
1.	Inhaltsverzeichnis	1
2.	Zusammenfassung	3
3.	Tyrosinkinase als Signaltransduktoren	5
3.1.	Überblick über die Proteinkinase	5
3.2.	Tyrosinkinase	5
3.3.	Onkogene Tyrosinkinase	6
3.4.	Hemmung onkogener Tyrosinkinase als therapeutisches Konzept gezielter Therapiestrategie	7
4.	Die chronische myeloische Leukämie	9
4.1.	Definition	9
4.2.	Historische Aspekte	9
4.3.	Epidemiologie	10
4.4.	Klinik	10
4.4.1.	Symptome	10
4.4.2.	Typische Laborbefunde	11
4.4.3.	Stadieneinteilung	11
4.5.	Die Philadelphia Translokation - biologische Grundlagen	12
4.5.1.	Überblick	12
4.5.2.	Das BCR-ABL Fusionstranskript	13
4.5.3.	Das p210 ^{Bcr/Abl} Fusionsprotein	14
4.5.4.	Signaltransduktionswege	15
4.5.4.1.	Gesteigerte Zellproliferation	16
4.5.4.2.	Apoptosehemmung	16
4.5.4.3.	Veränderte Interaktion mit der extrazellulären Matrix	16
4.6.	Diagnostik	17
4.7.	Prognose	18
5.	Therapie der CML	19
5.1.	Überblick	19
5.2.	“Targeted Therapy” der CML – Imatinib	20
5.2.1.	Imatinib Wirkmechanismus und präklinische Daten	21
5.2.1.1.	In vivo eradication of human BCR/ABL-positive leukemia cells with an ABL kinase inhibitor	22
5.2.2.	Imatinib - klinische Studien	22
5.2.2.1.	Imatinib in Philadelphia Chromosome Positive Chronic Phase CML Patients: Molecular and Cytogenetic Response Rates and Prediction of Clinical Outcome	23
5.2.3.	Imatinib Resistenzmechanismen	23
5.2.3.1.	Induction of resistance to the Abelson inhibitor STI571 in	

	human leukemic cells through gene amplification	25
5.2.3.2.	Determination of α -1 Acid Glycoprotein in Patients with Ph+ Chronic Myeloid Leukemia during the first 13 Weeks of Therapy with STI571	25
5.2.4.	Imatinib Pharmakokinetik	25
5.2.4.1.	Pharmacokinetics and cellular uptake of imatinib and its main metabolite CGP74588	26
5.2.5.	In-vivo Purging mit Imatinib	26
5.2.5.1.	Filgrastim-induced stem cell mobilization in chronic myeloid leukaemia Patients during imatinib therapy: safety, feasibility and evidence for an efficient in vivo purging	27
5.2.5.2.	Autologous peripheral blood stem cell transplantation of stem cells harvested in imatinib-induced complete cytogenetic remission: an example of in vivo purging in CML	27
6.	Ausblick	28
7.	Literaturverzeichnis	29
8.	Danksagung	43
9.	Erklärung	44

2. Zusammenfassung

Das zunehmende Wissen über die zahlreichen zellulären Funktionen, die durch Proteinkinasen reguliert werden, führte in den vergangenen Jahrzehnten zur Entschlüsselung diverser Signaltransduktionskaskaden. Ein relevanter Teil dieser Proteinkinasen wird durch Tyrosinkinasen gebildet, die durch Phosphorylierung funktionell bedeutsamer Tyrosinreste aktiviert bzw. inaktiviert werden können.

Bei hämatologischen Malignomen sind deregulierte Tyrosinkinasen identifiziert worden, die zur Fehlfunktion einzelner Signaltransduktionskaskaden führen und somit eine grundlegende Bedeutung in der Entstehung malignen Wachstums erhalten können.

Aufgrund ihrer Bedeutung in der Pathogenese sind dysregulierte Tyrosinkinasen dadurch gleichzeitig Zielstrukturen spezifischer Therapieansätze.

Der auf den molekularen Mechanismen ihrer Entstehung beruhende Therapieansatz bei der chronischen myeloischen Leukämie (CML) ist paradigmatisch für diese Entwicklung. Der Identifikation einer reziproken chromosomalen Translokation (t(9;22)(q34;q11)), dem sogenannten Philadelphia Chromosom, bei nahezu allen Patienten mit CML, folgte die Entdeckung des Bcr-Abl Fusionstranskriptes bzw. des p210^{Bcr-Abl} Fusionsproteins, einer onkogenen Tyrosinkinase. Umfangreiche zellbiologische und tierexperimentelle Studien bewiesen die kausale Bedeutung der p210^{Bcr-Abl} Tyrosinkinase für die Leukämogenese der CML. Die konstitutiv gesteigerte Tyrosinkinaseaktivität mit der Eigenschaft der Autophosphorylierung ist ein entscheidendes Charakteristikum von p210^{Bcr-Abl}.

Typische Eigenschaften Philadelphia Chromosom positiver Zellen, wie eine gesteigerte Zellproliferation, die Hemmung der Apoptose oder auch eine veränderte Interaktion mit der extrazellulären Matrix sind durch p210^{Bcr-Abl} vermittelte Signaltransduktionswege verursacht.

Die ausschließliche Expression von p210^{Bcr-Abl} in CML-Zellen führte zur Entwicklung spezifischer, zielgerichteter Therapieansätze, die unter dem Begriff *targeted therapy* bekannt geworden sind. Der therapeutische Ansatz des Tyrosinkinaseinhibitors Imatinib hat zu einer drastischen Verbesserung der Therapie geführt.

In präklinischen Modellen konnte die Effektivität dieser Substanz in Bezug auf Hemmung der Proliferation und Rekonstitution der Apoptose bzw. die *in-vivo* Aktivität im Mausmodell gezeigt werden. Die sich anschließenden klinischen Studien erbrachten einen im Vergleich zur bisherigen Standardtherapie, bestehend aus Interferon- α haltigen Schemata, hochsignifikanten Vorteil bezüglich des Gesamtüberlebens, des progressionsfreien Überlebens, der Rate an zytogenetischen Remissionen sowie der Toxizität bei Patienten in der chronischen Phase der CML. Mittels quantitativer RT-PCR konnte bei Patienten in chronischer Phase ein anhaltender und signifikanter Abfall des Bcr-Abl Fusionstranskriptes beobachtet werden.

Die klinischen Ansprechraten bei Patienten in den fortgeschrittenen Krankheitsstadien zeigten zwar ein gegenüber bisherigen Therapieansätzen entweder gleichwertiges oder überlegenes Ansprechen in Bezug auf Gesamtüberleben, führten jedoch besonders in der Blastenkrise zu hämatologischen

Rezidiven in nahezu allen Patienten. In diesem Sinne stellen Untersuchungen zur Resistenzentstehung bzw. die Suche nach therapeutischen Ansätzen bei Patienten mit Therapieversagen auf Imatinib das Zentrum gegenwärtiger und zukünftiger Forschungsaktivitäten dar.

Bereits vor der Initiierung klinischer Studien wurde mit der Identifizierung möglicher Resistenzmechanismen begonnen. In Zellkulturmodellen konnte die Amplifikation der t(9;22) Translokation und die konsekutive Überexpression von p210^{Bcr-Abl} als ein Resistenzmechanismus identifiziert werden, der in der späteren klinischen Anwendung tatsächlich beobachtet wurde. Alternative Resistenzmechanismen die auf Zellkulturebene oder auch im Tiermodell beschrieben wurden, wie z.B. eine erhöhte Plasmaeiweißbindung bzw. die Überexpression des MDR-1 Genes wurden dagegen bislang in der klinischen Anwendung nicht beobachtet. Dagegen stellt das Auftreten von Punktmutationen im Bereich der Imatinib-Bindungsstelle einen Resistenzmechanismus mit signifikanter klinischer Relevanz dar.

Das Auftreten von Rezidiven aufgrund unterschiedlicher Resistenzmechanismen belegt die Notwendigkeit der Therapieoptimierung. Hierbei steht neben der Dosissteigerung, der Kombination mit bisherigen antileukämischen Substanzen und der Identifizierung von Hochrisikopatienten mit dem Ziel einer allogenen Stammzelltransplantation, die Entwicklung neuer Tyrosinkinaseinhibitoren im Vordergrund.

Eine zusätzliche alternative Therapieoptionen kann darüber hinaus auch die Sammlung CD34+ Stammzellen bei Patienten in kompletter zytogenetischer Remission, gegebenenfalls gefolgt von einer autologen Stammzelltransplantation, darstellen. In präliminären Ansätzen konnte hierbei die Durchführbarkeit einer kombinierten Gabe von G-CSF und Imatinib gezeigt werden.

3. Tyrosinkinasen als Signaltransduktoren

3.1. Überblick über die Proteinkinasen

Die wachsende Kenntnis über die Bedeutung von Proteinkinasen als essentieller Bestandteil zellbiologischer Signaltransduktion geht auf die in den fünfziger Jahren des vergangenen Jahrhunderts erstmals gemachte Beobachtung zurück, daß reversible Phosphorylierung die Enzymaktivität der Glykogenphosphorylase reguliert. Seit dieser Zeit haben intensive wissenschaftliche Bemühungen dazu geführt, das komplexe Netzwerk humaner Proteinkinasen, das sogenannte Kinom, weiter zu entschlüsseln.

Erst durch die Möglichkeiten der DNS-Klonierung und -Sequenzierung ergaben sich die methodischen Voraussetzungen eine komplette Erfassung und Klassifizierung aller Proteinkinasen anzustreben. Durch die konsequente Analyse des menschlichen Genom im Rahmen des *human genome project* konnte schließlich die Gesamtheit der humanen Proteinkinasen auf 518 beziffert werden, die durch ca. 1.7 % aller menschlichen Gene kodiert wird (Manning et al. 2002, Krupa and Srinivasan, 2002).

Proteinkinasen partizipieren durch Modifikation der Aktivität nachgeschalteter Substrate maßgeblich an der Vermittlung der Signaltransduktion bei grundlegenden eukaryoten Zellfunktionen wie Metabolismus, Transkription, Zellzyklusprogression, Zellmotilität, Apoptose und Zelldifferenzierung.

Die im Jahre 1995 erstellte Klassifikation von S.K. Hanks und T. Hunter unterteilte die Gesamtheit der Proteinkinasen in fünf Hauptgruppen, 44 Familien und 51 Subfamilien und wurde 2002 in einer revidierten Version erneut publiziert und um vier Hauptgruppen, 90 Familien und 145 Subfamilien erweitert (Manning et al. 2002, Hanks and Hunter, 1995). Die Kriterien dieser Klassifikation bestehen im Vergleich der Aminosäuresequenzen der jeweiligen katalytischen Domänen und anderer Proteindomänen sowie der biologischen Funktion.

Die sieben wichtigsten Hauptgruppen werden entsprechend der in ihnen vertretenen Familien als CAMK (*Calcium/calmodulin dependent protein kinase*), AGC (*Containing PKA, PKA, PKC families*), CK1 (*Casein kinase 1*), STE (*Homology of yeast Sterile 7, Sterile 11, Sterile 20 kinases*), CMGC (*Containing CDK, MAPK, GSK3, CLK families*), TKL (*Tyrosine Kinase like*) und TK (*Tyrosine Kinase*) bezeichnet. Insbesondere die letztgenannte Hauptgruppe, TK (*Tyrosine Kinase*), ist aufgrund ihrer Bedeutung im Kontext der malignen Transformation innerhalb der vergangenen Jahrzehnte intensiv erforscht worden.

3.2. Tyrosinkinasen

Insgesamt sind 90 Tyrosinkinasen bekannt, die sich in 58 Rezeptor Tyrosinkinasen (RTK) und 32 Nicht-Rezeptor Tyrosinkinasen (NRTK) unterteilen. Basierend auf den Aminosäuresequenzen ihrer extrazellulären und nichtkatalytischen Domänen werden RTKs und NRTKs in 20 bzw. 10 Subgruppen unterteilt.

Das aminoternale Ende der RTK bildet die extrazelluläre Bindungsstelle für den jeweiligen Liganden. Der transmembranöse Bereich besteht aus einer hydrophoben Helixstruktur. Der

intrazelluläre, zytoplasmatische Bereich besteht aus der konservierten Kinase-Region sowie zusätzlichen regulatorischen Sequenzen, die u.a. wesentliche carboxyterminale Tyrosinreste enthalten (Madhusudan and Ganesan, 2004).

Die Bindung des Liganden an die extrazelluläre Domäne resultiert in Dimerisierung oder Oligomerisierung des Rezeptors und konsekutiver, ATP-abhängiger, zytoplasmatischer Tyrosinkinaseaktivierung sowie Phosphorylierung von weiter carboxyterminal gelegenen Tyrosinresten. Diese autophosphorylierten Tyrosinreste dienen ihrerseits der Erkennung und Signalübermittlung an nachgeschaltete Substrate. Hierbei handelt es sich gehäuft um Proteine mit SH2 (*Src homology 2*) Domänen oder ebenfalls phosphotyrosinbindende Domänen. Auf diesem Wege kommt es zur Aktivierung bzw. Deaktivierung spezifischer Signalkaskaden, die durch Aneinanderreihung vieler signaltransduzierender Kinasen entstehen und schließlich spezifische Reaktionen im Nukleus, wie z.B. die Transkription einzelner Gene, verursachen.

NRTK verfügen ebenfalls über eine konservierte katalytische Domäne sowie die Fähigkeit zur aminoterminalen Bindung an spezifische Adaptermotive anderer Proteine. Tyrosinkinasen haben eine zentrale Stellung in der Regulation grundlegender biologischer Prozesse wie zelluläre Differenzierung, Proliferation, Wachstum, Apoptose, Adhäsion, Migration, Zellzykluskontrolle, Angiogenese und Transkription. Aufgrund der sich hieraus ergebenden dominierenden Rolle in der zellulären Homöostase liegt die Erforschung einzelner Tyrosinkinasekaskaden im Kontext hämatologischer und onkologischer Erkrankungen nahe (Madhusudan and Ganesan, 2004).

3.3. Onkogene Tyrosinkinasen

Tyrosinkinasen, sowohl RTK als auch NRTK, können durch unterschiedliche Mechanismen an der malignen Transformation und somit an der Entstehung und Progression hämatologischer oder onkologischer Erkrankungen beteiligt sein. Hierbei können fünf grundlegende Mechanismen voneinander abgegrenzt werden, die zu veränderter Tyrosinkinaseaktivität bzw. deregulierter Kontrolle nachfolgender Signaltransduktionskaskaden führen. Tyrosinkinasen können (1.) aufgrund einer Genamplifikation überexprimiert werden und durch gesteigerte Aktivität zu quantitativer und qualitativer Beeinträchtigung nachfolgender Signalwege führen. Ein typisches Beispiel ist die Überexpression von EGF-R (Epidermal Growth Factor Receptor) im Falle von Patienten mit Ovarial-, HNO-, Ösophagus-, Zervix-, Blasen-, Mamma-, Prostata-, Lungen, gastrointestinalen oder Knochentumoren mit ungünstiger Prognose (Nicholson et al. 2001, Tandon et al. 1989, Meden H et al. 1997, Sadasivan et al. 1993, Selvaggi et al. 2002, Zhou et al. 2003). Daneben kann es (2.) zu genetischen *rearrangements* auf dem Boden chromosomaler Translokationen kommen, wie z.B. im Falle des Npm-Alk Fusionsproteins bei Patienten mit großzellig anaplastischem Non-Hodgkin Lymphom (Morris et al. 1994). Ein weiterer Mechanismus (3.) ist die gesteigerte Tyrosinkinaseaktivität aufgrund aktivierender Mutationen in regulatorischen Domänen wie z.B. bei c-Kit im Zusammenhang mit gastrointestinalen Stromatumoren (GIST) (Taniguchi et al. 1999, Longley et al. 2001, Demetri et al. 2001). Unter der Entstehung einer sogenannten *autocrine loop* (4.)

versteht man die Überexpression eines physiologischen Liganden mit nachfolgender persistierender Rezeptortyrosinkinasestimulation wie beispielsweise bei einigen HNO-Tumoren (Grandis et al. 1998). Schließlich (5.) ist bei Nagern das Model der malignen Transformation nach retroviraler Transduktion eines Protoonkogen mit Tyrosinkinaseaktivität beschrieben worden (Blume-Jensen et al. 2001).

