbekannt. Einzig Strahlenexposition¹¹ und Benzolexposition¹² werden als etablierte Risikofaktoren anerkannt.¹³ Mit einer jährlichen Inzidenz von etwa 1 bis 2 Neuerkrankungen pro 100 000 Einwohner stellt die CML zwar eine seltene Erkrankung dar,¹³ macht jedoch etwa 15 % aller Leukämien aus und gehört damit zu den häufigsten bösartigen hämatologischen Erkrankungen.¹⁴ In Deutschland erkranken in jedem Jahr circa 1000 bis 1200 Patienten, wobei Männer im Verhältnis 1,2 - 1,7 : 1 häufiger als Frauen betroffen sind.¹³ Die Erkrankung kann Patienten aller Altersgruppen betreffen, tritt jedoch vergleichsweise selten im Kinder- und Jugendalter auf.¹⁵ Mit fortschreitendem Lebensalter wird sie häufiger und findet ihren Erkrankungsgipfel im 6. Lebensjahrzehnt (Medianalter in westlichen Ländern: 57-60 Jahre).^{13, 16-18} Die jährliche Mortalität beträgt etwa 1,7 % und ist rückläufig, weshalb die Prävalenz bei konstanter Inzidenz steigt.^{19, 20}

Die CML gilt als Modell der hämatologischen Onkogenese, da sich ihr Verlauf auf viele Tumorentitäten übertragen lässt und ihre Pathogenese vergleichsweise gut erforscht ist.²¹ Lange Zeit bedeutete die Diagnose einer CML fast immer einen fatalen Ausgang.¹⁹ Dass die Lebenserwartung von CML-Patienten inzwischen nahezu der Lebenserwartung gleichaltriger Gesunder entspricht,^{13, 16, 22-25} ist nicht zuletzt der Einführung von Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI) wie Imatinib (IM) um die Jahrtausendwende zu verdanken.^{26, 27} Diese Inhibitoren hemmen spezifisch das *BCR-ABL* Onkoprotein und revolutionierten die Behandlung der CML.²⁸ Sie sind als

Wegbereiter für die Entdeckung von Zielstrukturen anderer onkologischer Erkrankungen und die Entwicklung von inhibitorischen „*small molecules*“ zu sehen (sogenannte „*targeted therapies*“).²¹ Trotz dieser Erfolge zeigen etwa 10 % der Patienten kein Ansprechen auf die Therapie mit IM oder TKIs der zweiten Generation (2GTKIs).²⁹

1.1.1 Klinisches Bild

Unter Hämatopoese wird die Bildung unserer Blutzellen im Knochenmark aus „Mutterzellen“ oder pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) verstanden. Aus diesen Stammzellen entstehen durch Zellteilung undifferenzierte Vorläuferzellen, sogenannte Progenitorzellen. Durch den Einfluss von Wachstumsfaktoren entwickeln sich die Progenitorzellen in drei verschiedene Blutzellgruppen. Es werden die Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten unterschieden. Abbildung 1 zeigt ein Schema der Hämatopoese.

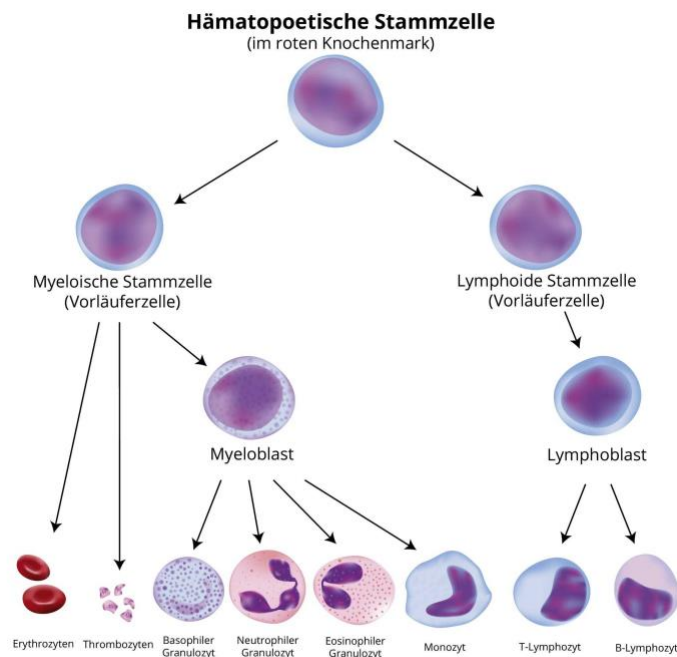


Abbildung 1: Hämatopoese (Blutbildung), Darstellung Bringer, D; Mekras, G.³⁰

Diese reifen Blutzellen erfüllen viele lebenswichtige Funktionen, haben jedoch nur eine begrenzte Lebensdauer. Es ist daher entscheidend, dass die Blutbildung im Knochenmark (KM) ausgewogen reguliert ist. Bei der CML handelt es sich um eine Erkrankung einer pluripotenten HSZ, wodurch granulozytäre Leukozyten der myeloiden Reihe fehlerhaft gebildet werden und nicht funktionsfähige Vorläuferzellen (Blasten) ins Blut abgeben werden. Die CML ist klonal myeloproliferativ, da die von dieser erkrankten Stammzelle abstammenden Granulozyten und Blasten im Übermaß gebildet werden. Das äußert sich zu Beginn der Erkrankung, der sogenannten Chronischen Phase (CP) darin, dass die Leukozytenanzahl im Blut erhöht ist (Leukozytose). Zudem kommt es zu einer kontinuierlichen, pathologischen Linksverschiebung. Hierunter versteht man das vermehrte Auftreten im Blut unreifer Vorstufen der Myelopoese (siehe Abbildung 2A). Da diese Masse an Blutzellen auch

abgebaut werden muss, kann es in diesem Stadium zu einer graduell unterschiedlich ausgeprägten Vergrößerung der Milz (Splénomegalie) kommen, in welcher der Abbau stattfindet. Folge dessen können unspezifische Oberbauchschmerzen sein. Häufig tritt auch eine Blutarmut (Anämie) auf, da das KM durch die vermehrte Bildung von Leukozyten der Bildung von Erythrozyten nicht mehr gerecht werden kann. Im Labor wird die Anämie durch einen verminderten Farbstoffgehalt der Erythrozyten (Hämoglobin) unter 12 – 14 g/dl oder eine Reduktion des prozentuellen Anteils der Erythrozyten am Blutvolumen (Hämatokrit) unter 37 – 40 % festgestellt. Da Erythrozyten unter anderem für den Sauerstofftransport in unserem Körper zuständig sind, kann sich diese Anämie beispielsweise im Sinne einer Einschränkung der Atmung (Dyspnoe), aber auch in allgemeiner Schwäche, Blässe oder Leistungsminderung äußern. Wie bei vielen malignen Prozessen kann auch eine B-Symptomatik auftreten, eine Symptomtrias aus Fieber ($> 38,5\text{ }^{\circ}\text{C}$), Gewichtsverlust ($> 10\%$ in den letzten 6 Monaten) und Nachtschweiß. Bei manchen Patienten wird die Produktion der Thrombozyten durch die Erkrankung beeinträchtigt, was sich in Form einer Thrombozytose oder einer verringerten Thrombozytenzahl, einer Thrombopenie, ausprägt. Der natürliche Krankheitsverlauf der CML wird in drei Stufen eingeteilt. In der ersten Stufe (CP) kann die Erkrankung dank des Einsatzes von TKI bei den meisten Patienten lebenslang bis an die Nachweisgrenze zurückgedrängt werden (Remission). Spricht der Patient jedoch beispielsweise aufgrund einer Resistenz nicht auf die Therapie an, kann die CML in die Akzelerierte Phase (AP) fortschreiten. Hierbei kommt es zu einer Verschlechterung des Blutbildes mit einer vermehrten Abgabe von Blasten ins Blut und zusätzlichen Veränderungen des Erbguts. Gelingt durch eine adäquate Therapie keine Rückführung in die CP, treten die Patienten nach Übergang in die Blastenphase (BP) in die Blastenkrise ein, welche den akuten Leukämien ähnelt. Hierbei bildet das KM so viele insuffiziente Blasten, dass kaum mehr funktionstüchtige Blutzellen im Blut vorhanden sind. So kann die CML in der Blastenkrise durch fulminante Komplikationen wie eine ausgeprägte Anämie, eine erhöhte Infektanfälligkeit oder Blutungen innerhalb weniger Wochen zum Tode führen.⁸

1.1.2 Diagnostik

Die Diagnose einer CML erfolgt häufig zufällig im Rahmen einer routinemäßigen Blutbildbestimmung und liegt hierbei in mehr als 97 % aller Fälle in der CP vor. Bei einem Verdacht auf eine CML erfolgt eine multimodale Diagnostik. Anamnestisch stellen sich die Patienten bei symptomatischer Erkrankung mit einer unspezifischen Symptomatik wie anhaltender Abgeschlagenheit und Schwäche vor. Vegetativ wird häufig eine Appetitlosigkeit oder ein Gewichtsverlust berichtet. Auch sollten Knochenschmerzen oder Oberbauchbeschwerden anamnestisch erfragt werden. In der körperlichen Untersuchung erfolgt die Messung der Milz- und Lebergröße. Durch die Abnahme von peripherem Blut ist eine Blutbildbestimmung inklusive Leukozytendiagnostik mit Differentialblutbild, Bestimmung der Thrombozyten, des Hämoglobins, des Hämatokrits und der Blutzellzahl indiziert.¹⁹ Hinweisend auf die Verdachtsdiagnose können beispielsweise eine Leukozytose, Thrombozytose, die Detektion von unreifen Vorläuferzellen der Leukozyten (Blasten) oder eine Anämie sein. Darüber hinaus wird eine Laborkontrolle im Sinne eines standardisierten biochemischen Profils mit Hepatitis B Serologie und Bestimmung von ergänzenden Parametern wie Cholesterolemie, Lipase oder Hämoglobin A1c Werten sowie die Durchführung eines Elektrokardiogramms (EKG) empfohlen.²⁹

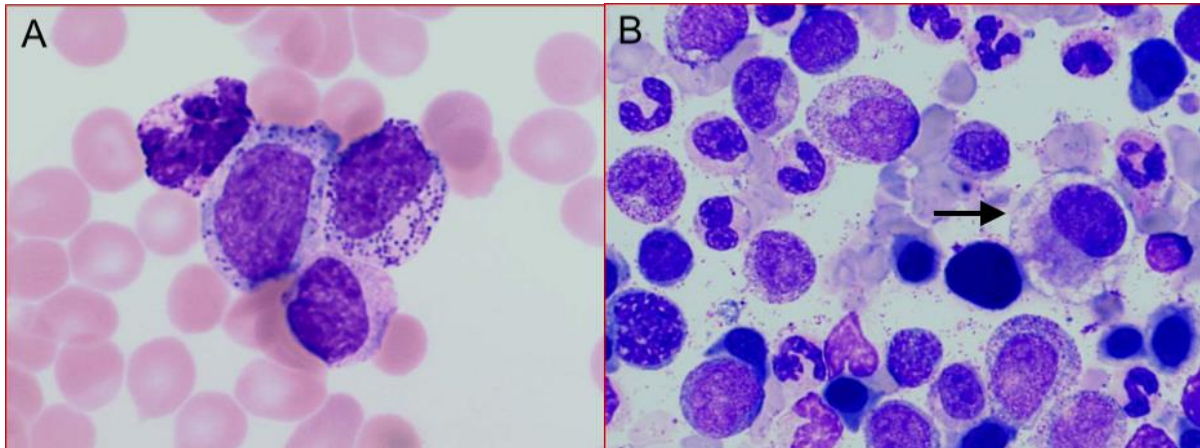


Abbildung 2: Zytomorphologische Untersuchung, panoptische Färbung nach Pappenheim, Darstellung Fuchs, R; Brümmendorf, T; Haase, D.³¹

Um basophile, neutrophile und eosinophile Strukturen darstellen zu können, werden bei der panoptischen Färbung nach Pappenheim („May-Grünwald-Giemsa-Färbung“) luftgetrocknete Blutausstriche mit mehreren Farblösungen behandelt. (A) CML CP, Blutausstrich. Charakteristisches Bild mit basophilem Granulozyten, zwei Promyelozyten, einem Myelozyten. (B) CML CP, KM. Myeloische Hyperplasie mit charakteristischem Mikromegakaryozyt (Pfeil).

Zur Diagnosesicherung ist eine Untersuchung des KMs via KM-Aspiration unabdinglich. Hierdurch kann sowohl die Analyse der Zytologie als auch der Zytogenetik erfolgen. Im Rahmen der Zytologie wird insbesondere der Anteil und die Beschaffenheit von Blasten und Basophilen, aber auch die Morphologie der Megakaryozyten untersucht. So können beispielsweise die für die CML charakteristischen einkernigen Mikromegakaryozyten detektiert werden (Pfeil, Abbildung 2B). Durch das Verhältnis der Blasten und Basophilen erfolgt die Unterscheidung zwischen CP und AP/BP. Auch die für die CML typische kontinuierliche Linksverschiebung kann hier beobachtet werden. In der Zytogenetik gelingt über eine Analyse der Metaphasen die Sicherung der Diagnose. Hierzu wird die für das Ph Chromosom ursächliche Translokation (9;22)(q34;q11) mittels einer Giemsa-Färbung der Chromosomenbanden während der Metaphase nachgewiesen. Falls das Ph Chromosom nicht darstellbar ist, die Molekulardiagnostik jedoch *BCR-ABL1*-Transkripte aufzeigt, kann die Sicherung der Diagnose auch mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung aus KM- oder peripheren Blutproben erfolgen. Mittels KM-Biopsie kann darüber hinaus eine Bestimmung im Aspirat nicht detektierter Blasten sowie des Fibrosegrads erfolgen, welcher prognostischen Wert hat.^{19, 32-34} Um den Therapieerfolg evaluieren und überwachen zu können, sollte aus einer peripheren Blutprobe der Nachweis von *BCR-ABL1*-Transkripten¹⁹ sowie die Identifikation des Transkripttyps mittels qRT-PCR (qualitative Reverse-Transkriptase *polymerase chain reaction*, Multiplex-PCR) erfolgen. Die exakte Transkripttypisierung ist schon bei Diagnosestellung substanziell, da atypische Transkripte oder Bruchpunktvarianten, welche bei etwa 2 bis 4 % der CML-Patienten vorliegen, eventuell von den qRT-PCR-Standardprotokollen im Therapieverlauf nicht detektiert werden. So könnte der fehlerhafte Eindruck eines Therapieerfolgs im Sinne einer *Major Molecular Response* (MMR), einer guten molekularen Remission, entstehen. Die Durchführung einer quantitativen RT-PCR ist hingegen nicht verpflichtend bei Diagnosestellung.²⁹

Die Einstufung des Patienten in die Verlaufsstufen der CML basiert auf hämatologischen Parametern³⁵⁻³⁷ und ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: ELN-Kriterien für die Einteilung in die verschiedenen Verlaufsphasen der CML³⁵⁻³⁷

Phase	Peripheres Blut oder KM
Chronische Phase	< 15 % Blasten
Akzelerierte Phase	15 – 29 % Blasten oder > 30 % Blasten plus Promyelozyten (mit < 30 % Blasten) oder ≥ 20 % Basophile im Blut oder persistierende und therapieunabhängige Thrombozytopenie (< 100 000/μl) oder Entstehung klonaler chromosomaler Abnormalitäten in Ph+ Zellen (<i>major route</i>) unter Therapie
Blastenphase	≥ 30 % Blasten oder extramedulläre Blastenproliferation (außer Milz)

ELN, European LeukemiaNet.

Nach den Kriterien des European LeukemiaNet (ELN) erfolgt die Abgrenzung von der CP in die AP primär durch den Blastenanteil im Blut oder KM. Von der CP wird bis zu einem Anteil von 15 % ausgegangen. Liegt der Blastenanteil über 15 %, ist von einer AP auszugehen. Auch eine neu entstandene klonale Evolution, zunehmende Basophilie sowie eine persistierende Thrombozytopenie können Anzeichen für den Progress der CML in die AP sein. Der Grenzwert für die Blastenkrise ist ab 30 % Blasten im KM oder peripheren Blut definiert (Tabelle 1). Abbildung 3 vergleicht Ausstriche peripheren Bluts von einer gesunden Person und eines CML-Patienten in der BP. Hierbei wird insbesondere die Leukozytose sowie der erhöhte Blastenanteil im Vergleich zu den anderen Blutzellen deutlich.

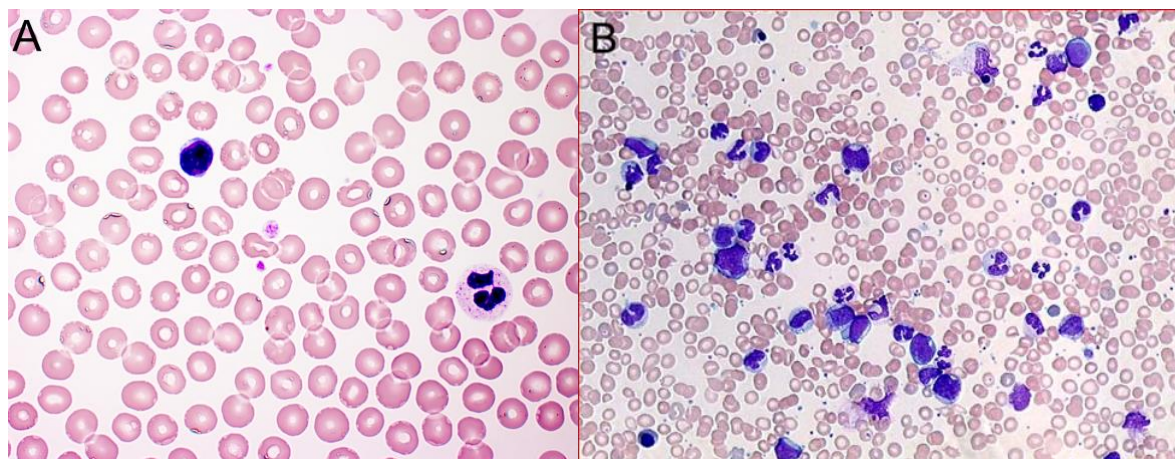


Abbildung 3: Vergleich zwischen Blutausstrichen einer gesunden Person sowie eines Patienten mit CML in Blastenkrise, Zytomorphologische Untersuchung, panoptische Färbung nach Papanheim, Darstellung (A) Institut für Pathophysiologie, Semmelweis Universität, Budapest,³⁸ Darstellung (B) Fuchs, R; Panse, J.³⁹

(A) Normalbefund, gesunde Person. (B) CML Blutausstrich, Blastenschub. Myeloischer Blastenschub mit zahlreichen, teilweise stark granulierten myeloischen Blasten.

Der Patient wird in die CP zurückgestuft, wenn keine der Kriterien der AP zutreffen beziehungsweise die Kriterien bezüglich der Blasten oder Basophilen im Verlauf, beispielsweise unter Therapie, nicht mehr darstellbar sind.³⁵⁻³⁷ Von einer

grundlegenden Progression der Erkrankung wird ausgegangen, wenn der Patient auf die Behandlung mit zwei verschiedenen TKI nicht anspricht, eine *BCR-ABL1 kinase domain* (KD)-Mutation oder zusätzliche chromosomale Aberrationen in Ph+ (Ph positiven) Zellen nachweisbar sind.^{17, 40-42} An den verschiedenen Einteilungsparametern wird deutlich, dass eine eindeutige Unterscheidung der verschiedenen Verlaufsphasen eine große Herausforderung darstellt (Tabelle 1).^{17, 36}

1.1.3 Zytogenetik

Die CML gilt als erste Erkrankung, bei der eine zugrunde liegende spezifische Chromosomenaberration als Auslöser entdeckt werden konnte.⁵ Ursächlich ist die reziproke Chromosomentranslokation t(9;22)(q34;q11), welche 95 % aller CML-Patienten aufweisen.^{3, 5} Durch diese Translokation entsteht ein im langen Arm verkürztes Chromosom 22. Dieses Ph Chromosom trägt das pathogenetisch essentielle *BCR-ABL*-Fusionsgen (Abbildung 4). Darüber hinaus entsteht ein im langen Arm verlängertes Chromosom 9 (9q+) mit einem *BCR-ABL*-Fusionsgen ohne pathogenetische Bedeutung. 5 % aller CML-Patienten besitzen ein *BCR-ABL*-Fusionsgen ohne Ph Chromosom.⁴³

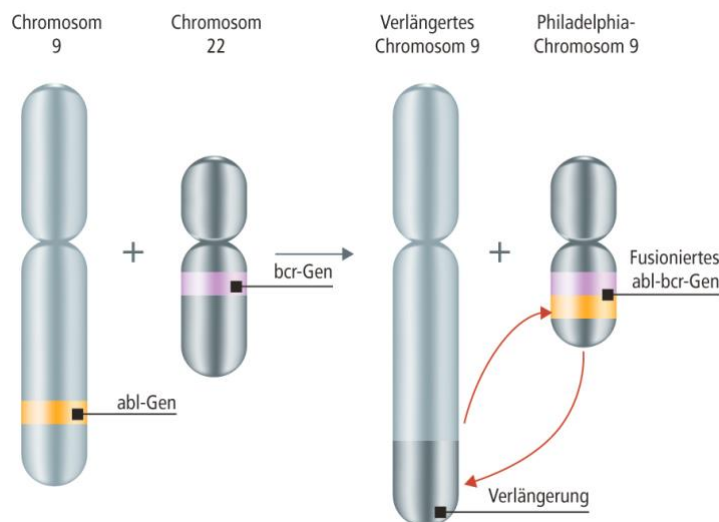


Abbildung 4: Graphische Darstellung des Philadelphia-Chromosoms, Darstellung Interpharma.⁴⁴ Das *BCR-ABL* Fusionsgen, welches für ein Fusionsprotein mit Tyrosinkinaseaktivität codiert, entsteht durch eine reziproke Chromosomentranslokation von Chromosom 9 und 22.

Zusätzliche Chromosomenveränderungen liegen zum Diagnosezeitpunkt bei 10 – 15 % der Patienten in CP vor und korrelieren mit einer Progression der Erkrankung. Im weiteren Krankheitsverlauf weisen etwa 80 % der Patienten zusätzliche Aberrationen oder Mutationen auf, da aufgrund der sogenannten „klonalen Evolution“ immer häufiger Zellklone mit einem aggressiveren Phänotyp selektiert werden.^{45, 46} Vermutlich ist hierfür eine genetische Instabilität ursächlich.⁴⁷ Die Progression aus der karyotypisch stabilen CP in die BP stellt durch das Auftreten zahlreicher numerischer Chromosomenaberrationen⁴⁸ sowie dem Auftreten aggressiverer Blasten im peripheren Blut eine schlechte Prognose für betroffene Patienten dar. Es wird angenommen, dass diese numerischen Aberrationen die Folge

einer Fehlsegregation der Schwesterchromatiden während der Zellteilung sind.⁶ In der AP finden sich bei 30 % und in der BP in bis zu 80 % zusätzliche chromosomale Aberrationen oder genetische Mutationen.⁴⁵ Unter *major route* Aberrationen werden hierbei häufig auftretende Veränderungen wie eine Trisomie 8, 19, eine Duplikation des Ph Chromosoms oder ein Isochromosom des Chromosoms 17, i(17)(q10), zusammengefasst. Diese *major route* Aberrationen indizieren eine höhere Progressionsrate in die AP und BP sowie eine schlechtere Prognose.^{40, 46}

1.1.4 Molekularbiologie

Im Rahmen der beschriebenen Chromosomentranslokation t(9;22)(q34;q11) wird das Gen *BCR* (*breakpoint cluster region*) durch Kürzung des Chromosoms 22 (22q11) reziprok an das *ABL* (*Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1*) Gen auf Chromosom 9 verlagert. Hierbei bricht das *ABL*-Protoonkogen auf Chromosom 9q34 zwischen dem ersten (a1-) und zweiten (a2-) Exon.⁴³ Die übrig bleibenden Exons a2-a11 fusionieren mit dem Bruchbereich im *BCR*-Gen (Chromosom 22), welcher die *BCR*-Exons 12 bis 16 (früher b1-b5) umfasst und als „*major breakpoint cluster region*“ bezeichnet wird (M-*BCR*).⁴⁹ Das entstehende Fusionsprotein variiert in seiner Größe und ist abhängig davon, wo der Bruchpunkt im *BCR*-Gen liegt (siehe Abbildung 5). Hierbei werden drei verschiedene Bruchpunkt-Clusterregionen unterschieden: major (M-*BCR*), minor (m-*BCR*) und mikro (μ -*BCR*).⁴³

Auf dem verkürzten Chromosom 22 liegt bei der Mehrzahl der Patienten das hybride p210^{*BCR-ABL*} Fusionsprotein vor,⁵⁰ welches eine konstitutive Tyrosinkinaseaktivität aufweist. Hierdurch führt es zu der malignen Transformation der Zellen, da es zu einer massiven Vermehrung von Zellen der myeloischen Reihe führt, indem Proliferations-, Differenzierungs- sowie Apoptoseverhalten gestört werden.⁴³

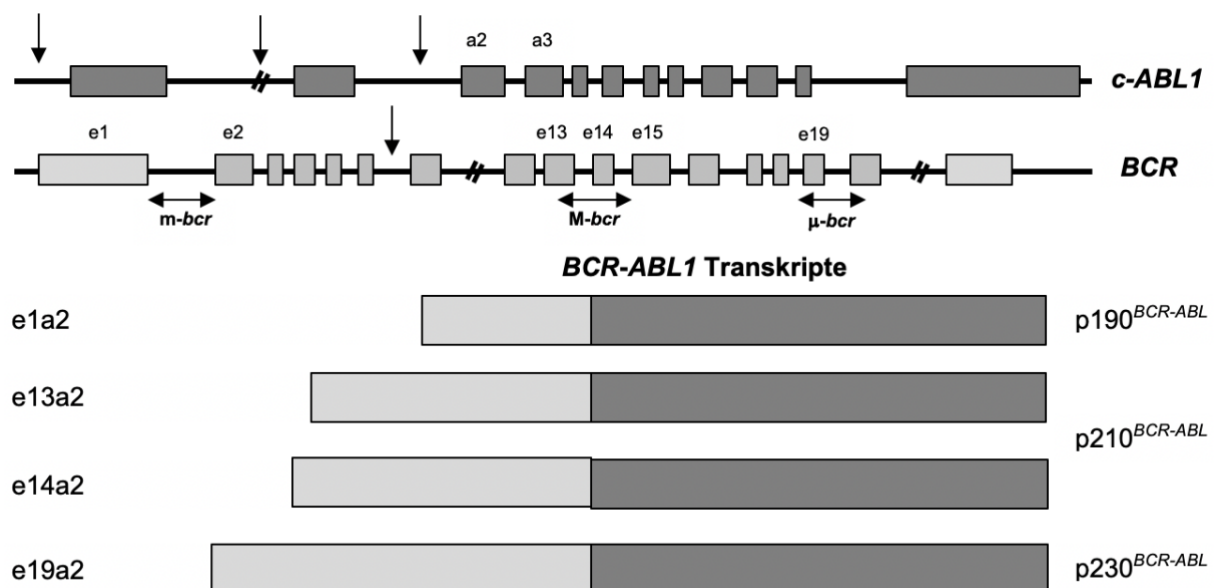


Abbildung 5: Lokalisation der Bruchpunkte des *ABL*- und *BCR*-Gens und resultierende *BCR-ABL1*-Fusionsproteine. Dargestellt sind e1a2, e13a2, e14a2 und e19a2. Eigene Darstellung nach Deininger, MW et al.⁵¹ m, minor; M, major; μ , mikro.

Von den verschiedenen Bruchpunktvarianten, welche auftreten können, stellen die Varianten e13a2 (früher b2a2) und e14a2 (früher b3a2) die häufigsten dar, welche für p210^{BCR-ABL} (M-bcr) codieren.^{43, 52} Bei CML-Patienten mit der Variante e14a2 konnten im Vergleich zu Patienten mit e13a2 leicht erhöhte Thrombozytenzahlen nachgewiesen werden.⁵³⁻⁵⁵ In seltenen Fällen können Zellen mit dem e14a12 Fusionsgen durch alternatives Spleißen, einem Schritt in der Weiterverarbeitung der Ribonukleinsäure, auch ein e13a2 Transkript aufweisen. Beide Transkripte werden ebenso in das p210^{BCR-ABL} Protein translatiert. Eine weitere Bruchpunktvariante, e19a2, bildet die p230^{BCR-ABL} Variante (μ -bcr) und ist häufig mit einer Thrombozytose und prominenter Reifung der Neutrophilen verbunden. Für die Bruchpunktvarianten e13a2, e14a2 und e19a2 konnte keine prognostische Relevanz nachgewiesen werden.⁵² In wenigen CML-Fällen transloziert *ABL* in den m-*BCR* Bereich und führt zu einem e1a2 Transkript, welches für p190^{BCR-ABL} codiert. CML-Patienten mit dieser Variante haben eine schlechtere Prognose^{52, 56} und weisen im Blutbild häufig eine Monozytose, eine fehlende Basophilie und die Tendenz zu einer Progression in eine lymphoide BP auf.⁵⁷⁻⁵⁹

Bis heute ist die physiologische Funktion des Proteins BCR weitgehend unklar, obwohl es in allen Geweben auffindbar ist und sich im Zellkern oder Zytoplasma der Zelle befindet. Bekannt ist, dass BCR mittels seiner Serin/Threonin-Kinase-Aktivität GTPasen (Guaninnucleotid-bindende Proteine) aktivieren kann.^{49, 60-62} Die Nichtrezeptor-Tyrosinkinase ABL wird ebenso ubiquitär exprimiert und partizipiert an diversen zellulären Prozessen wie Differenzierung, Apoptose, Migration und Adhäsion.⁶³ Hierbei interagiert ABL sowohl mit Zellzyklusregulatoren, Transkriptionsfaktoren als auch mit Phosphatasen und Kinasen und bewegt sich dabei zwischen Zytoplasma und Zellkern hin und her. Die Kinaseaktivität von ABL wird dabei durch sterische Autoinhibition des aktiven Zentrums supprimiert.⁶⁴ Erfolgt nun im Rahmen der Translokation der Bruch des BCR-Gens, bleibt sein Promoter unversehrt und kontrolliert das entstehende *BCR-ABL1*-Hybridgen. Dieses Onkogen fördert die genomische Instabilität der Zelle, eine mögliche Ursache für die Transformation in die BP, indem es die Reparatur der DNA (Desoxyribonukleinsäure) inhibiert.⁵¹ Aus diesem wird im Folgenden das BCR-ABL Onkoprotein translatiert. Hierbei handelt es sich um eine Serin-Threonin-Kinase mit konstitutiver Tyrosinkinaseaktivität, welche auf das erste *BCR*-Exon zurückzuführen ist.^{65, 66} Seine N-terminale „coiled coil“ Domäne bewirkt, dass sich die BCR-ABL1-Proteine miteinander dimerisieren sowie tetramisieren. Infolge dessen liegen die Proteine räumlich so nah beieinander, dass ABL sich an seinen Aktivierungsdomänen selbst autophosphoryliert. Im Zuge dessen wird die inhibierte Kinaseaktivität von ABL ohne Beihilfe anderer zellulärer Botenproteine aufgehoben⁶⁴ und das BCR-ABL Onkoprotein kann die aberrante Proliferation der HSZ und ihrer Progenitorzellen orchestrieren.⁵² Hierfür interagiert es mit einer Vielzahl von Enzymen und Proteinen, welche den Zellzyklus steuern. Dies wiederum gipfelt in einer schnelleren Zellteilung und verhindert den selbstinduzierten Zelltod, die Apoptose.^{67, 68} Zu den mitogenen Signalwegen gehört beispielsweise der MAPK (*RAS-mitogen-activated protein kinase*) Signalweg, welchen ABL aktiviert, indem es einen Tyrosinrest an BCR phosphoryliert. Einer Apoptose wird über Stimulation der JAK/STAT (*signal transducer and activator of transcription 3*) Signalkaskade oder Rekrutierung der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3-Kaskade) entgegengewirkt.⁵¹ Durch Einwirkung von BCR und Phosphorylierung von Zytoskelettkomponenten entstehen adhäsive Anomalien. Es wird vermutet, dass diese Schwächung der Zellintegrität zu einer Ausschwemmung der unreifen HSZ und ihrer Vorläufer aus dem KM-Stroma ins Blut führt.⁶⁹⁻⁷¹

1.1.5 Prognose

Die Beurteilung der Prognose kann anhand mehrerer Scores erfolgen. Nach Abschluss der „European Treatment and Outcome Study“ (EUTOS) wurde der EUTOS-Score eingeführt. Hierdurch kann die Wahrscheinlichkeit eines Patienten, CCyR zu erreichen, anhand des Anteils an Basophilen im peripheren Blut und der Milzgröße zum Diagnosezeitpunkt bestimmt werden.⁷² Heutzutage wird die Anwendung des „EUTOS-Long Term Survival (ELTS)-Scores bevorzugt, welcher das CML-spezifische Überleben berücksichtigt und auch bei Minderjährigen angewendet werden kann.⁷³⁻⁷⁵ Der ELTS-Score wird, anders als der EUTOS-Score, neben der Milzgröße über die Parameter Alter, Thrombozyten und dem Anteil der Blasten in Prozent ermittelt. Darüber hinaus findet sich mit der Bestimmung eines intermediären Risikos eine differenziertere Darstellung des Risikos (siehe Tabelle 2).⁷⁶

Tabelle 2: Definitionen des EUTOS- und ELTS-Scores zur Einschätzung der Prognose von CML-Patienten⁷⁵

Score	EUTOS	ELTS
Parameter	Milzgröße (unterhalb des Rippenbogens) in cm % Basophile im peripheren Blut	Milzgröße (unterhalb des Rippenbogens) in cm % Blasten im peripheren Blut Alter in Jahren Thrombozyten /nl
Wahrscheinlichkeit, keine CCyR zu Erreichen		
Niedriges Risiko	≤ 87	≤ 1,5680
Intermediäres Risiko	n.a.	1,5680 – 2,2185
Hohes Risiko	> 87	> 2,2187

EUTOS-Score: $4 \times \text{Milzgröße in cm unterhalb des Rippenbogens} + 7 \times \text{Basophilenanteil im peripheren Blut}$

ELTS-Score: $0,0615 \times \text{Milzgröße in cm unterhalb des Rippenbogens} + 0,1052 \times \text{Blastenanteil im peripheren Blut} + 0,0025 \times (\text{Alter in vollständigen Jahren}/10)^3 + 0,4104 \times (\text{Thrombozytenzahl}/1000)^{-0,5}$

EUTOS, European Treatment and Outcome Study; ELTS, EUTOS-Long Term Survival; CCyR, komplette zytogenetische Remission; n.a, nicht anwendbar.

1.1.6 Therapie, Ansprechen und Resistenzentwicklung

Vor der Etablierung von TKIs wurde die CML in der CP mit Hydroxyurea (HU) oder Cytarabinosid (Ara-C) in Kombination mit Interferon- α (IFN α) als Standardtherapeutikum behandelt.²¹

In der Erstlinientherapie der CML werden seit Einführung von IM 2001 TKIs eingesetzt. TKIs sind selektive Hemmstoffe von BCR-ABL1, welche dessen Aktivität im KM und somit die Proliferation dysfunktionaler Stamm- und Progenitorzellen unterdrücken. Sie verhindern über Besetzung der Bindedomäne der Tyrosinkinase ABL die ATP-Bindung und somit die Aktivierung der ABL-Effektorsignalwege.⁶⁴ Aktuell werden als Erstlinientherapeutika der „Goldstandard“ IM sowie 2GTKI wie Dasatinib, Nilotinib und Bosutinib eingesetzt.^{29, 77} Da alle verfügbaren TKIs die QT-Zeit verlängern können, sollte eine regelmäßige Kontrolle von Elektrolyten sowie des EKGs erfolgen.⁷⁸ Die Kriterien zur Auswahl des geeigneten TKIs beschränken sich nicht mehr auf das reine Überleben des Patienten. Auch Faktoren wie Effizienz, Toleranz, Toxizität und Kosten der Therapie sowie das Erhalten der Lebensqualität und die Vermeidung langfristiger Organschäden fallen ins Gewicht. Darüber hinaus liegen aktuelle Bestrebungen darin, das geeignete Therapieschema so zu optimieren, dass die TKI-Therapie gestoppt und

die sogenannte „Therapie-freie Remission“ (TFR) erreicht werden kann.²⁹ Vergangene Studien legten nahe, dass die Behandlung der CML mit TKIs nicht dauerhaft erfolgen muss, solange die Patienten besonders gutes molekulares Ansprechen wie eine über mindestens zwei Jahre stabile MMR⁷⁹ oder eine Reduktion von *BCR-ABL1* unter die Nachweisgrenze⁸⁰ zeigten. Bis zu 40 % dieser Patienten konnten nach Therapiestopp für mindestens drei Jahre einen MR3 Status aufrechterhalten.⁸¹ Aktuell untersuchen die NAUT (CML VII) sowie die Endure-Studie (CML IX) das TKI-Absetzen nach guter molekularer Remission. Ob solche Patienten auch langfristig von einem Absetzen der TKI-Therapie profitieren und welche Faktoren prädiktiv sind, wird derzeit beispielsweise in den Studien Euro-SKI⁸² und TIGER (CML V)⁸³ untersucht.

Erstlinientherapie

Imatinib

Als erster Vertreter seiner Klasse zeigt das „*First Line*“-Therapeutikum IM (Glivec®, Entwicklungsname STI-571) frühes molekulares Ansprechen nach 3 beziehungsweise 6 Monaten (*BCR-ABL1* ≤ 10,00 % IS) in 60 - 80 % sowie MMR nach einem Jahr (*BCR-ABL1* ≤ 0,10 %) in 20 – 59 % der Behandlungen.²⁹ Nach seiner Einführung im Jahr 2001 wurde seine Überlegenheit gegenüber der damaligen Standardtherapie mit IFN α und Ara-C im Rahmen der „International Randomized Study of Interferon and STI571“ (IRIS) Studie belegt. Hierbei zeigten die 553 mit IM behandelten Patienten eine normale Lebenserwartung, in 76 % wurde eine komplette zytogenetische Remission (CCgR) und in 39 % MMR erreicht.^{27, 84} Aufgrund seiner guten Wirksamkeit, vergleichsweise milden Nebenwirkungen sowie dem Fehlen absoluter Kontraindikationen werden IM und seine Generika weltweit eingesetzt.^{29, 85} Als Therapiestandard hat sich eine Tagesdosis von 400 mg in oraler Applikation etabliert. Eine Dosisreduktion kann in CP bei Erreichen von MMR in Erwägung gezogen werden. Bei Fortschreiten der CML in AP kann die Tagesdosis verdoppelt werden, wobei bei weiterer Progression ein Wechsel zu einem 2GTKI empfohlen wird.²⁹ IM ist ein Phenylaminopyrimidinderivat und hemmt neben BCR-ABL weitere Tyrosinkinase wie die Tyrosin-Protein-Kinase Kit, den *Platelet-derived growth factor receptor* (PDGFR) sowie Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase.⁸⁶ Darüber hinaus konnte eine Herunterregulierung der Telomeraseaktivität maligner Zellen unter IM-Therapie nachgewiesen werden.^{87, 88} Dieses breite Wirkspektrum bedingt den Einsatz von IM bei weiteren hämatologischen Tumorerkrankungen wie der akuten lymphatischen Leukämie (ALL)⁸⁹, den myelodysplastischen Syndromen (MDS)⁹⁰ oder bei einer Reihe von Hauttumoren⁹¹ und gastrointestinalen Stromatumoren.⁹²

Dasatinib

Dasatinib (Sprycel®) kann effektiv bei IM- oder Nilotinib-Resistenz aufgrund der *BCR-ABL1* Mutationen Y253H, E255V/K und F359V/I/C eingesetzt werden. Die empfohlene Dosierung beträgt 100 mg täglich.²⁹ Es zeigt mit höheren Raten von frühem molekularem Ansprechen und MMR eine höhere Potenz als IM bei ähnlichem progressionsfreier (PFS) und Gesamtüberleben (OS). Trotz gravierender pleuropulmonaler Nebenwirkungen konnte eine IM ähnliche Toleranz beobachtet werden.^{29, 93} Als Multikinaseinhibitor inhibiert Dasatinib zusätzlich zu ABL1 PDGFR, c-KIT, Ephrinrezeptorkinasen sowie Tyrosinkinase der SRC-Familie.⁹⁴

Nilotinib

Nilotinib (Tasigna®) inhibiert von allen TKIs ABL1 mit der höchsten Spezifität und BCR-ABL1 potenter als IM. Es ist bei den *BCR-ABL1* Mutationen F317L/V/I/C, T315A

und V299L einsetzbar und verfügt über eine bessere zelluläre Bioverfügbarkeit als IM.^{29, 95} Analog zu Dasatinib zeigten Patienten unter Nilotinib-Therapie mit seiner Standarddosierung von 300 mg ein besseres Ansprechen mit höheren Raten von Remissionen als unter IM-Therapie, jedoch eine ähnliches PFS und OS bei höheren Raten kardiovaskulärer Nebenwirkungen.²⁹ Nilotinib inhibiert zusätzlich die Tyrosinkinasen c-KIT, ARG, PDGFR sowie die der SRC-Familie.⁹⁶

Bosutinib

Auch für Bosutinib (Bosulif®) konnte eine höhere Wirksamkeit gegen *BCR-ABL1*, höhere Raten an frühem molekularem Ansprechen sowie MMR in seiner Erstlinien-Standarddosierung von 400 mg täglich als IM nachgewiesen werden.^{29, 97} Aktuell konnte seine Wirksamkeit bei einigen *BCR-ABL1*-Mutationen nur in vitro nachgewiesen werden.²⁹ Bosutinib hemmt BCR-ABL sowie die SRC-Kinasen, zeigt jedoch keine signifikante Wirksamkeit gegenüber c-KIT und PDGFR, was sein im Vergleich zu den anderen TKI verändertes Nebenwirkungsprofil erklärt.^{95, 98}

Zweitlinientherapie und weitere Therapieoptionen

Ponatinib

Ein TKI der dritten Generation (3GTKI), Ponatinib (Inclusig®), ist gegen alle bisher bekannten *BCR-ABL1*-Mutationen wirksam und potenter als alle anderen TKIs. Aufgrund seines kardiovaskulären Risikoprofils sollte Ponatinib in seiner Standarddosierung von 45 mg erst bei fehlendem Ansprechen auf zwei oder mehr 2GTKIs eingesetzt werden.^{29, 99}

(Vor-)Therapie mit HU und Ara-C

Bei Patienten mit starken Beschwerden oder starker Leukozytose kann aufgrund der Gefahr der Entstehung eines Hyperviskositätssyndroms auch vor Klärung des *BCR-ABL1*-Status initial eine Vortherapie mit HU (40 mg/kg Körpergewicht und Tag) erfolgen. Bei myeloischer Blastenkrise war eine Therapie mit Ara-C, einem Chemotherapeutikum der AML und Inhibitor der DNA-Replikation, insbesondere in Kombination mit IFN α , lange eine Therapieoption und führte hierbei zu einer Verlängerung der OS.^{21, 100}

Kombination mit IFN α

Durch die Konjugation mit Polyethylenglykol (PEG) konnte eine langsamere Freisetzung des Wirkstoffs und somit eine seltenere Applikation erreicht werden. Kürzlich sowie aktuell durchgeführte Studien legen eine Rückkehr der ehemaligen Erstlinientherapie⁸ IFN α als Co-Therapeutikum der CP nahe.^{29, 101} So konnte für die Kombinationen von IM¹⁰² und auch 2GTKIs¹⁰³ mit PEG-IFN α bei einigen Patienten ein besseres molekulares Ansprechen nachgewiesen werden.²⁹

Allogene Stammzelltransplantation

Bei Resistenz gegenüber zwei oder mehr 2GTKIs und Progression der Erkrankung sollte nebst experimentellen Ansätzen und dem Einsatz von Ponatinib eine allogene Stammzelltransplantation (allo-SZT) in Erwägung gezogen und die Suche nach einem HLA (Humane Leukozytenantigen)-kompatiblen Spender initiiert werden.²⁹ Aufgrund der Wirksamkeit der TKI-Therapie, des hohen Alters bei Erstmanifestation sowie der geringen Verfügbarkeit kompatibler Spender ist die Anwendung der allo-SZT eingeschränkt. Etwa 50 % der transplantierten Patienten können mittels allo-SZT von der CML geheilt werden. Zu den häufigsten Risiken einer allo-SZT gehören die Abstoßung des Transplantats, septische Komplikationen sowie die Entwicklung einer

chronischen *Graft versus Host*-Erkrankung. Des Weiteren wird durch die benötigte lebenslange Immunsuppression nach Transplantation die Entstehung von Zweitmalignomen begünstigt.^{81, 104}

Therapieansprechen

Für die Beurteilung des Therapieverlaufs und das langfristige Überleben der Patienten ist das Ansprechverhalten der Patienten auf das Therapeutikum ausschlaggebend. Das molekulare Monitoring findet über eine Quantifizierung der *BCR-ABL1* mRNA (*messenger* Ribonukleinsäure) im peripheren Blut statt. Hierzu erfolgt nach jeweils 3, 6, 12 und 24 Monaten eine quantitative RT-PCR (qRT-PCR) aus 10 ml EDTA (Ethyldiamintetraacetat)-antikoaguliertem Blut.²⁹ Die *BCR-ABL1*-Transkripte werden auf die internationale Skala (IS) bezogen, um zwischen verschiedenen Laboren eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu ermöglichen.¹⁰⁵ Hierbei erfolgt eine Umrechnung des Laborquotienten mit dem sogenannten Konversionsfaktor (CF).¹⁰⁶ Die IS stellt eine Ratio dar, mit welcher das Verhältnis zwischen *BCR-ABL1*-Transkripten zu *ABL1* Transkripten oder anderen international akzeptierten Kontrolltranskripten wie β -Glucuronidase (*GUSB*) dargestellt wird.²⁹ Die Dokumentation erfolgt wie in Abbildung 6 dargestellt: Die *BCR-ABL1*-Transkripte werden in Prozent auf einer Logskala und unterhalb der in der IRIS-Studie standardisierten Baseline aufgetragen. Hierbei korrespondieren 1,00 %, 0,10 %, 0,01 % und 0,0032 % mit einem Abstieg von 2, 3, 4, 4.5 und 5 logs.^{29, 105, 107, 108}

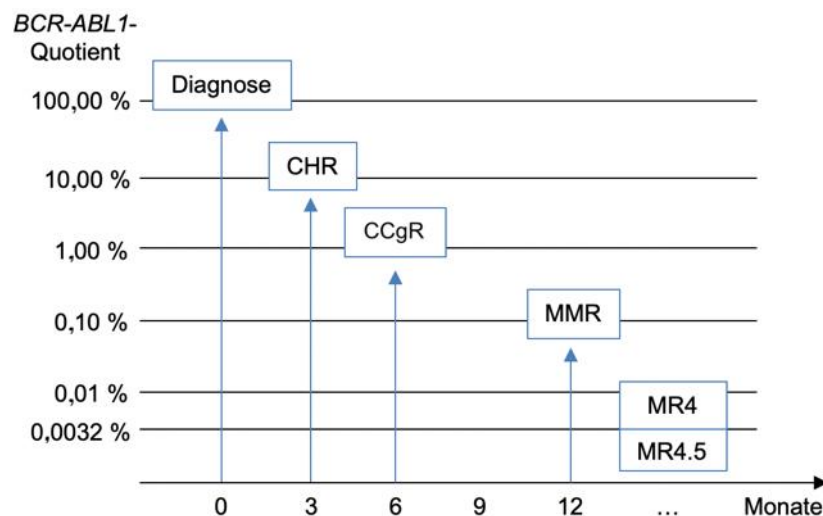


Abbildung 6: Monitoring des Therapieansprechens bei CML-Patienten unter TKI-Therapie, idealer Verlauf, eigene Darstellung nach Kompetenznetz Leukämie.¹⁰⁹ CHR, komplette hämatologische Remission; CCgR, komplette zytogenetische Remission; MMR, gute molekulare Remission; MR4, MR4.5, tiefe molekulare Remission.

Das Therapieansprechen wird über hämatologische, zytogenetische sowie molekulare Parameter definiert (siehe Tabelle 3). So wird das molekulare Ansprechen, wie eingehend erläutert, zunächst über die *BCR-ABL1/ABL1* Ratio evaluiert. Erreicht diese $\leq 0,10$ % auf der IS, wird von einer guten molekularen Remission gesprochen (MMR). Sind keine *BCR-ABL1*-Transkripte in 2 aufeinanderfolgenden Blutproben mehr detektierbar, befindet sich der Patient in kompletter molekularer Remission (CMR). Zytogenetisch erfolgt die Beurteilung des Ansprechens über die Detektion von Ph+ Zellen in Teilung oder Metaphasen. Von einer kompletten hämatologischen Remission

(CHR) wird ausgegangen, wenn im Differentialblutbild keine myeloischen Vorläuferzellen mehr nachzuweisen sind, sich die Leukozyten- und Thrombozytenzahl auf unter 10 000 Zellen/ μ l beziehungsweise 450 000 Zellen/ μ l reduziert haben, die basophilen Granulozyten weniger als 5 % der Leukozyten ausmachen und die Milz keine palpable Splenomegalie aufweist.^{29, 35-37, 110}

Tabelle 3: ELN-Kriterien des Therapieansprechens für CML-Patienten unter TKI-Therapie^{35, 36, 110}

Typ des Ansprechens	Definition
Hämatologisch	
Komplett (CHR)	<ul style="list-style-type: none"> Leukozyten < 10 x 10⁹/l Basophile < 5 % Keine Myelozyten, Promyelozyten, Myeloblasten im Differentialblutbild Thrombozytenzahl < 450 x 10⁹/l Nicht zu palpierende Milz
Zytopenetisch	
Komplett (CCgR)	Keine Ph+ Metaphasen
Partiell (PCgR)	1 % bis 35 % Ph+ Metaphasen
Minor (mCgR)	36 % bis 65 % Ph+ Metaphasen
Minimal (minCgR)	66 % bis 95 % Ph+ Metaphasen
Keine (noCgR)	> 95 % Ph+ Metaphasen
Molekular	
Komplett (CMR)	Nicht detektierbare <i>BCR-ABL1</i> mRNA-Transkripte via qRT- und/oder <i>nestet</i> PCR in 2 konsekutiven Blutproben angemessener Qualität (Sensitivität > 10 ⁴)
Major (MMR)	<i>BCR-ABL1</i> zu <i>ABL1</i> Ratio (oder zu anderem Housekeeping Gene) \leq 0.1 % auf der Internationalen Skala

ELN, European LeukemiaNet; TKI, Tyrosinkinaseinhibitor; CHR, komplette hämatologische Remission; CCgR, komplette zytopenetische Remission; PCgR, partielle zytopenetische Remission; Ph+, Philadelphia Chromosom positiv; mCgR, gute zytopenetische Remission; minCgR, kleine zytopenetische Remission; noCgR, keine zytopenetische Remission; CMoIR, komplette molekulare Remission; PCR, Polymerase-Kettenreaktion; MMR, gute molekulare Remission.

Nach dem Start der Therapie wird in den ersten Wochen zunächst eine Normalisierung des Blutbilds angestrebt und somit bestenfalls innerhalb der ersten drei Monate eine CHR erreicht. Idealerweise schließt sich nach sechs Monaten eine CCgR an, ein Sinken der Ph+ Zellzahl unter die Nachweisgrenze. Bei optimalem Ansprechen sollte spätestens nach 12-monatiger Therapie MMR eintreten und der in der PCR gemessene *BCR-ABL1*-Quotient 0,10 % oder weniger betragen. Spricht der Patient so gut auf die Therapie an, dass der *BCR-ABL1*-Wert auf unter 0,01 % oder unter 0,0032 % fällt, liegt eine tiefe molekulare Remission vor (MR4, MR4.5).

Basierend auf dem molekularen Monitoring der *BCR-ABL1*-Transkriptlevel nach 3, 6 und 12 Monaten empfiehlt das ELN Richtwerte, ob die derzeitige Therapie weitergeführt („optimales Ansprechen“) oder das Therapieschema oder Therapeutikum geändert werden sollte („Versagen oder TKI-Resistenz“). Überdies können hohe Risikoscores aufgrund von Komorbiditäten oder klinischen Parametern den Anlass geben, die Entscheidung einer Fortführung oder Änderung der Therapie gründlich zu evaluieren („Warnung“). Als 12-Monatskriterium wird hierbei ein Erreichen von MMR nach 12 Monaten definiert, folglich eine Reduktion der Transkripte um 3 Log-Stufen (10,00 % – 1,00 % – 0,10 %) nach IRIS. Folgende Meilensteine sollten

optimalerweise erreicht werden und sprechen für ein gutes Ansprechen auf die TKI-Therapie (Tabelle 4) ^{29, 37}:

Tabelle 4: Meilensteine des molekularen Monitorings von *BCR-ABL1*-Transkriptleveln²⁹

Zeit nach Beginn der TKI-Therapie in Monaten	<i>BCR-ABL1</i> -Transkriptlevel
3 Monate	<i>BCR-ABL1</i> ≤ 10,00 % (IS)
6 Monate	<i>BCR-ABL1</i> ≤ 1,00 % (IS)
12 Monate	<i>BCR-ABL1</i> ≤ 0,10 % (IS)

IS, Internationale Skala; für weitere Abkürzungen siehe Legende zu Tabelle 3.

Resistenzentwicklung

Treten im weiteren Verlauf erneut Ph+ Leukämiezellen auf oder kommt es zu einem Verlust des bereits erreichten MMRs oder CHRs, könnte dies auf ein Fortschreiten der Erkrankung und/oder einer Resistenz gegenüber dem verwendeten TKI zurückzuführen sein. In diesem Falle spricht der Patient nur unzureichend auf die Therapie an und es sollte eine Änderung des Therapieschemas oder der Wechsel auf einen anderen Inhibitor erfolgen. Von einem Therapieversagen wird ausgegangen, wenn nach 3 und 6 Monaten erfolgter TKI-Therapie die Zahl der *BCR-ABL1*-Transkripte im Blut noch mehr als 10,00 % und nach 12 Monaten noch mehr als 1,00 % nach IS beträgt. In dem Fall ist die Änderung des Therapieschemas beziehungsweise des Therapeutikums obligatorisch. Auch der Nachweis von Resistenzmutationen sowie die Entstehung neuer chromosomaler Aberrationen indizieren ein Fortschreiten der Erkrankung. In diesen Fällen kann als *Ultima Ratio* eine allogene Stammzelltransplantation durchgeführt werden.^{29, 35-37, 81} In der Leitlinie des ELN von 2020 sind die Kriterien für ein unzureichendes Ansprechen und eine Resistenz auf TKIs festgelegt.²⁹

Eine Resistenz gegen TKI kann in der Erstlinientherapie unter IM bei 10-15 % und unter 2GTKIs bei etwa 10 % der Patienten auftreten.²⁹ Diese sogenannte sekundäre Chemoresistenz kann verschiedene Ursachen haben. Auslöser wie eine MDR (*multidrug resistance*)¹¹¹, mangelnde Compliance des Patienten, eine erhöhte Verstoffwechslung durch Induktion der CYP3A4 (Cytochrom P₄₅₀ 3A4) Kaskade bei Einnahme weiterer Medikamente oder eine Überexpression von *BCR-ABL1* können durch eine konsequente Einnahme ausreichend hoher Dosen beeinflusst werden.^{29, 112} Darüber hinaus können klonale Evolution im Sinne von zusätzlichen chromosomalen Aberrationen (*additional chromosomal abnormalities, ACA*) oder die Aktivierung von *BCR-ABL1* unabhängigen Signalwegen eine Resistenz verursachen.²⁹ Hierbei können zytogenetische Risikoklassifikationen eine Einschätzung und risikoadaptierte Therapieanpassung ermöglichen.^{41, 113} Mutationen der KD des *BCR-ABL1* Fusionsgens führen zu einer Veränderung der räumlichen Konformation der TKI-Bindungsstelle und folgend zu einer nachlassenden Bindungsaffinität. Mit etwa einem Drittel aller Resistenzen von Patienten in CP und zwei Dritteln der Resistenzen von Patienten in AP und BP machen diese bis dato über 100 verschiedenen Punktmutationen etwa die Hälfte aller sekundären Chemoresistenzen aus.²⁹ Dementsprechend sollte der Wechsel des TKIs bei Therapieversagen mit einer Untersuchung der *BCR-ABL1* KD-Mutation einhergehen.^{29, 98, 114-116} Bietet der Einsatz von 2 oder mehr räumlich passenderen TKI nach KD-Mutationsanalyse keine Besserung des Ansprechens, sollte eine allogene Stammzelltransplantation in Betracht gezogen werden. Auch der Einsatz des 3GTKI Ponatinibs kann unter Berücksichtigung des kardiovaskulären Risikoprofils bei CML-

Patienten in der Endphase der Erkrankung mit unspezifischer Resistenz gegen 2GTKI erfolgen.^{29, 117} Neuste Erkenntnisse legen nahe, dass auch ein Persistieren eines leukämischen Stammzellklons (LSC), welcher *BCR-ABL1*-unabhängige Signalwege nutzt, Ursache für eine TKI-Resistenz sein kann.¹¹⁸⁻¹²⁰ Bei den Patienten mit Resistenz, bei welchen keine Mutation von *BCR-ABL1* als (alleinige) Ursache nachgewiesen werden kann, könnten in Zukunft Analysen des Genoms und der Expression relevanter Gene Aufschlüsse über zugrunde liegende somatische Mutationen als therapeutische Marker für schlechtes Therapieansprechen liefern.^{29, 121-123}

1.2 Zellzyklus, Zentrosomen und Zentrosomenzyklus

Als Zellzyklus wird die Abfolge verschiedener Aktivitätsphasen zwischen den Teilungen einer eukaryontischen Zelle bezeichnet. An verschiedenen Kontrollpunkten, sogenannten Checkpoints, wird die korrekte Abfolge der Zellzyklusphasen über spezielle Zellzyklusproteine wie Cycline und Cyclin abhängige Kinasen (CDKs) überwacht (siehe Abbildung 7). Deren Aktivierung erfolgt wiederum über Wachstumsfaktoren und Protoonkogene. An den Checkpoints kann sowohl der Zellzyklus arretiert oder über Auslösung apoptotischer Signalkaskaden der programmierte Zelltod eingeleitet werden.

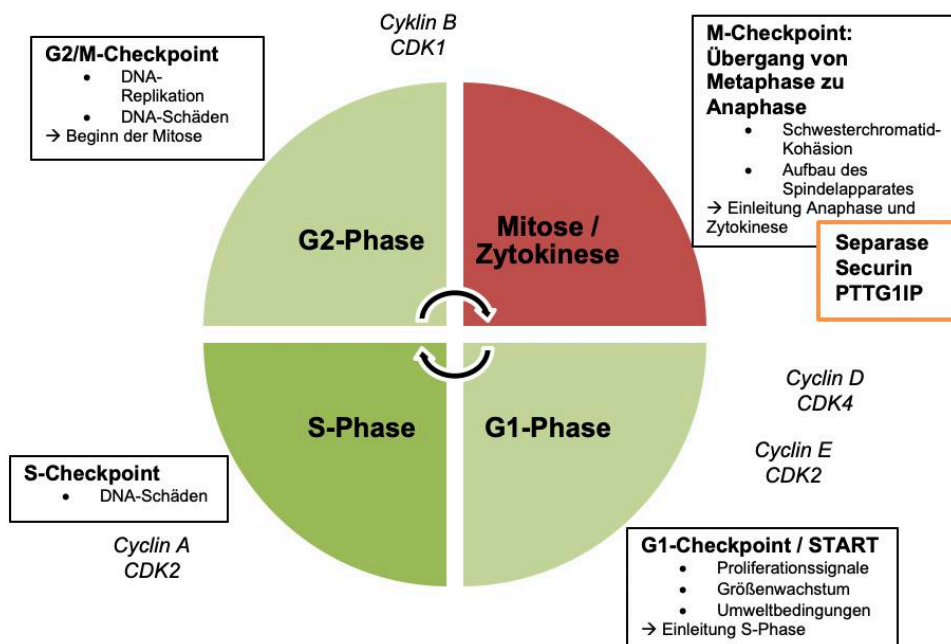


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Zellzyklus, eigene Darstellung nach Alberts et al.¹²⁴. Die Abbildung zeigt ein Zellzyklusschema inklusive Checkpoints zur Überprüfung des zeitlichen Ablaufs und der korrekten Durchführung (Kasten). Beteiligte Cycline und CDKs sind kursiv dargestellt. Die bei den Checkpoints M, G1/START, S und G2/M zu kontrollierenden Parameter sind zusammengefasst. Der M-Checkpoint wurde durch Nennung der für die Zentrosomenduplikation und Chromatidentrennung relevanten Proteine Separase, Securin und PTTG1IP erweitert. DNA, Desoxyribonukleinsäure; G1, Gap-1; G2, Gap-2; M, Mitose; S, Synthese; CDK, Cyclin depending kinase.

