

Aus dem Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie

(Direktor: Prof. Dr. Dr. Ingolf Cascorbi)

im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel

an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**EPIGENETISCHE MECHANISMEN DER IMATINIB-
RESISTENZ IN DER BEHANDLUNG DER CHRONISCHEN
MYELOISCHEN LEUKÄMIE**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Medizinischen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

TOBIAS DIEWOCK

aus Schleswig

Kiel, 2016

1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Dr. Ingolf Cascorbi
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Dr. Michael Kneba
Tag der mündlichen Prüfung:	05.12.2017
Zum Druck genehmigt:	Kiel, den 28.08.2017

gez.: Prof. Dr. Johann Roider
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis/Glossar	V
1. Einleitung	1
1.1. Chronisch myeloische Leukämie.....	1
Epidemiologie.....	1
Pathogenese	1
Klinik	2
Therapie.....	3
Resistenz	5
Resistenzmechanismen	6
1.2. MicroRNAs.....	7
Biosynthese.....	8
Wirkmechanismus	8
Funktion	9
1.3. Fragestellung dieser Studie	10
2. Material und Methoden.....	11
2.1. Material.....	11
2.1.1. Kits.....	11
2.1.2. Chemikalien	11
2.1.3. Laborchemische Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	11
2.1.4. Software und Datenbanken.....	12
2.2. Methoden.....	12
2.2.1. Patientenproben.....	12
2.2.2. RNA-Isolierung.....	13
2.2.2.1. Leukozytenextraktion.....	13
2.2.2.2. MicroRNA-Isolation.....	13
2.2.3. Reverse Transkription	14
2.2.3.1. Für TaqMan® Low Density Arrays.....	14
2.2.3.2. Für Individualassays und Genexpressionsanalyse	15
2.2.4. Konzentrationsbestimmung.....	16
2.2.5. Mutationsanalyse	16
2.2.6. Real-time PCR.....	16
2.2.6.1. Funktionsweise.....	16

2.2.6.2. Durchführung.....	17
2.2.7. Statistische Auswertung.....	18
2.2.7.1. Low Density Arrays.....	18
2.2.7.2. Individualassays.....	19
2.2.7.3. Genexpressionsanalyse.....	19
2.2.8. ROC-Analyse.....	20
2.2.9. Target Gene Prediction.....	20
2.2.10. Funktionelle Analyse.....	21
3. Ergebnisse.....	22
3.1. Differentielle microRNA-Expression in Respondern und Non-Respondern.....	22
3.2. Bestätigung der differentiellen microRNA-Expression mittels Individualassays.....	25
3.3. ROC-Analyse.....	27
3.4. Target Prediction der identifizierten microRNAs.....	28
3.5. Differentielle mRNA-Expression von Respondern und Non-Respondern.....	33
4. Diskussion.....	37
4.1. MicroRNAs und Krebs.....	37
4.2. Verwendung als Biomarker.....	40
4.3. Signaltransduktionsweg-Analyse.....	42
4.4. Genexpressionsstudie.....	43
4.5. Limitationen dieser Studie.....	45
4.6. Ausblick.....	45
5. Zusammenfassung.....	47
6. Literaturverzeichnis.....	49
7. Anhang.....	81
7.1. Ethikvotum.....	81
8. Danksagung.....	84
9. Lebenslauf.....	85

Abkürzungsverzeichnis/Glossar

ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Area under curve
ABC	ATP binding cassette
ABCB1	ATP binding cassette-Transporter B1
ABCG2	ATP binding cassette-Transporter G2
ABL1	Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1
ACTB	Beta-Aktin
AML	Akute myeloische Leukämie
Asp	Aspartat
BCR	breakpoint cluster region
BCRP	Breast cancer related protein
CCyR	complete cytogenetic response
cDNA	complementary desoxyribonucleic acid
CHR	complete hematologic response
CLL	Chronisch lymphatische Leukämie
CML	Chronisch myeloische Leukämie
C _t	cycle threshold
CYP	Cytochrom-P450
DAVID	Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery
DEFA1-3	α-Defensin 1-3
DEFA4	α-Defensin 4
DFG	Aspartat-Phenylalanin-Glycin-Motiv
DGHO	Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie
DNA	desoxyribonucleic acid
EGFR	epidermal growth factor receptor
ErbB	erythroblastic leukemia viral oncogene homolog
EUTOS	European Treatment Outcome Study
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
hOCT1	humaner organischer Kationentransporter 1
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IRIS	International Randomized Study of Interferon vs. STI571
IS	Internationaler Standard
KEGG	Kyoto encyclopedia of genes and genomes
KM	Knochenmark

MammU6	mammalian U6
MAPK	mitogen-activated protein kinase
miR	microRNA
miRISC	microRNA-induced silencing complex
MMR	major molecular response
mTOR	mechanistic Target of Rapamycin
myomiR	myokardiale microRNA
NF-κB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
nt	Nukleotid
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PCyR	partial cytogenetic response
PDGFR	platelet-derived growth factor receptor
PGP	p-Glykoprotein
Ph ⁺	Philadelphia-Chromosom positiv
Phe	Phenylalanin
PI3	Phosphatidylinositol-3
piRNA	piwi-interacting RNA
pre-miR	precursor microRNA
pri-miR	primary microRNA
Ras	rat sarcoma oncogene
Rb	Retinoblastom
RNA	ribonucleic acid
ROC	receiver operating characteristic
rtPCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
siRNA	small interfering RNA
TGF- β	transforming growth factor β
TKI	Tyrosinkinaseinhibitor
U	Unit (Einheit)
UTR	untranslated region
UV	Ultraviolett
WHO	Weltgesundheitsorganisation
Wnt	wingless Int-1

1. Einleitung

1.1. Chronisch myeloische Leukämie

Epidemiologie

Die chronisch myeloische Leukämie (CML) ist eine klonale myeloproliferative Erkrankung, die von einer pluripotenten hämatopoietischen Stammzelle ausgeht. Im Jahr erkranken ungefähr 1,5 von 100.000 Personen, Männer sind häufiger betroffen als Frauen. Die Inzidenz steigt mit zunehmendem Lebensalter. Die jährliche Mortalitätsrate ist über die letzten Jahre aufgrund optimierter Therapiemaßnahmen bei gleichbleibender Inzidenz auf etwa 1,5% gesunken. Als Auslöser für die Krankheit ist derzeit nur die Exposition gegenüber großen Dosen ionisierender Strahlung, die im Rahmen atomarer Explosionen freigesetzt werden, bekannt. Ein Zusammenhang zwischen potenziell mutagenen Chemikalien wie Benzol und dem Auftreten von CML konnte bisher nicht nachgewiesen werden [1-3].

Pathogenese

Die CML gilt als Modellerkrankung für die Erforschung der Pathogenese und der damit verbundenen Entwicklung einer zielgerichteten Therapie von Krebserkrankungen. In über 90% der Patienten ist eine einzige chromosomale Translokation kausale Ursache für die Krankheitsentstehung. Typischerweise handelt es sich um die reziproke Translokation $t(9;22)(q34;q11)$, die zu einem erstmalig 1960 beschriebenen und später als „Philadelphia-Chromosom“ bezeichneten verkürzten Chromosom 22 und einem verlängerten Chromosom 9 führt [4]. Dabei gerät das Abelson Murine Leukemia Viral Oncogene Homolog 1 (ABL1)-Gen in die Region des Breakpoint Cluster Region (BCR)-Gens [5-8].

Das 230 kb große ABL1-Gen kodiert für eine 145 kDa große Non-Rezeptor-Tyrosinkinase, die sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma wichtige Zellfunktionen steuert und deshalb in sehr engen Grenzen reguliert wird [9,10]. Durch die reziproke Translokation geht der für diese Regulation verantwortliche Teil des ABL1-Gens verloren, stattdessen führt der Einfluss des BCR-Promotors im BCR-ABL-Fusionsgen zu einer konstitutiven Expression der im Zytoplasma lokalisierten BCR-ABL-Tyrosinkinase in Philadelphia-Chromosom-positiven Zellen [10-15].

Das BCR-ABL-Fusionsprotein bewirkt über verschiedene Signalwege die onkogene Transformation der hämatopoietischen Stammzelle, was unter anderem zu einer gesteigerten Zellproliferation und verminderten Apoptose führt, die Differenzierung der Zelle und Interaktionen mit der Extrazellulärmatrix und dem Knochenmarkstroma stört und der Zelle dadurch weitgehende Autonomie von Wachstumssignalen ermöglicht [16-19].

Die BCR-ABL-Kinasedomäne ist bilobal strukturiert, entsprechend der konservierten Struktur anderer Serin/Threonin- und Tyrosinkinasedomänen. Die kleinere Untereinheit (*N-lobe*) beinhaltet die ATP-Bindungsstelle (*P-loop*), die größere Untereinheit (*C-lobe*) enthält die katalytische Domäne (*catalytic loop*) sowie die Aktivierungsdomäne (*activation loop*). Im aktiven Zustand befindet sich diese Aktivierungsdomäne in einer offenen Konformation. Ein Aspartatrest (Asp-381) innerhalb eines hochkonservierten Aspartat-Phenylalanin-Glycin-(DFG-) Motivs am N-terminalen Ende der Aktivierungsdomäne ist dann in der Lage, ATP in die ATP-Bindungsstelle zu dirigieren. Das ausgeklappte C-terminale Ende der Aktivierungsdomäne dient als Bindeplattform für das Substrat.

Im Jahre 2001 wurde von der Firma Novartis der erste gegen BCR-ABL gerichtete Tyrosinkinaseinhibitor (TKI) auf den Markt gebracht (Imatinib, Gleevec®).

Nur im inaktiven Zustand der Kinase ist die Bindung dieses Tyrosinkinaseinhibitors möglich. Im entstehenden Komplex sind das DFG-Motiv und die Aktivierungsdomäne derart rotiert, dass der Aspartatrest Asp-381 von der ATP-Bindestelle abgewandt ist, wodurch eine ATP-Bindung verhindert wird. Weiterhin wird eine Substratbindung verhindert, indem die Aktivierungsdomäne im eingeklappten Zustand das aktive Zentrum blockiert [20,21]. Der Proliferationsreiz auf die entartete Zelle geht somit verloren.

Klinik

Der Krankheitsverlauf wird klassischerweise in drei Stadien unterteilt und beginnt mit der chronischen Phase, die oft jahrelang andauert und in der zu mehr als 85 Prozent der Fälle die Diagnose gestellt wird. Etwa die Hälfte der Patienten ist asymptomatisch und wird zufällig erkannt. Symptomatische Patienten klagen über unspezifische Symptome wie Abgeschlagenheit, Müdigkeit und Schwäche als Ausdruck einer Anämie, Oberbauchbeschwerden infolge einer Splenomegalie, Appetitlosigkeit, Gewichtsverlust und Knochenschmerzen. Im weiteren Krankheitsverlauf kann sich eine B-Symptomatik entwickeln oder verstärken.

Eine mehrmonatige akzelerierte Phase schließt sich an die chronische Phase an. Die entarteten, unreifen Zellen verdrängen vermehrt die verbliebenen gesunden Zellen des Knochenmarks, was zusätzlich eine erhöhte Blutungsneigung und Infektanfälligkeit der Patienten zur Folge haben kann. Schließlich endet die Leukämie in der Blastenkrise, welche analog zu einer akuten Leukämie unbehandelt nach wenigen Wochen tödlich verläuft [2,22].

Das Blutbild ist in der Regel durch Leukozytose und eine pathologische Linksverschiebung gekennzeichnet. Im Gegensatz zu anderen Leukämieformen, die einen Reifungsstopp aufweisen, kann sich die entartete Stammzelle bis zu einem gewissen Grad weiter

differenzieren [23]. Die Thrombozytenzahl ist fast immer erhöht, die Erythrozytenzahl leichtgradig verringert. Der Knochenmarkausstrich fällt insbesondere durch Hyperzellularität mit gesteigerter Myelopoiese auf, andere Zelllinien können supprimiert sein [2,24].

Zur Bestätigung der Verdachtsdiagnose kann neben Blutbild und Knochenmarkausstrich das für die CML pathognomonisch verkürzte Chromosom 22 („Philadelphia-Chromosom“) in der Chromosomenanalyse gefunden werden. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung oder Polymerasekettenreaktion sind Verfahren zum Nachweis der BCR-ABL-Translokation. Das weitere Monitoring, das Aussagen über die Tumorlast trifft und dadurch eine Abschätzung und Überwachung des Therapieerfolgs auf molekularer Ebene ermöglicht, kann durch hochsensitive Messung des BCR-ABL-Transkripts im peripheren Blut mit quantitativer Polymerasekettenreaktion erfolgen [2,24-26].