3.4. Hemmung onkogener Tyrosinkinasen als therapeutisches Konzept gezielter Therapiestrategie

Aufgrund der zentralen Rolle, die zumindest einige RTK und NRTK in der Pathogenese einzelner Malignome spielen, ist früh versucht worden, therapeutische Ansätze durch unterschiedliche Wege der Interaktion mit den betroffenen Signaltransduktionskaskaden zu realisieren. In Abgrenzung zur klassischen Chemotherapie, welche unspezifisch sich teilende Zellen eradiziert und dabei die grundsätzlich höhere Proliferationsrate maligner Zellen ausnutzt, wird bei der Hemmung onkogener Tyrosinkinasen versucht, unter Schonung der physiologischen Zellhomöostase, selektiv die maligne Zelle zu treffen. Dieser Begriff der sogenannten *targeted therapy* ist an vier Grundvoraussetzungen gebunden:

1. Die entsprechende Targetstruktur muss hauptsächlich in dem malignen Klon exprimiert sein und nicht auf physiologischen Zellen.
2. Die entsprechende Targetstruktur sollte in der betroffenen Krankheitsentität in einem hohen Anteil der betroffenen Patienten nachweisbar sein.
3. Die entsprechende Targetstruktur sollte für die biologische Integrität der malignen Zelle erforderlich sein.
4. Die entsprechende Targetstruktur darf für physiologische Zellen nur untergeordnete oder vernachlässigbare biologische Signifikanz haben.

Auf präklinischer Ebene wurden im Kontext von *targeted therapy* der Einsatz von Antisense-Nukleotiden, von monoklonalen Antikörpern bzw. von kleinen Molekülen (*small molecules*) erprobt. Der Einsatz von Antisense-Nukleotiden, also der Versuch mittels spezifischer Nukleotide, die durch komplementäre DNS- oder RNS-Bindung die Transkription spezifischer onkogener Targetsequenzen hemmen, ist bislang über das präklinische Stadium kaum herausgetreten. Der Einsatz monoklonaler Antikörper dagegen hat sich zu einem erfolgreichen Konzept entwickelt. Beispielsweise zeigen 25-30% der Patientinnen mit Mammakarzinom eine prognostisch ungünstige Überexpression der HER2 Rezeptortyrosinkinase. Im Rahmen einer randomisierten Studie konnte die Effektivität eines monoklonalen Antikörpers (Herceptin) gezeigt werden, der gegen die Ligand-Rezeptor Bindung gerichtet ist und in Kombination mit konventioneller Chemotherapie zu einem verlängerten Überleben führt (Slamon et al. 2001).

Der Einsatz kleiner Moleküle bezeichnet die Möglichkeit, katalytisch essentielle Domänen onkogener Tyrosinkinasen, beispielsweise durch kompetitive Verdrängung von ATP aus seiner Bindungsstelle,

zu hemmen und auf diesem Wege die Dissoziation spezifischer Signaltransduktionswege, die den malignen Phänotyp unterhalten, zu erreichen.

4. Die chronische myeloische Leukämie

4.1. Definition

Die chronische myeloische Leukämie (CML) ist eine monoklonale, hämatopoetische Stammzellneoplasie. Die Erkrankung ist durch die Tyrosinkinaseaktivität des onkogenen Fusionsproteins p210^{Bcr-Abl} verursacht, dessen Expression auf eine chromosomale Translokation, t(9;22)(q34;q11), dem Philadelphia Chromosom, zurückzuführen ist.

4.2. Historische Aspekte

Die CML wurde im Jahre 1845 von John H. Bennett und David Craigie in Edinburgh und wenige Monate später von Rudolf Virchow an der Charité in Berlin zum ersten Mal beschrieben (Bennett 1845, Virchow 1845). In beiden Fällen handelte es sich um Einzelfallberichte von Patienten mit Abgeschlagenheit und massiver Splenomegalie bzw. Fieber (Bennett 1845) und Epistaxis (Virchow 1845), die in kurzer Zeit verstarben. Autoptisch fielen beide Patienten durch Blutbildveränderungen auf, die Virchow später als „weisses Blut“, griechisch „Leukämie“ (λευκον αιμα), beschrieb (Virchow 1847). Im Gegensatz zu Bennett postulierte Virchow bereits eine nicht-infektiöse Genese der Erkrankung.

Das Knochenmark als Ort der Hämatopoese und der Leukämogenese geht u.a. auf autoptische Erkenntnisse von E. Neumann zurück (Neumann 1870). Erst die Einführung der Färbetechniken von Paul Ehrlich ermöglichte dann die weitere Klassifikation der Leukämien (Ehrlich 1891). Für die CML typische Blutbildveränderungen wie Zunahme der Granulopoese mit Linksverschiebung, Thrombozythämie, Eosinophilie und Basophilie wurden bis in die 20er Jahre des 20. Jahrhunderts erkannt. Der Zusammenhang zwischen Anstieg der Myeloblasten und Verschlechterung der Prognose wurde u.a. von A. Piney beobachtet und mündete später in die Identifizierung spezifischer Prognoseparameter (Piney 1931).

Ein entscheidender Meilenstein in der weiteren Erforschung der CML gelang 1960 P. Nowell und D.A. Hungerford durch die Beschreibung eines abnormalen, kleinen und akrozentrischen Chromosoms im peripheren Blut von sieben CML Patienten, das seitdem als Philadelphia Chromosom bezeichnet wird (Nowell et Hungerford 1960). Bereits in ihrer Erstveröffentlichung betonten die Autoren die Vermutung, daß es sich bei dem Philadelphia Chromosom nicht nur um ein spezifisches zytogenetisches Charakteristikum, sondern vielmehr auch um eine pathogenetisch relevante chromosomale Abberation handelt.

Janet Rowley gelang 1973 die weitere Entschlüsselung des Philadelphia Chromosom durch die Beobachtung, daß es sich um eine reziproke Translokation der langen Arme der Chromosomen 9 und 22 handelt, die zu der exakten Bezeichnung t(9;22)(q34;q11) führte (Rowley 1973). Anschließend wurden die an dieser Translokation beteiligten Gene ABL und BCR identifiziert (de Klein et al. 1982; Bartram et al. 1983; Groffen et al. 1984). Schließlich gelang 1986 der Nachweis eines 210 kD Proteins als Produkt des chimären BCR-ABL Gens (Ben-Neriah et al. 1986), das als p210^{Bcr-Abl} bezeichnet wird.

Von entscheidender Bedeutung für das heutige Verständnis des der CML zugrundeliegenden Pathomechanismus war die Entdeckung einer im Vergleich zu normalem Abl gesteigerten und deregulierten Tyrosinkinaseaktivität von p210^{Bcr-Abl} (Lugo et al 1990). Unterschiedliche Gruppen zeigten dann die Entstehung CML-ähnlicher Erkrankungen in Mäusen nach Transplantation mit BCR-ABL infizierten Retroviren, wodurch die pathogenetische Bedeutung des p210 Bcr-Abl Proteins bestätigt wurde (Daley et al. 1990, Heisterkamp et al. 1990, Elefanty et al 1990).

Zusammenfassend entstand gegen Ende des 20. Jahrhunderts eine ausreichende pathogenetische Charakterisierung der CML, die die Entwicklung gezielter bzw. selektiver Therapieansätze ermöglichte.

4.3. Epidemiologie

Die Inzidenz der CML beträgt etwa 1 – 1,5 / 100 000 (Deininger et al. 2003). In den USA beträgt die Inzidenz im Alter unter 40 Jahren 1 / 100 000 und steigt kontinuierlich auf 11/100 000 im Alter über 80 Jahren an (National Cancer Institute 1997). Das mediane Alter zum Diagnosezeitpunkt liegt etwa bei 60 Jahren. Das Verhältnis zwischen männlichen und weiblichen Patienten liegt bei 1 : 1,4.

Ein prädisponierender ethnischer oder geographischer Risikofaktor konnte bislang nicht identifiziert werden. Gleichmaßen konnte im Gegensatz zur akuten myeloischen Leukämie kein gesteigertes Risiko nach Exposition gegenüber organischen Lösungsmitteln beobachtet werden. Allerdings kam es nach den Atombombenkatastrophen in Hiroshima und Nagasaki zu einer gesteigerten Inzidenz in den betroffenen Bevölkerungsgruppen (Heyssel et al. 1960, Preston et al. 1994). Ebenfalls ist bei Patienten nach therapeutischer Strahlenexposition eine erhöhte Inzidenz beschrieben worden (Corso et al. 1995).

Diese Beobachtungen werden gestützt durch die experimentelle Induktion von BCR-ABL Transkripten nach in-vitro durchgeführter Gamma- und Neutronenbestrahlung an BCR-ABL-negativen Zelllinien (Deininger et al. 1998).

4.4. Klinik

4.4.1. Symptome

In über 50% der Patienten wird die Diagnose der CML im Rahmen einer Routineuntersuchung gestellt. Die Erkrankung kann demnach über lange Zeit symptomlos existieren. Häufige Symptome bei Erstdiagnose im Frühstadium der Erkrankung bestehen in Leistungsabfall (ca. 60%), Splenomegalie (ca. 72%), Hepatomegalie (ca. 49%), Organomegalie – assoziierte Symptome (ca. 33%), Gewichtsverlust (ca. 21%) und Fieber (ca. 6 %) (Hehlmann et al. 1994). In selteneren Fällen, besonders in fortgeschrittenen Krankheitsstadien, kommt es weiterhin zu hämorrhagischer Diathese, Infektionsneigung, Wundheilungsstörungen oder auch Priapismus. Cervantes et al. (1999) zeigten ein günstigeres klinisches Profil bei Patienten, die nach 1985 diagnostiziert wurden und führten diese Beobachtung auf den früheren Diagnosezeitpunkt aufgrund zunehmender Routineblutbilduntersuchungen zurück.

Generell kommt es mit Fortschreiten der Erkrankung gehäuft zur Zunahme der klinischen Symptome.

4.4.2. Typische Laborbefunde

Die Befunde des peripheren Blutausstrichs bestehen in einer häufig massiven Leukozytose mit Werten bis über $5 \times 10^5/\mu\text{l}$ mit der typischen Linksverschiebung im Differentialblut – also dem Nachweis granulozytärer Vorläuferformen bis zum Myeloblasten. Weitere Veränderungen des peripheren Blutes bestehen in Basophilie bzw. Eosinophilie. Im Gegensatz zur akuten myeloischen Leukämie ist die CML nicht auf das myeloische Zellkompartiment beschränkt, so daß es ebenfalls zu gelegentlich massiver Thrombozythämie mit Werten über $10^6/\mu\text{l}$ kommen kann. Trotz des Nachweis des BCR-ABL Fusionsgens auch in kernhaltigen erythrozytären Vorstufen ist eine Erythrozytose nur selten beobachtet worden.

Laborchemische Parameter sind unspezifisch und bestehen in LDH-Erhöhung, Erniedrigung der ALP (alkalische Leukozytenphosphatase) bzw. Hyperurikämie.

Im Knochenmark zeigt sich in den meisten Fällen ein hyperzelluläres Mark mit Verschiebung des Verhältnisses zwischen Granulopoese und Erythropoese (normal 3:1) zugunsten der Granulopoese (gelegentlich bis 10:1). Gleichzeitig kommt es auch hier zum Anstieg von Myeloblasten und Promyelozyten. Im weiteren Verlauf der Erkrankung kann es zur Myelofibrose mit Panzytopenie kommen.

4.4.3. Stadieneinteilung

Der Verlauf der CML ist triphasisch. Der überwiegende Anteil der Patienten wird in der Frühphase der Erkrankung, der chronischen Phase, diagnostiziert, die nach einer mittleren Dauer von ca. 4,5 Jahren in die akzelerierte Phase übergeht. Dieses Intermediärstadium mit einer Dauer von wenigen Wochen bis zu zwölf Monaten geht dann in die terminale Phase der CML, der Blastenkrise oder auch Blastenschub, über.

Sichere Kriterien zur Bestimmung des Krankheitsstadium sind Anteil der Blasten und Promyelozyten im peripheren Blut und Knochenmark, Anteil an Basophilen oder Eosinophilen im peripheren Blut, nicht therapiebedingte Thrombozytopenie, Thrombozytose, progrediente Splenomegalie, Anämie sowie zusätzlich zytogenetische Aberrationen neben dem Philadelphia Chromosom. Extramedulläre blastäre Infiltrate (Chlorome) außerhalb von Leber, Lymphknoten oder Milz gelten als beweisend für eine Blastenkrise. Unsichere Kriterien, die einen Krankheitsprogress anzeigen können sind zunehmender Bedarf antileukämischer Medikamente als Ausdruck einer zunehmenden Therapieresistenz, steigende Leukozytenzahlen, Anämie sowie Zunahme der klinischen Symptome.

Eine universell gültige Stadieneinteilung existiert zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht. Insbesondere die zytologischen und klinischen Kriterien zur Definition der akzelerierten Phase sind nicht einheitlich, was auf den kontinuierlichen und nicht schrittweisen Übergang von einem Stadium in das nächste hinweist.

Aus diesem Grunde steht die Stadieneinteilung der *World Health Organization* (WHO) neben denen des *Center for International Blood and Marrow Transplant Research* (CIBMTR) bzw. der deutschen CML-Studien-Gruppe.

Im Falle der WHO-Klassifikation besteht eine akzelerierte Phase entweder bei 10 – 19% Blasten im peripheren Blut oder Knochenmark oder bei mindestens 20% Basophilen im peripheren Blut oder persistierender, therapieresistenter Thrombozytose ($>1000 \times 10^9/l$) oder progredienter, therapieresistenter Splenomegalie oder Leukozytose oder bei klonaler Evolution, also zusätzlichen chromosomalen Aberrationen (Jaffe et al. 2001). Eine Blastenkrise liegt entsprechend dieser Klassifikation vor bei mindestens 20% Blasten im peripheren Blut oder Knochenmark oder bei extramedullärem Befall durch Blasten (Jaffe et al. 2001). Die chronische Phase definiert sich durch Ausschluß einer akzelerierten Phase bzw. eines Blastenschubes.

Ein Drittel der Patienten mit Blastenschub haben einen lymphatischen Phänotyp, während die restlichen zwei Drittel einen myeloischen oder undifferenzierten Phänotyp aufweisen (Griffin et al. 1983).

4.5. Die Philadelphia Translokation - biologische Grundlagen

4.5.1. Überblick

Das Philadelphia Chromosom ist in über 90% der Patienten mit CML zytogenetisch nachweisbar (Shepherd et al. 1995). In weiteren 5% der Patienten ohne zytogenetischen Nachweis der t(9;22) Translokation kann das BCR-ABL Fusionsgen mittels molekularbiologischer Methoden nachgewiesen werden. Bei den verbleibenden 5% BCR-ABL negativen Patienten wird die CML als „atypisch“ bezeichnet. Patienten mit atypischer CML sind durch einen klinisch ungünstigeren Verlauf gekennzeichnet, was die Vermutung einer separaten Krankheitsentität nahelegt.

Neben Patienten mit CML ist das Philadelphia Chromosom in ca. 20-40% der Patienten mit akuter lymphoblastischer Leukämie (ALL) und in wenigen Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) nachweisbar (Westbrook et al. 1992, Najfeld et al. 1989).

Aufgrund der Tatsache, daß in der Blastenkrise der CML Zellen mit unterschiedlichem Phänotyp dominieren können, liegt die Vermutung eines in Bezug auf die Differenzierung der hämatopoetischen Stammzelle frühen Auftretens des Philadelphia Chromosom nahe. Tatsächlich konnte das Philadelphia Chromosom sowohl in Vorläuferzellen aller drei Zellreihen nachgewiesen werden, obwohl es nur zur Expansion der granulozytären und gelegentlich thrombozytären Zellreihe kommt (Fialkow et al. 1967, Fialkow et al. 1977).

Aufgrund der Beobachtung, dass in Philadelphia Chromosom positiven Zellen von heterozygoten Trägerinnen der Gene für die Glukose-6-Phosphatdehydrogenase (G-6-PD) Isoenzyme ausschließlich eine Variante dieser Isoenzyme exprimiert wurde, gilt neben der Stammzellgenese die Klonalität der Erkrankung ebenfalls als gesichert (Fialkow et al. 1967, Fialkow et al. 1977).

Die der (9;22) Translokation vorausgehenden Vorgänge sind unbekannt. Von Interesse ist jedoch die Beobachtung einer relativ geringen räumlichen Entfernung der BCR und ABL Gene in

physiologischen humanen Lymphozyten und CD34 positiven Zellen (Kozubek et al. 1997, Neves et al. 1999).

