

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

**Die Rolle von Influx- und Effluxkanälen in der Prädiktion der
therapiefreien Remission bei Patienten mit chronischer myeloischer
Leukämie**

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

vorgelegt von
Sébastien Rinaldetti

aus
Düdelingen (Luxemburg)
2017

Dekan: Prof. Dr. med. Sergij Goerd
Referentin: Frau Prof. Dr. med. Susanne Sauße

Und plötzlich in diesem mühsamen Nirgends, plötzlich
die unsägliche Stelle, wo sich das reine Zuwenig
unbegreiflich verwandelt –, umspringt
in jenes leere Zuviel.
Wo die vielstellige Rechnung
zahlenlos aufgeht.

Rainer Maria Rilke, *Duineser Elegien*

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1	EINLEITUNG	1
1.1	Einführung in die Thematik der chronischen myeloischen Leukämie (CML) .	1
1.2	Pathophysiologie	2
1.3	Von der Diagnose zur Therapie der CML	2
1.3.1	Diagnostik und Staging	2
1.3.2	CML Monitoring	3
1.4	Die CML als <i>model of cancer</i>	4
1.4.1	Therapie	5
1.5	BCR-ABL abhängige Resistenzmechanismen	8
1.5.1	BCR-ABL Mutationen	8
1.5.2	BCR-ABL Amplifikation	9
1.5.3	Klonale Evolution (auch BCR-ABL unabhängig)	9
1.6	BCR-ABL unabhängige Resistenzmechanismen	10
1.6.1	Pharmakogenetik und Pharmakokinetik	10
1.6.2	Stammzellnische	10
1.6.3	Alternative Signalwege und Epigenetik	11
1.7	ABCB1 (MDR1), ABCG2 und OCT1	12
1.8	Absetzstudien: CML-Heilung in Sicht?	14
1.9	Hypothese und translationale Relevanz des Forschungsprojektes	16
2	MATERIAL UND METHODEN	17
2.1	Instrumente	17
2.2	Chemikalien	17
2.3	Zubehör	18
2.4	Studiendesign	19
2.5	Aufarbeitung des peripheren Blutes	20
2.5.1	Pelletierung mononukleärer Zellen	20
2.5.2	RNA-Isolierung	21
2.5.3	cDNA-Synthese	22
2.6	Etablierung der Plasmidstandards	24

2.6.1	Plasmiddesign	24
2.6.2	pME2 Plasmid-Klonierung	24
2.6.3	pEX-A2 Plasmid-Klonierung	25
2.6.4	Plasmid-Aufreinigung mittels HiSpeed Plasmid Maxi Kit	26
2.6.5	Herstellung einer Verdünnungsreihe	26
2.7	Etablierung der qRT-PCR zur Messung der ABCG2, OCT1, ABCB1 und GUSB Expression	27
2.8	Messung der BCR-ABL Expression	29
2.9	Statistische Methoden	29
3	ERGEBNISSE	31
3.1	Patientencharakteristika	31
3.2	Expressions-Level der In- und Effluxkanälen zum Absetzzeitpunkt (<i>baseline</i>)	32
3.3	Einfluss der In- und Effluxkanälen auf die therapiefreie Remission	36
3.4	Testung unabhängiger Biomarker in einem multivariaten Cox Regressionsmodell zur Prädiktion der TFR	38
	DISKUSSION	41
4	ZUSAMMENFASSUNG	45
5	LITERATURVERZEICHNIS	47
6	EIGENANTEIL AN DATENERHEBUNG UND -AUSWERTUNG UND EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN	57
7	LEBENS LAUF	59
8	DANKSAGUNG	60
9	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	61

1 EINLEITUNG

1.1 Einführung in die Thematik der chronischen myeloischen Leukämie (CML)

Die Etymologie des Wortes ‚Leukämie‘ ist auf das altgriechische λευκός-weiß und αἷμα-Blut zurückzuführen, dies bedeutet so viel wie ‚weißes Blut‘. Die CML war vermutlich die erste Leukämie, die als eigenständige Entität erkannt wurde und deren Erstbeschreibung auf den Analysen von John Hughes Bennett und Robert Virchow basiert.(Bennett and University of Glasgow. Library, 1845; Virchow, 1975) Ernst Neumann konnte erstmals das Knochenmark als Ursprung der Erkrankung identifizieren.(Cooper, 2011) 1960 wurde das Philadelphia-Chromosom von Nowell und Hungerford entdeckt, welches jedoch erst Jahre später als reziproke Translokation zwischen dem langen Arm von Chromosom 9 und 22 beschrieben wurde.(Nowell and Hungerford, 1960) Seitdem gilt das Philadelphia-Chromosom als pathognomonischer Marker für die Diagnose der CML. Die Translokation ist für die Genese des Fusionsgens ‚BCR-ABL‘ verantwortlich,(Bartram et al., 1983) das zu einer konstitutiven aktiven Tyrosinkinase führt, mit der Folge einer kontinuierlichen Zellteilung und -vermehrung. Die Identifizierung dieser Abläufe führte zu der Entdeckung von Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI), die die Therapie der dahin tödlich verlaufenden CML und anderer Krebserkrankungen revolutionierten und den Grundpfeiler für die Ära der personalisierten Medizin setzten. (Druker et al., 1996; Goldman and Melo, 2001) Aufgrund des verhältnismäßig einfachen Pathomechanismus fungiert die CML als ein ‚model of cancer‘.(Hehlmann et al., 2005)

Die Inzidenz der CML beträgt 1-2 Neuerkrankungen pro 100.000 Personen pro Jahr.(Sant et al., 2010) Das mediane Erkrankungsalter liegt bei 65. Lebensjahren, in der Regel sind mehr Männer als Frauen von der Diagnose betroffen.(Berger et al., 2005; Hehlmann et al., 2007) Da aufgrund der derzeitigen Therapiemodalitäten CML Patienten die gleiche Lebenserwartung haben wie die Gesamtbevölkerung, steigt die Prävalenz dieser Erkrankung jährlich an.

Zu den auslösenden Faktoren der CML ist nur sehr wenig bekannt. Es konnte bisher gezeigt werden, dass ionisierende Bestrahlung und Benzol das Erkrankungsrisiko erhöhen.(Moloney, 1987; Vlaanderen et al., 2012)

1.2 Pathophysiologie

Der Pathomechanismus basiert auf der reziproken Translokation $t(9;22)(q34;q11)$ in progenitor Zellen des Knochenmarks.(Rowley, 1973) Das gebildete Fusionsgen BCR-ABL führt zu einer konstitutiv aktiven Tyrosinkinase.(Daley et al., 1990) Beim ABL-Gen handelt es sich um eine Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase dessen Sequenz sich auf dem langen Arm von Chromosom 9 befindet. Der *downstream* Signalkaskade konnte eine Rolle in der Zellzyklussteuerung und Apoptose zugeordnet werden.(Wang, 2000)

Das *breakpoint cluster region*-Gen (BCR-Gen) befindet sich auf dem langen Arm von Chromosom 22 und kodiert für eine Serin/Threonin-Kinase. Trotz intensiver Forschung ist die genaue Rolle dieses Wildtyps noch unbekannt. Im Gegensatz zum ABL-Gen besitzt das BCR-Gen, wie der Name schon sagt, mehrere mögliche Bruchpunktstellen, wodurch Fusionstranskripte unterschiedlicher Größe generiert werden: p190 (e1a2), p210 (e13a2, e14a2) und p230 (e19a2).(Deininger et al., 2000) Durch die Fusion erfolgt eine Phosphorylierung von ABL über den BCR-Teil, wodurch die Tyrosinkinase konstitutiv aktiv bleibt. Es wurde nachgewiesen, dass die unterschiedlichen Transkripte einen teilweise unterschiedlichen klinischen Phänotyp aufzeigen.(Hanfstein et al., 2014) Die häufigste Transkriptvariante ist p210, die bei 90% der Patienten nachgewiesen wird.(Deininger et al., 2000) Die ‚downstream‘ Signaltransduktion führt über den Ras/Raf/MEK/MAPK- und den JAK/STAT-Signalkaskade. Erstere beeinflusst die Zelladhäsion und führt bei Alteration zur erhöhten Migrationseigenschaften von Leukämiezellen.(Ma et al., 1997; Pendergast et al., 1993; Sawyers et al., 1995) Letztere ist im Rahmen der antiapoptotischen Wirkung unmittelbar an der malignen Transformation der hämatopoietischen Zellen beteiligt. Beim therapie-naiven Knochenmark fällt eine Granulozytose im Besonderen durch eine erhöhte Anzahl von Basophilen auf.(Chai et al., 1997; Horita et al., 2000; Ilaria and Van Etten, 1996) Es ist derzeit noch nicht bekannt in welchem Zellstadium der Granulopoese das Translokationsereignis stattfindet.

1.3 Von der Diagnose zur Therapie der CML

1.3.1 Diagnostik und Staging

Der klinische Verlauf der CML wird in drei Phasen unterteilt: chronische Phase (unbehandelt mit einer Dauer von ca. 4-6 Jahren), akzelerierte Phase (bis zu einem Jahr) und zuletzt die Blastenkrise (3-6 Monate). Die meisten Patienten werden in der

chronischen Phase (CP) diagnostiziert. Bis zu 50% der Diagnosen sind Zufallsdiagnosen im Rahmen von routinemäßigen Blutbilduntersuchungen. Das klinische Bild der CML ist geprägt von Symptomen wie Hypermetabolismus, Splenomegalie, Anämie und Allgemeinsymptomen wie Schwäche.(Hehlmann et al., 2007) Die Verdachtsdiagnose stellt sich in Zusammenschau des Differentialblutbildes und der Knochenmarkzytologie. Die Bestätigung der Diagnose erfolgt über eine PCR (*polymerase chain reaction*) zum Transkriptnachweis (meist e13a2 und e14a2) und in der Regel auch zytogenetisch über FISH (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung). Eine Risikostratifizierung der Patienten erfolgt derzeit über den EUTOS- und ELTS-Score.(Hasford et al., 2011) In Rahmen von Studien werden jedoch noch oft der Sokal- sowie der EURO Score benutzt, die jedoch beide vor der TKI- Ära entwickelt wurden.

1.3.2 CML Monitoring

Das Therapieansprechen kann durch 3 unterschiedliche Methoden determiniert werden: klinisch (*haematologic response* - HR), zytogenetisch (*cytogenetic response*-CyR) und molekular (*molecular response* – MR).(Hochhaus et al., 2009) Im Laufe der Jahre sind die beiden ersten Monitoring-Methoden zur CML Verlaufskontrolle in den Hintergrund geraten. Wegen der Standardisierbarkeit und schnellen Durchführbarkeit hat sich das molekulare Monitoring mittels quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) durchgesetzt. Die jeweilige Expression der Fusionstranskripte wird mittels absoluter Quantifizierung anhand von Plasmidstandards bestimmt. Als Referenzgen werden in der Regel die Gene BCR, ABL oder GUSB benutzt. Die logarithmische Tiefe des Ansprechens wird in Relation mit der IRIS-*Baseline* gesetzt deren Ausgangswert auf arbiträr 100% gesetzt wurde.(Marin et al., 2012) Eine MMR (*major molecular response*) entspricht einer 1000-fachen Reduktion des Ausgangswertes. MR⁴IS (*molecular response log(10⁴) nach international scale*) hingegen entspricht einer Reduktion der CML Zellen um das 10.000-fache.(Tabelle 1)

Tabelle 1: ELN Kriterien des hämatologischen, zytogenetischen und molekularen Ansprechens. (Tabelle aus Onkopedia database, 2017)

Methode	Remission	Abkürzung	Parameter
Hämatologisch	komplett	CHR	<ul style="list-style-type: none"> Leukozyten < 10 x 10⁹ /L, Basophile < 5 % keine Myelozyten, Promyelozyten oder Myeloblasten im Differenzialblutbild Thrombozyten < 450 x 10⁹ /L Milz nicht tastbar
Zytogenetisch	komplett	CCyR*	keine Ph+ Metaphasen
	partiell	PCyR*	1-35% Ph+ Metaphasen
	minor	mCyR	36-65% Ph+ Metaphasen
	minimal	minCyR	66-95% Ph+ Metaphasen
	keine	keine CyR	> 95% Ph+ Metaphasen
Molekular	major	MMR	BCR-ABL Transkripte (IS)** < 0,1%***
	tief	MR ⁴	BCR-ABL Transkripte < 0,01%
	tief	MR ^{4,5}	BCR-ABL Transkripte < 0,0032%

Gemäß den Leitlinien des European LeukemiaNet (ELN) wird das TKI Therapieansprechen in *optimal*, *warning* und *failure* unterteilt. Diese Einteilung basiert auf dem Grad der erreichten HR, CyR oder MR zum Zeitpunkt von 3, 6 bzw. 12 Monaten. (Baccarani et al., 2013) Bei optimalem Ansprechen wird kein Therapiewechsel empfohlen, wohingegen ein *warning* auf die Notwendigkeit eines engmaschigen Monitorings hinweist. Therapieversagen (*failure*) ist eine direkte Indikation zur Therapieumstellung. Generell wird bei TKI Versagen eine Mutationsanalyse empfohlen. Die TKI Plasmakonzentration wird in der Regel nur bei unerwartet ausgeprägten Nebenwirkungen bestimmt.

1.4 Die CML als *model of cancer*

Die CML kann in vieler Hinsicht als *model of cancer* bezeichnet werden. Sie ist die erste Krebsentität, die einer bestimmten chromosomalen Aberration (Philadelphia Chromosom) zugeordnet werden konnte. Außerdem genügt nur ein Ereignis im Sinne einer genetischen Läsion, auch *single hit* genannt, um das Fusionstranskript zu generieren. Zudem ist die CML die erste maligne hämatologische Entität, die durch ein rationales Wirkstoffdesign zu einer zielgerichteten und personalisierten

Therapie führte. All diese Eigenschaften ergeben eine sehr günstige Grundlage zur Erforschung der Kanzerogenese, die Rückschlüsse auf andere maligne Entitäten erlaubt. Jedoch ist trotz der vielen Untersuchungen zur CML Pathogenese noch immer ungeklärt, wodurch diese Erkrankung konkret auslöst wird und in welcher Zellart die Aberration als erstes stattfindet. (Hehlmann et al., 2005)

1.4.1 Therapie

Vor 15 Jahren wurden als CML Therapie hauptsächlich Interferon-alpha, Hydroxyurea und niedrig-dosiertes Cytarabine eingesetzt. Eine weitere Therapieoption war die Stammzelltransplantation. Die Entwicklung des ersten TKI Imatinib (initial STI571), sowie dem in-vitro und in-vivo Beweis seines therapeutischen Nutzens revolutionierte die Therapie sowie Prognose der CML. (Druker et al., 2001) Imatinib ist ein kompetitives ATP-Mimetikum, das zur Gruppe der 2-Phenylaminopyrimidine gehört, welche eine Gruppe von Tyrosinkinase, darunter ABL, inhibiert. Dieses TKI erlaubt das Erreichen einer kompletten zytogenetischen und molekularen Remission und führte zu einem deutlich längerem progressionsfreien und Gesamtüberleben der CML Patienten als unter bisherigen Therapien. (O'Brien et al., 2003) Die kristallographische Aufarbeitung der Tyrosinkinase führte zu weiteren Erkenntnissen in der Interaktion zwischen TKIs und den Proteinen. Infolgedessen konnten die TKI der 2. Generation Dasatinib und Nilotinib sowie der 3. TKI-Generation Bosutinib und Ponatinib entwickelt werden.

Nilotinib ist ein Aminopyrimidin-Derivat, dessen Aktion zielgerichteter auf die ABL Kinase ausgelegt ist als bei Imatinib und selbst bei manchen Imatinib-resistenten ABL-Mutationen immer noch Wirkung zeigt. In der ENESTnd (*Evaluating Nilotinib Efficacy and Safety in Clinical Trials-Newly Diagnosed Patients*) wurde die Überlegenheit von Nilotinib im Vergleich zu Imatinib 400mg im Hinblick auf die Dauer bis zum Erreichen einer MMR und dem progressionsfreien Überleben bewiesen. (Larson et al., 2012)

Dasatinib ist ein Piperazinylderivat, das hemmend auf SRC und ABL Kinasen wirkt. Dieses TKI deckt zum Teil ein anderes Spektrum an Imatinib-resistenten ABL-Mutationen ab als Nilotinib. In der DASISION Studie (*dasatinib vs imatinib in patients with newly diagnosed chronic phase chronic myeloid leukemia*) wurde eine Überlegenheit von Dasatinib gegenüber Imatinib durch eine rascher erreichte und tiefere molekulare Remission gezeigt. Ein Überlebensvorteil konnte indes nicht nachgewiesen werden. (Kantarjian et al., 2012)

Auch Bosutinib als dualer SRC und ABL Inhibitor zeigte in der BELA Studie eine stärkere BCR-ABL-inhibitorische Aktivität als Imatinib in der 400 mg-Dosierung. Jedoch hatte diese Studie eine hohe Patientenabbruchrate aufgrund des Nebenwirkungsprofils von Bosutinib 500mg.(Cortes et al., 2012a) In der neu aufgelegten BFORE Studie wurde eine niedrigere Dosierung (400mg) erprobt. Nebenwirkungen wie Diarrhoe und Erhöhung der Leberparameter wurden dadurch attenuiert. Ähnlich wie bei Dasatinib und Nilotinib zeigte sich ein schnelleres molekulares Ansprechen gegenüber Imatinib.(Cortes et al., 2017)

Ponatinib gilt als einziger TKI, der bei der T315I Mutation im ABL Gen wirkt.(Cortes et al., 2012b; O'Hare et al., 2009) Die EPIC Studie, in der dieser TKI ebenfalls im Vergleich zu Imatinib eingesetzt wurde, musste wegen dem vermehrten Auftreten von arteriellen Verschlusskrankheiten im Ponatinib-Arm abgebrochen werden.(Lipton et al., 2016)

Das Nebenwirkungsprofil der TKIs unterscheidet sich.(Druker et al., 2006) Die häufigsten Imatinib-Nebenwirkungen sind Ödeme, muskuloskeletale Schmerzen bzw. Krämpfe und Diarrhoe.(Kalmanti et al., 2015) Die Nebenwirkungen von Nilotinib umfassen Kopfschmerzen, Erhöhung der Cholestaseparameter, Erhöhung des Blutzuckerspiegels und arterielle Verschlusskrankheit. Unerwünschte Arzneimittelwirkungen von Dasatinib bestehen hauptsächlich aus Thrombozytopenie und Pleuraergüssen. Bosutinib zeigt erhöhte Lebertoxizität und eine höhere Rate an Diarrhoen im Vergleich zu den anderen TKIs.(Cortes et al., 2012a; Kantarjian et al., 2012; Larson et al., 2012)

Bei Therapieversagen (Tabelle 2) gilt als letzte Option die allogene Stammzelltransplantation (SZT). Im Gegensatz zu den TKIs ist die allogene SZT die einzige bisher bewiesene kurative Therapie.(Baccarani et al., 2013) Bislang geht man davon aus, dass unter der Behandlung mit TKIs immer eine minimale Resterkrankung (*minimal residual disease* – MRD) verbleibt. Eine totale Eradikation von malignen CML-Progenitorzellen in der Stammzellnische des Knochenmarks scheint nicht möglich (siehe auch Kapitel 1.5.). Eine neue Substanz, als Therapieoption bei Therapieversagern ist derzeit in Entwicklung (ABL001, Asciminib). Dieser Wirkstoff bindet nicht an der Kinasedomäne des ABL Proteins, sondern an einer regulatorischen Untereinheit und führt durch einen allosterischen Mechanismus zu einer Abnahme der Kinaseaktivität. Somit sollte diese Substanz auch bei allen bisher bekannten Kinasedomänenmutationen wirken. Das Wirkungsspektrum von

ABL001 wird aktuell in Studien als Einzeltherapeutikum oder in Kombination mit anderen TKIs evaluiert. (Wylie et al., 2017) Nach ELN Leitlinien ist die derzeitige Standardtherapie Imatinib, Nilotinib und Dasatinib. Bei Versagen sollte das TKI gewechselt werden bzw. auf Bosutinib oder Ponatinib umgestellt werden.

