Aus dem Institut für Pathologie
der Universität zu Lübeck
- Direktor: Prof. Dr. med. A.C. Feller -

MicroRNA und mRNA Expressionsmuster bei *BCR-ABL1*-positiver CML und *JAK2* p.V617F-positiven chronisch-myeloproliferativen Erkrankungen

Inauguraldissertation

Zur Erlangung der Doktorwürde
Der Universität zu Lübeck

- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von

Herrn Niklas Gebauer
aus Göttingen

1. Berichterstatter/Berichterstatterin: Prof. Dr. med. Hartmut Merz

2. Berichterstatter/Berichterstatterin: Prof. Dr. med. Siegfried Görg

Tag der mündlichen Prüfung: 03.03.2014

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 03.03.2014

- Promotionskommission der Sektion Medizin -

Für Emil und Justus

1. Inhaltsverzeichnis

1. Inhaltsverzeichnis

2. Abkürzungen

3. Einleitung

4. Grundlagen

4.1 Die chronische myeloische Leukämie

4.1.1 Geschichtliches

4.1.2 Epidemiologie und Pathogenese

4.1.3 Klinik

4.1.4 Histopathologie

4.1.5 Molekularpathologie

4.2 Ph-negative myeloproliferative Neoplasien

4.2.1 Molekulargenetische Marker für Ph-negative Neoplasien

4.3 Imatinib

4.3.1 Struktur und Synthese

4.3.2 Wirkungsprofil

4.3.3 Therapie mit Imatinib

4.3.4 Kontrolle des Therapieerfolges

4.3.5 Resistenz und Resistenzmechanismen gegenüber Imatinib

4.4 Morphologie des Knochenmarks unter Imatinib

4.4.1 Therapieerfolg und morphologische Charakteristika

4.4.2 Morphologische Charakteristika bei Therapieversagen

4.5 MicroRNAs

4.5.1 Struktur, Synthese und Bedeutung

4.5.2 MicroRNAs bei CML und CMPEs

4.6 Fragestellung

5. Material und Methoden

5.1 Materialien

5.1.1 Puffer

5.1.2 Chemikalien
5.1.3 Antikörper
5.1.4 Oligonukliotide
5.1.5 Reagenzien
5.1.6 Kits
5.1.7 Geräte
5.1.8 Verbrauchsmaterialien
5.1.9 Software
5.1.10 In Silico Ressourcen
5.2 Methoden
5.2.1 Studiengruppe
5.2.1.1 Patientenproben
5.2.1.2 Charakteristika der Patienten/innen
5.2.2 Histopathologische Methoden:
5.2.2.1 Morphologie
5.2.2.2 Immunhistochemie
5.2.3 Molekularbiologische Methoden:
5.2.3.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren
5.2.3.2 Isolierung von Nukleinsäuren
5.2.3.2.1 DNA-Isolierung aus formalinfixiertem und in Paraffin eingebettetem Gewebe
5.2.3.2.2 RNA-Isolierung aus formalinfixiertem und in Paraffin eingebettetem Gewebe
5.2.3.3 Pyrosequenzierung der *JAK2*-Mutation c.1849 G>T, p.V617F
5.2.3.3.1 Primerdesign
5.2.3.3.2 PCR
5.2.3.3.3 Agarose-Gelelektrophorese
5.2.3.3.4 Immobilisierung der PCR-Produkte
5.2.3.3.5 Sequenzreaktion
5.2.3.4 Quantitative Real-Time-Polymerasekettenreaktion für MicroRNAs
5.2.3.4.1 Reverse Transkription
5.2.3.4.2 Real-Time Polymerase-Kettenreaktion
5.2.3.5 Quantitative Real-Time-Polymerasekettenreaktion für mRNAs
5.2.3.5.1 Reverse Transkription

5.2.3.5.2 Real-Time Polymerase-Kettenreaktion

5.3 Etablierung neuer immunhistochemischer Färbung für c-MYB

5.4 Statistik

6. Ergebnisse

6.1 Histopathologische Befunde unter Therapie mit Imatinib

6.1.1 Morphologie

6.1.2 Immunhistochemie

6.1.3 Lugli-Score

6.2 Quantitative MicroRNA-Expression bei CML

6.2.1 Vergleich der MicroRNA-Expression von CML und Normalgewebe

6.2.2 Vergleich der MicroRNA-Expression von CML vor sowie unter Therapie

6.2.3 Korrelationsanalyse der MicroRNA-Expression von CML unter Therapie und dem morphologischen Ansprechen

6.3 Quantitative MicroRNA-Expression bei CMPEs

6.3.1 Vergleich der MicroRNA-Expression von CMPEs und Normalgewebe

6.3.2 Korrelation des *JAK2* V617F-Mutationsstatus und der Expression von MicroRNA 150

6.4 Vergleich der Expression von MicroRNAs und mRNAs von Ziel-Genen

6.5 Immunhistochemischer Nachweis von c-MYB bei CML

6.5.1 Immunhistochemische Expression von *c-MYB* bei CML zum Zeitpunkt Diagnose sowie unter Therapie

6.6 Korrelation von MicroRNA-Expression im Knochenmark und dem peripheren Blutbild

6.6.1 Peripheres Blutbild und MicroRNA-Expression bei CML

6.6.2 Peripheres Blutbild und MicroRNA-Expression bei CMPE

7. Diskussion

7.1 Charakteristische klinische, morphologische und immunhistochemische Befunde bei CML unter Therapie

7.1.1 Morphologische Parameter divergieren zwischen CML bei Diagnose sowie unter Therapie mit Imatinib

7.1.2 Immunhistochemische Parameter divergieren zwischen CML bei Diagnose sowie unter Therapie mit Imatinib

7.1.3 Klinische, morphologische und immunhistochemische Untersuchungen klassifizieren das Therapieansprechen der CML unter Imatinib

7.2 MicroRNA-Expressionsmuster der CML

7.2.1 MicroRNA-Expressionsmuster differenzieren zwischen CML und Normalgewebe

7.2.2 MicroRNA-Expressionsmuster verändern sich unter Therapie mit Imatinib

7.2.3 MicroRNA-Expression bei CML unter Therapie korreliert mit morphologischem Ansprechen

7.3 MicroRNA-Expression von JAK2 pos. CMPEs

7.3.1 MicroRNA-Expressionen divergieren zwischen *JAK2* pos. CMPEs und Normalgewebe

7.3.2 MicroRNA 150 Expression korreliert mit *JAK2*-Mutationsstatus

7.4 Einfluss von MicroRNA-Expression auf die mRNA von Ziel-Genen

7.5 Immunhistochemischer Nachweis von dysregulierten Ziel-Genen divergiert bei CML und Normalgewebe

7.6 Peripheres Blutbild und MicroRNA-Expression im Knochenmark

7.6.1 Leukozyten im peripheren Blutbild korrelieren mit MicroRNA-Expression bei CML

7.6.2 Thrombozyten im peripheren Blutbild korrelieren mit MicroRNA-Expression bei CMPEs

8. Zusammenfassung

9. Literaturangaben

10. Danksagung

11. Lebenslauf

12. Erklärung

2. Abkürzungen

Kürzel	Bedeutung
°C	Grad Celsius
µ	Mikro-
AML	Akute myeloische Leukämie
bp	Basenpaare
bzw.	Beziehungsweise
c-	Centi-
ca.	*circa*
cDNA	*copy* DNA
CIMF	Chronisch-ideopathische Myelofibrose
CML	Chronische myeloische Leukämie
CMPEs	Chronisch-myeloproliferative Erkrankungen
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleotide
ds	doppelsträngig
EDTA	Ethylendiaminessigsäure
ET	Essentielle Thrombozythämie
et al.	*et alteri*
G	Gramm, Erdbeschleunigung
H	Stunde
HPLC	*high performance liquid chromatography*
HRP	Meerrettichperoxidase
k	Kilo
l	Liter
m	Milli-, Meter
M	Molar
min	Minute
mRNA	*messenger-RNA*
n	Nano-
nt	Nukleotide
OD	optische Dichte

PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PV, PVR	Polyzythämia Vera (Rubra)
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
rpm	round per minute
RT	Reverse Transkriptase, Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
sec	Sekunde
TEA	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
z.B.	zum Beispiel
z.T.	Zum Teil

3. Einleitung

Die chronische myeloische Leukämie besitzt in vielerlei Hinsicht Modellcharakter für die moderne Diagnostik und Therapie von Hämoblastosen im Zeitalter eines fortgeschrittenen molekulargenetischen Verständnisses von pathophysiologischen Mechanismen in der Entstehung und Unterhaltung maligner Prozesse. Nicht nur konnte mit der Identifikation des Philadelphia-Chromosoms als Produkt der reziproken Translokation t(9,22) (q34; q11.2) und dem hieraus hervorgehenden Gen für die konstitutiv aktivierte Tyrosinkinase *BCR-ABL1* ein nahezu pathognomonisches, molekulargenetisches Korrelat des malignen Phänotyps der Erkrankung gefunden, sondern in der Folge mit Imatinib (Glivec®) auch ein erster spezifischer Inhibitor dieses Onkogens entwickelt werden. Innerhalb kürzester Zeit bewies diese neue Substanz in klinischen Studien ihre Überlegenheit gegenüber den bis dato etablierten Therapieansätzen mit Hydroxyurea, Interferon-α und Cytarabin und ist heute unter beinahe allen Voraussetzungen als First-Line-Medikation für die CML etabliert. Unter Monotherapie mit Imatinib erreicht die Mehrzahl der Patienten eine komplette hämatologische Remission, der Krankheitsprogress wird signifikant verzögert und bei einem beachtlichen Anteil findet sich ein vollständiges molekulares Ansprechen, gleichbedeutend mit einem Abfall der Anzahl der *BCR-ABL1*-Transkripte unter die Nachweisgrenze. In ersten Studien zeigen die molekularen Tyrosinkinaseinhibitoren späterer Generation ein noch eindrucksvolleres Ansprechen. Eine Eradikation des malignen Klons im Knochenmark gelingt allerdings gegenwärtig noch nicht regelmäßig, wie Rezidive und Krankheitsprogresse in therapiefreien Intervallen oder im Rahmen primärer oder sekundärer Resistenzentwicklung zeigen. Resistenzentwicklung war und ist entsprechend Gegenstand intensiver Forschung, um die Erkrankung einer Heilung abseits der bisher einzigen kurativen Option, der allogenen Knochenmarkstransplantation, zuführen zu können. Der einflussreichste Resistenzmechanismus scheinen Punktmutationen im *BCR-ABL1*-Gen zu sein, die die Tyrosinkinase ihre Sensitivität gegenüber Imatinib und in einigen Fällen auch gegenüber Tyrosinkinaseinhibitoren späterer Generationen verlieren lassen. Die Knochenmarksmorphologie der CML vor sowie unter Therapie wurde ebenfalls unter dem Gesichtspunkt des Ansprechens auf Imtinib untersucht. Aus einer frühen und umfangreichen Studie zu diesem Thema ging das heute gebräuchliche Scoringsystem nach Lugli *et al*. hervor.

Eine moderne Methode auf der Suche nach Ursachen und Auswirkungen der malignen Transformation von Zellen ist die Analyse epigenetischer Regulationsmechanismen der Genexpression. Ein prominentes Beispiel hierfür ist die quantitative Untersuchung der Expression von MicroRNAs, einer Nukleinsäurespezies, die in Einzelstrangform im Zytoplasma vorliegt, eine Länge von 19-22 Basen besitzt und durch teilkomplementäre Bindung an mRNAs die Genexpression auf posttranskriptioneller Ebene negativ reguliert. Für viele benign und maligne Neoplasien wie auch für zahlreiche nicht neoplastische Erkrankungen konnte ein spezifisches MicroRNA-Expressionsmuster nachgewiesen

werden und es wird postuliert, dass eine solche Charakterisierung für jede physiologische Zelle bzw. für jedes normale Gewebe, aber auch für jede Neoplasie möglich ist. Für die CML in ihren unterschiedlichen Stadien wurden in aufwändigen Arbeiten Expressionsprofile eines großen Teils der bekannten MicroRNAs bestimmt, indem die gemessenen Werte mit Proben von gesunden Spendern verglichen wurden und so einige, in ihrer Expression spezifisch deregulierte, MicroRNAs identifiziert werden konnten. Des Weiteren wurde untersucht, in welchem Maße eine Therapie mit Imatinib diese Expressionsmuster in vitro und in vivo verändern kann. Ebenso wurde erforscht, ob es signifikante Unterschiede in der Expression bestimmter MicroRNAs von Patienten gibt, die unter Therapie eine Resistenz, unabhängig von *BCR-ABL1*-Punktmutationen, gegenüber Imatinib aufweisen im Gegensatz zu Patienten, die ein gutes Therapieansprechen zeigen.

In der vorliegenden Arbeit wird an RNA-Extrakten aus Formalin-fixierten und in Paraffin eingebetteten Beckenkammtrepanaten die quantitative Expression von MicroRNAs und ausgewählten Zielgenen untersucht, die anhand bereits publizierter Daten für die CML bzw. nachgewiesener Relevanz für das blutbildende System ausgewählt wurden. Berücksichtigt wurden Proben von Patienten vor sowie unter Therapie, die ein gutes oder intermediäres Ansprechen auf Imatinib, definiert durch die morphologischen Kriterien nach Lugli *et al.*, zeigten. Darüber hinaus wurden Fälle von Patienten, die unter Therapie eine Resistenz gegenüber Imatinib unabhängig vom Mutationsstatus des *BCR-ABL1*-Fusionstranskripts sowie z.T. eine Akzeleration bis in ein blastisches Stadium entwickelten, untersucht. Als Referenz dienten Proben ohne pathologischen Befund. Um die Spezifität etwaiger Phänomene für die CML zu gewährleisten, wurde komplementär zum CML-Studienkollektiv stets eine kleinere Fallzahl der klassischen chronisch-myeloproliferativen Erkrankungen (s.u.) in analoger Weise untersucht. Ziel war die Identifikation von MicroRNAs und ihren Ziel-Genen, die als Marker vor oder unter Therapie eine Aussage über das Ansprechen auf Imatinib sowie die individuelle Prognose des Patienten komplementär zu zytogenetischen und molekularpathologischen Befunden zulassen. Darüber hinaus waren aufwändige begleitende morphologische und immunhistochemische Untersuchungen an den Proben darauf ausgelegt, das Verständnis der Korrelation von Morphologie, molekulargenetischen Befunden und dem Verlauf der Erkrankung zu vertiefen, sowie letztlich die pathophysiologischen Mechanismen der Persistenz des malignen Klons im Organismus aufzuklären. Diese Erkenntnis wäre von entscheidender Bedeutung im Hinblick auf das Ziel einer vollständigen und dauerhaften Eradikation der CML.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden Proben klassischer chronisch-myeloproliferativer Erkrankungen, speziell der Polyzythämia Vera, der Essentiellen Thrombozythämie und der primären Myelofibrose, berücksichtigt und anhand größerer Fallzahlen auf charakteritische Expressionsmuster myelopoese- und myeloprolifertions-assoziierter MicroRNAs untersucht. Darüber hinaus wurde das Potential des MicrRNA 150 Ziel-Gens *c-MYB* als möglichem differentialdiagnostischen Marker, insbesondere für das oft kryptische Initialstadium dieser Erkrankungen mit seinen relevanten klinischen und prognostischen Implikationen evaluiert.

4. Grundlagen

4.1 Die chronische myeloische Leukämie

4.1.1 Geschichtliches

Im Jahre 1845 wurde die CML zeitgleich und unabhängig voneinander durch Virchow und Bennett beschrieben, und 1951 wiederum durch Dameshek zusammen mit einigen weiteren medullären Erkrankungen, für die er eine analoge Pathogenese postulierte, in der Gruppe der chronischen myeloproliferativen Erkrankungen (CMPE) zusammengefasst [60, 235, 267].

Die CML ist eine myeloproliferative Neoplasie, die, ausgehend von einer abnormen pluripotenten Stammzelle, eine konstante und pathogenetisch entscheidende Assoziation mit dem *BCR-ABL1* Fusionsgen zeigt. Dieses charakteristische Gen ist auf dem, 1960 von Nowell und Hungerford erstbeschriebenen, Philadelphia-Chromosom lokalisiert, welches regelhaft aus einer reziproken Translokation t(9;22) (q34; q11.2) hervorgeht. Es kodiert für eine konstitutiv aktivierte Tyrosinkinase, die die charakteristische Dysregulation der Proliferation, die reduzierte Adhärenz der transformierten Zellen an das Knochenmarkstroma sowie das Ausbleiben einer adäquaten, apoptotischen Antwort auf mutagene Stimuli bedingt. Molekulargenetische Untersuchungen konnten zeigen, dass die Translokation t(9;22) eine Koppelung des c-abl-Protoonkogens auf Chromosom 9 an die Breakpoint Cluster Region (BCR) auf Chromosom 22 herbeiführt [12, 44, 62, 99, 108, 113, 135, 180, 192, 224]. Der Nachweis eines solchen BCR-Rearrangements lässt sich ebenfalls in etwa 30% der Fälle bei der seltenen Ph-Chromosom negativen CML führen (nächstliegend bedingt durch komplexe cytogenetische Aberrationen unter Einschluss der beiden *loci*) [137, 148, 174, 263, 276]. Auch kann das Ph-Chromosom im Rahmen einer akuten myeloischen oder lymphatischen Leukämie auftreten und sich molekulargenetisch in seltenen Fällen durch die gleichen Fusionsprodukte darstellen. Somit ist der Nachweis eines Ph-Chromosoms oder des BCR-ABL-Rearrangments nicht spezifisch bzw. pathognomonisch für die CML, dient jedoch als wichtigster Marker in der Differentialdiagnostik der CMPE, speziell für die Abgrenzung der CML gegenüber anderen chronisch-myeloproliferativen Erkrankungen oder myelodysplastischen Syndromen wie der CMML [55, 69, 87, 113, 274].

4.1.2 Epidemiologie und Pathogenese

Weltweit zeigt die CML eine jährliche Inzidenz von 1-2/100.000 und verteilt sich auf alle Altersschichten, wobei eine Prädominanz des fünften und sechsten Lebensjahrzehnts und ein leicht gehäuftes Auftreten in der männlichen Bevölkerung zu verzeichnen sind. Mit einem Anteil von knapp 40% stellt die CML die größte Entität in der Gruppe der CMPE [84, 86, 125, 219].

Prädisponierende Faktoren wie etwa infektiöse Agenzien sind bisher nicht sicher bekannt, auch wenn radiogene Strahlung als auslösender, mutagener Stimulus diskutiert wird. Eine erbliche Komponente in der Entstehung der CML konnte bislang nicht identifiziert werden [19, 51].

4.1.3 Klinik

Der natürliche, untherapierte Verlauf der CML gestaltet sich bi- bzw. triphasisch. Initial manifestiert sie sich in einer chronischen Phase mit schleichendem, indolentem Verlauf, die in der Folge in eine Akzelerierte Phase und/oder eine Blastische Phase übergehen kann.

Die Diagnosestellung erfolgt häufig während des schleichenden Verlaufs der chronischen Phase, wobei 20-40% der Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose asymptomatisch sind und die beweisende Diagnostik einzig auf Grund von leukämischen Veränderungen im peripheren Blutbild im Rahmen von Routineuntersuchungen erfolgt [58, 84, 232]. Typische Symptome der CML bei Diagnosestellung umfassen Abgeschlagenheit, Gewichtsverlust, Nachtschweiß, Anämie und Splenomegalie [58, 232]. Im Rahmen atypischer Verläufe kann es allerdings auch zu einer isolierten Thrombozytose ohne Leukozytose sowie einer initialen Manifestation in der Blastischen Phase ohne apparente chronische Phase im Vorfeld kommen [3, 58, 211]. Ohne die Anwendung kausal-kurativer Therapiekonzepte zeigt die CML in der chronischen Phase einen sprunghaften oder über das Zwischenstadium der Akzelerierten Phase einen transienten Progress in die Blastische Phase. Die progrediente Transformation der Erkrankung manifestiert sich klinisch in der Regel in einer Aggravierung des Allgemeinzustandes des Patienten, einer zunehmenden Anämie, einer Thrombopenie oder einer Splenomegalie [84].

Während die leukämischen Zellen im chronischen Stadium der Erkrankung ein minimalinvasives Verhalten zeigen und sich die neoplastischen Zellproliferate in der Regel nur in hämatopoetischem Gewebe und dabei vor allem im Blut, dem Knochenmark, der Milz und in einigen Fällen auch in der Leber finden, können in der Blastischen Phase auch Infiltrate maligner Vorläuferzellen in extramedullären Geweben wie Lymphknoten, der Haut oder Weichteilgewebe imponieren [58, 122, 189]. Im Verlauf der chronischen Phase zeigt das periphere Blutbild in der Regel eine Leukozytose variabler Ausprägung (12-1000x10^9/L) bei einem medianen Wert von 100x10^9/L. Das Blutbild wird dominiert von neutrophilen Granulozyten in unterschiedlichen Reifungsstadien, vornehmlich Myelozyten und segmentkernige Neutrophile, jeweils ohne signifikante Atypien oder Dysplasiezeichen [15, 58, 84, 144, 232, 239, 281]. Blasten machen normalerweise weniger als 2% der kernhaltigen Zellen im peripheren Blutbild aus [15, 239].

Regelmäßig zeigt das Blutbild der CML eine absolute Basophilie und auch eine Eosinophilie ist gängig. Eine absolute Monozytose kann auftreten, wobei der relative Anteil der Monozyten an der Leukozytose jedoch in der Regel unterhalb von 3% liegt. Ausnahmen finden sich in Assoziation mit der seltenen p190 *BCR-ABL1*-Isoform, bei der eine Monozytose regelmäßig vorliegt, wodurch sich die Differentialdiagnose zur Chronischen Myelo-Monozytären Leukämie schwierig gestaltet [15, 181, 239].

Schlussendlich zeigen sich normwertige Thrombozytenzahlen, aber auch Thrombozythämien mit Werten bis über $1000x10^9$/L, wohingegen sich Thrombozytopenien in diesem Stadium der Erkrankung nur selten finden [232].

4.1.4 Histopathologie

Histologisch weist das Knochenmark im Rahmen der granulozytären Proliferation eine erhöhte Zellularität auf, deren Verteilung über die Reifestadien sich analog zum peripheren Blutbild verhält. Die peritrabekuläre Manschette der neutrophilen Vorläuferzellen zeigt häufig eine gesteigerte Schichtdicke von 5-10 Zellen (Norm. 2-3) mit gerichteter Ausreifung, wobei die segmentkernigen neutrophilen Granulozyten im intertrabekulären Raum verteilt liegen. Auch eosinophile Granulozyten können prominent erscheinen. Blasten machen in diesem Stadium der CML in der Regel weniger als 5% der Zellen im Knochenmark aus, wobei Werte ab 10% einen Progress im Sinne einer Akzeleration oder einer Transformation in die Blastische Phase nahelegen [56, 58, 189]. Erythropoetische Vorläuferzellen kommen in variablem Maße zur Darstellung, wobei die erythroiden Inseln tendenziell in Größe und Anzahl vermindert sind. Ebenfalls reduziert und zusätzlich regelhaft mit kleinen, hypolobulierten Kernen imponierend zeigt sich die Megakaryopoese (Mikromegakaryozyten) mitunter zeigen Patienten allerdings auch eine moderate bis exzessive megakarozytäre Proliferation. Aus diesen Varianten wird die Möglichkeit einer Subspezifizierung in „klassisch“ granulozytenreich und megakaryozytenreich abgeleitet [11, 38, 40, 163, 248, 253].

Bei Diagnosestellung besteht in 30% der Fälle eine retikuläre Fibrose, die eine Korrelation mit einer gesteigerten Anzahl an Megakaryozyten, ausgeprägterer Splenomegalie und tendenziell einer schlechteren Prognose zeigt [37, 67, 149, 248, 253]. Kerntrümmermakrophagen und speichernde Histiozyten, insbesondere Pseudo-Gaucher-Zellen und Seeblaue-Histiozyten, die sich regelmäßig im Biopsat finden, sind Ausdruck eines erhöhten Zellumsatzes. Mehr als 80% der Patienten zeigen verminderte oder vollständig depeltierte Eisenbestände in den Makrophagen und dem Retikulum [4, 238, 255].

Im chronischen Stadium der Erkrankung ist die rote Pulpa Milz meist durch granulozytäre Infiltrate variabler Reifungsgrade vergrößert. Ähnliche Manifestationen können sich in den hepatischen Sinusoiden und den Portalfeldern finden.

Die Erkennung eines Krankheitsprogresses im Sinne einer Transformation aus der chronischen in die Akzelerierte oder Blastische Phase gestaltet sich trotz großer prognostischer und therapeutischer Bedeutung schwierig, da sowohl die klinischen wie auch die morphologischen Grenzen zwischen den Stadien fließend verlaufen und Verlaufsparameter nach wie vor kontrovers diskutiert werden [9, 37, 54, 56, 96, 136, 231]. Im Rahmen der dritten Auflage der WHO-Klassifikation (2001) für Tumore des hämatopoetischen und lymphatischen Gewebes wird geraten, die Diagnose einer CML in Akzelerierter Phase in Betracht zu ziehen, wenn einer der folgenden Umstände gegeben ist oder vorliegt:

Tab. 1: Kriterien für die Akzeleration einer CML, übernommen aus [241]

1.	Therapierefraktäre, persistierende oder progrediente Leukozytose (>10x10^9/L) und/oder therapierefraktäre, persistente oder progrediente Splenomegalie.
2.	Therapierefraktäre und persistierende Thrombozytämie (>1000 x10^9/L)
3.	Persistente Thrombopenie (<100 x10^9/L) unabhängig von therapeutischen Maßnahmen
4.	Klonale zytogenetische Evolution ausgehend vom initialen Karyotyp bei Diagnosestellung
5.	Auftreten einer relativen Basophilie im peripheren Blut von 20% oder mehr
6.	10-19% Myeloblasten im peripheren Blutbild oder im Knochenmark

Die Kriterien 1-4 zeigen eine stärkere Assoziation mit einem Progress einer CML aus der chronischen in die Akzelerierte Phase, wohingegen die Kriterien 5 und 6 eher einen Übergangszustand zwischen Akzelerierter und Blastischer Phase (Transformation) markieren. Obwohl Modifikationen an diesen Kriterien vorgeschlagen und andere Kriterien vorgestellt wurden [56], besagt die gegenwärtige WHO-Klassifikation (2008) [241], dass die dargelegten Parameter weiterhin als Indikatoren einer Progredienz der CML zu werten sind. Ob diese Kriterien allerdings im Zeitalter der PKI prognostische Relevanz in Bezug auf das Gesamtüberleben besitzen, oder ob und in welchem Ausmaß Faktoren wie die Resistenz gegenüber modernen Therapien zu berücksichtigen sind, lässt sich gegenwärtig noch nicht abschließend evaluieren.

In der Akzelerierten Phase zeigt sich das Knochenmark in der Regel hyperzellulär und Dysplasien der Myelopoese können auftreten [189, 281]. Die gesteigerte Anzahl myeloischer Blasten lässt sich mit einer CD34-Färbung am Biopsat nachweisen [202]. Cluster von Mikromegakaryozyten in Kombination mit ausgeprägter retikulärer oder kollagener Fibrose finden sich regelhaft und legen für sich genommen bereits die Diagnose einer CML in der Akzelerierter Phase nahe. In der Regel sind diese Merkmale allerdings mit einem der WHO-Kriterien assoziiert [31, 37, 189]. Selten finden sich Lymphoblasten im peripheren Blut oder im Knochenmark, wobei in einem solchen Fall der Verdacht naheliegt, dass die chronisch myeloische in eine akute lymphoblastische Leukämie übergegangen ist.

Nach der aktuellen WHO-Klassifikation (2008)[241] kann die Diagnose einer CML in der Blastischen Phase gestellt werden, wenn eines der beiden folgenden Kriterien erfüllt ist:

Tab. 2: Kriterien für die Blastische Phase einer CML, übernommen aus [241]

1.	Blasten machen 20% oder mehr der kernhaltigen Zellen im peripheren Blutbild oder dem Knochenmark aus
2.	Es zeigen sich neben der medullären Manifestation der CML zusätzlich extramedulläre Blastenproliferate

In etwa 70% der Fälle sind die Blasten myeloischen Ursprungs und können einen granulozytären, monozytären, megakaryozytären, erythrozytären oder eine beliebige Kombination der genannten Phänotypen präsentieren. Die verbleibenden 20-30% der Fälle in Blastischer Phase weisen unreife Vorstufen lymphatischen Ursprungs auf [68, 139, 191, 207, 227, 278]. Der Ursprung der Blastenpopulation kann morphologisch klar ersichtlich sein oder aber einer immunhistochemischen

Klärung bedürfen. Wenn Blasten einen fokalen Abschnitt des Biopsates, wie einen intertrabekulären Raum, weitgehend okkupieren, so liegt in der Regel die Diagnose einer CML in der Blastischen Phase vor, auch wenn die umliegenden Areale die Grunderkrankung in der chronischen Phase abbilden. Es kann erforderlich sein, immunhistochemische Untersuchungen für CD34 und terminale Deoxynucleotidyltransferasen (TdT) durchzuführen, um Myelo- und Promyelozytenfoci sowie Lymphoblastennester differentialdiagnostisch abzugrenzen. Extramedulläre Manifestationen der Blastischen Phase zeigen sich am häufigsten in der Haut, Lymphknoten, der Milz, dem skelettalen System oder dem ZNS, können aber in beliebiger Lokalisation auftreten und sowohl myeloischen als auch lymphatischen Ursprungs sein [122].

Die neutrophilen Graulozyten der CML im chronischen Stadium zeigen im Gegensatz zu den anderen klassischen chronisch myeloproliferativen Erkrankungen eine markant erniedrigte alkalische Leukozytenphosphataseaktivität [201]. Im Rahmen der myeloischen Blastenphase präsentieren die Blasten eine variable Myeloperoxidaseaktivität, jedoch sind neben granuloytären, monozytären, megakryozytären und/oder erythrozytären Markern oft auch lymphatische Antigene nachweisbar [68, 139, 191, 227]. Lymphatische Blasten entstammen in der Regel der B-Zellreihe, vereinzelt finden sich allerdings auch maligne Klone T-lymphoblastischen Ursprungs. In der Mehrzahl der Fälle werden neben den lymphatischen auch ein oder mehrere myeloische Antigenene exprimiert. Etwa 25% der blastischen CML-Fälle erfüllen die Kriterien für eine Mixed Phenotype acute Leukaemia (MPAL) [68, 139, 191, 227].

4.1.5 Molekularpathologie

Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung findet sich in 90-95% der Fälle die charakteristische reziproke Translokation t (9;22) (q34;q11.2) und somit das Ph-Chromosom. Die verbleibenden Fälle zeigen entweder eine komplexere Translokation unter Beteiligung eines dritten oder vierten Chromosoms oder eine kryptische Translokation von 9q34 und 22q11.2, die in den zytogenetischen Routineuntersuchungen nicht detektiert werden kann. In solchen Fällen lässt sich das *BCR-ABL1*-Fusionsgen mit Hilfe von FISH-Analysen, RT-PCR oder Southern-Blot-Technik nachweisen [179]. Die genaue Lokalisation der chromosomalen Bruchstelle im BCR-Gen beeinflusst die phänotypische Morphologie der Erkrankung mitunter entscheidend [179]. Bei der CML liegt die Bruchstelle in den meisten Fällen in der Major Breakpoint Cluster Region (M-BCR), welche die Exons 12-16 umfasst und das abnorme Fusionsprotein p-210 generiert, das durch gesteigerte Tyrosinkinaseaktivität imponiert. Selten kommt es zum Bruch in der μ-BCR Region (Exon 17-20), was in einem größeren Fusionsprotein (p-230) resultiert, das eine auffällige neutrophile Ausreifung und/oder eine hervorstechende Thrombozytose induzieren kann [179, 206]. Obwohl Chromosomenbrüche in der Minor Breakpoint Cluster Region (m-BCR) mit einem verkürzten Fusionsprotein (p-190) einhergehen, das am häufigsten mit der Ph-Chromosom positiven ALL assoziiert ist, können in >90% der Patienten mit der „klassischen“ p-210-CML kleine Mengen dieser transformierten Tyrosinkinase nachgewiesen

werden, die aus alternativem Splicing des BCR-Gens resultieren [226, 264]. Darüber hinaus gibt es Fallberichte, in denen primär das p-190 Fusionsprotein bei CML nachgewiesen wurde. Aufgrund erhöhter Monozyten lagen in diesen Fällen Aspekte des morphologischen Bildes eines myelodysplastischen Syndroms im Sinne einer CMML vor [181].

Die abnorm gesteigerte Tyrosinkinaseaktivität des *BCR-ABL1*-Hybridproteins bedingt die konstitutive Aktivierung mehrerer Signaltransduktionswege [64]. Die reduzierte Adhärenz der transformierten Zellen an das Knochenmarkstroma, die charakteristische Dysregulation der Proliferation, sowie das Ausbleiben einer adäquaten, apoptotischen Antwort auf mutagene Stimuli und somit letztlich der leukämische Phänotyp der CML-Zellen resultieren hieraus [14, 92, 214]. Die mangelnde Fixation im Knochenmark, der eine Teilrolle in der insuffizienten apoptotischen Aktivität bei CML zugeschrieben wird, wurde anhand von Auffälligkeiten in einer beta1-Integrin-Variante [266], an Crkl [198, 230, 259] sowie einer hochregulierten Expression von alpha6-Integrin [66] erklärt. Dies war im Rahmen der Interferon-α-Therapie das primäre therapeutische Ziel, da so dem adhäsiven Defekt partiell entgegengewirkt werden konnte [18]. Die Dysregulation der mitotischen Aktivität bei Patienten mit CML geht offenbar primär auf Interaktionen zwischen *BCR-ABL1* und Ras sowie dem MAP-Kinaseweg zurück [198, 208, 209], wobei auch beschriebene Verbindungen zum Jak-Stat-, PI3- und Myc-Signaltransduktionsweg zu berücksichtigen sind [46, 61, 120, 233, 236]. Die Mechanismen, mit denen die neoplastischen Zellen bei der CML der Apoptose entgehen, sind abseits der Interaktionen der Tyrosinkinase mit Ras in Abwesenheit von Wachstumsstimuli noch unzureichend verstanden. Es wird gemutmaßt, dass *BCR-ABL1*-positive Zelllinien der Apoptose nach DNA-Schädigung entgehen und die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien und somit die Aktivierung der Caspasen durch *BCR-ABL1* inhibiert wird. Diesem Mechanismus soll eine Interaktion mit Proteinen der Bcl2-Familie zugrunde liegen [2, 13, 14, 73, 229].

4.2 Ph-negative Neoplasien

Die klassischen *BCR-ABL1*-negativen myeloproliferativen Neoplasien, die Polyzythämia Vera (PV), die Essentielle Thrombozythämie (ET) und die Primäre Myelofibrose (CIMF), sind klonale Stammzellerkrankungen, die durch uni- oder multiliniäre myeloische Proliferation charakterisiert sind. Es handelt sich vor allem um Erkrankungen des fortgeschrittenen Lebensalters mit einem Häufigkeitsgipfel zwischen der 5. und 7. Dekade, wobei insbesondere Fälle der Essentiellen Thrombozythämie auch im Kindesalter auftreten. Die kombinierte Inzidenz aller neoplastischen myeloproliferativen Subtypen beträgt jährlich 6-10/100.000 [125, 126, 128]. Initial zeigen die myeloproliferativen Erkrankungen eine Hyperzellularität des Knochenmarks bei effektiv ausreifender Hämatopoese, sowie eine erhöhte Anzahl an Granulozyten, Erythrozyten und/oder Thrombozyten im peripheren Blutbild. Klinisch manifestiert sich regelmäßig eine Splenomegalie und/oder eine Hepatomegalie (betont im Rahmen der primären Myelofibrose), die aus der Sequestration peripherer Blutzellen hervorgeht. Trotz des schleichenden Beginns der Erkrankungen bergen die

myeloproliferativen Neoplasien das Potenzial einer sequentiellen Progression, die in ein terminales Knochenmarksversagen durch Myelofibrose, ineffektive Hämatopoese oder eine akute Blastenkrise münden kann. Genetische Evolution vom Ausgangsbefund ist häufig ein Anzeichen eines Progresses. Auch kann sich dieser durch fortschreitende Organomegalie, steigende oder auffällig fallende periphere Blutwerte, voranschreitende Myelofibrose oder das Auftreten von Myelodysplasien manifestieren. Finden sich 10-19% Blasten im peripheren Blut oder im Knochenmark, so ist von einer Akzeleration auszugehen. Werte > 20% genügen, um die Diagnose einer akuten Leukämie in Blastenphase zu stellen [241]. Im Rahmen der Revision der WHO-Klassifikation Hämatologischer Neoplasien aus dem Jahre 2008 wurde neben dem klinischen Zustand des Patienten und den relevanten laborchemischen Parametern nun auch die Untersuchung auf Kinase-aktivierende Mutationen im *JAK2* Gen (s.u.) in den diagnostischen Algorithmus aufgenommen. Darüber hinaus nimmt die morphologische Begutachtung des Knochenmarks ebenfalls einen größeren Stellenwert ein. Sowohl für den molekulargenetischen Phänotyp als auch für das morphologische Erscheinungsbild konnte eine Korrelation mit den klinischen Eigenschaften der Erkrankung nachgewiesen werden [126, 241, 245, 250, 254]. Dennoch bestehen gerade in frühen Stadien der Erkrankung noch Probleme bei der Differentialdiagnose der drei Subtypen. Insbesondere bevor ET und CIMF klinisch und morpholgisch ihr Vollbild bieten, zeigen sich auch in der Anwendung der revidierten WHO-Kriterien noch diagnostische Ungenauigkeiten [249]. Die Frage nach verlässlichen Markern bei der Diagnosefindung im Initialstadium mit ihren erheblichen prognostischen Implikationen bleibt bis dato unbefriedigend geklärt.

4.1.3 Molekulargenetische Marker für Ph-negative Neoplasien

Für die Mehrzahl der myeloproliferativen Neoplasien ist ein Zusammenhang mit klonalen Abnormitäten in Genen, die für Phosphotyrosinkinasen kodieren, nachgewiesen. Die geschilderten Punktmutationen führen zu konstitutiv aktivierter Tyrosinkinaseaktivität, die in der Aktivierung von Signaltransduktionswegen resultiert, welche die abnorme Poliferation des Klons bedingt. Erworbenen somatischen Mutationen von *JAK2* auf dem Chromosom 9p24 konnte eine herausragende Rolle in der Pathogenese *BCR-ABL1*-negativer myeloproliferativer Erkrankungen nachgewiesen werden [124, 143, 147, 156, 157]. Die häufigste *JAK2*-Punktmutation p.V617F resultiert in eine konstitutiv aktiven zytoplasmatischen Tyrosinkinase, die sowohl auf STAT, MAPK als auch auf PI3K aktivierend wirkt. Sie findet sich in nahezu allen Fällen der Polyzythämia Vera und in etwa der Hälfte aller Fälle von Primärer Myelofibrose und Essentieller Thrombozythämie und stellt somit keinen spezifischen Marker für eine einzele Entität im Kreis der myeloproliferativen Erkrankungen dar. In den wenigen Fällen der Polyzythämia Vera, in denen sich keine *JAK2*-Punktmutation p.V617F findet, kann regelmäßig eine aktivierende Mutation in Exon 12 des *JAK2*-Gens nachgewiesen werden. In seltenen Fällen der Primären Myelofibrose und der Essentiellen Thrombozythämie findet sich darüber hinaus eine aktivierende Mutation im *MPL*-Gen (p.W515L oder p.W515K). Die *JAK2*-Punktmutation p.V617F

konnte des Weiteren in einigen Fällen Myeloproliferativer/myelodysplastischer Syndrome, bei MDS mit Thrombozytose, selten im Rahmen einer AML und gelegentlich in Kombination mit anderen gut definierten genetischen Aberrationen, wie etwa *BCR-ABL1* nachgewiesen werden [128]. Weiterhin bleibt aber die molekulargenetische Pathogenese in etwa der Hälfte aller Fälle von Primärer Myelofibrose und Essentieller Thrombozythämie ungeklärt [241].