4.5.2. Das BCR-ABL Fusionstranskript

Sowohl Hybridisierungsanalysen mit ABL-RNS-Proben als auch proteinchemische Experimente mit murinem Abl-Antiserum bewiesen die Beteiligung des physiologischen ABL-Gens an dem Fusionstranskript (Canaani et al 1984, Konopka et al. 1984).

Die Beobachtung, daß Bruchpunkte des Philadelphia Chromosomes innerhalb des *breakpoint cluster region* (BCR) Gens auf Chromosom 22 auftraten, führten zur Identifikation des zweiten Partners des Fusionstranskriptes (Groffen et al. 1984). Diese Ergebnisse wurden durch cDNS-Klonierung bestätigt (Heisterkamp et al. 1985, Mes-Masson et al. 1986, Shtivelman et al. 1985, Grosveld et al. 1986). Sowohl ABL als auch BCR werden ubiquitär exprimiert.

Neben dem pathologisch relevanten BCR-ABL Gen kommt es aufgrund des reziproken Austausches von genetischem Material auch zu einem ABL-BCR Gen. Die Expression eines entsprechenden Abl-Bcr Proteins ist jedoch nicht beschrieben.

Das humane ABL Gen ist auf dem langen Arm des Chromosom 9 lokalisiert und erstreckt sich ca. über 225 kb (de Klein et al. 1982) bzw. elf Exons. Das mRNA Transkript hat eine Größe von 6 oder 7 kb, je nachdem welche der beiden Varianten des Exon 1 (1a oder 1b) transkribiert wird (Westin et al. 1982, Shtivelman et al. 1986, Ben-Neriah et al. 1986).

Das humane BCR Gen ist auf dem langen Arm des Chromosom 22 lokalisiert und erstreckt sich über 135 kb bzw. 23 normalen sowie den zwei alternativen Exons 1 und 2 (Heisterkamp et al. 1985, Romero et al. 1989). Die mRNA Transkripte überspannen 4,5 bzw. 6,7 kb (Heisterkamp et al. 1985, Hariharan et al.1987).

Alle DNS Bruchpunkte des BCR-ABL Gen sind intronisch. Die Bruchpunkte im ABL Gen können überall innerhalb eines >300kb Segmentes am 5' Ende auftreten und zwar entweder zwischen den beiden alternierenden Exons 1b und 1a oder aber *downstream* von 1a (Melo et al. 1993). Die Bruchpunkte innerhalb des BCR Gen sind variabler und treten hauptsächlich in den als m-bcr, M-bcr und μ -bcr bezeichneten Regionen auf. In nahezu allen Patienten mit CML und etwa einem Drittel der Patienten mit Philadelphia Chromosom positiver ALL findet sich der BCR Bruchpunkt innerhalb der 5,8 kb großen M-bcr Region, die auch *major breakpoint cluster region* genannt wird. M-bcr Bruchpunkte können zwischen den BCR Exons b2 und b3 oder b3 und b4 entstehen. Aufgrund der Variabilität der jeweiligen Bruchpunkte können sich individuelle CML Patienten hinsichtlich ihres Fusionstranskriptes unterscheiden.

Bruchpunkte innerhalb der BCR Region m-bcr treten nahezu ausschließlich bei Patienten mit ALL auf. BCR Bruchpunkte in μ -bcr sind selten und lediglich in Einzelfällen beschrieben worden (Saglio et al. 1990). Bose et al. (1998) wiesen in Gesunden mittels nested RT-PCR niedrige Mengen BCR-ABL mRNA nach. Die biologische Relevanz dieser Beobachtung ist jedoch ungeklärt.

Je nach Muster der im BCR Gen beteiligten Bruchpunkte entstehen Fusionsproteine unterschiedlicher Größe. Im Falle der CML, bei der der M-bcr Bruchpunkt involviert ist, kommt es auf Proteinebene zur

Expression eines Bcr-Abl Proteins mit einem Molekulargewicht von 210 kd, das konsequenterweise als p210^{Bcr-Abl} bezeichnet wird. Nachdem bei Patienten mit Philadelphia Chromosom positiver ALL sowohl der M-Bcr als auch der m-Bcr Bruchpunkt involviert sein können, kommt es entweder zur Expression eines p210^{Bcr-Abl} Protein oder eines kürzeren p190^{Bcr-Abl} Protein.

Darüber hinaus kann es in seltenen Fällen, unter Beteiligung des μ -bcr Bruchpunktes, zu Expression eines p230^{Bcr-Abl} Protein kommen, das ebenfalls bei CML Patienten auftreten kann (Saglio et al.1990). Bei den unterschiedlichen Varianten des Bcr-Abl Proteins ist daraufhin zu weisen, daß die Längenunterschiede in erster Linie durch den variablen Bcr-Anteil hervorgerufen werden, während der Abl-Anteil größenkonstant bleibt.

4.5.3. Das p210^{Bcr/Abl} Fusionsprotein

Die Proteinprodukte der beiden physiologischen Fusionsproteinpartner Bcr und Abl sind Proteine mit multiplen Domänen.

Die physiologische Funktion von Bcr ist nicht hinreichend geklärt. Das N-terminale Ende des Proteins verfügt über eine *dimerization*-Domäne und besitzt Serin/Threonin Kinaseaktivität (McWhirter et al. 1993, Maru and Witte 1991).

Im Zentrum des Bcr Protein befinden sich eine *dbl-like* und eine *pleckstrin homology* Domäne (Ron et al. 1991). Das C-terminale Ende des Proteins verfügt über GTPase Aktivität gegenüber Rac, einem Signaltransduktor der Ras-Familie, das in neutrophilen Granulozyten eine NADPH Oxidase aktiviert (Diekmann et al. 1991). Zusammenfassend legen diese Beobachtungen für Bcr eine Rolle innerhalb einer Signaltransduktionskaskade nahe.

Bcr-knockout Mäuse haben, abgesehen von einem vermehrten oxidativen *burst*, einen unauffälligen Phänotyp (Voncken et al. 1995).

Das ABL Gen ist das humane Homolog des murinen v-abl-Onkogen, welches im Abelson Virus enthalten ist. Es kodiert für ein 145 kD Non-Rezeptorprotein mit Tyrosinkinaseaktivität (Sawyers et al. 1992). In Abl finden sich die *Src homology* Domänen 1, 2 und 3 (SH1, SH2 und SH3), die zentral gelegenen *proline-rich* Regionen, sowie eine C terminal gelegene GTPase (Kipreos et al. 1992). Die SH1 Domäne verfügt über Tyrosinkinaseaktivität, während die SH2 und SH3 Domänen zur Interaktion mit anderen Proteinen fähig sind. Abl ist vorwiegend im Nukleus lokalisiert und scheint hier an der Regulation des Zellzyklus beteiligt zu sein (Sawyers et al. 1994).

Der zytoplasmatische Anteil scheint an der Weitergabe integrin-vermittelter Signale beteiligt zu sein (Lewis und Schwartz 1998).

Von besonderer Relevanz ist die Beteiligung von Abl an DNS Reparaturmechanismen. In diesem Zusammenhang konnte die Interaktion mit wichtigen Schlüsselproteinen wie *ataxia telangiectasia-mutated* (Atm), DNA-PK und Rad51 gezeigt werden (Baskaran et al. 1997, Shafman et al. 1997, Kharbanda et al. 1997, Yuan et al. 1998, Chen et al. 1999).

Insbesondere im Anschluß an Bestrahlung konnte eine Abl-vermittelte Induktion von Apoptose gezeigt werden (Yuan et al. 1997).

Abl-knockout Mäuse haben eine hohe perinatale Mortalität, die durch Thymus- und Milzatrophy bzw. einer T- und B-zellulären Lymphopenie gekennzeichnet ist (Schwartzberg et al. 1991, Tybulewicz et al. 1991).

Die Molekularstruktur bzw. die Funktion von p210^{Bcr-Abl} sind intensiv untersucht worden. Hierbei erwiesen sich einzelne Elemente des chimären Proteins als essentiell für die maligne Transformation. Im Abl-Anteil handelt es sich hierbei zunächst um die SH1 Domäne bzw. um die *actin-binding* Domäne (Lugo et al. 1990, McWhirter und Wang, 1993). Im Bcr-Anteil sind die *dimerization*-Domäne sowie der Tyrosinrest in Position 177 essentiell für die maligne Transformation (McWhirter et al. 1993, Million und Van Etten 2000).

Unter physiologischen Bedingungen wird die Abl-Tyrosinkinaseaktivität streng reguliert. Hierbei scheint die SH3-Region eine zentrale intramolekulare inhibitorische Funktion auszuüben (Mayer and Baltimore 1994, Barila and Superti Furga 1998). Diese Autoregulation ist in p210^{Bcr-Abl} aufgehoben und führt zu konstitutiver Autophosphorylierung.

Die bereits erwähnten unterschiedlichen Varianten der Bcr-Abl Tyrosinkinase korrelieren mit den unterschiedlichen Leukämietypen (CML, ALL, CNL).

Hierbei scheint der größenkonstante Abl-Bereich, inklusive der tyrosinkinaseaktiven SH1 Region, die transformierenden Eigenschaften des Fusionsproteins zu tragen, während der größenvariable Bcr-Bereich zur deregulierten Autophosphorylierung von Abl beiträgt. Diese Vermutung wird gestützt durch die Erkenntnis, daß in seltenen Fällen mit CML-ähnlichem Krankheitsbild eine Tel-Abl (ETV6-Abl) Fusion im Rahmen einer komplexen t(9;12) Translokation nachgewiesen wurde (Million et al. 2002).

4.5.4. Signaltransduktionswege

Eine Vielzahl von Proteinen, die als Substrate von p210^{Bcr-Abl} fungieren, bzw. ein komplexes Bild unterschiedlicher Signaltransduktionswege, die durch p210^{Bcr-Abl} beeinflusst werden, sind identifiziert worden. Wie diese unterschiedlichen Signaltransduktionswege im Rahmen der malignen Transformation koordiniert werden, ist unklar.

Entsprechend ihrer subzellulären Bedeutung können die Substrate unterteilt werden in (1.) Proteine mit Funktionen im Bereich des Zytoskelett bzw. der Zellmembran (z.B. Paxillin, Talin und FAK), in (2.) Proteine mit Adaptorfunktion (CRKL, CRK, SHC, P62^{DOK}) oder in (3.) Proteine mit katalytischer Funktion (FES oder SYP).

Gleichzeitig können die einzelnen, von p210^{Bcr-Abl} beeinflussten Signaltransduktionswege, hinsichtlich ihrer Funktion eingeteilt werden in Prozesse, die zu (1.) gesteigerter Zellproliferation, zu (2.) Apoptosehemmung oder (3.) veränderter Interaktion mit der extrazellulären Matrix führen.

Die wichtigsten bekannten Signaltransduktionswege, die hierbei involviert sind, sind die Ras-Signalkaskade, der JAK-Signalweg, der Phosphatidyinositol-3-Kinaseweg und der Myc-Signalweg.

4.5.4.1. Gesteigerte Zellproliferation

Etliche p210^{Bcr-Abl} positive humane Zelllinien, wie z.B. LAMA84, K562 oder KCL22, die aus CML-Patienten in fortgeschrittenen Krankheitsstadien stammen, sind im Gegensatz zu vielen anderen Zelllinien zur wachstumsfaktorunabhängigen Proliferation fähig. Bei Zellen von Patienten in chronischer Phase besteht immerhin noch eine relative Wachstumsfaktorunabhängigkeit (Jonuleit et al. 1998).

Die aberrante Regulation des Phosphorylierungsstatus von p210^{Bcr-Abl} führt u.a. zur Autophosphorylierung am Tyrosinrest Y-177 und auf diesem Wege zur Rekrutierung einer Bindungsstelle für GRB2, einem kleinen Adaptermolekül, das durch Vermittlung von Sos, den RAS Signaltransduktionsweg aktivieren kann (Pendergast et al. 1993, Ma et al. 1987, Sawyers et al. 1995, Tauchi et al. 1994, Reuther et al. 1994, Egan et al. 1993).

Gleichzeitig konnte die p210^{Bcr-Abl} vermittelte Phosphorylierung bzw. Aktivierung von JAK2 und STAT1/STAT5 gezeigt werden, die mitogene Signale von Zellmembranrezeptoren direkt in den Zellkern leiten (Shuai et al. 1996, Ilaria et al. 1996, Carlesso et al. 1996, Frank et al. 1996).

Zusammengefasst führen RAS- und STAT-Aktivierung zu wachstumsfaktorunabhängiger und gesteigerter Zellproliferation.

4.5.4.2. Apoptosehemmung

Ähnlich wie die gesteigerte proliferative Aktivität von p210^{Bcr-Abl} durch Beteiligung unterschiedlicher Signaltransduktionswege unterhalten wird, scheint auch die Hemmung der Apoptose multifaktorieller Genese zu sein.

Von Bedeutung in der Vermittlung p210^{Bcr-Abl} assoziierter antiapoptotischer Effekte ist die Beteiligung der unterschiedlichen Proteine der Bcl-2 Familie. Hochregulation und somit Aktivierung von Bcl-2 durch p210^{Bcr-Abl} ist in Abhängigkeit des Ras Signalweges aber auch des PI-3 Kinaseweges beschrieben worden (Sanchez-Garcia et al. 1997, Skorski et al. 1997). Bcl-2 wiederum führt zur Raf-1 vermittelten, mitochondrialen Inaktivierung des proapoptotischen Proteins Bad durch Phosphorylierung eines Serinrestes (Zha et al. 1996).

4.5.4.3. Veränderte Interaktion mit der extrazellulären Matrix

In der normalen Hämatopoese kommt es zur Adhärenz von Progenitorzellen an Stromazellen des Knochenmarks und der assoziierten extrazellulären Matrix. Eine entscheidende Rolle in der Adhärenz spielen dabei Proteine der extrazellulären Matrix, die Fibronektine genannt werden und mit der Oberfläche von Progenitorzellen interagieren. Die intakte Adhärenz von Progenitorzellen an Stromazellen gilt als Voraussetzung für eine Exposition gegenüber zellregulatorischen Zytokinen.

Im Gegensatz dazu weisen Philadelphia Chromosom positive Progenitorzellen eine reduzierte Adhäsion gegenüber Stromazellen auf und könnten sich auf diesem Wege einer zytokinvermittelten Regulation entziehen (Gordon et al. 1987). Ein schlüssiges Modell, das die Aktivität von p210^{Bcr-Abl} mit einer veränderten Zelladhäsion in Verbindung bringt, existiert nicht. Tatsächlich scheint eine Beteiligung von CrkL, einem in Philadelphia Chromosom positiven Zellen stark phosphorylierten

Protein, an der zellulären Motilität möglich, nachdem CrkL mit der Funktion von Adhäsionsproteinen wie Fak, p130^{Cas}, Hef1 und Paxillin assoziiert ist (Sattler et al. 1996, Sattler et al. 1997).

4.6. Diagnostik

Die Diagnose der CML stützt sich neben allgemeininternistischen Untersuchungsschritten (Anamnese, körperliche Untersuchung, laborchemische Analyse des peripheren Blutes) auf Techniken der Hämatologie. Hierbei stehen das Differentialblutbild bzw. die Knochenmarkpunktion mit Gewinnung einer Histologie und eines zytologischen Aspirates im Vordergrund. Die unter 4.4.1 beschriebenen Symptome bzw. zusammen mit den unter 4.4.2 beschriebenen laborchemischen und zytologischen Befunden führen dann zur Diagnose.

Die Diagnose muss durch den Nachweis des Philadelphia Chromosom oder des BCR-ABL Fusionstranskriptes erweitert werden. Die hierbei eingesetzten Methoden wie Karyotypisierung mittels zytogenetischer Analyse, Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) oder Polymerasekettenreaktion (PCR) ergänzen sich und müssen bei Verlaufskontrollen in Abhängigkeit der klinischen Fragestellung eingesetzt werden.