Tabelle 2: Resistenzkriterien (*Failure*) gemäß der ELN Leitlinien. (Baccarani et al., 2013, Tabelle aus Onkopedia database, 2017)

Zeit nach Beginn der TKI-Therapie, Monate	Ansprechen	
	hämatologische und zytogenetische Kriterien	PCR-Kriterien
3	keine CHR, keine CyR	
6	>35% Ph+, keine PCyR	>10% BCR-ABL (IS)
12	>0% Ph+, keine CCyR	>1% BCR-ABL (IS)
18		>0,1% BCR-ABL (IS)
jeder Zeitpunkt	<ul style="list-style-type: none"> • Verlust der CHR • Verlust der CCyR • Mutationen mit komplettem Verlust der TKI-Wirkung • klonale Evolution 	<ul style="list-style-type: none"> • Verlust der MMR • andere Mutationen mit reduzierter TKI-Bindung

1.5 BCR-ABL abhängige Resistenzmechanismen

Generell kann die TKI Resistenz, sei sie nun BCR-ABL abhängig oder unabhängig, in primäre, d.h. von Beginn der Erkrankung an, oder sekundäre, d.h. erworbene Resistenz, unterteilt werden.(Abbildung 1)(Apperley, 2007)

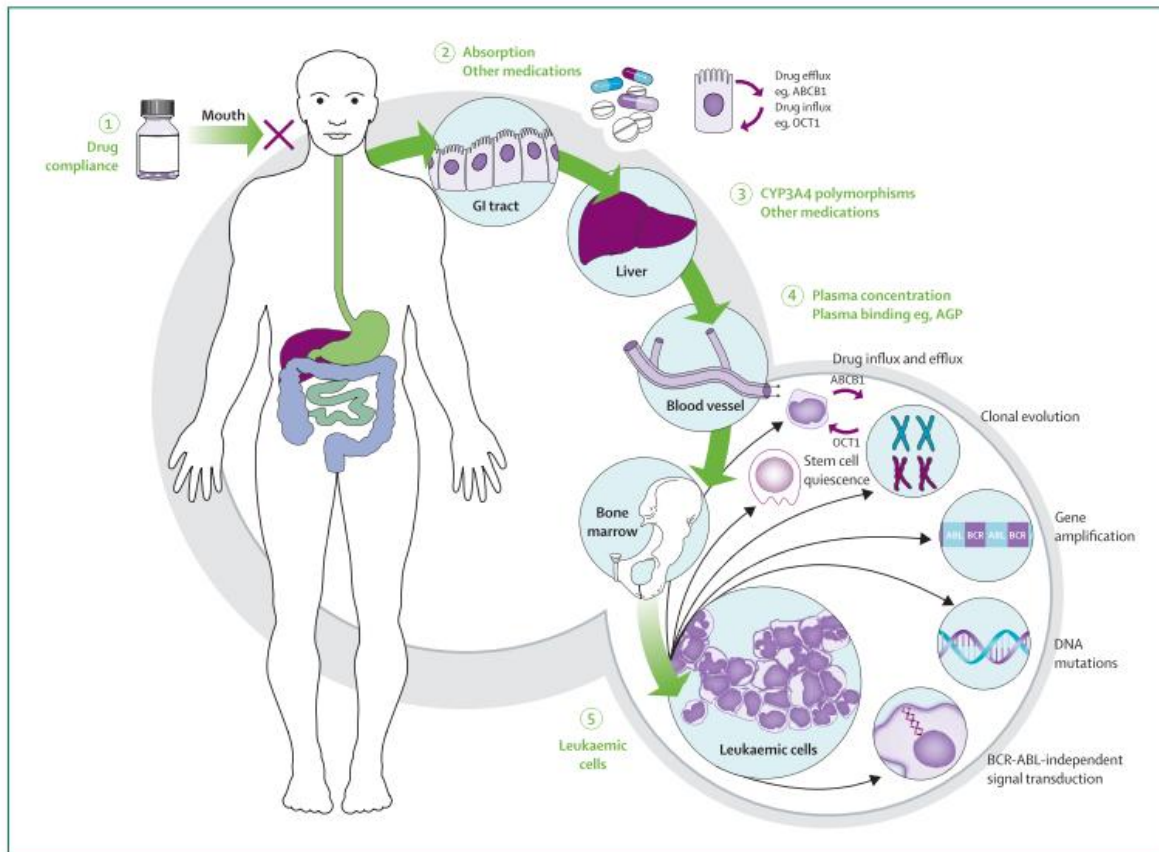


Abbildung 1: Zusammenfassung der BCR-ABL abhängigen und unabhängigen Resistenzmechanismen.(Abbildung aus Apperley, 2007)

1.5.1 BCR-ABL Mutationen

Die Rate der Punktmutationen im BCR-ABL-Fusionsgen variiert zwischen 40-90%, und bis zu 57% der resistenten Patienten haben mindestens zwei Mutationen im BCR-ABL-Gen.(Quintás-Cardama et al., 2008, 2009) Die *Hotspot*-Regionen befinden sich am *P-Loop*, am Aktivierungsloop, an der katalytischen Domäne sowie an der TKI Bindungsstelle des Fusionsproteins.(Apperley, 2007) Nicht jede Mutation führt sofort zu einer Resistenzentwicklung, jedoch geben bestimmte Mutationen eine Rationale zum TKI-Wechsel, um eine Resistenz zu vermeiden.(Roche-Lestienne et al., 2002) Zu einer der häufigsten Mutationen zählt T315I, welche gleichzeitig auch die fatalste Mutation darstellt, da in diesem Fall nur noch Ponatinib Wirkung zeigt. Eine

Forschungsarbeit zeigte, dass das Fusionsprotein durch die Synthese von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) die Mutagenese begünstigt.

1.5.2 BCR-ABL Amplifikation

Generell treten Genamplifikationen häufiger als Punktmutationen auf. In einer Studie wurde jedoch nachgewiesen, dass nur bei 2 von 66 resistenten Patienten eine BCR-ABL Amplifikation stattfand. (Hochhaus et al., 2002) Tatsächlich basieren die in-vitro-Resistenzen hauptsächlich auf BCR-ABL-Überexpression nach Imatinib-Langzeitexposition. (Mahon et al., 2000) In Zelllinien-Experimenten konnte gezeigt werden, dass nach Imatinibdeprivation das Fusionstranskript schnell herunterreguliert wird. Dieser Mechanismus gibt einen Hinweis darauf, dass eine zu hohe BCR-ABL Expression schädlich für das Überleben der Zellen sein könnte. (Tipping et al., 2001) Eine weitere Studie zeigte, dass Zellen mit BCR-ABL Amplifikation schneller resistente Subklone bilden. (Barnes et al., 2005)

1.5.3 Klonale Evolution (auch BCR-ABL unabhängig)

Im Krankheitsverlauf der CML können zusätzliche genetische Aberrationen im Ph⁺-Klon auftreten, auch *additional chromosomal aberrations* (ACA) genannt. Diese werden je nach Art und Grad der Aberration in *minor route-* bzw. *major route-*ACAs unterteilt. Während im Rahmen einer Blastenkrise bis zu 80% der Patienten eine ACA aufweisen, sind es in der chronischen Phase lediglich 10%. Durch den Selektionsdruck der TKIs selektieren sich im Verlauf *die* Klone heraus, dessen Aberrationen einen Überlebensvorteil bieten. In diesem Kontext wurde in der CML IV Studie anhand von 1551 Patienten nachgewiesen, dass die Unterscheidung zwischen major route- und minor route-ACAs eine Risikostratifizierung erlaubt und einen signifikanten Einfluss auf das progressionsfreie Überleben sowie das Gesamtüberleben von CML Patienten hat. (Fabarius et al., 2011, 2015)

Des Weiteren wurde bestätigt, dass in BCR-ABL negativen Subklonen von TKI-resistenten Patienten Mutationen, ähnlich wie beim myelodysplastischen Syndrom, bei myeloproliferativen Neoplasien und bei der akuten myeloischen Leukämie eine große Rolle spielen (z.B. DNMT3A, EZH2, RUNX1, TET2, TP53, U2AF1 und ZRSR2). Diese Mutationen können sowohl im Ph⁺ als auch im Ph⁻ Klon auftreten. Sie können auch vor Auftreten der BCR-ABL Translokation im selben Klon bereits vorhanden sein. Die hier beschriebene Studie analysiert jedoch nur eine kleine

Anzahl von Zielgenen. Somit liegt in der Genomanalyse von Subkolonien der Stammzellnische ein enormes Aufklärungspotential.(Schmidt et al., 2014)

1.6 BCR-ABL unabhängige Resistenzmechanismen

1.6.1 Pharmakogenetik und Pharmakokinetik

Auch die Bioverfügbarkeit und die Plasmaproteinbindung spielen eine Rolle in der CML-Resistenzentwicklung. Imatinib wird durch das Cytochrome p450 Isoenzym P3A4 in der Leber metabolisiert. Somit wird der Plasmaspiegel von Imatinib auch von der Komedikation der Patienten beeinflusst.(Apperley, 2007; Cohen et al., 2002; Lucas et al., 2008; Takahashi et al., 2010) Imatinib ist zu 95% an Albumin gebunden und nur teilweise an das Alpha-1 Glycoprotein-1 (AGP-1). Nur freies Imatinib kann in die Zelle eindringen und seine Wirkung entfalten.(Quintás-Cardama et al., 2009)

Die intrazelluläre Konzentration von Imatinib wird am häufigsten über folgende drei Kanäle reguliert: OCT1 (SLC22A1), ABCB1 (MDR1) und ABCG2 (BCRP). Die weiteren Funktionen dieser Transporter werden im Absatz 1.7 gesondert erläutert, da diese ein zentrales Thema dieser Arbeit sind.

1.6.2 Stammzellnische

Die Reduktionsgeschwindigkeit der leukämischen Zelllast ist biphasisch. Ein entsprechendes mathematisches Modell lässt den Schluss zu, dass in einer ersten Phase eine schnelle Reduktion der Leukämie last erfolgt, diese jedoch in einer zweiten Phase abflacht. Somit geht man davon aus, dass zu Beginn alle differenzierten Ph⁺ Zellen eradiziert werden und danach erst die Progenitorzellen eliminiert werden .(Graham et al., 2002; Michor et al., 2005) Man vermutet noch eine 3. Phase, eine relativ konstante Phase, in der die langsame Eradikation der Stammzellen erfolgt. Es wurde bestätigt, dass ruhende CD34⁺ Ph⁺ Stammzellen konstitutiv resistent gegen TKIs sind.(Apperley, 2007) Nach langjähriger TKI Therapie zeigen Absetzversuche (siehe Abschnitt 1.8.), dass auch bei Patienten in tiefer molekularer Remission (MR⁴ oder MR^{4.5}) bzw. mit nicht mehr nachweisbarem Transkript-Level dennoch eine hohe Wahrscheinlichkeit besteht (+/- 50%), dass diese einen Rückfall erleiden. Dies beweist die Persistenz einer minimalen Resterkrankung. In einer Arbeit wurde vor kurzem festgestellt, dass TKIs in Kombination mit PPAR γ -Agonisten eine anhaltende Remission nach Therapieabsetzen hervorrufen können, da diese Agonisten die Stammzellen aus

ihrer ruhenden Phase holen. Die Eradikation der leukämischen Stammzellen ist die vielversprechendste Methode, um eine Heilung der CML zu erreichen, aber die Resistenzmechanismen dieser Zellen und die Rolle ihrer Mikroumgebung sind bisher nur mangelhaft erforscht.(Apsel Winger and Shah, 2015)

1.6.3 Alternative Signalwege und Epigenetik

In zahlreichen Studien wurde nachgewiesen, dass die Epigenetik ein wichtiger Faktor in der Resistenzentwicklung der CML ist.(Bixby and Talpaz, 2011; Jabbour et al., 2006; Johansson et al., 2002; Koptyra et al., 2006; Lahaye et al., 2005; Lee et al., 2007; Quintás-Cardama et al., 2008) Die Überexpression von Histon-Deacetylasen und die Suppression von Histon-Acetyltransferasen spielen eine wichtige Rolle in der Selbsterneuerung von leukämischen Stammzellen und fördern die Entwicklung von Resistenzen. Studien konnten zeigen, dass deacetylierende Wirkstoffe in Kombination mit TKI zwar eine proapoptotische Wirkung in vivo zeigen, jedoch klinisch keinen nennenswerten Effekt auf das Überleben von Patienten in Blastenkrise haben.(Bhatia et al., 2009; Fiskus et al., 2006; Guilhot et al., 2008; Kircher et al., 2009)

Die ‚downstream‘ Kaskade des BCR-ABL Proteins involviert eine hohe Anzahl an verschiedenen Signalkaskaden, deren Rolle in der Resistenzentwicklung noch diskutiert wird: SRC Kinasenfamilie, JAK/STAT, P53/MYC und die RAS/RAF/MEK Signalkaskade.(Bixby and Talpaz, 2011)

1.7 ABCB1 (MDR1), ABCG2 und OCT1

Wie oben beschrieben spielen die verschiedenen In- und Effluxkanäle eine wichtige Rolle in der CML-Therapie.

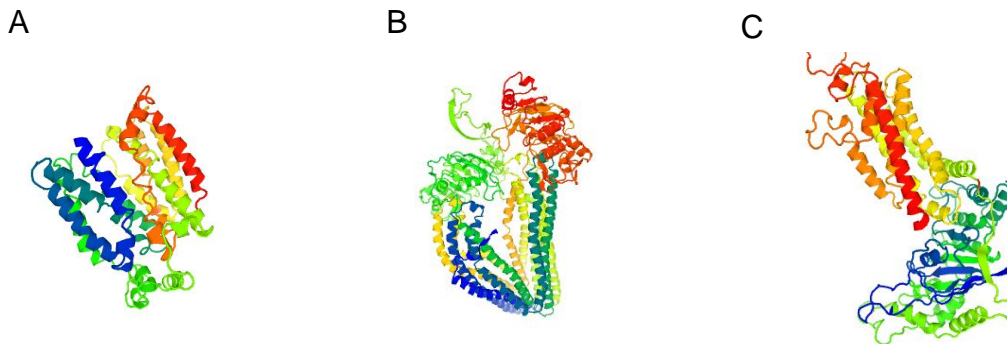


Abbildung 2: Dreidimensionale Proteinstruktur der Transmembran-Kanäle OCT1 (SLC22A1) (A), ABCB1 (B) und ABCG2 (C). Das Design basiert auf der Rekonstruktion mittels der Swissmodel Software.(Biasini et al., 2014)

Der Effluxkanal ABCB1 gehört zu der ABC-(ATP binding cassette) Transporter-Familie B1, d.h. der Efflux von Substanzen aus der Zelle ist ATP-abhängig und unabhängig der Ladung des transportierten Moleküls. Die ABC-Transporter-Familie ist für die Entwicklung von Resistenzen auf zahlreiche Xenobiotika bei Tumorzellen verantwortlich, daher auch die Bezeichnung MDR ‚multidrug resistance‘. ABCB1 ist hauptsächlich für die Homöostase der Bluthirnschranke verantwortlich und einer der Gründe, weshalb eine Aufsättigung von Medikamenten im Liquor cerebrospinalis so problematisch ist.(Dicato et al., 1997) Ein Zusammenhang zwischen ABCB1 Punktmutationen und dem Erreichen einer MMR wurde bestätigt.(Dulucq et al., 2008) In den bisherigen Studien lieferte Dasatinib die beste Evidenz, als Substrat für ABCB1 zu gelten.(Eadie et al., 2014) In-vivo-Experimente bestätigten, dass eine Inhibition von ABCB1 in ABCB1-überexprimierenden Zelllinien zu einer Reduktion der mittleren inhibitorischen Konzentration (IC₅₀) von Dasatinib führt. Diese Substrat-Spezifität von ABCB1 konnte mittels radioaktiv markiertem Dasatinib nachgewiesen werden. Auch für Nilotinib und Imatinib gibt es eine in-vitro-Evidenz auf eine Interaktion mit ABCB1. Nilotinib zeigt jedoch eine konzentrationsabhängige Interaktion mit ABCB1 und ABCG2, da bei hohen Nilotinib Konzentrationen eine Inhibition beider Kanäle erfolgt.(Eadie et al., 2014) In einer klinischen Studie konnte des Weiteren gezeigt werden, dass Imatinib-resistente CML-Patienten mit hoher

ABCB1 Expression ein gutes Ansprechen nach einem Wechsel auf Nilotinib zeigten.(Agrawal et al., 2014) Zudem konnte in einer kürzlich erschienenen Studie nachgewiesen werden, dass insbesondere der mRNA Expressionverlauf von ABCB1 mit dem molekularen Ansprechen negativ korreliert.(Eadie et al., 2017)

ABCG2, auch bekannt als das ‚breast cancer resistance protein‘, gehört wie ABCB1 zu den ATP-abhängigen Transportern und existiert im Gegensatz zu ABCB1 als Halbtransporter.(Abbildung 2) Eine Dimerisierung führt zu einem funktionellen membranständigen Homodimer. ABCG2 als Resistenzgen wurde erstmals bei Studien zu Brustkrebs beschrieben, daher auch die Bezeichnung als *breast cancer resistance protein* (BCRP). Es wurde nachgewiesen, dass ABCG2 eine Akkumulation diverser Chemotherapeutika (Mitoxantron, Doxorubicin und Daunorubicin) verhindert und so zu einer reduzierten Zytotoxizität dieser Medikamente führt.(Allen and Schinkel, 2002) Studien belegten, dass Imatinib, Nilotinib und Dasatinib Substrate von ABCG2 sind. Neben dem reinen Efflux dieser Substanzen zeigten Imatinib und Nilotinib noch weitere Wechselwirkungen mit dem ABCG2 Transporter. In-vitro-Experimente belegten, dass Imatinib den Efflux von ABCG2-Substraten im Sinne eines kompetitiven Antagonisten hemmt. Jedoch nur wenige Studien konnten bestätigen, dass sich die intrazelluläre Konzentration von Imatinib in Abhängigkeit der ABCG2 Proteinexpression verändert.(Allen and Schinkel, 2002) Somit geht man derzeit davon aus, dass es sich bei Imatinib eher um ein ABCG2 Inhibitor als um ein ABCG2 Substrat handelt. Nilotinib beeinflusst die Funktion dieses Transporters konzentrationsabhängig, indem er einen direkten Einfluss auf dessen ATPase-Aktivität hat und ist somit nicht direkt ein Substrat von ABCG2. Wechselwirkungen mit Dasatinib wurden nicht nachgewiesen.(Eadie et al., 2014)

Der Influxkanal OCT1 (*human organic cation transporter 1*) gehört zu einer Gruppe von drei ähnlichen Influxkanälen, der *solut carrier* Familie SLC22A. Das Transportprotein besteht aus 12 Transmembran-Helizes, die ausschließlich Kationen in die Zelle einschleusen.(Abbildung 2) Das zugrundeliegende Gen befindet sich auf Chromosom 6. OCT1 spielt eine wichtige Rolle in der Absorption und in der Verteilung von Xenobiotika und wird hauptsächlich in Hepatozyten exprimiert.(Burckhardt and Wolff, 2000; Jonker and Schinkel, 2004) In funktionellen in-vitro-Assays wurde beschrieben, dass die intrazelluläre Konzentration von radioaktiv markiertem Imatinib in Kombination mit spezifischen Influxtransporter-blockierenden Medikamenten in CML-Zelllinien abnimmt.(Ciarimboli et al., 2004) Der

gemeinsame Nenner dieser blockierenden Substanzen war OCT1. Prazosin stellte sich als potentester Inhibitor heraus. Auf Basis dieser Arbeit erfolgte die Untersuchung der OCT1-Aktivität (OA) bei CML.(White et al., 2006) Definiert wurde diese als Differenz zwischen der intrazellulären Aufnahme von Imatinib mit und ohne Prazosin. Eine positive Korrelation zwischen der OA und dem Erreichen von MMR bzw. Resistenzentwicklung wurde dabei bestätigt.(Engler et al., 2010; White et al., 2007) Ein Zusammenhang zwischen der OCT1 Expression und dem Gesamtüberleben bzw. dem molekularen Ansprechen ist hingegen noch nicht endgültig bewiesen.(White et al., 2009) Imatinib konnte als Substrat bestätigt werden. Für Dasatinib und Nilotinib gibt es keine klaren Hinweise auf eine Interaktion mit OCT1. Die Korrelation der OCT1 mRNA Expression mit dem TKI-Ansprechen lieferte in bisherigen Studien sehr widersprüchliche Ergebnisse, teils wegen Expressionsmessungen an unterschiedlichen Zellpopulationen, teils aber auch wegen der unterschiedlichen Isoformspezifität der jeweilig ausgewählten Primer.(Angelini et al., 2013; Crossman et al., 2005; Erben et al., 2010; Giannoudis et al., 2013; Nardinelli et al., 2012; Wang et al., 2008; Zhang et al., 2009; Zhong et al., 2012)