Verschiedene Arbeiten beschäftigten sich in der Vergangenheit mit der Erstellung von Staging-Systemen, mit denen CML-Patienten in Risikogruppen eingeordnet und Aussagen über ihre Prognose getroffen werden können. Die bisher geläufigsten, der Sokal-Index und der Hasford-Score [27,28], gelten für Patienten, die mit Chemotherapie beziehungsweise Interferon- α behandelt werden. Diese wurden nach der Einführung von Imatinib 2001 durch den „European Treatment and Outcome Study Score“ (EUTOS-Score) ersetzt. Als Parameter werden der Prozentsatz an basophilen Granulozyten im Blut und die Milzgröße zum Zeitpunkt der Diagnosestellung verwendet, der Score unterteilt daraufhin die Patienten in eine Hoch- und eine Niedrigrisikogruppe bezogen auf die Wahrscheinlichkeit dieser Patienten, eine komplette zytogenetische Remission ohne nachweisbare proliferative Ph⁺-Zellen im Blut zu erreichen [29].

Therapie

Ziel der Therapie ist es, die malignen Zellen soweit wie möglich zu eliminieren. Der Therapieerfolg beziehungsweise -misserfolg wird dabei auf drei Ebenen beurteilt. Nach gängiger Konvention gibt das hämatologische Ansprechen den Grad der Normalisierung des Blutbildes an, das zytogenetische Ansprechen beurteilt den Rückgang des Anteils an Philadelphia-Chromosom-positiven Zellen und das molekulare Ansprechen den Rückgang des Anteils des BCR-ABL-Fusionsprodukts im peripheren Blut (Tab. 1).

Tabelle 1: Definition des hämatologischen, zytogenetischen und molekularen Ansprechens nach der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie [3,30,31].

Method	Remission	Parameter
hämatologisch	komplett	<ul style="list-style-type: none"> • Leukozyten < 10 x 10⁹ /l • Basophile < 5 % • keine Myelozyten, Promyelozyten oder Myeloblasten im Differenzialblutbild • Thrombozyten < 450 x 10⁹ /l • Milz nicht tastbar
zytogenetisch	komplett	keine Ph ⁺ -Metaphasen
	partiell	1 - 35% Ph ⁺ -Metaphasen
	minor	36 - 65% Ph ⁺ -Metaphasen
	minimal	66 - 95% Ph ⁺ -Metaphasen
	keine	> 95% Ph ⁺ -Metaphasen
molekular	major	Quotient aus BCR-ABL- und ABL1-Transkripten < 0,1%
	tief	Quotient aus BCR-ABL- und ABL1-Transkripten < 0,01%

Noch vor wenigen Jahren war die Chemotherapie mit Busulfan und Hydroxyharnstoff die Behandlung der Wahl, welche eine 5-Jahres-Überlebensrate von 42% erzielte. Die anschließende Standardtherapie der CML aus einer Kombination der Wirkstoffe IFN- α und Cytarabin führte zu einer Steigerung der 5-Jahres-Überlebensrate auf 57% [32].

Ende des 20. Jahrhunderts gelang es schließlich, den Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib (Glivec[®]/Gleevec[®]) zu entwickeln [33]. Dieser zur Gruppe der *small molecule inhibitors* gehörige Wirkstoff bindet selektiv zwischen N- und C-Untereinheit der im inaktiven Zustand befindlichen Kinasedomäne, wobei ein Ende des Imatinibmoleküls die ATP-Bindestelle im katalytischen Zentrum der BCR-ABL-Tyrosinkinase blockiert. Der restliche Teil befindet sich zwischen Aktivierungsdomäne und α C-Helix und interagiert mit dem Phenylalaninrest (Phe-382) des DFG-Motivs. Dadurch wird die Kinasedomäne in ihrer inaktiven Konformation stabilisiert [20]. Als Folge wird eine Phosphorylierung der Substrate durch das BCR-ABL-Protein verhindert, sodass der überlebenswichtige Proliferationsstimulus auf die Tumorzelle wegfällt und diese untergeht [34,35].

Weitere untersuchte Effekte von Imatinib sind eine reduzierte Koloniebildung und Auslösung von Apoptose [33,36]. Imatinib inhibiert außer ABL1 beziehungsweise BCR-ABL noch zwei weitere Tyrosinkinasen, c-Kit und PDGFR [37,38].

Im Vergleich zur vorherigen Standardtherapie mit Interferon- α erzielte eine Behandlung mit Imatinib in der chronischen Phase deutlich bessere Ergebnisse. Von den Patienten der „International Randomized Study of Interferon and STI571“- (IRIS-) Studie, die Imatinib erhielten, erreichten 95,3% eine hämatologische Response und 73,8% eine komplette zytogenetische Response im Gegensatz zu 55,5% beziehungsweise 8,5% der Patienten in der Vergleichsgruppe [39]. Seitdem wird Imatinib klinisch erfolgreich als Standardtherapie für CML in der chronischen Phase eingesetzt und führt zu 6-Jahres-Überlebensraten von 88% [40]. Die unerwünschten Arzneimittelwirkungen sind im Vergleich zu konventioneller Chemotherapie als eher mild anzusehen, selten wird ein WHO-Grad von 3 oder 4 erreicht. Am häufigsten wird hämatologische Toxizität (Anämie, Neutropenie und Thrombozytopenie) in 16,7% der Fälle berichtet, es folgen erhöhte Leberenzyme (5,3%) und periphere Ödeme (4,5%) [39,41]. In Einzelfällen wurde Imatinib die Entstehung von Hyperphosphaturie und Herzinsuffizienz zugeschrieben [42,43]. Aufgrund der noch ungeklärten Teratotoxizität wird eine gleichzeitige Kontrazeption empfohlen [44]. Inzwischen sind in Deutschland neben Imatinib auch die Tyrosinkinaseinhibitoren der zweiten Generation Nilotinib und Dasatinib für die Erstlinientherapie der CML zugelassen [45].

Bei ungenügender Wirksamkeit kann eine Dosiserhöhung oder ein Wechsel auf einen anderen TKI (zum Beispiel Bosutinib oder Ponatinib) erwogen werden. Auch die Kombinationsgabe von Imatinib mit Interferon- α erhöht die Remissionsrate signifikant gegenüber einer Monotherapie [46]. Als letzter Ausweg bei fehlendem Behandlungserfolg gilt die allogene Stammzelltransplantation [3].

Resistenz

Trotz des überwiegend guten Ansprechens entwickeln ungefähr 20-30% der Patienten eine Resistenz gegenüber der Imatinibtherapie [47,48]. Klinisch gilt ein Patient als resistent, wenn definierte Meilensteine der Therapie nicht erreicht werden. Tab. 2 fasst die Kriterien für ein ungenügendes Ansprechen nach DGHO zusammen.

Es werden primäre von sekundären Resistenzen unterschieden. Primär resistente Patienten sprechen von Beginn an ungenügend auf eine Behandlung mit Imatinib an. Im Laufe einer zunächst erfolgreichen Therapie erwerben einige Patienten sekundäre Resistenzen, wobei das Risiko mit zunehmender Behandlungsdauer steigt [49].

Tabelle 2: Definition des unzureichenden Ansprechens und der Resistenz auf Tyrosinkinase-Inhibitoren nach DGHO [3]. Legende: CCyR - komplette zytogenetische Remission; CHR - komplette hämatologische Remission; MMR - majore molekulare Remission; PCyR - partielle zytogenetische Remission; IS - Internationaler Standard; TKI - Tyrosinkinase-Inhibitoren.

Zeit nach Beginn der TKI-Therapie, Monate	Unzureichendes Ansprechen	
	hämatologische und zytogenetische Kriterien	PCR-Kriterien
3	keine CHR, keine CyR	
6	>35% Ph ⁺ , keine PCyR	>10% BCR-ABL/ABL1 (IS)
12	>0% Ph ⁺ , keine CCyR	>1% BCR-ABL/ABL1 (IS)
18		>0,1% BCR-ABL/ABL1 (IS)
jeder Zeitpunkt	<ul style="list-style-type: none"> • Verlust der CHR • Verlust der CCyR • Mutationen mit komplettem Verlust der TKI-Wirkung • klonale Evolution 	<ul style="list-style-type: none"> • Verlust der MMR • andere Mutationen mit reduzierter TKI-Bindung

Resistenzmechanismen

Die Wirksamkeit von Imatinib ist mit der Plasma- sowie intrazellulären Imatinibkonzentration assoziiert [50-52]. Metabolisiert wird das Medikament hauptsächlich von den Cytochromen P450 2C8, 3A4 und 3A5, wodurch interindividuelle Aktivitätsunterschiede, beispielsweise durch genetische Polymorphismen oder Interaktionen mit Induktoren oder Inhibitoren dieser Enzyme, zu einem verminderten Plasmaspiegel führen und auf diese Weise eine Resistenz verursachen können [53,54]. Eine übermäßige Bindung von Imatinib an α -1-saures-Glykoprotein im Plasma wird als weitere Ursache für eine Resistenzentwicklung diskutiert, die klinische Relevanz ist allerdings unklar [55-58]. Die intrazelluläre Imatinibkonzentration ist abhängig von Transportvorgängen über die Zielzellmembran. Als Substrat von Exportern der ABC-Familie [59-62] wird Imatinib bei einer Überexpression dieser Proteine vermehrt aus der Zielzelle heraustransportiert (zelluläre Detoxifikation), sodass die intrazelluläre Bioverfügbarkeit sinkt.

Weitere Resistenzmechanismen betreffen das BCR-ABL-Gen. Es konnte gezeigt werden, dass Tumorzellen durch Überexpression von BCR-ABL therapieresistent werden können [63]. Die häufigste und am besten untersuchte Ursache für eine Resistenzentwicklung sind Mutationen des BCR-ABL-Gens. Mehrere Studien machten einen Gesamtanteil von 12-63% resistenter Patienten aus, wobei der Anteil bei fortgeschritten erkrankten sowie sekundär

resistenten Patienten größer war [64]. Inzwischen sind über 90 Punktmutationen identifiziert worden, wobei die 15 häufigsten in bis zu 85% der mutierten Zellpopulationen gefunden werden [65-68].

Mutationen lassen sich im Wesentlichen in vier Gruppen aufteilen. Zunächst kann eine Mutation die direkte Bindung von Imatinib beeinträchtigen, die häufigste Mutation, T315I, ist hierfür ein Beispiel [69]. Andere Mutationen verändern die ATP-Bindestelle, die katalytische oder aktivierende Domäne und bewirken eine Stabilisierung der aktiven Konformation der BCR-ABL-Tyrosinkinase, die die Imatinibbindung verhindert [34,35,63,70]. Je nach Mutation ist eine mehr oder minder ausgeprägte Restsensibilität gegenüber Imatinib vorhanden [71]. In einigen Patienten finden sich zwei oder mehr Mutationen der Kinasedomäne, die mit einer schlechteren Prognose verbunden sind [72].

Neben dem Auftreten von Mutationen der Kinasedomäne und mit vergleichbarer Häufigkeit finden sich mit fortschreitendem Krankheitsverlauf vermehrt weitere chromosomale und onkogenetische Veränderungen in der Krebszellpopulation. Oft auftretende Beispiele für chromosomale Aberrationen sind Trisomie 8 (34%) mit der Folge einer c-Myc-Überexpression oder ein dupliziertes Ph-Chromosom (38%) einhergehend mit überexprimiertem BCR-ABL [73-75]. Durch Funktionsverlust von Tumorsuppressorgenen wie p53 kann die maligne Zelle von den Wachstumssignalen der BCR-ABL-Tyrosinkinase vollständig unabhängig werden [76]. Von diesen als klonale Evolution bezeichneten Vorgängen sind bis zu 73% der Patienten in einer Blastenkrise betroffen [77].

Die Aktivierung alternativer Signalwege [78-80] und Dysregulation der epigenetischen Acetylierung [81] sind weitere Möglichkeiten der Zelle, ein BCR-ABL-unabhängiges Überleben zu ermöglichen.

Im Gegensatz zu differenzierten Zellen, die durch Imatinib eliminiert werden können, sind Stammzellen für den Wirkstoff nicht sensibel. Daher kann es trotz vorübergehenden Erreichens einer kompletten molekularen Remission nach Beendigung der Imatinibtherapie zu einem Krankheitsrezidiv kommen [82,83].

1.2. MicroRNAs

Sowohl an der Aufnahme von Imatinib in die Zelle als auch an der Ausschleusung sind verschiedene Transporter beteiligt, unter anderem Exporter der ABC-Familie. Wie oben beschrieben, kann die Dysregulation dieser Transportvorgänge zu einer Imatinibresistenz beitragen. Allerdings sind die Regulationsmechanismen der Genexpression und Synthese

dieser Transporter komplex und zahlreichen Wechselwirkungen unterworfen. Eine putative Rolle bei der Regulation kommt microRNAs zu, einer erst seit einigen Jahren bekannten Klasse kleiner, nicht-kodierender Ribonukleinsäuren von 21 bis 25 Nukleotiden Länge, die zum Großteil hochkonserviert sind und wichtige regulatorische Aufgaben in vielen Organismen erfüllen [84,85].

