

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt für Hämatologie und  
Onkologie am Campus Virchow Klinikum der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Apherese von CD34-positiven Vorläuferzellen unter  
Imatinibmesylat bei Patienten mit chronischer myeloischer  
Leukämie in kompletter zytogenetischer Remission:**

**Ein Modell für erfolgreiches In-vivo-Purging**

Zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Christine Klühs

aus Rostock

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. Ph. le Coutre

2. Prof. Dr. med. M. Bornhäuser

3. Priv.-Doz. Dr. med. Th. Held

Datum der Promotion: 07.11.2008

Für Isabel und Gustaf

<b>1. EINLEITUNG</b> .....	<b>7</b>
1.1. DIE CHRONISCHE MYELOISCHE LEUKÄMIE (CML) .....	7
1.2. KLINIK.....	7
1.3. DIAGNOSTIK .....	8
1.3.1. Zytogenetik .....	9
1.3.2. Molekulargenetik.....	10
1.3.2.1. Das BCR-ABL-Onkogen.....	10
1.3.2.2. Polymerasekettenreaktion (PCR).....	11
1.4 THERAPIEMANAGEMENT .....	12
1.4.1. Historischer Überblick.....	12
1.4.2. Medikamentöse Therapie .....	13
1.4.2.1. Hydroxyurea (HU) .....	13
1.4.2.2. Interferon alpha (IFN- $\alpha$ ).....	13
1.4.3. Allogene Stammzelltransplantation (alloHSCT) .....	14
1.4.4. Autologe Stammzelltransplantation (autoHSCT).....	15
1.4.5. Der selektive Tyrosinkinase-Inhibitor Imatinib .....	17
1.4.5.1. Präklinische Studien.....	18
1.4.5.2. Phase I-Studien.....	18
1.4.5.3. Phase II-Studien.....	19
1.4.5.4. Phase III-Studie / IRIS-Studie.....	20
1.4.5.5. Resistenzmechanismen gegenüber Imatinib.....	22
1.5. AUFGABENSTELLUNG DER DISSERTATION .....	23
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>26</b>
2.1. KLONIERUNG UND GENERIERUNG VON STANDARDREIHEN.....	29
2.1.1. Plasmide, Primer und Bakterienstämme .....	29
2.1.2. Chemikalien und Enzyme .....	30
2.1.3. DNA-Manipulation.....	30
2.1.4. Partielle Restriktion mit EcoRI .....	30
2.1.5. Herstellung der Standardreihe.....	31
2.2. PROBENGWINNUNG UND AUFBEREITUNG.....	33
2.2.1. Dextran-Separierung .....	33
2.2.2. RNA-Extraktion .....	34
2.2.3. DNA-Konzentrationsbestimmung .....	34
2.2.4. Reverse Transkription.....	35
2.3. POLYMERASEKETTENREAKTION .....	35
2.3.1. Qualitative PCR/ Nested PCR .....	35
2.3.2. Quantitative PCR / LightCycler.....	36
2.4. FLUORESCENZ-IN-SITU-HYBRIDISIERUNG.....	37
2.4.1. Direktpräparation und Vorbehandlung der Stammzellen .....	37

2.4.2. Pepsinverdau aus 10%iger Stammlösung und Hybridisierung .....	37
2.4.3. Waschen und Kernfärbung nach der Hybridisierung .....	38
2.4.4. Auswertung .....	38
2.5. STAMMZELLMOBILISIERUNG, CD34+ APHERESE UND PATIENTENCHARAKTERISTIKA .....	39
2.5.1. Stammzellmobilisation und Apherese .....	39
2.5.2. Patientencharakteristika .....	39
2.6. STATISTISCHE AUSWERTUNG .....	40
<b>3. ERGEBNISSE .....</b>	<b>41</b>
3.1. ERGEBNISSE UNTER IMATINIBTHERAPIE UND STAMMZELLMOBILISIERUNG .....	41
3.1.1. Klinische Patientencharakteristika zur Stammzellmobilisierung (SCM) und CD34+ Apherese .....	41
3.1.2. Zytogenetische Untersuchungen .....	42
3.1.3. Molekularbiologische Ergebnisse .....	43
3.1.3.1. Imatinibresponse .....	43
3.1.3.2. Vergleich molekularbiologischer Untersuchungen des peripheren Blutes vor und nach SCM ...	45
3.1.3.3. PCR-Ergebnisse der Aphereseprodukte .....	47
3.2. AUSWERTUNG ANHAND EINIGER PATIENTENBEISPIELE .....	48
3.2.1. Patient 1 .....	48
3.2.2. Patient 2 .....	50
3.2.3. Patient 9 .....	53
3.2.4. Patient 10 .....	56
<b>4. DISKUSSION .....</b>	<b>59</b>
4.1. METHODIK .....	59
4.1.1. LightCycler/ Standardreihe .....	59
4.2. BEDEUTUNG DER PROGNOTISCHEN AUSSAGEN HINSICHTLICH THERAPIEANSPRECHEN UND THERAPIEVERSAGEN .....	60
4.3. HÄMATOLOGISCHES, ZYTOGENETISCHES UND MOLEKULARGENETISCHES ANSPRECHEN UNTER IMATINIBTHERAPIE .....	61
4.4. KORRELATION ZWISCHEN QUANTITATIVER PCR UND ZYTOGENETISCHEM ANSPRECHEN .....	62
4.5. AUTOGRAFTING .....	63
4.6. BEDEUTET PH-NEGATIV UND BCR-ABL-NEGATIV WIRKLICH NEGATIV? .....	68
4.7. DORMANT STEM CELLS .....	69
4.8. AUSBLICK .....	70
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>71</b>
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>73</b>
<b>7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>78</b>
<b>8. ANHANG .....</b>	<b>80</b>
<b>9. PUBLIKATIONSLISTE .....</b>	<b>83</b>

<b>10. ERKLÄRUNG.....</b>	<b>84</b>
<b>11. DANKSAGUNG .....</b>	<b>85</b>
<b>12. TABELLARISCHER LEBENSLAUF .....</b>	<b>86</b>

## 1. Einleitung

### 1.1. Die chronische myeloische Leukämie (CML)

Die chronische myeloische Leukämie (CML) wurde erstmals im Jahre 1845 von *Virchow* und *Benett* unabhängig voneinander beschrieben [1, 2]. *Virchow* verwendete die Bezeichnung ‚Weißes Blut‘, womit er treffend die Morphologie beschrieb. Die CML ist eine klonale Neoplasie der Hämatopoese, die nicht nur die myeloischen, sondern auch die monozytären, erythrozytären und megakaryozytären Knochenmarkzellen betrifft [3]. Sie gehört zu den chronischen myeloproliferativen Erkrankungen und betrifft 10-20% der Leukämien. Die jährliche Inzidenz beträgt 1-2 auf 100.000 Einwohner mit einem medianen Erkrankungsalter im fünften und sechsten Dezennium. Männer sind etwa 1,4mal häufiger betroffen als Frauen. Als Risikofaktor wird die Exposition gegenüber ionisierender Strahlung (Radiotherapie bei Krebserkrankungen, Überlebende des Atombombenabwurfes) diskutiert [4, 5]. Charakteristisch für die CML ist eine spezifische Chromosomenanomalie, das Philadelphia-Chromosom (Ph), das erstmalig 1960 durch *Nowell* und *Hungerford* beschrieben wurde [6]. Dabei handelt es sich um ein verkürztes Chromosom 22, das durch reziproke Translokation der distalen Bereiche der langen Arme der Chromosomen 9 und 22,  $t(9;22)(q34;q11)$ , entsteht [7]. Bei ungefähr 95% der Patienten lässt sich das Philadelphia-Chromosom nachweisen. Mit Hilfe molekulargenetischer Methoden wurde bei etwa der Hälfte der übrigen 5% der Patienten das BCR-ABL-Gen identifiziert (siehe Kapitel 1.3.2.1.). Diese Patienten sind klinisch und molekulargenetisch nicht von den Philadelphia-Chromosom-positiven (Ph+) CML-Patienten zu unterscheiden [8].

### 1.2. Klinik

Die Diagnose CML wird bei mehr als der Hälfte der Patienten zufällig während Routineuntersuchungen gestellt. Gewöhnliche klinische Befunde sind Müdigkeit, Gewichtsverlust, Appetitlosigkeit und Nachtschweiß. In über 70% der Patienten findet sich eine deutlich vergrößerte Milz und dadurch bedingtes Völlegefühl. Anämiezeichen wie Blässe, Dyspnoe und Tachykardie kommen bei mehr als der Hälfte der CML-Erkrankten vor.

Als Folge der gestörten Thrombozytenfunktion können Hämatome, Epistaxis, Menorrhagien oder Blutungen in anderen Regionen auftreten und die durch

verstärkten Purinabbau bedingte Hyperurikämie kann es zu Gicht oder Nierenfunktionsstörungen führen. Seltene Symptome sind Sehstörungen und Priapismus.

Der klinische Verlauf der Erkrankung ist zwei- oder dreiphasig. In 85% der Fälle wird die CML in der chronischen Phase diagnostiziert. Die chronische Phase (CP) ist durch eine exzessive Erhöhung der Leukozyten im Blut, verbunden mit einer pathologischen Linksverschiebung der Granulopoese, gekennzeichnet. Häufig sind die eosinophilen und basophilen Vorstufen sowie die Megakaryopoese betroffen. 3 bis 7 Jahre nach Diagnose kommt es zum Fortschreiten der Erkrankung in die Akzelerationsphase (AP) und Blastenkrise (BC). Etwa 25% der Patienten entwickeln keine AP.

Die Kriterien der AP sind [9]:

- 15-29% Blasten im Blut oder Knochenmark,
- >30% Blasten und Promyelozyten im Blut oder Knochenmark,
- $\geq 20\%$  Basophile im Blut,
- nicht therapieinduzierte persistierende Thrombozytopenie ( $< 100 \times 10^9/L$ ).

Relativ plötzlich im Anschluss an die AP oder im Verlauf der CP kommt es zur BC, deren Dauer unter Chemotherapie im Median nur etwa 3 bis 6 Monate beträgt. Die BC ist definiert durch das Auftreten von mehr als 30% Blasten im Blut oder Knochenmark oder von extramedullären blastären Infiltraten [10]. Die BC kann sowohl als lymphatische als auch als myeloische Leukämie auftreten [11, 12].

Neue diagnostische Methoden und Kriterien könnten die Grenzen zwischen CP, AP und BC verändern und in gewissem Maße die Unterteilung in 3 Phasen modifizieren.

### **1.3. Diagnostik**

Zur Basisdiagnostik gehören Anamnese (Leistungsknick und Verschlechterung des Allgemeinzustands) und körperlicher Befund mit Milz- und Lebergröße, Inspektion von Haut und Schleimhäuten auf extramedulläre Infiltrate und Blutungszeichen sowie die Suche nach Hinweisen auf thromboembolische Ereignisse und Mikrozirkulationsstörungen. Paraklinisch von Bedeutung sind das Differenzialblutbild, die Laborchemie, die Knochenmarksbiopsie mit Aspirationszytologie und eine Sonographie des Abdomens. Im Blutbild fallen Leukozytose mit Linksverschiebung, Basophilie und Eosinophilie auf. Die Aktivität der alkalischen

Leukozytenphosphatase (ALP) ist erniedrigt oder nicht nachweisbar, während die Laktatdehydrogenase (LDH) erhöht ist. Harnsäure und Kreatinin sind erhöht. Das Knochenmark ist hyperzellulär mit Linksverschiebung, gesteigerter Megakaryopoese und vermehrtem Auftreten von Promyelozyten und Blasten.

Differentialdiagnostisch muss immer an eine reaktive Leukozytose oder andere myeloproliferative Syndrome wie Osteomyelofibrose, Essentielle Thrombozytose oder Polycythaemia vera gedacht werden. Die Splenomegalie kann weiterhin hinweisend sein auf Non-Hodgkin-Lymphome oder Erkrankungen nicht-hämatologischer Genese.

### 1.3.1. Zytogenetik

Im Jahre 1960 entdeckten *Hungerford* und *Nowell* das Philadelphia-Chromosom als erste typische zytogenetische Abberation in Verbindung mit einer Krebserkrankung [6]. Sie untersuchten 7 CML-Patienten, bei denen jeweils das Philadelphia-Chromosom gefunden werden konnte. Mittels verbesserter Bänderungstechniken gelang es *Rowley* 1973 zu zeigen [7], dass es sich beim Philadelphia-Chromosom um eine Translokation der Chromosomen 9 und 22 handelt. Zum Nachweis des für die CML charakteristischen Philadelphia-Chromosoms und anderer Abberationen werden Blut und Knochenmark konventionell zytogenetisch und mit Hilfe der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) untersucht. Ebenso bietet die Zytogenetik die Möglichkeit zur Erfassung klonaler Evolution. Sie ist neben der Molekulargenetik entscheidend für die Verlaufskontrolle und Beurteilung der Response. Die Sensitivität dieser Technik beträgt 1-5%. Um die Möglichkeit zum internationalen Vergleich zu schaffen, definierte man 4 Remissionsarten [13]:

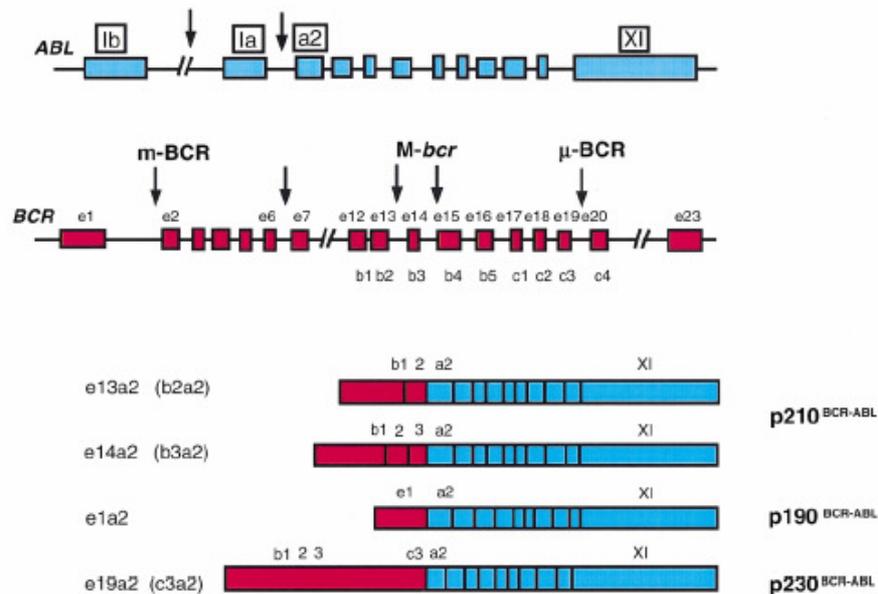
1. *Komplette zytogenetische Remission* mit 0% Ph+ Metaphasen im Knochenmark bei mindestens 10 untersuchten Metaphasen (CCR)
2. *Partielle zytogenetische Remission* mit 1-34% Ph+ Metaphasen im Knochenmark
3. *Geringe zytogenetische Remission* mit 35-94% Ph+ Metaphasen im Knochenmark
4. *Keine zytogenetische Remission* mit >94% Ph+ Metaphasen im Knochenmark

Die komplette und partielle Remission werden als *Major Cytogenetic Response* (MCR), die geringe zytogenetische Remission als *Minor Cytogenetic Response* bezeichnet.

### **1.3.2. Molekulargenetik**

#### **1.3.2.1. Das BCR-ABL-Onkogen**

Durch Untersuchungen an Ph<sup>+</sup> Zellen entdeckten 1982 *de Klein et al.* [14], dass ABL vom Chromosom 9 auf Chromosom 22 transloziert war. Erstmals wurde damit gezeigt, dass es sich bei der Philadelphia-Translokation um eine reziproke balancierte Translokation handelt. Die Bruchpunkte dieser Translokation t(9;22) liegen auf Chromosom 9 im Bereich des ABL(*Abelson leukemia virus*)-Protoonkogens, auf Chromosom 22 im Bereich des BCR(*breakpoint cluster region*)-Gens. Es bildet sich ein hybrides BCR-ABL-Gen, das in eine 8,5 kb Fusions-messenger-RNA transkribiert und in ein Fusionsprotein p210<sup>BCR-ABL</sup> mit einem Molekulargewicht von 210 kDa translatiert wird. In einigen Fällen findet sich bei Patienten anstelle des Onkogens mit 210 kDa ein BCR-ABL-Gen mit einem Molekulargewicht von 230 kDa. Dieses seltene Onkogen ist für Patienten mit chronisch-neutrophiler Leukämie charakteristisch [15]. Bei Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie (ALL) lassen sich 185 kDa- oder 190 kDa-Varianten des BCR-ABL-Onkogens nachweisen [16]. Abb. 1 stellt die typischen Bruchpunkte der Gene ABL und BCR dar.



**Abb. 1: Typische Bruchpunkte der Gene ABL und BCR bei der Philadelphia-Translokation und Fusionsproteine der Ph+ Leukämien [17]**

Das für die CML charakteristische Fusionsprotein p210<sup>BCR-ABL</sup> hat eine deregulierte und erhöhte Tyrosinkinaseaktivität, die in unmittelbarem Zusammenhang mit der Pathogenese des Fusionsproteins steht [18].

Tyrosinkinasen gehören zur Familie der Proteinkinasen. Sie sind Enzyme, die den Transfer einer Phosphatgruppe von einem Donor (meist ATP) auf die Seitenketten-Hydroxyl-(OH-)Gruppe der Aminosäure Tyrosin katalysieren.

Die Tyrosinphosphorylierung von BCR-ABL-Substraten führt zur Aktivierung von Signaltransduktionswegen. Gesteigerte Proliferation, reduzierter natürlicher Zelltod und verminderte Adhäsion der leukämischen Zellen am Knochenmarkstroma kennzeichnen BCR-ABL-positive (BCR-ABL+) Zellen [19].

### 1.3.2.2. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) trägt wesentlich zum Nachweis kleinster Mengen erkrankungsspezifischer Nukleotidsequenzen bei, was diagnostisch zur Verlaufsbeurteilung einer minimalen Resterkrankung nach Therapie und auch prognostisch bedeutend ist.

Man unterscheidet qualitative und quantitative PCR. Bei der qualitativen PCR werden mit Hilfe spezifischer ABL- und BCR-Primer b2a2- und/oder b3a2-BCR-ABL-Transkripte nach Extraktion leukozytärer RNA, reverser Transkription zu cDNA und

PCR-Amplifizierung nachgewiesen. Zum Erreichen maximaler Sensitivität reamplifiziert man einen Bruchteil der Reaktionsprodukte (nested PCR). Die quantitative PCR dient der Abschätzung der absoluten oder relativen Zahl der RNA- oder DNA-Target-Moleküle in einer Probe. Die im Erkrankungsverlauf gemessenen Daten ermöglichen eine frühere und effektivere Rezidivtherapie [20].

Mit Hilfe der quantitativen PCR-Technologie besteht die Möglichkeit anhand steigender BCR-ABL-Transkripte ein Rezidiv schon früher zu erkennen. *Elmaagacli et al.* [21] entwickelten eine neue LightCycler-Technik, mit der es möglich war, zuverlässige Unterschiede zwischen molekularem, zytogenetischem und hämatologischem Rezidiv auszumachen. Diese Möglichkeit ist von relevanter klinischer Bedeutung, da sie ausschlaggebend für die weitere Therapie ist. Somit schließt die quantitative PCR die Lücke, die in der Diagnostik mit nicht-quantitativen PCR-Methoden entsteht.

## **1.4 Therapiemanagement**

### **1.4.1. Historischer Überblick**

Im frühen 20. Jahrhundert behandelte man die CML mit ionisierender Bestrahlung, Arsen oder Splenektomie. Seit den 70er Jahren gibt es Studien mit unterschiedlichen Zytostatika. Hydroxyurea (HU) verlängert das mediane Überleben von CML-Patienten [22]. Mitte der 80er hat Interferon-alpha (IFN- $\alpha$ ) erhebliche Bedeutung für die Therapie der CML gewonnen. 30% der Patienten erreichen zytogenetische Remissionen [23] und die 5-Jahres-Überlebensrate war um 15% besser als bei mit HU oder Busulfan behandelten Patienten [24]. Die These, dass eine konsequente Senkung der Tumormasse zur Verzögerung der Progression der Erkrankung und damit zur Verlängerung des Überlebens führen könne, beeinflusste die Entwicklung neuer Therapieansätze. Es folgten Kombinationstherapien mit HU und IFN- $\alpha$ , IFN- $\alpha$  mit Arabinosyl-Cytosin (Ara-C) und schließlich begann man mit der Transplantation autologer Stammzellen nach vorheriger Separation und Hochdosischemotherapie.

Die zurzeit einzige kurative Therapie ist die allogene Stammzelltransplantation (alloHSCT). Sie weist aber eine hohe Rate an Komplikationen wie Infektionen, Graft-versus-Host-Disease, idiopathischer Pneumonie, Venooclusive-Disease (Verschluss der kleinen Lebervenen) und Transplantatversagen auf.

Das Therapieregime muss individuell auf den Patienten abgestimmt sein. Wichtig dabei ist die Abwägung zwischen Risiko und Nutzen einer Therapie. Der Hasford-Score benutzt Patientenalter, Milzgröße, Anzahl der Blasten, Eosinophilen, Basophilen und Thrombozyten zum Zeitpunkt der Diagnose, um zwischen niedrigem, intermediärem und hohem Risiko zu unterscheiden [25, 26]. Die Berechnung kann im Internet unter [www.pharmacoepi.de](http://www.pharmacoepi.de) erfolgen.

## **1.4.2. Medikamentöse Therapie**

### **1.4.2.1. Hydroxyurea (HU)**

HU ist ein S-Phasen-spezifischer Inhibitor der Ribonukleotidreduktase und inhibiert damit die DNA-Synthese. In einer randomisierten Studie der *German CML Study Group* [22] wurde gezeigt, dass HU im Vergleich zu Busulfan ein besseres medianes Überleben hatten (58,2 vs. 45,4 Monate).

### **1.4.2.2. Interferon alpha (IFN- $\alpha$ )**

In den 90er Jahren wurden Multicenter-Studien veröffentlicht, die zeigten, dass das Ansprechen und Überleben von IFN- $\alpha$ -behandelten Patienten besser war, als das von Patienten, die mit Busulfan oder HU behandelt worden waren [23, 27, 28]. Eine Metaanalyse von 7 randomisierten Studien bestätigte eine höhere Überlebensrate der IFN- $\alpha$ -behandelten (57%) Patienten gegenüber HU (42%) [24]. Durch IFN- $\alpha$  können bei 70-80% der Patienten nicht nur stabile hämatologische Remissionen, sondern auch bei 5-10% dauerhafte komplette zytogenetische Remissionen induziert werden [27].

Eine Kombinationstherapie von IFN- $\alpha$  mit Ara-C scheint synergistische Effekte zu haben. Eine randomisierte klinische Studie konnte bei Patienten, die mit beiden Substanzen behandelt wurden, eine signifikante Steigerung der hämatologischen Remissionsrate (67% vs. 54%), der zytogenetischen Remission (39% vs. 22%) und eine Verlängerung der 3-Jahres Überlebensrate (88% vs. 76%) aufzeigen [29].

Den trotz alledem viel versprechenden Ergebnissen der Behandlung mit IFN- $\alpha$  steht gegenüber, dass 15-25% der Patienten dosislimitierende Nebenwirkungen gegenüber der Substanz aufweisen. Diese äußern sich in grippeartigen Symptomen mit Fieber, Gliederschmerzen, Appetitlosigkeit und können durch die prophylaktische Gabe von Antiphlogistika gemildert werden. Weiterhin kommt es zu Anämie,

Leukopenie, Thrombozytopenie, depressiven Reaktionen, Hyper- und Hypotonien, Ödemen, Neuropathien etc. Kombinationstherapien erlauben eine bessere Flexibilität in der Therapie während der CP.

### 1.4.3. Allogene Stammzelltransplantation (alloHSCT)

Die allogene Stammzelltransplantation (alloHSCT) ist bis heute der einzig kurative Ansatz in der Behandlung der CML. Dabei hat man die Eradikation des leukämischen Klons durch Gabe einer myeloablativen Chemotherapie und die Wiederherstellung der normalen Hämatopoese durch Transplantation von Stammzellen zum Ziel. CML-Patienten besitzen abhängig vom individuellen Risikoprofil die besten 5- und 10-Jahres-Überlebensraten aller Leukämien nach alloHSCT. Das krankheitsfreie Überleben 10 Jahre nach alloHSCT liegt bei ca. 60%, sowohl für Verwandten- als auch Fremdspende [30]. Ein von der EBMT (European Group for Blood and Marrow Transplantation) erarbeiteter Transplantationsscore ermöglicht die Einschätzung des individuellen Risikos [31]. Dieser sogenannte *Risk Assessment Index for CML* ergibt sich aus dem Stadium der Erkrankung, der Herkunft des Transplantats (Verwandten- oder Fremdspender-Transplantation), dem Alter und dem Geschlecht des Empfängers, dem Geschlecht des Spenders und der Zeit von der Erstdiagnose bis zur Transplantation (Tab. 1).

**Tab. 1: EBMT Risiko Score**

<b>Risikofaktor</b>	<b>Punktzahl</b>
<b><u>Spendertyp</u></b>	
HLA-identisch	0
Fremdspender	1
<b><u>Erkrankungsstadium</u></b>	
Chronische Phase	0
Akzelerationsphase	1
Blastenkrise	2
<b><u>Alter des Patienten</u></b>	
<20 Jahre	0
20-40 Jahre	1
>40 Jahre	2
<b><u>Geschlechterkombination</u></b>	
Andere	0
Weiblicher Spender/Männlicher Empfänger	1
<b><u>Zeitintervall von Diagnose bis HSCT</u></b>	
<12 Monate	0
>12 Monate	1

\* 2-Jahres-Überlebensrate nach alloHSCT: 0-1 65%; 2-4 55%; >4 24% [32]

Die transplantationsassoziierte Morbidität und Mortalität (TRM) durch Infektionen, akute oder chronische GvHD und Organversagen entscheiden über Erfolg bzw. Misserfolg der alloHSCT.

Die GvHD ist die häufigste Komplikation nach alloHSCT. Vitale T-Spenderlymphozyten vermitteln im Organismus des Empfängers zelluläre Immunreaktionen und bilden zytotoxische T-Zellen und Antikörper gegen die Antigene an den Organen des Empfängers. Der *Graft-versus-Leukemia*-Effekt (GvL) ist eine durch T-Lymphozyten des Spenders hervorgerufene Immunreaktion, die gegen die Leukämiezellen gerichtet ist. GvHD und GvL-Effekt sind eng miteinander verbunden. Je nach Auftreten der GvHD spricht man von akuter (innerhalb der ersten 100 Tage nach alloHSCT) oder chronischer (ab dem 100. Tag) GvHD. Zur Prävention einer GvHD kann eine kurzzeitige Therapie mit Methotrexat und eine mehrmonatige Gabe von Cyclosporin A oder Tacrolimus indiziert sein. Eine hohe Anzahl von CD34+ Zellen führt zur schnelleren Wiederherstellung der Hämatopoese, reduzierter TRM und geringerer Rückfallrate (*relapse incidence* RI). Das Risiko einer GvHD steigt mit dem Grad der Histoinkompatibilität. Je höher der Grad der akuten GvHD ist, desto größer ist die TRM. Allerdings sinkt die RI. Patienten ohne GvHD haben ein erhöhtes Rückfallrisiko.