1.8 Absetzstudien: CML-Heilung in Sicht?

Die Fortschritte in der Therapie der CML erlauben es, dass man bei einer Erkrankung, die noch vor 20 Jahren fast immer zum Tod geführt hat, heute an das Absetzen der Therapie denken kann. Das Absetzen der TKIs wird zukünftig zu einem wichtigen Therapieziel werden, einerseits aufgrund der belastenden TKI-Nebenwirkungen, andererseits wegen dem guten Ansprechen und den hohen Kosten einer TKI-Therapie - mit Blick auf die beachtliche finanzielle Entlastung der nationalen Gesundheitsökonomien.(Saußele et al., 2016) Den Anstoß gab vor allem die multizentrische STIM (STop IMatinib) Studie in der 100 Patienten nach 2 Jahren oder mehr in DMR (*deep molecular response*) Imatinib absetzten, aber nur 40% der Teilnehmer einen molekularen Rückfall erlitten.(Etienne et al., 2017; Mahon et al., 2010) Nach dieser Studie folgten viele weitere Absetzstudien, auch mit anderen TKIs, die allesamt eine molekulare Rückfall-Rate zwischen 40-60% zeigten.(Hochhaus et al., 2017; Imagawa et al., 2015; Mori et al., 2015; Ross et al., 2010, 2013) Bislang erreichten alle Studienpatienten, die einen molekularen Rückfall hatten, nach Wiederaufnahme der TKI-Therapie eine gute molekulare Remission. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Dauer der vorhergehenden TKI Therapie,

aber auch die Dauer des molekularen Ansprechens ausschlaggebende Faktoren für den Absetzerfolg sind. Die EURO-SKI Studie ist bis dato die weltweit größte multizentrische Absetzstudie (821 Patienten) mit dem Ziel, standardisierbare Bedingungen zu eruieren, die eine sichere und anhaltende therapiefreie Remission (TFR) erlauben. In dieser Arbeit wurde die Expression von ABCG2, ABCB1 und OCT1 zum Zeitpunkt des Absetzens (*baseline*) bei 132 Patienten aus der EURO-SKI Studie gemessen. Die Studienteilnehmer wurden ausschließlich im ‚Mannheimer Exzellenzzentrum für CML‘ gescreent. (Mahon et al., 2016)

Trotz der hohen Rate an Patienten, die in TFR bleiben, wagt man es derzeit noch nicht, von einer Heilung der CML zu sprechen. In der Tat, wurden bei Patienten mit anhaltender TFR zwei unterschiedliche Phänomene nachgewiesen: Ein Teil der Patienten hat dauerhaft ein nicht mehr nachweisbares Transkript-Level im peripheren Blut, der andere Teil zeigt eine fluktuierende BCR-ABL Expression ohne MMR-Verlust. Mathematische Modelle lassen vermuten, dass dies einerseits mit einem unterschiedlichen Grad der leukämischen Stammzelleradikation zusammenhängt, andererseits aber auch durch eine kontinuierliche Immunantwort gegen CML Zellen verursacht werden kann. (Tang et al., 2012) Es konnten bereits zahlreiche Studien den wichtigen Stellenwert des Immunsystems in der CML hervorheben. Eine Kombinationstherapie mit pegyliertem IFN-alpha scheint nicht nur ein tieferes molekulares Ansprechen zu erlauben, sondern auch die Wahrscheinlichkeit für eine anhaltende TFR zu erhöhen. (Burchert et al., 2015; Ilander et al., 2017; Schütz et al., 2017)

Der BCR-ABL-Quotient ist bei Patienten mit sehr tiefer molekularer Remission nicht als TFR Prädiktor geeignet, da auch BCR-ABL negative Patienten zu einem großen Anteil einem MMR Verlust unterliegen. (Mahon et al., 2010) Somit ist man nun auf der Suche nach neuen Biomarkern zur Prädiktion der TFR. Die derzeit klinischen Dauer der Therapie sowie der molekularen Remission und in einigen Studien auch *risk scores*. (Saußele et al., 2016) Prädiktive Biomarker begrenzen sich derzeit auf die Anzahl der natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und CD86 Expression auf dendritischen Zellen. (Ilander et al., 2017; Schütz et al., 2017). In dieser Arbeit wird jedoch eine Analyse der Pharmakogenetik durchgeführt, im Sinne der Expressionsanalyse relevanter Influx- und Effluxkanäle. Biomarkerbestimmungen werden in der Regel zum Zeitpunkt des Absetzens (*baseline*) durchgeführt.

1.9 Hypothese und translationale Relevanz des Forschungsprojektes

Die Hypothese dieser Arbeit basiert auf der Annahme, dass die Pharmakogenetik im Sinne von Influx- bzw Effluxkanälen einen Einfluss auf den Absetzerfolg bei CML Patienten haben. Da ABCG2, ABCB1 (MDR1) und OCT1 nicht nur eine Rolle in der Resistenzentwicklung, sondern auch in der Prädiktion eines tiefen molekularen Ansprechens spielen, ist davon auszugehen, dass Patienten anhand konstitutioneller (*germline*) Unter- bzw. Überexpression dieser Kanäle unterschiedliches Ansprechen haben und damit unterschiedliche Voraussetzungen für einen TFR-Erfolg zeigen. Da bisherige Arbeiten hauptsächlich den Einfluss des Immunsystems auf den TFR-Erfolg analysierten, werden in dieser Untersuchung ein Teil der pharmakogenetischen Einflussfaktoren auf die TFR analysiert. Es soll des Weiteren eine standardisierbare Methodik entwickelt werden, die eine sensitive und in der Routine durchführbare Messung der Expression-Levels von OCT1, ABCB1 und ABCG2 erlaubt.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Instrumente

Vortexer REAX	Heidolph
Light Cycler 1.5 oder 1.0	Roche
Tischzentrifuge	Heraeus Christ; Biofuge, Sigma
Heizblock QBT2	Grant Instruments
Eismaschine AF200	Scotsman
Becherglas	Neolab
Gelelektrophorese-Kammer aus Plexiglas	VWR
Spannungsgeber	Bio-Rad
Chemi Doc XRS	BioRad
Präzisionswaagewaage	Kern, Sartorius
Brutschrank	WTB Binder
Erlenmeyerkolben	Buddeberg
Zentrifuge	Sorvall
HiSpeed Plasmid maxi-Kit	Qiagen
Impföse	Buddeberg
Transferpipette 3,5 ml	Sarstedt
HERAsafe Sicherheitswerkbank	Haereus
Spectrophotometer	Peqlab
NanoDrop ND 1000	Peqlab
Tischzentrifuge	Sigma
Bunsenbrenner	Buddeberg
LightCycler 480	Roche

2.2 Chemikalien

Aqua ad iniectabilia (RNAse-frei)	Braun
LC Faststart Plus Kit	Roche
Uracil-DNA Glycosylase	Roche
Primer Lyophilisate	MW / Eurofins
Sonden Lyophilisate	TIB MOLBIOL
RNasin	Fa. Promega
Reverse Transkriptase	Fa. Invitrogen

DEPC	Sigma
EDTA	Sigma
PBS	Sigma
β-Mercaptoethanol (37%)	Biorad
Trizol	Invitrogen
Chloroform 100%	Merck-Millipore
Ethanol 75%, 100%	VWR
SYBRSafe	Invitrogen
Agarose	Seakem/ Biozym
TBE-Puffer	
HiSpeed Plasmid Maxi Kit	Qiagen
Puffer H	Roche
Luria Broth BASE/ Miller's LB Broth BASE	Sigma
Bacterolog. Agar	Sigma
Ampicillin	Fa. Roche
DMSO	Sigma
X-Gal	Appli Chem
LB-Medium	Invitrogen
Isopropanol	Merck
Tris-EDTA Puffer	Sigma
rRNA 16S- and 23S-ribosomal 100A260 units	Roche
Taq-Polymerase-Kit	Invitrogen
Escherichia coli one shot Top10F	Invitrogen
2.3 Zubehör	
1000 µl, 200 µl und 20 µl-Pipette	Gilson oder Eppendorf
Kühlblock	Roche
Kapillarentferner	Roche
Light Cycler Carousel Centrifuge	Roche
20 µl, 200 µl und 1000 µl Spitzen	Greiner oder Eppendorf
Schutzbrille	Neolab
Spezial-Nitril-Handschuhe	Dermatril P
Isolierbehälter	Buddeberg
Platten	Greiner Bio-one
Falcons 14 ml	Becton/Dickinson

Falcon 50 ml	Becton Dickinson
QIArac	Qiagen
1,5 ml Reaktionsgefäße	Fa. Eppendorf
0,5 ml Lichtschutzreaktionsgefäße	Fa. Eppendorf

2.4 Studiendesign

Die ‚EUROpe Stop TKI‘ Studie (EURO-SKI) ist eine interventionelle, multizentrische ‚open-label‘ Studie mit primärem Ziel, den Prozentsatz von Patienten mit anhaltender TFR (d.h. anhaltender MMR oder besser, nach Therapiestopp) zu eruieren (eudract number: 2011-000440-22). Gemäß der Deklaration von Helsinki haben alle eingeschlossenen Patienten nach eingehender Aufklärung ihre schriftliche Zustimmung gegeben. (Ethikvotum 2012-247AWB-MA)

Sekundäre Endpunkte der Studie sind:

- Evaluation der gesundheitsbezogenen Lebensqualität bei Patienten in TFR
- Dauer bis zum Erreichen einer erneuten MR⁴ nach molekularem Rückfall
- Evaluation der medizinisch-ökonomischen Wirkung des TKI Absetzens
- Identifikation klinischer und biologischer Einflussfaktoren auf die Dauer einer TFR

Die genauen Einschlusskriterien umfassen:

- CML in chronischer Phase, Therapie mit Erst- oder Zweitgenerations TKI
- Seit mindestens 3 Jahren Therapie mit TKI
- Stabile MR⁴ seit mindestens 1 Jahr
- Inklusion beider Geschlechter. Fertile Frauen nur unter Kontrazeption.
- Mindestens 18 Jahre alt

Die Ausschlusskriterien waren definiert mit

- Minderjährige
- Nicht einwilligungsfähige Patienten
- Vor oder nach allogener Stammzelltransplantation

Der Molekulare Rückfall wurde als Verlust der MMR nach TKI Absetzen zu einem Zeitpunkt definiert.

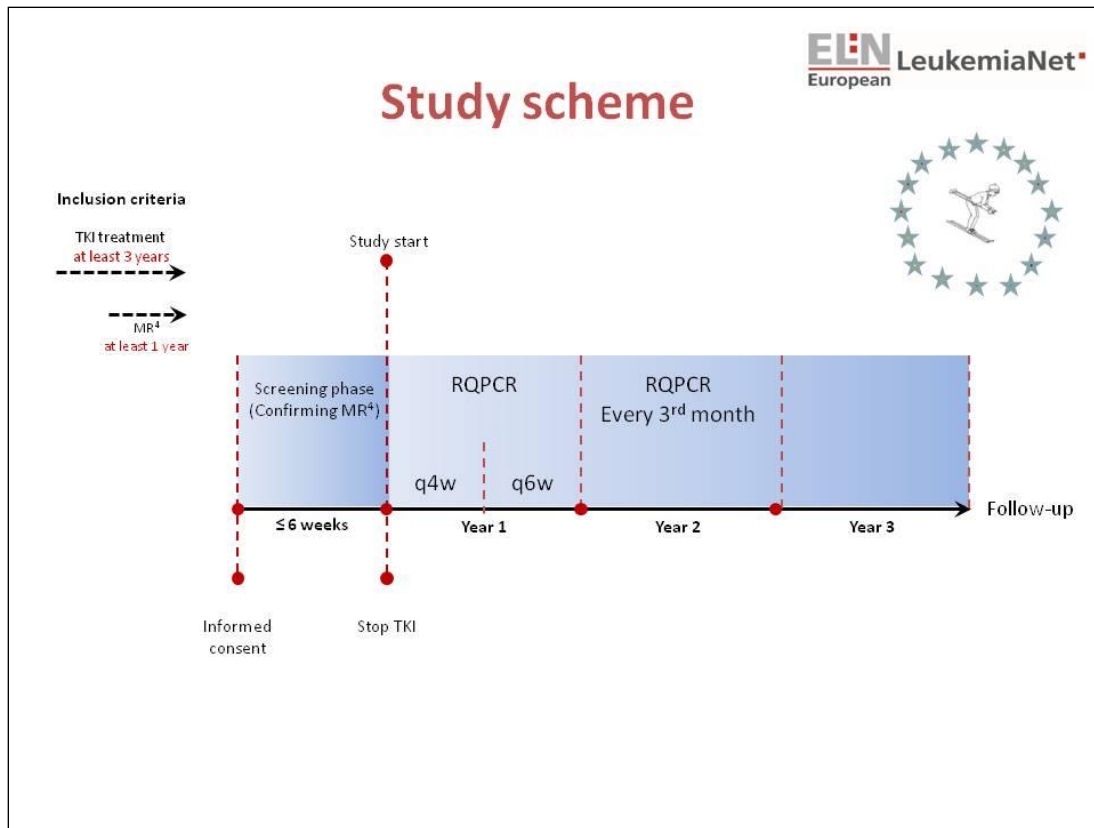


Abbildung 3: EURO-SKI Studienschema: Nach mindestens 3 Jahren TKI Therapie und einem Jahr MR⁴ konnten die Patienten in die EURO-SKI Studie eingeschlossen werden. Der letzte Tag der TKI Einnahme wurde als *baseline* definiert. Danach erfolgten 4- bis 6-wöchentliche BCR-ABL^{IS} Kontrollen. Bei MMR verlust wurde die TKI Therapie fortgesetzt.

In dieser retrospektiven Substudie wurden die Genexpression von OCT1, ABCB1 und ABCG2 an Leukozyten cDNA im peripheren Blut von 132 an der EURO-SKI Studie teilnehmenden Patienten gemessen. Der Abnahmezeitpunkt entsprach dem Tag des Absetzens, hier als *baseline* bezeichnet. (Abbildung 3) Verwendet wurden ausschließlich Patientenproben, die im ‚Mannheimer Exzellenzzentrum für CML‘ eingegangen und analysiert worden sind.

2.5 Aufarbeitung des peripheren Blutes

2.5.1 Pelletierung mononukleärer Zellen

Nach dem Abfüllen des peripheren Blutes in Aliquote wurden die Erythrozyten mit Lysispuffer lysiert. Die 50 ml Reaktionsgefäße wurden für 10 Minuten auf Eis gestellt. Dabei wurden die Falconröhrchen gelegentlich geschüttelt. Anschließend wurde der

Ansatz für 10 Minuten bei 453 x g und 4°C zentrifugiert. Vor Einbringung in die Zentrifuge wurden die Falconröhrchen noch mal geschüttelt.

Der Lysispuffer trat durch die Membran der Erythrozyten. Während dieses Durchtritts verschlechterte sich der Zustand der Membran einerseits durch das Quellen der Zelle, andererseits durch das Auflösen der Membran im Lysispuffer. Durch Zentrifugieren entstand ein Zellpellet mit Überstand.

Lysispuffer:

H ₂ O	100 ml
NH ₄ HCO ₃	0,79 g [10 mM]
NH ₄ Cl	8,29 g [0,155 M]
EDTA (pH 7,4)	200 µl [1 mM]

Der Überstand (hämolyzierte Erythrozyten) wurde verworfen. Anschließend wurde das Zellpellet mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden durch die Zugabe eines entsprechenden Homogenisierungspuffers resuspendiert, um eine molekulargenetische Leukozytenanalyse zu ermöglichen. Durch diese Reagenzien wurden gleichzeitig RNasen und sonstige Enzyme inaktiviert.

2.5.2 RNA-Isolierung

Die Trizol-Standard-Methode basiert auf dem Prinzip der sauren Guanidinisothiozyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion. Das Trizolreagenz enthält das Guanidinthiozyanat, Phenol und einen roten organischen Farbstoff. Diese Methode stellt eine sehr einfache Möglichkeit dar, aus Zellen RNA zu isolieren. Es wurden sich dabei die Unterschiede in der Löslichkeit der Komponenten in organischen und wässrigen Lösungsmitteln zu Nutze gemacht.

Proteine und DNA-Protein-Komplexe wurden denaturiert und bildeten eine unlösliche Phase. Die RNA hingegen verblieb in der wässrigen Phase. Nach Zusatz von Chloroform und anschließender Zentrifugation trennten sich die Phasen deutlich in die farblose wässrige Oberphase und die rötliche organische Unterphase. Die denaturierten Proteine bildeten eine unlösliche Interphase. Aus der wässrigen Phase konnte die RNA durch Isopropanol-Fällung gewonnen werden. Nach einem Waschschrift wurde die RNA getrocknet und in destilliertem Wasser gelöst. Meist wird diese Methode zur Isolierung von sehr reiner Gesamt-RNA genutzt, die nicht mit DNA oder Protein kontaminiert ist. Die genaue Vorgehensweise war folgende:

Es wurde 1 ml Trizol-Reagenz in 1,5 ml- Eppendorf-Röhrchen abgefüllt. Die Leukozytenpellets wurden bei Raumtemperatur 10 Minuten aufgetaut. Nach Durchmischung der Pellets mit Trizol wurden diese in den Schüttler gesetzt und bei 6,58 x g und 37°C für 10 Minuten geschüttelt. Nach kurzem Anzentrifugieren wurden 200 µl Chloroform (0,2 ml Chloroform pro ml eingesetztem Trizol) hinzugefügt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur per Hand mit dem Vortexer stark gemischt, bis sie trüb waren. Nach 10 Minuten bei 8°C und Zentrifugation mit 11934 x g, wurde mit einer 200 µl-Pipette der Überstand am Rand des Reaktionsgefäßes bis zur Interphase abgenommen und Gefäße überführt. Es wurde erneut 200 µl Chloroform zugegeben und gemischt, bis die Phasen trüb waren. Nach erneutem 10-minütigem Anzentrifugieren bei 8°C und 11934 x g wurde mit einer 200µl-Pipette am Rand des Reaktionsgefäßes die oberste Phase bis zur Interphase abgenommen. Es wurden nun 0,5 ml 100% 4°C kaltes Ethanol hinzugefügt, gemischt und anschließend für 30 Minuten bei -20°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Pelletierung für 10 Minuten bei 8°C und 11934 x g. Die RNA wurde als Pellet an der unteren Wand des Reaktionsgefäßes sichtbar. Das Pellet wurde mit 1ml 75%-iger Ethanol-Lösung von der Unterfläche abgehoben und vorsichtig durchmischt, ohne das Pellet aufzulösen. Nach erneuter Zentrifugation wurden der Ethanolüberstand vorsichtig abgekippt und die Reaktionsgefäße auf dem Wärmeblock bei 37°C getrocknet, bis das Pellet begann durchsichtig zu werden. Die getrockneten RNA-Pellets wurden auf Eis gesetzt und in 21µl RNase-freies H₂O aufgelöst. Nach der Nanodrop-Messung erfolgt die cDNA Synthese.

2.5.3 cDNA-Synthese

Bei der cDNA-Synthese erfolgte eine sogenannte reverse Transkription von RNA in die komplementäre DNA, die eine höhere Stabilität aufweist. Dieser Vorgang wurde durch eine RNA-abhängige DNA-Polymerase katalysiert. Das daraus resultierende Produkt war ein komplementärer DNA-Einzelstrang (cDNA) der im Gegensatz zur RNA keine Introns enthielt, da es sich beim Ausgangsprodukt um bereits prozessierte mRNA handelt. Der experimentelle Ansatz verlief wie folgt:

Es wurden 19µl der RNA-Proben Röhrchen für 10 Minuten bei 65°C denaturiert und danach mindestens 3 Minuten auf Eis gelegt. Zu jedem Probensatz und zur Negativkontrolle wurden 21µL (zu 19µL RNA) Mixansatz (s.u.) dazu pipettiert und mit der Pipettenspitze vorsichtig gemischt. Danach erfolgte eine Inkubation für 2 Stunden

bei 37°C auf dem Heizblock. Die Proben konnten anschließend bei –20°C gelagert oder weiterverarbeitet werden.

Der Mixansatz bestand aus folgenden Komponenten:

H ₂ O	930 µl
dNTP	190 µl [25 mM]
Random-Hexamere	100 µl
Dithiothreitol	47,5 µl
Reverse Transkriptase	950 µl

2.6 Etablierung der Plasmidstandards

2.6.1 Plasmiddesign

In dieser Arbeit erfolgte eine absolute Quantifizierung der Gene mittels Plasmidstandards. Es waren insgesamt zwei Plasmide in Gebrauch. Ein Plasmid mit Namen ‚pME2‘ enthält die Sequenzen für β -Glucuronidase GUSB, ABL und BCR-ABL. Das zweite Plasmid wurde speziell für unsere Fragestellung hergestellt und enthielt die Sequenzen für OCT1, ABCB1, ABCG2 und GUSB als Referenzgen (pEX-A2 Plasmid).