Die erste microRNA wurde 1993 im Genom von *Caenorhabditis elegans* durch ein genetisches Screening entdeckt und als *lin-4* bezeichnet [86]. Im gleichen Jahr konnte gezeigt werden, dass die Expression des *lin-14*-Gens durch *lin-4* reguliert wird [87]. Seit dieser Entdeckung wurden durch Sequenzierung klonierter kleiner RNAs, „deep sequencing“-Verfahren und *in silico*-Suche in sequenzierten Genomen zahlreiche weitere microRNAs identifiziert [88]. Neu entdeckte Sequenzen müssen aufgrund der Ähnlichkeit zu anderen kleinen RNAs wie siRNAs oder piRNAs bestimmte Expressions- und Biogenesekriterien erfüllen, um als microRNA eingeordnet zu werden [89]. In der zur Katalogisierung von microRNAs eingerichteten Datenbank *MirBase* sind inzwischen mehr als 2600 humane microRNAs gelistet (Release 21, Stand Juni 2014) [90], die nach aktueller Studienlage für die Regulation von bis zu 60% der humanen, für Proteine kodierenden Gene in Betracht kommen [91].

Biosynthese

Die Synthese der microRNAs beginnt mit der Transkription eines Primärtranskripts (primary microRNA, „pri-miR“) von 500-3000 Nukleotiden Länge [92]. Im Zellkern wird die pri-miR durch das RNase-III-Enzym (Drosha) zur 70-80 Nukleotide langen precursor microRNA (pre-miR) prozessiert [93-96]. Alternativ können aus kurzen Introns, sogenannten miRtrons, durch Splicing pre-miR-Imitate hergestellt werden [97-99]. Nach Export ins Zytoplasma via Exportin 5 [100] wird die pre-miR vom RNase-III-Enzym Dicer in ein 17-24 Nukleotide langes doppelsträngiges RNA-Stück geschnitten [101-105]. Dieses enthält die mature microRNA sowie einen als microRNA* bezeichneten komplementären Strang. Dicer bildet mit Mitgliedern aus der Ago-Protein-Familie und der muren microRNA einen Effektor-Komplex, den sogenannten microRNA-induced silencing complex (miRISC), während die microRNA* meist degradiert, manchmal jedoch in einen zweiten miRISC aufgenommen wird [106-108].

Wirkmechanismus

Die microRNA des miRISC bindet an komplementäre Bindestellen, meist in der 3'-UTR der Ziel-mRNA, in einigen Fällen kann sich der zu der microRNA komplementäre mRNA-Abschnitt auch in der kodierenden Region [99, 100] oder der 5'-UTR [109] der mRNA befinden. Erfolgt die Bindung annähernd komplett komplementär, kann die Endonukleaseaktivität des Ago-Proteins die mRNA degradieren. Nach neuen Erkenntnissen

ist die Degradation der mRNA der Hauptwirkmechanismus von microRNAs [110]. Weisen tierische microRNAs zu ihren Bindestellen dagegen partielle Komplementarität auf, bewirkt die Bindung des miRISC an Zielsequenzen der mRNA eine Inhibierung der Translation [111-115].

Es wurde beschrieben, dass es einigen microRNAs möglich ist, abhängig vom Stadium des Zellzyklus zu Aktivatoren der Translation zu werden [116]. Neuere Studien konnten zeigen, dass sich miRISCs auch im Zellkern befinden und direkt die Transkription regulieren können [117-120].

Computergestützte Vorhersagen ergeben, dass eine einzige microRNA im Durchschnitt etwa 200 Transkripte reguliert. Umgekehrt kann aber auch eine mRNA synergistisch von mehreren microRNAs reguliert werden [121-124].

Funktion

Durch die Expressionsregulation eines Großteils des Transkriptom beeinflussen microRNAs verschiedenste wichtige Funktionen. Das Expressionsmuster variiert dabei abhängig vom Gewebe [125], tatsächlich sind einige microRNAs in bestimmten Geweben hoch angereichert, zum Beispiel miR-1 im Herzen, miR-122 in der Leber und miR-124a im Gehirn [126]. Auf diese Weise kann die Expression gewebetypischer Proteine durch microRNAs gesteuert werden. Zellwachstum und -überleben, Entwicklung und Differenzierung unter anderem von Myoblasten, Adipozyten und hämatopoietischen Stammzellen hängen wesentlich von der Regulation durch microRNAs ab [127-130]. Insbesondere die Entwicklung und Aufrechterhaltung des neuronalen Systems sowie die Ausbildung der synaptischen Plastizität und damit auch die Verhaltensentwicklung wird entscheidend durch microRNAs reguliert [129,131,132].

Verschiedene Studien wiesen Assoziationen zwischen Krankheiten und einer veränderten microRNA-Expression nach. Gut untersucht sind Krebserkrankungen, beispielhaft die chronische lymphatische Leukämie vom B-Zell-Typ, die mit einer Dysregulation der microRNAs miR-15a und miR-16-1 vergesellschaftet ist [133], oder das Bronchialkarzinom, für dessen Entstehung ein Zusammenhang mit let-7 und Ras gefunden wurde [134]. Eine *in silico*-Genomstudie postuliert, dass die Zielgene von über 50% der humanen microRNAs in krebsassoziierten Genombereichen zu finden sind [135]. Neben Tumorerkrankungen legten weitere Studien eine Beteiligung von microRNAs an der Entstehung von kardiovaskulären [136,137], neurologischen und psychiatrischen [138-140], metabolischen [141] und einer Vielzahl weiterer Erkrankungen nahe, eine Übersicht bietet die von Jiang et al. eingerichtete Datenbank *miR2Disease* [142].

1.3. Fragestellung dieser Studie

Die Entwicklung der Tyrosinkinaseinhibitoren hat die Krebstherapie revolutioniert. Erstmals ist es gelungen, Erkenntnisse über die Pathogenese der CML zu verwenden, um daraus wirkungsvolle, hochspezifische Medikamente zu entwickeln. Vor diesem Kontext stellt die Behandlung der nicht unerheblichen Anzahl therapieresistenter Patienten eine besondere Herausforderung dar. Es ist wichtig, die zugrunde liegenden Resistenzmechanismen zu begreifen und im Einzelfall frühzeitig zu identifizieren, um ihnen mit einer an den Patienten angepassten Individualtherapie entgegenwirken zu können.

Die vorliegende Studie soll zunächst eruieren, ob die microRNA-vermittelte Genexpressionsregulation der Tumorzellen signifikante Unterschiede zwischen respondierenden (Respondern) und nicht-respondierenden (Non-Respondern) CML-Patienten aufweist und ob einzelne dysregulierte microRNAs mit der Genese der Resistenz assoziiert werden und somit als Prädiktionsfaktoren für eine Non-Response dienen können. Weitere Mechanismen, insbesondere eine mögliche Regulation von Transportern, durch die microRNAs Einfluss auf das Ansprechen von CML-Patienten auf die Imatinibtherapie ausüben könnten, sollen näher untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Kits

TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit	(Applied Biosystems, Foster City, USA)
QIAamp RNA Blood Mini Kit	(Qiagen, Hilden, Deutschland)
mirVana miRNA Isolation Kit	(Applied Biosystems/Ambion, Austin, USA)
TaqMan® Array Human MicroRNA A Cards v2.0	(Applied Biosystems)
TaqMan® MicroRNA Assays	(Applied Biosystems)
TaqMan® mRNA Assays	(Applied Biosystems)

2.1.2. Chemikalien

Human Megaplex Primers Pool A v.2.1	(Applied Biosystems)
Megaplex PreAmp Primers Pool A	(Applied Biosystems)
TaqMan® PreAmp Mastermix	(Applied Biosystems)
TaqMan® MicroRNA Assay Mix	(Applied Biosystems)
TaqMan® mRNA Assay Mix	(Applied Biosystems)
TaqMan® Universal PCR Master Mix	(Applied Biosystems)

2.1.3. Laborchemische Geräte und Verbrauchsmaterialien

GeneAmp PCR System 9700	(Applied Biosystems)
ABI Prism 7900HT Sequence Detection System	(Applied Biosystems)
Eppendorf 5810R Zentrifuge	(Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
Eppendorf Thermomixer Compact	(Eppendorf AG)
Eppendorf 5418 Mikrozentrifuge	(Eppendorf AG)
Galaxy Mini Zentrifuge	(VWR, Radnor, USA)
neoLab D-6012 Vortexer	(neoLab, Heidelberg, Deutschland)
Eppendorf BioPhotometer	(Eppendorf AG)
96-Well-Platten	(Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts)
Pipetten	(Eppendorf AG)
Pipettenaufsätze, RNase-frei	(Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
Microfuge-tubes (0,5 und 1,5 ml), RNase-frei	(Eppendorf AG)
Falcon-Tubes	(Sarstedt)
Kühl- und Gefrierschränke	(Liebherr, Bulle, Schweiz)

2.1.4. Software und Datenbanken

Microsoft Excel	(Microsoft, Redmond, USA)
Partek Genomics Suite software	(Partek Incorporated, St. Louis, USA)
SDS 2.3 and RQ Manager Software	(Applied Biosystems)
SPSS v19.0	(IBM, Armonk, USA)
GraphPad Prism v5	(GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA)
R	(R-Project, https://www.r-project.org)
TargetScan 6.1 [91, 146, 147]	(http://www.targetscan.org/)
Diana microT 5.0 [148]	(http://www.microna.gr/webServer/)
PicTar 2.0	(http://pictar.mdc-berlin.de/)
Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID)	(https://david.ncifcrf.gov/)
Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)	(http://www.genome.jp/kegg/)

2.2. Methoden

2.2.1. Patientenproben

In die vorliegende Studie wurden 45 Patienten mit einem medianen Alter von 57 Jahren aus der II. Medizinischen Klinik des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein eingeschlossen, die die Erstdiagnose chronisch myeloische Leukämie (CML) in der chronischen Phase erhielten. Nach venöser Blut- oder Knochenmarkentnahme zum Zeitpunkt der Diagnosestellung wurden die Patienten mit Imatinibdosen von 400 bis 800 mg täglich therapiert und abhängig von ihrem Ansprechen auf die Therapie als Responder oder Non-Responder klassifiziert. Hierzu wurden regelmäßig mittels quantitativer real-time PCR sowohl die BCR-ABL- als auch die ABL1-Transkripte gemessen und in Relation gesetzt. Bei Erreichen einer molekularen Response, definiert als Abfall des BCR-ABL/ABL1-Verhältnisses auf unter $1 \cdot 10^{-3}$, innerhalb der ersten 18 Monate nach Therapiebeginn wurde der Patient als Responder eingestuft, bei Nichterreichen als Non-Responder. Insgesamt erreichten 26 der Patienten nach dieser Definition eine Response, 19 wurden als Non-Responder klassifiziert.

Von einer zweiten, kleineren Patientenkohorte, bestehend aus 9 Respondern und 11 Non-Respondern wurden zusätzlich zu Proben vor der Imatinibbehandlung Folgeproben von 10 Patienten (4 Responder und 6 Non-Responder) in einem Zeitraum von 4-15 Monaten nach Therapiebeginn entnommen. Dadurch konnten Untersuchungen zum Einfluss der Imatinibtherapie auf die Genexpression durchgeführt werden.

Die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel hat die Studie befürwortend bewertet und alle Patienten gaben ihr schriftliches, informiertes Einverständnis.

2.2.2. RNA-Isolierung

Zur Isolierung der RNA wurden zunächst Leukozyten mit dem QIAamp RNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) aus den Blut- beziehungsweise Knochenmarksproben extrahiert. Anschließend wurde das mirVana miRNA Isolation Kit (Applied Biosystems/Ambion, Austin, USA) verwendet, um die Gesamt-RNA zu isolieren. Für die anschließenden Arbeiten wurde die RNA in cDNA umgeschrieben. Hierzu wurde das TaqMan[®] MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA) wie unten beschrieben verwendet.

2.2.2.1. Leukozytenextraktion

Für die Gewinnung der RNA-haltigen Leukozyten wurde das QIAamp RNA Blood Mini Kit nach Angaben des Herstellers verwendet. 1,5 ml Blut wurden zunächst mit 7,5 ml der hypotonen EL-Pufferlösung (Qiagen) versetzt, die die Lyse der Erythrozyten herbeiführt. Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Leukozyten bei 400 x g und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach erneuter Zugabe von 5 ml EL-Pufferlösung und anschließender Zentrifugation wurde das gewonnene Leukozytenpellet schließlich mit 600 µl der RLT-Pufferlösung (Qiagen) lysiert und bei -80°C gelagert.

2.2.2.2. MicroRNA-Isolation

Zur Isolierung der Gesamt-RNA wurde das mirVana miRNA Isolation Kit nach Angaben des Herstellers benutzt. Das Leukozytenlysat wurde zunächst durch eine Phenol-/Chloroformextraktion von organischen Komponenten bereinigt. Dazu wurden 60 µl eines Homogenisierungszusatzes (Applied Biosystems/Ambion) hinzugefügt und das Gemisch 10 Minuten auf Eis inkubiert. Nach gründlicher Vermischung mit 600 µl Acid-Phenol/Chloroform (Applied Biosystems/Ambion) und anschließender Zentrifugation für 5 Minuten bei 10000 x g konnte die wässrige, RNA-haltige Phase von der organischen Phase getrennt werden. Nach Ausfällung der RNA mit 96-100% Ethanol wurde die RNA durch Zentrifugation in einer Säulenmatrix (Herstellerangaben) gebunden. Die Säule wurde insgesamt dreifach mit mitgelieferten Waschlösungen gewaschen, bevor die RNA mit nukleasefreiem Wasser eluiert wurde. Die optionale Anreicherung von kleinen RNAs, wie im Herstellerprotokoll beschrieben, wurde nicht durchgeführt.