Für Patienten, die nach der ersten Transplantation einen Rückfall erleiden, gibt es verschiedene Rezidivtherapien. Die Gabe von Spenderlymphozyten, die sogenannte *Donor Lymphocyte Infusion*, stellt eine effektive Rezidivtherapie dar [33]. Patienten, bei denen es bis zur Umstellung der Therapie nur zum zyto- oder molekulargenetischen Wiederauftreten der Erkrankung gekommen war, hatten ein besseres Ansprechen auf die Gabe von Spenderleukozyten als solche, die einen hämatologischen Rückfall erlitten [20]. Andere therapeutische Optionen sind das Absetzen der immunsuppressiven Therapie, IFN- $\alpha$ -Therapie, Zweittransplantation oder intensive Chemotherapie [34].

#### **1.4.4. Autologe Stammzelltransplantation (autoHSCT)**

Für die Patienten, bei denen aufgrund ihrer Komorbidität, ihres Alters oder der erfolglosen Spendersuche keine alloHSCT möglich war, versucht man neue alternative Therapiestrategien zu entwickeln. Eine Option besteht in der autologen Stammzellsammlung und Stammzelltransplantation. Die ersten Versuche autologer

Stammzelltransplantation bei an CML erkrankten Patienten wurden zur Wiederherstellung einer CP, der zweiten CP, durchgeführt [35, 36]. Die Stammzellgewinnung zum Zeitpunkt der Diagnose wurde ohne vorherige Chemotherapie und Gabe von Wachstumsfaktoren durchgeführt. Vorteile waren Zytoreduktion bei initial hoher Zellzahl und die Möglichkeit, bei raschem Progress durch Retransplantation eine zweite CP zu erreichen. Die hohe Kontamination mit Ph<sup>+</sup> Zellen war von Nachteil. Um die Anzahl Philadelphia-negativer (Ph<sup>-</sup>) Zellen im Leukapheresat zu erhöhen, wurden verschiedene *Purging*(=Reinigungs)-Verfahren angewandt. Grundsätzlich muss zwischen *In-vivo*- und *In-vitro*(=*ex-vivo*)-*Purging* unterschieden werden. Beim *In-vivo*-*Purging* wurde eine „spezifische“ Therapie gegen Leukämiezellen verabreicht mit sich anschließender Apherese. Bei der G-CSF-Mobilisierung von IFN- $\alpha$ -Respondern in CCR konnten bei 63% bzw. 89% der Patienten Ph<sup>-</sup> Apheresate gesammelt werden [37, 38]. Beim *In-vitro*-*Purging* werden die gesammelten Stammzellen mit verschiedenen Methoden zur Reduktion des Ph<sup>+</sup> Klons, z.B. der Applikation von Antisenseoligonukleotiden [39], behandelt.

Anhand verschiedener Veröffentlichungen [40, 41, 42, 43, 44] kann man die Ergebnisse der autoHSCT bei Patienten mit CML in Transformation folgendermaßen zusammenfassen:

- Bei Patienten, die eine periphere Blut-Stammzell-Transplantation (PBSCT) erhielten, trat die hämatologische Regeneration schneller ein als nach Knochenmark-Stammzell-Transplantation (BMSCT). Außerdem wird für die Entnahme peripherer Stammzellen keine Narkose benötigt.
- Die mediane Überlebenszeit bei Patienten, die in AP oder BC transplantiert wurden, beträgt 20 Monate mit besseren Ergebnissen der Patienten in AP.
- Einige Patienten wiesen eine zytogenetische Veränderung ähnlich dem Wiederauftreten Ph<sup>-</sup> Zellen auf und schienen damit ein längeres Überleben zu haben.
- Ebenso hatten Patienten mit einer mehrmaligen Stammzellsammlung ein längeres Überleben.
- In den meisten Fällen konnte eine zweite CP erreicht werden. Allerdings war deren Dauer gewöhnlich kurz. Der Großteil der Patienten entwickelte nach 6-9 Monaten erneut eine BC.

Aufgrund bis heute nicht gesicherter Überlebensvorteile zählt die autoHSCT nicht zu den etablierten standardisierten Verfahren.

### 1.4.5. Der selektive Tyrosinkinase-Inhibitor Imatinib

Das Verständnis der Pathogenese der CML und die Aufklärung der molekularen Grundlagen haben zur Entwicklung von Imatinib geführt. Imatinib, ein 2-Phenylaminopyrimidinderivat, ist ein selektiver Inhibitor der BCR-ABL-Tyrosinkinase. Diese Form der Therapie wird *targeted therapy* (=zielgerichtete Therapie) genannt. Imatinib, früher bekannt als CGP57148 oder STI571; (*signal transduction inhibitor*; Novartis, Pharma, Basel, Schweiz) bindet kompetitiv die ATP-Bindungsstelle der BCR-ABL-Tyrosinkinase (Abb. 2). Die kompetitive Bindung an die Tyrosinkinase hemmt die Tyrosinphosphorylierung von Proteinen der BCR-ABL-Signaltransduktionskaskade. Die Interaktion der nicht-phosphorylierten Proteine mit diversen Signaltransduktionskaskaden wird unterbrochen und die maligne Transformation so unterbunden. Imatinib verursacht in BCR-ABL+ Zellen einen Proliferationsstopp und die Reinduktion des programmierten Zelltodes (Apoptose). Dadurch wird die Regeneration der gesunden Resthämatopoese ermöglicht, was sich klinisch in zytogenetischen Remissionen manifestiert. Imatinib wird hauptsächlich über CYP3A4 metabolisiert.

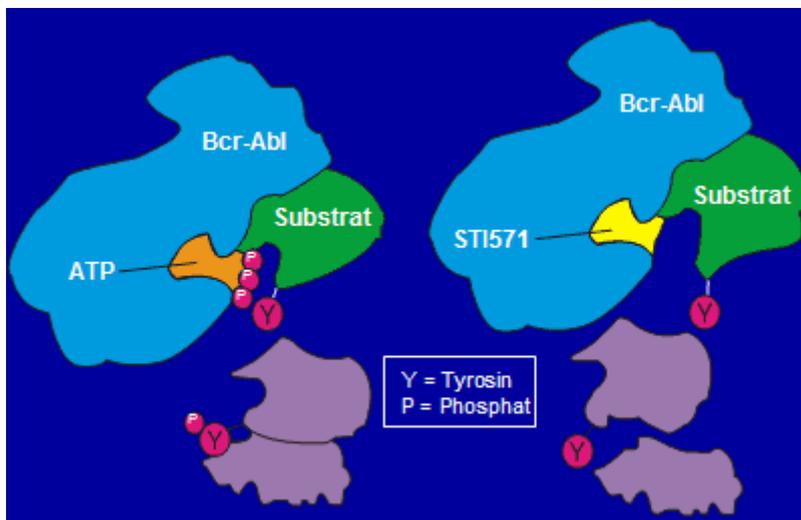


Abb. 2: Wirkmechanismus von STI571 = Imatinib:

Imatinib bindet kompetitiv die ATP-Bindungsstelle der BCR-ABL-Tyrosinkinase und hemmt somit die Phosphorylierung von Proteinen der BCR-ABL-Signaltransduktionskaskade. Proliferationsstopp und Reinduktion des programmierten Zelltodes sind die Folge. Aus [www.onkodin.de](http://www.onkodin.de)

Seit 1998 gibt es Studien mit einem selektiven Tyrosinkinase-Inhibitor (STI571, Glivec), in die man zunächst IFN- $\alpha$ -resistente Patienten einschloss. Aufgrund der guten hämatologischen und zytogenetischen Remissionsraten wird es heute als *first-line*-Therapie bei Patienten mit Ph<sup>+</sup> CML eingesetzt.

#### **1.4.5.1. Präklinische Studien**

In präklinischen Untersuchungen wurde gezeigt, dass Imatinib in submikromolaren Konzentrationen die Autophosphorylierung von v-Abl, PDGF-R (platelet-derived growth factor receptor), des c-kit-Rezeptors und der Arg-Tyrosinkinase (abl-related gene) hemmt, während andere Tyrosinkinasen (Flt-3, EGF-Rezeptor, Insulin-Rezeptor, IGF-1-Rezeptor) nicht gehemmt werden [45]. Darüber hinaus inhibiert es die PDGF-induzierte Bildung von Inositolphosphat, die Aktivierung der MAP-Kinase und die Expression von c-fos-mRNA in intakten Zellen [46].

*Gambacorti-Passerini et al.* haben gezeigt, dass Imatinib selektiv das Wachstum BCR-ABL<sup>+</sup> Zellen hemmt und zur Induktion von Apoptose führt [47].

Die Versuche mit einer großen Zahl natürlicher Zelllinien, hergeleitet von Patienten mit CML oder Ph<sup>+</sup> akuter lymphatischer Leukämie, haben in den meisten Fällen eine Empfindlichkeit dieser Zellen gegenüber Imatinib gezeigt.

#### **1.4.5.2. Phase I-Studien**

Nachdem sich Imatinib in präklinischen Untersuchungen als effektiv erwiesen hatte und auch die Toxizität im Tierversuch akzeptabel erschien [48], begannen im Jahr 1998 die ersten klinischen Studien. In einer Dosisescalationsstudie wurde gezeigt, dass sowohl in der IFN-refraktären CP als auch in fortgeschrittenen Phasen mit einer Dosis von mindestens 300 mg p.o. täglich hämatologische und zytogenetische Remissionen erreicht werden können [49]. 53 der 54 Patienten (98%) erreichten eine komplette hämatologische Remission (CHR).

Zytogenetisches Ansprechen beobachtete man bei 29 Patienten, wobei 17 der 29 Patienten eine MCR, 7 Patienten eine CCR erreichten. Das zytogenetische Ansprechen trat frühestens 2 und spätestens 10 Monate nach Beginn der Imatinibtherapie ein.

Imatinib hat ein sehr günstiges Nebenwirkungsspektrum, da in dieser Studie keine dosislimitierende Toxizität beobachtet wurde. Häufigste Nebenwirkungen waren Übelkeit, Muskelkrämpfe, Ödeme und Diarrhö. Diese waren im Allgemeinen aber

mild und wurden als Grad-I-Toxizität eingestuft. Erhöhte Leberwerte (Grad II und höher) beobachtete man bei 7 Patienten. Bei Dosierungen ab 300 mg sah man bei ca. 25% der Patienten eine höhergradige (Grad II-IV) Myelotoxizität. Die Unterdrückung der Hämatopoese ist aber Teil des therapeutischen Effekts.

Für die folgenden Studien wurden tägliche Dosen von 400 mg Imatinib in CP und 600 mg in AP empfohlen.

#### **1.4.5.3. Phase II-Studien**

1999 wurden Phase II-Studien begonnen, in die CML-Patienten in CP (CP) [50], in AP [51] und BC [10] eingeschlossen wurden. Diese Studien waren internationale Multicenterstudien mit einer Rekrutierungszahl von insgesamt 532 Patienten in CP, 235 in AP und 260 Patienten in BC. Patienten in CP erhielten täglich 400 mg Imatinib, Patienten in AP und BC entweder 400 mg oder 600 mg täglich. Bei 95% der Patienten in CP kam es zur CHR, bei 60% zur MCR. 41% der Patienten in MCR zeigten sogar eine CCR. Prognostisch günstig für das zytogenetische Ansprechen waren Blastenfreiheit im peripheren Blut, ein Hämoglobingehalt im Blut von über 12 g/dL, weniger als 5% Blasten im Knochenmark, eine CML-Dauer von weniger als einem Jahr und ein zytogenetisches Ansprechen vor IFN-Therapieresistenz bzw. IFN-Unverträglichkeit. Das progressionsfreie Überleben bei Patienten in CP lag bei 89%. Die Rate der Progressionsfreiheit war positiv mit dem Erreichen eines zytogenetischen Ansprechens innerhalb von 3 Monaten assoziiert.

In der Gruppe der Patienten in AP zeigten 69% der Patienten eine hämatologische Remission von mindestens 4 Wochen, 34% eine CHR. Die zytogenetische Ansprechrate (MCR) lag bei 24%, davon 17% CCR.

Bei Patienten in BC lag die hämatologische Ansprechrate bei 31%, 8% davon CHR. Nur 16% erreichten ein partielles oder komplettes (7%) zytogenetisches Ansprechen. Die mediane Überlebenszeit betrug 6,9 Monaten. In Tab. 2 sind die Ergebnisse zusammengefasst.

**Tab. 2: Zusammenfassung der Phase II-Studien:**

**CHR = komplette hämatologische Remission, MCR = Major Cytogenetic Response (Ph+ Metaphasen ≤ 35%), CCR = komplette zytogenetische Remission**

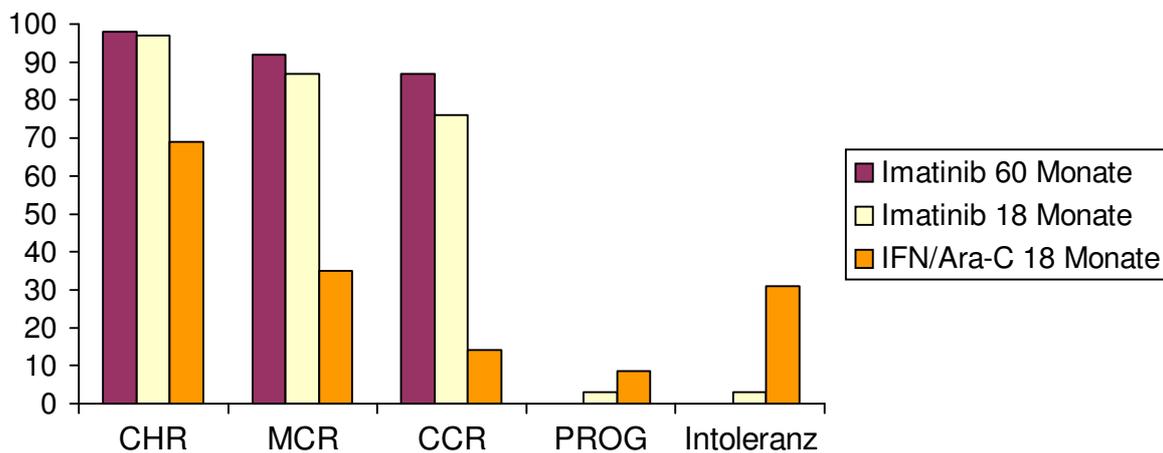
Ansprechen	Chronische Phase n=532	Akzelerationsphase n=235	Blastenkrise n=260
CHR	95%	34%	8%
MCR	60%	24%	16%
CCR	41%	17%	7%
<b>Progression</b>	<b>11%</b>	<b>40%</b>	<b>80%</b>

#### **1.4.5.4. Phase III-Studie / IRIS-Studie**

Die Internationale Randomisierte IFN versus STI571 (IRIS) Studie ist eine prospektive, multizentrische, offene Phase III-Studie im Cross-over-Design, in die 1106 Patienten eingeschlossen wurden. Die Auswahlkriterien für Patienten waren ein Alter zwischen 18 und 70 Jahren und eine innerhalb der letzten 6 Monaten vor Studieneintritt diagnostizierte Ph+ CML in CP, die bis dahin unbehandelt war (mit Ausnahme von HU und/oder Anagrelide). Im randomisierten Vergleich erhielten 1106 Patienten entweder täglich 400 mg Imatinib oral oder subkutan INF- $\alpha$  + low-dose-cytarabine (mediane IFN-Dosis: 4,8 Millionen U täglich) [52]. Bei Non-Respondern mit einem Anstieg der Leukozyten oder bei einer Intoleranz der Therapie, d.h. innerhalb der ersten 12 Monate keine CCR oder nach 6 Monaten keine CHR, war es den Patienten erlaubt, den Therapiearm zu wechseln. Ziel der IRIS-Studie war die Erfassung des progressionsfreien Überlebens, der CHR und CCR, der Sicherheit und Verträglichkeit, der molekulargenetischen Remissionen, der Pharmakogenetik und -kinetik sowie der Lebensqualität.

Nach einer medianen Beobachtungszeit von 18 Monaten zeigten sich hoch signifikante Wirksamkeitsvorteile für die mit Imatinib behandelten Patienten (CCR Imatinib 76% vs. CCR IFN/Ara-C 14,5%). 65% der Patienten, die zunächst im IFN/Ara-C-Arm behandelt wurden, wechselten in den Imatinib-Arm. Die häufigsten Gründe des Wechsels waren Intoleranz bezüglich der Therapie (26%), Fehlen einer CHR oder einer MCR (16%) und Progression der Erkrankung (14%). Im Fokus der letzten Auswertung mit einer medianen Nachbeobachtungszeit von 60 Monaten standen die Patienten, die bereits initial Imatinib erhalten hatten [53]. Die Kaplan-Meier-Kurven zum kumulativen Therapieansprechen zeigten, dass sich die Ansprechraten im Behandlungsverlauf weiter verbessert hatten. Nach 60 Monaten (vs. 18 Monate) hatten 98% (vs. 97%) der Patienten eine CHR, 92% (vs. 87%) eine

MCR und 87% (vs. 76%) eine CCR erreicht. In Abb. 3 sind die Ergebnisse der IRIS-Studie nach 18 und 60 Monaten dargestellt. Innerhalb der Subgruppe der Patienten mit CCR hatte der Anteil der Patienten mit molekularer Remission (>3-log-Reduktion des BCR-ABL-Transkripts) von 53% nach 12 Monaten auf 80% zugenommen (99/124;  $p < 0,001$ ).



**Abb. 3: Ergebnisse der IRIS-Studie:**

**Ordinate: Anzahl der Patienten in %, Abszisse: Darstellung von CHR, MCR, CCR, Progression der CML und Intoleranz von Imatinib bzw. IFN/Ara-C nach 18 und 60 Monaten [53]**

Nach 60 Monaten betrug das „event-free survival“ laut Kaplan-Meier-Kurve 83%, 93% der Patienten transformierten nicht in die AP oder BC. Die jährliche Progressionsrate in die AP oder BC hatte ab dem 2. Behandlungsjahr kontinuierlich bis auf 0,6% abgenommen. Patienten mit CCR bzw. molekularer Remission (MR) nach 12 bzw. 18 Monaten hatten einen besonders günstigen Langzeitverlauf. Bei 97% der Patienten mit CCR nach 12 Monaten gab es nach 60 Monaten nach wie vor keine Progression in die AP oder BC. Bei keinem der Patienten mit CCR und MR ( $\geq 3$  log-Reduktion des BCR-ABL-Transkripts) nach 18 Monaten kam es zu einem Progress. Im Vergleich dazu erlitten 13% der Patienten ohne CCR ( $p < 0,001$ ) einen Progress.

Das Gesamtüberleben nach 5 Jahren betrug bei den mit Imatinib behandelten Patienten 89,4%, womit die Überlebensrate deutlich höher liegt als im historischen Vergleich. Die 5-Jahres-Ergebnisse der IRIS-Studie bestätigen Imatinib als Goldstandard für die *first-line*-Therapie von CML-Patienten auch im Hinblick auf die Lebensqualität [54].

Patienten, die zytogenetisch in Remission kamen, wurden auf die BCR-ABL-Transkript-Anzahl molekulargenetisch untersucht [55, 56]. Hierbei kam es bei ungefähr der Hälfte der Patienten zu einer sehr schnellen Reduktion der BCR-ABL-Transkripte bis hinunter auf ein sehr niedriges, wiewohl detektierbares Level. Die Anzahl der Patienten, die molekulargenetisch BCR-ABL-negativ wurden, variiert von 4-34% [57]. Die Ziele der Imatinibtherapie sind CHR nach 3 Monaten, PCR nach 6 Monaten, CCR nach 12 Monaten und eine molekulare Remission mit einer 3-log-Reduktion. In Tab. 3 sind die Definitionen für Therapieversagen und suboptimales Ansprechen sowie Warnhinweise zusammengefasst. Die Therapieempfehlungen bei Therapieversagen, suboptimalem Ansprechen und vorhandenen Warnhinweisen sind neben erhöhtem Monitoring eine Reevaluierung der Therapie mit eventueller Dosiserhöhung, Therapieumstellung oder alloHSCT.

**Tab. 3: Therapieansprechen unter Imatinib als first-line-Therapie [57]:**

**HR = hämatologische Remission, CHR = komplette hämatologische Remission**

Zeitpunkt	Versagen	Suboptimales Ansprechen	Warnhinweise
Diagnose			High risk, del9q+, zusätzliche zytogenetische Aberration in Ph+ Zellen
3 Monate	Keine HR	Keine CHR	
6 Monate	< CHR, keine CR	Keine partielle CR	
12 Monate	Keine partielle CR	Keine CCR	Keine MMoIR
18 Monate	Keine CCR	Keine MMoIR	
Immer	Verlust: CHR, CCR, Mutation	Verlust: MMoIR, Mutation, zusätzliche zytogenetische Aberration in Ph+ Zellen	Anstieg des BCR-ABL- Transkript-Levels, chromosomale Aberrationen in Ph- Zellen

Im Hinblick auf die minimale Resterkrankung (MRD), die im Großteil der Patienten nachweisbar ist, stellt die Resistenzentwicklung ein großes Problem dar.

#### **1.4.5.5. Resistenzmechanismen gegenüber Imatinib**

Während präklinischer Studien hatte sich bereits gezeigt, dass es einige Zelllinien, z.B. KCL22 und SD1, gibt, die bereits primär resistent gegenüber Imatinib waren [58]. Ebenso gibt es primäre Resistenzen bei Imatinib-behandelten Patienten und Resistenzen, die nach anfänglichem Ansprechen auftreten. *In-vitro*-Untersuchungen

zeigten verschiedene Hypothesen der Resistenzentwicklung BCR-ABL+ Zellen gegenüber Imatinib. Die Kultivierung BCR-ABL+ Zelllinien (LAMA84) in langsam steigenden Konzentrationen von Imatinib führte zur Selektion Imatinib-resistenter Klone (LAMA84R) [59]. Beim Vergleich beider Zelllinien zeigte sich eine 4,6fach erhöhte, über genomische Amplifikation vermittelte Expression des Fusionsproteins p210<sup>BCR-ABL</sup>. Zur Inhibition der BCR-ABL-Tyrosinphosphorylierung und zur Reduktion der Kinaseaktivität wurden in den resistenten Zellen höhere Imatinibkonzentrationen benötigt.

*Gorre et al.* beschrieben als erste die Mutation von Threonin 315 zu Isoleucin bei Patienten, die einen Rückfall erlitten hatten. Durch diese Mutation wird die Bindung von Imatinib verhindert [60]. Mittlerweile sind ca. 40 Punktmutationen beschrieben worden. Viele dieser Mutationen führen durch den Austausch einer Aminosäure zu intermolekularen Veränderungen, sodass die Bindung von Imatinib an die ABL-Kinase-Domäne behindert wird.

Einen weiteren wichtigen Mechanismus der Resistenzentwicklung stellt die klonale Evolution dar [61]. Durch zusätzliche chromosomale Aberrationen kommt es zur BCR-ABL-unabhängigen Proliferation von Blasten.

Überexpression des MDR-1-Gens und des damit assoziierten alpha-1-sauren Glykoproteins in BCR-ABL-überexprimierenden Zellen wurden beschrieben, sind aber klinisch nicht ausreichend untersucht [62]. Die Bindung von Imatinib an Plasmaproteine führt zur Reduktion der freien Imatinibkonzentration. Vor allem die Beteiligung des alpha-1-sauren Glykoprotein wurde untersucht und als Mechanismus nichtzellulärer Resistenz diskutiert [63, 64].

## **1.5. Aufgabenstellung der Dissertation**

Der therapeutische Erfolg mit Imatinib hat entscheidend die Prognose und das Management von CML-Patienten beeinflusst. Obwohl die alloHSCT die einzig mögliche kurative Therapieoption für Patienten mit CML in chronischer Phase darstellt, hat die verlängerte zytogenetische Remission, die durch Imatinib erreicht werden kann, zur Zulassung als *first-line*-Therapie geführt. Es muss zwischen dem kurativen Potential der alloHSCT und der Imatinibtherapie mit Berücksichtigung der potentiellen Toxizität jeder Therapie abgewogen werden. Erschwerend kommt die Tatsache der noch ausstehenden Langzeitergebnisse mit Imatinib hinzu,

wohingegen Transplantationsergebnisse mit Follow-up-Raten von mehr als 10 Jahren bestehen.

Resistenzen gegenüber Imatinib könnten zunehmend zu Frührezidiven führen. Es besteht die berechnete Befürchtung, dass es bei Patienten unter Imatinibtherapie plötzlich zum Fortschreiten der Erkrankung kommt, in der eine Transplantation nicht sicher und effizient durchgeführt werden kann. Das Aufschieben der Transplantation durch eine vorherige Behandlung mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor beeinflusst entscheidend das Ergebnis der Transplantation. Die zurzeit einzig bewiesene kurative Therapie der CML könnte in ihrer Effizienz abgeschwächt werden. Daher ist es wichtig, frühzeitig Resistenzen zu erkennen, sodass gegebenenfalls die Indikation zur Transplantation gestellt werden kann, bevor es zur Progression der Erkrankung kommt.

Ebenso scheint es vernünftig, die alloHSCT als eine bedeutende Option zur Behandlung vor allem junger Patienten mit CML zu belassen, bis Klarheit über die Langzeitergebnisse mit Imatinib besteht.

In Anbetracht der Problematik sollte das Konzept der autoHSCT reevaluiert werden. Vor Einführung mit Imatinib konnten Studien mit ungepurgten Stammzellen eine Verlängerung des Überlebens nicht sichern [65, 66]. Eine effektive Purgung-Strategie mit Imatinib könnte die Wirksamkeit der autoHSCT mit möglicherweise Ph-Stammzellen erhöhen [67].

Die Überlegungen und Fragen, die zur vorliegenden Promotionsarbeit geführt haben, betreffen die therapeutischen Möglichkeiten für CML-Patienten, die sich durch Imatinib in Verbindung mit autoHSCT ergeben könnten.

Da sich im Knochenmark von an CML erkrankten Patienten neben dem Ph<sup>+</sup> leukämischen Klon auch normale, Ph<sup>-</sup> Progenitorzellen befinden, könnte ein während der Mobilisierung durch Imatinib in BCR-ABL<sup>+</sup> Zellen verursachter Proliferationsstopp mit Induktion des programmierten Zelltodes zur Proliferationshemmung und Verminderung des BCR-ABL<sup>+</sup> Zellklons führen und damit die Regeneration der gesunden Resthämatopoese fördern. Ruhende, durch Imatinib nicht zu beeinflussende Ph<sup>+</sup> Stammzellen wären möglicherweise durch den Austritt aus der G<sub>0</sub>-Phase durch den Tyrosinkinase-Inhibitor wieder angreifbar. Es bestünde somit die Möglichkeit Ph<sup>-</sup> Stammzellapheresate zu sammeln und zudem durch Regeneration der BCR-ABL<sup>-</sup>negativen Stammzellen mit gleichzeitiger

Apoptoseinduktion des BCR-ABL+ Klons eine molekulargenetische Remission zu erreichen.