2.6.2 pME2 Plasmid-Klonierung

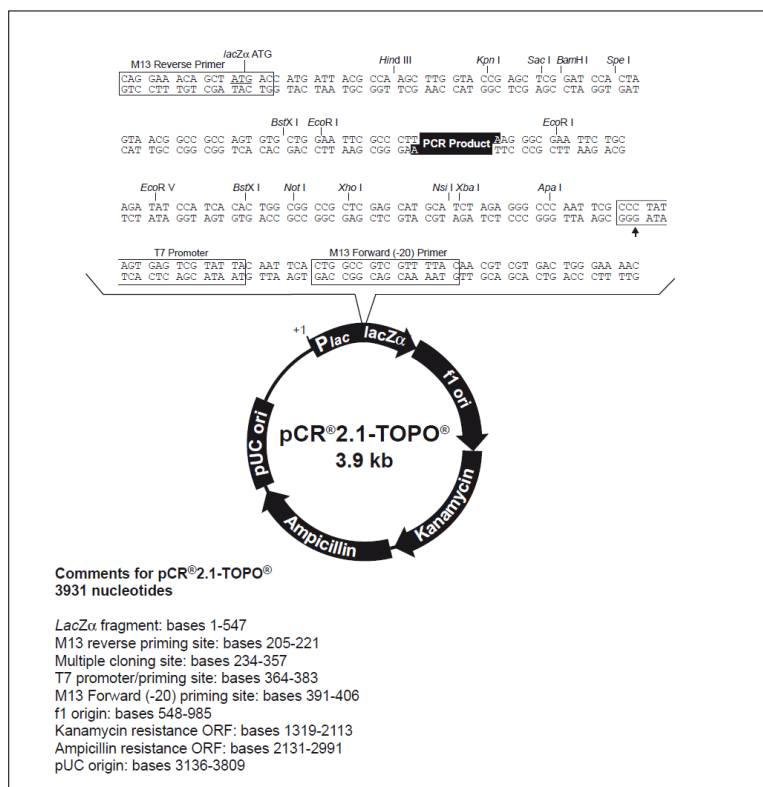


Abbildung 4: pME2 Plasmiddesign.

Für die Herstellung der Standardplasmide wurde im ersten Schritt das jeweilige BCR-ABL-Konstrukt (e1a2 oder e14a2), welches durch den Einsatz von spezifischen Primern aus cDNA der Zelllinien SD1 bzw. K562 generiert wurde, mittels dem TOPO TA Cloning Kit in den pCR2.1 Vektor kloniert. (Abbildung 4) Das Prinzip des TOPO TA Cloning Kit besteht darin, dass durch die Taq-Polymerase ein zusätzliches Deoxyadenosin an das 3' Ende des PCR-Produktes synthetisiert wird und der linearisierte Vektor durch überhängende 3'Deoxythymidinreste eine passende Insertionsstelle aufweist. Mittels dem Enzym Topoisomerase I des Vaccinia Virus

kann dadurch ein PCR-Produkt in kürzester Zeit in den Vektor eingebaut werden. Das aus der K562 cDNA synthetisierte beta-Glucorinidase PCR-Produkt wurde durch einen Restriktionsverdau mit XbaI und der Verwendung einer T4-Ligase zusätzlich eingebaut. Für die Herstellung des GUSB PCR-Produktes wurden GUSB-spezifische Primer mit einer zusätzlicher Xba I-Schnittstelle verwendet. Da die pME2 Plasmidstandards bereits vorgefertigt im Labor vorhanden sind, wird im Weiteren auf die Klonierung des für diese Untersuchung hergestellten Plasmid pEX-A2 genauer eingegangen.

2.6.3 pEX-A2 Plasmid-Klonierung

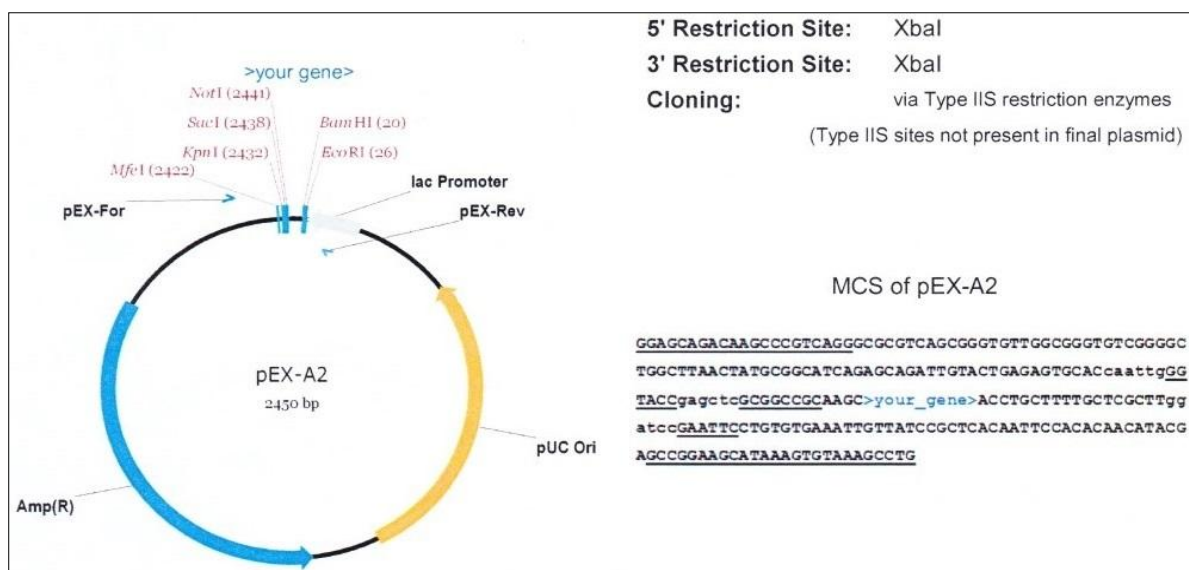


Abbildung 5: pEX-A2 Plasmiddesign (Eurofins)

Das pEX-A2 Plasmid wurde zur Klonierung in das Escherichia coli Bakterium one shot Top 10 F') inseriert.(Abbildung 5) Dieser Vorgang wird als Transformation bezeichnet. Dabei wurde das Wasserbad auf 42°C erhitzt um das SOC Medium aufzutauen. Es erfolgte parallel die Zusammensetzung der Klonierungsreaktion:

	1 Reaktion
PCR Produkt	2 µl
Salzlösung	1 µl
H2O	2 µl
Vector	1 µl
Reaktionsvolumen Gesamt	6 µl

Dieses Reaktionsgemisch wurde vorsichtig gemischt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. 2 µl von der Klonierungsreaktion wurde zu den E.Coli gegeben und leicht gerührt. Nach einer Inkubation von 20 Minuten auf Eis (4°C) erfolgt ein Hitzeschock durch 45 Sekunden bei 42 °C im Wasserbad. Nach dem Hinzugeben von 250 µl SOC Medium wurde das Gefäß verschlossen und für 1 Stunde bei 37°C (Thermomixer), mit 300 Upm inkubiert. Danach wurden 80 µl auf vorgewärmte (37°C) Ampicillin Agar Platten ausplattiert und für 24 Stunden im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Von der Platte wurden anschließend jeweils 20 Klone gepickt und in 2,5 ml LB Medium mit Ampicillin gegeben und bei 220 Upm über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.6.4 Plasmid-Aufreinigung mittels HiSpeed Plasmid Maxi Kit

Es wurden 400 µl aus der über Nacht gewachsenen Kultur entnommen und mit 40 µl Lysis Reagent (Kit) vermischt. Die Probe wurde für 3-5 Sekunden auf dem Vortexer geschüttelt und für 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Bindungssäule wurde in ein 2 ml Tube gestellt. Hierzu wurden 400 µl Kulturlösung gegeben und für 10 Sekunden zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und 400 µl Bindungslösung (Binding solution) zum Lysat gegeben. Anschließend wurden 780 µl der Lösung auf die Säule geben und für 20 Sekunden bei 13000 Upm zentrifugiert. Der Durchlauf wurde dann verworfen. Im Anschluss wurden 700 µl Waschlösung auf die Säule geben und für 20 Sekunden bei 13000 Upm zentrifugiert. Das Gleiche wurde nochmals mit 200 µl Waschlösung und für 30 Sekunden bei 13000 Upm wiederholt. Diese Lösung wurde erneut für 20 Sekunden zentrifugiert um die Säule zu trocknen, anschließend wurde die Säule in eine neue Tube gestellt. Im letzten Schritt wurden 30µl Wasser auf die Säule gegeben und abzentrifugiert.

2.6.5 Herstellung einer Verdünnungsreihe

Das ungeschnittene zirkuläre Plasmid wurde durch einen Restriktionsverdau mit einem spezifischen Enzym in eine linearisierte Form überführt. Anhand des linearisierten Plasmids wurde eine PCR mit den Primer durchgeführt, die sich an beiden Enden des Inserts befinden. Gemäß Plasmiddesign war dadurch eine Transkriptlänge von 861 Basenpaaren (bp) zu erwarten. Dies konnte in der Gelelektrophorese bestätigt werden.(Abbildung 6)

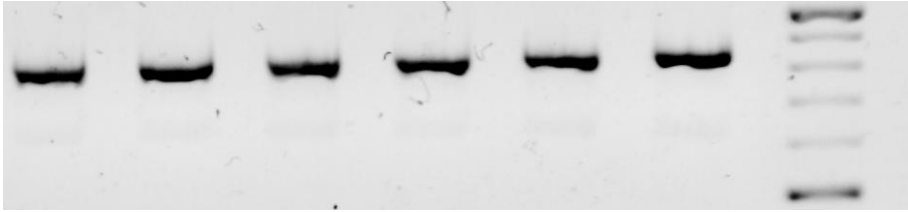


Abbildung 6: Replikate des PCR Transkripts mittels Gelelektrophorese zur Bestätigung der berechneten Transkriptlänge von 861bp.

Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe aus einer definierten Ausgangsmenge von Plasmid-DNA-Molekülen hergestellt mit folgender Formel:

$$\left(\frac{a}{\left(\frac{6.023 \cdot 10^{23}}{b \cdot 660}\right) / 10^{18}}\right) / c \cdot 10^3$$

a= Anzahl der gewünschten Moleküle in 1 μ l (Mittelwert von drei Messungen)

b= Länge des Vektors + Insert in bp

c= Konzentration in ng/ μ l

Das Ergebnis entsprach einer gewissen Menge an Plasmid und musste für eine Zielkonzentration von 2×10^9 Plasmide/ μ l mit Wasser auf 1000 μ l aufgefüllt werden. Die hergestellte 2×10^9 Verdünnungsstufe wurde zunächst gut durchmischt, bevor die nächste Verdünnungsstufe pipettiert wurde.

Ansatz:

450 μ l TER + 50 μ l Plasmid aus der nächst höheren Verdünnungsstufe

Verdünnungsreihe:

$$2 \times 10^9 \rightarrow 2 \times 10^8 \rightarrow 2 \times 10^7 \rightarrow 2 \times 10^6 \rightarrow 2 \times 10^5 \rightarrow 2 \times 10^4 \rightarrow 2 \times 10^3 \rightarrow 2 \times 10^2 \rightarrow 2 \times 10^1 \rightarrow 2 \times 10^0$$

Die Überprüfung der Verdünnungsreihe erfolgte durch einen PCR-Standardtestlauf. (Abbildung 9)

2.7 Etablierung der qRT-PCR zur Messung der ABCG2, OCT1, ABCB1 und GUSB Expression

Zur Eruiierung der idealen Bedingungen der qRT-PCR, welche eine Quantifizierung von GUSB, ABCB1 ABCG2 und OCT1 auf dem LightCycler 480 (Roche) erlauben soll, wurden mehrere Durchläufe mit unterschiedlichen Zyklustemperaturen und

unterschiedlicher Zyklusdauer durchgeführt. Als Template wurden 6 Verdünnungsstufen der o.g. Verdünnungsreihe benutzt, welche bei 2 µl Input von 4×10^1 bis 4×10^6 erreichten. Die bearbeitete Probe sollte folgende Qualitätskriterien erfüllen:

- Auswertbarkeit von mindestens 4 Verdünnungsstufen
- Bestehen einer Linearität
- Auswertbarkeit eines mindestens 4×10^2 er Standards.
- Standardfehler < 0.1

Das unten beschriebene Protokoll ermöglichte eine reproduzierbare konstante Quantifizierung aller Standards:

	1 Rxn (µl)
Primer rev.	1
Primer for.	1
UGD	1
Roche MM	4
Sonden-Mix	0,5
H ₂ O	10,5

Die qRT-PCR beinhaltet folgende Laufparameter:

	T°	time
Denaturierung:	95	10 min
Denaturierung:	95	15 s
Annealing:	60	20 s
Elongation:	72	30 s
Storage:	40	30 s
Schritt 2-4 x 45 Zyklen		

Folgende Primer wurden verwendet:

ABCG2 vorwärts:	5'-AGTGTTCAGCCGTGGAA-3'
ABCG2 rückwärts:	5'-GCATCTGCCTTTGGCTTCAA-3'
OCT1 vorwärts:	5'-GATGTACCTGTGGTTCACGG-3'
OCT1 rückwärts:	5'-TCATAGTCTTCAGGCTGAGKG-3'

ABCB1 vorwärts: 5'-GTCCGGACCACCATTGTGATAG-3'
 ABCB1 rückwärts: 5'-CATTTCCCTGCTGTCTGCATTGTG-3'
 GUSB vorwärts: 5'-AGAAACGATTGCAGGGTTTCAC-3'
 GUSB rückwärts: 5'-CCGAGTGAAGATCCCCTTTTAA-3'

Folgende Sonden wurden verwendet:

ABCG2 Sonden:

LC640-TTCCAAGGAAATAAGATGACACTCTGTAGTATCCGC-PH
 5'-CATCCTCATGGGTAATAAATCAGATAACAGT-FL

OCT1 Sonden:

LC640-TGCAATACAAATGATCTGCCTGGTGAATG-PH
 5'-GTGTTTRGCCGAATGGGAATCACCA-FL

ABCB1 Sonden:

LC640-AGGAAATCATGATGAACTCATGAAAGAGAAAGGC-PH
 5'-CTGGTTTCGATGATGGAGTCATTGTGGAGA-FL

GUSB Sonden:

LC640-TAGCAGACTTTTCTGGTACTCTTCAGTGAACA-PH
 5'-TGATCCAGACCCAGATGGTACTGCT-FL

2.8 Messung der BCR-ABL Expression

Die Quantifizierung des BCR-ABL-Transkript-Levels als Maß für die CML Aktivität erfolgt mittels qRT-PCR auf dem LightCycler 1.0/1.5 (Roche). Als Referenzgen wurde ABL benutzt. Anhand der ABL und BCR-ABL Plasmidstandardreihen erfolgte eine absolute Quantifizierung. Das Protokoll der qRT-PCR basierte auf einer voretablierten standardisierten Methodik, die bereits von unserem Institut publiziert wurde. (Emig et al., 1999; Paschka et al., 2003)

2.9 Statistische Methoden

Die statistische Analyse wurden mittels der SPSS Software (Version 20, IBM) vorgenommen. Mittels dem Chi-Quadrat Test wurde die Verteilung der Patientencharakteristika auf Signifikanz geprüft. Bei Teilmengen kleiner als 5 wurde

der exakte Fisher-Test anstelle des Chi-Quadrat Testes eingesetzt. Die Verteilung der stetigen Variablen, wie z.B. Alter und Expression-Levels, wurden anhand des Kruskal-Wallis Tests mit einem Konfidenzintervall von 95% errechnet.

Die Generierung von *Cutoffs* erfolgte mittels Bonferroni Korrektur der mittels *bootstrapping* generierten p-Werte. Im Rahmen der *Bootstrap*-Analysen erfolgten 10000 Permutationen (Vergleiche) von verschiedenen *Cutoffs*. Die minimale Gruppengröße wurde auf 15% der Gesamtkohorte (n=132) festgelegt. Als *Cutoff* wurde der Transkript-Level ausgewählt der sich am häufigsten als signifikant herausstellte ($p < 0.05$) im Rahmen der Permutationen. Diese *Bootstrap*-Analysen wurden vom Institut für Biometrie und Statistik der LMU-München durchgeführt. Weiters erfolgten *Cutoff*-Analysen mittels der weniger stringenteren *minimal p-value* Methodik über die *Charité cutoff finder* Software. (Budczies et al., 2012)

Kovariaten, die in den univariaten Analysen einen signifikanten Einfluss auf den molekularen Rückfall zeigten, flossen in das Cox Regressionsmodell mit ein. Rückfallkurven wurden mittels Kaplan-Meier Diagrammen dargestellt und die Signifikanz wurde mit dem Log-Rank Test geprüft. Eine Zensierung fand zum Zeitpunkt der letzten Beobachtung statt.

3 ERGEBNISSE

3.1 Patientencharakteristika

Insgesamt wurden 132 Patientenproben analysiert. Im Vergleich zu anderen Absetzstudien weisen die Patienten in dieser EURO-SKI Substudie eine verhältnismäßig lange TKI-Vorbehandlung von im Schnitt 7,6 Jahren sowie eine Dauer von insgesamt 4,3 Jahren im Remissions-Level MR⁴ auf. Die Geschlechterverteilung ist in dieser Kohorte ausgeglichen. (Tabelle 3) Wegen der höheren Prävalenz der e14a2 Patienten überwiegt deren Anteil auch in der untersuchten Kohorte. Lediglich 13% der Patienten wurden vor dem Absetzen mit Nilotinib oder Dasatinib behandelt.

Tabelle 3: Klinische und molekularbiologische Eigenschaften der in der EURO-SKI Substudie analysierten Patienten.

Patient characteristics (n=132)	Value (range)
Median age (range)	62 (27-87)
Gender (%)	
Male	52
Female	48
Transcript type n=129 (%)	
e13a2	28
e14a2	63
e13a2 & e14a2	9
Median TKI duration (y)	7,6 (3-14)
Median MR ⁴ duration in (y)	4,3 (1-13)
Median ABCG2 expression (%)	0,7 (0-4)
Median OCT1 expression (%)	4,1 (0-26)
Mediane ABCB1 expression (%)	70 (18-512)
Median observation time (m)	11 (1-33)
Imatinib Therapie (%)	87
Relapse (%)	46

Mittels Kaplan-Meier Analyse des Absetzerfolges bzw. der therapiefreien Remission. Insgesamt verblieben 54% der 132 Patienten in TFR. Dieser Prozentsatz ist in Einklang mit den Ergebnissen der EURO-SKI Gesamtkohorte. (Mahon et al., 2016)

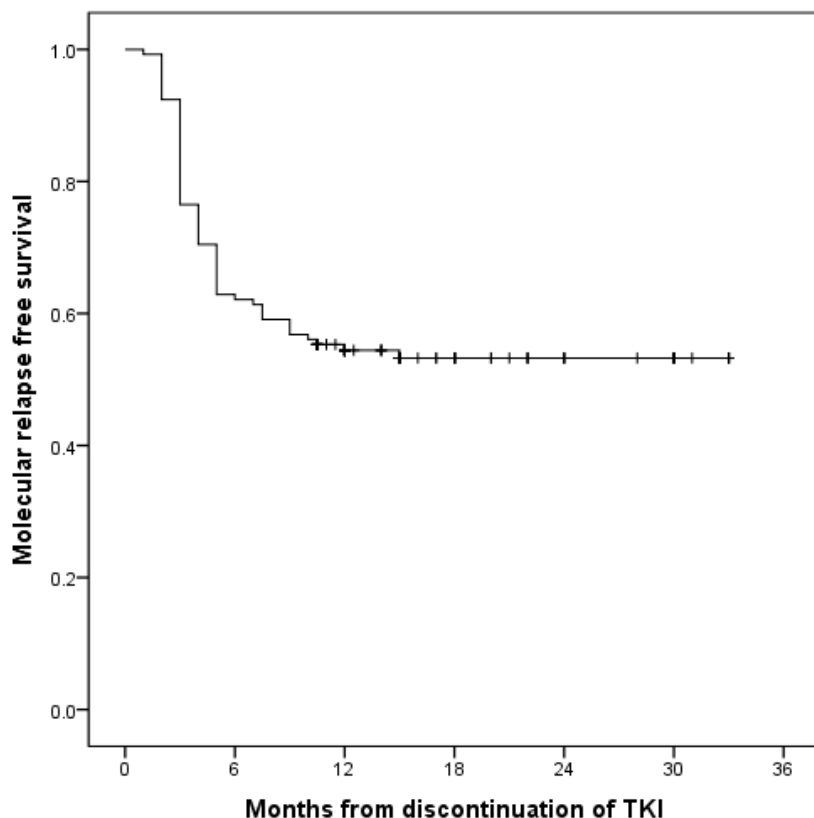


Abbildung 7: Kaplan-Meier Analyse der therapiefreien Remission.