2.2.3. Reverse Transkription

Abhängig von der späteren Verwendung des Transkriptionsproduktes für die TaqMan® Low Density Arrays beziehungsweise für Individualassays und Genexpressionsanalyse wurden zwei Protokolle befolgt.

2.2.3.1. Für TaqMan® Low Density Arrays

Je 200ng der Gesamt-RNA wurden mit dem TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA) revers transkribiert. Als Primer wurden pro RNA-Probe je 0,8 µl der Human Megaplex Primer Pool A v.2.1 (Applied Biosystems) verwendet.

Tabelle 3: Reaktionsansatz für reverse Transkription der microRNAs für TaqMan® Low Density Arrays.

Desoxyribonukleotide	20 nmol
10x konzentrierte Reverse Transkriptase-Pufferlösung	0,8 µl
Multiscribe™ Reverse Transkriptase	75 U
Human Megaplex Primer Pool A v2.1	0,8 µl
Magnesiumchlorid	22,5 nmol
Nukleasefreies Wasser	0,2 µl
RNAse Inhibitor	2 U
Gesamt-RNA	200 ng

Hinzu kamen 20 nmol Desoxyribonukleotide (0,2 µl), 0,8 µl zehnfach konzentrierte Pufferlösung, 22,5 nmol Magnesiumchlorid (0,9 µl), 0,2 µl nukleasefreies Wasser, 2 U RNAse Inhibitor (0,1 µl) und 75 U Multiscribe™ Reverse Transkriptase (1,5 µl). Schließlich wurden 200 ng RNA (3 µl) hinzugefügt (Tab. 3). Im Anschluss wurde der Reaktionsansatz 5 Minuten auf Eis inkubiert. Die RT-Reaktion fand auf einem GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) statt. Das Programm begann mit 12 Zyklen á 2 min bei 16°C, 1 min bei 42°C und endete mit 5 min bei 85°C.

Um die eigentliche PCR-Reaktion zu ermöglichen, wurden die cDNA-Proben nach Angaben des Herstellers präamplifiziert. Dazu wurden 2,5 µl des Megaplex PreAmp Primer Pools A (Applied Biosystems) als Primer verwendet und mit 12,5 µl des TaqMan® PreAmp Mastermix (Applied Biosystems), 7,5 µl nukleasefreiem Wasser und 2,5 µl des Reversen Transkriptionsprodukts vermischt (Tab. 4). Das Reaktionsgemisch wurde zunächst für 5 min auf Eis inkubiert und die Reaktion im Anschluss auf einem GeneAmp PCR System 9700 mit folgenden Programmparametern durchgeführt: 10 min bei 95°C, 2 min bei 55°C, 2 min bei

72°C, gefolgt von 12 Zyklen mit 15 sec bei 95°C, 4 min bei 60°C, und 10 min bei 99,9°C. Zum Schluss wurde die Probe mit 75 µl 0,1fach konzentriertem TE-Puffer mit einem pH von 8,0 verdünnt.

Tabelle 4: Reaktionsansatz für Präamplifikation der cDNA.

Megaplex PreAmp Primer Pool A	2,5 µl
TaqMan® PreAmp Mastermix	12,5 µl
Nukleasefreies Wasser	7,5 µl
cDNA	2,5 µl

2.2.3.2. Für Individualassays und Genexpressionsanalyse

Für die Individualassays und die Genexpressionsanalyse wurde die RNA nach Angaben des TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) umgeschrieben. Zunächst wurde ein Mastermix angesetzt, um Pipettierungenauigkeiten zu minimieren. Pro umzuschreibender Probe wurden 15 nmol Desoxyribonukleotide (0,15 µl), 1,5 µl zehnfach konzentrierter Puffer, 4,16 µl nukleasefreies Wasser, 3,8 U RNase Inhibitor (0,19 µl) und 50 U Multiscribe™ Reverse Transkriptase (1 µl) vermischt. Anschließend wurden 7 µl des Mastermixes mit 5 µl der RNA, eingestellt auf 2 ng/µl, und 3 µl Primer, entweder spezifisch für eine microRNA im Falle der Individualassays oder für eine mRNA im Rahmen der Genexpressionsanalysen, vermischt (Tab. 5). Der Ansatz wurde auf einem GeneAmp PCR System 9700 zuerst bei 16°C für 30 min inkubiert, daraufhin erfolgte die reverse Transkription bei 42°C für 30 min. Die Inaktivierung der Reversen Transkriptase erfolgte bei 85°C für 5 min.

Tabelle 5: Reaktionsansatz für reverse Transkription der microRNAs für Individualassays beziehungsweise der mRNAs für Genexpressionsanalyse.

Desoxyribonukleotide	15 nmol
Multiscribe™ Reverse Transkriptase	50 U
10x konzentrierte Reverse Transkriptase-Pufferlösung	1,5 µl
microRNA-/mRNA-spezifische Primer	4,16 µl
Nukleasefreies Wasser	5 µl
RNase Inhibitor	3,8 U
Gesamt-RNA	3 µl

2.2.4. Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration und Reinheit der isolierten Nukleinsäuren wurde photometrisch durch Messung der UV-Absorption mit einem Eppendorf BioPhotometer (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) bestimmt. Für einzelsträngige DNA und RNA entspricht dabei eine optische Einheit, gemessen bei einer Wellenlänge von 260 nm, 40 µg/ml Nukleinsäuren.

2.2.5. Mutationsanalyse

Patienten mit klinisch signifikanten Mutationen der BCR-ABL-Kinasedomäne wurden vor Beginn der Experimente ausgeschlossen. Die Mutationsanalyse der Proben erfolgte im Rahmen der Patientendiagnostik in der II. Medizinischen Klinik des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein.

2.2.6. Real-time PCR

2.2.6.1. Funktionsweise

Analog zu der klassischen Polymerasekettenreaktion basiert auch das Prinzip der real-time PCR auf einer enzymatischen Vervielfältigung ausgewählter DNA-Abschnitte *in vitro*. Typischerweise besteht die Kettenreaktion aus einem sich mehrfach wiederholenden Reaktionszyklus, der durch Temperaturänderungen reguliert wird. Ein Zyklus verwendet dabei das Amplifikat des vorigen Zyklus als neues Substrat, sodass eine exponentielle Vervielfältigung resultiert. Zu Beginn eines Reaktionszyklus wird bei einer Temperatur um 95°C die DNA hitzedenaturiert. Nach Abkühlung des Reaktionsgemisches auf etwa 50-70°C binden Oligonukleotide (Primer) an komplementäre Sequenzen auf den DNA-Einzelsträngen (Annealing). Eine thermostabile DNA-Polymerase polymerisiert im dritten Schritt ausgehend von den Primern den gewünschten DNA-Bereich. Als Temperatur wird das Arbeitsoptimum der Polymerase gewählt (etwa 68-72°C). Im Gegensatz zu der klassischen PCR, deren Reaktionsprodukte gelelektrophoretisch aufgetrennt werden, ermöglicht die real-time PCR eine relative Quantifizierung der Menge des Amplifikats in Echtzeit. Dazu werden DNA-Sonden dem Reaktionsansatz hinzugegeben, die sequenzspezifisch an die nachzuweisende DNA binden. Jede Sonde ist an ein Reporter-molekül gekoppelt, welches, durch Laserlicht angeregt, ein Fluoreszenzsignal erzeugt. Dieses wird zunächst durch die räumliche Nähe eines ebenfalls mit der Sonde verbundenen Quencher-moleküls unterdrückt. Erst während der Vervielfältigung des entsprechenden DNA-Abschnittes wird die Sonde von der DNA-Polymerase gespalten, sodass das Fluoreszenzsignal mithilfe einer Kamera detektiert werden kann. Um eine stabile Hybridisierung der Sonde zu gewährleisten, wird die

Extensionstemperatur in der Regel so niedrig gewählt, dass eine „2-step PCR“ mit nur zwei Temperaturniveaus durchgeführt wird.

Rückschlüsse auf die Ausgangskopienzahl der zu untersuchenden DNA können gezogen werden, indem ein Schwellenwert oberhalb des Hintergrundsignals festgelegt wird. Die Anzahl der Zyklen, die für eine Probe zur Überschreitung des Schwellenwertes benötigt wird, verhält sich dabei umgekehrt exponentiell zur Ausgangsmenge an DNA. Die Ergebnisse werden normiert, indem zusätzlich ein endogener Standard gemessen wird, der die Normalisierung der Proben erlaubt.

2.2.6.2. Durchführung

2.2.6.2.1. TaqMan® Low Density Arrays

Low Density Arrays erlauben die parallele Untersuchung einer Vielzahl von microRNAs auf Expressionsunterschiede und sollten deshalb dazu verwendet werden, um microRNAs zu identifizieren, die zur Genese einer Non-Response beitragen.

Zur Bestimmung der relativen microRNA-Expression wurden TaqMan® Array Human MicroRNA Cards v2.0 (Applied Biosystems) verwendet, wobei es sich um 384-Well-Platten handelt, in deren Wells die spezifischen Primer und DNA-Sonden zur Detektion der umgeschriebenen microRNAs vorgelegt sind. Die Arrays existieren als Versionen A und B, die sich hinsichtlich ihrer microRNA-Zusammensetzung unterscheiden, und können insgesamt 667 verschiedene humane microRNAs nachweisen. Wir verwendeten ausschließlich Arrays der Version A, welche 377 der am umfassendsten untersuchten humanen microRNAs detektieren können. Diese wurden daraufhin mit einem Gemisch aus je 400 µl des 20fach konzentrierten TaqMan® Universal Master Mix und 400 µl der cDNA der Patientenprobe befüllt, nachdem die cDNA mit den entsprechenden Primern aus Pool A revers transkribiert und präamplifiziert wurden. Die Expression wurde anschließend auf einem ABI Prism 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) mittels real-time PCR quantitativ gemessen. SDS 2.3 und RQ Manager Software (Applied Biosystems) wurden zum Auslesen der gemessenen Daten verwendet.

2.2.6.2.2. Individualassays

Individualassays dienen zur Verifizierung der Ergebnisse aus den zuvor durchgeführten Low Density Array Experimenten und verwenden im Gegensatz zu diesen schon während der reversen Transkription ein spezifisches Primerpaar, um eventuelle unspezifische Amplifikationen ausschließen zu können. Die Assays wurden nach Angaben des TaqMan® MicroRNA Assay-Protokolls (Applied Biosystems) durchgeführt. Pro Reaktionsansatz wurden 10 µl 20fach konzentrierter TaqMan® Universal Master Mix, 7,5 µl nukleasefreies Wasser

und 1,5 µl TaqMan® MicroRNA Assay Mix, der die für die zu untersuchende microRNA spezifischen Primer und DNA-Sonden beinhaltet, mit 1 µl cDNA vermischt (Tab. 6). Auf dem ABI Prism 7900HT Sequence Detection System wurde nach zweiminütiger Aktivierung der DNA-Polymerase bei 50°C das Reaktionsgemisch für 10 min auf 95°C erhitzt, gefolgt von 40 Zyklen mit je 15 sec bei 95°C und 1 min bei 60°C. Alle Proben wurden dreifach gemessen und die Messungen gemittelt.

Tabelle 6: Reaktionsansatz der real-time PCR für Individualassays.

20x konzentrierter TaqMan® Universal Master Mix	10 µl
TaqMan® MicroRNA Assay Mix	1,5 µl
Nukleasefreies Wasser	7,5 µl
cDNA	1 µl

2.2.6.2.3. Genexpressionsanalyse

Zur Untersuchung der Genexpression wurde zunächst 1 µl cDNA zu einem Gemisch aus 10 µl 20fach konzentriertem TaqMan® Universal Master Mix, 1 µl TaqMan® mRNA Assay Mix, die spezifischen Primer und DNA-Sonden enthaltend, und 8 µl nukleasefreiem Wasser gegeben (Tab. 7).

Tabelle 7: Reaktionsansatz der real-time PCR für Genexpressionsanalyse.

20x konzentrierter TaqMan® Universal Master Mix	10 µl
TaqMan® mRNA Assay Mix	1 µl
Nukleasefreies Wasser	8 µl
cDNA	1 µl

Auf dem ABI Prism 7900HT Sequence Detection System fand die Reaktion für 2 min bei 50°C, 10 min bei 95°C und 40 Zyklen mit je 15 sec bei 95°C und 1 min bei 60°C statt. Alle Proben wurden ebenfalls dreifach gemessen.