4.3 Imatinib (STI571)

Das voranschreitende Verständnis der alterierten Signalwege im Rahmen der CML führte zur Entwicklung und Erprobung kleiner molekularer Inhibitoren der Tyrosinkinaseaktivität von *BCR-ABL1*. Imatinib war die erste Substanz dieser Wirkstoffklasse, die erfolgreich in der Behandlung der CML eingesetzt werden konnte [71, 72].

4.3.1 Struktur und Synthese

Ausgehend vom Grundgerüst des 2-Phenylaminopyrimidins, welches schwache und wenig spezifische inhibitorische Aktivität gegenüber Serin/Threonin- und Tyrosinkinasen zeigte, wurde eine Reihe von Derivaten auf der Suche nach neuartigen Proteinkinaseinhibitoren synthetisiert [286, 287]. Entscheidend bei der Generierung des Imatinib waren die Einführungen einer 3'Pyridylgruppe in der 3'Position des Pyrimidinrings und einer Benzamidgruppe am Phenylring mit dem Ziel einer Steigerung der spezifische Aktivität gegen Tyrosinkinasen. Diese konnte überdies verbessert werden, indem an der 6'Position des Anilinophenylrings eine „Flag-Methylgruppe" als Substituent eingebracht wurde. Dies führte außerdem zu einem Verlust der Inhibition der Proteinkinase C durch 2-Phenylaminopyrimidin. Im Sinne der pharmakokinetischen Eigenschaften des Moleküls war es erforderlich, eine polare Seitenkette (N-methylpiperazin) anzuhängen, welche die schlechte Löslichkeit in Wasser und die schwache Bioverfügbarkeit verbesserte. In dieser Weise verändert, ging STI571 als vielversprechendster Wirkstoff in die klinische Entwicklung, da er eine hohe Selektivität und ausgeprägte Wachstumsinhibition für BCR-ABL-positive Zellen zeigte.

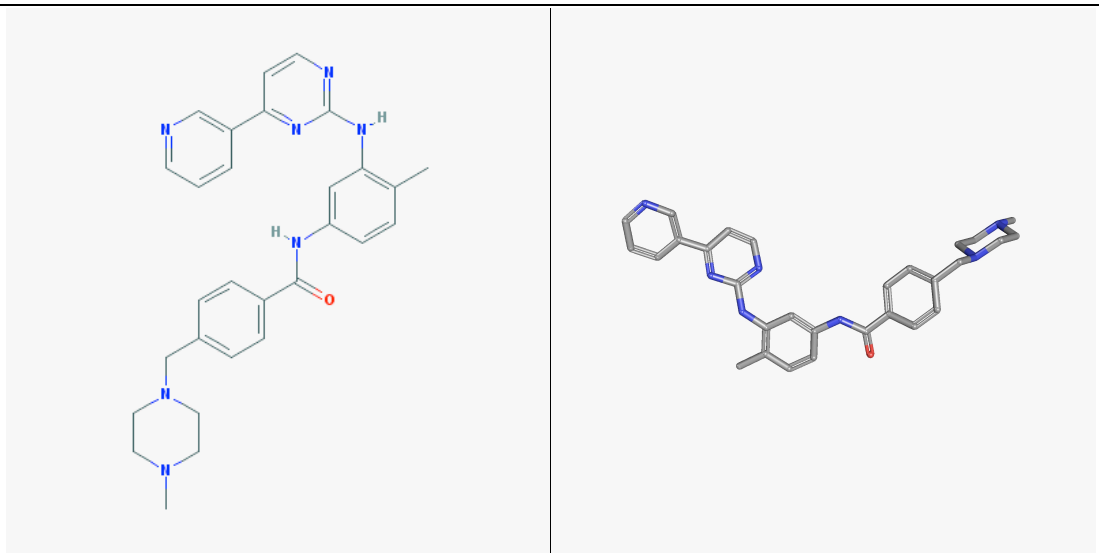

Abb.1: 2/3d-Struktur des Imatinibs, übernommen aus PubChem

4.3.2 Wirkungsprofil

Molekulargenetische und pharmakodynamische Arbeiten an Tyrosinkinasen, die als bakterielle Fusionsproteine exprimiert oder mittels Immunpräzipitation aufkonzentriert wurden, konnten demonstrieren, dass Imatinib potenziell alle Tyrosinkinasen der ABL-Familie inhibiert [32, 33, 72]. Des Weiteren wurde an mehreren Zelllinien *in vitro* gezeigt, dass sich diese Aktivität weder auf Serin/Threoninkinasen noch auf den EGFR, VEGF-R1, VEGF-R2, EGF, IGF-I, FLT-3 FGFR oder die Nicht-Rezeptortyrosinkinase *JAK2* erstreckt [16, 33, 45, 72]. Sowohl der PDGFR als auch der KIT-Rezeptor werden hingegen durch Imatinib wirkungsvoll inhibiert, was in der Therapie Gastrointestinaler Stroma Tumoren mit aktivierender *KIT*-Mutation und PDGFR-assoziierten Eosinophiliesyndromen von Relevanz ist [32, 34, 45, 109, 258].

4.3.3 Therapie mit Imatinib

Nachdem im Anschluss an die Einführung von Imatinib die erfolgsversprechendeste Therapie von Patienten mit neu diagnostizierter CML in der chronischen Phase über einige Zeit Gegenstand von Diskussionen war, gilt diese Frage heute weitestgehend als geklärt. Es galt abzuwägen, inwiefern Patienten von einer möglichen allogenen Stammzelltransplantation profitieren könnten, die das Potenzial einer Heilung der Grunderkrankung barg, wohingegen eine Dauertherapie mit Imatinib lediglich eine Lebensverlängerung ohne Aussicht auf Heilung bei unklaren Langzeitfolgen bot. Basierend auf den Ergebnissen der klinischen Studien und der therapeutischen Erfahrung, die mit dem Wirkstoff gesammelt werden konnten, verringerte sich die Anzahl der allogenen Stammzelltransplantationen signifikant in den ersten fünf Jahren nach Einführung des Imatinib; die meisten Hämatologen empfehlen gegenwärtig eine initiale Monotherapie mit Imatinib oder den Einschluss in eine klinische Studie zur Therapie mit Imatinib oder einem Tyrosinkinaseinhibitor der zweiten Generation (Dasatinib, Nilotinib) [89, 95]. Dennoch gilt es auch heute noch als legitim, einem

Hoch-Risiko-Patienten (nach Sokal oder Hasford Kriterien (s.u)) bei guten Aussichten auf das Überleben einer allogenen Stammzelltransplantation nach EBMT diese bei Diagnosestellung anzubieten, auch wenn selbst in dieser Subgruppe die Initialtherapie mit Imatinib heute ebenfalls als etabliert gilt [96, 102, 237]. Zwei Ausnahmen von dieser generellen Regel sind anzuführen. Zum einen gehen einige Pädiater davon aus, dass die initiale allogene Stammzelltransplantation Therapie der Wahl für Kinder mit HLA-identischen Geschwistern ist, zum anderen wird mitunter aus wirtschaftlichen Überlegungen der Transplantation vor der Imatinib-Dauertherapie der Vorzug gegeben, da letztere über viele Jahre hinweg überaus kostenintensiv ist und unter Imatinib kaum dauerhafte Heilungen zu beobachten sind [90]. Obwohl einige Patienten, die in der Akzelerierten oder Blastischen Phase zur Vorstellung kommen, ebenso von einer Therapie mit Imatinib profitieren können, wie dies bei Patienten in der chronischen Phase der Fall ist, ist das Ansprechen auf den Wirkstoff in diesen späteren Stadien der Erkrankung oft kürzer [134, 234, 244]. Es erscheint naheliegend, in diesen Fällen die initiale Dosierung von 400 auf 600 bzw. 800 mg/d anzuheben und so bald als möglich auf eine allogene Stammzelltransplantation hinzuwirken, sofern diese eine für den Patienten praktikable Option darstellt [234]. Ist dies nicht der Fall, bleibt die Möglichkeit einer konventionellen Chemotherapie. Die Erfahrungen mit den Tyrosinkinaseinhibitoren der zweiten Generation sind nach wie begrenzt, sodass ihr Stellenwert in der (firstline) Therapie fortgeschrittener Stadien der CML zu evaluieren bleibt. Dennoch sollte für Patienten mit potenziellen Spendern, die passende HLA-Merkmale aufweisen, in jedem Fall primär die allogene Stammzelltransplantation in Betracht gezogen werden [244].

Die empfohlene Tagesdosis von Imatinib im Rahmen der IRIS-Studie, die beweisen konnte, dass die Imatinib-Monotherapie der bis dahin etablierten Gabe von Interferon-α und niedrig dosiertem Cytarabin überlegen ist, lag bei 400mg/d [5, 194]. Es sind seitdem Studien mit einer initialen Dosierung von 800mg/d bzw. 400mg/d und einer Steigerung auf 800mg/d bei Verfehlen definierter therapeutischer Ziele aufgelegt worden, wobei jedoch zum gegenwärtigen Zeitpunkt keine Evidenz dafür besteht, dass ein intensiviertes therapeutisches Vorgehen mit einer Risikoreduktion in Bezug auf das Voranschreiten der Erkrankung oder einer Verlängerung des Gesamtüberlebens assoziiert ist [26, 133]. Wichtige Faktoren, die es bei der Therapieplanung zu berücksichtigen gilt, sind spezielle krankheitsassoziierte Eigenschaften, die prädiktiven Wert für ein über- oder unterdurchschnittliches Ansprechen auf Therapie besitzen. Sokal *et al.* identifizierten 1984 mit dem Alter, der Größe der Milz, der Thrombozytenzahl im peripheren Blut sowie dem prozentualen Anteil an Myeloblasten im peripheren Blut vier Kriterien, die bei Diagnosestellung eine Aufteilung der Patientenpopulation in eine Kategorie mit guter, eine mit intermediärer und eine mit schlechter Prognose ermöglichte [237]. Obwohl der Sokal-Index an einer Patientenpopulation entwickelt wurde, die vornehmlich mit Busulfan behandelt wurde, konnte eine angepasste Version im Zeitalter der Interferon-α-Therapie verwendet werden [102]. Auch scheint der Sokal-Index Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit einer kompletten zytogenetischen Remission und der „Major Molecular Response“ bei Therapie mit

Imatinib zu haben [194]. Es ist jedoch davon auszugehen, dass neue Techniken wie das Erstellen von Genexpressionsprofilen, die Quantifizierung des Wirkstofftransports oder die Bestimmung der individuellen IC_{50} für Imatinib größere Aussagekraft bezüglich des Therapieansprechens besitzen werden (29-33). Vielversprechend erscheint auch die Untersuchung von CML-spezifisch aberrierten MicroRNAs bei Patienten mit unterschiedlichem Ansprechen.

Zytopenien einer oder mehrerer Zelllinien sind ein therapeutisches Problem bei der Gabe von Imatinib, dem jedoch mit der supportiven Gabe von G-CSF und/oder Erythropoetin begegnet wird, um die volle therapeutische Dosis applizieren zu können [173]. Lediglich das Auftreten von starken Thrombozytopenien stellt einen Grund für die Unterbrechung der Therapie mit Imatinib dar. In diesem Fall herrscht die Empfehlung die Medikation abzusetzen, bis sich das periphere Blutbild normalisiert hat, anstatt die Imatinibdosis unter einen Wert von 300mg/d zu senken [90, 173]. Das Auftreten dieser unerwünschten Arzneimittelwirkung ist in signifikantem Maße assoziiert mit der Höhe der applizierten Dosis [65, 172]. Pathogenetisch sind die Zytopenien unter Imatinibtherapie noch unvollständig verstanden. Es erscheint unwahrscheinlich, dass es sich um einen direkten Effekt des Wirkstoffes auf die normale Hämatopoese handelt, da dieser bei Patienten mit Gastrointestinalen Stromatumoren und identischer Therapie nur selten beobachtet wird. Es besteht die Möglichkeit, dass die Ursache in einer inadäquaten Stammzellreserve von Patienten mit CML liegt oder dass immunologisch vermittelte Phänomene relevant sind.

Imatinib kann außerdem eine Reihe von nicht-hämatologischen Nebenwirkungen bedingen. Einige Patienten präsentieren infraorbitale oder (seltener) generalisierte Ödeme. Schmerzen in Knochen und Gelenken können auftreten und ein abnormer Anstieg der Leberenzyme kann eine Therapiepause erforderlich machen, ohne die es gelegentlich zum Leberversagen kommen kann. Bei einigen Patienten konnte eine Hypophosphatämie bei erniedrigten Kalziumspiegeln und niedrigen Spiegeln der Vitamin D-Metabolite beobachtet werden [17]. Häufig kann nach einer erforderlichen Therapiepause die Gabe von Imatinib ohne Wiederauftreten der entsprechenden Nebenwirkung fortgesetzt werden. In einigen Fällen muss der Patient als intolerant eingestuft und auf einen neueren Tyrosinkinaseinhibitor eingestellt werden. Ein Wiederauftreten der besagten Nebenwirkungen unter einer solchen Salvage-Therapie ist selten [90]. Spekulationen um das gehäufte Auftreten von Herzinsuffizienz unter Therapie oder die Kanzerogenität im Sinne von sekundären Malignome, wie etwa akuter myeloischer Leukämien oder urothelialer Neoplasien, konnten bisher nicht untermauert werden [6, 83, 104, 138, 213, 223, 225]. Tierexperimentell wurde nachgewiesen, dass Imatinib ein moderates teratogenes Potenzial besitzt, sodass Frauen unter Therapie zu einer wirkungsvollen Kontrazeption geraten wird. Dennoch ist es zu Schwangerschaften bei Frauen gekommen, die Imatinib regelmäßig in therapeutischen Dosen erhielten; hierbei konnte ein höheres Fehlbildungrisiko beobachtet werden als man es bei einer vergleichbaren, gesunden Population erwarten würde [7, 215].

Generell zeigt Imatinib eine Reihe von moderaten Nebenwirkungen. In der bisher 10-jährigen klinischen Erfahrung waren schwerwiegende oder fatale Komplikationen allerdings eine Seltenheit.

4.3.4 Kontrolle des Therapieerfolges

Das Therapieansprechen unter Imatinib zeigt eine große Variabilität sowohl in Bezug auf die Geschwindigkeit der Reaktion, als auch auf das Ausmaß der Reduktion der Krankheitslast im Körper des Patienten. Erklärungen für dieses Phänomen können in der Heterogenität der behandelten Leukämie, der individuellen Tumorlast zu Beginn der Therapie, sowie den individuellen pharmakokinetischen Reaktionen der Patienten liegen. Aus diesen Gründen ergibt sich die Notwendigkeit eines hochfrequenten Monitorings der Patienten, um das Therapieansprechen zu charakterisieren und ggf. eine Resistenz gegenüber Imatinib frühzeitig zu registrieren [90]. Das Ansprechen auf Tyrosinkinaseinhibition verläuft in der Regel nach einem charakteristischen Schema, bei dem zunächst eine Normalisierung der eventuellen Splenomegalie eintritt, gefolgt von einer Normalisierung des peripheren Blutbildes sowie einer Negativierung des Knochenmarks für Ph+-Zellen und letztlich auch einer Reduktion der *BCR-ABL1*-Transkripte, z.T. unter die Nachweisgrenze. Dieser sequentielle Verlauf kann genutzt werden, um das Therapieansprechen zu klassifizieren [130]. Generell ist eine engmaschige Therapiekontrolle wichtig, da die quantitative Reduktion der Krankheitslast, gemessen an zytogenetischen Befunden sowie der Anzahl zirkulierender *BCR-ABL1*-Transkripte, invers mit Wahrscheinlichkeit eines Krankheitsprogesses unter Therapie korreliert ist [114]. Es ist von entscheidender therapeutischer Bedeutung, bei einem schwachen Ansprechen auf Imatinib zeitnah andere therapeutische Optionen in Betracht zu ziehen [8]. Die Mehrzahl der Patienten zeigt eine Normalisierung des peripheren Blutbildes binnen drei Monaten unter Therapie und mehr als 90% erreichen eine komplette hämatologische Remission (CHR) innerhalb von sechs Monaten. Etwa 40% der Patienten zeigen unter Imatinib nach sechs Monaten ein partielles zytogenetisches Ansprechen und 65% erreichen innerhalb eines Jahres eine vollständige zytogenetische Remission (s.Tab 3). Eine kleine Minderheit der Patienten, die eine komplette zytogenetische Remission (CCyR) erreicht haben, zeigen im weiteren Verlauf eine erneute Positivierung für Ph+-Zellen und ein noch kleinerer Anteil weist in der Folge einen Krankheitsprogress auf [90].

Zusammenfassend gilt die Empfehlung, das Knochenmark ab Diagnosestellung in drei-monatlichen Intervallen zytogenetisch zu untersuchen, bis eine CCyR erreicht ist. In der Folge sollten zytogenetische Untersuchungen jährlich erfolgen. Eine quantitative Bestimmung der *BCR-ABL1*-Transkripte mittels qRT-PCR sollte ebenfalls ab Therapiebeginn drei-monatlich durchgeführt werden, wobei hier Knochenmarksaspirat und periphere Blutproben gleichwertige Ergebnisse liefern und somit letztere zu bevorzugen sind. Diese Frequenzen sind bei Patienten mit zunehmenden pathologischen Befunden zu steigern [90].

Tab. 3: Definition des Therapieansprechens (CML) [90]

Hämatologisches Ansprechen: Periphere Blutwerte (HR)
Komplett (C)
Thrombozyten<450x10^9/L
Leukozyten<10x10^9/L
Differentialblutbild: Keine unreifen granulozytären Vorstufen und <5% Basophile
Zytogenetisches Ansprechen: Ph-positive Metaphase (CyR)
Komplett: 0% (C)
Partiell: 1%-35% (P)
Minor: 36%-65% (m)
Minimal: 66%-95% (M)
Molekulares Ansprechen: *BCR-ABL1* Transkripte (MR)
Komplett: Transkripte nicht nachweisbar
Major: 0,1% (M)

Trotz der relativ kurzen Erfahrung mit Imatinib wurden bereits einige Kriterien vorgeschlagen, anhand derer das Ansprechen eines Patienten auf den Wirkstoff in der Standarddosis von 400 mg/d gemessen werden könnte [91], wobei eine Einstufung in „Therapieversagen“, das einer unmittelbaren Umstellung der Behandlung bedarf, und „suboptimales Therapieansprechen“, bei dem ein Wechsel der therapeutischen Strategie in Erwägung zu ziehen ist, vorgeschlagen wurde [8]. In einer dritten Kategorie „Warnzeichen“ wurden die Patienten zusammengefasst, die aus unterschiedlichen Gründen ein suboptimales Ansprechen vermuten lassen und daher engmaschiger zu kontrollieren sind.

Tab. 4: Klassifikation des Therapieansprechens unter Imatinib, übernommen aus [90]

Zeitpunkt	**Therapieversagen**	**Suboptimales Ansprechen**	**Warnzeichen**
Diagnose	Nicht anwendbar	Nicht anwendbar	Hochrisikopatienten; del(9q+); weitere chromosomale Aberrationen in Ph-Chromosom-positiven Zellen
3 Monate	Keine HR; stagnierende Erkrankung oder Progress	Weniger als CHR	Nicht anwendbar
6 Monate	Weniger als CHR, kein zytogenetisches Ansprechen; PH+>95%	Weniger als PCyR: PH+>35%	Nicht anwendbar
12 Monate	Weniger als PCyR: Ph+>35%	Weniger als CCyR	Weniger als MMR
18 Monate	Weniger als CCyR	Weniger als MMR	Nicht anwendbar
Zu jeder Zeit	Verlust der CHR; Verlust der CCyR, Mutationen (z.B. T315I)	Chromosomale Aberrationen in Ph-Chromosom-positiven Zellen; Verlust der MMR, Mutationen	Jeder Anstieg des Transkript-Levels

4.3.5 Resistenz und Resistenzmechanimen gegenüber Imatinib

Das Ansprechen eines Patienten mit CML auf eine Behandlung mit Imatinib ist hochgradig davon abhängig, in welchem Stadium der Erkrankung die Therapie initiiert wird [132, 194, 234, 244]. Zu unterscheiden sind grundsätzlich die primäre und die sekundäre Resistenz, welche sich im Anschluss an ein initiales Ansprechen einstellen kann, da von divergenten Pathomechanismen ausgegangen werden kann.

Im Verlauf kommt es bei zahlreichen Patienten mit CML unter Imatinib zum Therapieversagen. In einer Phase 3-Studie konnte bei weniger als 4% der Patienten in kompletter zytogenetischer Remission eine Negativierung für *BCR-ABL1* bei mindestens einer Gelegenheit nachgewiesen werden [114, 190]. Eine weitere Arbeit zeigte keinen einzigen molekularen Responder unter 120 Patienten in einem späten Stadium der CML[184]. Die weit höheren Raten an *BCR-ABL1*-Negativierungen, die von manchen Autoren beschrieben wurden, müssten vor dem Hintergrund der damals verwendeten, weniger sensitiven Methoden kritisch evaluiert werden. Hier wurde beispielsweise die reine quantitative RT-PCR ohne eine Validierung durch nested RT-PCR verwendet [52]. Die Frage , ob Patienten in kompletter zytogenetischer Remission, jedoch mit minimaler residueller Erkrankung unweigerlich ein Rezidiv nach Absetzen der Therapie mit Imatinb erleiden würden, konnte folglich bisher nicht abschließend geklärt werden [53, 176]. Während die Therapie der CML mit Interferon-α nämlich unter anderem zur Induktion einer zytotoxischen T-Zellreaktion gegen leukämische Epitope führt, welche im Verlauf unabhängig von einer Fortführung der medikamentösen Therapie bestehen bleibt, konnte kein derartiger Effekt unter Therapie mit Imatinib beschrieben werden. Dies könnte eine kontinuierliche TKI Behandlung oder zusätzliche therapeutische Maßnahmen erforderlich machen [39, 186]. Im Anschluss an eine allogene Knochenmarkstransplantation jedoch ist das klar definierte therapeutische Ziel die molekulargenetische Negativierung für *BCR-ABL1*, da dieses Kriterium nachgewiesenermaßen großen prädiktiven Wert für das progressfreie Überleben besitzt [151].

Am Beispiel von Zellkulturen, die graduell zunehmenden Konzentrationen von Imatinib ausgesetzt wurden und in der Folge über den Zeitraum mehrerer Monate eine Resistenz gegenüber dem Wirkstoff entwickelten, konnte gezeigt werden, dass eine signifikante Zunahme von *BCR-ABL1* mRNA und der Kinase auf Proteinebene, sowie teilweise eine ABL1-Genamplifikation gängige Resistenzmechanismen bei CML sind [153, 170, 273]. Darüber hinaus konnten andere Autoren darlegen, dass eine gesteigerte Expression von MDR1 eine Resistenz zur Folge hat, die durch Verapamil, einem Inhibitor des P-Glykoproteins, antagonisierbar ist. Darauffolgende Studien galten der Klärung der Rolle des P-Glykoproteins als zellulärem Transporter von Imatinib. Die Datenlage hierzu ist jedoch noch inhomogen [59, 77, 101, 107, 169, 275]. Ein großer Anteil der Patienten, die eine sekundäre Resistenz gegenüber Imatinib entwickeln, weisen einen Ph-positiven Subklon auf, der durch eine Punktmutation in der BCR-ABL-Kinasedomäne charakterisiert ist, welche eine Reaktivierung der dysregulierten, enzymatischen Aktivität bewirkt [90, 220]. Solche Punktmutationen finden sich gehäuft in fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung. Die Punktmutation p.T315I war die

erste derartige Mutation, die beschrieben wurde und sie gilt als bedeutsamster Subklon, da sie sowohl eine Resistenz gegenüber Imatinib als auch gegenüber Tyrosinkinaseinhibitoren der zweiten Generation bedingt. In der Folge wurden weitere Punktmutationen an den Codonpositionen 244, 253, 255, 315, 317, 355 und 396 beschrieben, welche Aminosäuren im BCR-ABL-Protein verändern und denen röntgenkristallographisch ein Kontakt mit Imatinib nachgewiesen werden konnte. Das Ausmaß der hieraus resultierenden Resistenz gegenüber Imatinib ist von variabler klinischer Bedeutung und reicht von marginal verlangsamten hämatologischen und zytogenetischen Ansprechzeiten über den Bedarf einer gesteigerten Imatinib Erhaltungsdosis oder einem Wechsel auf BCR-ABL1-Inhibitoren der zweiten Generation bis hin zum Krankheitsprogress unter Therapie [49, 140, 197]. Der molekulargenetische Nachweis dieser Punktmutationen erfolgt mittels Sequenzierung des relevanten Abschnitts im *BCR-ABL1*-Gens oder durch eine Allel-spezifische Polymerase-Kettenreaktion, wobei für die zuletzt genannte Methode in Studien eine höhere Sensitivität nachgewiesen werden konnte [131].

4.4 Morphologie des Knochenmarks unter Imatinib

Wie beschrieben basiert das Monitoring von Patienten unter Imatinib in der Regel auf Untersuchungen des peripheren Blutbildes sowie zytogenetischer und molekularbiologischer Marker. Morphologische Studien an Knochenmarksaspiraten und Beckenkammtrepanaten konnten einige prominete Merkmale unter Therapie mit Imatinib aufzeigen, deren Korrelation mit der Zytogenetik als gängigem Verlaufsmarker allerdings kontrovers diskutiert wird [27, 103].

4.4.1 Therapieeffekte und morphologische Charakteristika

Bei Patienten in der chronischen Phase einer CML unter Therapie mit Imatinib konnte bereits nach drei- bzw. sechs-monatiger Therapie sowohl eine signifikante Reduktion der leukämischen Zelllast, als auch eine Reduktion der allgemeinen Zellularität des Knochenmarks verzeichnet werden. Ebenfalls konnte eine Restitution der zytologisch normalen Hämatopoese beobachtet werden. Bei Patienten in der Akzelerierten bzw. der Blastischen Phase wurden diese Entwicklungen signifikant seltener beobachtet [178]. Anschließende enzym- und immunhistochemische Untersuchungen konnten dies bestätigen und erlaubten spezifischere Aussagen über eine signifikante Reduktion, speziell der granulozytären Vorläufer und der CD34-positiven Blasten sowie der megakaryozytären Vorstufen. Letztere zeigten morphometrisch signifikant weniger zytologische Atypien und lagen seltener in Mikroformen vor. Ebenso konnte eine Normalisierung der erythrozytären Vorläuferzellzahlen beschrieben werden. Neben einer Abnahme der Dichte mikrovaskulärer Proliferationen konnte auch eine Reduktion der prognostisch relevanten Myelofibrose beschrieben werden. Des Weiteren konnten sowohl der antiproliferative, als auch der apoptotische Effekt von Imatinib, der aus *in vitro* Untersuchung bekannt war, *in vivo* bestätigt werden [36, 251, 252].

4.4.2 Morphologische Charakteristika bei Therapieversagen

Mit zunehmender Erfahrung in der Befundung von Knochenmarksaspiraten und Beckenkammtrepanaten unter Therapie konnten Lugli *et al*. für sieben morphologische Faktoren eine signifikante positive Korrelation mit dem zytogenetischen Befund einer Remission belegen. Die Abwesenheit einer Punctio sicca und abnormer Megakaryozyten sowie die Normalisierung der Zellularität im Knochenmark wie auch der Myelofibrose waren hierbei ebenso von Bedeutung wie der Myeloid/Erythroid-Index, die Anzahl an Blasten im Ausstrich und die Basophilie im Aspirat [165]. Die Integration dieser Parameter zu einem morphologischen Score zwischen 0 und maximal 6 zeigt eine frühe und eine späte Korrelation mit dem zytogenetischen Ansprechen. Es konnte dargestellt werden, dass hochgradige morphologische Abnormitäten in den meisten Fällen mit einem Krankheitsprogress unter Therapie einhergehen und somit eine Intensivierung der Therapie oder einen Wechsel des Therapieschemas nahelegen. Für einen Score von 0 oder 1 konnte mit einer Sensitivität von 87,5% eine zytogenetische Remission bei einem negativen prädiktiven Wert von 93,1% nachgewiesen werden, wohingegen bei einem Score von 2 und höher eine zytogenetische Remission mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% ausgeschlossen werden konnte [165].

4.5 MicroRNAs

MircoRNAs sind eine relativ neu entdeckte Spezies kurzer, nicht-kodierender RNAs, die im Dienste der epigenetischen Regulation die Expression ihrer (teil-)komplementären Ziel-Gene auf mRNA-Ebene negativ regulieren[123, 261].

4.5.1 Struktur, Synthese und Bedeutung

Reife MicroRNAs sind 19 bis 22 Nukleotide kurze Moleküle und entstehen in mehreren Prozessierungsschritten aus einem 500-3000 Nukleotid-langen Primärtranskript (Primary MicroRNA), welches durch die Polymerasen II oder III aus einem nicht-kodierenden Abschnitt des Genoms transkribiert wird. Das Primärtranskript bildet spontan eine Loop-Struktur aus und wird durch einen Komplex aus nukleärer RNAse III (Drosha) und DGCR8 in eine 70 bis 100 Nukleotide-lange Precursor-MicroRNA überführt. Diese wiederum formt spontan eine Hairpin-Struktur und gelangt via Exportin 5 in das Zytoplasma, um durch die dortige RNAse III (Dicer) in 19 bis 22 Nukleotide-lange doppelsträngige MicroRNAs gespalten zu werden [10, 42]. In der Folge führt eine Interaktion zwischen dem aktiven Dicer-Komplex und dem TRB-Protein zu einer Entwindung und Singularisierung der Doppelstränge [171]. In der Regel geht die modulierende Wirkung vom Führungsstrang in Interaktion mit dem RIS-Komplex (*RNA-induced silencing complex*) aus. Einzelsträngige MicroRNAs binden über (partielle) Sequenzhomologien an die 3'untranslatierte Region ihrer Ziel-mRNA und zeigen in Abhängigkeit vom Grad ihrer Komplementarität entweder eine Repression der Translation oder aber bei hochgradiger/vollständiger Homologie eine Degradierung der selbigen [216]. Gegenwärtig sind im menschlichen Genom etwa 940 MicroRNAs

bekannt, von denen die meisten auch in anderen Säugetieren (Maus, Ratte, Schimpanse, etc.) konserviert sind. Eine MicroRNA kann eine variable Anzahl von Genen epigenetisch regulieren und im Umkehrschluss besitzen die meisten Gene mehrere Sequenzen von (partieller) Homologie zu unterschiedlichen MicroRNAs. Dies bedingt ein komplexes System der posttranskriptionellen Regulation, welches gegenwärtig nur in seinen ersten groben Zügen verstanden wird, da die Funktionen der meisten MicroRNAs auch bei Kenntnis ihrer Nukleotid-Sequenz und somit möglicher Ziel-mRNAs noch nicht bekannt sind. Mit der Entdeckung der MicroRNAs wurde ein neues Stellglied in der posttranslationalen Regulation der Genexpression identifiziert [277], welches zur Einflussnahme auf zentrale Funktionen der Zelle wie Proliferation [105, 106], Differenzierung [47] und Apoptose [28] befähigt ist. Die zahlreichen bedeutsamen zytologischen Prozesse, die dem steuernden Eingriff durch MicroRNAs unterliegen, begründen ihre Rolle als (Proto-)Onkogene [269] und Tumorsuppressorgene [127]. Die relativ kurzen MicroRNA-Moleküle zeigen im Vergleich mit ihren instabilen, weit längeren Ziel-Strukturen eine große Beständigkeit und Stabilität, was sie einer erfolgreichen Bestimmung auch aus Formalin-fixiertem und Parafin-eingebettetem (FFPE) Material zugänglich macht [70, 110, 279]. Dieser Umstand kommt gerade der Pathologie zu Gute, da sich in pathologischen Archiven für viele, auch seltene, maligne Erkrankungen FFPE-Proben von großer Zahl finden und für einzelne Patienten mitunter über einen langen Zeitraum mehrere Proben vorliegen, die den Krankheitsverlauf abbilden. Für die Hämatopathologie ist es von besonderer Bedeutung, dass entkalkte FFPE-Proben von Beckenkammtrepanaten im Rahmen quantitativer MicroRNA-Expressionsanalysen valide und reproduzierbare Ergebnisse liefern, die diese Materialien analog den FFPE-Proben anderer Gewebe der Forschung zugänglich machen [22]. Mit dem Nachweis von MicroRNAs in Körperflüssigkeiten wie Serum und Urin samt aberranten Expressionsmustern im Krankheitsfall gewinnt diese junge Molekül-Spezies noch zudem potenziell Gewicht in der Qualität eines Biomarkers für Diagnosestellung, Therapieansprechen oder Krankheitsprogression [152].

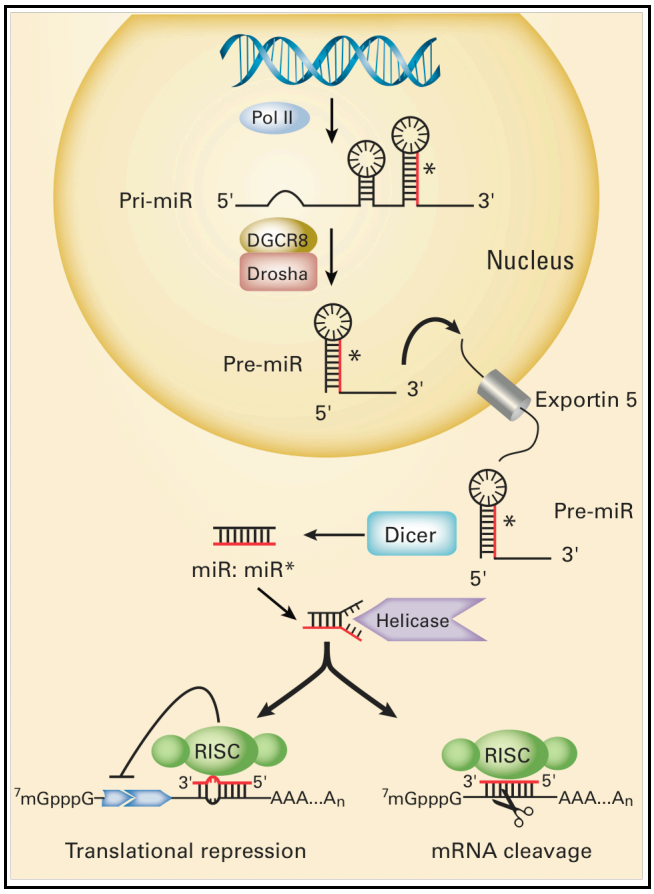

Abb.2: Biosynthese, Struktur und Wirkungsweise von MicroRNAs, übernommen aus [121]

4.5.2 MicroRNAs bei CML und CMPEs

Die Rolle der MicroRNAs in der Entstehung der CML sowie im Rahmen ihres Ansprechens auf eine Therapie mit Tyrosinkinaseinhibitoren wurde bisher nur oberflächlich untersucht und bleibt kausal unverstanden. Bisher durchgeführte Untersuchungen zeigten mitunter wenig reproduzierbare Ergebnisse. Es wurde von einer gesteigerten Expression des MicroRNA 17-92 Polycistrons in der chronischen Phase der Erkrankung berichtet, welche nicht in gleichem Maße in Proben in der Blastischen Phase zur Darstellung kam. Im Rahmen derselben Studie konnte eine aberrante Expression der MicroRNA 106a und MicroRNA 212 aufgezeigt werden. Es wurden jeweils aufgereinigte CD34-positive Vorläuferzellen von Patienten in der chronischen bzw. Blastischen Phase sowie gesunden Spendern untersucht [265]. In einer weiteren Arbeit wurden MicroRNAs identifiziert, die sowohl in mononukleären Zellen,des Knochenmarks als auch in isoliert betrachteten, aufgereinigten CD34-positiven Zellen eine auffällige Expression zeigten. Hierbei fand sich eine heraufregulierte Expression der MicroRNA 96 sowie eine negative Regulation der Expression von MicroRNA 10a, MicroRNA 150 und MicroRNA 151. An einem Zelllinien-Modell konnte mittels Tyrosinkinaseinhibition eine regulative Abhängigkeit der *BCR-ABL1*-Expression für MicroRNA 150 und MicroRNA 151 gezeigt werden. Die aberrante Expression der MicroRNA 10a hingegen scheint unabhängig von *BCR-ABL1* vermittelt zu sein. In keiner der untersuchten Zelllinien ließ sich der Nachweis von MicroRNA 96 führen [1]. Des Weiteren konnten anhand aufwändiger Versuche für die

MicroRNA 203 Eigenschaften eines Tumorsuppressorgens belegt werden. Als solches reguliert sie die Expression des *ABL1*-Transkripts herunter. Für die CML und weitere Hämoblastosen konnte eine reduzierte Expressivität dieser MicroRNA gezeigt werden, welche sich pathophysiologisch durch eine Hypermethylierung der Promotorregion für die entsprechende genomische Sequenz erklären ließ [35]. Da für die MicroRNA 21 eine onkogene Wirkung in einigen malignen Neoplasien gezeigt werden konnte, wurde anhand eine Inhibition durch sequenzspezifische Oligonukleotide untersucht, welchen Einfluss eine Suppression der MicroRNA 21 gesteuerten Signaltransduktionswege auf die CML-ähnliche Zelllinie K-562 hat. In diesem Rahmen konnte eine gesteigerte Apoptoserate, ein vermindertes Zellwachstum sowie ein inhibiertes Migrationsverhalten dargelegt werden [111].

Um die Dynamik in der MicroRNA-Expression unter Therapie nachzuvollziehen, wurde eine Untersuchung an Patienten im direkten Anschluss an die Diagnosestellung einer CML durchgeführt und Expressionsprofile an den Tagen 0, 1, 7 und 14 unter Therapie bestimmt. Ziel war es Imatinib-vermittelte Expressionsänderungen zu registrieren, um so einen Eindruck von der Wirkung der Substanz auf Ebene der epigenetischen Expressionsregulation zu gewinnen. Signifikante Veränderungen ergaben sich für MicroRNA 142-3p, MicroRNA 146a, MicroRNA 150 und MicroRNA 199b-5p, wobei peripheres Patientenblut als Probenmaterial diente und alle Ergebnisse mit den Expressionsmustern gesunder Spender unabhängig von relevanten pharmakologischen Therapien korreliert wurden. Eine positive Regulation zeigte sich unter Therapie für MicroRNA 146a sowie MicroRNA 150, eine Herabregulation fand sich hingegen bei MicroRNA 142-3p und MicroRNA 199b-5p [78]. In einer weiteren Arbeit wurde die globale MicroRNA-Expression in Abhängigkeit vom Stadium der CML zunächst mittels Microarrays untersucht. Die signifikante Deregulation auffälliger MicroRNAs wurde in einem zweiten Schritt mittels qRT-PCR validiert. Darüber hinaus wurden aufwändige *in silico* Untersuchungen angestellt, um potenzielle Ziel-Gene und ihre (patho-) physiologischen Implikationen zu charakterisieren. Basierend auf diesen Studien konnte im Rahmen der CML eine inverse Korrelation der Expression von miR 150 und MYB in vitro wie auch in vivo gezeigt werden [168].