3.2 Expressions-Level der In- und Effluxkanälen zum Absetzzeitpunkt (*baseline*)

Die in Abschnitt 2.7. beschriebene qRT-PCR ergaben für ABCG2, ABCB1, GUSB und OCT1 Plasmidstandards jeweils 6 Amplifikationskurven welche als Basis für die Berechnung der Standardreihe dienten. Die Amplifikation der Transkripte fand hauptsächlich zwischen Zyklus 17 und 35 statt und sind jeweils +/-3 Zyklen voneinander entfernt im Rahmen der 1:10 Verdünnungsschritten. (Abbildung 8)

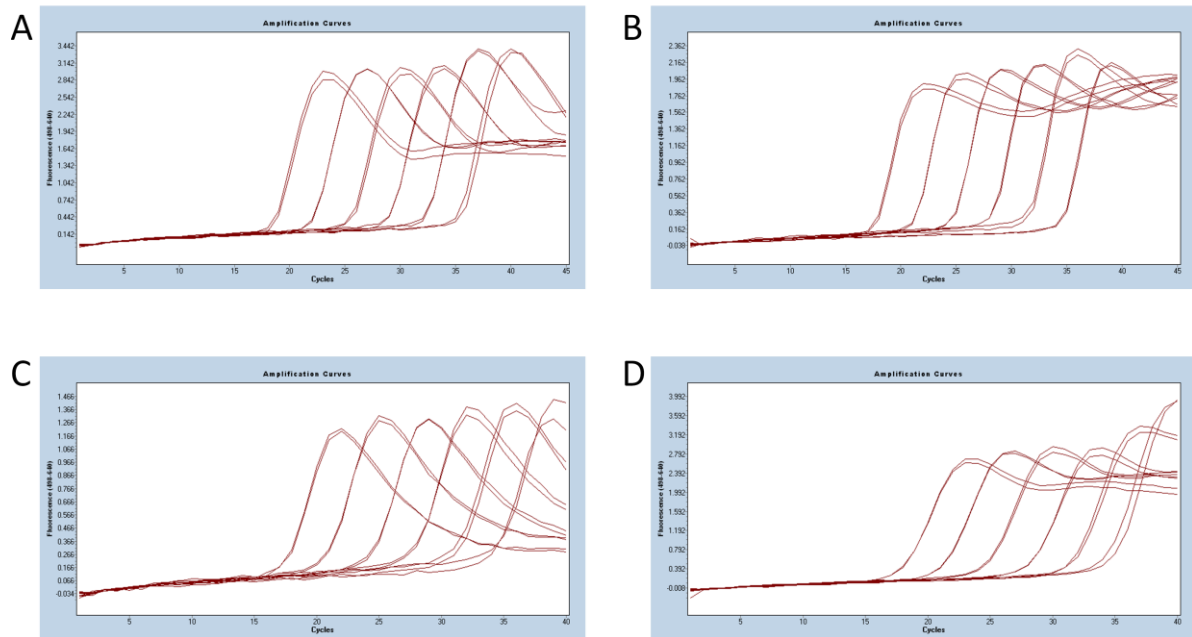


Abbildung 8: Amplifikationskurven der Plasmidstandards für ABCB1 (A), GUSB (B), OCT1 (C) und ABCG2 (D) im Rahmen der qRT-PCR auf dem LightCycler 480.

Die unterste Verdünnungsstufe war bei jedem Lauf für jeweils alle Gene quantifizierbar, so dass die LOD (limit of detection) bei der hohen Assaysensitivität bei Weitem noch nicht erreicht wird. Auf Basis der unter Abbildung 8 gezeigten Amplifikationskurven wurden die Standardreihen für ABCG2, ABCB1 und OCT1 aus dem Quotienten mit GUSB als Referenzen errechnet. (Abbildung 9)

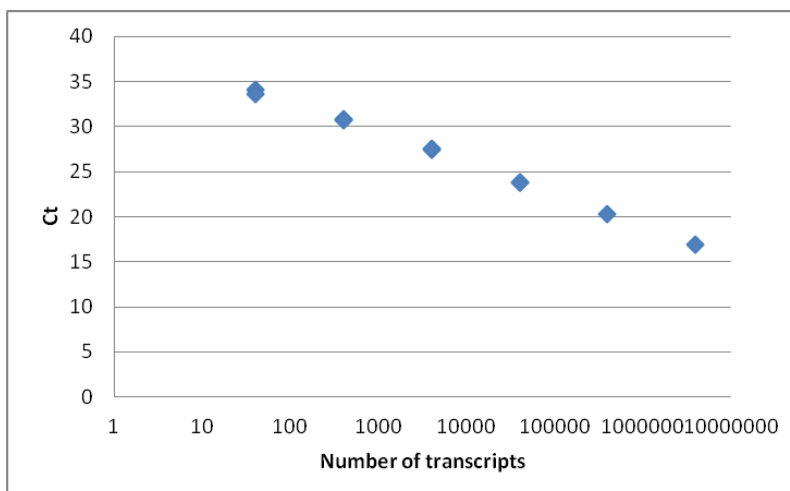


Abbildung 9: Die hier abgebildete exemplarische Standardreihe für ABCG2. Die Plasmidstandards stehen in nahezu perfekter linearer Beziehung zueinander ($R^2=0,99$).

Die In- und Effluxkanäle waren jeweils bei jedem Patienten quantifizierbar. Die Verteilung der Koeffizienten basierend auf den Rohdaten sind in Abbildung 10 dargestellt und ersprechen einer Gauß'schen Normalverteilung.

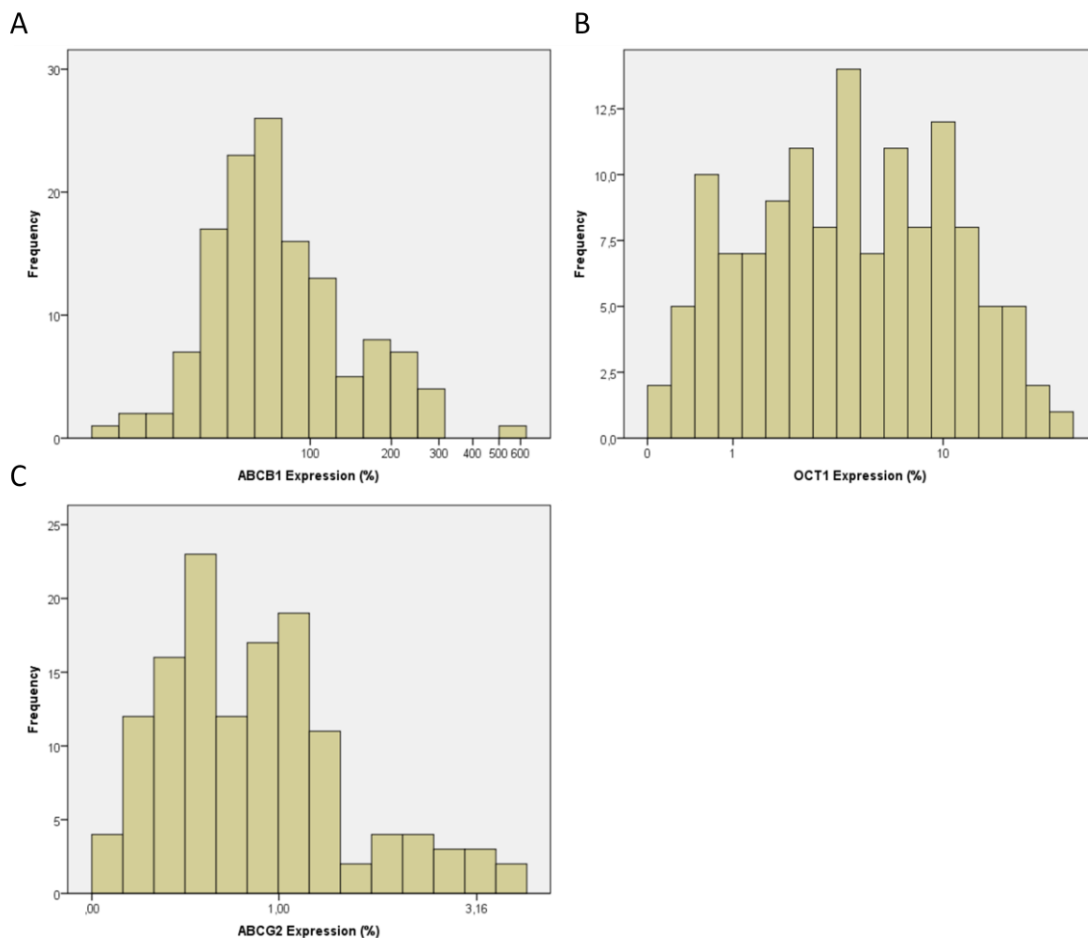


Abbildung 10: Verteilung der ABCB1, ABCG2 und OCT1 Transkript-Levels von 132 EURO-SKI Patienten.

Zur Hypothesengenerierung erfolgte ein Vergleich der medianen Genexpression zum *baseline*-Zeitpunkt. Patienten mit anhaltender TFR sind hier als *no relapse* bezeichnet. Die höchste mediane Expression wies das ABCB1 Transkript auf, das häufig über 100% lag, d.h. eine höhere Expression als das Referenzgen GUSB aufwies. Der Effluxkanal ABCG2 zeigte die niedrigste Expression. (Abbildung 11)

Zum Zeitpunkt des Absetzens (*baseline*) zeigen ABCG2, ABCB1 und OCT1 keine signifikante differentielle Expression zwischen *Relapse*- und Remissionspatienten. Es besteht jedoch ein signifikanter Unterschied in der Expression von OCT1 und ABCB1 zwischen gesunden Probanden und CML-Patienten ($p < 0.03$). ABCB1 ist bei CML-Patienten nach langjähriger TKI-Therapie unterexprimiert, wohingegen OCT1 bei Patienten mit langjähriger Therapie eine Überexpression im Vergleich zu gesunden

Probanden aufweist.(Abbildung 11 A-C) Um die Kinetik der In- und Effluxkanäle zu analysieren, wurde bei einem Anteil der *Relapse*-Patienten (n=40) die Expression zum Zeitpunkt des Absetzens mit der Expression zum Zeitpunkt des MMR-Verlustes (*relapse*) verglichen. Bei allen drei Kanälen wurde kein signifikant unterschiedlicher Transkript-Level nachgewiesen.(Abbildung 11 D-F)

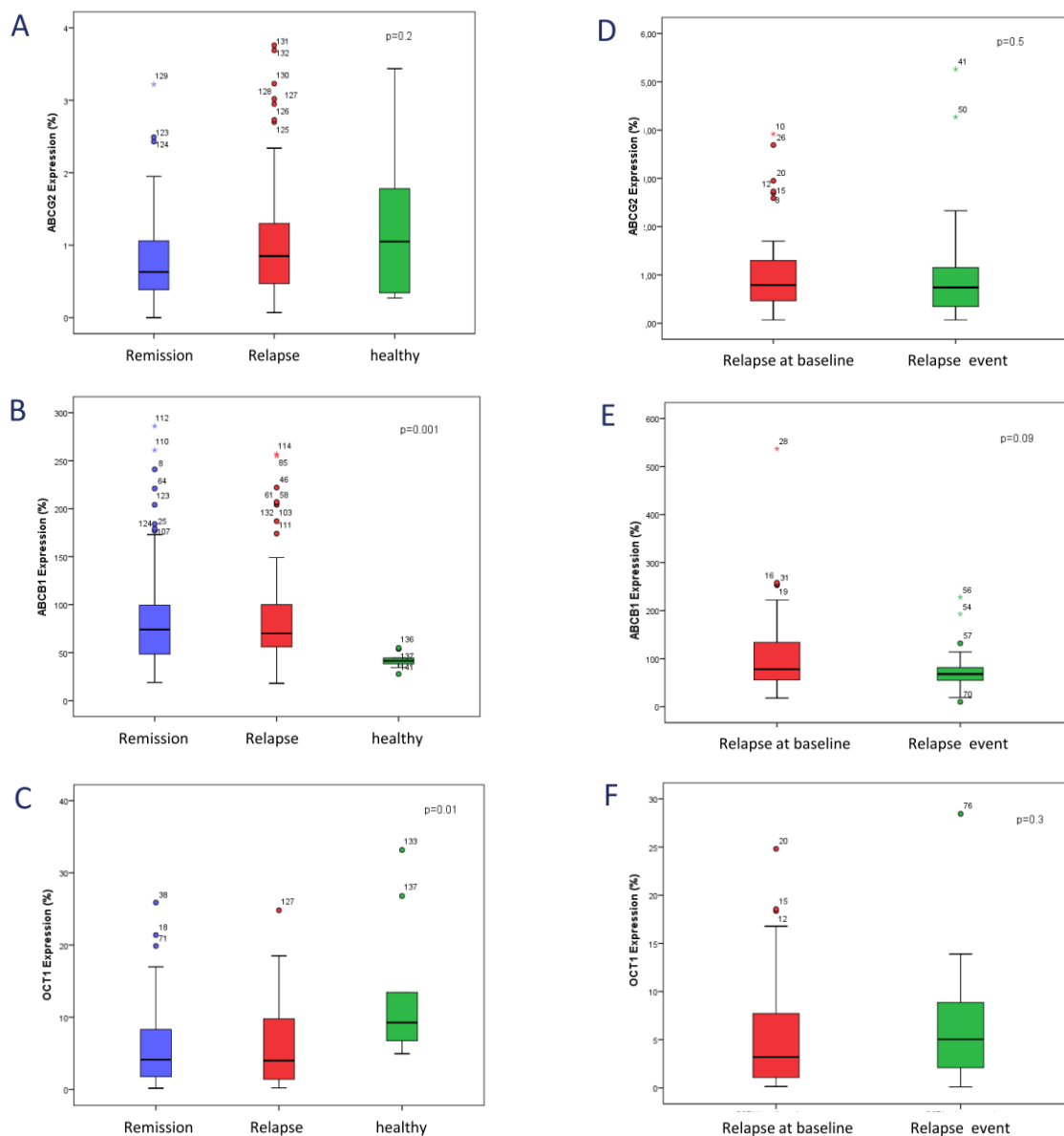


Abbildung 11: *Baseline*-Expression (A,B,C): Die Transkript-Level von *Relapse*- und Remissionspatienten zeigten keinen signifikanten Unterschied. Im Vergleich mit gesunden Probanden (n=10) zeigte sich jedoch bei ABCB1 und OCT1 ein signifikanter Unterschied ($p < 0.05$). Transkript-Level zum *Baseline*- (n=40) und *Relapse*-Zeitpunkt (n=40) (D,E,F): Die Expression der In- und Effluxkanälen unterschied sich nicht zwischen Absetz- und *Relapse*-Zeitpunkt.

3.3 Einfluss der In- und Effluxkanälen auf die therapiefreie Remission

Um die Prädikktivität der In- und Effluxkanäle in Bezug auf die TFR zu testen, erfolgte eine Cutoff-Ermittlung. Ziel war die Identifikation der Patientengruppe mit erhöhtem *Relapse*-Risiko. In der *Bootstrap*-Analyse wurde eine Gruppengröße von mindestens 10% der Kohorte gewählt. Die Detektion von *Cutoffs*, die sich von Null unterscheiden, erfolgte mittels 10.000 Permutationen für die jeweiligen Gene im Rahmen der *Bootstrap*-Analyse. Nur für ABCG2 konnte ein Trennwert gefunden werden. Als häufigster ABCG2 Cutoff wurde 4.5‰ gewählt. (Abbildung 12) Man sieht jedoch einen doppelten Peak und eher eine breitere Verteilung, woran man erkennen kann, dass der Cutoff nicht sehr stabil ist. Deshalb musste dieser Trennwert noch in einem Cox Regressionsmodell getestet werden.

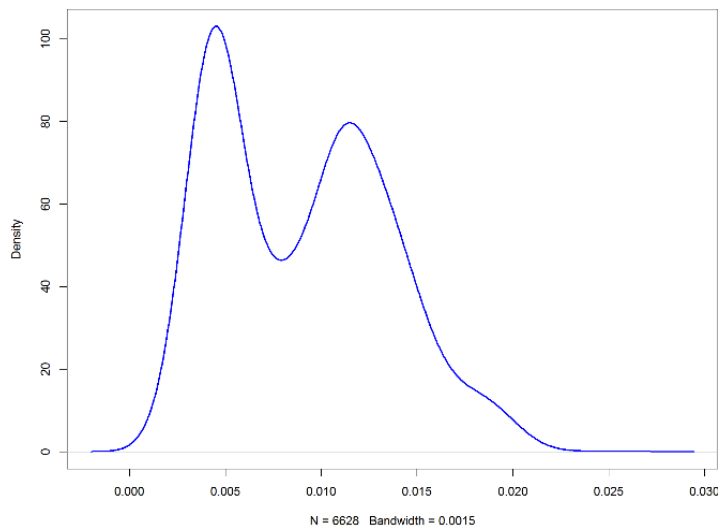


Abbildung 12: *Bootstrap*-Analyse zur Ermittlung des besten ABCG2 *Cutoffs* (=0,0045). Die y-Axe zeigt wie oft ein gewisser *Cutoff* ausgesucht wurde im Rahmen von 10.000 Permutationen.

In der Kaplan-Meier Analyse erlaubte der Effluxkanal ABCG2 für den 4.5‰ *Cutoff* eine Auftrennung in eine Hoch- bzw. Niedrigrisikogruppe im Hinblick auf die TFR. Patienten mit einem ABCG2/GUSB Transkript-Level über 4.5‰ (n=93) haben 30 Monate nach Absetzen des TKI eine TFR-Rate von 47%. Patienten mit einer ABCG2 Expression unter oder gleich 4.5‰ (n=39) wiesen 30 Monate nach Absetzen des TKI eine TFR-Rate von 67% (p=0.043) auf. (Abbildung 13)

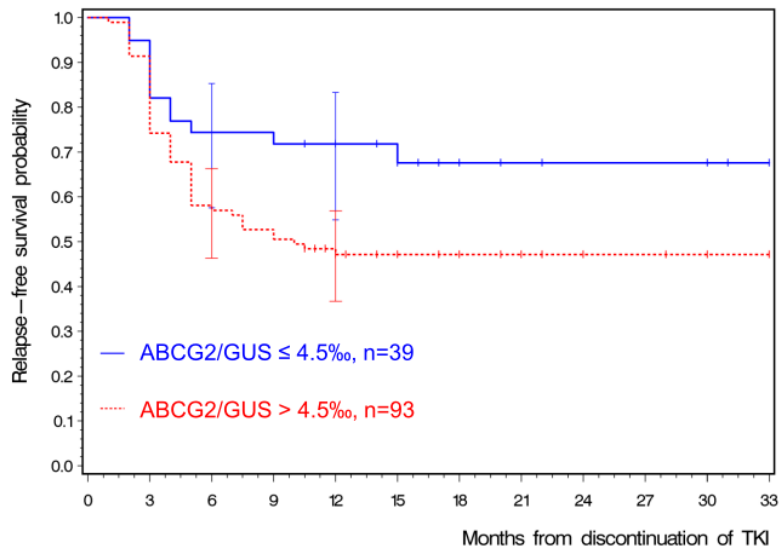


Abbildung 13: Risikostratifizierung mittels ABCG2 *Cutoff* zur TFR-Prädiktion ($p=0.043$).

Auch mittels der weniger stringenten *minimal p-value* Methode konnte für ABCB1 und OCT1 kein signifikanter Trennwert eruiert werden ($p>0.05$, Abbildung 14). Da die Bildung von Quotienten zwischen Efflux- und Influxkanälen biologisch sinnvoll schien, wurden auch folgende Kombinationen getestet:

ABCG2 Quotient/OCT1 Quotient

ABCB1 Quotient/ OCT1 Quotient

(ABCB1 Quotient + ABCG2 Quotient)/OCT1 Quotient

Für alle Kombinationen konnte kein *Cutoff* gefunden werden der einen signifikanteren Einfluss auf die TFR hatte als der alleinige ABCG2 *Cutoff*.

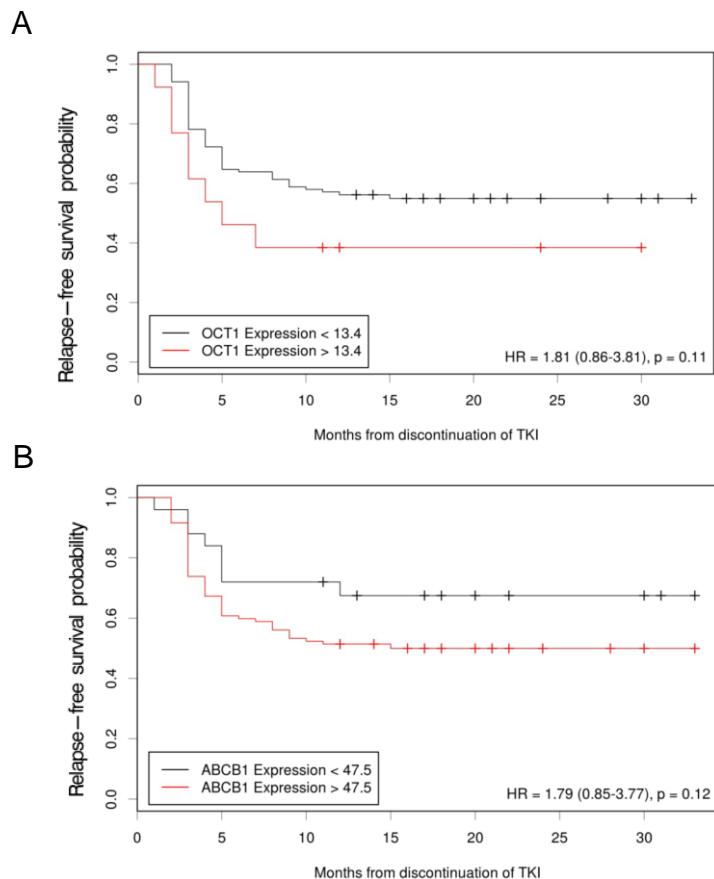


Abbildung 14: Risikostratifizierung mittels OCT1 (A) und ABCB1 (B) *Cutoff* zur TFR-Prädiktion ($p > 0.05$).