Zur Klärung der Sicherheit, Durchführbarkeit und Effizienz der Apherese wurden im Zeitraum 2001-2003 18 CML-Patienten, die unter Imatinibtherapie eine CCR in mindestens 2 aufeinanderfolgenden Knochenmarkpunktionen zeigten, ohne Therapieunterbrechung mit Filgrastim (granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), Neupogen, Amgen Inc., München, Deutschland) stimuliert. Vor, während und nach der Mobilisierung wurden sowohl Blut- und Knochenmarksproben als auch die Stammzellapheresate zytogenetisch und molekulargenetisch untersucht.

## 2. Material und Methoden

### Reagenzien

10x PCR Puffer Gibco  
10x PCR Puffer PE  
Agarose  
Ammoniumchlorid  
Ampli Taq DNS Polymerase (5 U/μl)  
Aqua dest  
Bromphenolblau  
Bovine Serum Albumin (BSA)  
Chloroform  
DEPC- Wasser  
Desoxynukleosidtriphosphate (10 mM)  
Dextran T 500  
Dinatriumsalz-Dihydrat (EDTA-Titriplex)  
DNS-Leiter 123 bp  
DNS-Marker lambdaHDIII  
DTT (0.1 mM)  
EDTA  
Eisessig (Essigsäure 100%)  
Ethanol  
Ethidiumbromid  
Gibco Taq Polymerase Platinum (5 U/μl)  
Glycerol  
Isoamylalkohol  
Kaliumhydrogencarbonat  
Luria-Bertani (LB) Medium  
MgCl<sub>2</sub> (50 mM)  
Natrium-Acetat  
Natriumchlorid  
Nusieve (GTG-Agarose)  
Paraffinöl  
PBS  
(phosphatgepufferte Kochsalzlösung (10x))

### Primer:

B2a  
Abl3  
Bcr  
Ca3  
B2a2

### Firma/ Hersteller

Gibco BRL, Eggenstein  
Perkin Elmer Cetus, USA  
Roth, Karlsruhe  
Merck, Darmstadt  
Perkin Elmer Cetus  
Braun, Melsungen  
Merck, Darmstadt  
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Freiburg  
Merck, Darmstadt  
Carl Roth GmbH, Karlsruhe  
Gibco BRL, Eggenstein  
Carl Roth GmbH, Karlsruhe  
Merck, Darmstadt  
Invitrogen GmbH, Karlsruhe  
Boehringer, Mannheim  
Invitrogen GmbH, Karlsruhe  
Merck, Darmstadt  
Merck, Darmstadt  
Serva, Heidelberg  
Serva, Heidelberg  
Gibco BRL, Eggenstein  
Gibco BRL, Eggenstein  
Merck, Darmstadt  
Merck, Darmstadt  
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen  
Gibco BRL, Eggenstein  
Merck, Darmstadt  
Merck, Darmstadt  
FMC-Products  
Merck, Darmstadt  
Gibco BRL, Eggenstein

TIB MOLBIOL, Berlin  
TIB MOLBIOL, Berlin  
TIB MOLBIOL, Berlin  
TIB MOLBIOL, Berlin  
TIB MOLBIOL, Berlin

Abl3(78)	TIB MOLBIOL, Berlin
RS3 $\beta$ -act	TIB MOLBIOL, Berlin
PS $\beta$ -act as	TIB MOLBIOL, Berlin
M13 Primer forward/reverse	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
2-Propanol	Merck, Darmstadt
Proteinase K	Merck, Darmstadt
Pd(N) <sub>6</sub> Random Hexamer Primer	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Qiaquick Gel Extraktions Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
Ribonuclease Inhibitor	
RNSclean	Thermo Hybaid, Ashford, Middlesex, UK
Saccharose	Serva, Heidelberg
SDS (Dodecylsulfat-NaCl)	Serva, Heidelberg
<u>Sonden:</u>	
LSI bcr/abl ES Color Translokation Probe (bcr locus SpectrumGreen/ abl locus SpectrumOrange)	Vysis, Stuttgart
Superscript	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
TOPO-TA Cloning Kit	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Merck, Darmstadt

### **Gerät**

ABI PRISM 7700 Sequence Detector  
Axioskop/Mikroskop  
Bio Doc CCD-Camera  
Gene Quant II (Spektrophotometer)  
Lightcycler  
Megafuge 1.0  
MicroAmp Optical Caps/Tubes  
Polyethylen-Reaktionsgefäße  
(0,5; 1,0; 1,5; 2,0 ml)  
Polyethylenröhrchen (10 ml)  
Reax 2000  
TRIO-Thermoblock  
Video Graphik Printer UP-890 CE  
WIDE MINI SUB CELL  
(Gelelektrophoresekammer)  
Zentrifuge 5403

### **Hersteller**

Perkin Elmer, Applied Biosystems, USA  
Zeiss, Jena  
Biometra, Göttingen  
Pharmacia Biotech, Freiburg  
Roche Diagnostics, Mannheim  
Heraeus Instruments, Hanau  
Perkin Elmer, Foster City, USA  
EPPENDORF, Hamburg  
FALCON, New Jersey, USA  
GFC  
Biometra  
Sony  
Biorad  
EPPENDORF, Hamburg

## **Puffer und Lösungen**

### **DAPI- Lösung (100 ml):**

Ansatz mit 90 ml Aqua dest.,  
10 ml 20xSSC und  
20 µl DAPI-Stocklösung  
(2 mg DAPI/ 10 ml Aqua dest. bei – 20°C)

### **Gelladepuffer:**

Sacchrose (40%)  
Bromphenolblau (0,05-0,25%)  
10 ml Aqua dest.

### **Natrium-Acetat:**

204,12 g ad 500 ml Aqua dest. (3 M, 20°C)

### **20x SSC (1000 ml):**

3 M NaCl 87,0 g / 500 ml (174 g),  
0,3 M Natriumcitrat 44,1 g / 500 ml (88,2 g)

### **2x SSC/0,1% NP –40 (pH 7,0 – 7,5):**

Ansatz für 1000 ml mit 900 ml Aqua dest.,  
100 ml 20x SSC und 1 ml NP –40 (10%ig)

### **TAE-Puffer (1x):**

2,42 g Tris  
0,57 ml Eisessig  
1 ml EDTA (pH=0,8 / 0,5 M)  
500 ml Aqua dest.

### **Dextranlösung:**

20 g Dextran (steril, 4°C, 5%)  
3,504 g NaCl  
400 ml A.dest.

### **10x Lyse-Puffer:**

8,02 g 1,5 M Ammoniumchlorid  
1,0 g 0,1 M Kaliumhydrogencarbonat  
0,037 g EDTA mit 2H<sub>2</sub>O = Titriplex III  
100 ml Aqua dest.

### **Proteinase K:**

100 mg gelöst in 5ml A.dest. (20 mg/ml, 20°C)

### **0,4x SSC/0,3% NP –40 (pH 7,0 – 7,5):**

Ansatz für 1000 ml mit 980 ml Aqua dest.,  
20 ml 20x SSC und 3 ml NP –40 (10%ig)

### **STE:**

1 ml 1 M Tris (pH 8,0)  
2 ml 5 M NaCl  
0,2 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)  
96,8 ml Aqua dest.

### **TE-Puffer:**

2 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0 / 20°C)  
10 ml 1 M Tris (pH 8,0)  
1000 ml Aqua dest.

## 2.1. Klonierung und Generierung von Standardreihen

Die Klonierung und Generierung der Standardreihe wurde in Zusammenarbeit mit Dipl. Ing. Joachim Lupberger durchgeführt. Es wurden Zielgen (*bcr-abl* Majorfusion) und Referenzgen (*β-actin*) in einem Plasmid vereinigt.

Das *β-actin*-PCR-Produkt und *bcr-abl*-PCR-Produkt wurden je in pCR2.1-TOPO kloniert. Die Inserts sind von 2 EcoRI sites flankiert, die auf dem TOPO Vektor codiert sind. Das 192 bp EcoRI Fragment des *β-actin*-Vektors wurde in eine der beiden EcoRI sites des *bcr-abl*-Vektors kloniert. Das Öffnen des *bcr-abl*-Vektors erfolgte mit partiellem EcoRI-Verdau. Die Generierung des pmaac (Plasmid+Majorfusion+β-actin) wurde von Dipl. Ing. Joachim Lupberger durchgeführt.

### 2.1.1. Plasmide, Primer und Bakterienstämme

Tab. 4: Verwendete Plasmide, Bakterienstämme und Oligonukleotide.

6FAM = 6-Carboxyfluorescein, X=Tamra (Carboxytetramethylrhodamine), pmaac für Plasmid+Majorfusion+β-actin

Plasmide	Relevante Eigenschaften	Referenz
pCR 2.1-TOPO	AmpR KanR pUCori f1 ori <i>lac Za</i>	Invitrogen
pmaac_#	pCR 2.1-TOPO β-actin (RS3 β-act/PS β-act as) b3a2 (b2a2/abl3(78))	Unsere Arbeitsgruppe
pUC19	Positivkontrolle, Amp <sup>R</sup> pUCori <i>lac Za</i>	Invitrogen
<b>Bakterienstämme</b>		
<i>E. coli</i> DH5α-T1 <sup>R</sup>	Klonierungsstamm blau/weiss Selektion ohne IPTG	Invitrogen
<b>Primer</b>		
M13-F (-20)	5'-GTA AAA CGA CGG CCA G-3'	Invitrogen
M13-R	5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3'	Invitrogen
RS3 β-act	5'-AGC CTC GCC TTT GCC GA	[68]
PS β-act as	5'-CTG GTG CCT GGG GCG	[68]
b2a2	5'-AGC ATT CCG CTG ACC ATC A	[69]
abl3(78)	5'-G CGT GAT GTA GTT GCT TGG GAC	[69]
<b>Sonden</b>		
TM abl3	5'-6FAM-TTT GGG CT XT CAC ACC ATT CCC CAT TG p	[69]
QT β-act	5'-6FAM-CCG CCG CCC GTC CAC ACC CGC C XT p	[68]

Der Bakterienstamm *Escherichia coli* DH5a-T1R wuchs aerob bei 37°C auf Luria-Bertani (LB) Medium. Festes LB Medium enthielt zusätzlich 2% (w/w) Agarose (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland). Die Klonierung von Plasmid-DNA erfolgte durch Selektion auf 100 µg/L Ampicillin. Zellen wurden in 10% (v/v) DMSO bei -80°C gelagert.

### **2.1.2. Chemikalien und Enzyme**

Alle verwendeten Enzyme inkl. Puffer und Feinchemikalien zur PCR wurden von der Firma Roche Biochemicals (Basel, Schweiz) bezogen.

### **2.1.3. DNA-Manipulation**

PCR-Produkte wurden in den Vektor pCR2.1-TOPO kloniert und in chemokompetente *E. coli* DH5α-T1<sup>R</sup> (OneShort®, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) unter Verwendung des TOPO TA Cloning Kits transfiziert.

Bei der Kolonie-PCR wurden geringe Spuren von *E. coli* Zellen in den PCR-Mix überführt und bei 94°C 10 min partiell lysiert. Die nachfolgende PCR erfolgte gemäß dem PCR-Protokoll.

Die Plasmidextraktion aus *E. coli* wurde mit QIAprep Miniprep Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) durchgeführt. DNA-Reinigung sowie Extraktion von DNA aus gelierter Agarose wurde mit QIAquick Gel Extraktions Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) durchgeführt. Die DNA wurde jeweils in 30-50 µL EB Puffer (10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.5) eluiert.

Konzentrationsbestimmung von dsDNA wurde mit dem Photometer GeneQuant II (Pharma Biotech, Freiburg, Deutschland) bei 260 nm durchgeführt ( $abs_{\sim 0,1-1}$ ;  $OD_{260/280} \sim 1,8$ ).

### **2.1.4. Partielle Restriktion mit EcoRI**

Bei konstanter Plasmid-DNA Menge (1 µg) wurde pro Ansatz die anfänglich hohe Enzymmenge von ~5 U *EcoRI* um jeweils den Faktor 2 verdünnt, damit nur eine der zwei Schnittstellen geschnitten wird. Nach standardisierter Inkubation (1 h, 37°C)

wurden dann alle Ansätze durch Agarosegelelektrophorese getrennt. Bei sinkender Enzym/DNA-Ratio wurde dabei die DNA zunehmend unvollständig geschnitten.

### 2.1.5. Herstellung der Standardreihe

Zur Quantifizierung der PCR-Produkte wurde eine Standardkurve des linearisierten pmaac durch Herstellen einer Verdünnungsreihe nach Aufreinigung und Konzentrationsbestimmung der klonierten Fragmente generiert [69].

Die Linearisierung des Plasmids erfolgte mit *Bgl*II (*Bgl* für *Bacillus globuli* und II für das zweite isolierte Restriktionsenzym), da ein Plasmid eine andere Dynamik in der PCR zeigt als ein lineares Molekül und somit die Vergleichbarkeit des Standards gegeben ist.

Die Standardreihe umfasste einen Bereich von  $10^7$  bis  $10^0$  Moleküle pro 100 ng DNS und wurde in TE-Puffer, pH 8.0 und Aqua dest. gelöst.

#### Berechnung der DNA- Molekülzahl pro Volumen (x):

$$x = (\beta \cdot a \cdot 10^{-9}) / (\sum_{bp} \cdot M_{bp}) \text{ (}\mu\text{L}^{-1}\text{)}$$

$\beta$  = Massenkonzentration der DNA ( $\mu\text{g/ml}$ )

$\sum_{bp}$  = Größe des DNA Fragments (bp)

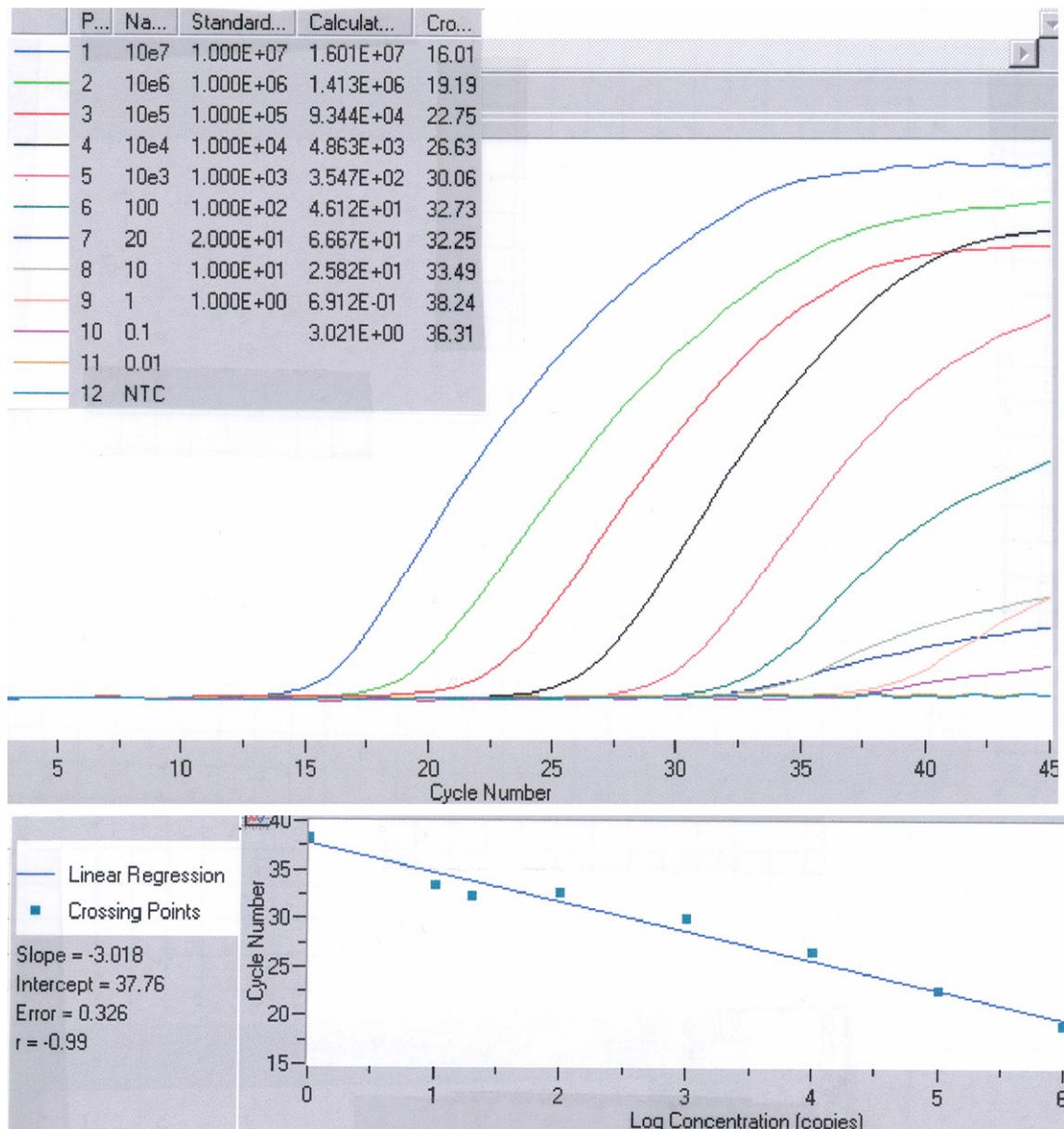
$a$  = Avogadrokonstante =  $6.022 \text{ E}+23 \text{ mol}^{-1}$

$M_{bp}$  = mittlere Molekülmasse einer Basenpaarbindung =  $659,9 \text{ g/mol}$

Folgende Standardkonzentrationen des linearisierten pmaac wurden in TE Puffer (5 mmol/L Tris-HCl / 0.5 mmol/L EDTA) verdünnt:

0,5E+7; 0,5E+6; 0,5E+5; 0,5E+4; 0,5E+3; 0,5E+2; 10; 5; 0,5; 0,05; 0,005 (Moleküle/ $\mu\text{L}$ ).

Die Standardreihe wurde gegen Null verdünnt ( $0,05 \mu\text{L}^{-1}$ ,  $0,005 \mu\text{L}^{-1}$ ), um die Berechnung der eingesetzten Kopienzahl zu überprüfen.



**Abb. 4: LightCycler®-PCR zur BCR-ABL-Quantifizierung (Primer Set: b2a2/abl3(78)).**

**Dargestellt sind die PCR-Verläufe der Standardreihe und einer Negativkontrolle.**

**Temperaturprofil: 94 °C 3'; (94 °C 30'', 64 °C 30'', 72 °C 35'')\*45; 40 °C 30''.**

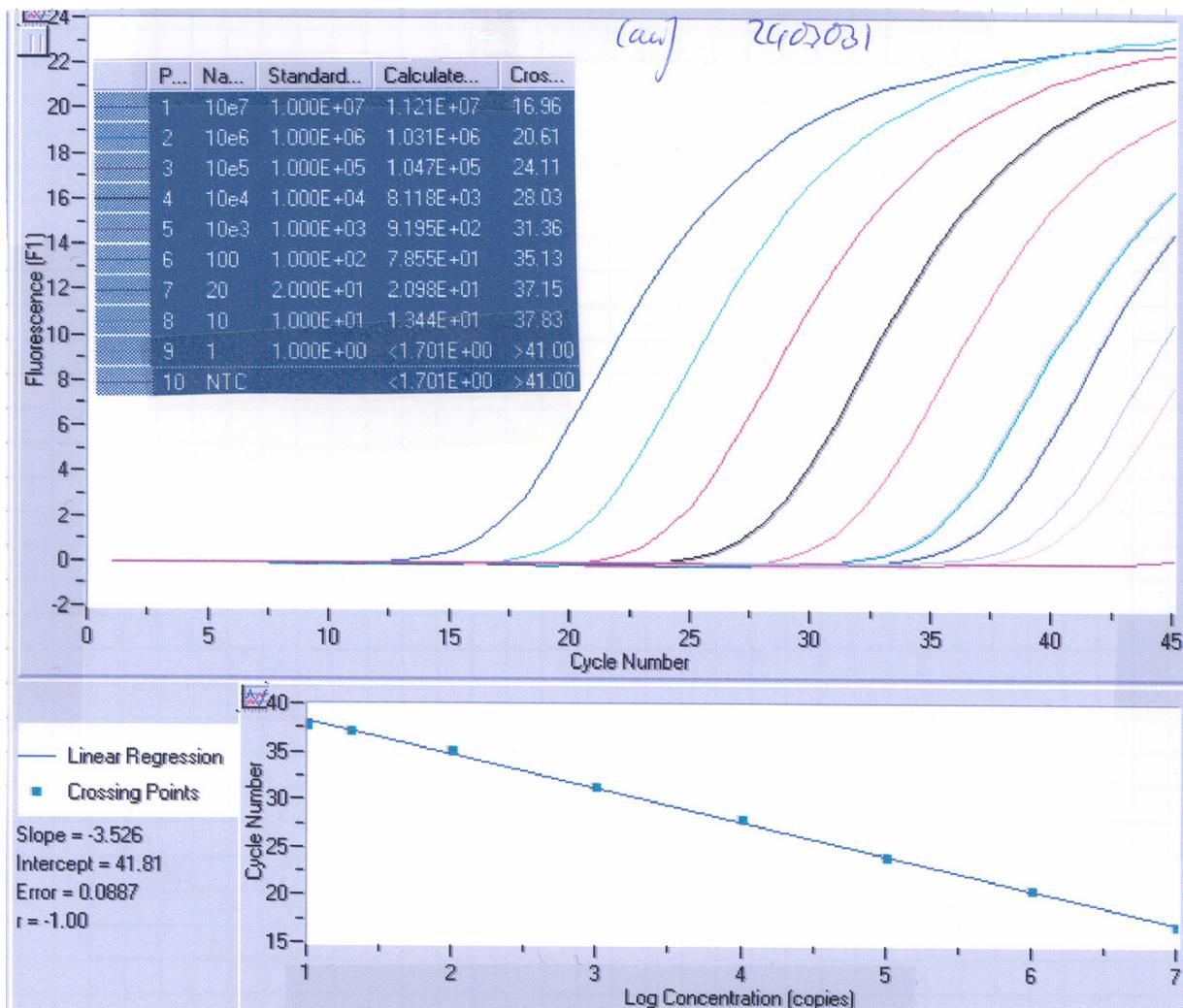


Abb. 5 LightCycler®-PCR zur  $\beta$ -Aktin-Quantifizierung (Primer Set: RS 3  $\beta$ -act/PS  $\beta$ -act as).

Dargestellt sind die PCR-Verläufe der Standardreihe und einer Negativkontrolle.

Temperaturprofil: 94 °C 3'; (94 °C 30'', 67 °C 30'', 72 °C 25'')\*45; 40 °C 30''.

## 2.2. Probengewinnung und Aufbereitung

Die Entnahme der Blutproben erfolgte in sterile Heparinröhrchen. Die Proben wurden sofort zur Weiterbearbeitung ins Labor gebracht. Ihre Aufbereitung erfolgte in Zusammenarbeit mit dem molekulargenetischen Labor nach etablierten Methoden.

### 2.2.1. Dextran-Separierung

10 ml Heparinblut wurden mit 2 ml Dextranlösung (steril, 4 °C, 5%) versetzt und zur Sedimentation über 40 min bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Der Überstand wurde abgenommen und über 6 min bei 1100 Umdrehungen/min (rpm) zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation wurden der Überstand verworfen und die Zellen in 10 ml Lyse-Puffer (1x) suspendiert und über 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für die Zellen in Lysepuffer (1x) über 6 min bei 1100 Umdrehungen/min (rpm). Nach diesem Schritt wurde erneut der Überstand verworfen und die resultierenden Zellen sogleich weiterverarbeitet.

### **2.2.2. RNA-Extraktion**

Die resultierenden Zellen wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäßen in 900 µl RNSclean unter sich anschließender Zugabe von 100 µl Chloroform-Isoamylalkohol resuspendiert. Danach wurden sie 5 min auf Eis gestellt und im Anschluß daran 30 min bei 13000-14000 Umdrehungen/min (rpm) zentrifugiert. Den Überstand (max. 600 µl) überführte man sofort in ein neues Reaktionsgefäß, das mit 600 µl gekühltem Isopropanol vorgelegt wurde. In der Unter- und Interphase befanden sich DNA und Proteine.

Zur Präzipitation der RNA wurden die Reaktionsgefäße für 15 min auf Eis gestellt. Nachfolgend wurde 15 min auf höchster Stufe zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Resuspension der RNA erfolgte mit 500 µl Ethanol (steril, 4°C, 75%). Es schloß sich eine erneute Zentrifugation für 15 min bei 12000 Umdrehungen/min (rpm) an. Der Überstand wurde erneut verworfen. Damit der Restalkohol verdunstete, ließ man die Reaktionsgefäße für 30 min offen stehen. Letztendlich wurde die RNA in DEPC/ H<sub>2</sub>O gelöst.

### **2.2.3. DNA-Konzentrationsbestimmung**

Ein Aliquot der zu messenden DNA-Lösung wurde mit Aqua dest. 1:50 verdünnt. Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte spektrophotometrisch (Quarzküvette, 1 cm Schichtdicke) durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm. Dabei entsprach die Extinktion von 1 bei doppelsträngiger DNA ungefähr einer Konzentration von 50 µg/ml. Der Reinheitsgrad der DNA-Lösung ließ sich durch den Quotienten der Extinktionen bei OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> ermitteln.

## 2.2.4. Reverse Transkription

Für 1 µg RNA wurde ein Mastermix aus 1 µl Pd(N)<sub>6</sub> Random Hexamer Primer (Amersham Biosciences GmbH, Freiburg), 5 µl dNTP's (Desoxynukleosidtriphosphate-Set 10 mM, Gibco BRL, Eggenstein), 2 µl 10x PCR-Puffer und 2 µl 0,1 M DTT (Gibco BRL, Eggenstein) hergestellt und zu den vorbereiteten Proben (1 µg RNA auf 8 µl Gesamtvolumen mit H<sub>2</sub>O), einer Positiv- (verdünnte K562-RNA) und einer Negativkontrolle (nur 8 µl H<sub>2</sub>O) gegeben (Tab. 5). Die Proben wurden für 3-5 min bei 85-95°C im Hitzblock denaturiert und danach für 1-2 min auf Eis gestellt. Nun wurde zu jeder Probe 1 µl Rnase-Inhibitor und 0,7 µl Superscript (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) gegeben. Es folgte eine 10-minütige Inkubation bei Raumtemperatur, eine 40-minütige Inkubation bei 42°C und letztlich eine Inkubation bei 95°C für 5 min. Die fertigen Proben wurden, nachdem sie für 1-2 min auf Eis standen, bei -20°C aufbewahrt.