Das Zellorganell Zentrosom organisiert maßgeblich die Organisation, Bewegung und Form des Zytoskeletts der Zellen. Zentrosomen treten in der Zellteilung gepaart auf und sind für den Aufbau des mitotischen Spindelapparats zuständig. Die Mikrotubuli

binden an die Kinetochore der Zwei-Chromatiden-Chromosomen der Zelle und teilen über Trennung der Schwesterchromatiden die entstehenden Tochterchromosomen auf die beiden neu entstehenden Kerne der Tochterzellen auf.¹²⁵ Ein Zentrosom wird aus zwei senkrecht zueinanderstehenden Zentriolen, dem Mutter-(MC) und dem Tochterzentriol (TC) gebildet.¹²⁶ Die Zentriolen bestehen aus Mikrotubuli, welche über Cohesine miteinander verknüpft werden.¹²⁷ Die Duplikation des Zentrosoms erfolgt in proliferierenden Zellen genau einmal pro Zellzyklus in Abstimmung mit der Chromosomenduplikation während der S-Phase. Um den Aufbau einer bipolaren Mitosespindel zu garantieren, erfolgt eine akribische Regulation der Struktur und Anzahl. Hierdurch besitzt nach der Mitose jede Tochterzelle ein Zentrosom mit jeweils einem Paar voneinander getrennter Zentriole.^{128, 129} Zunächst werden die Zentriole während der G1-Phase getrennt, danach erfolgt in der S-Phase ihre Duplikation. Während der G2-Phase kommt es anschließend zu einer Elongation und Reifung der Zentriole, welche in der Zentrosomentrennung am Ende der G2-Phase resultiert. Die getrennten Zentrosomen migrieren während der M-Phase zu den Polen, um die Mitosespindel für die Chromosomentrennung aufzubauen. Für die korrekte Ausführung des ersten Schritts, der Zentriolentrennung, bedarf es mehrerer Hilfsproteine. Die Cystein-Endopeptidase Separase trennt nach ihrer Aktivierung in der späten Anaphase der Mitose MC und TC durch Spaltung des zentrosomalen Cohesins voneinander und ist von wesentlicher Bedeutung für die korrekte Verdopplung der Zentrosomen (siehe Abbildung 9). Treten bei der Regulation der Zentrosomenduplikationen Fehler auf, kann dies zu defektiven Zellteilungen sowie einer Fehlverteilung der Chromosomen führen. So wird das Auftreten aberranter Zentrosomen mit der Tumorgenese assoziiert.¹³⁰

1.3 Zentrosomale Aberrationen und Schlüsselproteine

Das Unvermögen einer Zelle, die Zentrosomenzahl zu kontrollieren, kann zu Zentrosomenamplifikationen (ZA) führen. ZA stellen ein auffälliges Charakteristikum einiger Präkanzerosen und aller malignen Tumore dar.¹³¹ Ursächlich hierfür sind Karzinogene oder Onkogene, welche zu Defekten in der Zentrosomenduplikation führen.^{132, 133} ZA werden als primäre Ursache in der Entstehung von defekten mitotischen Teilungsspindeln gesehen, was wiederum in einer Fehlverteilung der Chromosomen resultiert. Diese Fehlverteilung kann zentrosomale Instabilität (*centrosomal instability*, CIN) sowie Aneuploidie induzieren. Aneuploidie, eine aberrante Anzahl an Chromosomen, stellt ein Merkmal aller Tumore dar.

Der Krankheitsprogress von Patienten mit der *BCR-ABL 1*-Bruchvariante b3a2 (e14a2) korreliert mit einer erhöhten Aktivität der Separase, einem Schlüsselenzym des Zell- und Zentrosomenzyklus. Dem scheint eine aberrante Expression oder posttranslationale Dysregulation zugrunde zu liegen.¹³⁴ In zahlreichen humanen Krebszellen sowie abgeleiteten Zelllinien konnte eine Überexpression der Separase nachgewiesen werden.¹³⁵⁻¹³⁸ Verschiedene Modellsysteme und Tumoranalysen legen nahe, dass diese Überexpression oder außerplanmäßige Aktivierung ZA sowie eine Fehlverteilung der Chromosomen fördert. Eine Hyperaktivität der Separase wird mit der Karzinogenese assoziiert,¹³⁵ da sie in Zellen Aneuploidie induziert. Hierbei fungiert die hyperaktive Separase als regelrechtes Onkogen und steigert vermutlich über ZAs die Anfälligkeit der Zellen für Aneuploidie und DNA-Schäden.^{139, 140} In intakten Zellen unterliegt die Aktivität der Separase einer strengen zellzyklusabhängigen Kontrolle durch verschiedene Regelkreise und „*check points*“. Der wichtigste Mechanismus zur Verhinderung einer unerwünschten vorzeitigen Aktivierung ist die stöchiometrische Bindung von Securin (codiert von dem Gen *PTTG1*). Securin ist ein intrazellulärer

Regulator der Separase¹⁴¹ und benötigt für den posttranslationalen Transport in den Nukleus das Hilfsprotein PTTG1IP (PTTG1 *interacting protein*).¹⁴²

Abzuleiten ist, dass die Funktion der Separase durch die korrekte Expression der 3 Proteine (*ESPL1*/Separase, *PTTG1*/Securin, *PTTG1IP*/PTTG1IP) bedingt wird. Im Folgenden sollen die Funktionen und die Wechselwirkungen der Separase, des Securins und des *PTTG1 Interacting proteins* näher erläutert werden. In Abbildung 8 ist das Zusammenspiel der Proteine im Kontext des Zellzyklus grafisch dargestellt.

1.3.1 Separase

Die Separase wird bei Menschen durch das Gen *ESPL1* codiert. Als wichtiges Schlüsselenzym des Zellzyklus ist sie an der korrekten Zentrosomenduplikation und Chromosomentrennung während der Mitose beteiligt. Für die Zellteilung und die ordnungsgemäße Vererbung sind eine feste Schwesterchromatid-Kohäsion vor der Anaphase sowie deren rechtzeitige Trennung während des Übergangs von Meta- zu Anaphase entscheidend. Durch die Hydrolyse des Proteins Cohesins, welches im ungespaltenen Zustand die feste Bindung der Schwesterchromatiden während der frühen Anaphase sichert, leitet die Separase die Anaphase ein.¹⁴³ Das Cohesinprotein Rad21 sichert während der DNA-Replikation nicht nur die Schwesterchromatid-Kohäsion und die chromosomale Stabilität. Es fungiert darüber hinaus ungespalten als Klebeprotein und verbindet MC und TC der Zentrosomen. Das Cohesin besitzt eine ringartige Struktur, mit welcher es topologisch die Schwesterchromatiden umschließt. Hierfür öffnet sich das Cohesinmolekül, das Schwesterchromatid tritt in den Ring ein und Rad21 schließt daraufhin den Ring mitsamt dem Schwesterchromatid¹⁴⁴⁻¹⁴⁸ über die Verbindung zweier Untereinheiten (SMC1A und SMC3).^{146, 149} Wird nun die Separase vor der Anaphase aktiviert, erfolgt nach einer Phosphorylierung der Cohesin-Komplex-Einheiten STAG1 und STAG2 die proteolytische Spaltung des zentrosomalen Pols des Cohesins durch die Separase. Dies führt zur Loslösung der Zentriole und stellt den Startschuss für die Zentriolenduplikation in der folgenden S-Phase dar¹⁵⁰. Nachfolgend wird das chromosomale Cohesin, die Untereinheit SCC1 (RAD21) durch die Separase gespalten. Dies erlaubt die Trennung der Schwesterchromatiden über den motorischen Mikrotubulus-Apparat (Vergleich Abbildung 8).¹⁵¹⁻¹⁵³

In gesunden Zellen ist die Aktivität der Separase eng gekoppelt mit dem Zellzyklus, weshalb die Separase nur ein Mal pro Zyklus für kurze Zeit aktiviert wird. Wenn sich eine Zelle nicht in der Teilungsphase befindet, wird die ungeplante Aktivierung durch die stöchiometrische Bindung des Proteins Securin an der Separase verhindert.¹⁴¹ Weiterhin verhindern eine spezielle Phosphorylierung von Serin-Rückständen durch den Cyclin-CDK-Komplex, autokatalytische Spaltung sowie eine Proteinphosphatase 2-abhängige Stabilisation von Separase-gebundenem Securin die frühzeitige Spaltung des Cohesins und Trennung der Schwesterchromatiden.¹⁵⁴⁻¹⁵⁶ Eine Überexpression oder ungeplante Aktivierung der Separase kann zu einer frühzeitigen Chromatidentrennung oder Ausbildung verspäteter Chromosomen- und Anaphasenbrücken kommen, welche die ordnungsgemäße Trennung der Schwesterchromatiden in der Anaphase verhindern.¹³⁵ Auch eine entstehende Loslösung der Zentrosomenduplikation vom Zellzyklus kann in ZA, defekten mitotischen Spindeln und Aneuploidie resultieren.¹⁵⁷

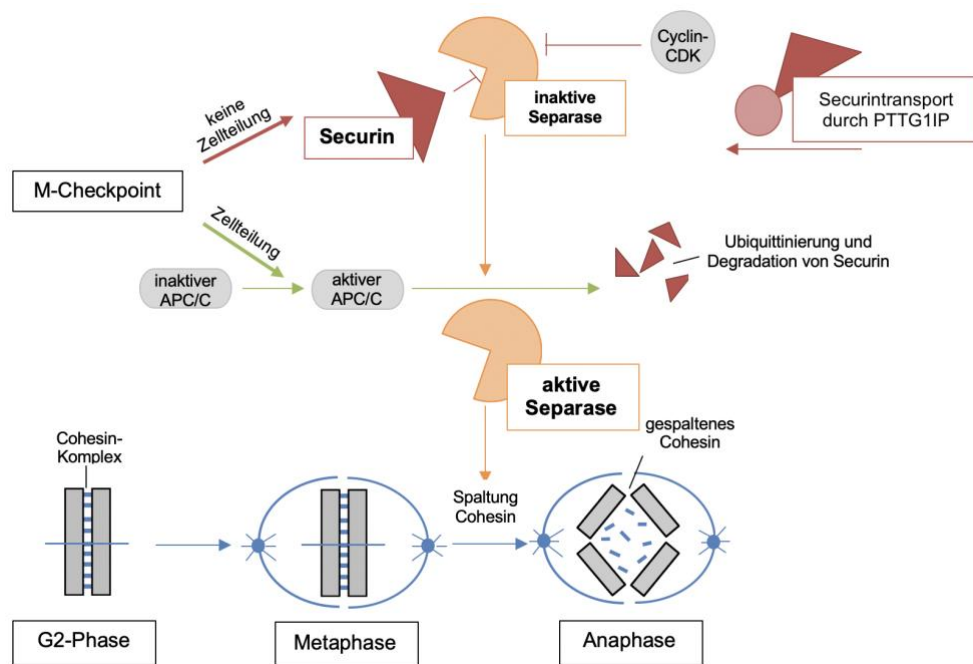


Abbildung 8: Rolle der Separase und ihrer Schlüsselproteine während des Zellzyklus, eigene Darstellung nach Ruppenthal, S.¹⁵⁸

Die Bindung von Securin sowie die Phosphorylierung durch den Cyclin-CDK-Komplex verhindern die Aktivierung der Separase. Wird der APC/C (*anaphase promoting complex/cyclosome*) im Zuge des M-Checkpoints aktiviert, vermittelt er die Degradation von Securin, wodurch die Separase aktiviert wird. Die Separase spaltet anschließend Cohesin, wodurch die Schwesterchromatiden getrennt werden (symbolisiert durch die grauen Zylinder) und die Anaphase eingeleitet wird.

1.3.2 Securin/*PTTG1*

Securin, ein Protein des mitotischen Checkpointsystems, ist durch seine erhöhte Expression an der Entwicklung von genetischer Instabilität beteiligt.¹⁵⁹ In humanen Zellen wird Securin durch das Hypophysen-Tumor-transformierende Gen 1 (*PTTG1*, *pituitary Tumor transforming gene 1*) codiert. In seiner Funktion als Checkpoint-Schlüsselprotein der Schnittstelle zwischen Meta- zu Anaphase verhindert Securin zunächst die Spaltung des Cohesins durch die Separase und somit die Trennung der Schwesterchromatiden durch Bildung eines Securin-Separase-Komplexes.¹⁶⁰ Ohne initiale Bildung dieses Komplexes ist die Separase in den meisten Organismen nicht wirksam, da Securin die Faltung der funktionellen Konformation der Separase unterstützt.¹⁶¹ Des Weiteren fördert Securin im intakten Zustand bis zum Checkpoint die nukleäre Akkumulation der Separase und inhibiert gleichzeitig deren proteolytische Aktivität.¹⁶¹ Dieser Checkpoint überprüft vor dem Übergang in die Anaphase, ob eine korrekte Anordnung der replizierten Chromosomen auf der Äquatorialebene stattgefunden hat sowie die notwendige Interaktion zwischen den Mikrotubuli und Kinetochoren gewährleistet ist. Dann erfolgt die Aktivierung des Anaphase-fördernden Komplex / Cyclosom (APC/C, *anaphase-promoting complex/cyclosome*), welcher den Übergang aus der M- in die G1-Phase ermöglicht¹⁶² und die Zerlegung des Securins initiiert. Hierdurch wird der Securin-Separase-Komplex aufgelöst und die Separase kann das Cohesin spalten.^{161, 163, 164} Des Weiteren konnte für *PTTG1* eine Beteiligung in verschiedenen zellulären Signalwegen nachgewiesen werden. So ist *PTTG1* als Protoonkogen beispielsweise über die transkriptionale Aktivierung des basischen Fibroblasten-Wachstumsfaktors (bFGF, *basic fibroblast growth factor*) im Nukleus direkt an Proliferation, Zellwachstum und Angiogenese beteiligt. Weitere wichtige

Funktionen schließen Signalwege der DNA-Reparatur, der Invasion sowie von genetischer Instabilität ein.¹⁶⁵

In Hypophysen-, Colon- und anderen Tumoren zeigte das Protein eine erhöhte Expression.¹⁶⁶⁻¹⁶⁸ Durch die resultierende chromatische Fehlsegregation kann Securin Aneuploidie induzieren und fördern.¹⁶⁹ So führte eine Überexpression eines mutierten abbauresistenten Securins in embryonalen Mausfibroblasten zu fehlerhafter Chromatidseparation¹⁷⁰ und eine stabile Expression in einer humanen Zelllinie eines Osteosarkoms zu Aneuploidie.¹⁷¹ In CML CP Patientenproben konnte darüber hinaus eine erhöhte Securin-Expression im Vergleich zu karyotypisch normalen Patienten mit AML nachgewiesen werden.¹⁷² Ein weiterer Aspekt, welcher genetische Instabilität fördert, scheint seine Interaktion mit DNA-Reparaturproteinen wie p53 und Ku70 zu sein.^{173, 174} Im Falle von DNA-Schäden wird die Securin-Ku70-Interaktion inhibiert und Ku70 kann über Bindung der Bruchstelle die nicht homologe Endverknüpfung (NHEJ, *non-homologous end-joining*) induzieren, welche für die Reparatur von ds-(Doppelstrang-) DNA-Brüchen hauptsächlich verantwortlich ist.¹⁷⁴

1.3.3 *PTTG1 Interacting Protein*/PTTG1IP

Auch wenn das *PTTG1*-interagierende Protein (*PTTG1IP*), bekannt als *PTTG1*-bindender Faktor (PBF), in humanem Gewebe ubiquitär exprimiert wird, bleibt seine genaue Funktion bis dato unklar.¹⁷⁶ Es wird durch das *PTTG1IP* Gen codiert,^{177, 178} welches auf Chromosom 21q22:3 lokalisiert ist.¹⁷⁶ Sein hochkonserviertes Vorliegen in vielen Tierarten weist auf eine mögliche einzigartige und evolutionär bedeutsame Funktion von *PTTG1IP* hin. Die Entdeckung eines Kernlokalisierungssignals (*Nuclear Localisation Signal*, NLS) legt nahe, dass das Protein sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern eine Rolle spielt. Über NLS können größere Proteine von Importinen, bestimmten Helferproteinen, erkannt und durch Kernporen in den Zellkern transportiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass es direkt mit Securin interagiert und ihm hilft, postranslational in den Nukleus zu gelangen,¹⁷⁶ wo es nachfolgend zur Ausbildung des Separase-Securin-Komplexes kommt. Dadurch ist es als Hilfsprotein von Securin indirekt an der kontrollierten Trennung der Schwesterchromatiden während des Übergangs von Meta- zu Anaphase beteiligt.¹⁶⁵ Da *PTTG1* auch in Signalwege der Invasion, DNA-Reparatur und genetischen Instabilität involviert und mit einer erhöhten Expression in verschiedenen Tumorentitäten nachzuweisen ist, scheint der Interaktion zwischen den Proteinen eine entscheidende Rolle in der Karzinogenese zuzukommen. So zeigen neuere Studien eine mögliche direkte Rolle von *PTTG1IP* bei der Krebsentstehung, beispielsweise durch Dysregulation des p53-Abbaus.^{179, 180} Die Überexpression und Sekretion induziert Zellinvasion, welche essentiell für die Formation metastatischer Erkrankungen ist.¹⁷⁶ *PTTG1IP* wird in einigen Tumorentitäten überexprimiert und ist hierbei mit einem schlechteren onkologischen Outcome, wie beispielsweise einer frühen Tumorrekurrenz oder geringerer Überlebenszeit assoziiert.¹⁸⁰⁻¹⁸³ So konnten bereits in Brustkrebs, beim kolorektalen Karzinom sowie in Schilddrüsentumoren erhöhte *PTTG1IP*-Transkriptspiegel gemessen werden.^{180, 181, 184} Eine Untersuchung von 487 Brustkrebspatienten von Repo et al. zeigte hingegen eine inverse Beziehung zwischen Securin und dem *PTTG1*-interagierenden Protein: Eine erniedrigte/negative Protein-Expression vom Protein PTTG1IP bei einer simultan erhöhten Expression von Securin korrelierte hierbei mit einem aggressiveren Verlauf und einem erhöhten Risiko, an dem Brustkrebs zu versterben.¹⁴² Trotz seiner Identifikation als mögliches Onkogen,¹⁸⁵ bleiben seine genaue Funktion, Rolle in der Karzinogenese sowie sein Wirkdualismus mit Securin weitgehend ungeklärt.

1.4 Zielsetzung

Die CML ist durch das aus der zugrundeliegenden Translokation resultierende BCR-ABL1 Fusionsprotein charakterisiert, welches eine konstitutive Tyrosinkinaseaktivität aufweist und zu einer massiven Vermehrung von Zellen der myeloischen Reihe führt. TKIs erreichen als selektive Hemmstoffe von *BCR-ABL1* in einem Großteil der Patienten Remission und verhindern eine Progression der Erkrankung. Das Ansprechverhalten von CML-Patienten auf die TKI-Therapie spielt für ihr langfristiges Überleben eine wesentliche Rolle und wird über *BCR-ABL1*-Monitoring evaluiert. So ist von einem unzureichenden Ansprechen auszugehen, wenn nach 12 Monaten TKI-Therapie die Zahl der *BCR-ABL1*-Transkripte im Blut noch mehr als 0,10 % (= kein MMR) nach IS beträgt. In diesem Fall ist die Änderung des Therapieschemas/Therapeutikums indiziert.^{29, 37} Da ein Therapieversagen mit einem schlechteren *Outcome* einhergeht, bedarf es molekularer Marker, die schlechte Ansprecher frühzeitig identifizieren können.

Der Krankheitsprogress bei CML-Patienten korreliert mit einer Überaktivität des Proteins Separase¹⁷⁵ und die Regelung seiner Expression stellt als Proliferationsmarker in Tumor-Zellen eine Schlüsselstelle dar.¹³⁵ Der wichtigste Mechanismus zur Verhinderung einer unerwünschten vorzeitigen Aktivierung der Separase ist die Bindung von Securin,¹⁴¹ welches für seinen Transport in den Nukleus das Hilfsprotein PTTG1IP benötigt.¹⁴² Anzunehmen ist, dass für die ordnungsgemäße Funktion der Separase die korrekte Expression dieser drei Proteine (*ESPL1*/Separase, *PTTG1*/Securin und *PTTG1IP*) notwendig ist.

Da bislang nicht bekannt ist, ob eine aberrante Expression der beteiligten Gene und somit ein für die Karzinogenese entscheidendes Zusammenspiel vorliegt, steht die Untersuchung der initialen Transkriptspiegel von *ESPL1*, *PTTG1* und *PTTG1IP* bei CML-Patienten im Fokus dieser Arbeit. Hierzu sollen die Transkriptspiegel der drei Gene in cDNA (komplementäre DNA)-Proben von Patienten vorangegangener CML-Studien mit Hilfe der qRT-PCR (LightCycler Technologie) analysiert werden. Da die Genexpressionen von *PTTG1* und *PTTG1IP* bislang noch nie in Blutzellen von CML-Patienten gemessen wurden, erfolgt die Etablierung der Primer mittels Pilotexperimenten an CML-Zelllinien. Anschließend sollen die CML-Patienten anhand des 12-Monatskriteriums (Erreichen von MMR) für die zu untersuchenden Patientenkohorten (gute Ansprecher (*Responder*) versus schlechte Ansprecher (*Non-Responder*)) selektiert werden. Um Unterschiede zwischen gesunden und erkrankten Proben zu beleuchten, werden die Transkriptspiegel der drei Gene parallel in einer gesunden Kontrollkohorte gemessen. Zur Untersuchung eines möglichen Zusammenspiels der drei Gene werden die Korrelationen zwischen den Transkriptspiegeln geprüft. Sollten in der Untersuchung der Transkriptspiegel der drei Gene Patienten mit besonders auffälligen Werten hervorstechen, werden die Expressionsdaten abschließend anhand ihrer Verlaufsdaten näher betrachtet sowie mögliche Ursachen der Expressionen und Konsequenzen auf das Ansprechverhalten beleuchtet. Mit dem Ziel, Unterschiede zwischen den Patienten je nach Therapieansprechen zu identifizieren, werden klinische Daten wie Geschlecht, Alter, Bruchpunktvariante, *BCR-ABL1*-Quotient, Leukozyten und Therapie analysiert und statistisch ausgewertet.

Ziel der Arbeit ist es, mit den zuvor beschriebenen Methoden die Frage zu beantworten, ob eine Quantifizierung der Transkripte der Gene *ESPL1*, *PTTG1* und *PTTG1IP* zu Beginn der CML-Erkrankung als molekularer Prognosemarker eine individualisierte Vorhersage des Ansprechverhaltens von Patienten unter TKI ermöglicht.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Studiendesign

Die Untersuchungsmethoden der vorliegenden experimentellen Arbeit sind in Abbildung 9 dargestellt. Nach der Methodenetablierung und nach ersten Pilotexperimenten an CML-Zelllinien wurden die Transkriptspiegel der Gene *ESPL1*, *PTTG1* und *PTTG1IP* in 148 vorhandenen cDNA-Proben mithilfe der qRT-PCR (LightCycler) untersucht. Es wurden die Expressionsdaten vor Therapiebeginn von zwei Patientengruppen ($n = 97$) und einer Kontrollgruppe ($n = 51$) miteinander verglichen, die individuellen Abstände vom Mittelwert in einem 3-D-Modell dargestellt und im Anschluss der Verlauf mit den Transkriptwerten der untersuchten Gene sowie mit klinischen Parametern der Patienten in Bezug gesetzt.

Die Patienten wurden je nach Ansprechverhalten auf die Therapie mit TKI in zwei Kohorten eingeteilt. Zu der Kohorte der *Responder* ($n = 46$) wurden diejenigen Patienten gezählt, welche innerhalb der ersten 12 Monate nach Therapiebeginn ein gutes molekulares Ansprechen (MMR = 0,10 % *BCR-ABL1*-Quotient) zeigten. Patienten, die nur unzureichendes Ansprechen zeigten und kein MMR innerhalb von 12 Monaten erreichten, wurden zu der Kohorte der *Non-Responder* ($n = 51$) gezählt. Abschließend wurden die klinischen Parameter von fünf *Non-Respondern*, deren Proben in der Analyse auffällige Expressionswerte ergaben („Ausreißer“) sowie von fünf *Respondern*, welche ein besonders schnelles Ansprechen auf die Therapie zeigten, näher betrachtet und verglichen.

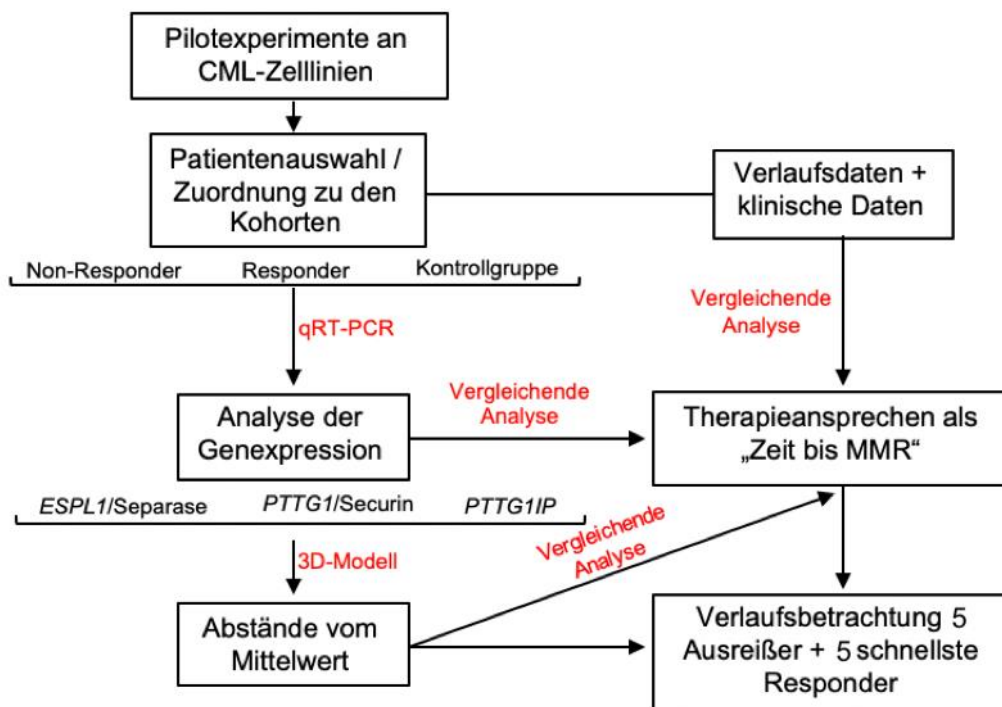


Abbildung 9: Flussdiagramm der Untersuchung der Transkriptspiegel der Separase und Separase-Regulatoren bei CML-Patienten. qRT-PCR, quantitative Reverse-Transkriptase-PCR. Für weitere Abkürzungen siehe Legende zu Tabelle 3.

2.2 Patienten

2.2.1 Patientenmaterial

Alle in dieser Arbeit analysierten Proben der CML-Patienten stammten aus dem Labor der III. Medizinischen Klinik und wurden hier diagnostiziert sowie analysiert. Im Laufe ihrer mehrjährigen Therapie am Universitätsklinikum Mannheim wurde Ihnen peripheres Blut und KM (EDTA, Lithium-Heparin, NH₄-Heparin, Citrat) abgenommen, aus welchem das Transkriptom der Leukozyten isoliert wurde. Durch die umfangreiche Daten- und Probenbank der III. Medizinischen Klinik war die für die Auswertung erforderliche Vordiagnostik mit Transkripttypisierung und Mutationsdiagnostik routinemäßig bereits durchgeführt worden. Überschüssiges Probenmaterial wurde asserviert und war somit der Forschung zugänglich. Alle Patienten sind Teilnehmer folgender CML Studien und wurden dementsprechend während des Beobachtungszeitraumes mit verschiedenen TKI therapiert (Tabelle 18). Im Deutschen Leukämie-Studienregister sind die entsprechenden Informationen und Studien gelistet.¹⁰⁹

Die kontrollierte, randomisierte und multizentrische **CML-Studie IV** der Deutschen CML-Studiengruppe prüfte die Effektivität von IM bei 1151 Patienten in unterschiedlicher Dosierung und Kombination. Die randomisierte Studie ist unter www.clinicaltrials.gov als NCT00055874 zu finden.

Die **CML-Studie V (TIGER)** ist eine multizentrische, randomisierte, offene und zweiarmlige Studie der CML-Studiengruppe mit 717 eingeschlossenen Patienten. Ihr Ziel ist die Behandlungsoptimierung bei neu diagnostizierten Ph- und/oder *BCR-ABL1*-positiven CML-Patienten in CP unter Betrachtung von IM und Nilotinib in Kombination mit IFN α -Induktion im Vergleich.

Die **CML-Studie VI** ist eine multizentrische Registerstudie, welche Patienten einschließt, die nicht in vorangegangenen Studien erfasst werden konnten. Dies ist eine prospektive, bevölkerungsbezogene, nicht-interventionelle und reine Beobachtungsstudie. Nach eigener Schätzung können etwa 520-880 Patienten pro Jahr in das Register aufgenommen werden.

Bei der prospektiven, nicht randomisierten und multizentrischen Studie **EURO-SKI** wurden 868 Patienten eingeschlossen. Die Studie ist unter www.clinicaltrials.gov als NCT01596114 registriert.

Die multizentrische, randomisierte, prospektive und kontrollierte CML-Studie **DasaHIT** der CML-Studiengruppe prüft Behandlungsoptimierung für circa 300 CML-Patienten in Erstbehandlung und Patienten mit Resistenz oder Intoleranz gegenüber anderen TKIs.

Die **Byond-Studie** ist eine offene, multizentrische und nicht randomisierte CML-Studie zu Bosutinib bei CML-Patienten mit Resistenz oder Unverträglichkeit gegenüber einem vorherigen TKI mit 163 eingeschlossenen Patienten.

Die offene, randomisierte und multizentrische CML-Studie **IRIS** schloss 1106 CML-Patienten ein und verglich die Behandlung der CML in chronischer Phase mit IM mit der ehemaligen Standardtherapie, bestehend aus Interferon-alpha und Cytarabin.

Die nicht-interventionelle, prospektive und multizentrische CML-Studie **TARGET** (CAMN107ADE04) untersuchte die Sicherheit und Wirksamkeit der Nilotinib-Therapie bei CML-Patienten, welche auf eine vorherige Behandlung resistent oder mit Unverträglichkeit reagierten.

Die Definitionen der CML-Phasen richteten sich bei allen genannten Studien nach den ELN-Empfehlungen. Die Protokolle folgten der Deklaration von Helsinki. Für die Verwendung der Proben im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde von der

IRB/Medizinische Ethikkommission II der Medizinischen Fakultät Mannheim der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg ein positives Votum erteilt (2016-506N-MA). Eine schriftliche Einwilligungserklärung wurde von allen Patienten, bevor sie an den Studien teilnahmen, unterzeichnet.

2.2.2 Patientenauswahl

Da für alle Patienten der Studien bereits umfangreiche klinische Daten und Verlaufsdaten vorliegen, konnten die geeigneten cDNA-Proben aus der vorhandenen Materialbank für die zwei zu untersuchenden Patientenkohorten selektiert werden. In dieser Arbeit wurde Material von 97 Patienten mit *BCR-ABL1* positiver CML sowie von 51 gesunden Kontrollpersonen untersucht. Alle CML-Patienten exprimierten *BCR-ABL1-Transkripte*, welche mittels Multiplex-PCR nachgewiesen werden konnten. Im Folgenden soll auf die Patientencharakteristika und Bruchpunktvarianten eingegangen werden, Richtwerte der Verteilung wie Median sowie Minimum und Maximum sind in Tabelle 5 wiedergegeben.

In der Kohorte der *Non-Responder* ($n = 51$) betrug das Durchschnittsalter 58,35 Jahre. Es wurden in dieser Kohorte 30 Männer (58,80 %) und 21 Frauen (41,20 %) untersucht. 42,00 % ($n = 21$) wiesen das Fusionstranskript e13a2 auf, in 38,00 % ($n = 19$) der Fälle wurde ein Fusionstranskript von Typ e14a2 gefunden und bei 20,00 % ($n = 10$) konnte sowohl e13a2 als auch e14a2 nachgewiesen werden. Die Bruchpunktvariante e1a2 besaßen 2 (4,00 %) der *Non-Responder*. Das Durchschnittsalter betrug in der Kohorte der *Responder* ($n = 46$) 57,80 Jahre, davon waren 27 Männer (58,70 %) und 19 Frauen (41,30 %). In 47,80 % ($n = 22$) der Fälle wurde ein Fusionstranskript von Typ e13a2 gefunden, 30,40 % ($n = 14$) wiesen das Fusionstranskript e14a2 auf und bei 21,70 % ($n = 10$) konnte sowohl e13a2 als auch e14a2 nachgewiesen werden.

Tabelle 5: Patientencharakteristika von 148 analysierten Proben

	Anzahl (n)	Medianalter	Weibliches Geschlecht	Männliches Geschlecht
CML-Patienten Gesamt	97	58,00 (14 – 87)		
<i>Non-Responder</i> untherapiert	51	57,00 (26 – 87)	21	30
Therapiepause	0	0		
<i>Responder</i> untherapiert	46	58,50 (14 – 85)	19	27
Therapiepause	40			
Gesunde Spender (Kontrollgruppe)	6			
	51	<i>n.b.</i>	<i>n.b.</i>	<i>n.b.</i>

CML, chronische myeloische Leukämie; *n.b.*, nicht bekannt.

Die verwendeten cDNA-Proben stammten bei 91 Patienten vom Zeitpunkt vor Beginn der Therapie. Die verbleibenden 6 Patientenproben entstammten vom Zeitpunkt vor Wiederbeginn der Therapie nach einer Therapiepause von mindestens 3 Monaten, nachdem die Patienten nach initialer Remission rezidierten. Abbildung 10 zeigt beispielhaft den Therapieverlauf eines solchen Patienten anhand der *BCR-ABL1*-Transkripte und der -Quotienten. Die Erstdiagnose erfolgte im April 2013 und bereits im Juli 2013 wurde MMR erreicht. Nach initial gutem Ansprechen rezidierte der Patient innerhalb der anschließenden einjährigen Therapiepause. Die untersuchte Probe stammt in einem solchen Fall unmittelbar vor Wiederbeginn der Therapie und

im anschließenden Beobachtungszeitraum von 12 Monaten zeigte der Patient wie auch zuvor schnelle Remission.

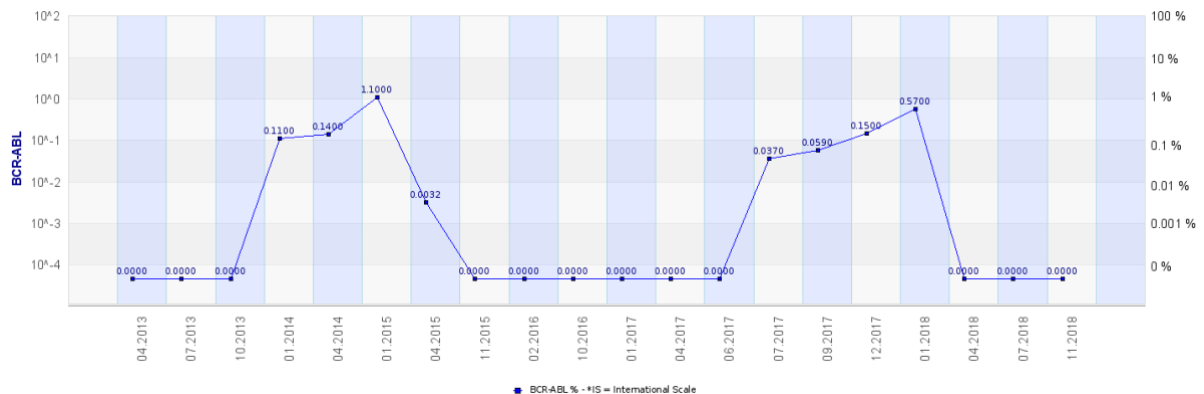


Abbildung 10: *BCR-ABL1*-Transkriptzahlen und -Quotient eines *Responders* mit Rezidiv nach 1-jähriger Therapiepause (R-16).

Bei Patienten, die nach 1 Jahr und darüber hinaus überhaupt noch kein MMR erreicht hatten, konnte auch die nächstmöglich verfügbare Probe eingeschlossen werden, falls die Probe der Erstdiagnosen nicht verfügbar war (Abbildung 11). Dies traf für 2 Proben der *Non-Responder* zu. Hintergrund ist, dass historisch bei Erstdiagnosen oftmals noch keine *BCR-ABL1-Quantifizierung* durchgeführt wurde, da hier eine qualitative Multiplex-PCR zum Nachweis vom *BCR-ABL1* und seines Fusionstyps üblich ist.

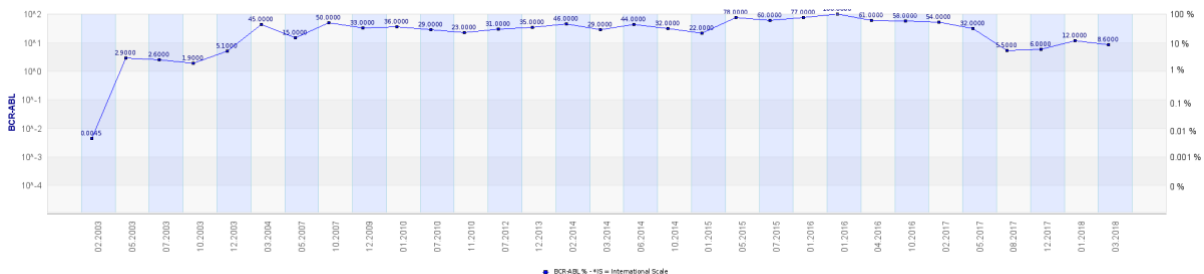


Abbildung 11: *BCR-ABL1*-Transkriptzahlen und -Quotient eines *Non-Responders* ohne Erreichen von MMR bis dato (nR-42)

Kontrollgruppe

Es wurden 51 Blutproben (EDTA-Blut) von gesunden Blutspendern als Kontrollen für die Experimente untersucht. Die Proben stammen aus der Blutbank Mannheim (Institut für Transfusionsmedizin, Friedrich-Ebert-Straße 107, 68167 Mannheim) oder von gesundem Laborpersonal der III. Medizinischen Universitätsklinik und wurden hier analysiert. Da die Proben anonymisiert sind, liegen keine klinischen Daten vor.

2.3 Material

2.3.1 Chemikalien und Lösungen

Substanz / Chemikalie	Firma / Firmensitz / Land
Agar-Pulver (Fertigpulver, imMedia AmpBlue for LacZ Amp resistant E. coli strains)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
Ammoniumchlorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ammoniumdicarbonat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
100 Basenpaarmarker	Roche, Mannheim, D
Blue Dye	Promega GmbH, Madison, USA
Bromphenolblau	Merck Biosciences KGaA, Darmstadt, D
β -Mercaptoethanol (37 %)	Merck Biosciences KGaA, Darmstadt, D
DEPC (Diethyldicarbonat)	Promega GmbH, Madison, USA
DNase I (lyophilized)	Promega GmbH, Madison, USA
EDTA	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Fetales Kälberserum (FKS)	Life Technologies GmbH, Darmstadt, D
Ficoll-Paque TM Premium	GE Healthcare Europe, Freiburg, D
Glycerin	Fluka Chemie GmbH
GIT (Guanidin Thiocyanat)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Homogenisierungslösung	Promega GmbH, Madison, USA
Ladepuffer	Ficoll, Sigma Aldrich, St. Louis, USA
L-Glutamin (200 mM)	Life Technologies GmbH, Darmstadt, D
Lysis Buffer	Promega GmbH, Madison, USA
M-MLV Reverse Transkriptase	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
Natriumcitrat (<i>Citric Acid</i>)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
N-Lauroylsarkosine	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Nuclease-Free Water	Promega GmbH, Madison, USA
10x PCR-RXN-Puffer	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
Phosphate buffered saline (PBS)	Life Technologies GmbH, Darmstadt, D
Proteinkinase K	Promega GmbH, Madison, USA
QuantiFast [®] SYBR [®] Green PCR-KIT	Qiagen GmbH, Hilden, D
Reverse Transkriptase Set	Life Technologies GmbH, Darmstadt, D
RLT-Lösung	Qiagen GmbH, Hilden, D
RNase freies Wasser	Qiagen GmbH, Hilden, D
RNase freies H ₂ O: Aqua ad iniectabilia	B. Braun, Melsungen, D
RNasin [®] RNaseinhibitor	Promega GmbH, Madison, USA
Roti [®] -Nanoquant	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, D
RPMI 1640 Medium (GIBCO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Steriles Wasser (Aqua B. Braun)	B. Braun, Melsungen, D
Streptomycin-Penicilin	Life Technologies GmbH, Darmstadt, D
Sybr Safe DNA Gel Stain	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
1x TBE-Puffer (Trisborat-EDTA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Thioglycerol	Promega GmbH, Madison, USA
Trizol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypanblau (0,40 %)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypsin	Life-Technologies GmbH, Darmstadt, D

2.3.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Geräte	Firma
BD Falcon TM tubes (15 ml, 50 ml)	BD Bioscience, Heidelberg, D
Becherglas	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, D
Begrenzer	BioRad Laboratories GmbH, München, D
Cytospin-Kammern (Zentrifugeneinsätze)	Heraeus, Hanau, D
Brutschrank BB 6220	Heraeus, Hanau, D

Centrifuge 5810 R	Eppendorf AG, Hamburg, D
Chemi Doc XRS	BioRad Laboratories GmbH, München, D
Deckgläser für Objektträger	Marienfeld GmbH & Co.KG, Lauda Königshofen, D
Eismaschine AF200	Scotsman, Mailand, I
Feinwaage (CC224S)	Sartorius, Göttingen, D
Gelelektrophorese-Kammer Modell 200/2.0	BioRad Laboratories GmbH, München, D
Gelelektrophorese-Kämme	BioRad Laboratories GmbH, München, D
Große Tischzentrifugen G30B2, G30B3 und G30B5	Eppendorf AG, Hamburg, D
Heizblock QBT2	Grant Instruments, Cambridge, UK
„Hot-Hand“-Hitzeschutz	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, D
Kleine Tischzentrifuge 5417R	Eppendorf AG, Hamburg, D
LaminAir® sterile Werkbank LB-48C	Heraeus, Hanau, D
50 LEV Plungers	Promega GmbH, Mannheim, D
LightCycler 480 II	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
Maxwell 16LEV	Promega GmbH, Mannheim, D
48 Maxwell 16LEV Cartridges (MCE) (Kartuschen)	Promega GmbH, Mannheim, D
Mikroskop DMi1	Leica, Bensheim, D
Mikroskop DMLS	Leica, Bensheim, D
Mikrotiterplatten 96 well, weiß	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
Mikrowellengerät	Micromat, AEG
NanoDrop ND-100 Spectrophometer	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, USA
Neubauer-Zählkammer	Brand GmbH, Wertheim, D
Pipettierhilfe (Pipetus®)	Hirschmann-Laborgeräte, Eberstadt, D
Pipettenspitzen	Eppendorf AG, Hamburg, D
Pipettenspitzen gestopft	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Power Supply EPS 2A200	BioRad Laboratories GmbH, München, D
Power Supply Model 1000/500	Osram GmbH, München, D
Reaktionsgefäße 0,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, D
Schottflasche 500 ml mit Deckel	
Schutzbrille	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, D
Software ImageLab 3.0.1	Bio-Rad Laboratories Inc., München, D
Varispensor	Eppendorf AG, Hamburg, D
Vortexer REAX Top	Heidolph, Schwabach, D
Zellkulturflaschen (CellStar®) (T25, T75)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf AG, Hamburg, D
Zentrifugenröhrchen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Wasserbad (SW20C)	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, D

Gekaufte Lösungen und Puffer

Lösungen / Puffer	Firma
10x PCR-RXN Buffer (ohne MgCl ₂)	Invitrogen
Roti®-Nanoquant	Carl Roth, Karlsruhe, D
TBE-Puffer	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tris-EDTA Puffer	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypanblau (0,4 %)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Angesetzte Lösungen und Puffer

Name	Menge
Agarose-Gel 2%ig	- 2 g Agarose - 100 ml 1x TBE
100 Basenpaarmarker	- 200 µl Molecular Weight Marker XIV (100 bp ladder), Roche, Mannheim, D - 440 µl Aqua ad iniectionabilia - 250 µl Ladepuffer - 10 µl 0,50 M EDTA; pH 8 - 100 µl 10x RXN Buffer

Homogenisierungspuffer	<ul style="list-style-type: none"> - 1-Thioglycerol 600 µl - Homogenisierungslösung 30 ml (Kit-spezifisch)
Ladepuffer 1 (für Ansatz des Basenpaarmarkers)	<ul style="list-style-type: none"> - 5 ml Aqua inieciabilia - 5 ml Glycerin - 1 Spatelspitze Bromphenolblau
Ladepuffer 2 (für Gele)	<ul style="list-style-type: none"> - 125 mg Bromphenol Blue Sodium Salt - 7,50 g Ficoll, Sigma Aldrich, St. Louis, USA - Ad 50,00 ml Aqua ad inieciabilia
1x Lysispuffer	<ul style="list-style-type: none"> - 100 ml aus 1 l Flasche Aqua ad inieciabilia (+ DEPC) - 100 ml 10x Lysispuffer
10x Lysispuffer	<ul style="list-style-type: none"> - 82,91 g NH₄Cl [1,55 M] - 7,91 g NH₄HCO₃ [0,10 M] - 2 ml EDTA pH 8 0,50 M [1 mM] - 150 ml aus 1 l Flasche Aqua ad inieciabilia (+ DEPC) <p>Abgewogenes Pulver einfüllen und ad 1000 ml Aqua ad inieciabilia (DEPC-H₂O)</p>
RLT-Puffer	<ul style="list-style-type: none"> - Qiagen RLT-Lösung - 2-Mercaptoethanol
TBE-Puffer	500 ml 10x TBE-Puffer ad 5 l Aqua (von Millipore-Anlage)

Kit-Systeme

Kit-System	Firma
Maxwell 16LEV simplyRNA Blood Kit	Promega
QuantiFast®SYBR®Green PCR	Qiagen GmbH, Hilden, D
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen GmbH, Hilden, D

2.3.3 Zelllinien

Es wurden 5 humane leukämische Zelllinien untersucht. Diese dienen als Referenz für die Auswertung und auch zur Etablierung der qRT-PCR Nachweissysteme. Alle verwendeten Zelllinien entstammen ursprünglich der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Deutschland). Alle Zelllinien sind im Labor etabliert und in zahlreichen Vorstudien hinsichtlich ihrer Verwendbarkeit als Kontrollen für CML Zellen genau charakterisiert.¹³⁸

HL-60

Die Zelllinie HL-60 wurde 1976 aus dem peripheren Blut einer 36-jährigen Frau mit akuter Promyelozytenleukämie (APL) kultiviert. Die Zelllinie weist einen pseudodiploiden weiblichen Chromosomensatz auf, ist *BCR-ABL1* negativ und unter ACC 3 katalogisiert.

KCL-22

Die Zelllinie KCL-22 wurde 1981 aus dem Pleuraerguss einer 32-jährigen Frau mit Ph+ CML während der Blastenkrise gewonnen. Sie weist einen hyperdiploiden weiblichen Karyotyp mit 3,30 % Polyploidie auf und exprimiert das *BCR-ABL1* (e13a2) Fusionsgen. Die Zelllinie ist unter ACC 519 katalogisiert.

BV-173

1980 wurde die Zelllinie BV-173 aus dem peripheren Blut eines 45-jährigen Mannes mit *BCR-ABL1* (e13a2) positiver CML während der Blastenkrise etabliert. Die Zelllinie weist einen hyperdiploiden männlichen Karyotyp auf und ist unter ACC 20 katalogisiert.

LAMA-84

Die Zelllinie LAMA-84 entstammt dem peripheren Blut einer Frau mit CML einen Monat nach Beginn der myeloisch-megakaryozytischen Blastenkrise. Die Patientin war 29 Jahre alt und wurde vorab 5 Jahre lang mit Busulfan von 1979 bis 1984 behandelt. Die Zelllinie besitzt einen hypertriploiden weiblichen Karyotyp mit Polyploidie und exprimiert das Fusionsgen *BCR-ABL1* (e14a2). Die Zelllinie ist unter ACC 168 katalogisiert.

K-562

Die Zelllinie K-562 wurde 1970 aus dem Pleuraerguss einer Frau mit CML etabliert und ist *BCR-ABL1* positiv (e14a2). Die Patientin war 53 Jahre alt und befand sich in der Blastenkrise. Die Zelllinie besitzt einen weiblichen hypotriploiden Karyotyp und ist unter ACC 10 katalogisiert.

2.4 Zellbiologie/Zellkultur

Kultivierung der Zelllinien

Die verwendeten Zellen wurden bei 37 °C, einem CO₂-Anteil von 5 % und einer Atmosphäre von 95 % Luftfeuchtigkeit in Zellflaschen kultiviert. Die Kultivierung der Zelllinien KCL-22, BV-173, LAMA-84 und K562 erfolgte in RPMI 1640 Medium, welchem 10 % FKS, 2 % L-Glutamin sowie 1 % Penicillin/Streptomycin zugesetzt wurden.

Passagieren von Zellen

Bei Erreichen eines nahezu konfluenten Monolayers wurde die Zellpassage durchgeführt. Hierzu wurde das aufgebrauchte Medium zunächst abpipettiert und der Zellrasen mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS, *phosphate buffered saline*) gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 0,5 ml Trypsin (1 ml für 75 cm² Flaschen). Durch diese Trypsin-Reaktion sollten die adhärenen Zellen vom Flaschenboden abgelöst werden. Nach circa 5 min Inkubationszeit wurde frisches Medium hinzugegeben und die Reaktion beendet. Nach anschließender Zentrifugation der Zellsuspension bei 250 g erfolgte die Resuspension des Zellpellets in Kulturmedium. Anschließend konnte die Zellzahl bestimmt und das Zellpellet in der erforderlichen Zelldichte wieder in Kulturflaschen ausgesät werden.

Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl und der Vitalität wurde die Trypan-Blau Färbung gewählt, welche einen schnell und einfach anzuwendenden Schnelltest darstellt und routinemäßigen Einsatz findet. Ziel ist es, die gezüchteten Zellkulturen zu splitten, um sie somit bei einer Konzentration von ca. 3×10^5 Z/ml zu halten. Bis das Wachstumsverhalten und die Verdopplungszeit der Zelllinie ermittelt werden konnten, erfolgte die Bestimmung der Zellzahl bei jeder Passage. Sobald bekannt ist, wann eine Verdopplung oder Verdreifachung der Zellzahl eintritt, kann ein Erfahrungswert für die folgende Zellkultivierung genutzt werden. Verändern sich die Wachstumsbedingungen nicht, sollte dieser keine wesentliche Änderung zeigen. Vor den jeweiligen Experimenten erfolgte eine genaue Zellzahlbestimmung, um gleiche

Ausgangsbedingungen zu schaffen. Die Färbung der Zellen erfolgte mittels Trypanblau, eines Farbstoffes der Azogruppe. Stirbt eine Zelle ab, wird ihre Membran durchlässig und das Trypanblau kann in die tote Zelle gelangen. Diesen Mechanismus macht man sich bei dieser sogenannten Ausschlussfärbung zunutze. Tote Zellen zeigen unter dem Mikroskop eine tiefblaue Färbung, während sich vitale Zellen hell darstellen. 10 µl einer Verdünnung aus Zellsuspension und Farbstoff wurden in die Neubauer-Zählkammer pipettiert und mikroskopisch ausgezählt. Die exakte Anzahl vitaler Zellen pro Milliliter wurde durch Multiplikation der bestimmten Zellzahl, dem Kammerfaktor (10^4) und der jeweiligen Verdünnung und anschließender Division der Anzahl ausgezählter Quadranten gewonnen.

2.5 Gesamt-RNA-Extraktion aus Blutzellen

Leukozyten-Extraktion aus Blutzellen

Die Methode zur Isolierung von Gesamt-RNA aus Leukozyten beruht darauf, nach einer vorgeschalteten Erythrozytenlyse die übrigbleibenden Leukozyten in einer geeigneten chemischen Umgebung zu lysieren und dabei RNasen zügig zu denaturieren. In einem zweiten unmittelbar nachfolgenden Schritt erfolgt eine automatisierte Aufreinigung der Gesamt-RNA mittels paramagnetischer „beads“ (Maxwell-Verfahren).

Zunächst wurden die Erythrozyten nach Abfüllen der Aliquote mittels 1 x Lysispuffers (siehe Angesetzte Lösungen und Puffer) lysiert. Nach der Überführung der Zellsuspension in ein 50 ml Falcon wurde sie mit kaltem 1 x Lysispuffer auf 45 ml aufgefüllt und durch kräftiges Schütteln gemischt. Nun tritt der Puffer durch die Erythrozytenmembran und verringert durch das Auflösen der Membran und das allgemeine Quellen der Zelle die Membrankonstitution. Nach einer Inkubationszeit von 10 min auf Eis und erneutem Aufschütteln wurde für 10 min bei 453 x g und 4 °C zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde wiederholt, bis sich ein weißliches Zellpellet mit einem rot-durchsichtigen Überstand aus den hämolysierten Erythrozyten gebildet hatte, welcher abgegossen wurde. Das Leukozyten-Zellpellet wurde im Folgenden mit 25 ml PBS gewaschen (geschüttelt, bis das Pellet resuspendiert ist), erneut für 5 Minuten bei 453 x g bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand entfernt. Die Falconröhrchen wurden kurz umgedreht auf ein sauberes Handtuchpapier und dann auf Eis gestellt. Die Zellpellets wurden in Vorbereitung der RNA-Isolation in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und in je 200 µl Homogenisierungspuffer resuspendiert (siehe 2.3.3 Angesetzte Lösungen und Puffer). Durch die enthaltenen Reagenzien werden gleichzeitig RNasen sowie sonstige Enzyme inaktiviert, welche zu einer Zerstörung der RNA führen würden.

Isolierung von RNA aus Leukozyten

Der Pipettierroboter Maxwell 16 LEV ermöglicht eine automatisierte RNA-Isolierung. Hierbei werden mithilfe der paramagnetischen Wells der Reagenzkartusche Nukleinsäuren über sequentielle Bindung sowie Freisetzung extrahiert. Durch das Maxwell 16 LEV *simplyRNA Blood Kit* (Promega), welches unter anderem Proteinasen und DNasen enthält, und kleine RNA-bindender Säulen wird die RNA von den übrigen zellulären Bestandteilen getrennt.

Die lysierten, gewaschenen und in Homogenisierungspuffer aufgenommenen Zellpellets aus jeweils ca. 1×10^6 Leukozyten wurden zunächst gevortext und bei 2000 rpm anzentrifugiert. In die Elutionsgefäße wurden je 40 µl H₂O pipettiert und diese verschlossen. Nach der Zugabe von 200 µl Lysis Buffer (siehe 2.3.3 Angesetzte Lösungen und Puffer) und 25 µl Proteinkinase K zu jeder Probe erfolgte erneutes

Vortexen und Anzentrifugieren. Während der folgenden 10-minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden die Proben und Elutionsgefäße nach dem 4-Augen-Prinzip abgeglichen. Nach Zugabe von 5 µl DNase1 in die 4. Position des Kartuschenständers wurde ein Farbumschlag von gelb nach grün beobachtet. Im Anschluss wurde die komplette Probe (ca. 500 µl) in die 1. Position überführt und die Plunger in die 8. Position eingesetzt. Es folgte das Beladen der Proben und Starten des Programms. Der Kartuschenständer wurde positioniert und die Elutionsgefäße geöffnet. Nach Beendigung des 62-minütigen RNA-Extraktionslaufes wurden die Elutionsgefäße sofort anzentrifugiert, auf Eis gelagert und für die folgende Konzentrationsmessung aliquotiert. Nach der Gesamt-RNA-Isolation wurden die Proben für kurze Zeit bei -70 °C gelagert.

RNA Konzentrationsbestimmung

Die Quantifizierung der RNA nach ihrer Isolation erfolgte mithilfe des NanoDrop™ Spektralphotometers (= Mikrovolumen-Spektralphotometer). Hierdurch wurde gewährleistet, dass die gleiche Menge an RNA für die anschließende cDNA-Synthese verwendet wird. Die Nukleinsäure-Konzentrationen wurden bestimmt, indem die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen wurde. Als Blank (Blindprobe) sowie als Lösungspuffer wurde Aqua dest. verwendet. Die Verdünnung des Aliquot mit Aqua dest. erfolgte im Verhältnis 1 : 2 bis 1 : 5. Die Berechnung des Reinheitsgrades fand über die Bestimmung des Extinktionsquotienten bei OD260/280 statt. Für eine reine RNA-Präparation sollte der errechnete Wert bei 1.8 – 2.2 liegen. Ein niedrigerer Wert indiziert eine durch Proteine oder Phenol kontaminierte Probe. Die Arbeitslösungen wurden bei 8 °C gelagert.

2.6 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese aus RNA erfolgte nach Standardprotokoll. Vorab wurden die eingefrorenen RNA-Proben aufgetaut, gevortext und anzentrifugiert und im Anschluss bei 65 °C für 10 min denaturiert, bevor sie für 3 min auf Eis gelagert wurden. Als Negativkontrolle diente 19 µl RNase-freies H₂O. Der vorab bei -20 °C gelagerte cDNA-Mix wurde zunächst aufgetaut.

Tabelle 6: cDNA-Mix-Ansatz

Reagenz	Menge
cDNA-Mix	350 µl
RNasin	12 µl
Reverse Transkriptase	24 µl
RNA (Probensatz)	(16x) 19 µl
RNase-freies H ₂ O (Negativkontrolle)	19 µl

RNasin und RT wurden nach dem Ansatz wie in Tabelle 6 beschrieben zum Mix dazupipettiert, gemischt, anzentrifugiert und dann auf Eis gestellt. Zu jedem Probensatz, bestehend aus 19 µl RNA sowie der Negativkontrolle, wurde daraufhin 21 µl cDNA-Mix dazu pipettiert und mit der Pipettenspitze gemischt. Durch eine Inkubation über 1 h auf einem 37 °C Heizblock wurde das Enzym Reverse Transkriptase aktiviert. Abschließend wurde das Enzym durch eine Inkubationszeit von 5 min bei 65 °C inaktiviert. Folgend wurden die cDNA-Proben bei -20 °C gelagert.

2.7 Vervielfältigung der DNA

2.7.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Dank der Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) können kleinste Mengen DNA in kurzer Zeit *in-vitro* vervielfältigt werden. Hierzu wird ein Zyklus aufeinanderfolgender Schritte mehrfach wiederholt. Das Verfahren basiert auf der Fähigkeit der DNA-abhängigen DNA-Polymerase, komplementäre Stränge nach dem Matrizenstrang (Vorlage) zu synthetisieren. Da die DNA-Polymerase neue Stränge nur von der Hydroxygruppe (OH) des 3'-Endes hin zum 5'-Ende erstellen kann, ist ein Primer erforderlich. Hierunter versteht man einen kurzen, komplementären DNA-Abschnitt, welcher an der DNA bindet und als Vorgabe zur Amplifikation dient. In diesem Experiment wurden Random-Hexamere eingesetzt. Nach der Auftrennung der doppelsträngigen DNA (Denaturierung) liegen die DNA-Stränge einzeln vor. Nach Binden des Primers an die Einzelstrang-DNA (*Primer-Annealing*) erfolgt die Verlängerung des Primers durch die DNA-abhängige DNA-Polymerase (*Primer-Extension*). Folgend wird die einzelsträngige cDNA durch diese DNA-Polymerase in eine doppelsträngige cDNA umgeschrieben (*Elongation*).

2.7.2 Quantitative Reverse-Transkriptase-PCR (qRT-PCR)

Mittels der qRT-PCR lassen sich Nukleinsäuren schnell und voll automatisiert vervielfältigen. Ihr Prinzip gleicht dabei dem der herkömmlichen PCR. Direkt während der Amplifikation wird die Vermehrung des PCR-Produktes durch Fluoreszenzmessung analysiert. Hierbei wird in Echtzeit (*real time*) die Entwicklung des Fluoreszenzfarbstoffs SYBRGreen (Qiagen) gemessen, welcher mit der DNA interkaliert. Der Fluoreszenzanstieg erfolgt im Laufe der Zyklen zu der Menge der gebildeten PCR-Produkte. In der sogenannten exponentiellen Phase der PCR, welche nur wenige Zyklen in einem Lauf andauert und während derer optimale Reaktionsbedingungen herrschen, lässt sich schlussendlich anhand der Fluoreszenzsignale die Expression quantifizieren. Hierbei wird der Fluoreszenz Schwellenwert, der *Threshold-Cycle* Wert (C_T -Wert), berechnet.