Bei ca. 90% der Patienten mit CML läßt sich mittels konventioneller Zytogenetik das Philadelphia Chromosom nachweisen. Darüber hinaus bietet die Methode die Möglichkeit andere chromosomale Anomalien im Sinne eines komplex aberranten Karyotypes zu erfassen und liefert somit ein entscheidendes Kriterium der Stadieneinteilung. Klassischerweise werden mindestens 25 Metaphasen analysiert und der Prozentsatz der Philadelphia Chromosom positiven Zellen bestimmt (Schoch et al. 2002). Bei der Verlaufskontrolle wird hierbei der Therapieerfolg auf zytogenetischer Ebene in vier Kategorien eingeteilt: ein komplettes zytogenetisches Ansprechen (0% Philadelphia Chromosom positive Metaphasen), ein partielles zytogenetisches Ansprechen (1-34% Philadelphia Chromosom positive Metaphasen), ein geringes zytogenetisches Ansprechen (35-94% Philadelphia Chromosom positive Metaphasen) und kein zytogenetisches Ansprechen (mehr als 95% Philadelphia Chromosom positive Metaphasen). Das komplette und das partielle zytogenetische Ansprechen werden gelegentlich auch als major zytogenetische Remission zusammengefasst (weniger als 35% Philadelphia Chromosom positive Metaphasen).

Die FISH Untersuchung weist die Philadelphia Translokation klassischerweise in Interphasekernen nach, wobei auch Metaphasekerne verwendet werden können. Im Gegensatz zur Zytogenetik können aufgrund des zellerhaltenden Verfahrens zusätzlich immunzytologische Methoden verwendet werden, die dann die Zuordnung Philadelphia Chromosom positiver Zellen zu den einzelnen Zelllinien ermöglicht (Haferlach et al. 1996). In Abhängigkeit der verwendeten Sonden schwankt die Nachweisgrenze Philadelphia Chromosom positiver Zellen zwischen 1-5% (Chase A et al. 1997, Garcia-Isidoro et al. 1997). Bei den etwa 10% Patienten, bei denen die Philadelphia Translokation mittels Zytogenetik nicht nachweisbar ist, gelingt in etwa einem Drittel der Fälle der Nachweis mittels FISH.

Die Polymerase Kettenreaktion schließlich verfügt über die höchste Sensitivität. Aufgrund der verhältnismäßig langen intronischen Abschnitte des BCR-ABL Transkriptes ist die Kombination aus reverser Transkription der RNS und einer PCR erforderlich. Zur Diagnosestellung ist eine konventionelle qualitative PCR ausreichend. Die Sensitivität dieser PCR kann durch den Einsatz eines intern gelegenen zweiten Primersets im Sinne einer sogenannten *nested* PCR gesteigert werden.

Die *Real-Time-PCR* ermöglicht die quantitative Abschätzung der Anzahl von RNS- oder DNS-Target-Molekülen in einer Probe und eignet sich hervorragend zur Verlaufskontrolle der sogenannten MRD (*minimal residual disease*). Hierbei wird zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Verlauf der PCR die absolute Menge des PCR-Amplifikates durch Fluoreszenzbestimmung markierter DNS oder durch den Einsatz von Oligonukleotidsonden mit einem Reporterfarbstoff ermittelt. Hierbei wird zwischen dem TaqMan®- und dem LightCycler®-Prinzip unterschieden (Higuchi et al. 1993, Preudhomme et al. 1999, Branford et al. 1999, Emig et al. 1999).

4.7. Prognose

Vor der Einführung von Tyrosinkinaseinhibitoren in der Therapie der CML lag die mittlere Überlebenszeit zwischen vier und sieben Jahren. Unterschiedliche *scores* zur Ermittlung der Prognose sind in den vergangenen 25 Jahren entwickelt worden.

Der Sokal-*score* unterteilt erstdiagnostizierte Patienten in drei Risikogruppen in Abhängigkeit der prognostisch relevanten Variablen Alter, Milzgröße, prozentualer Blastenanteil im peripheren Blut und Thrombozytenzahl (Sokal et al. 1984).

Dieser Ansatz wurde in den neunziger Jahren modifiziert, um insbesondere Patienten berücksichtigen zu können, die mit der damaligen medikamentösen Standardtherapie, bestehend aus Interferon- α enthaltenden Regimen, behandelt wurden. Hierbei wurde der neue CML-*score* (Hasford-*score*) etabliert, der ebenfalls die Unterteilung in drei Risikogruppen vorsah, jedoch neben den bisherigen Variablen auch den prozentualen Anteil an Basophilen und Eosinophilen berücksichtigte (Hasford et al. 1998). Hierbei zeigten Patienten unter einer Therapie mit Interferon- α ein medianes Überleben von 100 Monaten in der Niedrigrisikogruppe und von 43 Monaten in der Hochrisikogruppe.

Unter Therapie werden als prognostisch relevante Größen das hämatologische, das zytogenetische sowie das molekulare Ansprechen ermittelt.

5. Therapie der CML

5.1. Überblick

Seit der Erstbeschreibung sind therapeutische Optionen mit unterschiedlichen Wirkprinzipien in der Behandlung der CML angewandt bzw. im Rahmen von klinischen Studien geprüft worden. Bereits im frühen 20. Jahrhundert wurden erste Therapieversuche mit der Gabe von Arsen unternommen. Daneben konnte mittels Milzbestrahlung durch ionisierende Strahlen zwar kein Überlebensvorteil, aber immerhin eine Verbesserung der Lebensqualität erreicht werden. Erst in der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts wurden Alkylanzien wie Busulfan erprobt. Seit 1966 wird Hydroxyurea eingesetzt. In diesen Zeitraum datiert auch der Beginn kontrollierter klinischer Studien. All diese Therapieformen erzielten im besten Falle eine hämatologische Remission. Die Therapieziele zytogenetische Remission und Lebenszeitverlängerung konnten erst mit der Einführung von Kombinationstherapien bestehend aus Interferon- α und entweder Hydroxyurea oder Arabinosyl-Cytosin (Ara-C) erreicht werden (Hehlmann et al. 1994, Guilhot et al. 1997, Bonifazi et al. 2001, Baccarani et al. 2002, Hehlmann et al. 2003, Kluijn-Nelemans et al. 2004).

Neben diesen medikamentösen Therapieformen wurde seit den siebziger Jahren des vergangenen Jahrhunderts die allogene Stammzelltransplantation etabliert und stellt bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt die einzige kurative Therapieoption der CML dar. Die prognoserelevanten Variablen dieses Therapieansatzes sind die Spendereigenschaften (Geschwisterspender versus unverwandter Spender bzw. die HLA-Kompatibilität), das Krankheitsstadium zum Zeitpunkt der Transplantation, das Alter des Patienten, die Geschlechtszugehörigkeit von Patient und Spender sowie die Zeitdauer seit Erstdiagnose, die in den sogenannten *Gratwohl-Score* integriert sind und die Möglichkeit zur Risikoabschätzung bilden (Gratwohl et al. 1998). Die grundsätzlichen Probleme der allogenen Stammzelltransplantation liegen in der therapieassoziierten Frühmortalität bzw. in der Entstehung der akuten oder chronischen Graft-versus-Host Krankheit (GvHD).

Die sich kontinuierlich verbessernden Transplantationsergebnisse lassen sich auf die insgesamt weiterentwickelte Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der unterschiedlichen Komplikationen der Transplantation zurückführen. Neben verbesserter supportiver Therapie ist hier in erster Linie die erfolgreiche Therapie von Posttransplantationsrezidiven mittels Spender-Lymphozyten-Infusionen (DLI, donor lymphocyte infusion) zu nennen (Kolb et al. 1990, Kolb et al. 1995, Dazzi et al. 2000, Elmaagacli et al. 2001, Kolb et al. 2004).

5.2. „Targeted Therapy“ der CML - Imatinib

Das p210^{Bcr-Abl} Fusionsprotein der CML erfüllt die vier Grundvoraussetzungen, die für die Entwicklung einer *targeted therapy* erforderlich sind. Die p210^{Bcr-Abl} Tyrosinkinase wird ausschließlich durch den leukämischen Klon exprimiert, sie ist in Abhängigkeit der Methode in nahezu 100 % der Patienten mit CML nachweisbar, hat eine kausale Bedeutung in der Pathogenese der CML und ist für die Integrität physiologischer Zellen irrelevant.

In Kenntnis dieser Eigenschaften sind früh spezifische Therapieansätze erprobt worden. Im Vordergrund standen hier zunächst der Einsatz von antisense-Nukleotiden, die spezifisch die Expression des BCR-ABL Transkriptes unterdrücken sollten. Insbesondere wurde dieser Ansatz im Rahmen klinischer Studien zum *purging* apherisierter CD34+ Zellen erprobt. Zusammenfassend waren die Ergebnisse wenig erfolgreich, wobei die entscheidenden Mängel in der ineffektiven Passage der verabreichten antisense-Nukleotide über die Zellmembran und in der mangelhaften Spezifität der verwendeten Antisense-Moleküle lag (Ratajczak et al. 1992, Gewirtz 1997).

Auch immunologische Ansätze, die auf die BCR-ABL Sequenz als potentielles Antigen abzielten, waren erfolglos.

Erst die Beobachtung, dass die Tyrosinkinaseaktivität von p210^{Bcr-Abl} für die transformierenden Eigenschaften des Fusionsprotein verantwortlich ist, führte zur Suche nach spezifischen Inhibitoren.

Bei den ersten Tyrosinkinaseinhibitoren handelte es sich um Substanzen der Tyrphostingruppe, die zur Inaktivierung der Abl-Tyrosinkinase führen. Aufgrund ihrer geringen Spezifität bzw. der zu erwartenden Toxizität eigneten sich diese Substanzen nicht für den klinischen Einsatz (Kaur et al. 1994, Bhatia et al. 1998).

Im Rahmen einer als *rational drug design* bezeichneten Strategie wurden ausgehend von der kristallographisch ermittelten Struktur der Kinasedomäne neue Moleküle entwickelt, die durch sequenzielle Modifikation zur Kinaseinhibition in der Lage waren.

Auf diesem Wege wurden Angehörige der 2-Phenylpyrimidinklasse als Tyrosinkinaseinhibitoren des Platelet-derived growth factor receptor (PDGFR) identifiziert (Buchdunger et al. 1995). Einer der im Rahmen dieser Studien entwickelten Tyrosinkinaseinhibitoren (CGP 53716) zeigte ebenfalls Aktivität gegen die physiologische Abl Aktivität, was nach weiterer Modifikation zur Entwicklung von CGP57148 (STI571, Glivec®, Imatinib mesilate, Imatinib) führte (Buchdunger et al. 1996, Druker et al. 1996).

5.2.1. Imatinib Wirkmechanismus und präklinische Daten

Imatinib ($C_{29}H_{31}N_7O.CH_4SO_3$) ist ein Phenylaminopyrimidinderivat mit einem Molekulargewicht von 589,7. Chemisch handelt es sich um 4-[(4-Methyl-1-piperazinyl)methyl]-N-[4-methyl-3-[[4-[3-pyridinyl)-2-pyrimidinyl]amino]phenyl]benzamidmethansulfonat.

Der Wirkmechanismus ist erst im Anschluß an die ersten klinischen Erfolge dieser Substanz komplett verstanden worden. Imatinib wirkt als kompetitiver Inhibitor der ATP-Bindung (Buchdunger et al. 1996, Druker et al. 1996). Die Hemmung der ATP-vermittelten Aktivierung von $p210^{Bcr-Abl}$ führt zur Hemmung der Proliferation, zur Rekonstitution der Apoptose und zur Unterbrechung CML-spezifischer nachgeschalteter Signaltransduktionswege.

Die katalytische Domäne eukaryoter Tyrosinkinase besitzt eine hoch konservierte bilobäre Struktur. In diese Struktur sind die ATP-Bindungsstelle und die katalytische Domäne integriert (Nagar et al. 2002). Der aktivierte Zustand der Kinase hängt von der Position der sogenannten *activation loop* ab, die im Falle von Abl die Aminosäurereste 381 bis 402 enthält. Im aktivierten Zustand befindet sich diese *activation loop* in einer sogenannten „offenen“ Konformation, da sie in relativer Entfernung zum katalytischen Zentrum der Kinase steht. Die *activation loop* dient als Plattform für die Substratbindung und erhält somit eine erhebliche biochemische Bedeutung. Dem Abl-Tyrosinrest 393 kommt in der Aktivierung der Kinase eine besondere Rolle zu. Im inaktiven Zustand ist dieser Tyrosinrest nicht phosphoryliert, neigt sich dem Zentrum der Kinase entgegen und führt somit zum „geschlossenen“ Zustand des Enzyms, der die Substratphosphorylierung nicht zuläßt (Schindler et al. 2000, Nagar et al. 2002).

Die Kristallographie der katalytischen Domäne von Abl, sowohl in Gegenwart eines Imatinib-Analogon, als auch von Imatinib führte zu der Erkenntnis, dass Imatinib ausschließlich die inaktive Form von Abl bindet (Schindler et al. 2000, Nagar et al. 2002).

Erste Untersuchungen in zellfreien Systemen zeigten Aktivität gegen Abl und seine unterschiedlichen aktivierten Derivate v-Abl, Bcr-Abl und Tel-Abl mit IC_{50} Werten (Konzentration, die zu einer Hemmung von 50% führt) bei $0,025\mu M$ (Buchdunger et al. 1996, Druker et al. 1996, Carroll et al. 1997). Gleichzeitig zeigte sich Aktivität gegenüber PDGF-R bzw. c-Kit, während eine Reihe anderer Tyrosinkinase (Flt-3, c-Src, c-Lyn, Syk, Jak-2, EGF-R, Insulin-Rezeptor, VEGF-R u.a.) erst bei unspezifischen Konzentrationen gehemmt wurden.

Experimente auf Zellebene zeigten eine IC_{50} zwischen $0,25$ und $0,5\mu M$, führten zur Induktion von Apoptose bzw. bestätigten die Dephosphorylierung von $p210^{Bcr-Abl}$ im Westernblot. Hierbei wurden entweder $p210^{Bcr-Abl}$ positive humane Zelllinien leukämischer Patienten oder transfizierte Zellen untersucht (Druker et al. 1996, Gambacorti-Passerini et al. 1997, Deininger et al. 1997).

In mononukleären Zellen von CML Patienten in unterschiedlichen Stadien der Erkrankung konnte ebenfalls im Rahmen von ex-vivo Ansätzen die Aktivität von Imatinib bestätigt werden. In diesen Untersuchungen lag die IC_{50} bei $1\mu M$ (Gambacorti-Passerini et al. 1997, Deininger et al. 1997).

Schließlich wurde Imatinib in zwei unterschiedlichen Tiermodellen getestet. In syngenesischen Mäusen führte die subkutane Injektion Bcr-Abl-transformierter 32D Zellen zum Wachstum meßbarer Tumore.

In diesem Modell führte die intraperitoneale Applikation von 10 bis 50 mg/kg Imatinib zur dosisabhängigen Hemmung des Tumorwachstum (Druker et al. 1996).

In einem zweiten Modell von le Coutre et al. (1999) wurde die in-vivo Aktivität von Imatinib in Nacktmäusen gezeigt, denen subkutan humane Bcr-Abl positive Leukämiezellen injiziert wurden (siehe 5.2.1.1.).

5.2.1.1. In vivo eradication of human BCR/ABL-positive leukemia cells with an ABL kinase inhibitor.

le Coutre P, Mologni L, Cleris L, Marchesi E, Buchdunger E, Giardini R, Formelli F, Gambacorti-Passerini C. In vivo eradication of human BCR/ABL-positive leukemia cells with an ABL kinase inhibitor. *J Natl Cancer Inst*, 91(2),163-168, 1999

5.2.2. Imatinib - klinische Studien

Aufgrund der vielversprechenden präklinischen Ergebnisse wurde 1998 mit der Durchführung klinischer Studien begonnen. Die erhobenen Phase I Daten zeigten ab einer Dosierung von 300 mg oral einmal täglich sowohl hämatologische als auch zytogenetische Remissionen. Diese Studien wurden sowohl mit Patienten in fortgeschrittenen Krankheitsstadien als auch in Interferon- α refraktären Patienten in chronischer Phase durchgeführt (Druker et al. 2001, Druker et al. 2001).

Im Vergleich zu den bisherigen Interferon- α -haltigen Therapieregimen kam es nur zu geringen Nebenwirkungen nach WHO-Kriterien, die hauptsächlich in leichter Übelkeit, periorbitalen Ödemen, Muskelkrämpfen oder Hautirritationen bestanden. Nur in seltenen Fällen sind massive Hauttoxizitäten beobachtet worden (Schwarz et al. 2002).