Die Rolle von MicroRNAs bei der Resistenz gegenüber Imatinib ist gegenwärtig noch weitgehend unklar. In einer ersten orientierenden Arbeit zu diesem Thema konnten Expressionsprofile von drei Patienten mit primärer Imatinibresistenz mit denen von fünf Patienten korreliert werden, die ein regelhaftes Therapieansprechen zeigten. Untersucht wurden mononukleäre Zellen des Knochenmarks vor Therapie. Es konnte eine signifikante Herabregulation für 18 MicroRNAs (MicroRNAs 7, 23a, 26a, 29a, 29c, 30b, 30c, 100, 126#, 134, 141, 183, 196b, 199a, 224, 326, 422b and 520a) bei den Patienten mit Imatinibresistenz gezeigt werden sowie eine positive Regulation für MicroRNA 191 [228].

Eine systematische Untersuchung der MicroRNA-Expressionsmuster aller drei Entitäten des Formenkreises der klassischen myeloproliferativen Erkrankungen anhand großer Stichproben und speziell am histologischen Präparat steht bis dato aus wenngleich erste orientierende Arbeiten an

verschiedenen Patientenmaterialien die (nur zum Teil reproduzierbare) Deregulation einzelner MicroRNAs (u.a. MicroRNA 150) aufzeigen konnten [29, 30, 100, 117].

4.6 Fragestellung

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollen die folgenden Fragen beantwortet werden:
Lassen sich bei der chronischen myeloischen Leukämie spezifisch aberrierte MicroRNA-Expressionsmuster im histologischen Präparat nachweisen und zeigen diese eine charakteristische Kinetik unter Therapie mit Imatinib oder eine Korrelation mit morphologischen Befunden im Knochenmark? Zeigen einzelne MicroRNAs in ihrer Expression eine Korrelation mit Parametern des peripheren Blutbildes? Bieten orientierende Genexpressionsstudien an beschriebenen Ziel-Genen dysregulierter MicroRNAs neue Einblicke in die MicroRNA-abhängige Prägung des Phänotyps der Erkrankung?

Der zweite Teil der Arbeit ist der Beantwortung ähnlicher Fragestellungen für die anderen Erkrankungen des chronisch-myeloproliferativen Formenkreises gewidmet:
Lassen sich für die PV, die ET und die CIMF jeweils bei Diagnosestellung Dysregulationen in der Expression ausgewählter MicroRNAs nachweisen und kann ein *JAK2*-assoziierter Mechanismus hierfür angenommen werden? Zeigen einzelne MicroRNAs in ihrer Expression eine Korrelation mit Parametern des peripheren Blutbildes? Lassen sich anhand begleitender Genexpressionsstudien potenzielle Marker für die Differentialdiagnostik der genannten chronisch-myeloproliferativen Erkrankungen identifizieren?

5. Material und Methoden

5.1 Materialien

Im Folgenden findet sich eine Aufstellung der Materialien, die im Rahmen der Anfertigung der vorliegenden Arbeit Verwendung fanden.

5.1.1 Puffer

Alle Puffer wurden mit HPLC-gereinigtem Wasser angesetzt. Der pH-Wert der Puffer wurde mit NaOH- und HCL- Lösungen entsprechender Verdünnungen und Normalitäten eingestellt.

Tab. 5: Puffer

Puffer	Zusammensetzung
TAE (50×)	2 M (w/v) Tris-HCl; 1 M (v/v) Eisessig; 0,1 M EDTA, pH 7,6
Gelladepuffer	62,5% (v/v) Glycerin; 0,4% (v/v) SDS; 0,05% (w/v) Bromphenolblau

5.1.2 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden von den Firmen Merck, Roth oder Sigma-Aldrich im jeweils höchsten Reinheitsgrad bezogen.

5.1.3 Antikörper

Tab. 6: Antikörper

Antikörper	Hersteller	Klon	Verdünnung	Antigendemaskierung
CD3	Lab Vision	SP7	1:200	Dampfgarer (pH 9,0)
CD14	Lab Vision	7	1:30	Dampfgarer, EDTA (pH 8,0)
CD20	Lab Vision	L26	1:200	Dampftopf (pH 6,1)
CD34	Lab Vision	QB End/10	1:100	Dampfgarer (pH 9,0)
CD42	Lab Vision	42C01	1:200	Dampfgarer (pH 9,0)
CD117	Dako	Poly	1:300	Dampfgarer (pH 9,0)
HOXA1	Lifespan Biosciences	Poly	1:200	Dampfgarer (pH 9,0)
MYB	Epitomics	Mono	1:40	Dampfgarer (pH 6,1)

5.1.4 Oligonukliotide

Tab. 7: Oligonukleotide (*EK=endogene Kontrolle)

Assay-Bezeichnung	Hersteller	Verwendung
hsa-MicroRNA 10a	ABI[1]	RT und qRT-PCR – MicroRNA-Expression
hsa-MicroRNA 17-5p	ABI[1]	RT und qRT-PCR – MicroRNA-Expression
hsa-MicroRNA 23a	ABI[1]	RT und qRT-PCR – MicroRNA-Expression
hsa-MicroRNA 29a	ABI[1]	RT und qRT-PCR – MicroRNA-Expression
hsa-MicroRNA 29c	ABI[1]	RT und qRT-PCR – MicroRNA-Expression
hsa-MicroRNA 30c	ABI[1]	RT und qRT-PCR – MicroRNA-Expression
hsa-MicroRNA 106a	ABI[1]	RT und qRT-PCR – MicroRNA-Expression
hsa-MicroRNA 126#	ABI[1]	RT und qRT-PCR – MicroRNA-Expression
hsa-MicroRNA 142-3p	ABI[1]	RT und qRT-PCR – MicroRNA-Expression
hsa-MicroRNA 146a	ABI[1]	RT und qRT-PCR – MicroRNA-Expression
hsa-MicroRNA 150	ABI[1]	RT und qRT-PCR – MicroRNA-Expression
hsa-MicroRNA 155	ABI[1]	RT und qRT-PCR – MicroRNA-Expression
hsa-MicroRNA 182	ABI[1]	RT und qRT-PCR – MicroRNA-Expression
hsa-MicroRNA 199b-5p	ABI[1]	RT und qRT-PCR – MicroRNA-Expression
hsa-MicroRNA 203	ABI[1]	RT und qRT-PCR – MicroRNA-Expression
hsa-MicroRNA 342	ABI[1]	RT und qRT-PCR – MicroRNA-Expression
hsa-miR422b	ABI[1]	RT und qRT-PCR – MicroRNA-Expression
hsa-MicroRNA 451	ABI[1]	RT und qRT-PCR – MicroRNA-Expression
RNU6B	ABI[1]	RT und qRT-PCR – MicroRNA-Expression (EK*)
HMOX1	ABI[1]	qRT-PCR – Genexpression
HOXA1	ABI[1]	qRT-PCR – Genexpression
GLS	ABI[1]	qRT-PCR – Genexpression
GLS2	ABI[1]	qRT-PCR – Genexpression
c-MYB	ABI[1]	qRT-PCR – Genexpression
BACH1	ABI[1]	qRT-PCR – Genexpression
ABL1	ABI[1]	qRT-PCR – Genexpression
TOB2	ABI[1]	qRT-PCR – Genexpression
ß-GUS	ABI[1]	qRT-PCR – Genexpression (EK*)
JAK2 p.V617F	ABI[1]	Pyrosequenzierung

[1]Applied Biosystems, Inc., Foster City, California, United States

5.1.5 Reagenzien

Tab. 8: Reagenzien

Name	Hersteller
1 kb Plus DNA Ladder	Invitrogen
Agarose „Molecular Biology Grade“	Eurogentec
BrightVision +Poly-HRP-Anti Ms/Rb/Rt	ImmunoLogic
Ethidiumbromid	Serva
HPLC-H2O	Roth
PyroMark Annealing buffer version 1	Qiagen
PyroMark Binding buffer version 1	Qiagen
PyroMark Q24 reagents 5x24	Qiagen
PyroMark Wash buffer 10x	Qiagen
Streptavidin Sepharose Beads	GE Health Care

5.1.6 Kits

Tab. 9: Kits

Name	Hersteller
Light Cycler® Taq Man Master	Roche Diagnostics
PyroMark PCR Kit	Qiagen
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen
Recover AllTM Total Nucleic Acid Isolation	Ambion
TaqMan® Micro RNA Assay	Applied Biosystems
TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems
TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG	Applied Biosystems

5.1.7 Geräte

Tab. 10: Geräte

Gerät	Hersteller
Abzüge	Captair, Heraeus Instruments
Agarose-Elektrophoresekammern	Pharmacia, Bio-Rad
Agarose-Geldokumentationsanlage	Cellcame
Elektrophorese-Netzgeräte	Bio-Rad, Pharmacia
Feinwaagen	Ohaus, Kern
Kapillarspalt-Objektträger	Marienfeld
Light Cycler® 480	Roche Diagnostics
Magnetrührer	Ikamag

Mehrkanalpipetten	Eppendorf
Mikroskop – Axioscop	Zeiss
Mikroliter-Pipetten	Eppendorf
Minishaker	Sarstedt
Phase Fotodokumentation	Phase
Picofugen	Sarstedt, Stratagene
PyroMark Q24	Qiagen
Rotationsmikrotom DSC1	Leica
Thermocycler T1	Biometra
Thermomixer	Gerhardt, Eppendorf
Tischzentrifugen	Beckman, Heraeus Instruments, Eppendorf
UV-Spectrophometer	NanoDrop Technologies
Wasserbäder	GFL, Köttermann Labortechnik

5.1.8 Verbrauchsmaterialien

Tab. 11: Verbrauchsmaterialien

Materialien	Hersteller
96-Well-Reaktionsplatten - MicroAmp®	Applied Biosystems
96-Well-Reaktionsplatten	Roche Diagnostics
Eppendorf-Gefäße	Sarstedt
Klebefolie, optisch klar	Sarstedt, Roche Diagnostics
MicroAmp®-Film	Applied Biosystems
Pipettenspitzen	Sarstedt
Pipettenspitzen mit Filter	Sarstedt, Eppendorf, Greiner
Wägeschälchen	Hassa

5.1.9 Software

Tab. 12: Software

Programm	Hersteller
PyroMark Assay design 2.0	Qiagen
PyroMark Q24 – Laufprogramm	Qiagen
LightCycler – Software Version 1.5	Roche Diagnostics
GraphPad Prism 5.0d	GraphPad Software, Inc.
Genesis 1.7.6	TU Graz
Excel 12	Microsoft
R 2.12	r-project.org

5.1.10 In Silico Ressourcen

Tab. 13: *In Silico* Ressourcen

Programm	URL
PubMed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/
miRBase	http://www.mirbase.org/
miRanda	http://www.microRNA.com
PicTar	http://pictar.mdc-berlin.de/
TargetScan	http://www.targetscan.org/

5.2 Methoden

5.2.1 Studiengruppe

Im Folgenden wird die Rekrutierung der Studiengruppe anhand der berücksichtigten Auswahlkriterien sowie deren Charakterisierung beschrieben.

5.2.1.1 Patientenproben

Es wurden für die Untersuchungen an der chronischen myeloischen Leukämie aus dem Archiv des Instituts für Pathologie des UK-SH, Campus Lübeck die Proben ausgewählt, die neben dem morphologischen Bild einer CML bei Diagnosestellung auch ein Philadelphia-Chromosom in der Fluoreszenz-in-situ Hybridisierung oder ein BCR-ABL-Fusionstranskript in der PCR aufwiesen. In die Arbeit aufgenommen wurden des Weiteren Proben von Patienten, zu denen jeweils mindestens eine Probe im Verlauf unter Therapie mit einer bekannten Dosis Imatinib vorlag. Auf Grund der Seltenheit von Proben von Rezidiven unter Therapie wurden diese stets eingeschlossen, auch wenn keine Probe vom Zeitpunkt der Erstdiagnose vorlag. Berücksichtigt wurden Proben aus den Jahren 2002 bis 2011. Zusätzlich wurden Proben der anderen klassischen myeloproliferativen Erkrankungen (PVR, ET, CIMF) zum Zeitpunkt der Diagnosestellung, nicht-klassifizierbare Erkrankungen des Formenkreises sowie Proben von gesunden Patienten mit einem physiologischen Knochenmarksbefund aus dem Archiv rekrutiert. Letztere werden im Folgenden als Referenzgruppe bezeichnet. Eingeschlossen wurden ausschließlich Proben, die morphologisch klar einer der genannten Entitäten zuzuordnen und im Falle der chronisch myeloproliferativen Erkrankungen positiv auf die *JAK2*-Punktmutation p.V617F getestet werden konnten. Hierbei wurden Proben aus den Jahren 2006 bis 2010 berücksichtigt. Allen Gruppen gemeinsam war die Voraussetzung eines genügend großen und ausreichend beurteilbaren Knochenmarksbiopsates frei von Manifestationen anderer relevanter Erkrankungen. Alle Proben samt zugehöriger hämatologischer Daten wurden nach der Rekrutierung für die Studie einer umgehenden Anonymisierung im Sinne des genehmigten Ethikantrages der Ethikkommission der Universität zu Lübeck unterzogen.

5.2.1.2 Charakteristika der Patienten/innen

Das Geschlechterverhältnis bei den 101 berücksichtigten Proben im CML fokusierten Versuchsaufbau war mit 61:50 (m:w) insgesamt sowie innerhalb der Gruppen annähernd gleichmäßig. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung waren die Patienten mit CML (n=32) im Durchschnitt 56 Jahre alt. Unter Therapie betrug das durchschnittliche Alter der Gruppe (n=34) 57 Jahre. Die durchschnittliche Therapiedauer betrug 17,8 Monate. Die weiteren untersuchten Gruppen zeigten ein Durchschnittsalter von 65 (PV), 66 (ET), 65 (CIMF), 47 (nicht-klassifizierbare myelodysplastisch/myeloproliferative Erkrankungen) und 43 (Referenzgruppe) Jahren. In den gesonderten Untersuchungen an PV (n=27), ET (n=17) und CIMF (n=23) zeigte sich eine ähnliche Zusammensetzung. Es wurde die gleiche Referenzgruppe eingeschlossen (n=15). In allen Fällen entstammten die Proben dem Beckenkamm. An klinischen Parametern fanden neben der Imatinib-Dosierung sowie der Dauer der Therapie für die Patientengruppe mit CML noch der Hämoglobin-Wert sowie die Anzahl an Leukozyten und Thrombozyten im peripheren Blut gruppenübergreifend Berücksichtigung.

5.2.2 Histopathologische Methoden

5.2.2.1 Morphologie

Die morphologisch/histopathologische Aufarbeitung der Proben erfolgte an Haematoxylin-Eosin-, sowie Giemsa-gefärbten Paraffinschnitten. Das Verhältnis myeloischer und erythroider Zellen wurde anhand der enzymhistochemischen Darstellung der Naphtol-AS-D-Chloracetatesterase beurteilt. Des Weiteren wurden für jeden Fall eine Eisenfärbung und eine Gomori-Versilberung angefertigt. Sofern verfügbar wurde die Eisenfärbung neben dem Trepanat auch an Knochenmarksausstrichen durchgeführt, um eine höhere Sensitivität in der Erfassung von Speichereisen zu gewährleisten. Wo immer dies in Ermangelung aussagekräftiger Ausstriche nicht möglich war, wurde der Fall von weiteren Analysen in Bezug auf den Speichereisengehalt ausgeschlossen. Alle Färbungen wurden von Mitarbeitern/innen des Labors für hämatologische Diagnostik des Instituts für Pathologie in Lübeck angefertigt. Die im Folgenden beschriebenen morphologischen Kriterien wurden von zwei Untersuchern (H.Merz und N.Gebauer) beurteilt und standardisiert dokumentiert.

Stadienzuordnung: Die Stadienzuordnung der Erkrankungen erfolgte in Übereinstimmung mit den Diagnose-Kriterien der WHO[241].

Zellularität: Anhand des HE-Schnitts wurde die Zellularität des Präparates in Referenz zum Alter des Patienten bestimmt und anhand eines Scores semiquantitativ erfasst (-3=stark -, -2=mäßig-, -1= leicht hypozellulär, 0= normozellulär, 1= leicht -, 2=mäßig-, 3=stark hyperzellulär).

Myeloid/Erythroid-Ratio: Anhand der Naphtol-ASD-Chloracetatesterase-Reaktion wurde das Verhältnis myeloischer und erythroider Zellen und ihrer Vorläufer bestimmt.

Speichereisen: Speichereisen wurde am Knochenmarksausstrich mit Hilfe der Berliner-Blaureaktion nachgewiesen und beurteilt. In Fällen, zu denen keine Knochenmarksausstriche vorlagen, wurde die

Berliner-Blaureaktion am Knochenmarkstrepanat durchgeführt und die Beurteilung mit einer entsprechenden, der Methodik geschuldeten, Einschränkung versehen.
Agyrophile Fasern: Der agyrophile Fasergehalt des Knochenmarks wurde in der Gomori-Versilberung anhand des gängigen WHO-Scoring-Systems beurteilt (0-3)[247].

5.2.2.2 Immunhistochemie

Mittels immunhistochemischer Verfahren können Antigene in Gewebeproben durch die Bindung spezifischer Antikörper sowie chromogener Substanzen am Paraffinschnitt markiert und durch eine Gegenfärbung mit Haematoxylin speziellen histomorphologischen Strukturen zugeordnet werden. Zur Anwendung kommt hier die indirekte Immunhistochemie, bei der ein Primärantikörper an das zu visualisierende Epitop bindet und entweder im Falle monoklonaler Maus-Antikörper als Primärreagenz über einen Enhancer-Schritt oder im Falle von polyklonalen Antikörpern oder auch rabbit-monoklonalen Antikörpern einem enzymgekoppelten Sekundärantikörper (heute in Form eines Polymers) in einem zweiten (bzw. dritten) Schritt als Zielstruktur dient. Das gekoppelte Enzym katalysiert im Folgenden den sichtbaren Farbumschlag durch Präzipitation eines zugesetzen Chromogens. Bei allen verwendeten Antikörpern wurde das ursprünglich fast farblose Chromogen Diaminobenzidin (DAB) zugesetzt, welches durch die enzymatisch katalysierte Oxidation einen Farbumschlag in einen braun-schwarzen Niederschlag am Ort des Zielantigens zeigt. Die notwendigen Inkubations- und Waschschritte wurden mit dem TechMate™-Automaten von DAKO (Glostrup, Dänemark) durchgeführt. Die vorherige Antigendemaskierung erfolgte mit Puffern verschiedener pH-Werte mittels Hitzevorbehandlungen in der Mikrowelle, im Dampfgarer und im Dampftopf. Es kamen Primärantikörper gegen folgende Zielstrukturen zur Anwendung: CD3, CD14, CD20, CD34, CD42, CD117 (Tab. 14). Zur Visualisierung wurde das BrightVision +Poly- HRP-Anti Ms/Rb/Rt IgG Biotin-free Kit von ImmunoLogic (Duiven, Niederlande) verwendet. Dies beinhaltet einen IgG-Sekundärantikörper mit dem die HR-Peroxidase konjugiert ist (Poly-HRP-Anti-mouse/rabbit/rat IgG).

Tab. 14: Verwendete Primärantikörper mit Verdünnung und Antigendemaskierung

Antikörper	Typische markierte Strukturen	Firma	Klon	Verdünnung	Antigendemaskierung
CD3	T-Zellen	Lab Vision	SP7	1:200	Dampfgarer (pH 9,0)
CD14	Monozyten, Histiozyten	Lab Vision	7	1:30	Dampfgarer, EDTA (pH 8,0)
CD20	Reife B-Zellen, nicht Plasmazellen	Lab Vision	L26	1:200	Dampftopf (pH 6,1)
CD34	Hämatopoetische Vorläuferzellen, Endothelien	Lab Vision	QB End/10	1:100	Dampfgarer (pH 9,0)
CD42	Megakaryozytäre Reihe	Lab Vision	42C01	1:200	Dampfgarer (pH 9,0)
CD117	Hämatopoetische Vorläuferzellen, Mastzellen	Dako	Poly	1:300	Dampfgarer (pH 9,0)

5.2.3 Molekularbiologische Methoden

5.2.3.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren in wässriger Lösung erfolgt über die Messung der optischen Dichte (OD). Gemessen wurde die Absorption der Nukleinsäuren bei einer Wellenlänge von 260 nm, bei der die aromatischen Ringe der Nukleinsäuren die maximale Absorption erreichen. Die Absorptionsmessung erfolgte unter Verwendung des NanoDrop. Anhand des Verhältnisses der OD260nm und der OD280nm konnte auf die Reinheit der Nukleinsäuren geschlossen werden. Für reine DNA sollte der Quotient um 1,8 liegen. Niedrigere Werte deuten Verunreinigungen durch Proteine, höhere Werte Verunreinigungen durch Salze und Zucker an.

5.2.3.2 Isolierung von Nukleinsäuren

5.2.3.2.1 DNA-Isolierung aus Formalin-fixiertem und in Paraffin eingebettetem Gewebe

Im Rahmen der Isolierung chromosomaler DNA aus FFPE-Patientenmaterial mit dem Ziel der anschließenden Pyrosequenzierung und Detektion der *JAK2*-Punktmutation p.V617F bei den Proben von chronisch myeloproliferativen Neoplasien sowie deren relativer Quantifizierung wurde das QiaAmp Mini Kit 250 nach Herstellerangaben verwendet. Die Präparation erfolgt hierbei unter Verwendung einer Silika-Matrix, welche selektiv Nukleinsäuren bindet.

5.2.3.2.2 RNA-Isolierung aus Formalin-fixiertem und in Paraffin eingebettetem Gewebe

Im Rahmen der RNA-Extraktion wurde das RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit (Applied Biosystems P/N: AM1975) entsprechend der Herstelleranweisungen verwendet. Dabei wird die RNA an eine Silika-Membran gebunden. Durch einen hohen Ethanol-Gehalt in den Waschpuffern bleiben die MicroRNAs an der Membran gebunden und können, zusammen mit der restlichen RNA, abschließend eluiert werden. Im Vorfeld der Isolation wurden alle dazu benötigten Reagenzien entsprechend der Herstelleranweisungen vorbereitet.

5.2.3.3 Pyrosequenzierung der *JAK2*-Mutation p.V617F

Die Pyrosequenzierung ist eine Methode zur DNA-Sequenzierung, die, anders als die Kettenabbruchmethode durch Didesoxynukleotide nach Sanger, auf dem Prinzip der Sequenzierung parallel zur Synthese in Echtzeit basiert. Detektiert wird hierbei Pyrophosphat (PPi), welches durch die Zugabe und den anschließenden Einbau von Nukleotiden durch die DNA-Polymerase frei wird. Trotz der gegenwärtigen Limitierung auf etwa 400-500 Basen pro Lauf, im Gegensatz zu etwa 800-

1000 Nukleotiden nach Sanger, bietet die Pyrosequenzierung einen Ansatz für die parallele Bearbeitung vieler Proben und ermöglicht so einen höheren Durchsatz.

Die Präparation der Matrize für die Sequenzierung erfolgte unter Verwendung von Streptavidin-beschichteten Sepharose-Beads. Bei dem hier verwendeten Verfahren wird die Immobilisierung durch die Biotinylierung eines Primers und somit in der Folge dessen Bindung an Streptavidin auf den Beads ermöglicht. Die zu sequenzierende DNA liegt als Einzelstrang vor und wird mit dem sog. Sequencing-Primer hybridisiert. Außerdem werden noch DNA-Polymerase, ATP-Sulfurylase, Luciferase, Apyrase und Adenosin-5'Phosphosulfat sowie Luciferin zugesetzt. Die sequenzielle Inkubation mit Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTPs) bzw. dATPαS an Stelle von dATP, da letzteres als Substrat der Luciferase fungiert, induziert bei korrekter Hybridisierung den Einbau des komplementären Nukleotids durch die DNA-Polymerase, wobei PPi frei wird. Die ATP-Sulfurylase synthetisiert ATP aus Adenosin-5'Phosphosulfat in Gegenwart des so freiwerdenden PPi. ATP vermittelt in der Folge die katalytische Umwandlung von Luciferin in Oxiluciferin durch die Luciferase. Das hierbei generierte Licht wird durch eine Kamera detektiert und ist in seiner Quantität dem freiwerdenden ATP und somit der Anzahl der polymerisierten Nukleotide proportional. Zuletzt werden unverbaute Nukleotide sowie unverbrauchtes ATP durch die Apyrase neutralisiert und die Reaktion kann mit einem weiteren Nukleotid von neuem ablaufen.

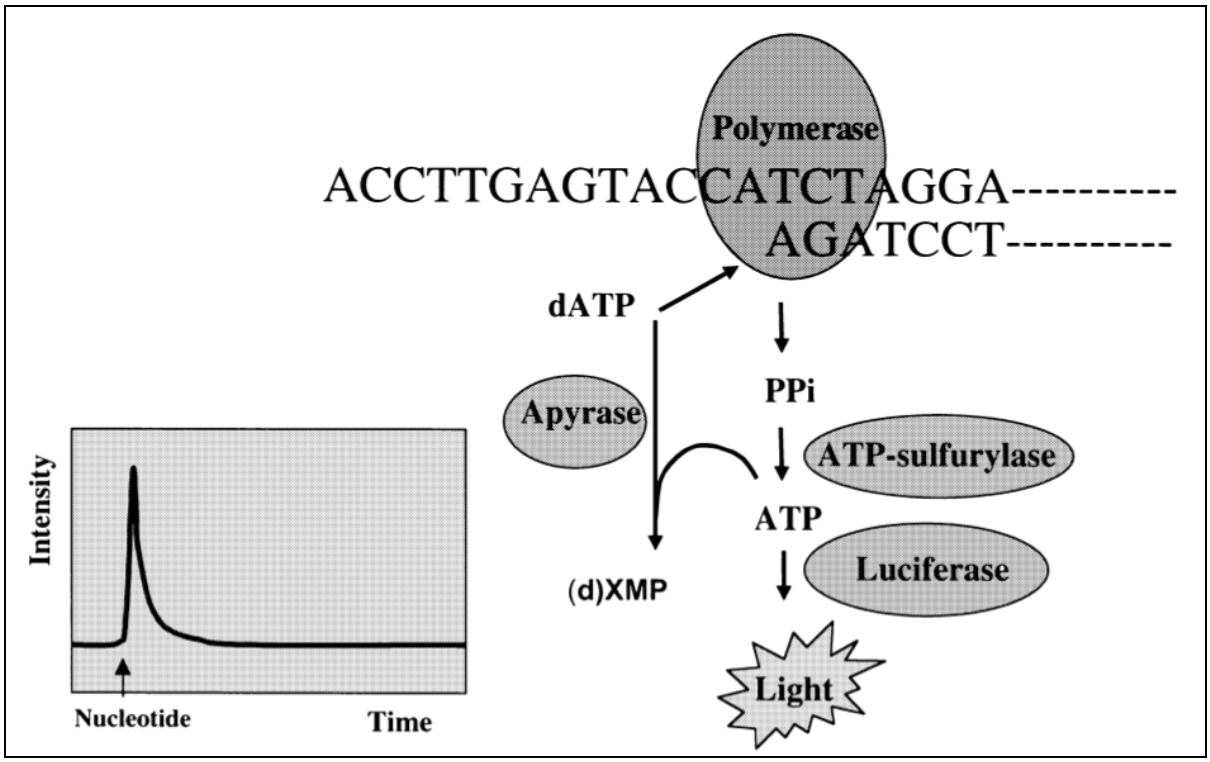

Abb. 3: Prinzip der Pyrosequenzierung, übernommen aus [222]

5.2.3.3.1 Primerdesign

Die verwendeten Primer wurden mit Hilfe der PyroMark Assay design Software 2.0 unter Betrachtung der benachbarten Sequnzabschnitte des bekannten Lokus der *JAK2*-Punktmutation p.V617F in

Übereinstimmung mit einem bereits beschriebenen Verfahren generiert [128]. Ziel war die Amplifikation eines Abschnittes von nicht mehr als 120 Basenpaaren. Der Sequenzprimer wurde in unmittelbarer Nähe der betroffenen Base platziert.

5.2.3.3.2 PCR

1. Zunächst wurden die Reagenzien des Kits zum Auftauen aus dem Tiefkühlschrank genommen.
2. Des Weiteren wurden 20 ng DNA je Probe mit HPLC-H_2O zu einem Gesamtvolumen von 9 μl vermischt.
3. Es wurde der PCR-Mix wie folgt jeder Probe zugesetzt.

Tab. 15: Ansatz des PCR-Mix für die Pyrosequenzierung

Komponente	Volumen
PyroMark PCR MasterMix (2x)	12,5 μl
CoralLoad Konzentrat (10x)	2,5 μl
J2-V617F-F (Biotin-gaagcagcaagtatgatgagca)	0,5 μl
J2-V617F-R (tgctctgagaaaggcattagaa)	0,5 μl

4. Im Anschluss wurde folgendes PCR-Programm am Thermocycler gestartet:

Tab. 16: Thermocycler PCR-Programm (Pyrosequenzierung)

Temperatur	Dauer	Zyklen
95°C	15 min	1
95°C	30 sec	45
58°C	30 sec	
72°C	30 sec	
72°C	10 min	1
4°C	-	-

5.2.3.3.3 Agarose-Gelelektrophorese

Mit dem Ziel der Darstellung der amplifizierten DNA-Fragmente wurden diese ihrer Größe nach in einem horizontalen Agarosegel aufgetrennt. Zu diesem Zweck wurden 5 μl des PCR-Produkts auf ein 1,5%iges Agarose-Gel aufgetragen. Zusätzlich wurden 1,5 μl 1 kb-DNA-Marker aufgetragen. Im Anschluss erfolgte eine Gelelektrophorese über 40 Minuten bei 100V und 400 mA. Um die Amplifikate sichtbar zu machen, wurde dem Gel beim Gießen 0,5 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt (s. Abb. 4).

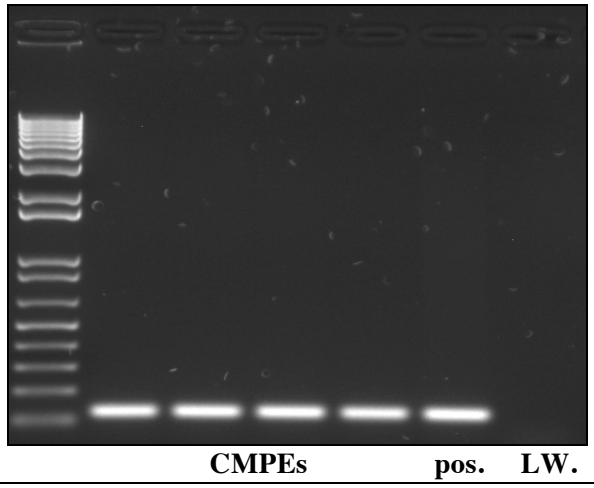

Abb. 4: *JAK2*V617F: Marker, CMPEs, Positiv-Kontrolle, Leerwert

5.2.3.3.4 Immobilisierung der PCR-Produkte

1. Zunächst wurde im Sinne der Einzelstrangpräparation der Matrize ein Immobilisierungsmix angesetzt und
2. In folgender Zusammensetzung auf eine, auf den PyroMark Q24 zugeschnittene, Reaktionsplatte gegeben.

Tab. 17: Ansatz für die Einzelstrangpräparation

Komponente	Volumen
PyroMark PCR Bindungspuffer	40 µl
Streptavidin Sepharose beads	2 µl
PCR-Produkt	10 µl
Wasser	28 µl

3. Im Anschluss wurde die Reaktionsplatte bei Raumtemperatur für 10 min bei 1400 U geschüttelt.

5.2.3.3.5 Sequenzreaktion

1. Zuerst wurde ein Heizblock auf 80°C vorgeheizt,
2. Der Lauf in der PyroMark Software hinterlegt
3. Und die Waschstation vorbereitet.
4. Im Anschluss wurden die folgenden Reagenzien für die Sequenzreaktion angesetzt:

Tab. 18: Ansatz für die Sequenzreaktion

Komponente	Volumen
Sequenzierprimer (ttacttactctcgtctccac)	0,5 μl
PyroMark Annealing-Puffer	24,5 μl

5. Danach wurden die Sequenzierplatte und die Immobilisierungsplatte in die Waschstation eingesetzt und aufgereinigt.
6. Daraufhin wurde die Sequenzierplatte für 2 min bei 80°C denaturiert, um danach für 5 min bei Raumtemperatur abzukühlen.
7. Währenddessen wurde eine Kartusche mit Substraten, den Enzymen sowie den dNTPs bestückt.
8. Zuletzt wurden Sequenzierplatte und Kartusche in den PyroMark eingesetzt und der Lauf gestartet.
9. Die Erfassung und Verarbeitung der Messdaten erfolgte unter Verwendung der PyroMark Q24 Softwar in der Version 2.0.

5.2.3.4 Quantitative Real-Time-Polymerasekettenreaktion für MicroRNAs

Die quantitative oder Real-time-PCR (qRT-PCR bzw. RTq-PCR) beschreibt einen Versuchsaufbau nach dem Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion, bei dem die Menge des entstehenden Amplifikats zeitgleich mit der Synthese bestimmt wird. Dieses Verfahren wird i.d.R. zur Quantifizierung von Genexpression, der Unterscheidung von homo- und heterozygoten Zellen oder aber zur Diagnostik infektiöser oder maligner Prozesse verwendet. Die quantitative Detektion der Amplifikate erfolgt über die Bestimmung von Fluoreszenzintensitäten, die sich in Abhängigkeit von der verwendeten Methode mehr oder weniger spezifisch für das jeweilige Produkt ergeben. Durch die Verwendung doppelstrang-spezifisch interkalierender DNA-Farbstoffe wie Ethidiumbromid oder SYBR-Green I kommt unspezifische Fluoreszenz im Rahmen der qRT-PCR zustande. Die Ergebnisse eines solchen Versuches können in einem weiteren Schritt mittels einer Schmelzkurvenanalyse spezifiziert werden. Einen spezifischen Nachweis der PCR-Produkte erlauben fluorophormarkierte Oligonukleotidsonden, die mit der Zielsequenz hybridisieren. In der Vorliegenden Arbeit kamen nach diesem Prinzip TaqMan-Sonden (oder Double-Dye-Oligos) zum Einsatz. Hierbei handelt es sich um Oligonukleotide, die an einem Ende mit einem Reporterfluoreszenzfarbstoff wie Tetrachlorofluoreszein (TET) oder 6-Carboxifluorescein (FAM) und am anderen Ende mit einem Quencher wie Tetramethylrhodamin (TAMRA) markiert sind. Aus der räumlichen Nähe von Fluorophor und Quencher ergibt sich zunächst eine vollständige Suppression der Fluoreszenz[162]. Die Sequenz der Sonden wird so gewählt, dass ihre Bindung in dem DNA-Abschnitt erfolgt, der durch ein spezifisches Primerpaar amplifiziert wird. Wenn im Verlauf der PCR die verwendete Taq-Polymerase mittels ihrer 5'-3'-Exonukleaseaktivität bei der Gegenstrangsynthese das 5'-Ende der Sonde hydrolytisch abspaltet, kommt es zur Trennung

von Fluorophor und Quencher. Dieser Effekt manifestiert sich in einer steigenden Fluoreszenzintensität definierter Wellenlänge des angeregten Reporterfluoreszenzfarbstoffes, welche zum Ende jedes Zyklus detektiert wird. Die gemessene Fluoreszenzintensität ist folglich der Anzahl der Amplifikate und somit in etwa der Menge an cDNA proportional.

Aus diesem Aufbau ergibt sich die Anzahl der abgelaufenen Zyklen als Einheit für die relative Quantität. Der Schnittpunkt mit einer Baseline oberhalb des Hintergrundrauschens markiert den Zeitpunkt des Übertritts der Reaktion aus der linearen in die exponentielle Phase. Der Heraustritt des spezifischen Signals aus dem Hintergrund wird als *crossing point* (CP) oder *threshold cycle* (Ct) bezeichnet. Diese Quantifizierung erfolgte mit Hilfe der LightCycler-Software (Roche Diagnostics) unter Verwendung des *second derivate maximum* Analysemodus.

Die Auswahl der zu untersuchenden MicroRNAs und mRNAs, sowohl für die Untersuchungen an der CML als auch für die Studien an den CMPEs, wurde anhand der statistischen Signifikanz in Voruntersuchungen anderer Arbeitsgruppen, an der Entität sowie der Tragweite der physiologischen Implikationen einer potenziellen Aberration getroffen. Die Quantifizierung der MicroRNAs wurde mit Hilfe von TaqMan® MicroRNA-Assays in einer zweistufigen Real-Time-PCR durchgeführt. Im ersten Schritt erfolgte die reverse Transkription, bei der die cDNA unter Verwendung der jeweiligen MicroRNA-spezifischen looped RT-Primer aus den TaqMan® MicroRNA-Assays, dem TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems P/N: 4367038 REV A) sowie der zuvor extrahierten RNA synthetisiert wurde. Im Anschluss folgte eine Polymerase-Kettenreaktion, in der cDNA durch TaqMan® MicroRNA-Assays und den TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG (Applied Biosystems P/N: 4324018) unter Detektion der generierten Fluoreszenz amplifiziert wurde. Die nachfolgend beschriebenen Schritte wurden jeweils für folgende MicroRNAs sowie die endogene Kontrolle (snRNA U6B) durchgeführt:

Tab. 19: Untersuchte MicroRNAs

Transkript	Hersteller	AssayID	CML	CMPEs
RNU6B	ABI[1]	001093	X	X
MicroRNA 10a	ABI[1]	000387	X	X
MicroRNA 17-5p	ABI[1]	000393	X	
MicroRNA 23a	ABI[1]	000399	X	
MicroRNA 29a	ABI[1]	002112	X	
MicroRNA 29c	ABI[1]	000587	X	
MicroRNA 30c	ABI[1]	000419	X	
MicroRNA 106a	ABI[1]	002169	X	
MicroRNA 126#	ABI[1]	002228	X	
MicroRNA 142-3p	ABI[1]	000464	X	
MicroRNA 146a	ABI[1]	000468	X	

MicroRNA 150	ABI[1]	000473	X	X
MicroRNA 155	ABI[1]	002623	X	
MicroRNA 182	ABI[1]	002334		X
MicroRNA 199b-5p	ABI[1]	000500	X	
MicroRNA 203	ABI[1]	000507	X	
MicroRNA 342	ABI[1]	000551		X
MicroRNA 422b	ABI[1]	000575	X	
MicroRNA 451	ABI[1]	001105	X	

[1]Applied Biosystems, Inc., Foster City, California, United States

5.2.3.4.1 Reverse Transkription

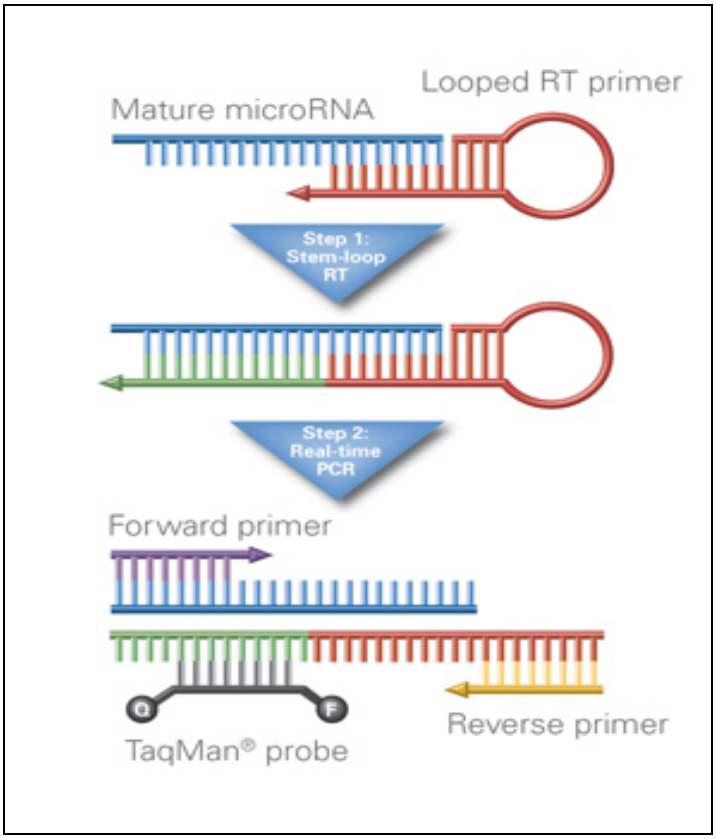

Abb. 5: Prinzip der quantitativen RT-PCR von reifen MicroRNAs (www.appliedbiosystems.com).