**Tab. 5: Ansatz für 1 µg RNA**

Reagenz	Konzentration	Menge
Random hex Primer	100 µM	1,0 µl
dNTP (ATP, CTP, TTP, GTP)	2,5 mM	5,0 µl
10x PCR-Puffer (Perkin Elkmer)		2,0 µl
DTT	0,1 M	2,0 µl
RNSase-Inhibitor		1,0 µl
Superscript		0,7 µl

## 2.3. Polymerasekettenreaktion

### 2.3.1. Qualitative PCR/ Nested PCR

Die erste und nested RT-PCR für chimäre BCR-ABL mRNA-Transkripte wurde nach Standardprotokollen durchgeführt mit einer Sensitivität von 1:10<sup>6</sup>. Die jeweiligen Primer sind in Tab. 6 aufgeführt.

**Tab. 6: Primer der konventionellen und nested PCR**

Primer	Konzentration	Qualitative Eigenschaft
<i>Konventionelle PCR</i>		
b2a	20 µM	5'-TTC AGA AGC TTC TCC CTG GCA TCC GT
abl3	20 µM	5'-TTC AGA AGC TTC TCC CTG GCA TCC GT
<i>Nested PCR</i>		
bcr	20 µM	5'-GTC CAC AGC ATT CCG CTG ACC ATC AAT
Ca3	20 µM	5'-TGT TGA CTG GCG TGA TGT AGT TGC TTG G

### 2.3.2. Quantitative PCR / LightCycler

Die quantitative Bestimmung der BCR-ABL-Transkripte wurde mit dem Lightcycler II (Serien# 1402558) der Firma Roche Biochemicals (Basel, Schweiz) durchgeführt. Mit einer Sensitivität von  $1:10^5$  bei einer BCR-ABL-Kopie pro 100 ng cDNA wurden die Quotienten von BCR-ABL und  $\beta$ -Aktin (Referenzgen) bestimmt. Dabei wurde ein Wert von  $10^{-8}$  als negativ festgelegt [69]. Bei einer BCR-ABL-Kopieanzahl von weniger als 10 wurde die Probe mit Hilfe der nested PCR kontrolliert.

**Tab. 7: Mix pro Ansatz mit 25 µL**

Reagenz	Menge
Reinstwasser	10,15 µL
10x PCR Puffer (ohne MgCl <sub>2</sub> )	2,5 µL
MgCl <sub>2</sub> (50 mmol/L)	2 µL
dNTP mix (jedes NTP 2.5 mmol/L)	4 µL
Rinderserum Albumin (BSA) (0.6-3 mg/mL)	0,3 µL
TE Puffer (pH 8.0)	0,3 µL
Forward Primer (10 µmol/L)	2.5 µL
Reverse Primer (10 µmol/L)	2.5 µL
TaqMan Sonde (10 µmol/L)	0.5 µL
Platinum Taq Polymerase (5 U/µL)	0.25 µL
DNA bzw. Standardverdünnung pro PCR Ansatz	2 µL

#### Temperaturbedingungen:

94°C 3', 45\*(94°C 30'', 64°C BCR-ABL/67°C  $\beta$ -Aktin 30'', 72°C 35'' BCR-ABL/ 25''  $\beta$ -Aktin), 40°C 30''

## **2.4. Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung**

Die FISH-Diagnostik beruht auf der Hybridisierung von DNA-Sonden, die bestimmte chromosomale Strukturen wie Zentromerregionen einzelner Chromosomen, bestimmte Gene oder ganze Chromosomen markieren.

Zunächst werden DNA-Sonden und Patienten-DNA denaturiert. Bei der anschließenden Renaturierung erfolgt die Anlagerung der Sonden an die komplementären Abschnitte der Patienten-DNA. Da die Sonden entweder durch Fluoreszenzfarbstoffe markiert sind oder mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern nachgewiesen werden, können die entsprechenden chromosomalen Strukturen als Fluoreszenzsignale ausgewertet werden. Die FISH-Diagnostik kann sowohl an Interphasekernen als auch an Metaphasenchromosomen durchgeführt werden.

### **2.4.1. Direktpräparation und Vorbehandlung der Stammzellen**

Die Stammzellen wurden 20 min mit 0,45%igem KCl bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Nach 10-minütiger Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt. Die Zellen wurden resuspendiert, mit Fixatio (1 Teil Essigsäure und 3 Teile Methanol) aufgefüllt und erneut 10 min zentrifugiert mit anschließender Absaugung des Überstandes. Diese Schritte wurden noch 3-mal wiederholt. Zum Schluß wurden die mit frischem Fixatio aufgefüllten und gut gemischten Zellen auf einen Objektträger getropft. Für jede der 6 Stammzellproben wurden 2 Objektträger (OT) präpariert.

### **2.4.2. Pepsinverdau aus 10%iger Stammlösung und Hybridisierung**

Zur Vorbereitung wurden 99 ml Aqua dest. in der Pepsinküvette und die PBS-Küvette für 30 min ins Wasserbad bei 37°C gestellt. Bei Erreichen der Temperatur wurden die OT für 5 min in die PBS-Küvette gestellt. In die Pepsinküvette wurden 50 µl 10%iges Pepsin gegeben. PBS wurde entsorgt und der Inhalt der Pepsinküvette in die PBS-Küvette gefüllt. Nach einer Inkubation von 8-10 min wurde der Inhalt entleert und die OT mit PBS gespült. Zur PBS-Küvette wurden 100 ml aus 5 ml 1 M MgCl<sub>2</sub> + 95 ml PBS gegeben und die OT für 5 min inkubiert. Danach wurden zum Küvetteninhalt 2,7 ml Formaldehyd gegeben. Nach 10-15 min wurde die Formaldehydlösung extra entsorgt und die OT mit PBS gespült. Es folgte die Inkubation der OT mit aufsteigender Alkoholreihe (70%, 90%, 100%) für je 3 min.

Während die OT trockneten, wurden die Sonden (LSI bcr/abl ES Color Translokation Probe, Vysis, Stuttgart, Deutschland) verdünnt (7 µl Hybridisierungspuffer + 2 µl steriles Wasser + 1 µl der vorgetexten und zentrifugierten Sonden). Zur Hybridisierung wurden 10 µl der Sonde auf jeden OT gegeben und mit einem Deckglas, welches mit Fixogum abgedichtet wurde, abgedeckt. Die OT wurden in einer dunklen Kammer über Nacht bei 37°C im Wasserbad hybridisiert.

#### **2.4.3. Waschen und Kernfärbung nach der Hybridisierung**

Zur Vorbereitung wurde eine Küvette mit 0,4x SSC/0,3% NP -40 (pH 7,0-7,5) ins 73°C-Wasserbad gestellt und eine andere Küvette mit 2x SSC/0,1% NP -40 (pH 7,0-7,5) gefüllt und bei Raumtemperatur (RT) stehen gelassen. Fixogum und danach das Deckgläschen vom OT wurden entfernt. Die OT wurden in die vorbereitete 73°C warme Lösung gegeben und für 2 min auf den Schüttler gestellt. Danach wurden die OT für 1 min in 2x SSC/0,1% NP -40 (pH 7,0-7,5) bei RT inkubiert. Nach kurzem Spülen mit Aqua dest. wurden die OT für 5 min in eine 20 min bei RT vorgewärmte DAPI-Lösung gestellt. Nach einem 5-minütigem Waschschrift wurden die OT für je 3 min in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 90%, 100%) inkubiert und dann zum Trocknen aufgestellt. Auf jeden OT wurden 35 µl Antifade aufgetragen und zum Schluss wurde jeder OT mit einem Deckgläschen abgedeckt.

#### **2.4.4. Auswertung**

Am Mikroskop (Zeiss, Axioskop) in 360-facher Vergrößerung unter Benutzung von Immersionsöl wurden möglichst 200 Zellkerne in Inter- bzw. Metaphase ausgewertet. In gesunden Kernen finden sich sowohl zwei grüne als auch zwei rote Fluoreszenzsignale. Im Falle einer Translokation t(9;22) zeigen sich zwei rote Signale, dem normalen Chromosom 9 und dem Derivat entsprechend, ein grünes, dem normalen Chromosom 22 entsprechenden Signal und ein orange-farbenes Signal, das durch die Fusion des bcr- und abl-Gens im Philadelphia-Chromosom entsteht. Die verwendete Sonde hat einen geringen Grenzwert für falsch positive Signale. Der Grenzwert dieser Sonde liegt bei ca. 2%.

## **2.5. Stammzellmobilisierung, CD34+ Apherese und Patientencharakteristika**

### **2.5.1. Stammzellmobilisation und Apherese**

Die Mobilisierung aller Patienten erfolgte mit 2-mal täglich je 5 µg/kg Körpergewicht (KG) Filgrastim s.c. (granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), Neupogen, Amgen Inc., München, Deutschland) unter kontinuierlicher Imatinibtherapie für ungefähr 5 Tage. Um Effizienz der G-CSF-Therapie zu verfolgen, wurden die zirkulierenden CD34+ Zellen mit der Durchflusszytometrie (FACScan, Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) gezählt. Bei weniger als 5 CD34+ Zellen/µl erfolgte keine Apherese. Gesammelt wurde entweder über die peripheren Venen oder mittels Sheldon-Katheter an einem oder mehreren aufeinanderfolgenden Tagen mit Hilfe der COBE Spectra (COBE BCT, Planegg-Martinsried, Germany) und/oder Fresenius AS104 (Fresenius NPBI, Dreieich, Germany). Vor dem Einfrieren der Aphereseprodukte wurden Proben zur Bestimmung der Anzahl der gesammelten CD34+ Zellen entnommen. Die kumulative Anzahl per kg KG wurde für jeden Patienten individuell geschätzt. Die Stammzellprodukte wurden bei -196°C nach Standardprotokollen kryokonserviert. Als erfolgreiche Apherese wurde eine Menge von mindestens  $2,0 \times 10^6$ /kg KG CD34+-Progenitorzellen definiert.

### **2.5.2. Patientencharakteristika**

Es wurden 18 Patienten analysiert, 8 (44%) Frauen und 10 (56%) Männer. 15 (83%) befanden sich initial in CP und 3 (17%) in AP. Die Einschlusskriterien dieser Untersuchung waren der Nachweis der CCR über mehr als 6 Monate, das Fehlen eines verwandten oder nicht-verwandten Spenders und die grundsätzliche Eignung zur autoHSCT (keine größere nicht-hämatologische Komorbidität). Die mittlere Erkrankungsdauer der CML vor autoHSCT betrug 40,6 Monate (Range: 8-91 Monate). Das mittlere Alter lag bei 49 Jahren (Range: 24-72 Jahre).

15 (83%) der Patienten waren mit HU oder/und IFN-α vorbehandelt worden, ein Patient (Patient 11) mit Ara-C. Die mittlere Dauer der Imatinibtherapie bis zur Separation betrug 16,2 Monate (Range: 6-27 Monate). Durchschnittlich 24 Monate (Range: 1-73 Monate) nach Erstdiagnose wurde die Therapie mit Imatinib begonnen. Patienten in CP erhielten täglich 400 mg Imatinib, Patienten in AP 600 mg. Die Charakteristika der einzelnen Patienten sind in Tab. 8 aufgeführt.

**Tab. 8: Patientencharakteristika:**

**M = Männlich, F = Weiblich; CP = chronische Phase, AP = Akzelerationsphase; SCM = Stammzellmobilisierung**

Patient	Alter/ Geschlecht	Krankheitsstadium vor Imatinib	CML-Dauer vor SCM [Monate]	Dauer der Imatinibtherapie vor SCM [Monate]
1	29/M	AP	8	7
2	59/F	2. CP	72	26
3	57/F	1. CP	37	27
4	24/F	1. CP	38	7
5	60/M	1. CP	28	19
6	40/F	AP	29	19
7	71/M	1. CP	51	16
8	33/M	1. CP	61	19
9	36/M	AP	24	6
10	45/M	1. CP	44	16
11	50/M	1. CP	19	10
12	36/F	1. CP	20	12
13	63/M	1. CP	34	14
14	72/M	1. CP	22	18
15	59/F	1. CP	22	18
16	48/F	1. CP	91	18
17	34/M	1. CP	41	21
18	65/F	1. CP	89	18

Alle Patienten haben nach ausführlicher Aufklärung über Hintergründe und mögliche Risiken der entsprechenden Studie ihre schriftliche Einwilligung in diese Studie gegeben. Alle Untersuchungen wurden nach der Helsinki-Deklaration in der jüngsten gültigen Fassung durchgeführt. Die Studie wurde durch die zuständige Ethikkommission genehmigt.

## **2.6. Statistische Auswertung**

Die Auswertung erfolgte mit dem Wilcoxon-Test. P-Werte <0,01 gelten als statistisch signifikant.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Ergebnisse unter Imatinibtherapie und Stammzellmobilisierung

##### 3.1.1. Klinische Patientencharakteristika zur Stammzellmobilisierung (SCM) und CD34+ Apherese

Tab. 9 fasst die klinischen Charakteristika zur Stammzellsammlung für jeden einzelnen Patienten zusammen. Zudem ist das Follow-up mit derzeitigem Ansprechen aufgeführt.

**Tab. 9: Klinische Patientencharakteristika zur Stammzellsammlung mit Erkrankungsdauer bis zur Stammzellapherese in Monaten, Anzahl der notwendigen Apheresen, CD34+ Ausbeute, Follow-up in Monaten mit derzeitigem Ansprechen:**

**SCM = Stammzellmobilisierung, CHR = komplette hämatologische Remission, MCR = major zytogenetische Remission, CCR = komplette zytogenetische Remission, MR = molekulare Remission, n.a. = keine Probe vorhanden, da erfolglose SCM**

Patient	Erkrankungsdauer bis zur SCM [Monate]	Anzahl der Apheresen	CD34 <sup>+</sup> Ausbeute [x10 <sup>6</sup> /kg KG]	Follow-up seit SCM [Monate]	Auto-SCT Ja/nein	Derzeitiges Ansprechen
1	8	1	3,6	11	nein	CCR
2	72	2	4,9	12	ja	CCR
3	37	2	0,7	9	nein	CCR
4	38	2	3,0	6	nein	CCR
5	28	1	1,1	6	nein	MCR
6	29	1	0,7	17	nein	CCR
7	51	0	n.a.	18	nein	CCR
8	61	1	2,6	6	nein	MCR
9	24	1	4,6	18	nein	MR
10	44	2	3,1	18	nein	MCR
11	19	2	2,6	18	nein	CHR
12	20	0	n.a.	18	nein	CCR
13	34	2	3,0	15	nein	CCR
14	22	1	1,9	4	nein	CCR
15	22	1	2,8	7	nein	CCR
16	91	3	2,0	15	nein	CCR
17	41	2	3,2	14	nein	CCR
18	89	2	2,8	14	nein	CCR

Die Erkrankungsdauer bis zur Stammzellmobilisierung und Apherese lag bei durchschnittlich 40,6 Monaten. Nach einer Mobilisierung von 5 Tagen (Range: 4-6) mit Filgrastim lag die mittlere Anzahl peripherer CD34+ Progenitorzellen bei

$2,8 \times 10^6$ /kg KG (Range:  $0,7-4,9 \times 10^6$ /kg KG). Es waren durchschnittlich 2 Apheresen (Range: 1-4) nötig.

Bei 2 der Patienten (11%) lag die Anzahl der im peripheren Blut zirkulierenden CD34+ Zellen unter 5 Zellen/ $\mu$ l. Dies wies auf eine erfolglose Mobilisierung hin. Bei 4 Patienten (22%) wurden weniger als  $2,0 \times 10^6$  CD34+-Progenitorzellen je kg KG gesammelt werden. 12 unserer Patienten (67%) zeigten einen erfolgreichen Verlauf der Stammzellzellsammlung mit einer durchschnittlichen Stammzellkonzentration von  $3,2 \times 10^6$ /kg KG (Range: 2,0-4,9). Bei 13 von 15 Patienten in CP erfolgte die CD34+ Apherese. Allerdings lag die Anzahl der gesammelten CD34+ Zellen bei 3 Patienten unter  $2,0 \times 10^6$  Zellen/kg KG. Bei allen 3 Patienten in AP (Patient 1, 6, 9) wurden Stammzellen gewonnen, aber bei nur 2 der Patienten konnte eine ausreichende Anzahl CD34+ Zellen gesammelt werden (Patient 1 und 9). Das Follow-up zum Zeitpunkt der Auswertung der Ergebnisse beträgt durchschnittlich 12,6 Monate (Range: 4-18).

### **3.1.2. Zytogenetische Untersuchungen**

Alle Patienten waren mindestens 6 Monate vor SCM in CCR. Die CCR wurde durch mindestens 2 aufeinanderfolgende Ph- Knochenmarksbefunde mittels FISH-Diagnostik nachgewiesen. Die FISH-Untersuchungen wurden im Abstand von etwa 3 Monaten (12 Wochen) durchgeführt.

7 CD34+ Apheresate wurden molekularzytogenetisch untersucht. In 6 der 7 Apheresate gab es einen Ph- Befund. Ein Stammzellasservat (Patient 2) war in 8% der untersuchten Zellen Ph+. Das in der FISH-Untersuchung gefundene Signalmuster spricht dafür, dass neben Zellen mit einem Philadelphia-Chromosom (4%; 9 von 205 untersuchten Zellen) auch Zellen mit zwei (3%; 7 von 205 untersuchten Zellen) und drei (1%; 2 von 205 untersuchten Zellen). 2 Wochen vor SCM war der Knochenmarksbefund noch Ph-. Auf Patient 2 wird aufgrund des besonderen Verlaufes gesondert in 3.4.2. eingegangen.

14 Patienten waren nach einem durchschnittlichen Follow-up von 12,6 Monaten (Range: 4-18) nach SCM weiterhin in CCR. Der zytogenetische Befund von Patient 4 wurde als grenzwertiger Befund gewertet. 4 Patienten hatten ein zytogenetisches Rezidiv (Patient 5, 6, 8 und 11). 3 Patienten (Patient 5 und 10) befinden sich in MCR und ein Patient (Patient 11) in CHR. In Tab. 10 sind die Ergebnisse der FISH-

Untersuchungen vor SCM, 6 Monate nach SCM und die Ergebnisse der 7 Stammzellasservate aufgeführt.

**Tab. 10: Ergebnisse der FISH-Diagnostik vom Knochenmark vor und 6 Monate nach SCM:**

**KM = Knochenmark, SCM = Stammzellmobilisierung, Ph+ = Philadelphia-positiv, Grenzwert 2%. Die Befunde bei zytopenetischem Rezidiv sind rot hervorgehoben.**

Patient	KM vor SCM	CD34+ Apheresate	KM 6 Monate nach SCM	KM zum Zeitpunkt des Follow-up
1	1/260 (0,38%)		0/204	2/200 (1%)
2	0/202	9/205 1Ph+, 7/205 2Ph+, 2/205 3Ph+	0/200	1/200 (0,5%)
3	0/210	0/20	0/200	1/200 (0,5%)
4	1/210(0,5%)	1/205(0,5%)	4/200(2%)	4/200(2%)
5	0/206	0/202	7/303(2,3%)	7/303 (2,3%)
6	2/200(1%)		80/120(66,7%)	6/200 (3%) <sup>1</sup>
7	0/195		0/209	0/200
8	0/103	1/200(0,5%)	0/200	0/200
9	46,XY[26]		0/212	0/200
10	2/202(1%)		0/217	15/200 (7,5%)
11	0/200		7/215(3,3%)	65/216 (30,1%)
12	1/220(0,5%)		0/203	0/200
13	3/209(1,4%)		0/205	0/200
14	0/200	0/200	0/88 <sup>2</sup>	0/88 <sup>2</sup>
15	0/208	2/200(1%)	0/200	0/200
16	0/210		0/203	0/200
17	3/210(1,4%)		0/211	0/200
18	0/107		0/200	0/200

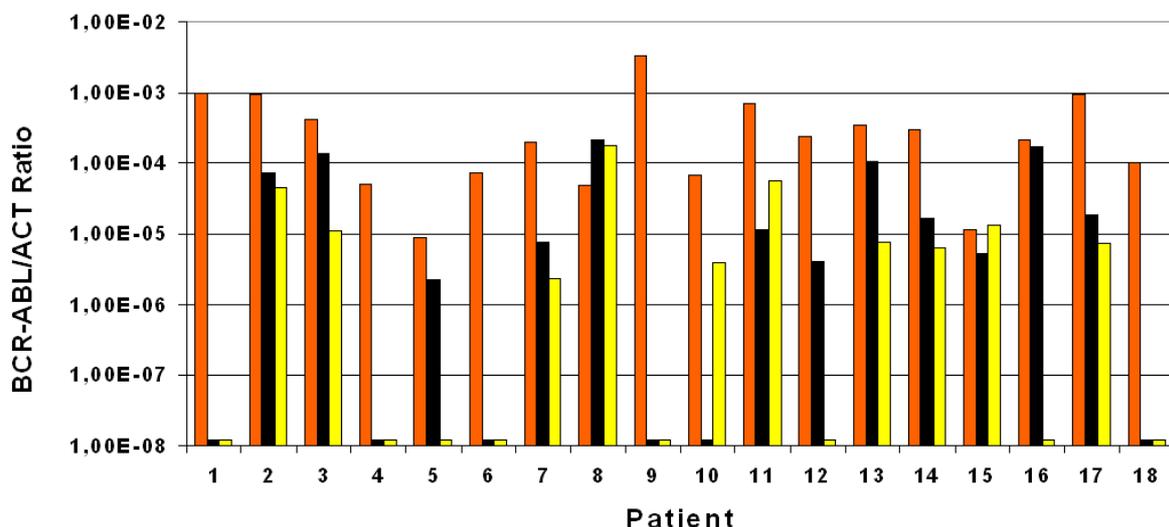
<sup>1</sup> GW: 6%, da scheinbare Fusionen in diesem GW-Bereich nicht sicher von Fusionen mit Deletion des ES-Signals unterscheidbar sind; <sup>2</sup> eingeschränkte Aussagekraft, da unter 100 ausgewertete Zellen

### 3.1.3. Molekularbiologische Ergebnisse

#### 3.1.3.1. Imatinibresponse

Die durchschnittliche Erkrankungsdauer vor Therapiebeginn mit Imatinib betrug 24,4 Monate (Range: 1-73). In Abb. 6 sind die BCR-ABL/ACT Ratios aller Patienten vor Therapiebeginn, nach drei- und sechsmonatiger Therapie mit Imatinib dargestellt. Nach 3 Monaten war die BCR-ABL/ACT Ratio bei 17 der 18 Patienten (94%) geringer als vor Beginn der Imatinibtherapie. Die Reduktion der BCR-ABL/ACT Ratio nach 3 Monaten betrug bei 6 von 18 Patienten mehr als 3-log-Stufen.

Nur bei einem Patienten (Patient 8) war kein Ansprechen innerhalb der ersten 3 Monate zu beobachten. Die detektierten BCR-ABL-Transkripte dieses Patienten verzeichneten einen Anstieg von zuvor durchschnittlich 150 Kopien/100ng cDNA auf über 500 Kopien. 6 Monate nach Therapiebeginn waren 77,2% Ph+ Kerne in der FISH-Diagnostik und 24 von 25 Ph+ Metaphasen in der Zytogenetik nachweisbar. Im molekulargenetisch untersuchten Knochenmark ließen sich 3000 BCR-ABL-Kopien/100ng cDNA nachweisen. Nach 15 Monaten weiterer Therapie mit Imatinib war der Patient erstmalig in CCR, die 12 Monate anhielt. Der Patient befindet sich nach einem Follow-up von insgesamt 25 Monaten nach Beginn der Imatinibtherapie bzw. 6 Monate nach SCM in MCR (Konventionelle Zytogenetik: 46,XY[25]; FISH: 0/200 Interphasekernen Ph-, 1/30 Metaphasekernen Ph+).



**Abb. 6: Vergleich der BCR-ABL/ACT Ratio vor Therapiebeginn und Therapieansprechen nach 3 und 6 Monaten:**

Bei allen Patienten bis auf Patient 8 kam es zur Reduktion der BCR-ABL/ACT Ratio nach 3 Monaten. Bei 3 Patienten (Patient 10, 11 und 15) kam es nach 6 Monaten zum erneuten Anstieg der Ratio. Durch die logarithmische Darstellung sind die molekulargenetischen Remission mit >3-log gut zu erkennen (Patient 1, 4, 6, 9, 10 und 18 nach 3 Monaten und Patient 1, 4, 5, 6, 9, 12, 16 und 18 nach 6 Monaten).

Nach sechsmonatiger Therapie kam es bei insgesamt 14 Patienten zu einer Reduktion der BCR-ABL Transkripte. 8 Patienten (Patient 1, 4, 5, 6, 9, 12, 16 und 18) waren in molekulargenetischer Remission mit einer Reduktion der BCR-ABL/ACT

Ratio von >3-log. Bei 4 Patienten kam es zu einem Anstieg der Transkripte. Bei 3 der 4 Patienten war es zunächst zur Reduktion der BCR-ABL/ACT Ratio gekommen.

Der Abfall der BCR-ABL/ACT-Ratio nach 3 und 6 Monaten zur Baseline ist statistisch signifikant ( $p=0,001$ ). Der Vergleich der Ratios von 3 zu 6 Monaten ergibt ein P-Wert von  $p<0,05$  und ist somit statistisch nicht signifikant.

Nach durchschnittlich 5,8 Monaten (Range: 1-19) Imatinibtherapie hatten alle Patienten eine CCR erreicht. 10 der 18 Patienten hatten beim Erreichen der CCR eine Reduktion der BCR-ABL/ACT Ratio von mindestens 2-log-Stufen. Im weiteren Verlauf der Imatinibtherapie erreichten 16 Patienten eine molekulargenetische Reduktion der Transkriptrate von mehr als 3-log-Stufen. Bei 2 der 18 Patienten (Patient 14 und 15) wurde keine major molekulare Remission (> 3-log-Reduktion) beobachtet. Beide Patienten befinden sich in CCR (Follow-up seit Beginn der Imatinibtherapie: 26 bzw. 29 Monate).

### **3.1.3.2. Vergleich molekularbiologischer Untersuchungen des peripheren Blutes vor und nach SCM**

Es wurden die Patientenproben des peripheren Blutes kurz vor und 1-2 Monate nach SCM sowohl quantitativ als auch qualitativ untersucht.

Die mediane BCR-ABL/ACT-Ratio vor Stammzellapherese betrug  $1,0 \times 10^{-8}$  und sie änderte sich nicht nach Apherese. Proben der Patienten 5 und 8 lagen nicht vor.

Der Vergleich der BCR-ABL/ACT-Ratio vor und 1-2 Monate nach SCM zeigte keine statistische Signifikanz ( $p=0,866$ ; Wilcoxon-Test).

Von 12 Patienten konnte die BCR-ABL/ACT-Ratio ungefähr ein halbes Jahr nach Stammzellsammlung bestimmt werden. Die mediane Ratio ein halbes Jahr nach Mobilisierung lag bei  $1,0 \times 10^{-8}$ . Bei 2 von 18 Patienten erhöhte sich die BCR-ABL/ACT-Ratio (Patient 11 und 14). Bei den Patienten 3 und 15 war sie nach SCM vermindert.

Die Ergebnisse der qualitativen PCR zeigen folgende Veränderungen:

Bei den Patienten 2 und 4 ist eine Zunahme der PCR-Produkte zu beobachten.