2.2.7. Statistische Auswertung

2.2.7.1. Low Density Arrays

Die Daten aus den Low Density Arrays wurden zu Beginn gegen die endogene Kontrolle Mammalian-U6-snRNA (MammU6) normalisiert. Es handelt sich dabei um eine kleine RNA, die im Zellkern lokalisiert ist und konstitutiv in allen kernhaltigen Zellen exprimiert wird. Die

Normalisierung wurde mit der Partek Genomics Suite Software (Partek Incorporated, St. Louis, USA) durchgeführt. Wegen der geringeren Aussagekraft bei höheren C_t -Werten wurde ein Cut-Off-Wert von 35 Zyklen festgelegt. Alle microRNAs mit einem höheren C_t -Schwellenwert wurden aus der Studie ausgeschlossen. Für die verbleibenden microRNAs wurde zwischen den Patientenkollektiven Responder versus Non-Responder vor Therapiebeginn die relative Expressionsniveaudifferenz mit dem $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Verfahren berechnet (Abb. 1) [143]. Dieses Verfahren beruht auf der Überlegung, dass sich mit jedem PCR-Zyklus, eine hundertprozentige Effizienz der PCR-Reaktion vorausgesetzt, die Kopienzahl der amplifizierten DNA verdoppelt. Für eine normalisierte Probe ergibt sich folglich eine Proportionalität zwischen $2^{-\Delta C_t}$ -Wert (wobei $\Delta C_t = C_{t(\text{Probe})} - C_{t(\text{endogene Kontrolle})}$) und Startkopienzahl, die dazu genutzt wurde, die Mediane der $2^{-\Delta C_t}$ -Werte der Patientenkollektive zu vergleichen ($2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Wert). Im Anschluss wurde mit SPSS v19.0 (IBM, Armonk, USA) ein Mann-Whitney-U-Test durchgeführt, um die Signifikanzen der gemessenen relativen Expressionsniveaudifferenzen der microRNAs zu ermitteln. Aufgrund der unterschiedlichen Herkunft des Probenmaterials (aus peripherem Blut oder Knochenmark) wurde neben der gemeinsamen jeweils eine separate Betrachtung durchgeführt. Zur weiteren Überprüfung wurden statistisch signifikante microRNAs mit nicht-adjustierten p-Werten $< 0,01$ ausgewählt.

2.2.7.2. Individualassays

Individualassays wurden für eine Auswahl der in den Low Density Arrays untersuchten signifikant differentiell exprimierten microRNAs durchgeführt, um die Signifikanz der Ergebnisse zu bestätigen. Die Normalisierung erfolgte gegen MammU6-snRNA. Es wurden wiederum die relativen Expressionsniveaudifferenzen zwischen den oben genannten Patientenkollektiven ermittelt und die Signifikanz mit einem Mann-Whitney-U-Test berechnet. Auch bei diesem Versuch wurde für alle Proben die Herkunft des Probenmaterials gesondert berücksichtigt.

2.2.7.3. Genexpressionsanalyse

Im Gegensatz zu den vorigen Experimenten wurde mit der Genexpressionsanalyse die Expression ausgewählter mRNAs, die für Transporter (ABCB1, ABCG2 und SLC22A1) und Defensine (DEFA1-3, DEFA4) kodieren, untersucht. Die Normalisierung erfolgte hierbei gegen die mRNA des ACTB-Gens, welches für β -Aktin, eines ubiquitär in allen eukaryoten Zellen exprimierten Strukturproteins, kodiert. In Analogie wurden daraufhin zwischen oben genannten Patientenkollektiven die relativen Expressionsniveaudifferenzen und mittels Mann-Whitney-U-Testes die Signifikanz bestimmt.

2.2.8. ROC-Analyse

Die Ergebnisse der Individualassays wurden verwendet, um mit einer *receiver operator characteristic* (ROC)-Kurven-Analyse die Trennschärfe eines diagnostischen Tests zur Einteilung der Patienten in Responder und Non-Responder zu bestimmen. Diese Analyse wurde mit dem Paket ROCR des Statistikprogrammes R durchgeführt [144,145].

Ausgehend von den Expressionswerten der microRNAs (C_t -Werte) werden für jeden Punkt die relativen Häufigkeitsverteilungen in Form von Sensitivität und 1 - Spezifität ermittelt und graphisch dargestellt. Zudem wurden die microRNAs mathematisch zusammengefasst, da Biomarker, die aus mehreren Parametern bestehen, als störunanfälliger gelten. Die Zusammenfassung erfolgte, indem die Expressionswerte herunterregulierter microRNAs von denen hochregulierter microRNAs subtrahiert wurden.

Um Aussagen über die Qualität der microRNAs zur diagnostischen Testung zu treffen, wurde die *area under the curve* (AUC) entsprechend der Wahrscheinlichkeit, dass Patienten häufiger der richtigen als der falschen Gruppe zugeordnet werden, für die jeweiligen microRNAs berechnet. Ebenfalls berechnet wurden Sensitivität und Spezifität für einen optimalen Cut-Off-Wert. Dieser wurde ermittelt, indem für jeden Punkt der ROC-Kurve die Distanz zum Punkt P(0|1) (entsprechend 100% Signifikanz und 100% Spezifität) berechnet und der Punkt mit der minimalen Distanz ausgewählt wurde.

2.2.9. Target Gene Prediction

Nachdem durch die Individualassays differentiell exprimierte microRNAs bestätigt wurden, sollte im nächsten Schritt die mögliche biologische Funktion dieser microRNAs näher betrachtet werden. Zu diesem Zweck wurde zunächst für jede Kandidaten-microRNA eine *in-silico*-Suche nach Zielgenen durchgeführt. Für die Suche wurden die Algorithmen TargetScan 6.1 [91,146,147], Diana microT 5.0 [148] und PicTar 2.0 [149] verwendet. Die Algorithmen durchsuchen das Genom nach konservierten Bindestellen von 7 bis 8 Nukleotiden Länge, die komplementär zur *seed region* der jeweiligen microRNA sind, berücksichtigen dabei aber auch andere Faktoren wie evolutionäre Konservierung der *seed*-Regionen, wodurch sie alternativen Algorithmen überlegen sind [150]. Zielgene, die von mindestens zwei der Algorithmen vorhergesagt wurden, wurden bei der anschließenden funktionellen Analyse berücksichtigt.

2.2.10. Funktionelle Analyse

Zur Einordnung der Liste der putativen Zielgene in einen biologischen Kontext wurde die Datenbank *Database for Visualization and Integrated Discovery* (DAVID) verwendet [151,152]. Nachdem die zu untersuchende Genliste in die Datenbank geladen wurde, erfolgte die Verknüpfung der Gene mit Informationen über ihre biologische Funktion. Durch das „Functional Annotation Clustering“ wurden die Gene gruppiert und die Anreicherung der Gruppen gegenüber dem Hintergrund des humanen Genoms berechnet. Dabei wurden funktionelle Gruppen berücksichtigt, in denen mindestens drei Gene enthalten sind und die einen EASE-Wert nach Bonferroni-Korrektur von unter 0,01 haben. Der EASE-Wert wird von DAVID berechnet und entspricht einem modifizierten p-Wert, berechnet mit dem exakten Test nach Fisher. In einem zweiten Schritt wurden die Gene unter Zuhilfenahme der Datenbank *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) [153] zellulären Signaltransduktionswegen zugeordnet, in denen sie mit statistischer Signifikanz involviert sind (EASE-Wert < 0,01).

3. Ergebnisse

3.1. Differentielle microRNA-Expression in Respondern und Non-Respondern

Hauptziel dieser Studie war es, microRNAs zu identifizieren, die eine unterschiedliche Expression zwischen Respondern und Non-Respondern der Imatinibtherapie der CML aufweisen und dadurch an einer Resistenzentstehung beteiligt sein sowie als Prädiktoren für ein Therapieansprechen fungieren könnten. Im ersten Schritt wurden deshalb mit einer MicroRNA-Array-unterstützten Analyse die Expressionsprofile von 377 der häufigsten microRNAs bestimmt.

Hierzu wurden für jede Patientenprobe die Expression aller 377 der durch die TaqMan® Array Human MicroRNA Cards v2.0 Version A von Applied Biosystems detektierbaren microRNAs mittels real-time PCR-Verfahren bestimmt. Die ermittelten Expressionsprofile wurden im Anschluss auf Unterschiede in Abhängigkeit vom Therapieansprechen untersucht, dabei wurden insgesamt drei Vergleiche durchgeführt und jeweils die relative Expressionsdifferenz der microRNAs bestimmt. Im Folgenden bezieht sich diese relative Expressionsdifferenz auf die Expression in Non-Responder-Proben im Vergleich zu Responder-Proben. Eine positive relative Expressionsdifferenz bedeutet daher eine erhöhte, eine negative eine verminderte Expression in Non-Respondern.

Zunächst erfolgte der Vergleich zwischen der Gesamtheit aller Responder- und Non-Responder-Proben. Da das untersuchte Probenmaterial teils aus Knochenmark und teils aus peripherem Blut gewonnen wurde und davon auszugehen ist, dass sich die zelluläre Zusammensetzung und insbesondere der Anteil der malignen Zellen abhängig vom Gewebetyp unterscheidet, wurden zwei gewebespezifische Untervergleiche durchgeführt.

Im Vergleich aller Patientenproben unabhängig von der Gewebeherkunft konnten 8 hoch- und 5 herunterregulierte microRNAs mit einem nicht-adjustierten p-Wert kleiner als 0,05 identifiziert werden. Die größte positive Expressionsdifferenz weist die miR-133a auf, sie wird in Non-Respondern 6,45-fach höher exprimiert als in Respondern. Im Gegensatz dazu wird die miR-888 2,5-fach mehr in Responder-Proben exprimiert. Der p-Wert variiert zwischen minimal 0,0048 für die miR-331-5p und 0,049 für die miR-133a. Sechs microRNAs (miR-133a, miR-449, miR-1, miR-331-5p, miR-193a-3p und miR-365a-3p, in Abb. 1 durch einen Stern gekennzeichnet) wurden aufgrund ihrer hohen relativen Expressionsdifferenz und hohen Signifikanz als Kandidaten-microRNAs identifiziert und für die anschließenden Bestätigungsversuche vorgesehen.

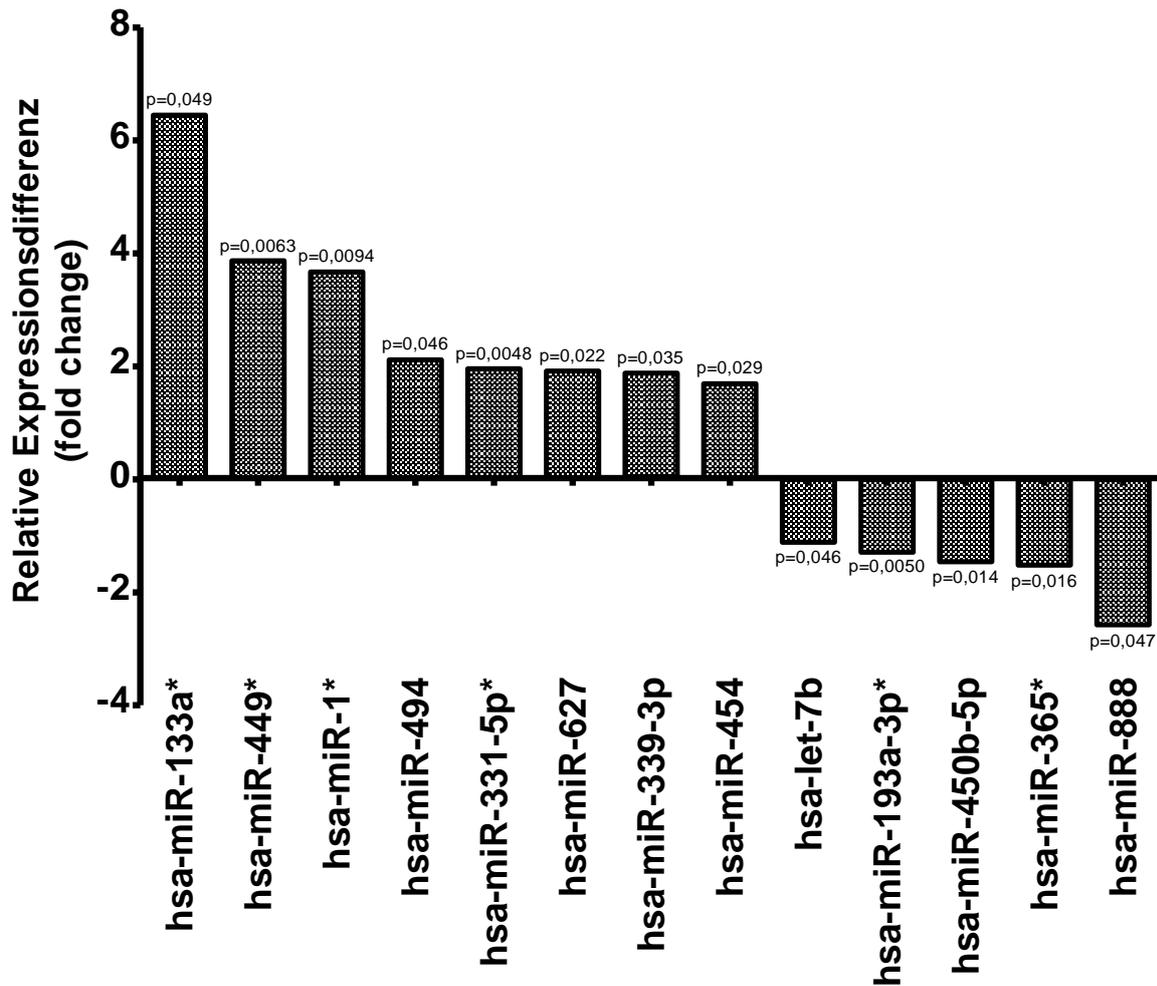


Abbildung 1: Relative Expressionsdifferenz (fold change) signifikant dysregulierter microRNAs ($p < 0.05$) in Non-Respondern im Vergleich zu Respondern. Mit einem Stern gekennzeichnete microRNAs wurden zur weiteren Analyse ausgewählt.