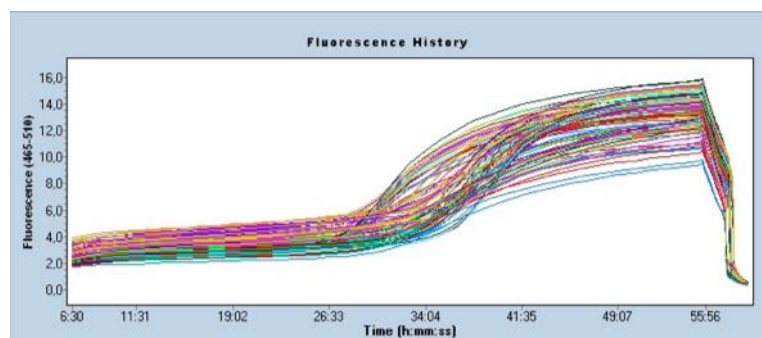


Abbildung 12: Schmelz- und Amplifikationskurve einer beispielhaften qRT-PCR von Kontrollproben

Die Experimente erfolgten mit dem Roche LightCycler 480 System entsprechend der Anleitung des Herstellers (*two step LightCycler 480 protocol*; Roche Diagnostics, Mannheim, D). Die qRT-PCR wurde nach dem Ansatz wie in Tabelle 8 beschrieben durchgeführt. Für die qRT-PCR wurde als Template eine cDNA Menge von 20 ng

eingesetzt. Für die Genexpressionsanalysen wurden folgende Primer aus Tabelle 7 verwendet:

Tabelle 7: qRT-PCR Primer

Target	Primer (Artikelnummer)	Assay	Firma
<i>ESPL1</i>	Hs_ESPL1_1_SG	QuantiTect Primer Assay (QT00027216)	Qiagen GmbH, Hilden, D
<i>PTTG1</i>	Hs_PTTG1_1_SG	QuantiTect Primer Assay (QT00044037)	Qiagen GmbH, Hilden, D
<i>PTTG1IP</i>	Hs_PTTG1IP_1_SG	QuantiTect Primer Assay (QT00076601)	Qiagen GmbH, Hilden, D
<i>GUS</i>	Hs_GUSB_1_SG	QuantiTect Primer Assay (QT00046046)	Qiagen GmbH, Hilden, D

Tabelle 8: qRT-PCR Ansatz

Zutaten Ansatz 25 µl	1x (µl)	28x (µl)
PCR-H ₂ O	8	224
SybrGreen Mix	12,50	350
Primer Mix 1 µM final conc.	2,50	70
Template 20 ng (max 100 ng)	2	(2)

Der qRT-PCR-Ansatz wurde gemischt, für 5 Sekunden zentrifugiert und in die Wells pipettiert. Dann wurden dreifach pro Gen jeweils 2 µl der dazugehörigen Patienten-cDNA dazupipettiert (Triplets, Tabelle 9). Die genutzten qRT-PCR-Parameter sind in Tabelle 10 dargestellt. Die cDNA-Proben sowie die Bestandteile des Ansatzes wurden während der Versuche auf Eis und nach Beendigung bei -20 °C gelagert.

Tabelle 9: qRT-PCR Pipettierschema 96-well *block*

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>GUS</i>	A	P1	P1	P1	P2	P2	P2	P3	P3	P3	P4	P4	P4
<i>ESPL1</i>	B	P1	P1	P1	P2	P2	P2	P3	P3	P3	P4	P4	P4
<i>PTTG1</i>	C	P1	P1	P1	P2	P2	P2	P3	P3	P3	P4	P4	P4
<i>PTTG1IP</i>	D	P1	P1	P1	P2	P2	P2	P3	P3	P3	P4	P4	P4
<i>GUS</i>	E	P5	P5	P5	P6	P6	P6	P7	P7	P7	P8	P8	P8
<i>ESPL1</i>	F	P5	P5	P5	P6	P6	P6	P7	P7	P7	P8	P8	P8
<i>PTTG1</i>	G	P5	P5	P5	P6	P6	P6	P7	P7	P7	P8	P8	P8
<i>PTTG1IP</i>	H	P5	P5	P5	P6	P6	P6	P7	P7	P7	P8	P8	P8

P, Patient.

Tabelle 10: qRT-PCR Programm *two-step* LightCycler 480 protocol

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	95 °C	5 min
Denaturierung	95 °C	10 sec
Annealing & Elongation	60 °C	30 sec
Kühlen	37 °C	5 min

} 40 Zyklen

2.7.3 Quantitative Auswertung der qRT-PCR

Dass die Menge des gebildeten PCR-Produktes bei jedem Zyklus verdoppelt wird, ermöglicht anschließend an die qRT-PCR eine quantitative Auswertung der Messdaten. Die gebildete Produktmenge steigt hierbei proportional zu der Menge anfänglich vorhandener cDNA Moleküle n_0 und zur Anzahl C der durchlaufenen PCR-Zyklen:

$$n = n_0 \times 2^C$$

Die detektierte Fluoreszenz steht ebenfalls in einem linearen Verhältnis zur Produktmenge. Dies ermöglicht, dass nach einer definierten Abfolge von Zyklen C anhand der Fluoreszenz auf die Anfangsmenge n_0 geschlossen werden kann. Hierbei besteht eine reziproke Proportionalität zwischen dem C_t -Wert und der cDNA. Demnach gilt: Je mehr cDNA-Moleküle in einer Probe vorhanden sind, desto kleiner der gemessene C_t -Wert. Die Quantifizierung erfolgte relativ unter Verwendung der „Advanced Relative Quantification Analysis“. Die C_t -Werte wurden durch manuelles Abgleichen der Referenzgene und Targets berechnet (Software LCS480 1.5.0.39; Roche). Bei der relativen Quantifizierung erfolgt der Vergleich der Mengen von drei Targetsequenzen in einer Probe. Abschließend wird als Ergebnis das Verhältnis (Ratio) von Target zu Referenz betrachtet.

In der vorliegenden Arbeit werden für die komparativen Berechnungen von Genexpressionsspiegeln der drei Zielgene (*ESPL1*, *PTTG1* und *PTTG1IP*, sowie *GUSB* als internes Referenzgen) Δ - C_t -Werte aus den qRT-PCR-Messungen herangezogen. Diese sind auf *GUSB* normalisiert ($C_t^{\text{Zielgen}} - C_t^{\text{GUSB}}$), sodass Einflüsse wie eine unterschiedliche RNA-Menge oder RNA-Qualität beim relativen Probenvergleich keinen Einfluss haben. Als Richtwert kann gelten: Ein Unterschied um einen Δ - C_t -Wert von 3,31 zwischen zwei Proben entspricht einem RNA-Spiegelunterschied (Zielgen) um den Faktor 10 (unter der Annahme, dass sich pro PCR-Zyklus die Produktmenge verdoppelt). Zur Gewährleistung der Präzision wurden jeweils 3 Replikate (Triplet) pro Probe untersucht.

Um zu ermitteln, inwieweit eine differenzielle Expression der Gene zwischen den gesunden Kontrollproben und den CML-Patienten vorliegt, wurde der mittlere *Fold change* (*FC*) berechnet. Hierfür errechnet man zunächst aus den Δ - C_t -Werten $\Delta\Delta$ - C_t :

$$\Delta\Delta\text{-}C_t = \Delta\text{-}C_t\text{-Probe} - \Delta\text{-}C_t\text{-Kontrolle}$$

Als Kalibrator diente bei der Untersuchung der CML-Patienten für jedes Gen der Δ - C_t -Mittelwert der gesunden Kontrollgruppe ($n = 51$), bei den Zelllinien der Δ - C_t -Mittelwert der gesunden Kontrollperson K-1. Im Anschluss wird nun der *FC* ($2^{-(\Delta\Delta C_t)}$) der Expression berechnet. Ein *FC* von 1 bedeutet 100 % Genexpression in Relation zu der Kontrollgruppe, ergo gibt es keinen Unterschied zwischen den beiden Gruppen. *FC* Werte über 1 zeigen eine Hochregulierung im Vergleich zu der Kontrollgruppe (1,5 = 150 %, 2 = 200 %, et cetera). Liegt der *FC* einer Genexpression unter 1, liegt eine Herunterregulierung im Vergleich zu der Kontrolle vor. Werte < 0 können bei dieser Methode somit nicht auftreten.¹⁸⁶

2.8 Gelelektrophorese

Der Nachweis von PCR-Syntheseprodukten (Amplikons) erfolgte mittels Gelelektrophorese auf einem 2%igen TBE-Agarosegel. Die Gelelektrophorese dient der Auftrennung unterschiedlicher Nukleinsäure-Stränge nach ihrer Größe und ermöglicht die Bestimmung der Größe durch den direkten Vergleich mit Strängen bekannter Größe (= Eichmarker = DNA-Leiter).

Da 5 x 4 Gene untersucht wurden, wurden 2 Kämme in die Kammer gesteckt. 6 g der Agarose wurden durch Erhitzen in der Mikrowelle in 300 ml 1 x TBE-Puffer (siehe Kapitel 2.2.3 Angesetzte Lösungen und Puffer) gelöst und nach leichter Abkühlung auf etwa 50 °C wurden 100 ml in ein Becherglas abgefüllt. Um die Moleküle später unter UV-Licht sichtbar zu machen, wurde im nächsten Schritt 5 µl des Farbstoffes SYBR Safe zugeführt und gemischt. Im Anschluss wurde das Gemisch in die Gelkammer gegossen und etwaige Luftblasen mit einer Pipettenspitze entfernt. Nach 20 Minuten, in denen die flüssige Agarose bei Raumtemperatur polymerisieren konnte, wurde das Gel mit 1 x TBE-Puffer bedeckt und die Kämme und Begrenzer wurden entfernt. Vor dem Auftragen der Proben mit jeweils 12 µl cDNA wurden diese mit jeweils 3 µl Ladepuffer (Beschwerungspuffer, siehe Kapitel 2.2.3 Angesetzte Lösungen und Puffer) nach dem Ansatz in Tabelle 12 versetzt und jeweils 8 µl pro Probe in die Geltaschen pipettiert. Somit wurden jeweils etwa 6,40 µl DNA auf das 2%ige Agarosegel aufgetragen.

Als Molekulargewichtsmarker wurde die 100 bp (Basenpaar) Leiter verwendet. Die Elektrophorese erfolgte unter konstanter Spannung von 100 Volt für 50 Minuten. Die negativ geladenen Nukleinsäure-Moleküle wandern vom Minuspol zum Pluspol durch das Gel. Das Gel fungiert als Molekularsieb und erlaubt eine Differenzierung nach Ladung und Größe der Moleküle. Kleinere Moleküle wandern mit höherer Geschwindigkeit durch die Maschen im Gel. Dadurch werden die Stränge nach ihrer Größe aufgetrennt und gleiche DNA-Fragmente laufen in diskreten Zonen, sogenannten Banden.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel auf einer Folie unter den Transilluminator gelegt. Über die Software ImageLab3.0 und das Chemiedoc Imaging System wurde dann ein Bild vom Gel erzeugt.

2.9 Statistik

In Zusammenarbeit mit der Abteilung für Medizinische Statistik und Biomathematik der Universität Heidelberg, Medizinische Fakultät Mannheim erfolgte die statistische Auswertung unter der Verwendung des Programms SAS® (Version 8.0, SAS Institute GmbH, Heidelberg, Deutschland). Die kontinuierlichen Variablen wurden auf Normalverteilung geprüft und dementsprechend parametrische sowie nicht-parametrische Tests für die Auswertung angewandt. Das Signifikanzniveau betrug für alle Verfahren $p < 0,05$. Metrische Variablen wurden den Messungen oder der Datenbank entnommen und in Mittelwerten, Standardabweichungen oder Medianen wiedergegeben.

Die Ergebnisse der Genexpressionstestung von *GUS*, *ESPL1*, *PTTG1* und *PTTG1IP* mittels qRT-PCR wurden wie folgt verarbeitet: Jedes der 4 untersuchten Gene wurde für jede Probe dreifach untersucht (Triplets) und der Mittelwert des jeweiligen Triplets zur weiteren Berechnung genutzt. Die Abstände („Distances“) wurden als Mittelwerte,

Standardabweichungen, Median und Streuung vom Mittelwert wiedergegeben und die Mittelwerte für die weiteren Analysen genutzt.

Für die statistische Analyse wurden zunächst die Mittelwerte der drei Subgruppen *Responder*, *Non-Responder* und Kontrollen mittels einer Varianzanalyse verglichen. Bei jeder Analyse wurde ein globaler p -Wert ermittelt, welcher besagt, ob generell Unterschiede zwischen den Gruppen gegeben sind oder nicht. Bei Signifikanz dieses Ergebnisses wurde ein Scheffé-Test für paarweise Vergleiche durchgeführt. Dieser Test gewährleistet, dass das 5 %-Signifikanzniveau auch bei mehreren Tests eingehalten wird. Die Signifikanztestung erfolgte mittels t-Test. Die Effektstärke wurde durch den FC quantifiziert. Im Anschluss wurde die Stärke des Zusammenhangs zwischen zwei Genen mittels der Korrelationskoeffizienten nach Pearson quantifiziert. Die Effektstärke des Vergleichs der Korrelationskoeffizienten wurde anschließend mithilfe des Cohens q verglichen.

Im Folgenden wurden Abstände berechnet. Hierzu wurde geometrisch eine Kugel im 3-dimensionalen Raum konstruiert, deren Zentrum aus den drei Mittelwerten für *ESPL1*, *PTTG1* und *PTTG1IP* bezogen auf alle *Responder* und *Non-Responder* definiert wurde. Dieses Zentrum bildet den Durchschnitt aller drei Expressionen und der Abstand ist die Entfernung einer Beobachtungseinheit vom Zentrum. Die statistischen Kenngrößen bezüglich der Abstände wurden mittels eines t-Tests ausgewertet. Mithilfe einer logistischen Regression basierend auf dem Hypothesentest zur Korrelation und Regression wurde im Anschluss eine Gleichung erstellt, mit der sich in Abhängigkeit vom jeweiligen Abstand einer Beobachtungseinheit die Wahrscheinlichkeit berechnen lässt, dass es sich bei einem untersuchten Patienten um einen *Non-Responder* handelt.¹⁸⁷

Anschließend wurden die statistischen Kenngrößen der klinischen Faktoren separat für die beiden Gruppen *Non-Responder* und *Responder* ermittelt und verglichen. Im Folgenden sind in Tabelle 11 die in der Analyse verwendeten Parameter gelistet:

Tabelle 11: Klinische Parameter und verwendete statistische Tests

Parameter	Test
Zeit bis MMR in Monaten	U-Test
Alter in Jahren	t-Test
Leukozyten	U-Test
Quotient <i>BCR-ABL1</i>	U-Test
Q IS	U-Test
Bruchpunkttyp	Fisher
Geschlecht	Chi ²

Da bei Betrachtung der Variationskoeffizienten alle Parameter außer das Alter keiner Normalverteilung, sondern aufgrund von Ausreißern einer schiefen Verteilung entsprachen, wurden sowohl parametrische als auch nicht-parametrische Testverfahren eingesetzt. Für den Vergleich unabhängiger Stichproben wurde der t-Test genutzt. Der Mann-Whitney-U-Test wurde für den Vergleich der Variablen eingesetzt, bei welchen keine Normalverteilung angenommen werden konnte. Der exakte Fisher Test wurde bei dichotomen Zielvariablen verwendet. Bei Zielvariablen, welche nominalskalierte Merkmale mit mehr als zwei Kategorien darstellten, wurde der Chi²-Test angewandt. Bei Verwendung des t-Tests wurde zur Berechnung der Effektstärke Cohens d verwendet, bei U-Test und dem Kruskal-Wallis-Test wurde der Unterschied mit der Effektgröße r quantifiziert. Zusätzlich wurde bei den Parametern, welche mit t-Tests untersucht wurden, aus Cohens d der Korrelationskoeffizient r nach

Pearson berechnet. Hiermit wurde eine Vergleichbarkeit der Effektgrößen gewährleistet. Bei Verwendung des exakten Fisher Test wurde Cramers V und bei Chi²-Test der Phi-Koeffizient (ϕ) berechnet. Die nominalen Variablen wurden als absolute und relative Häufigkeit dargestellt. Weitere statistische Kennwerte wurden mit dem Mittelwert als Lagemaß und als Streuungsmaß die Standardabweichung angegeben.

Folgend wurden die Assoziationen mit der „Zeit bis MMR“ in Monaten für die gemischte Gruppe der *Responder* und *Non-Responder* sowie separat für die Kohorten geprüft. Bei diesem Schritt der Analyse wurden die Daten der 53 Patienten berücksichtigt, welche als Monoinitialtherapie Imatinib oder Nilotinib erhielten. Es wurde mit folgenden in Tabelle 12 gelisteten Parametern gearbeitet:

Tabelle 12: Analytierte Assoziationen mit "Zeit bis MMR" und verwendete statistische Verfahren

Parameter	Test
<i>ESPL1</i>	Spearman
<i>PTTG1</i>	Spearman
<i>PTTG1IP</i>	Spearman
Abstand	Spearman
Bruchpunkttyp	Kruskal-Wallis
Geschlecht	U-Test
Alter	Spearman
Leukozyten	Spearman
Quotient <i>BCR-ABL1</i>	Spearman
Therapie	U-Test

Zur Überprüfung einer Assoziation zwischen der „Zeit bis MMR“ und einer anderen Variable wurden nicht-parametrische Tests verwendet, da für „Zeit bis MMR“ keine Normalverteilung angenommen werden kann. Für die meisten Variablen wurde die Spearman-Korrelation verwendet. Abschließend wurden die Korrelationskoeffizienten nach Spearman ermittelt. Der Vergleich zwischen den Korrelationskoeffizienten der Kohorten wurde durch einen t-Test auf Signifikanz geprüft und dessen Effektstärke mittels Cohens q quantifiziert.

Mit SPSS erfolgte die grafische Darstellung der Korrelationsdaten. Zur besseren Übersichtlichkeit wurden die Ergebnisse der deskriptiven Statistik auf zwei Dezimalstellen gerundet und die p -Werte wurden zur Präzisionssicherung mit drei Nachkommastellen angegeben. In den übrigen Teilen der Arbeit erfolgte die Angabe der Dezimalstellen anhand ihrer Aussagekraft. *BCR-ABL1*-Quotienten wurden nach internationaler Schreibweise über die gesamte Arbeit hinweg mit zwei bis vier Dezimalstellen angegeben.

3 ERGEBNISSE

3.1 Untersuchung von humanen leukämischen Zelllinien

Durch vorangegangene Untersuchungen ist bereits bekannt, dass es eine Korrelation zwischen einer aberranten Aktivität der Cysteinprotease *ESPL1*/Separase und dem Krankheitsprogress bei CML-Patienten gibt¹³⁴. Da die Expressionsspiegel der Gene *PTTG1* und *PTTG1IP* in Blutzellen von Patienten mit CML zum Zeitpunkt der Experimente noch nie untersucht wurden, wurden die Analysen vorab an humanen leukämischen Zelllinien durchgeführt. Dies diente als Referenz für die Auswertung und zur Etablierung der qRT-PCR Nachweissysteme (Primer und Sondenpaare). Hierzu wurden fünf Zelllinien kultiviert, deren RNA extrahiert sowie cDNA synthetisiert (siehe Abschnitt 2.5 cDNA-Synthese). Im Anschluss erfolgte die cDNA-Vervielfältigung mittels qRT-PCR, welche zwei Mal durchgeführt wurde, um etwaige Pipettier- und Anwendungsfehler auszuschließen. Im ersten Durchlauf wurde eine Kontrollprobe einer gesunden Person K-1, die Zelllinien LAMA-84, K562, HL60 sowie eine Negativkontrolle mit 2 µl H₂O (siehe Abbildung 14A) untersucht. Die Zelllinien LAMA-84, K562, HL60 wurden in einem zweiten Durchgang erneut zusammen mit den weiteren Zelllinien KCL-22 und BV-173 betrachtet (siehe Abbildung 13B). Von K-1 sowie jeder Zelllinie wurden drei Proben (*Triplet*) untersucht und der Mittelwert zur weiteren Berechnung genutzt. Die Werte der zweifach untersuchten Zelllinien wurden gemittelt. Im Anschluss wurden die vom *House-keeping*-Gen *GUS* bereinigten Δ -C_t-Werte zur weiteren Darstellung genutzt. Um zu ermitteln, welche Gene zwischen den leukämischen Zelllinien und der gesunden Kontrollperson eine unterschiedliche Differenzierung zeigen, wurde der mittlere *FC* herangezogen (siehe Methoden 2.9 Quantitative Auswertung der qRT-PCR). Hierbei gilt, dass Werte zwischen 0 bis 1 für eine Herunterregulierung und Werte zwischen 1 bis unendlich für eine Überexpression der Gene sprechen. Anschließend an die qRT-PCR konnten die PCR-Syntheseprodukte in einer Gelelektrophorese nachgewiesen und damit die Etablierung der Primer und Sondenpaare erfolgen (siehe Abbildung 15). Nachfolgend sind die Schmelzkurve des ersten Durchgangs und die Amplifikationskurve des zweiten Durchgangs in Abbildung 13 aufgeführt.

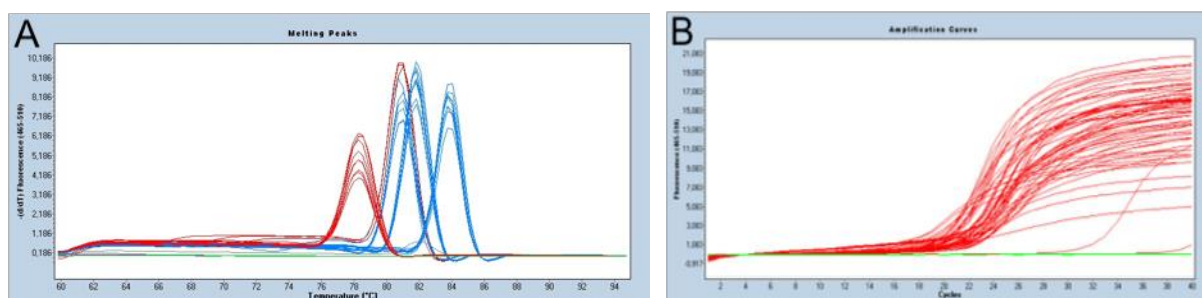


Abbildung 13: qRT-PCR Schmelz- und Amplifikationskurven von Zelllinien
(A) Schmelzkurve von LAMA-84, K562, HL60 und einer Negativkontrolle. (B) Amplifikationskurve von LAMA-84, K562, HL60, KCL-22 und BV-173

Transkriptspiegel von *ESPL1*, *PTTG1* und *PTTG1IP*

In fünf humanen leukämischen Zelllinien wurden die Genexpressionen der Gene *ESPL1*, *PTTG1*, *PTTG1IP* mittels qRT-PCR gemessen. Abbildung 16 zeigt die verschiedenen relativen Genexpressionen (Δ -C_t-Werte) der Zelllinien LAMA-84, K562, HL60, KCL-22, BV-173 und einer gesunden Kontrollprobe K-1. In allen untersuchten Zelllinien fand sich in der folgenden Betrachtung der FC eine Überexpression der drei Gene im Vergleich zu der gesunden Kontrollprobe. Die einzelnen FCs sind in Abbildung 14 dargestellt.

Die Zelllinien LAMA-84 und HL60 zeigten eine ähnliche Überexpression von *ESPL1* (LAMA-84 Δ -C_t^{*ESPL1*} = 1,06, FC^{*ESPL1*} = 46,43, HL60 Δ -C_t^{*ESPL1*} = 1,14, FC^{*ESPL1*} = 43,82) im Vergleich zu der *ESPL1*-Expression in der Kontrollprobe (Δ -C_t^{*ESPL1*} = 6,60). Für die Zelllinie K562 ergab sich in der Messung der *ESPL1*-Transkriptspiegel eine Überexpression mit einem Δ -C_t-Wert von 1,81. Die Zelllinie KCL-22 zeigte für *ESPL1* eine um den Faktor 50 (FC^{*ESPL1*} = 50,00) erhöhte relative Genexpression von 0,95. Auch die Zelllinie BV-173 zeigte mit einem Δ -C_t von 0,60 eine deutliche Überexpression von *ESPL1*. Für das Gen *PTTG1* konnte in Zellen der Linie LAMA-84 mit einem Δ -C_t von -2,12 eine Hochregulierung im Vergleich zu der Expression in der gesunden Kontrollgruppe (Δ -C_t^{*PTTG1*} = 4,72) nachgewiesen werden. *PTTG1* wurde auch in den Zellen von BV-173, HL60 und K562 um einen ähnlichen Faktor hochreguliert exprimiert (BV-173 Δ -C_t^{*PTTG1*} = -0,53, HL60 Δ -C_t^{*PTTG1*} = -0,56, K562 Δ -C_t^{*PTTG1*} = -0,28). Das Gen *PTTG1* wurde von KCL-22 mit einem Δ -C_t-Wert von -2,05 eminent erhöht exprimiert. Auch für das Gen *PTTG1IP* konnte in LAMA-84 Zellen eine erhöhte Expression mit einem Δ -C_t-Wert von 0,4 im Vergleich zu K-1 gemessen werden. Ebenso wiesen die Zellen der Zelllinien K562 und HL60 eine Hochregulierung von *PTTG1IP* auf (K562 Δ -C_t^{*PTTG1IP*} = 0,56, HL60 Δ -C_t^{*PTTG1IP*} = 1,98). Für *PTTG1IP* konnte auch in Zellen von KCL-22 und BV-173 eine Überexpression um den Faktor 18 beziehungsweise 3 im Vergleich zu der gesunden Probe gemessen werden (KCL-22 Δ -C_t^{*PTTG1IP*} = -0,58, BV-173 Δ -C_t^{*PTTG1IP*} = 1,89).

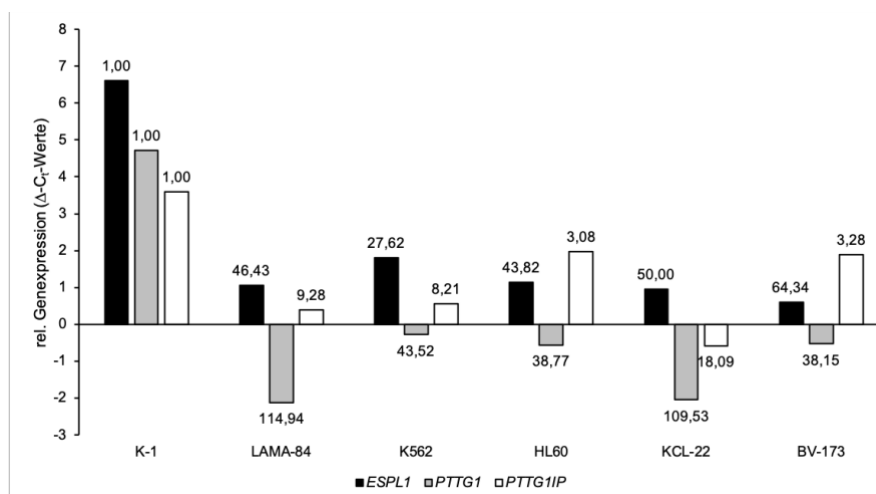


Abbildung 14: Transkriptspiegel von *ESPL1*, *PTTG1* und *PTTG1IP* in humanen leukämischen Zelllinien. Dargestellt sind die relativen Genexpressionen der Separase (*ESPL1*) sowie von zwei Separase-Regulatorproteinen (*PTTG1*, *PTTG1IP*) in den humanen leukämischen Zelllinien LAMA-84, K562, HL60, KCL-22 und BV-173, bezogen auf eine Kontrollprobe eines gesunden Probanden K-1. Als *House-keeping*-Gen wurde *GUS* verwendet. Die relativen Genexpressionen sind als mittlerer Δ -C_t-Wert von drei Proben je Zelllinie dargestellt. Über den Säulen sind die FCs in Bezug auf K-1 wiedergegeben.

Probennachweis mittels Gelelektrophorese

Um die PCR-Syntheseprodukte (Amplikons) der 5 Zelllinien nachzuweisen, wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt (siehe Methodenteil). Alle Primerpaare zeigten eine saubere, einzelne Bande ohne etwaige Nebenprodukte der erwarteten Größe (Abbildung 15). *GUS* stellte sich mit etwa 100 bp Größe dar, *ESPL1* mit 150 bp, *PTTG1* mit 160 bp und *PTTG1IP* mit durchschnittlich 80 bp Größe.

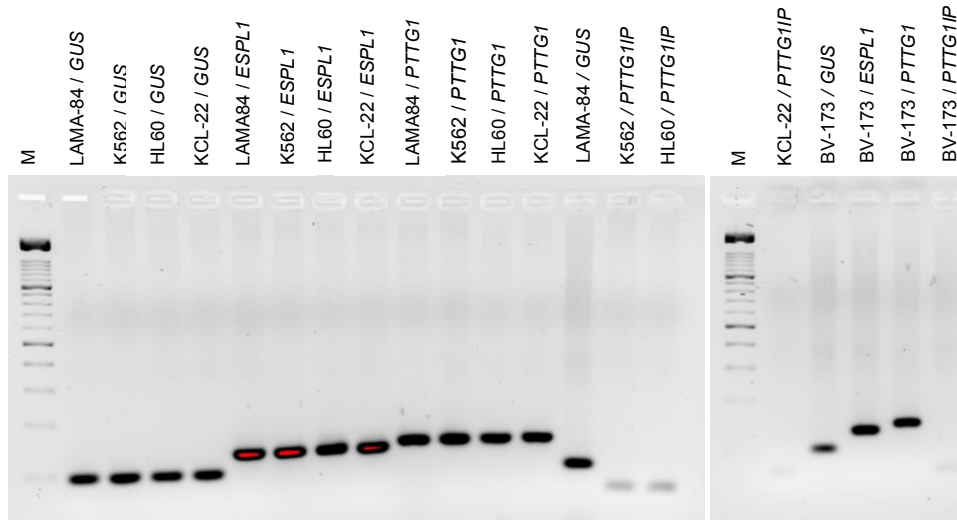


Abbildung 15: Gelelektrophorese zum Nachweis der qRT-PCR-Genprodukte von *GUS*, *ESPL1*, *PTTG1* und *PTTG1IP* von humanen leukämischen Zelllinien

Es wurden jeweils etwa 6,4 µl DNA auf das 2%ige Agarosegel aufgetragen. Die Detektion erfolgte mittels Fluoreszenz (Farbstoff *SYBRSafe*). Spur M: DNA Molekulargewichtsmarker (100 bp Leiter). *GUS*: 100 bp. *ESPL1*: 150 bp. *PTTG1*: 160 bp. *PTTG1IP*: 80 bp. Von den Zelllinien K562, HL60, KCL-22 sowie BV-173 wurden die 4 Gene *GUS*, *ESPL1*, *PTTG1* und *PTTG1IP* jeweils mit einer Bande nachgewiesen. Für LAMA-84 erfolgte der einfache Nachweis von *ESPL1*, *PTTG1* sowie der zweifache Nachweis von *GUS*.

3.2 Zuordnung zu den Kohorten

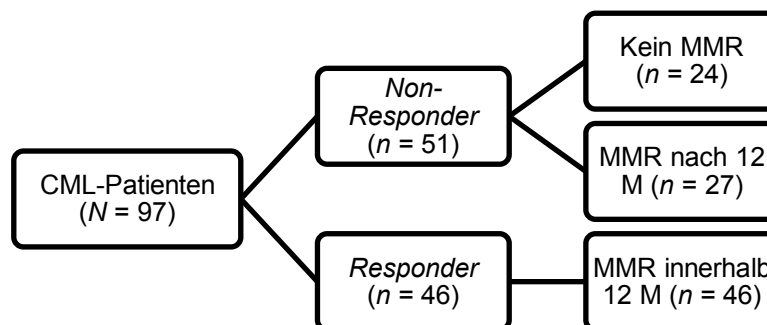


Abbildung 16: Zuordnung der Patienten zu den Kohorten

CML; chronische myeloische Leukämie; MMR, gute molekulare Remission; N, Anzahl Probanden gesamt; n, Anzahl Probanden Kohorte.

Die 97 CML-Patienten wurden pro Kohorte nach dem Kriterium des Ansprechens auf die Therapie eingeteilt (siehe Abbildung 16). Hierbei galt ein Patient als *Responder* (Ansprecher), wenn er innerhalb von 12 Monaten nach Therapiebeginn mit TKI MMR

zeigte. Von gutem molekularem Ansprechen wurde ausgegangen, wenn nach 12 Monaten TKI-Therapie die Zahl der *BCR-ABL1*-Transkripte im Blut weniger als 0,10 % nach IS beträgt. Bei der Zuordnung der Patienten zu der jeweiligen Gruppe wurde jedoch nicht nur der Stichtag, sondern auch das generelle Verhalten unter der Therapie berücksichtigt.

Responder

Alle 46 *Responder* erreichten innerhalb der ersten 12 Monate nach Therapiebeginn MMR und zeigten auch darüber hinaus ein konstantes Ansprechen auf die TKI-Therapie. Die durchschnittliche Zeit bis zum Erreichen von MMR in der Kohorte der *Responder* betrug 5,24 Monate ($SD = 3,01$ M). Abbildung 17 zeigt einen *Responder* mit typisch gutem Ansprechen im Beobachtungszeitraum. Die Aufzeichnung der *BCR-ABL1*-Transkripte und des -Quotienten sowie die Probe vom Erstdiagnosezeitpunkt stammen aus April 2015. Drei Monate später, im Juli 2015, war der *BCR-ABL1*-Quotient bereits unter 0,10 % gesunken und blieb auch die folgenden neun Monate konstant niedrig. Ein Patient wurde auch dann zu den *Respondern* gerechnet, wenn er innerhalb des Beobachtungszeitraumes kurzzeitig sein MMR verlor und einen *BCR-ABL1*-Quotienten über 0,10 % vorwies, aber ansonsten ein kontinuierlich gutes Ansprechen auf die Therapie zeigte (Abbildung 18).

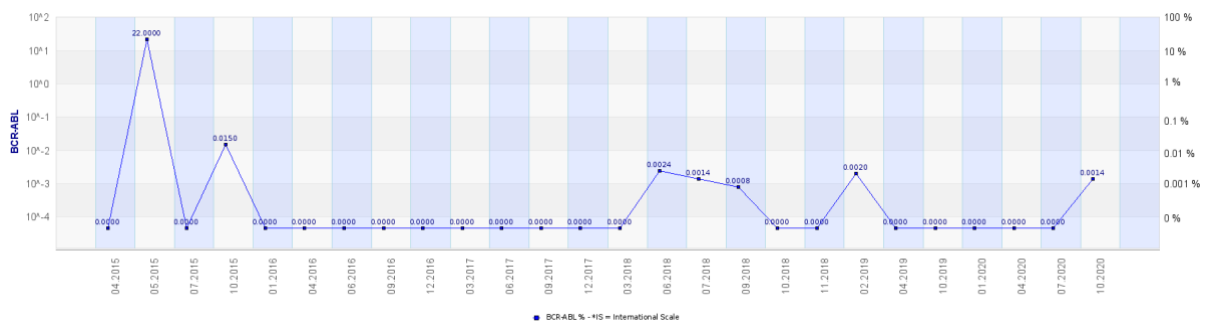


Abbildung 17: Verlauf der *BCR-ABL1*-Transkriptzahlen und des -Quotienten eines *Responders* mit typischem Verlauf (R-28)

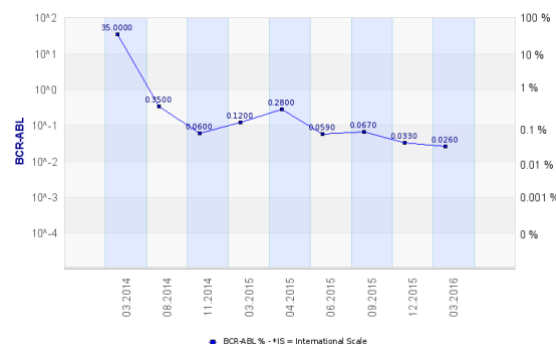


Abbildung 18: Verlauf der *BCR-ABL1*-Transkriptzahlen und -Quotienten eines *Responders* mit gutem Ansprechen, aber intermittierendem Verlust des MMRs im Beobachtungszeitraum (R-36)

Non-Responder

Ein Patient galt umgekehrt als *Non-Responder* (Nicht-Ansprecher), wenn er innerhalb der ersten 12 Monate nach Therapiebeginn kein oder nur unzureichendes molekulares

Ansprechen zeigte. Die durchschnittliche Zeit bis zum Erreichen von MMR betrug in der Kohorte der *Non-Responder* 26,04 Monate ($SD = 14,77$ M) (Tabelle 15). In Abbildung 19 ist ein solcher *Non-Responder* mit typisch schlechtem Ansprechverhalten dargestellt. Die Aufzeichnung der *BCR-ABL1*-Transkripte sowie die Probenentnahme erfolgten im Mai 2006. Über 12 Monate später liegt der *BCR-ABL1*-Quotient immer noch weit über 0,10 %. Insgesamt zeigten von den 51 *Non-Respondern* mit 24 Patienten (47,06 %) nahezu die Hälfte im Laufe der gesamten Therapie kein ausreichendes molekulares Ansprechen. 27 *Non-Responder* (52,94 %) erreichten erst nach einer Therapiedauer von mehr als 12 Monaten ein MMR. Ein Patient wurde auch dann zu den *Non-Respondern* gezählt, wenn er während des Beobachtungszeitraumes MMR zeigte, sein Verlauf jedoch für ein eher schlechtes Ansprechen sprach und der singuläre Wert eher einem Messfehler oder mangelnder Probenqualität zuzuschreiben ist (Abbildung 20).

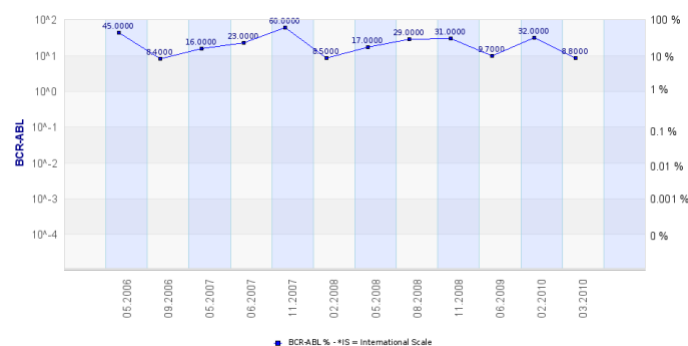


Abbildung 19: Verlauf der *BCR-ABL1*-Transkriptzahlen und -Quotienten eines *Non-Responders* mit typischem Verlauf (nR-31)

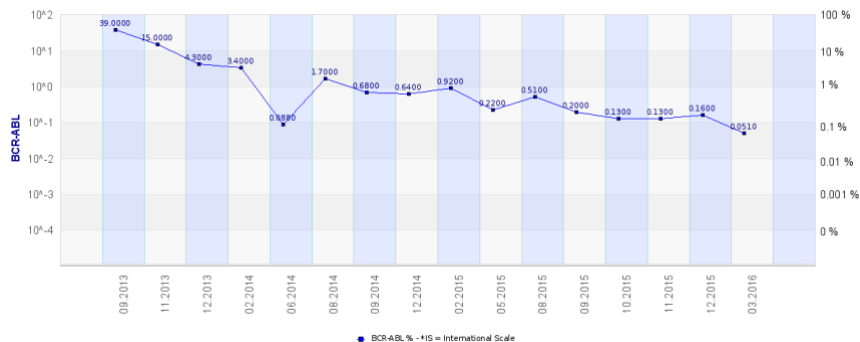


Abbildung 20: Verlauf der *BCR-ABL1*-Transkriptzahlen und des -Quotienten eines *Non-Responders* mit schlechtem Ansprechen, aber MMR im Beobachtungszeitraum (nR-36)

3.3 Untersuchung von CML-Patienten

3.3.1 Transkriptspiegel von *ESPL1*, *PTTG1* und *PTTG1IP*

Um die Transkriptspiegel der drei Gene *ESPL1*, *PTTG1* und *PTTG1IP* nachzuweisen, wurden alle Proben mittels quantitativer RT-PCR untersucht. Als *House-keeping*-Gen wurde *GUS* verwendet. Die Transkriptspiegel von *ESPL1*, *PTTG1* und *PTTG1IP* wurden in cDNA-Proben von CML-Patienten mit gutem Ansprechen auf die Therapie

(*Responder*, $n = 46$), CML-Patienten mit schlechterem Ansprechen auf die Therapie (*Non-Responder*, $n = 51$) sowie cDNA-Proben gesunder Kontrollen ($n = 51$) bestimmt und verglichen. Jedes der vier Gene wurde für jede Patientenprobe dreifach untersucht (*Triplets*) und der Mittelwert des jeweiligen *Triplets* zur weiteren Berechnung genutzt. Pro Durchlauf wurden somit acht CML-Patienten oder Kontrollpersonen untersucht. Abbildung 21 zeigt beispielhafte Fluoreszenz- und Amplifikationskurven von qRT-PCRs der drei Kohorten. In der Tabelle 15 finden sich alle Ergebnisse der Untersuchung sowie die genauen klinischen Angaben zu jedem Patienten.

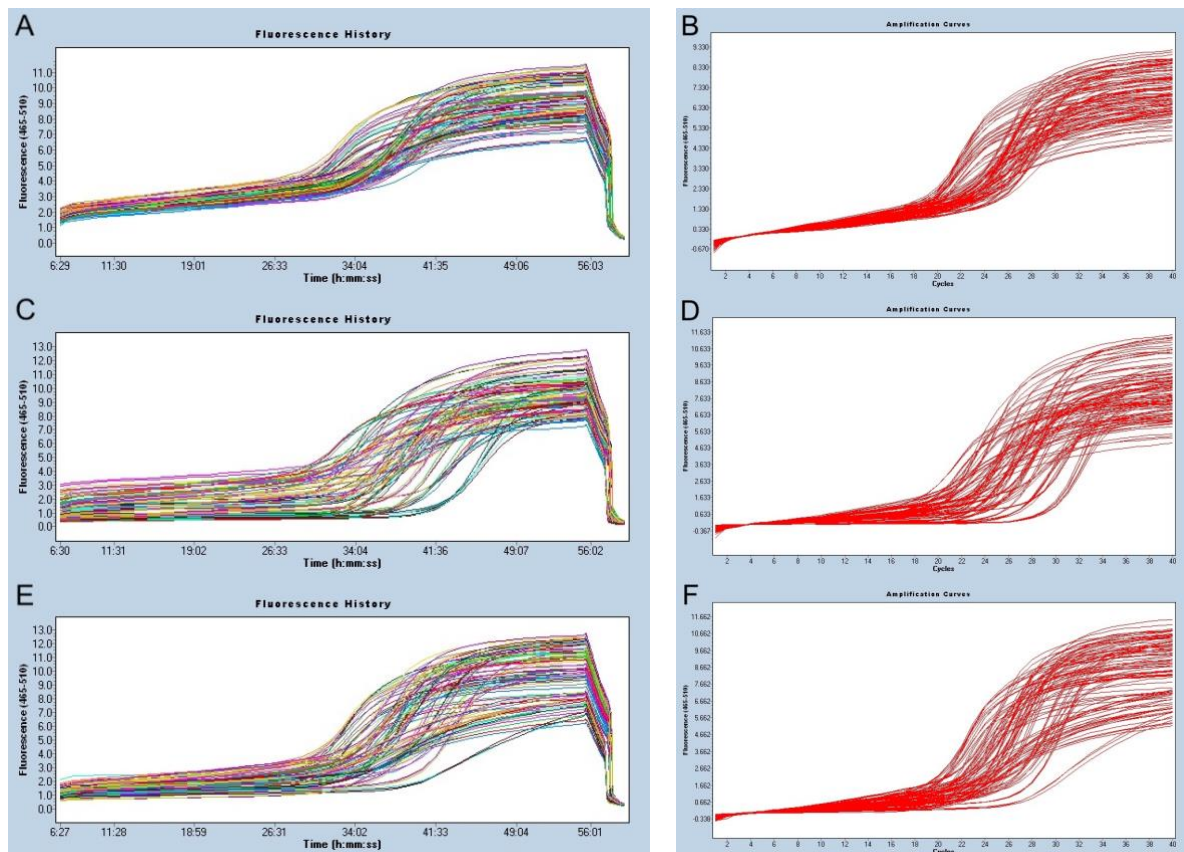


Abbildung 21: Beispielhafte Fluoreszenz- und Amplifikationskurven von CML-Patienten mit unterschiedlichem Ansprechen auf die TKI-Therapie und einer Kontrollgruppe. Die Genexpression von *ESPL1*, *PTTG1* und *PTTG1IP* wurden mittels qRT-PCR aus cDNA-Proben bestimmt. Als *House-keeping*-Gen wurde *GUS* verwendet. In den Abbildungen sind Kurven einer gesunden Kontrollgruppe ($n = 51$) und von 97 CML-Patienten mit schlechtem ($n = 47$) sowie gutem ($n = 51$) Ansprechen auf die TKI-Therapie dargestellt. In einem Durchlauf wurden 96 Proben (8 Patienten) untersucht. Links, Fluoreszenzkurven; Rechts, Amplifikationskurven. Jede Linie in den Abbildungen entspricht einer untersuchten Probe. (A) Fluoreszenzkurve Kontrollen. (B) Amplifikationskurven Kontrollen. (C) Fluoreszenzkurve *Non-Responder*. (D) Amplifikationskurve *Non-Responder*. (E) Fluoreszenzkurve *Responder*. (F) Amplifikationskurve *Responder*.

Wie unter 2.9 Quantitative Auswertung der qRT-PCR nachzulesen, wurde im Folgenden der bereinigte $\Delta-C_T$ -Wert für jede Probe ermittelt (siehe Tabelle 15). Für jede der drei Subgruppen konnten dann Gen-spezifische $\Delta-C_T$ -Mittelwerte (siehe Tabelle 13) errechnet werden, welche in einer Varianzanalyse (siehe Abbildungen 23, 24, 25) miteinander verglichen wurden. Zur Quantifizierung der Differenz zwischen den Genen wurden die *FC* berechnet. Hierbei gilt, dass *FC*-Werte zwischen 0 und 1 für eine Herunterregulierung und Werte von 1 bis unendlich für eine Überexpression der Gene sprechen. Als Kalibrator diente für jedes Gen der jeweilige $\Delta-C_T$ -Mittelwert der

gesunden Kontrollgruppe ($n = 51$). In Tabelle 16 sind die Mittelwerte der Genexpressionen der jeweiligen Kohorte, erreichte Minima sowie Maxima und die Änderung der Genexpression im Vergleich zu den Kontrollen als *FC* wiedergegeben. Abbildung 22 stellt mithilfe von Box-Whiskers-Plots die relativen Genexpressionen der einzelnen Kohorten dar. Im folgenden Abschnitt erfolgt eine nähere Betrachtung der Expressionen der einzelnen Gene innerhalb der verschiedenen Kohorten.

Tabelle 13: Änderung der relativen Genexpression ($\Delta-C_t$) in CML-Patienten und gesunden Kontrollproben

Gruppe	Gen	Mittelwert	Minimum	Maximum	FC
Kontrollen	<i>ESPL1</i>	$5,89 \pm 0,76$	3,22	7,38	-
	<i>PTTG1</i>	$4,10 \pm 0,65$	1,92	6,62	-
	<i>PTTG1IP</i>	$3,07 \pm 0,93$	0,06	4,50	-
Non-Responder (n = 51)	<i>ESPL1</i>	$4,53 \pm 1,86$	1,57	10,47	4,40
	<i>PTTG1</i>	$3,41 \pm 1,72$	0,22	8,69	3,64
	<i>PTTG1IP</i>	$2,87 \pm 2,57$	-0,86	11,21	3,05
Responder (n = 46)	<i>ESPL1</i>	$4,94 \pm 1,51$	2,20	7,73	3,13
	<i>PTTG1</i>	$3,42 \pm 0,78$	1,07	5,03	1,88
	<i>PTTG1IP</i>	$2,38 \pm 1,69$	-0,76	7,58	2,67

n, Anzahl Probanden Kohorte; *FC*, Fold change.

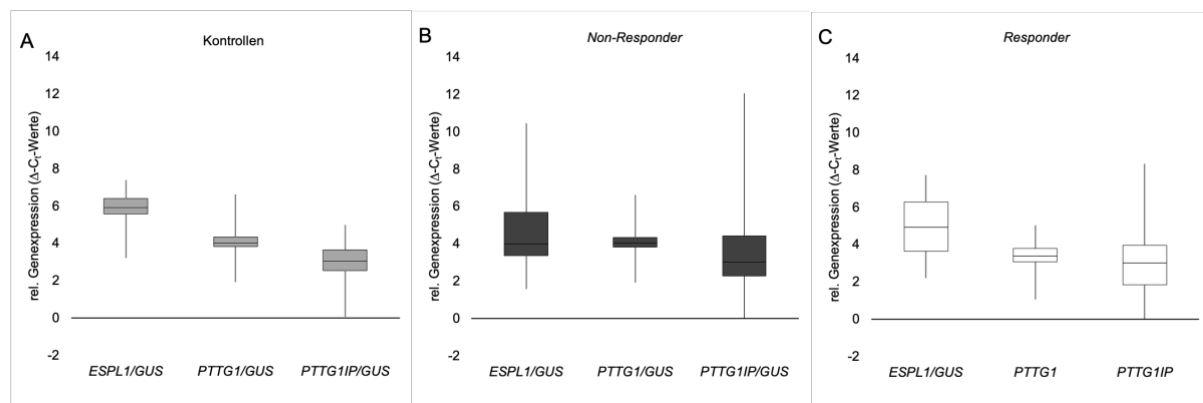


Abbildung 22: Transkriptspiegel von Separase/*ESPL1*, Securin/*PTTG1* und *PTTG1 Interacting Protein/PTTG1IP* bei CML-Patienten

Die Genexpression von *ESPL1* sowie die Genexpression der Hilfs- und Regulatorproteine *PTTG1* und *PTTG1IP* ($\Delta-C_t$ -Werte) wurden mittels qRT-PCR bestimmt. Als *House-keeping*-Gen wurde *GUS* verwendet. Als relative Genexpression sind die $\Delta-C_t$ -Werte dargestellt, welche sich aus den gemessenen C_t -Werten minus C_t -Werten von *GUS* ergeben. In den Abbildungen sind die Expressionen einer Kontrollgruppe ($n = 51$) und von CML-Patienten mit schlechtem (*Non-Responder*; $n = 47$) sowie gutem (*Responder*; $n = 51$) Ansprechen auf die jeweilige TKI-Therapie dargestellt. Untersucht wurden cDNA-Proben aus EDTA-Blut sowie KM-Proben. Box-Whiskers-Plots der relativen Genexpression bezogen auf die einzelnen Kohorten. Die Boxen entsprechen dem Interquartilsabstand (1. und 3. Quartil), die Whisker den Minimal- und Maximalwerten und der Querstrich dem Median. (A) Genexpression Kontrollen (Normalpersonen). (B) Genexpression Non-Responder. (C) Genexpression Responder.

3.3.2 *ESPL1*/Separase

Für das Protein Separase codiert das Gen *ESPL1*. Es wurde in den Proben der Kontrollgruppe mit einem mittleren Δ -C_t-Wert von 5,89 ($SD = 0,76$) und damit mit einem höchst signifikanten Unterschied ($p < 0,001$) zu den Transkriptspiegeln der *Non-Responder* und *Responder* exprimiert (siehe Abbildung 23). Im Vergleich mit den gemessenen Expressionen der *Non-Responder* ($M = 4,53$, $SD = 1,86$) zeigten diese eine höchst signifikante Überexpression von *ESPL1* etwa um den Faktor 4, $p < 0,001$, $FC^{ESPL1} = 4,40$. Auch die Transkriptspiegel der *Responder* ($M = 4,94$, $SD = 1,51$) waren mit einem *Fold change* von 3,13 gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöht ($p = 0,013$). Zwischen den Expressionen von *ESPL1* der *Non-Responder* und *Responder* konnte jedoch kein signifikanter Unterschied, $p = 0,391$, nachgewiesen werden.

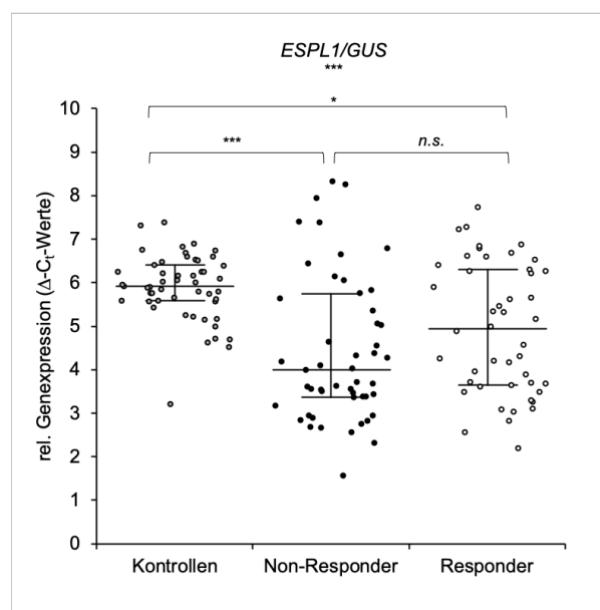


Abbildung 23: Transkriptspiegel von Separase/*ESPL1* bei CML-Patienten

Die Genexpression von *ESPL1* (Δ -C_t-Werte) wurde mittels qRT-PCR bestimmt. Als *House-keeping*-Gen wurde *GUS* verwendet. Als relative Genexpression sind die Δ -C_t-Werte dargestellt, welche sich aus den gemessenen C_t-Werten minus C_t-Werten von *GUSB* ergeben. In den Abbildungen sind die Expressionen einer Kontrollgruppe ($n = 51$) und von 97 CML-Patienten mit schlechtem (*Non-Responder*; $n = 47$) sowie gutem (*Responder*; $n = 51$) Ansprechen auf die jeweilige TKI-Therapie dargestellt. Untersucht wurden cDNA-Proben aus EDTA-Blut sowie KM-Proben. Punktwolkendiagramme inklusive Box-Whiskers-Plots der relativen Genexpression eines Gens. Jeder Datenpunkt in der Abbildung entspricht einer untersuchten Probe. Die äußeren Linien entsprechen dem Interquartilsabstand (1. und 3. Quartil), die Whisker den Minimal- und Maximalwerten und der Querstrich dem Median. *n.s.*, nicht signifikant; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Relative Genexpression von *ESPL1* als Prädiktor für das Ansprechverhalten von CML-Patienten auf die Therapie mit TKI

Um zu überprüfen, ob die relative Genexpression von *ESPL1* als Prädiktor für das Ansprechen eines CML-Patienten auf die Therapie geeignet ist, wurde eine logistische Regression durchgeführt. Hiermit wurde berechnet, wie hoch die Wahrscheinlichkeit einer Probe in Abhängigkeit des *ESPL1*-Wertes ist, einem *Non-Responder* zu entstammen. Der dazugehörige p -Wert ist mit $p = 0,244$, OR = 0,87, 95 % [0,68 – 1,10] nicht signifikant.

3.3.3 PTTG1/Securin

Für das Gen *PTTG1*, welches für ein Regulatorprotein der Separase codiert, wurde ein signifikanter Unterschied ($p = 0,004$) zwischen den Kontrollen ($M = 4,10$, $SD = 0,65$) und einer anderen Gruppe (*Non-Responder* oder *Responder*) nachgewiesen. Abbildung 26 zeigt die relativen Genexpressionen von *PTTG1* als Streudiagramm. (siehe Abbildung 24). Im Vergleich zu den Kontrollen wurde *PTTG1* in Zellen der *Non-Responder* mit einem *Fold change* von 3,64 und einem p -Wert = 0,013 deutlich hochreguliert exprimiert ($M = 3,41$, $SD = 1,72$). In Zellen der *Responder* ($M = 3,42$, $SD = 0,78$) konnte, verglichen mit gesunden Kontrollen, eine geringere Überexpression von *PTTG1* um den Faktor 2 ($FC^{PTTG1} = 1,88$) gezeigt werden. Der Unterschied der Expression zwischen den Kohorten der *Non-Responder* und *Responder* war für *PTTG1* mit einem p -Wert $< 1,000$ nicht signifikant.

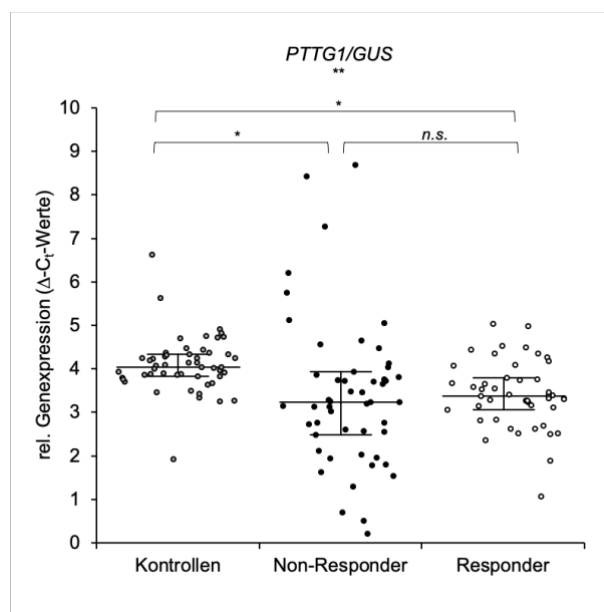


Abbildung 24: Transkriptspiegel von Securin/*PTTG1* bei CML-Patienten mit unterschiedlichem Ansprechen auf die TKI-Therapie

Die Genexpression von *PTTG1* ($\Delta-C_T$ -Werte) wurde mittels qRT-PCR bestimmt. Als *House-keeping*-Gen wurde *GUS* verwendet. Als relative Genexpression sind die $\Delta-C_T$ -Werte dargestellt, welche sich aus den gemessenen C_T -Werten minus C_T -Werten von *GUS* ergeben. In den Abbildungen sind die Expressionen einer Kontrollgruppe ($n = 51$) und von 97 CML-Patienten mit schlechtem (*Non-Responder*, $n = 47$) sowie gutem (*Responder*, $n = 51$) Ansprechen auf die jeweilige TKI-Therapie dargestellt. Untersucht wurden cDNA-Proben aus EDTA-Blut sowie KM-Proben. Punktwolkendiagramme inklusive Box-Whiskers-Plots der relativen Genexpression eines Genes. Jeder Datenpunkt in der Abbildung entspricht einer untersuchten Probe. Die äußeren Linien entsprechen dem Interquartilsabstand (1. und 3. Quartil), die Whisker den Minimal- und Maximalwerten und der Querstrich dem Median. *n.s.*, nicht signifikant; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

3.3.4 PTTG1IP

Bei Betrachtung der relativen Genexpressionen von *PTTG1IP* konnte im Hinblick auf die Gesamtgruppe ($N = 148$) zwischen den drei Kohorten kein signifikanter Unterschied ($p = 0,174$) nachgewiesen werden, wie in Abbildung 25 verdeutlicht wird. *PTTG1IP* wird in Zellen der *Non-Responder* mit einem *Fold change* von 3,05 vermehrt exprimiert, verglichen mit gesunden Kontrollen (*Non-Responder* $M = 2,87$, $SD = 2,57$, Kontrollen $M = 3,07$, $SD = 0,93$). Für die *Responder* konnte eine etwas geringere, jedoch ähnliche Überexpression nahe dem Faktor 3 von *PTTG1IP* gemessen werden ($M = 2,38$, $SD = 1,69$, $FC^{PTTG1IP} = 2,67$).