1. Zunächst wurden die Reagenzien des Kits aus dem Tiefkühlschrank genommen und auf Eis gelagert, um kontrolliert auftauen zu können.
2. In einem Reagenzgefäß wurde im Anschluss der Master-Mix für die Reverse Transkription wie folgt vorbereitet:

Tab. 20: Ansatz des RT-Master-Mix

Komponente	Master-Mix Volumen/ Reaktion
dNTP mix (100 mM total)	0,075 µl
Multiscribe™ RT Enzym (50 U/µl)	0,5 µl
10 x RT Puffer	0,75 µl
RNase Inhibitor (20 U/µl)	0,094 µl
RT-Primer (10 nm/ µl)	1,5 µl
Gesamt	2,919 µl

3. Der Ansatz wurde vorsichtig durchmischt, kurz anzentrifugiert und dann auf Eis gelagert, während die 96-Well-Reaktionsplatte für die reverse Transkription vorbereitet wurde.
4. Für jede RT-Reaktion wurden 2,919 µl des RT-Master-Mixes in die 96-Well-Reaktionsplatte vorgelegt und 4,581 µl der extrahierten RNA (10ng) zugegeben.
5. Die 96-Well-Reaktionsplatte wurde im Anschluss mit MicroAmp®-Film verschlossen.
6. Der Ansatz wurde vorsichtig durchmischt, kurz anzentrifugiert und anschließend für 5 Minuten auf Eis inkubiert, bevor er im Thermo-Cycler platziert wurde, der wie folgt eingestellt wurde:

Tab. 21: Thermocycler PCR-Programm (Reverse Transkription)

Zeit (Minuten)	Temperatur (°C)
30	16
30	42
5	85
∞	4

5.2.3.4.2 Real-Time Polymerase-Kettenreaktion

1. Zunächst wurde ein Master-Mix für die qPCR in einem geeigneten Reagenzgefäß mit folgenden Komponenten vorbereitet:

Tab. 22: Ansatz des qPCR-Master-Mix (MicroRNA)

Komponente	Master-Mix Volumen/18,66 µl Reaktion
TaqMan® Small RNA Assay	1,00 µl
TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase®	10,00 µl

UNG	
Nuklease-freies Wasser	7,67 µl
Gesamt	18,66 µl

2. Das Reagenzgefäß wurde im Anschluss verschlossen und der Inhalt vorsichtig durchmischt und kurz anzentrifugiert.
3. Eine 96-Well-Reaktionsplatte wurde der Reaktion entsprechend beschriftet. In die verwendeten Wells wurden 1,33 µl der zu amplifizierenden cDNA vorgelegt und 18,66 µl des Master-Mix hinzugefügt.
4. Im Anschluss wurde die Platte mit Folie verschlossen
5. Und kurz anzentrifugiert.
6. Der gesamte Ansatz wurde in den Thermo-Cycler (Roche LightCycler® 480 Real-Time-PCR System) gegeben.
7. In der System-Software wurden Angaben über die Proben-ID, Ansatzvolumen und Reaktionskonditionen wie folgt hinterlegt:

Tab. 23: Lightcycler-Programm (MicroRNA)

Schritt	Enzymaktivierung	Denaturierung (je 40 Zyklen)	Annealing (je 40 Zyklen)
Temperatur (°C)	95	95	60
Zeit	10 Minuten	15 Sekunden	60 Sekunden

8. Abschließend wurde der PCR-Lauf gestartet.
9. Die gemessenen Ergebnisse wurden mit Hilfe der System-Software verarbeitet, indem Baseline und Threshold bestimmt wurden.
10. Die so formatierten Daten wurden zur weiteren Bearbeitung und Analyse in ein wissenschaftliches 2D Statistik- und Grafikprogramm (GraphPad Software Inc.GraphPad Prism 5) übertragen.

5.2.3.5 Quantitative Real-Time-Polymerasekettenreaktion für mRNAs

Im Anschluss an die MicroRNA-Expressionsanalysen wurden TaqMan® Genexpressions-Assays verwendet, um aberrante und potenziell MicroRNA-vermittelte Genexpressionsmuster auf mRNA-Ebene zu detektieren.

5.2.3.5.1 Reverse Transkription

Zur reversen Transkription ausgewählter mRNAs (s.Tab. 24) wurde RNA unter Verwendung des High Capacity RNA to cDNA Kits (ABI) nach Herstellerangaben in cDNA transkribiert. Die generierte cDNA wurde bei –20°C gelagert oder direkt für die PCR verwendet.

5.2.3.5.2 Real-Time Polymerase-Kettenreaktion

Die nachfolgend beschriebenen Schritte wurden jeweils für folgende mRNAs sowie die endogene Kontrolle Beta-Glucuronidase (*β-GUS*) durchgeführt:

Tab. 24: Verwendete Genexpressions-Assays

Transkript	Hersteller	AssayID	CML	CMPEs
c-MYB	ABI[1]	Hs00920554_m1*	X	X
BACH1	ABI[1]	Hs00230917_m1*	X	
ABL1	ABI[1]	Hs01104728_m1*	X	
TOB2	ABI[1]	Hs00249392_s1*	X	
HMOX1	ABI[1]	Hs01110250_m1	X	

[1]Applied Biosystems, Inc., Foster City, California, United States

1. Zunächst wurde ein Master-Mix für die qPCR in einem geeigneten Reagenzgefäß mit folgenden Komponenten vorbereitet:

Tab. 25: Ansatz des Master-Mix (Genexpression)

Komponente	Master-Mix Volumen µl/Reaktion
TaqMan® Genexpressions-Assay	1 µl
TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG	10 µl
Nuklease-freies Wasser	5 µl
Gesamt	16 µl

2. Das Reagenzgefäß wurde im Anschluss verschlossen und der Inhalt vorsichtig durchmischt und kurz anzentrifugiert.
3. Eine 96-Well-Reaktionsplatte wurde der Reaktion entsprechend beschriftet. In die verwendeten Wells wurden jeweils 16µl des Master-Mix sowie 4 µl der jeweils zu amplifizierenden cDNA vorgelegt.
4. Im Anschluss wurde die Platte mit Folie verschlossen

5. Und kurz anzentrifugiert.
6. Der gesamte Ansatz wurde in den Thermo-Cycler (Roche LightCycler® 480 Real-Time-PCR System) gegeben.
7. In der System-Software wurden Angaben über die Proben-ID, Ansatzvolumen und Reaktionskonditionen wie folgt hinterlegt:

Tab. 26: Lightcycler-Programm (Genexpression)

Schritt	UNG Inkubation	Enzymaktivierung	Denaturierung (je 45 Zyklen)	Annealing (je 45 Zyklen)
Temperatur (°C)	50	95	95	60
Zeit	2 Minuten	10 Minuten	15 Sekunden	60 Sekunden

1. Abschließend wurde der PCR-Lauf gestartet.
2. Die gemessenen Ergebnisse wurden mit Hilfe der System-Software verarbeitet, indem Baseline und Threshold bestimmt wurden.
3. Die so formatierten Daten wurden zur weiteren Bearbeitung und Analyse in ein wissenschaftliches 2D Statistik- und Grafikprogramm (GraphPad Software Inc.GraphPad Prism 5) übertragen.

5.3 Etablierung einer neuen immunhistochemischen Färbung für *c-MYB*

Zur Verwendung kommt auch hier, wie unter 5.1 beschrieben, die indirekte Immunhistochemie, bei der ein Primärantikörper an das zu visualisierende Epitop bindet und einem enzymgekoppelten Sekundärantikörper in einem zweiten Schritt als Zielstruktur dient. Das gekoppelte Enzym katalysiert im Folgenden den sichtbaren Farbumschlag eines zugesetzen Chromogens. Es wurde das ursprünglich fast farblose Chromogen Diaminobenzidin (DAB) zugesetzt, welches durch die enzymatisch katalysierte Oxidation einen Farbumschlag ins Bräunliche zeigt. Die notwendigen Inkubations- und Waschschritte wurden mit dem TechMate™-Automaten von DAKO (Glostrup, Dänemark) durchgeführt. Die vorherige Antigendemaskierung erfolgte im Rahmen der Etablierung mittels Hitzevorbehandlungen im Dampfgarer mit einem Puffer des vom Hersteller empfohlenen pH-Wertes von 6,1. Die verwendeten Primärantikörper wurden in mehreren Verdünnungen evaluiert (Herstellerempfehlung 12,5-25:1), wobei besonderes Augenmerk auf Sensitivität und Spezifität der Markierung gelegt wurde. Neben dem Knochenmark wurden weiteren Gewebe berücksichtigt (Tonsille, Lymphknoten, Milz, Darm). Eine optimale Relation dieser Parameter ergab sich bei einer Vorbehandlung im Dampfgarer in einem Puffer mit dem pH 6,1 und einer Verdünnung von 1:15.
Unter Berücksichtigung der angegebenen Parameter wurde exemplarisch eine Färbung an fünf Fällen aus der Referenzgruppe, zehn Fällen von CML bei Erstdiagnose und zehn Fällen von CML unter

Therapie angefertigt. Die Auswahl der Fälle orientierte sich an der charakteristischen quantitativen Expression der MYB-mRNA. Es wurden die angefärbten Zellen auf Zelllinienzugehörigkeit und prozentualen Anteil an der Gesamtzellularität der Probe hin untersucht.

5.4 Statistik

Zur statistischen Auswertung der relativen Expression von MicroRNAs und potentiellen Zielgenen wurde der nicht-parametrische Mann-Whitney-U-Test für die vergleichende Untersuchung von malignem Proben- und Kontrollmaterial verwendet. Die Auswertung der Expressionsentwicklung unter Therapie erfolgte mittels des gepaarten nicht-parametrischen „Wilcoxon matched-pairs signed rank"-Test. Berücksichtigung fanden hier selbstverständlich nur Patienten von denen Proben vor sowie unter Therapie vorlagen. Um den Grad der Korrelation von morphologischem Therapieansprechen, gefasst in Form des Lugli-Scores (0-6), und der Expression der einzelnen MicroRNAs zu erfassen, wurden die Korrelationsbestimmungen nach Spearman sowie eine lineare Regression berechnet. Regressionsgraden wurden in die graphische Darstellung der Ergebnisse eingepflegt. Diese Tests wurden auch für die Untersuchung der Korrelation von peripherem Blutbild und quantitativer Expression der einzelnen MicroRNAs verwendet. Alle angegebenen p-Werte beziehen sich auf zweiseitige Tests. Als Signifikanzniveau wurde ein alpha-Wert von 5% gewählt. Eine Normalisierung der quantitativen Expression einzelner MicroRNAs wurde nach der Delta-CT-Methode unter Bezug auf die quantitative Expression der ubiquitär exprimierten *RNU6B* für jede Probe durchgeführt (In Analogie wurde die Expression von mRNAs in Relation zum *Housekeeping-Gen* Beta-Glucorunidase normalisiert). Relative Expressionsänderungen wurden nach der $2^{-\Delta\Delta CT}$-Methode kalkuliert. Als Referenz dienten die Delta-CT-Werte der Referenzpopulation. Im Rahmen dieser explorativ angelegten Arbeit wurde auf eine Bonferroni-Korrektur zur Neutralisation der Alphafehler-Kumulierung verzichtet. In einem ersten Ansatz wurde die Wertigkeit der einzelnen MicroRNAs für diagnostische Fragestellungen unter Verwendung von Random Forest mit dem Ziel einer späteren Generierung von Klassifikationsbäumen bestimmt. Die Durchführung der genannten statistischen Tests und ihre graphische Aufbereitung erfolgte mit Microsoft Excel Version 12.2.8 und GraphPad Prism 5. Frau Silke Szymczak und Herr Jochen Kruppa aus dem Institut für Medizinische Biometrie und Statistik der Universität Lübeck fungierten im Rahmen dieser Arbeit als Berater bei der Frage nach der Auswahl der statistischen Testverfahren. Herr Kruppa war darüber hinaus maßgeblich an der Bestimmung der Wertigkeit einzelner MicroRNAs für diagnostische Fragestellungen beteiligt.

6. Ergebnisse

6.1 Histopathologische Befunde unter Therapie mit Imatinib

Es konnte im Rahmen einiger aufwändiger Studien gezeigt werden, dass sich unter Therapie mit Imatinib einige charakteristische Befunde am Knochenmark erheben lassen, denen z.T. eine erhebliche prognostische Bedeutung zukommt [36, 165, 178, 251, 252]. Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit erfolgten umfangreiche morphologische und immunhistochemische Untersuchungen an Knochenmarksbiopsaten und Ausstrichen von Patienten mit CML vor sowie unter Therapie mit Imatinib. Diese sollten einen Ausgangspunkt für die anschließenden Studien zu MicroRNA/mRNA-Expressionsmustern und deren Korrelation mit konventionellen histopathologischen Befunden bilden. Hierbei sollte evaluiert werden, inwiefern ausgewählte MicroRNAs und/oder mRNAs Potenzial als Marker in der Diagnostik oder in der Verlaufsbegutachtung maligner myeloischer Prozesse im Knochenmark in Analogie zu den etablierten und konventionellen Methoden in der Routine-Diagnostik besitzen.

6.1.1 Morphologie

Anhand von morphologischen (HE, Giemsa) und enzymhistochemischen Färbungen (Naphtol-ASD-Chloracetatesterase) sowie der Gomori-Versilberung wurden die folgenden Mermale evaluiert:
Zunächst sind hier die Befunde zum Zeitpunkt der Diagnosestellung im Mittel dargestellt (s.Tab. 27).

Tab. 27: Morphologische Merkmale bei CML zum Zeitpunkt der Diagnosestellung *Als Score von -3 - 0 - +3 (-3=stark -, -2=mäßig-, -1= leicht hypozellulär, 0= normozellulär, +1= leicht -, +2=mäßig-, +3=stark hyperzellulär), ** European-Cosensus-Grading [247], *** Gale-Score [82], SD in Klammern

Zellularität*	Myeloid/Erythroid-Ratio	Myelofibrose**	Speichereisen***
2,16 (0,63)	5,69 (2,66)	1,25 (0,62)	1,41 (0,97)

Dieselben morphologischen Merkmale zeigten unter Therapie eine veränderte Verteilung, deren Mittel im Folgenden dargestellt ist (s.Tab. 28).

Tab. 28: Morphologische Merkmale bei CML unter Therapie *Als Score von -3 - 0 - +3 (-3=stark -, -2=mäßig-, -1= leicht hypozellulär, 0= normozellulär, +1= leicht -, +2=mäßig-, +3=stark hyperzellulär), ** European-Consensus-Grading [247], *** Gale-Score [82], SD in Klammern

	Zellularität*	Myeloid/Erythroid-Ratio	Myelofibrose**	Speichereisen***
	0,29 (1,36)	3,56 (2,11)	1,29 (0,46)	2,71 (1,74)
Therapieeffekt	-1,87	-2,13	+0,04	+1,30
p-Wert	<0,0001	0,0002	0,90	0,0018

6.1.2 Immunhistochemie

Unter Verwendung immunhistochemischer Methoden wurde semiquantitativ die Expression der Antigene CD3, 14, 20, 34, 42 und 117 sowie deren histologische Verteilung bestimmt.
Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung zeigte sich folgendes Verteilungsmuster der genannten Antigene (s.Tab 29.1 und 29.2):

Tab. 29.1: Prozentuale Antigenverteilung bei Diagnosestellung, SD in Klammern

Antigen	Mittlerer prozentualer Anteil an der Zellularität der Biopsie	Kommentar
CD 3	9,69% (4,39)	z.T gemischtzellige Lymphozytenherde
CD 14	7,00% (4,25)	-
CD 20	3,63% (2,18)	z.T gemischtzellige Lymphozytenherde
CD 34	6,75% (4,28)	-
CD 117	4,84% (3,845)	-

Tab. 29.2: Antigenverteilung bei Diagnosestellung, SD in Klammern

Antigen	Mittlerer Score* für den Anteil der Megakaryopoese an der Zellularität der Biopsie	Kommentar
CD42	2,09 (0,73)	z.T. Mikroformen, lockere Gruppenbildung/Clusterbildung

*(0=normwertig; 1=leicht gesteigert 2=mäßig gesteigert; 3=stark gesteigert)

Unter Therapie ergab sich für dieselben Parameter eine veränderte Verteilung, die im Folgenden dargestellt ist (s. Tab. 30.1 und 30.2):

Tab. 30.1: Prozentuale Antigenverteilung bei CML unter Therapie, SD in Klammern

Antigen	Mittlerer prozentualer Anteil an der Zellularität der Biopsie	Kommentar	Therapieeffekt	p-Wert
CD 3	14,79% (6,79)	z.T gemischtzellige Lymphozytenherde	+ 5,10%	0,0006
CD 14	10,88% (5,29)	-	+ 3,88%	0,0011
CD 20	7,27% (3,72)	z.T gemischtzellige Lymphozytenherde	+ 3,64%	<0,0001
CD 34	5,00% (3,05)	-	- 1,75%	0,1431
CD 117	2,85% (2,89)	-	- 1,99%	0,0148

Tab. 30.2: Antigenverteilung bei CML unter Therapie, SD in Klammern

Antigen	Mittlerer Score* für den Anteil der Megakaryopoese an der Zellularität der Biopsie	Kommentar	Therapieeffekt	p-Wert
CD42	1,41 (0,50)	z.T. Mikroformen, lockere Gruppenbildung	0,68	0,0002

*(0=normwertig; 1=leicht gesteigert 2=mäßig gesteigert; 3=stark gesteigert)

6.1.3 Lugli-Score

Die Kriterien zur Charakterisierung des morphologischen Ansprechens unter Therapie mit Imatinib nach Lugli *et al*. anwendend ergab sich für die Stichprobe die folgende Fallverteilung.

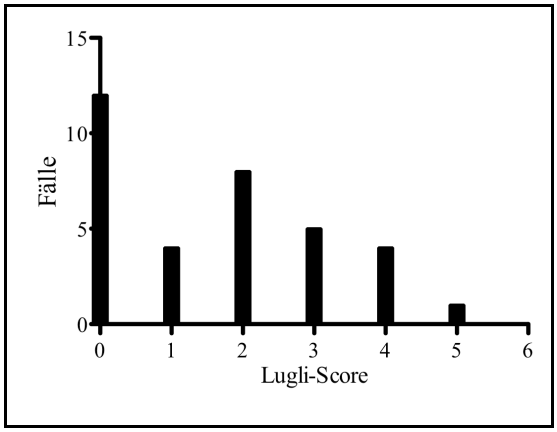

Abb. 6: Fallverteilung der Stichprobe (CML unter Therapie)

6.2 Quantitative MicroRNA-Expression bei CML

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass MicroRNAs zur Klassifizierung von Tumorentitäten geeignet sind [164]. Zum Teil ist damit sogar eine präzisere Unterteilung möglich als mit etablierten Methoden wie der Immunhistochemie oder der Detektion von mRNA-Expressionen. Aus diesem Grund sollte in der vorliegenden Arbeit die Expression von MicroRNAs an 32 Fällen mit CML-Erstdiagnosen und 34 Fällen von CML unter Therapie bestimmt werden. Um die Spezifität der detektierbaren MicroRNA Veränderungen zu überprüfen, wurden zusätzlich stichprobenartig Fälle klassischer chronisch-myeloproliferativer Erkrankungen untersucht. Um darüber hinaus MicroRNA-Expressionsmuster von malignen myeloischen Prozessen mit denen „normaler", d.h. gesunder Knochenmarksproben zu kontrastieren, wurden zusätzlich 15 reaktiv-entzündliche Proben ohne pathologischen Befund untersucht.

Für den Nachweis von MicroRNA-Expressionen in bestimmten Zellen stehen, wie auch bei der Quantifizierung von mRNAs, zwei verschiedene Methoden zur Wahl: Microarrays oder quantitative RT-PCRs. Die erste Variante hat den Vorteil, dass mit einem relativ geringen Aufwand eine große Zahl von MicroRNAs auf ihren Expressionsstatus hin untersucht werden können. Problematisch sind die relativ schlechte Reproduzierbarkeit, die geringe Aussagekraft bezüglich der genauen Expressionsstärke und Schwierigkeiten bei der Detektion von ausschließlich reifen MicroRNAs. Ein direkter Vergleich zwischen mehreren Proben ist dadurch nur in begrenztem Maße möglich. Die zweite Variante, die quantitative RT-PCR, hat den großen Vorteil, sehr genaue und reproduzierbare Ergebnisse zu liefern. Dadurch sind direkte Vergleiche und Aussagen über Expressionslevel möglich. Nachteile dieser Methode sind der relativ große technische und finanzielle Aufwand.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen hinsichtlich des Nachweises von MicroRNA-Expressionen erfolgten mittels quantitativen RT-PCRs. Dazu wurde das System der Firma Applied Biosystems genutzt. Für jeden Fall wurde die quantitative Expression von 16 MicroRNAs sowie einer „Housekeeping"-RNA bestimmt. Dabei erfolgt in einem ersten Schritt die cDNA-Synthese mittels MicroRNA-spezifischen *looped* RT-Primern. Diese Primer sorgen dafür, dass nur reife MicroRNAs umgeschrieben werden und sind der erste Schritt zur Gewährleistung der Spezifität der einzelnen Reaktionen. Für jede MicroRNA existiert ein spezieller *looped* RT-Primer. Dementsprechend wurden 17 parallele Reaktionen für jede Probe durchgeführt. Die anschließenden Real-Time Quantifizierungen erfolgten ebenfalls für jede MicroRNA einzeln; es fanden also 17 Einzelreaktionen statt. Das System basiert auf dem bekannten TaqMan-Prinzip mit einem MicroRNA-spezifischen sense Primer, einem spezifischen antisense Primer und einer MicroRNA-spezifischen TaqMan MGB-Sonde (*minor groove binder*). Dadurch wird auch in diesem zweiten Schritt gewährleistet, dass jeweils nur eine spezielle MicroRNA amplifiziert wird. Die so gewonnenen Ct-Werte mehrerer Proben konnten anschließend miteinander verglichen und auf Unterschiede in den Expressionsleveln untersucht werden.

6.2.1 Vergleich der MicroRNA-Expression von CML und Normalgewebe

Zunächst wurde in einem ersten Ansatz die Expression der ausgewählten MicroRNAs bei CML-Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bestimmt und mit der Referenzpopulation verglichen. Anhand des nicht-parametrischen Mann-Whitney U-Tests wurde nach statistisch signifikant dysregulierten MicroRNAs gesucht. MicroRNAs wurden ab einem p-Wert≤0,05 als signifikant differentiell exprimiert gewertet. Die Auswahl der untersuchten MicroRNAs erfolgte in Anlehnung an den bisherigen Stand der Forschung zum Thema aberrant exprimierter MicroRNAs bei malignen hämatologischen Erkrankungen und der CML im Speziellen [1, 35, 78, 228, 265].

Von den 16 untersuchten MicroRNAs zeigten sechs eine aberrante Expression im Vergleich zu den Referenztrepanaten (s. Abb. 7.1 und 7.2). Dabei zeigte allein die MicroRNA 150 eine höchst signifikant reduzierte Expression (p<0,0001), im Mittel um mehr als das 9-fache, wohingegen MicroRNA 23a um das 1,6-fache (p=0,0043), MicroRNA 146a (p=0,0422) um das 2,6-fache, MicroRNA 155 um das 3,6-fache (p=0,0284), MicroRNA 199b-5p um das 2,9-fache (p=0,0007) und MicroRNA 422b um das 4,5-fache (p=0,0007) überexprimiert waren. Alle beschriebenen Effekte erreichten statistische Signifikanz nach den *a priori* definierten Kriterien. Die genannten Phänomene nutzend, wurde unter Verwendung von *Random Forest*, einem Script eingebettet im Statistikprogramm R, die Wertigkeit einzelner MicroRNAs für die Differenzierung reaktiver und neoplastischer, speziell CML-spezifischer Prozesse bestimmt. Hierbei ergaben sich als wertigste Marker die MicroRNAs 150, 155 und 199b-5p. Unter Verwendung der Expressionsdaten der drei wertigsten MicroRNAs für die Differenzierung beider Gruppen wurde eine hierarchische Clusteranalyse mit der Genesis-Software nach der *Average Linkage Methode* angestrebt [240]. Hierdurch ließ sich ein Klassifikationsbaum generieren, welcher in zwei Clustern CML-Fälle (Cluster 1) mit einer Sensitivität von 88,24% (30 von 34) und einer Spezifität von 93,75% (30 von 32) von reaktiven Knochenmarksbefunden mit Leukozytose (Cluster 2) zu differenzieren vermochte (s. Abb. 8).

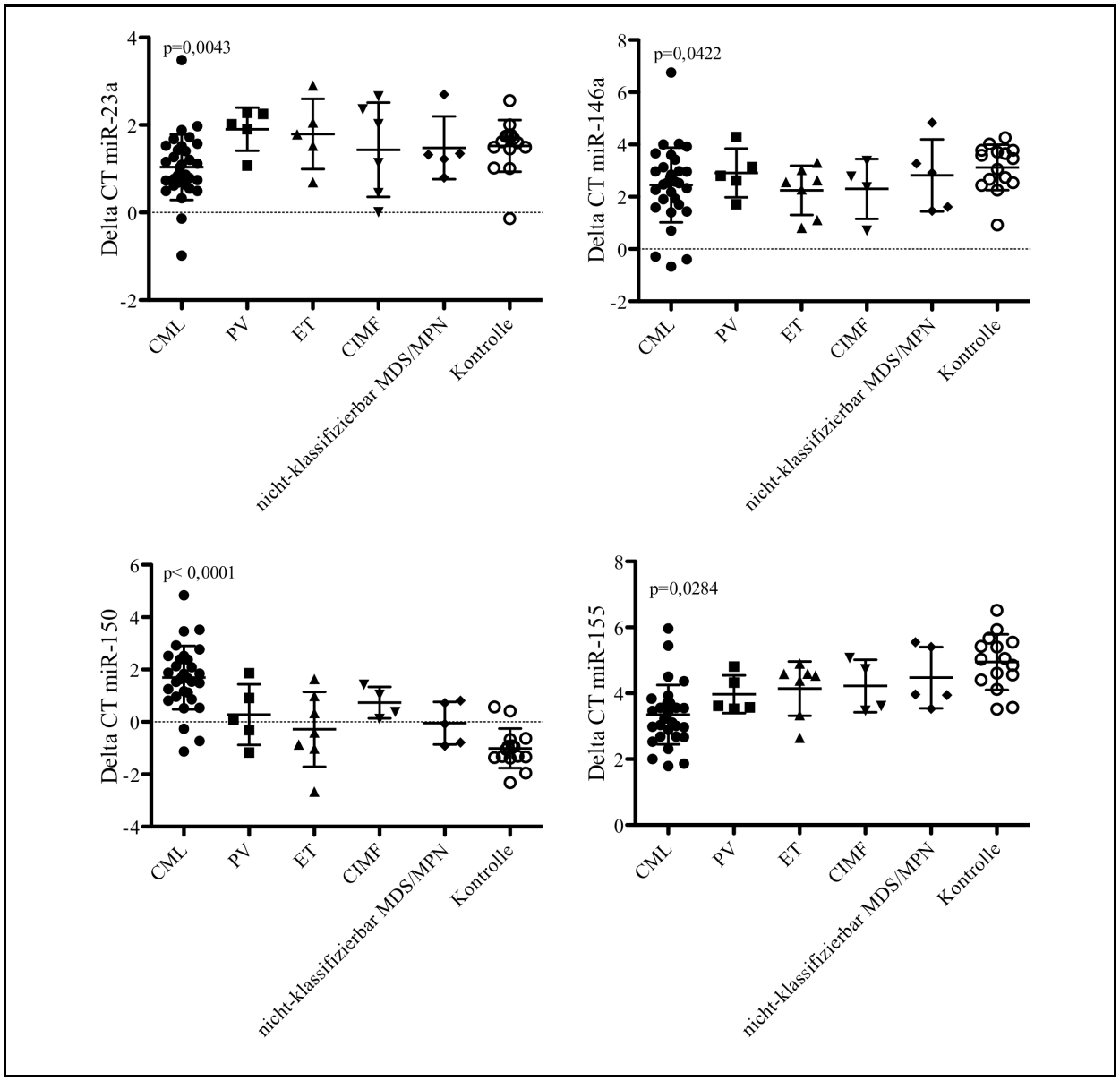

Abb. 7.1: Aberrante MicroRNA-Expression im Knochenmark von CML-Patienten bei Diagnosestellung verglichen mit gesunden Kontrollfällen

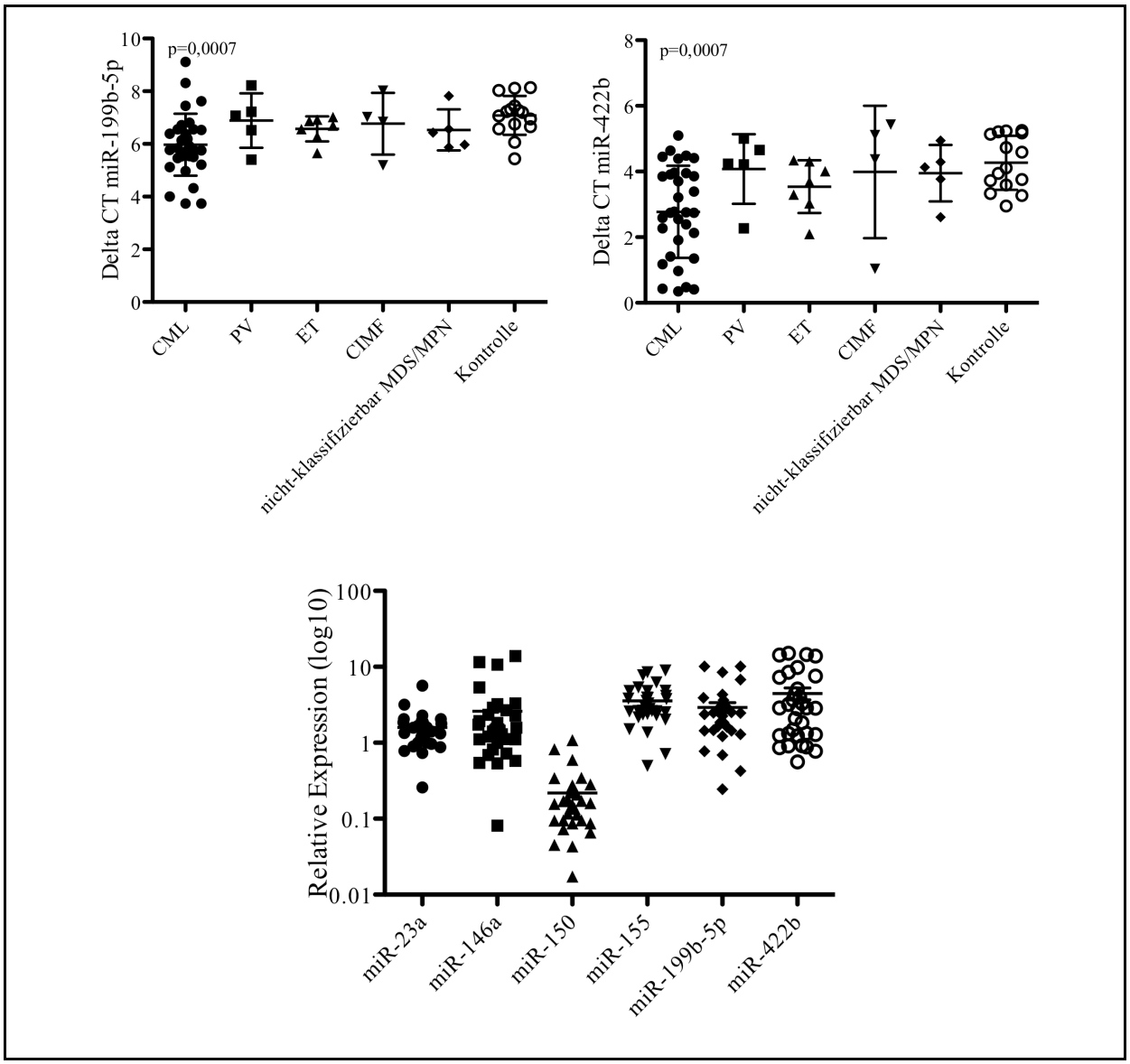

Abb. 7.2: Aberrante MicroRNA-Expression im Knochenmark von CML-Patienten bei Diagnosestellung verglichen mit gesunden Kontrollfällen

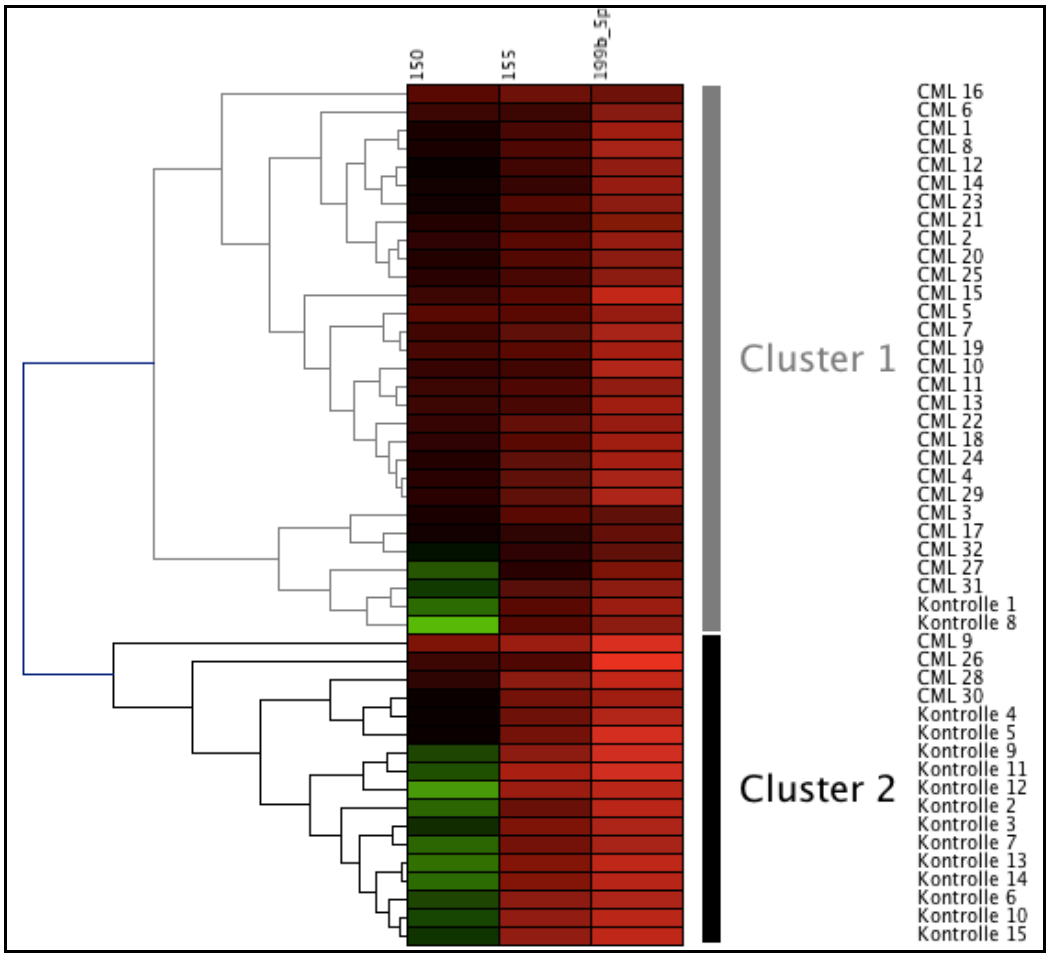

Abb. 8: Hierarchische Clusteranalyse der MicroRNA-Expression (als deltaCT-Wert) bei CML und reaktiven Kontrollfällen (skaliert von -3 bis 9)

6.2.2 Vergleich der MicroRNA-Expression von CML vor sowie unter Therapie

Des Weiteren wurde in einem zweiten Ansatz die Expression der oben genannten MicroRNAs bei CML-Patienten vor sowie unter Therapie untersucht. Statistisch signifikant beeinflusste MicroRNAs wurden mit dem nicht-parametrischen, gepaarten Wilcoxon matched-pairs signed rank Test ermittelt. Ab einem p-Wert≤0,05 wurde die MicroRNA-Expressionsänderungen als signifikant gewertet. Sieben der sechzehn untersuchten MicroRNAs zeigten eine Expressionsänderung unter Therapie. Es fand sich eine Umkehr der Effekte, die bei Diagnosestellung gegenüber den Kontrollfällen evaluiert werden konnten (s. Abb 9.1 und 9.2). Zusätzlich kam eine signifikante Expressionsminderung der MicroRNA 142-3p zur Darstellung, deren relative Überexpression zum Zeitpunkt der Diagnosestellung knapp das festgelegte Signifikanzniveau verfehlte (p=0,089). Unter Therapie zeigte nur die MicroRNA 150 einen signifikanten Anstieg der Expression um das 6,17-fache (p<0,0001). Eine signifikante Reduktion der Expression hingegen konnte für MicroRNA 23a (p=0,0008), MicroRNA 142-3p (p=0,0012), MicroRNA 146a (p=0,0308), MicroRNA 155 (p<0,0001), MicroRNA 199b-5p (p=0,0006) und MicroRNA 422b (p<0,0001) nachgewiesen werden. Die gemittelte relative Expressionsänderung lag hierbei für die MicroRNA 23a bei einem Faktor von 2,4, für die MicroRNA 142-3p bei 3,4, für die

MicroRNA 146a bei 3,3, für die MicroRNA 155 bei 2,7, für die MicroRNA 199b-5p bei 4,6 und für die MicroRNA 422b bei 5,1. Aufgrund der fehlenden Expression der MicroRNA 203 in vielen der untersuchten Fälle vor sowie unter Therapie ließ sich hier kein sinnvoller gepaarter Test auf eine signifikante Expressionsänderung rechnen, obwohl sich anhand der vorliegenden Daten ein eindeutiger Trend in Richtung einer reduzierten Expression unter Therapie annehmen ließ. Die genannten Phänomene nutzend, wurde erneut unter Verwendung von *Random Forest* die Wertigkeit einzelner MicroRNAs für die Differenzierung spezifischer Fälle der Stichprobe in zwei Gruppen, die anhand des Lugli-Scores definiert wurden (Lugli 0-1 = Responder; Lugli > 1 = Non-Responder), bestimmt. Hierbei ergaben sich als wertigste Marker die MicroRNAs 142-3p, 150 und 199b-5p. Unter Verwendung der Expressionsdaten der drei wertigsten MicroRNAs für die Differenzierung beider Gruppen wurde in beschriebener Weise eine hierarchische Clusteranalyse angestrebt. Diese lieferte allerdings keine unmittelbare Anordnung der Fälle in Clustern nach Gruppen.