Aufgrund der unterschiedlichen Herkunft des Probenmaterials aus Knochenmarksproben beziehungsweise aus peripheren Blutproben wurden separate Vergleiche durchgeführt, um potenzielle weitere Kandidaten-microRNAs ebenfalls berücksichtigen zu können. Knochenmarksproben lagen von 14 Respondern und 3 Non-Respondern vor. Es fanden sich 14 herabregulierte microRNAs mit einem nicht-adjustierten p-Wert kleiner als 0,05 (Abb. 2). Die relative Expressionsdifferenz betrug zwischen -1,99 und -15,42. Die microRNAs miR-130a (Relative Expressionsdifferenz -7,82, p-Wert 0,047) und miR-142-5p (Relative Expressionsdifferenz -8,62, p-Wert 0,032) wurden für die folgenden Bestätigungsversuche ausgewählt.

Knochenmarksproben

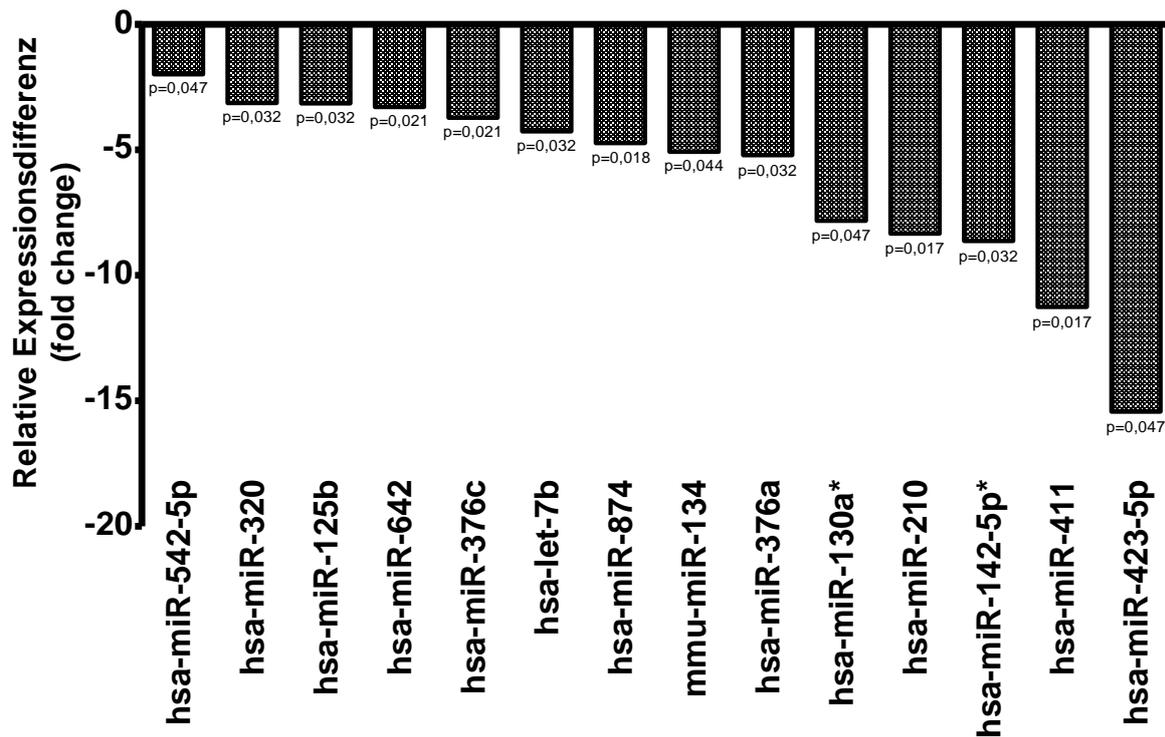


Abbildung 2: Relative Expressionsdifferenz (fold change) signifikant dysregulierter microRNAs ($p < 0,05$) im Vergleich der Knochenmarksproben. Mit Stern markierte microRNAs wurden zur weiteren Analyse ausgewählt.

Von 12 Respondern und 16 Non-Respondern lagen periphere Blutproben vor. Abb. 3 zeigt 2 hochregulierte und 6 herabregulierte microRNAs mit einem nicht-adjustierten p-Wert kleiner als 0,05 in diesen Proben. Die relative Expressionsdifferenz variierte zwischen maximal 2,48 (miR-636) und minimal -2,81 (miR-888). Für Folgeversuche wurden 5 microRNAs ausgewählt (miR-636, miR-331-5p, miR-193a-5p, miR-365a-3p und miR-142-5p).

Periphere Blutproben

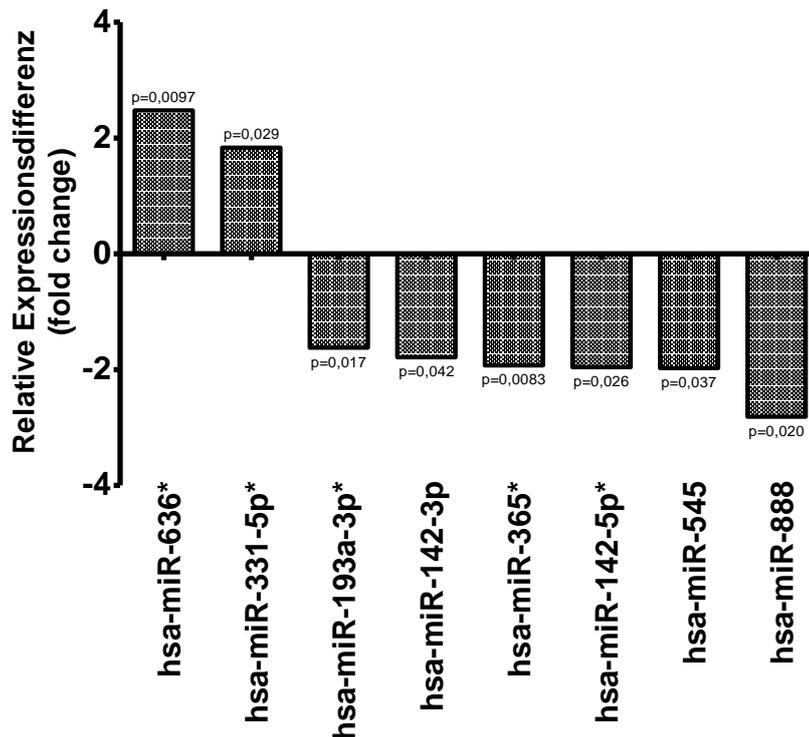


Abbildung 3: Relative Expressionsdifferenz (fold change) signifikant dysregulierter microRNAs ($p < 0,05$) im Vergleich der peripheren Blutproben. Mit Stern markierte microRNAs wurden zur weiteren Analyse ausgewählt.

3.2. Bestätigung der differentiellen microRNA-Expression mittels Individualassays

In den zuvor beschriebenen Ergebnissen des MicroRNA-Arrays wurden die nicht-adjustierten p-Werte angegeben. Da jedoch multiple Hypothesen getestet wurden, erscheint eine Korrektur des p-Wertes notwendig. Berechnet man beispielsweise die False Discovery Rate (FDR), welche das Verhältnis aller fälschlicherweise positiven Tests im Verhältnis zu allen signifikanten Tests darstellt, können keine signifikanten Expressionsunterschiede mehr nachgewiesen werden. Daher wurden die aus dem Vorversuch nach den Kriterien hoher relativer Expressionsunterschied und niedriger p-Wert identifizierten neun microRNAs (miR-1, miR-130a, miR-133a, miR-142-5p, miR-193a-3p, miR-331-5p, miR-365a-3p, miR-449, miR-636) mit Individualassays zur Bestätigung erneut analysiert. Methodisch wird im Gegensatz zum Screening-Array bereits bei der reversen Transkription ein für die zu untersuchende microRNA spezifisches Primerpaar verwendet, um unspezifische Amplifikationen auszuschließen. Im Anschluss wird mit dem Assay das Expressionsprofil dieser microRNA bestimmt. Dabei konnten für 3 microRNAs die Resultate aus dem

Vorversuch bestätigt werden. Es handelt sich um microRNA-1 mit einer 3,94-fach höheren Expression in Non-Respondern ($p=0,0359$), miR-142-5p (1,75-fach niedrigere Expression in Non-Respondern, $p=0,0098$) und miR-365a-3p (1,84-fach niedrigere Expression in Non-Respondern, $p=0,0199$) (Abb. 4).

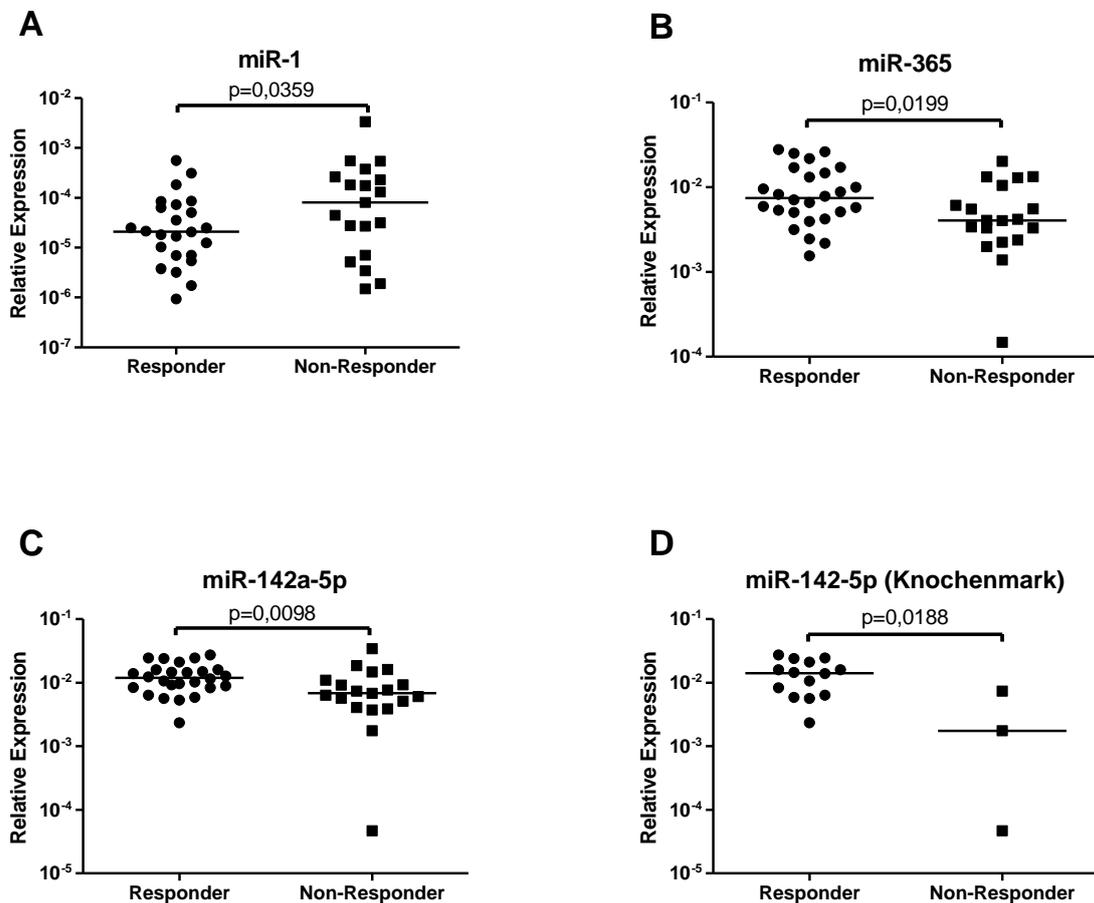


Abbildung 4: Ergebnisse der Individualassays. **A-C** Vergleiche der 3 signifikant differentiell exprimierten microRNAs miR-1, miR-142-5p und miR-365a-3p. **D** Vergleich der Knochenmarksproben für miR-142-5p.

Unter Berücksichtigung der Herkunft des Probenmaterials fand sich im Vergleich der Knochenmarksproben ein signifikanter Expressionsunterschied der microRNA miR-142-5p (8,11-fach niedrigere Expression in Non-Respondern, $p=0,0188$). Der Vergleich peripherer Blutproben konnte keine signifikant differentiell exprimierte microRNA identifizieren.

3.3. ROC-Analyse

Um die Diskriminationsfähigkeit der gefundenen microRNAs im Hinblick auf ihre Verwendung als potenzielle Biomarker zu überprüfen, wurde eine *receiver operating characteristic*-Analyse durchgeführt. Abbildung 5 stellt sowohl die ROC-Analysen für jede der drei microRNAs dar, als auch einen gemeinsamen Graphen, der sich aus Zusammenfassung der Expressionswerte der microRNAs ergab.