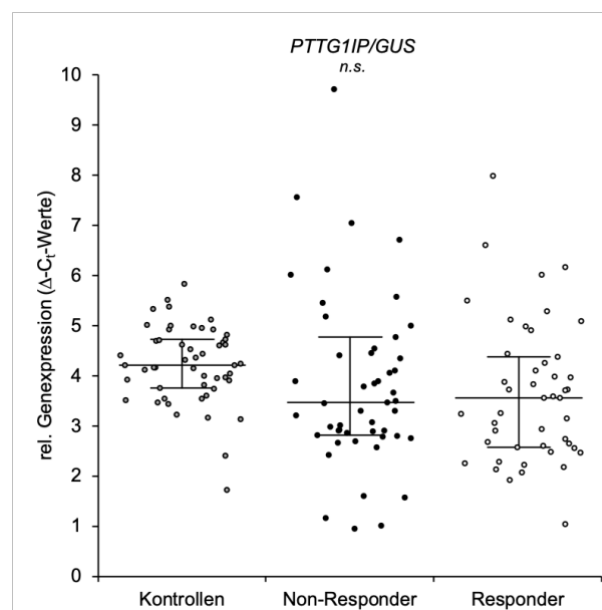


Abbildung 25: Transkriptspiegel von *PTTG1 Interacting Protein/PTTG1IP* bei CML-Patienten
Die Genexpression von *PTTG1IP* wurde mittels *Real-Time-PCR* bestimmt. Als *House-keeping-Gen* wurde *GUS* verwendet. Als relative Genexpression sind die $\Delta-C_T$ -Werte dargestellt, welche sich aus den gemessenen C_T -Werten minus C_T -Werten von *GUSB* ergeben. In den Abbildungen sind die Expressionen einer Kontrollgruppe ($n = 51$) und von 97 CML-Patienten mit schlechtem (*Non-Responder*, $n = 47$) sowie gutem (*Responder*, $n = 51$) Ansprechen auf die jeweilige TKI-Therapie dargestellt. Untersucht wurden cDNA-Proben aus EDTA-Blut sowie KM-Proben. Punktwolkendiagramme inklusive Box-Whiskers-Plots der relativen Genexpression eines Gens. Jeder Datenpunkt in der Abbildung entspricht einer untersuchten Probe. Die äußeren Linien entsprechen dem Interquartilsabstand (1. und 3. Quartil), die Whisker den Minimal- und Maximalwerten und der Querstrich dem Median. *n.s.*, nicht signifikant.

3.3.5 Korrelation der Genexpressionen

Um zu untersuchen, inwieweit die Transkriptspiegel der drei untersuchten Gene miteinander korrelieren und wie stark der Zusammenhang zwischen den Genen ist, wurden sowohl für die Gesamtgruppe als auch die einzelnen Kohorten die Korrelationskoeffizienten nach Pearson berechnet (siehe Tabelle 14).

In der Kontrollgruppe ($n = 51$) wurde zwischen den Transkriptspiegeln von *ESPL1* und *PTTG1* eine positive Korrelation mittlerer Stärke ($r = 0,25$) detektiert, welche sich jedoch mit $p = 0,076$ als nicht signifikant erwies. Die Genexpressionen von *ESPL1* und *PTTG1IP* korrelierten bei den Kontrollen signifikant und moderat positiv ($p = 0,031$, $r = 0,30$). *PTTG1* korrelierte mittelstark positiv, jedoch nicht signifikant mit *PTTG1IP* ($p = 0,094$, $r = 0,24$).

Bei Betrachtung aller untersuchten CML Patienten ($N = 97$) korrelierte die relative Genexpression von *ESPL1* stark positiv und höchst signifikant ($p < 0,001$, $r = 0,56$) mit der Expression von *PTTG1*. Zwischen *ESPL1* und *PTTG1IP* konnte eine schwach positive, jedoch nicht signifikante Korrelation nachgewiesen werden ($p = 0,165$, $r = 0,12$). Die relative Genexpression von *PTTG1* korrelierte moderat positiv ($r = 0,42$) und mit $p < 0,001$ höchst signifikant mit der Expression von *PTTG1IP*.

Für die Beziehung zwischen den relativen Genexpressionen von *ESPL1* und *PTTG1* konnten sowohl für die *Non-Responder* als auch die *Responder* eine starke positive Korrelation ($r = 0,58$, $r = 0,55$) nachgewiesen werden, welche in beiden Gruppen höchst signifikant war ($p < 0,001$, $p < 0,001$). Der Unterschied dieser Korrelationen zwischen den beiden Kohorten war nicht signifikant, $p = 0,849$, $q = 0,04$. Die Transkriptspiegel von *ESPL1* und *PTTG1IP* zeigten in Zellen der *Non-Responder* wie auch in der Gesamtgruppe nur eine leichte, positive und nicht signifikante Korrelation ($p = 0,075$, $r = 0,25$). *ESPL1* und *PTTG1IP* korrelierten bei den *Respondern* signifikant ($p = 0,044$, $r = -0,30$) und unterschieden sich mit einer moderat negativen Korrelation sehr signifikant von den *Non-Respondern* ($p = 0,007$). Die Korrelationen beider Kohorten unterschieden sich hierbei mit großem Effekt sehr signifikant, $p = 0,007$, $q = 0,56$. Die Assoziation zwischen den relativen Genexpressionen von *PTTG1* und *PTTG1IP* fiel bei den *Non-Respondern* signifikant ($p = 0,035$, $q = 0,44$) stärker positiv ($r = 0,25$, $p < 0,001$) als bei den *Respondern* ($r = 0,13$, $p = 0,395$) aus.

Tabelle 14: Korrelationen der Genexpressionen (Korrelationskoeffizienten nach Pearson)

	Kontrollgruppe ($n = 51$)	CML Patienten Gesamt ($N = 97$)	<i>Non-Responder</i> ($n = 51$)	<i>Responder</i> ($n = 46$)
<i>ESPL1/PTTG1</i>	0,25	0,56 ***	0,58 ***	0,55 ***
<i>ESPL1/PTTG1IP</i>	0,30 *	0,12	0,25	-0,30 *
<i>PTTG1/PTTG1IP</i>	0,24	0,42 ***	0,52 ***	0,13

N , Anzahl Probanden gesamt; n , Anzahl Probanden Kohorte; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Tabelle 15: Detaillierte Übersicht der 97 untersuchten CML-Patienten

Nr.	ESPL1 (Δ -Ct- Wert)	PTTG1 (Δ -Ct- Wert)	PTTG1 IP (Δ -Ct- Wert)	Zeit bis MMR (M)	Bruchpunkttyp	Geschlecht	Alter (a)	Leukozytenzahl/ μ l Diagnose	BCR-ABL1-Quotient (%)	Q(IS)	Initialtherapie
CML-Patienten der Kohorte <i>Non-Responder</i> (n = 51)											
nR-1	5,82	3,66	2,40	> 12	e13a2	m	57	4800	18	-	Nilotinib
nR-2	4,56	4,04	6,06	> 12	n.b.	m	49	97 300	76	-	Nilotinib
nR-3	4,65	3,74	1,44	> 12	e13a2	m	45	21 800	22	-	Dasatinib
nR-4	3,38	3,70	1,48	> 12	e14a2	m	63	399 000	100	-	Imatinib, Bosutinib
nR-5	4,28	3,81	4,00	14	e13a2, e14a2	w	29	81 400	31	-	Nilotinib + IFN α
nR-6	2,95	2,55	1,96	14	e13a2, e14a2	w	48	36 700	61	-	Imatinib
nR-7	2,94	2,77	4,22	> 14	e13a2, e14a2	w	67	34 000	14	-	Imatinib
nR-8	6,44	3,86	-0,61	15	e14a2	w	61	5800	13	-	Imatinib
nR-9	6,65	3,49	1,96	16	e14a2	m	83	2600	0,62	0,48	Imatinib
nR-10	8,26	8,69	10,29	16	e14a2	w	41	8000	0,15	0,13	Nilotinib, + IFN α
nR-11	5,64	5,76	2,67	16	e14a2	m	47	4500	31 *	-	Imatinib, Dasatinib
nR-12	7,38	3,29	1,19	> 16	e14a2	m	81	3500	25	-	Imatinib + IFN α
nR-13	3,99	3,13	4,54	17	e13a2, e14a2	m	75	40 200	52	-	Dasatinib
nR-14	6,15	3,73	-0,86	17	e13a2	m	51	6500	0,69	0,53	Nilotinib
nR-15	2,84	2,73	1,38	> 17	e13a2	m	59	75 500	51	-	HU, Imatinib
nR-16	5,37	5,06	2,93	18	e13a2	m	27	168 400	131	-	Imatinib, Dasatinib
nR-17	3,62	2,61	1,24	18	e13a2	m	41	18 200	52 *	-	SZT §
nR-18	3,36	0,51	2,61	> 18	e14a2	m	57	57 000	33	-	Nilotinib, + IFN α
nR-19	2,32	1,81	1,36	19	e13a2	w	66	256 150	43 *	-	Imatinib
nR-20	3,69	3,76	2,19	19	e13a2	w	68	80 000	4,6 *	4,0 *	Imatinib
nR-21	3,53	3,26	1,50	> 20	e1a2	m	87	52 300	38	-	HU, Nilotinib, + IFN α
nR-22	7,95	7,28	9,65	21	e13a2, e14a2	w	33	9100	17	-	Nilotinib
nR-23	2,66	1,95	3,30	21	e14a2	m	40	404 000	80	-	Nilotinib
nR-24	5,75	3,23	-0,79	21	e14a2	w	58	2000	0,99	0,76	Nilotinib, Imatinib
nR-25	2,76	1,78	1,34	21	e14a2	m	49	4900 *	2,3	1,8	Nilotinib
nR-26	2,57	2,03	1,68	> 21	e14a2	w	67	23 900	52	-	HU, Nilotinib
nR-27	7,40	8,42	11,21	23	e13a2	m	49	61 400	26	-	HU, Nilotinib, Imatinib
nR-28	1,57	1,29	2,54	23	e14a2	w	70	297 400	7,1 *	6,2 *	Imatinib
nR-29	5,02	1,54	-0,11	23	e13a2, e14a2	m	76	40 400	28 *	-	Imatinib
nR-30	2,83	4,48	2,88	25	e13a2, e14a2	w	48	113 700	12 *	-	Imatinib
nR-31	3,61	2,48	2,14	25	e14a2	w	70	80 100	9,6 *	8,4 *	Imatinib
nR-32	4,39	3,72	4,68	26	e14a2	m	50	118 000	66	-	Nilotinib + IFN α , Dasatinib
nR-33	3,48	2,57	3,45	27	e13a2	m	50	149 700	4,4 *	3,9 *	Imatinib
nR-34	8,33	0,69	6,46	28	e14a2	m	59	9300	20 *	-	Imatinib §

nR-35	6,79	3,24	1,31	29	e13a2, e14a2	m	78	5200	2,1	1,8	Imatinib
nR-36	4,20	5,12	7,07	29	e13a2	m	28	380 000	39	-	Ara-C, Dasatinib, Nilotinib
nR-37	3,56	4,65	3,35	29	e13a2	m	57	200 000	77	-	Imatinib
nR-38	3,56	4,57	0,91	30	e14a2	w	83	33 700	178	-	Imatinib
nR-39	4,03	3,47	1,47	31	e13a2	m	84	5300	15	-	Imatinib §
nR-40	3,18	3,15	5,22	33	e14a2	m	26	56 800	4,7	4,1	HU, Nilotinib, + IFN α
nR-41	2,89	1,62	1,57	> 32	e13a2	w	60	355 000	30 *	-	Nilotinib
nR-42	3,44	2,77	3,72	35 †	e13a2	m	86	56 300	2,9 *	2,6 *	Imatinib
nR-43	3,50	3,03	1,62	36	e14a2	w	56	181 000	52	-	HU, Nilotinib, + IFN α
nR-44	5,05	4,13	3,22	40	e13a2	w	69	59 200	102	-	HU, Nilotinib, Imatinib
nR-45	3,38	1,95	2,16	41	e14a2	w	52	87 600	43	-	Nilotinib
nR-46	4,33	3,21	1,10	> 42	e13a2	w	71	7200	57	-	Imatinib
nR-47	6,05	3,93	-0,07	51	e13a2	w	49	5000	1,2	0,92	Nilotinib, Bosutinib,
nR-48	2,69	2,11	5,34	51	e14a2	w	57	264 000	45	-	Imatinib
nR-49	3,72	0,22	2,66	64	e13a2	m	67	45 000	20 *	-	Imatinib
nR-50	4,10	3,14	1,49	86	e13a2	m	50	120 000	4,8 *	4,2 *	Imatinib §
nR-51	10,47	6,21	1,85	> 91	e13a2	m	82	11 000	8,3	7,3	Imatinib

CML-Patienten der Kohorte *Responder* (n = 46)

R-1	6,31	4,27	0,61	<1	e13a2	m	56	7300	0,016 *	0,012 *	Dasatinib
R-2	6,53	3,39	1,18	1	e13a2	w	77	7000	2,8	2,5	Imatinib
R-3	6,60	4,53	1,09	1	e13a2	m	59	4400	0,59	0,52	Imatinib
R-4	6,88	4,35	2,77	2	e13a2	m	79	6900	0,40	0,35	Imatinib
R-5	6,26	3,32	0,96	2	e13a2	m	63	10 300	0,57	0,50	Imatinib
R-6	6,22	3,39	1,29	2	e13a2, e14a2	w	71	7300	30	-	Nilotinib, + IFN α
R-7	6,62	3,54	0,56	2	e13a2	m	85	3400	6,7	5,2	Imatinib
R-8	7,28	3,38	1,49	2	e13a2	m	27	3500	0,71	0,55	Nilotinib + IFN α
R-9	5,47	4,09	3,89	2	e14a2	w	73	7000	22	-	Nilotinib
R-10	5,33	3,75	2,93	2	e14a2	w	57	5800	7,8	6,0	Imatinib
R-11	6,40	3,67	0,71	2	e13a2, e14a2	w	65	6700	0,91	0,90	Dasatinib
R-12	7,73	5,03	3,32	3	e14a2	w	41	6700	1,1	0,97	HU, Dasatinib
R-13	3,49	3,15	7,58	3	e13a2	m	28	68 600	51	-	n.b.
R-14	5,35	3,40	0,66	3	e14a2	m	53	12 100	1,3	1,1	Dasatinib, Nilotinib
R-15	7,23	3,59	1,22	3	e14a2	m	84	5300	0,39	0,30	Imatinib
R-16	3,69	3,33	-0,76	3	e13a2	w	63	19 700	68	-	Nilotinib, + IFN α
R-17	4,20	2,62	3,98	3	e13a2, e14a2	m	53	208 000	48	-	Dasatinib
R-18	6,69	4,99	3,11	3	e13a2	m	72	6200	0,20	0,18	Nilotinib
R-19	3,26	1,89	2,47	4	e13a2, e14a2	w	28	178 000	78	-	Dasatinib
R-20	5,66	3,45	2,46	5	e13a2, e14a2	m	54	6300	0,14	0,12	Imatinib
R-21	6,80	4,35	2,47	5	e13a2	m	59	7100	4,8	4,2	Bosutinib
R-22	3,96	3,29	2,64	5	e13a2	m	28	13 800	34	-	Nilotinib
R-23	6,84	3,54	0,31	5	e13a2, e14a2	w	49	3500	4,2	3,2	Imatinib

R-24	2,20	2,62	0,99	5	e13a2, e14a2	m	48	43 800	85	-	Nilotinib
R-25	4,31	3,76	2,31	5	e13a2, e14a2	m	70	4300	23	-	Nilotinib
R-26	2,82	3,27	1,52	6	e13a2	m	14	316 000	73	-	Imatinib
R-27	4,89	4,44	5,93	6	e13a2, e14a2	w	54	27 600	6,8	6,0	Nilotinib
R-28	3,09	2,52	2,59	6	e14a2	w	70	25 600	36	-	Nilotinib
R-29	3,49	2,52	1,07	6	e14a2	m	85	86 600	49	-	Nilotinib, + IFN α
R-30	3,89	2,69	2,26	6	e14a2	m	73	26 100	53	-	Nilotinib + IFN α
R-31	2,56	2,81	1,66	6	e13a2	m	47	166 000	55	-	Nilotinib
R-32	3,10	2,50	1,78	6	e14a2	w	67	46 600	70	-	Nilotinib + IFN α
R-33	3,64	3,24	2,27	6	e14a2	w	50	22 000	48	-	Nilotinib
R-34	4,99	3,79	0,49	7	e13a2	m	76	8800	12	9,2	Nilotinib, Imatinib
R-35	3,67	3,31	4,11	7	e14a2	w	67	38 200	33	-	Dasatinib
R-36	4,26	4,07	4,60	8	e13a2	m	52	43 800	35	-	Imatinib
R-37	4,17	4,49	5,22	8	e13a2	m	43	132 000	79	-	HU, Nilotinib + IFN α
R-38	6,27	3,65	0,74	8	e13a2	m	46	5100	0,90	0,69	Nilotinib
R-39	5,62	3,27	1,13	8	e13a2	w	38	5300	40	-	Nilotinib
R-40	5,91	3,06	1,89	8	e14a2	w	58	8400	34	-	Nilotinib
R-41	3,72	2,37	1,91	8	e13a2	m	78	35 100	0,23 *	0,18 *	Imatinib
R-42	3,29	4,18	5,40	10	e14a2	w	84	93 700	6,4 *	5,6 *	Imatinib, Nilotinib
R-43	3,61	2,83	4,15	11	e13a2, e14a2	m	66	70 900	58	-	Nilotinib
R-44	5,17	3,12	2,76	11	e13a2	w	68	5200	0,87	0,67	Nilotinib, Dasatinib
R-45	4,58	1,07	3,25	11	e13a2	m	32	17 100	81	-	HU, Nilotinib
R-46	3,04	3,16	4,34	12	e14a2	w	49	103 000	68	-	Nilotinib

Kontrollgruppe (n = 51)

K-1	6,60	4,72	3,60
K-2	5,79	4,74	2,70
K-3	3,22	1,92	1,87
K-4	5,15	4,37	2,48
K-5	4,52	3,28	1,76
K-6	5,00	4,92	2,76
K-7	5,77	4,23	3,64
K-8	5,89	6,62	3,01
K-9	6,83	4,47	3,44
K-10	6,61	3,50	3,23
K-11	5,59	3,79	3,06
K-12	5,84	3,89	4,61
K-13	5,88	4,20	4,41
K-14	6,06	4,71	5,00
K-15	6,76	3,86	4,01
K-16	6,74	3,83	3,54
K-17	6,16	3,89	3,18

K-18	6,01	3,35	2,79
K-19	5,17	4,83	3,78
K-20	5,58	3,97	3,68
K-21	6,02	4,28	4,45
K-22	5,58	5,62	2,24
K-23	6,22	4,37	3,91
K-24	6,26	4,76	4,15
K-25	6,25	3,63	3,92
K-26	5,22	4,26	3,94
K-27	7,32	4,26	2,94
K-28	5,25	4,15	3,98
K-29	6,39	4,33	3,05
K-30	5,75	4,02	3,53
K-31	5,57	3,88	3,01
K-32	5,61	4,04	0,06
K-33	6,52	3,43	2,58
K-34	5,66	3,86	3,54
K-35	4,69	4,24	3,09
K-36	5,92	3,71	2,71
K-37	6,16	4,15	2,24
K-38	5,43	4,08	3,66
K-39	6,89	3,83	3,33
K-40	6,26	3,93	3,29
K-41	6,40	3,45	2,50
K-42	4,72	3,26	0,88
K-43	7,38	4,32	3,99
K-44	6,09	3,92	2,84
K-45	4,63	3,67	2,74
K-46	6,51	4,03	2,33
K-47	6,69	4,34	2,99
K-48	5,77	4,01	2,17
K-49	5,79	4,44	1,80
K-50	6,48	4,09	2,13
K-51	5,96	3,76	2,22

CML, chronische myeloische Leukämie; MMR, gute molekulare Remission; IS, Internationaler Standard; *n*, Anzahl Probanden Kohorte; nR, *Non-Responder*, R, *Responder*; K, Kontrollen; IFN α , Interferon- α ; HU, Hydroxyurea; SZT, Stammzelltransplantation; Ara-C, Cytarabin.

> weitere Daten darüber hinaus nicht verfügbar

□ Untersuchte Probe nicht von Therapiebeginn

* Aufgrund schlechter Probenqualität wurden die Werte der nachfolgenden Probe herangezogen

△ abweichender Verlauf

§ MMR nach SZT

† Tod durch Blastenkrise

3.3.6 Räumliche Abstände der Expressionswerte

Da für jeden Patienten drei Δ -Ct-Werte (*ESPL1*, *PTTG1* und *PTTG1IP*) vorliegen, ist es naheliegend, diese für die Erstellung eines 3-D-Plots einzusetzen (siehe Abbildung 26). Möglicherweise können so Cluster von Patienten identifiziert werden, die prädiktorische oder funktionale Rückschlüsse zulassen. Zusätzlich können dann basierend auf den Mittelwerten der Expressionsdaten der drei Gene räumliche Distanzen berechnet werden. Hierfür wurde eine Kugel im dreidimensionalen Raum geometrisch konstruiert, deren Zentrum aus den drei Mittelwerten für *ESPL1*, *PTTG1* und *PTTG1IP* der *Responder* und *Non-Responder* definiert wurde. Dieses Zentrum bildet annähernd den Durchschnitt aller drei Expressionen. Der Abstand ist hierbei die Entfernung einer Beobachtungseinheit vom Zentrum.

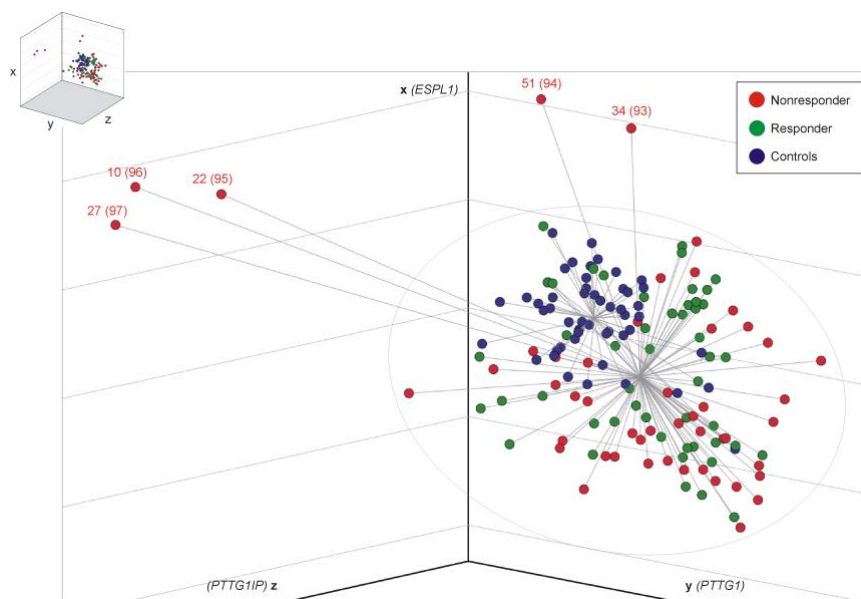


Abbildung 26: 3D-Streudiagramm zur Veranschaulichung von 148 analysierten Proben. Relative Transkriptlevel-Daten (Δ -Ct-Werte) der Gene *ESPL1* (x-Achse), *PTTG1* (y-Achse) und *PTTG1IP* (z-Achse) wurden im dreidimensionalen Raum mit einem Zentrum für gesunde Kontrollen (blau, $n = 51$) und einem gemeinsamen Zentrum für CML *Responder* (grün, $n = 46$) und *Non-Responder*-Proben (rot, $n = 51$) angeordnet. Erste Zahl: Patientennummer Tabelle 15; Zahl in Klammer: Tabelle 17.

Der Abstand vom Zentrum betrug für die Gesamtgruppe ($N = 97$) der untersuchten CML-Patienten im Mittel 2,62 ($SD = 1,62$) mit einer großen Streuung vom Mittelwert ($v = 61,83\%$). Die Kohorte der *Non-Responder* zeigte durchschnittlich eine größere Distanz ($M = 2,98$, $SD = 2,02$) als die *Responder* ($M = 2,23$, $SD = 0,87$) vom Zentrum. Die *Non-Responder* unterschieden sich im Mittel mit einer Distanz von 0,75 signifikant von den *Respondern*, $p = 0,019$, $d = -0,47$, 95 % CI [-0,87, -0,07]. Bei Betrachtung der Verteilung zeigten die *Non-Responder* ein Minimum von 0,98 und einen maximalen Abstand von 10,28 mit einer Spannweite von 9,30. Im Vergleich hierzu wiesen die *Responder* einen ähnlichen Minimalwert von 0,55 auf, erreichten jedoch maximal nur einen Abstand von 5,10 und eine Spannweite von 4,55. Auch die Streuung vom Mittelwert erwies sich bei den *Non-Respondern* mit einem Variationskoeffizienten von 67,89 % deutlich stärker als bei der Kohorte der *Responder* ($v = 39,00\%$).

Der Abstand als Prädiktor für das Ansprechverhalten von CML-Patienten auf die Therapie mit TKI

Anschließend erfolgte durch eine logistische Regression die Erstellung einer Gleichung, basierend auf dem Hypothesentest zur Korrelation und Regression.¹⁸⁷ Mit dieser Gleichung lässt sich in Abhängigkeit vom jeweiligen Abstand einer Beobachtungseinheit die Wahrscheinlichkeit berechnen, dass es sich bei der untersuchten Probe um einen *Non-Responder* handelt. Diese Assoziation ist signifikant, $p = 0,039$, $OR = 1,48$, $CI\ 95\ % [1,02, 2,14]$. Die Wahrscheinlichkeit einer Probe, einem *Non-Responder* zu entstammen, erhöht sich hierbei um etwa 47,90 %, wenn der Abstand um eine Einheit zunimmt. Ab einem Abstand von 5 beträgt die Wahrscheinlichkeit, dass es sich bei der untersuchten Probe um einen *Non-Responder* handelt, 75,00 %. Die Wahrscheinlichkeit eines *Responders* läge hierbei bei 25,00 %. In Tabelle 16 sind berechnete Wahrscheinlichkeiten für verschiedene Werte des Abstandes wiedergegeben. In dem Liniendiagramm (Abbildung 27) wird erkennbar, dass es bei steigendem Abstand wahrscheinlicher wird, einen *Non-Responder* zu prognostizieren.

Tabelle 16: Wahrscheinlichkeiten für *Non-Responder/Responder* in Bezug auf den Abstand

Abstand	Wahrscheinlichkeit nR	Wahrscheinlichkeit R
0	0,29	0,71
1	0,38	0,62
2	0,48	0,52
3	0,57	0,43
4	0,66	0,34
5	0,75	0,25
6	0,81	0,19
7	0,86	0,14
8	0,90	0,10
9	0,93	0,07
10	0,95	0,05
11	0,97	0,03
12	0,98	0,02

nR, *Non-Responder*, R, *Responder*.

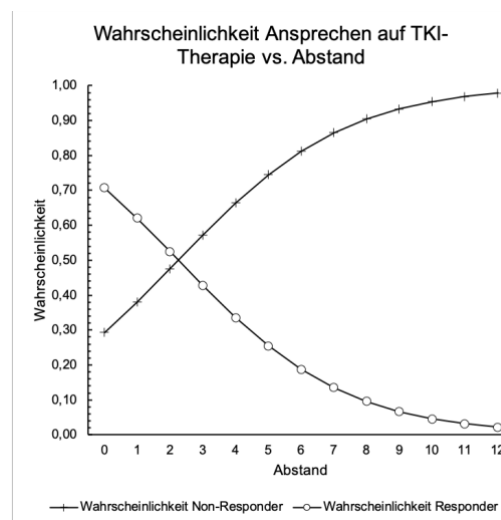


Abbildung 27: Abstand im Bezug zur Wahrscheinlichkeit *Responder/Non-Responder*

In dem Liniendiagramm sind mit den Datenpunkten ausgewählte Wahrscheinlichkeiten von zwölf Abständen aus Tabelle 16 dargestellt. TKI, Tyrosinkinaseinhibitor.

Im Folgenden wurden die Sensitivitäten und Spezifitäten für diverse Schwellenwerte ermittelt und in Abbildung 28 als *Receiver Operating Characteristic* (ROC)-Kurve dargestellt, in welcher für jeden Schwellenwert die Sensitivität und Spezifität eingetragen sind. Ein Schwellenwert zeigt hierbei die hypothetische Annahme, dass ab diesem Abstand jede untersuchte Probe die eines *Non-Responders* ist. Tabelle 17 zeigt die Schwellenwerte inklusive ihrer zugehörigen Sensitivität und Spezifität, die vollständigen Angaben zu jedem Schwellenwert finden sich im Anhang.

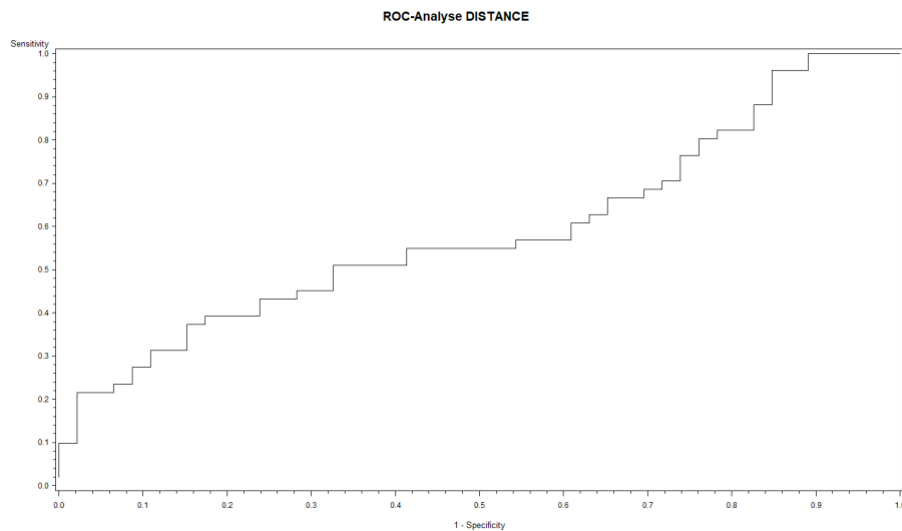


Abbildung 28: ROC-Analyse der Abstände

Basierend auf den Mittelwerten der Expressionsdaten der Gene *ESPL1*, *PTTG1* und *PTTG1IP* von 97 untersuchten CML-Patienten mit unterschiedlichem Ansprechen auf die TKI-Therapie wurden räumliche Distanzen berechnet. Der Abstand (*Distance*) stellt hierbei die Entfernung einer Beobachtungseinheit vom Zentrum dar. Anschließend erfolgte mittels logistischer Regression die Erstellung einer Hypothesengleichung, mit welcher die Wahrscheinlichkeit für einen *Non-Responder* für bestimmte Schwellenwerte berechnet wird. Für diverse Schwellenwerte wurden Sensitivitäten und Spezifitäten ermittelt und in der Abbildung als ROC-Kurve dargestellt. ROC, *Receiver Operating Characteristic*.

Tabelle 17: Sensitivitäten und Spezifitäten für diverse Schwellenwerte (CUTS)

Patient	Sensitivität	Spezifität	Summe	Abstand
1	1	0	1	0.549594
2	1	0.021739	1.021739	0.633119
3	1	0.043478	1.043478	0.750284
4	1	0.065217	1.065217	0.773095
5	1	0.086957	1.086957	0.951466
6	1	0.108696	1.108696	0.980357
7	0.980392	0.108696	1.089088	1.150964
8	0.960784	0.108696	1.06948	1.156968
9	0.960784	0.130435	1.091219	1.162309
10	0.960784	0.152174	1.112958	1.17719
11	0.941176	0.152174	1.09335	1.244523
12	0.921569	0.152174	1.073743	1.335997
13	0.901961	0.152174	1.054135	1.355251
14	0.882353	0.152174	1.034527	1.441234
15	0.882353	0.173913	1.056266	1.488975
16	0.862745	0.173913	1.036658	1.534161
17	0.843137	0.173913	1.01705	1.601827
18	0.823529	0.173913	0.997442	1.605338
19	0.823529	0.195652	1.019182	1.61878
20	0.823529	0.217391	1.040921	1.637496

21	0.803922	0.217391	1.021313	1.647798
22	0.803922	0.23913	1.043052	1.652854
23	0.784314	0.23913	1.023444	1.708054
24	0.764706	0.23913	1.003836	1.757046
25	0.764706	0.26087	1.025575	1.793212
26	0.745098	0.26087	1.005968	1.793669
27	0.72549	0.26087	0.98636	1.79974
28	0.705882	0.26087	0.966752	1.810044
29	0.705882	0.282609	0.988491	1.840533
30	0.686275	0.282609	0.968883	1.864345
31	0.686275	0.304348	0.990622	1.95028
32	0.666667	0.304348	0.971014	1.964042
33	0.666667	0.326087	0.992754	2.015026
34	0.666667	0.347826	1.014493	2.039745
35	0.647059	0.347826	0.994885	2.042153
36	0.627451	0.347826	0.975277	2.05187
37	0.627451	0.369565	0.997016	2.057197
38	0.607843	0.369565	0.977408	2.069368
39	0.607843	0.391304	0.999147	2.085874
40	0.588235	0.391304	0.97954	2.096926
41	0.568627	0.391304	0.959932	2.122027
42	0.568627	0.413043	0.981671	2.124711
43	0.568627	0.434783	1.00341	2.180675
44	0.568627	0.456522	1.025149	2.189591
45	0.54902	0.456522	1.005541	2.195555
46	0.54902	0.478261	1.02728	2.20937
47	0.54902	0.5	1.04902	2.277969
48	0.54902	0.521739	1.070759	2.283053
49	0.54902	0.543478	1.092498	2.316287
50	0.54902	0.565217	1.114237	2.358355
51	0.54902	0.586957	1.135976	2.363681
52	0.529412	0.586957	1.116368	2.376338
53	0.509804	0.586957	1.09676	2.405917
54	0.509804	0.608696	1.1185	2.429324
55	0.509804	0.630435	1.140239	2.444764
56	0.509804	0.652174	1.161978	2.456408
57	0.509804	0.673913	1.183717	2.465865
58	0.490196	0.673913	1.164109	2.469809
59	0.470588	0.673913	1.144501	2.516639
60	0.45098	0.673913	1.124893	2.564055
61	0.45098	0.695652	1.146633	2.565945
62	0.45098	0.717391	1.168372	2.611456
63	0.431373	0.717391	1.148764	2.678705
64	0.431373	0.73913	1.170503	2.710391
65	0.431373	0.76087	1.192242	2.73141
66	0.411765	0.76087	1.172634	2.771444
67	0.392157	0.76087	1.153026	2.799222
68	0.392157	0.782609	1.174766	2.815116
69	0.392157	0.804348	1.196505	2.85643
70	0.392157	0.826087	1.218244	2.860967
71	0.372549	0.826087	1.198636	2.880366
72 *	0.372549	0.847826	1.220375	3.021803
73	0.352941	0.847826	1.200767	3.028484
74	0.333333	0.847826	1.181159	3.061431
75	0.313725	0.847826	1.161552	3.115181
76	0.313725	0.869565	1.183291	3.149723
77	0.313725	0.891304	1.20503	3.156747
78	0.294118	0.891304	1.185422	3.205288
79	0.27451	0.891304	1.165814	3.209935
80	0.27451	0.913043	1.187553	3.334363
81	0.254902	0.913043	1.167945	3.347152

82	0.235294	0.913043	1.148338	3.452303
83	0.235294	0.934783	1.170077	3.481048
84	0.215686	0.934783	1.150469	3.481381
85	0.215686	0.956522	1.172208	3.547112
86	0.215686	0.978261	1.193947	3.579134
87	0.196078	0.978261	1.174339	3.624489
88	0.176471	0.978261	1.154731	3.698418
89	0.156863	0.978261	1.135124	3.789116
90	0.137255	0.978261	1.115516	3.802186
91	0.117647	0.978261	1.095908	4.781442
92	0.098039	0.978261	1.0763	5.099709
93 **	0.098039	1	1.098039	5.917999
94	0.078431	1	1.078431	6.435286
95	0.058824	1	1.058824	8.635014
96	0.039216	1	1.039216	9.944185
97	0.019608	1	1.019608	10.28212

* Der optimale Grenzwert wird bei einer maximalen Summe aus Spezifität und Sensitivität erreicht.

** Für Proben mit Grenzwerten $\geq 5,92$ beträgt die Spezifität 100%.

Im Zuge der Analyse fielen insbesondere fünf der 51 *Non-Responder* (9,80 %) auf (Vergleich Abbildung 26), deren Distanzwerte zum Zentrum der drei Gene *ESPL1*, *PTTG1* und *PTTG1IP* über 5,92 liegen und deren Δ -C_t-Werte der drei Gene zusammengefasst in der 3-D-Distanz eine Wahrscheinlichkeit von 75,00 %, dass es sich um einen *Non-Responder* handelt und innerhalb von 12 Monaten kein MMR erreicht wird, zulassen. Im Folgenden werden die klinischen Daten sowie Verläufe dieser fünf *Non-Responder* genauer betrachtet.

3.4 Ausreißer und die schnellsten *Responder*

Gesamtbetrachtung

Bei der Auswertung der Abstände sowie der Darstellung im dreidimensionalen Raum fielen insbesondere fünf *Non-Responder* auf, welche starke Abweichungen vom Mittelwert der Kohorte und eine große Distanz zum gemeinsamen 3-D-Zentrum aller CML-Patienten, definiert durch die Δ -C_t-Werte der drei Gene *ESPL1*, *PTTG1* und *PTTG1IP*, zeigten. Mit einem Abstand von über 5,92 könnte mit 75%iger Wahrscheinlichkeit schon zu Diagnosestellung kein Erreichen von MMR innerhalb von zwölf Monaten und damit ein schlechteres Ansprechen auf die Therapie vorausgesagt werden. In der folgenden Ausarbeitung soll deshalb anhand der Genexpressionsergebnisse, klinischen Parameter und Angaben zum Krankheitsverlauf geprüft werden, ob und falls ja, inwiefern sich diese fünf Ausreißer im Vergleich zu den fünf schnellsten *Respondern* unterscheiden. Die untersuchten *Responder* wurden anhand des kürzesten Zeitraums bis Erreichen von MMR ausgewählt. Tabelle 18 zeigt den statistischen Vergleich zwischen den Genexpressionsdaten sowie Leukozytenzahlen und dem *BCR-ABL1*-Quotienten zum zum Probenzeitpunkt, nach 12 Monaten sowie bei Erreichen von MMR. Die vollständigen Angaben sind in den Tabellen 19, 20, 21, 22 und 23 nachzulesen. Tabelle 19 paraphrasiert die wichtigsten Eckdaten zu den 10 untersuchten CML-Patienten. In den Tabellen 20, 21, 22 und 23 werden die Mittelwerte, Standardabweichungen, Mediane, Minima und Maxima der Parameter Leukozytenzahlen, *BCR-ABL1*-Quotienten, Transkriptzahlen *BCR-ABL1* und *ABL1* jeweils für die Gruppe der fünf Ausreißer und der fünf besten *Responder* zu den Zeitpunkten „Untersuchte Probe“, „12 Monate“ und „Erreichen von MMR“ aufgeführt.

Die Geschlechtsverteilung ergab für die fünf schnellsten *Responder* vier Männer (80,00 %) und zwei Frauen (20,00 %). Die betrachteten *Non-Responder* bestanden aus drei Männern (60,00 %) und zwei Frauen (40 %). Im Mittel waren die *Responder* mit 66,80 Jahren ($SD = 10,55$ Jahre) 14,20 Jahre älter als die *Non-Responder* mit 52,60 Jahren ($SD = 18,88$ Jahre). Alle *Responder* trugen initial die Bruchpunktvariante e13a2 (100,00 %). Bei den *Non-Respondern* lagen e13a2 und e14a2 jeweils mit 40,00 % vor. Der Studienzeitpunkt war in beiden Gruppen mehrheitlich initial. Zwei *Responder* (40,00 %) befanden sich zum Untersuchungszeitpunkt in einer Therapiepause von IM und zwei der Ausreißer (40,00 %) hatten zu diesem Zeitpunkt eine Vortherapie mit HU erhalten. Vier *Responder* erhielten initial eine Therapie mit IM (66,67 %), wohingegen dies nur für 2 der *Non-Responder* zutraf (20,00 %).

Tabelle 18: p -Werte aus dem Vergleich der vorhersagbaren *Non-Responder* ($n = 5$) vs. der schnellsten *Responder* ($n = 5$)

	Untersuchte Probe	Nach 12 Monaten	MMR
Abstand	0,003	-	-
Δ -C _t ESPL1	0,018	-	-
Δ -C _t PTTG1	0,194	-	-
Δ -C _t PTTG1IP	0,017	-	-
Leukozyten (Zellen/μl)	0,295	0,031	0,045
BCR-ABL1-Quotient (%)	0,041	0,185	0,089

Die Δ -C_t-Werte zeigten bei den Ausreißern für die Gene *ESPL1* ($p = 0.018$) und *PTTG1IP* ($p = 0.017$) signifikant niedrigere Expressionen als bei den *Respondern* (siehe Tabelle 18). Der mittlere *Fold change* indizierte für die Ausreißer für beide Gene eine Unterexpression. Für das Gen *PTTG1* konnte für beide Gruppen eine Überexpression nachgewiesen werden. *PTTG1IP* wurde in den Zellen der fünf betrachteten *Responder* mit einem mittleren *FC* von 3,75 ($SD = 1,57$) deutlich überexprimiert, im Kontrast hierzu zeigten die *Non-Responder* auch bei Betrachtung des mittleren *FC* von 0,50 eine markante Herunterregulierung ($SD = 1,04$). Die fünf betrachteten *Non-Responder* wiesen durchschnittlich mit 8,42 ($SD = 1,99$) und einem p -Wert von 0.003 einen signifikant größeren Abstand von den mittleren Genexpressionen der Gesamtgruppe ($N = 97$) als die *Responder* ($M = 2,47$, $SD = 0,18$) auf. In der untersuchten Probe zum Diagnosezeitpunkt wiesen die *Non-Responder* durchschnittlich nicht signifikant ($p = 0,295$) höhere Leukozytenzahlen als die *Responder* auf. Wie in den Tabellen 18, 22 und 23 ersichtlich, änderte sich dies nach 12 Monaten ($p = 0.031$) sowie beim Erreichen von MMR ($p = 0.045$) und die Ausreißer zeigten signifikant geringere Leukozytenzahlen. Der *BCR-ABL1*-Quotient fiel bei den Ausreißern zu Beginn signifikant ($p = 0.041$), jedoch nach 12 Monaten sowie bei Erreichen von MMR nicht signifikant höher aus ($M = 14,29$ %, $SD = 10,16$ %, $M = 5,45$ %, $SD = 7,57$ %, $M = 0,08$ %, $SD = 0,03$ %), verglichen mit den Quotienten der *Responder* ($M = 0,88$, $SD = 1,10$ %, $M = 0,02$ %, $SD = 0,02$ %, $M = 0,03$ %, $SD = 0,03$ %). Gleichwohl besaßen die fünf Ausreißer zum Zeitpunkt der Diagnosestellung, nach 12 Monaten sowie bei Erreichen von MMR durchschnittlich mehr *BCR-ABL1*-Transkripte als die *Responder* (Vergleich Tabellen 21, 22, 23). Die *ABL1*-Transkriptzahlen waren zu allen Zeitpunkten vergleichbar hoch (siehe Tabellen 21, 22, 23). Die betrachteten fünf *Non-Responder* erreichten im Mittel nach 35,80 Monaten ($SD = 31,16$ M) MMR, wobei zwei (33,33 %) unter der TKI-Therapie kein MMR erreichen konnten. Zur Berechnung wurde für nR-51 ein hypothetisches Erreichen von MMR nach 91,00 Monaten (Zeitraum, der seit der Diagnosestellung

vergangen ist) angenommen, während nR-34 nach einer allo-SZT 28 Monate nach Diagnose MMR erreichte. Die Gruppe betrachteten *Responder* erreichte im Durchschnitt nach 1,20 Monaten MMR ($SD = 0,84$ M). Ein *Non-Responder* (16,67 %) erreichte während seiner Therapie unter Dasatinib MR5 und ein weiterer (16,67 %) erreichte zwar zwischendurch rekurrend MR4, konnte jedoch im Grunde diesen Zustand nicht stabil halten. Alle *Responder* erreichten MR4 oder MR5, größtenteils unter IM und ein Patient unter Nilotinib-Therapie. Für nR-51 und nR-34 (33,33 %) konnten keine Daten bezüglich des Quotienten, des Quotienten (IS), des *BCR-ABL1* Transkripts sowie des *ABL1*-Transkripts ermittelt werden, weshalb die Daten der darauffolgenden Probe zur Berechnung hinzugezogen wurden.

Tabelle 19: Eckdaten 12 CML-Patienten

Nr.	Geschlecht	Alter	Bruchpunkt-variante	Studie	Initialtherapie
<i>Non-Responder</i>					
nR-10	w	41	e14a2	CML-V	Nilotinib
nR-22	w	33	e13a2, e14a2	CML-V	HU, Nilotinib, Dasatinib
nR-27	m	49	e13a2	CML-V	HU, Nilotinib
nR-34	m	59	e14a2	CML-IV	Imatinib, allo-SZT
nR-51	m	82	e13a2	CML-IV	Imatinib, Dasatinib, Nilotinib
<i>Responder</i>					
R-1	m	56	e13a2	n.b.	Dasatinib, Bosutinib, Dasatinib
R-2	w	77	e13a2	EURO-SKI	Imatinib
R-3	m	59	e13a2	EURO-SKI	Imatinib, Nilotinib
R-4	m	79	e13a2	EURO-SKI, IRIS	Wiederaufnahme Imatinib
R-5	m	63	e13a2	CML-IV, EURO-SKI	Wiederaufnahme Imatinib

CML, chronische myeloische Leukämie; nR, *Non-Responder*; R, *Responder*; w, weiblich; m, männlich; HU, Hydroxyurea; SZT, Stammzelltransplantation; n.b., nicht bekannt.

Tabelle 20: Daten der untersuchten Probe I

		<i>ESPL1</i> (Δ -C _t -Wert)	<i>FC ESPL1</i>	<i>PTTG1</i> (Δ -C _t -Wert)	<i>FC PTTG1</i>	<i>PTTG1IP</i> (Δ -C _t -Wert)	<i>FC PTTG1IP</i>	Abstand
nR	M	8,48	0,21	6,26	2,21	7,50	0,50	8,24
	SD	± 1,17	± 0,12	± 3,26	± 4,70	± 3,82	± 1,04	± 1,99
	Md	8,26	0,20	7,28	0,11	9,65	0,01	8,64
	Min	7,40	0,04	0,69	0,04	1,85	< 0,01	5,92
	Max	10,47	0,37	8,69	10,62	11,21	2,35	10,28
R	M	6,52	0,66	3,97	1,17	1,32	3,75	0,88
	SD	± 0,25	± 0,11	± 0,57	± 0,47	± 0,84	± 1,57	± 1,10
	Md	6,53	0,65	4,27	0,89	1,09	3,96	0,57
	Min	6,26	0,50	3,32	0,75	0,61	1,23	0,02
	Max	6,88	0,78	4,53	1,72	2,77	5,51	2,80

FC, Fold change. Für weitere Abkürzungen siehe Legende zu Tabelle 19.

Tabelle 21: Daten der untersuchten Probe II

		Leukozyten (Zellen/ μ l)	<i>BCR-ABL1</i> (%)	<i>BCR-ABL1</i> (IS) (%)	Transkripte <i>BCR-ABL1</i> (Kopien/2 μ l cDNA)	Transkripte <i>ABL1</i> (Kopien/2 μ l cDNA)
nR	M	19 760,00	14,29	3,72	4493,80	36 442,00
	SD	\pm 23 302,00	\pm 10,16	\pm 5,07	\pm 5500,66	\pm 23 072,26
	Md	9300,00	17,00	3,72	2743,00	33 000,00
	Min	8000,00	0,15	0,13	102,00	14 610,00
	Max	61 400,00	26,00	7,30	14 110,00	66 330,00
R	M	7180,00	0,88	0,78	580,00	77 866,00
	SD	\pm 2097	\pm 1,10	\pm 0,98	\pm 751,82	\pm 33 591,4845
	Md	7000,00	0,57	0,50	338,00	67 800,00
	Min	4400,00	0,02	0,01	22,00	51 490,00
	Max	10 300,00	2,80	2,50	1896,00	135 400,00

Für Abkürzungen siehe Legende zu Tabelle 19.

Tabelle 22: Daten Probe nach 12 Monaten

		Leukozyten (Zellen/ μ l)	<i>BCR-ABL1</i> (%)	<i>BCR-ABL1</i> (IS) (%)	Transkripte <i>BCR-ABL1</i> (Kopien/2 μ l cDNA)	Transkripte <i>ABL1</i> (Kopien/2 μ l cDNA)
nR	M	3920,00	6,39	2,63	4335,60	63 120,00
	SD	\pm 749,67	\pm 8,91	\pm 4,71	\pm 5802,80	\pm 27 344,37
	Md	3700,00	0,38	0,32	168,00	48 710,00
	Min	2900,00	0,20	0,18	148,00	39 140,00
	Max	4800,00	20,00	9,70	11 970,00	104 300,00
R	M	5920,00	0,02	0,01	15,25	67 546,00
	SD	\pm 1409,61	\pm 0,02	\pm 0,02	\pm 18,39	\pm 26 545,11
	Md	5700,00	0,01	0,01	12,00	71 820,00
	Min	4000,00	0,00	0,00	0,00	26 130,00
	Max	7400,00	0,05	0,04	37,00	99 710,00

Für Abkürzungen siehe Legende zu Tabelle 19.

Tabelle 23: Daten Probe bei MMR

		Leukozyten (Zellen/ μ l)	<i>BCR-ABL1</i> (%)	<i>BCR-ABL1</i> (IS) (%)	Transkripte <i>BCR-ABL1</i> (Kopien/2 μ l cDNA)	Transkripte <i>ABL1</i> (Kopien/2 μ l cDNA)	Zeit bis MMR (Monat)
nR	M	4466,67	0,08	0,07	64,33	69 676,67	35,80
	SD	\pm 472,58	\pm 0,03	\pm 0,03	\pm 46,36	\pm 37 365,28	31,16
	Md	4300,00	0,10	0,08	71,00	72 590,00	23,00
	Min	4100,00	0,05	0,04	15,00	30 940,00	16,00
	Max	5000,00	0,10	0,09	107,00	105 500,00	91,00
R	M	5840,00	0,03	0,03	15,80	63 020,00	1,20
	SD	\pm 1040,67	\pm 0,03	\pm 0,02	\pm 9,36	\pm 42 730,41	0,84
	Md	5600,00	0,04	0,03	19,00	52 060,00	1,00
	Min	4400,00	0,00	0,00	0,00	22 150,00	0,00
	Max	7000,00	0,07	0,05	23,00	135 400,00	2,00

Für Abkürzungen siehe Legende zu Tabelle 19.

Einzelbetrachtung

Der *Non-Responder* nR-10 ist weiblichen Geschlechts, Teilnehmer der CML-V Studie und zum Zeitpunkt dieser Untersuchung 41 Jahre alt. Die untersuchte Probe wurde bei Diagnosestellung entnommen. Ihre Zellen zeigten hierbei eine deutliche

Unterexprimierung von *ESPL1*, *PTTG1* und *PTTG1IP* ($\Delta\text{-C}_t^{\text{ESPL1}} = 8,26$, $\text{FC}^{\text{ESPL1}} = 0,20$, $\Delta\text{-C}_t^{\text{PTTG1}} = 8,69$, $\text{FC}^{\text{PTTG1}} = 0,04$) mit einem Abstand vom Zentrum von 9,94 auf. Insbesondere *PTTG1IP* wurde in den Zellen von nR-10 mehr als 100-fach herunterreguliert exprimiert ($\Delta\text{-C}_t^{\text{PTTG1IP}} = 10,29$, $\text{FC}^{\text{PTTG1IP}} < 0,01$). Ihre Leukozytenzahl betrug initial 8000 Zellen/ μl Blut und mit 102 *BCR-ABL1*-Transkripten und hierzu vergleichsweise hohen 66 330 *ABL1*-Transkripten/2 μl cDNA ergab ihr *BCR-ABL1*-Quotient 0,15 % (IS = 0,13 %). Ihr Initialtranskript war e14a2 und eine Vortherapie ist nicht bekannt. Unter konstanter Therapie mit Nilotinib erhöhte sich ihr *BCR-ABL1*-Quotient innerhalb der ersten 12 Monate auf 0,20 % (IS = 0,18 %) bei 155 gemessenen *BCR-ABL1*- und 77 670 *ABL1*-Transkripten im Mai 2014. Hämatologisch sprach sie mit einer nahezu halbierten Leukozytenzahl (4500 Leukozyten/ μl Blut) adäquat auf die Therapie an. Von Juli 2014 bis März 2015 erhielt sie eine Kombinationstherapie mit Nilotinib und PEG-IFN α , im Rahmen derer ihr *BCR-ABL1*-Quotient auf 0,10 % (IS = 0,09 %, *BCR-ABL1*-Transkripte = 107 Kopien/2 μl cDNA, *ABL1*-Transkripte = 105 500 Kopien/2 μl cDNA.) sank und sie im Oktober 2014 nach 16 Monaten TKI-Therapie erstmals MMR erreichte. Nach Absetzen des PEG-IFN α im März 2015 stieg ihr *BCR-ABL1*-Quotient auf seinen Höchstwert im Oktober 2015 von 0,25 %, sank jedoch schon drei Monate später unter 0,10 %. Der *BCR-ABL1*-Quotient reduzierte sich fortan recht konstant und so erreichte sie im Juli 2017 erstmals eine tiefe molekulare Remission (MR4), welche sie jedoch rekurrend verlor. In der Gesamtbetrachtung (siehe Abbildung 29) zeigte nR-10 ein moderates, aber persistentes Ansprechen auf die Monotherapie mit Nilotinib und konnte nach etwa 1,5 Jahren Gesamttherapie (ab 2016) konstant in guter molekularer Remission bleiben.

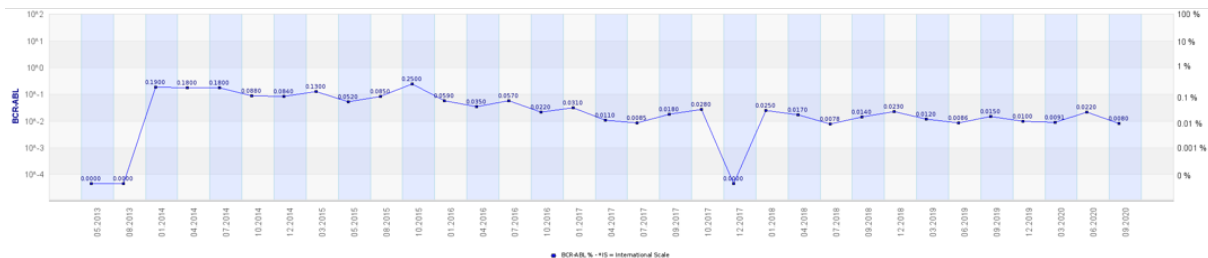


Abbildung 29: Verlauf der *BCR-ABL1*-Transkriptzahlen und des -Quotienten von nR-10

Der *Non-Responder* nR-22 ist weiblich und zum Untersuchungszeitpunkt 33 Jahre alt. Ihre Zellen wiesen das Initialtranskript e13a2, e14a2 auf und sie war Teilnehmerin der CML-V Studie. Die untersuchte Probe ist initial. Mit einem Abstand zum Zentrum von 8,64 exprimierten ihre Zellen zum Zeitpunkt der Diagnose im Januar 2014 *ESPL1* und *PTTG1* ähnlich niedrig ($\Delta\text{-C}_t^{\text{ESPL1}} = 7,95$, $\text{FC}^{\text{ESPL1}} = 0,24$, $\Delta\text{-C}_t^{\text{PTTG1}} = 7,28$, $\text{FC}^{\text{PTTG1}} = 0,11$) und *PTTG1IP* mit einem *Fold change* von 0,01 ($\Delta\text{-C}_t^{\text{PTTG1IP}} = 9,65$) deutlich herunterreguliert. Mit einem *BCR-ABL1*-Quotienten von 17,00 % zeigte sie eine beachtliche Zahl an *BCR-ABL1*-Transkripten (*BCR-ABL1* Transkripte = 2464 Kopien/2 μl cDNA, *ABL1*-Transkripte = 14 610 Kopien/2 μl cDNA). Ihre Leukozytenzahl betrug initial 9100 Zellen/ μl . Aufgrund der klinischen Präsentation erhielt sie eine dreimonatige Vortherapie mit HU, während derer sich die Transkriptzahl weiter erhöhte. Im Juli 2014, nach drei Monaten Monotherapie mit Nilotinib, erreichte der *BCR-ABL1*-Quotient mit 0,54 % seinen Höhepunkt. Nach 12 Monaten Therapie hatte sich der *BCR-ABL1*-Quotient zwar auf 0,35 % (IS = 0,31 %, *BCR-ABL1*-Transkripte = 168 Kopien/2 μl cDNA, *ABL1*-Transkripte = 48 710 Kopien/2 μl cDNA) reduziert, im

Hinblick auf den seit Diagnose verdoppelten Quotienten sprach sie jedoch kaum auf die Nilotinibtherapie an. Ihre Leukozytenzahl hatte sich im Januar 2015 nahezu halbiert (4800 Leukozyten/ μl). Im weiteren Verlauf zeigte sie ein deutlich schnelleres Ansprechen und erreichte im Oktober 2015 nach 21 Monaten Nilotinibtherapie MMR ($BCR-ABL1$ -Quotient = 0,05 %, IS = 0,04 %, $BCR-ABL1$ -Transkripte = 15 Kopien/2 μl cDNA, $ABL1$ -Transkripte = 30 940 Kopien/2 μl cDNA, 5000 Leukozyten/ μl). Im September 2017 erreichte sie erstmals eine tiefe Remission und konnte diese unter Nilotinib bis Januar 2019 halten. Bis zum Wechsel ihrer Therapie auf Dasatinib im Juli 2019 konnte ein neuerlicher Anstieg auf einen $BCR-ABL1$ -Quotienten von 0,35 % beobachtet werden. Mit Dasatinib wurden die $BCR-ABL1$ -Transkripte jedoch innerhalb eines halben Jahres bis zu MR5 und somit nahe der Nachweisgrenze reduziert (siehe Abbildung 30).



Abbildung 30: Verlauf der $BCR-ABL1$ -Transkriptzahlen und des -Quotienten von nR-22

Der *Non-Responder* nR-27 ist männlich, zum Zeitpunkt der Untersuchung 49 Jahre alt und sein Initialtranskript ist e13a2. Seine Diagnose erfolgte im Juli 2013 und er wurde in die CML-V Studie eingeschlossen. Die untersuchte Probe entstammt dem initialen Diagnosezeitpunkt. Alle drei betrachteten Gene wurden in seinen Zellen deutlich weniger exprimiert. Insbesondere für $PTTG1IP$ konnte eine mehr als 100-fache Herunterregulierung nachgewiesen werden ($\Delta-C_t^{PTTG1IP} = 11,21$, $FC^{PTTG1IP} < 0,01$). $ESPL1$ wurde weniger als halb so oft exprimiert ($\Delta-C_t^{ESPL1} = 7,40$, $FC^{ESPL1} = 0,37$) und $PTTG1$ zeigte eine mehr als 10-fach niedrigere Expression ($\Delta-C_t^{PTTG1} = 8,42$, $FC^{PTTG1} = 0,05$). Analog wie nR-27 mit 10,28 den größten Abstand zu den durchschnittlichen Mittelwerten der untersuchten Patienten auf. Der Verlauf seines $BCR-ABL1$ -Quotienten ist in Abbildung 31 dargestellt. Er zeigte mit einem $BCR-ABL1$ -Quotienten von 26,00 % ($BCR-ABL1$ -Transkripte = 14 110 Kopien/2 μl cDNA, $ABL1$ -Transkripte = 53 330 Kopien/2 μl cDNA) auffallend hohe $BCR-ABL1$ -Transkriptzahlen und eine ausgeprägte Leukozytose (61 400 Zellen/ μl), weswegen er mit HU vortherapiert wurde. Von November 2013 bis Mai 2014 erhielt er eine Monotherapie mit Nilotinib, auf die er jedoch mit einem $BCR-ABL1$ -Quotienten von 0,38 % (IS = 0,33 %, $BCR-ABL1$ -Transkripte = 148 Kopien/2 μl cDNA, $ABL1$ -Transkripte = 39 140 Kopien/2 μl cDNA) nach 12 Monaten kein Ansprechen zeigte. Seine Leukozyten hatten sich mit 3700 Zellen/ μl normalisiert. Aufgrund des Therapieversagens erfolgte im Mai 2014 der Wechsel auf IM, unter welchem sich sein $BCR-ABL1$ -Quotient konstant, jedoch langsam reduzierte. Im Juli 2015 erreichte nR-27 dann nach 23 Monaten Gesamttherapie und 13 Monaten IM-Therapie eine gute molekulare Remission mit einem $BCR-ABL1$ -Quotienten von 0,09 % (IS = 0,09 %, $BCR-ABL1$ -Transkripte = 71 Kopien/2 μl cDNA, $ABL1$ -Transkripte = 725 900 Kopien/2 μl cDNA) und einer physiologischen Leukozytenzahl von 4300 Zellen/ μl . Im weiteren

Verlauf zeigte er weiterhin ein mäßiges Ansprechen auf IM, sein *BCR-ABL1*-Quotient konnte zwar stabil unter 0,10 % gehalten werden, eine tiefere Remission erreichte er jedoch nicht.