3.4 Testung unabhängiger Biomarker in einem multivariaten Cox Regressionsmodell zur Prädiktion der TFR

Zur Auswahl der geeigneten Kovariaten wurde der Multivariatanalyse die Univariatanalysen vorgeschaltet. Die in Tabelle 4 dargestellten Werte wurden auf ihren Einfluss auf den Erhalt der TFR im Rahmen der Univariatanalysen getestet. Die einzigen Parameter, die einen Einfluss auf den TKI Absetzerfolg zu haben scheinen ($p < 0.05$) sind der ABCG2 *Cutoff* ($p = 0.043$) und der Transkripttyp ($p = 0.03$) e13a2, im Gegensatz zu den anderen Transkripttypen (e14a2, e13a2 & e14a2, atypische Transkripte, p210). Es erfolgte auch eine Testung anderer Transkriptkombinationen. Der kategorielle Vergleich der Transkriptvarianten im einzelnen, ergab keine Signifikanz. Die hier genannte Kombination war die einzige mit signifikantem Einfluss auf TFR. Die Transkript Variante e13a2 und ein ABCG2 Level über 4.5‰ zeigen ein bis zu zweifach erhöhtes *Relapse*-Risiko. (Tabelle 4)

Univariatanalysen	HR	95% CI	p
Alter			0.454
Geschlecht			0.515
MR ⁴ Dauer			0.441
TKI Dauer			0.281
Transkript (e13a2 vs rest)	1.80	1.06-3.05	0.030
ABCG2 cutoff	1.90	1.01-3.57	0.043

Die Kaplan-Meier Analyse zeigte gleich der univariaten Regressionsanalyse eine signifikante Risikostratifizierung zwischen den beiden Transkriptgruppen e13a2 versus den restlichen (p=0.03). Die 20-monatige TFR Rate betrug für Patienten mit dem e13a2 Transkript (n=36) 41%, wohingegen die restlichen Patienten (n=81) zu 58% in therapiefreier Remission blieben. (Abbildung 15)

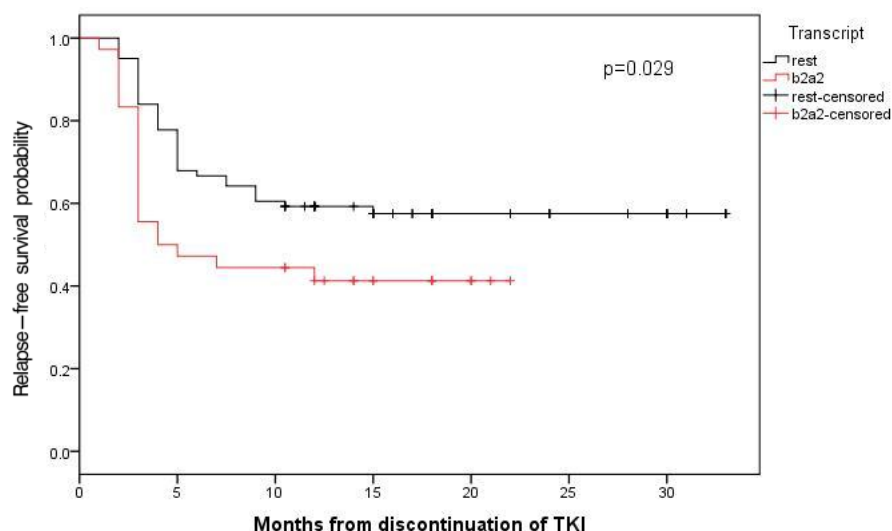


Abbildung 15: Risikostratifizierung anhand der BCR-ABL Transkriptvariante (b2a2 = e13a2).

Im multivariaten Cox Regressionsmodell bleiben beide Parameter, ABCG2 *Cutoff* sowie Transkripttyp, als unabhängige Prädiktoren der therapiefreien Remission erhalten (p<0.05). Beide Parameter zeigen nach wie vor ein doppeltes *Relapse*-Risiko. Zwischen beiden Faktoren besteht jedoch keine Korrelation im Sinne einer unterschiedlichen Expression von In- bzw Effluxkanälen je Transkriptart (p>0.05). (Tabelle 4)

Tabelle 4: Multivariates Cox Regressionsmodell basierend auf den signifikanten Kovariaten der Univariatanalysen: BCR-ABL Transkriptvariante und ABCG2 *Cutoff*.

Multivariatanalysen	HR	95% CI	p
Transkript (e13a2 vs rest)	1.90	1.14-3.30	0.015
ABCG2 cutoff	2.00	1.05-3.70	0.035

Die ROC-Analyse ergab für den ABCG2 *Cutoff* eine Sensitivität von 80% eine Spezifität von nur 37%. Somit ergibt sich eine hohe falsch-positiv-Rate wie in Abbildung 16 ersichtlich.

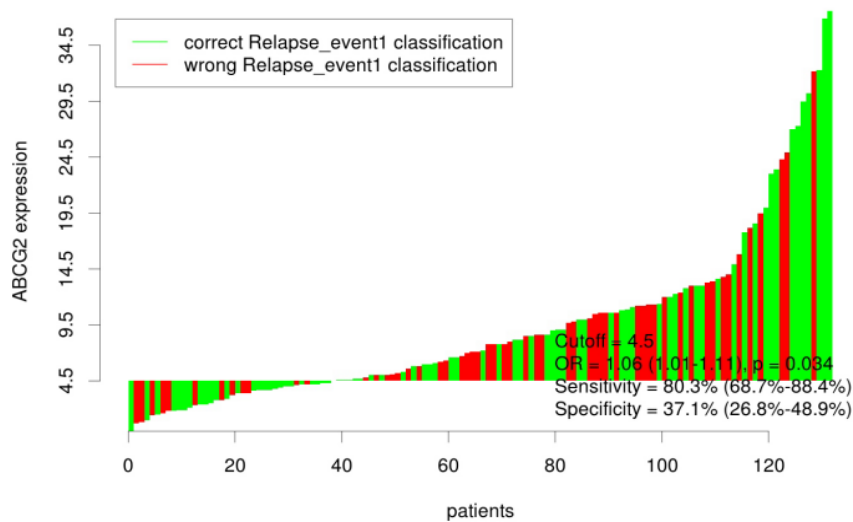


Abbildung 16: Waterfall-Plot auf Basis des ABCG2 *Cutoffs* zur Veranschaulichung der mittels ROC-Analyse errechneten Sensitivität und Spezifität.

DISKUSSION

Viele Mechanismen der therapiefreien Remission in der CML sind aktuell noch unbekannt. Erste in-vivo und in-vitro-Daten lassen vermuten, dass das Immunsystem einen entscheidenden Einfluss hat. Jedoch gilt es bei der Analyse der TFR alle Mechanismen in Betracht zu ziehen, die auch eine Rolle in der CML Resistenz und Progression spielen, nicht zuletzt da diese Mechanismen auch dem Schutz der leukämischen Stammzellnische dienen. In dieser Untersuchung wird zum ersten Mal der Einfluss der Pharmakogenetik mit einer sensitiven, absoluten Quantifizierungsmethode analysiert. Die In- und Effluxkanäle OCT1, ABCB1 und ABCG2, bekannt für ihre Interaktionen mit Dasatinib, Nilotinib und Imatinib, wurden im Rahmen der EURO-SKI Substudie auf ihre Prädiktivität im Hinblick auf den Erhalt der TFR zum Zeitpunkt des TKI Absetzens getestet.

Bei Patienten in tiefer molekularer Remission (DMR) sind im peripheren Blut BCR-ABL positive Zellen kaum noch nachweisbar. Es ist daher davon auszugehen, dass die Expressionsanalysen an gesunden, hauptsächlich BCR-ABL negativen Leukozyten durchgeführt wurden. Demnach galt es zu testen, ob eine konstitutive, d.h. eine bereits veranlagte („germline“) Über- oder Unterexpression der In- und Effluxkanälen bei den Patienten vorliegt, die Aufschluss auf den späteren Absetzerfolg gibt. In diesem Zusammenhang soll diese Arbeit als Basis zur weiteren Hypothesengenerierung dienen.

Im direkten Vergleich zwischen *Relapse*- und Remissionspatienten konnte keine unterschiedliche Expression der In- und Effluxkanäle eruiert werden. Unter Einbezug der TFR-Dauer konnten wir jedoch für das ABCG2 Gen einen Trennwert finden, der eine Risikostratifizierung in zwei Gruppen erlaubte. Eine ABCG2 Überexpression (>4.5%) führt zu einem zweifach erhöhtem *Relapse*-Risiko. Dies scheint insofern logisch, da eine höhere Expression von Effluxkanälen zu einer geringeren intrazellulären Exposition mit Imatinib führt. Die Mehrheit der experimentellen Studien zu diesem Thema ergaben jedoch, dass es sich bei Imatinib um einen Inhibitor von ABCG2 handelt und nicht um ein Substrat. Zum jetzigen Zeitpunkt ist anhand der kontradiktorischen Datenlage nicht auszuschließen, dass es sich bei Imatinib nicht auch um ein Substrat von ABCG2 handelt. (Eadie et al., 2014) In-vitro-Experimente zu der Fragestellung wurden unterschiedlich durchgeführt und berücksichtigen auch nicht SNPs (single nucleotide polymorphisms). In einer kürzlich publizierten

Metaanalyse wurde nachgewiesen, dass insbesondere der C421A Polymorphismus des ABCG2 Gens signifikant mit dem Erreichen einer MMR korreliert.(Jiang et al., 2017) Dieser SNP führt zu einer reduzierten Expression von ABCG2 auf Proteinebene, zum einen durch eine erhöhte Proteininstabilität, zum anderen durch eine erhöhte miRNA-Blockade der Proteintranslation. Eine unterschiedliche Expression auf mRNA Ebene wurde nicht nachgewiesen. Diese Erkenntnisse weisen auf die Notwendigkeit hin, die Prädiktivität der einzelnen Kanäle für TFR auch im Kontext von Germline-SNPs zu analysieren.

Der Vergleich der Transkript-Levels bei gesunden Probanden mit CML-Patienten zeigte in unserer Untersuchung eine signifikant unterschiedliche Expression für ABCB1 und OCT1, jedoch nicht für ABCG2. Dieser Expressionsunterschied für ABCB1 und OCT1 wurde hier an einer Patientenkohorte mit einer medianen TKI Therapiedauer von 7.6 Jahren das erste Mal nachgewiesen. Bisherige Analysen der mRNA Kinetik von In- und Effluxkanälen basieren entweder auf in vitro Experimenten oder übersteigen bei der vorangegangenen TKI-Therapiedauer nicht ein Jahr.(Eadie et al., 2017; Galimberti et al., 2005; Gromicho et al., 2011) Es ist allgemein bekannt, dass eine Exposition der Zellen mit Xenobiotika zu einer Hochregulierung der ABCB1 Expression führt. Auch hier scheint die höhere Expression von ABCB1 für das Überleben gesunder Leukozyten bei CML-Patienten unter jahrelanger TKI Exposition von Vorteil zu sein.

Über die Kinetik der OCT1 Expression gibt es zur Zeit keine validen Daten. Die Prädiktivität der OCT1 mRNA Expression in Bezug auf das molekulare Ansprechen ist bislang noch umstritten. Es gibt zu diesem Influx-Transporter jedoch in vitro-Daten, die annehmen lassen, dass die BCR-ABL Expression keinen Einfluss auf die Funktionalität oder Expression von OCT1 hat.(Engler et al., 2011) In unserer Studie sehen wir eine Abnahme der OCT1 Expression nach langjähriger TKI Therapie, welche vermutlich in der gleichen Logik wie bei ABCB1, für Leukozyten durch eine erniedrigte intrazelluläre TKI Konzentration einen Überlebensvorteil darstellen.

Im Gegensatz zu OCT1 und ABCB1, zeigt ABCG2 keine signifikant unterschiedliche Expression im Vergleich zu gesunden Probanden. Jedoch konnte bereits in vitro nachgewiesen werden, dass die ABCG2 Expression, im Gegensatz zu den anderen Kanälen, durch BCR-ABL beeinflusst wird. Die Ergebnisse unserer Untersuchung lassen den Schluss zu, dass die ABCG2 Proteinexpression an der Zellmembran über die PI3K-Aktivität indirekt durch BCR-ABL reguliert wird. Da Imatinib BCR-ABL

inaktiviert und somit auch die PI3K-Aktivität reduziert, wurde in K562 Zellen eine Abnahme der ABCG2 Aktivität auf Proteinebene bei unveränderter RNA Expression nachgewiesen. (Huang et al., 2014) In der Tat zeigt die ABCG2 Expression von gesunden Probanden keinen Unterschied im Vergleich zu CML Patienten in DMR nach langjähriger Imatinib-Therapie. Dennoch wurde mit der hier etablierten sensitiven Quantifizierungsmethode eine Risikostratifizierung für die TFR auf mRNA-Ebene entwickelt. Aus pathophysiologischer Sicht stellt ABCG2 einen potentiellen Surrogatmarker für BCR-ABL dar. Aus unserer Sicht sollte als nächster Schritt die ABCG2 Proteinexpression und –aktivität in Korrelation mit der Dauer der TFR analysieren werden.

Im Rahmen der Multivariatanalysen zeigte sich ein überraschend starker Einfluss der BCR-ABL-Transkriptvarianten auf den Erhalt der TFR. Patienten mit der e13a2 Variante haben eine signifikant schlechtere Prognose für den Verbleib in TFR. Aus unserer Untersuchung ging hervor, dass sich die Transkriptvarianten einerseits im Differentialblutbild unterscheiden und e13a2 eine kumulativ niedrigere MMR-Rate zeigte. (Hanfstein et al., 2014) Letzteres ist jedoch am ehesten auf die bessere PCR-Effizienz des kurzen e13a2 Transkriptes zurückzuführen. Es wurde mittels sensitiven Methoden nachgewiesen, dass die schlechtere PCR Effizienz bei der längeren e14a2 Variante zu einer Unterschätzung des molekularen Ansprechens führt. (Gniot et al., 2017) Dies ließe jedoch erwarten, dass das e14a2 Transkript therapeutisch benachteiligt werden würde und so zu einer schlechteren TFR führen müsste. Dies ist jedoch nicht der Fall. Somit kann die Hypothese, dass e13a2 und e14a2 unterschiedliche biologische CML-Entitäten darstellen, durchaus möglich sein.

In dieser Studie wurden fast ausschließlich CML Patienten mit langjähriger Imatinib-Therapie eingeschlossen. Die unterschiedlichen Wechselwirkungen zwischen den 3 genannten Kanälen und den TKI der 2. und 3. Generation müssen in weiteren Untersuchung validiert werden.

Um zukünftig zu vermeiden, dass die Hälfte der Patienten in DMR nach TKI Absetzen das molekulare Ansprechen verliert, ist die Identifizierung verlässlicher Prädiktoren notwendig. Diese Prädiktoren sollten idealerweise auch Hinweise auf eine Therapieumstellung geben, um eine TFR zu ermöglichen.

Die BCR-ABL Transkriptvariante und ABCG2 haben als Einzelparameter eine zu niedrige Sensitivität und Spezifität, um getrennt als Marker zu dienen. Im Rahmen der multifaktoriellen Genese der TFR, werden Gensignaturen in der Zukunft

höchstwahrscheinlich als Prädiktor eine Rolle spielen. Die Suche nach neuen Biomarkern bzw. potentiellen BCR-ABL-Surrogatmarkern wird zukünftige CML Forschungsinitiativen entscheidend prägen. ABCG2 und die Transkriptvariante e13a2 können vielversprechende Biomarker für ein zukünftiges molekulares TFR-Screening von CML Patienten sein.

4 ZUSAMMENFASSUNG

In kürzlich publizierten Studien konnte gezeigt werden, dass bei CML-Patienten mit tiefem molekularem Ansprechen ein Absetzversuch der Tyrosinkinase Inhibitor (TKI)-Therapie unter bestimmten Voraussetzungen als sicher eingestuft werden kann. Als Prädiktoren für eine therapiefreie Remission gelten die vorherige Dauer der Therapie und die Dauer des tiefen molekularen Ansprechens. Alter, BCR-ABL Transkript-Level, Geschlecht und Risiko-Scores hingegen scheinen keinen Einfluss auf die TFR zu haben. Darüber hinaus scheint das Immunsystem eine übergeordnete Rolle zu spielen, da die Anzahl von NK-Zellen und CD86+ dendritischen Zellen signifikant mit dem Erhalt der TFR korrelieren. Bislang wurde jedoch der Einfluss der Pharmakogenetik auf die TFR noch nicht analysiert. Die In- und Effluxkanäle ABCG2, ABCB1 und OCT1 sind bekannt für ihre Rolle in der CML Progression bzw. Resistenzentwicklung. In dieser Arbeit wurde anhand des ABCG2/ABCB1/OCT1-Transkript-Levels getestet, ob eine konstitutionelle Disposition für eine TFR bei CML Patienten besteht.

In unserer Kohorte haben 132 CML Patienten den TKI (davon 87% mit Imatinib in Erstlinientherapie) im Rahmen der EURO-SKI abgesetzt. Zum Zeitpunkt des Absetzens wurde die Expression von ABCG2, ABCB1 und OCT1 anhand absoluter Quantifizierung mittels Plasmidstandards (Referenzgen: GUSB) an Leukozyten-RNA aus dem peripheren Blut gemessen. Mittels der minimal p-value Methode und nach Bonferroni-Adjustierung wurden jeweils die signifikanten *Cutoffs* eruiert. Im Rahmen eines multivariaten Cox Regressionsmodel wurden die einzelnen Variablen auf ihre Unabhängigkeit bezüglich der TFR Prädiktivität hin getestet. Als *Relapse* wurde der Zeitpunkt des MMR Verlustes definiert.

Die teilnehmenden 132 CML Patienten wiesen in dieser Substudie eine TFR-Rate von 54% nach TKI-Absetzen auf. Die *Cutoff*-Analysen ergaben nur für den Effluxkanal ABCG2 eine signifikante Risikostratifizierung. Bei Patienten mit einem ABCG2/GUSB Transkript-Level über 4.5‰ (n=93) verbleiben 30 Monate nach Absetzen des TKI 47% in TFR. Bei Patienten mit einer ABCG2 Expression unter oder gleich 4.5‰ (n=39) beträgt die TFR-Rate 30 Monate nach Absetzen des TKI 67% (p=0.043). ABCB1 und OCT1 zeigen, im Gegensatz zu ABCG2, eine signifikant differentielle Transkriptexpression im Vergleich zu gesunden Probanden. ABCG2 war das einzige Transporter-Gen das in den Multivariatanalysen als unabhängiger

Prädiktor verblieb. Im Cox Regressionsmodell hatten Patienten mit einem ABCG2 *Cutoff* über 4.5‰ ein zweifach erhöhtes *Relapse*-Risiko. Ein weiterer unabhängiger Prädiktor in der Multivariatanalyse, war die Transkriptvariante e13a2, welche auch eine signifikante Risikostratifizierung in Bezug auf *Relapse* erlaubte ($p=0.015$). Die e13a2 Transkriptvariante zeigte wie ABCG2 ein zweifach erhöhtes *Relapse*-Risiko (HR 1.90 versus 2.00, CI 1.05-3.70 versus 1.14-3.30).

Die Suche nach neuen Biomarkern bzw. potentiellen BCR-ABL-Surrogatmarkern wird zukünftige CML Forschungsinitiativen entscheidend prägen. ABCG2 und die Transkriptvariante e13a2 können vielversprechende Biomarker für ein zukünftiges molekulares TFR-Screening von CML Patienten sein.