Die sich anschließende Phase II Studie wurden mit Dosierungen zwischen 400 – 800 mg Imatinib täglich durchgeführt. Bei den insgesamt 454 Patienten mit Interferon- α refraktärer CML in chronischer Phase kam es nach einer medianen Beobachtungsdauer von 18 Monaten bei 95% der Patienten zu einer kompletten hämatologischen Remission und bei 60% der Patienten zu einem major-zytogenetischen Ansprechen (Kantarjian et al. 2002). Bei 181 Patienten in akzelerierter Phase wurde in 37 % der Patienten eine komplette hämatologische Remission und eine zytogenetische Remissionen bei 26 % der Patienten beobachtet (Talpaz et al. 2002). Schließlich kam es bei den 229 untersuchten Patienten in myeloischer Blastenkrise in 31 % zu einer hämatologischen Remission von weniger als zwölf Monaten bzw. bei 15% zu einer zytogenetischen Remission (Sawyers et al. 2002). Bereits in diesen Phase II Studien wurde studienbegleitend bei Patienten in später chronischer Phase nach vorangegangener Therapie mit Interferon- α - haltigen Therapieregimen das molekulare Ansprechen mittels quantitativer RT-PCR bestimmt (Merx et al. 2002, Wu et al. 2002, Kantarjian et al. 2003, le Coutre et al. 2003, Paschka et al. 2003, Na et al. 2005). Aufgrund der nicht standardisierten Methoden sind die Ergebnisse dieser Arbeiten schwer vergleichbar. Dennoch zeigten diese Daten einheitlich den signifikanten Abfall des BCR-ABL Transkriptes unter Imatinib (le Coutre et al. 2003, siehe 5.2.2.1.).

Im Juni 2000 wurde eine internationale multizentrische Phase III Studie begonnen, die den Vergleich einer Monotherapie mit Imatinib, 400 mg einmal täglich, mit der bisherigen Standardtherapie, bestehend aus einer Kombinationstherapie aus Interferon- α und Cytarabin, zum Inhalt hatte. In diese Studie wurden insgesamt 1106 Patienten mit ausschließlich neu diagnostizierter CML in erster chronischer Phase rekrutiert und in die beiden Therapiearme randomisiert (O'Brien et al. 2003).

Nach einem medianen Beobachtungszeitraum von 19 Monaten zeigte sich ein zytogenetisches Ansprechen im Sinne eines *major response* in 87,1% der mit Imatinib behandelten Patienten und in 34,7% der Patienten mit Standardtherapie. Gleichmaßen kam es bei 76,2% der Patienten mit Imatinibtherapie und bei 14,5% der Patienten mit Standardtherapie zu einer kompletten zytogenetischen Remission. Insgesamt zeigte sich ein hochsignifikanter Unterschied hinsichtlich des progressionsfreien Überlebens zugunsten einer Therapie mit Imatinib. In Analogie zu den vorausgegangenen Phase I und II Studien zeichnete sich ein deutlich günstigeres Toxizitätsprofil für Imatinib ab (O'Brien et al. 2003).

Diese Daten führten 2001 zur Zulassung von Imatinib als medikamentöse Erstlinientherapie der CML.

Hughes et al. (2003) untersuchten bei 370 Patienten mit kompletter zytogenetischer Remission aus dieser Studie das molekulare Ansprechen und konnten zeigen, daß Patienten aus dieser Gruppe mit einem Abfall des BCR-ABL Transkriptes um mindestens drei logarithmische Stufen innerhalb der ersten zwölf Behandlungsmonate eine progressionsfreie Überleben von 100% nach 24 Monaten haben. Diese Daten bestätigten sich in Subgruppenanalysen (Müller et al. 2003, Branford et al. 2003).

5.2.2.1. Imatinib in Philadelphia Chromosome Positive Chronic Phase CML Patients: Molecular and Cytogenetic Response Rates and Prediction of Clinical Outcome

le Coutre P, Kreuzer K-A, Na IK, Schwarz M, Lupberger J, Holdhoff M, Baskaynak G, Gschaidmeier H, Platzbecker U, Ehninger G, Prejzner W, Huhn D, Schmidt CA. Imatinib in Philadelphia Chromosome Positive Chronic Phase CML Patients: Molecular and Cytogenetic Response Rates and Prediction of Clinical Outcome. *Am J Hematol*, 73:249-255, 2003

5.2.3. Imatinib Resistenzmechanismen

Grundsätzlich können Resistenzmechanismen gegenüber Imatinib hinsichtlich des Zeitpunktes ihres Auftretens bzw. hinsichtlich ihrer biologischen Eigenschaften klassifiziert werden.

Dementsprechend wird unter einer primären (intrinsischen) Resistenz die Unwirksamkeit einer Therapie bereits zu Beginn der Behandlung verstanden, während die sekundäre (erworbene) Resistenz das Auftreten einer Therapieunwirksamkeit nach initialem Ansprechen bezeichnet.

Demgegenüber kann in Abhängigkeit des Phosphorylierungsstatus von p210^{Bcr-Abl} in Bcr-Abl-abhängige und Bcr-Abl-unabhängige Resistenz unterschieden werden. Bcr-Abl-Abhängigkeit im

Kontext einer Resistenzentstehung gegenüber Imatinib bezeichnet dabei die Frage inwieweit phosphoryliertes bzw. aktiviertes p210^{Bcr-Abl} noch an der Aufrechterhaltung des resistenten Klones beteiligt ist.

Die Vermutung, daß die Entstehung p210^{Bcr-Abl} positiver Klone mit Resistenz gegenüber Imatinib eine kritische Beeinträchtigung eines langfristigen Therapieansprechens darstellen könnte, ging dem tatsächlichen Nachweis der klinischen Resistenz voraus.

In diesem Sinne wurde bereits vor der klinischen Erprobung von Imatinib versucht Zelllinien zu generieren, die trotz des Vorhandenseins von p210^{Bcr-Abl} resistent sind.

Hierbei wurden BCR-ABL positive Zelllinien in langsam steigenden Konzentrationen von Imatinib über mehrmonatige Zeiträume kultiviert, was zur Selektion resistenter Klone führte (le Coutre et al. 2000, Weisberg et al. 2000, Mahon et al. 2000, Gambacorti-Passerini C et al. 2000, siehe 5.2.3.1.). Am Beispiel der humanen Zelllinie LAMA84 bzw. an deren Imatinib-resistenten Subklon LAMA84-R konnte gezeigt werden, daß die Amplifikation des Philadelphia Chromosoms zur Überexpression von p210^{Bcr-Abl} und zur Resistenzentstehung führen kann (le Coutre et al. 2000, siehe 5.2.3.1.).

Die klinische Relevanz dieses Mechanismus wurde kurz darauf in Patienten bestätigt (Gorre et al. 2001).

Das Auftreten von Punktmutationen in der Abl-Kinase-Domäne, die zur inadäquaten oder kompletten Behinderung der Imatinibbindung führen, ist ein weiterer entscheidender Mechanismus der Resistenzentstehung, der interessanterweise ausschließlich in Patienten beschrieben wurde (Gorre et al. 2001). Grundsätzlich führen diese Mutationen zur Reaktivierung der Bcr-Abl Aktivität und gehen in etwa 89% der Fälle einem hämatologischen Rezidiv voraus (Gorre et al. 2001, Hochhaus et al 2002, Shah et al 2002, von Bubnoff et al. 2002).

Viele dieser zum gegenwärtigen Zeitpunkt über 30 Punktmutationen betreffen Aminosäuren, die u.a. durch die Entstehung von Wasserstoffbrückenbindungen für eine adäquate Imatinibbindung erforderlich sind. In Bezug auf die Quartärstruktur der Abl Domäne liegt die überwiegende Anzahl der Punktmutationen entweder in der *P-loop*, die physiologischerweise zur Bindung der ATP-Phosphatreste dient, oder der *A-loop (activation-loop)*. Eine Ausnahme bildet die sogenannte T315I Mutation, die außerhalb dieser Bereiche liegt.

In-vitro Studien zeigten, daß einige dieser Mutationen zu einer drastischen Steigerung der IC₅₀ gegenüber Imatinib im Vergleich zum p210^{Bcr-Abl} Wildtyp führen (Corbin et al. 2002, Roumiantsev et al. 2002).

Anhand von nested-PCR Ansätzen bzw. mittels eines neu etablierten PNA-clamping assay konnte gezeigt werden, daß Punktmutationen in Bezug auf den Beginn einer Imatinibtherapie präexistent sein können und erst im Verlauf der Behandlung durch Selektion an Relevanz gewinnen (Roche-Lestienne et al. 2002, Kreuzer et al. 2003).

Die klonale Evolution ist ein weiterer Mechanismus der Resistenzentstehung gegenüber Imatinib (Hochhaus et al. 2002). Hierbei kommt es durch die Generierung zusätzlicher chromosomaler Aberrationen zur Entstehung einer Bcr-Abl unabhängigen Blastenpopulation, die zum Rezidiv führt. Die Mechanismen dieser Resistenzentstehung sind weitestgehend unklar.

Die Beteiligung des MDR-1 Genes bzw. die Überexpression des damit assoziierten P-Glykoprotein-1 ist in der klinischen Anwendung nicht ausreichend untersucht, jedoch ist eine Überexpression von MDR-1 bei einer Bcr-Abl überexprimierenden Zelllinie beschrieben worden (Mahon et al. 2000).

Ein weiterer Resistenzmechanismus besteht prinzipiell in der Bindung von Imatinib durch Plasmaproteine und die daraus resultierende Herabsetzung der freien und aktiven Imatinibkonzentration. Insbesondere die Bindung von Imatinib an das akute Phase-Serumprotein alpha-1 saures Glykoprotein (AGP) wurde von Gambacorti-Passerini et al. (2000) auf Zellkulturebene und tierexperimentell als nichtzellulärer Mechanismus der Resistenz beschrieben. Interessanterweise konnte hierbei in der Zellkultur die Imatinib-AGP Bindung durch Kokultivierung mit Erythromycin gelöst und die Hemmung von p210^{Bcr-Abl} wiederhergestellt werden. Die klinische Relevanz dieses Mechanismus ist nicht eindeutig geklärt (Jørgensen et al. 2002, Gambacorti-Passerini et al. 2002, Larhero et al. 2003). Dennoch konnte ein stadienabhängiger Anstieg von AGP bei Patienten in chronischer Phase, akzelerierter Phase oder Blastenkrise gezeigt werden, der sich im Verlauf einer Imatinibtherapie normalisierte (le Coutre et al. 2002, siehe 5.2.3.2.).

5.2.3.1. Induction of resistance to the Abelson inhibitor STI571 in human leukemic cells through gene amplification.

le Coutre P, Tassi E, Varella-Garcia M, Barni R, Mologni L, Cabrita G, Marchesi E, Supino R, Gambacorti-Passerini C. Induction of resistance to the Abelson inhibitor STI571 in human leukemic cells through gene amplification. *Blood*, 95, 1758-66, 2000

5.2.3.2. Determination of α -1 Acid Glycoprotein in Patients with Ph+ Chronic Myeloid Leukemia during the first 13 Weeks of Therapy with STI571.

le Coutre P, Kreuzer KA, Na IK, Lupberger J, Holdhoff M, Appelt C, Schwarz M, Müller C, Gambacorti-Passerini C, Platzbecker U, Bonnet R, Ehninger G, and Schmidt CA. Determination of α -1 Acid Glycoprotein in Patients with Ph+ Chronic Myeloid Leukemia during the first 13 Weeks of Therapy with STI571. *Blood Cells Mol Dis*, 28 (1), 75-85, 2002

5.2.4. Imatinib Pharmakokinetik

Trotz der erfolgreichen klinischen Ergebnisse mit Imatinib sind Fragen zur Pharmakokinetik weitestgehend ungeklärt. Insbesondere die Frage des transmembranösen Transportes von Imatinib in die Zelle aber auch in Körperkompartimente wie z.B. in den Liquorraum bei Patienten mit meningeosis leukaemica sind bisher wenig bearbeitet worden. Weiterhin stehen wichtige Untersuchungen hinsichtlich der biologischen Wirksamkeit der unterschiedlichen Metabolite von Imatinib aus. Schließlich lassen sich Fragestellungen hinsichtlich der Interaktion von Imatinib entweder mit Serumproteinen wie z.B. AGP oder auch anderen Medikamenten nicht ohne entsprechende pharmakokinetische Untersuchungen beantworten.

Die derzeit etablierten HPLC-Methoden (high-pressure-liquid-chromatography) weisen sowohl Imatinib als auch den Hauptmetaboliten CGP74588 hoch sensitiv nach (Parise et al. 2003, Schleyer et al. 2004). Mit Hilfe dieser Methoden konnten in kleinen Patientengruppen die Imatinib- und CGP74588-Spiegel, sowie deren Exkretion über die Niere untersucht werden (le Coutre et al. 2004, siehe 5.2.4.1.). Prospektive Studien an ausreichenden Patientenpopulationen, die eine Korrelation zwischen Imatinib-Plasmaspiegeln und klinischem Ansprechen ermöglichen, stehen jedoch aus.

5.2.4.1. Pharmacokinetics and cellular uptake of imatinib and its main metabolite CGP74588

le Coutre P, Kreuzer KA, Pursche S, Bonin M, Leopold T, Baskaynak G, Dörken B, Ehninger G, Ottmann O, Jenke A, Bornhauser M, Schleyer E. Pharmacokinetics and cellular uptake of imatinib and its main metabolite CGP74588. *Cancer Chemother Pharmacol.* 53(4):313-23, 2004

5.2.5. In-vivo Purging mit Imatinib

Aufgrund der hohen Rate an kompletten zytogenetischen Remissionen bei Imatinib-behandelten Patienten in chronischer Phase, die sich in den Phase II und Phase III Studien zeigte, ergab sich die Überlegung, bei diesen Patienten CD34 positive aber Philadelphia Chromosom negative Stammzellen nach Stimulation mit G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor) zu apherisieren. Im Gegensatz zu den bekannten Erfahrungen des in-vitro purging, also der therapeutischen Manipulation von ex-vivo verfügbaren Stammzellen beispielsweise mit Oligonukleotiden, würde das in-vivo Purging die Möglichkeit einer Stammzellmobilisierung mit G-CSF unter einer laufenden antileukämischen Therapie ermöglichen.

Grundsätzlich war dieser Ansatz getragen von der Überlegung für Patienten in chronischer Phase, im Falle eines Progresses unter Imatinib, eine zusätzliche Therapieoption, im Sinne einer autologen Stammzelltransplantation, zu schaffen. Hierbei kann auf Erfahrungen aus der Zeit vor der Verfügbarkeit vom Imatinib zurückgegriffen werden (Corsetti et al. 2000). In initialen Studien konnte in kleinen Patientengruppen die grundsätzliche Sicherheit und Durchführbarkeit dieses Ansatzes gezeigt werden. Hierbei wurden bei chronische Phase Patienten mit kompletter zytogenetischer Remission nach 3–5 tägiger Stimulation mittels G-CSF mindestens $2,0 \times 10^6$ /kg/KG CD34 positive Stammzellen apherisiert (Kreuzer et al. 2003, Hui et al. 2003, Kreuzer et al. 2004, siehe 5.2.5.1.).

Nachdem sich auch bei Patienten in kompletter zytogenetischer Remission eine Persistenz Bcr-Abl positiver Stammzellen zeigte (Bathia et al. 2003), könnte die simultane Gabe von G-CSF weiterhin einen zusätzlichen therapeutischen Effekt durch Stimulation bislang nicht proliferierender Stammzellen erzielen.

Tatsächlich konnte mittels RT-PCR in wenigen Patienten eine Verbesserung des molekularen Status des apherisierten Materials im Vergleich zum peripheren Blut erzielt werden (Kreuzer et al. 2004, siehe 5.2.5.1.). Inwieweit es sich hierbei um einen ausschließlichen Effekt der G-CSF Stimulation handelt, bleibt ungeklärt.

Bislang wurde eine autologe Stammzelltransplantation mit einem Apheresat, das zum Zeitpunkt der zytogenetischen Vollremission entnommen wurde beschrieben (le Coutre et al. 2003, siehe 5.2.5.2.). Anhand dieses Falles einer erfolgreichen autologen Stammzelltransplantation in zweiter Blastenkrise zeigte sich die grundsätzliche Durchführbarkeit der Methode. Die hierbei erzielte hämatologische Remission hielt ca. 18 Monate an und legt nahe, daß der Stellenwert der autologen Transplantation in erster Linie in dem vorübergehenden Erreichen einer erneuten hämatologischen oder gar zytogenetischen Remission liegt, so daß neue therapeutische Strategien notwendig sind.