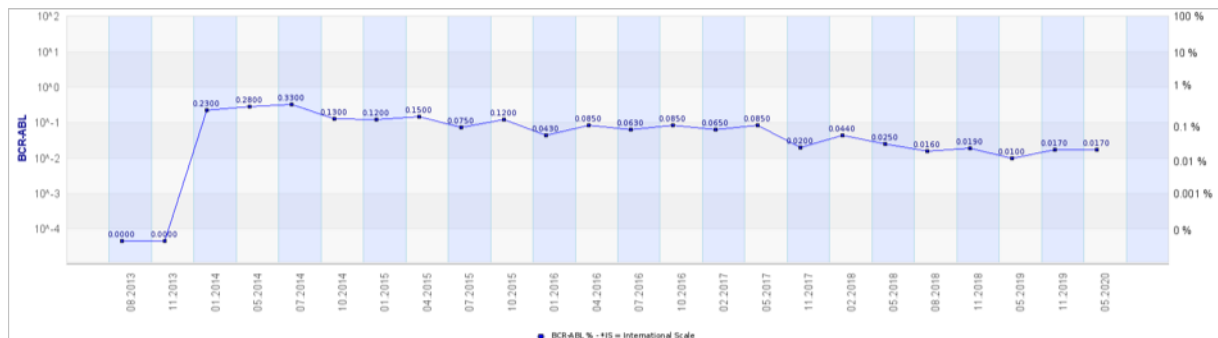


Abbildung 31: Verlauf der *BCR-ABL1*-Transkriptzahlen und des -Quotienten von nR-27

nR-34 ist ein *Non-Responder* männlichen Geschlechts, Teilnehmer der CML-IV Studie und zum Untersuchungszeitpunkt 59 Jahre alt. Seine Bruchpunktvariante ist e14a2 und die untersuchte Probe initial. Seine Zellen exprimierten *ESPL1* und *PTTG1IP* deutlich weniger ($\Delta-C_t^{ESPL1} = 8,33$, $FC^{ESPL1} = 0,19$, $\Delta-C_t^{PTTG1IP} = 6,46$, $FC^{PTTG1IP} = 0,10$). Auffällig hierbei ist, dass *PTTG1* mit einem *Fold change* von 10,62 eine erhebliche Hochregulierung zeigte ($\Delta-C_t^{PTTG1} = 0,69$). nR-34 weist einen Abstand vom Zentrum von 5,92 auf. Zum Diagnosezeitpunkt besaß er 9300 Leukozyten/ μ l Blut. In der nächstfolgenden Probe betrug sein *BCR-ABL1*-Quotient 20,00 % (*ABL1*-Transkripte = 14940 Kopien/2 μ l), der Quotient nach IS sowie die *BCR-ABL1*-Transkriptzahlen sind nicht bekannt. Ab November 2006 erhielt er eine Therapie mit IM, unter welcher sein *BCR-ABL1*-Quotient nach 12 Monaten auf 11,00 % (9,70 % IS, *BCR-ABL1*-Transkripte = 11 970 Kopien/2 μ l cDNA, *ABL1*-Transkripte = 104 300 Kopien/2 μ l cDNA) sank. Hämatologisch zeigte er nach einem Jahr ein gutes Ansprechen und seine Leukozyten hatten sich um mehr als die Hälfte reduziert (3700 Zellen/ μ l Blut). Im folgenden Jahr schwankte sein *BCR-ABL1*-Quotient zwischen 10,00 % und 1,00 % und erreichte bei seiner letztverfügbaren Probe vom Mai 2008 mit 0,63 % (IS = 0,55 %) seinen Tiefstand. Allgemein sprach er jedoch ausgesprochen defizitär auf die Therapie an und erreichte zu keinem Zeitpunkt Remission, weswegen er im Februar 2009 nach 28 Monaten eine allo-SZT erhielt (siehe Abbildung 32).

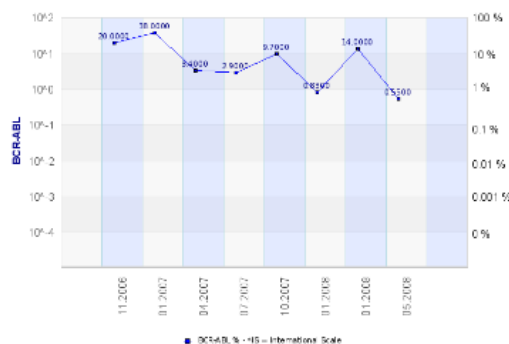


Abbildung 32: Verlauf der *BCR-ABL1*-Transkriptzahlen und des -Quotienten von nR-34

Der 82-jährige *Non-Responder* nR-51 ist männlich und trägt die Bruchpunktvariante e13a2. Als Teilnehmer der CML-IV Studie erhielt er initial eine Monotherapie mit IM. Zum Zeitpunkt seiner Diagnose im Januar 2009 zeigte nR-51 einen Abstand von 6,44 vom Zentrum mit einer zweifachen Überexpression von *PTTG1IP* ($\Delta-C_t^{PTTG1IP} = 1,85$, $FC^{PTTG1IP} = 2,35$). *ESPL1* und *PTTG1* wurden in seinen Zellen herunterreguliert exprimiert, insbesondere *ESPL1* mehr als zehnfach weniger exprimiert ($\Delta-C_t^{ESPL1} = 10,47$, $FC^{ESPL1} = 0,04$, $\Delta-C_t^{PTTG1} = 6,21$, $FC^{PTTG1} = 0,23$). Mit 2743 *BCR-ABL1*-Transkripten/2 μ l cDNA und 33 000 *ABL1*-Transkripten/2 μ l cDNA wies nR-51 einen *BCR-ABL1*-Quotienten von 8,30 % (IS = 7,30 %) auf. Mit 11 000 Leukozyten/ μ l Blut bestand eine leichtgradige Leukozytose. Wie in Abbildung 33 ersichtlich, sprach nR-51 nicht auf seine IM-Therapie an und sein *BCR-ABL1*-Quotient stieg innerhalb des ersten Therapiejahres auf 20,00 % (*BCR-ABL1*-Transkripte = 9237 Kopien/2 μ l cDNA, *ABL1*-Transkripte = 45 780 Kopien/2 μ l cDNA) an. Seine Leukozyten reduzierten sich markant auf 2900 Zellen/ μ l. Sein *BCR-ABL1*-Quotient sank Mitte des Jahres 2010 zwar kurzzeitig unter 10,00 %, blieb jedoch in den folgenden Jahren trotz Therapiewechsel auf Dasatinib im Mai 2011 und auf Nilotinib im Oktober 2011 konstant über 10,00 % und erreichte im Oktober 2011 mit 26,00 % seinen bisherigen Höchstwert. Mit bis dato über 91 Monaten weist nR-51 von den 97 untersuchten CML-Patienten die längste Zeit bis zum Erreichen von MMR auf.



Abbildung 33: Verlauf der *BCR-ABL1*-Transkriptzahlen und des -Quotienten von nR-51

Der *Responder* R-1 ist männlichen Geschlechts, 56 Jahre alt und trägt das Initialtranskript e13a2. Seine Studienteilnahme ist nicht bekannt, die untersuchte Probe wurde zum Zeitpunkt der Diagnosestellung entnommen. Mit einem Abstand von 2,71 konnten in seinen Zellen marginale Unterexpressionen von *ESPL1* und *PTTG1* nachgewiesen werden ($\Delta-C_t^{ESPL1} = 6,31$, $FC^{ESPL1} = 0,75$, $\Delta-C_t^{PTTG1} = 4,27$, $FC^{PTTG1} = 0,89$). *PTTG1IP* wurde in den Zellen von R-1 circa 5,5-fach höher exprimiert, verglichen mit gesunden Kontrollen ($\Delta-C_t^{PTTG1IP} = 0,61$, $FC^{PTTG1IP} = 5,51$). Zum Zeitpunkt seiner Diagnose im Juni 2015 wies er bei 7300 Leukozyten/ μ l Blut sowie einem *BCR-ABL1*-Quotienten von 0,016 % (IS = 0,012 %, *ABL1*-Transkripte = 824 Kopien/2 μ l cDNA) bereits MMR auf. *BCR-ABL1*-Transkripte waren schon initial nicht detektierbar. Unter Initialtherapie mit Dasatinib sprach er einen Monat später hämatologisch gut an und zeigte eine Reduktion seiner Leukozytenzahl auf 5600 Zellen/ μ l Blut bei gleichbleibendem *BCR-ABL1*-Quotienten von 0,016 % (IS = 0,012 %, *BCR-ABL1*-Transkripte = 22 Kopien/2 μ l cDNA, *ABL1*-Transkript = 135 400 Kopien/2 μ l cDNA). Nach insgesamt 12 Monaten Therapie war seine Leukozytenzahl auf die anfänglichen 7400 Zellen/ μ l Blut gestiegen. Sein *BCR-ABL1*-Quotient hatte sich auf 0,0062 % (IS = 0,0084 %, *BCR-ABL1*-Transkripte = 6.2

Kopien/2 μ l cDNA, *ABL1*-Transkripte = 99 710 Kopien/2 μ l cDNA) reduziert und R-1 somit tiefe Remission (MR4) erreichen können. Nach leichtem Anstieg des Quotienten zwischen Juni und September 2016 auf über 0,01 % erfolgte der TKI-Wechsel auf Bosutinib, unter welchem es zu einem erneuten Abfall kam. Hierbei ist unklar, ob die Werte vom Februar 2017 einem MR6 oder einem Messfehler entsprechen. Ab Februar 2017 erfolgte der neuerliche Wechsel auf Dasatinib, unter welchem R-1 rezidivierend MR4, jedoch nie TFR erreichte (siehe Abbildung 34).

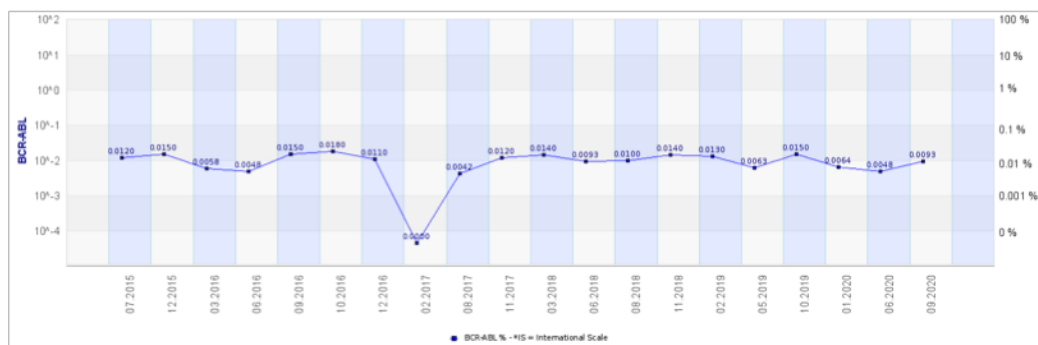


Abbildung 34: Verlauf der *BCR-ABL1*-Transkriptzahlen und des -Quotienten von R-1

R-2 ist weiblich, Teilnehmerin der EURO-SKI Studie und zum Zeitpunkt der Untersuchung 77 Jahre alt. Auch sie trägt das Initialtranskript e13a2 und die untersuchte Probe entstammt dem Zeitpunkt nach Beginn der Therapie im Dezember 2014. Sie befand sich schon zum Diagnosezeitpunkt im Juli 2014 mit einem *BCR-ABL1*-Quotienten von 0,0011 % in tiefer molekularer Remission (MR4.5). In den folgenden Monaten kam es bis zum Dezember 2014 zu einem Anstieg des *BCR-ABL1*-Quotienten auf 2,80 % (IS = 2,50 %, *BCR-ABL1*-Transkripte = 1896 Kopien/2 μ l cDNA, *ABL1*-Transkripte = 67 800 Kopien/2 μ l cDNA) sowie 7000 Leukozyten/ μ l Blut (siehe Abbildung 35). Ihr Abstand vom Zentrum betrug 2,32. Sowohl *PTTG1IP* als auch *PTTG1* wurden zu diesem Zeitpunkt in ihren Zellen hochreguliert, *PTTG1IP* nahezu vierfach (Δ -C_t^{*PTTG1*} = 3,39, FC^{*PTTG1*} = 1,64, Δ -C_t^{*PTTG1IP*} = 1,18, FC^{*PTTG1IP*} = 3,71). *ESPL1* wurde in ihren Zellen etwa halb so stark exprimiert wie in den Kontrollen (Δ -C_t^{*ESPL1*} = 6,53, FC^{*ESPL1*} = 0,65). Nach Wiederaufnahme der Therapie mit IM erreichte sie mit optimalem Ansprechen innerhalb von zwei Monaten MMR und der *BCR-ABL1*-Quotient war im Februar 2015 auf 0,05 % (IS = 0,04 %, *BCR-ABL1*-Transkripte = 23 Kopien/2 μ l cDNA, *ABL1*-Transkripte = 52 060 Transkripte/2 μ l cDNA) bei 7000 Leukozyten/ μ l Blut gesunken. Im Jahr nach der Wiederaufnahme sank der Quotient unter die Nachweisgrenze und R2 erreichte im September 2015 tiefe molekulare Remission. So konnte 12 Monate nach der Wiederaufnahme von IM im Dezember 2015 keine *BCR-ABL1*- und 26 130 *ABL1*-Transkripte/2 μ l cDNA detektiert werden. Ihre Leukozytenzahl betrug 5300 Zellen/ μ l Blut. Nach neuerlicher Therapiepause sowie konsekutivem *BCR-ABL1*-Anstieg im Juli 2017 konnte die IM-Therapie im März 2018 wieder erfolgreich eingesetzt, jedoch insgesamt kein TFR erreicht werden.

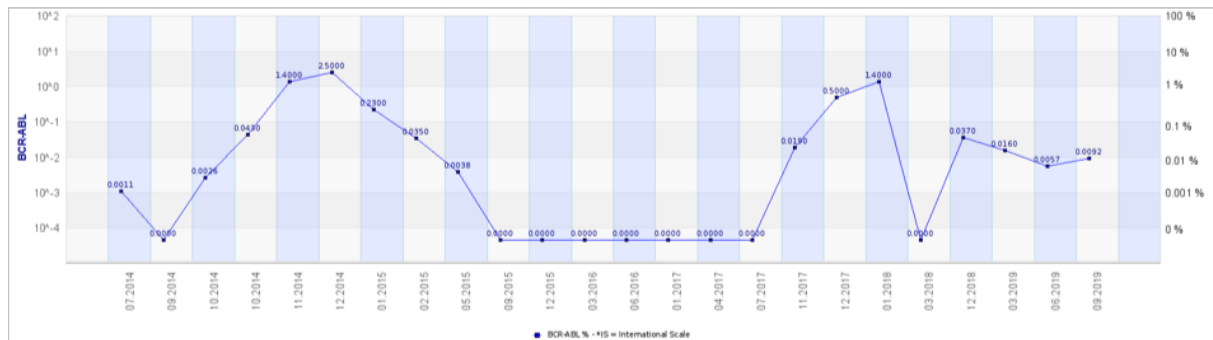


Abbildung 35: Verlauf der *BCR-ABL1*-Transkriptzahlen und des *BCR-ABL1*-Quotienten von R-2

Der *Responder R-3* ist männlich, 59 Jahre alt, hat die Bruchpunktvariante e13a2 und wurde im August 2014 im Rahmen seiner Erstdiagnose in die Studie EURO-SKI aufgenommen. Vor Beginn der Initialtherapie mit IM erhielt R-3 keine Vortherapie. Die untersuchte Probe entstammt dem Zeitpunkt nach einmonatiger IM-Therapie, einer dreimonatigen Therapiepause sowie der Wiederaufnahme der IM-Therapie. Mit einem initialen *BCR-ABL1*-Quotienten von 0,0013 % war R-3 schon zu Beginn der Therapie in tiefer molekularer Remission und konnte diesen Zustand unter IM-Therapie halten. Im August 2014 erfolgte das Absetzen der Therapie und ein konsekutiver Anstieg des *BCR-ABL1*-Quotienten auf den Höchstwert 0,88 % im November 2014, woraufhin die Wiederaufnahme der IM-Therapie erfolgte. Im folgenden Monat nach der Therapiepause waren *ESPL1* und *PTTG1* leicht herunterreguliert ($\Delta-C_t^{ESPL1} = 6,60$, $FC^{ESPL1} = 0,61$, $\Delta-C_t^{PTTG1} = 4,53$, $FC^{PTTG1} = 0,75$), *PTTG1IP* hingegen mit einem *Fold change* von 3,96 nahezu vierfach stärker exprimiert ($\Delta-C_t^{PTTG1IP} = 1,09$). Sein Abstand vom Zentrum betrug 2,68 bei einem *BCR-ABL1*-Quotienten von 0,59 % (IS = 0,52 %, 338 *BCR-ABL1*-Transkripte/2 μ l cDNA, 57 730 *ABL1*-Transkripte/2 μ l cDNA). Die Leukozyten waren zu diesem Zeitpunkt schon normwertig mit 4400 Zellen/ μ l Blut. Im Folgenden zeigte R-3 wie auch zuvor ein gutes Ansprechen auf die Therapie mit IM und erreichte innerhalb von einem Monat MMR (*BCR-ABL1*-Quotient = 0,07 %, IS = 0,05 %, *BCR-ABL1*-Transkripte = 15 Kopien/2 μ l cDNA, *ABL1*-Transkripte = 22 150 Kopien/2 μ l cDNA) mit gleichwertigen Leukozyten. 12 Monate nach Wiederaufnahme der Therapie waren die Leukozyten leicht gestiegen und der *BCR-ABL1*-Quotient auf 0,05 % (IS = 0,04 %, *BCR-ABL1*-Transkripte = 37 Kopien/2 μ l cDNA, *ABL1*-Transkripte = 74 400 Kopien/2 μ l cDNA, Leukozyten = 5700 Zellen/ μ l Blut) gesunken. Im März 2016 kam es dann nach kurzzeitigem Erreichen von MR4 wieder zu einem Anstieg des Quotienten. Zugrunde könnte eine sekundäre Chemoresistenz liegen, da im Dezember 2016 der Wechsel auf das 2GTKI Nilotinib erfolgte. Von einer TFR kann anhand der vorliegenden Daten nicht ausgegangen werden (siehe Abbildung 36).

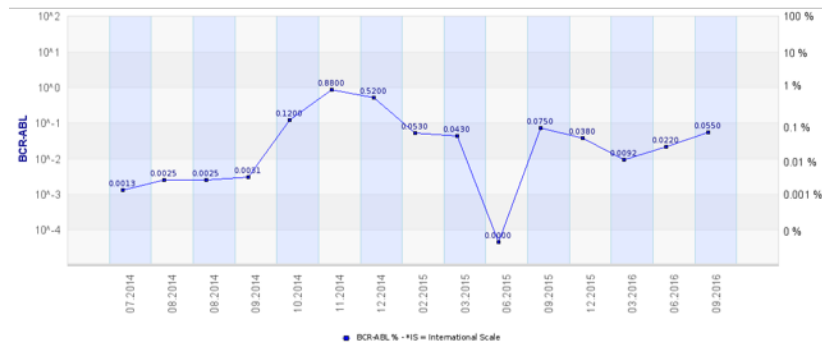


Abbildung 36: Verlauf der *BCR-ABL1*-Transkriptzahlen und des *BCR-ABL1*-Quotienten von R-3

R-4 ist ein 79-jähriger *Responder* männlichen Geschlechts, welcher zunächst Teilnehmer der STI-571, EURO-SKI und später der IRIS Studie war. Sein Initialtranskript ist e13a2 und die untersuchte Probe entstammt dem Zeitpunkt nach der Therapiepause und Wiederaufnahme mit IM. Zu seinem Diagnosezeitpunkt im November 2000 liegen keine weiteren Angaben vor. Bekannt ist, dass er im Rahmen der EURO-SKI Studie eine Therapie mit IM erhielt. Im März 2003 betrug sein *BCR-ABL1*-Quotient 0,18 % und er konnte anschließend innerhalb von fünf Jahren während seiner IM-Therapie tiefe molekulare Remission erreichen. Gesichert ist, dass im August 2014 ein Absetzversuch von IM erfolgte, welcher ebenso an dem steigenden *BCR-ABL1*-Quotienten in Abbildung 37 erkennbar ist. Im Dezember 2014 erfolgte die Wiederaufnahme von IM bei 208 *BCR-ABL1*- und 51 490 *ABL1*-Transkripten sowie einem *BCR-ABL1*-Quotienten von 0,40 % (IS = 0,35 %). Seine Leukozytenzahl betrug 6900 Zellen/ μ l Blut. Bei einem Abstand vom Zentrum von 2,36 wurden *ESPL1* und *PTTG1* in seinen Zellen herunterreguliert, während *PTTG1IP* marginal überexprimiert wurde (Δ -C_t^{ESPL1} = 6,88, FC^{ESPL1} = 0,50, Δ -C_t^{PTTG1} = 4,35, FC^{PTTG1} = 0,84, Δ -C_t^{PTTG1IP} = 2,77, FC^{PTTG1IP} = 1,23). Nach zwei Monaten IM-Therapie erreichte R-4 im März 2015 mit einem *BCR-ABL1*-Quotienten von 0,04 % (IS = 0,03 %, *BCR-ABL1*-Transkripte = 15 Kopien/2 μ l cDNA, *ABL1*-Transkripte = 22 150 Kopien/2 μ l cDNA) gute molekulare Remission und konnte seither MMR unter IM-Therapie erhalten. Nachdem er im Juli 2015 erst mal MR4 erreichte, betrug sein *BCR-ABL1*-Quotient 12 Monate nach Wiederaufnahme der IM-Therapie im Dezember 2015 0,04 % (IS = 0,03 %) bei 24 *BCR-ABL1*-Transkripten/2 μ l cDNA sowie 65 670 *ABL1*-Transkripten/2 μ l cDNA. Seine Leukozytenzahl war normwertig mit 7200 Zellen/ μ l Blut. Nachdem er MR4 zunächst verlor, konnte er im Juli 2016 sowie ab Oktober 2017 konsekutiv in tiefer molekularer Remission bleiben (MR4).



Abbildung 37: Verlauf der *BCR-ABL1*-Transkriptzahlen und des -Quotienten von R-4

R-5 ist ein männlicher, 63-jähriger *Responder*, welcher Teilnehmer der CML-IV sowie der EURO-SKI Studien war. Er trägt die Bruchpunktvariante e13a2 und befand sich zum Zeitpunkt der Untersuchung nach einer Therapiepause in der Wiederaufnahme der IM-Therapie. Zuvor zeigte er nach seiner Erstdiagnose im November 2004 mit einem *BCR-ABL1*-Quotienten von 1,68 % ein langsames, aber konstantes Ansprechen auf seine IM-Therapie und konnte so im September 2014 mit 0,0017 % eine tiefe molekulare Remission (MR4.5) erreichen. Von September 2014 bis Januar 2015 erfolgte ein Absetzversuch, währenddessen R-5 seine Remission verlor und zum Untersuchungszeitpunkt einen *BCR-ABL1*-Quotienten von 0,57 % (IS = 0,50 %, *BCR-ABL1*-Transkripte = 436 Kopien/2 µl cDNA, *ABL1*-Transkripte = 76 910 Kopien/2 µl cDNA) bei manifester Leukozytose (103 000 Zellen/µl Blut) vorwies. Zu diesem Zeitpunkt wies R-5 einen Abstand von 2,28 und für *PTTG1* und *PTTG1IP* eine Überexpression verglichen mit den Kontrollen auf. So exprimierte er insbesondere *PTTG1IP* über vierfach und *PTTG1* zweifach so stark ($\Delta-C_t^{ESPL1} = 6,26$, $FC^{ESPL1} = 0,78$, $\Delta-C_t^{PTTG1} = 3,32$, $FC^{PTTG1} = 1,72$, $\Delta-C_t^{PTTG1IP} = 0,96$, $FC^{PTTG1IP} = 4,34$). Nach zweimonatiger Therapie mit IM erreichte R-5 nicht nur MMR, sondern sogar tiefste molekulare Remission (MR5 – 6) bei nicht detektierbaren *BCR-ABL1*-Transkripten (*ABL1*-Transkripte = 143 200 Kopien/2 µl cDNA). Auch erlangte er hämatologische Remission mit einer Normalisierung seiner Leukozytose auf 4600 Leukozyten/µl Blut. In den folgenden Monaten konnte er weitgehend MR4 beziehungsweise MR5 unter IM erhalten. So war sein *BCR-ABL1*-Quotient im Januar 2015 nach 12 Monaten nach Wiederaufnahme der Therapie unverändert mit 0,00 % nicht detektierbar, seine Leukozyten hatten sich auf 4000 Zellen/µl reduziert und seine *ABL1*-Transkripte betragen 43 950 Kopien/2 µl cDNA. Wie in Abbildung 38 erkennbar, erreichte R-5 nach Wiederaufnahme der IM-Therapie nicht nur innerhalb kürzester Zeit MMR, sondern konnte MR5 weitestgehend stabil halten.

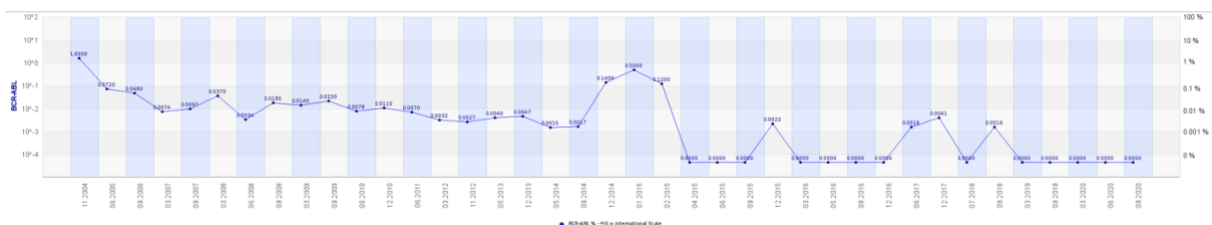


Abbildung 38: Verlauf der *BCR-ABL1*-Transkriptzahlen und des -Quotienten von R-5

Zusammenfassung

In Gesamtbetrachtung erzielten die fünf Ausreißer (= *Non-Responder*) im Vergleich zu den schnellsten fünf *Respondern* signifikant höhere $\Delta-C_t$ -Werte für die Gene *ESPL1* und *PTTG1IP*. Mit durchschnittlich 8,42 erzielten sie einen signifikant größeren Abstand vom Zentrum als die schnellsten *Responder* mit 2,47. Es gilt: Je höher die $\Delta-C_t$ -Werte, desto geringer die Transkriptspiegel der Gene. Demnach exprimierten fünf Ausreißer die Gene *ESPL1* und *PTTG1IP* deutlich geringer als die schnellsten *Responder*. Überdies zeigten die Ausreißer zu Beginn ihrer Erkrankung einen signifikant höheren *BCR-ABL1*-Quotienten. Die *Non-Responder* wiesen zu allen betrachteten Zeitpunkten signifikant höhere Leukozytenzahlen auf. Zwei der *Non-Responder* erreichten innerhalb des Beobachtungszeitraumes kein MMR, nur ein *Non-Responder* erreichte etwas Besseres als MMR, während von den schnellsten fünf *Respondern* alle MR4 oder besser erlangten.

3.5 Klinische Parameter der *Non-Responder* und *Responder*

Für alle 97 CML-Patienten wurden die klinischen Parameter „Geschlecht“, „Alter“, „Bruchpunktvariante“ diagnostisch relevanter „Quotient *BCR-ABL1*“, „Leukozytenzahl“ sowie „Zeit bis Erreichen von MMR“ bei Diagnosestellung erhoben. Diese Daten entstammen der Patienten-Datenbank (LeukDB) des Labors für Leukämiediagnostik der III. Medizinischen Universitätsklinik Mannheim. Zusätzlich wurden die Therapiekonstellationen im Beobachtungszeitraum aus der Datenbank sowie mithilfe von Arztbriefen zusammengetragen. Im Anschluss wurde untersucht, ob sich die zwei Kohorten *Non-Responder* und *Responder* bezüglich dieser Parameter unterscheiden. Die vollständigen klinischen Angaben der einzelnen Patienten sind in Tabelle 15 und die Betrachtung der Gesamtgruppe in Material und Methoden nachzulesen.

Geschlecht

In der Kohorte der *Non-Responder* wurden insgesamt 51 Patienten untersucht, hiervon waren 21 Frauen (41,18 %) und 30 Männer (58,82 %). Die Kohorte der *Responder* ($n = 46$) bestand aus 19 Frauen (41,30 %) und 27 Männern (58,70 %). Die Auswertung mittels Chi²-Test zeigte für das Geschlecht keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,990$) oder Zusammenhang ($\varphi < 0,01$) zwischen den beiden Kohorten.

Alter

Bei Betrachtung des Parameters Alter (siehe Abbildung 42) zeigte die Kohorte der *Non-Responder* ein mittleres Alter von 58,35 Jahren ($SD = 16,15$). Der jüngste *Non-Responder* war zum Zeitpunkt der Untersuchung 28 Jahre und der älteste 87 Jahre alt ($S = 61$). In der Kohorte der *Responder* waren die Patienten im Mittel ähnlich alt ($M = 57,80$ Jahre, $SD = 17,49$), der jüngste Patient 14 und der älteste 85 Jahre alt ($S = 71$). Die Auswertung mittels t-Test konnte keinen signifikanten Unterschied oder Effekt ($p = 0,873$, $d = 0,03$, 95 % $CI [-0,431, 0,366]$, $r = 0,02$) bezüglich des Alters zwischen den beiden Kohorten detektieren.

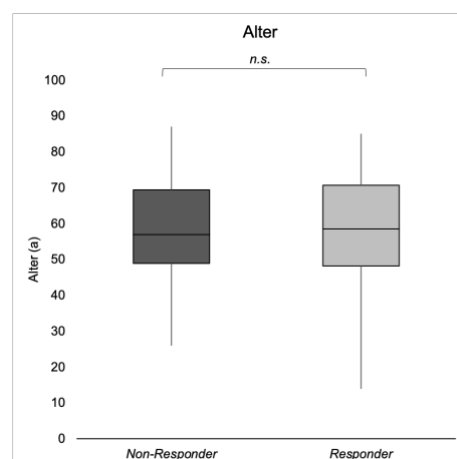


Abbildung 39: Alter von 97 untersuchten CML-Patienten

In den Abbildungen ist das Alter von CML-Patienten mit schlechtem (*Non-Responder*, $n = 47$) sowie gutem (*Responder*, $n = 51$) Ansprechen auf die jeweilige TKI-Therapie als Box-Whiskers-Plot dargestellt. Das Geburtsdatum wurde bei Erstdiagnose erhoben und entstammt der Patienten-Datenbank (LeukDB) des Labors für Leukämiediagnostik der III. Medizinischen Universitätsklinik Mannheim. Die äußeren Boxen entsprechen dem Interquartilsabstand (1. und 3. Quartil), die Whisker den Minimal- und Maximalwerten und der Querstrich dem Median. *n.s.*, nicht signifikant.

Bruchpunktvariante

Im Folgenden wurden die Bruchpunktvarianten der einzelnen Kohorten betrachtet (siehe Abbildung 43). In der Kohorte der *Non-Responder* ($n = 51$) zeigten 41,00 % den Bruchpunkttyp e13a2, 37 % e14a2 und 16 % den Typ e13a2, e14a2. Zwei *Non-Responder* (4,00 %) wiesen die seltene Variante e1a2 auf. Für einen *Non-Responder* (2,00 %) waren keine Angaben auffindbar, weswegen für folgende Analysen der Bruchpunktvariante die Kohorte der *Non-Responder* mit 50 anstatt 51 Patienten gezählt wurde. Auch in der Kohorte der *Responder* ($n = 46$) wiesen etwa die Hälfte der Patienten (48,00 %) die Bruchpunktvariante e13a2 auf, gefolgt von dem Typ e14a2 (30,00 %). Die Variante e13a2, e14a2 wiesen 22,00 % der *Responder* auf. Im Vergleich der beiden Kohorten mittels des Fisher-Tests konnte kein signifikanter Unterschied ($p = 0,487$) mit einem schwachen positiven Zusammenhang ($V = 0,17$) zwischen beiden Kohorten nachgewiesen werden.

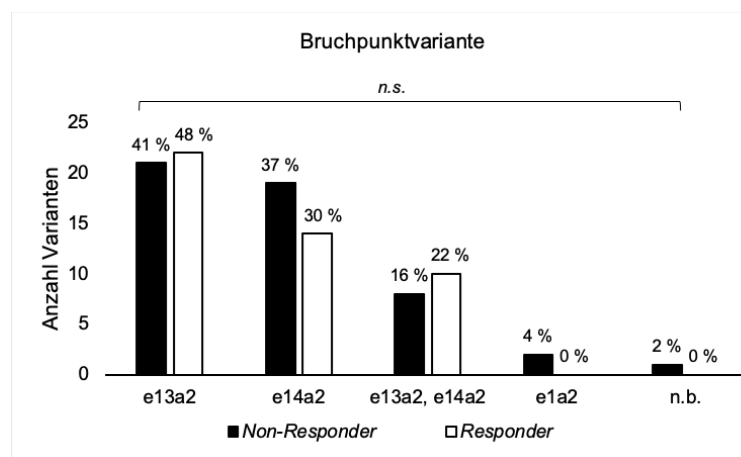


Abbildung 40: Bruchpunktvarianten von 97 untersuchten CML Patienten

In den Abbildungen sind die Bruchpunktvarianten von CML-Patienten mit schlechtem (*Non-Responder*, $n = 47$) sowie gutem (*Responder*, $n = 51$) Ansprechen auf die jeweilige TKI-Therapie als Säulendiagramm dargestellt. Der Bruchpunkttyp wurde bei Erstdiagnose erhoben und entstammt der Patienten-Datenbank (LeukDB) des Labors für Leukämediagnostik der III. Medizinischen Universitätsklinik Mannheim. *n.s.*, nicht signifikant; *n.b.*, nicht bekannt.

BCR-ABL1-Quotient

Gemeinsam für beide Kohorten betrachtet betrug der *BCR-ABL1*-Quotient zum Zeitpunkt der Diagnosestellung 32,12 % ($SD = 32,90$ %) mit einem Minimum von 0,02 % und einem maximalen Quotienten von 178,00 %. Die Kohorte der *Non-Responder* ($n = 51$) zeigte im Mittel einen Quotienten von 35,38 % ($SD = 36,30$ %, $Min = 0,15$ %, $Max = 178,00$ %). Die *Responder* ($n = 46$) wiesen einen nicht signifikant ($p = 0,243$, $r = -0,12$) geringeren *BCR-ABL1*-Quotienten von 28,50 % ($SD = 28,62$ %, $Min = 0,02$ %, $Max = 85,00$ %) auf. Die Mediane legen sowohl für die Gesamtgruppe ($Md = 25,00$ %), die *Non-Responder* ($Md = 26,00$ %) als auch die *Responder* ($Md = 22,50$ %) eine schiefe Verteilung nahe (siehe Abbildung 44).

Im Anschluss erfolgte die Auswertung des *BCR-ABL1*-Quotienten nach IS für diejenigen 37 Patienten (38,14 %), bei welchen der IS in der Datenbank hinterlegt war. Die Kohorte der *Non-Responder* ($n = 15$) zeigte im Mittel einen nicht signifikant ($p = 0,173$, $r = 0,23$) höheren *BCR-ABL1*-Quotienten (IS) von 3,14 % ($SD = 2,61$ %, $Md = 2,60$ %) als die *Responder* ($M = 2,23$ %, $SD = 2,63$ %, $Md = 0,80$ %).

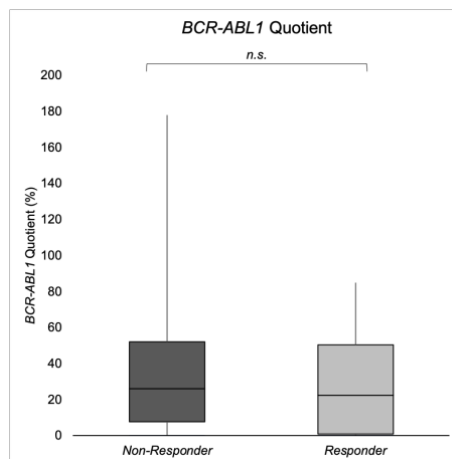


Abbildung 41: *BCR-ABL1*-Quotient von 97 untersuchten CML Patienten

In den Abbildungen sind die *BCR-ABL1*-Quotienten von CML-Patienten mit schlechtem (*Non-Responder*, $n = 47$) sowie gutem (*Responder*, $n = 51$) Ansprechen auf die TKI-Therapie als Box-Whiskers-Plots dargestellt. Die Quotienten wurden bei Erstdiagnose erhoben und entstammen der Patienten-Datenbank (LeukDB) des Labors für Leukämiediagnostik der III. Medizinischen Universitätsklinik Mannheim. Die Boxen entsprechen dem Interquartilsabstand (1. und 3. Quartil), die Whisker den Minimal- und Maximalwerten, der Querstrich dem Median. *n.s.*, nicht signifikant.

Leukozyten

Die Gesamtgruppe zeigte eine initiale Leukozytenzahl von 68 448,44 Zellen/ μl Blut ($SD = 95\,922,26$ Zellen/ μl Blut, $Md = 26\,850,00$ Zellen/ μl Blut, $Min = 2000,00$ Zellen/ μl Blut, $Max = 404\,000,00$ Zellen/ μl Blut). Die *Non-Responder* wiesen im Mittel 90 977,45 Zellen/ μl Blut ($SD = 112\,439,96$ Zellen/ μl Blut, $Md = 52\,300,00$ Zellen/ μl Blut, $Min = 2000,00$ Zellen/ μl Blut, $Max = 404\,000,00$ Zellen/ μl Blut, auf. Die *Responder* hatten eine signifikant ($p = 0,018$, $r = 0,24$) geringere mittlere Leukozytenzahl von 42 089,13 Zellen/ μl Blut ($SD = 64\,662,72$ Zellen/ μl , $Min = 3400,00$ Zellen/ μl Blut, $Max = 316\,000,00$ Zellen/ μl Blut, $Md = 11\,200,00$ Zellen/ μl Blut) (siehe Abbildung 45).

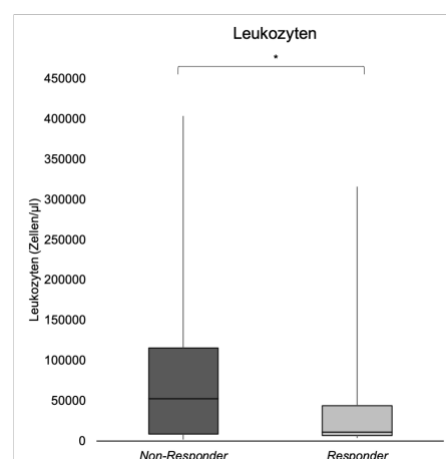


Abbildung 42: Leukozytenzahl bei Diagnosestellung von 97 untersuchten CML Patienten

In der Abbildung ist die initiale Leukozytenzahl von CML-Patienten mit schlechtem (*Non-Responder*, $n = 47$) sowie gutem (*Responder*, $n = 51$) Ansprechen auf ihre TKI-Therapie als Box-Whiskers-Plots dargestellt. Die Leukozytenzahlen wurden in KM-Proben ermittelt und entstammen der Patienten-Datenbank (LeukDB) des Labors für Leukämiediagnostik der III. Medizinischen Universitätsklinik Mannheim. Die äußeren Boxen entsprechen dem Interquartilsabstand (1. und 3. Quartil), die Whisker den Minimal- und Maximalwerten und der Querstrich dem Median. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Zeit bis zum Erreichen von MMR

Im Folgenden wurde der Zeitraum, in welchem die CML-Patienten nach Diagnosestellung MMR erreichten, betrachtet (siehe Abbildung 46). Die Kohorte der *Non-Responder* erreichte im Mittel nach 27,32 Monaten und einer Standardabweichung von 16,67 Monaten MMR. Die kürzeste Zeit bis MMR betrug hierbei 12,50 Monate und das Maximum über 91,50 Monate ($S = 79,00$ M). Die Kohorte der *Responder* erreichte erwartungsgemäß im Durchschnitt nach höchst signifikant ($p < 0,001$) kürzerer Zeit ($M = 5,17$ M, $SD = 3,01$ M) als die *Non-Responder* MMR. Die Spannweite war mit 12 Monaten ($Min = 0,00$ M, $Max = 12,00$ M) geringer als bei den *Respondern*. Die Zeit bis zum Erreichen von MMR korrelierte stark positiv ($r = 0,86$) mit der Einteilung der beiden Gruppen.

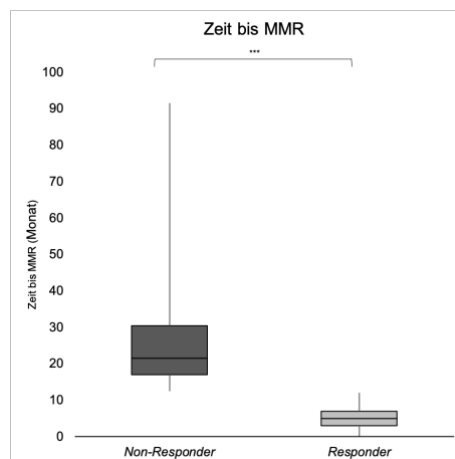


Abbildung 43: Zeit bis Erreichen von MMR bei 97 untersuchten CML-Patienten

In den Abbildungen ist der Zeitraum, in welchem CML-Patienten nach Diagnosestellung und Beginn der TKI-Therapie MMR erreichten, angegeben. Es ist die Zeit bis MMR von Patienten mit schlechtem (*Non-Responder*; $n = 47$) sowie gutem (*Responder*; $n = 51$) Ansprechen auf die jeweilige TKI-Therapie als Box-Whiskers-Plots dargestellt. Der Zeitraum wurde ab Erstdiagnose und Therapiebeginn gezählt. Die für die Untersuchung herangezogenen Daten entstammen der Patienten-Datenbank (LeukDB) des Labors für Leukämiediagnostik der III. Medizinischen Universitätsklinik Mannheim. Die äußeren Boxen entsprechen dem Interquartilsabstand (1. und 3. Quartil), die Whisker den Minimal- und Maximalwerten und der Querstrich dem Median. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Therapie

Von 97 Patienten konnten für 96 vollständige Therapieangaben ermittelt werden (siehe Tabelle 15). Für den *Responder* R-13 konnten kein Datenbankeintrag zur Therapie gefunden werden. Da R-13 Teilnehmer einer der angegebenen CML-Studien war, ist von einer Behandlung mit Tyrosinkinaseinhibitoren auszugehen. Für die statistische Betrachtung der Therapien und sich auf Therapien beziehende Analysen wurde R-13 jedoch ausgeschlossen. Um eine übersichtliche Darstellung zu ermöglichen, wurde die Gruppierung der Therapiekombinationen der Patienten ohne Berücksichtigung der individuellen Reihenfolge angegeben. Die verschiedenen Therapiekombinationen sind in Abbildung 47 dargestellt.

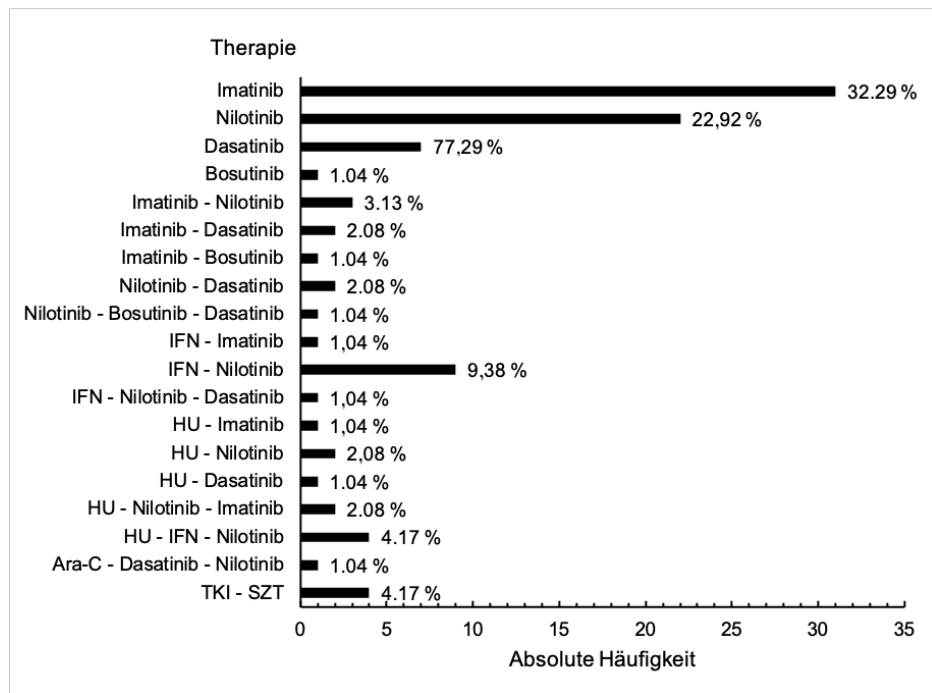


Abbildung 44: Häufigkeit der Therapiekombinationen bei CML-Patienten

Betrachtet wurde die Behandlung mit TKI und ergänzenden medikamentösen Therapien von 96 Patienten mit CML in dem Zeitraum von Diagnosestellung bis 12 Monate später. Die einzelnen Gruppierungen ermöglichen keine Aussage über die Reihenfolge der erfolgten Therapie. Darstellung der Therapiekombinationen als gruppiertes Säulendiagramm. Die y-Achse repräsentiert die absolute Häufigkeit der Therapie in der betrachteten Patientengruppe. Die relativen Häufigkeiten sind in Prozent neben den Balken notiert.

In Abbildung 48 sind die folgenden, näher betrachteten Therapien dargestellt. Von den 96 für diese Betrachtung erfassten Patienten erhielten 44 (45,83 %) innerhalb des initialen Beobachtungszeitraumes von 12 Monaten unter anderem IM. Hierbei wurden 30 *Non-Responder* (68,18 %) und 14 (31,82 %) *Responder* mit IM therapiert. Es wurden signifikant weniger *Responder* (31,11 %) im Vergleich zu den *Non-Respondern* (68,18 %) mit IM behandelt, $p = 0,007$, $V = 0,28$. 31 Patienten der Gesamtgruppe (32,29 %) erhielten während des Beobachtungszeitraumes eine Monotherapie mit IM. Hiervon waren 19 Patienten (61,29 %) *Non-Responder* und machten in ihrer Kohorte einen Anteil von 37,25 % aus. 12 der nur mit IM behandelten Patienten (38,71 %) waren *Responder*. Mit einem Anteil von 26,67 % an der Kohorte *Responder* konnte bezüglich der Monotherapie mit IM keine statistische Signifikanz gefunden werden ($p = 0,268$, $V = 0,11$). Nahezu die Hälfte der Gesamtgruppe wurde unter anderem mit Nilotinib therapiert ($n = 46$, 47,92 %). Hierbei handelte es sich bei 20 Patienten (43,48 %) um *Non-Responder* und mit 26 Patienten (56,52 %) waren mehr als die Hälfte dieser Patienten *Responder*. Der Anteil der Kohorte *Responder* war mit 57,78 % im Vergleich zu den mit Nilotinib therapierten *Non-Respondern* (39,22 %) nicht signifikant größer ($p = 0,073$, $V = 0,19$). 22 Patienten (22,92 %) der Gesamtgruppe erhielten eine initiale Monotherapie mit Nilotinib. Eine Monotherapie mit Nilotinib erhielten hiervon mit 14 Patienten (63,64 %) insgesamt mehr *Responder* als *Non-Responder* mit 8 Patienten (36,36 %). Der Unterschied zwischen beiden Kohorten bezüglich des Anteils der Monotherapie an der jeweiligen Kohorte war mit 15,69 % der *Non-Responder* nicht signifikant niedriger als der Anteil an den *Respondern* mit 31,11 %, $p = 0,073$, $V = 0,18$.

3.6 Zusammenhang zwischen „Zeit bis MMR“ und klinischen Parametern

Im Folgenden wurde anhand verschiedener nicht-parametrischer Tests untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen dem Zeitraum, in welchen die Patienten MMR erreichten, und den erfassten klinischen Parametern Geschlecht, Alter, Bruchpunktvariante, Therapie, *BCR-ABL1*-Quotient und der Leukozytenzahl, der jeweiligen relativen Genexpressionen von *ESPL1*, *PTTG1* und *PTTG1IP* sowie des Abstandes bei Diagnosestellung besteht. Es wurden mittels sowohl die Assoziationen für die Gesamtgruppe ($N = 97$) als auch separat für die *Non-Responder* ($n = 51$) und *Responder* ($n = 46$) überprüft und mittels des Korrelationskoeffizienten nach Spearman oder der Effektstärke r quantifiziert.

3.6.1 Geschlecht versus „Zeit bis MMR“

Für den Zusammenhang zwischen Geschlechtsverteilung und „Zeit bis MMR“ konnte sowohl in der Gesamtbetrachtung ($r = 0,04$, $p = 0,665$) als auch in der einzelnen Betrachtung der *Non-Responder* ($r = 0,11$, $p = 0,427$) und *Responder* ($r = 0,06$, $p = 0,677$) keine signifikante Assoziation oder relevante Effektstärke gefunden werden.

3.6.2 Alter versus „Zeit bis MMR“

Das Alter korrelierte in der Betrachtung der Gesamtgruppe nicht linear und nicht signifikant ($r = 0,02$, $p = 0,873$) mit der Zeit bis MMR. Die *Non-Responder* zeigten hierbei eine leicht positive und nicht signifikante Korrelation ($r = 0,20$, $p = 0,153$) zwischen dem Alter und der „Zeit bis MMR“. Das Alter korrelierte bei den *Respondern* schwach negativ und nicht signifikant ($r = -0,13$, $p = 0,377$) mit der Zeit bis zum Erreichen von MMR.

3.6.3 Bruchpunktvariante versus „Zeit bis MMR“

Bei Betrachtung der Assoziation zwischen Bruchpunktvariante und „Zeit bis MMR“ konnte für alle drei betrachteten Gruppen eine leicht positive Korrelation ohne Signifikanz (Gesamtgruppe $r = 0,21$, $p = 0,258$) oder der einzelnen Kohorten (*Non-Responder* $r = 0,31$, $p = 0,182$, *Responder* $r = 0,15$, $p = 0,609$) nachgewiesen werden.

3.6.4 TKI-Therapie korreliert mit „Zeit bis MMR“ bei *Respondern*

Anschließend wurde geprüft, ob die Wahl des Tyrosinkinaseinhibitors eine Assoziation mit der Zeit bis zum Erreichen von MMR vorwies (siehe Abbildung 38). Aufgrund der Vielzahl an Therapiekombinationen sowie Vortherapien über den 12-monatigen Betrachtungszeitraum hinweg wurde der U-Test bei der Betrachtung der Korrelation zwischen Zeit bis MMR und der Therapie mit denjenigen 53 CML-Patienten (54,64 %) durchgeführt, welche eine alleinige Therapie mit Imatinib oder Nilotinib erhielten. Hierbei zeigte sich bei Betrachtung der Gesamtgruppe ($N = 53$) keine signifikante Assoziation ($r = -0,16$, $p = 0,247$). Die Therapiewahl korrelierte im Gegensatz zu den *Non-Respondern* ($r = -0,25$, $p = 0,193$) bei den *Respondern* mit $r = -0,46$ signifikant ($p = 0,019$) negativ mit der Zeit bis MMR.

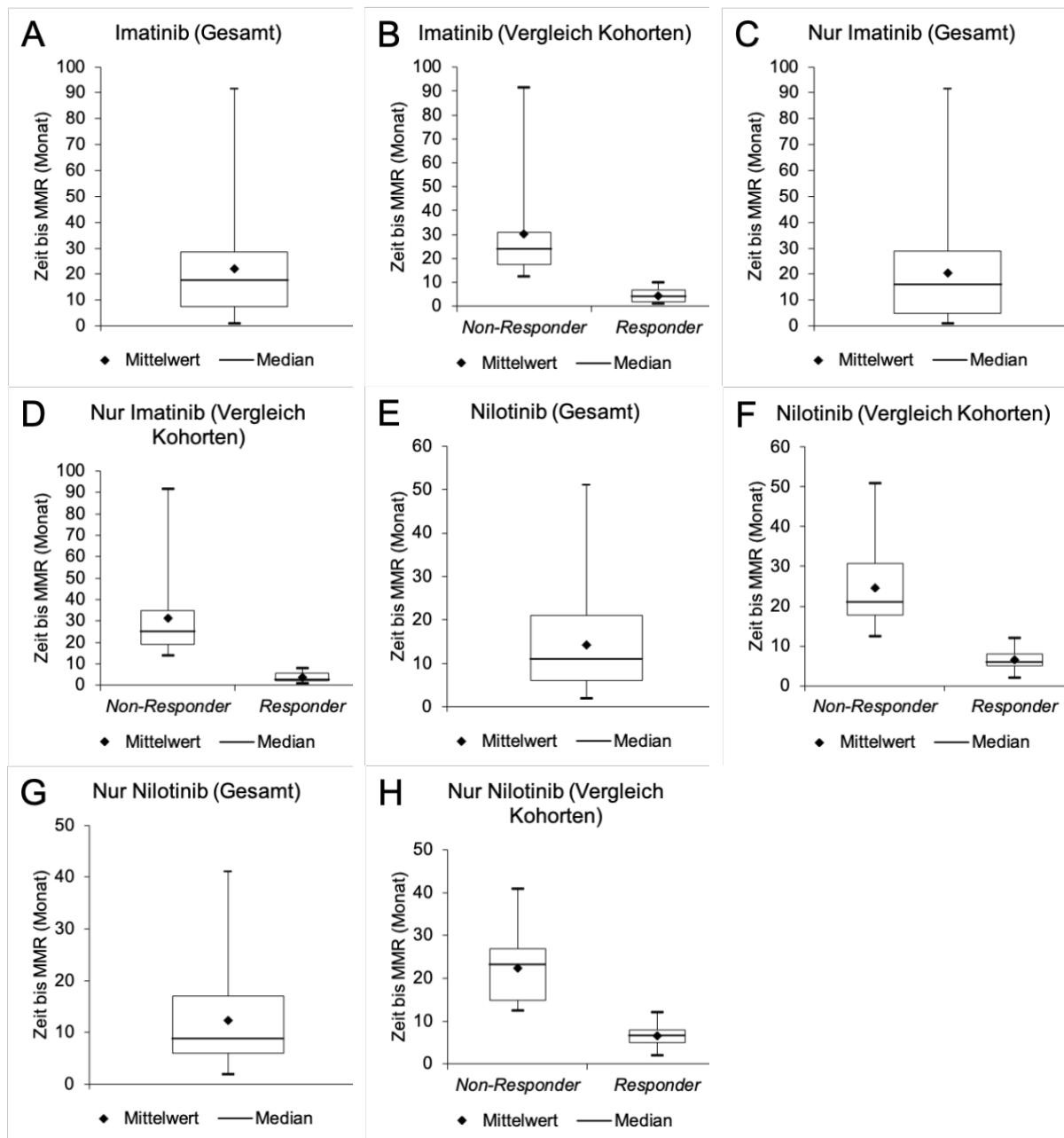


Abbildung 45: Assoziation TKI-Therapie mit der „Zeit bis MMR“ bei CML-Patienten

Die Assoziationen zwischen „Zeit bis MMR“ und der TKI-Therapie von 53 untersuchten CML-Patienten sind als Box-Whiskers-Plots dargestellt. Betrachtet wurden die gesamte Gruppe ($N = 53$) sowie separat *Non-Responder* ($n = 27$) und *Responder* ($n = 26$). Als Maß für das Therapieansprechen wurde ein Zeitraum von 12 Monaten definiert. Die Zeit bis MMR wurde für jeden Patienten anhand des Therapieverlaufs aus der Patienten-Datenbank (LeukDB) des Labors für Leukämiediagnostik der III. Medizinischen Universitätsklinik Mannheim bestimmt. Die Therapie wurde im Kontext der Studienteilnahme der Patienten in regelmäßigen Abständen dokumentiert und entstammt der Datenbank der Medizinischen Klinik II. Jeder Datenpunkt in den Graphiken entspricht einer untersuchten Probe. Die äußeren Boxen entsprechen dem Interquartilsabstand (1. und 3. Quartil), die Whisker den Minimal- und Maximalwerten und der Querstrich dem Median. (A) Imatinib (Gesamt). (B) Imatinib (Vergleich Kohorten). (C) Nur Imatinib (Gesamt). (D) Nur Imatinib (Vergleich Kohorten). (E) Nilotinib (Gesamt). (F) Nilotinib (Vergleich Kohorten). (G) Nur Nilotinib (Gesamt). (H) Nur Nilotinib (Vergleich Kohorten).

3.6.5 *BCR-ABL1*-Quotient korreliert mit „Zeit bis MMR“ bei CML-Patienten

Zwischen dem *BCR-ABL1*-Quotienten und der Zeit bis MMR konnte eine leicht positive, jedoch nicht signifikante Korrelation ($r = 0,20$, $p = 0,052$) nachgewiesen werden (Abbildung 49A). Wie in Abbildung 49B ersichtlich, konnte keine Korrelation der Quotienten der *Non-Responder* ($r = -0,06$, $p = 0,672$) mit der „Zeit bis MMR“ nachgewiesen werden. Zwischen den *BCR-ABL1*-Quotienten der *Responder* konnte ein sehr signifikanter linearer Zusammenhang ($r = 0,44$, $p = 0,003$) mit der Zeit bis zum Erreichen von MMR gezeigt werden (Abbildung 49C). Die Korrelationskoeffizienten der beiden Kohorten unterschieden sich signifikant ($p = 0,012$) voneinander (Abbildung 49D).

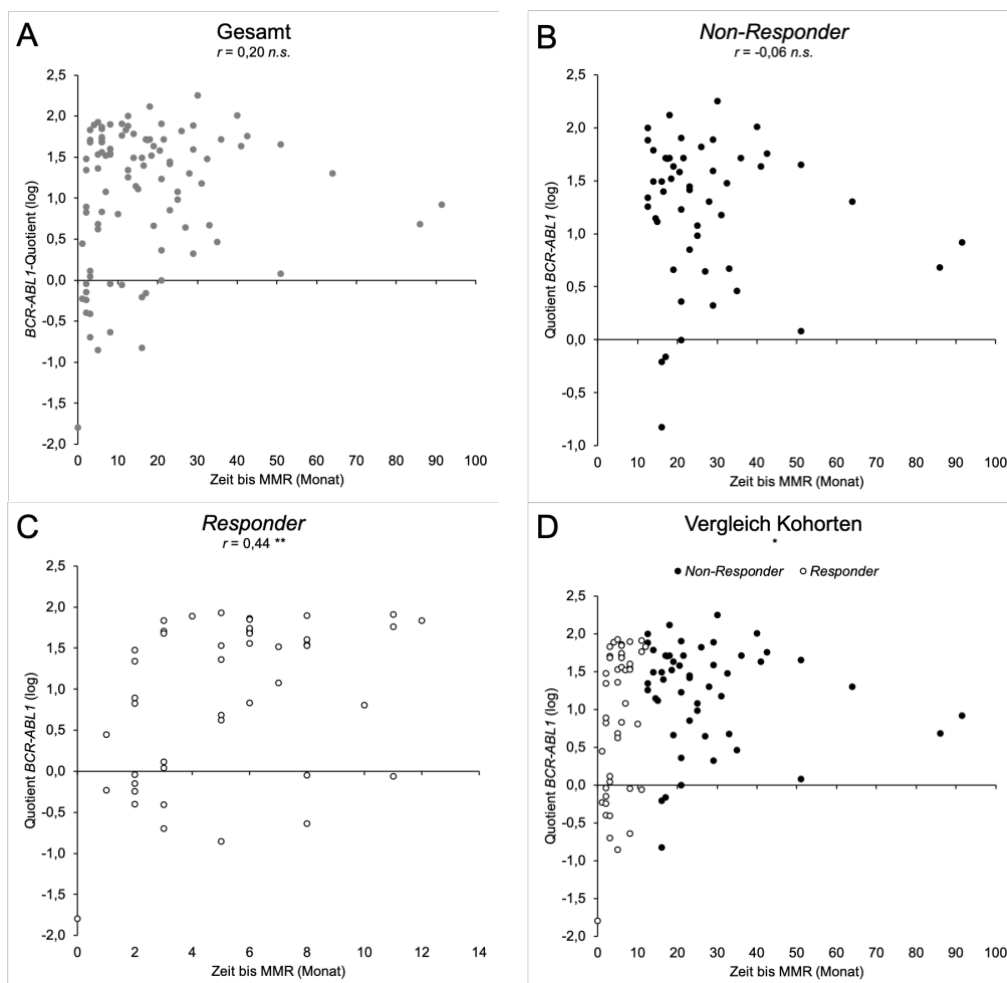


Abbildung 46: Assoziation *BCR-ABL1*-Quotient mit der „Zeit bis MMR“ bei CML-Patienten

Die Assoziationen zwischen „Zeit bis MMR“ und dem logarithmierten *BCR-ABL1*-Quotienten von 97 untersuchten CML-Patienten sind als Punktwolkendiagramme dargestellt. Betrachtet wurden die gesamte Gruppe ($N = 97$) sowie separat *Non-Responder* ($n = 51$) und *Responder* ($n = 46$). Als Maß für das Therapieansprechen wurde ein Zeitraum von 12 Monaten definiert. Die Zeit bis MMR wurde für jeden Patienten anhand des Therapieverlaufs aus der Patienten-Datenbank (LeukDB) des Labors für Leukämiediagnostik der III. Medizinischen Universitätsklinik Mannheim bestimmt. Der *BCR-ABL1*-Quotient wurde bei Diagnosestellung erhoben und entstammt der Datenbank der Medizinischen Klinik II. Jeder Datenpunkt in den Graphiken entspricht einer untersuchten Probe. (A) Gesamtgruppe. (B) *Non-Responder*. (C) *Responder*. (D) Vergleich Kohorten. r , Korrelationskoeffizient nach Spearman; n.s., nicht signifikant; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

3.6.6 Leukozytenzahl korreliert mit „Zeit bis MMR“ bei CML-Patienten

Die Leukozyten zeigten bei Betrachtung der Gesamtgruppe eine moderat positive und höchst signifikante Korrelation ($r = 0,35$, $p < 0,001$) mit der „Zeit bis MMR“ (siehe Abbildung 50A). Für die Anzahl der Leukozyten konnte bei den *Non-Respondern* ein schwach positiver, jedoch nicht signifikanter Zusammenhang ($r = 0,21$, $p = 0,149$) nachgewiesen werden, welcher in Abbildung 50B dargestellt ist. In der Kohorte der *Responder* korrelierten die Leukozyten deutlich positiv und sehr signifikant ($r = 0,42$, $p = 0,004$) mit der Zeit bis zum Erreichen von MMR (Abbildung 50C). Im Vergleich der Korrelationskoeffizienten der beiden Kohorten konnte kein signifikanter Unterschied ($p = 0,257$) nachgewiesen werden (siehe Abbildung 50D).