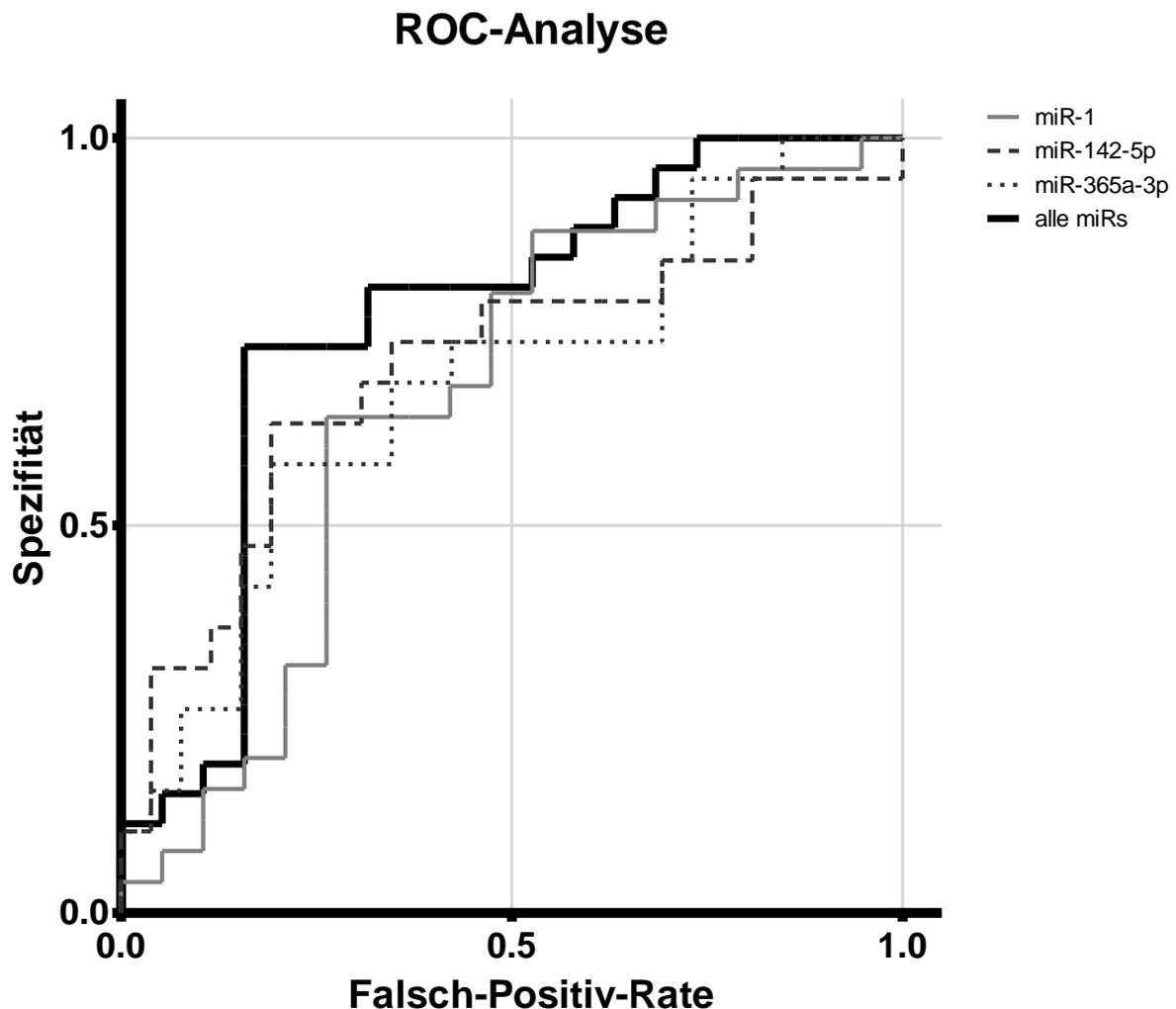


Abbildung 5: Receiver Operator Characteristic (ROC)-Kurven für einzelne und die Kombination der drei Kandidaten-microRNAs.

Bereits in der Grafik zeigt sich, dass die microRNAs einzeln betrachtet vergleichbare Testeigenschaften aufweisen und die Fläche unter dem Graphen der zusammengefassten Daten im Vergleich am größten ist.

Um genauere Aussagen über die Qualität der microRNAs zur diagnostischen Testung zu treffen, wurde die *area under the Curve* (AUC) entsprechend der Wahrscheinlichkeit, dass

Patienten häufiger der richtigen als der falschen Gruppe zugeordnet werden, für die jeweiligen microRNAs berechnet (Tab. 8). Ebenfalls angegeben sind Sensitivität und Spezifität für einen optimalen Cut-Off-Wert.

Tabelle 8: AUC, optimaler Cut-Off-Wert, Sensitivität und Spezifität der microRNAs.

	<i>miR-1</i>	<i>miR-142-5p</i>	<i>miR-365a-3p</i>	<i>alle miRs</i>
AUC (%)	63,79	70,65	68,22	76,32
Cut-Off (C_t)	15,29	7,03	7,90	0,97
Sensitivität (%)	60	63,16	57,89	73,08
Spezifität (%)	73,68	80,77	80,77	84,21

Die drei untersuchten microRNAs weisen ähnliche Testeigenschaften auf. Die AUC beträgt zwischen 64 % (miR-1) und 70 % (miR-142-5p). Die Sensitivität beträgt in allen Fällen ungefähr 60 %, die Spezifität etwa 80 % (miR-1: 74%). Nach mathematischer Zusammenfassung der drei microRNAs wird eine AUC von 76 % erreicht, die Sensitivität ist auf 73% und die Spezifität auf 84 % gesteigert. Eine korrekte Klassifizierung eines Patienten als Responder oder Non-Responder ist diesen Ergebnissen zufolge durch Bestimmung der Expressionsprofile oben genannter microRNAs in etwa 76 % der Fälle möglich.

3.4. Target Prediction der identifizierten microRNAs

In den folgenden Schritten sollte der Frage nachgegangen werden, welche biologische Funktionen die genannten microRNAs erfüllen könnten und ob sich ein Zusammenhang mit der Pathogenese der CML und dem Ansprechen auf eine Imatinib-Therapie herstellen lässt. Dazu wurden putative Zielgene der drei microRNAs durch eine *in silico-Target Prediction* ermittelt und daraufhin untersucht, welche funktionellen Cluster aller Zielgene gegenüber dem Hintergrund des humanen Genoms überrepräsentiert sind.

Für die miR-1 wurden 1831 potentielle Zielgene identifiziert und mit der DAVID-Datenbank analysiert. Eine Übersicht über die 10 am signifikantesten angereicherten Cluster zeigt Abb. 6. Die Ionenbindung, insbesondere von Zinkionen, die Regulation der Transkription und Genexpression sowie auch Proteinkinaseaktivität und Proteinlokalisierung und -transport sind wichtige Funktionen eines Großteils der Zielgene.

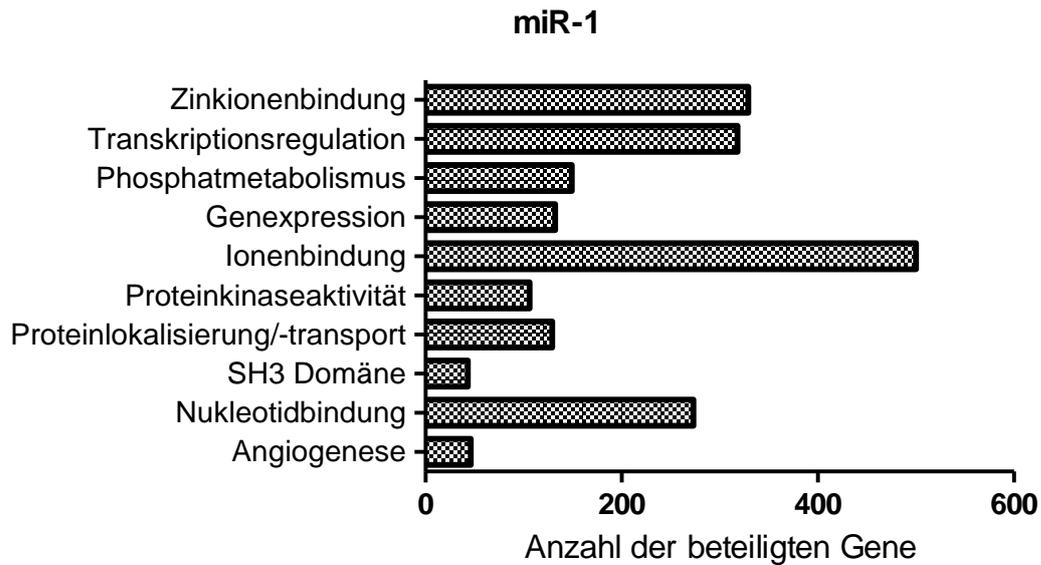


Abbildung 6: Übersicht der 10 Cluster mit der höchsten Anreicherung an Zielgenen der miR-1 ($p < 0.01$).

Für die miR-142-5p wurden 2727 mögliche Zielgene ermittelt, die ebenfalls hauptsächlich an Ionenbindung und Transkriptionsregulation beteiligt sind (Abb. 7).

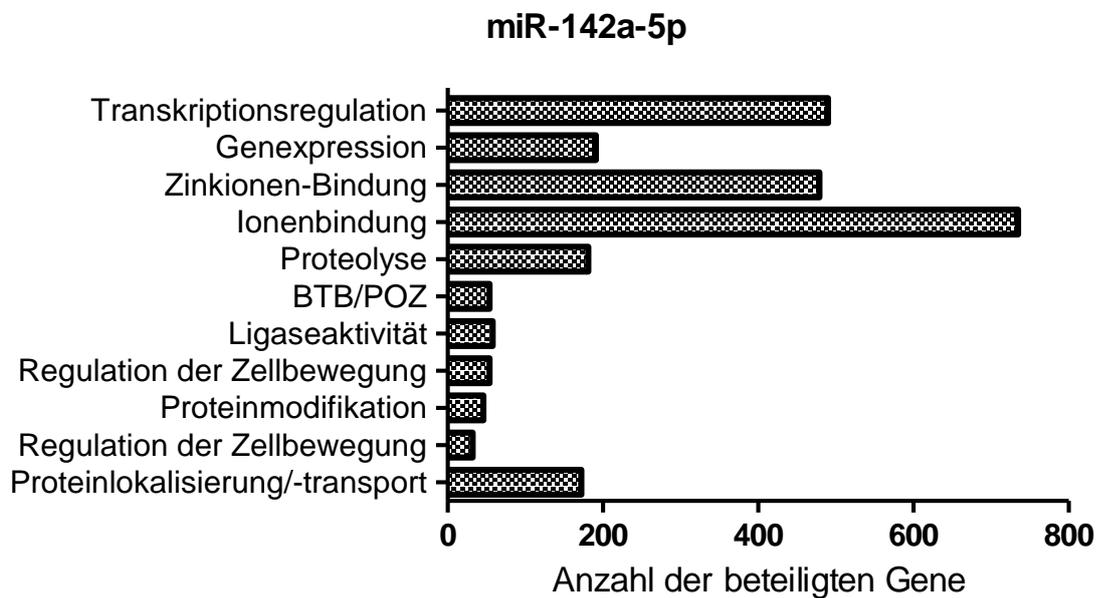


Abbildung 7: Übersicht der 10 Cluster mit der höchsten Anreicherung an Zielgenen der miR-142-5p ($p < 0.01$).

Die Anzahl der putativen Zielgene der miR-365a-3p beläuft sich auf 1351. Hier steht die Transkriptionsregulation, von der Zinkionenbindung abgesehen, deutlich im Vordergrund, gefolgt von Phosphatmetabolismus und positiver Regulation der Genexpression (Abb. 8).

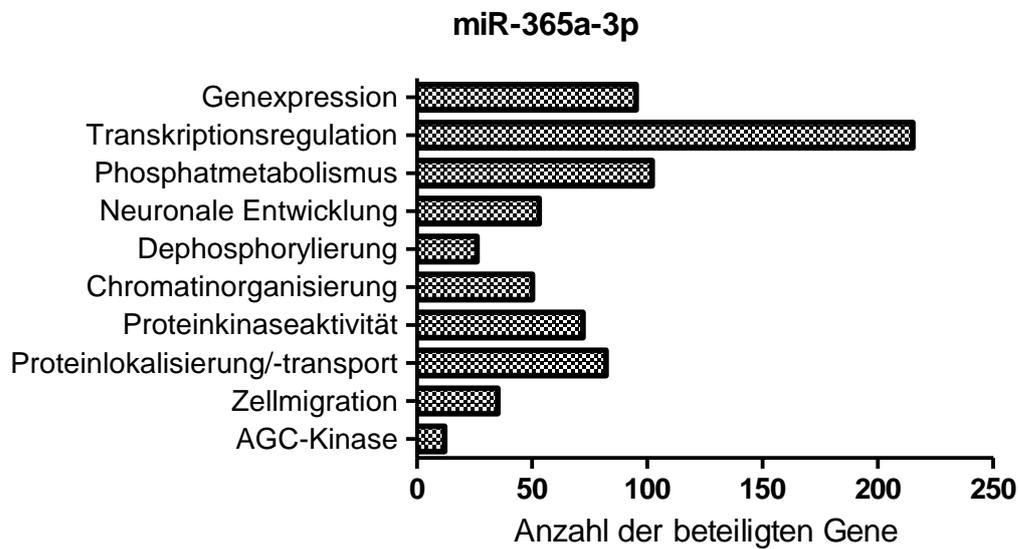


Abbildung 8: Übersicht der 10 Cluster mit der höchsten Anreicherung an Zielgenen der miR-365a-3p ($p < 0.01$).