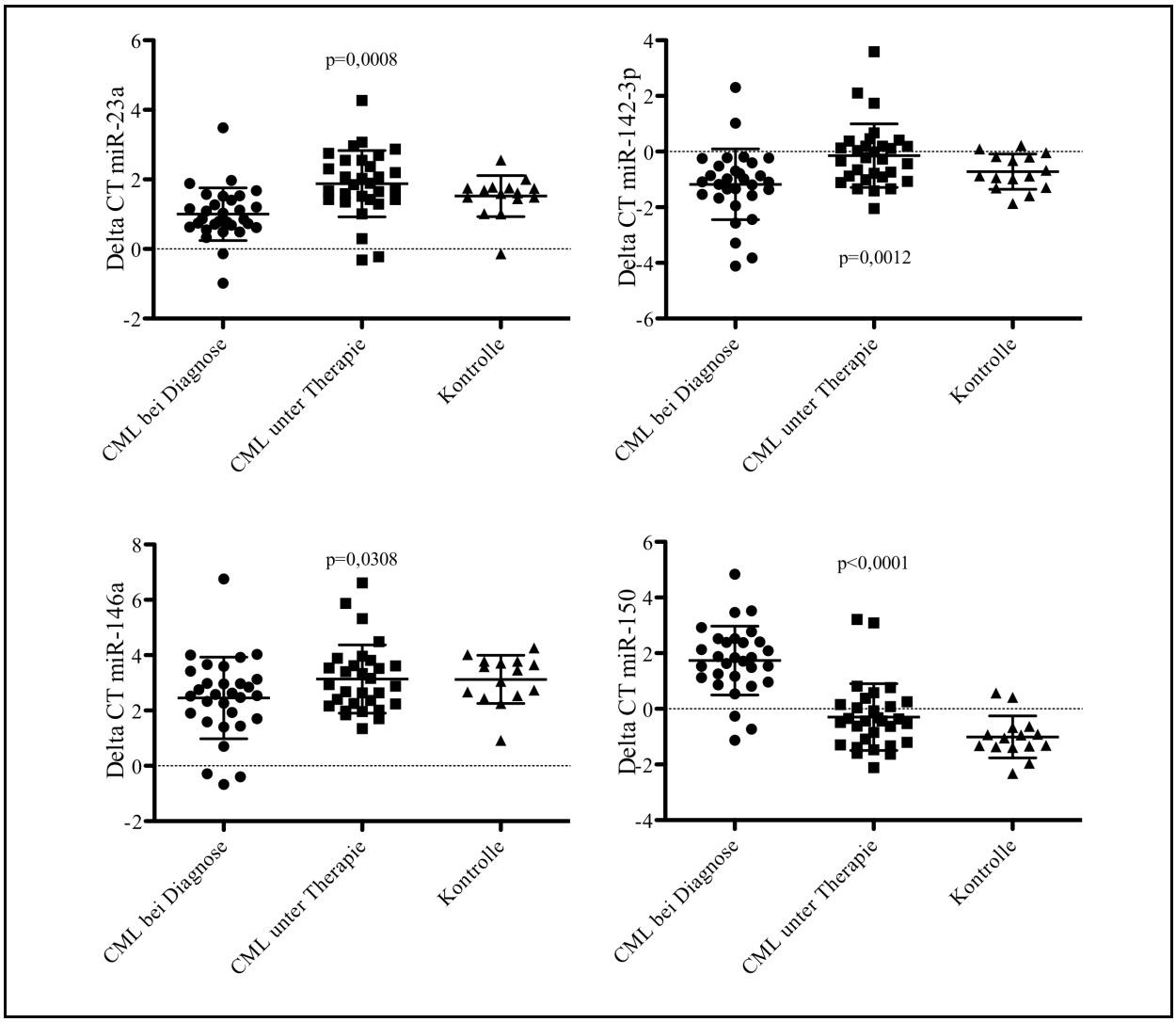

Abb. 9.1: MicroRNA-Expressionsänderungen im Knochenmark bei CML unter Therapie mit Imatinib

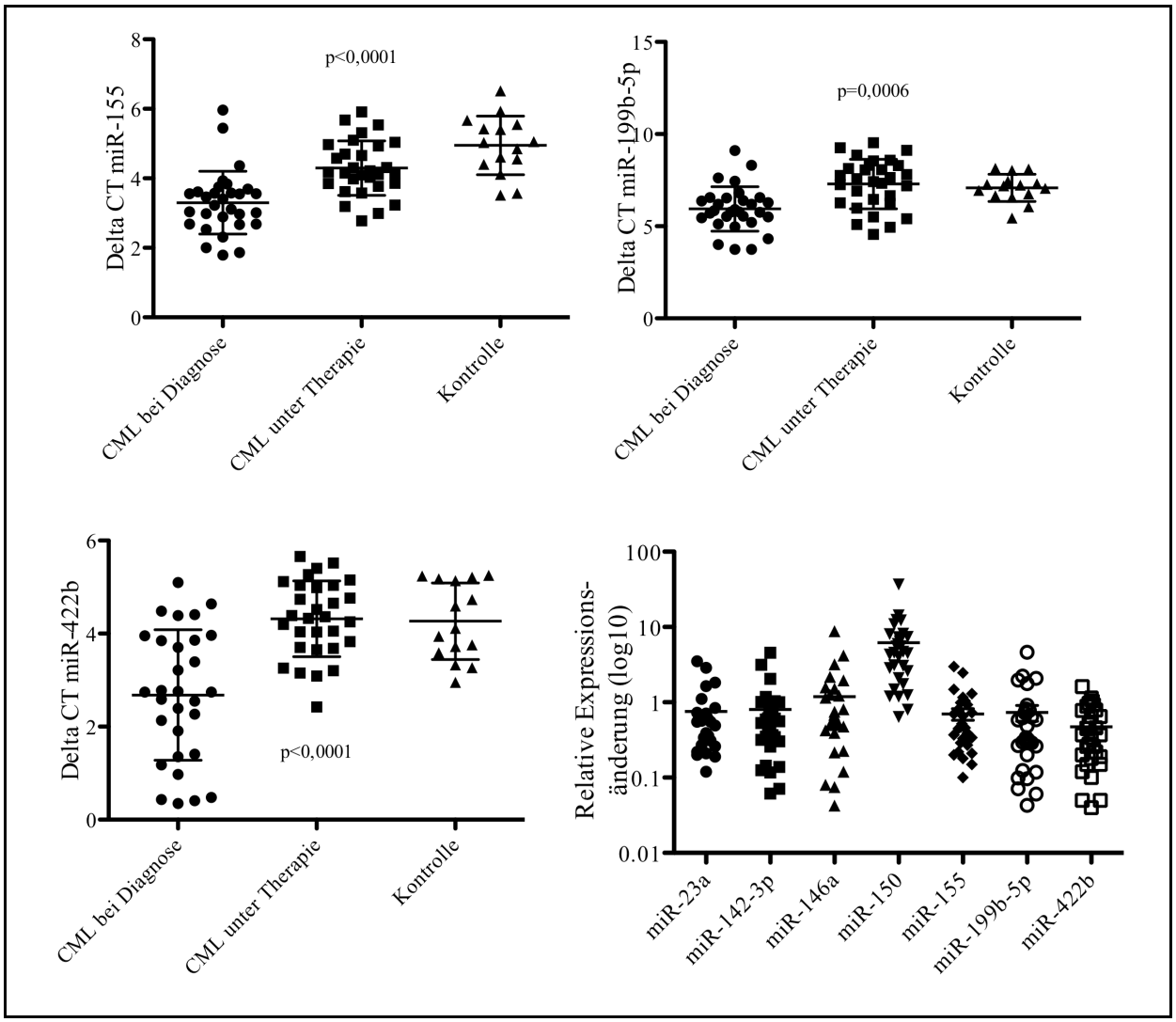

Abb. 9.2: MicroRNA-Expressionsänderungen im Knochenmark bei CML unter Therapie mit Imatinib

6.2.3 Korrelationsanalyse der MicroRNA-Expression von CML unter Therapie und dem morphologischen Ansprechen

In der Folge sollte bestimmt werden, ob die Änderungen der MicroRNA-Expression unter Therapie eine Korrelation mit den definierten morphologischen Kriterien für das Therapieansprechen unter Imatinib nach Lugli *et al.* zeigen [165]. Zu diesem Zweck wurde der lineare Korrelationskoeffizient nach Spearman für die quantitative MicroRNA-Expression, ausgedrückt als ΔCT-Wert, und den Lugli-Score berechnet. Des Weiteren wurden Regressionsgraden für die MicroRNAs generiert, die unter Therapie eine signifikante Expressionsänderung gezeigt hatten. Ein Korrelationskoeffizient $r>0{,}0{,}25$ bzw. $r<-0{,}25$ und ein p-Wert$\leq 0{,}05$ für eine Steigung der Regressionsgraden $\neq 0$ wurden als signifikante lineare Korrelation gewertet (s. Abb. 10). Fälle, in denen die MicroRNA 203 nicht exprimiert war, wurden von der Korrelationsanalyse für diese MicroRNA ausgeschlossen. Die Ergebnisse der jeweiligen Analyse sind entsprechend unter Vorbehalt zu werten. Ein positiver linearer Zusammenhang ließ sich für die ΔCT-Werte der MicroRNA 150 nachweisen ($r=0{,}4951$; $p=0{,}0029$), wohingegen sich für die ΔCT-Werte der MicroRNA 142-3p ($r=-0{,}3770$; $p=0{,}0280$), MicroRNA 203

(r=-0,4942; p=0,0194), MicroRNA 199b-5p (r=-0,5184; p=0,0017) und der MicroRNA 422b (r=-0,3587; p=0,0372) eine negative lineare Korrelation nachweisen ließ. Im Fall der MicroRNA 23a ließ sich ein Trend in Richtung eines negativen linearen Zusammenhangs erkennen, der jedoch bei dieser Stichprobengröße keine statistische Signifikanz erreichen konnte (r=-0,2724; p=0,1191). Für die MicroRNA 155 konnte keinerlei lineare Beziehung zwischen morphologischem Befund und MicroRNA-Expression evaluiert werden (r=0,09422; p=0,5961).

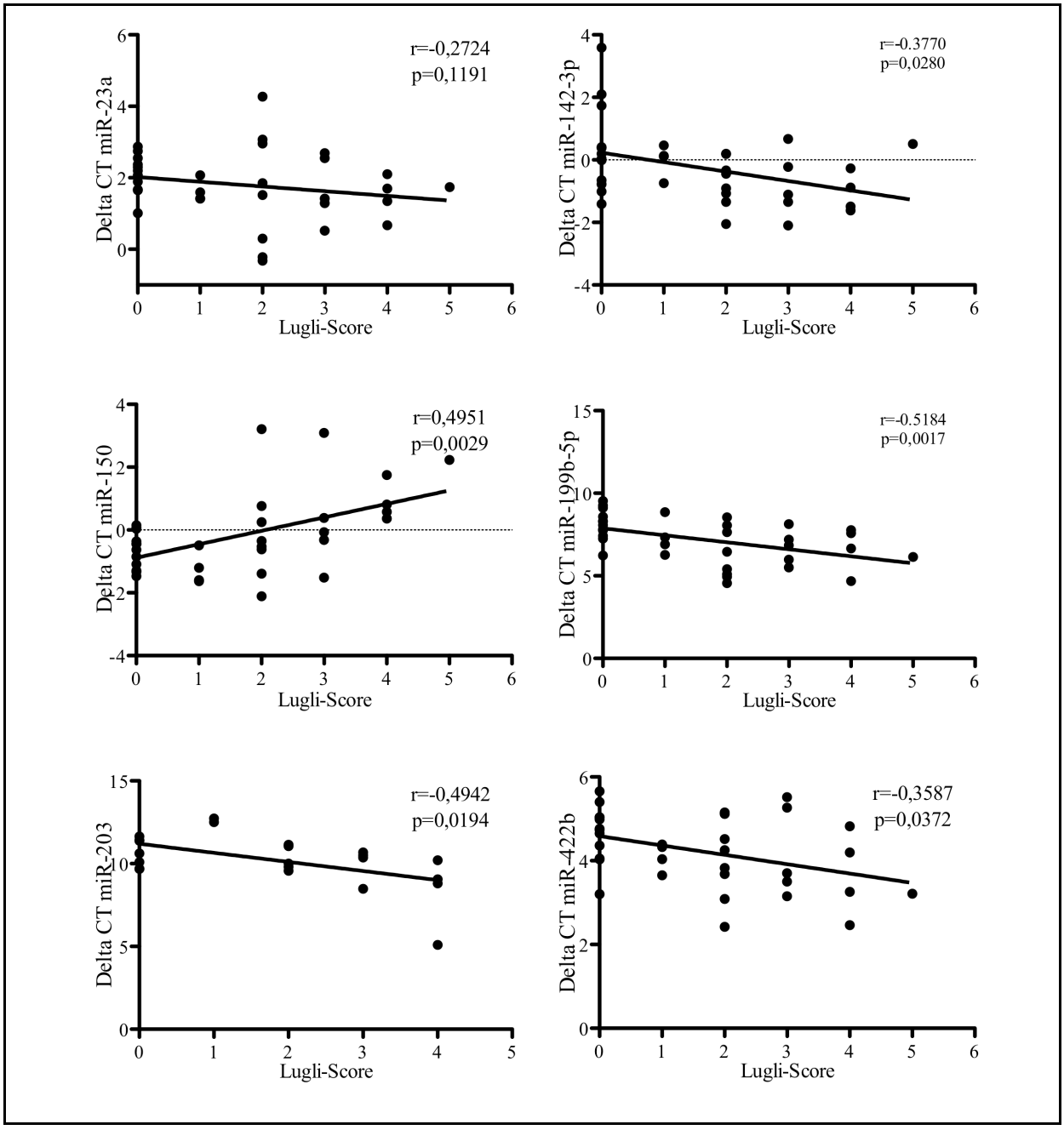

Abb. 10: Korrelation von Lugli-Score und MicroRNA-Expression im Knochenmark von CML-Patienten unter Therapie mit Imatinib

6.3 Quantitative MicroRNA-Expression bei CMPDs

Entsprechend den unter 6.2 geschilderten Studien wurden 26 Fälle von Polyzythämia Vera, 17 Fälle von Essentieller Thrombozythämie und 22 Fälle von Chronisch-idiopathischer Myelofibrose auf ihre Expression ausgewählter MicroRNAs hin untersucht.
Um MicroRNA-Expressionsmuster von neoplastischen Prozessen mit denen im gesunden Knochenmark zu kontrastieren, wurden zusätzlich 15 reaktiv-entzündliche Proben ohne pathologischen Befund untersucht.

6.3.1 Vergleich der MicroRNA-Expression von CMPDs und Normalgewebe

In Analogie zum vorangegangenen Versuch mit dem Ziel der Identifikation aberrant exprimierter MicroRNAs bei CML gegenüber der Referenzpopulation wurden in der Folge vier MicroRNAs anhand einer größeren Stichprobe (PV n=26, ET n=17, CIMF n=22) auf eine differentielle Expression bei CMPEs hin untersucht. Die Auswahl der untersuchten MicroRNAs erfolgte unter Berücksichtigung bisheriger Forschungsergebnisse zu MicroRNAs bei myeloischen Neoplasien im Allgemeinen und CMPEs im Speziellen [29, 30, 117].
Für die vier untersuchten MicroRNAs konnten aberrante Expressionsmuster im Vergleich zu den Referenztrepanaten identifiziert werden (s. Abb. 11). Dabei konnte für die MicroRNA 150 eine höchst signifikant reduzierte Expression ($p<0,0001$) bei der PV im Mittel um das 2,2-fache und eine hochsignifikante Reduktion der Expression ($p=0,0014$) bei der CIMF im Mittel um das 1,7-fache evaluiert werden. Kein solcher Befund war bei der ET zu erheben. Ebenfalls in signifikantem Maße um den Faktor 1,1 reduziert war die Expression der MicroRNA 342 bei der PV ($p=0,0039$). Die MicroRNA 10a hingegen zeigte für die CIMF und die ET eine (hoch-)signifikante Steigerung ihrer Expressivität im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p=0,0082$ bzw. 0,360). Die relative Abweichung der Expression lag für die CIMF bei einem Faktor von 2,5 und für die ET bei einem Faktor von 1,6. Ebenfalls hochsignifikant gesteigert war die Expression der MicroRNA 182 für die PV ($p=0,0042$) um den Faktor 2,4, der ET ($p=0,0004$) um den Faktor 2,6 und der CIMF ($p=0,0054$) um den Faktor 7,3. Der große zuletzt genannte Effekt geht allerdings in besonderer Weise auf zwei starke Ausreißer zurück. Es fand sich für die MicroRNA 342 bei PV des Weiteren eine signifikant reduzierte Expression auch gegenüber CIMF ($p=0,0039$), wobei ein ähnlicher Effekt zwischen PV und ET knapp statistische Signifikanz verfehlte.

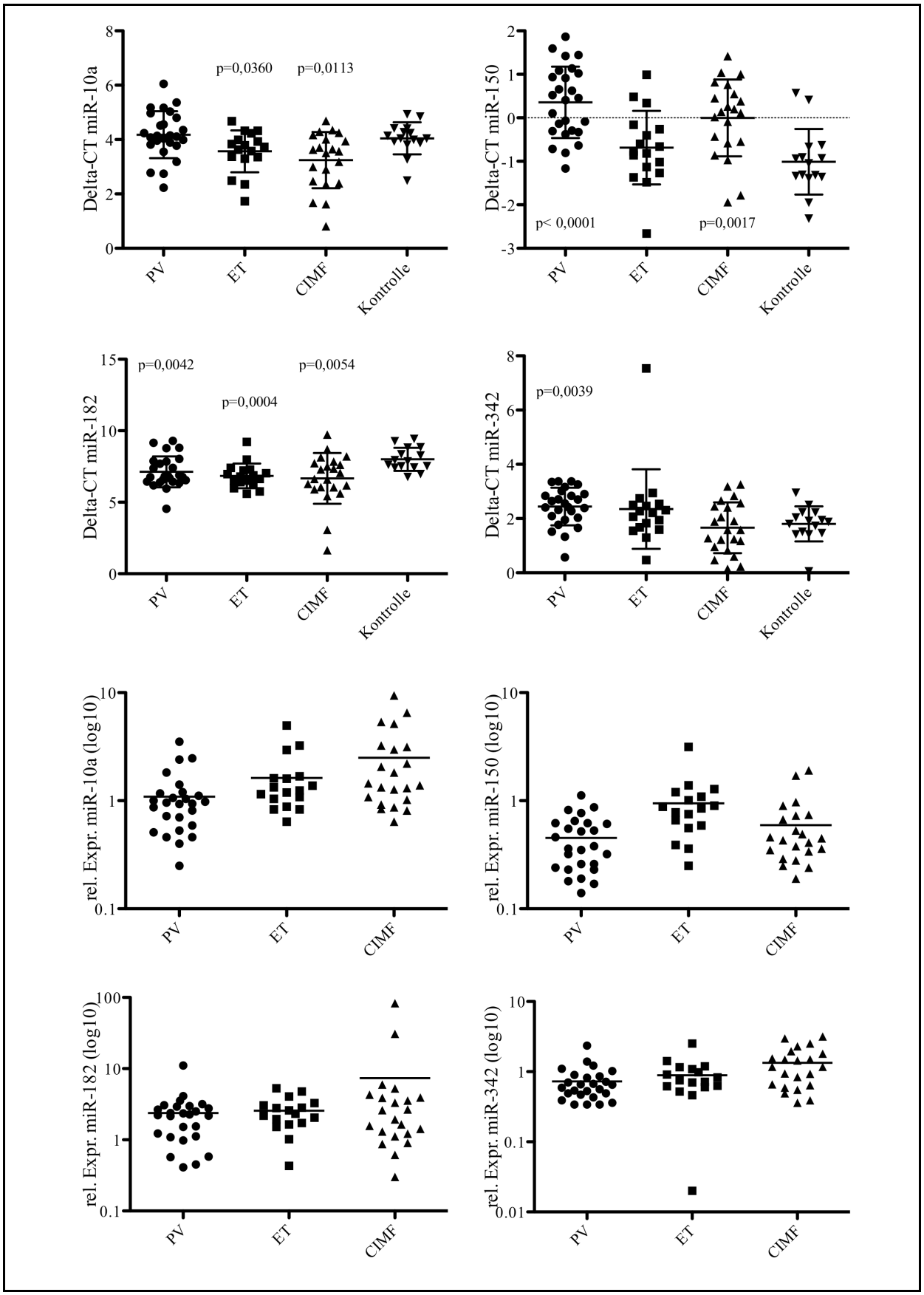

Abb. 11: Aberrante MicroRNA-Expression im Knochenmark von Patienten mit CMPEs bei Diagnosestellung

6.3.2 Korrelation des *JAK2* V617F-Mutationsstatus und der Expression von MicroRNA 150

Um den pathophysiologischen Mechanismus der Dysregulation in der Expression von MicroRNAs bei CMPEs weiter zu beleuchten wurde die Korrelation der quantitative MicroRNA-Expression, ausgedrückt als ΔCT-Wert mit der Mutationsfrequenz bzw. der Allellast der *JAK2*-Punktmutation p.V617F, untersucht, die mittels Pyrosequenzierung bestimmt worden war. Hierbei ergab sich für den ΔCT-Wert der MicroRNA 150 eine signifikante positive Korrelation nach Spearman mit der *JAK2*-Allellast (r=0,4398; p=0,0018) (s. Abb. 12). Kein solcher linearer Zusammenhang ließ sich für die anderen untersuchten MicroRNAs demonstrieren.

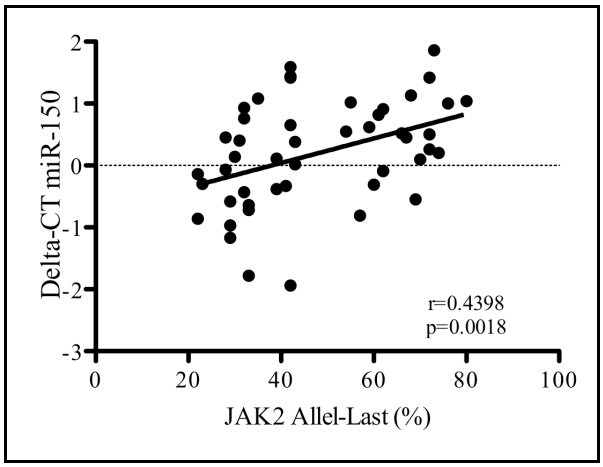

Abb. 12: Korrelation von *JAK2*-Mutationsstatus und Expression der MicroRNA 150 bei PV und CIMF

6.4 Vergleich der Expression von MicroRNAs und mRNAs von Ziel-Genen

In einem weiteren Schritt sollten nun die Implikationen einer Aberration in der Expression ausgewählter MicroRNAs für nachgewiesene und mutmaßliche Ziel-Gene im Knochenmark exemplarisch für einige der auffälligen MicroRNAs evaluiert werden, um potenzielle neue Marker für die CML sowie ihren entsprechende Verlaufsbeobachtungen unter Therapie zu identifizieren und die Grundvoraussetzungen für nachfolgende Arbeiten über die funktionelle Assoziation aberranter MicroRNA-Expressionsmuster und deren Ziel-mRNAs zu schaffen. Auch sollte untersucht werden, ob veränderte MicroRNA Expressionsmuster in einem kausalen Zusammenhang mit der Normalisierung der hämatopoetischen Verhältnisse bei CML unter Therapie mit Imatinib stehen. Dabei wurden die mRNA-Expressionslevel in der Studiengruppe vor sowie unter Therapie verglichen und mit ihrer korrespondieren MicroRNA-Expression korreliert. Sofern sich in der Literatur für eine MicroRNA kein nachgewiesenes Ziel-Gen mit direktem Einfluss auf die Hämatopoese fand, wurde auf den TargetScan Algorithmus und dessen Vorraussagen mutmaßlicher Ziel-Gene zurückgegriffen [80, 98, 158].

Von den sechs untersuchten mRNAs fand sich bei vier unter Therapie eine signifikante Expressionsänderung. Diese verhielt sich umgekehrt zur Kinetik der korrespondierenden MicroRNAs unter Therapie (s. Abb. 13.1 und 13.2). *C-MYB*, nachweislich durch MicroRNA 150 negativ reguliert, wurde unter Therapie hochsignifikant herunterreguliert (1,2-fach, p= 0,0058). *BACH1*, reguliert durch MicroRNA155, hingegen zeigte eine signifikante Expressionssteigerung (1,7-fach, p= 0,0031). Für das ebenfalls durch die MicroRNA 155 regulierte Gen *JARID2* fand sich ebenfalls eine signifikante Expressionssteigerung (2-fach, p=0,0274). Außerdem ließ sich eine Korrelation von *JARID2*-Expression und megakaryozytärer Proliferation demonstrieren (r=0,27, p=0,0404). Ein Trend zur direkten Korrelation der Expression der MicroRNA 150 mit der megakaryozytären Proliferation verfehlte knapp das Signifikanzniveau.

Der ebenfalls beobachtete Trend des MicroRNA 422b-regulierten Gens *TOB2* hin zu einer Expressionssteigerung unter Therapie verfehlte knapp das definierte Signifikanzniveau (p=0,076).

Eine Korrelation der mRNA-Expression und dem morphologischen Ansprechen konnte in den beschriebenen Fällen nicht demonstriert werden.

Mayerhofer *et al.* konnten für die *Häm-Oxygenase 1* (*HMOX1*) einen BCR-ABL-abhängigen proliferativen und anti-apoptotischen Mechanismus demonstrieren [177]. Basierend auf den gewonnenen Erkenntnissen bezüglich der MicroRNA 155 abhängigen *BACH1*-Regulation unter Therapie sowie der bereits beschriebenen negativ-regulatorischen Wirkung von *BACH1* auf *HMOX1*, wurde des weiteren die Frage einer *BACH1*-abhängigen Reduktion der *HMOX1* Expression bei CML unter Therapie erörtert [185, 271]. Es ergab sich wider Erwarten eine signifikant um das 3-fache reduzierte Expression von *HMOX1* bei CML zum Zeitpunkt der Diagnosestellung gegenüber reaktiven Kontrollfällen (p<0,0001) (s. Abb. 14). Unter Therapie stieg die Expression um das 14,8-fache und glich sich der Referenzgruppe an (p<0,0001). Darüber hinaus fand sich eine signifikante Korrelation des Lugli-Scores mit der Expression von *HMOX1* (r=0,5127, p=0,0027) (s. Abb. 15).

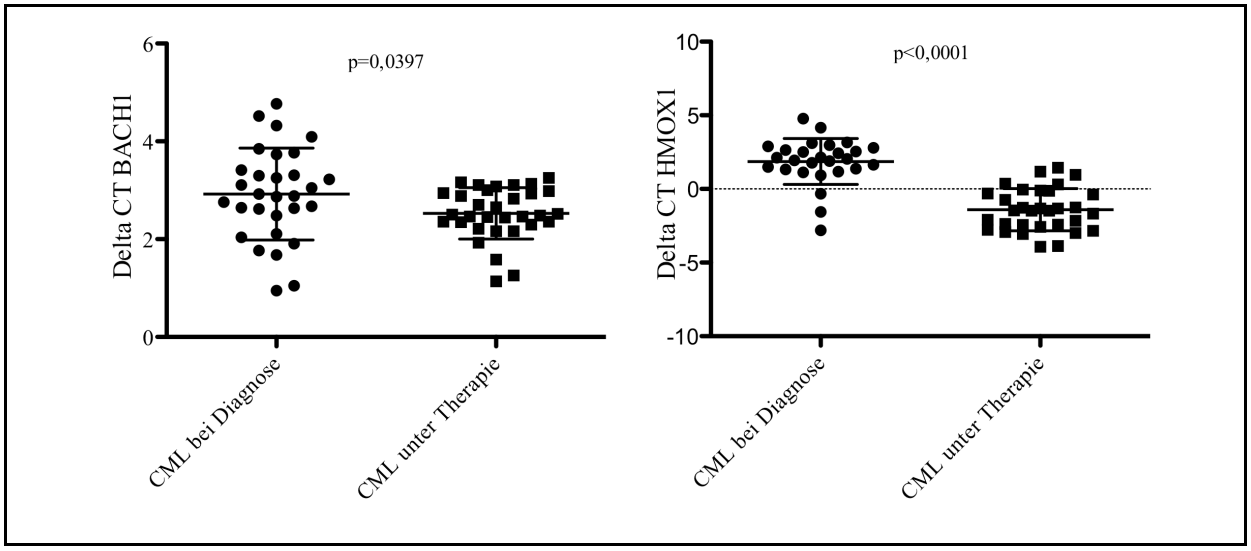

Abb. 13.1: Kinetik MicroRNA-regulierter mRNAs bei CML unter Therapie mit Imatinib

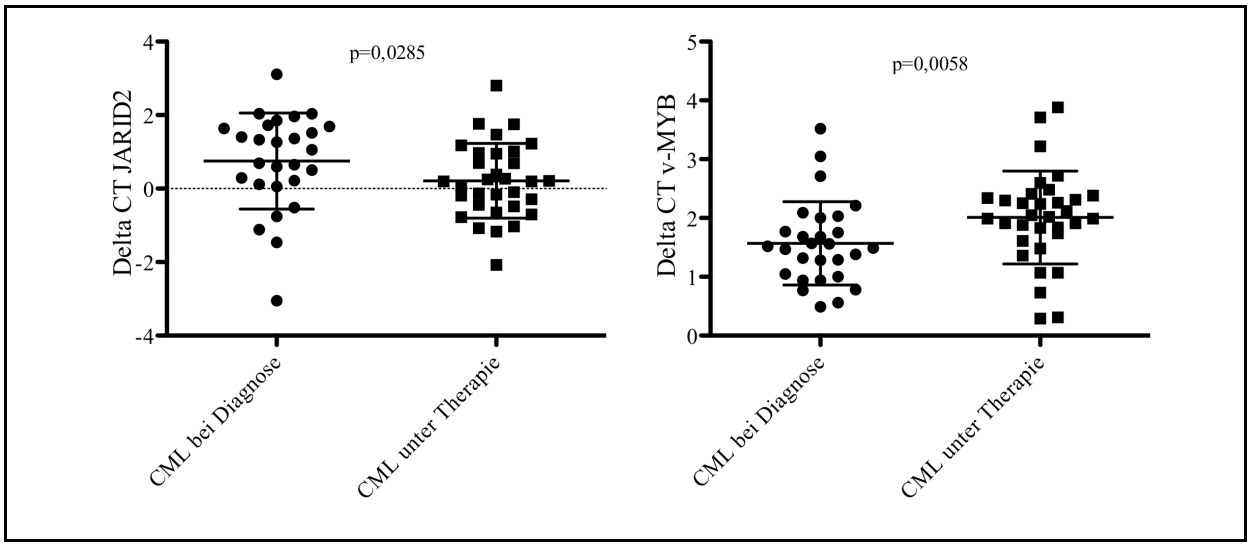

Abb. 13.2: Kinetik MicroRNA-regulierter mRNAs bei CML unter Therapie mit Imatinib

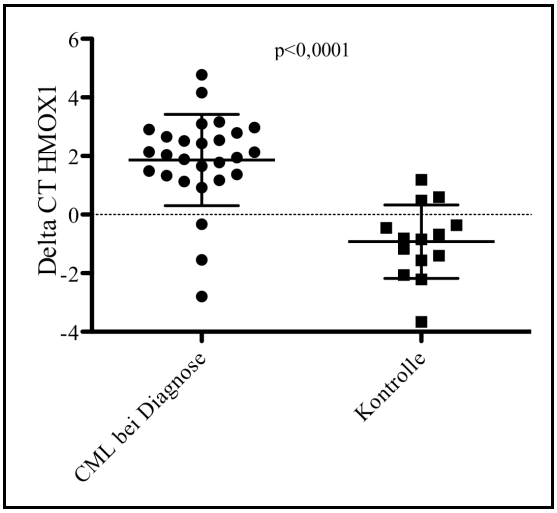

Abb. 14: *HMOX1*-Expression bei CML und reaktiven Kontrollen

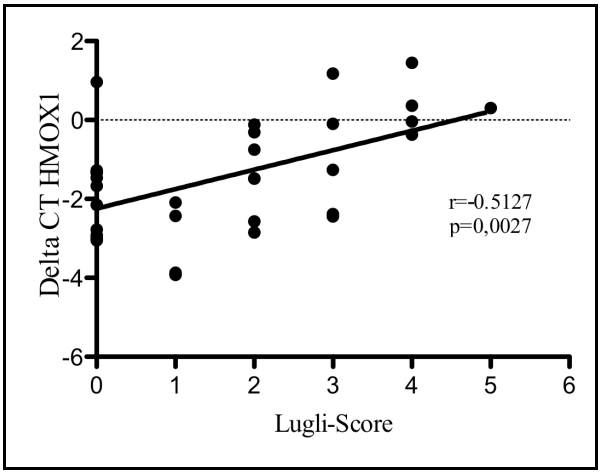

Abb. 15: Korrelation der *HMOX1*-Expression mit dem Lugli-Score

6.5 Immunhistochemischer Nachweis von *c-MYB* bei CML

Mit dem Ziel der Applikation hier neu gewonnener Erkenntnisse über die Expression der MicroRNA 150 in der pathologischen Routinediagnostik myeloproliferativer Erkrankungen wurde eine immunhistochemische Färbung für den Marker *c-MYB* etabliert und dessen Expression zunächst rein deskriptiv erfasst.

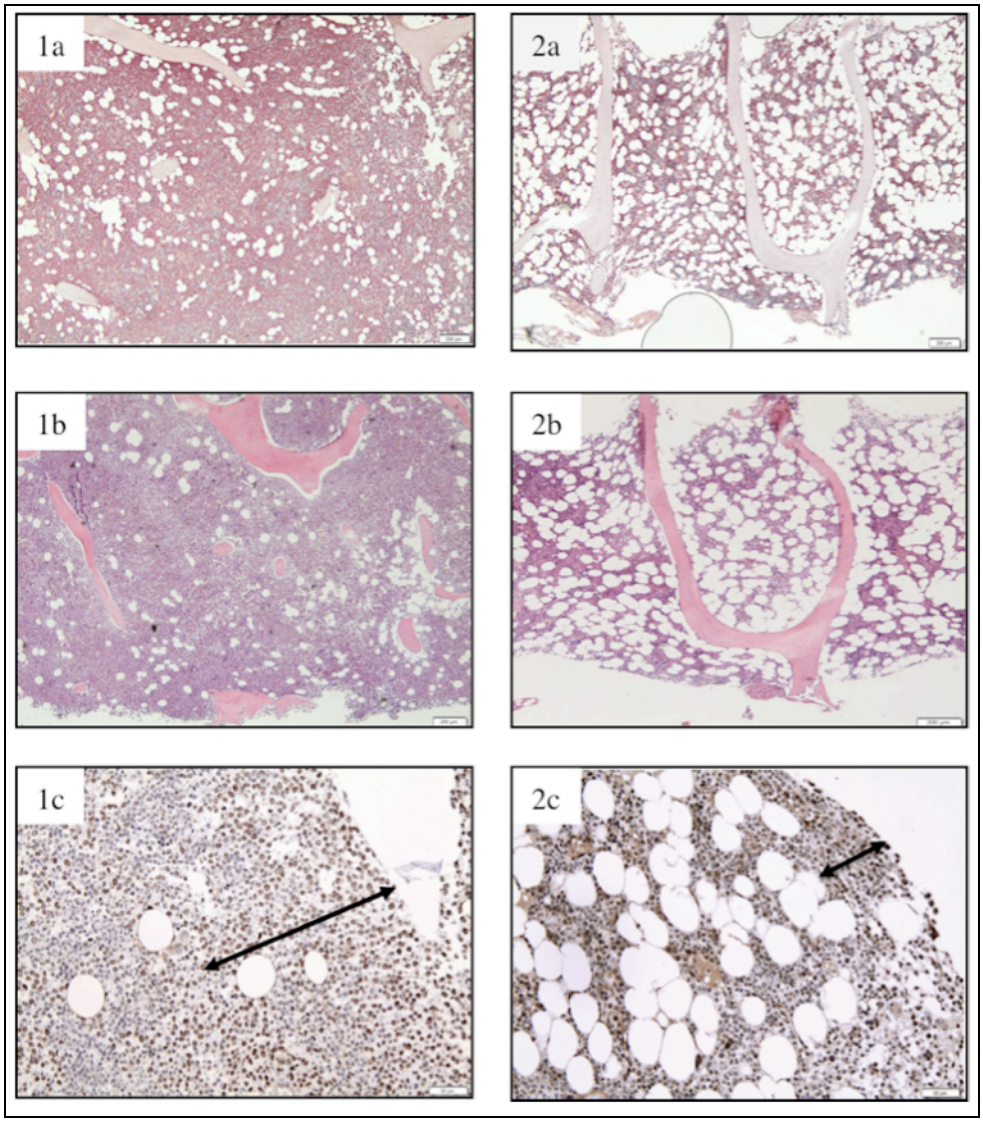

Abb. 16: HE, Naphtol-ASD-Chloracetat-Esterase und immunhistochemischer Nachweis von *c-MYB* bei CML vor (**1a-c**) sowie unter Therapie mit Imatinib, Lugli 0 (**2a-c**). Doppelpfeile illustrieren die Breite der peritrabekulären, granulopoetischen Manschette.

6.5.1 Immunhistochemische Expression von *c-MYB* bei CML zum Zeitpunkt der Diagnose sowie unter Therapie

Für die Verteilung und die Expression des MicroRNA 150 regulierten Markers *c-MYB* bei CML zum Zeitpunkt der Diagnosestellung sowie unter Therapie ergab sich das im Folgenden geschilderte Verteilungsmuster.

Bei der Verwendung des Primärantikörpers gegen *c-MYB* wurden vor allem die Zellen der unreifen Erythropoese sowie der Megakaryopoese markiert. Letztere zeigten lediglich eine schwache zytoplasmatische Reaktion. Darüber hinaus fand sich eine starke Positivität der unreifen Granulopoese, woraus sich ein erheblich größerer Anteil markierter Zellen im Trepanat von CML-Patienten bei Diagnose und im Rezidiv gegenüber Patienten in Remission und reaktiven Kontrollen ergab. Eindrucksvoll wurde die verbreiterte peritrabekuläre Manschette granulozytärer Vorläuferzellen markiert.

6.6 Korrelation von MicroRNA-Expression im Knochenmark und dem peripheren Blutbild

Es sollte auch geklärt werden, inwiefern die Expressionslevel einzelner MicroRNAs im Zusammenhang mit dem Blutbild des Patienten stehen. Zu diesem Zweck wurden der lineare Korrelationskoeffizient nach Spearman für die quantitative MicroRNA-Expression, ausgedrückt als ΔCT-Wert, und die Parameter des peripheren Blutbildes bei den jeweiligen Krankheitsbildern berechnet und entsprechende Regressionslinien generiert. Ein Korrelationskoeffizient $r>0{,}25$ bzw. $r<-0{,}25$ und ein p-Wert$\leq 0{,}05$ für eine Steigung der Regressionsgraden $\neq 0$ wurden als signifikante lineare Korrelation gewertet.