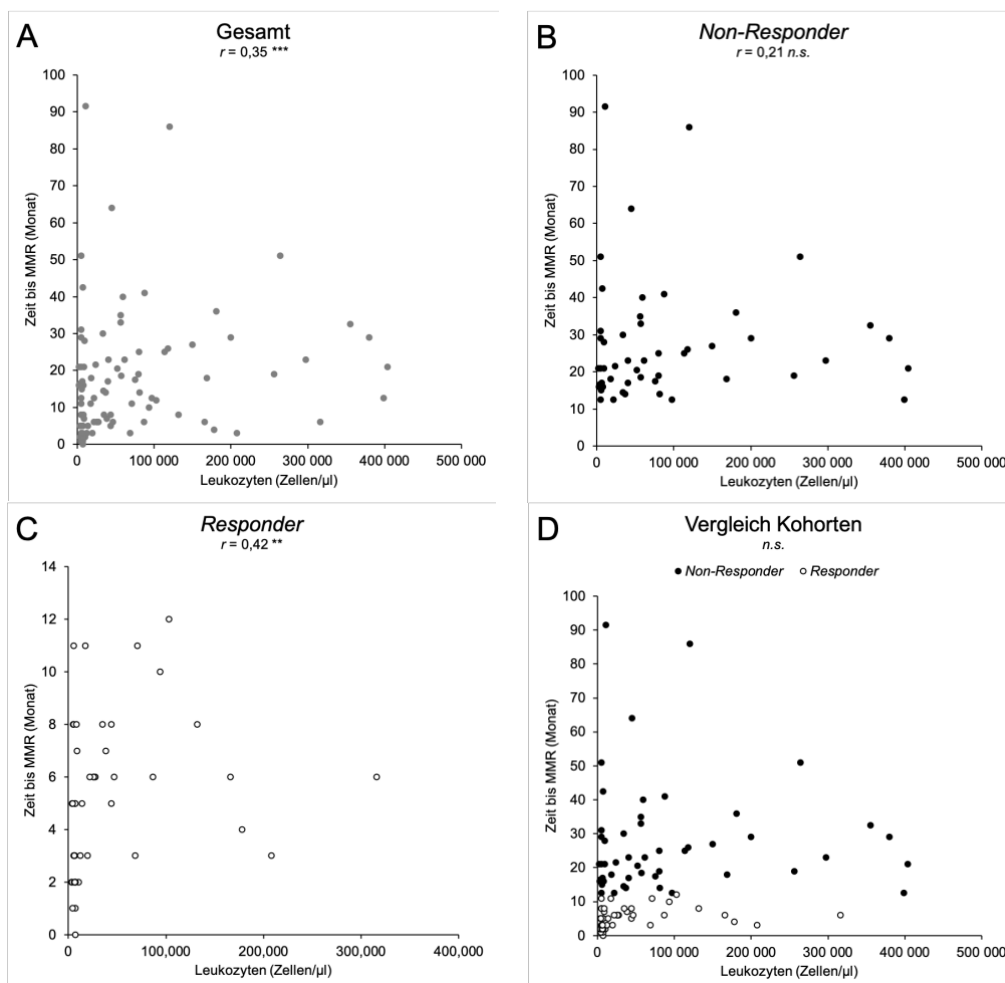


Abbildung 47: Assoziation Leukozytenzahl mit der „Zeit bis MMR“ bei CML-Patienten

Die Assoziationen zwischen „Zeit bis MMR“ und der Leukozytenzahl von 97 untersuchten CML-Patienten sind als Punktwolkendiagramme dargestellt. Betrachtet wurden die gesamte Gruppe ($N = 97$) sowie separat *Non-Responder* ($n = 51$) und *Responder* ($n = 46$). Als Maß für das Therapieansprechen wurde ein Zeitraum von 12 Monaten definiert. Die Zeit bis MMR wurde für jeden Patienten anhand des Therapieverlaufs aus der Patienten-Datenbank (LeukDB) des Labors für Leukämiediagnostik der III. Medizinischen Universitätsklinik II. bestimmt. Die Leukozytenzahl wurde bei Diagnosestellung erhoben. Jeder Datenpunkt in den Graphiken entspricht einer untersuchten Probe. (A) Gesamtgruppe. (B) *Non-Responder*. (C) *Responder*. (D) Vergleich Kohorten. r , Korrelationskoeffizient nach Spearman; *n.s.*, nicht signifikant; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

3.6.7 Genexpression von *ESPL1* korreliert mit „Zeit bis MMR“ bei CML-Patienten

Bei Betrachtung der relativen Genexpression von *ESPL1* und der „Zeit bis MMR“ konnte in der Betrachtung der Gesamtgruppe eine sehr signifikante Assoziation mit einer moderaten negativen Korrelation ($r = -0,28$, $p = 0,006$) gezeigt werden (siehe Abbildung 51A). Die *ESPL1*-Werte der *Non-Responder* wiesen eine leicht negative, nicht signifikante Korrelation ($r = -0,09$, $p = 0,509$) mit der „Zeit bis MMR“ auf (siehe Abbildung 51B). Für die Expression von *ESPL1* konnte für die *Responder* eine höchst signifikante Assoziation mit einer deutlich negativen Korrelation ($r = -0,53$, $p < 0,001$) mit der Zeit nachgewiesen werden (Abbildung 51C). Wie Abbildung 51D zeigt, unterschieden sich die beiden Kohorten in ihrer Korrelation zwischen der „Zeit bis MMR“ und der *ESPL1*-Transkriptspiegel signifikant ($p < 0,019$). Dabei gilt: Je höher die errechneten $\Delta\text{-C}_t$ -Werte (X-Achse), desto geringer die *ESPL1*-Genexpression.

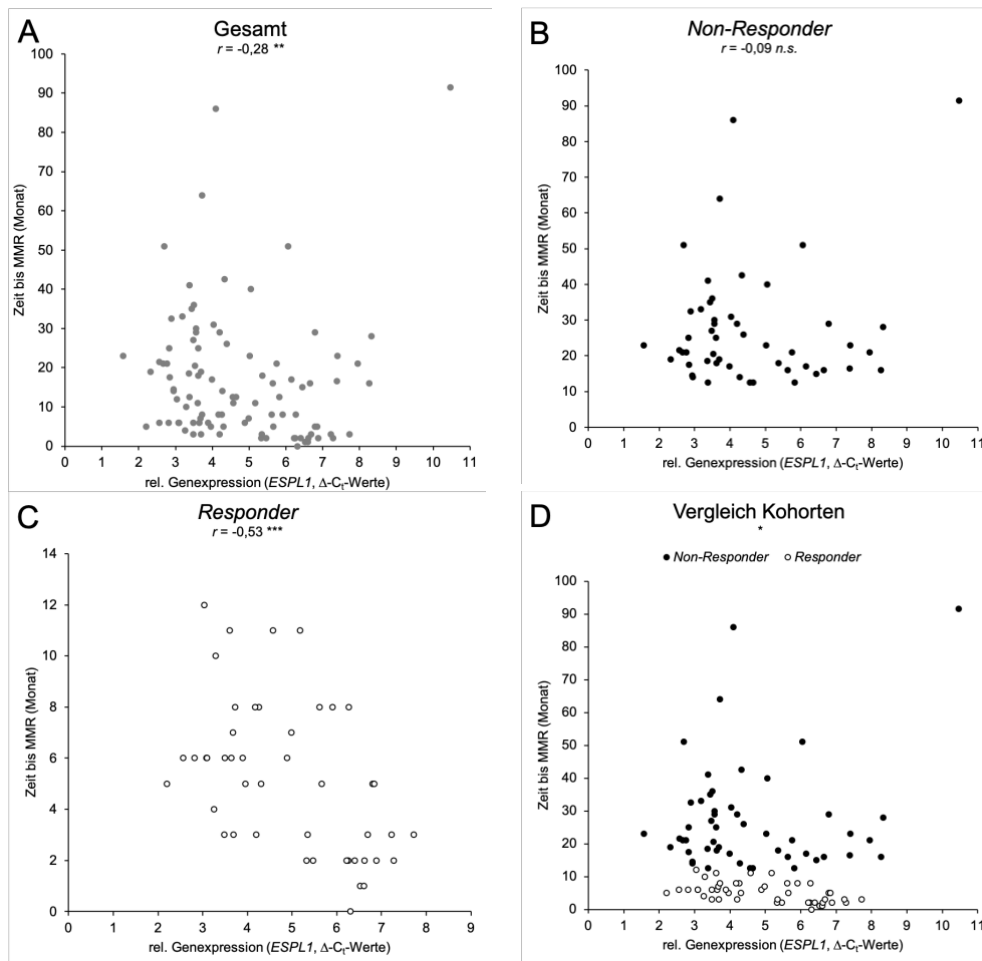


Abbildung 48: Assoziation Genexpression Separase/*ESPL1* mit der „Zeit bis MMR“ bei CML-Patienten Die Assoziationen zwischen „Zeit bis MMR“ und der relativen Genexpression von *ESPL1* ($\Delta\text{-C}_t$ -Werte) bei 97 untersuchten CML-Patienten sind als Punktwolkendiagramme dargestellt. Betrachtet wurden die gesamte Gruppe ($N = 97$) sowie separat *Non-Responder* ($n = 51$) und *Responder* ($n = 46$). Als Maß für das Therapieansprechen wurde ein Zeitraum von 12 Monaten definiert. Die Genexpression von *ESPL1* wurde mittels qRT-PCR aus cDNA-Proben vom Zeitpunkt der Diagnose bestimmt. Als *House-keeping*-Gen wurde *GUS* verwendet. Die $\Delta\text{-C}_t$ -Werte ergeben sich aus den gemessenen C_t -Werten minus C_t -Werten von *GUSB*. Jeder Datenpunkt in den Graphiken entspricht einer untersuchten Probe. (A) Gesamtgruppe. (B) *Non-Responder* (C) *Responder* (D) Vergleich Kohorten. r , Korrelationskoeffizient nach Spearman; n.s., nicht signifikant; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

3.6.8 Genexpression von *PTTG1* korreliert mit „Zeit bis MMR“ bei *Respondern*

Die relative Genexpression von *PTTG1* zeigte bei Betrachtung der Gesamtgruppe eine moderat negative Korrelation ($r = -0,19$), welche mit $p = 0,063$ nicht signifikant war (siehe Abbildung 52A). Die *Non-Responder* wiesen einen schwach negativen und nicht signifikanten Zusammenhang ($r = -0,17$, $p = 0,245$) zwischen der Expression von *PTTG1* und „Zeit bis MMR“ auf (Abbildung 52B). Wie in Abbildung 52C ersichtlich, zeigten die *Responder* bei *PTTG1* eine signifikante Assoziation sowie moderat negative Korrelation mit der „Zeit bis MMR“ ($r = -0,37$, $p = 0,011$). Es konnte kein signifikanter Unterschied, $p = 0,293$, zwischen den beiden Gruppen bezüglich dieser Korrelation gefunden werden (siehe Abbildung 52D). Dabei gilt: Je höher die errechneten $\Delta\text{-C}_t$ -Werte (X-Achse), desto geringer die *PTTG1*-Genexpression.

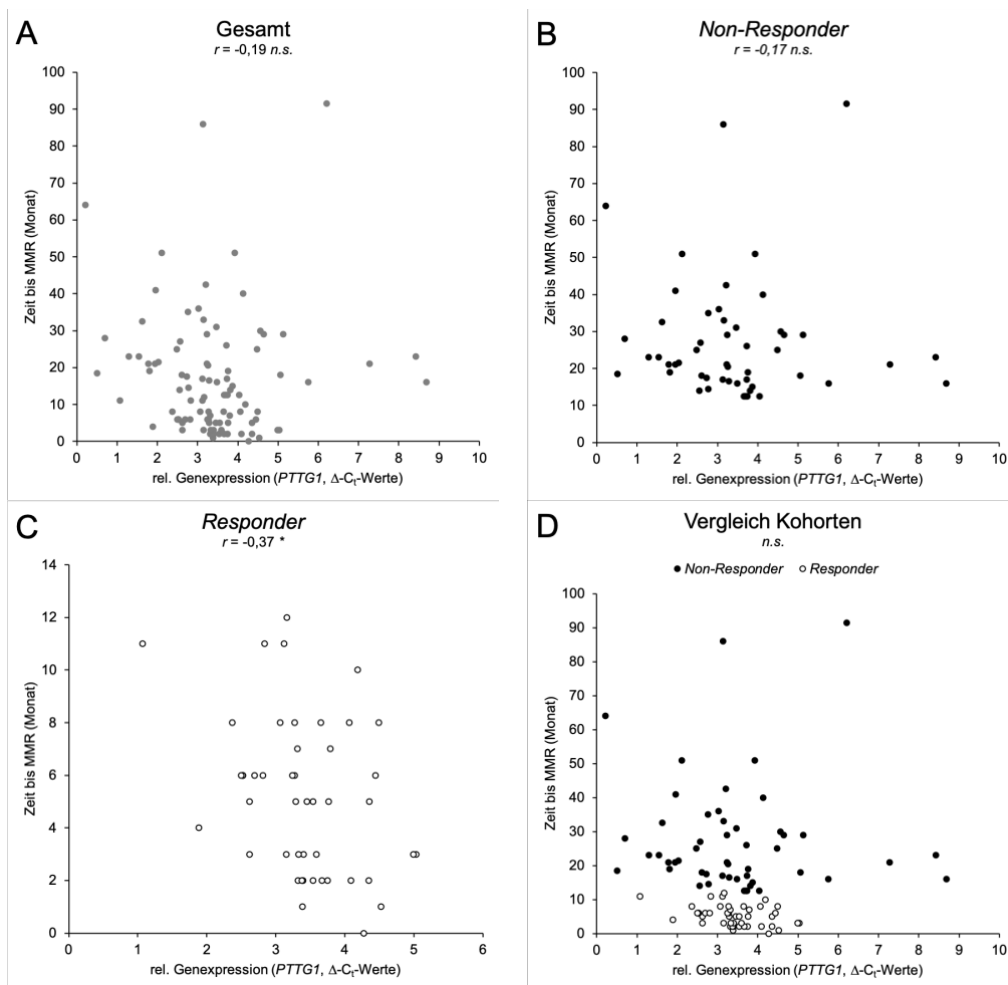


Abbildung 49: Assoziation Genexpression Securin/*PTTG1IP* mit der „Zeit bis MMR“ bei CML-Patienten Die Assoziationen zwischen „Zeit bis MMR“ und der relativen Genexpression von *PTTG1* ($\Delta\text{-C}_t$ -Werte) bei 97 untersuchten CML-Patienten sind als Punktwolkendiagramme dargestellt. Betrachtet wurden die gesamte Gruppe ($N = 97$) sowie separat *Non-Responder* ($n = 51$) und *Responder* ($n = 46$). Als Maß für das Therapieansprechen wurde ein Zeitraum von 12 Monaten definiert. Die Genexpression von *PTTG1* wurde mittels qRT-PCR aus cDNA-Proben vom Zeitpunkt der Diagnose bestimmt. Als *House-keeping*-Gen wurde *GUSB* verwendet. Die $\Delta\text{-C}_t$ -Werte ergeben sich aus den gemessenen C_t -Werten minus C_t -Werten von *GUSB*. Jeder Datenpunkt in den Graphiken entspricht einer untersuchten Probe. (A) Gesamtgruppe. (B) *Non-Responder* (C) *Responder* (D) Vergleich Kohorten. r , Korrelationskoeffizient nach Spearman; n.s., nicht signifikant; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

3.6.9 Genexpression von *PTTG1IP* korreliert mit „Zeit bis MMR“ bei Respondern

Bei Betrachtung der Assoziation zwischen relativer Genexpression von *PTTG1IP* konnte für die Gesamtgruppe eine schwach positive, nicht signifikante Korrelation ($r = 0,15$, $p = 0,131$) zwischen den Kohorten gezeigt werden (Abbildung 53A). Bei den *Non-Respondern* korrelierten die Expressionswerte von *PTTG1IP* nicht signifikant und schwach positiv ($r = 0,014$, $p = 0,924$) mit der „Zeit bis MMR“ (Abbildung 53B). Wie in Abbildung 53C ersichtlich, zeigten die *PTTG1IP*-Expressionswerte der *Responder* eine signifikante Assoziation mit der „Zeit bis MMR“ und zeigten eine moderat positive Korrelation ($r = 0,36$, $p = 0,015$). Abbildung 53D verdeutlicht, dass die beiden Kohorten sich hinsichtlich ihrer Korrelation nicht signifikant unterschieden ($p = 0,088$). Je höher die errechneten Δ -C_t-Werte (X-Achse), desto geringer die *PTTG1IP*-Genexpression.

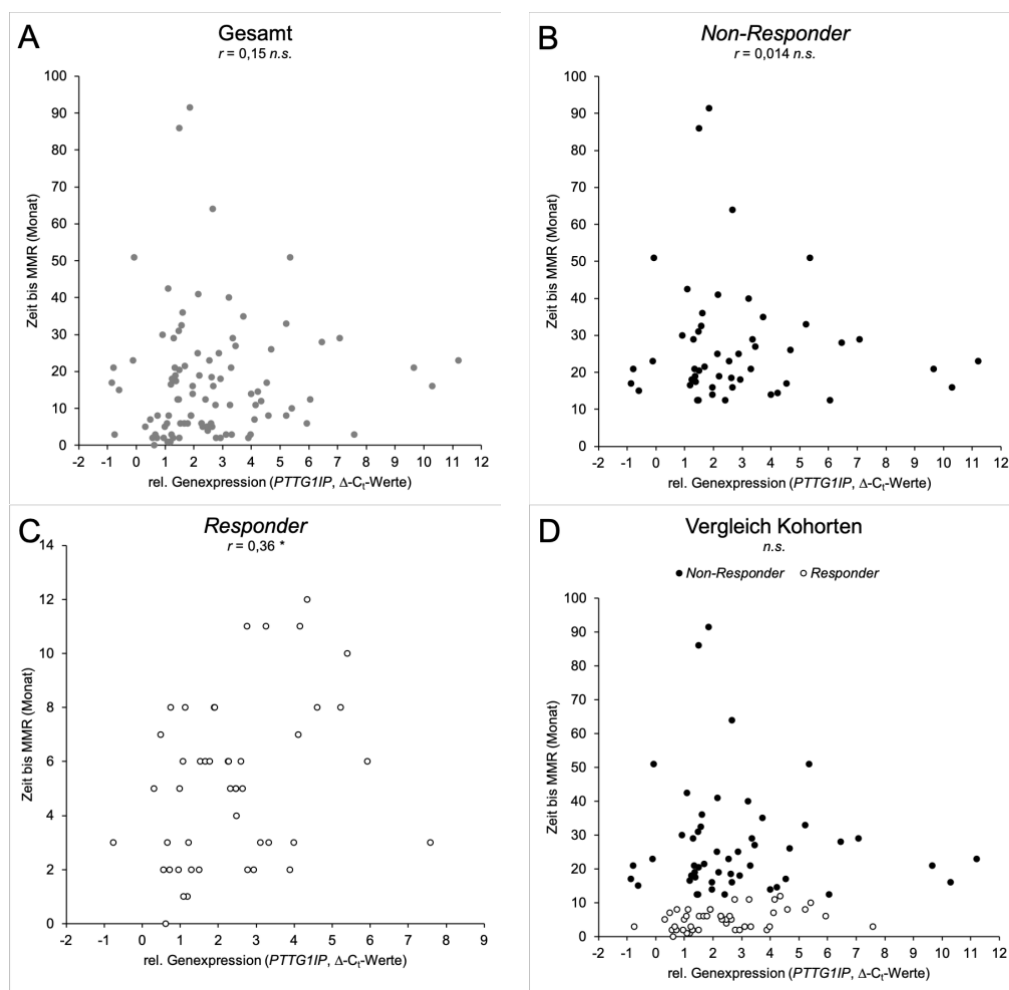


Abbildung 50: Assoziation Genexpression *PTTG1IP* mit der „Zeit bis MMR“ bei CML-Patienten
 In den Darstellungen sind die Assoziationen zwischen Zeit bis MMR und der relativen Genexpression von *PTTG1IP* bei 97 untersuchten CML-Patienten als Punktwolkendiagramme abgebildet. Betrachtet wurden die gesamte Gruppe ($N = 97$) sowie separat *Non-Responder* ($n = 51$) und *Responder* ($n = 46$). Als Maß für das Therapieansprechen wurde ein Zeitraum von 12 Monaten definiert. Die Genexpression von *PTTG1IP* wurde mittels qRT-PCR aus cDNA-Proben vom Zeitpunkt der Diagnose bestimmt. Als *House-keeping*-Gen wurde *GUS* verwendet. Die Δ -C_t-Werte ergeben sich aus den gemessenen C_t-Werten minus C_t-Werten von *GUS*. Jeder Datenpunkt in den Graphiken entspricht einer untersuchten Probe. (A) Gesamtgruppe. (B) *Non-Responder* (C) *Responder* (D) Vergleich Kohorten. r , Korrelationskoeffizient nach Spearman; *n.s.*, nicht signifikant; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

3.6.10 Gemessener 3D-Abstand versus „Zeit bis MMR“

Bei der Überprüfung einer Assoziation zwischen „Zeit bis MMR“ und den 3-D-Distanzen konnte eine schwach positive Korrelation ohne Signifikanz ($r = 0,10$, $p = 0,334$) bei Betrachtung der Gesamtgruppe ermittelt werden (Abbildung 54A). Auch die separate Überprüfung konnte weder für die Kohorte der *Non-Responder* noch die der *Responder* eine signifikante Assoziation zwischen Zeit und dem Abstand zeigen. Abbildung 54B - D verdeutlichen, dass der Abstand bei den *Non-Respondern* nicht signifikant und leicht positiv ($r = 0,03$, $p = 0,811$) und bei den *Respondern* schwach negativ und nicht signifikant ($r = -0,22$, $p = 0,150$) korrelierte.

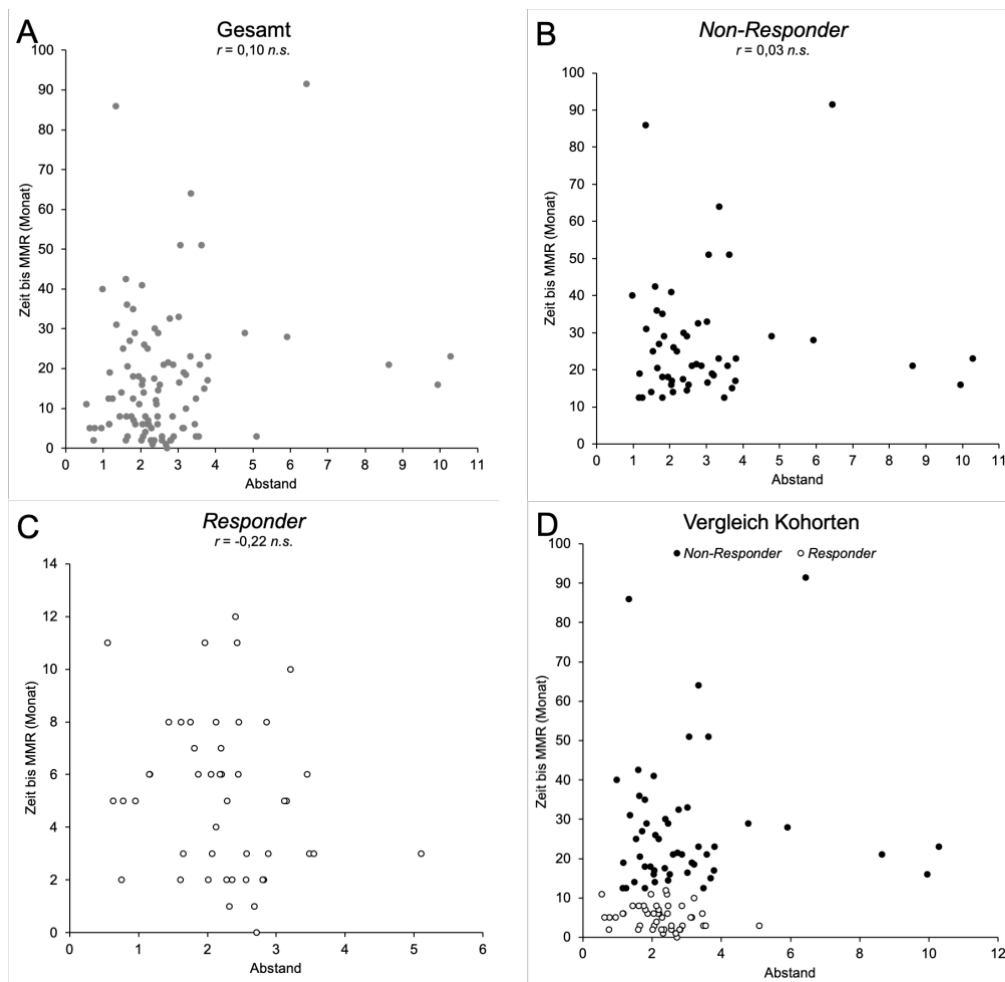


Abbildung 51: Assoziation Abstand mit der „Zeit bis MMR“ bei CML-Patienten

In den Darstellungen sind die Assoziationen zwischen „Zeit bis MMR“ und dem Abstand bei 97 untersuchten CML-Patienten als Punktwolkendiagramme abgebildet. Betrachtet wurde die gesamte Gruppe ($N = 97$) sowie separat *Non-Responder* ($n = 51$) und *Responder* ($n = 46$). Als Maß für das Therapieansprechen wurde ein Zeitraum von 12 Monaten definiert. Die Genexpression von *ESPL1*, *PTTG1* und *PTTG1IP* wurde mittels qRT-PCR aus cDNA-Proben vom Zeitpunkt der Diagnose bestimmt. Der Abstand stellt die Entfernung einer Beobachtungseinheit vom Zentrum dar, basierend auf den Mittelwerten der relativen Genexpression (Δ - C_t -Werte). Die Δ - C_t -Werte ergeben sich aus den gemessenen C_t -Werten minus C_t -Werten von *GUSB*. Jeder Datenpunkt in den Graphiken entspricht einer untersuchten Probe. (A) Gesamtgruppe. (B) *Non-Responder*. (C) *Responder*. (D) Vergleich Kohorten. r , Korrelationskoeffizient nach Spearman; n.s., nicht signifikant; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4 DISKUSSION

Eines der charakteristischen Merkmale von Malignomen ist eine unkontrollierte Tumorzellproliferation, welche durch aberrante Expression verschiedener Zellzyklusgene ausgelöst wird. Dementsprechend ist es naheliegend, den therapeutischen und prognostischen Wert der Expressionen dieser Zellzyklusgene zu untersuchen.¹⁸⁸ Bei der CML konnten im Krankheitsverlauf eine erhöhte Aktivität der Separase, einem Schlüsselprotein der Zellteilung nachgewiesen werden.¹⁷⁵ Eine erhöhte Expression von *ESPL1* wird mit einem schlechteren *Outcome* bei diversen Tumorentitäten assoziiert. Bislang sind keine prognostischen molekularen Marker vorhanden, welche zum Diagnosezeitpunkt der CML ein unzureichendes Ansprechen auf die TKI-Therapie vorhersagen können. Auf der Suche nach solchen molekularen Markern wurden deshalb in der vorliegenden Arbeit die Transkriptspiegel von *ESPL1* und erstmals von *PTTG1* und *PTTG1IP* im peripheren Blut von CML-Patienten gemessen. Aus vorselektierten cDNA-Proben von Patienten vorangegangener CML Studien wurden 97 Patienten ausgewählt, für welche umfangreiche klinische Daten sowie Verlaufsdaten vorlagen. Die Patienten wurden entsprechend ihrem Ansprechverhalten auf die TKI-Therapie nach dem 12-Monatskriterium ($\leq 0,10\%$ *Log level BCR-ABL1* IS, MMR) in zwei Kohorten eingeteilt. Insgesamt liegen für 97 CML-Patienten und 51 gesunde Kontrollpersonen Genexpressionsdaten und klinische Parameter vom Beginn der Erkrankung sowie Verlaufsdaten vor.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Quantifizierung der Transkripte der Gene *ESPL1*, *PTTG1* und *PTTG1IP* zu Beginn einer CML-Erkrankung als molekularer Prognosemarker eine individualisierte Vorhersage des Ansprechverhaltens von Patienten unter TKI-Therapie ermöglicht. Basierend auf den $\Delta\text{-C}_t$ -Werten jedes Patienten wurde eine 3-D-Kugel entworfen, welche es ermöglicht, das Ansprechverhalten eines Patienten anhand seines Abstandes zum Zentrum der Kugel vorherzusagen. Je größer der Abstand einer Probe vom Zentrum, umso eher kann ein schlechtes Ansprechen auf die Therapie prognostiziert werden. So kann ab einem Abstand von 5,92 mit einer Wahrscheinlichkeit von 75,00 % ein schlechtes Ansprechen auf die TKI-Therapie prognostiziert werden. Dies trifft für etwa 9,80 % ($n = 5$) der hier analysierten *Non-Responder* zu.

Nach den vorliegenden Messungen werden die Gene *ESPL1* und *PTTG1* bei CML-Patienten signifikant überexprimiert (= kleinere $\Delta\text{-C}_t$ -Werte). *PTTG1IP* wurde nicht signifikant hochreguliert. Die Transkriptspiegel zeigten entgegen den Erwartungen keinen Unterschied zwischen den Kohorten. Es konnte jedoch erstmals nachgewiesen werden, dass eine niedrigere *ESPL1*-Expression mit einem schnelleren Ansprechen der CML-Patienten auf ihre TKI-Therapie korreliert. Des Weiteren konnten für die Kohorte der *Responder* Korrelationen zwischen der Zeit bis zum Erreichen von MMR und den Genexpressionen der Gene *PTTG1* und *PTTG1IP* gezeigt werden. Diese Ergebnisse liefern einen tieferen Einblick in das Zusammenspiel der drei Gene. So konnte anhand einer Korrelationsanalyse die bereits durch vorherige Studien bekannte enge Verknüpfung zwischen *ESPL1* und *PTTG1* sowie *PTTG1* und *PTTG1IP* bekräftigt werden. Es konnte bestätigt werden, dass *Non-Responder* initial höhere Leukozytenzahlen vorweisen und diese sowie der *BCR-ABL1*-Quotient bei CML-Patienten mit einem langsameren Ansprechen auf die Therapie korrelieren. Dies ist biologisch plausibel, da eine initiale Leukozytose für eine hohe Tumorzelllast aus *BCR-ABL1* positiven Tumorzellen spricht, welche durch die TKI-Therapie eliminiert werden muss.

In dieser Arbeit wurden insgesamt 148 Proben untersucht, von denen 97 von CML-Patienten aus CML-Studien stammen. Da eine Therapie mit TKI einen möglichen Einfluss auf die Expression der Gene nehmen kann, wurden nur solche cDNA-Proben ausgewählt, welche vom Zeitpunkt vor Beginn der Therapie datiert sind. Aufgrund nicht ausreichender Menge oder Qualität der Proben von sechs Patienten wurden für diese solche Proben ausgewählt, welche vom Zeitpunkt vor Wiederbeginn der Therapie nach einer Therapiepause von mindestens drei Monaten entstammen. Somit besteht die Möglichkeit, dass Effekte auf die Genexpressionen dieser Proben sichtbar sind, welche keinen pathogenen Ursprung haben, sondern durch die vorherige TKI-Therapie verursacht wurden. Da das TKI IM in Tumorzelllinien bislang reduktive Effekte auf die Proteinexpression der Separase und des Securins zeigte,¹³⁸ ist anzunehmen, dass solche Effekte, wenn überhaupt, die Expressionen dieser Patienten eher vermindert haben.

Die Einteilung der 97 CML-Patienten in die Kohorten nach ihrem Ansprechen auf die TKI-Therapie erfolgte nach dem 12-Monatskriterium.²⁹ Hierbei galt ein Patient als *Responder*, wenn er innerhalb von 12 Monaten nach Therapiebeginn mit TKI MMR (= 0,10 % *Log level BCR-ABL1* IS) zeigte. Dies ist in den Leitlinien als Meilenstein einer optimalen TKI-Therapie definiert.³⁷ Das 12-Monatskriterium ermöglichte eine grundlegende Unterscheidung zwischen den Patienten, wurde allerdings der Komplexität des individuellen Ansprechens nicht gerecht. Da ein Patient trotz Erreichen von MMR innerhalb der ersten 12 Monate dieses auch wieder verlieren konnte, wurde für die Zuordnung auch das generelle Verhalten unter der Therapie berücksichtigt. Im klinischen Alltag erlaubt die *BCR-ABL1*-Messung nach 3, 6 und 12 Monaten mit ihren jeweiligen Quotienten-Meilensteinen eine differenziertere Betrachtung des Therapieansprechens. Ergänzende zytogenetische Untersuchungen hätten weiteren Aufschluss über mögliche Resistenzen und deren Ursachen wie ACA geliefert und somit eine präzisere Zuordnung in die Kohorten ermöglicht. Die Bezugnahme der hämatologischen Remission hätte darüber hinaus eine klinisch exaktere Differenzierung des Ansprechens erlaubt. Der *BCR-ABL1*-Quotient dient jedoch als primäres Maß für die Beurteilung des Therapieverlaufs und das Erreichen von MMR ermöglicht eine Vorhersage des CML-spezifischen Überlebens von nahezu 100%.²⁹ Ein Erreichen von MMR innerhalb der ersten 12 Monate geht mit einem längeren Progressionsfreien Überleben, Gesamtüberleben sowie einem längeren Erhalt von CCgR als ein Quotient von > 1,00 % einher, bietet jedoch keinen Überlebensvorteil gegenüber dem CCgR nach 12 Monaten. So wird aktuell CCgR als primärer Endpunkt der TKI-Therapie definiert und ein Therapiewechsel bei Patienten mit CCgR, aber ohne MMR nach 12 Monaten nicht empfohlen.^{29, 189} Ein Therapiewechsel wäre nach der CML-IV Studie sogar schon nach 6 Monaten bei *BCR-ABL1* Transkripten < 1,00 % indiziert.¹⁸⁹ So wäre es denkbar, dass die Unterscheidung des Ansprechens anhand des CCgRs nach 12 Monaten in folgenden Untersuchungen einen prognostisch signifikanteren Wert hat.

Zur Beantwortung der Frage, ob die Transkriptspiegel der Gene *ESPL1*, *PTTG1* und *PTTG1IP* als molekularer Marker für das Ansprechverhalten bei CML-Patienten unter TKI-Therapie dienen können, wurden im ersten Schritt die relativen Genexpressionen der drei Gene mithilfe der qRT-PCR sowohl in gesunden Kontrollproben als auch in *Non-Respondern* und *Respondern* aus Proben zum Zeitpunkt der Diagnose bestimmt. Die hierbei untersuchte kryokonservierte cDNA entstammte bei den Kontrollproben aus Leukozyten des peripheren Bluts und bei den CML-Patienten sowohl dem peripheren Blut als auch dem KM. Die Untersuchung und Verwendung beider Medien ist nach den aktuellen ELN-Richtlinien aus 2020 in der Verlaufskontrolle der CML als gleichwertig anzusehen.²⁹ Die Verwendung der qRT-PCR für die

Genexpressionsanalysen erlaubt eine Messung der PCR-Amplifikation in Echtzeit. Hierbei erfolgt die Messung der Genexpression im Gegensatz zur herkömmlichen PCR quantitativ, indem die Daten während der Phase exponentiellen Wachstums der PCR erfasst werden. Eine herkömmliche PCR misst hingegen erst auf dem Plateau, was durch Variationen der Reaktionskinetik zu unpräziseren Ergebnissen führt. Darüber hinaus erlaubt die qRT-PCR eine sofortige Interpretation der Ergebnisse, da eine Erhöhung des Fluoreszenzsignals direkt proportional zur Anzahl der erzeugten Amplikone ist.¹⁹⁰

Für das Erreichen von MMR konnte für alle CML-Proben ein Quotient nach IS ermittelt werden. Für die untersuchten Proben, welche vom Diagnosezeitpunkt stammen, konnte jedoch nur für 37 (38,00 %) der Patienten ein Quotient nach IS zur weiteren Berechnung verwendet werden. Die Definition des IS wurde erstmals 2015 von Cross und Kollegen publiziert. Da die Angleichung mittels CF nur für Proben mit einem *BCR-ABL1*-Quotienten $\leq 10,00$ % definiert ist, gibt es für Proben mit einem Quotienten $> 10,00$ % definitionsgemäß keinen IS.¹⁰⁶ Anhand des hohen *BCR-ABL1*-Quotienten ist eine derart große Tumorlast anzunehmen, dass eine Unterscheidung zwischen dem Laborquotienten und dem CF-berichtigten Quotienten (aktueller CF = 1,147) keine klinische Konsequenz hätte. Demnach ist es legitim, für die Statistik bei solchen Patienten den Laborquotienten zugrunde zu legen.^{191, 192} In Tabelle 18 wird ersichtlich, dass alle 60 Patienten, für die kein *BCR-ABL1*-Quotient nach IS ermittelt werden konnte, einen initialen *BCR-ABL1*-Quotienten $> 10,00$ % vorwiesen.

Die hier vorgenommenen Auswertungen der klinischen Angaben aus der Datenbank wies gewisse Limitationen auf. Erstens erfolgten die Analysen retrospektiv und für einzelne Patienten waren die Angaben unvollständig oder das Material von schlechter Qualität, weshalb auf Daten aus nächstverfügbaren Proben zurückgegriffen werden musste.

Zur Testung einer Korrelation wurde überwiegend der Pearson-Korrelationskoeffizient berechnet. Für eine Überprüfung der Assoziation zwischen „Zeit bis MMR“ und einer anderen Variablen wurde jedoch die Spearman-Korrelation genutzt, da für „Zeit bis MMR“ keine Normalverteilung angenommen werden kann. Die Spearman-Korrelation betrachtet im Gegensatz zum Pearson-Korrelationskoeffizienten die nach Rang geordneten Werte für die einzelnen Variablen anstelle der Rohdaten. Die Anwendung der Spearman-Korrelation war auch insofern sinnvoll, als dass die hohe Anzahl an Ausreißern die Korrelation bei Betrachtung des Pearson-Koeffizienten eventuell verfälscht hätte.

Für die Berechnung, ob die Genexpression von *ESPL1* oder aber der Abstand als Prädiktor für das Ansprechen eines CML-Patienten auf seine TKI-Therapie dienen können, wurde mithilfe einer logistischen Regression eine Gleichung basierend auf dem Hypothesentest zur Korrelation und Regression erstellt. Die logistische Regression bietet im Gegensatz zu Klassifikationsmodellen den Vorteil, Wahrscheinlichkeiten zu berechnen. Darüber hinaus gibt sie nicht nur Aufschluss darüber, wie relevant ein Prädiktor ist, sondern auch, ob seine Assoziationsrichtung positiv oder negativ ist. Es ist jedoch anzumerken, dass die Erfassung komplexerer Beziehungen limitiert ist.¹⁸⁷

4.1 *ESPL1*, *PTTG1* und *PTTG1IP* als molekulare Marker

Um die Transkriptspiegel der Gene *ESPL1*, *PTTG1* und *PTTG1IP* analysieren zu können, mussten zunächst die qRT-PCR Nachweissysteme etabliert werden. Da die Expressionsspiegel der Gene *PTTG1* und *PTTG1IP* zum Zeitpunkt der Experimente noch nie in Leukozyten des peripheren Blutes oder KMs von CML-Patienten

untersucht wurden, erfolgten die Messungen vorab an humanen leukämischen Zelllinien. In allen fünf untersuchten Zelllinien konnte für alle drei Gene eine Überexpression im Vergleich zu einer gesunden Kontrollprobe nachgewiesen werden. Die gemessenen Überexpressionen der Gene bestätigen bisherige Ergebnisse zur gesteigerten Expression der Separase und des Securins in leukämischen Zelllinien und erweitern sie darüber hinaus um Kenntnisse über die Genexpressionen von *ESPL1*, *PTTG1* und *PTTG1IP*.^{138, 193} Im Anschluss erfolgten mittels Gelelektrophorese der Probennachweis und hiermit die Validierung der in den folgenden Experimenten verwendeten Primerpaare.

Zur Beantwortung der Frage, ob die Transkriptspiegel der Gene *ESPL1*, *PTTG1* und *PTTG1IP* als molekularer Marker für das Ansprechverhalten bei CML-Patienten unter TKI-Therapie dienen können, wurden im ersten Schritt die relativen Genexpressionen der drei Gene mithilfe der qRT-PCR sowohl in gesunden Kontrollproben als auch in *Non-Respondern* und *Respondern* aus Proben zum Zeitpunkt der Diagnose bestimmt. Die Kohorten der CML-Patienten zeigten im Vergleich zu den gesunden Kontrollen eine signifikante Hochregulierung der Gene *ESPL1* und *PTTG1*. Zwischen den Expressionen der *Non-Responder* und *Responder* wurde kein deutlicher Unterschied festgestellt. Auffällig an den Transkriptspiegeln war, dass die Genexpressionen der *Non-Responder* aller drei Gene eine größere Streuung zeigten und beispielsweise für *PTTG1* und *PTTG1IP* doppelt so hohe Standardabweichungen aufwiesen. Dies impliziert, dass die Genexpressionen der *Non-Responder* sich deutlich stärker voneinander unterscheiden und weniger homogen verteilt sind als die Expressionen der *Responder*.

Die Cysteinprotease Separase spielt eine entscheidende Rolle bei der Trennung der Schwesterchromatiden und Zentriolen. Von verschiedenen Modellsystemen und Tumoranalysen ist bekannt, dass eine aberrante Expression oder außerplanmäßige Aktivierung der Separase zu ZAs und Chromosomenfehlverteilungen führt und mit Aneuploidie und Karzinogenese assoziiert ist.^{135, 194, 195} Ergebnisse zahlreicher Studien konnten das onkogene Potential der Separase bei der Entstehung einiger solider Tumorarten bereits bestätigen.^{135, 136, 139, 140} Bislang ist über die Genexpression von *ESPL1* in hämatologischen Neoplasien nur wenig bekannt und die Überexpression wurde zumeist durch immunhistochemische Färbung in Geweben bestimmt. Kürzlich konnte nachgewiesen werden, dass der Krankheitsprogress bei CML-Patienten mit der *BCR-ABL1*-Bruchpunktvariante e14a2 mit einer erhöhten Aktivität der Cysteinprotease *ESPL1*/Separase korreliert. Alles deutet auf eine aberrante Expression oder eine posttranslationale Dysregulation der Separase hin.¹⁷⁵ Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die Genexpression von *ESPL1* in CML-Patientenproben zum Zeitpunkt der Diagnose gemessen und das Zusammenspiel ihrer Expression mit verschiedenen Regulatoren untersucht.

Entsprechend den Erwartungen ergaben die durchgeführten Messungen der Transkriptspiegel eine höchst signifikante Überexpression von *ESPL1*/Separase für beide Kohorten der CML-Patienten im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe. Insbesondere das Transkriptom der Leukozyten der *Non-Responder* wies eine deutliche Hochregulierung um den Faktor 7 mit einer relativen Genexpression von 4,53 von *ESPL1* auf. Für die *Responder* konnte eine etwas geringere Überexprimierung nachgewiesen werden. Die relativen Genexpressionen der *Non-Responder* und *Responder* unterschieden sich hierbei nicht signifikant voneinander. Diese Ergebnisse können mit einer fast dreifach so großen Stichprobe die Beobachtungen von Šmahelová und Kollegen aus 2016 bestätigen, welche eine Überexpression von *ESPL1* bei CML-Patienten zum Diagnosezeitpunkt nachweisen konnten. Analog zu den vorliegenden Ergebnissen wurde *ESPL1* bei *Non-Respondern* stärker als in

Respondern überexprimiert, wobei der Unterschied in der Überexpression nicht signifikant war.¹⁹⁶ Um zu berechnen, wie hoch die Wahrscheinlichkeit einer Probe in Abhängigkeit der Höhe des *ESPL1*-Wertes ist, einem *Non-Responder* zu entstammen, wurde eine logistische Regression durchgeführt. Entgegen der Hypothese eignet sich die relative Genexpression von *ESPL1* nicht als Prädiktor für das Ansprechen eines CML-Patienten auf seine TKI-Therapie. Diese Erkenntnis steht im Einklang mit den bisherigen erfolglosen Bemühungen, mittels Genexpressionsanalysen prognostische Marker zu finden.¹⁹⁷ Die Auswertungen der Transkriptspiegel legen nahe, dass die Expression eines einzelnen Gens keinen ausreichend prognostischen Wert zu haben scheint.

Die Hypothese, dass die erhöhte Separaseaktivität bei CML-Patienten einer aberranten Expression zugrunde liegen könnte, konnte mit den gemessenen Transkriptspiegeln untermauert werden.¹⁷⁵ Eine Erklärung hierfür bietet die Funktion der Separase als Protein der Zellteilung: In gesunden Zellen liegt die Separase zumeist inaktiv oder mit nur geringer Aktivität vor, da sie für die größte Zeit des Zellzyklus durch die Bindung vom Hilfsprotein Securin inhibiert wird.¹⁶¹ In gesundem, wenig proliferierendem Gewebe liegt ihre Expression teilweise unterhalb der Nachweisgrenze verfügbarer Antikörper.¹³⁵ In soliden Tumoren wird *ESPL1*, so wie das Protein Separase, stark exprimiert. Solide Tumore zeichnen sich durch eine starke Proliferation oder Zellteilung aus. Für diese Zellteilung erfolgt die Aktivierung der Separase zu Beginn der Anaphase über die Spaltung des Securins durch den APC/C.¹⁶² Nachfolgend kommt die Separase bei der Trennung der Schwesterchromatiden zum Einsatz, indem sie Cohesin spaltet. Die Überexpression der Separase verschafft dem Tumorgewebe gegenüber dem gesunden Gewebe einen deutlichen Wachstumsvorteil.¹⁴⁰ Als myeloproliferative Erkrankung ist die CML ebenso durch eine ausgeprägte Zellteilung einer myeloischen Stammzelle charakterisiert. Basierend auf dieser Herleitung und der in dieser Arbeit beobachteten Überexpression von *ESPL1* in Zellen von CML-Patienten ist anzunehmen, dass es bei CML-Patienten infolge einer Entkopplung zu einer Hochregulierung der Genexpression von *ESPL1* kommt, wodurch die gesteigerte Proliferation der Blutzellen erreicht wird. Hierdurch könnte die erhöhte Aktivität der Separase erklärt werden, welche in CML-Zellen über eine verfrühte Spaltung des Cohesins zu einer fehlerhaften, unzeitgemäßen Chromatid- und Zentriolentrennung führt. Diese wiederum resultieren in Aneuploidie, welche eine der Hauptursachen für die Entartung der Zellen darstellt.¹⁹⁴

In intakten Zellen unterliegt die Aktivität der Separase einer strengen zellzyklusabhängigen Kontrolle durch verschiedene Regelkreise und „*check points*“. Der wichtigste Mechanismus zur Verhinderung einer unerwünschten vorzeitigen Aktivierung stellt hierbei die stöchiometrische Bindung von Securin dar. Securin ist somit ein intrazellulärer Regulator der Separase¹⁴¹ und benötigt darüber hinaus für den posttranslationalen Transport in den Nukleus das Hilfsprotein *PTTG1IP*.¹⁴² Die vorliegenden Messungen zeigen, dass das Hilfsprotein Securin in Zellen von CML-Patienten überexprimiert wird. Es konnte nach aktuellem Kenntnisstand erstmals belegt werden, dass die Transkriptspiegel von *PTTG1* bei CML-Patienten signifikant höher als in Zellen gesunder Kontrollen ausfallen. So konnte für *PTTG1* in der Kohorte der *Non-Responder* eine Überexpression um den Faktor 6,54 mit einer relativen Genexpression (= Δ -C_t-Wert) von 3,41 gemessen werden. Zellen der *Responder* exprimierten *PTTG1* mit einer relativen Genexpression von 3,42 um den Faktor 3 ähnlich hoch. Die niedrigeren Expressionsspiegel in gesunden Kontrollen decken sich damit, dass die Proteinspiegel von *PTTG1* in gesundem Gewebe überwiegend gering ausfallen.¹⁹⁸

Je stärker *ESPL1* in Zellen von CML-Patienten exprimiert wird, desto höher fallen auch die Transkriptspiegel von *PTTG1* aus. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die relativen Genexpressionen von *ESPL1* und *PTTG1* im Gegensatz zu gesunden Zellen in den Kohorten der CML-Patienten höchst signifikant miteinander korrelieren. Damit können die Ergebnisse der Untersuchung von Yu und Kollegen aus 2021 auch für die CML nachvollzogen werden, im Rahmen derer eine erhöhte transkriptionelle Synchronität der beiden Gene bei Nierenzellkarzinom-Patienten nachgewiesen werden konnte. Dass diese Synchronität insbesondere bei Patienten mit schlechter Prognose zunahm, kann anhand der vorliegenden Daten nicht bestätigt werden, auch wenn die Gene in Zellen der *Non-Responder* marginal stärker miteinander zu korrelieren scheinen.¹⁹⁹ Dass ein solcher Zusammenhang in Zellen gesunder Kontrollen nicht nachweisbar ist, untermauert die selektive Funktion und verstärkte Expression der Separase und des Securins in der Teilungsphase. In Tumorzellen, welche stark proliferieren, werden beide Gene augenscheinlich verstärkt exprimiert, da beide Proteine für die Zellteilung benötigt werden. Gesunde, wenig proliferierende Zellen scheinen beide Gene hingegen kaum zu exprimieren, weshalb kein Zusammenspiel nachweisbar oder erforderlich ist.

Bislang war unklar, wie und ob die Separase und das Securin auf transkriptioneller Ebene zusammenspielen. Gemäß den vorliegenden Ergebnissen werden *ESPL1* und *PTTG1* in Zellen von CML-Patienten überexprimiert und ihre Transkriptspiegel korrelieren stark ($p < 0,001$, $r = 0,56$) miteinander. Dieses Ergebnis belegt erwartungsgemäß die enge funktionale Verknüpfung zwischen den beiden Genen, da Securin ein Regulatorprotein der Separase ist.¹⁴¹ Eine mögliche Ursache könnte in einer kompensatorischen Hochregulierung von *PTTG1* aufgrund der aberranten Expression von *ESPL1* liegen. Wenn die Genexpression von *ESPL1* entkoppelt wird, könnte *PTTG1* am Übergang von Meta- zu Anaphase ausgleichend verstärkt exprimiert werden, um die außerplanmäßige Aktivierung der Separase zu inhibieren und einer vorzeitigen Trennung der Schwesterchromatiden vorzubeugen. Des Weiteren konnte durch forcierte Überexpression in humanen Fibroblasten bereits demonstriert werden, dass *PTTG1* in frühen Stadien als *Fail-Safe*-Mechanismus die Tumorprogression verlangsamt. Hierbei induziert die erhöhte *PTTG1*-Expression eine p53-abhängige Alterung und hemmt die weitere Proliferation dieser Zellen.²⁰⁰ Indessen konnte durch diverse Studien nachgewiesen werden, dass eine Überexpression von *PTTG1* ebenso zu Fehlsegregation der Chromosomen und somit genomischer Instabilität führen kann und in verschiedenen Krebsarten nachweisbar ist.^{169, 201} Neben der fehlerhaften Inhibition der Separase fördert *PTTG1* die Tumorentstehung auch über Störung der durch p53 regulierten Apoptose, der DNA-Reparatur mittels Interaktion mit dem Ku-Protein und induziert Angiogenese.^{173, 174, 202, 203} Wie auch für andere Onkogene geltend, scheint *PTTG1* eine duale Rolle in der Tumorentstehung einzunehmen: Zunächst schützt es die Zellen vor Transformation und treibt in späteren Tumorstadien die Tumorprogression voran.^{200, 204} Die in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse legen nahe, dass Separase und Securin schon auf genetischer Ebene eng miteinander verknüpft sind und bestätigen im weiteren Sinne damit die bekannte Rolle von Securin als Regulatorprotein. Das kausale Zusammenspiel der beiden Gene in der Entstehung der CML bleibt dennoch unbekannt und könnte in künftigen Untersuchungen der transkriptionellen Verknüpfungen beispielsweise über das 2021 veröffentlichte Verfahren der Correlation by Individual Level Product (CLIP) nach Yu und Kollegen auch für die CML näher untersucht werden.¹⁹⁹

PTTG1IP spielt als Hilfsprotein eine entscheidende Rolle bei der Segregation der Schwesterchromatiden, indem es Securin beim posttranslationalen Transport in den

Nukleus unterstützt.¹⁷⁶ Darüber hinaus scheint eine Überexpression von *PTTG1IP* direkt mit der Entstehung, Progression sowie schlechterem *Outcome* von Tumorerkrankungen wie beispielsweise Brustkrebs oder Hypophysentumoren assoziiert zu sein.^{183, 184} Entgegen der Erwartungen konnte kein genereller Unterschied zwischen den Transkriptspiegeln von *PTTG1IP* gesunder Kontrollen sowie CML-Patienten nachgewiesen werden. Dennoch zeigten sowohl Zellen der *Non-Responder* als auch der *Responder* eine vierfache Hochregulierung von *PTTG1IP* mit einer relativen Genexpression (= Δ -Ct-Wert) von 2,87 beziehungsweise 2,38. Eine mögliche Erklärung für die ähnliche Expression zwischen CML-Patienten und gesunden Kontrollproben könnte die Tatsache sein, dass *PTTG1IP* auch in gesundem Gewebe ubiquitär exprimiert wird.¹⁷⁶ Darüber hinaus wurde seit seiner Entdeckung die Expression von *PTTG1IP* in gesundem Gewebe kaum untersucht. Künftige Studien sollten mittels eines größeren Patientenkollektivums das genaue Verhältnis der Expression analysieren.

Der genaue Wirkdualismus zwischen *PTTG1* und *PTTG1IP* war bislang weitgehend ungeklärt. In der vorliegenden Arbeit konnte eine starke, positive Korrelation ($p < 0,001$, $r = 0,42$) zwischen den relativen Genexpressionen der beiden Gene in Zellen von CML-Patienten festgestellt werden. Bei näherer Betrachtung der Kohorten zeigte sich, dass insbesondere in Zellen der *Non-Responder* ein höherer *PTTG1*-Transkriptspiegel mit einer höheren Expression von *PTTG1IP* korreliert. Während Chien und Kollegen im Jahr 2000 bereits nachweisen konnten, dass das *PTTG1 Interacting Protein* über direkte Interaktion Securin beim Transport in den Nukleus unterstützt¹⁷⁶, legen diese Ergebnisse auch eine enge Verknüpfung auf genetischer Ebene nahe. Anzunehmen ist, dass bei höherer Exprimierung von *PTTG1* und gesteigerter Bildung von Securin vermehrt *PTTG1 Interacting Protein* für den Transport in den Nukleus benötigt wird, weshalb auch *PTTG1IP* stärker exprimiert wird. Ungeklärt bleibt, weshalb dieser Zusammenhang insbesondere in der Kohorte der *Non-Responder* zu beobachten war. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass sowohl für Patienten mit einer Überexpression von *PTTG1* als auch mit einer Überexpression von *PTTG1IP* in verschiedenen Krebsarten eine schlechtere Prognose beobachtet werden konnte.^{168, 180} Diese Vermutung könnte in Verbindung mit der simultanen Betrachtung von Risikoscores wie dem ELTS-Score in zukünftigen Untersuchungen Aufschluss über den prognostischen Wert des Zusammenspiels der beiden Gene liefern.

Zwischen den Transkriptspiegeln von *ESPL1* und *PTTG1IP* konnte bei Betrachtung der Gesamtgruppe der CML-Patienten kein Zusammenhang nachgewiesen werden ($p = 0,165$, $r = 0,12$). Diese Beobachtung ist insofern schlüssig, als dass bislang keine direkte funktionale Verknüpfung zwischen der Separase und dem *PTTG1 Interacting Protein* bekannt ist.

Die Hypothese, dass die Transkriptspiegel der Gene *ESPL1*, *PTTG1* und *PTTG1IP* mit dem Zeitraum, in welchem ein Patient MMR erreicht, korrelieren, wurde insbesondere durch die Analyse der *Responder* bestätigt. So korrelierten die Genexpressionen aller drei Gene mit der „Zeit bis MMR“.

Es konnte nach aktuellem Kenntnisstand erstmals gezeigt werden, dass eine niedrigere Genexpression von *ESPL1* und *PTTG1* bei Erstdiagnose (= hohe Δ -Ct-Werte) insbesondere bei den *Respondern* mit einer kürzeren Zeit bis zur Erreichung von MMR und somit mit einem besseren Ansprechen auf die TKI-Therapie korreliert. Nach derzeitigem Kenntnisstand ist dies der erste Bericht dieses Zusammenhangs bei CML-Patienten. Die Auswertung der gemessenen Transkriptspiegel von *ESPL1* aller untersuchten CML-Patienten lieferte eine sehr signifikante und schwach negative Korrelation mit der „Zeit bis MMR“. Bei näherer Betrachtung der *Responder* konnte

sowohl für *ESPL1* als auch für *PTTG1* ein deutlich negativer Zusammenhang nachgewiesen werden. Für *PTTG1* zeichnete sich in der Gesamtgruppe eine negative Tendenz ab.

Für die Kohorte der *Non-Responder* konnte wider unsere Hypothese keine aussagekräftigen Korrelationen festgestellt werden. Eine mögliche Ursache für dieses Ergebnis könnte die starke Streuung der Daten der *Non-Responder* (Zeit bis zur Erreichung von MMR) darstellen. Dementsprechend unterschieden sich die Kohorten hinsichtlich ihrer Korrelation für *ESPL1* deutlich. Die fehlende Korrelation zwischen *PTTG1* und der „Zeit bis MMR“ in der Gesamtgruppe könnte mit dem fehlenden signifikanten Unterschied der Korrelation zwischen den beiden Kohorten erklärt werden. Zukünftige Untersuchungen mit größeren Stichproben oder einer strengeren Einteilung für das Therapieansprechen sollten aussagekräftigere Ergebnisse zutage bringen.