5 LITERATURVERZEICHNIS

Agrawal, M., Hanfstein, B., Erben, P., Wolf, D., Ernst, T., Fabarius, A., Saussele, S., Purkayastha, D., Woodman, R.C., Hofmann, W.-K., et al. (2014). MDR1 expression predicts outcome of Ph+ chronic phase CML patients on second-line nilotinib therapy after imatinib failure. *Leukemia* 28, 1478–1485.

Allen, J.D., and Schinkel, A.H. (2002). Multidrug resistance and pharmacological protection mediated by the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Mol. Cancer Ther.* 1, 427–434.

Angelini, S., Soverini, S., Ravegnini, G., Barnett, M., Turrini, E., Thornquist, M., Pane, F., Hughes, T.P., White, D.L., Radich, J., et al. (2013). Association between imatinib transporters and metabolizing enzymes genotype and response in newly diagnosed chronic myeloid leukemia patients receiving imatinib therapy. *Haematologica* 98, 193–200.

Apperley, J.F. (2007). Part I: mechanisms of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia. *Lancet Oncol.* 8, 1018–1029.

Apfel Winger, B., and Shah, N.P. (2015). PPAR γ : Welcoming the New Kid on the CML Stem Cell Block. *Cancer Cell* 28, 409–411.

Baccarani, M., Deininger, M.W., Rosti, G., Hochhaus, A., Soverini, S., Apperley, J.F., Cervantes, F., Clark, R.E., Cortes, J.E., Guilhot, F., et al. (2013). European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood* 122, 872–884.

Barnes, D.J., Palaiologou, D., Panousopoulou, E., Schultheis, B., Yong, A.S.M., Wong, A., Pattacini, L., Goldman, J.M., and Melo, J.V. (2005). Bcr-Abl expression levels determine the rate of development of resistance to imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia. *Cancer Res.* 65, 8912–8919.

Bartram, C.R., de Klein, A., Hagemeijer, A., van Agthoven, T., Geurts van Kessel, A., Bootsma, D., Grosveld, G., Ferguson-Smith, M.A., Davies, T., and Stone, M. (1983). Translocation of c-ab1 oncogene correlates with the presence of a Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature* 306, 277–280.

Bennett, J.H., and University of Glasgow. Library (1845). Case of hypertrophy of the spleen and liver, which death took place from suppuration of the blood [electronic resource] ([Edinburgh]: [Printed by Stark and Company]).

Berger, U., Maywald, O., Pfirrmann, M., Lahaye, T., Hochhaus, A., Reiter, A., Hasford, J., Heimpel, H., Hossfeld, D.K., Kolb, H.-J., et al. (2005). Gender aspects in chronic myeloid leukemia: long-term results from randomized studies. *Leukemia* 19, 984–989.

Bhatia, R., Snyder, D.S., Lin, A., Arceo, J., Seymour, L., Deininger, M., Radich, J., Blanchard, S., and Forman, S. (2009). A Phase I Study of the HDAC Inhibitor LBH589 in Combination with Imatinib for Patients with CML in Cytogenetic Remission with Residual Disease Detectable by Q-PCR. *ASH Annu. Meet. Abstr.* 114, 2194.

- Biasini, M., Bienert, S., Waterhouse, A., Arnold, K., Studer, G., Schmidt, T., Kiefer, F., Gallo Cassarino, T., Bertoni, M., Bordoli, L., et al. (2014). SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Res.* 42, W252-258.
- Bixby, D., and Talpaz, M. (2011). Seeking the causes and solutions to imatinib-resistance in chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 25, 7–22.
- Budczies, J., Klauschen, F., Sinn, B.V., Györfy, B., Schmitt, W.D., Darb-Esfahani, S., and Denkert, C. (2012). Cutoff Finder: a comprehensive and straightforward Web application enabling rapid biomarker cutoff optimization. *PLoS One* 7, e51862.
- Burchert, A., Saussele, S., Eigendorff, E., Müller, M.C., Sohlbach, K., Inselmann, S., Schütz, C., Metzelder, S.K., Ziermann, J., Kostrewa, P., et al. (2015). Interferon alpha 2 maintenance therapy may enable high rates of treatment discontinuation in chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 29, 1331–1335.
- Burckhardt, G., and Wolff, N.A. (2000). Structure of renal organic anion and cation transporters. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 278, F853-866.
- Chai, S.K., Nichols, G.L., and Rothman, P. (1997). Constitutive activation of JAKs and STATs in BCR-Abl-expressing cell lines and peripheral blood cells derived from leukemic patients. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 159, 4720–4728.
- Ciarimboli, G., Struwe, K., Arndt, P., Gorboulev, V., Koepsell, H., Schlatter, E., and Hirsch, J.R. (2004). Regulation of the human organic cation transporter hOCT1. *J. Cell. Physiol.* 201, 420–428.
- Cohen, M.H., Williams, G., Johnson, J.R., Duan, J., Gobburu, J., Rahman, A., Benson, K., Leighton, J., Kim, S.K., Wood, R., et al. (2002). Approval summary for imatinib mesylate capsules in the treatment of chronic myelogenous leukemia. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 8, 935–942.
- Cooper, B. (2011). The origins of bone marrow as the seedbed of our blood: from antiquity to the time of Osler. *Proc. Bayl. Univ. Med. Cent.* 24, 115–118.
- Cortes, J.E., Kim, D.-W., Kantarjian, H.M., Brümmendorf, T.H., Dyagil, I., Griskevicius, L., Malhotra, H., Powell, C., Gogat, K., Countouriotis, A.M., et al. (2012a). Bosutinib versus imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia: results from the BELA trial. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 30, 3486–3492.
- Cortes, J.E., Kantarjian, H., Shah, N.P., Bixby, D., Mauro, M.J., Flinn, I., O'Hare, T., Hu, S., Narasimhan, N.I., Rivera, V.M., et al. (2012b). Ponatinib in refractory Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N. Engl. J. Med.* 367, 2075–2088.
- Cortes, J.E., Gambacorti-Passerini, C., Deininger, M.W., Mauro, M.J., Chuah, C., Kim, D.-W., Dyagil, I., Glushko, N., Milojkovic, D., le Coutre, P., et al. (2017). Bosutinib Versus Imatinib for Newly Diagnosed Chronic Myeloid Leukemia: Results From the Randomized BFORE Trial. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* JCO2017747162.

- Crossman, L.C., Druker, B.J., Deininger, M.W.N., Pirmohamed, M., Wang, L., and Clark, R.E. (2005). hOCT 1 and resistance to imatinib. *Blood* 106, 1133–1134; author reply 1134.
- Daley, G.Q., Van Etten, R.A., and Baltimore, D. (1990). Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Science* 247, 824–830.
- Deininger, M.W., Vieira, S., Mendiola, R., Schultheis, B., Goldman, J.M., and Melo, J.V. (2000). BCR-ABL tyrosine kinase activity regulates the expression of multiple genes implicated in the pathogenesis of chronic myeloid leukemia. *Cancer Res.* 60, 2049–2055.
- Dicato, M., Duhem, C., Pauly, M., and Ries, F. (1997). Multidrug resistance: molecular and clinical aspects. *Cytokines Cell. Mol. Ther.* 3, 91–99.
- Druker, B.J., Tamura, S., Buchdunger, E., Ohno, S., Segal, G.M., Fanning, S., Zimmermann, J., and Lydon, N.B. (1996). Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat. Med.* 2, 561–566.
- Druker, B.J., Sawyers, C.L., Kantarjian, H., Resta, D.J., Reese, S.F., Ford, J.M., Capdeville, R., and Talpaz, M. (2001). Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. *N. Engl. J. Med.* 344, 1038–1042.
- Druker, B.J., Guilhot, F., O'Brien, S.G., Gathmann, I., Kantarjian, H., Gattermann, N., Deininger, M.W.N., Silver, R.T., Goldman, J.M., Stone, R.M., et al. (2006). Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 355, 2408–2417.
- Dulucq, S., Bouchet, S., Turcq, B., Lippert, E., Etienne, G., Reiffers, J., Molimard, M., Krajcinovic, M., and Mahon, F.-X. (2008). Multidrug resistance gene (MDR1) polymorphisms are associated with major molecular responses to standard-dose imatinib in chronic myeloid leukemia. *Blood* 112, 2024–2027.
- Eadie, L.N., Hughes, T.P., and White, D.L. (2014). Interaction of the efflux transporters ABCB1 and ABCG2 with imatinib, nilotinib, and dasatinib. *Clin. Pharmacol. Ther.* 95, 294–306.
- Eadie, L.N., Dang, P., Saunders, V.A., Yeung, D.T., Osborn, M.P., Grigg, A.P., Hughes, T.P., and White, D.L. (2017). The clinical significance of ABCB1 overexpression in predicting outcome of CML patients undergoing first-line imatinib treatment. *Leukemia* 31, 75–82.
- Emig, M., Saussele, S., Wittor, H., Weisser, A., Reiter, A., Willer, A., Berger, U., Hehlmann, R., Cross, N.C., and Hochhaus, A. (1999). Accurate and rapid analysis of residual disease in patients with CML using specific fluorescent hybridization probes for real time quantitative RT-PCR. *Leukemia* 13, 1825–1832.
- Engler, J.R., Frede, A., Saunders, V., Zannettino, A., White, D.L., and Hughes, T.P. (2010). The poor response to imatinib observed in CML patients with low OCT-1

activity is not attributable to lower uptake of imatinib into their CD34+ cells. *Blood* 116, 2776–2778.

Engler, J.R., Zannettino, A.C.W., Bailey, C.G., Rasko, J.E.J., Hughes, T.P., and White, D.L. (2011). OCT-1 function varies with cell lineage but is not influenced by BCR-ABL. *Haematologica* 96, 213–220.

Erben, P., Hanfstein, B., Munjal, U., Daikeler, H., Agrawal, M., Popa, J., Nowak, D., Leitner, A., Hossfeld, D.K., Kolb, H.J., et al. (2010). Pretreatment Expression Levels of MDR1 and OCT-1 Predict Response to First Line Imatinib Treatment In Chronic Phase CML Patients. *ASH Annu. Meet. Abstr.* 116, 671.

Etienne, G., Guilhot, J., Rea, D., Rigal-Huguet, F., Nicolini, F., Charbonnier, A., Guerci-Bresler, A., Legros, L., Varet, B., Gardembas, M., et al. (2017). Long-Term Follow-Up of the French Stop Imatinib (STIM1) Study in Patients With Chronic Myeloid Leukemia. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 35, 298–305.

Fabarius, A., Leitner, A., Hochhaus, A., Müller, M.C., Hanfstein, B., Haferlach, C., Göhring, G., Schlegelberger, B., Jotterand, M., Reiter, A., et al. (2011). 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.

Fabarius, A., Kalmanti, L., Dietz, C.T., Lauseker, M., Rinaldetti, S., Haferlach, C., Göhring, G., Schlegelberger, B., Jotterand, M., Hanfstein, B., et al. (2015). Impact of unbalanced minor route versus major route karyotypes at diagnosis on prognosis of CML. *Ann. Hematol.* 94, 2015–2024.

Fiskus, W., Pranpat, M., Bali, P., Balasis, M., Kumaraswamy, S., Boyapalle, S., Rocha, K., Wu, J., Giles, F., Manley, P.W., et al. (2006). Combined effects of novel tyrosine kinase inhibitor AMN107 and histone deacetylase inhibitor LBH589 against Bcr-Abl-expressing human leukemia cells. *Blood* 108, 645–652.

Galimberti, S., Cervetti, G., Guerrini, F., Testi, R., Pacini, S., Fazzi, R., Simi, P., and Petrini, M. (2005). Quantitative molecular monitoring of BCR-ABL and MDR1 transcripts in patients with chronic myeloid leukemia during Imatinib treatment. *Cancer Genet. Cytogenet.* 162, 57–62.

Giannoudis, A., Wang, L., Jorgensen, A.L., Xinarianos, G., Davies, A., Pushpakom, S., Liloglou, T., Zhang, J.-E., Austin, G., Holyoake, T.L., et al. (2013). The hOCT1 SNPs M420del and M408V alter imatinib uptake and M420del modifies clinical outcome in imatinib-treated chronic myeloid leukemia. *Blood* 121, 628–637.

Goldman, J.M., and Melo, J.V. (2001). Targeting the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 344, 1084–1086.

Graham, S.M., Jørgensen, H.G., Allan, E., Pearson, C., Alcorn, M.J., Richmond, L., and Holyoake, T.L. (2002). Primitive, quiescent, Philadelphia-positive stem cells from patients with chronic myeloid leukemia are insensitive to STI571 in vitro. *Blood* 99, 319–325.

Gromicho, M., Dinis, J., Magalhães, M., Fernandes, A.R., Tavares, P., Laires, A., Rueff, J., and Rodrigues, A.S. (2011). Development of imatinib and dasatinib

resistance: dynamics of expression of drug transporters ABCB1, ABCC1, ABCG2, MVP, and SLC22A1. *Leuk. Lymphoma* 52, 1980–1990.

Guilhot, F., Dubruille, V., Skotnicki, A.B., Hellmann, A., Shamsazar, J., Bourquelot, P.M., Jalaluddin, M., Li, M., Abruzzese, E., and Akard, L. (2008). A Phase II Study of Oral Panobinostat (LBH589) in Accelerated Phase (AP) or Blast Crisis (BC) Chronic Myeloid Leukemia (CML) Patients Resistant to ≥ 2 BCR-ABL Tyrosine Kinase Inhibitors. *ASH Annu. Meet. Abstr.* 112, 4263.

Hanfstein, B., Lauseker, M., Hehlmann, R., Saussele, S., Erben, P., Dietz, C., Fabarius, A., Proetel, U., Schnittger, S., Haferlach, C., et al. (2014). Distinct characteristics of e13a2 versus e14a2 BCR-ABL1 driven chronic myeloid leukemia under first-line therapy with imatinib. *Haematologica* 99, 1441–1447.

Hasford, J., Baccarani, M., Hoffmann, V., Guilhot, J., Saussele, S., Rosti, G., Guilhot, F., Porkka, K., Ossenkuppele, G., Lindoerfer, D., et al. (2011). Predicting complete cytogenetic response and subsequent progression-free survival in 2060 patients with CML on imatinib treatment: the EUTOS score. *Blood* 118, 686–692.

Hehlmann, R., Berger, U., and Hochhaus, A. (2005). Chronic myeloid leukemia: a model for oncology. *Ann. Hematol.* 84, 487–497.

Hehlmann, R., Hochhaus, A., and Baccarani, M. (2007). Chronic myeloid leukaemia. *Lancet* 370, 342–350.

Hochhaus, A., Kreil, S., Corbin, A.S., La Rosée, P., Müller, M.C., Lahaye, T., Hanfstein, B., Schoch, C., Cross, N.C.P., Berger, U., et al. (2002). Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (STI571) therapy. *Leukemia* 16, 2190–2196.

Hochhaus, A., O'Brien, S.G., Guilhot, F., Druker, B.J., Branford, S., Foroni, L., Goldman, J.M., Müller, M.C., Radich, J.P., Rudoltz, M., et al. (2009). Six-year follow-up of patients receiving imatinib for the first-line treatment of chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 23, 1054–1061.

Hochhaus, A., Masszi, T., Giles, F.J., Radich, J.P., Ross, D.M., Gómez Casares, M.T., Hellmann, A., Stentoft, J., Conneally, E., García-Gutiérrez, V., et al. (2017). Treatment-free remission following frontline nilotinib in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase: results from the ENESTfreedom study. *Leukemia*.

Horita, M., Andreu, E.J., Benito, A., Arbona, C., Sanz, C., Benet, I., Prosper, F., and Fernandez-Luna, J.L. (2000). Blockade of the Bcr-Abl kinase activity induces apoptosis of chronic myelogenous leukemia cells by suppressing signal transducer and activator of transcription 5-dependent expression of Bcl-xL. *J. Exp. Med.* 191, 977–984.

Huang, F.-F., Zhang, L., Wu, D.-S., Yuan, X.-Y., Yu, Y.-H., Zhao, X.-L., Chen, F.-P., and Zeng, H. (2014). PTEN regulates BCRP/ABCG2 and the side population through the PI3K/Akt pathway in chronic myeloid leukemia. *PLoS One* 9, e88298.

Ilander, M., Olsson-Strömberg, U., Schlums, H., Guilhot, J., Brück, O., Lähteenmäki, H., Kasanen, T., Koskenvesa, P., Söderlund, S., Höglund, M., et al. (2017).

Increased proportion of mature NK cells is associated with successful imatinib discontinuation in chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 31, 1108–1116.

Ilaria, R.L., and Van Etten, R.A. (1996). P210 and P190(BCR/ABL) induce the tyrosine phosphorylation and DNA binding activity of multiple specific STAT family members. *J. Biol. Chem.* 271, 31704–31710.

Imagawa, J., Tanaka, H., Okada, M., Nakamae, H., Hino, M., Murai, K., Ishida, Y., Kumagai, T., Sato, S., Ohashi, K., et al. (2015). Discontinuation of dasatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained deep molecular response for longer than 1 year (DADI trial): a multicentre phase 2 trial. *Lancet Haematol.* 2, e528-535.

Gniot, M., Komarnicki, M., Lewandowski, K. (2017). The europe against cancer protocol for bcr-abl p210 transcript measurement may overestimate results for e13a2 variant. EHA Abstract.

<https://learningcenter.ehaweb.org/eha/2017/22nd/181898/michal.gniot.the.europe.against.cancer.protocol.for.bcr-abl.p210.transcript.html?f=p6m3e1181o16884>
[05.08.2017]

Jabbour, E., Kantarjian, H., Jones, D., Talpaz, M., Bekele, N., O'Brien, S., Zhou, X., Luthra, R., Garcia-Manero, G., Giles, F., et al. (2006). Frequency and clinical significance of BCR-ABL mutations in patients with chronic myeloid leukemia treated with imatinib mesylate. *Leukemia* 20, 1767–1773.

Jiang, Z.-P., Zhao, X.-L., Takahashi, N., Angelini, S., Dubashi, B., Sun, L., and Xu, P. (2017). Trough concentration and ABCG2 polymorphism are better to predict imatinib response in chronic myeloid leukemia: a meta-analysis. *Pharmacogenomics* 18, 35–56.

Johansson, B., Fioretos, T., and Mitelman, F. (2002). Cytogenetic and molecular genetic evolution of chronic myeloid leukemia. *Acta Haematol.* 107, 76–94.

Jonker, J.W., and Schinkel, A.H. (2004). Pharmacological and physiological functions of the polyspecific organic cation transporters: OCT1, 2, and 3 (SLC22A1-3). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 308, 2–9.

Kalmanti, L., Saussele, S., Lauseker, M., Müller, M.C., Dietz, C.T., Heinrich, L., Hanfstein, B., Proetel, U., Fabarius, A., Krause, S.W., et al. (2015). Safety and efficacy of imatinib in CML over a period of 10 years: data from the randomized CML-study IV. *Leukemia* 29, 1123–1132.

Kantarjian, H.M., Shah, N.P., Cortes, J.E., Baccarani, M., Agarwal, M.B., Undurraga, M.S., Wang, J., Ipiña, J.J.K., Kim, D.-W., Ogura, M., et al. (2012). Dasatinib or imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia: 2-year follow-up from a randomized phase 3 trial (DASISION). *Blood* 119, 1123–1129.

Kircher, B., Schumacher, P., Petzer, A., Hoflehner, E., Haun, M., Wolf, A.M., Nachbaur, D., and Gastl, G. (2009). Anti-leukemic activity of valproic acid and imatinib mesylate on human Ph⁺ ALL and CML cells in vitro. *Eur. J. Haematol.* 83, 48–56.