Die PCR des Patienten 2 war vor Stammzellsammlung in der konventionellen PCR BCR-ABL-negativ und positiv in der nested PCR. Nach SCM allerdings war schon die konventionelle PCR BCR-ABL+. Da die Patientin unmittelbar nach SCM einen Blastenschub erlitt, wird sie in 3.2.2. ausführlicher besprochen.

Patient 4 war zunächst vor SCM BCR-ABL-negativ in der nested PCR. Nach SCM wurde Patient 4 BCR-ABL+ in der nested PCR.

In der quantitativen PCR zeigten sich keine Veränderungen bei diesen Patienten.

Eine Verbesserung der PCR-Ergebnisse gab es bei 2 Patienten (Patient 7 und 18). Beide waren vor SCM in der nested PCR BCR-ABL+. Nach der SCM war das Ergebnis der nested PCR bei diesen Patienten BCR-ABL-negativ.

Bei den restlichen 12 Patienten war das Ergebnis unverändert.

Die Ergebnisse der qualitativen und quantitativen PCR des peripheren Blutes vor SCM und 1-2 Monate nach SCM sind in Tab. 11 dargestellt.

**Tab. 11: Vergleich von qualitativer und quantitativer PCR im peripheren Blut vor und nach Stammzellsammlung:**

**erhöhte/verminderte** BCR-ABL-Transkriptzahl; **SCM** = Stammzellmobilisierung, **+** = positiv, **-** = negativ, **-/-** = BCR-ABL-negative nested PCR, **-/+** = BCR-ABL-negative konventionelle, aber BCR-ABL-positive nested PCR, **+/+** = BCR-ABL-positive konventionelle PCR, **n.a.** = keine Probe vorhanden

Patient	BCR-ABL RT-PCR vor SCM [konventionell/ nested]	BCR-ABL/ACT Ratio vor SCM	BCR-ABL RT-PCR nach SCM [konventionell/ nested]	BCR-ABL/ACT Ratio nach SCM
1	-/+	<1.0x10 <sup>-8</sup>	-/+	<1.0x10 <sup>-8</sup>
2	+/+	1.6x10 <sup>-4</sup>	+/+	1.8x10 <sup>-4</sup>
3	-/+	2.0x10 <sup>-5</sup>	-/+	5.1x10 <sup>-5</sup>
4	-/-	<1.0x10 <sup>-8</sup>	-/+	<1.0x10 <sup>-8</sup>
5	-/-	<1.0x10 <sup>-8</sup>	n.a.	n.a.
6	-/+	<1.0x10 <sup>-8</sup>	-/+	<1.0x10 <sup>-8</sup>
7	-/+	<1.0x10 <sup>-8</sup>	-/-	<1.0x10 <sup>-8</sup>
8	-/+	3.5x10 <sup>-5</sup>	n.a.	n.a.
9	-/-	<1.0x10 <sup>-8</sup>	-/-	<1.0x10 <sup>-8</sup>
10	-/+	<1.0x10 <sup>-8</sup>	-/+	<1.0x10 <sup>-8</sup>
11	+/+	3.3x10 <sup>-5</sup>	-/+	1.0x10 <sup>-5</sup>
12	-/+	<1.0x10 <sup>-8</sup>	-/+	<1.0x10 <sup>-8</sup>
13	-/+	8.5x10 <sup>-6</sup>	-/+	8.6x10 <sup>-6</sup>
14	-/+	8.8x10 <sup>-5</sup>	-/+	2.9x10 <sup>-5</sup>
15	-/+	3.3x10 <sup>-4</sup>	-/+	6.4x10 <sup>-5</sup>
16	-/+	<1.0x10 <sup>-8</sup>	-/+	<1.0x10 <sup>-8</sup>
17	-/+	<1.0x10 <sup>-8</sup>	-/+	<1.0x10 <sup>-8</sup>
18	-/+	<1.0x10 <sup>-8</sup>	-/-	<1.0x10 <sup>-8</sup>

### 3.1.3.3. PCR-Ergebnisse der Aphereseprodukte

Es wurden die Apheresate von 14 Patienten mittels quantitativer und qualitativer PCR untersucht. Tab. 12 fasst die molekulargenetischen Daten der Apherese-  
produkte zusammen.

Tab. 12: Quantitative und qualitative PCR-Ergebnisse der Aphereseprodukte:

n.a. = keine Probe vorhanden, **kein** = **erfolglose Stammzellmobilisierung**, **quantitativ und qualitativ BCR-ABL-negative Stammzellapheresate (Patient 3, 4, 5, 10, 14, 16, 18)**, + = positiv, - = negativ, -/- = BCR-ABL-negative nested PCR, -/+ = BCR-ABL-negative konventionelle, aber BCR-ABL-positive nested PCR, +/+ = BCR-ABL-positive konventionelle PCR

Patient	BCR-ABL/ACT Ratio der CD34+ Apheresate	BCR-ABL RT-PCR der CD34 <sup>+</sup> Apheresate [konventionell/ nested]
1	<1.0x10 <sup>-8</sup>	-/+
2	<1.0x10 <sup>-8</sup>	-/+
3	<1.0x10 <sup>-8</sup>	-/-
4	<1.0x10 <sup>-8</sup>	-/-
5	<1.0x10 <sup>-8</sup>	-/-
6	n.a.	n.a.
7	kein	kein
8	<1.0x10 <sup>-8</sup>	-/+
9	n.a.	n.a.
10	<1.0x10 <sup>-8</sup> <1.0x10 <sup>-8</sup>	-/- -/-
11	<1.0x10 <sup>-8</sup> <1.0x10 <sup>-8</sup> <1.0x10 <sup>-8</sup>	-/+ -/+ -/-
12	kein	kein
13	<1.0x10 <sup>-8</sup> <1.0x10 <sup>-8</sup>	-/+ -/-
14	<1.0x10 <sup>-8</sup>	-/-
15	<1.0x10 <sup>-8</sup>	-/+
16	<1.0x10 <sup>-8</sup> <1.0x10 <sup>-8</sup>	-/- -/-
17	<1.0x10 <sup>-8</sup> <1.0x10 <sup>-8</sup>	+/+ -/+
18	<1.0x10 <sup>-8</sup> <1.0x10 <sup>-8</sup>	-/- -/-

Von 6 Patienten gab es 2 bzw. 3 Proben von aufeinanderfolgenden Tagen, sodass insgesamt 21 Proben ausgewertet wurden.

In der quantitativen PCR waren alle Proben BCR-ABL-negativ.

Die konventionelle PCR der Proben war in allen bis auf einer Probe (Patient 17, Probe vom 1. Tag der Apherese) ebenso BCR-ABL-negativ. 12 Proben (57%) waren auch in der nested PCR BCR-ABL-negativ. Bei den Patienten, die an mehreren Tagen apheresiert wurden, blieb das PCR-Ergebnis entweder gleich oder es verbesserte sich. Bei insgesamt 7 Patienten (39%) wurden molekulargenetisch BCR-ABL-negative Stammzellapheresate gesammelt (Patient 3, 4, 5, 10, 14, 16 und 18).

### **3.2. Auswertung anhand einiger Patientenbeispiele**

Im Folgenden werden anhand von 4 beispielhaften Patienten verschiedene Verläufe ausführlich dargestellt.

Patient 1 zeigt ein schnelles Ansprechen auf Imatinib und eine erfolgreiche Stammzellmobilisierung und –sammlung ohne Veränderung der BCR-ABL-Transkriptrate.

Patient 2 wurde in zweiter Blastenkrise erfolgreich mit den 2 Monate zuvor gesammelten Stammzellen autolog transplantiert.

Patient 9 zeigt nach Beginn der Imatinibtherapie eine molekulargenetische Remission (> 3-log-Stufen) innerhalb nur eines Monats und ist seit SCM sowohl in der quantitativen als auch qualitativen PCR BCR-ABL-negativ.

Patient 10 sprach zunächst gut auf die Imatinibtherapie. Nach SCM allerdings kam es zu einem zunächst nur molekulargenetisch diagnostizierten Anstieg der BCR-ABL-Transkripte. 12 Monate nach SCM kam es zu einem zytogenetischen Rückfall.

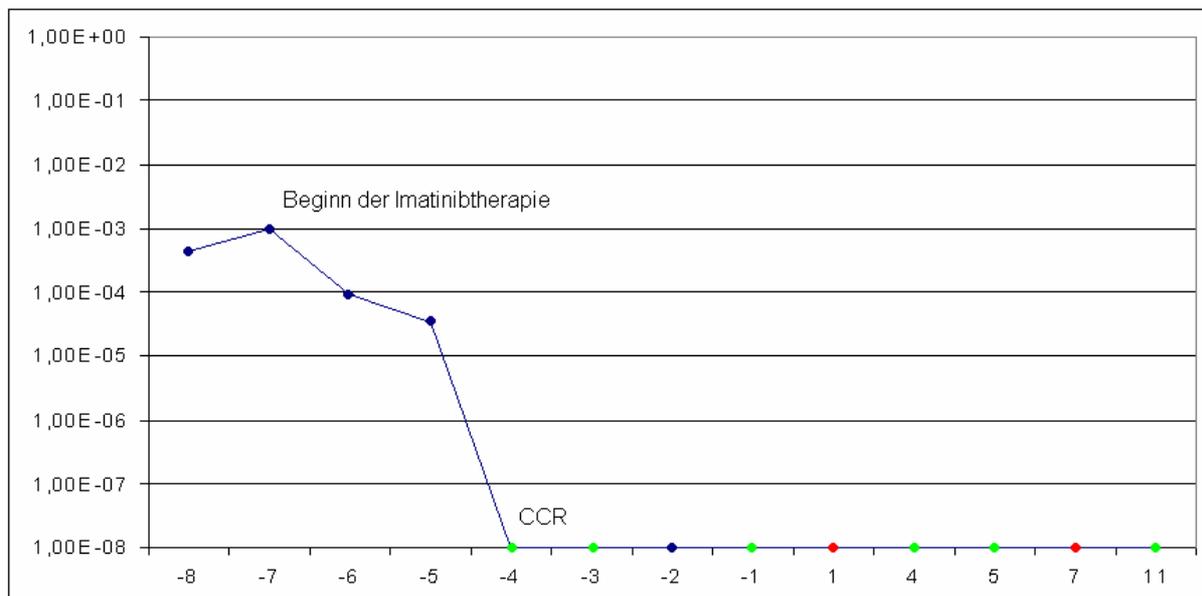
#### **3.2.1. Patient 1**

Die Anamnese des Patienten begann im Alter von 28,5 Jahren mit der Vorstellung beim Urologen wegen erstmalig aufgetretenen Priapismus und der dort im Blutbild diagnostizierten Leukozytose. Anamnestisch gab der Patient diskreten Nachschweiß, reduzierten Appetit und sporadische Nausea an. Sonographisch war eine erhebliche Splenomegalie mit einem Querdurchmesser von 25 cm auffällig. Die weiteren Untersuchungen ergaben eine Ph+, BCR-ABL+ (b3a2-Fusion inkl. e1a2-Splicevariante) CML in AP. Zunächst wurde die Therapie mit täglich 2x 500 mg Litalir eingeleitet. Einen Monat nach Diagnosestellung erfolgte die Therapieeinleitung mit täglich 600 mg Imatinib. In der Abb. 7 ist deutlich zu erkennen, dass es bereits nach

einem Monat zu einer Reduktion der BCR-ABL/ACT-Ratio um eine log-Stufe bzw. 10% kommt ( $9,75E-04$  vs.  $9,31E-05$ ). Bereits 3 Monate nach Therapieeinleitung befindet sich der Patient in CCR. In der quantitativen PCR lag die Kopienzahl der BCR-ABL-Transkripte unter 10 Kopien/100ng cDNA, sodass das Ergebnis definitionsgemäß BCR-ABL-negativ ist. Auch die einstufige qualitative RT-PCR ergab in keiner Probe einen Nachweis des BCR-ABL-Transkriptes. Allerdings waren die nested PCR-Untersuchungen der Blut- und Knochenmarkproben in allen bis auf 2 Blutproben, eine vom ersten Monat nach SCM bzw. 8 Monate nach Imatinib-Therapiebeginn und die andere 7 Monate nach SCM bzw. 14 Monate nach Start der Therapie mit Glivec, BCR-ABL+.

7 Monate nach Therapiestart erfolgte die Stammzellsammlung, bei der  $3,6 \times 10^6$  CD34+-Zellen/kg KG gesammelt werden konnten. Die zytogenetischen und molekulargenetischen Befunde zeigten keine Veränderungen. Der Patient ist 11 Monate nach SCM in CCR.

Die Ergebnisse sind in Abb. 7 und Tab. 13 dargestellt.



**Abb. 7: Transkriptrate des BCR-ABL-Transkriptes als BCR-ABL/ACT Ratio:**

**Ordinate: BCR-ABL/ACT Ratio, Abszisse: Monate vor/nach Stammzellmobilisierung; ●BCR-ABL-negativ in nested PCR, ●BCR-ABL-negativ in einstufiger PCR; 7 Monate vor SCM = Beginn der Imatinibtherapie, 4 Monate vor SCM = CCR**

Tab. 13: Patient 1 - Ergebnisse von Zytogenetik, FISH, qualitativer und quantitativer PCR:

KM = Knochenmark, PB = peripheres Blut, CD34+ = Stammzellasservat, +/- = BCR-ABL-positive nested PCR, kein = keine Probe, -/- = BCR-ABL-negative nested PCR

Therapiedauer [Monate]/ Monate vor/nach SCM	Material	Konventionelle Zytogenetik / FISH	BCR-ABL RT PCR [konventionell/nested]	Quantitative PCR
3/-4	KM	46,XY[25]	kein	kein
3/-4	PB		-/+	1,00E-08
4/-3	PB		-/+	1,00E-08
6/-1	KM	1/260 (0,38%)	-/+	1,00E-08
7/0	CD34+		-/+	1,00E-08
8/1	pB		-/-	1,00E-08
9/2	KM	0/205	kein	1,00E-08
11/4	KM	Metaphase: 0/30; Interphase: 0/207	-/+	1,00E-08
11/4	PB		-/+	1,00E-08
12/5	pB		-/+	1,00E-08
14/7	KM	Metaphase: 0/7; Interphase: 0/204	-/+	1,00E-08
14/7	PB		-/-	1,00E-08
18/11	KM	Metaphase: 0/25; Interphase: 2/200 (1%)	kein	1,00E-08
18/11	PB		-/+	1,00E-08

### 3.2.2. Patient 2

6 Jahre vor SCM wurde die Diagnose CML gestellt. 3 Jahre zuvor wurde ein invasiv duktales Mammakarzinom diagnostiziert, welches nach Ablatio mammae adjuvant mit CMF (Cyclophosphamid, Methotrexat, 5-FU) und Tamoxifen behandelt wurde.

Nach Stammzellseparation begann die Therapie mit Litalir und später IFN- $\alpha$ . Aufgrund eines persistierenden Ph+ Klons und IFN- $\alpha$ -induzierter Nebenwirkungen wurde die Patientin im Rahmen der CSTI571 0113 Studie mit Imatinib 400 mg/d behandelt. 13 Monate nach Therapiebeginn kam es zum ersten Blastenschub (lymphatisch) mit einem komplex abberanten Karyotyp:

(48,XX,-9,+der(9)t(9;22)(q34;q11),+12,-22,+idic(22)t(9;22)(22pter->22q11::9q34::9q34::22q11->22pter)x2[4]/51,XX,+6,+8,-9,+ider(9)t(9;22)(22qter->22q11::9q34->9q10::9q10->9q34::22q11->22qter),+10,+19,-22,+der(22)t(9;22)(q34;q11)x2[39]/46,XX[6])

Es wurde eine Hochdosistherapie (BEAM) mit Rückgabe der initial gewonnenen Stammzellen durchgeführt. Die Patientin blieb Ph+, hatte aber keine zusätzlichen

chromosomalen Abnormalitäten. Die erneute Therapie mit Imatinib (400 mg/d) wurde eingeleitet, welche nach 6 Monaten zur CCR führte.

12 Monate nach dem ersten Blastenschub wurde die Mobilisierung durchgeführt. Die SCM war mit  $4,9 \times 10^6$  CD34+Zellen/kg KG und  $3,9 \times 10^8$  MNC/kg KG erfolgreich.

2 Monate nach SCM erlitt die Patientin eine Progression der Erkrankung. Es erfolgte erneut eine Hochdosistherapie (Myeloablative conditioning therapy-TBI 12 Gy in 6 Fraktionen von Tag -6 bis -4 + Cyclophosphamid  $2 \times 60$ mg/kg/d) ohne vorausgegangene Induktionstherapie mit autologer Transplantation der zuvor gesammelten Stammzellen. Die Imatinibtherapie wurde bei Diagnosestellung des zweiten Blastenschubes abgesetzt.

Die gesammelten Stammzellen wurden sowohl quantitativ und qualitativ mit der PCR-Technik untersucht als auch durch Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung.

205 Interphasekerne wurden ausgewertet. 9 Kerne (4%) zeigten ein Fusionsignal, 7 Kerne (3%) 2 Fusionsignale und 2 Kerne (1%) 3 Fusionsignale. Damit ist das Stammzellasservat molekularzytogenetisch in insgesamt 8% der untersuchten Zellen Ph+. Das Signalmuster spricht dafür, dass neben Zellen mit einem Philadelphia-Chromosom auch Zellen mit 2 und 3 Philadelphia-Chromosomen vorliegen. Damit ist davon auszugehen, dass bereits zum Zeitpunkt der SCM eine beginnende Progression der Erkrankung vorlag.

Molekulargenetisch war das Asservat in der nested PCR BCR-ABL+. Quantitativ konnte eine BCR-ABL-Kopie auf  $6,7 \times 10^6$  Aktinkopien detektiert werden. Das ist laut Definition BCR-ABL-negativ.

Nach autoHSCT wurden regelmäßig, zunächst in zweiwöchigem Rhythmus, später monatlich, Knochenmarksproben molekularzytogenetisch und molekulargenetisch mittels quantitativer und qualitativer PCR untersucht.

Seit 10 Monaten, d.h. ein Jahr nach SCM, befindet sich die Patientin in CCR.

Die Ergebnisse der konventionellen PCR sind BCR-ABL-negativ, einige Proben sind ebenso BCR-ABL-negativ in der nested PCR. 5 Monate nach SCM sind die Ergebnisse der quantitativen PCR erstmals BCR-ABL-negativ.

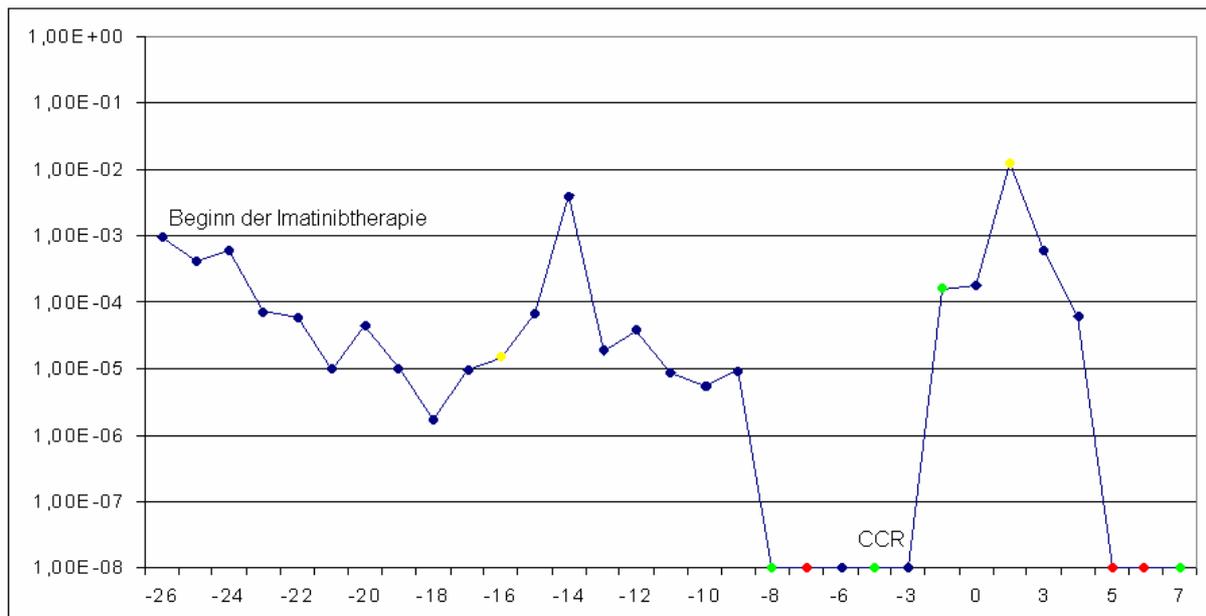
In der Abb. 8 sind die PCR-Ergebnisse 2 Jahre vor bis 7 Monate nach SCM dargestellt. Der erste und zweite Blastenschub (1.Schub:  $-13/4,0E-03$ ; 2.Schub:  $2/1,2E-02$ ) kommen dabei deutlich zum Ausdruck. In Tab. 14 sind die zytogenetischen Ergebnisse dieser Patientin zusammengefasst.

**Tab. 14: Knochenmarkuntersuchungen und Ergebnisse des Stammzellapheresates des Patienten 2 mit Dauer der Imatinibtherapie in Monaten, Monate vor bzw. nach Stammzellmobilisierung (SCM), konventioneller Zytogenetik, FISH-Diagnostik und Ergebnissen der nested PCR:**

**46,XX,t(9;22)(q34;q11) = Philadelphia-Chromosom, -/+ = BCR-ABL-positive nested PCR**

Dauer der Imatinibtherapie [Monate]/ Monate vor/nach SCM	Konventionelle Zytogenetik/FISH	BCR-ABL RT-PCR [konventionell/nested]
6/-20	46,XX[3]	
10/-16	46,XX[25]	
13/-13	komplex abberant/ Metaphase: 25/25	
<b>Hochdosistherapie mit Stammzellrückgabe (09/96 separiert)</b>		
14/-12	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[20]/46,XX[4]	
17/-9	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[1]/46,XX[17]	
20/-6	46,XX[23]/ Metaphase: 0/25; Interphase: 0/202	-/+
23/-3	Interphase: 0/52 <sup>1</sup>	-/+
25/-1	Interphase: 0/209	
<b>26/0 CD34+</b>	<b>46,XX,t(9;22)(q34;q11)+12[2]/ 46,XX,t(9;22)(q34;q11),+12,+der(22)t(9;22)(q34;q11)x2[1]</b>  <b>Interphase: 9/205(4%) 1Ph+ 7/205(3%) 2Ph+ 2/205(1%) 3Ph+</b>	<b>-/+</b>
28/2	47,XX,t(9;22)(q34;q11),+12[11]/ 48,XX,t(9;22)(q34;q11),+12,+der(22)t(9;22)(q34;q11)[10]/ 49,XX,t(9;22)(q34;q11),+12,+der(22)t(9;22)(q34;q11)x2[3]/ 50,XX,t(9;22)(q34;q11),+12,+der(22)t(9;22)(q34;q11)x3[1]	
30/4	Metaphase: 7/100 1Ph+ 91/100 2Ph+ 1/100 3Ph+	
30/4	Interphase: 5/212(2,4%) 1Ph+ 12/212(5,7%) 2Ph+	
30,5/4,5	Metaphase: 0/4; Interphase: 0/200	
31/5	Interphase: 0/200	
31,5/5,5	Metaphase: 0/3; Interphase: 0/200	
32/6	Interphase: 0/200	
33/7	Interphase: 0/100	
34/8	Interphase: 0/200	
35/9	46,XX[7]/ Metaphase: 0/25; Interphase: 0/200	
37/11	46,XX[5]/ Metaphase: 0/25; Interphase: 1/200(0,5%)	

<sup>1</sup> eingeschränkte Aussagekraft, da unter 100 Interphasekernen



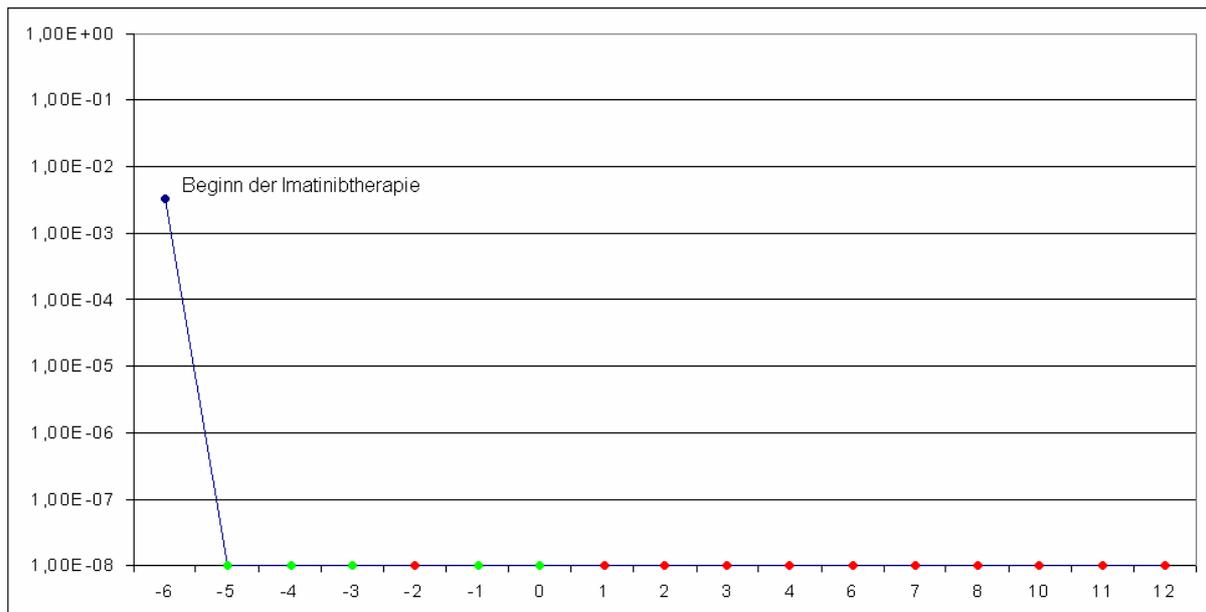
**Abb. 8: Transkriptrate des BCR-ABL-Transkriptes als BCR-ABL/ACT Ratio:**

**Ordinate: BCR-ABL/ACT Ratio, Abszisse: Monate vor/nach Stammzellmobilisierung, ●BCR-ABL-negativ in nested PCR, ●BCR-ABL-negativ in einstufiger PCR, ●BCR-ABL+ in erster PCR; 26 Monate vor SCM = Beginn der Imatinibtherapie, 6 Monate vor SCM = CCR**

### 3.2.3. Patient 9

Bei Patient 9 wurde im Alter von 33,5 Jahre eine Ph+ CML mit BCR-ABL-Rearrangement im Rahmen einer Abklärung einer Leukozytose diagnostiziert. Zytogenetische Untersuchungen wurden bei ED nicht durchgeführt, sodass keine Einteilung in eine Phase zum Zeitpunkt der ED vorgenommen werden kann. 13 Monate nach ED wurde der Patient mit IFN behandelt. Da die zytogenetische Untersuchung nach 5 Monaten IFN-Therapie in 15 der 26 analysierten Metaphasen eine komplexe Variante des Philadelphia-Chromosomens mit Involvierung des Chromosom 14 ergab, wurde der Patient 18 Monate nach ED im Rahmen der STI-Studie mit Imatinib 600 mg/d behandelt.