Die Ergebnisse legen nahe, dass ein niedrigerer *ESPL1*-Transkriptspiegel mit einem schnelleren Ansprechen von CML-Patienten und niedrigere *ESPL1*- sowie *PTTG1*-Transkriptspiegel mit einem schnelleren Ansprechen von *Respondern* auf ihre TKI-Therapie korrelieren. Diese Ergebnisse stimmen mit früheren Beobachtungen überein, welche für die meisten Tumorarten eine Überexpression der Separase mit einer ungünstigeren Tumorklassifikation in Verbindung brachten.^{136, 139} Auch für *PTTG1* konnte bislang, entsprechend unserer Beobachtung, ein Zusammenhang zwischen einer Überexpression und einer schlechteren Prognose beispielsweise beim Multiplen Myelom gefunden werden.¹⁴¹

Unsere Ergebnisse sind nicht für die fünf vorhersehbaren *Non-Responder* gültig, bei welchen eine inverse Korrelation festgestellt wurde (Tabelle 18). Hier zeigten die fünf Ausreißer im Vergleich zu den schnellsten sechs *Respondern* niedrigere Transkriptspiegel von *ESPL1* und *PTTG1* (= höhere Δ -Ct-Werte). Allerdings sind die Leukozytenzahlen (Tendenz) sowie der *BCR-ABL1*-Quotient im Einklang mit dem jeweiligen Datensatz der Kohorten der *Responder* und *Non-Responder*. Es ist unklar, inwieweit molekulare Mechanismen oder genetische Veränderungen, wie eine genetische Prädisposition, für das unerwartete Genexpressionsschema der fünf Ausreißer verantwortlich sind, welches offenkundig auch als prädiktiver Marker für das Erreichen von MMR dienen kann. Mögliche Erklärungen werden in früheren Studien angeboten, die von einer Korrelation zwischen der Herunterregulation von Separase, Polyploidie und der Entwicklung verschiedener Krebsarten berichten.^{154, 205}

Entsprechend den vorliegenden Ergebnissen konnte beispielsweise eine geringere Progression des Adenokarzinoms des Magens bei Überexpression von *ESPL1* beobachtet werden.²⁰⁶ Basierend auf der kürzlichen Annahme, dass TKI eine Abnahme der *ESPL1*-Expression induzieren und hierdurch zu einem verzögerten Ansprechen auf die TKI-Therapie und hiernach zu einem schlechteren Krankheitsverlauf führen können,¹³⁸ wäre auch ein Kompensationsmechanismus denkbar, welcher die proteolytische Aktivität von Separase in *Non-Respondern* erhöht. Weiterhin könnte eine entsprechende Unterexpression der Separase die Segregation von Schwesterchromatiden verhindern, was wiederum zu einer Acetylierung von *Structural Maintenance of Chromosomes Protein 3* (SMC3) und einem Versagen bei der Blockierung des Zellzyklus während der Replikation führt.²⁰⁷ Die daraus resultierenden fehlerhaften Replikationsrunden würden mit den höheren Leukozytenzahlen und erhöhten *BCR-ABL1*-Quotienten bei den vorhersehbaren *Non-Respondern* übereinstimmen.

Eine wichtige Auffälligkeit der fünf Ausreißer ist, dass zwei der betrachteten Ausreißer niemals MMR und zwei weitere niemals etwas besseres als MMR erreichten. Dies könnte auf einen Unwillen ihres leukämischen Stammzellklons hindeuten, auf die TKI-

Therapie anzusprechen. Ein Persistieren von LSCs, welche nicht auf die TKI-Therapie ansprechen,¹¹⁸ scheint BCR-ABL1-Kinase unabhängig zu sein.¹¹⁹ Erklärt werden kann dies dadurch, dass TKIs nur das Onkoprotein BCR-ABL1 inaktivieren, jedoch das Onkogen selbst unangetastet bleibt.²⁰⁸ Mögliche Mechanismen, über welche die TKI-Resistenz der Stammzellklone orchestriert wird, werden oftmals epigenetisch aktiviert und erstrecken sich von JAK/STAT, p53 sowie Interaktionen mit der KM-Nische über weitere mögliche Signalwege.^{209, 210} Bislang ist unklar, ob die LSC-Resistenz durch akquirierte Mechanismen während der Therapie oder bereits bestehende Defekte der Mutterstammzelle entsteht. Bekannt ist, dass eine Persistenz dieser LSCs in CML-Patienten zu einer Resistenz der TKI-Therapie und einem erhöhten Risiko der Tumorrekurrenz nach einem Absetzversuch führen kann.^{120, 211, 212} Für die durch das in dieser Arbeit vorgestellte Verfahren identifizierten Patienten würde dies bedeuten, dass eventuell schon bei Diagnosestellung eine Kombination aus TKIs und Therapeutika, welche die alternativen LSC-Signalwege inhibieren, angewendet werden könnte.^{212, 213}

Für die gesamte Kohorte der *Responder* korrelieren unsere Daten hohe *PTTG1IP*-Expressionsniveaus (wie durch niedrige Δ -Ct-Werte angegeben) mit einer schnellen Reaktion auf die TKI-Therapie. Dies stimmt mit den *PTTG1IP*-Expressionsdaten der fünf vorhersehbaren *Non-Responder* überein, welche signifikant geringere Transkriptniveaus als die schnellsten *Responder* aufwiesen (Tabelle 18). Diese Ergebnisse sind mit den Beobachtungen von Repo und Kollegen aus 2017 vereinbar. Brustkrebspatienten mit einer Unterexpression von *PTTG1IP* sowie einer höheren Expression von Securin zeigten hierbei ein höheres Risiko für eine aggressivere Progression.¹⁴² Mechanistisch könnte für diese inverse Beziehung sowie den schlechteren Verlauf die fehlende Nuklearisierung des Securins sein ursächlich sein,^{176, 214} was zu aberrant hohen Securin-Niveaus im Zytoplasma und einem Mangel an ordnungsgemäßer Separase-Kontrolle führt.¹⁴² Die daraus resultierende unkontrollierte proteolytische Aktivität von Separase und außerplanmäßige Replikationsrunden würde mit den höheren Leukozytenzahlen und erhöhten *BCR-ABL1*-Quotienten übereinstimmen, welche bei Kohorte der *Non-Responder* beobachtet wurden.

Zukünftige Studien sollten zur Untersuchung dieses Zusammenspiels in CML-Patienten eine parallele Auswertung der Genexpression sowie der Proteinaktivität mittels quantitativen Aktivitätsassays und Spektrofluorometrie anstreben.^{137, 215}

4.2 Der 3D-Abstand als prädiktiver molekularer Marker

Die Streuung der Transkriptspiegel aller drei Gene legte nahe, dass die relativen Genexpressionen der *Non-Responder* im Vergleich zu denen der *Responder* weniger homogen verteilt sind. Da für jeden Patienten drei Δ -Ct-Werte (*ESPL1*, *PTTG1* und *PTTG1IP*) vorliegen, ist es naheliegend, diese für die Erstellung eines 3-D-Plots einzusetzen. Basierend auf den Mittelwerten der Expressionsdaten der drei Gene wurden räumliche Distanzen berechnet. Hierdurch konnte ein Cluster von Patienten identifiziert werden, welches prädiktorische oder funktionale Rückschlüsse zulässt. Des Weiteren verdeutlicht eine solche räumliche Darstellung den Unterschied der Kohorten in der Überexpression der Gene und der Verteilung der Expressionen. Die Expression der drei Gene in Zellen der *Non-Responder* und *Responder* unterscheidet sich in der Gesamtbetrachtung deutlich. Belege für diesen Unterschied liefern insbesondere zwei der vorliegenden Ergebnisse: Zum einen waren die *Non-Responder* mit durchschnittlich 2,98 signifikant weiter vom Zentrum entfernt als die

Responder mit 2,23. Darüber hinaus spricht die deutlich stärkere Streuung der *Non-Responder* für eine grundlegend andere Verteilung der Expressionsdaten. Die größeren Werte der Standardabweichung, des Variationskoeffizienten, des Maximalwerts und der Spannweite legen eine starke Streuung der Daten nahe. Entgegen unserer Hypothese konnte keine Korrelation zwischen dem Abstand und der Zeit bis zum Erreichen von MMR nachgewiesen werden.

Dass sich der Abstand als Prädiktor für das Ansprechen von CML-Patienten unter TKI-Therapie eignet, konnte mithilfe einer Gleichung basierend auf dem Hypothesentest zur Korrelation und Regression bewiesen werden. Diese Gleichung wurde mittels logistischer Regression erstellt und ermöglicht es in Abhängigkeit vom jeweiligen Abstand die Wahrscheinlichkeit zu berechnen, dass es sich bei der untersuchten Probe um einen *Non-Responder* handelt. Je größer der Abstand einer Probe vom Zentrum, umso eher kann ein schlechtes Ansprechen auf die Therapie prognostiziert werden. So beträgt die Wahrscheinlichkeit, dass es sich bei der untersuchten Probe um einen *Non-Responder* handelt, ab einem Abstand von 5,92 etwa 75,00 %, ab einem Abstand von 8 circa 90,00 % und ab einem Abstand von 10 bereits 95,00 %. Mit steigendem Abstand wird es wahrscheinlicher, einen *Non-Responder* prognostizieren zu können, da sich diese Wahrscheinlichkeit bei Zunahme des Abstandes um eine Einheit um 47,90 % erhöht.

Es bleibt jedoch fraglich, inwieweit dieses Verfahren in der allgemeinen Population von CML-Patienten anwendbar ist. So konnte in der Gesamtgruppe für fünf *Non-Responder* ein Abstand über 5,92 und damit eine initiale Identifikation ihres Therapieversagens erfolgen. Des Weiteren kann bei Patienten, deren Expressionen einen Abstand darunter ergeben, ein Ansprechen oder Versagen der Therapie nicht eindeutig zugeordnet werden. Nichtsdestotrotz geben erhöhte Abstandswerte auch bei diesen Patienten einen Hinweis, das Therapieansprechen genauestens zu beobachten und gegebenenfalls bei Nichterreichen einer frühen molekularen Remission nach 3 bis 6 Monaten das Therapeutikum zu wechseln.

Dieser Test ermöglicht es, das individuelle Ansprechverhalten eines Patienten bereits zum Zeitpunkt der Diagnose mithilfe der Expressionen der Gene *ESPL1*, *PTTG1* und *PTTG1IP* vorherzusagen. Ab einem Abstand von 5,92 kann man beinahe sicher sein, dass der Patient unzureichend auf seine TKI-Therapie ansprechen wird und eine individualisierte Therapie initiieren. Dies trifft in dieser Untersuchung immerhin auf 9,20 % ($n = 5$) der *Non-Responder* zu und wäre trotz der kleinen Zahl im klinischen Kontext ein Fortschritt für eine erfolgreiche Verbesserung der Patientenstratifikation. Für diese Patientengruppe kann mithilfe dieses Verfahrens ein großer Benefit geschaffen werden, da sie nun frühzeitig identifiziert werden können. Bei diesen Patienten muss nun nicht mehr 6 beziehungsweise 12 Monate abgewartet werden, um die Entwicklung der *BCR-ABL1*-Transkripte im Blut zu beobachten und das Therapeutikum ändern zu können. Für die klinische Praxis müsste für ein solches Testverfahren ein Schwellenwert festgelegt werden, ab welchem ein Patient als *Non-Responder* gilt. Der hier betrachtete Schwellenwert von 5 hätte eine Spezifität von 100,00 %. Es wäre somit äußerst unwahrscheinlich, dass ein *Responder* fälschlicherweise als *Non-Responder* eingestuft werden würde. Man würde jedoch nur etwa jeden zehnten *Non-Responder* als solchen identifizieren können. Ein geeigneterer Schwellenwert läge bei einem Abstand von 3, da man hierbei die maximale Summe aus Sensitivität und Spezifität erreichen würde. Mit diesem Schwellenwert könnte man etwa 37,26 % der Therapieversager bereits zum Diagnosezeitpunkt identifizieren, weniger als ein Fünftel der *Responder* würde irrtümlich als Therapieversager klassifiziert werden. In einer prospektiven,

kontrollierten und randomisierten Kontrollstudie könnte die Reliabilität des Abstandes überprüft werden.

4.3 Korrelation von klinischen Parametern mit dem Therapieansprechen

CML-Patienten mit schlechtem Ansprechen auf die Therapie besitzen initial höhere Leukozytenzahlen als Patienten mit gutem Ansprechen auf die Therapie. So wiesen die untersuchten *Non-Responder* zum Zeitpunkt der Diagnose mit mehr als doppelt so vielen Zellen eine signifikant höhere Leukozytenzahl als die *Responder* auf. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass eine erhöhte Leukozytenzahl zu Erkrankungsbeginn höchst signifikant mit einem langsameren Ansprechen von CML-Patienten auf ihre TKI-Therapie korreliert. Dass die Leukozytenzahl bei Patienten mit schlechtem Ansprechen auf die TKI-Therapie schon zu Beginn signifikant erhöht ist, liegt aufgrund der in Form der basophilen Granulozyten in den prädiktiven EUTOS-Score eingehenden Leukozytenanzahl nahe. Auch wenn die Leukozytenzahl in der univarianten Analyse eine prognostische Relevanz aufzeigte, wurde der prognostische Wert auf das Therapieansprechen bislang kaum untersucht. Ursächlich könnte sein, dass eine Leukozytose als Charakteristikum der Erkrankung weit verbreitet ist. Neuere Studien konnten bereits einen Zusammenhang zwischen der Leukozytenzahl und dem frühzeitigen Erreichen molekularer Remission etablieren.^{216, 217} Die vorliegenden Analysen bestätigen somit die aktuelle Studienlage nicht nur, sondern schaffen darüber hinaus ein tieferes Verständnis für die grundlegende Beziehung zwischen der Leukozytenzahl und dem Therapieansprechen. Dem aktuellen Kenntnisstand nach konnte im Rahmen dieser Arbeit das erste Mal eine höchst signifikante positive Korrelation zwischen der Leukozytenzahl und der „Zeit bis MMR“ nachgewiesen werden. Da diese Analysen jedoch retrospektiv erfolgt sind, sollten zukünftige prospektive multizentrale Studien diese Ergebnisse bestätigen. Entgegen unserem Nachweis korreliert die „Zeit bis MMR“ zwar in der Gesamtkohorte sowie bei den *Respondern* mit der Leukozytenzahl bei den *Respondern*, jedoch nicht bei den *Non-Respondern*. Da kein Unterschied zwischen den Korrelationskoeffizienten der Kohorten festgestellt werden konnte, könnte eine größere Stichprobenzahl aussagekräftigere Resultate zeigen.

Der *BCR-ABL1*-Quotient korreliert mit der Zeit bis zum Erreichen von MMR bei Patienten, welche gut auf ihre TKI-Therapie ansprechen. In der Auswertung der CML-Patienten wiesen die *Non-Responder* im Schnitt keine höheren Transkriptzahlen als die *Responder* auf. Für den Quotienten nach IS konnte ebenso kein Unterschied zwischen den Kohorten gezeigt werden. Die schiefe Verteilung der Daten sowie der doppelt so hohe Maximalwert der *Non-Responder* legt jedoch einen Unterschied nahe, welcher gegebenenfalls mit einer größeren Stichprobe aussagekräftiger ausfallen würde. Es konnte herausgefunden werden, dass der *BCR-ABL1*-Quotient mit $p = 0,052$ tendenziell positiv mit der Zeit, in welcher ein CML-Patient MMR erreicht, korreliert. Dieser Zusammenhang wurde mit großer Signifikanz für die *Responder* nachgewiesen. Eine mögliche Ursache für das langsamere Ansprechen bei Patienten mit erhöhtem *BCR-ABL1*-Quotienten könnte eine stärkere genomische Instabilität sowie ein gestörtes Differenzierungsverhalten sein, welche in Zellen mit erhöhter *BCR-ABL1*-Expression nachgewiesen werden konnten.^{218, 219} Als Treiber der CML kontrolliert *BCR-ABL1* nahezu jedes onkogene Event wie Zellwachstum und Überleben, welche zur Entartung der Stammzellen und Pathogenese der Erkrankung führen. Ein Patient mit einer initial ausgeprägten Leukozytose besitzt aufgrund der Erkrankung viele *BCR-ABL1* positive Zellen und somit einen hohen Quotienten. Wenn ein solcher Patient therapiert wird, dauert es länger, bis er Remission erreicht, da

proportional viele Zellen eine gestörte Zelldifferenzierung aufweisen und somit eine größere Tumorzellzahl durch die Therapie eliminiert werden muss. Dabei scheint *BCR-ABL1* nicht nur als Initiator, sondern auch in der Progression der Erkrankung in die BC eine Rolle zu spielen. So konnten in Verlaufspuren einzelner Patienten im Vergleich zur CP erhöhte Transkriptzahlen in der BC gemessen werden.²²⁰ Dies unterstreicht die im Rahmen dieser Arbeit erfolgte Beobachtung bei den Patienten mit schlechterem Therapieansprechen.

Bislang gelten insbesondere das frühe molekulare Ansprechen nach 3 Monaten²⁹ sowie nach neuesten Untersuchungen die Halbwertszeit der *BCR-ABL1*-Transkriptreduktion²²¹ als prognostische Marker. Die vorliegenden Ergebnisse legen nahe, dass ein initial hoher *BCR-ABL1*-Quotient mit einem langsameren Ansprechen auf die TKI-Therapie korreliert und prognostischen Wert haben könnte. Der signifikante Unterschied der Korrelationen zwischen den Kohorten impliziert, dass die große Streuung der *Non-Responder* eine allgemeine Schlussfolgerung nicht zulässt. Ob eine Diskrimination zwischen prognostischen Vorhersagen bei Patienten mit angenommener guter Risikokonstellation tatsächlich möglich ist, wurde in vergangenen Studien unterschiedlich beantwortet und könnte eine Ursache für den fehlenden Zusammenhang bei den hier untersuchten *Non-Respondern* sein.^{222, 223} Da die Stichprobengröße zu ähnlichen Studien vergleichsweise klein ausfiel und die Patienten vorab nach ihrem Ansprechen selektiert wurden, sollten zukünftige Studien mit größeren Stichproben unbedingt eine Überprüfung unseres Ergebnisses anstreben.

Auch wenn die Hälfte aller untersuchten Patienten mit IM behandelt wurden, waren hiervon signifikant weniger *Responder*. Im Gegensatz dazu erhielten tendenziell mehr *Responder* eine Monotherapie mit Nilotinib. Die Therapiewahl korrelierte bei den *Respondern* moderat negativ und signifikant mit der Zeit bis zum Erreichen von MMR. Eine mögliche Erklärung hierfür bietet die höhere *BCR-ABL1*-spezifische Potenz von Nilotinib gegenüber IM. So zeigten Patienten unter Nilotinibtherapie mit höheren Raten an zytogenetischen und molekularen Remissionen ein besseres Ansprechen als unter IM-Therapie.²⁹ Die vorliegenden Analysen sind jedoch aufgrund der reduzierten Patientenzahl und der alleinigen Betrachtung der Therapien mit Nilotinib oder IM in ihrer Aussagekraft deutlich limitiert. Bei Betrachtung der Assoziation der Therapiewahl mit der „Zeit bis MMR“ bei denjenigen 53 Patienten, welche eine alleinige Therapie mit Nilotinib oder IM erhielten (54,64 %), konnte sowohl für die Gesamtgruppe als auch für die differenzielle Betrachtung *Non-Responder* keine Korrelation nachgewiesen werden.

Beide Kohorten wiesen größtenteils die Bruchpunktvariante e13a2 vor, dicht gefolgt von e14a2 und unterschieden sich diesbezüglich nicht. In der Gesamtgruppe sowie in den Kohorten konnte eine schwach positive Korrelation ohne Signifikanz zwischen der Bruchpunktvariante und der Zeit bis MMR beobachtet werden. Diese Ergebnisse spiegeln den aktuellen Disput über die prognostische Relevanz der Bruchpunktvarianten wider.^{224, 225} Unsere Ergebnisse entsprechen vorherigen Beobachtungen, dass der Bruchpunkttyp keine entscheidende Rolle in der Prognose der CML spielt.^{52, 226, 227} Andererseits konnten vergangene Studien eine Korrelation zwischen der Bruchpunktvariante und dem Therapieansprechen^{54, 228} sowie der Prognose^{229, 230} nachweisen, was durch die hier beobachtete schwach positive Korrelation zumindest teilweise nachvollzogen werden konnte. Darüber hinaus wiesen zwei der untersuchten *Non-Responder* ein e1a2 Transkript auf. Mit ihren initialen *BCR-ABL1*-Quotienten von 52,00 % und 38,00 % sowie jeweils 36 Monaten bis MMR und mit über 20 Monaten bis dato nicht erreichtem MMR zeichneten sich beide durch ein langsames Ansprechen aus. Diese Befunde könnten auf eine schlechte Prognose

hindeuten, welche für die Variante e1a2 bereits in vorherigen Studien nachgewiesen werden konnte.^{52, 56} Für eine Bestätigung der schlechteren Prognose sowie einer Korrelation mit der Bruchpunktvariante könnte eine größere Studienteilnehmerzahl dienlich sein.

4.4 Schlussfolgerung

Ziel dieser Arbeit war es, die Frage zu beantworten, ob eine Quantifizierung der Transkripte der Gene *ESPL1*, *PTTG1* und *PTTG1IP* zu Beginn einer CML-Erkrankung als molekularer Prognosemarker eine individualisierte Vorhersage des Ansprechverhaltens von Patienten unter TKI-Therapie ermöglicht. Die gemessene, signifikant erhöhte Genexpression von *ESPL1* und *PTTG1* und eine Überexpression von *PTTG1IP* korreliert bei CML-Patienten mit unterschiedlichem Ansprechen auf ihre TKI-Therapie mit der Zeit, in welcher sie MMR erreichen. Die in der vorliegenden Arbeit präsentierte Ermittlung des 3-D-Abstandes erlaubt eine prädiktive Filterung derjenigen CML-Patienten, welche besonders schlecht auf ihre TKI-Therapie ansprechen werden. Dies ermöglicht es diesen Patienten, eine frühzeitige individualisierte Therapie zu erhalten und keine kostbare Zeit mit Therapiewechseln nach den gängigen Intervallen zu verlieren oder sogar eine Progression der Erkrankung in Kauf nehmen zu müssen. Da bei 10 - 15 % der Patienten unter IM-Therapie und bei etwa 10 % der Patienten unter Therapie mit 2GTKIs eine Resistenz auftritt,²⁹ ist auch die wirtschaftliche Belastung nicht zu unterschätzen. Diese könnte durch die frühzeitige Identifizierung des fehlenden Ansprechens auf die TKI-Therapie reduziert werden. So kostet die Therapie eines CML-Patienten mit IM oder 2GTKI wie Nilotinib oder Dasatinib in Deutschland zwischen circa 48 000 – 81 000 € jährlich.²³¹ Ein solches Testverfahren könnte somit erhebliche Kosten durch nicht adäquate TKI-Therapien verhindern. Auf das genetische Zusammenspiel der drei Proteine Separase, Securin und *PTTG1IP* konnte mit der vorliegenden Arbeit Licht geworfen werden. So konnte gezeigt werden, dass die Separase und das Securin sowie das Securin und *PTTG1IP* schon auf genetischer Ebene aufeinander abgestimmt werden. Die Frage, inwieweit sich Patienten mit unterschiedlichem Ansprechen klinisch unterscheiden, konnte insbesondere hinsichtlich der Leukozytenzahl und *BCR-ABL1*-Quotienten beantwortet werden. Mögliche Ursachen für das unterschiedliche Ansprechen und insbesondere für die Überexpressionen von *ESPL1* und *PTTG1* bei CML-Patienten reichen über kompensatorische Genregulationsmechanismen bis zu einem Persistieren von LSCs. Ausgehend von diesen Ergebnissen bedarf es zur Ursachenabklärung und Validierung des 3-D-Abstandsverfahrens weiterer Untersuchungen der Transkriptspiegel und Proteinaktivität der Separase und ihrer Regulatoren mit größeren Stichproben. Unsere Ergebnisse unterstreichen die Hypothese, dass die Messung der Transkriptspiegel der Separase und ihrer Regulatoren als prädiktiver Marker künftig Bestandteil der CML-Routinediagnostik werden könnte.

Unsere Ergebnisse weisen auf einen prädiktischen Wert der Transkriptspiegel der drei Gene zum Erkrankungsbeginn der CML hin. Mittels der 3-D-Abstandsberechnung wurde eine mögliche Antwort auf die Frage nach einem prognostischen Marker gefunden. Doch ganz nach dem einleitenden Zitat von Hesse endet diese Suche nach einer Antwort nicht mit einem Schlusszeichen, sondern mit neuen Fragezeichen. Weshalb CML-Patienten unterschiedlich auf ihre Therapie ansprechen, aus welchem Grund insbesondere *ESPL1* und *PTTG1* überexprimiert werden und wie und ob der Abstand als prädiktiver Marker künftig das Therapieansprechen von CML-Patienten in der klinischen Praxis vorhersagen kann, wird im Rahmen künftiger Untersuchungen beantwortet werden müssen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Als chronische myeloische Leukämie (CML) wird eine klonale hämatopoetische Stammzellerkrankung bezeichnet, welche durch eine ineffektive Hämatopoese und einen dreiphasigen Verlauf mit Gipfel in der tödlich endenden Blastenphase charakterisiert ist. Die ursächliche Translokation führt zur Entstehung des Philadelphia Chromosoms und des pathogenetischen *BCR-ABL1*-Gens. Dank des Einsatzes von Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI) können heutzutage die meisten Patienten lebenslange Remission erreichen. Die Rationale stellt die Inhibierung der konstitutiv aktiven Tyrosinkinase BCR-ABL1 dar, welche die gesteigerte Produktion von Zellen mit überwiegend myeloischer Differenzierung bedingt. Dennoch sprechen etwa 10 – 15 % der Patienten nicht auf die TKI-Therapie an. Aufgrund der Tatsache, dass ein Therapieversagen mit einem schlechteren *Outcome* einhergeht, bedarf es prädiktiver molekularer Marker, welche schlechte Ansprecher schon zu Beginn der Erkrankung identifizieren können. Solche Marker sind bis dato nicht verfügbar. Bei CML-Patienten korreliert die Progression der Erkrankung mit einer Überaktivität des mitotischen Schlüsselproteins Separase. Eine Überexpression seines Gens *ESPL1* konnte bereits in einigen Tumorentitäten nachgewiesen werden und wird mit der karzinogenen Entstehung von Aneuploidie und genetischer Instabilität assoziiert. Eine unerwünschte Aktivierung der Separase wird unter anderem durch die Bindung von Securin verhindert. Hierfür bedarf es des Transportes von im Zytoplasma translatierten Securins über die Kernmembran in den Nukleus durch das Hilfsprotein PTTG1IP. Für die ordnungsgemäße Funktion der Separase wird vermutlich eine korrekte Expression der drei Proteine (*ESPL1*/Separase, *PTTG1*/Securin und *PTTG1IP*) benötigt. Bislang war nicht bekannt, ob ein für die Karzinogenese entscheidendes Zusammenspiel dieser drei Gene vorliegt und inwieweit aberrante Expressionen bei CML-Patienten bestehen. Ziel der Arbeit war es, die Frage zu beantworten, ob eine Quantifizierung der Transkripte der Gene *ESPL1*, *PTTG1* und *PTTG1IP* zu Beginn der CML-Erkrankung als molekularer Prognosemarker eine individualisierte Vorhersage des Ansprechverhaltens von Patienten unter TKI-Therapie ermöglicht.

Im Fokus dieser Arbeit stand die Untersuchung der initialen Transkriptspiegel von *ESPL1*, *PTTG1* und *PTTG1IP* bei CML-Patienten. Hierfür wurden cDNA-Proben von 97 CML-Patienten und 51 gesunden Kontrollpersonen mithilfe der quantitativen Reverse-Transkriptase-PCR (qRT-PCR, LightCycler) analysiert. Die Quantifizierung der relativen Genexpression erfolgte über die Berechnung der $\Delta\text{-C}_t$ -Werte. Die CML-Patienten wurden anhand des 12-Monatskriteriums (Erreichen von MMR = $\text{Log}(\text{BCR-ABL1}/\text{GUSB } 0,10\% \text{ IS})$) für die zu untersuchenden Patientenkohorten (gute Ansprecher (TKI *Responder* n = 46) versus schlechte Ansprecher (TKI *Non-Responder* n = 51)) selektiert. Anschließend erfolgte eine nähere Untersuchung der Expressionsdaten und Verlaufsdaten aus der Patienten-Datenbank (LeukDB) des Labors für Leukämediagnostik der III. Medizinischen Universitätsklinik Mannheim für zehn Patienten, welche entweder besonders auffällige Werte oder das schnellste Ansprechen auf die TKI-Therapie zeigten. Zur Identifikation von Unterschieden zwischen den Kohorten wurden nachfolgend für alle 97 untersuchten Patienten klinische Daten wie Geschlecht, Alter, Bruchpunktvariante, *BCR-ABL1*-Quotient, Leukozyten und Therapie analysiert. Abschließend wurde die Assoziation der Genexpressionen, aber auch der klinischen Parameter mit der Zeit bis zum Erreichen von MMR geprüft.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Quantifizierung der Genexpressionen von *ESPL1*, *PTTG1* und *PTTG1IP* zum Zeitpunkt der Diagnose

einer CML als prädiktiver molekularer Marker eine individualisierte Vorhersage des Ansprechverhaltens von Patienten unter TKI-Therapie ermöglicht. Basierend auf den Δ -Ct-Werten jedes Patienten wurde eine 3-D-Kugel entworfen, welche es erlaubt, das Ansprechverhalten eines Patienten aufgrund seines Abstandes zum Zentrum der Kugel vorherzusagen. Je größer der 3-D-Abstand einer Probe vom Zentrum, umso eher kann ein schlechtes Ansprechen auf die Therapie prognostiziert werden. Ab einem Abstand von 5,92 könnte mit einer Wahrscheinlichkeit von circa 75 % (Spezifität = 100 %) ein schlechtes Ansprechen auf die TKI-Therapie prognostiziert werden. Hierdurch konnte ein Patientencluster von fünf Non-Respondern identifiziert werden, für welche zum Zeitpunkt der Diagnose bereits mit hoher Sicherheit ein defizitäres Therapieansprechen vorhergesagt hätte werden können. Diese „Ausreißer“ zeigten im Gegensatz zur Gesamtgruppe eine inverse Korrelation der Genexpressionen mit der Zeit bis zum Erreichen von MMR. Insgesamt konnte nachgewiesen werden, dass die Gene *ESPL1* und *PTTG1* bei CML-Patienten signifikant überexprimiert werden. Für *PTTG1IP* fand sich eine tendenzielle Überexprimierung, welche in zukünftigen Untersuchungen mit einer aussagekräftigeren Stichprobenzahl nachvollzogen werden sollte. Entgegen den Erwartungen konnte in den Transkriptspiegeln kein Unterschied zwischen den beiden CML-Kohorten festgestellt werden. Die vorliegenden Ergebnisse legen nahe, dass eine niedrigere Expression von *ESPL1* mit einem schnelleren Ansprechen der CML-Patienten auf ihre TKI-Therapie korreliert. Des Weiteren konnten für die Kohorte der *Responder* Korrelationen zwischen der Zeit bis zum Erreichen von MMR und den Genexpressionen der Gene *PTTG1* und *PTTG1IP* gezeigt werden. Die Ergebnisse der Korrelationsanalyse konnten die bereits durch vorherige Studien bekannte enge Verknüpfung zwischen *der Separase* und *Securin* sowie *Securin* und *PTTG1IP* auch auf genetischer Ebene belegen und somit tieferen Einblick in das Zusammenspiel der drei Proteine liefern. Darüber hinaus konnte bestätigt werden, dass *Non-Responder* initial höhere Leukozytenzahlen vorweisen und diese sowie ein erhöhter *BCR-ABL1*-Quotient bei CML-Patienten mit einem schlechteren Ansprechen auf die TKI-Therapie korrelieren.

Die in der Arbeit gefundenen korrelativen Daten lassen vermuten, dass die aberranten Expressionen der drei Gene entweder Begleiterscheinungen oder als molekulare Stellglieder am unterschiedlichen Ansprechen der CML-Patienten auf ihre TKI-Therapie mitbeteiligt sind. So konnte für die Transkriptspiegel sowohl von *ESPL1*, *PTTG1* als auch *PTTG1IP* nachgewiesen werden, dass diese mit der Zeit bis zum Erreichen von MMR korrelieren. Die ermittelten Unterschiede der Kohorten hinsichtlich Leukozytenzahl und *BCR-ABL1*-Quotient und deren nachgewiesener Assoziation mit dem Ansprechen untermauern die bekannte Pathogenese sowie Risikostratifizierung der Erkrankung. Mit dem auf dem 3-D-Abstand basierenden Testverfahren könnten bei einem gewählten Schwellenwert von 3 bereits 37,26 % der zukünftigen Therapieversager zum Diagnosezeitpunkt identifiziert werden. Ab einem Abstand von 5,92 könnte man nahezu sicher sein, dass der Patient unzureichend auf seine TKI-Therapie ansprechen wird und eine individualisierte Therapie in Erwägung ziehen. Gemäß unseren Ergebnissen betrifft das 9,82 % der *Non-Responder* und wäre im klinischen Kontext als Fortschritt für eine erfolgreiche Verbesserung der Patientenstratifizierung zu werten. Dies würde einen großen Benefit für solche besonders schlecht ansprechenden Patienten ermöglichen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen daher den Eingang der Messung der *ESPL1*, *PTTG1* und *PTTG1IP* Genexpressionen in der Routinediagnostik als Surrogatmarker für den Erfolg einer TKI-Therapie als vielversprechend erscheinen.

6 LITERATURVERZEICHNIS

6.1 Literaturverzeichnis

1. Virchow, R: Weisses Blut. *Frorireps Notizen* 36: 151-156, 1845.
2. Virchow, R: Weißes Blut (Leukämie). *Archiv Pathol Anat*, 1: 563, 1847.
3. Sawyers, CL: Chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*, 340: 1330-1340, 1999. <https://doi.org/10.1056/nejm199904293401706>
4. Holyoake, DT: Recent advances in the molecular and cellular biology of chronic myeloid leukaemia: lessons to be learned from the laboratory. *Br J Haematol*, 113: 11-23, 2001. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2001.02558.x>
5. Nowell, PC, Hungerford, DA: Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *J Natl Cancer Inst*, 25: 85-109, 1960.
6. Calabretta, B, Perrotti, D: The biology of CML blast crisis. *Blood*, 103: 4010-4022, 2004. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-12-4111>
7. 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*, 233: 212-214, 1986. <https://doi.org/10.1126/science.3460176>
8. Melo, JV, Barnes, DJ: Chronic myeloid leukaemia as a model of disease evolution in human cancer. *Nat Rev Cancer*, 7: 441-453, 2007. <https://doi.org/10.1038/nrc2147>
9. Spiers, AS: The clinical features of chronic granulocytic leukaemia. *Clin Haematol*, 6: 77-95, 1977.
10. Savage, DG, Szydlo, RM, Goldman, JM: Clinical features at diagnosis in 430 patients with chronic myeloid leukaemia seen at a referral centre over a 16-year period. *Br J Haematol*, 96: 111-116, 1997. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.1997.d01-1982.x>
11. Högglund, M, Sandin, F, Simonsson, B: Epidemiology of chronic myeloid leukaemia: an update. *Ann Hematol*, 94 Suppl 2: S241-247, 2015. <https://doi.org/10.1007/s00277-015-2314-2>
12. Cronkite, EP: Chemical leukemogenesis: benzene as a model. *Semin Hematol*, 24: 2-11, 1987.
13. Högglund, M, Sandin, F, Simonsson, B: Epidemiology of chronic myeloid leukaemia: an update. *Ann Hematol*, 94 Suppl 2: S241-247, 2015. <https://doi.org/10.1007/s00277-015-2314-2>
14. Siegel, RL, Miller, KD, Jemal, A: Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin*, 65: 5-29, 2015. <https://doi.org/10.3322/caac.21254>
15. Suttorp, M, Millot, F, Sembill, S, Deutsch, H, Metzler, M: Definition, Epidemiology, Pathophysiology, and Essential Criteria for Diagnosis of Pediatric Chronic Myeloid Leukemia. *Cancers (Basel)*, 13, 2021. <https://doi.org/10.3390/cancers13040798>
16. Hehlmann, R, Lauseker, M, Saussele, S, Pfirrmann, M, Krause, S, Kolb, HJ, Neubauer, A, Hossfeld, DK, Nerl, C, Gratwohl, A, Baerlocher, GM, Heim, D, Brummendorf, TH, Fabarius, A, Haferlach, C, Schlegelberger, B, Muller, MC, Jeromin, S, Proetel, U, Kohlbrenner, K, Voskanyan, A, Rinaldetti, S, Seifarth, W, Spiess, B, Balleisen, L, Goebeler, MC, Hanel, M, Ho, A, Dengler, J, Falge, C, Kanz, L, Kremers, S, Burchert, A, Kneba, M, Stegelmann, F, Kohne, CA, Lindemann, HW, Waller, CF, Pfreundschuh, M, Spiekermann, K, Berdel, WE, Muller, L, Edinger, M, Mayer, J, Beelen, DW, Bentz, M, Link, H, Hertenstein, B, Fuchs, R, Wernli, M, Schlegel, F, Schlag, R, de Wit, M, Trumper, L, Hebart, H, Hahn, M, Thomalla, J, Scheid, C, Schafhausen, P, Verbeek, W, Eckart, MJ, Gassmann, W, Pezzutto, A, Schenk, M, Brossart, P, Geer, T, Bildat, S, Schafer, E, Hochhaus, A, Hasford, J: Assessment of imatinib as first-line treatment of chronic myeloid leukemia: 10-year survival results of the randomized CML study IV and impact of non-CML determinants. *Leukemia*, 31: 2398-2406, 2017. <https://doi.org/10.1038/leu.2017.253>
17. Swerdlow, SH: WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 2017.
18. Hoffmann, VS, Baccarani, M, Hasford, J, Lindoerfer, D, Burgstaller, S, Sertic, D, Costeas, P, Mayer, J, Indrak, K, Everaus, H, Koskenvesa, P, Guilhot, J, Schubert-Fritschle, G, Castagnetti, F, Di Raimondo, F, Lejniece, S, Griskevicius, L, Thielen, N, Sacha, T, Hellmann, A, Turkina, AG, Zaritsky, A, Bogdanovic, A, Sninska, Z, Zupan, I, Steegmann, JL, Simonsson, B, Clark, RE, Covelli, A, Guidi, G, Hehlmann, R: The EUTOS population-based registry: incidence and clinical characteristics of 2904 CML patients in 20 European Countries. *Leukemia*, 29: 1336-1343, 2015. <https://doi.org/10.1038/leu.2015.73>
19. Hehlmann, R, Hochhaus, A, Baccarani, M: Chronic myeloid leukaemia. *Lancet*, 370: 342-350, 2007. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(07\)61165-9](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(07)61165-9)
20. Rohrbacher, M, Hasford, J: Epidemiology of chronic myeloid leukaemia (CML). *Best Pract Res Clin Haematol*, 22: 295-302, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.beha.2009.07.007>

-
21. Hehlmann, R, Berger, U, Hochhaus, A: Chronic myeloid leukemia: a model for oncology. *Ann Hematol*, 84: 487-497, 2005. <https://doi.org/10.1007/s00277-005-1039-z>
 22. Thielen, N, Visser, O, Ossenkoppele, G, Janssen, J: Chronic myeloid leukemia in the Netherlands: a population-based study on incidence, treatment, and survival in 3585 patients from 1989 to 2012. *Eur J Haematol*, 97: 145-154, 2016. <https://doi.org/10.1111/ejh.12695>
 23. Bower, H, Bjorkholm, M, Dickman, PW, Hoglund, M, Lambert, PC, Andersson, TM: Life Expectancy of Patients With Chronic Myeloid Leukemia Approaches the Life Expectancy of the General Population. *J Clin Oncol*, 34: 2851-2857, 2016. <https://doi.org/10.1200/JCO.2015.66.2866>
 24. Sasaki, K, Strom, SS, O'Brien, S, Jabbour, E, Ravandi, F, Konopleva, M, Borthakur, G, Pemmaraju, N, Daver, N, Jain, P, Pierce, S, Kantarjian, H, Cortes, JE: Relative survival in patients with chronic-phase chronic myeloid leukaemia in the tyrosine-kinase inhibitor era: analysis of patient data from six prospective clinical trials. *Lancet Haematol*, 2: e186-193, 2015. [https://doi.org/10.1016/S2352-3026\(15\)00048-4](https://doi.org/10.1016/S2352-3026(15)00048-4)
 25. Welch, HG, Kramer, BS, Black, WC: Epidemiologic Signatures in Cancer. *N Engl J Med*, 381: 1378-1386, 2019. <https://doi.org/10.1056/NEJMSr1905447>
 26. 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*, 344: 1031-1037, 2001. <https://doi.org/10.1056/nejm200104053441401>
 27. O'Brien, SG, Guilhot, F, Larson, RA, Gathmann, I, Baccarani, M, Cervantes, F, Cornelissen, JJ, Fischer, T, Hochhaus, A, Hughes, T, Lechner, K, Nielsen, JL, Rousset, P, Reiffers, J, Saglio, G, Shepherd, J, Simonsson, B, Gratwohl, A, Goldman, JM, Kantarjian, H, Taylor, K, Verhoef, G, Bolton, AE, Capdeville, R, Druker, BJ: Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*, 348: 994-1004, 2003. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa022457>
 28. An, X, Tiwari, AK, Sun, Y, Ding, PR, Ashby, CR, Jr., Chen, ZS: BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors in the treatment of Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukemia: a review. *Leuk Res*, 34: 1255-1268, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2010.04.016>
 29. Hochhaus, A, Baccarani, M, Silver, RT, Schiffer, C, Apperley, JF, Cervantes, F, Clark, RE, Cortes, JE, Deininger, MW, Guilhot, F, Hjorth-Hansen, H, Hughes, TP, Janssen, J, Kantarjian, HM, Kim, DW, Larson, RA, Lipton, JH, Mahon, FX, Mayer, J, Nicolini, F, Niederwieser, D, Pane, F, Radich, JP, Rea, D, Richter, J, Rosti, G, Rousset, P, Saglio, G, Sauße, S, Soverini, S, Steegmann, JL, Turkina, A, Zaritsky, A, Hehlmann, R: European LeukemiaNet 2020 recommendations for treating chronic myeloid leukemia. *Leukemia*, 34: 966-984, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41375-020-0776-2>
 30. Bringer, D, Mekras, G: Wo und wie entsteht Blut?, 2022. <https://www.medpertise.de/blutwerte/blutbild/wo-und-wie-entsteht-blut/>. Abgerufen 12.03.2022.
 31. Fuchs, R, Brümmendorf, T: Atlas Chronische myeloische Leukämie - Chronische Phase, n.d. Abgerufen 12.03.2022.
 32. Buesche, G, Hehlmann, R, Hecker, H, Heimpel, H, Heinze, B, Schmeil, A, Pffirmann, M, Gomez, G, Tobler, A, Herrmann, H, Kappler, M, Hasford, J, Buhr, T, Kreipe, HH, Georgii, A: Marrow fibrosis, indicator of therapy failure in chronic myeloid leukemia - prospective long-term results from a randomized-controlled trial. *Leukemia*, 17: 2444-2453, 2003. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403172>
 33. Buesche, G, Ganser, A, Schlegelberger, B, von Neuhoff, N, Gadzicki, D, Hecker, H, Bock, O, Frye, B, Kreipe, H: Marrow fibrosis and its relevance during imatinib treatment of chronic myeloid leukemia. *Leukemia*, 21: 2420-2427, 2007. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404917>
 34. Hidalgo-López, JE, Kanagal-Shamanna, R, Quesada, AE, Gong, Z, Wang, W, Hu, S, Medeiros, LJ, Bassett, RL, Jr., d'Orcy, E, Yin, CC, Cortes, J, Jabbour, EJ, Kantarjian, HM, Bueso-Ramos, CE: Bone marrow core biopsy in 508 consecutive patients with chronic myeloid leukemia: Assessment of potential value. *Cancer*, 124: 3849-3855, 2018. <https://doi.org/10.1002/cncr.31663>
 35. 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, European, L: Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*, 108: 1809-1820, 2006. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-02-005686>
 36. 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*, 27: 6041-6051, 2009. <https://doi.org/10.1200/jco.2009.25.0779>
37. Baccarani, M, Deininger, MW, Rosti, G, Hochhaus, A, Soverini, S, Apperley, JF, Cervantes, F, Clark, RE, Cortes, JE, Guilhot, F, Hjorth-Hansen, H, Hughes, TP, Kantarjian, HM, Kim, DW, Larson, RA, Lipton, JH, Mahon, FX, Martinelli, G, Mayer, J, Müller, MC, Niederwieser, D, Pane, F, Radich, JP, Rouselot, P, Saglio, G, Sauße, S, Schiffer, C, Silver, R, Simonsson, B, Steegmann, JL, Goldman, JM, Hehlmann, R: European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood*, 122: 872-884, 2013. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-05-501569>
38. Pathophysiologie, If: Normaler peripherer Blutausschlag 3., 2018. <https://kortan.semmelweis.hu/targyak/kortan/gyakorlat/hemat/vvt/pict/NP03-100x.jpg>. Abgerufen 20.02.2022.
39. Fuchs, R, Panse, J: Atlas Chronische myeloische Leukämie - Blastenschub, n.d. <https://www.onkopedia.com/de/wissensdatenbank/wissensdatenbank/chronische-myeloische-leukaemie-cml/CMLBlastenschub.pdf>. Abgerufen 10.03.2022.
40. Fabarius, A, Kalmanti, L, Dietz, CT, Lauseker, M, Rinaldetti, S, Haferlach, C, Gohring, G, Schlegelberger, B, Jotterand, M, Hanfstein, B, Seifarth, W, Hanel, M, Kohne, CH, Lindemann, HW, Berdel, WE, Staib, P, Muller, MC, Proetel, U, Balleisen, L, Goebeler, ME, Dengler, J, Falge, C, Kanz, L, Burchert, A, Kneba, M, Stegelmann, F, Pfreundschuh, M, Waller, CF, Spiekermann, K, Brummendorf, TH, Edinger, M, Hofmann, WK, Pfirrmann, M, Hasford, J, Krause, S, Hochhaus, A, Saussele, S, Hehlmann, R, Sakk, the German, CMLSG: Impact of unbalanced minor route versus major route karyotypes at diagnosis on prognosis of CML. *Ann Hematol*, 94: 2015-2024, 2015. <https://doi.org/10.1007/s00277-015-2494-9>
41. Wang, W, Cortes, JE, Tang, G, Khoury, JD, Wang, S, Bueso-Ramos, CE, DiGiuseppe, JA, Chen, Z, Kantarjian, HM, Medeiros, LJ, Hu, S: Risk stratification of chromosomal abnormalities in chronic myelogenous leukemia in the era of tyrosine kinase inhibitor therapy. *Blood*, 127: 2742-2750, 2016. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-01-690230>
42. Hehlmann, R, Voskanyan, A, Lauseker, M, Pfirrmann, M, Kalmanti, L, Rinaldetti, S, Kohlbrenner, K, Haferlach, C, Schlegelberger, B, Fabarius, A, Seifarth, W, Spieß, B, Wuchter, P, Krause, S, Kolb, HJ, Neubauer, A, Hossfeld, DK, Nerl, C, Gratwohl, A, Baerlocher, GM, Burchert, A, Brummendorf, TH, Hasford, J, Hochhaus, A, Sauße, S, Baccarani, M: High-risk additional chromosomal abnormalities at low blast counts herald death by CML. *Leukemia*, 34: 2074-2086, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41375-020-0826-9>
43. Melo, JV: BCR-ABL gene variants. *Baillieres Clin Haematol*, 10: 203-222, 1997. [https://doi.org/10.1016/s0950-3536\(97\)80003-0](https://doi.org/10.1016/s0950-3536(97)80003-0)
44. Interpharma: Wie entsteht das Philadelphia-Chromosom?, n.d. <https://biotechlerncenter.interpharma.ch/themen/krebs-neue-medikamente/4-wichtige-entdeckung-in-philadelphia/>. Abgerufen 10.02.2022.
45. Johansson, B, Fioretos, T, Mitelman, F: Cytogenetic and molecular genetic evolution of chronic myeloid leukemia. *Acta Haematol*, 107: 76-94, 2002. <https://doi.org/10.1159/000046636>
46. Fabarius, A, Leitner, A, Hochhaus, A, Müller, MC, Hanfstein, B, Haferlach, C, Göhring, G, Schlegelberger, B, Jotterand, M, Reiter, A, Jung-Munkwitz, S, Proetel, U, Schwaab, J, Hofmann, WK, Schubert, J, Einsele, H, Ho, AD, Falge, C, Kanz, L, Neubauer, A, Kneba, M, Stegelmann, F, Pfreundschuh, M, Waller, CF, Spiekermann, K, Baerlocher, GM, Lauseker, M, Pfirrmann, M, Hasford, J, Saussele, S, Hehlmann, R: Impact of additional cytogenetic aberrations at diagnosis on prognosis of CML: long-term observation of 1151 patients from the randomized CML Study IV. *Blood*, 118: 6760-6768, 2011. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-08-373902>
47. Giehl, M, Fabarius, A, Frank, O, Hochhaus, A, Hafner, M, Hehlmann, R, Seifarth, W: Centrosome aberrations in chronic myeloid leukemia correlate with stage of disease and chromosomal instability. *Leukemia*, 19: 1192-1197, 2005. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403779>
48. Faderl, S, Talpaz, M, Estrov, Z, O'Brien, S, Kurzrock, R, Kantarjian, HM: The biology of chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*, 341: 164-172, 1999. <https://doi.org/10.1056/nejm199907153410306>
49. Hazlehurst, LA, Bewry, NN, Nair, RR, Pinilla-Ibarz, J: Signaling networks associated with BCR-ABL-dependent transformation. *Cancer Control*, 16: 100-107, 2009. <https://doi.org/10.1177/107327480901600202>
50. Groffen, J, Stephenson, JR, Heisterkamp, N, Bartram, C, de Klein, A, Grosveld, G: The human c-abl oncogene in the Philadelphia translocation. *J Cell Physiol Suppl*, 3: 179-191, 1984. <https://doi.org/10.1002/jcp.1041210421>

-
51. Deininger, MW, Goldman, JM, Melo, JV: The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood*, 96: 3343-3356, 2000.
 52. Goldman, JM, Melo, JV: Chronic myeloid leukemia--advances in biology and new approaches to treatment. *N Engl J Med*, 349: 1451-1464, 2003. <https://doi.org/10.1056/NEJMra020777>
 53. Perego, RA, Costantini, M, Cornacchini, G, Gargantini, L, Bianchi, C, Pungolino, E, Rovida, E, Morra, E: The possible influences of B2A2 and B3A2 BCR/ABL protein structure on thrombopoiesis in chronic myeloid leukaemia. *Eur J Cancer*, 36: 1395-1401, 2000. [https://doi.org/10.1016/s0959-8049\(00\)00128-3](https://doi.org/10.1016/s0959-8049(00)00128-3)
 54. Hanfstein, B, Lauseker, M, Hehlmann, R, Saussele, S, Erben, P, Dietz, C, Fabarius, A, Proetel, U, Schnittger, S, Haferlach, C, Krause, SW, Schubert, J, Einsele, H, Hanel, M, Dengler, J, Falge, C, Kanz, L, Neubauer, A, Kneba, M, Stegelmann, F, Pfreundschuh, M, Waller, CF, Spiekermann, K, Baerlocher, GM, Pfirrmann, M, Hasford, J, Hofmann, WK, Hochhaus, A, Muller, MC, Sakk, the German, CMLSG: Distinct characteristics of e13a2 versus e14a2 BCR-ABL1 driven chronic myeloid leukemia under first-line therapy with imatinib. *Haematologica*, 99: 1441-1447, 2014. <https://doi.org/10.3324/haematol.2013.096537>
 55. Jain, P, Kantarjian, H, Patel, KP, Gonzalez, GN, Luthra, R, Kanagal Shamanna, R, Sasaki, K, Jabbour, E, Romo, CG, Kadia, TM, Pemmaraju, N, Daver, N, Borthakur, G, Estrov, Z, Ravandi, F, O'Brien, S, Cortes, J: Impact of BCR-ABL transcript type on outcome in patients with chronic-phase CML treated with tyrosine kinase inhibitors. *Blood*, 127: 1269-1275, 2016. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-10-674242>
 56. Verma, D, Kantarjian, HM, Jones, D, Luthra, R, Borthakur, G, Verstovsek, S, Rios, MB, Cortes, J: Chronic myeloid leukemia (CML) with P190 BCR-ABL: analysis of characteristics, outcomes, and prognostic significance. *Blood*, 114: 2232-2235, 2009. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-02-204693>
 57. Hur, M, Song, EY, Kang, SH, Shin, DH, Kim, JY, Park, SS, Cho, HI: Lymphoid preponderance and the absence of basophilia and splenomegaly are frequent in m-bcr-positive chronic myelogenous leukemia. *Ann Hematol*, 81: 219-223, 2002. <https://doi.org/10.1007/s00277-002-0433-z>
 58. Ohsaka, A, Shiina, S, Kobayashi, M, Kudo, H, Kawaguchi, R: Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia expressing p190(BCR-ABL). *Intern Med*, 41: 1183-1187, 2002. <https://doi.org/10.2169/internalmedicine.41.1183>
 59. Ohtake, S: Chronic myelogenous leukemia with p190BCR-ABL expression: the missing link with monocytosis. *Intern Med*, 41: 1092-1093, 2002. <https://doi.org/10.2169/internalmedicine.41.1092>
 60. Cho, YJ, Cunnick, JM, Yi, SJ, Kaartinen, V, Groffen, J, Heisterkamp, N: Abr and Bcr, two homologous Rac GTPase-activating proteins, control multiple cellular functions of murine macrophages. *Mol Cell Biol*, 27: 899-911, 2007. <https://doi.org/10.1128/MCB.00756-06>
 61. Laurent, E, Talpaz, M, Kantarjian, H, Kurzrock, R: The BCR gene and philadelphia chromosome-positive leukemogenesis. *Cancer Res*, 61: 2343-2355, 2001.
 62. Malmberg, EK, Andersson, CX, Gentsch, M, Chen, JH, Mengos, A, Cui, L, Hansson, GC, Riordan, JR: Bcr (breakpoint cluster region) protein binds to PDZ-domains of scaffold protein PDZK1 and vesicle coat protein Mint3. *J Cell Sci*, 117: 5535-5541, 2004. <https://doi.org/10.1242/jcs.01472>
 63. Raitano, AB, Whang, YE, Sawyers, CL: Signal transduction by wild-type and leukemogenic Abl proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1333: F201-216, 1997. [https://doi.org/10.1016/s0304-419x\(97\)00023-1](https://doi.org/10.1016/s0304-419x(97)00023-1)
 64. Hantschel, O, Superti-Furga, G: Regulation of the c-Abl and Bcr-Abl tyrosine kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5: 33-44, 2004. <https://doi.org/10.1038/nrm1280>
 65. Pendergast, AM, Muller, AJ, Havlik, MH, Maru, Y, Witte, ON: BCR sequences essential for transformation by the BCR-ABL oncogene bind to the ABL SH2 regulatory domain in a non-phosphotyrosine-dependent manner. *Cell*, 66: 161-171, 1991. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90148-r](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90148-r)
 66. Muller, AJ, Young, JC, Pendergast, AM, Pondel, M, Landau, NR, Littman, DR, Witte, ON: BCR first exon sequences specifically activate the BCR/ABL tyrosine kinase oncogene of Philadelphia chromosome-positive human leukemias. *Mol Cell Biol*, 11: 1785-1792, 1991. <https://doi.org/10.1128/mcb.11.4.1785-1792.1991>
 67. Bedi, A, Zehnbauser, BA, Barber, JP, Sharkis, SJ, Jones, RJ: Inhibition of apoptosis by BCR-ABL in chronic myeloid leukemia. *Blood*, 83: 2038-2044, 1994.
 68. Deininger, MW, Vieira, S, Mendiola, R, Schultheis, B, Goldman, JM, Melo, JV: BCR-ABL tyrosine kinase activity regulates the expression of multiple genes implicated in the pathogenesis of chronic myeloid leukemia. *Cancer Res*, 60: 2049-2055, 2000.