6.6.1 Peripheres Blutbild und MicroRNA-Expression bei CML

In der Gruppe der CML-Fälle vor sowie unter Therapie ließ sich ein positiver linearer Zusammenhang mit der Anzahl an Leukozyten im peripheren Blutbild für die ΔCT-Werte der MicroRNA 150 nachweisen ($r=0{,}5770$; $p<0{,}0001$), wohingegen sich für die ΔCT-Werte der MicroRNA 23a ($r=-0{,}5614$; $p<0{,}0001$), MicroRNA 142-3p (0,5216; $p<0{,}0001$), MicroRNA 155 ($r=0{,}4932$; $p<0{,}0001$), MicroRNA 199b-5p ($r=0{,}5381$; $p<0{,}0001$), MicroRNA 203 ($r=-0{,}4942$; $p=0{,}0194$) und der MicroRNA 422b ($r=-0{,}3587$; $p=0{,}0372$) eine negative lineare Korrelation fand (s. Abb. 17). Ein linearer Zusammenhang zwischen der Expression einzelner MicroRNAs und den Zellzahlen der anderen beiden Zellreihen im peripheren Blutbild ließ sich nicht evaluieren. Fälle, in denen die MicroRNA 203 nicht exprimiert war, wurden von der Korrelationsanalyse für diese MicroRNA ausgeschlossen. Die Ergebnisse der jeweiligen Analyse sind entsprechend unter Vorbehalt zu werten.

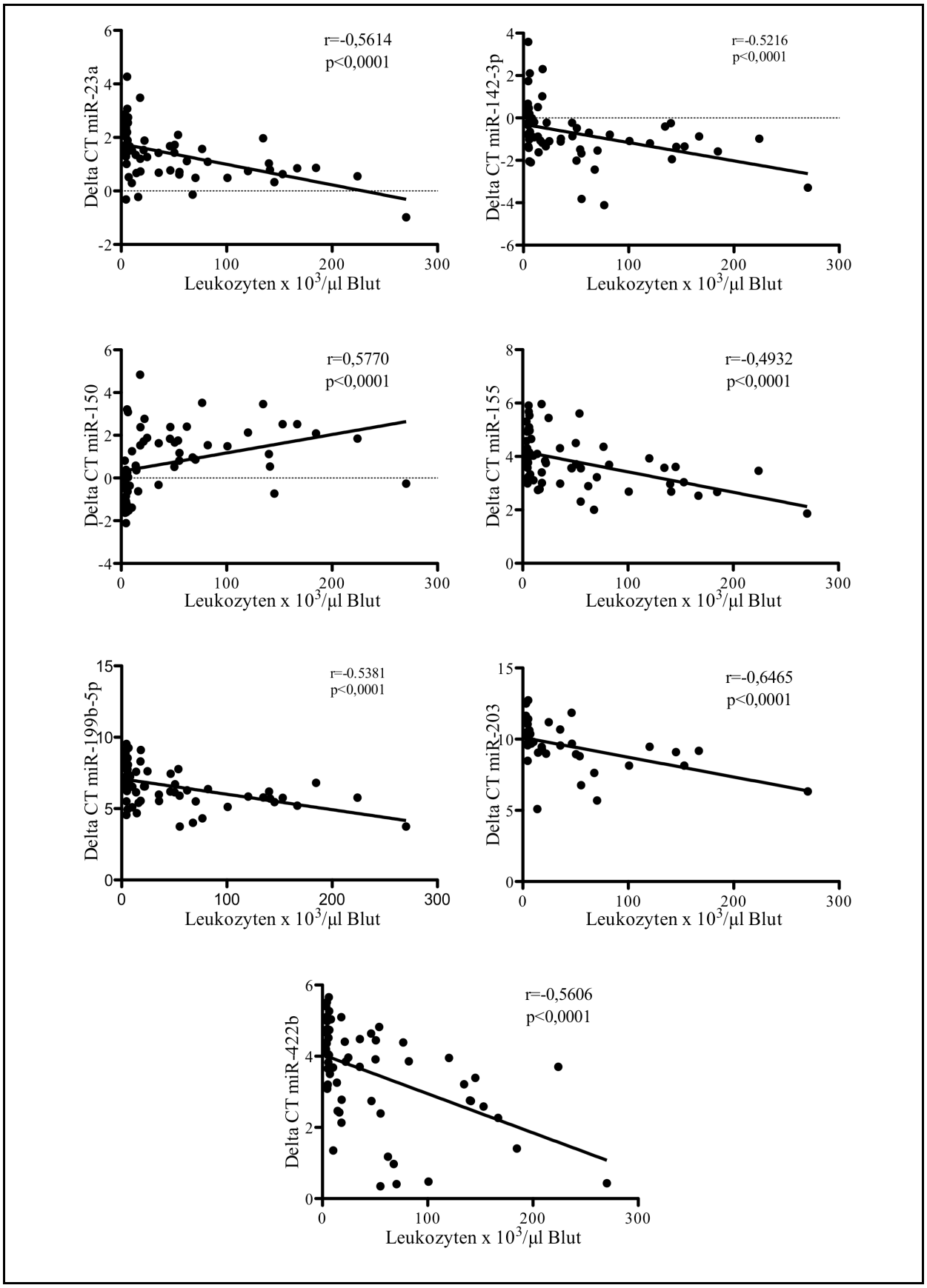

Abb. 17: Korrelation von MicroRNA-Expression und Parametern des peripheren Blutbildes (CML)

6.6.2 Peripheres Blutbild und MicroRNA-Expression bei CMPE

In der Gruppe der kumulierten CMPEs ergab sich ein negativer linearer Zusammenhang zwischen den ΔCT-Werten der MicroRNA 150 und der Anzahl an Thrombozyten im peripheren Blut (r= -0,2744; p= 0,0282) im Grenzbereich statistischer Signifikanz. Auch zeigte sich für die ΔCT-Werte der MicroRNA-150 ein signifikanter Trend in Richtung eines positiven linearen Zusammenhangs mit der Anzahl an Leukozyten im peripheren Blut, der bei der gewählten Stichprobengröße allerdings ebenfalls einen Korrelationskoeffizienten unterhalb der konventionellen Grenzwerte für einen schwachen linearen Zusammenhang aufwies (r=0,2499; p=0,0464) (s. Abb. 18). Um einen statistischen Effekt nachweisen zu können war, wie beschrieben, eine Kumulation der CMPEs von Nöten, was dazu führt, dass die Ergebnisse des Versuchsaufbaus mit entsprechenden Einschränkungen zu werten sind. Für die anderen untersuchten MicroRNAs konnten keine Anzeichen für einen linearen Zusammenhang von quantitativer Expression und den Parametern des peripheren Blutbildes ausgemacht werden.

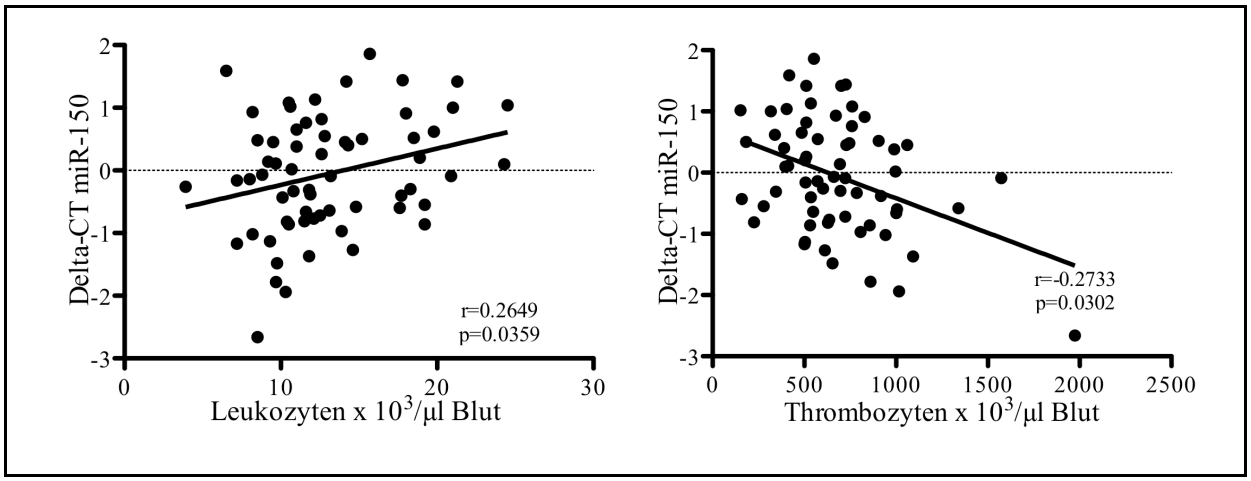

Abb. 18: Korrelation von MicroRNA-Expression und Parametern des peripheren Blutbildes (CMPEs)

7. Diskussion

7.1 Charakteristische klinische, morphologische und immunhistochemische Befunde bei CML unter Therapie mit Imatinib

Die beschriebenen morphologischen und immunhistochemische Analysen dienen vornehmlich dem Nachweis charakteristischer Veränderungen im Knochenmark vor sowie unter Therapie mit Imatinib und somit der Einordnung der vorliegenden Studiengruppe in das Gesamtbild der publizierten Literatur. Es soll die Anwendbarkeit der hier gewonnen Erkenntnisse auf das Krankheitsbild im Allgemeinen, trotz der überproportional häufig eingeschlossenen Rezidive und ungünstigen Verläufe, demonstriert werden.

7.1.1 Morphologische Parameter divergieren zwischen CML bei Diagnose sowie unter Therapie mit Imatinib

Anhand aufwändiger Studien konnten zahlreiche morphologische Parameter identifiziert werden, die in ihrer Ausprägung signifikant zwischen dem Vollbild der CML bei Diagnosestellung und dem Befund eines erfolgreich therapierten Patienten unter Imatinib divergieren [36, 248, 251]. Neben einer signifikanten Reduktion der Zellularität unter Therapie ließ sich für die hier untersuchte Stichprobe auch eine Senkung der Myeloid/Erythroid-Ratio sowie eine Normalisierung der Eisenbestände im Knochenmark evaluieren. Es bleibt zu berücksichtigen, dass die betrachteten Parameter bewiesenermaßen mit dem Ausmaß des Therapieansprechens korrelieren, sodass in der vorliegenden Arbeit Effekte der Therapie mit Imatinib auf die morphologischen Aspekte des Knochenmarks aufgrund der übermäßig großen Anzahl berücksichtigter Rezidive tendentiell zu niedrig ausfallen. Die erhobenen Befunde befinden sich dennoch in weitreichender Übereinstimmung mit der gängigen Literatur. Lediglich das Phänomen der Zunahme der Myelofibrose unter Therapie, wenngleich nicht signifikant, scheint auf der Zusammensetzung der Studiengruppe zu beruhen.

7.1.2 Immunhistochemische Parameter divergieren zwischen CML bei Diagnose sowie unter Therapie mit Imatinib

Immunhistochemische Methoden nehmen in der Routine-Diagnostik des Knochenmarks bei CML eine zentrale Rolle ein, da mit ihrer Hilfe differenziertere Aussagen über Häufigkeiten und Verteilungsmuster von Zellen getroffen werden können, die ein spezielles Epitop präsentieren. Dies ermöglicht teilweise eine Zuordnung von normalen und neoplastischen Zellen mit unklarem morphologischem Befund zu einer Zellreihe oder einem Reifestadium [262]. Fühere Arbeiten an großen Fallzahlen von histologischen Knochenmarkspräparaten bei CML konnten charakteristische qualitative und quantitative Veränderungen in der Expression einzelner Epitope demonstrieren [178, 251, 252]. In der vorliegenden Stichprobe fand sich neben einer Reduktion CD34- und/oder CD117-positiver Vorläuferzellen bzw. Gefäßproliferate sowie der Megakaryozyten, für die sich darüber

hinaus eine Normalisierung ihres zytologischen Bildes demonstrieren ließ, eine signifikante Vermehrung der Monozyten. In den Lymphozytenfärbungen (CD3 für T-Zellen und CD20 für B-Zellen) zeigte sich eine jeweils signifikante Zunahme von B- und T-Zell-Infiltraten, sowie eine Tendenz zur Formation vor allem gemischtzelliger Lymphozytenherde. Auch in der Zusammenschau der immunhistochemischen Befunde findet sich somit eine weitstreckige Übereinstimmung mit der gängigen Literatur. Die fehlende Signifikanz für die Reduktion CD34-positiver Vorläuferzellen sowie die ungewöhnliche Zunahme der CD-14-positiven Monozyten erklärt sich nächstliegend anhand der unverhältnismäßig großen Anzahl in die Studie eingeschlossener Rezidive unter Therapie.

7.1.3 Klinische, morphologische und immunhistochemische Untersuchungen klassifizieren das Therapieansprechen der CML unter Imatinib

Durch die Integration klinischer, morphologischer und immunhistochemischer Parameter ließ sich für die einzelnen Fälle der untersuchten Stichprobe ein Lugli-Score-Wert bestimmen, der dank seiner hervorragenden Korrelation mit dem zytogenetischen Therapieansprechen im Folgenden als Maß für das Therapieansprechen der einzelnen Fälle dienen konnte [165].

7.2 MicroRNA-Expressionsmuster der CML

7.2.1 MicroRNA-Expressionsmuster differenzieren zwischen CML und Normalgewebe

In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass sich anhand der quantitativen Expressionsanalyse von MicroRNAs Probenmaterial eindeutig einer Tumorentität, oft sogar einer Subspezies zuordnen lässt [20]. Im Rahmen der Generierung von spezifischen MicroRNA-Profilen ließen sich für viele Entitäten anhand weniger MicroRNAs hochspezifische Klassifikationsbäume kalkulieren, deren Reproduzierbarkeit weit über der von mRNA-Expressionsprofilen lag [164]. Die Möglichkeit der Bestimmung solcher MicroRNA-Expressionsprofile an Beckenkammtrepanaten wurde von mehreren Autoren belegt [23, 118]. Die Integration histopathologischer Untersuchungen am Beckenkammtrepanat sowie quantitativer Bestimmungen von MicroRNA Expressionsmustern bei der CML blieb hingegen bisher unversucht.

Durch die quantitative Analyse von 16 MicroRNAs, deren Expression in früheren Arbeiten Auffälligkeiten bei CML gezeigt hatten, mittels qRT-PCR konnten Expressionsmuster generiert werden, die zwischen Probenmaterial von CML und Normalgewebe zu differenzieren vermögen.

In der vergleichenden Untersuchung von CML und Normalgewebe konnten sechs MicroRNAs mit differentieller Expression ermittelt werden. Lediglich die MicroRNA 150 zeigte eine reduzierte Expression, wohingegen die MicroRNAs 23a, 146a, 155, 199b-5p und 422b überexprimiert waren. Dies ist eine eher seltene Konstellation, da im Rahmen maligner Prozesse MicroRNAs in der Regel herabreguliert werden [164].

Die hier beobachtete Dysregulation der einzelnen MicroRNAs zeigt sich in Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen. So konnte für die Expression der MicroRNA 23a eine starke Assoziation mit Zellen der myeloischen Reihe beschrieben werden, in denen selbige um ein Vielfaches stärker exprimiert wird als in den anderen Zellreihen des Knochenmarks [146]. Eine gesteigerte Expression konnte auch in humanen Nierenzell- und Urothelkarzinomen nachgewiesen werden und in einer HCC-Zellline eine antiapoptotische sowie eine proliferative Wirkung dieser MicroRNA beschrieben werden [93, 112]. Eine gesteigerte Expression im Rahmen einer malignen Neoplasie des Knochenmarks mit Prädominanz der myeloischen Reihe erscheint schlüssig. Im Zusammenhang mit der CML war die MicroRNA 23a primär als potenzieller Marker für ein schlechtes Therapieansprechen in Erscheinung getreten [228].

Die physiologischen Effekte der MicroRNA 146a sind verhältnismäßig gut charakterisiert und konzentrieren sich im weitesten Sinne auf negativ regulatorische Funktionen im Bereich der angeborenen Immunität, der entzündlichen Immunantwort sowie der Abwehr viraler Pathogene [242, 257]. Dysregulationen und Überexpressionen der MicroRNA 146a sind sowohl für entzündliche als auch für neoplastische Prozesse, u.a. des Urogenitaltrakts, der Schilddrüse und der Haut, beschrieben [159, 204, 210, 212]. Aus hämatopathologischer Sicht imponieren insbesondere die aberranten Expressionsmuster im Rahmen der CLL, der akuten lymphoblastischen und myeloischen Leukämien des Kindesalters sowie des 5q- Syndroms [268, 270, 283]. Unter Berücksichtigung dieser Erkenntnisse scheint eine Assoziation zwischen der hier dargestellten Überexpression der MicroRNA 146a und klonalen Knochenmarkserkrankungen wie der CML in Einklang mit der bisher publizierten Literatur zu stehen. Im Kontext der CML konnte bisher nur von Flamant *et al*. eine Normalisierung der primär bei Diagnosestellung deregulierten Expression der MicroRNAs 142-3p, 146a, 150 und 199b-5p unter Therapie mit Imatinib gezeigt werden [78]. Gründe für diese paradoxen Befunde sind möglicherweise die kleiner bemessene Stichprobe, die kurze Verlaufsbeobachtung sowie die unterschiedlichen untersuchten Materialien.

Auffällige Expressionsmuster für die MicroRNA 155 hatten sich zunächst im Rahmen lymphatischer Neoplasien gezeigt, was in der Folge dazu führte, dass ihre physiologische Bedeutung im Kontext der lymphatischen Immunantwort und deren Regulation untersucht wurde [57, 74, 145, 221, 246]. Auch wurde eine Assoziation mit autoimmunologischen Phänomenen, basierend auf einer Hyperreaktivität des T-Zellsystems, beschrieben.

Neuere Arbeiten widmeten sich der Frage nach der Rolle der MicroRNA 155 in der Reifung hämatologischer Vorläuferzellen myeloischer Prägung unter Stimulation durch Lipopolysacharide und im Zusammenhang mit akuten myeloischen Neoplasien. Zum einen fand sich nach Stimulation des Monozytären/Granulozytären Systems durch bakterielle Antigene eine kurzfristige und kurzlebige Expressionssteigerung der MicroRNA 155 mit stimulierendem Effekt auf die Reifung mononukleärer Zellen *in vitro* [196]. Zum anderen konnte bei langfristig persistierender Expression der MicroRNA 155 ein myelodysplastischer Phänotyp der induzierten Monozytären/Granulozytären Population am

Mausmodell evaluiert werden. In diesem Zusammenhang wurde die Expression auch für die akute myeloische Leukämie an menschlichem Probenmaterial bestimmt und es fand sich eine gesteigerte Expression bei den Subtypen M4 und M5, die morphologisch einen ähnlichen Phänotyp präsentieren wie die im Mausmodell induzierten, dysplastischen Zellen des Monozytären/Granulozytären Systems [195]. Analog zu diesen Betrachtungen sind wahrscheinlich die vorliegenden Ergebnisse an Probenmaterial der chronischen myeloischen Leukämie zu verstehen, deren prädominanter Phänotyp morphologisch ebenfalls eine enge Verwandtschaft mit den durch MicroRNA 155 induzierbaren Zelltypen zeigt. Eine im Mittelwert um das fünffache gesteigerte Expression dieser MicroRNA wurde bereits von Hussein *et al*. beschrieben, konnte in den bisherigen Studien zu diesem Thema allerdings nicht als signifikantes Phänomen charakterisiert werden [116]. Es ist davon auszugehen, dass die zu eng bemessene Stichprobe in den vorangegangenen Arbeiten ausschlaggebend für diese partiell divergenten Ergebnisse ist.

Die MicroRNA 199b-5p, deren Überexpression kürzlich im Rahmen von Asbestose-assoziierten Bronchialkarzinomen gezeigt werden konnte, ist in ihrer physiologischen Funktion weitgehend unverstanden [193]. Publiziert sind unter anderem eine signifikant gesteigerte Expression in nicht-entzündeten Mukosa-Arealen bei Morbus Crohn gegenüber Colitis ulcerosa sowie eine niedrigere Expression bei metastasierten Medulloblastomen im Vergleich zu lokalisierten Befunden [75, 85]. Die hier dargestellten Ergebnisse befinden sich im Einklang mit der beschriebenen Studie von Flamant *et al*., die eine signifikante Abnahme der primär gesteigerten Expression im Verlauf der ersten zwei Wochen unter Therapie mit Imatinib nachweisen konnte. Auch konnten mehrere potenzielle Ziel-Gene mit nachgewiesener Wirkung auf die Entwicklung des malignen Phänotyps in leukämischen Erkrankungen, wie etwa LARG, MAP3K11 und MYH9, anhand von *in silico* Analysen identifiziert werden [78].

Über die Rolle der MicroRNA 422b im Rahmen leukämischer Prozesse ist bisher wenig bekannt. Neben einer Rolle im Stoffwechsel von Osteoblasten konnte eine aberrante Expression in BRCA1/2 assoziierten Ovarialkarzinomen gezeigt werden [154, 205]. Da Landgraf *et al*. die MicroRNA 422b einem 3'-Produkt der MicroRNA 378 zuordnen konnten, werden beide seither gemeinsam betrachtet [150]. Der MicroRNA 378 konnte in aufwändigen Arbeiten eine Rolle bei der Antiapoptose, der Angiogenese und der Proliferation von Tumorzellen nachgewiesen werden [155]. Ebenso zeigte sich eine aberrante Expression in Fällen von Polyzythämia Vera und Magenkarzinomen sowie eine Assoziation mit vaskulitischen Prozessen [30, 260, 282]. Weitere Untersuchungen sind von Nöten, um den kausalen Zusammenhang zwischen dieser MicroRNA und der CML zu beleuchten, wenngleich eine Beteiligung an der malignen Transformation hämatopoetischer Vorläuferzellen bei CML zum gegenwärtigen Zeitpunk schlüssig erscheint. Auch erscheint eine Beteiligung der aberrant exprimierten MicroRNA 422b/378 mit den ihr zugeschriebenen antiapoptotischen und angiogenetischen Eigenschaften an den vermehrt berichteten CD34-positiven Gefäßproliferaten bei der CML wahrscheinlich und sollte in weiteren Studien näher beleuchtet werden [248, 252].

Die physiologische Bedeutung der MicroRNA 150 scheint unter anderem in der Kontrolle der Expression des einflussreichen Transkriptionsfaktors *c-MYB* zu liegen, welcher unter anderem Einfluss auf die B-Zellreifung nimmt [161, 280, 285]. Im Rahmen von Studien an malignen Lymphomen ließen sich der MicroRNA 150 darüber hinaus Tumorsuppressoreigenschaften nachweisen [272]. Ebenfalls konnte eine aberrante Expression im Rahmen von Arbeiten an der CLL beschrieben werden [81]. In Assoziation mit der CML konnte eine reduzierte Expression bereits von Agirre *et al.* dargestellt werden; Flamant *et al.* sowie Machova-Polakova *et al.* zeigten eine Normalisierung dieser aberranten Expression im peripheren Blut von Patienten unter Therapie mit Imatinib [1, 78, 168]. Von besonderem Interesse ist die Regulation des Transkriptionsfaktors *c-MYB* durch die MicroRNA 150, da dieser eine essentielle regulatorische Funktion in der Leukämogenese der *BCR-ABL1* positiven CML einzunehmen scheint [160]. Darüber hinaus ist eine signifikante inverse Korrelation der MicroRNA 150 mit der quantitativen Expression des *BCR-ABL1*-Fusionstranskripts sowie eine positive Korrelation von *c-MYB* und *BCR-ABL1* beschrieben [168].

Zu berücksichtigen bleibt allerdings ebenfalls, dass die Divergenzen der quantitativen Expression zu gering ausfallen und eine zu geringe Spezifität aufweisen, als dass eine einzelne MicroRNA als Marker für die Diagnostik der CML von Bedeutung sein könnte.

Der diagnostische Wert der hier vorgeschlagenen MicroRNA-Marker samt ihrer differentialdiagnostischen Bedeutung bleibt durch weitere Studien zu evaluieren. In kommenden Arbeiten bleibt des weiteren die Validität sowie die klinische Umsetzbarkeit des vorgeschlagenen Klassifikationsbaums für die Differenzierung reaktiver und maligner, speziell CML-spezifischer Prozesse zu beurteilen. Darüber hinaus ist die generelle Frage der Kausalität aberranter MicroRNA-Expressionsmuster in neoplastischen Prozessen weiterhin ungeklärt. In der bisher publizierten Literatur finden sich zahlreiche Anhaltspunkte für eine konkrete Rolle von MicroRNAs in der primären Entstehung von Neoplasien. Die Möglichkeit einer sekundären Dysregulation von MicroRNAs, was diese zu einem reinen Epiphänomen machen würde, kann nicht abschließend verworfen werden [24].

Eine mögliche pathogenetische Bedeutung der beschriebenen MicroRNAs wird durch die vorliegende Studie hingegen untermauert und ihr onkogenes Potenzial unterstrichen. Aus der expressionsgesteuerten Induktion neoplastischer und paraneoplastischer Prozesse im Knochenmark bei CML erwachsen ggf. durch eine spezifische Inhibition der dysregulierten MicroRNA oder der betroffenen Signaltransduktionskaskaden neue therapeutische Ansätze.

7.2.2 MicroRNA-Expressionsmuster verändern sich unter Therapie mit Imatinib

In bisherigen Studien wurde die Entwicklung von MicroRNA-Expressionsprofilen in den ersten 14 Tagen unter Therapie mit Imatinib durch Flamant *et al.* beschrieben [78]. Darüberhinaus wurden Expressionsprofile für hämatologische Rezidive, Therapieversager im Sinne einer ausbleibenden zytogenetischen Remission sowie ein molekulargenetisches Ansprechen durch Machova-Polakova *et*

al. ermittelt [168]. Entsprechende Untersuchungen am Beckenkammtrepanat stehen allerdings bis dato aus. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Integration nicht nur zytologischer und zyto- bzw. molekulargenetischer, sondern auch histologischer Befunde des Knochenmarks sowie der Expressionsanalyse ausgewählter MicroRNAs unternommen.

Nur die MicroRNA 150 zeigte unter Therapie einen signifikanten Anstieg der Expression. Dieser Befund steht im Einklang mit den Untersuchungen von Flamant *et al*. und Machova-Polakova *et al*. [78, 168]. Eine signifikante Reduktion der Expression konnte für die MicroRNAs 23a, 142-3p, 146a, 155, 199b-5p und 422b nachgewiesen werden. Auch diese Befunde scheinen unter Berücksichtigung der nachgewiesenen Effekte aberranter Expressionsmuster der genannten MicroRNAs im Rahmen neoplastischer Prozesse im Einklang mit der publizierten Literatur zu stehen, da unter Therapie mit Imatinib für eine Vielzahl der behandelten Patienten eine schnelle und drastische Normalisierung der MicroRNAs, die die CML charakterisieren, gefunden wurde [178, 194, 234, 244]. Einzig die Expression der MicroRNA 146a sowie ihr Verhalten unter Therapie scheint im Widerspruch zu den Ergebnissen von Flamant *et al*. zu stehen. Hierbei bleiben aber neben der deutlich größeren Stichprobe in der vorliegenden Arbeit das differente Patientengut und das deutlich längere mittlere Follow-up zu berücksichtigen. Für die physiologischen Implikationen der aberranten Expression von CML-typischen MicroRNAs und deren Normalisierung unter Therapie siehe 7.2.1.

Lediglich die aberrante Expression der MicroRNA 142-3p erreichte im Vergleich zum Normalgewebe keine statistische Signifikanz, wohl aber unterschied sich ihre Expression signifikant vor sowie unter Therapie. Primär fand die MicroRNA 142-3p Erwähnung in einer Arbeit über die differenzielle MicroRNA-Expression zwischen den unterschiedlichen Zelllinien der Hämatopoese [183]. Des weiteren konnte ihr eine Rolle im Rahmen entzündlicher Veränderungen, wie der Psoriasis vulgaris, zugeordnet werden [129]. Darüber hinaus konnten zahlreiche maligne Neoplasien des Plattenepithels verschiedener Lokalisationen, wie des Kopf-Hals-Bereiches und der Bronchien, mit aberranten Expressionsmustern dieser MicroRNA in Zusammenhang gebracht werden [115, 175]. Hämatopathologisch relevant ist die onkogene Wirkung einer gesteigerten Expression im Rahmen der T-ALL sowie des Mantel-Zell-Lymphoms [167, 284]. Eine Abnahme der Expression unter Therapie mit Imatinib, wie bereits durch Flamant *et al*. geschildert, auch in Abwesenheit einer statistisch signifikanten Überexpression zum Zeitpunkt der Diagnosestellung, scheint sich daher sinnig in das Gefüge der bis dato publizierten Informationen einzufügen.

Spekulationen über das Verhalten der MicroRNA 422b unter Therapie sowie Rückschlüsse auf kausale Zusammenhänge sind zurückhaltender zu bewerten, da über ihre Rolle in leukämischen Prozessen bisher kaum etwas bekannt ist.

7.2.3 MicroRNA-Expression bei CML unter Therapie korreliert mit morphologischem Ansprechen

In früheren Arbeiten an der CML zum Therapieansprechen unter Imatinib konnten anhand von MicroRNA-Expressionsprofilen des aspirierten, unfixierten Knochenmarks vom Zeitpunkt der Diagnosestellung Expressionscluster und ein Klassifikationsbaum definiert werden, die drei primär resistente Proben ohne *BCR-ABL1*-Mutationen und fünf Kontrollen mit Therapieerfolg korrekt gruppierten [228]. In einer weiteren Arbeit wurde die globale MicroRNA-Expression in Abhängigkeit vom Stadium der CML untersucht [168]. Eine Klassifikation des therapeutischen Erfolges am Beckenkammtrepanat durch eine Quantifizierung der Expression ausgewählter MicroRNAs sowie die Integration histopathologischer Befunde hingegen ist bisher nicht beschrieben.

Die Normalisierung aberranter Expressionsmuster unter Therapie fällt über die nach den morphologischen Kriterien des Therapieansprechens nach Lugli *et al*. geordneten Gruppen für viele der untersuchten MicroRNAs homogen aus. Eine signifikante positive Korrelation von MicroRNA-Expression und Lugli-Score fand sich für die MicroRNAs 142-3p, 199b-5p, 203 und 422b. Ein gleichgerichteter Trend für die MicroRNA 23a erreichte anhand der untersuchten Stichprobe keine statistische Signifikanz. Wenngleich Bueno *et al*. einen Expressionsverlust der MicroRNA 203 samt eines konsekutiven Wegfalls ihrer Tumorsuppressorwirkung auch für CML erwarteten, konnte in späteren Arbeiten demonstriert werden, dass sich bei der CML im Unterschied zu zahlreichen lymphatischen Neoplasien keine Promotorhypermethylierung für die MicroRNA 203 findet [48]. Des weiteren konnte für das duktale Adenokarzinom des Pankreas ein Assoziation von hoher MicroRNA 203-Expression und einer schlechteren Prognose aufgezeigt werden, sodass die vorliegenden Ergebnisse schlüssig im Hinblick auf den gegenwärtigen Stand der Forschung sind [97]. Eine negative Korrelation fand sich für die MicroRNA 150. Die beobachteten Effekte waren allerdings auch für die genannten MicroRNAs zu wenig spezifisch, so dass der quantitativen Expression einer einzelnen MicroRNA keine große Bedeutung in der Evaluation des Therapieansprechens zukommen könnte. Im Unterschied zu den MicroRNAs, die lediglich eine signifikante Tendenz zur Normalisierung unter Therapie mit Imatinib zeigten, findet sich für die angesprochenen MicroRNAs dennoch ein Potenzial zur Differenzierung des therapeutischen Effekts. Gleichsam schlagen die hier beschriebenen Effekte eventuell eine Brücke zwischen konventionellen histopathologischen Befunden und der Expressionsanalyse von MicroRNAs bei CML. Dieses Phänomen nutzend wurde unter Verwendung von Random Forest die Wertigkeit einzelner MicroRNAs für die Differenzierung spezifischer Fälle der Stichprobe in zwei Gruppen, die anhand des Lugli-Scores definiert wurden, bestimmt. Für einen Lugli-Score von 0-1 kann mit einer Wahrscheinlichkeit von 93,1% eine komplette zytogenetische Remission angenommen werden, sodass nach diesem Kriterium die Gruppe der Responder gebildet wurde. Für einen Score von 2 oder größer hingegen kann ein zytogenetisches Ansprechen mit 95%iger Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden[165]. Letzteres Kriterium wurde entsprechend für den Einschluss in die Gruppe der sog. Therapieversager gewählt.

Der diagnostische Wert der hier beschriebenen MicroRNAs samt ihrer differentialdiagnostischen Wertigkeit im Rahmen von Verlaufsbegutachtungen des Knochenmarks bei CML unter Therapie mit Imatinib bleibt zu evaluieren. Auch steht zu klären, ob die Analyse weiterer MicroRNAs die Erstellung eines validen Klassifikationsbaumes anhand hierarchischer Cluster mit dem Ziel einer alternativen molekulargenetischen Verlaufsbeobachtung ermöglicht. Des Weiteren bleibt zu beleuchten, ob die beschriebenen MicroRNAs auch eine Korrelation mit dem zytogenetischen oder dem molekulargenetischen Ansprechen zeigen, welches nicht am Formalin-fixierten Beckenkammtrepanat beurteilt werden kann. Auch wenn es in dieser ersten Arbeit das Ziel war, Befunde unabhängig vom Mutationsstatus des *BCR-ABL1*-Fusionstranskripts zu erheben, wäre die Berücksichtigung solcher Zusatzinformationen in Zukunft sicher von Nutzen. Weitere Studien unter Einschluss unfixierten Probenmaterials sind diesbezüglich von Nöten.

7.3 MicroRNA-Expression von *JAK2* pos. CMPEs

7.3.1 MicroRNA-Expressionen divergieren zwischen *JAK2* pos. CMPEs und Normalgewebe

In bisherigen Arbeiten an verschiedenen Patientenmaterialien konnten für die untersuchten MicroRNAs aberrante Expressionsmuster beschrieben werden [29, 30, 100, 117]. Eine systematische Untersuchung der MicroRNA-Expressionsmuster aller drei klassischen myeloproliferativen Erkrankungen anhand großer Stichproben am histologischen Präparat stand allerdings bis dato aus.
Für die MicroRNA 150 fand sich eine signifikant reduzierte Expression bei der PV und der CIMF, eine gesteigerte Expression hingegen wies die MicroRNA 10a bei der ET und der CIMF auf.
Die vorliegenden Ergebnisse bezüglich der Dysregulation der MicroRNA 150 stehen im Einklang mit der bisher veröffentlichten Literatur [29, 100]. Eine aberrante Expression der MicroRNA-10a wurde bisher im Rahmen der AML sowie einer zellulären Subpopulation der CML beschrieben, auch wenn sich letzteres Phänomen in der vorliegenden Arbeit am histologischen Präparat der Erkrankung nicht bestätigen ließ [1, 63]. Ebenfalls scheint eine aberrante Expression dieser MicroRNA mit Hinblick auf eines ihrer beschriebenen Ziel-Gene, USF2, bei ET und CIMF schlüssig, da beide morphologisch u.a. durch ein atypisches Bild der Megakaryopoese hervorstechen und USF2 eine zentrale Rolle in der megakaryozytären Genexpressionsregulation zukommt [200]. Die hier beschriebenen Effekte konnten durch Hussein *et al.* an Megakaryozyten, die durch Lasermikrodissektion präpariert worden waren, nicht bestätigt werden, wobei hierbei zu berücksichtigen bleibt, dass sowohl die Behandlung des Probenmaterials divergiert als auch der Fokus auf nur eine Zelllinie des Knochenmarks gerichtet wurde, was die Detektion etwaiger Interaktionen zwischen den Zellen der Megakaryopoese, dem Stroma und anderen Zellreihen des Knochenmarks erschwert [117].
Es bleibt zu berücksichtigen, dass obwohl hier signifikante Unterschiede in der Expression einzelner MicroRNAs zwischen den Entitäten des chronisch-myeloproliferativen Formkreises teils zum ersten

Mal beschrieben werden konnten, deren Potenzial für die oft komplexe Differentialdiagnosik, speziell im Frühstadium der Erkrankungen, in kommenden Studien unter Einschluss potenzieller Ziel-Gene und deren immunhistochemischer Verteilung zu evaluieren bleibt. Darüber hinaus ist anhand der vorliegenden Studie nicht mit letzter Sicherheit auszuschließen, dass die beschriebenen Effekte nicht allein auf den spezifischen Subtyp einer CMPE, sondern vielleicht auch oder gar ausschließlich auf die quantitative Erfassung einzelner Zellreihen in unterschiedlichen Stadien der Ausreifung oder deren unterschiedlichen Verhältnisse zurückgehen, wenngleich die bisherige Datenlage zu diesem Thema letzteres äußerst unwahrscheinlich erscheinen lässt [29].

7.3.2 MicroRNA 150 Expression korreliert mit *JAK2*-Mutationsstatus

Bereits in früheren Studien konnte gezeigt werden, dass einzelne aberrant exprimierte MicroRNAs eine Korrelation mit dem quantitativen *JAK2*-Mutationsstatus zeigen [29, 100]. Wiederum stand eine vergleichende systematische Untersuchung am Beckenkammtrepanat für alle drei Entitäten noch aus.
In der vorliegenden Arbeit konnte ein signifikanter negativ-linearer Zusammenhang zwischen dem prozentualen Anteil *JAK2*-mutierter Zellen in PV und CIMF und der Expression der MicroRNA 150 beschrieben werden. Hingegen ließ sich kein positiver Zusammenhang zwischen der Expression der MicroRNA 10a und dem *JAK2*-Mutationsstatus nachweisen. Um zu belegen, dass für die Expression der MicroRNA 150 und der entsprechenden Regulation ihrer Ziel-Gene ein partiell *JAK2*-vermittelter Mechanismus zu Grunde liegt, wie es die vorliegenden Ergebnisse nahelegen, und dass die Aberration der Expression der MicroRNA 10a unabhängig von diesem ist, sind weitere, funktionelle Untersuchungen wünschenswert.

7.4 Einfluss von MicroRNA-Expression auf die mRNA von Ziel-Genen

Die Rolle von *c-MYB* in der normalen Hämatopoese wurde zunächst orientierend im Rahmen von Studien an *c-MYB*-knock-out Mäusen untersucht, wobei eine gestörte Hämatopoese in der Leber, eine Reduktion der erythroiden und myeloischen Kolonieformationen sowie eine defizitäre B- und T-Zell Lymphopoese imponierten [88, 188, 256]. Die offenbar obligaten Funktionen, die *c-MYB* im Rahmen dieser Prozesse inne hält, scheinen auf seiner Eigenschaft als Transkriptionsfaktors zu fußen. Regulatorische Zielstrukturen sind offenbar mehrere Gene, deren Expression vor allem im Stadium früher Vorläuferzellen von signifikanter Bedeutung ist (CD34, CD117, FLT3). Über diese Gene greift *c-MYB* indirekt in das zelluläre Gefüge von Proliferation und Apoptose der hämatopoetischen Vorläuferzellen ein [182, 218]. Seinen Einfluss auf die Lymphopoese macht *c-MYB* anscheinend indirekt über die Regulierung der BCL-2 Expression geltend [79].
Es konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass *c-MYB* bei CML intakt, seine Expression jedoch signifikant gesteigert ist. Pathogenetisch wurde zum einen eine gesteigerte Proteinstabilität, reguliert über den PI-3K/Akt Signaltransduktionsweg, postuliert [41, 50, 166]. Andere Arbeitsgruppen konnten *c-MYB* darüber hinaus als Zielstruktur der MicroRNA 150 charakterisieren, die wiederum im Rahmen

der CML in stark reduziertem Maße exprimiert wird [78, 168]. Eine Normalisierung sowohl der *c-MYB*- als auch der MicroRNA150-Expression nach Therapie konnte ebenfalls dargestellt werden. In der vorliegenden Arbeit konnten die genannten Phänomene bestätigt werden, wenngleich lediglich die differentielle *c-MYB*-Expression zwischen der Studien- und der Kontrollgruppe knapp keine statistische Signifikanz erreichte. Darüberhinaus fand sich mit der Korrelation der MicroRNA-150-Expression und dem morphologischen Therapieansprechen ein potenzieller Mechanismus für die Persistenz des malignen Phänotyps der Erkrankung im Knochenmark bei Therapieversagern. Kritisch bleibt in diesem Zusammenhang lediglich die fehlende Korrelation der *c-MYB* Expression mit dem morphologischen Knochenmarksbefund unter Therapie zu bewerten, die mutmaßlich weiteren bisher nicht charakterisierten Regulationsmechanismen geschuldet ist.