5.2.5.1. Filgrastim-induced stem cell mobilization in chronic myeloid leukaemia Patients during imatinib therapy: safety, feasibility and evidence for an efficient in vivo purging

Kreuzer KA, 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*, 124(2):195-9, 2004

5.2.5.2. Autologous peripheral blood stem cell transplantation of stem cells harvested in imatinib-induced complete cytogenetic remission: an example of in vivo purging in CML.

le Coutre P, Kreuzer KA, Massenkeil G, Baskaynak G, Zscheschang P, Genvresse I, Lupberger J, Mapara M, Dörken B, Arnold R. 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*, 17(12):2525-6, 2003

6. Ausblick

Das Konzept einer spezifisch gegen die Leukämiezelle gerichteten Therapie konnte innerhalb der letzten zehn Jahre am Beispiel der chronischen myeloischen Leukämie mit der Einführung des Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib erfolgreich umgesetzt werden.

Bei Patienten in der chronischen Phase der Erkrankung konnten hierbei hochsignifikant verbesserte Therapieergebnisse im Vergleich zur bisherigen Standardtherapie erzielt werden.

Jedoch kam es insbesondere bei Patienten in fortgeschrittenen Krankheitsstadien zum Auftreten unterschiedlicher Resistenzmechanismen, die zum Rezidiv der Erkrankung führen können.

Demzufolge wird ein zukünftiger wissenschaftlicher Schwerpunkt in der Optimierung der Inhibierung der Tyrosinkinaseaktivität liegen. Bereits zum gegenwärtigen Zeitpunkt sind neue Tyrosinkinaseinhibitoren in der klinischen Erprobung, die präklinisch ein deutlich verbessertes Wirkungsprofil zeigten (Shah et al. 2004, Weisberg et al. 2005).

Zukünftige klinische Studien werden dabei untersuchen, ob eine Therapieoptimierung durch entsprechende Monotherapien eventuell mit gesteigerten Dosierungen oder durch Kombination unterschiedlicher Tyrosinkinaseinhibitoren erreicht wird.

Weitere Fortschritte werden auf dem Gebiet der Risikostratifizierung umgesetzt werden. Insbesondere die Möglichkeiten der quantitativen PCR in Kombination mit hochsensitiven Mutationsanalysen sowie der Microarray-Analyse könnten entscheidende Daten hinsichtlich der optimalen Therapieempfehlung und des Monitoring für den einzelnen Patienten liefern.

Schließlich könnte die Identifikation weiterer spezifischer molekularer Strukturen maligner Zellen zur Realisierung des Konzeptes einer „targeted therapy“ auch bei anderen Neoplasien führen.

7. Literaturverzeichnis

Baccarani M, Rosti G, de Vivo A, Bonifazi F, Russo D, Martinelli G, Testoni N, Amabile M, Fiacchini M, Montefusco E, Saglio G, Tura S and the Italian Cooperative Study Group on Myeloid Leukemia. A randomized study of interferon-alpha versus interferon-alpha and low-dose arabinosyl cytosine in chronic myeloid leukemia. *Blood* 99, 1527-1535, 2002

Barila D, Superti Furga G. An intramolecular SH3-domain interaction regulates c-Abl activity. *Nat genet*, 18, 280-282, 1998

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

Baskaran R, Wood LD, Whitaker LL, Canman CE, Morgan SE, Xu Y, Barlow C, Baltimore D, Wynshaw BA, Kastan MB, Wang JY. Ataxia telangiectasia mutant protein activates c-Abl tyrosine kinase in response to ionizing radiation. *Nature*, 387, 516-519, 1997

Bathia R, Holtz M, Niu N, Gray R, Snyder DS, Sawyers CL, Arber DA, Slovak ML, Forman SJ. Persistence of malignant hematopoietic progenitors in chronic myelogenous leukemia patients in complete cytogenetic remission following imatinib mesylate treatment. *Blood*, 101, 4701-4707, 2003

Bhatia R, Munthe HA, Verfaillie CM. Tyrphostin AG957, a tyrosine kinase inhibitor with anti-BCR/ABL tyrosine kinase activity restores beta1 integrin-mediated adhesion and inhibitory signaling in chronic myelogenous leukemia hematopoietic progenitors. *Leukemia*, 12(11), 1708-1717, 1998

Ben-Neriah Y, Bernardis A, Paskind M, Daley GQ, Baltimore D. Alternative 5' exons in c-abl mRNA. *Cell*, 44, 577-586, 1986

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

Bennett JH. Case of hypertrophy of the spleen and liver in which death took place from suppuration of the blood. *Edinburgh Medical and Surgical Journal*, 64, 413-423, 1845

Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signalling. *Nature*, 411, 355-365, 2001

Bonifazi F, de Vivo A, Rosti G, Guilhot F, Guilhot J, Trabacchi E, Hehlmann R, Hochhaus A, Sheperd PCA, Steegmann JL, Kluin-Nelemans HC, Thaler J, Simonsson B, Louwagi A, Reiffers J, Mahon FX, Montefusco E, Alimena G, Hasford J, Richards S, Saglio G, Testoni N, Martinelli G, Tura S, Baccarani M, for the European Study Group on Interferon in Chronic Myeloid Leukemia. Chronic myeloid leukemia and α interferon. A study of complete cytogenetic responders. *Blood* 98, 3074-3081, 2001

Bose S, Deininger M, Gora-Tybor J, Goldman JM, Melo JV. 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*, 92, 3362-3367, 1998

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

Branford S, Rudzki Z, Harper A, Grigg A, Taylor K, Durrant S, Arthur C, Browett P, Schwarzer AP, Ma D, Seymour JF, Bradstock K, Joske D, Lynch K, Gathmann I, Hughes TP. Imatinib produces significantly superior molecular responses compared to interferon alfa plus cytarabine in patients with newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic phase. *Leukemia*, 17(12), 2401-2409, 2003

Von Bubnoff N, Schneller F, Peschel C, Duyster J. BCR-ABL gene mutations in relation to clinical resistance of Philadelphia-chromosome-positive leukaemia to STI571: a prospective study. *Lancet* 359, 487-491, 2002

Buchdunger E, Zimmermann J, Mett H, Meyer T, Müller M, Druker BJ, Lydon NB. Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylaminopyrimidine derivative. *Cancer Res*, 56, 100-104, 1996

Buchdunger E, Zimmermann J, Mett H, Meyer T, Müller M, Regenass U, Lydon NB. 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 USA*, 92, 2558-2562, 1995

Canaani E, Steiner-Saltz D, Aghai E, Gale RP, Berrebi A, Januszewicz E. Altered transcription of an oncogene in chronic myeloid leukaemia. *Lancet* 1, 593-595, 1984

Carlesso N, Frank DA, Griffin JD. Tyrosyl phosphorylation and DNA binding activity of signal transducers and activators of transcription (STAT) proteins in hematopoietic cell lines transformed by Bcr/Abl. *J Exp Med*, 183, 811-820, 1996

Carroll M, Ohno Jones S, Tamura S, Buchdunger E, Zimmermann J, Lydon NB, Gilliland DG, Druker B. CGP57148, a tyrosine kinase inhibitor, inhibits the growth of cells expressing BCR-ABL, TEL-ABL and TEL-PDGFR fusion proteins. *Blood*, 90, 4947-4952, 1997

Cervantes F, Hernández-Boluda JC, Ferrer A, Cid J, Montserrat E. The changing profile of Ph-positive chronic myeloid leukemia at presentation: possible impact of earlier diagnosis on survival. *Haematologica*, 84, 324 – 327, 1999

Chase A, Grand F, Zhang JG, Blackett N, Goldman J, Gordon M. Factors influencing the false positive and negative rates of BCR-ABL fluorescence in-situ hybridization. *Genes, Chromosom Cancer*, 18, 246-253, 1997

Chen G, Yuan SS, Liu W, Xu Y, Trujillo K, Song B, Cong F, Goff SP, Wu Y, Arlinghaus R, Baltimore D, Gasser PJ, Park MS, Sung P, Lee EY. Radiation induced assembly of Rad51 and Rad 52 recombination complex requires ATM and c-Abl. *J Biol Chem*, 274, 12748-12752, 1999

Corbin AS, Buchdunger E, Pascal F, Druker BJ. Analysis of the structural basis of specificity of inhibition of the Abl kinase by STI571. *J Biol Chem*, 277, 32214-32219, 2002

Corsetti MT, Lerma E, Dejana A, Cavaliere M, Figari O, Vassallo F, Abate M, Luchetti S, Piaggio G, Parodi C, Pira GL, Manca F, Carella AM. Cytogenetic response to autografting in chronic myelogenous leukaemia correlates with the amount of BCR-ABL positive cells in the graft. *Experimental Hematology*, 28, 353, 2000

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

le Coutre P, Kreuzer KA, Massenkeil G, Baskaynak G, Zscheschang P, Genvresse I, Lupberger J, Mapara M, Dorken B, Arnold R. 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*, 17(12):2525-6, 2003

le Coutre P, Kreuzer KA, Na IK, Lupberger J, Holdhoff M, Appelt C, Schwarz M, Müller C, Gambacorti-Passerini C, Platzbecker U, Bonnet R, Ehninger G, and Schmidt CA. Determination of α -1 Acid Glycoprotein in Patients with Ph+ Chronic Myeloid Leukemia during the first 13 Weeks of Therapy with STI571. *Blood Cells Mol Dis*, 28 (1), 75-85, 2002

le Coutre P, Kreuzer K-A, Na IK, Schwarz M, Lupberger J, Holdhoff M, Baskaynak G, Gschaidmeier H, Platzbecker U, Ehninger G, Prejzner W, Huhn D, Schmidt CA. Imatinib in Philadelphia Chromosome Positive Chronic Phase CML Patients: Molecular and Cytogenetic Response Rates and Prediction of Clinical Outcome. *Am J Hematol*, 73:249-255, 2003

le Coutre P, Kreuzer KA, Pursche S, Bonin M, Leopold T, Baskaynak G, Dörken B, Ehninger G, Ottmann O, Jenke A, Bornhauser M, Schleyer E. Pharmacokinetics and cellular uptake of imatinib and its main metabolite CGP74588. *Cancer Chemother Pharmacol*. 53(4):313-23, 2004

le Coutre P, Mologni L, Cleris L, Marchesi E, Buchdunger E, Giardini R, Formelli F, Gambacorti-Passerini C. In vivo eradication of human BCR/ABL-positive leukemia cells with an ABL kinase inhibitor. *J Natl Cancer Inst*, 91(2),163-168, 1999

le Coutre P, Tassi E, Varella-Garcia M, Barni R, Mologni L, Cabrita G, Marchesi E, Supino R, Gambacorti-Passerini C. Induction of resistance to the Abelson inhibitor STI571 in human leukemic cells through gene amplification. *Blood*, 95, 1758-66, 2000

Daley GQ, van Etten RA, Baltimore D. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the p210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Science*, 247, 824-830, 1990

Dazzi F, Szydlo RM, Cross NC, Craddock C, Kaeda J, Kanfer E, Cwynarski K, Olavarria E, Yong A, Apperley JF, Goldman JM. Durability of response following donor lymphocyte infusions for patients who relapse after allogeneic stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia. *Blood* 96, 2712-2716, 2000

Deininger MWN, Bose S, Gora-Tybor J, Yan XH, Goldman JM, Melo JV. Selective induction of leukemia-associated fusion genes by high-dose ionizing radiation. *Cancer Res*, 58, 421-425, 1998

Deininger MW, Goldman JM, Lydon NB, Melo JV. The tyrosine kinase inhibitor CGP57148B selectively inhibits the growth of BCR-ABL positive cells. *Blood*, 90, 3691-3698, 1997

Deininger MW, Druker BJ. Specific Targeted Therapy of Chronic Myelogenous Leukemia with Imatinib. *Pharmacol Rev*, 55, 401-423, 2003

Demetri GD. Targeting c-kit mutations in solid tumors: Scientific rationale and novel therapeutic options. *Semin Oncol*, 28, 5, 19-26, 2001

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

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

Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal GM, Fanning S, Zimmermann J, Lydon NB. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med*, 2, 561-566, 1996

Druker BJ, Sawyers CL, Kantarjian H, Resta DJ, Fernandez Reese S, Ford JM, Capdeville R, Talpaz M. Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukaemia with the Philadelphia chromosome. *N Engl J Med*, 344, 1038-1042, 2001

Egan SE, Giddings BW, Brooks MW, Buday L, Sizeland AM, Weinberg RA. Association of Sos Ras exchange protein with Grb2 is implicated in tyrosine kinase signal transduction and transformation. *Nature*, 363, 45-51, 1993

Ehrlich P. *Farbenanalytische Untersuchungen zur Histologie und Klinik des Blutes*. Hirschwald, Berlin, 1891

Elefanty AG, Hariharan IK, Cory S. bcr-abl, the hallmark of chronic myeloid leukaemia in man, induces multiple myelopoeitic neoplasms in mice. *EMBO J*, 9, 1069-1078, 1990

Elmaagacli AH, Beelen DW, Trenn G, Schmidt O, Nahler M, Schaefer UW. Induction of a graft-versus-leukemia reaction by cyclosporin A withdrawal as immunotherapy for leukemia relapsing after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 23, 771-777, 1999

Emig M, Saussele S, Wittor H, Weisser A, Reiter A, Willer A, Berger U, Hehlmann R, Cross NCP, Hochhaus A. Accurate and rapid analysis of residual disease in patients with CML using specific fluorescent hybridization probes for real time quantitative RT-PCR. *Leukemia* 13, 1825-1832, 1999

Fialkow PJ, Gartler SM, Yoshida A. Clonal origin of chronic myelocytic leukemia in man. *Proc Natl Acad Arts Sci*, 58, 1468-1471, 1967

Fialkow PJ, Jacobson RJ, Papayanopoulou T. Chronic myelocytic leukemia: clonal origin in a stem cell common to the granulocyte, erythrocyte, and platelet monocyte/macrophage. *Am J Med*, 63, 125-130, 1977

Frank DA, Varticovski L. BCR/abl leads to the constitutive activation of Stat proteins, and shares an epitope with tyrosine phosphorylated Stats. *Leukemia*, 10, 1724-1730, 1996

Gambacorti-Passerini C, Barni R, le Coutre P, Zuchetti M, Cabrita G, Cleris L, Rossi F, Gianazza E, Brueggen J, Cozens R, Pioltelli P, Pogliani E, Corneo G, Formelli F, D'Inalci M. 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*, 92(20):1641-50, 2000

Gambacorti-Passerini C, le Coutre P, Mologni L, Fanelli M, Bertazzoli C, Marchesi E, Di Nicola M, Biondi A, Corneo GM, Belotti D, Pogliani E, Lydon NB. Inhibition of the ABL kinase activity blocks the proliferation of BCR/ABL+ leukemic cells and induces apoptosis. *Blood Cells Mol Dis*, 23(3),380-94, 1997

Gambacorti-Passerini C, le Coutre P, Tassi E, Ruchatz H. Gene amplification the most likely mechanism of resistance to STI571 in LAMA84R cells. *Blood*, 96 (12):4004-5, 2000

Gambacorti-Passerini C, le Coutre P, Zuchetti M, D'Inalci M. Binding of imatinib by alpha(1)-acid glycoprotein. *Blood*,100(1), 367-8, 2002

Garcia-Isidoro M, Tabernero MD, Garcia JL, Najera ML, Hernandez JM, Wiegant J, Raap A, San Miguel J, Orfao A. Detection of the Mbcrl/abl translocation in chronic myeloid leukemia by fluorescence in situ hybridization: comparison with conventional cytogenetics and implications for minimal residual disease detection. *Hum Pathol*, 28, 154-159, 1997

Gewirtz AM. Antisense oligonucleotide therapeutics for human leukaemia. *Crit Rev Oncog* 8(1), 93-109, 1997

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

Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K, Hsu N, Paquette R, Rao PN, Sawyers CL. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science*, 293, 976-880, 2001

Grandis JR, Chakraborty A, Zeng Q, Melhem MF, Tweardy DJ. Downmodulation of TGF- α protein expression with antisense oligonucleotides inhibits proliferation of head and neck squamous carcinoma but not normal mucosal epithelial cells. *J Cell Biochem*, 69, 55-62, 1998

Gratwohl A, Hermans J, Goldman JM, Arcese W, Carreras E, Devergie A, Frassoni F, Gahrton G, Kolb HJ, Niederwieser D, Ruutu T, Vernant JP, de Witte T, Apperley J. Risk assessment for patients with chronic myeloid leukemia before allogeneic blood or marrow transplantation. Chronic Leukemia Working party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Lancet* 1087-1092, 1998

Griffin JD, Todd RF, Ritz J, Nadler LM, Canellos GP, Rosenthal D, Gallivan M, Beveridge RP, Weinstein H, Karp D, Schlossman SF. Differentiation patterns in blastic phase of chronic myeloid leukemia. *Blood*, 61, 85-91, 1983

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

Grosveld G, Verwoerd T, van Agthoven T, de Klein A, Ramachandran KL, Heisterkamp N, Stam K, Groffen J. The chronic myelocytic cell line K562 contains a breakpoint in bcr and produces a chimeric bcr/c-abl transcript. *Mol Cell Biol*, 6, 607-616, 1986.