-
69. 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*, 328: 342-344, 1987. <https://doi.org/10.1038/328342a0>
70. Ren, R: Mechanisms of BCR-ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia. *Nat Rev Cancer*, 5: 172-183, 2005. <https://doi.org/10.1038/nrc1567>
71. Salesse, S, Verfaillie, CM: Mechanisms underlying abnormal trafficking and expansion of malignant progenitors in CML: BCR/ABL-induced defects in integrin function in CML. *Oncogene*, 21: 8605-8611, 2002. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206088>
72. Hasford, J, Baccarani, M, Hoffmann, V, Guilhot, J, Saussele, S, Rosti, G, Guilhot, F, Porkka, K, Ossenkoppele, G, Lindoerfer, D, Simonsson, B, Pffirmann, M, Hehlmann, R: Predicting complete cytogenetic response and subsequent progression-free survival in 2060 patients with CML on imatinib treatment: the EUTOS score. *Blood*, 118: 686-692, 2011. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-12-319038>
73. Pffirmann, M, Baccarani, M, Saussele, S, Guilhot, J, Cervantes, F, Ossenkoppele, G, Hoffmann, VS, Castagnetti, F, Hasford, J, Hehlmann, R, Simonsson, B: Prognosis of long-term survival considering disease-specific death in patients with chronic myeloid leukemia. *Leukemia*, 30: 48-56, 2016. <https://doi.org/10.1038/leu.2015.261>
74. Millot, F, Guilhot, J, Suttorp, M, Gunes, AM, Sedlacek, P, De Bont, E, Li, CK, Kalwak, K, Lausen, B, Culic, S, Dworzak, M, Kaiserova, E, De Moerloose, B, Roula, F, Biondi, A, Baruchel, A: Prognostic discrimination based on the EUTOS long-term survival score within the International Registry for Chronic Myeloid Leukemia in children and adolescents. *Haematologica*, 102: 1704-1708, 2017. <https://doi.org/10.3324/haematol.2017.170035>
75. Hochhaus, A, Baerlocher, GM, Brümmendorf, T, le Coutre, P, Metzler, M, Petzer, A, Saussele, S, Suttorp, M, Wolf, D: Chronische Myeloische Leukämie, 2018. <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/chronische-myeloische-leukaemie-cml/@@guideline/html/index.html>. Abgerufen 14.12.2021.
76. Pffirmann, M, Clark, RE, Prejzner, W, Lauseker, M, Baccarani, M, Saussele, S, Guilhot, F, Heibl, S, Hehlmann, R, Faber, E, Turkina, A, Ossenkoppele, G, Hoglund, M, Zaritskey, A, Giskevicius, L, Olsson-Stromberg, U, Everaus, H, Koskenvesa, P, Labar, B, Sacha, T, Zackova, D, Cervantes, F, Colita, A, Zupan, I, Bogdanovic, A, Castagnetti, F, Guilhot, J, Hasford, J, Hochhaus, A, Hoffmann, VS: The EUTOS long-term survival (ELTS) score is superior to the Sokal score for predicting survival in chronic myeloid leukemia. *Leukemia*, 34: 2138-2149, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41375-020-0931-9>
77. Hochhaus, A, Ernst, T, Eigendorff, E, La Rosee, P: Causes of resistance and treatment choices of second- and third-line treatment in chronic myelogenous leukemia patients. *Ann Hematol*, 94 Suppl 2: S133-140, 2015. <https://doi.org/10.1007/s00277-015-2323-1>
78. Steegmann, JL, Baccarani, M, Breccia, M, Casado, LF, Garcia-Gutierrez, V, Hochhaus, A, Kim, DW, Kim, TD, Khoury, HJ, Le Coutre, P, Mayer, J, Milojkovic, D, Porkka, K, Rea, D, Rosti, G, Saussele, S, Hehlmann, R, Clark, RE: European LeukemiaNet recommendations for the management and avoidance of adverse events of treatment in chronic myeloid leukaemia. *Leukemia*, 30: 1648-1671, 2016. <https://doi.org/10.1038/leu.2016.104>
79. Mahon, FX, Rea, D, Guilhot, J, Guilhot, F, Huguet, F, Nicolini, F, Legros, L, Charbonnier, A, Guerci, A, Varet, B, Etienne, G, Reiffers, J, Rousselot, P, Intergroupe Francais des Leucemies Myeloides, C: 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*, 11: 1029-1035, 2010. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(10\)70233-3](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(10)70233-3)
80. Branford, S, Yeung, DT, Ross, DM, Prime, JA, Field, CR, Altamura, HK, Yeoman, AL, Georgievski, J, Jamison, BA, Phillis, S, Sullivan, B, Briggs, NE, Hertzberg, M, Seymour, JF, Reynolds, J, Hughes, TP: Early molecular response and female sex strongly predict stable undetectable BCR-ABL1, the criteria for imatinib discontinuation in patients with CML. *Blood*, 121: 3818-3824, 2013. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-10-462291>
81. Breccia, M, Alimena, G, Baccarani, M, Bocchia, M, Di Raimondo, F, Gambacorti-Passerini, C, Gozzini, A, Morra, E, Pane, F, Pregno, P, Rege-Cambrin, G, Rosti, G, Specchia, G, Vigneri, P, Saglio, G: Current management of CML patients: Summary of the Italian Consensus Meeting held in Rome, April 11-12, 2013. *Crit Rev Oncol Hematol*, 90: 181-189, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2013.12.010>
82. Saussele, S, Richter, J, Guilhot, J, Gruber, FX, Hjorth-Hansen, H, Almeida, A, Janssen, J, Mayer, J, Koskenvesa, P, Panayiotidis, P, Olsson-Stromberg, U, Martinez-Lopez, J, Rousselot, P, Vestergaard, H, Ehrencrona, H, Kairisto, V, Machová Poláková, K, Müller, MC, Mustjoki, S, Berger, MG, Fabarius, A, Hofmann, WK, Hochhaus, A, Pffirmann, M, Mahon, FX: Discontinuation of tyrosine kinase inhibitor therapy in chronic myeloid leukaemia (EURO-SKI):

-
- a prespecified interim analysis of a prospective, multicentre, non-randomised, trial. *Lancet Oncol*, 19: 747-757, 2018. [https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(18\)30192-x](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(18)30192-x)
83. Hochhaus, A, Saussele, S, Baerlocher, GM, Brümmendorf, TH, Burchert, A, La Rosée, P, Hasford, J, Hehlmann, R, Heim, D, Krause, SW, le Coutre, P, Niederwieser, D, Mayer, J, Lange, T, Haenel, M, Stegelmann, F, Gil, A, Ernst, T, Fabisch, C, Pffirmann, M: Nilotinib Vs Nilotinib Plus Pegylated Interferon-alpha2b Induction and Nilotinib or Pegylated Interferon-alpha2b Maintenance Therapy for Newly Diagnosed BCR-ABL+ Chronic Myeloid Leukemia Patients in Chronic Phase: Interim Analysis of the Tiger (CML V)-Study. *Blood*, 132: 460-460, 2018. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-99-112119>
84. Hochhaus, A, Larson, RA, Guilhot, F, Radich, JP, Branford, S, Hughes, TP, Baccarani, M, Deininger, MW, Cervantes, F, Fujihara, S, Ortmann, CE, Menssen, HD, Kantarjian, H, O'Brien, SG, Druker, BJ, Investigators, I: Long-Term Outcomes of Imatinib Treatment for Chronic Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*, 376: 917-927, 2017. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1609324>
85. Rosti, G, Castagnetti, F, Gugliotta, G, Baccarani, M: Tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukaemia: which, when, for whom? *Nat Rev Clin Oncol*, 14: 141-154, 2017. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.139>
86. Savage, DG, Antman, KH: Imatinib mesylate--a new oral targeted therapy. *N Engl J Med*, 346: 683-693, 2002. <https://doi.org/10.1056/NEJMra013339>
87. Uziel, O, Fenig, E, Nordenberg, J, Beery, E, Reshef, H, Sandbank, J, Birenbaum, M, Bakhanashvili, M, Yerushalmi, R, Luria, D, Lahav, M: Imatinib mesylate (Gleevec) downregulates telomerase activity and inhibits proliferation in telomerase-expressing cell lines. *Br J Cancer*, 92: 1881-1891, 2005. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602592>
88. Keller, G, Brassat, U, Braig, M, Heim, D, Wege, H, Brümmendorf, TH: Telomeres and telomerase in chronic myeloid leukaemia: impact for pathogenesis, disease progression and targeted therapy. *Hematol Oncol*, 27: 123-129, 2009. <https://doi.org/10.1002/hon.901>
89. Shimada, A: Hematological malignancies and molecular targeting therapy. *Eur J Pharmacol*, 862: 172641, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172641>
90. Doi, S, Tashiro, Y, Yoshinaga, N, Kishimoto, W, Hamada, T, Ueda, C, Moriguchi, T, Kato, K: [BCR-ABL1-positive myelodysplastic syndrome with neutropenia and anemia treated successfully with imatinib mesylate]. *Rinsho Ketsueki*, 61: 455-461, 2020. <https://doi.org/10.11406/rinketsu.61.455>
91. Allen, A, Ahn, C, Sangüeza, OP: Dermatofibrosarcoma Protuberans. *Dermatol Clin*, 37: 483-488, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.det.2019.05.006>
92. Reichardt, P: The Story of Imatinib in GIST - a Journey through the Development of a Targeted Therapy. *Oncol Res Treat*, 41: 472-477, 2018. <https://doi.org/10.1159/000487511>
93. Cortes, JE, Saglio, G, Kantarjian, HM, Baccarani, M, Mayer, J, Boqué, C, Shah, NP, Chuah, C, Casanova, L, Bradley-Garelik, B, Manos, G, Hochhaus, A: Final 5-Year Study Results of DASISION: The Dasatinib Versus Imatinib Study in Treatment-Naïve Chronic Myeloid Leukemia Patients Trial. *J Clin Oncol*, 34: 2333-2340, 2016. <https://doi.org/10.1200/jco.2015.64.8899>
94. Lindauer, M, Hochhaus, A: Dasatinib. *Recent Results Cancer Res*, 212: 29-68, 2018. https://doi.org/10.1007/978-3-319-91439-8_2
95. Weisberg, E, Manley, PW, Cowan-Jacob, SW, Hochhaus, A, Griffin, JD: Second generation inhibitors of BCR-ABL for the treatment of imatinib-resistant chronic myeloid leukaemia. *Nat Rev Cancer*, 7: 345-356, 2007. <https://doi.org/10.1038/nrc2126>
96. Gresse, M, Kim, TD, le Coutre, P: Nilotinib. *Recent Results Cancer Res*, 212: 69-85, 2018. https://doi.org/10.1007/978-3-319-91439-8_3
97. Cortes, JE, Gambacorti-Passerini, C, Deininger, MW, Mauro, MJ, Chuah, C, Kim, DW, Dyagil, I, Glushko, N, Milojkovic, D, le Coutre, P, Garcia-Gutierrez, V, Reilly, L, Jeynes-Ellis, A, Leip, E, Bardy-Bouxin, N, Hochhaus, A, Brümmendorf, TH: Bosutinib Versus Imatinib for Newly Diagnosed Chronic Myeloid Leukemia: Results From the Randomized BFORE Trial. *J Clin Oncol*, 36: 231-237, 2018. <https://doi.org/10.1200/jco.2017.74.7162>
98. Gambacorti-Passerini, C, Aroldi, A, Cordani, N, Piazza, R: Chronic myeloid leukemia: Second-line drugs of choice. *Am J Hematol*, 91: 67-75, 2016. <https://doi.org/10.1002/ajh.24247>
99. Cortes, JE, Kim, DW, Pinilla-Ibarz, J, le Coutre, PD, Paquette, R, Chuah, C, Nicolini, FE, Apperley, JF, Houry, HJ, Talpaz, M, DeAngelo, DJ, Abruzzese, E, Rea, D, Baccarani, M, Muller, MC, Gambacorti-Passerini, C, Lustgarten, S, Rivera, VM, Haluska, FG, Guilhot, F, Deininger, MW, Hochhaus, A, Hughes, TP, Shah, NP, Kantarjian, HM: Ponatinib efficacy and safety in Philadelphia chromosome-positive leukemia: final 5-year results of the phase 2 PACE trial. *Blood*, 132: 393-404, 2018. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-09-739086>

-
100. Iacoboni, SJ, Plunkett, W, Kantarjian, HM, Estey, E, Keating, MJ, McCredie, KB, Freireich, EJ: High-dose cytosine arabinoside: treatment and cellular pharmacology of chronic myelogenous leukemia blast crisis. *J Clin Oncol*, 4: 1079-1088, 1986. <https://doi.org/10.1200/JCO.1986.4.7.1079>
 101. Talpaz, M, Hehlmann, R, Quintas-Cardama, A, Mercer, J, Cortes, J: Re-emergence of interferon-alpha in the treatment of chronic myeloid leukemia. *Leukemia*, 27: 803-812, 2013. <https://doi.org/10.1038/leu.2012.313>
 102. Simonsson, B, Gedde-Dahl, T, Markevarn, B, Remes, K, Stentoft, J, Almqvist, A, Bjoreman, M, Flogegard, M, Koskenvesa, P, Lindblom, A, Malm, C, Mustjoki, S, Myhr-Eriksson, K, Ohm, L, Rasanen, A, Sinisalo, M, Sjalander, A, Stromberg, U, Bjerrum, OW, Ehrencrona, H, Gruber, F, Kairisto, V, Olsson, K, Sandin, F, Nagler, A, Nielsen, JL, Hjorth-Hansen, H, Porkka, K, Nordic, CMLSG: Combination of pegylated IFN-alpha2b with imatinib increases molecular response rates in patients with low- or intermediate-risk chronic myeloid leukemia. *Blood*, 118: 3228-3235, 2011. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-02-336685>
 103. Hjorth-Hansen, H, Stentoft, J, Richter, J, Koskenvesa, P, Høglund, M, Dreimane, A, Porkka, K, Gedde-Dahl, T, Gjertsen, BT, Gruber, FX, Stenke, L, Eriksson, KM, Markevarn, B, Lubking, A, Vestergaard, H, Udby, L, Bjerrum, OW, Persson, I, Mustjoki, S, Olsson-Stromberg, U: Safety and efficacy of the combination of pegylated interferon-alpha2b and dasatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia patients. *Leukemia*, 30: 1853-1860, 2016. <https://doi.org/10.1038/leu.2016.121>
 104. Jabbour, E, Kantarjian, H: Chronic myeloid leukemia: 2012 update on diagnosis, monitoring, and management. *Am J Hematol*, 87: 1037-1045, 2012. <https://doi.org/10.1002/ajh.23282>
 105. Cross, NC, White, HE, Muller, MC, Saglio, G, Hochhaus, A: Standardized definitions of molecular response in chronic myeloid leukemia. *Leukemia*, 26: 2172-2175, 2012. <https://doi.org/10.1038/leu.2012.104>
 106. Cross, NC, Hochhaus, A, Müller, MC: Molecular monitoring of chronic myeloid leukemia: principles and interlaboratory standardization. *Ann Hematol*, 94 Suppl 2: S219-225, 2015. <https://doi.org/10.1007/s00277-015-2315-1>
 107. Hughes, T, Deininger, M, Hochhaus, A, Branford, S, Radich, J, Kaeda, J, Baccarani, M, Cortes, J, Cross, NC, Druker, BJ, Gabert, J, Grimwade, D, Hehlmann, R, Kamel-Reid, S, Lipton, JH, Longtine, J, Martinelli, G, Saglio, G, Soverini, S, Stock, W, Goldman, JM: Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. *Blood*, 108: 28-37, 2006. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-01-0092>
 108. Branford, S, Fletcher, L, Cross, NC, Muller, MC, Hochhaus, A, Kim, DW, Radich, JP, Saglio, G, Pane, F, Kamel-Reid, S, Wang, YL, Press, RD, Lynch, K, Rudzki, Z, Goldman, JM, Hughes, T: Desirable performance characteristics for BCR-ABL measurement on an international reporting scale to allow consistent interpretation of individual patient response and comparison of response rates between clinical trials. *Blood*, 112: 3330-3338, 2008. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-04-150680>
 109. Kompetenznetz Leukämie: Chronische myeloische Leukämie (CML), 2000 - 2022. <https://www.kompetenznetz-leukaemie.de/content/patienten/leukaemien/cml/>. Abgerufen 10.02.2022.
 110. Baccarani, M, Saglio, G, Goldman, J, Hochhaus, A, Simonsson, B, Appelbaum, F, Apperley, J, Cervantes, F, Cortes, J, Deininger, M, Gratwohl, A, Guilhot, Fo, 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*, 108: 1809-1820, 2006. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-02-005686>
 111. Efferth, T, Volm, M: Multiple resistance to carcinogens and xenobiotics: P-glycoproteins as universal detoxifiers. *Arch Toxicol*, 91: 2515-2538, 2017. <https://doi.org/10.1007/s00204-017-1938-5>
 112. Hochhaus, A, Kreil, S, Corbin, AS, La Rosee, P, Muller, MC, Lahaye, T, Hanfstein, B, Schoch, C, Cross, NC, Berger, U, Gschaidmeier, H, Druker, BJ, Hehlmann, R: Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (STI571) therapy. *Leukemia*, 16: 2190-2196, 2002. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402741>
 113. Gong, Z, Medeiros, LJ, Cortes, JE, Chen, Z, Zheng, L, Li, Y, Bai, S, Lin, P, Miranda, RN, Jorgensen, JL, McDonnell, TJ, Wang, W, Kantarjian, HM, Hu, S: Cytogenetics-based risk prediction of blastic transformation of chronic myeloid leukemia in the era of TKI therapy. *Blood Adv*, 1: 2541-2552, 2017. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2017011858>

-
114. Shah, NP, Guilhot, F, Cortes, JE, Schiffer, CA, le Coutre, P, Brummendorf, TH, Kantarjian, HM, Hochhaus, A, Rousselot, P, Mohamed, H, Healey, D, Cunningham, M, Saglio, G: Long-term outcome with dasatinib after imatinib failure in chronic-phase chronic myeloid leukemia: follow-up of a phase 3 study. *Blood*, 123: 2317-2324, 2014. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-10-532341>
115. Giles, FJ, le Coutre, PD, Pinilla-Ibarz, J, Larson, RA, Gattermann, N, Ottmann, OG, Hochhaus, A, Radich, JP, Saglio, G, Hughes, TP, Martinelli, G, Kim, DW, Novick, S, Gillis, K, Fan, X, Cortes, J, Baccarani, M, Kantarjian, HM: Nilotinib in imatinib-resistant or imatinib-intolerant patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase: 48-month follow-up results of a phase II study. *Leukemia*, 27: 107-112, 2013. <https://doi.org/10.1038/leu.2012.181>
116. Smith, BD, Brummendorf, TH, Roboz, GJ, Gambacorti-Passerini, C, Charbonnier, A, Viquiera, A, Leip, E, Giles, F, Ernst, T, Hochhaus, A, Rosti, G: Efficacy of Bosutinib in Imatinib-Resistant Vs Dasatinib/Nilotinib-Resistant Chronic Phase Chronic Myeloid Leukemia: Results from the Phase 4 BYOND Study. *Blood*, 134: 1650-1650, 2019. <https://doi.org/10.1182/blood-2019-122230>
117. Andrews, C, Lipton, J: The role of ponatinib in chronic myeloid leukemia in the era of treatment free remission. *Leuk Lymphoma*, 60: 3099-3101, 2019. <https://doi.org/10.1080/10428194.2019.1665667>
118. Chu, S, McDonald, T, Lin, A, Chakraborty, S, Huang, Q, Snyder, DS, Bhatia, R: Persistence of leukemia stem cells in chronic myelogenous leukemia patients in prolonged remission with imatinib treatment. *Blood*, 118: 5565-5572, 2011. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-12-327437>
119. Corbin, AS, Agarwal, A, Loriaux, M, Cortes, J, Deininger, MW, Druker, BJ: Human chronic myeloid leukemia stem cells are insensitive to imatinib despite inhibition of BCR-ABL activity. *J Clin Invest*, 121: 396-409, 2011. <https://doi.org/10.1172/jci35721>
120. Shan, Y, DeSouza, N, Qiu, Q, Li, S: Leukemia Stem Cells in Chronic Myeloid Leukemia. *Adv Exp Med Biol*, 1143: 191-215, 2019. https://doi.org/10.1007/978-981-13-7342-8_9
121. Kok, CH, Yeung, DT, Lu, L, Watkins, DB, Leclercq, TM, Dang, P, Saunders, VA, Reynolds, J, White, DL, Hughes, TP: Gene expression signature that predicts early molecular response failure in chronic-phase CML patients on frontline imatinib. *Blood Adv*, 3: 1610-1621, 2019. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2019000195>
122. Grossmann, V, Kohlmann, A, Zenger, M, Schindela, S, Eder, C, Weissmann, S, Schnittger, S, Kern, W, Muller, MC, Hochhaus, A, Haferlach, T, Haferlach, C: A deep-sequencing study of chronic myeloid leukemia patients in blast crisis (BC-CML) detects mutations in 76.9% of cases. *Leukemia*, 25: 557-560, 2011. <https://doi.org/10.1038/leu.2010.298>
123. Branford, S, Wang, P, Yeung, DT, Thomson, D, Purins, A, Wadham, C, Shahrin, NH, Marum, JE, Nataran, N, Parker, WT, Geoghegan, J, Feng, J, Shanmuganathan, N, Mueller, MC, Dietz, C, Stangl, D, Donaldson, Z, Altamura, H, Georgievski, J, Braley, J, Brown, A, Hahn, C, Walker, I, Kim, SH, Choi, SY, Park, SH, Kim, DW, White, DL, Yong, ASM, Ross, DM, Scott, HS, Schreiber, AW, Hughes, TP: Integrative genomic analysis reveals cancer-associated mutations at diagnosis of CML in patients with high-risk disease. *Blood*, 132: 948-961, 2018. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-02-832253>
124. Alberts, B, Johnson, A, Lewis, J, Raff, M, Roberts, K, Walter, P: Molecular biology of the cell. *SCANDINAVIAN JOURNAL OF RHEUMATOLOGY*, 32: 125-125, 2003.
125. Bornens, M: The centrosome in cells and organisms. *Science*, 335: 422-426, 2012. <https://doi.org/10.1126/science.1209037>
126. Fujita, H, Yoshino, Y, Chiba, N: Regulation of the centrosome cycle. *Mol Cell Oncol*, 3: e1075643, 2016. <https://doi.org/10.1080/23723556.2015.1075643>
127. Arquint, C, Gabryjonczyk, AM, Nigg, EA: Centrosomes as signalling centres. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 369, 2014. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0464>
128. Tsou, MF, Stearns, T: Controlling centrosome number: licenses and blocks. *Curr Opin Cell Biol*, 18: 74-78, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2005.12.008>
129. Tsou, MF, Stearns, T: Mechanism limiting centrosome duplication to once per cell cycle. *Nature*, 442: 947-951, 2006. <https://doi.org/10.1038/nature04985>
130. Chan, JY: A clinical overview of centrosome amplification in human cancers. *Int J Biol Sci*, 7: 1122-1144, 2011. <https://doi.org/10.7150/ijbs.7.1122>
131. Duensing, A, Duensing, S: Centrosomes, polyploidy and cancer. *Adv Exp Med Biol*, 676: 93-103, 2010. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6199-0_6
132. Fukasawa, K: Oncogenes and tumour suppressors take on centrosomes. *Nat Rev Cancer*, 7: 911-924, 2007. <https://doi.org/10.1038/nrc2249>
133. Holmes, AL, Wise, SS, Sandwick, SJ, Lingle, WL, Negron, VC, Thompson, WD, Wise, JP, Sr.: Chronic exposure to lead chromate causes centrosome abnormalities and aneuploidy in

-
- human lung cells. *Cancer Res*, 66: 4041-4048, 2006. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-3312>
134. Haass, W, Kleiner, H, Weiss, C, Haferlach, C, Schlegelberger, B, Muller, MC, Hehlmann, R, Hofmann, WK, Fabarius, A, Seifarth, W, Schweizerische Arbeitsgemeinschaft für Klinische, K, German, CMLSG: Clonal Evolution and Blast Crisis Correlate with Enhanced Proteolytic Activity of Separase in BCR-ABL b3a2 Fusion Type CML under Imatinib Therapy. *PLoS One*, 10: e0129648, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129648>
 135. Zhang, N, Ge, G, Meyer, R, Sethi, S, Basu, D, Pradhan, S, Zhao, YJ, Li, XN, Cai, WW, El-Naggar, AK, Baladandayuthapani, V, Kittrell, FS, Rao, PH, Medina, D, Pati, D: Overexpression of Separase induces aneuploidy and mammary tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105: 13033-13038, 2008. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801610105>
 136. Meyer, R, Fofanov, V, Panigrahi, A, Merchant, F, Zhang, N, Pati, D: Overexpression and mislocalization of the chromosomal segregation protein separase in multiple human cancers. *Clin Cancer Res*, 15: 2703-2710, 2009. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.Ccr-08-2454>
 137. Basu, D, Zhang, N, Panigrahi, AK, Horton, TM, Pati, D: Development and validation of a fluorogenic assay to measure separase enzyme activity. *Anal Biochem*, 392: 133-138, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2009.05.046>
 138. Haas, W, Stehle, M, Nittka, S, Giehl, M, Schrotz-King, P, Fabarius, A, Hofmann, WK, Seifarth, W: The proteolytic activity of separase in BCR-ABL-positive cells is increased by imatinib. *PLoS One*, 7: e42863, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042863>
 139. Mukherjee, M, Ge, G, Zhang, N, Edwards, DG, Sumazin, P, Sharan, SK, Rao, PH, Medina, D, Pati, D: MMTV-Espl1 transgenic mice develop aneuploid, estrogen receptor alpha (ER α)-positive mammary adenocarcinomas. *Oncogene*, 33: 5511-5522, 2014. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.493>
 140. Pati, D: Oncogenic activity of separase. *Cell Cycle*, 7: 3481-3482, 2008. <https://doi.org/10.4161/cc.7.22.7048>
 141. Noll, JE, Vandyke, K, Hewett, DR, Mrozik, KM, Bala, RJ, Williams, SA, Kok, CH, Zannettino, AC: PTTG1 expression is associated with hyperproliferative disease and poor prognosis in multiple myeloma. *J Hematol Oncol*, 8: 106, 2015. <https://doi.org/10.1186/s13045-015-0209-2>
 142. Repo, H, Gurvits, N, Löyttyniemi, E, Nykänen, M, Lintunen, M, Karra, H, Kurki, S, Kuopio, T, Talvinen, K, Söderström, M, Kronqvist, P: PTTG1-interacting protein (PTTG1IP/PBF) predicts breast cancer survival. *BMC Cancer*, 17: 705, 2017. <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3694-6>
 143. Uhlmann, F: Secured cutting: controlling separase at the metaphase to anaphase transition. *EMBO Rep*, 2: 487-492, 2001. <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kve113>
 144. Gruber, S, Haering, CH, Nasmyth, K: Chromosomal cohesin forms a ring. *Cell*, 112: 765-777, 2003. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00162-4](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00162-4)
 145. Gruber, S, Arumugam, P, Katou, Y, Kuglitsch, D, Helmhart, W, Shirahige, K, Nasmyth, K: Evidence that loading of cohesin onto chromosomes involves opening of its SMC hinge. *Cell*, 127: 523-537, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.08.048>
 146. Haering, CH, Löwe, J, Hochwagen, A, Nasmyth, K: Molecular architecture of SMC proteins and the yeast cohesin complex. *Mol Cell*, 9: 773-788, 2002. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(02\)00515-4](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(02)00515-4)
 147. Haering, CH, Schoffnegger, D, Nishino, T, Helmhart, W, Nasmyth, K, Löwe, J: Structure and stability of cohesin's Smc1-kleisin interaction. *Mol Cell*, 15: 951-964, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.08.030>
 148. Ivanov, D, Nasmyth, K: A physical assay for sister chromatid cohesion in vitro. *Mol Cell*, 27: 300-310, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.07.002>
 149. Anderson, DE, Losada, A, Erickson, HP, Hirano, T: Condensin and cohesin display different arm conformations with characteristic hinge angles. *J Cell Biol*, 156: 419-424, 2002. <https://doi.org/10.1083/jcb.200111002>
 150. Tsou, MF, Wang, WJ, George, KA, Uryu, K, Stearns, T, Jallepalli, PV: Polo kinase and separase regulate the mitotic licensing of centriole duplication in human cells. *Dev Cell*, 17: 344-354, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.07.015>
 151. Simmons Kovacs, LA, Haase, SB: Cohesin: it's not just for chromosomes anymore. *Cell Cycle*, 9: 1750-1753, 2010. <https://doi.org/10.4161/cc.9.9.11792>
 152. Schöckel, L, Möckel, M, Mayer, B, Boos, D, Stemmann, O: Cleavage of cohesin rings coordinates the separation of centrioles and chromatids. *Nat Cell Biol*, 13: 966-972, 2011. <https://doi.org/10.1038/ncb2280>
 153. Agircan, FG, Schiebel, E: Sensors at centrosomes reveal determinants of local separase activity. *PLoS Genet*, 10: e1004672, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004672>

-
154. Waizenegger, I, Giménez-Abián, JF, Wernic, D, Peters, JM: Regulation of human separase by securin binding and autocleavage. *Curr Biol*, 12: 1368-1378, 2002. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(02\)01073-4](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(02)01073-4)
155. Holland, AJ, Taylor, SS: Cyclin-B1-mediated inhibition of excess separase is required for timely chromosome disjunction. *J Cell Sci*, 119: 3325-3336, 2006. <https://doi.org/10.1242/jcs.03083>
156. Yim, H, Erikson, RL: Regulation of the final stage of mitosis by components of the pre-replicative complex and a polo kinase. *Cell Cycle*, 10: 1374-1377, 2011. <https://doi.org/10.4161/cc.10.9.15489>
157. Nigg, EA, Raff, JW: Centrioles, centrosomes, and cilia in health and disease. *Cell*, 139: 663-678, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.10.036>
158. Ruppenthal, S: *Separase-Aktivität und genetische Instabilität beim myelodysplastischen Syndrom*. Med. Dissertation. Medizinische Fakultät Mannheim, Universität Heidelberg, 2018. 10.11588/heidok.00024258
159. Loeb, LA: A mutator phenotype in cancer. *Cancer Res*, 61: 3230-3239, 2001.
160. Kim, DS, Franklyn, JA, Smith, VE, Stratford, AL, Pemberton, HN, Warfield, A, Watkinson, JC, Ishmail, T, Wakelam, MJ, McCabe, CJ: Securin induces genetic instability in colorectal cancer by inhibiting double-stranded DNA repair activity. *Carcinogenesis*, 28: 749-759, 2007. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgl202>
161. Hornig, NC, Knowles, PP, McDonald, NQ, Uhlmann, F: The dual mechanism of separase regulation by securin. *Curr Biol*, 12: 973-982, 2002. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(02\)00847-3](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(02)00847-3)
162. Jallepalli, PV, Lengauer, C: Chromosome segregation and cancer: cutting through the mystery. *Nat Rev Cancer*, 1: 109-117, 2001. <https://doi.org/10.1038/35101065>
163. Nasmyth, K, Peters, JM, Uhlmann, F: Splitting the chromosome: cutting the ties that bind sister chromatids. *Science*, 288: 1379-1385, 2000. <https://doi.org/10.1126/science.288.5470.1379>
164. Yanagida, M: Cell cycle mechanisms of sister chromatid separation; roles of Cut1/separin and Cut2/securin. *Genes Cells*, 5: 1-8, 2000. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.2000.00306.x>
165. Salehi, F, Kovacs, K, Scheithauer, BW, Lloyd, RV, Cusimano, M: Pituitary tumor-transforming gene in endocrine and other neoplasms: a review and update. *Endocr Relat Cancer*, 15: 721-743, 2008. <https://doi.org/10.1677/ERC-08-0012>
166. McCabe, CJ, Gittoes, NJ: PTTG--a new pituitary tumour transforming gene. *J Endocrinol*, 162: 163-166, 1999. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1620163>
167. Heaney, AP, Singson, R, McCabe, CJ, Nelson, V, Nakashima, M, Melmed, S: Expression of pituitary-tumour transforming gene in colorectal tumours. *Lancet*, 355: 716-719, 2000. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(99\)10238-1](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(99)10238-1)
168. Solbach, C, Roller, M, Fellbaum, C, Nicoletti, M, Kaufmann, M: PTTG mRNA expression in primary breast cancer: a prognostic marker for lymph node invasion and tumor recurrence. *Breast*, 13: 80-81, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2003.09.008>
169. Yu, R, Lu, W, Chen, J, McCabe, CJ, Melmed, S: Overexpressed pituitary tumor-transforming gene causes aneuploidy in live human cells. *Endocrinology*, 144: 4991-4998, 2003. <https://doi.org/10.1210/en.2003-0305>
170. Zur, A, Brandeis, M: Securin degradation is mediated by fzy and fzr, and is required for complete chromatid separation but not for cytokinesis. *Embo j*, 20: 792-801, 2001. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.4.792>
171. Yu, R, Heaney, AP, Lu, W, Chen, J, Melmed, S: Pituitary tumor transforming gene causes aneuploidy and p53-dependent and p53-independent apoptosis. *J Biol Chem*, 275: 36502-36505, 2000. <https://doi.org/10.1074/jbc.C000546200>
172. Auner, HW, Zebisch, A, Schimek, MG, Bodner, C, Hiden, K, Linkesch, W, Haas, OA, Beham-Schmid, C, Sill, H: High expression of the sister-chromatid separation regulator and proto-oncogene hSecurin occurs in a subset of myeloid leukaemias but is not implicated in the pathogenesis of aneuploidy. *Leukemia*, 18: 303-308, 2004. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403235>
173. Romero, F, Multon, MC, Ramos-Morales, F, Domínguez, A, Bernal, JA, Pintor-Toro, JA, Tortolero, M: Human securin, hPTTG, is associated with Ku heterodimer, the regulatory subunit of the DNA-dependent protein kinase. *Nucleic Acids Res*, 29: 1300-1307, 2001. <https://doi.org/10.1093/nar/29.6.1300>
174. Bernal, JA, Luna, R, Espina, A, Lázaro, I, Ramos-Morales, F, Romero, F, Arias, C, Silva, A, Tortolero, M, Pintor-Toro, JA: Human securin interacts with p53 and modulates p53-mediated transcriptional activity and apoptosis. *Nat Genet*, 32: 306-311, 2002. <https://doi.org/10.1038/ng997>
175. Haaß, W, Kleiner, H, Weiß, C, Haferlach, C, Schlegelberger, B, Müller, MC, Hehlmann, R, Hofmann, WK, Fabarius, A, Seifarth, W: Clonal Evolution and Blast Crisis Correlate with

-
- Enhanced Proteolytic Activity of Separase in BCR-ABL b3a2 Fusion Type CML under Imatinib Therapy. *PLoS One*, 10: e0129648, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129648>
176. Chien, W, Pei, L: A novel binding factor facilitates nuclear translocation and transcriptional activation function of the pituitary tumor-transforming gene product. *J Biol Chem*, 275: 19422-19427, 2000. <https://doi.org/10.1074/jbc.M910105199>
177. Yaspo, ML, Aaltonen, J, Horelli-Kuitunen, N, Peltonen, L, Lehrach, H: Cloning of a novel human putative type Ia integral membrane protein mapping to 21q22.3. *Genomics*, 49: 133-136, 1998. <https://doi.org/10.1006/geno.1998.5217>
178. Hattori, M, Fujiyama, A, Taylor, TD, Watanabe, H, Yada, T, Park, HS, Toyoda, A, Ishii, K, Totoki, Y, Choi, DK, Groner, Y, Soeda, E, Ohki, M, Takagi, T, Sakaki, Y, Taudien, S, Blechschmidt, K, Polley, A, Menzel, U, Delabar, J, Kumpf, K, Lehmann, R, Patterson, D, Reichwald, K, Rump, A, Schillhabel, M, Schudy, A, Zimmermann, W, Rosenthal, A, Kudoh, J, Schibuya, K, Kawasaki, K, Asakawa, S, Shintani, A, Sasaki, T, Nagamine, K, Mitsuyama, S, Antonarakis, SE, Minoshima, S, Shimizu, N, Nordsiek, G, Hornischer, K, Brant, P, Scharfe, M, Schon, O, Desario, A, Reichelt, J, Kauer, G, Blocker, H, Ramser, J, Beck, A, Klages, S, Hennig, S, Riesselmann, L, Dagand, E, Haaf, T, Wehrmeyer, S, Borzym, K, Gardiner, K, Nizetic, D, Francis, F, Lehrach, H, Reinhardt, R, Yaspo, ML: The DNA sequence of human chromosome 21. *Nature*, 405: 311-319, 2000. <https://doi.org/10.1038/35012518>
179. Read, ML, Seed, RI, Fong, JC, Modasia, B, Ryan, GA, Watkins, RJ, Gagliano, T, Smith, VE, Stratford, AL, Kwan, PK, Sharma, N, Dixon, OM, Watkinson, JC, Boelaert, K, Franklyn, JA, Turnell, AS, McCabe, CJ: The PTTG1-binding factor (PBF/PTTG1IP) regulates p53 activity in thyroid cells. *Endocrinology*, 155: 1222-1234, 2014. <https://doi.org/10.1210/en.2013-1646>
180. Read, ML, Seed, RI, Modasia, B, Kwan, PP, Sharma, N, Smith, VE, Watkins, RJ, Bansal, S, Gagliano, T, Stratford, AL, Ismail, T, Wakelam, MJ, Kim, DS, Ward, ST, Boelaert, K, Franklyn, JA, Turnell, AS, McCabe, CJ: The proto-oncogene PBF binds p53 and is associated with prognostic features in colorectal cancer. *Mol Carcinog*, 55: 15-26, 2016. <https://doi.org/10.1002/mc.22254>
181. Stratford, AL, Boelaert, K, Tannahill, LA, Kim, DS, Warfield, A, Eggo, MC, Gittoes, NJ, Young, LS, Franklyn, JA, McCabe, CJ: Pituitary tumor transforming gene binding factor: a novel transforming gene in thyroid tumorigenesis. *J Clin Endocrinol Metab*, 90: 4341-4349, 2005. <https://doi.org/10.1210/jc.2005-0523>
182. Imruetaicharoenchoke, W, Fletcher, A, Lu, W, Watkins, RJ, Modasia, B, Poole, VL, Nieto, HR, Thompson, RJ, Boelaert, K, Read, ML, Smith, VE, McCabe, CJ: Functional consequences of the first reported mutations of the proto-oncogene PTTG1IP/PBF. *Endocr Relat Cancer*, 24: 459-474, 2017. <https://doi.org/10.1530/erc-16-0340>
183. McCabe, CJ, Khaira, JS, Boelaert, K, Heaney, AP, Tannahill, LA, Hussain, S, Mitchell, R, Olliff, J, Sheppard, MC, Franklyn, JA, Gittoes, NJ: Expression of pituitary tumour transforming gene (PTTG) and fibroblast growth factor-2 (FGF-2) in human pituitary adenomas: relationships to clinical tumour behaviour. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 58: 141-150, 2003. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2265.2003.01598.x>
184. Watkins, RJ, Read, ML, Smith, VE, Sharma, N, Reynolds, GM, Buckley, L, Doig, C, Campbell, MJ, Lewy, G, Eggo, MC, Loubiere, LS, Franklyn, JA, Boelaert, K, McCabe, CJ: Pituitary tumor transforming gene binding factor: a new gene in breast cancer. *Cancer Res*, 70: 3739-3749, 2010. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.Can-09-3531>
185. Melloni, GE, Ogier, AG, de Pretis, S, Mazzarella, L, Pelizzola, M, Pelicci, PG, Riva, L: DOTS-Finder: a comprehensive tool for assessing driver genes in cancer genomes. *Genome Med*, 6: 44, 2014. <https://doi.org/10.1186/gm563>
186. Livak, KJ, Schmittgen, TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25: 402-408, 2001. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
187. Weiß, C: Logistische Regression. In: *Basiswissen Medizinische Statistik*. Berlin, Heidelberg, Springer, 2019.
188. Otto, T, Sicinski, P: Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 17: 93-115, 2017. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.138>
189. Jabbour, E, Kantarjian, H: Chronic myeloid leukemia: 2018 update on diagnosis, therapy and monitoring. *Am J Hematol*, 93: 442-459, 2018. <https://doi.org/10.1002/ajh.25011>
190. Life Technologies Corporation: Real-Time, digitale PCR und herkömmliche PCR im Vergleich, n.d. <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/real-time-vs-digital-vs-traditional-pcr.html>. Abgerufen 01.03.2022.

-
191. Cross, NC, White, HE, Müller, MC, Saglio, G, Hochhaus, A: Standardized definitions of molecular response in chronic myeloid leukemia. *Leukemia*, 26: 2172-2175, 2012. <https://doi.org/10.1038/leu.2012.104>
192. Feroni, L, Wilson, G, Gerrard, G, Mason, J, Grimwade, D, White, HE, de Castro, DG, Austin, S, Awan, A, Burt, E, Clench, T, Farruggia, J, Hancock, J, Irvine, AE, Kizilors, A, Langabeer, S, Milner, BJ, Nickless, G, Schuh, A, Sproul, A, Wang, L, Wickham, C, Cross, NC: Guidelines for the measurement of BCR-ABL1 transcripts in chronic myeloid leukaemia. *Br J Haematol*, 153: 179-190, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2011.08603.x>
193. Patel, H, Gordon, MY: Abnormal centrosome-centriole cycle in chronic myeloid leukaemia? *Br J Haematol*, 146: 408-417, 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2009.07772.x>
194. Kumar, R: Separase: Function Beyond Cohesion Cleavage and an Emerging Oncogene. *J Cell Biochem*, 118: 1283-1299, 2017. <https://doi.org/10.1002/jcb.25835>
195. Zhang, N, Pati, D: Biology and insights into the role of cohesin protease separase in human malignancies. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 92: 2070-2083, 2017. <https://doi.org/10.1111/brv.12321>
196. Smahelova, J, Kastankova, I, Polakova, KM, Klamova, H, Zemanova, K, Tachezy, R, Hamsikova, E, Smahel, M: Expression of genes encoding centrosomal proteins and the humoral response against these proteins in chronic myeloid leukemia. *Oncol Rep*, 37: 547-554, 2017. <https://doi.org/10.3892/or.2016.5226>
197. Wolf, D, Sopper, S: Molecular response prediction in CML: novel ideas? *Oncotarget*, 8: 80105-80106, 2017. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21049>
198. Pei, L, Melmed, S: Isolation and characterization of a pituitary tumor-transforming gene (PTTG). *Mol Endocrinol*, 11: 433-441, 1997. <https://doi.org/10.1210/mend.11.4.9911>
199. Yu, H, Wang, L, Chen, D, Li, J, Guo, Y: Conditional transcriptional relationships may serve as cancer prognostic markers. *BMC Med Genomics*, 14: 101, 2021. <https://doi.org/10.1186/s12920-021-00958-3>
200. Hsu, YH, Liao, LJ, Yu, CH, Chiang, CP, Jhan, JR, Chang, LC, Chen, YJ, Lou, PJ, Lin, JJ: Overexpression of the pituitary tumor transforming gene induces p53-dependent senescence through activating DNA damage response pathway in normal human fibroblasts. *J Biol Chem*, 285: 22630-22638, 2010. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.096255>
201. Vlotides, G, Eigler, T, Melmed, S: Pituitary tumor-transforming gene: physiology and implications for tumorigenesis. *Endocr Rev*, 28: 165-186, 2007. <https://doi.org/10.1210/er.2006-0042>
202. Zhang, X, Horwitz, GA, Prezant, TR, Valentini, A, Nakashima, M, Bronstein, MD, Melmed, S: Structure, expression, and function of human pituitary tumor-transforming gene (PTTG). *Mol Endocrinol*, 13: 156-166, 1999. <https://doi.org/10.1210/mend.13.1.0225>
203. Ishikawa, H, Heaney, AP, Yu, R, Horwitz, GA, Melmed, S: Human pituitary tumor-transforming gene induces angiogenesis. *J Clin Endocrinol Metab*, 86: 867-874, 2001. <https://doi.org/10.1210/jcem.86.2.7184>
204. Collado, M, Blasco, MA, Serrano, M: Cellular senescence in cancer and aging. *Cell*, 130: 223-233, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.07.003>
205. Xu, J, Wang, M, Gao, X, Hu, B, Du, Y, Zhou, J, Tian, X, Huang, X: Separase phosphosite mutation leads to genome instability and primordial germ cell depletion during oogenesis. *PLoS One*, 6: e18763, 2011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018763>
206. Wang, D, Zhu, H, Guo, M, Fan, X, Hu, S, Yan, K, Sun, J, Wang, J, Li, M, Xiao, H, Liu, Z: Expression and prognostic value of cell-cycle-associated genes in gastric adenocarcinoma. *BMC Gastroenterol*, 18: 81, 2018. <https://doi.org/10.1186/s12876-018-0811-1>
207. Cucco, F, Palumbo, E, Camerini, S, D'Alessio, B, Quarantotti, V, Casella, ML, Rizzo, IM, Cukrov, D, Delia, D, Russo, A, Crescenzi, M, Musio, A: Separase prevents genomic instability by controlling replication fork speed. *Nucleic Acids Res*, 46: 267-278, 2018. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1172>
208. Vuelta, E, García-Tuñón, I, Hernández-Carabias, P, Méndez, L, Sánchez-Martín, M: Future Approaches for Treating Chronic Myeloid Leukemia: CRISPR Therapy. *Biology (Basel)*, 10, 2021. <https://doi.org/10.3390/biology10020118>
209. Bhatia, R: Novel approaches to therapy in CML. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2017: 115-120, 2017. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2017.1.115>
210. Loscocco, F, Visani, G, Galimberti, S, Curti, A, Isidori, A: BCR-ABL Independent Mechanisms of Resistance in Chronic Myeloid Leukemia. *Front Oncol*, 9: 939, 2019. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00939>
211. Li, L, Bhatia, R: Stem cell quiescence. *Clin Cancer Res*, 17: 4936-4941, 2011. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.Ccr-10-1499>

-
212. Mojtahedi, H, Yazdanpanah, N, Rezaei, N: Chronic myeloid leukemia stem cells: targeting therapeutic implications. *Stem Cell Res Ther*, 12: 603, 2021. <https://doi.org/10.1186/s13287-021-02659-1>
213. Yung, Y, Lee, E, Chu, HT, Yip, PK, Gill, H: Targeting Abnormal Hematopoietic Stem Cells in Chronic Myeloid Leukemia and Philadelphia Chromosome-Negative Classical Myeloproliferative Neoplasms. *Int J Mol Sci*, 22, 2021. <https://doi.org/10.3390/ijms22020659>
214. Gurvits, N, Repo, H, Loyttyneimi, E, Nykanen, M, Anttinen, J, Kuopio, T, Talvinen, K, Kronqvist, P: Prognostic implications of securin expression and sub-cellular localization in human breast cancer. *Cell Oncol (Dordr)*, 39: 319-331, 2016. <https://doi.org/10.1007/s13402-016-0277-5>
215. Haaß, W, Kleiner, H, Müller, MC, Hofmann, WK, Fabarius, A, Seifarth, W: Measurement of separate proteolytic activity in single living cells by a fluorogenic flow cytometry assay. *PLoS One*, 10: e0133769, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133769>
216. Hughes, TP, Saglio, G, Kantarjian, HM, Guilhot, F, Niederwieser, D, Rosti, G, Nakaseko, C, De Souza, CA, Kalaycio, ME, Meier, S, Fan, X, Menssen, HD, Larson, RA, Hochhaus, A: Early molecular response predicts outcomes in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase treated with frontline nilotinib or imatinib. *Blood*, 123: 1353-1360, 2014. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-06-510396>
217. Qin, YZ, Jiang, Q, Jiang, H, Lai, YY, Zhu, HH, Liu, YR, Jiang, B, Huang, XJ: Combination of White Blood Cell Count at Presentation With Molecular Response at 3 Months Better Predicts Deep Molecular Responses to Imatinib in Newly Diagnosed Chronic-Phase Chronic Myeloid Leukemia Patients. *Medicine (Baltimore)*, 95: e2486, 2016. <https://doi.org/10.1097/md.0000000000002486>
218. Skorski, T: Genetic mechanisms of chronic myeloid leukemia blastic transformation. *Curr Hematol Malig Rep*, 7: 87-93, 2012. <https://doi.org/10.1007/s11899-012-0114-5>
219. Chang, JS, Santhanam, R, Trotta, R, Neviani, P, Eiring, AM, Briercheck, E, Ronchetti, M, Roy, DC, Calabretta, B, Caligiuri, MA, Perrotti, D: High levels of the BCR/ABL oncoprotein are required for the MAPK-hnRNP-E2 dependent suppression of C/EBPalpha-driven myeloid differentiation. *Blood*, 110: 994-1003, 2007. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-03-078303>
220. Barnes, DJ, Palaiologou, D, Panousopoulou, E, Schultheis, B, Yong, AS, Wong, A, Pattacini, L, Goldman, JM, Melo, JV: Bcr-Abl expression levels determine the rate of development of resistance to imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia. *Cancer Res*, 65: 8912-8919, 2005. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-0076>
221. Cai, Z, Jia, X, Zi, J, Song, H, Wang, S, McGrath, M, Zhao, L, Song, C, Ge, Z: BCR-ABL1 transcript decline ratio combined BCR-ABL1(IS) as a precise predictor for imatinib response and outcome in the patients with chronic myeloid leukemia. *J Cancer*, 11: 2234-2240, 2020. <https://doi.org/10.7150/jca.38752>
222. Goldman, JM, Lu, DP: New approaches in chronic granulocytic leukemia--origin, prognosis, and treatment. *Semin Hematol*, 19: 241-256, 1982.
223. Gomez, GA, Sokal, JE, Walsh, D: Prognostic features at diagnosis of chronic myelocytic leukemia. *Cancer*, 47: 2470-2477, 1981. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19810515\)47:10<2470::aid-cnrc2820471026>3.0.co;2-0](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19810515)47:10<2470::aid-cnrc2820471026>3.0.co;2-0)
224. Chereda, B, Melo, JV: Natural course and biology of CML. *Ann Hematol*, 94 Suppl 2: S107-121, 2015. <https://doi.org/10.1007/s00277-015-2325-z>
225. Melo, JV: The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. *Blood*, 88: 2375-2384, 1996.
226. Rozman, C, Urbano-Ispizua, A, Cervantes, F, Rozman, M, Colomer, D, Feliz, P, Pujades, A, Vives Corrons, JL: Analysis of the clinical relevance of the breakpoint location within M-BCR and the type of chimeric mRNA in chronic myelogenous leukemia. *Leukemia*, 9: 1104-1107, 1995.
227. 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 leukaemia: no correlation with clinical features, cytogenetic response, duration of chronic phase, or survival. *Br J Haematol*, 89: 546-554, 1995. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1995.tb08362.x>
228. Lucas, CM, Harris, RJ, Giannoudis, A, Davies, A, Knight, K, Watmough, SJ, Wang, L, Clark, RE: Chronic myeloid leukemia patients with the e13a2 BCR-ABL fusion transcript have inferior responses to imatinib compared to patients with the e14a2 transcript. *Haematologica*, 94: 1362-1367, 2009. <https://doi.org/10.3324/haematol.2009.009134>
229. Mills, KI, Sproul, AM, Leibowitz, D, Burnett, AK: Mapping of breakpoints, and relationship to BCR-ABL RNA expression, in Philadelphia-chromosome-positive chronic myeloid leukaemia patients with a breakpoint around exon 14 (b3) of the BCR gene. *Leukemia*, 5: 937-941, 1991.
230. Elliott, SL, Taylor, KM, Taylor, DL, Rodwell, RL, Williams, BF, Shuttlewood, MM, Wright, SJ, Eliadis, PE, Bunce, IH, Frost, TJ, et al.: Cytogenetic response to alpha-interferon is predicted

-
- in early chronic phase chronic myeloid leukemia by M-bcr breakpoint location. *Leukemia*, 9: 946-950, 1995.
231. Leukemia, EICM: The price of drugs for chronic myeloid leukemia (CML) is a reflection of the unsustainable prices of cancer drugs: from the perspective of a large group of CML experts. *Blood*, 121: 4439-4442, 2013. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-03-490003>

6.2 Eigene Veröffentlichung

Christiani, E, Naumann, N, Weiss, C, Spiess, B, Kleiner, H, Fabarius, A, Hofmann, WK, Saussele, S, Seifarth, W: Gene Expression Pattern of *ESPL1*, *PTTG1* and *PTTG1IP* Can Potentially Predict Response to TKI First-Line Treatment of Patients with Newly Diagnosed CML. *Cancers*, 15, 2652, 2023. <https://doi.org/10.3390/cancers15092652>

7 TABELLARISCHER ANHANG

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: ELN-Kriterien für die Einteilung in die verschiedenen Verlaufsphasen der CML	7
Tabelle 2: Definitionen des EUTOS- und ELTS-Scores zur Einschätzung der Prognose von CML-Patienten	11
Tabelle 3: ELN-Kriterien des Therapieansprechens für CML-Patienten unter TKI-Therapie	15
Tabelle 4: Meilensteine des molekularen Monitorings von <i>BCR-ABL1</i> -Transkriptleveln	16
Tabelle 5: Patientencharakteristika von 148 analysierten Proben	25
Tabelle 6: cDNA-Mix-Ansatz	32
Tabelle 7: qRT-PCR Primer	34
Tabelle 8: qRT-PCR Ansatz	34
Tabelle 9: qRT-PCR Pipettierschema 96-well block	34
Tabelle 10: qRT-PCR Programm two-step LightCycler 480 protocol	34
Tabelle 11: Klinische Parameter und verwendete statistische Tests	37
Tabelle 12: Analysierte Assoziationen mit "Zeit bis MMR" und verwendete statistische Verfahren	38
Tabelle 13: Änderung der relativen Genexpression ($\Delta-C_t$) in CML-Patienten und gesunden Kontrollproben	45
Tabelle 14: Korrelationen der Genexpressionen (Korrelationskoeffizienten nach Pearson)	49
Tabelle 15: Detaillierte Übersicht der 97 untersuchten CML-Patienten	50
Tabelle 16: Wahrscheinlichkeiten für <i>Non-Responder/Responder</i> in Bezug auf den Abstand	55
Tabelle 17: Sensitivitäten und Spezifitäten für diverse Schwellenwerte (CUTS)	56
Tabelle 18: <i>p</i> -Werte aus dem Vergleich der vorhersagbaren <i>Non-Responder</i> ($n = 5$) vs. der schnellsten <i>Responder</i> ($n = 5$)	59
Tabelle 19: Eckdaten 12 CML-Patienten	60
Tabelle 20: Daten der untersuchten Probe I	60
Tabelle 21: Daten der untersuchten Probe II	61
Tabelle 22: Daten Probe nach 12 Monaten	61
Tabelle 23: Daten Probe bei MMR	61

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Hämatopoese (Blutbildung)	4
Abbildung 2: Zytomorphologische Untersuchung, panoptische Färbung nach Pappenheim	6
Abbildung 3: Vergleich zwischen Blutaussstrichen einer gesunden Person sowie eines Patienten mit CML in Blastenkrise	7
Abbildung 4: Graphische Darstellung des Philadelphia-Chromosoms	8
Abbildung 5: Lokalisation der Bruchpunkte des <i>ABL</i> - und <i>BCR</i> -Gens und resultierende <i>BCR-ABL1</i> -Fusionsproteine	9
Abbildung 6: Monitoring des Therapieansprechens bei CML-Patienten unter TKI-Therapie	14
Abbildung 7: Schematische Darstellung des Zellzyklus	17
Abbildung 8: Rolle der Separase und ihrer Schlüsselproteine während des Zellzyklus	20
Abbildung 9: Flussdiagramm der Untersuchung der Transkriptspiegel der Separase und Separase-Regulatoren bei CML-Patienten	23
Abbildung 10: <i>BCR-ABL1</i> -Transkriptzahlen und -Quotient eines <i>Responders</i> mit Rezidiv nach 1-jähriger Therapiepause (R-16)	26
Abbildung 11: <i>BCR-ABL1</i> -Transkriptzahlen und -Quotient eines <i>Non-Responders</i> ohne Erreichen von MMR bis dato (nR-42)	26
Abbildung 12: Schmelz- und Amplifikationskurve einer beispielhaften qRT-PCR von Kontrollproben	33
Abbildung 13: qRT-PCR Schmelz- und Amplifikationskurven von Zelllinien	39
Abbildung 14: Transkriptspiegel von <i>ESPL1</i> , <i>PTTG1</i> und <i>PTTG1IP</i> in humanen leukämischen Zelllinien	40
Abbildung 15: Gelelektrophorese zum Nachweis der qRT-PCR-Genprodukte von <i>GUS</i> , <i>ESPL1</i> , <i>PTTG1</i> und <i>PTTG1IP</i> von humanen leukämischen Zelllinien	41
Abbildung 16: Zuordnung der Patienten zu den Kohorten	41
Abbildung 17: Verlauf der <i>BCR-ABL1</i> -Transkriptzahlen und des -Quotienten eines <i>Responders</i> mit typischem Verlauf (R-28)	42
Abbildung 18: Verlauf der <i>BCR-ABL1</i> -Transkriptzahlen und -Quotienten eines <i>Responders</i> mit gutem Ansprechen, aber intermittierendem Verlust des MMRs im Beobachtungszeitraum (R-36)	42

Abbildung 19: Verlauf der <i>BCR-ABL1</i> -Transkriptzahlen und -Quotienten eines <i>Non-Responders</i> mit typischem Verlauf (nR-31).....	43
Abbildung 20: Verlauf der <i>BCR-ABL1</i> -Transkriptzahlen und des -Quotienten eines <i>Non-Responders</i> mit schlechtem Ansprechen, aber MMR im Beobachtungszeitraum (nR-36).....	43
Abbildung 21: Beispielhafte Fluoreszenz- und Amplifikationskurven von CML-Patienten mit unterschiedlichem Ansprechen auf die TKI-Therapie und einer Kontrollgruppe	44
Abbildung 22: Transkriptspiegel von <i>Separase/ESPL1</i> , <i>Securin/PTTG1</i> und <i>PTTG1 Interacting Protein/PTTG1IP</i> bei CML-Patienten	45
Abbildung 23: Transkriptspiegel von <i>Separase/ESPL1</i> bei CML-Patienten	46
Abbildung 24: Transkriptspiegel von <i>Securin/PTTG1</i> bei CML-Patienten	47
Abbildung 25: Transkriptspiegel von <i>PTTG1 Interacting Protein/PTTG1IP</i> bei CML-Patienten	48
Abbildung 26: 3D-Streudiagramm zur Veranschaulichung von 148 analysierten Proben.....	54
Abbildung 27: Abstand im Bezug zur Wahrscheinlichkeit <i>Responder/Non-Responder</i>	55
Abbildung 28: ROC-Analyse der Abstände.....	56
Abbildung 29: Verlauf der <i>BCR-ABL1</i> -Transkriptzahlen und des -Quotienten von nR-10	62
Abbildung 30: Verlauf der <i>BCR-ABL1</i> -Transkriptzahlen und des -Quotienten von nR-22	63
Abbildung 31: Verlauf der <i>BCR-ABL1</i> -Transkriptzahlen und des -Quotienten von nR-27	64
Abbildung 32: Verlauf der <i>BCR-ABL1</i> -Transkriptzahlen und des -Quotienten von nR-34	64
Abbildung 33: Verlauf der <i>BCR-ABL1</i> -Transkriptzahlen und des -Quotienten von nR-51	65
Abbildung 34: Verlauf der <i>BCR-ABL1</i> -Transkriptzahlen und des -Quotienten von R-1	66
Abbildung 35: Verlauf der <i>BCR-ABL1</i> -Transkriptzahlen und des -Quotienten von R-2	67
Abbildung 36: Verlauf der <i>BCR-ABL1</i> -Transkriptzahlen und des -Quotienten von R-3	68
Abbildung 37: Verlauf der <i>BCR-ABL1</i> -Transkriptzahlen und des -Quotienten von R-4	68
Abbildung 38: Verlauf der <i>BCR-ABL1</i> -Transkriptzahlen und des -Quotienten von R-5	69
Abbildung 39: Alter von 97 untersuchten CML-Patienten.....	70
Abbildung 40: Bruchpunktvarianten von 97 untersuchten CML Patienten	71
Abbildung 41: <i>BCR-ABL1</i> -Quotient von 97 untersuchten CML Patienten	72
Abbildung 42: Leukozytenzahl bei Diagnosestellung von 97 untersuchten CML Patienten	72
Abbildung 43: Zeit bis Erreichen von MMR bei 97 untersuchten CML-Patienten	73
Abbildung 44: Häufigkeit der Therapiekombinationen bei CML-Patienten	74
Abbildung 45: Assoziation TKI-Therapie mit der „Zeit bis MMR“ bei CML-Patienten.....	76
Abbildung 46: Assoziation <i>BCR-ABL1</i> -Quotient mit der „Zeit bis MMR“ bei CML-Patienten	77
Abbildung 47: Assoziation Leukozytenzahl mit der „Zeit bis MMR“ bei CML-Patienten.....	78
Abbildung 48: Assoziation Genexpression <i>Separase/ESPL1</i> mit der „Zeit bis MMR“ bei CML-Patienten	79
Abbildung 49: Assoziation Genexpression <i>Securin/PTTG1IP</i> mit der „Zeit bis MMR“ bei CML-Patienten	80
Abbildung 50: Assoziation Genexpression <i>PTTG1IP</i> mit der „Zeit bis MMR“ bei CML-Patienten	81
Abbildung 51: Assoziation Abstand mit der „Zeit bis MMR“ bei CML-Patienten	82

8 LEBENSLAUF

PERSONALIEN

Name und Vorname: Christiani Eva Louise
Geburtsdatum: 29.08.1996
Geburtsort: Mönchengladbach

SCHULISCHER WERDEGANG

2011 – 2015 Cornelius-Burgh-Gymnasium Erkelenz
21.06.2015 Abitur

UNIVERSITÄRER WERDEGANG

WS 2016/17 Beginn des Studiums (Humanmedizin)
Universität Heidelberg, Medizinische Fakultät Mannheim
03.09.2018 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M1)
2018 - 2022 Hauptstudium
13.10.2022 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M2)
November 2022 - Praktisches Jahr
Oktober 2023

PRAKTISCHES JAHR

1. Quartal (Innere Medizin) Klinik für Hämatologie und Onkologie, III. Medizinische Klinik, Universitätsklinikum Mannheim
2. Quartal (Wahlfach) Transfusionsmedizin, Universitätsklinikum Mannheim
3. Quartal (Chirurgie) Klinikum der Stadt Ludwigshafen
4. Quartal (Ambulante Medizin) ITM/TTZ/Strahlentherapie, Universitätsklinikum Mannheim

PRAXISERFAHRUNG

Oktober 2017 Wahlfach „Klinische Forschung“
2017 - 2020 College Journal Club Mannheim
2019 Absolventin Junior Scientific Masterclass/Fokko van der Woude Kolleg (JSM)
Februar 2021 Wahlfach „Translationale Forschung“

DANKSAGUNG

Beginnend richte ich meinen Dank an den Direktor der III. Medizinischen Klinik Herrn Prof. Dr. med. Wolf-K. Hofmann und an den Laborleiter Herrn Prof. Dr. med. Daniel Nowak für die Möglichkeit, die Dissertation im Wissenschaftlichen Labor der III. Medizinischen Klinik durchführen zu können.

Ein ganz herzlicher Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Wolfgang Seifarth für die Überlassung dieses interessanten Dissertationsthemas und die ausgezeichneten Bearbeitungsmöglichkeiten. Bei dieser Gelegenheit möchte ich mich zudem für die vielen konstruktiven Gespräche, Anregungen und die enorme Unterstützung bedanken. Die ermutigende Begleitung wird mir immer als bereicherender Austausch in Erinnerung bleiben.

Weiterhin danke ich Frau Priv.-Doz. Dr. sc. hum. Birgit Spiess, Frau Prof. Dr. med. Susanne Saußeke und Frau Dr. sc. hum. Nicole Naumann für die wertvollen fachlichen Anmerkungen und die Bereitstellung unentbehrlicher Patienteninformationen.

Besonderen Dank schulde ich Frau Prof. Dr. sc. Hum. Habil. Dipl.- Math. Christel Weiss, die mich bei der Durchführung der statistischen Analysen unterstützte und mir jederzeit durch kritischen Diskurs beim Verständnis statistischer Fragestellungen half. Anschließend möchte ich mich auch bei Frau Sylvia Büttner für die Unterstützung bei den graphischen Darstellungen bedanken.

Ich bedanke mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern vom Wissenschaftlichen Labor der III. Medizinischen Klinik für die gute Zusammenarbeit und angenehme Atmosphäre. Hierbei möchte ich insbesondere Frau Dipl.-Ing. Helga Kleinert für die exzellente Einarbeitung und Unterstützung während dieses Projektes meinen Dank aussprechen.

Bei dieser Gelegenheit möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Martin C. Müller danken, dessen Leidenschaft für die Hämatologie / Onkologie mich schon zu Beginn meines Studiums beeinflusst und mich zu der Wahl dieses Themas bewegt hat.

Mein persönlicher Dank richtet sich an meinen Lebensgefährten Alexander Korjagin, ohne dessen unermüdliche Geduld und liebevolle Verständnis dieser Arbeitsumfang nicht hätte gelingen können. Die mehrfache Durchsicht dieser Arbeit, seine differenzierten Anmerkungen sowie kritische Betrachtungen, jedoch insbesondere seine Fürsprache und sein moralischer Beistand haben mir den notwendigen Mut für die Vollendung dieser Dissertation gegeben.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei meiner Schwester Laura Marie Christiani für ihren Rückhalt, die Durchsicht meiner Arbeit und die vielen produktiven Hinweise, die zur Vollendung derselben unentbehrlich waren.

Abschließend möchte ich mich von ganzem Herzen bei meinen Eltern Silke und Ulf Christiani und meinen Großeltern Heide und Horst Christiani sowie Sigrid und Hermann-Josef Zitzen für die Ermutigungen, Zusprüche und fortwährende emotionale Unterstützung während des Verfassens dieser Arbeit und des gesamten Studiums bedanken.