In der Abb. 9 sieht man eine deutliche Reduktion der BCR-ABL-Transkriptrate schon nach einem Monat. Die zytogenetische Knochenmarksuntersuchung 3 Monate nach Beginn der Therapie zeigte eine CCR. Nach 7 Monaten war der Patient molekulargenetisch sowohl quantitativ als auch qualitativ BCR-ABL-negativ.



**Abb. 9: Transkriptrate des BCR-ABL-Transkriptes als BCR-ABL/ACT Ratio:**

**Ordinate: BCR-ABL/ACT Ratio, Abszisse: Monate vor/nach Stammzellmobilisierung, ●BCR-ABL-negativ in nested PCR, ●BCR-ABL-negativ in einstufiger PCR; Molekulargenetische Remission einen Monat nach Beginn der Imatinibtherapie, Komplette molekulargenetische Remission einen Monat nach SCM bis zum Ende des Follow-up, 12 Monate nach SCM**

6 Monate nach Therapiebeginn erfolgte die Mobilisierung mit Filgrastim mit sich anschließender Apherese. Während der Stammzellapherese konnten  $4,6 \times 10^6$  CD34+Zellen/kg gesammelt werden. Der Patient zeigte auch nach SCM keinen Anstieg der BCR-ABL-Transkripte und ist seitdem in kompletter molekulargenetischer Remission bei einem Follow-up von 12 Monaten nach SCM. Tab. 15 fasst die zytogenetischen und molekulargenetischen Ergebnisse zusammen.

Tab. 15: Patient 9 - Ergebnisse von Zytogenetik, FISH, qualitativer und quantitativer PCR:

SCM = Stammzellmobilisierung, 46,XY,t(9;22;14)(q34;q11;q?23) = komplexe Variante des Philadelphia-Chromosoms mit Involvierung des Chromosomen 14, + = positiv, - = negativ, -/- = BCR-ABL-negative nested PCR, -/+ = BCR-ABL-negative konventionelle, aber BCR-ABL-positive nested PCR

Dauer vor/nach SCM	Material	Zytogenetik/FISH	BCR-ABL RT-PCR [konventionell/nested]	Quantitative PCR [BCR-ABL/ACT Ratio]
-13	pB			2,14E-03
-12	pB			7,77E-04
-11	pB			7,52E-04
-10	pB			1,86E-04
-9	pB			2,30E-04
-7	KM	46,XY,t(9;22;14)(q34;q11;q?23)[15]/46,XY[11]		
-7	pB			2,66E-04
-6	pB			3,27E-03
<b>Start der Therapie mit Imatinib</b>				
-5	pB		-/+	1,00E-08
-4	pB		-/+	1,00E-08
-3	KM	46,XY[26]		
-3	pB		-/+	1,00E-08
-2	pB		-/-	1,00E-08
-1	pB		-/+	1,00E-08
0	KM	46,XY[24]	-/-	1,00E-08
0	pB		-/+	1,00E-08
1	pB		-/-	1,00E-08
2	pB		-/-	1,00E-08
3	pB		-/-	1,00E-08
3	KM	Metaphase: 0/25; Interphase: 0/211	-/-	1,00E-08
4	pB		-/-	1,00E-08
6	pB		-/-	1,00E-08
7	pB		-/-	1,00E-08
7	KM	Metaphase: 0/3; Interphase: 0/212	-/-	1,00E-08
8	pB		-/-	1,00E-08
10	pB		-/-	1,00E-08
11	pB		-/-	1,00E-08
12	pB		-/-	1,00E-08
12	KM	Metaphase: 0/25; Interphase: 3/213(1,4%)		
16	KM	Interphase: 0/200		

### 3.2.4. Patient 10

Mit 41,5 Jahren wurde bei Patient 10 eine Ph+ CML diagnostiziert. Aufgrund von IFN- $\alpha$ -Toxizität erfolgte 28 Monate später die Umstellung auf STI571 im Rahmen der Studie CSTI571 0113.

Unter dieser Therapie erreichte der Patient nach 6 Monaten eine CCR. Die molekulargenetischen Untersuchungen zeigten eine Reduktion der BCR-ABL-Transkripte auf 10% des Ausgangswertes und ein BCR-ABL-negatives Ergebnis in der konventionellen PCR. In der nested PCR waren die Blutproben bis zur Stammzellapherese BCR-ABL-negativ. 2 Monate vor SCM bzw. 14 Monate nach Therapiebeginn war die untersuchte Knochenmarkprobe in der nested PCR BCR-ABL-negativ.

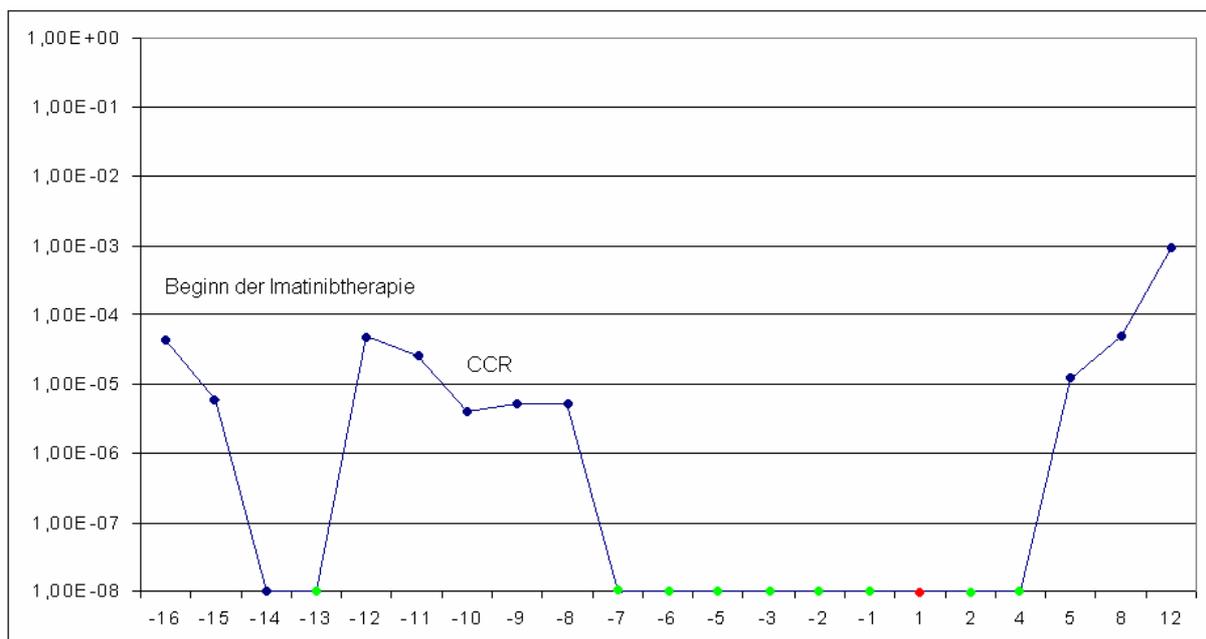
Die Stammzellmobilisation und –apherese war mit insgesamt  $3,1 \times 10^6$  gesammelten CD34+ Zellen/kg erfolgreich. Die Apherese erfolgte an 2 aufeinanderfolgenden Tagen. Die Stammzellen wurden molekulargenetisch hinsichtlich des BCR-ABL-Transkripts untersucht. Die qualitative PCR war sowohl in der ersten Runde als auch im nested Schritt BCR-ABL-negativ. In der quantitativen PCR wurde bei insgesamt 4 Läufen eine Kopie detektiert, was man definitionsgemäß als BCR-ABL-negativ bewertet. Allerdings lagen die Anzahl der Aktinkopien deutlich unter den sonst üblichen Werten, sodass man von einem Qualitätsdefizit der aufbereiteten Stammzellen ausgehen muss.

Einen Monat nach SCM bzw. 17 Monate nach Therapiebeginn mit Imatinib konnten keine BCR-ABL-Transkripte in der nested PCR nachgewiesen werden, wie 3 Monate zuvor beim untersuchten Knochenmark. Allerdings war die einen Monat darauf entnommene Blutprobe erneut BCR-ABL+ in der nested PCR. Im 4. Monat nach SCM war im Knochenmark ein Anstieg auf das zehnfache der Kopienanzahl zu beobachten. Die Kopienzahl in der Blutprobe lag weiterhin unter 10/100ng cDNA. In der FISH-Diagnostik des Knochenmarks fand sich kein Nachweis einer Philadelphia-Translokation. Im weiteren Verlauf stiegen die BCR-ABL-Transkriptzahlen auch im peripheren Blut stetig an. Das 8 Monate nach SCM untersuchte Knochenmark zeigte einen weiteren Anstieg auf über 300 BCR-ABL-Kopien/100ng cDNA. Zytogenetisch gab es noch immer keinen Hinweis auf einen Rückfall.

4 Monate später bzw. 12 Monate nach SCM fand sich in 7,5% (n=15) der Interphasekerne (n=200) ein Translokationssignal. 5 der zusätzlich nach Hybridisierung analysierten 25 Metaphasen waren Ph+, sodass sich nun auch

zytogenetisch der Rückfall zeigte. Die in den nachfolgenden Monaten (15 Monate und 17 Monate nach SCM) untersuchten Knochenmarkproben waren konventionell zytogenetisch Ph<sup>+</sup>. Allerdings konnte eine Reduktion der Ph<sup>+</sup> Zellen von 11 Ph<sup>+</sup> bei insgesamt 25 untersuchten Zellen im Monat 15 auf 2 Ph<sup>+</sup> bei insgesamt 24 untersuchten Zellen im Monat 17 beobachtet werden.

Der Patient befand sich nach einem Follow-up von 33 Monaten nach Beginn der Imatinibtherapie bzw. 17 Monate nach SCM in einer partiellen zytogenetischen Remission. Die molekular- und zytogenetischen Ergebnisse sind in Abb. 10 und Tab. 16 dargestellt.



**Abb. 10: Transkriprate des BCR-ABL-Transkriptes als BCR-ABL/ACT Ratio:**

**Ordinate: BCR-ABL/ACT Ratio, Abszisse: Monate vor/nach Stammzellmobilisierung, ●BCR-ABL-negativ in nested PCR, ●BCR-ABL-negativ in einstufiger PCR; CCR 6 Monate nach Beginn der Imatinibtherapie, Anstieg der BCR-ABL-Transkripte 5 Monate nach SCM**

**Tab. 16: Patient 10 - Ergebnisse von Zytogenetik, FISH, qualitativer und quantitativer PCR:**

**SCM = Stammzellmobilisierung, 46,XY,t(9;22)(q34;q11) = Philadelphia- Chromosom, -/- = BCR-ABL-negative nested PCR, +/- = BCR-ABL-positive nested PCR**

<b>Imatinibtherapie [Monate]/ Monate vor bzw. nach SCM</b>	<b>Konventionelle Zytogenetik</b>	<b>FISH-Diagnostik</b>	<b>BCR-ABL RT-PCR [konventionell/ nested]</b>	<b>Quantitative PCR [BCR-ABL/ACT Ratio]</b>
6/-10	46,XY[25]	Metaphase: 0/25; Interphase: 2/202(1%)	-/+	1,71E-06
9/-7	46,XY[26]		-/+	1,00E-08
14/-2	46,XY[25]		-/-	1,00E-08
17/1	4 Mitosen Ph-	Metaphase: 0/25; Interphase: 0/214	-/+	1,00E-08
20/4	kein	Interphase: 0/217		3,39E-06
24/8	kein	Metaphase: 0/25; Interphase: 0/200		1,47E-04
28/12	kein	Metaphase: 5/25; Interphase: 15/200(7,5%)		
31/15	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[11]/ 46,XY[14]			
33/17	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[2]/ 46,XY[22]			

## **4. Diskussion**

Die CML ist eine monoklonale, hämatopoetische Stammzellneoplasie, deren Charakteristika – gesteigerte Zellproliferation, Apoptosehemmung und veränderte Interaktion mit der extrazellulären Matrix - durch die erhöhte Tyrosinkinaseaktivität des onkogenen Fusionsproteins p210<sup>BCR-ABL</sup> verursacht werden. Das Wissen um diesen Zusammenhang führte zur Entwicklung des Tyrosinkinaseinhibitors Imatinib. 1998 wurde aufgrund der vielversprechenden präklinischen Daten mit der Durchführung klinischer Studien begonnen. Die Ergebnisse der IRIS-Studie, einer internationalen multizentrischen Phase III Studie, zeigten einen hochsignifikanten Unterschied hinsichtlich des progressionsfreien Überlebens zugunsten der Therapie mit Imatinib im Vergleich zur vorherigen Standardtherapie mit IFN- $\alpha$  und Cytarabin [52]. Dies führte 2001 zur Zulassung von Imatinib als medikamentöse Erstlinientherapie der CML.

Zum Zeitpunkt des Beginns dieser Arbeit war das Procedere bei Imatinibresistenz unklar. In diesem Zusammenhang schien es sinnvoll, die Bedeutung autologer Stammzellsammlungen und –transplantation zu re-evaluieren.

Es wurden 18 CML-Patienten, die unter Imatinib eine CCR erreicht hatten, ohne Therapieunterbrechung mit G-CSF stimuliert, um CD34+ Stammzellen zu apheresieren. Die vor Beginn der Imatinibtherapie, während der Therapie, vor und nach der autologen Stammzellmobilisierung und –sammlung entnommenen Blut- und Knochenmarkproben sowie die Stammzellapheresate wurden zytogenetisch und molekulargenetisch mittels quantitativer und qualitativer PCR untersucht. Im Vergleich der molekulargenetischen Daten vor und nach der SCM gab es keine statistische Signifikanz. 14 der 18 Patienten sind nach einem durchschnittlichen Follow-up von 12,6 Monaten weiterhin in CCR. In der vorliegenden Arbeit konnte die Sicherheit, Durchführbarkeit und Effizienz der Apherese gezeigt werden.

### **4.1. Methodik**

#### **4.1.1. LightCycler/ Standardreihe**

Die LightCycler-Technik ist eine Form der quantitativen Realtime PCR. Gegenüber anderen quantitativen Methoden bietet sie mehrere Vorteile. Durch die schnelle Temperatureinstellung und die spezifische Amplifikation der Zielsequenz, die am

Monitor zu verfolgen ist und somit eine spätere Gelelektrophorese überflüssig macht, ist die PCR mittels LightCycler erheblich zeitsparend. Somit erlaubt die LightCycler-Technik eine schnellere Analyse von absoluten und relativen Werten, ohne dass weitere Schritte nach der PCR nötig sind. Es können 10 BCR-ABL Kopien/100 ng cDNA gemessen werden [69]. Der Verzicht auf die Gelelektrophorese minimiert die Kontaminationsgefahr mit Ziel-DNA. Nachteil im Vergleich zur nested-PCR ist die geringere Sensivität.

Durch Verwendung einer einmolekularen Standardreihe zur Quantifizierung von Ziel- und Referenzgen kann der Verdünnungsfehler eliminiert werden. Selbst wenn die berechnete Konzentration um eine logarithmische Stufe abweichen sollte (z. B. durch Fehlverdünnung oder langsame Degeneration), wird dies durch Bildung der Ratio der Ergebnisse eliminiert. Bei der Etablierung der Standardreihe kann man so deutlich zwischen einzelnen falsch verdünnten Konzentrationen und ungünstigen PCR-Bedingungen unterscheiden, da sich ein Verdünnungsfehler nun in den PCRs von Ziel- und Referenzgen widerspiegeln muss. In diesem konkreten Fall wird deutlich, dass die PCR-Bedingungen für das Referenzgen sehr gut sind (Abb. 5), beim Zielgen aber noch Potential zur Optimierung besteht (Abb. 4).

Im Abschnitt 4.6. gehe ich ausführlicher auf die Nachweisgrenze der PCR ein.

## **4.2. Bedeutung der prognostischen Aussagen hinsichtlich Therapieansprechen und Therapieversagen**

Die derzeit einzig kurative Therapiemöglichkeit stellt die alloHSCT dar. Da die frühe, möglichst ein bis zwei Jahre nach Diagnosestellung durchgeführte Stammzelltransplantation zu einem besseren Langzeitüberleben führt [31, 70], ist es von größter Wichtigkeit möglichst früh prognostische Aussagen zum erwarteten Ansprechen auf die Therapie zu treffen, um bei Therapieversagen oder ungenügendem Ansprechen eine eventuelle Veränderung der Therapiestrategie in Erwägung zu ziehen. *Kantarjian et al.* konnten zeigen, dass das Erreichen einer CCR unter IFN-Therapie mit einem geringeren Risiko jährlicher Mortalität assoziiert ist [13].

Aus vielen Studien wurde berichtet, dass ein zytogenetisches Ansprechen mit einer Reduktion der Ph<sup>+</sup> Zellen auf unter 35% mit einer exzellenten Langzeitprognose verbunden ist [29, 71]. 4-7 Jahre betrug die mittlere Überlebenszeit vor Einführung der Tyrosinkinaseinhibitoren. Verschiedene Risikoscores wurden in den letzten

Jahrzehnten entwickelt. Das individuelle Risiko der Patienten kann berechnet und verschiedene Studienpopulationen bezüglich ihrer Risikoverteilung können verglichen werden. Niedrigrisikopatienten haben eine längere mediane Gesamtüberlebenszeit als Patienten mit hohem Risiko. Der Sokal-Score unterteilt Erstdiagnostizierte in drei Risikogruppen unter Berücksichtigung von Alter, Milzgröße, prozentualer Blastenanteil im peripheren Blut und Thrombozytenzahl [72]. In den neunziger Jahren wurde der Score zur Berücksichtigung der Patienten mit der damaligen Standardtherapie IFN- $\alpha$  modifiziert. Im Zeitalter von Imatinib scheint das Erreichen einer CCR die schlechte Prognose durch den Sokal-Score aufzuheben [53].

Der Hasford-Score berücksichtigt neben den bisherigen Variablen zusätzlich noch den prozentualen Anteil von Basophilen und Eosinophilen [25].

Prognostisch relevante Größen sind das hämatologische, zytogenetische und molekulare Ansprechen.

#### **4.3. Hämatologisches, zytogenetisches und molekulargenetisches Ansprechen unter Imatinibtherapie**

Die IRIS-Studie hat gezeigt, dass die hämatologische und zytogenetische Ansprechrate bei Patienten mit neu diagnostizierter CML, die mit Imatinib behandelt werden, höher ist als bei den Patienten, die nach Diagnosestellung mit IFN- $\alpha$  und Cytarabine therapiert werden [52]. Nach 60 Monaten Follow-up wurden noch 69% der Patienten mit Imatinib, 3% mit Ara-C/IFN behandelt. 65% der Patienten, die zunächst im Ara-C/IFN -Arm waren, haben auf Imatinib gewechselt [53].

18 Monate nach Therapiebeginn waren 97% der Patienten in der Imatinibgruppe und 69% der Patienten in der Ara-C/IFN-Gruppe in CHR, 87% vs. 35% in partieller zytogenetischer Remission (MCR) und 76% vs. 14% in CCR. Nach 60 Monaten sind 98% der mit Imatinib behandelten Patienten in CHR, 92% in MCR und 87% in CCR.

Die Ergebnisse machen deutlich, dass sich die jährliche Progressionsrate nicht erhöht hat. Das Erreichen einer CCR mit einer 3-log-Reduktion der BCR-ABL-Transkripte ist prognostisch prädiktiv.

Therapieziele sind CHR nach 3 Monaten, zytogenetisches Ansprechen nach 6 Monaten mit CCR nach 12 Monaten und eine 3-log-Reduktion der BCR-ABL-Transkripte nach 18 Monaten [9]. Ein Verlust der CHR, der CCR oder der molekularen Remission, das Nichterreichen eines der Therapieziele oder

neuaufgetretene zusätzliche zytogenetische Abberationen bedingen ein erhöhtes Monitoring und eine Reevaluation der Therapie.

Die Erkenntnisse zu den guten Ansprechraten unter Imatinib spiegeln sich auch in den Ergebnissen dieser Arbeit wider. Nach 6 Monaten Imatinibtherapie kam es bei 14 der 18 Patienten zum Abfall der BCR-ABL/ACT Ratio. 8 der 14 Patienten zeigten eine molekulare Remission mit einer 3-log-Reduktion. Bei einem dieser 8 Patienten (Patient 5) kam es zu einem Verlust der CCR. Der Patient befindet sich nach einem Follow-up von 25 Monaten seit Beginn der Imatinibtherapie in MCR. Bei 3 der 4 Patienten ohne Abfall bzw. mit erneutem Anstieg der BCR-ABL/ACT Ratio innerhalb der ersten 6 Monate der Imatinibtherapie kam es nach anfänglicher CCR zum Verlust dieser (Patient 5, 10 und 11).

#### **4.4. Korrelation zwischen quantitativer PCR und zytogenetischem Ansprechen**

Die Effizienz einer Therapie wird u.a. reflektiert durch die Expression von BCR-ABL als Marker für die Tumorlast.

Verschiedene Arbeitsgruppen zeigten, dass das Level der Expression der BCR-ABL-Transkripte, gemessen im peripherem Blut und Knochenmark mit Hilfe der quantitativen PCR, signifikant mit dem Prozentsatz der Ph<sup>+</sup> Metaphasen im Knochenmark korreliert [73, 74, 75].

*Merx et al.* untersuchten die Vorhersagbarkeit für das zytogenetische Ansprechen nach Imatinibtherapie, indem sie molekulargenetische Ergebnisse einen, 2 und 3 Monate nach Beginn der Therapie mit dem Ansprechen verglichen. Eine mediane BCR-ABL/ABL Ratio von <20% nach 2 Monaten Imatinibtherapie war mit einer signifikant höheren Wahrscheinlichkeit für einen Major Response verbunden [73].

2003 veröffentlichten *Wang et al.* Ergebnisse, die belegten, dass ein frühes molekulargenetisches Ansprechen nach ein bis 3 Monaten Imatinibtherapie mit einem Abfall der BCR-ABL/ABL Ratio von unter 50% der Baseline zu einer signifikant höheren Wahrscheinlichkeit für ein partiell oder komplett zytogenetisches Ansprechen führen [76]. Bei 44 der 47 untersuchten Patienten war eine Abnahme der BCR-ABL/ABL-Ratio nach 4 Wochen Therapie zu verzeichnen. Nach 3 Monaten Imatinibtherapie waren bei 6 Patienten höhere Ratios als die der Baseline zu messen. Bei den von *Wang* untersuchten 47 Patienten erreichten 13 nach 6 Monaten eine CCR und 10 Patienten eine PCR, welche nach 12 Monaten anhielt. Bei den 20

Nonresponder konnte auch nach 12 Monaten kein zytogenetisches Ansprechen beobachtet werden. Die restlichen 4 Patienten waren Minor-Responder, die aufgrund der steigenden Ph+ Metaphasen nach 9 und 12 Monaten zur Gruppe der Nonresponder gezählt wurden.

Bei allen 18 Patienten, die in diese Studie eingeschlossen wurden, kam es durchschnittlich 5,8 Monaten (Range: 1-19) nach Beginn der Imatinibtherapie zur CCR. Innerhalb der ersten 3 Monate wurde bei 6 Patienten eine Reduktion der Baseline um mindestens 50% erreicht. Bei einem dieser Patienten kam es zum erneuten Anstieg nach 6 Monaten (Patient 10).

#### **4.5. Autografting**

Viele Studien demonstrierten die Zuverlässigkeit und Wirksamkeit autologer Stammzellseparation und –transplantation.

*Mughal et al.* beobachteten 21 Patienten nach autoHSCT [65]. 11 der 17 zytogenetisch untersuchten Patienten erreichten eine teilweise Ph- Hämatopoese und es schien, als würden diese Patienten im Gegensatz zu Patienten mit Ph+ Hämatopoese ein nach Autotransplantation längeres Überleben haben. Es wird vermutet, dass Autografting in einigen Fällen den Ph- Progenitorzellen einen proliferativen Vorteil bietet [77].

1994 wurde die erste Multicenteranalyse mit 200 Patienten aus 8 Transplantationszentren veröffentlicht [66]. Das mediane Alter der Patienten war 42 Jahre (Range: 7-67). 142 Patienten (71%) waren zum Zeitpunkt der Transplantation in CP, 30 (15%) in AP und 28 (14%) befanden sich entweder in BC oder in der zweiten CP, die einer oder mehreren BC folgte. Die Patienten erhielten durchschnittlich 14,6 Monate (Range: 2-113) nach CML-Diagnose Knochenmark- (n=122) oder periphere Stammzellen (n=73). Zwischen den einzelnen Erkrankungsstadien gab es signifikante Unterschiede im Überleben. Es konnte bei den Patienten in CP ein Plateau zwischen 3,6 bis 7,5 Jahren in der Überlebenskurve beobachtet werden. Die mediane Überlebenszeit dieser Gruppe war nach 7 Jahren noch nicht erreicht, während sich das mediane Überleben der Patienten in AP bei 35,9 Monaten (knapp 3 Jahren) belief. Patienten in BC hatten keinen Überlebensvorteil nach autoHSCT. Im Kurzzeitüberleben schien auch das Alter eine Rolle zu spielen. Unter 40-jährige Patienten hatten eine besonders niedrige

Sterberate im 1. Jahr nach Transplantation. Die 1-Jahres-Sterberate älterer Patienten unterschied sich nicht von denen, die konventionell behandelt worden waren, was impliziert, dass auch Patienten über 50 und 60 Jahre auf lange Sicht einen Überlebensvorteil haben, denn die Überlebenskurven nach 3 Jahren glichen sich bei beiden Altersgruppen an.

*Simonsson et al.* entwickelten dazu ein Protokoll, in das 160 Patienten, die zuvor 6 Monate hochdosiert IFN- $\alpha$  und HU nach 1-3 Zyklen intensiver Chemotherapie erhielten [78]. Das Alter der Patienten betrug maximal 55 Jahre. Patienten mit Spender wurden allogent transplantiert und Patienten, die im Knochenmark Ph-negativ wurden, transplantierte man autolog. Bei 51% der mit IFN- $\alpha$ - und HU-behandelten Patienten diagnostizierte man eine signifikante Reduktion Ph<sup>+</sup> Zellen, 5% wurden sogar Ph-negativ. 27 der 30 autotransplantierten Patienten wurden betreff des Ph-Chromosoms analysiert, wobei 17 der 27 Patienten zytogenetisch rezidierten, während 10 von 27 (37%) Patienten 1-64 Monate nach autoHSCT Ph-negativ blieben.