- Koptyra, M., Falinski, R., Nowicki, M.O., Stoklosa, T., Majsterek, I., Nieborowska-Skorska, M., Blasiak, J., and Skorski, T. (2006). BCR/ABL kinase induces self-mutagenesis via reactive oxygen species to encode imatinib resistance. *Blood* 108, 319–327.
- Lahaye, T., Riehm, B., Berger, U., Paschka, P., Müller, M.C., Kreil, S., Merx, K., Schwindel, U., Schoch, C., Hehlmann, R., et al. (2005). Response and resistance in 300 patients with BCR-ABL-positive leukemias treated with imatinib in a single center: a 4.5-year follow-up. *Cancer* 103, 1659–1669.
- Larson, R.A., Hochhaus, A., Hughes, T.P., Clark, R.E., Etienne, G., Kim, D.-W., Flinn, I.W., Kurokawa, M., Moiraghi, B., Yu, R., et al. (2012). Nilotinib vs imatinib in patients with newly diagnosed Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia in chronic phase: ENESTnd 3-year follow-up. *Leukemia* 26, 2197–2203.
- Lee, S.M., Bae, J.H., Kim, M.J., Lee, H.S., Lee, M.K., Chung, B.S., Kim, D.W., Kang, C.D., and Kim, S.H. (2007). Bcr-Abl-independent imatinib-resistant K562 cells show aberrant protein acetylation and increased sensitivity to histone deacetylase inhibitors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 322, 1084–1092.
- Lipton, J.H., Chuah, C., Guerci-Bresler, A., Rosti, G., Simpson, D., Assouline, S., Etienne, G., Nicolini, F.E., le Coutre, P., Clark, R.E., et al. (2016). Ponatinib versus imatinib for newly diagnosed chronic myeloid leukaemia: an international, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 17, 612–621.
- Lucas, C.M., Wang, L., Austin, G.M., Knight, K., Watmough, S.J., Shwe, K.H., Dasgupta, R., Butt, N.M., Galvani, D., Hoyle, C.F., et al. (2008). A population study of imatinib in chronic myeloid leukaemia demonstrates lower efficacy than in clinical trials. *Leuk. Off. J. Leuk. Soc. Am. Leuk. Res. Fund UK* 22, 1963–1966.
- Ma, G., Lu, D., Wu, Y., Liu, J., and Arlinghaus, R.B. (1997). Bcr phosphorylated on tyrosine 177 binds Grb2. *Oncogene* 14, 2367–2372.
- Mahon, F., Richter, J., Guilhot, J., Hjorth-Hansen, H., Almeida, A., Janssen, J.J.W.M.J., Mayer, J., Porkka, K., Panayiotidis, P., Stromberg, U., et al. (2016). Cessation of Tyrosine Kinase Inhibitors Treatment in Chronic Myeloid Leukemia Patients with Deep Molecular Response: Results of the Euro-Ski Trial. *Blood* 128, 787–787.
- Mahon, F.X., Deininger, M.W., Schultheis, B., Chabrol, J., Reiffers, J., Goldman, J.M., and Melo, J.V. (2000). Selection and characterization of BCR-ABL positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor STI571: diverse mechanisms of resistance. *Blood* 96, 1070–1079.
- Mahon, F.-X., Réa, D., Guilhot, J., Guilhot, F., Huguet, F., Nicolini, F., Legros, L., Charbonnier, A., Guerci, A., Varet, B., et al. (2010). 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.
- Marin, D., Ibrahim, A.R., Lucas, C., Gerrard, G., Wang, L., Szydlo, R.M., Clark, R.E., Apperley, J.F., Milojkovic, D., Bua, M., et al. (2012). Assessment of BCR-ABL1 transcript levels at 3 months is the only requirement for predicting outcome for

patients with chronic myeloid leukemia treated with tyrosine kinase inhibitors. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 30, 232–238.

Michor, F., Hughes, T.P., Iwasa, Y., Branford, S., Shah, N.P., Sawyers, C.L., and Nowak, M.A. (2005). Dynamics of chronic myeloid leukaemia. *Nature* 435, 1267–1270.

Moloney, W.C. (1987). Radiogenic leukemia revisited. *Blood* 70, 905–908.

Mori, S., Vagge, E., le Coutre, P., Abruzzese, E., Martino, B., Pungolino, E., Elena, C., Pierri, I., Assouline, S., D’Emilio, A., et al. (2015). Age and dPCR can predict relapse in CML patients who discontinued imatinib: the ISAV study. *Am. J. Hematol.* 90, 910–914.

Nardinelli, L., Sanabani, S.S., Didone, A., Ferreira, P. de B., Serpa, M., Novaes, M.M.Y., Marchiani, M., Ruiz, A.L., Lima, I.S., Chamone, D. de A.F., et al. (2012). Pretherapeutic expression of the hOCT1 gene predicts a complete molecular response to imatinib mesylate in chronic-phase chronic myeloid leukemia. *Acta Haematol.* 127, 228–234.

NOWELL, P.C., and HUNGERFORD, D.A. (1960). Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *J. Natl. Cancer Inst.* 25, 85–109.

O’Brien, S.G., Guilhot, F., Larson, R.A., Gathmann, I., Baccarani, M., Cervantes, F., Cornelissen, J.J., Fischer, T., Hochhaus, A., Hughes, T., et al. (2003). Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 348, 994–1004.

O’Hare, T., Shakespeare, W.C., Zhu, X., Eide, C.A., Rivera, V.M., Wang, F., Adrian, L.T., Zhou, T., Huang, W.-S., Xu, Q., et al. (2009). AP24534, a pan-BCR-ABL inhibitor for chronic myeloid leukemia, potently inhibits the T315I mutant and overcomes mutation-based resistance. *Cancer Cell* 16, 401–412.

Onkopedia Database, Chronische Myeloische Leukämie (CML), https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/chronische-myeloische-leukaemie-cml/@_@view/html/index.html [05.08.2017]

Paschka, P., Müller, M.C., Merx, K., Kreil, S., Schoch, C., Lahaye, T., Weisser, A., Petzold, A., König, H., Berger, U., et al. (2003). Molecular monitoring of response to imatinib (Glivec) in CML patients pretreated with interferon alpha. Low levels of residual disease are associated with continuous remission. *Leukemia* 17, 1687–1694.

Pendergast, A.M., Quilliam, L.A., Cripe, L.D., Bassing, C.H., Dai, Z., Li, N., Batzer, A., Rabun, K.M., Der, C.J., and Schlessinger, J. (1993). BCR-ABL-induced oncogenesis is mediated by direct interaction with the SH2 domain of the GRB-2 adaptor protein. *Cell* 75, 175–185.

Quintás-Cardama, A., Gibbons, D.L., Kantarjian, H., Talpaz, M., Donato, N., and Cortes, J. (2008). Sequencing of subcloned PCR products facilitates earlier detection of BCR-ABL1(T315I) and other mutants compared to direct sequencing of the ABL1 kinase domain. *Leukemia* 22, 885–888.

- Quintás-Cardama, A., Kantarjian, H.M., and Cortes, J.E. (2009). Mechanisms of primary and secondary resistance to imatinib in chronic myeloid leukemia. *Cancer Control J. Moffitt Cancer Cent.* *16*, 122–131.
- Roche-Lestienne, C., Soenen-Cornu, V., Grardel-Duflos, N., Laï, J.-L., Philippe, N., Facon, T., Fenaux, P., and Preudhomme, C. (2002). Several types of mutations of the Abl gene can be found in chronic myeloid leukemia patients resistant to STI571, and they can pre-exist to the onset of treatment. *Blood* *100*, 1014–1018.
- Ross, D.M., Branford, S., Seymour, J.F., Schwarzer, A.P., Arthur, C., Bartley, P.A., Slader, C., Field, C., Dang, P., Filshie, R.J., et al. (2010). Patients with chronic myeloid leukemia who maintain a complete molecular response after stopping imatinib treatment have evidence of persistent leukemia by DNA PCR. *Leukemia* *24*, 1719–1724.
- Ross, D.M., Branford, S., Seymour, J.F., Schwarzer, A.P., Arthur, C., Yeung, D.T., Dang, P., Goyne, J.M., Slader, C., Filshie, R.J., et al. (2013). Safety and efficacy of imatinib cessation for CML patients with stable undetectable minimal residual disease: results from the TWISTER study. *Blood* *122*, 515–522.
- Rowley, J.D. (1973). Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* *243*, 290–293.
- Sant, M., Allemani, C., Tereanu, C., De Angelis, R., Capocaccia, R., Visser, O., Marcos-Gragera, R., Maynadié, M., Simonetti, A., Lutz, J.-M., et al. (2010). Incidence of hematologic malignancies in Europe by morphologic subtype: results of the HAEMACARE project. *Blood* *116*, 3724–3734.
- Saußebe, S., Richter, J., Hochhaus, A., and Mahon, F.-X. (2016). The concept of treatment-free remission in chronic myeloid leukemia. *Leukemia* *30*, 1638–1647.
- Sawyers, C.L., McLaughlin, J., and Witte, O.N. (1995). Genetic requirement for Ras in the transformation of fibroblasts and hematopoietic cells by the Bcr-Abl oncogene. *J. Exp. Med.* *181*, 307–313.
- Schmidt, M., Rinke, J., Schäfer, V., Schnittger, S., Kohlmann, A., Obstfelder, E., Kunert, C., Ziermann, J., Winkelmann, N., Eigendorff, E., et al. (2014). Molecular-defined clonal evolution in patients with chronic myeloid leukemia independent of the BCR-ABL status. *Leukemia* *28*, 2292–2299.
- Schütz, C., Inselmann, S., Sausslele, S., Dietz, C.T., Müller, M.C., Eigendorff, E., Brendel, C.A., Metzelder, S.K., Bru Mmendorf, T.H., Waller, C., et al. (2017). Expression of the CTLA-4 ligand CD86 on plasmacytoid dendritic cells (pDC) predicts risk of disease recurrence after treatment discontinuation in CML. *Leukemia* *31*, 829–836.
- Takahashi, N., Miura, M., Scott, S.A., Kagaya, H., Kameoka, Y., Tagawa, H., Saitoh, H., Fujishima, N., Yoshioka, T., Hirokawa, M., et al. (2010). Influence of CYP3A5 and drug transporter polymorphisms on imatinib trough concentration and clinical response among patients with chronic phase chronic myeloid leukemia. *J. Hum. Genet.* *55*, 731–737.

- Tang, M., Foo, J., Gönen, M., Guilhot, J., Mahon, F.-X., and Michor, F. (2012). Selection pressure exerted by imatinib therapy leads to disparate outcomes of imatinib discontinuation trials. *Haematologica* 97, 1553–1561.
- Tipping, A.J., Mahon, F.X., Lagarde, V., Goldman, J.M., and Melo, J.V. (2001). Restoration of sensitivity to STI571 in STI571-resistant chronic myeloid leukemia cells. *Blood* 98, 3864–3867.
- Virchow, R. (1975). Cellular pathology: Lecture VIII. Blood and lymph. *CA. Cancer J. Clin.* 25, 93–97.
- Vlaanderen, J., Lan, Q., Kromhout, H., Rothman, N., and Vermeulen, R. (2012). Occupational benzene exposure and the risk of chronic myeloid leukemia: a meta-analysis of cohort studies incorporating study quality dimensions. *Am. J. Ind. Med.* 55, 779–785.
- Wang, J.Y. (2000). Regulation of cell death by the Abl tyrosine kinase. *Oncogene* 19, 5643–5650.
- Wang, L., Giannoudis, A., Lane, S., Williamson, P., Pirmohamed, M., and Clark, R.E. (2008). Expression of the uptake drug transporter hOCT1 is an important clinical determinant of the response to imatinib in chronic myeloid leukemia. *Clin. Pharmacol. Ther.* 83, 258–264.
- White, D.L., Saunders, V.A., Dang, P., Engler, J., Zannettino, A.C.W., Cambareri, A.C., Quinn, S.R., Manley, P.W., and Hughes, T.P. (2006). OCT-1-mediated influx is a key determinant of the intracellular uptake of imatinib but not nilotinib (AMN107): reduced OCT-1 activity is the cause of low in vitro sensitivity to imatinib. *Blood* 108, 697–704.
- White, D.L., Saunders, V.A., Dang, P., Engler, J., Venables, A., Zrim, S., Zannettino, A., Lynch, K., Manley, P.W., and Hughes, T. (2007). Most CML patients who have a suboptimal response to imatinib have low OCT-1 activity: higher doses of imatinib may overcome the negative impact of low OCT-1 activity. *Blood* 110, 4064–4072.
- White, D.L., Saunders, V.A., Frede, A., Dang, P., Zrim, S., Osborn, M.P., Manley, P., and Hughes, T. (2009). The Functional Activity of the OCT-1 Protein Is Predictive of Molecular Response and Survival in CP-CML Patients Treated with Imatinib: A 5 Year Update of the TIDEL Trial. *ASH Annu. Meet. Abstr.* 114, 507.
- Wylie, A.A., Schoepfer, J., Jahnke, W., Cowan-Jacob, S.W., Loo, A., Furet, P., Marzinzik, A.L., Pelle, X., Donovan, J., Zhu, W., et al. (2017). The allosteric inhibitor ABL001 enables dual targeting of BCR-ABL1. *Nature* 543, 733–737.
- Zhang, W.W., Cortes, J.E., Yao, H., Zhang, L., Reddy, N.G., Jabbour, E., Kantarjian, H.M., and Jones, D. (2009). Predictors of primary imatinib resistance in chronic myelogenous leukemia are distinct from those in secondary imatinib resistance. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 27, 3642–3649.
- Zhong, J.-S., Meng, F.-Y., Xu, D., Zhou, H.-S., and Dai, M. (2012). Correlation between imatinib trough concentration and efficacy in Chinese chronic myelocytic leukemia patients. *Acta Haematol.* 127, 221–227.

6 EIGENANTEIL AN DATENERHEBUNG UND -AUSWERTUNG UND EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN

Diese Arbeit stellt ein Subprojekt der EURO-SKI Studie (*Principal Investigator*: Prof. Dr. S. Saulele) dar. Ein Teil der klinischen Daten basiert auf der Studiendatenbank (INSERM, Poitiers, Frankreich). Die Daten der molekularen Verlaufskontrollen der BCR-ABL Transkript-Levels wurden aus der Datenbank des ‚Mannheimer Exzellenzzentrums für CML‘ erhoben. Als Assistenzarzt und Subinvestigator dieser Studie erfolgten folgende Eigenleistungen in Zusammenarbeit mit der Studiengruppe: Verwaltung der Studiendaten in der Datenbank, Betreuung der Studienpatienten, Bearbeitung der Patientenproben, Interpretation und Auswertung der molekularen Befunde, Erhebung der Patientendaten.

Meine weiteren Eigenleistungen im Rahmen der experimentellen Durchführung dieses Projektes sind folgende: Hypothesengenerierung und Erstellung des Projektkonzeptes, Plasmiddesign, Plasmidklonierung, Herstellung der Plasmid-Standards, Primerdesign, Etablierung der qRT-PCR und statistische Auswertung (außer *Bootstrap*-Analyse: LMU München).

Ergebnisse der vorliegenden Arbeit werden in der folgenden Publikation veröffentlicht:

Sébastien Rinaldetti, Markus Pfirmann, Kirsi Manz, Joelle Guilhot, Christian Dietz, Panayiotidis Panagiotidis, Birgit Spiess, Wolfgang Seifarth, Alice Fabarius, Martin Müller, Maria Pagoni, Maria Dimou, Jolanta Dengler, Cornelius Waller, Tim H. Brümmendorf, Regina Herbst, Andreas Burchert, Carsten Janßen, Maria Elisabeth Goebeler, Philipp J. Jost, Stefan Hanzel, Philippe Schafhausen, Gabriele Prange-Krex, Thomas Illmer, Viktor Janzen, Martine Klausmann, Robert Eckert, Gerd Büschel, Alexander Kiani, Wolf-Karsten Hofmann, François-Xavier Mahon, Susanne Saussele. *IMPACT OF ABCG2, OCT1 AND ABCB1 (MDR1) GENE EXPRESSION ON TREATMENT-FREE REMISSION IN AN EURO-SKI SUBTRIAL*. Submitted to journal

Diese Publikation basiert auf den Ergebnissen dieser Dissertation. Der Einfluss der Transkriptvarianten besteht nur im Rahmen der Konstellation ‚e13a2 versus Rest‘ (siehe Kapitel 3.4). In der Publikation wurde diese Art von Gruppierung nicht vorgenommen, da diese Fragestellung in einer größeren Kohorte noch weiter analysiert werden soll. Die Eigenleistung entspricht der der Dissertation sowie zusätzlich der selbstständigen Erstellung des Manuskripts.

Weitere Veröffentlichungen:

Hehlmann R, Lauseker M, Saußeles S, Pfirrmann M, Krause S, Kolb HJ, Neubauer A, Hossfeld DK, Nerl C, Gratwohl A, Baerlocher GM, Heim D, Brümmendorf TH, Fabarius A, Haferlach C, Schlegelberger B, Müller MC, Jeromin S, Proetel U, Kohlbrenner K, Voskanyan A, **Rinaldetti S**, Seifarth W, Spieß B, Balleisen L, Goebeler MC, Hänel M, Ho A, Dengler J, Falge C, Kanz L, Kremers S, Burchert A, Kneba M, Stegelmann F, Köhne CA, Lindemann HW, Waller CF, Pfreundschuh M, Spiekermann K, Berdel WE, Müller L, Edinger M, Mayer J, Beelen DW, Bentz M, Link H, Hertenstein B, Fuchs R, Wernli M, Schlegel F, Schlag R, de Wit M, Trümper 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, Schäfer E, Hochhaus A, Hasford J (2017) 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* doi:10.1038/leu.2017.253.

Rinaldetti S, Wirtz RM, Worst TS, Eckstein M, Weiss CA, Breyer J, Otto W, Bolenz C, Hartmann A, Erben P (2017) FOXM1 predicts overall and disease specific survival in muscle-invasive urothelial carcinoma and presents a differential expression between bladder cancer subtypes. *Oncotarget* : 47595–47606, doi:10.18632/oncotarget.17394.

Fabarius A, Kalmanti L, Dietz CT, Lauseker M, **Rinaldetti S**, Haferlach C, Göhring G, Schlegelberger B, Jotterand M, Hanfstein B, Seifarth W, Hänel M, Köhne C-H, Lindemann HW, Berdel WE, Staib P, Müller MC, Proetel U, Balleisen L, Goebeler M-E, Dengler J, Falge C, Kanz L, Burchert A, Kneba M, Stegelmann F, Pfreundschuh M, Waller CF, Spiekermann K, Brümmendorf TH, Edinger M, Hofmann W-K, Pfirrmann M, Hasford J, Krause S, Hochhaus A, Saußeles S, Hehlmann R, SAKK and the German CML Study Group (2015) Impact of unbalanced minor route versus major route karyotypes at diagnosis on prognosis of CML. *Ann Hematol* : 2015–2024, doi:10.1007/s00277-015-2494-9.

Kalmanti L, Sausseles S, Lauseker M, Müller MC, Dietz CT, Heinrich L, Hanfstein B, Proetel U, Fabarius A, Krause SW, **Rinaldetti S**, Dengler J, Falge C, Oppliger-Leibundgut E, Burchert A, Neubauer A, Kanz L, Stegelmann F, Pfreundschuh M, Spiekermann K, Scheid C, Pfirrmann M, Hochhaus A, Hasford J, Hehlmann R (2015) Safety and efficacy of imatinib in CML over a period of 10 years: data from the randomized CML-study IV. *Leukemia* : 1123–1132, doi:10.1038/leu.2015.36.

Rinaldetti S, Jung I. Démographie médicale du Luxembourg 2011. Luxembourg: Association luxembourgeoise des étudiants en médecine (ALEM), Impr. Centrale [001071990]

7 LEBENS LAUF

PERSONALIEN

Name und Vorname: Rinaldetti Sébastien
 Geburtsdatum: 07. Juni 1998
 Geburtsort: Düdelingen (Luxemburg)
 Familienstand: ledig
 Vater: Rinaldetti Léon
 Mutter: Camporese Yasmine

SCHULISCHER WERDEGANG

2000 – 2007 Gymnasium Athénée de Luxembourg : klassischer Unterricht, Fachgebiet Latein – Naturwissenschaften – Mathematik
 30.07.2007 Abitur

UNIVERSITÄRER WERDEGANG

WS2007/2008 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Medizinischen Universität Innsbruck
 2008 1. Abschnitt: Erste Diplomprüfung
 2009-2010 2. Abschnitt: Zweite Diplomprüfung.
 2011–2013 3. Abschnitt: Dritte Diplomprüfung
 2010–2013 Diplomarbeit: Mechanisms of Resistance in CML (Betreuer: Prof. Dr. M. Steurer).
 Tiroler Krebsforschungsinstitut (TKFI)
 19.08.2013 Approbation als Arzt
 Seit 2013 Assistenzarzt, Hematologie und Onkologie
 Medizinische Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg

8 DANKSAGUNG

Frau Prof. Dr. Susanne Saußeke danke ich für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und die ausgezeichneten Möglichkeiten, es zu bearbeiten.

Ebenso danke ich Frau Gabriele Bartsch für die Durchsicht und Korrektur meiner Arbeit.

9 EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

1. Bei der eingereichten Dissertation zu dem Thema:

Die Rolle von Influx- und Effluxkanälen in der Prädiktion der therapiefreien Remission bei Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie

handelt es sich um meine eigenständig erbrachte Leistung.

2. Ich habe nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und mich keiner unzulässigen Hilfe Dritter bedient. Insbesondere habe ich wörtlich oder sinngemäß aus anderen Werken übernommene Inhalte als solche kenntlich gemacht.

3. Die Arbeit oder Teile davon habe ich bislang nicht an einer Hochschule des In- oder Auslands als Bestandteil einer Prüfungs- oder Qualifikationsleistung vorgelegt.

4. Die Richtigkeit der vorstehenden Erklärungen bestätige ich.

5. Die Bedeutung der eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung sind mir bekannt. Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit erklärt und nichts verschwiegen habe.

Ort und Datum

Unterschrift