Unter Berücksichtigung seiner Regulation unter Therapie sowie seiner physiologischen Implikationen wurde *c-MYB* bereits als potenzielles therapeutisches Ziel bei CML und AML diskutiert, da seine Expression für die gesunde wie die leukämische Hämatopoese in unterschiedlichem Maße bedeutsam zu sein scheint [43, 217].

Die physiologische Bedeutung des BTB and CNC homology1 Gens (*BACH1*), eines Leucin-Zipper-Proteins, scheint in der Regulation der transkriptionellen Aktivität zahlreicher Gene zu liegen, die den Eisenstoffwechsel beeinflussen (*HMOX1, FTL, FTH1, ME1,* und *SLC48A1*), die Redox-Bilanz der Zelle kontrollieren (*GCLC, GCLM,* und *SLC7A11*) und einen Einfluss auf die Zellzyklussteuerung sowie die Apoptose ausüben (*ITPR2, CALM1, SQSTM1, TFE3, EWSR1, CDK6, BCL2L11,* und *MAFG*) [199, 203, 271]. Ebenfalls beschrieben ist eine zeitlich fest determinierte regulatorische Funktion von *BACH1* im Wechselspiel mit weiteren Transkriptsionsfaktoren in der Erythropoese [25]. Von besonderem Interesse in der vorliegenden Studie waren die Erkenntnisse, dass *BACH1* nicht nur negativ durch die MicroRNA 155 reguliert wird, wie bereits andere Autoren annahmen, sondern nachgewiesenermaßen auch die Transkription der *Häm-Oxygenase 1* inhibiert [94, 185]. Der zuletzt genannten konnte durch Mayerhofer *et al.* eine wachstumsfördernde und anti-apoptotische Wirkung in Abhängigkeit des BCR-ABL-Status bei CML, wenngleich nur an Zellkulturen, nachgewiesen werden [177]. Primär über die Generierung von Billiverdin und CO wird in den neoplastischen Zellen mit Überexpression von *HMOX1* die Apoptoseneigung gehemmt. In weiteren Studien an soliden Tumoren konnte eine gesteigerte Expression demonstriert werden, wohingegen die Mehrzahl der regulären Gewebe keine oder nur eine schwache Expression von *HMOX1* aufwies. Seine proliferativen Effekte im Rahmen maligner Prozesse entfaltet der sekundär deregulierte Transkriptionsfaktor *BACH1* über seine Wirkung auf *ITPR2, Calmodulin, TFE3, Cyclin E2* und *EWSR1*, wobei die beiden zuletzt genannten in ihrer Expression gehemmt, die verbleibenden hingegen induziert werden [271]. Die Summation der hier demonstrierten Ergebnisse legt einen MicroRNA-155-abhängigen Mechanismus der Expressionssteigerung der *Häm-Oxygenase* über *BACH1* nahe (s. Abb. 14). Die charakteristische Proliferationssteigerung und die supprimierte Apoptoseneigung im Rahmen der CML, sowie deren Umkehr unter Therapie mit Imatinib, erscheinen in diesem Kontext passend.

Eine konsekutiv vorgenommene mRNA-Expressionsanalyse der *Häm-Oxigenase 1* zeigte jedoch ein völlig gegenteiliges Bild. Gegenüber gesunden Kontrollfällen fand sich bei CML zum Zeitpunkt der Diagnose eine signifikante und im Mittel um das 3-fache erniedrigte Expression von *HMOX1*. Unter Therapie stellte sich eine Normalisierung der Befunde ein, wobei darüber hinaus eine eindeutige Korrelation des morphologischen Ansprechens der Erkrankung mit der mRNA-Expression demonstriert werden konnte. Eine niedrige Expression von *HMOX1* korrelierte zweifelsfrei mit einem schlechten morphologischen Ansprechen. Es bleibt somit zu postulieren, dass ein anderer, bis dato unbekannter, antagonistischer Mechanismus, der in bisherigen Studien an Zellkulturen nicht nachweisbar war, die Effekte der MicroRNA-155-vermittelten Expressionssteigerung von *BACH1 in* vivo unter Therapie mit Imatinib antagonisiert. Sarma *et al*. konnten eine *HMOX1* induzierte Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies demonstrieren, die K562- und HL60-Zellen nach Inkubation mit verschiedenen Toxinen vermehrt in Apoptose gehen ließen.

In der vorliegenden Arbeit kann somit zum ersten Mal die onkogene Wirkung der MicroRNA-155 auf den Transkriptionsfaktor *BACH1* bei fraglicher sekundärer Wirkung auf die *Häm-Oxygenase 1* bei der CML, entsprechend einem weiteren Beispiel für MicroRNA-vermittelte Onkogenese, demonstriert werden. Darüber hinaus kann hier zum ersten Mal eine Assoziation von niedriger *HMOX1*-Expression mit der CML bei Erstdiagnose sowie im Rezidiv aufgezeigt werden. Es bedarf jedoch weiterer Untersuchungen an größeren Kollektiven, um kausale Schlüsse in diesem Kontext ziehen und die diagnostische wie auch die prognostische Bedeutung der *Häm-Oxigenase 1* bei CML abschließend begutachten zu können. Auch bleibt zu klären, wodurch die kontroversen Ergebnisse in Analysen von BCR-ABL-positiven Zellkulturen (K562) bedingt sind. Zu brücksichtigen bleibt unter selbiger Fragestellung sicher, dass in der vorliegenden Studie das gesamte Knochenmark unter (patho-) pysiologischen Bedingungen und nicht lediglich eine artifiziell veränderte Zelllinie berücksichtigt wurde.

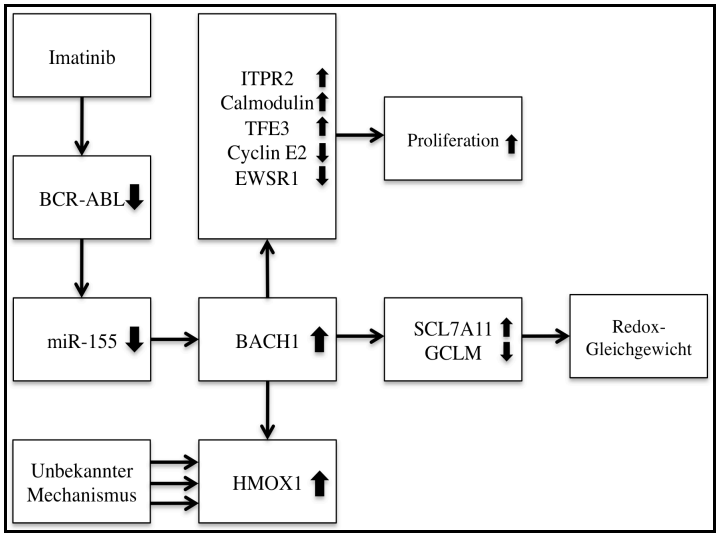

Abb. 19: Normalisierung der MicroRNA 155 unter Therapie mit Imatinib sowie physiologische Implikationen

JARID2 als Chromatin-modifizierendes Protein mit Histondemethylaseaktivität wurde primär als Regulator der embryonalen Entwicklung mehrerer Organe beschrieben [187, 243]. Kitajima *et al.* konnten dieses Konzept auf die definitive Hämatopoese übertragen und in einer weiteren Arbeit zeigen, dass eine reduzierte Expression von *JARID2* mit einer hyperproliferativen Megakaryopoese einhergeht [141, 142]. In den Fokus dieser Arbeit rückte *JARID2* als nachgewiesenes Ziel-Gen der MicroRNA 155, welche sich als signifikant überexprimiert demonstrieren ließ [21]. Unter der Überlegung einer MicroRNA 155 vermittelten Repression von *JARID2* mit konsekutiver Hyperplasie der Megakaryopoese im Rahmen der CML wurde die Expression von *JARID2* am Knochenmark bei CML vor sowie unter Therapie bestimmt und mit der megakaryozytären Zellularität der Trepanate korreliert. Dabei fand sich eine signifikante Zunahme der Expression unter Therapie sowie eine Korrelation von *JARID2*-Expression und megakaryozytärer Proliferation. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie deuten somit auf eine MicroRNA 155 vermittelte Expansion der Megakaryopoese bei CML hin. Darüber hinaus legt die Korrelation der *JARID2*-Expression mit der megakaryozytären Proliferation eine bisher unbeschriebene Assoziation zwischen der beschriebenen MicroRNA 155-*JARID2*-Achse und der Megakaryozyten-reichen Variante der CML nahe. Ein Trend zur Korrelation der Expression der MicroRNA 150 mit der megakaryozytären Proliferation verfehlte knapp das Signifikanzniveau.

Als Mitglied der *TOB/BTG1*-Familie gilt *TOB2* als potenzielles Tumorsuppressorgen mit bremsender Wirkung am Zellzyklus, dessen Assoziation mit der bei CML in der vorliegenden Arbeit als dereguliert demonstrierten MicroRNA 378 kürzlich demonstriert werden konnte. In derselben Arbeit konnte eine funktionelle Einheit aus c-MYC, MicroRNA 378 und Cyclin D-1 identifiziert werden [76, 119]. Unter Berücksichtigung der nachgewiesenen Korrelation von MicroRNA 378(422b)-Expression und morphologischem Therapieansprechen bei CML wurde der potenziell onkogenen Wirkung über eine Deregulation der *TOB2* Expression nachgegangen. Dabei ergab sich ein Trend hin zu einer Induktion unter Therapie, der allerdings knapp das Signifikanzniveau verfehlte. Hier sind weitere Studien an größeren Fallzahlen angezeigt, um eine Assoziation der MicroRNA 378-regulierten Expression von *TOB2* abschließend zu beweisen oder auszuschließen.

7.5 Immunhistochemischer Nachweis von dysregulierten Ziel-Genen divergiert bei CML und Normalgewebe

Im Rahmen der immunhistochemischen Analyse der Expression von *c-MYB* am Beckenkammtrepanat fand sich eine ausgeprägte nukleäre Markierung der unreifen Erythro- und Granulopoese sowie eine schwache zytoplasmatische Markierung der Megakaryopoese. Aufgrund der charakteristischen Befunde der Granulopoese im Knochenmark bei CML zum Zeitpunkt der Diagnose sowie im Rezidiv fand sich hier ein erheblich höherer Anteil markierter Zellen. Des Weiteren deutete sich eine Korrelation der mRNA-Expression mit den Ergebnissen der immunhistochemischen Untersuchungen an. Somit lässt sich *c-MYB* als weicher Marker für den sog. „pathologischen Linksshift“ interpretieren

und könnte als solcher von erheblichem diagnostischem wie auch prognostischem Wert sein. Es bedarf weiterer Studien an größeren Fallzahlen sowie korrespondierender mRNA-Expressionsbestimmungen, um den potenziellen Stellenwert von *c-MYB* in der Routine-Diagnostik der CML zu evaluieren.

7.6 Peripheres Blutbild und MicroRNA-Expression im Knochenmark

7.6.1 Leukozyten im peripheren Blutbild korrelieren mit MicroRNA-Expression bei CML

Bereits frühere Arbeiten konnten für einige MicroRNAs eine Korrelation mit Parametern des peripheren Blutbildes im Rahmen der CML nachweisen [78]. Versuche diesbezüglich an Beckenkammtrepanaten und unter Einschluss aller hier untersuchten MicroRNAs sind hingegen bisher nicht beschrieben.

Während sich für die MicroRNAs 23a, 142-3p, 155, 199b-5p, 203 und 422b eine positive Korrelation mit den Leukozyten des peripheren Blutes nachweisen ließ, zeigte lediglich die MicroRNA 150 eine negative Korrelation.

Unter Einschluss weiterer klinischer Daten wäre in späteren Studien eine Analyse der Expression auffälliger MicroRNAs und ihrer prognostischen Implikationen wünschenswert.

7.6.2 Thrombozyten im peripheren Blutbild korrelieren mit MicroRNA-Expression bei CMPEs

Während statistische Zusammenhänge im Sinne linearer Korrelationskoeffizienten für die CML bereits beschrieben sind, stehen solche Untersuchungen für die anderen chronisch-myeloproliferativen Erkrankungen bisher aus.

In der vorliegenden Arbeit kann analog zu den Ergebnissen für die CML ein Trend in Richtung eines negativen linearen Zusammenhangs zwischen der Expression der MicroRNA 150 und der Anzahl an Leukozyten im peripheren Blut für die Gruppe der *JAK2*-positiven CMPEs berichtet werden. Dieser erreichte allerdings nur knapp das *a priori* definierte statistische Signifikanzniveau. Für die Anzahl der Thrombzyten im peripheren Blut und die Expression der selben MicroRNA hingegen findet sich eine signifikante, wenngleich auch in ähnlichem Maße schwache, positive Korrelation.

Obwohl eine Kumulation der CMPEs zu einer Gruppe für die beschriebenen Analysen von Nöten war, die relative Schwäche der statistischen Evidenz sicher ein multifaktorielles Geschehen nahelegt, und anhand des gewählten Versuchsaufbaus für diese explorative Arbeit keine fundierten kausalen Schlüsse gezogen werden können oder sollten, deuten die beschriebenen Korrelationskoeffizienten für die Expression der MicroRNA 150 und die Anzahl der Leukozyten bzw. der Thrombozyten im peripheren Blut an, dass eine höhere Expression der MicroRNA 150 Auswirkungen auf das Equilibirium zwischen Megakaryopoese und Myelopoese im Knochenmark hat und somit eine Rolle

in der Aufklärung der pathophysiologischen Prozesse im Knochenmark bei CMPEs spielen könnte. Eine funktionelle Assoziation der hier beschriebenen molekular- bzw. epigenetischen Aberrationen und Phänomene mit dem charaktristischen Phänotyp der Erkrankungen liegt nahe. Im Sinne einer Validierung dieser Annahme bedarf es jedoch noch weiterer Studien.

8. Zusammenfassung

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expressionsmuster der MicroRNAs 23a, 146a, 150, 155, 199b-5p und 422b am histologischen Präparat des Knochenmarks zwischen CML und Normalgewebe divergieren und diese von einander zu differenzieren vermögen. Die weiterführende Analyse dieses Phänomens mündete in der Kalkulation der differentialdiagnostischen Wertigkeit einzelner MicroRNAs. Darüber hinaus konnten mit den MicroRNAs 23a und 422b in diesem Zusammenhang bisher unbeschriebene MicroRNAs charakterisiert werden. In einer hierarchischen Clusteranalyse anhand der Expression der MicroRNAs 150, 155 und 199b-5p konnte ein sensitiver und spezifischer Klassifikationsbaum generiert werden.

Des Weiteren wurde an Präparaten von Patienten unter Therapie mit Imatinib eine Normalisierung aberranter exprimierter MicroRNAs sowie eine signifikante Expressionsänderung der MicroRNAs 142-3p und 203 beobachtet. In einer integrativen Analyse von MicroRNA-Expressionsmustern und den morphologischen Parametern für das Therapieansprechen nach Lugli *et al.* (sog. Lugli-Score) konnten Korrelationen der MicroRNAs 142-3p, 150, 199b-5p, 203 und 422b mit dem therapeutischen Erfolg identifiziert werden. Dies zeigt für die MicroRNA-Expressionsanalyse ein Potenzial für die Verlaufsbegutachtung von Patienten mit CML unter Therapie mit Tyrosinkinaseinhibitoren auf. In der Folge konnte auch hier die Wertigkeit einzelner MicroRNAs für die Differenzierung in ein gutes und ein schlechtes Therapieansprechen kalkuliert werden.

Für die MicroRNAs 23a, 142-3p, 150, 155, 199b-5p, 203 und 422b konnte eine Korrelation mit der Anzahl der Leukozyten im peripheren Blut beschrieben werden. Dieser Umstand legt Rückschlüsse auf eine starke Assoziation der genannten MicroRNAs mit der Proliferation der myeloischen Reihe und der Ausschwemmung in das periphere Blut samt potenzieller, zukünftiger, therapeutischer und diagnostischer Optionen nahe.

Die Frage der Kausalität aberranter MicroRNA-Expressionsmuster in neoplastischen Prozessen bleibt hingegen ungeklärt, wenngleich schlüssig argumentiert werden konnte, dass bereits gesicherte Folgen der Dysregulation der genannten MicroRNAs mit dem malignen Phänotyp der CML im Einklang stehen, diesen prägen oder begünstigen könnten.

In einem ersten, explorativen Ansatz wurde die quantitative mRNA-Expression gesicherter und potenzieller Ziel-Gene dysregulierter MicroRNAs im Knochenmark bei CML untersucht. Darüber hinaus wurde die Lokalisation analog ausgewählter Proteine immunhistochemisch evaluiert. Dabei fand sich eine MicroRNA-abhängige Regulation von *BACH1*, *JARID2*, *c-MYB* und der offenbar multifaktoriell deregulierten Expression von *HMOX1*.

Die differentialdiagnostischen Implikationen und deren Nutzen für die Erstdiagnostik im Frühstadium myeloproliferativer Erkrankungen unter Einschluss der CML durch den immunhistochemischen Nachweises von *c-MYB* zeigen Potenzial, wenngleich weitere Studien für dessen Validierung notwendig sind.

Im zweiten Teil der Arbeit konnte anhand von histologischen Präparaten der anderen klassischen myeloproliferativen Erkrankungen dysregulierte MicroRNAs zum Zeitpunkt der Diagnosestellung identifiziert werden. Für die MicroRNA 150 fand sich eine reduzierte Expression bei der PV und der CIMF. Ebenso reduziert war die Expression der MicroRNA 342 bei der PV. Eine gesteigerte Expression hingegen wies die MicroRNA 10a bei der ET und der CIMF und die MicroRNA 182 bei allen drei untersuchten Entitäten auf.

Es konnte ein negativer Zusammenhang zwischen dem prozentualen Anteil *JAK2*-mutierter Zellen in PV und CIMF und der Expression der MicroRNA 150 beschrieben werden, was einen *JAK2*-vermittelten Mechanismus der MicroRNA-Dysregulation nahelegt. Das Fehlen eines solchen Zusammenhangs zwischen der dysregulierten Expression der anderen untersuchten MicroRNAs und dem *JAK2*-Mutationsstatus deutet hingegen einen unabhängigen Mechanismus an, dessen Pathogenese mit potenziellen therapeutischen Implikationen in weiteren Studien zu untersuchen ist.

In Analogie zu den explorativen Untersuchungen an den Ziel-Genen dysregulierter MicroRNAs bei der CML konnten für die anderen klassisch-myeloproliferativen Erkrankungen keine signifikanten MicroRNA-abhängigen Genexpressionsmuster nachgewiesen werden.

Zusätzlich wurden Trends an der Schwelle zur Signifikanz in Richtung einer Korrelation für die Expression der MicroRNA 150 sowie der Thrombozyten- und Leukozytenzahl im peripheren Blut festgestellt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit skizzieren pathogenetische Einflüsse und Mechanismen von MicroRNAs und deren Ziel-Genen im Rahmen der CML bei Diagnosestellung sowie eine Korrelation mit der Morphologie bei gutem und schlechtem Therapieansprechen. Analoge Beobachtungen konnten bei den anderen klassischen myeloproliferativen Erkrankungen gemacht werden. Zukünftige Studien sind für die Integration von quantitativen Befunden über die BCR-ABL-Last in Korrelation zur Expression auffälliger MicroRNAs bei der CML für die Integration des zytogenetischen und molekulargenetischen Ansprechens wünschenswert. Weitere Untersuchungen sind darüber hinaus von Nöten, um den spezifischen Einfluss aberranter Expressionsmuster der hier identifizierten MicroRNAs auf den jeweiligen Phänotyp der Erkrankungen zu bestimmen. In der Untersuchung der affektierten Signaltransduktionswege gilt es dabei speziell auch, potenzielle therapeutische Ziele zu identifizieren, welche im weiteren Verlauf nutzbar zu machen sind.

9. Literaturverzeichnis

1. Agirre, X., et al., *Down-regulation of hsa-miR-10a in chronic myeloid leukemia CD34+ cells increases USF2-mediated cell growth.* Mol Cancer Res, 2008. **6**(12): p. 1830-40.
2. Amarante-Mendes, G.P., et al., *Bcr-Abl exerts its antiapoptotic effect against diverse apoptotic stimuli through blockage of mitochondrial release of cytochrome C and activation of caspase-3.* Blood, 1998. **91**(5): p. 1700-5.
3. Anastasi, J., et al., *Lineage involvement by BCR/ABL in Ph+ lymphoblastic leukemias: chronic myelogenous leukemia presenting in lymphoid blast vs Ph+ acute lymphoblastic leukemia.* Leukemia, 1996. **10**(5): p. 795-802.
4. Anastasi, J., et al., *Pseudo-Gaucher histiocytes identified up to 1 year after transplantation for CML are BCR/ABL-positive.* Leukemia, 1998. **12**(2): p. 233-7.
5. Anstrom, K.J., et al., *Long-term survival estimates for imatinib versus interferon-alpha plus low-dose cytarabine for patients with newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia.* Cancer, 2004. **101**(11): p. 2584-92.
6. Atallah, E., H. Kantarjian, and J. Cortes, *In reply to 'Cardiotoxicity of the cancer therapeutic agent imatinib mesylate'.* Nat Med, 2007. **13**(1): p. 14; author reply 15-6.
7. Ault, P., et al., *Pregnancy among patients with chronic myeloid leukemia treated with imatinib.* J Clin Oncol, 2006. **24**(7): p. 1204-8.
8. Baccarani, M., et al., *Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet.* Blood, 2006. **108**(6): p. 1809-20.
9. Bacher, U., et al., *Blast count and cytogenetics correlate and are useful parameters for the evaluation of different phases in chronic myeloid leukemia.* Leuk Lymphoma, 2005. **46**(3): p. 357-66.
10. Bartel, D.P., *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function.* Cell, 2004. **116**(2): p. 281-97.
11. Bartl, R., B. Frisch, and W. Wilmanns, *Potential of bone marrow biopsy in chronic myeloproliferative disorders (MPD).* Eur J Haematol, 1993. **50**(1): p. 41-52.
12. Bartram, C.R., et al., *Translocation of c-ab1 oncogene correlates with the presence of a Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia.* Nature, 1983. **306**(5940): p. 277-80.
13. Bedi, A., et al., *BCR-ABL-mediated inhibition of apoptosis with delay of G2/M transition after DNA damage: a mechanism of resistance to multiple anticancer agents.* Blood, 1995. **86**(3): p. 1148-58.
14. Bedi, A., et al., *Inhibition of apoptosis by BCR-ABL in chronic myeloid leukemia.* Blood, 1994. **83**(8): p. 2038-44.
15. Bennett, J.M., et al., *The chronic myeloid leukaemias: guidelines for distinguishing chronic granulocytic, atypical chronic myeloid, and chronic myelomonocytic leukaemia. Proposals by the French-American-British Cooperative Leukaemia Group.* Br J Haematol, 1994. **87**(4): p. 746-54.
16. Beran, M., et al., *Selective inhibition of cell proliferation and BCR-ABL phosphorylation in acute lymphoblastic leukemia cells expressing Mr 190,000 BCR-ABL protein by a tyrosine kinase inhibitor (CGP-57148).* Clin Cancer Res, 1998. **4**(7): p. 1661-72.

17. Berman, E., et al., *Altered bone and mineral metabolism in patients receiving imatinib mesylate.* N Engl J Med, 2006. **354**(19): p. 2006-13.
18. Bhatia, R., et al., *Interferon-alpha restores normal adhesion of chronic myelogenous leukemia hematopoietic progenitors to bone marrow stroma by correcting impaired beta 1 integrin receptor function.* J Clin Invest, 1994. **94**(1): p. 384-91.
19. Bizzozero, O.J., Jr., K.G. Johnson, and A. Ciocco, *Radiation-related leukemia in Hiroshima and Nagasaki, 1946-1964. I. Distribution, incidence and appearance time.* N Engl J Med, 1966. **274**(20): p. 1095-101.
20. Blenkiron, C., et al., *MicroRNA expression profiling of human breast cancer identifies new markers of tumor subtype.* Genome Biol, 2007. **8**(10): p. R214.
21. Bolisetty, M.T., et al., *Reticuloendotheliosis virus strain T induces miR-155, which targets JARID2 and promotes cell survival.* J Virol, 2009. **83**(23): p. 12009-17.
22. Borze, I., et al., *MicroRNA microarrays on archive bone marrow core biopsies of leukemias-Method validation.* Leuk Res, 2010.
23. Borze, I., et al., *MicroRNA microarrays on archive bone marrow core biopsies of leukemias--method validation.* Leuk Res, 2011. **35**(2): p. 188-95.
24. Bousquet, M. and H.F. Lodish, *MicroRNAs: the primary cause or a determinant of progression in leukemia?* Expert Rev Hematol, 2011. **4**(2): p. 121-3.
25. Brand, M., et al., *Dynamic changes in transcription factor complexes during erythroid differentiation revealed by quantitative proteomics.* Nat Struct Mol Biol, 2004. **11**(1): p. 73-80.
26. Branford S, S.J., Grigg A, Arthur AS, Lynch K, Hughes T., *Increasing frequency and marked stability of the complete molecular re- sponse is observed in imatinib-treated CML pa- tients with long-term follow up.* Blood, 2006. **108**(430).
27. Braziel, R.M., et al., *Hematopathologic and cytogenetic findings in imatinib mesylate-treated chronic myelogenous leukemia patients: 14 months' experience.* Blood, 2002. **100**(2): p. 435-41.
28. Brennecke, J., et al., *bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in Drosophila.* Cell, 2003. **113**(1): p. 25-36.
29. Bruchova, H., M. Merkerova, and J.T. Prchal, *Aberrant expression of microRNA in polycythemia vera.* Haematologica, 2008. **93**(7): p. 1009-16.
30. Bruchova, H., et al., *Regulated expression of microRNAs in normal and polycythemia vera erythropoiesis.* Exp Hematol, 2007. **35**(11): p. 1657-67.
31. Brunning, R.D., *Tumors of the bone marrow*. 1994, Washington D.C.: Armed Forces Institute of Pathology.
32. Buchdunger, E., et al., *Abl protein-tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors.* J Pharmacol Exp Ther, 2000. **295**(1): p. 139-45.
33. Buchdunger, E., et al., *Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylaminopyrimidine derivative.* Cancer Res, 1996. **56**(1): p. 100-4.
34. Buchdunger, E., et al., *Selective inhibition of the platelet-derived growth factor signal transduction pathway by a protein-tyrosine kinase inhibitor of the 2-phenylaminopyrimidine class.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(7): p. 2558-62.
35. Bueno, M.J., et al., *Genetic and epigenetic silencing of microRNA-203 enhances ABL1 and BCR-ABL1 oncogene expression.* Cancer Cell, 2008. **13**(6): p. 496-506.
36. Buesche, G., et al., *Marrow fibrosis and its relevance during imatinib treatment of chronic myeloid leukemia.* Leukemia, 2007. **21**(12): p. 2420-7.

37. Buesche, G., et al., *Marrow fibrosis, indicator of therapy failure in chronic myeloid leukemia - prospective long-term results from a randomized-controlled trial.* Leukemia, 2003. **17**(12): p. 2444-53.
38. Buhr, T., H. Choritz, and A. Georgii, *The impact of megakaryocyte proliferation of the evolution of myelofibrosis. Histological follow-up study in 186 patients with chronic myeloid leukaemia.* Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol, 1992. **420**(6): p. 473-8.
39. Burchert, A., et al., *Interferon-alpha, but not the ABL-kinase inhibitor imatinib (STI571), induces expression of myeloblastin and a specific T-cell response in chronic myeloid leukemia.* Blood, 2003. **101**(1): p. 259-64.
40. Burkhardt, R., et al., *Working classification of chronic myeloproliferative disorders based on histological, haematological, and clinical findings.* J Clin Pathol, 1986. **39**(3): p. 237-52.
41. Bussolari, R., et al., *Coding sequence and intron-exon junctions of the c-MYB gene are intact in the chronic phase and blast crisis stages of chronic myeloid leukemia patients.* Leuk Res, 2007. **31**(2): p. 163-7.
42. Cai, X., C.H. Hagedorn, and B.R. Cullen, *Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs.* RNA, 2004. **10**(12): p. 1957-66.
43. Calabretta, B., et al., *Normal and leukemic hematopoietic cells manifest differential sensitivity to inhibitory effects of c-MYB antisense oligodeoxynucleotides: an in vitro study relevant to bone marrow purging.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(6): p. 2351-5.
44. Canellos, G.P., J. Whang-Peng, and V.T. DeVita, *Chronic granulocytic leukemia without the Philadelphia chromosome.* Am J Clin Pathol, 1976. **65**(4): p. 467-70.
45. Carroll, M., et al., *CGP 57148, a tyrosine kinase inhibitor, inhibits the growth of cells expressing BCR-ABL, TEL-ABL, and TEL-PDGFR fusion proteins.* Blood, 1997. **90**(12): p. 4947-52.
46. Chai, S.K., G.L. Nichols, and P. Rothman, *Constitutive activation of JAKs and STATs in BCR-Abl-expressing cell lines and peripheral blood cells derived from leukemic patients.* J Immunol, 1997. **159**(10): p. 4720-8.
47. Chen, C.Z., et al., *MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation.* Science, 2004. **303**(5654): p. 83-6.
48. Chim, C.S., et al., *Epigenetic inactivation of the hsa-miR-203 in haematological malignancies.* J Cell Mol Med, 2011. **15**(12): p. 2760-7.
49. Corbin, A.S., et al., *Several Bcr-Abl kinase domain mutants associated with imatinib mesylate resistance remain sensitive to imatinib.* Blood, 2003. **101**(11): p. 4611-4.
50. Corradini, F., et al., *Enhanced proliferative potential of hematopoietic cells expressing degradation-resistant c-MYB mutants.* J Biol Chem, 2005. **280**(34): p. 30254-62.
51. Corso, A., et al., *Chronic myelogenous leukemia and exposure to ionizing radiation--a retrospective study of 443 patients.* Ann Hematol, 1995. **70**(2): p. 79-82.
52. Cortes, J., et al., *Result of high-dose imatinib mesylate in patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia after failure of interferon-alpha.* Blood, 2003. **102**(1): p. 83-6.
53. Cortes, J., S. O'Brien, and H. Kantarjian, *Discontinuation of imatinib therapy after achieving a molecular response.* Blood, 2004. **104**(7): p. 2204-5.
54. Cortes, J.E., et al., *Prognostic significance of cytogenetic clonal evolution in patients with chronic myelogenous leukemia on imatinib mesylate therapy.* Blood, 2003. **101**(10): p. 3794-800.

55. Cortes, J.E., M. Talpaz, and H. Kantarjian, *Chronic myelogenous leukemia: a review.* Am J Med, 1996. **100**(5): p. 555-70.
56. Cortes, J.E., et al., *Staging of chronic myeloid leukemia in the imatinib era: an evaluation of the World Health Organization proposal.* Cancer, 2006. **106**(6): p. 1306-15.
57. Costinean, S., et al., *Pre-B cell proliferation and lymphoblastic leukemia/high-grade lymphoma in E(mu)-miR155 transgenic mice.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(18): p. 7024-9.
58. Cotta, C.V. and C.E. Bueso-Ramos, *New insights into the pathobiology and treatment of chronic myelogenous leukemia.* Ann Diagn Pathol, 2007. **11**(1): p. 68-78.
59. Dai, H., et al., *Distribution of STI-571 to the brain is limited by P-glycoprotein-mediated efflux.* J Pharmacol Exp Ther, 2003. **304**(3): p. 1085-92.
60. Dameshek, W., *Some speculations on the myeloproliferative syndromes.* Blood, 1951. **6**(4): p. 372-5.
61. Danial, N.N., A. Pernis, and P.B. Rothman, *Jak-STAT signaling induced by the v-abl oncogene.* Science, 1995. **269**(5232): p. 1875-7.
62. de Klein, A., et al., *A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia.* Nature, 1982. **300**(5894): p. 765-7.
63. Debernardi, S., et al., *MicroRNA miR-181a correlates with morphological sub-class of acute myeloid leukaemia and the expression of its target genes in global genome-wide analysis.* Leukemia, 2007. **21**(5): p. 912-6.
64. Deininger, M.W., J.M. Goldman, and J.V. Melo, *The molecular biology of chronic myeloid leukemia.* Blood, 2000. **96**(10): p. 3343-56.
65. Deininger, M.W., et al., *Practical management of patients with chronic myeloid leukemia receiving imatinib.* J Clin Oncol, 2003. **21**(8): p. 1637-47.
66. Deininger, M.W., et al., *BCR-ABL tyrosine kinase activity regulates the expression of multiple genes implicated in the pathogenesis of chronic myeloid leukemia.* Cancer Res, 2000. **60**(7): p. 2049-55.
67. Dekmezian, R., et al., *The relevance of reticulin stain-measured fibrosis at diagnosis in chronic myelogenous leukemia.* Cancer, 1987. **59**(10): p. 1739-43.
68. Derderian, P.M., et al., *Chronic myelogenous leukemia in the lymphoid blastic phase: characteristics, treatment response, and prognosis.* Am J Med, 1993. **94**(1): p. 69-74.
69. Dickstein, J.I. and J.W. Vardiman, *Issues in the pathology and diagnosis of the chronic myeloproliferative disorders and the myelodysplastic syndromes.* Am J Clin Pathol, 1993. **99**(4): p. 513-25.
70. Doleshal, M., et al., *Evaluation and validation of total RNA extraction methods for microRNA expression analyses in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues.* J Mol Diagn, 2008. **10**(3): p. 203-11.
71. Druker, B.J., et al., *Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia.* N Engl J Med, 2001. **344**(14): p. 1031-7.
72. Druker, B.J., et al., *Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells.* Nat Med, 1996. **2**(5): p. 561-6.
73. Dubrez, L., et al., *BCR-ABL delays apoptosis upstream of procaspase-3 activation.* Blood, 1998. **91**(7): p. 2415-22.
74. Eis, P.S., et al., *Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(10): p. 3627-32.

75. Fasseu, M., et al., *Identification of restricted subsets of mature microRNA abnormally expressed in inactive colonic mucosa of patients with inflammatory bowel disease.* PLoS One, 2010. **5**(10).
76. Feng, M., et al., *Myc/miR-378/TOB2/cyclin D1 functional module regulates oncogenic transformation.* Oncogene, 2011. **30**(19): p. 2242-51.
77. Ferrao, P.T., et al., *Overexpression of P-glycoprotein in K562 cells does not confer resistance to the growth inhibitory effects of imatinib (STI571) in vitro.* Blood, 2003. **102**(13): p. 4499-503.
78. Flamant, S., et al., *Micro-RNA response to imatinib mesylate in patients with chronic myeloid leukemia.* Haematologica, 2010. **95**(8): p. 1325-33.
79. Frampton, J., T. Ramqvist, and T. Graf, *v-Myb of E26 leukemia virus up-regulates bcl-2 and suppresses apoptosis in myeloid cells.* Genes Dev, 1996. **10**(21): p. 2720-31.
80. Friedman, R.C., et al., *Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs.* Genome Res, 2009. **19**(1): p. 92-105.
81. Fulci, V., et al., *Quantitative technologies establish a novel microRNA profile of chronic lymphocytic leukemia.* Blood, 2007. **109**(11): p. 4944-51.
82. Gale, E., J. Torrance, and T. Bothwell, *The quantitative estimation of total iron stores in human bone marrow.* J Clin Invest, 1963. **42**: p. 1076-82.
83. Gambacorti-Passerini, C., et al., *In reply to 'Cardiotoxicity of the cancer therapeutic agent imatinib mesylate'.* Nat Med, 2007. **13**(1): p. 13-4; author reply 15-6.
84. Garcia-Manero, G., et al., *Chronic myelogenous leukemia: a review and update of therapeutic strategies.* Cancer, 2003. **98**(3): p. 437-57.
85. Garzia, L., et al., *MicroRNA-199b-5p impairs cancer stem cells through negative regulation of HES1 in medulloblastoma.* PLoS One, 2009. **4**(3): p. e4998.
86. Georgii, A., *Histological classification and grading of bone marrow biopsies provides prognostic data at diagnosis in patients with chronic myeloproliferation. .* Haematologica, 1998. **83**: p. 169-174.
87. Georgii, A., et al., *Chronic myeloproliferative disorders in bone marrow biopsies.* Pathol Res Pract, 1990. **186**(1): p. 3-27.
88. Gewirtz, A.M. and B. Calabretta, *A c-MYB antisense oligodeoxynucleotide inhibits normal human hematopoiesis in vitro.* Science, 1988. **242**(4883): p. 1303-6.
89. Giralt, S.A., et al., *Impact of imatinib therapy on the use of allogeneic haematopoietic progenitor cell transplantation for the treatment of chronic myeloid leukaemia.* Br J Haematol, 2007. **137**(5): p. 461-7.
90. Goldman, J.M., *How I treat chronic myeloid leukemia in the imatinib era.* Blood, 2007. **110**(8): p. 2828-37.
91. Goldman, J.M. and D. Marin, *Management decisions in chronic myeloid leukemia.* Semin Hematol, 2003. **40**(1): p. 97-103.
92. Gordon, M.Y., et al., *Altered adhesive interactions with marrow stroma of haematopoietic progenitor cells in chronic myeloid leukaemia.* Nature, 1987. **328**(6128): p. 342-4.
93. Gottardo, F., et al., *Micro-RNA profiling in kidney and bladder cancers.* Urol Oncol, 2007. **25**(5): p. 387-92.
94. Gottwein, E., et al., *A viral microRNA functions as an orthologue of cellular miR-155.* Nature, 2007. **450**(7172): p. 1096-9.
95. Gratwohl, A., et al., *Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia in Europe 2006: transplant activity, long-term data and current results. An analysis by the Chronic Leukemia Working Party of the European Group*

for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). Haematologica, 2006. **91**(4): p. 513-21.