Guilhot F, Chastang C, Michallet M, Guerci A, Harousseau JL, Maloisel F, Bouabdallah R, Guyotat D, Cheron N, Nicolini F, Abgrall JF, Tanzer J for the French Chronic Myeloid Leukemia Study Group. Interferon alfa-2b combined with cytarabine versus interferon alone in chronic myelogenous leukemia. *N Engl J Med*, 337, 223-229, 1997

Haferlach T, Winkemann M, Löffler H, Schoch R, Gassmann W, Fonatsch C, Schoch C, Poetsch M, Weber Matthiasen K, Schlegelberger B. The abnormal eosinophils are part of the leukemic cell population in acute myelomonocytic leukemia with abnormal eosinophils (AML M4Eo) and carry the pericentric inversion 16: a combination of May-Grünwald-Giemsa staining and fluorescence in situ hybridization. *Blood*, 87, 2459-2463, 1996

Hanks SK, Hunter T. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J*, 9, 576-586, 1995

Hariharan IK, Adams JM. CDNA sequence for human bcr, the gene that translocates to the abl oncogene in chronic myeloid leukaemia. *EMBO J*, 6, 115-119, 1987

Hasford J, Pffirmann M, Hehlmann R, Allan NC, Baccarani M, Kluijn-Nelemans JC, Alimena G, Steegmann JL, Ansari H. A new prognostic score for survival of patients with chronic myeloid leukemia treated with interferon alfa. *J Natl Cancer Inst*, 90, 850-858, 1998

Hehlmann R, Berger U, Pffirmann M, Hochhaus A, Metzgeroth G, Maywald O, Hasford J, Reiter A, Hossfeld DK, Kolb HJ, Löffler H, Pralle H, Queisser W, Griesshammer M, Nerl C, Kuse R, Tobler A, Eimermacher H, Tichelli A, Aul C, Wilhelm M,

Fischer JT, Perker M, Scheid C, Schenk M, Weiss J, Meier CR, Kremers S, Iabedzki L, Schmeiser T, Lohrmann HP, Heimpel H and the German CML-Study Group. Randomized comparison of interferon alpha and hydroxyurea with hydroxyurea monotherapy in chronic myeloid leukemia (CML-study II): prolongation of survival by the combination of interferon alpha and hydroxyurea. *Leukemia* 17, 1529-1537, 2003

Hehlmann R, Heimpel H, Hasford J, Kolb HJ, Pralle H, Hossfeld DK, Queißer W, Löffler H, Hochhaus A, Heinze B, Georgii A, Bartram CR, Griebhammer M, Bergmann L, Essers U, Falge C, Queißer U, Meyer P, Schmitz N, Eimermacher H, Walther F, Fett W, Kleeberg UR, Käbisch A, Nerl C, Zimmermann R, Meuret G, Tichelli A, Kanz L, Tigges FJ, Schmid L, Brockhaus W, Tobler A, Reiter A, Perker M, Emmerich B, Verpoort K, Zankovich R, v Wussow P, Prümmer O, Thiele J, Buhr T, Carbonell F, Ansari H. Randomized Comparison of Interferon- α With Busulfan and Hydroxyurea in Chronic Myelogenous Leukemia. *Blood*, 84,12, 4064-4077, 1994

Heisterkamp N, Jenster G, ten Hoeve J, Zovich D, Pattengale PK, Groffen J. Acute leukaemia in bcr/abl transgenic mice. *Nature* 344, 251-253, 1990

Heisterkamp N, Stam K, Groffen J, de Klein A, Grosveld G. Structural organization of the bcr gene and its role in the Ph translocation. *Nature*, 315, 758-761, 1985

Heyssel R, Brill B, Woodbury L. Leukemia in Hiroshima bomb survivors. *Blood*, 15, 313, 1960

Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR: Real time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* 11, 1026-1030, 1993

Hochhaus A, Kreil S, Corbin AS, La Rosee P, Müller MC, Lahaye T, Hanfstein B, Schoch C, Cross NC, Berger U, Gschaidmeier H, Druker BJ, Hehlmann R. Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (STI571) therapy. *Leukemia* 16, 2190-2196, 2002

Hughes TP, Kaeda J, Branford S, Rudzki Z, Hochhaus A, Hensley ML, Gathmann I, Bolton AE, van Hoomissen IC, Goldman JM, Radich JP. Frequency of major molecular responses to imatinib or interferon alfa plus cytarabine in newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine* 349 (15): 1423-1432, 2003

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

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

Jonuleit T, Peschel C, Schwab R, van der Kuip H, Buchdunger E, Fischer T, Huber C, Aulitzky WE. Bcr-Abl kinase promotes cell cycle entry of primary myeloid CML cells in the absence of growth factors. *Br J Haematol*, 100, 295-303, 1998

Jørgensen HG, Elliott MA, Allan EK, Carr CE, Holyoake TL, Smith. Alpha 1 – acid glycoprotein expressed in the plasma of chronic myeloid leukemia patients does not mediate significance in vitro resistance to STI571. *Blood*, 99(2), 713 – 715, 2002

Kantarjian HM, Talpaz M, Cortes J, O'Brien S, Faderls S, Thomas D, Giles F, Rios MB, Shan J, Arlinghaus R. Quantitative polymerase chain reaction monitoring of BCR-ABL during therapy with imatinib mesilate (STI571; gleevec) in chronic-phase chronic myelogenous leukemia. *Clin Cancer Res*, 9(1), 160-166, 2003

Kantarjian H, Sawyers C, Hochhaus A, Guilhot F, Schiffer C, Gambacorti-Passerini C, Niederwieser D, Resta D, Capdeville R, Zoellner U, Talpaz M, Druker B, Goldman J, O'Brien SG, Russell N, Fischer T, Ottmann O, Cony-Makhoul P, Facon T, Stone R, Miller C, Tallman M, Brown R, Schuster M, Loughran T, Gratwohl A, Mandelli F, Saglio G, Lazzarino M, Russo D, Baccarani M, Morra E; International STI571 CML Study Group. Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukaemia. *N Engl J Med*, 346, 645-652, 2002

Kaur G, Gazit A, Levitzki A, Stowe E, Cooney DA, Sausville EA. Tyrphostin induced growth inhibition: correlation with effect on p210bcr-abl autokinase activity in K562 chronic myelogenous leukemia. *Anticancer Drugs*, 5(2), 213-222, 1994

Kharbanda S, Pandey P, Jin S, Inoue S, Bharti A, Yuan ZM, Weichselbaum R, Weaver D, Kufe D. Functional interaction between DNA-PK and c-Abl in response to DNA damage. *Nature*, 386, 732-735, 1997

Kipreos ET, Wang JY. Cell cycle-regulated binding of c-Abl tyrosine kinase to DNA. *Science*, 256, 382-385, 1992

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

Kluin-Nelemans HC, Buck G, le Cessie S, Richards S, Beverloo HB, Falkenburg JH, Littlewood T, Muus P, Bareford D, van der Lelie H, Green AR, Roozendaal KJ, Milne AE, Chapman CS, Sheperd P; MRC and HOVON groups. Randomized comparison of low-dose versus high-dose interferon-alpha in chronic myeloid leukemia: prospective collaboration of 3 joint trials by the MRC and HOVON groups. *Blood* 103, 4408-4415, 2004

Kolb HJ, Mittermüller J, Clemm C, Holler E, Ledderose G, Brehm G, Heim M, Wilmanns W. Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. *Blood* 76, 2462-2465, 1990

Kolb HJ, Schattenberg A, Goldman JM, Hertenstein B, Jacobsen N, Arcese W, Ljungman P, Ferrant A, Verdonck L, Niederwieser D, van Rhee F, Mittermüller J, de Witte T, Holler E, Ansari H: European Group for Blood and Marrow Transplantation Working Party Chronic Leukemia. Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. *Blood* 86, 2041-2050, 1995

Kolb HJ, Schmid C, Barrett AJ, Schendel DJ. Graft-versus-leukemia reactions in allogeneic chimeras. *Blood* 103, 767-776, 2004

Konopka JB, Watanabe SM, Witte ON. An alteration of the human c-abl protein in K562 leukemia cells unmasks associated tyrosine kinase activity. *Cell*, 37, 1035-1042, 1984

Kozubek S, Lukasova E, Ryznar L, Kozubek M, Liskova A, Govorun RD, Krasavin EA. Distribution of ABL and BCR genes in cell nuclei of normal and irradiated lymphocytes. *Blood*, 89, 4537-4545, 1997

Kreuzer KA, le Coutre P, Landt O, Na IK, Schwarz M, Schultheis K, Hochhaus A, Dörken B. Preexistence and evolution of imatinib mesylate-resistant clones in chronic myelogenous leukemia detected by a PNA-based PCR clamping technique. *Ann Hematol* 82 :284-9, 2003

Kreuzer KA, Klühs C, Schwarz M, Dörken B, le Coutre P. Safety and efficacy of stem cell mobilization under imatinib therapy. *Haematologica*, 88(10):1199-2000, 2003

Kreuzer KA, Kluhs C, Baskaynak G, Movassaghi K, Dorken 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*, 124(2):195-9, 2004

Krupa A, Srinivasan N. The repertoire of protein kinases encoded in the draft version of the human genome: atypical variations and uncommon domain combinations. *Genome Biol*, 2002, 3 (12):research0066.1-006614

Larghero J, Leguay T, Mourah S, Madelaine-Chambrin I, Taksin AL, Raffoux E, Bastie JN, Degos L, Berthaud P, Maroll JP, Calvo F, Chomienne C, Mahon FX, Rousselot P. Relationship between elevated levels of the alpha 1 acid glycoprotein in chronic myelogenous leukemia in blast crisis and pharmacological resistance to imatinib (Gleevec) in vitro and in vivo. *Biochem Pharmacol*, 66(10), 1907-1913, 2003

Lewis JM, Schwartz MA. Integrins regulate the association and phosphorylation of paxillin by c-Abl. *J Biol Chem*, 273, 14225-14230, 1998

Longley BJ, Reguera MR, Ma Y. Classes of c-KIT activating mutations: proposed mechanism of action and implications for disease classification and therapy. *Leukemia Res*, 25, 571-576, 2001

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

Ma G, Lu D, Wu Y, Liu J, Arlinghaus RB. Bcr phosphorylation on tyrosine 177 binds Grb2. *Oncogene*, 14, 2367-2372, 1997

Madhusudan S, Ganesan TS. Tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *Clin Biochem*, 37, 618-635, 2004

Mahon FX, Deininger MWN, Schultheis B, Chabrol J, Reiffers J, Goldman JM, Melo JV. Selection and characterization of BCR-ABL positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor STI571: diverse mechanisms of resistance. *Blood*, 96, 1070-1079, 2000

Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. The Protein Kinase Complement of the Human Genome. *Science*, 298, 1912-1934, 2002

Maru Y and Witte ON. The BCR gene encodes a novel serine/threonine kinase activity within a single exon. *Cell*, 67, 459-468, 1991

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

McWhirter JR, Galasso DL, Wang JY. A coiled-coil oligomerization domain of Bcr is essential for the transforming function of Bcr-Abl oncoproteins. *Mol Cell Biol*, 13, 7587-7595, 1993

McWhirter JR, Wang JY. An actin-binding function contributes to transformation by the Bcr-Abl oncoprotein of Philadelphia chromosome-positive human leukemias. *EMBO J*, 12, 1533-1546, 1993

Meden H, Kuhn W. Overexpression of the oncogene c-erbB-2 (HER2/neu) in ovarian cancer: a new prognostic factor. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 71, 173-179, 1997

Melo JV, Gordon DE, Cross NC, Goldman JM. The ABL-BCR fusion gene is expressed in chronic myeloid leukemia. *Blood*, 81, 158-165, 1993

Mes-Masson AM, McLaughlin J, Daley G, Paskind M, Witte ON. Overlapping cDNA clones define the complete coding region for the p210+ *c-abl* gene product associated with chronic myelogenous leukemia cells containing the Philadelphia chromosome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 83, 9768-9772, 1986

Merx K, Müller MC, Kreil S, Lahaye T, Paschka P, Schoch C, Weisser A, Kuhn C, Berger U, Gschaidmeier H, Hehlmann R, Hochhaus A. Early reduction of BCR-ABL mRNA transcript levels predict cytogenetic response in chronic phase CML patients treated with imatinib after failure of interferon alpha. *Leukemia*, 16(9), 1579-1583, 2002

Million RP, Aster J, Gilliland G, Van Etten RA. The Tel-Abl (ETV6-Abl) tyrosine kinase, product of complex (9;12) translocations in human leukemia, induces distinct myeloproliferative disease in mice. *Blood*, 99, 4568-4577, 2002

Million RP, Van Etten RA. The Grb2 binding site is required for the induction of chronic myeloid leukemia-like disease in mice by the Bcr/Abl tyrosine kinase. *Blood* 96, 664-670, 2000

Morris S, Kirstein MN, Valentine MB, Dittmer KG, Shapiro DN, Saltman DL, Look AT. Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science*, 263, 1281-1284, 1994

Müller MC, Gattermann N, Lahaye T, Deininger MW, Berndt A, Fruehauf S, Neubauer A, Fischer T, Hossfeld DK, Schneller F, Krause SW, Nerl C, Sayer HG, Ottmann OG, Waller C, Aulitzky W, le Coutre P, Freund M, Merx K, Paschka P, König H, Kreil S, Berger U, Gschaidmeier H, Hehlmann R, Hochhaus A. Dynamics of BCR-ABL mRNA expression in first-line therapy of chronic myelogenous leukemia patients with imatinib or interferon alpha/ara-C. *Leukemia*, 17(12):2392-400, 2003

Na I-K, Kreuzer K-A, Lupberger J, Dörken B, le Coutre P. Quantitative RT-PCR of Wilms tumor gene transcripts (WT1) for the molecular monitoring of patients with accelerated phase bcr/abl + CML. *Leuk Res*, 29(3), 343-345, 2005

Nagar B, Bornmann WG, Pellicena P, Schindler T, Veach DR, Miller WT, Clarkson B, Kuriyan J. Crystal structures of the kinase domain of c-Abl in complex with the small molecule inhibitors PD173955 and imatinib (STI-571). *Cancer Res*, 62, 4236-4243, 2002

Najfeld V, Cuttner J, Figur A, Kawasaki ES, Witte ON, Clark SS. P185BCR-ABL in two patients with late appearing Philadelphia chromosome-positive acute nonlymphocytic Leukemia. *Leukemia*, 3, 841, 1989

National Cancer Institute: Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) Program. Public use CD-ROM (1973-94) released October 1997, based on the August 1996 submission. National Cancer Institute, DCPC, Surveillance Program, Cancer Statistics Branch, Bethesda, MD, USA

Neumann E. Ein Fall von Leukämie mit Erkrankungen des Knochenmarkes. *Archives Heilkunde*, 1870

Neves H, Ramos C, da Silva MG, Parreira A, Parreira L. The nuclear topography of ABL, BCR, PML, and RAR α genes: evidence for gene proximity in specific phases of the cell cycle and stages of hematopoietic differentiation. *Blood*, 93, 1197-1207, 1999

Nicholson RI, Gee JM, Harper ME. EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer*, 37, 4, 9-15, 2001

Nowell P, Hungerford DA. A minute chromosome in human granulocytic Leukemia. *Science*, 132, 1497, 1960

O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA, Gathmann I, Baccarani M, Cervantes F, Cornelissen JJ, Fischer T, Hochhaus A, Hughes T, Lechner K, Nielsen JL, Rousselot P, Reiffers J, Saglio G, Shepherd J, Simonsson B, Gratwohl A, Goldman JM, Kantarjian H, Taylor K, Verhoef G, Bolton AE, Capdeville R, Druker BJ. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine* 348 (11): 994-1004, 2003