Eine weitere Studie wurde von *Carella et al.* in Genua durchgeführt [79]. 194 Patienten mit Ph<sup>+</sup> CML in verschiedenen Phasen wurden in diese Studie einbezogen. Bei 60 der 194 Patienten lag die ED CML weniger als 12 Monate zurück und sie waren nicht mit IFN- $\alpha$  vorbehandelt. Das Behandlungsschema für die Mobilisation bestand aus dem ICE-Protokoll: Idarubicin 8 mg/m<sup>2</sup>/d an Tag 1-5, Cytosine Arabinsine (Ara-C) 800 mg/m<sup>2</sup> über 2 h per infusionem an Tag 1-5 und Etoposide 150 mg/m<sup>2</sup> über 2 h per infusionem. Ab Tag 8 nach der Chemotherapie bekamen die Patienten 5-10  $\mu$ g/kg KG G-CSF. Überschritt die Anzahl der Leukozyten  $1 \times 10^9/l$  und enthielt das periphere Blut  $>10$  CD34<sup>+</sup>-Zellen/ $\mu$ l, wurde mit der Leukapherese begonnen. Ab einer Gesamtanzahl von  $2,0 \times 10^6/kg$  CD34<sup>+</sup> Zellen galt die Mobilisation als erfolgreich.

17 der 60 IFN- $\alpha$ -naiven Patienten erhielten das ICE-Protokoll, während die anderen 43 Patienten nach dem Mini-ICE-Protokoll (ICE-Protokoll über 3 Tage) behandelt wurden. Alle 60 Patienten beendeten die Mobilisation, keiner starb. Toxizitäten wie Alopezie, leichte Mukositis und Diarrhoe kamen hauptsächlich bei den mit dem ICE-Protokoll behandelten Patienten vor. Zytogenetische Analysen der gesammelten peripheren hämatopoetischen Progenitortellen zeigten bei 36 Patienten (60%) diploide Zellen, bei 14 Patienten (23%) fand man weniger als 34% oder weniger Ph<sup>+</sup> Zellen. 50 Patienten (83%) hatten Ph-negative Zellen und waren in MCR.

Verglichen mit Patienten, die in späterer CP eventuell mit IFN- $\alpha$ -Refraktaritat sammelten, zeigte sich ein Vorteil durch eine höhere Rate an CCR unter den Patienten in früher CP (60% vs 34% ) und bessere Ergebnisse in der Anzahl CD34+ Zellen, CFU-GM (colony-forming units granulocyte-macrophage) und LTC-IC (long-term culture-initiating cells).

*Keil et al.* führten bei 6 Patienten mit einem medianen Alter von 54 Jahren (Range: 42-59) eine SCM durch [80]. Dazu wurden 5 der Patienten nach Protokoll mit Idarubicin und Cytarabine [81] und 1 Patientin nach Mini-ICE-Protokoll [82] mobilisiert. Vor der mobilisierenden Chemotherapie lag die BCR-ABL-Positivität in der FISH-Diagnostik bei einem Median von 78% (Range: 50-93%). Zu Beginn der Apherese wurden durchschnittlich 11% (Range: 8-40%) BCR-ABL+ Zellen gemessen. Die BCR-ABL/ABL Ratio betrug 3,1% (Range: 0,4-24,7%). Es konnten  $5,18 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg KG (Range: 2,7-17,6) gesammelt werden. Dazu waren durchschnittlich 5 Apheresen (Range: 2-10) nötig. Bei jedem Patienten wurde ein stetiger Anstieg der BCR-ABL-Positivität im Laufe des folgenden Apherese-Procedere auf letztendlich 33% Interphasekerne (Range:15-74%) in der FISH-Diagnostik und einer BCR-ABL/ABL Ratio von 19,4% (Range: 1,9-53,2%) gemessen. Aufgrund der geringen Qualität der Zellen nach mobilisierender Chemotherapie können die zur Diagnostik benötigten Metaphasen oft nicht in ausreichendem Maße beurteilt werden. *Hess et al.* zeigten, dass in 43% der Leukaphereseprodukte nach mobilisierender Chemotherapie weniger als 10 Metaphasen quantitativ analysierbar waren [83].

*Carrasco et al.* evaluierten die Effektivität der konventionellen Zytogenetik und der Molekulargenetik zur Detektion der minimalen Resterkrankung und identifizierten die Faktoren, welche die Anzahl der zytogenetisch analysierbaren Metaphasen beeinflussen [84]. Die Wahrscheinlichkeit einer zur Analyse ausreichenden Metaphasenzahl im Apheresat ist reduziert bei einem Zeitraum von über 12 Monaten zwischen ED CML und SCM, bei einer nur kurzen Unterbrechung zwischen IFN-Therapie und SCM und bei einem intensiven Mobilisierungsregime nach dem ICE-Protokoll. Desweiteren sinkt die Wahrscheinlichkeit bei zuvor im peripheren Blut weniger als  $1 \times 10^9$  gemessenen Leukozyten/L und bei weniger als  $0,5 \times 10^8$  mononuklearen Zellen/kg im Apheresatbeutel. Deshalb ist der Vergleich der Zytogenetik mit einer zweiten zuverlässigen molekulargenetischen Methode wie der

quantitativen RealTime RT-PCR zur Quantifizierung des BCR-ABL-Klones von großem klinischen Interesse.

Die Zunahme der BCR-ABL-Positivität während der aufeinanderfolgenden Leukapheresen spricht für den Proliferationsvorteil, den der BCR-ABL-Klon besitzt. In präklinischen Studien konnte man eine selektive Hemmung des Wachstums von CML-Zelllinien und BCR-ABL+ Kolonien durch den Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib zeigen [45, 47, 58]. Durch kontinuierliche Therapie mit Imatinib während der Mobilisierung könnte dieser Klon nun seinen Vorteil verlieren und somit hätten Ph-Stammzellen die Möglichkeit zur Proliferation.

In dieser Arbeit wurden bei 18 CML-Patienten in CCR ohne Unterbrechung der Imatinibtherapie nach 4-6-tägiger G-CSF Stimulation CD34+ Stammzellen apheresiert. Bei 12 Patienten war die Apherese erfolgreich mit einer durchschnittlichen Stammzellkonzentration von  $3,2 \times 10^6$ /kg KG (Range: 2,0-4,9). Bei 3 Patienten lag die Konzentration der CD34+ Zellen unter  $2,0 \times 10^6$ /kg KG (durchschnittlich  $1,1 \times 10^6$ /kg KG Range: 0,7-1,9), bei 2 Patienten verlief die SCM ohne Erfolg.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen Übereinstimmung mit denen von *Hui et al* [85]. 12 Frauen und 20 Männer mit einem medianen Alter von 53 Jahren (Range: 21-67) wurden in deren Studie eingeschlossen. Die Patienten wurden in 2 Kohorten geteilt. Eine Gruppe erhielt während der Mobilisierung mit  $10 \mu\text{g}$  Filgrastim/kg/d Imatinib ohne Unterbrechung, während die Imatinibgabe in der zweiten Gruppe bei gleicher Filgrastimdosis 5-7 Tage vor PBSC Sammlung bis zur erfolgten Apherese unterbrochen wurde.

2 der 32 von *Hui et al.* untersuchten Patienten, jeweils einer aus jeder Kohorte, konnten nicht apheresiert werden, da die Anzahl CD34+ Zellen im Blut  $<5/\mu\text{L}$  betrug. In der mit kontinuierlicher Imatinibgabe mobilisierten Kohorte erfolgte bei 6 Patienten (33%) eine inadäquate Sammlung ( $<1,0 \times 10^6$ /kg KG) und bei 2 Patienten (11%) eine an Zellzahl grenzwertige Apherese ( $1,7-2,0 \times 10^6$ /kg KG). 9 Patienten (50%) sammelten adäquat mit  $\geq 2,0 \times 10^6$  CD34+Zellen/kg KG. Die Ergebnisse in der Kohorte, in der die Imatinibgabe während SCM unterbrochen wurde, waren besser. Bei nur 3 der 14 Patienten (21%) betrug die Anzahl CD34+ Zellen  $<2,0 \times 10^6$ /kg KG. 10 Patienten (71%) erreichten die für eine Transplantation nötigen Zellzahlen.

Patientenalter, das Verhältnis von Patientinnen zu Patienten und das Krankheitsstadium bei Therapiebeginn sind in beiden Arbeiten ähnlich. Die

durchschnittliche Dauer der Erkrankung und der Imatinibtherapie sind unterschiedlich, länger in dieser Arbeit (CML-Dauer: 40,6 vs. 21 Monate; Dauer der Imatinibtherapie: 16 vs. 9,5 Monate).

Die Ergebnisse beider Arbeiten sind in Tab. 17 vergleichend einander gegenübergestellt.

**Tab. 17: Patientencharakteristika im Vergleich**

Vergleichende Charakteristika	Eigene Ergebnisse n=18	<i>Hui et al.</i> Imatinib ohne Unterbrechung n=18	<i>Hui et al.</i> Imatinibpause während SCM n=14
Female/ Male	8/10	9/9	3/11
Medianes Alter (Range)	49 Jahre (24-72)	51,5 Jahre (21-67)	55 Jahre (23-64)
Durchschnittliche CML-Dauer (Range)	40,6 Monate (8 – 91)	22 Monate (6-252)	20,5 Monate (4-96)
Krankheitsstadium bei Therapiebeginn CP=chronisch, AP=akzeleriert, BC=Blastenkrise	CP: 15 AP: 3	CP: 14 AP: 3 BC: 1	CP: 10 AP: 3 BC: 1
Imatinibtherapie (Range)	16 Monate (6-27)	9 Monate (4-18)	10,5 Monate (4-19)
CD34+ Zellen/kg KG (Range)	2,66x10 <sup>6</sup> (0,7 - 4,9x10 <sup>6</sup> )	2,18x10 <sup>6</sup> (0,43-5,23)	3,70x10 <sup>6</sup> (0,15-8,71)
Erfolg der Apherese			
≥2,0x10 <sup>6</sup> /kg KG	12(67%)	9(50%)	10(71%)
<2,0x10 <sup>6</sup> /kg KG	4(22%)	8(44%)	3(21%)
keine Apherese	2(11%)	1(5,5%)	1(10%)

Eine lange Erkrankungsdauer vor SCM kann bei Stammzellsammlungen in geringen Erträgen von sich im peripheren Blut befindlichen CD34+ Zellen resultieren [86]. Weder in der Arbeit von *Hui et al.* noch in dieser Arbeit korrelierten die Dauer der CML und der CD34+ Ertrag.

Die Beobachtungen, dass die Transkriptzahlen im Verlauf stetig steigen [80, 87], sind entgegengesetzt zu den Ergebnissen dieser Arbeit. Im Verlauf der Stammzellsammlungen aller 6 Patienten, von denen es Apheresatproben aufeinanderfolgender Tage gab, sank die Anzahl der BCR-ABL-Transkripte in den Leukapheresaten oder sie war konstant.

Die Schlussfolgerungen, die aus unseren Ergebnissen und denen von *Hui et al.* gezogen werden können, sind folgende:

Es konnten in der Mehrzahl der Patienten mit seit mindestens 6 Monaten bestehendem zytogenetischen Response erfolgreich Stammzellasservate gesammelt werden. Die SCM unter Imatinibtherapie stellte sich als durchführbar, sicher und effizient dar. Sie scheint keinen mobilisierenden Effekt auf leukämische Progenitorzellen zu haben, denn die Leukämielast, mit Hilfe der quantitativen PCR gemessen, zeigte keinen signifikanten Unterschied nach einem medianen Follow-up von 15,6 Monaten (6 Monate *Hui et al*).

Der Ertrag könnte durch kurzzeitige Unterbrechung der Imatinibtherapie verbessert werden. Das Therapiemanagement nach autoHSCT ist entscheidend für den weiteren Verlauf der Erkrankung. Eine Patientin erhielt zweimal innerhalb von 16 Monaten nach Hochdosistherapie Stammzellen, die zuvor separiert waren (1. Gabe Separation bei ED CML; 2. Gabe SCM unter Imatinibtherapie) [88].

*Fischer et al.* untersuchten 24 BCR-ABL+ Patienten mit CML nach autoHSCT [89]. Es konnte gezeigt werden, dass Imatinib nach PBSCT sicher und wirksam ist. 42% der 24 Patienten berichteten über leichte nicht-hämatologische Nebenwirkungen Grad I-II wie Übelkeit, Erbrechen und Orbitalödem, welches gewöhnlich während der ersten Therapiewochen auftrat. Nur bei einem Patienten war es nötig aufgrund von nicht-hämatologischer Grad III-IV Toxizität, die Imatinibtherapie einzustellen.

#### **4.6. Bedeutet Ph-negativ und BCR-ABL-negativ wirklich negativ?**

Die Prognose der Patienten mit CML ist abhängig vom therapeutischen Ansprechen. Eine minimale Resterkrankung dient der Risikostratifizierung nach allogener oder autoHSCT und der Therapieplanung. Durch die Methode der nested PCR mit Reamplifizierung eines kleinen Teils der Reaktionsprodukte der konventionellen PCR mit intern liegenden Primern in einer 2. PCR konnte die Sensitivität erhöht werden. Die Sensitivität der qualitativen PCR in Routineverfahren liegt bei  $10^{-5}$ - $10^{-6}$  [90]. Es konnten sogar BCR-ABL-mRNA-Transkripte in geringsten Konzentrationen bei 22 von 73 bzw. 12 von 16 untersuchten gesunden Erwachsenen nachgewiesen werden [91, 92].

Für die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ist die RNA-Qualität entscheidend. Zudem sollte die Kontaminationsgefahr minimiert werden. Probengewinnung, RNA-Extraktion, reverse Transkription und ein schneller Datengewinn optimieren das Ergebnis [93].

Wichtig ist die Differenzierung zwischen Reproduzierbarkeit und Möglichkeit der Detektion. An der Sensibilitätsschwelle eines PCR Assay besteht eine nur geringe Wahrscheinlichkeit für das Vorhandensein der bestimmten Zielsequenz im Reaktionsmix. Damit ist ein einzelnes negatives PCR-Ergebnis nicht zuverlässig gleichbedeutend mit dem Verlust der Genexpression.

Die Reproduzierbarkeit von PCR-Ergebnissen wurde von *Melo et al.* untersucht. Es wurden Proben mit schrittweise reduzierten Zellzahlen hergestellt, aus denen RNA extrahiert wurde. Die Variabilität der Ergebnisse ist nicht nur durch den Samplingeffekt der sehr geringen, für die Amplifikation vorhandenen Transkriptanzahl bedingt, sondern auch durch die geringen Zellzahlen und damit die bei RNA-Extraktion entstehenden Verluste. Außerdem wurde aus Proben mit variabler Anzahl BCR-ABL-exprimierender Zellen und großer Anzahl von Non-CML-Zellen RNA extrahiert und amplifiziert, sodass geringe Zellzahlen nicht der limitierende Faktor waren. Jedoch war für reproduzierbare RT-PCR-Amplifizierungen von geringen sowohl absoluten als auch relativen BCR-ABL+ Zellen cDNA von mindestens 100-200 CML-Zellen notwendig [94].

Die Hypothese der ruhenden, nicht BCR-ABL-exprimierenden Ph+ Stammzellen, die einer Detektion der BCR-ABL-Transkripte entgehen könnten, wird im folgenden Abschnitt diskutiert.

#### **4.7. Dormant stem cells**

Hoch sensitive diagnostische Methoden haben die Frage aufgeworfen, ob es so etwas wie „schlafende“ Tumorzellen gibt. Diese Zellen könnten sich in der G<sub>0</sub>-Phase bzw. im Zellzyklusarrest befinden oder aber es besteht ein Gleichgewicht zwischen Proliferation und Apoptose. *Dormant stem cells*, auch ruhende Tumorzellen genannt, muss man von Vorstadien der Tumorzellen unterscheiden, denen die genetische, zur Neoplasie führende Komponente (noch) fehlt.

Schwierig ist ebenso die Differenzierung zwischen sich im Ruhezustand befindenden Zellen, präexistierender Erkrankung und minimaler Resterkrankung.

Mit Einführung von Imatinib in die Therapie der CML kam die Frage der Wirksamkeit des Tyrosinkinaseinhibitors gegenüber diesen ruhenden Ph+, nicht BCR-ABL-exprimierenden Zellen auf. Das In-vivo-Purging mit G-CSF unter laufender antileukämischer Therapie könnte bislang nicht proliferierende Stammzellen

mobilisieren und damit möglicherweise einen therapeutischen Effekt durch Imatinib hervorrufen. Mittels quantitativer und qualitativer PCR konnte tatsächlich bei 4 unserer Patienten eine verminderte BCR-ABL-Transkriptzahl erzielt werden.

#### **4.8. Ausblick**

Die Einführung des Tyrosinkinaseinhibitors Imatinib als spezifisch gegen die Leukämiezelle gerichtete Therapie („targeted therapy“) hat die Ergebnisse in der Behandlung der CML hochsignifikant verbessert. Dennoch kommt es vor allem bei Patienten mit längerer Erkrankungsdauer zum Auftreten von Resistenzen. Dabei ist die frühzeitige Diagnose mit Therapieoptimierung entscheidend. Fortschritte im Monitoring der Patienten mit optimaler Risikostratifizierung und Therapieempfehlung könnten die Therapieergebnisse weiter verbessern. Zudem stellt die Optimierung der zielgerichteten Therapie einen weiteren wichtigen Forschungsschwerpunkt dar. Das Potential autologer Stammzellsammlungen bei Patienten in CCR unter antileukämischer Therapie und das der im Falle eines Progresses der Erkrankung durchführbaren autoHSCT mit möglicher hämatologischer oder zytogenetischer Remission sollte durch weitere Studien evaluiert werden.

## 5. Zusammenfassung

Die CML ist eine klonale Neoplasie der Hämatopoese, für die eine spezifische Chromosomen-Anomalie, das Philadelphia-Chromosom, charakteristisch ist. Das Philadelphia-Chromosom bildet durch reziproke Translokation der Chromosomen 9 und 22,  $t(9;22)(q34;q11)$ , das BCR-ABL-Gen, durch welches das Fusionsprotein  $p210^{BCR-ABL}$  generiert wird.  $p210^{BCR-ABL}$  hat eine erhöhte und deregulierte Tyrosinkinaseaktivität, die zu gesteigerter Proliferation, reduziertem natürlichen Zelltod und verminderter Adhäsion der leukämischen Zellen am Knochenmarkstroma führt. Imatinib, ein 2-Phenylaminopyrimidinderivat, inhibiert selektiv die BCR-ABL-Tyrosinkinase, indem es kompetitiv die ATP-Bindungsstelle der Tyrosinkinase bindet. Der Tyrosinkinaseinhibitor verursacht dadurch in BCR-ABL+ Zellen einen Proliferationsstopp und die Reinduktion des programmierten Zelltodes. Die neuesten Daten der IRIS-Studie zeigen nach einer Beobachtungszeit von 60 Monaten zytogenetische Ansprechraten von 92% im Sinne eines MCR und von 87% mit CCR. Die herausragenden Remissionsraten haben die Prognose und das Therapiemanagement von CML-Patienten entscheidend beeinflusst. Dennoch können Resistenzen gegenüber Imatinib zum Rezidiv der Erkrankung führen.

Die vorliegende Promotionsarbeit beschäftigt sich mit den therapeutischen Möglichkeiten, die sich durch Imatinib in Verbindung mit autoHSCT ergeben könnten. Dazu wurden im Zeitraum von 3 Jahren 18 CML-Patienten mit CCR über mehr als 6 Monate zur Separation CD34+ Zellen mit Filgrastim mobilisiert, ohne dabei die Therapie mit Imatinib zu unterbrechen. Während der Therapie und Mobilisation wurden sowohl Blut- und Knochenmarksproben als auch die Stammzellapheresate zytogenetisch und molekulargenetisch untersucht.

Es wurden 8 Frauen und 10 Männer analysiert. 15 Patienten befanden sich initial in CP, 3 Patienten in AP. Die mittlere Erkrankungsdauer vor autoHSCT betrug 40,6 Monate (Range: 8-91 Monate), die mittlere Dauer der Imatinibtherapie bis zur Separation 16,2 Monate (Range: 6-27 Monate). Patienten in CP erhielten täglich 400 mg Imatinib, Patienten in AP 600 mg. Die Mobilisation erfolgte mit 2-mal täglich 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  KG Filgrastim s.c. unter kontinuierlicher Imatinibtherapie. Mindestens  $2,0 \times 10^6/\text{kg}$  KG CD34+ Zellen wurden als erfolgreiche Apherese definiert.

Die mittlere Anzahl peripherer CD34+ Zellen nach Mobilisation lag bei  $2,8 \times 10^6/\text{kg}$  KG (Range:  $0,7-4,9 \times 10^6/\text{kg}$  KG). Bei 2 Patienten erfolgte aufgrund einer zu geringen

Anzahl der im peripheren Blut zirkulierenden CD34+ Zellen keine Stammzellsammlung. Bei 4 Patienten wurden weniger als  $2,0 \times 10^6/\text{kg}$  KG CD34+ Zellen gesammelt. Erfolgreich verlief die Apherese bei 12 Patienten (67%). Durchschnittlich konnten  $3,2 \times 10^6/\text{kg}$  KG CD34+ Zellen (Range:  $2,0-4,9 \times 10^6/\text{kg}$  KG) gesammelt werden. 21 Proben der Apheresate von insgesamt 14 Patienten wurden molekulargenetisch analysiert. In der quantitativen PCR waren alle Proben BCR-ABL-negativ. Die qualitative konventionelle PCR war bis auf eine Probe ebenso BCR-ABL-negativ. 12 Proben (57%) waren auch in der nested PCR BCR-ABL-negativ. Insgesamt konnten von 7 Patienten BCR-ABL-negative CD34+ Zellen gesammelt werden. Der Vergleich der BCR-ABL-Ratio der Blut- und Knochenmarkproben vor und 1-2 Monate nach SCM zeigte keine statistisch signifikante Änderung im Wilcoxon-Test. Die Ergebnisse der qualitativen PCR waren bei 12 Patienten unverändert. Bei 2 Patienten zeigte sich eine Zunahme der BCR-ABL-PCR-Produkte, bei 2 Patienten war die nested PCR nach SCM BCR-ABL-negativ.

Die vorliegende Arbeit demonstriert die Sicherheit und Effizienz autologer Stammzellsammlungen unter Imatinibtherapie bei CML-Patienten in CCR. Es konnten bei 12 Patienten erfolgreich Stammzellapheresate gesammelt werden. Bei 7 Patienten waren diese sogar BCR-ABL-negativ, was für ein erfolgreiches In-vivo-Purging sprechen könnte. Das Auftreten von durch Resistenzen bedingten Rezidiven erfordert die weitere frühzeitige Therapieoptimierung. Autologe Stammzellsammlungen und –transplantation könnten eine alternative, vorübergehende Therapieoption beim Auftreten von Rezidiven darstellen.

## 6. Literaturverzeichnis

- [1] Virchow, R. (1845): Weisses Blut, *Fropiens Notizen* 36, Seite 151-156.
- [2] Bennett, J.H. Case of hypertrophy of the spleen and liver, in which death took place from suppuration of the blood, *Edinburgh Med Surg J* 1845; 64:413-423.
- [3] Fialkow, P. J.; Jacobson, R. J. und Papayannopoulou, T. Chronic myelocytic leukemia: clonal origin in a stem cell common to the granulocyte, erythrocyte, platelet and monocyte/macrophage, *Am J Med* 1977; 63,1:125-30.
- [4] Boice, J. D., Jr.; Day, N. E.; Andersen, A., et al. Second cancers following radiation treatment for cervical cancer. An international collaboration among cancer registries, *J Natl Cancer Inst* 1985; 74,5:955-75.
- [5] Ichimaru, M.; Ishimaru, T. und Belsky, J. L. Incidence of leukemia in atomic bomb survivors belonging to a fixed cohort in Hiroshima and Nagasaki, 1950--71. Radiation dose, years after exposure, age at exposure, and type of leukemia, *J Radiat Res (Tokyo)* 1978; 19,3:262-82.
- [6] Nowell, P., Hungerford, D. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukaemia, *Science* 1960; 132:1497.
- [7] Rowley, J. D. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining, *Nature* 1973; 243,5405:290-3.
- [8] Dreazen, O.; Klisak, I.; Rassool, F., et al. Do oncogenes determine clinical features in chronic myeloid leukaemia? *Lancet* 1987; 1,8547:1402-5.
- [9] Baccarani, M.; Saglio, G.; Goldman, J., et al. Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet, *Blood* 2006; 108,6:1809-20.
- [10] Sawyers, C. L.; Hochhaus, A.; Feldman, E., et al. Imatinib induces hematologic and cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in myeloid blast crisis: results of a phase II study, *Blood* 2002; 99,10:3530-9.
- [11] Cervantes, F.; Villamor, N.; Esteve, J., et al. 'Lymphoid' blast crisis of chronic myeloid leukaemia is associated with distinct clinicohaematological features, *Br J Haematol* 1998; 100,1:123-8.
- [12] Jacobs, P. und Greaves, M. Ph1-positive T lymphoblastic transformation, *Leuk Res* 1984; 8,4:737-9.
- [13] Kantarjian, H. M.; O'Brien, S.; Anderlini, P. und Talpaz, M. Treatment of myelogenous leukemia: current status and investigational options, *Blood* 1996; 87,8:3069-81.
- [14] de Klein, A.; van Kessel, A. G.; Grosveld, G., et al. A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia, *Nature* 1982; 300,5894:765-7.
- [15] Advani, A. S. und Pendergast, A. M. Bcr-Abl variants: biological and clinical aspects, *Leuk Res* 2002; 26,8:713-20.
- [16] Maurer, J.; Janssen, J. W.; Thiel, E., et al. Detection of chimeric BCR-ABL genes in acute lymphoblastic leukaemia by the polymerase chain reaction, *Lancet* 1991; 337,8749:1055-8.
- [17] Mughal, T. I. und Goldman, J. M. Chronic myeloid leukaemia. STI 571 magnifies the therapeutic dilemma, *Eur J Cancer* 2001; 37,5:561-8.
- [18] Goldman, J. M. und Melo, J. V. Chronic myeloid leukemia--advances in biology and new approaches to treatment, *N Engl J Med* 2003; 349,15:1451-64.
- [19] Clarkson, B.; Strife, A.; Wisniewski, D.; Lambek, C. L. und Liu, C. Chronic myelogenous leukemia as a paradigm of early cancer and possible curative strategies, *Leukemia* 2003; 17,7:1211-62.
- [20] van Rhee, F.; Lin, F.; Cullis, J. O., et al. Relapse of chronic myeloid leukemia after allogeneic bone marrow transplant: the case for giving donor leukocyte transfusions before the onset of hematologic relapse, *Blood* 1994; 83,11:3377-83.
- [21] Elmaagacli, A. H.; Freist, A.; Hahn, M., et al. Estimating the relapse stage in chronic myeloid leukaemia patients after allogeneic stem cell transplantation by the amount of BCR-ABL fusion transcripts detected using a new real-time polymerase chain reaction method, *Br J Haematol* 2001; 113,4:1072-5.
- [22] Hehlmann, R.; Heimpel, H.; Hasford, J., et al. Randomized comparison of busulfan and hydroxyurea in chronic myelogenous leukemia: prolongation of survival by hydroxyurea. The German CML Study Group, *Blood* 1993; 82,2:398-407.