96. Gratwohl, A., et al., *Risk assessment for patients with chronic myeloid leukaemia before allogeneic blood or marrow transplantation. Chronic Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation.* Lancet, 1998. **352**(9134): p. 1087-92.
97. Greither, T., et al., *Elevated expression of microRNAs 155, 203, 210 and 222 in pancreatic tumors is associated with poorer survival.* Int J Cancer, 2010. **126**(1): p. 73-80.
98. Grimson, A., et al., *MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing.* Mol Cell, 2007. **27**(1): p. 91-105.
99. Groffen, J., et al., *Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22.* Cell, 1984. **36**(1): p. 93-9.
100. Guglielmelli, P., et al., *MicroRNA expression profile in granulocytes from primary myelofibrosis patients.* Exp Hematol, 2007. **35**(11): p. 1708-18.
101. Hamada, A., et al., *Interaction of imatinib mesilate with human P-glycoprotein.* J Pharmacol Exp Ther, 2003. **307**(2): p. 824-8.
102. Hasford, J., et al., *A new prognostic score for survival of patients with chronic myeloid leukemia treated with interferon alfa. Writing Committee for the Collaborative CML Prognostic Factors Project Group.* J Natl Cancer Inst, 1998. **90**(11): p. 850-8.
103. Hasserjian, R.P., et al., *ST1571 (imatinib mesylate) reduces bone marrow cellularity and normalizes morphologic features irrespective of cytogenetic response.* Am J Clin Pathol, 2002. **117**(3): p. 360-7.
104. Hatfield, A., S. Owen, and P.R. Pilot, *In reply to 'Cardiotoxicity of the cancer therapeutic agent imatinib mesylate'.* Nat Med, 2007. **13**(1): p. 13; author reply 15-6.
105. He, L., et al., *A microRNA component of the p53 tumour suppressor network.* Nature, 2007. **447**(7148): p. 1130-4.
106. He, L., et al., *A microRNA polycistron as a potential human oncogene.* Nature, 2005. **435**(7043): p. 828-33.
107. Hegedus, T., et al., *Interaction of tyrosine kinase inhibitors with the human multidrug transporter proteins, MDR1 and MRP1.* Biochim Biophys Acta, 2002. **1587**(2-3): p. 318-25.
108. Hehlmann, R., et al., *[Multicenter prospective controlled study of therapy of chronic myeloid leukemia. Comparison of busulfan, hydroxyurea and interferon alpha (April 1990 status)].* Onkologie, 1991. **14**(1): p. 66-73.
109. Heinrich, M.C., et al., *Inhibition of c-kit receptor tyrosine kinase activity by STI 571, a selective tyrosine kinase inhibitor.* Blood, 2000. **96**(3): p. 925-32.
110. Hoefig, K.P., et al., *Unlocking pathology archives for microRNA-profiling.* Anticancer Res, 2008. **28**(1A): p. 119-23.
111. Hu, H., et al., *Antisense oligonucleotide against miR-21 inhibits migration and induces apoptosis in leukemic K562 cells.* Leuk Lymphoma, 2010. **51**(4): p. 694-701.
112. Huang, S., et al., *Upregulation of miR-23a approximately 27a approximately 24 decreases transforming growth factor-beta-induced tumor-suppressive activities in human hepatocellular carcinoma cells.* Int J Cancer, 2008. **123**(4): p. 972-8.
113. Huber, H.e.a., *Diagnostische Hämatologie. Laboratoriumsdiagnose hämatologischer Erkrankungen*. 1992, Springer: Berlin-Heidelberg. p. 284-334.

114. Hughes, T.P., et al., *Frequency of major molecular responses to imatinib or interferon alfa plus cytarabine in newly diagnosed chronic myeloid leukemia.* N Engl J Med, 2003. **349**(15): p. 1423-32.
115. Hui, A.B., et al., *Comprehensive MicroRNA profiling for head and neck squamous cell carcinomas.* Clin Cancer Res, 2010. **16**(4): p. 1129-39.
116. Hussein, K., et al., *Expression of myelopoiesis-associated microRNA in bone marrow cells of atypical chronic myeloid leukaemia and chronic myelomonocytic leukaemia.* Ann Hematol, 2010.
117. Hussein, K., et al., *Megakaryocytic expression of MicroRNA 10a, 17-5p, 20a and 126 in Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasm.* Ann Hematol, 2009. **88**(4): p. 325-32.
118. Hussein, K., et al., *Aberrant microRNA expression pattern in myelodysplastic bone marrow cells.* Leuk Res, 2010. **34**(9): p. 1169-74.
119. Ikematsu, N., et al., *TOB2, a novel anti-proliferative Tob/BTG1 family member, associates with a component of the CCR4 transcriptional regulatory complex capable of binding cyclin-dependent kinases.* Oncogene, 1999. **18**(52): p. 7432-41.
120. Ilaria, R.L., Jr. and R.A. Van Etten, *P210 and P190(BCR/ABL) induce the tyrosine phosphorylation and DNA binding activity of multiple specific STAT family members.* J Biol Chem, 1996. **271**(49): p. 31704-10.
121. Iorio, M.V. and C.M. Croce, *MicroRNAs in Cancer: Small Molecules With a Huge Impact.* Journal of Clinical Oncology, 2009. **27**(34): p. 5848-5856.
122. Jacknow, G., et al., *Extramedullary presentation of the blast crisis of chronic myelogenous leukaemia.* Br J Haematol, 1985. **61**(2): p. 225-36.
123. Jackson, R.J. and N. Standart, *How do microRNAs regulate gene expression?* Sci STKE, 2007. **2007**(367): p. re1.
124. James, C., et al., *A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera.* Nature, 2005. **434**(7037): p. 1144-8.
125. Jemal, A., et al., *Cancer statistics, 2004.* CA Cancer J Clin, 2004. **54**(1): p. 8-29.
126. Johansson, P., et al., *Trends in the incidence of chronic Philadelphia chromosome negative (Ph-) myeloproliferative disorders in the city of Goteborg, Sweden, during 1983-99.* J Intern Med, 2004. **256**(2): p. 161-5.
127. Johnson, S.M., et al., *RAS is regulated by the let-7 microRNA family.* Cell, 2005. **120**(5): p. 635-47.
128. Jones, A.V., et al., *Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders.* Blood, 2005. **106**(6): p. 2162-8.
129. Joyce, C.E., et al., *Deep sequencing of small RNAs from human skin reveals major alterations in the psoriasis MicroRNAome.* Hum Mol Genet, 2011. **20**(20): p. 4025-40.
130. Kaeda, J., A. Chase, and J.M. Goldman, *Cytogenetic and molecular monitoring of residual disease in chronic myeloid leukaemia.* Acta Haematol, 2002. **107**(2): p. 64-75.
131. Kang, H.Y., et al., *Comparison of allele specific oligonucleotide-polymerase chain reaction and direct sequencing for high throughput screening of ABL kinase domain mutations in chronic myeloid leukemia resistant to imatinib.* Haematologica, 2006. **91**(5): p. 659-62.
132. Kantarjian, H., et al., *Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia.* N Engl J Med, 2002. **346**(9): p. 645-52.
133. Kantarjian, H., et al., *High-dose imatinib mesylate therapy in newly diagnosed Philadelphia chromosome-positive chronic phase chronic myeloid leukemia.* Blood, 2004. **103**(8): p. 2873-8.

134. Kantarjian, H.M., et al., *Imatinib mesylate (STI571) therapy for Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia in blast phase.* Blood, 2002. **99**(10): p. 3547-53.
135. Kantarjian, H.M., et al., *Chronic myelogenous leukemia: a concise update.* Blood, 1993. **82**(3): p. 691-703.
136. Kantarjian, H.M., et al., *Characteristics of accelerated disease in chronic myelogenous leukemia.* Cancer, 1988. **61**(7): p. 1441-6.
137. Kantarjian, H.M., et al., *Significance and correlations of molecular analysis results in patients with Philadelphia chromosome-negative chronic myelogenous leukemia and chronic myelomonocytic leukemia.* Am J Med, 1988. **85**(5): p. 639-44.
138. Kerkela, R., et al., *Cardiotoxicity of the cancer therapeutic agent imatinib mesylate.* Nat Med, 2006. **12**(8): p. 908-16.
139. Khalidi, H.S., et al., *The immunophenotype of blast transformation of chronic myelogenous leukemia: a high frequency of mixed lineage phenotype in "lymphoid" blasts and A comparison of morphologic, immunophenotypic, and molecular findings.* Mod Pathol, 1998. **11**(12): p. 1211-21.
140. Khorashad, J.S., et al., *The presence of a BCR-ABL mutant allele in CML does not always explain clinical resistance to imatinib.* Leukemia, 2006. **20**(4): p. 658-63.
141. Kitajima, K., et al., *A role of jumonji gene in proliferation but not differentiation of megakaryocyte lineage cells.* Exp Hematol, 2001. **29**(4): p. 507-14.
142. Kitajima, K., et al., *Definitive but not primitive hematopoiesis is impaired in jumonji mutant mice.* Blood, 1999. **93**(1): p. 87-95.
143. Klion, A.D., et al., *Molecular remission and reversal of myelofibrosis in response to imatinib mesylate treatment in patients with the myeloproliferative variant of hypereosinophilic syndrome.* Blood, 2004. **103**(2): p. 473-8.
144. Kluin-Nelemans, H.C., et al., *Randomized comparison of low-dose versus high-dose interferon-alfa in chronic myeloid leukemia: prospective collaboration of 3 joint trials by the MRC and HOVON groups.* Blood, 2004. **103**(12): p. 4408-15.
145. Kluiver, J., et al., *BIC and miR-155 are highly expressed in Hodgkin, primary mediastinal and diffuse large B cell lymphomas.* J Pathol, 2005. **207**(2): p. 243-9.
146. Kong, K.Y., et al., *MIR-23A microRNA cluster inhibits B-cell development.* Exp Hematol, 2010. **38**(8): p. 629-640 e1.
147. Kralovics, R., et al., *A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders.* N Engl J Med, 2005. **352**(17): p. 1779-90.
148. Kurzrock, R., et al., *Rearrangement in the breakpoint cluster region and the clinical course in Philadelphia-negative chronic myelogenous leukemia.* Ann Intern Med, 1986. **105**(5): p. 673-9.
149. Kvasnicka, H.M., et al., *Bone marrow features improve prognostic efficiency in multivariate risk classification of chronic-phase Ph(1+) chronic myelogenous leukemia: a multicenter trial.* J Clin Oncol, 2001. **19**(12): p. 2994-3009.
150. Landgraf, P., et al., *A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing.* Cell, 2007. **129**(7): p. 1401-14.
151. Lange, T., D.W. Niederwieser, and M.W. Deininger, *Residual disease in chronic myeloid leukemia after induction of molecular remission.* N Engl J Med, 2003. **349**(15): p. 1483-4.
152. Lawrie, C.H., et al., *Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma.* Br J Haematol, 2008. **141**(5): p. 672-5.
153. le Coutre, P., et al., *Induction of resistance to the Abelson inhibitor STI571 in human leukemic cells through gene amplification.* Blood, 2000. **95**(5): p. 1758-66.

154. Lee, C.H., et al., *MicroRNA profiling of BRCA1/2 mutation-carrying and non-mutation-carrying high-grade serous carcinomas of ovary.* PLoS One, 2009. **4**(10): p. e7314.
155. Lee, D.Y., et al., *MicroRNA-378 promotes cell survival, tumor growth, and angiogenesis by targeting SuFu and Fus-1 expression.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(51): p. 20350-5.
156. Levine, R.L., et al., *Role of JAK2 in the pathogenesis and therapy of myeloproliferative disorders.* Nat Rev Cancer, 2007. **7**(9): p. 673-83.
157. Levine, R.L., et al., *Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis.* Cancer Cell, 2005. **7**(4): p. 387-97.
158. Lewis, B.P., C.B. Burge, and D.P. Bartel, *Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets.* Cell, 2005. **120**(1): p. 15-20.
159. Li, L., X.P. Chen, and Y.J. Li, *MicroRNA-146a and human disease.* Scand J Immunol, 2010. **71**(4): p. 227-31.
160. Lidonnici, M.R., et al., *Requirement of c-MYB for p210(BCR/ABL)-dependent transformation of hematopoietic progenitors and leukemogenesis.* Blood, 2008. **111**(9): p. 4771-9.
161. Lin, Y.C., et al., *c-MYB is an evolutionary conserved miR-150 target and miR-150/c-MYB interaction is important for embryonic development.* Mol Biol Evol, 2008. **25**(10): p. 2189-98.
162. Livak, K.J., et al., *Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization.* PCR Methods Appl, 1995. **4**(6): p. 357-62.
163. Lorand-Metze, I., J. Vassallo, and C.A. Souza, *Histological and cytological heterogeneity of bone marrow in Philadelphia-positive chronic myelogenous leukaemia at diagnosis.* Br J Haematol, 1987. **67**(1): p. 45-9.
164. Lu, J., et al., *MicroRNA expression profiles classify human cancers.* Nature, 2005. **435**(7043): p. 834-8.
165. Lugli, A., et al., *Proposal of a morphologic bone marrow response score for imatinib mesylate treatment in chronic myelogenous leukemia.* Hum Pathol, 2005. **36**(1): p. 91-100.
166. Lutwyche, J.K., et al., *Mutation screening of the c-MYB negative regulatory domain in acute and chronic myeloid leukaemia.* Br J Haematol, 2001. **114**(3): p. 632-4.
167. Lv, M., et al., *An oncogenic role of miR-142-3p in human T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) by targeting glucocorticoid receptor-alpha and cAMP/PKA pathways.* Leukemia, 2011.
168. Machova Polakova, K., et al., *Expression patterns of microRNAs associated with CML phases and their disease related targets.* Mol Cancer, 2011. **10**(1): p. 41.
169. Mahon, F.X., et al., *MDR1 gene overexpression confers resistance to imatinib mesylate in leukemia cell line models.* Blood, 2003. **101**(6): p. 2368-73.
170. Mahon, F.X., et al., *Selection and characterization of BCR-ABL positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor STI571: diverse mechanisms of resistance.* Blood, 2000. **96**(3): p. 1070-9.
171. Maniataki, E. and Z. Mourelatos, *A human, ATP-independent, RISC assembly machine fueled by pre-MicroRNA.* Genes Dev, 2005. **19**(24): p. 2979-90.
172. Marin, D., et al., *The use of imatinib (STI571) in chronic myelod leukemia: some practical considerations.* Haematologica, 2002. **87**(9): p. 979-88.

173. Marin, D., et al., *Granulocyte colony-stimulating factor reverses cytopenia and may permit cytogenetic responses in patients with chronic myeloid leukemia treated with imatinib mesylate.* Haematologica, 2003. **88**(2): p. 227-9.
174. Martiat, P., J.L. Michaux, and J. Rodhain, *Philadelphia-negative (Ph-) chronic myeloid leukemia (CML): comparison with Ph+ CML and chronic myelomonocytic leukemia. The Groupe Francais de Cytogenetique Hematologique.* Blood, 1991. **78**(1): p. 205-11.
175. Mascaux, C., et al., *Evolution of microRNA expression during human bronchial squamous carcinogenesis.* Eur Respir J, 2009. **33**(2): p. 352-9.
176. Mauro, M.J., B.J. Druker, and R.T. Maziarz, *Divergent clinical outcome in two CML patients who discontinued imatinib therapy after achieving a molecular remission.* Leuk Res, 2004. **28 Suppl 1**: p. S71-3.
177. Mayerhofer, M., et al., *Identification of heme oxygenase-1 as a novel BCR/ABL-dependent survival factor in chronic myeloid leukemia.* Cancer Res, 2004. **64**(9): p. 3148-54.
178. McNamara, C., et al., *Morphological effects of imatinib mesylate (STI571) on the bone marrow and blood of patients with Philadelphia chromosome (Ph) positive chronic myeloid leukaemia.* Clin Lab Haematol, 2003. **25**(2): p. 119-25.
179. Melo, J.V., *The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype.* Blood, 1996. **88**(7): p. 2375-84.
180. Melo, J.V. and D.J. Barnes, *Chronic myeloid leukaemia as a model of disease evolution in human cancer.* Nat Rev Cancer, 2007. **7**(6): p. 441-53.
181. Melo, J.V., et al., *P190BCR-ABL chronic myeloid leukaemia: the missing link with chronic myelomonocytic leukaemia?* Leukemia, 1994. **8**(1): p. 208-11.
182. Melotti, P., D.H. Ku, and B. Calabretta, *Regulation of the expression of the hematopoietic stem cell antigen CD34: role of c-MYB.* J Exp Med, 1994. **179**(3): p. 1023-8.
183. Merkerova, M., M. Belickova, and H. Bruchova, *Differential expression of microRNAs in hematopoietic cell lineages.* Eur J Haematol, 2008. **81**(4): p. 304-10.
184. Merx, K., et al., *Early reduction of BCR-ABL mRNA transcript levels predicts cytogenetic response in chronic phase CML patients treated with imatinib after failure of interferon alpha.* Leukemia, 2002. **16**(9): p. 1579-83.
185. Miyazaki, T., et al., *Expression of heme oxygenase-1 in human leukemic cells and its regulation by transcriptional repressor BACH1.* Cancer Sci, 2010. **101**(6): p. 1409-16.
186. Molldrem, J.J., et al., *Evidence that specific T lymphocytes may participate in the elimination of chronic myelogenous leukemia.* Nat Med, 2000. **6**(9): p. 1018-23.
187. Motoyama, J., et al., *Organogenesis of the liver, thymus and spleen is affected in jumonji mutant mice.* Mech Dev, 1997. **66**(1-2): p. 27-37.
188. Mucenski, M.L., et al., *A functional c-MYB gene is required for normal murine fetal hepatic hematopoiesis.* Cell, 1991. **65**(4): p. 677-89.
189. Muehleck, S.D., et al., *Transformation of chronic myelogenous leukemia: clinical, morphologic, and cytogenetic features.* Am J Clin Pathol, 1984. **82**(1): p. 1-14.
190. Muller, M.C., et al., *Dynamics of BCR-ABL mRNA expression in first-line therapy of chronic myelogenous leukemia patients with imatinib or interferon alpha/ara-C.* Leukemia, 2003. **17**(12): p. 2392-400.
191. Nair, C., et al., *Immunophenotype and ultrastructural studies in blast crisis of chronic myeloid leukemia.* Leuk Lymphoma, 1995. **19**(3-4): p. 309-13.
192. Nowell, P.C.e.a., *A minutre chromosome in human chronic granulocytic leukemia.* Science, 1960. **1**(132): p. 1497-1500.

193. Nymark, P., et al., *Integrative analysis of microRNA, mRNA and aCGH data reveals asbestos- and histology-related changes in lung cancer.* Genes Chromosomes Cancer, 2011. **50**(8): p. 585-97.
194. O'Brien, S.G., et al., *Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia.* N Engl J Med, 2003. **348**(11): p. 994-1004.
195. O'Connell, R.M., et al., *Sustained expression of microRNA-155 in hematopoietic stem cells causes a myeloproliferative disorder.* J Exp Med, 2008. **205**(3): p. 585-94.
196. O'Connell, R.M., et al., *MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(5): p. 1604-9.
197. O'Hare, T., C.A. Eide, and M.W. Deininger, *Bcr-Abl kinase domain mutations, drug resistance, and the road to a cure for chronic myeloid leukemia.* Blood, 2007. **110**(7): p. 2242-9.
198. Oda, T., et al., *Crkl is the major tyrosine-phosphorylated protein in neutrophils from patients with chronic myelogenous leukemia.* J Biol Chem, 1994. **269**(37): p. 22925-8.
199. Ohira, M., et al., *Characterization of a human homolog (BACH1) of the mouse BACH1 gene encoding a BTB-basic leucine zipper transcription factor and its mapping to chromosome 21q22.1.* Genomics, 1998. **47**(2): p. 300-6.
200. Okada, Y., et al., *Upstream stimulatory factors stimulate transcription through E-box motifs in the PF4 gene in megakaryocytes.* Blood, 2004. **104**(7): p. 2027-34.
201. Okun, D.B. and K.R. Tanaka, *Leukocyte alkaline phosphatase.* Am J Hematol, 1978. **4**(3): p. 293-9.
202. Orazi, A., et al., *CD34 immunostaining of bone marrow biopsy specimens is a reliable way to classify the phases of chronic myeloid leukemia.* Am J Clin Pathol, 1994. **101**(4): p. 426-8.
203. Oyake, T., et al., *Bach proteins belong to a novel family of BTB-basic leucine zipper transcription factors that interact with MafK and regulate transcription through the NF-E2 site.* Mol Cell Biol, 1996. **16**(11): p. 6083-95.
204. Pacifico, F., et al., *Nuclear factor-{kappa}B contributes to anaplastic thyroid carcinomas through up-regulation of miR-146a.* J Clin Endocrinol Metab, 2010. **95**(3): p. 1421-30.
205. Palmieri, A., et al., *Titanium acts on osteoblast translational process.* J Oral Implantol, 2008. **34**(4): p. 190-5.
206. Pane, F., et al., *Neutrophilic-chronic myeloid leukemia: a distinct disease with a specific molecular marker (BCR/ABL with C3/A2 junction).* Blood, 1996. **88**(7): p. 2410-4.
207. Patel, B.B., A.N. Mohamed, and C.A. Schiffer, *"Acute myelogenous leukemia like" translocations in CML blast crisis: two new cases of inv(16)/t(16;16) and a review of the literature.* Leuk Res, 2006. **30**(2): p. 225-32.
208. Pelicci, G., et al., *Constitutive phosphorylation of Shc proteins in human tumors.* Oncogene, 1995. **11**(5): p. 899-907.
209. Pendergast, A.M., et al., *BCR-ABL-induced oncogenesis is mediated by direct interaction with the SH2 domain of the GRB-2 adaptor protein.* Cell, 1993. **75**(1): p. 175-85.
210. Perske, C., et al., *Loss of inducible nitric oxide synthase expression in the mouse renal cell carcinoma cell line RENCA is mediated by microRNA miR-146a.* Am J Pathol, 2010. **177**(4): p. 2046-54.

211. Peterson, L.C., C.D. Bloomfield, and R.D. Brunning, *Blast crisis as an initial or terminal manifestation of chronic myeloid leukemia. A study of 28 patients.* Am J Med, 1976. **60**(2): p. 209-20.
212. Philippidou, D., et al., *Signatures of microRNAs and selected microRNA target genes in human melanoma.* Cancer Res, 2010. **70**(10): p. 4163-73.
213. Pilot, P.R., et al., *Epidemiological analysis of second primary malignancies in more than 9500 patients treated with imatinib.* Leukemia, 2006. **20**(1): p. 148; author reply 149.
214. Puil, L., et al., *Bcr-Abl oncoproteins bind directly to activators of the Ras signalling pathway.* EMBO J, 1994. **13**(4): p. 764-73.
215. Pye, S.M., et al., *The effects of imatinib on pregnancy outcome.* Blood, 2008. **111**(12): p. 5505-8.
216. Rajewsky, N., *microRNA target predictions in animals.* Nat Genet, 2006. **38 Suppl**: p. S8-13.
217. Ratajczak, M.Z., et al., *Acute- and chronic-phase chronic myelogenous leukemia colony-forming units are highly sensitive to the growth inhibitory effects of c-MYB antisense oligodeoxynucleotides.* Blood, 1992. **79**(8): p. 1956-61.
218. Ratajczak, M.Z., et al., *Myb and ets proteins are candidate regulators of c-kit expression in human hematopoietic cells.* Blood, 1998. **91**(6): p. 1934-46.
219. Redaelli, A., et al., *Clinical and epidemiologic burden of chronic myelogenous leukemia.* Expert Rev Anticancer Ther, 2004. **4**(1): p. 85-96.
220. Roche-Lestienne, C., et al., *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, 2002. **100**(3): p. 1014-8.
221. Rodriguez, A., et al., *Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function.* Science, 2007. **316**(5824): p. 608-11.
222. Ronaghi, M., *Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing.* Genome Res, 2001. **11**(1): p. 3-11.
223. Rousselot, P., et al., *Imatinib mesylate discontinuation in patients with chronic myelogenous leukemia in complete molecular remission for more than 2 years.* Blood, 2007. **109**(1): p. 58-60.
224. Rowley, J.D., *Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining.* Nature, 1973. **243**(5405): p. 290-3.
225. Roy, L., et al., *Unexpected occurrence of second malignancies in patients treated with interferon followed by imatinib mesylate for chronic myelogenous leukemia.* Leukemia, 2005. **19**(9): p. 1689-92.
226. Saglio, G., et al., *Consistent amounts of acute leukemia-associated P190BCR/ABL transcripts are expressed by chronic myelogenous leukemia patients at diagnosis.* Blood, 1996. **87**(3): p. 1075-80.
227. Saikia, T., et al., *Characterisation of blast cells during blastic phase of chronic myeloid leukaemia by immunophenotyping--experience in 60 patients.* Leuk Res, 1988. **12**(6): p. 499-506.
228. San Jose-Eneriz, E., et al., *MicroRNA expression profiling in Imatinib-resistant Chronic Myeloid Leukemia patients without clinically significant ABL1-mutations.* Mol Cancer, 2009. **8**: p. 69.
229. Sanchez-Garcia, I. and D. Martin-Zanca, *Regulation of Bcl-2 gene expression by BCR-ABL is mediated by Ras.* J Mol Biol, 1997. **267**(2): p. 225-8.

230. Sattler, M., et al., *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, 1996. **12**(4): p. 839-46.
231. Savage, D.G., et al., *Bone marrow transplantation for chronic myeloid leukaemia: the effects of differing criteria for defining chronic phase on probabilities of survival and relapse.* Br J Haematol, 1997. **99**(1): p. 30-5.
232. Savage, D.G., R.M. Szydlo, and J.M. Goldman, *Clinical features at diagnosis in 430 patients with chronic myeloid leukaemia seen at a referral centre over a 16-year period.* Br J Haematol, 1997. **96**(1): p. 111-6.
233. Sawyers, C.L., W. Callahan, and O.N. Witte, *Dominant negative MYC blocks transformation by ABL oncogenes.* Cell, 1992. **70**(6): p. 901-10.
234. Sawyers, C.L., et al., *Imatinib induces hematologic and cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in myeloid blast crisis: results of a phase II study.* Blood, 2002. **99**(10): p. 3530-9.
235. Sears, D.A., *History of the treatment of chronic myelocytic leukemia.* Am J Med Sci, 1988. **296**(2): p. 85-6.
236. Skorski, T., et al., *Phosphatidylinositol-3 kinase activity is regulated by BCR/ABL and is required for the growth of Philadelphia chromosome-positive cells.* Blood, 1995. **86**(2): p. 726-36.
237. Sokal, J.E., et al., *Prognostic discrimination in "good-risk" chronic granulocytic leukemia.* Blood, 1984. **63**(4): p. 789-99.
238. Sokal, J.E. and K.A. Sheerin, *Decreased stainable marrow iron in chronic granulocytic leukemia.* Am J Med, 1986. **81**(3): p. 395-9.
239. Spiers, A.S., B.J. Bain, and J.E. Turner, *The peripheral blood in chronic granulocytic leukaemia. Study of 50 untreated Philadelphia-positive cases.* Scand J Haematol, 1977. **18**(1): p. 25-38.
240. Sturn, A., J. Quackenbush, and Z. Trajanoski, *Genesis: cluster analysis of microarray data.* Bioinformatics, 2002. **18**(1): p. 207-8.
241. Swerdlow, S.H.e.a., *WHO Classification of Tumors of Haematopoetic and Lymphoid Tissues*. 4th ed. 2008: WHO.
242. Taganov, K.D., et al., *NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(33): p. 12481-6.
243. Takeuchi, T., et al., *Gene trap capture of a novel mouse gene, jumonji, required for neural tube formation.* Genes Dev, 1995. **9**(10): p. 1211-22.
244. Talpaz, M., et al., *Imatinib induces durable hematologic and cytogenetic responses in patients with accelerated phase chronic myeloid leukemia: results of a phase 2 study.* Blood, 2002. **99**(6): p. 1928-37.
245. Tefferi, A., et al., *Proposals and rationale for revision of the World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia, and primary myelofibrosis: recommendations from an ad hoc international expert panel.* Blood, 2007. **110**(4): p. 1092-7.
246. Thai, T.H., et al., *Regulation of the germinal center response by microRNA-155.* Science, 2007. **316**(5824): p. 604-8.
247. Thiele, J., et al., *European consensus on grading bone marrow fibrosis and assessment of cellularity.* Haematologica, 2005. **90**(8): p. 1128-32.
248. Thiele, J., H.M. Kvasnicka, and R. Fischer, *Bone marrow histopathology in chronic myelogenous leukemia (CML)--evaluation of distinctive features with clinical impact.* Histol Histopathol, 1999. **14**(4): p. 1241-56.

249. Thiele, J., et al., *Essential thrombocythemia versus early primary myelofibrosis: a multicenter study to validate the WHO classification.* Blood, 2011. **117**(21): p. 5710-8.
250. Thiele, J., H.M. Kvasnicka, and A. Orazi, *Bone marrow histopathology in myeloproliferative disorders--current diagnostic approach.* Semin Hematol, 2005. **42**(4): p. 184-95.
251. Thiele, J., et al., *Effects of the tyrosine kinase inhibitor imatinib mesylate (STI571) on bone marrow features in patients with chronic myelogenous leukemia.* Histol Histopathol, 2004. **19**(4): p. 1277-88.
252. Thiele, J., et al., *Bone marrow changes in chronic myelogenous leukaemia after long-term treatment with the tyrosine kinase inhibitor STI571: an immunohistochemical study on 75 patients.* Histopathology, 2005. **46**(5): p. 540-50.
253. Thiele, J., et al., *Bone marrow features and clinical findings in chronic myeloid leukemia--a comparative, multicenter, immunohistological and morphometric study on 614 patients.* Leuk Lymphoma, 2000. **36**(3-4): p. 295-308.
254. Thiele, J., H.M. Kvasnicka, and J. Vardiman, *Bone marrow histopathology in the diagnosis of chronic myeloproliferative disorders: a forgotten pearl.* Best Pract Res Clin Haematol, 2006. **19**(3): p. 413-37.
255. Thiele, J., et al., *Detection of the bcr/abl gene in bone marrow macrophages in CML and alterations during interferon therapy--a fluorescence in situ hybridization study on trephine biopsies.* J Pathol, 1998. **186**(3): p. 331-5.
256. Thomas, M.D., et al., *c-MYB is critical for B cell development and maintenance of follicular B cells.* Immunity, 2005. **23**(3): p. 275-86.
257. Tsitsiou, E. and M.A. Lindsay, *microRNAs and the immune response.* Curr Opin Pharmacol, 2009. **9**(4): p. 514-20.
258. Tuveson, D.A., et al., *STI571 inactivation of the gastrointestinal stromal tumor c-KIT oncoprotein: biological and clinical implications.* Oncogene, 2001. **20**(36): p. 5054-8.
259. Uemura, N. and J.D. Griffin, *The adapter protein Crkl links Cbl to C3G after integrin ligation and enhances cell migration.* J Biol Chem, 1999. **274**(53): p. 37525-32.
260. Urbich, C., A. Kuehbacher, and S. Dimmeler, *Role of microRNAs in vascular diseases, inflammation, and angiogenesis.* Cardiovasc Res, 2008. **79**(4): p. 581-8.
261. Valencia-Sanchez, M.A., et al., *Control of translation and mRNA degradation by MicroRNAs and siRNAs.* Genes Dev, 2006. **20**(5): p. 515-24.
262. Valiron, O., et al., *Immunophenotype of blast cells in chronic myeloid leukemia.* Leuk Res, 1988. **12**(10): p. 861-72.
263. van der Plas, D.C., et al., *Cytogenetic and molecular analysis in Philadelphia negative CML.* Blood, 1989. **73**(4): p. 1038-44.
264. van Rhee, F., et al., *p190 BCR-ABL mRNA is expressed at low levels in p210-positive chronic myeloid and acute lymphoblastic leukemias.* Blood, 1996. **87**(12): p. 5213-7.
265. Venturini, L., et al., *Expression of the miR-17-92 polycistron in chronic myeloid leukemia (CML) CD34+ cells.* Blood, 2007. **109**(10): p. 4399-405.
266. Verfaillie, C.M., et al., *Integrin-mediated regulation of hematopoiesis: do BCR/ABL-induced defects in integrin function underlie the abnormal circulation and proliferation of CML progenitors?* Acta Haematol, 1997. **97**(1-2): p. 40-52.
267. Virchow, R., *Weisses Blut.* Forieps Notizen, 1845. **36**: p. 151-156.
268. Visone, R., et al., *Karyotype-specific microRNA signature in chronic lymphocytic leukemia.* Blood, 2009. **114**(18): p. 3872-9.

269. Voorhoeve, P.M., et al., *A genetic screen implicates MicroRNA-372 and MicroRNA-373 as oncogenes in testicular germ cell tumors.* Cell, 2006. **124**(6): p. 1169-81.
270. Votavova, H., et al., *Differential expression of microRNAs in CD34+ cells of 5q-syndrome.* J Hematol Oncol, 2011. **4**: p. 1.
271. Warnatz, H.J., et al., *The BTB and CNC homology 1 (BACH1) target genes are involved in the oxidative stress response and in control of the cell cycle.* J Biol Chem, 2011. **286**(26): p. 23521-32.
272. Watanabe, A., et al., *The role of microRNA-150 as a tumor suppressor in malignant lymphoma.* Leukemia, 2011.
273. Weisberg, E. and J.D. Griffin, *Mechanism of resistance to the ABL tyrosine kinase inhibitor STI571 in BCR/ABL-transformed hematopoietic cell lines.* Blood, 2000. **95**(11): p. 3498-505.
274. Werner, M., et al., *Evidence from molecular genetic and cytogenetic analyses that bone marrow histopathology is reliable in the diagnosis of chronic myeloproliferative disorders.* Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol, 1993. **63**(4): p. 199-204.
275. Widmer, N., et al., *Functional consequence of MDR1 expression on imatinib intracellular concentrations.* Blood, 2003. **102**(3): p. 1142.
276. Wiedemann, L.M., et al., *The correlation of breakpoint cluster region rearrangement and p210 phl/abl expression with morphological analysis of Ph-negative chronic myeloid leukemia and other myeloproliferative diseases.* Blood, 1988. **71**(2): p. 349-55.
277. Wightman, B., I. Ha, and G. Ruvkun, *Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in C. elegans.* Cell, 1993. **75**(5): p. 855-62.
278. Wu, Y., et al., *Coexistence of inversion 16 and the Philadelphia chromosome in acute and chronic myeloid leukemias : report of six cases and review of literature.* Am J Clin Pathol, 2006. **125**(2): p. 260-6.
279. Xi, Y., et al., *Systematic analysis of microRNA expression of RNA extracted from fresh frozen and formalin-fixed paraffin-embedded samples.* RNA, 2007. **13**(10): p. 1668-74.
280. Xiao, C., et al., *MiR-150 controls B cell differentiation by targeting the transcription factor c-MYB.* Cell, 2007. **131**(1): p. 146-59.
281. Xu, Y., M.M. Dolan, and P.L. Nguyen, *Diagnostic significance of detecting dysgranulopoiesis in chronic myeloid leukemia.* Am J Clin Pathol, 2003. **120**(5): p. 778-84.
282. Yao, Y., et al., *MicroRNA profiling of human gastric cancer.* Mol Med Report, 2009. **2**(6): p. 963-70.
283. Zhang, H., et al., *MicroRNA patterns associated with clinical prognostic parameters and CNS relapse prediction in pediatric acute leukemia.* PLoS One, 2009. **4**(11): p. e7826.
284. Zhao, J.J., et al., *microRNA expression profile and identification of miR-29 as a prognostic marker and pathogenetic factor by targeting CDK6 in mantle cell lymphoma.* Blood, 2010. **115**(13): p. 2630-9.
285. Zhou, B., et al., *miR-150, a microRNA expressed in mature B and T cells, blocks early B cell development when expressed prematurely.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(17): p. 7080-5.
286. Zimmermann, J.e.a., *Phenylamino-pyrimidine (PAP)-derivatives: a new class of potent and highly selective PDGF-recep- tor autophosphorylation inhibitors.* Bioorg Med Chem Lett., 1996. **6**: p. 1221-1226.

287. Zimmermann, J.e.a., *Potent and selective inhibitors of the Abl kinase - phenylamino-pyrimidine (PAP) de- rivatives.* Bioorg Med Chem Lett., 1997. **7**: p. 187-192.

10. Danksagung

Zunächst gilt mein Dank meinen Eltern, die mir im Angesicht aller Widrigkeiten eine wundervolle Kindheit und eine hervorragende Ausbildung ermöglicht haben - meiner Mutter, der ich vom Beginn dieser Arbeit noch erzählen konnte und meinem Vater, dem ich seither zuviel davon erzähle.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. Alfred C. Feller für die Möglichkeit, diese Promotion am Institut für Pathologie der Universität zu Lübeck anfertigen zu können. Ohne die exzellenten Arbeitsbedingungen vor Ort wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Bei Herrn Prof. Dr. Hartmut Merz möchte ich mich in besonderem Maße für die Überlassung des Themas und seine unerschöpfliche Geduld und Hilfestellung bedanken. Zu jeder Zeit sind mir sein Interesse wie auch sein persönliches Engagement Inspiration gewesen und sind es noch. Seine warmherzige, freundliche Betreuung und Unterstützung waren ein sicherer Rückhalt im Entstehungsprozess dieser Arbeit.

Bei Frau Dr. Veronica Bernard möchte ich mich für die Hilfe im Zusammenhang mit den molekulargenetischen Methoden in dieser Arbeit sowie ihre freundliche Bereitschaft zur Diskussion von unzähligen Ideen und Ergebnissen bedanken.

Zu besonderem Dank bin ich ebenfalls den MTAs des Molekular-Labors Biggi Steinfeldt und Tanja Oeltermann verpflichtet, auf deren Unterstützung ich mich immer verlassen konnte.

Frau Silke Szymczak und Herr Jochen Kruppa aus dem Institut für Biometrie und Statistik waren mir eine große Hilfe bei der statistischen Aufarbeitung meiner Daten, wofür ich ihnen zu Dank verpflichtet bin.

Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei den Mitarbeitern/innen des Labors für hämatologische Diagnostik des Instituts für Pathologie in Lübeck für die Anfertigung zahlloser immunhistochemischer Färbungen.

Abschließend möchte ich mich in ganz besonderem Maße bei meiner Frau Judith und meinen Kindern Emil und Justus bedanken. Ohne ihren Rückhalt, ihre Unterstützung und ihre bedingungslose Liebe wäre diese Arbeit nie entstanden. Ihre Zuneigung und ihr Vertrauen sind es, die mich im Angesicht aller Unwegbarkeiten stets aufs Neue antreiben.

Danke

11. Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Name:	Niklas Gebauer
Geburtstag:	10.02.1987
Geburtsort:	Göttingen
Anschrift:	Erich-Klann-Straße 22 23560 Lübeck
Familienstand:	verheiratet mit cand. med. Judith Gebauer, geb. Gahr
Kinder:	Emil Jakob Gebauer, geboren am 17.08.2008 und Justus Henri Gebauer, geboren am 10.08.2011
Staatsangehörigkeit:	Deutsch/Schwedisch

Schulausbildung:

1993-97	Haarentorschule in Oldenburg
1997-99	Orientierungsstufe Eversten in Oldenburg
1999-2006	Gymnasium Eversten in Oldenburg
2006	Abitur (Durchschnittsnote 1,4)

Studium:

Seit 2006	Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck
2008	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Note: - gut -
2010	Beginn der experimentellen Arbeiten zur hier vorgelegten Dissertation
2010-11	Tätigkeit als studentische Hilfskraft am Institut für Pathologie der Universität Lübeck
2011-12	Praktisches Jahr am Institut für Pathologie des UKSH Campus Lübeck, den Inneren Kliniken des UKSH Campus Lübeck und der Chirurgie der Sana Klinik Eutin
2012	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Note: - sehr gut – Abschluss der experimentellen Arbeiten zur hier vorgelegten Dissertation
Seit Januar 2013	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pathologie der Universität Lübeck

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

MicroRNA expression and *JAK2* allele burden in bone marrow trephine biopsies of PV, ET and early PMF
Niklas Gebauer, Veronica Bernard, Wolfgang Gebauer, Alfred C. Feller, Hartmut Merz
Acta Haematologica 2013;129:251-256 (DOI: 10.1159/000345848)

MicroRNA expression correlated with morphological findings in chronic myeloid leukemia undergoing treatment with Imatinib mesylate.
Niklas Gebauer, Veronica Bernard, Wolfgang Gebauer, Alfred C. Feller, Hartmut Merz
Acta Haematologica 2014;131:11-15 (DOI: 10.1159/000353391)

12. Erklärung

Gemäß §9 Abs. 1 der Promotionsordnung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne fremde Hilfe im Institut für Pathologie unter Betreuung durch Herrn Prof. Dr. med. Merz und Frau Dr. rer. nat. Veronica Bernard angefertigt und keine anderen als die in der Arbeit genannten Hilfsmittel benutzt habe.
Ich habe weder anderweitig versucht eine Dissertation einzureichen oder eine Doktorprüfung durchzuführen, noch habe ich diese Dissertation oder Teile derselben einer anderen Prüfungskommission vorgelegt.

Niklas Gebauer