Parise RA, Ramanathan RK, Hayes MJ, Egorin MJ. Liquid chromatography-mass spectrometric assay for quantitation of imatinib and its main metabolite (CGP74588) in plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 791 (1-2), 39-44, 2003

Paschka P, Müller MC, Merx K, Kreil S, Schoch C, Lahaye T, Weisser A, Petzold A, König H, Berger U, Gschaidmeier H, Hehlmann R, Hochhaus A. Molecular monitoring of response to imatinib (Glivec) in CML patients pretreated with interferon alpha. Low levels of residual disease are associated with continuous remission. *Leukemia*, 17(9), 1687-1694, 2003

Pendergast AM, Gishizky ML, Havlik MH, Witte ON. SH1 domain autophosphorylation of p210 BCR/ABL is required for transformation but not growth factor independence. *Mol Cell Biol*, 13, 1728-1736, 1993

Piney A. *Recent Advances in Haematology*, 3rd edn., Churchill, London, 40-79, 1931

Preston DL, Kusumi S, Tomonaga M, Izumi S, Ron E, Kuramoto A, Kamada N, Dohy H, Matsui T, Nonaka H, Thompson DE, Soda M, Mabuchi K. Cancer incidence in atomic bomb survivors. Part III. Leukemia, lymphoma and multiple myeloma, 1950-1987. *Radiat Res*, 137, 68-97, 1994

Preudhomme C, Révillion F, Merlat A, Hornez L, Roumier C, Duflos-Grardel N, Jouet JP, Cosson A, Peyrat JP, Fenaux P. Detection of BCR-ABL transcripts in chronic myeloid leukemia (CML) using a "real time" quantitative RT-PCR assay. *Leukemia* 13, 957-964, 1999

Ratajczak MZ, Hijiya N, Catani L, DeRiel K, Luger SM, McGlave P, Gewirtz AM. Acute- and chronic-phase chronic myelogenous leukemia colony-forming units are highly sensitive to the growth inhibitory effects of c-myb antisense oligodeoxynucleotides. *Blood* 79(8), 1956-61, 1992

Reuther GW, Fu H, Cripe LD, Collier RJ, Pendergast AM. Association of the protein kinases c-Bcr and Bcr-Abl with proteins of the 14-3-3 family. *Science*, 266, 129-133, 1994

Roche-Lestienne C, Soenen-Cornu V, Grardel-Duflos N, Lai JL, Philippe N, Facon T, Fenaux P, Preudhomme C. Several types of mutations of the Abl gene can be found in chronic myeloid leukemia patients resistant to STI571 and they can pre-exist to the onset of treatment. *Blood* 100, 1014-1018, 2002

Romero P, Beran M, Shtalrid M, Andersson B, Talpaz M, Blick M. Alternative 5' end of the bcr-abl transcript in chronic myelogenous leukemia. *Oncogene*, 4, 93-98, 1989

Ron D, Zannini M, Lewis M, Wickner RB, Hunt LT, Graziani G, Tronick SR, Aaronson SA, Eva A. A region of proto-dbl essential for its transforming activity shows sequence similarity to a yeast cell cycle gene, CDC24 and the human breakpoint cluster gene, bcr. *New Biol*, 3, 372-379, 1991

Roumiantsev S, Shah NP, Gorre ME, Nicoll J, Brasher BB, Sawyers CL, Van Etten RA. Clinical resistance to the kinase inhibitor STI-571 in chronic myeloid leukemia by mutation of Tyr-253 in the Abl kinase domain P-loop. *Proc Natl Acad Sci*, 99, 10700-10705, 2002

Rowley JD. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature*, 243, 290-293, 1973

Sadasivan R, Morgan R, Jennings S, Austenfeld M, Van Veldhuizen P, Stephens R, Noble M. Overexpression of Her-2/neu may be an indicator of poor prognosis in prostate cancer. *J Urol*, 150, 126-131, 1993

Saglio G, Guerrasio A, Rosso C, Zaccaria A, Tassinari A, Serra A, Rege Cambrin G, Mazza U, Gavosto F. New type of Bcr/Abl junction in Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia. *Blood*, 76, 1819-24, 1990

Sanchez-Garcia I, Martin-Zanca D. Regulation of Bcl-2 gene expression by BCR-ABL is mediated by Ras. *J Mol Biol*, 267, 225-228, 1997

Sattler M, Salgia R, Okuda K, Uemura N, Durstin MA, Pisick E, Xu G, Li JL, Prasad KV, Griffin JD. The proto-oncogene product p120CBL and the adaptor proteins CRKL and c-CRK link c-ABL, p190BCR/ABL and p210BCR/ABL to the phosphatidylinositol-3' kinase pathway. *Oncogene*, 12, 839-846, 1996

Sattler M, Salgia R, Shrikhande G, Verma S, Uemura N, Law SF, Golemis EA, Griffin JD. Differential signaling after beta 1 integrin ligation is mediated through binding of CRKL to p120(CBL) and p110(HEF1). *J Biol Chem*, 272, 14320 – 14326, 1997

Sawyers CL, Callahan W, Witte ON. Dominant negative MYC blocks transformation by ABL oncogenes. *Cell*, 70, 901-910, 1992

Sawyers CL, Hochhaus A, Feldman E, Goldman JM, Miller CB, Ottmann OG, Schiffer CA, Talpaz M, Guilhot F, Deininger MW, Fischer T, O'Brien SG, Stone RM, Gambacorti-Passerini CB, Russel NH, Reiffers JJ, Shea TC, Chapuis B, Coutre S, Tura S, Morra E, Larson RA, Saven A, Peschel C, Gratwohl A, Mandelli F, Ben-Am M, Gathmann I, Capdeville R, Paque RL, Druker BJ. Imatinib induces hematologic and cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukaemia in myeloid blast crisis: results of a phase II study. *Blood*, 99, 3530-3539, 2002

Sawyers CL, McLaughlin J, Goga A, Havlik M, Witte O. The nuclear tyrosine kinase c-Abl negatively regulates cell growth. *Cell*, 77, 121-131, 1994

Sawyers CL, McLaughlin J, Witte ON. Genetic requirement for Ras in the transformation of fibroblasts and hematopoietic cells by the Bcr-Abl oncogene. *J Exp Med*, 181, 307-313, 1995

Schleyer E, Pursche S, Kohne CH, Schuler U, Renner U, Gschaidmeier H, Freiberg-Richter J, Leopold T, Jenke A, Bonin M, Bergemann T, le Coutre P, Gruner M, Bornhauser M, Ottmann OG, Ehninger G. Liquid chromatographic method for detection and quantitation of STI-571 and its main metabolite N-desmethyl-STI in plasma, urine, cerebrospinal fluid, culture medium and cell preparations. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 799(1):23-36, 2004

Schindler T, Bornmann W, Pellicena P, Miller WT, Clarkson B, Kuriyan J. Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase. *Science*, 289, 1938-1942, 2000

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

Schwartzberg PL, Stall AM, Hardin JD, Bowdish KS, Humaran T, Boast S, Harbison ML, Robertson EJ, Goff SP. Mice homozygous for the *abl*1 mutation show poor viability and depletion of selected B and T cell populations. *Cell* 65, 1165-1175, 1991

Schwarz M, Kreuzer KA, Baskaynak G, Dorken B, le Coutre P. Imatinib-induced acute generalized exanthematous pustulosis (AGEP) in two patients with chronic myeloid leukemia. *Eur J Haematol.* 69(4):254-6, 2002.

Selvaggi G, Scagliotti GV, Torri V, Novello S, Leonardo, Cappia S, Mossetti C, Ardisson F, Borasio P. Her-2/neu overexpression in patients with radically resected nonsmall cell lung carcinoma. Impact on long-term survival. *Cancer*, 94, 2669-2674, 2002

Shah NP, Nicoll JM, Nagar B, Gorre ME, Paquette RL, Kuriyan J, Sawyers CL. Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia. *Cancer Cell*, 2, 117-125, 2002

Shah NP, Tran C, Lee FY, Chen P, Norris D, Sawyers CL. Overriding imatinib resistance with a novel ABL kinase inhibitor. *Science*, 305, (5682): 399-401, 2004

Shafman T, Khanna KK, Kedar P, Spring K, Kozlov S, Yen T, Hobson K, Gatei M, Zhang N, Watters D, Egerton M, Shiloh Y, Kharbanda S, Kufe D, Lavin MF. Interaction between ATM protein and c-Abl in response to DNA damage. *Nature*, 387, 520-523, 1997

Shepherd P, Suffolk R, Halsey J, Allan N. Analysis of molecular breakpoint and m-RNA transcripts in a prospective randomized trial of interferon in chronic myeloid leukemia: no correlation with clinical features, cytogenetic response, duration of chronic phase, or survival. *Br J Haematol*, 89, 546-554, 1991

Shtivelman E, Lifshitz B, Gale RP, Roe BA, Canaani E. Fused transcript of *abl* and *bcr* genes in chronic myelogenous leukaemia. *Nature*, 315, 550-554, 1985

Shtivelman E, Lifshitz B, Gale RP, Roe BA, Canaani E. Alternative splicing of RNAs transcribed from the human *abl* gene and from the *bcr-abl* fused gene. *Cell*, 47, 277-284, 1986

Shuai K, Halpern J, ten Hoeve J, Rao X, Sawyers CL. Constitutive activation of STAT5 by the BCR-ABL oncogene in chronic myelogenous leukemia. *Oncogene*, 13, 247-254, 1996

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

Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J, Norton L. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med*, 344, 783-792, 2001

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

Talpaz M, Silver RT, Druker BJ, Goldman JM, Gambacorti-Passerini C, Guilhot F, Schiffer CA, Fischer T, Deininger MW, Lennard AL, Hochhaus A, Ottmann OG, Gratwohl A, Baccarani M, Stzone R, Tura S, Mahon FX, Fernandes-Reese S,

Gathmann I, Capdeville R, Kantarjian HM, Sawyers CL. Imatinib induces durable hematologic and cytogenetic responses in patients with accelerated phase chronic myeloid leukaemia: results of a phase 2 study. *Blood*, 99, 1928-1937, 2002

Tauchi T, Boswell HS, Leibowitz D, Broxmeyer HE. Coupling between p210bcr-abl and Shc and Grb2 adaptor proteins in hematopoietic cells permits growth factor receptor-independent link to ras activation pathway. *J Exp Med*, 179, 167-175, 1994

Tandon AK, Clark GM, Chamness GC, Ullrich A, McGuire WL. Her-2/neu oncogene protein and prognosis in breast cancer. *J Clin Oncol*, 7, 1120-1128, 1989

Taniguchi M, Nishida T, Hirota S, Isozaki K, Ito T, Nomura T, Matsuda H, Kitamura Y. Effect of c-KIT mutation on prognosis of gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res*, 59, 4297-4300, 1999

Tybulewicz VL, Crawford CE, Jackson PK, Bronson RT, Mulligan RC. Neonatal lethality and lymphopenia in mice with a homozygous disruption of the c-abl proto-oncogen. *Cell* 65, 1153-1163, 1991

Virchow R. Weisses Blut. *Frorieps Notizen*, 36, 151-156, 1845

Virchow R. Weisses Blut und Milztumore. *Medicale Zeitung*, 16, 9-15, 1847

Voncken JW, van Schaick H, Kaartinen V, Deemer K, Coates T, Landing B, Pattengale P, Dorseuil O, Bokoch GM, Groffen J, Heisterkamp N. Increased neutrophil respiratory burst in bcr-null mutants. *Cell* 80, 719-728, 1995

Weisberg E, Griffin JD. Mechanism of resistance to the ABL tyrosine kinase inhibitor STI571 in BCR/ABL transformed hematopoietic cell lines. *Blood*, 95, 3498-3505, 2000

Weisberg E, Manley PW, Breitenstein W, Brugger J, Cowan-Jacob SW, Ray A, Huntly B, Fabbro D, Fendrich G, Hall-Meyers E, Kung AL, Mestan J, Daley GQ, Callahan L, Catley L, Cavazza C, Azam M, Neuberg D, Wright RD, Gilliland DG, Griffin. Characterization of AMN107, a selective inhibitor of native and mutant Bcr-Abl. *Cancer Cell*, 2: 129-41, 2005

Westbrook CA, Hooberman AL, Spino C, Dodge RK, Larson RA, Davey F, Wurster-Hill DH, Sobol RE, Schiffer C, Bloomfield CD. Clinical significance of the BCR-ABL fusion gene in adult acute lymphoblastic leukemia: a Cancer and Leukemia Group B Study (8762). *Blood* 80, 2983-2990, 1992

Westin EH, Wong-Staal F, Gelmann EP, Dalla-Favera R, Papas TS, Lautenberger JA, Eva A, Reddy EP, Tronick SR, Aaronson SA, Gallo RC. Expression of cellular homologue of retroviral oncogenes in human hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 79, 2490-2494, 1982

Wu CJ, Neuberg D, Chillemi A, McLaughlin S, Hochberg EP, Galinsky I, DeAngelo D, Soiffer RJ, Alyea EP, Capdeville R, Stone RM, Ritz J. Quantitative monitoring of BCR/ABL transcript during STI-571 therapy. *Leuk Lymphoma*, 43(12), 2281-2289, 2002

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

Yuan ZM, Huang Y, Ishiko T, Nakada S, Utsugisawa T, Kharbanda S, Wang R, Sung P, Shinohara A, Weichselbaum R, Kufe D. Regulation of Rad51 function by c-Abl in response to DNA damage. *J Biol Chem*, 273, 3799-3802, 1998

Zha J, Harada H, Yang E, Jockel J, Korsmeyer SJ. Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell*, 87, 619-628, 1996

Zhou H, Randall RL, Brothman AR, Maxwell T, Coffin CM, Goldsby RE. Her-2/neu expression in osteosarcoma increases risk of lung metastasis and can be associated with gene amplification. *J Pediatr Hematol Oncol*, 25, 27-32, 2003

8. Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt allen ehemaligen und gegenwärtigen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern meiner Arbeitsgruppe insbesondere Gökben Baskaynak, Dr. med. Il-Kang Na, Dr. med. Matthias Holdhoff, Michaela Schwarz, Christine Klühs, Joachim Lupberger, Dipl.-Biol. Christine Appelt und Zhera El-Mousleh, die entscheidend an den in dieser Arbeit beschriebenen Publikationen beteiligt sind.

Weiterhin danke ich Dr. med. Karl-Anton Kreuzer, der an vielen Fragestellungen, die im Laufe der gemeinsamen Zeit in unserer Arbeitsgruppe bearbeitet wurden, maßgeblichen und unersetzbaren Anteil hatte.

Mein besonderer Dank gilt Professor Dr. med. Bernd Dörken für seine wohlwollende Unterstützung und sein kritisches Interesse sowohl in wissenschaftlichen als auch in klinischen Projekten.

Professor emeritus Dr. med. Dieter Huhn und Professor Dr. med. Christian Schmidt danke ich für die hilfreiche Unterstützung während meiner Anfangszeit an der Charité.

Mein herzlicher Dank gilt Professor Dr. Carlo Gambacorti-Passerini, Mailand, der mich mit dem interessanten Gebiet onkogener Fusionsproteine vertraut gemacht hat und dessen wissenschaftlichen Rat unentbehrlich ist.

Besonders danke ich allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Professor Dr. Carlo Gambacorti-Passerini insbesondere Edoardo Marchesi, Dr. Luca Mogni und Dr. Gonçalo Cabrita.

Schließlich danke ich meinen Kooperationspartnern sowie deren Arbeitsgruppen. Mein Dank gilt dabei Priv.-Doz. Dr. med. Eberhard Schleyer, Dresden, und seiner Arbeitsgruppe, Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Andreas Jordan, Berlin, und seiner Arbeitsgruppe sowie auf klinischer Ebene Frau Professor Dr.med. Renate Arnold und PD. Dr. med. Gero Massenkeil.

Meinem Doktorvater Professor Dr. med. Petro E. Petrides, München, bin ich verbunden für die Unterstützung während der Anfänge meiner wissenschaftlichen Arbeit.

9. Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité Campus Virchow-Klinikum

Hiermit erkläre ich,

- daß weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wird bzw. wurde,
- keine staatsanwaltschaftlichen Ermittlungsverfahren gegen mich anhängig sind,
- daß die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfaßt, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Mittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.
- daß mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

27. Februar 2006

Dr. med. P. le Coutre