- [23] (1994): Interferon alfa-2a as compared with conventional chemotherapy for the treatment of chronic myeloid leukemia. The Italian Cooperative Study Group on Chronic Myeloid Leukemia, *N Engl J Med* (Mar 24), Seite 820-5.
- [24] Interferon alfa versus chemotherapy for chronic myeloid leukemia: a meta-analysis of seven randomized trials: Chronic Myeloid Leukemia Trialists' Collaborative Group, *J Natl Cancer Inst* 1997; 89,21:1616-20.
- [25] Hasford, J.; Pffirmann, M.; Hehlmann, R., et al. A new prognostic score for survival of patients with chronic myeloid leukemia treated with interferon alfa. Writing Committee for the Collaborative CML Prognostic Factors Project Group, *J Natl Cancer Inst* 1998; 90,11:850-8.
- [26] Hasford, J.; Pffirmann, M.; Hehlmann, R., et al. Prognosis and prognostic factors for patients with chronic myeloid leukemia: nontransplant therapy, *Semin Hematol* 2003; 40,1:4-12.
- [27] Hehlmann, R.; Heimpel, H.; Hasford, J., et al. Randomized comparison of interferon-alpha with busulfan and hydroxyurea in chronic myelogenous leukemia. The German CML Study Group, *Blood* 1994; 84,12:4064-77.
- [28] Ohnishi, K.; Ohno, R.; Tomonaga, M., et al. A randomized trial comparing interferon-alpha with busulfan for newly diagnosed chronic myelogenous leukemia in chronic phase, *Blood* 1995; 86,3:906-16.
- [29] Guilhot, F.; Chastang, C.; Michallet, M., et al. Interferon alfa-2b combined with cytarabine versus interferon alone in chronic myelogenous leukemia. French Chronic Myeloid Leukemia Study Group, *N Engl J Med* 1997; 337,4:223-9.
- [30] Simonsson, B.; Oberg, G.; Bjoreman, M., et al. Intensive treatment and stem cell transplantation in chronic myelogenous leukemia: long-term follow-up, *Acta Haematol* 2005; 113,3:155-62.
- [31] Gratwohl, A.; Hermans, J.; Goldman, J. M., et al. Risk assessment for patients with chronic myeloid leukaemia before allogeneic blood or marrow transplantation. Chronic Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation, *Lancet* 1998; 352,9134:1087-92.
- [32] Gratwohl, A.; Brand, R.; Apperley, J., et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia in Europe 2006: transplant activity, long-term data and current results. An analysis by the Chronic Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT), *Haematologica* 2006; 91,4:513-21.
- [33] Kolb, H. J.; Schattenberg, A.; Goldman, J. M., et al. Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients, *Blood* 1995; 86,5:2041-50.
- [34] Elmaagacli, A. H.; Beelen, D. W. und Schaefer, U. W. A retrospective single centre study of the outcome of five different therapy approaches in 48 patients with relapse of chronic myelogenous leukemia after allogeneic bone marrow transplantation, *Bone Marrow Transplant* 1997; 20,12:1045-55.
- [35] Buckner, C. D.; Stewart, P.; Clift, R. A., et al. Treatment of blastic transformation of chronic granulocytic leukemia by chemotherapy, total body irradiation and infusion of cryopreserved autologous marrow, *Exp Hematol* 1978; 6,1:96-109.
- [36] Goldman, J. M.; Th'ng, K. H.; Park, D. S., et al. Collection, cryopreservation and subsequent viability of haemopoietic stem cells intended for treatment of chronic granulocytic leukaemia in blast-cell transformation, *Br J Haematol* 1978; 40,2:185-95.
- [37] Olavarria, E.; Parker, S.; Craddock, C., et al. Collection of Ph-negative progenitor cells from interferon responsive patients with chronic myeloid leukemia: effect of granulocyte-colony-stimulating factor mobilization, *Haematologica* 2000; 85,6:647-52.
- [38] Hernandez-Boluda, J. C.; Carreras, E.; Cervantes, F., et al. Collection of Philadelphia-negative stem cells using recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in chronic myeloid leukemia patients treated with alpha-interferon, *Haematologica* 2002; 87,1:17-22.
- [39] Gewirtz, A. M. Potential therapeutic applications of antisense oligodeoxynucleotides in the treatment of chronic myelogenous leukemia, *Leuk Lymphoma* 1993; 11 Suppl 1:131-7.
- [40] Haines, M. E.; Goldman, J. M.; Worsley, A. M., et al. Chemotherapy and autografting for chronic granulocytic leukaemia in transformation: probable prolongation of survival for some patients, *Br J Haematol* 1984; 58,4:711-21.
- [41] Butturini, A.; Keating, A.; Goldman, J. und Gale, R. P. Autotransplants in chronic myelogenous leukaemia: strategies and results, *Lancet* 1990; 335,8700:1255-8.
- [42] Reiffers, J.; Trouette, R.; Marit, G., et al. Autologous blood stem cell transplantation for chronic granulocytic leukaemia in transformation: a report of 47 cases, *Br J Haematol* 1991; 77,3:339-

45.

- [43] Reiffers, J.; Mahon, F. X.; Boiron, J. M., et al. Autografting in chronic myeloid leukemia: an overview, *Leukemia* 1996; 10,3:385-8.
- [44] Pigneux, A.; Faberes, C.; Boiron, J. M., et al. Autologous stem cell transplantation in chronic myeloid leukemia: a single center experience, *Bone Marrow Transplant* 1999; 24,3:265-70.
- [45] Druker, B. J.; Tamura, S.; Buchdunger, E., et al. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells, *Nat Med* 1996; 2,5:561-6.
- [46] Buchdunger, E.; Zimmermann, J.; Mett, H., et al. Selective inhibition of the platelet-derived growth factor signal transduction pathway by a protein-tyrosine kinase inhibitor of the 2-phenylaminopyrimidine class, *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92,7:2558-62.
- [47] Gambacorti-Passerini, C.; le Coutre, P.; Mologni, L., et al. Inhibition of the ABL kinase activity blocks the proliferation of BCR/ABL+ leukemic cells and induces apoptosis, *Blood Cells Mol Dis* 1997; 23,3:380-94.
- [48] le Coutre, P.; Mologni, L.; Cleris, L., et al. In vivo eradication of human BCR/ABL-positive leukemia cells with an ABL kinase inhibitor, *J Natl Cancer Inst* 1999; 91,2:163-8.
- [49] Druker, B. J.; Talpaz, M.; Resta, D. J., et al. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia, *N Engl J Med* 2001; 344,14:1031-7.
- [50] Kantarjian, H.; Sawyers, C.; Hochhaus, A., et al. Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia, *N Engl J Med* 2002; 346,9:645-52.
- [51] Talpaz, M.; Silver, R. T.; Druker, B. J., et al. Imatinib induces durable hematologic and cytogenetic responses in patients with accelerated phase chronic myeloid leukemia: results of a phase 2 study, *Blood* 2002; 99,6:1928-37.
- [52] O'Brien, S. G.; Guilhot, F.; Larson, R. A., et al. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia, *N Engl J Med* 2003; 348,11:994-1004.
- [53] Druker, B. J.; Guilhot, F.; O'Brien, S. G., et al. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia, *N Engl J Med* 2006; 355,23:2408-17.
- [54] Hahn, E. A.; Glendenning, G. A.; Sorensen, M. V., et al. Quality of life in patients with newly diagnosed chronic phase chronic myeloid leukemia on imatinib versus interferon alfa plus low-dose cytarabine: results from the IRIS Study, *J Clin Oncol* 2003; 21,11:2138-46.
- [55] Hughes, T., Kaeda, J., Branford, S. Molecular responses to imatinib (STI571) or interferon + Ara-C as initial therapy for CML: Results of the IRIS study, *Blood* 2002; 99(suppl 1, abstr 345).
- [56] Lin, F., Drummond, M., Byrne, J. et al. Molecular monitoring of complete cytogenetic responders following treatment with imatinib (STI571): A report from the UKSTI study group., *Blood* 2002,suppl 1, abstr 1425.
- [57] Baccarani, M.; Saglio, G.; Goldman, J., et al. Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia. Recommendations from an expert panel on behalf of the European Leukemianet, *Blood* 2006.
- [58] Deininger, M. W.; Goldman, J. M.; Lydon, N. und Melo, J. V. The tyrosine kinase inhibitor CGP57148B selectively inhibits the growth of BCR-ABL-positive cells, *Blood* 1997; 90,9:3691-8.
- [59] le Coutre, P.; Tassi, E.; Varella-Garcia, M., et al. Induction of resistance to the Abelson inhibitor STI571 in human leukemic cells through gene amplification, *Blood* 2000; 95,5:1758-66.
- [60] Gorre, M. E.; Mohammed, M.; Ellwood, K., et al. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification, *Science* 2001; 293,5531:876-80.
- [61] Hochhaus, A.; Kreil, S.; Corbin, A. S., et al. Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (STI571) therapy, *Leukemia* 2002; 16,11:2190-6.
- [62] Mahon, F. X.; Belloc, F.; Lagarde, V., et al. MDR1 gene overexpression confers resistance to imatinib mesylate in leukemia cell line models, *Blood* 2003; 101,6:2368-73.
- [63] Gambacorti-Passerini, C.; Barni, R.; le Coutre, P., et al. Role of alpha1 acid glycoprotein in the in vivo resistance of human BCR-ABL(+) leukemic cells to the abl inhibitor STI571, *J Natl Cancer Inst* 2000; 92,20:1641-50.
- [64] Gambacorti-Passerini, C.; Zucchetti, M.; Russo, D., et al. Alpha1 acid glycoprotein binds to imatinib (STI571) and substantially alters its pharmacokinetics in chronic myeloid leukemia patients, *Clin Cancer Res* 2003; 9,2:625-32.
- [65] Mughal, T.; Hoyle, C. und Goldman, J. M. Autografting for patients with chronic myeloid leukemia-

- the Hammersmith experience, *Stem Cells* 1993; 11 Suppl 3:20-2.
- [66] McGlave, P. B.; De Fabritiis, P.; Deisseroth, A., et al. Autologous transplants for chronic myelogenous leukaemia: results from eight transplant groups, *Lancet* 1994; 343,8911:1486-8.
- [67] Carella, A. M.; Beltrami, G. und Corsetti, M. T. Autografting in chronic myeloid leukemia, *Semin Hematol* 2003; 40,1:72-8.
- [68] Kreuzer, K. A.; Lass, U.; Landt, O., et al. Highly sensitive and specific fluorescence reverse transcription-PCR assay for the pseudogene-free detection of beta-actin transcripts as quantitative reference, *Clin Chem* 1999; 45,2:297-300.
- [69] Kreuzer, K. A.; Lass, U.; Bohn, A.; Landt, O. und Schmidt, C. A. LightCycler technology for the quantitation of bcr/abl fusion transcripts, *Cancer Res* 1999; 59,13:3171-4.
- [70] Hansen, J. A.; Gooley, T. A.; Martin, P. J., et al. Bone marrow transplants from unrelated donors for patients with chronic myeloid leukemia, *N Engl J Med* 1998; 338,14:962-8.
- [71] Bonifazi, F.; de Vivo, A.; Rosti, G., et al. Chronic myeloid leukemia and interferon-alpha: a study of complete cytogenetic responders, *Blood* 2001; 98,10:3074-81.
- [72] Sokal, J. E.; Cox, E. B.; Baccarani, M., et al. Prognostic discrimination in "good-risk" chronic granulocytic leukemia, *Blood* 1984; 63,4:789-99.
- [73] Merx, K.; Muller, M. C.; Kreil, S., et al. Early reduction of BCR-ABL mRNA transcript levels predicts cytogenetic response in chronic phase CML patients treated with imatinib after failure of interferon alpha, *Leukemia* 2002; 16,9:1579-83.
- [74] Kantarjian, H. M.; Talpaz, M.; Cortes, J., et al. Quantitative polymerase chain reaction monitoring of BCR-ABL during therapy with imatinib mesylate (STI571; gleevec) in chronic-phase chronic myelogenous leukemia, *Clin Cancer Res* 2003; 9,1:160-6.
- [75] Lange, T.; Bumm, T.; Otto, S., et al. Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction should not replace conventional cytogenetics for monitoring patients with chronic myeloid leukemia during early phase of imatinib therapy, *Haematologica* 2004; 89,1:49-57.
- [76] Wang, L.; Pearson, K.; Ferguson, J. E. und Clark, R. E. The early molecular response to imatinib predicts cytogenetic and clinical outcome in chronic myeloid leukaemia, *Br J Haematol* 2003; 120,6:990-9.
- [77] De Fabritiis, P.; Sandrelli, A.; Meloni, G., et al. Prolonged suppression of myeloid progenitor cell numbers after stopping interferon treatment for CML may necessitate delay in harvesting marrow cells for autografting, *Bone Marrow Transplant* 1990; 6,4:247-51.
- [78] Simonsson, B.; Oberg, G.; Bjoreman, M., et al. Intensive treatment in order to minimize the Ph-positive clone in CML. Danish-Swedish CML Group, *Bone Marrow Transplant* 1996; 17 Suppl 3:S63-4.
- [79] Carella, A. M.; Lerma, E.; Corsetti, M. T., et al. Autografting with philadelphia chromosome-negative mobilized hematopoietic progenitor cells in chronic myelogenous leukemia, *Blood* 1999; 93,5:1534-9.
- [80] Keil, F.; Mitterbauer, G.; Chen, X., et al. PBPC mobilization with chemotherapy and G-CSF in patients with chronic myeloid leukemia: quantification of bcr/abl-positive cells by interphase fluorescence in situ hybridization and competitive PCR, *Transfusion* 2001; 41,1:111-6.
- [81] Chalmers, E. A.; Franklin, I. M.; Kelsey, S. M., et al. Treatment of chronic myeloid leukaemia in first chronic phase with idarubicin and cytarabine: mobilization of Philadelphia-negative peripheral blood stem cells, *Br J Haematol* 1997; 96,3:627-34.
- [82] Carella, A. und Frassoni, F. ICE, mini-ICE or high-dose hydroxyurea to mobilize Philadelphia (Ph1)-negative PBPC in chronic myelogenous leukaemia., *Br J Haematol* 1996; 95:213-5.
- [83] Hess, G.; Reifenrath, C.; Friedrich-Freksa, A., et al. Autologous transplantation of in vivo purged PBSC in CML: comparison of FISH, cytogenetics, and PCR detection of Philadelphia chromosome in leukapheresis products, *Cancer Genet Cytogenet* 2000; 117,1:1-8.
- [84] Carrasco, M.; Sureda, A.; Martinez, C., et al. Prognostic factors influencing feasibility of cytogenetic and molecular analysis in leukapheresis products in chronic myelogenous leukemia patients, *Ann Hematol* 2002; 81,12:710-6.
- [85] Hui, C. H.; Goh, K. Y.; White, D., et al. Successful peripheral blood stem cell mobilisation with filgrastim in patients with chronic myeloid leukaemia achieving complete cytogenetic response with imatinib, without increasing disease burden as measured by quantitative real-time PCR, *Leukemia* 2003; 17,5:821-8.
- [86] Carella, A. M.; Cunningham, I.; Lerma, E., et al. Mobilization and transplantation of Philadelphia-

- negative peripheral-blood progenitor cells early in chronic myelogenous leukemia, *J Clin Oncol* 1997; 15,4:1575-82.
- [87] Corsetti, M. T.; Lerma, E.; Dejana, A., et al. Quantitative competitive reverse transcriptase-polymerase chain reaction for BCR-ABL on Philadelphia-negative leukaphereses allows the selection of low-contaminated peripheral blood progenitor cells for autografting in chronic myelogenous leukemia, *Leukemia* 1999; 13,7:999-1008.
- [88] le Coutre, P.; Kreuzer, K. A.; Massenkeil, G., et al. Autologous peripheral blood stem cell transplantation of stem cells harvested in imatinib-induced complete cytogenetic remission: an example of in vivo purging in CML, *Leukemia* 2003; 17,12:2525-6.
- [89] Fischer, T. [Results up to now of administration of STI-571 (Glivec) in recurrence after allogenic and autologous stem cell transplantation in chronic myeloid leukemia], *Med Klin (Munich)* 2002; 97 Suppl 1:22-7.
- [90] Cross, N.C.; Feng, L.; Chase, A., et al. Competitive polymerase chain reaction to estimate the number of BCR-ABL transcripts in chronic myeloid leukemia patients after bone marrow transplantation., *Blood* 1993; 82,6:1929-36.
- [91] Biernaux, C.; Sels, A.; Huez, G. und Stryckmans, P. Very low level of major BCR-ABL expression in blood of some healthy individuals., *Bone Marrow Transplant* 1996; 17(Suppl. 3):S45-S47.
- [92] Bose, S.; Deininger, M.; Gora-Tybor, J.; Goldman, J.M. und Melo, J.V. The presence of typical and atypical BCR-ABL fusion genes in leukocytes of normal individuals: biologic significance and implications for the assessment of minimal residual disease., *Blood* 1998; 92,9:3362-3367.
- [93] Hughes, T.; Deininger, M.; Hochhaus, A., et al. Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results, *Blood* 2006; 108,1:28-37.
- [94] Melo, J. V.; Yan, X. H.; Diamond, J., et al. Reverse transcription/polymerase chain reaction (RT/PCR) amplification of very small numbers of transcripts: the risk in misinterpreting negative results, *Leukemia* 1996; 10,7:1217-21.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

ABL	Abelson leukemia virus
ACT	Referenzgen $\beta$ -Aktin
alloHSCT	allogene Stammzelltransplantation (allogeneic haemopoietic stem cell transplantation)
ALP	Alkalische Leukozytenphosphatase
AP	Akzelerationsphase, akzelerierte Phase
Ara-C	Cytosin-Arabinosid
ATP	Adenosintriphosphat
autoHSCT	autologe Stammzelltransplantation (autolog haemopoietic stem cell transplantation)
AZ-Verschlechterung	Allgemeinzustandsverschlechterung
BC	Blastenkrise, Blastenschub
BCR	breakpoint cluster region
BCR-ABL+	BCR-ABL-positiv
BMSCT	bone marrow stem cell transplantation
CCR	komplette zytogenetische Remission (complete cytogenetic response)
CML	chronische myeloische Leukämie
CP	chronische Phase
G-CSF	Granulocyte-colony Stimulating
GvHD	Graft-versus-Host-Disease
GvL	Graft-versus-Leukemia
HU	Hydroxyurea
IFN- $\alpha$	Interferon alpha
kDa	Kilodalton (Einheit Molekulargewicht)
KG	Körpergewicht
LDH	Laktatdehydrogenase
MCR	partielle zytogenetische Remission (major cytogenetic response)
MDR1-Gen	multidrug resistance gene
MNC	mononukleäre Zellen
MR	molekulare Remission

MRD	minimale Resterkrankung (minimal residual disease)
n.a.	keine Probe vorhanden (not available)
OH	Hydroxyl-Gruppe
OT	Objektträger
p210 <sup>BCR-ABL</sup>	Fusionsprotein des BCR-ABL-Gens mit einem Molekulargewicht von 210 kDa
PCR	Polymerasekettenreaktion
PBSCT	peripheral blood stem cell transplantation
Ph+	Philadelphia-Chromosom-positiv
RI	relapse incidence
RNA	Ribonukleinsäure
RT	reverse Transkription
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
SCM	Stammzellmobilisierung
TRM	transplant related mortality

## 8. Anhang

### *Primer:*

#### *Nested PCR:*

**B2a:** 5' - TTC AgA AgC TTC TCC CTg gCA TCC gT

**abl3:** 5' - ggT ACC Agg AgT gTT TCT CCA gAC Tg

**Bcr:** 5' - gTC CAC AgC ATT CCg CTg ACC ATC AAT

**Ca3:** 5' - TgT TgA CTg gCg TgA TgT AgT TgC TTg g

#### *LightCycler:*

**PS  $\beta$ -act as:** 5' - CTg gTg CCT ggg gCg

**RS 3  $\beta$ -act:** 5' - AgC CTC gCC TTT gCC gA

**Abl3(78):** 5' - g CgT gAT gTA gTT gCT Tgg gAC

**B2a2:** 5' - AgC ATT CCg CTg ACC ATC A

**Sonden:** X= TAMRA

**QT  $\beta$ -act:** 5' - 6FAM-CCg CCg CCC gTC CAC ACC CgC C XT p

**TM abl3:** 5' - 6FAM-TTT ggg CT XT CAC ACC ATT CCC CAT Tg p

#### *Klonierung:*

Sequenz von pmaac:

AGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGGTTGGCCGATTCAATTAATGCAGCTGGCACGA  
CAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATT  
AGGCACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAA  
CAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCAC  
TAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGCCCTT**GCGTGATGTAGTTGCTTGGGAC**CCAGCCT  
TGGCCATTTTTGGTTTGGGCTTCACACCATTCCCATTGTGATTATAGCCTAAGACCCGGAGCTTT  
TCACCTTTAGTTATGCTTAGAGTGTTATCTCCACTGGCCACAAAATCATAACAGTGAACGAAAAGG  
TTGGGGTCATTTTACTGGGTCCAGCGAGAAGTTTTCTTGGAGTTCCAACGAGCGGCTTCACT  
CAGACCCTGAGGCTCAAAGTCAGATGCTACTGGCCGCTGAAGGGCTTTTGAACCTGCTTAAATC  
CAGTGGCTGAGTGGACGATGACATTAGAAACCCATAGAGCCCCGGAGACTCATCATCTTCCTTA  
**TTGATGGTCAGCGGAATGCT**AAGGGCGAATTCGCCCTT**CTGGTGCCTGGGGCG**CCCCACGATG  
GAGGGGAAGACGGCCCGGGGGGCATCGTCGCCCGGAAGCCGGCCTTACACATGCCGGAGCC  
GTTGTGACGACGAGCGCGGCGATATCATCATCCATGGTGTGAGCTGGCGGCGGGTGTGGACGGG  
CGGCGGAT**TCGGCAAAGGCGAGGCT**AAGGGCGAATTCGCCCTTGCAGATATCCATCACACTGGCGGCCG

CTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTGCGCCTATAGTGAGTCGTATTACAATCACTGGCCGT  
CGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGCAGCACATC  
CCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGGC  
CAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGGGGTGTGGTGGTT  
ACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTTCTTCCCTT  
CCTTTCTCGCCACGTTGCGCGGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTATAGGGTTC  
CGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGG  
GCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGAC  
TCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTGATTTATAAGGGATTTT  
GCCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAAACAA  
ATTCAGGGCGCAAGGGCTGCTAAAGGAAGCGGAACACGTAGAAAGCCAGTCCGCAGAAACGGT  
GCTGACCCCGGATGAATGTCAGCTACTGGGCTATCTGGACAAGGGAAAACGCAAGCGCAAAGAG  
AAAGCAGGTAGCTTGCAGTGGGCTTACATGGCGATAGCTAGACTGGGCGGTTTTATGGACAGCA  
AGCGAACCGGAATTGCCAGCTGGGGCGCCCTCTGGTAAGGTTGGGAAGCCCTGCAAAGTAACT  
GGATGGCTTTCTTGCCGCCAAGGATCTGATGGCGCAGGGGATCAAGATCTGATCAAGAGACAGG  
ATGAGGATCGTTTCGCATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTG  
GAGAGGCTATTCCGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCC  
GGCTGTCAGCGCAGGGGCGCCCGGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGA  
ACTGCAGGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCTTGGCAGCTGT  
GCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGA  
TCTCCTGTCATCCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGC  
TGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCATTGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGC  
ACGTA CTCCGATGGAAGCCGGTCTTGTGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTC  
GCGCCAGCCGAACTGTTCCGAGGCTCAAGGCGCGCATGCCCGACGGCGAGGATCTCGTCTGTG  
ACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTCATCGA  
CTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCT  
GAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCTCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATT  
CGCAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAATTGAAAAGGAAGAGTATGA  
GTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTTCGGCATTTCCTTCTGTTTTTGTCA  
CCCAGAAACGCTGGTGAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATC  
GAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCGAAGAACGTTTTTCCAATGAT  
GAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAAC  
TCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCAT  
CTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAACTGC  
GGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGG  
GGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGA  
GCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTA ACTGGCGAACTAC  
TACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTT  
CTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGT  
CTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACAC  
GACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTG

ATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTTCATTT  
TTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAATCCCTAACGTGAG  
TTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTT  
CTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCCCGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTTGCCGGA  
TCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTG  
TTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAAGTCTGTAGCACCGCCTACATACCTC  
GCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGG  
ACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACAC  
AGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAG  
CGCCACGCTTCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTTCGGAACAGG  
AGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCTGTCCGGTTTTCGC  
CACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACG  
CCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTG  
CGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGC  
AGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAG

## 9. Publikationsliste

Kreuzer, K. A.; Klühs, C.; Baskaynak, G.; Movassaghi, K.; Dörken, B.; le Coutre, P.: Filgrastim-induced stem cell mobilization in chronic myeloid leukaemia patients during imatinib therapy: safety, feasibility and evidence for an efficient in vivo purging, *Br J Haematol* 2004; 124,2:195-9.

Kreuzer, K. A.; Klühs, C.; Schwarz, M.; Dörken, B.; le Coutre, P.: Safety and efficacy of stem cell mobilization under imatinib therapy, *Haematologica* 2003; 88,10:1199-200.

## 10. Erklärung

„Ich, Christine Klühs, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema:

**Apherese von CD34-positiven Vorläuferzellen unter Imatinibmesylat  
bei Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie  
in kompletter zytogenetischer Remission:  
Ein Modell für erfolgreiches In-vivo-Purging**

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

## 11. Danksagung

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Bernd Dörken und bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von PD Dr. med. Philipp le Coutre und PD Dr. med. Karl-Anton Kreuzer.

Meinem Doktorvater PD Dr. med. Philipp le Coutre danke ich für die Vergabe dieses spannenden Themas und für die wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Gökben Koca, die während meiner ganzen Arbeit für mich da war, Katja Schultheis für die freundliche Unterstützung und Einarbeitung in die molekularbiologischen Labortechniken und Dipl. Ing. Joachim Lupberger für die Hilfe bei der Planung und Durchführung von Experimenten.

Auch möchte ich mich bei PD Dr. med. Karl-Anton Kreuzer, Dipl. biol. Christine Appelt, Dr. med. Matthias Holdhoff, Jutta Laser und Dipl. biol. Bärbel Pawlaczyk-Peter bedanken.

Für die hilfreiche Unterstützung und nette Betreuung während meiner Arbeit im Institut für Medizinische Genetik möchte ich Dr. med. Petra Zscheschang und Karin Lehmann danken.

Ich danke meiner Familie und meinen Freunden für ihre beständige Unterstützung und Anteilnahme während des Studiums und während der Doktorarbeit, insbesondere Robert Biesen für die Unterstützung bei der Umsetzung der Arbeit und Dr. med. Stephan Ruhla für die wertvolle Hilfe bei der Korrektur.

Schließlich möchte ich mich bei meinem Freund Felix Wiesjahn für die unermütlche Motivation und sein Verständnis bedanken.

## **12. Tabellarischer Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus Gründen des Datenschutzes in der elektronischen Fassung meiner Arbeit nicht veröffentlicht.