Im Anschluss an das funktionelle Clustering wurde das Augenmerk auf Signaltransduktionswege gelegt, in denen die Zielgene der drei microRNAs angereichert vorkommen und entsprechend involviert sind. Eine funktionelle Analyse mit DAVID und KEGG offenbarte, dass die Gene neben zellulären Prozessen an vielen Krebs- und Signaltransduktionswegen beteiligt sind (Abb. 9).

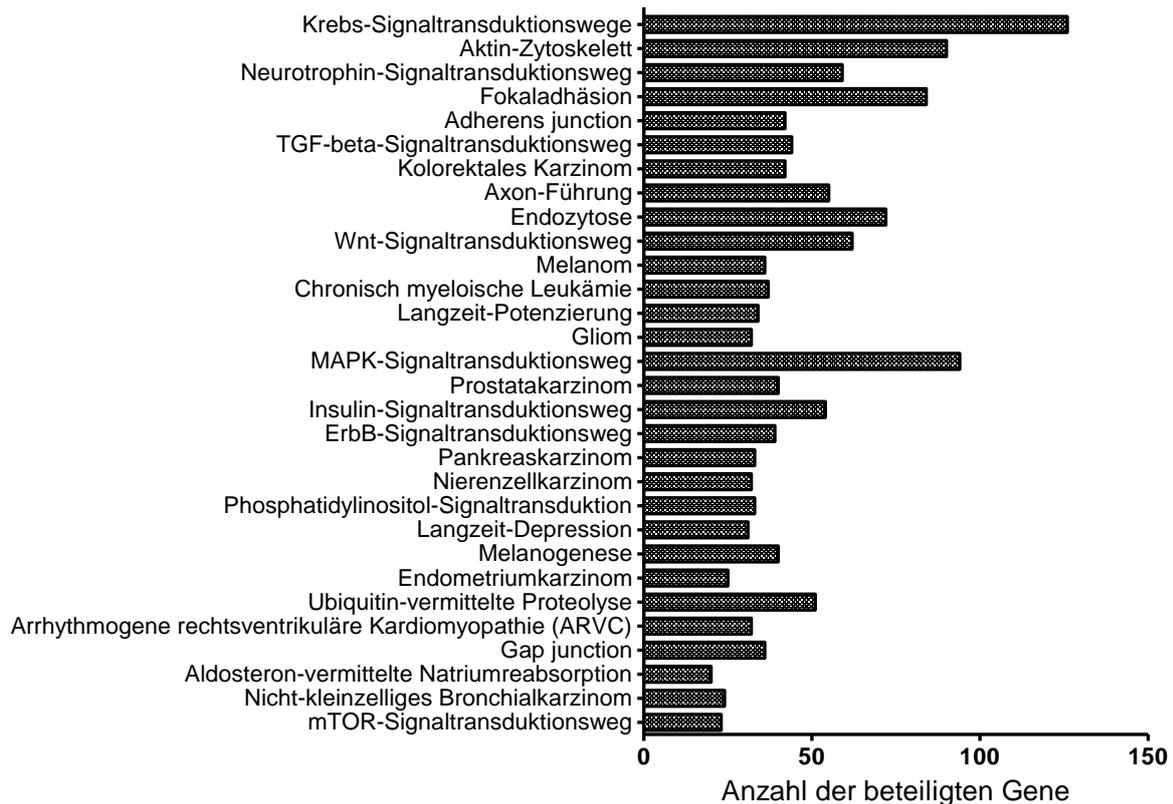


Abbildung 9: Übersicht über signifikant angereicherte der durch die Zielgene aller Kandidaten-miRs beeinflussten zellulären Prozesse ($p < 0.01$).

Für den Überbegriff „Krebspathways“ finden sich 126 potenziell involvierte Gene, allein für CML sind es 37 (Tab. 9, Abb. 10).

Tabelle 9: Zielgene der Kandidaten-microRNAs, die am CML-Signalweg beteiligt sind.

microRNA	Zielgene, beteiligt am CML-Signaltransduktionsweg
miR-1	CTBP2, CBL, CBLB, GAB2, SMAD4, CCND1, CDK6, MECOM, MAPK3, MAPK1, PIK3CB, PIK3R3, PIK3R5, RUNX1, SOS1, TGFB1, KRAS, CRK, BRAF
miR-142-5p	CTBP2, CBLB, SHC4, SMAD3, SMAD4, ACVR1C, ABL1, CCND1, CDK6, MECOM, MAPK1, MAP2K1, NRAS, PIK3CB, PIK3CD, SOS1, TGFB2, TGFB1, TGFB2, KRAS, AKT3, CRK, BRAF
miR-365a-3p	E2F2, SHC1, CCND1, CDK6, CDKN1A, HDAC2, MAPK1, PIK3R3, PTPN11, RB1, SOS1, TGFB3, TGFB1, KRAS, AKT3, CRKL

Auch andere Krebsarten wie das kolorektale Karzinom (42 betroffene Gene), Melanom, Gliom, Prostata- (40), Pankreas-, Nierenzell-, Endometrium und Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom sind mit Zielgenen assoziiert. Davon abgesehen sind zahlreiche Signaltransduktionswege wie mTOR, Wnt, TGF- β , MAPK, Insulin, ErbB und Phosphatidylinositol repräsentiert, die wiederum entscheidende Bedeutung für die Proliferationsregulation von Zellen aufweisen und somit durch Dysregulation auch onkogen wirken können.

3.5. Differenzielle mRNA-Expression von Respondern und Non-Respondern

Der letzte Versuch sollte zeigen, ob es auf mRNA-Ebene Expressionsunterschiede zwischen Imatinib-Respondern und -Non-Respondern gibt. Dazu wurde unter der Annahme, dass durch Dysregulation der Expression von Transportproteinen eine Imatinib-Resistenz begünstigt werden könnte, die Expression der Transportproteine ABCB1, ABCG2 und SLC22A1 bestimmt und zwischen den Gruppen verglichen. Zudem wurden die Defensine DEFA1-3 und DEFA4 untersucht, da diese an der Immunabwehr beteiligten Proteine offenbar eine unterschiedliche Expression zwischen Respondern und Non-Respondern aufweisen und als Biomarker für ein Therapieansprechen bereits vorgeschlagen wurden [154]. Weder für Transporter (Abb. 11) noch für Defensine (Abb. 12) konnte dabei ein signifikanter Expressionsunterschied festgestellt werden. Dies galt auch unter Berücksichtigung der Herkunft des Probenmaterials aus Knochenmark bzw. peripherem Blut (vergleichbare Ergebnisse, nicht gezeigt).

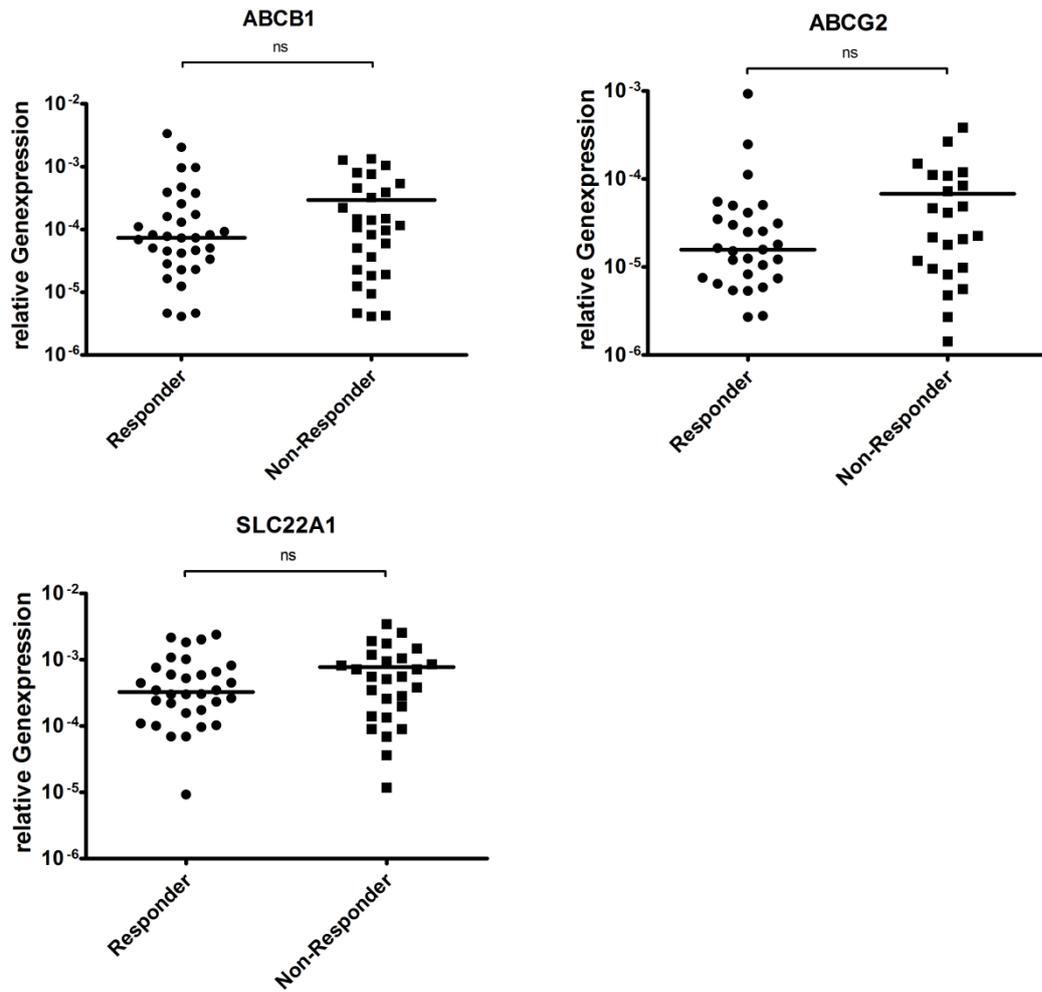


Abbildung 11: Vergleich der mRNA-Expressionsniveaus ausgewählter Transportproteine zwischen Respondern und Non-Respondern.

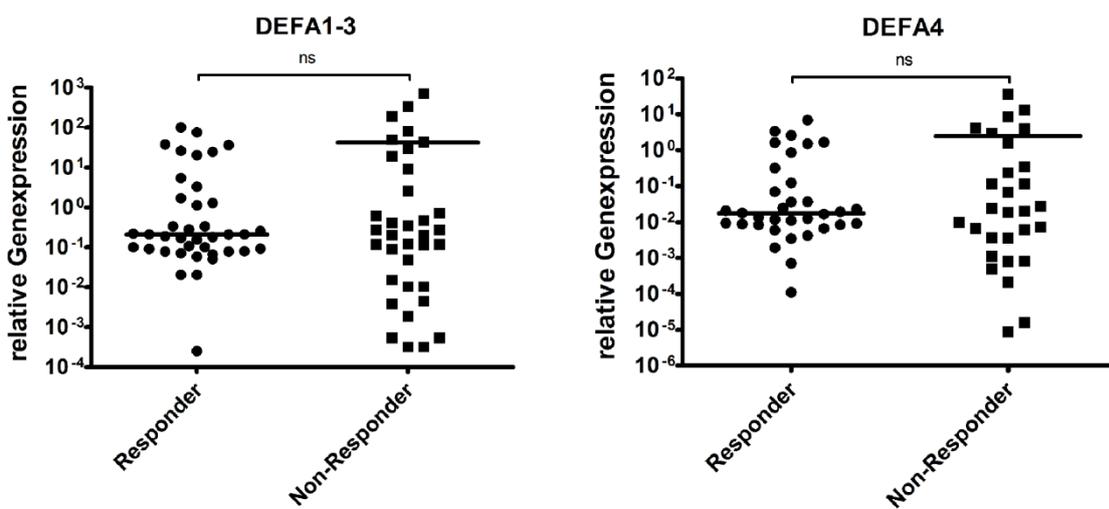


Abbildung 12: Vergleich der mRNA-Expressionsniveaus zweier α -Defensine zwischen Respondern und Non-Respondern.

Mithilfe von Probenmaterial aus einer kleineren Patientenkohorte, bestehend aus 9 Patienten, konnten die mRNA-Expressionsniveaus vor Beginn der Therapie mit Folgeproben, die nach 4 bis 15 Monaten Therapie gewonnen wurden, verglichen werden, was eine Aussage über den Einfluss der Imatinibbehandlung auf die Genexpression erlaubt. Bei diesem Vergleich zeigte sich nicht für ABCG2, jedoch für ABCB1 und SLC22A1 eine signifikante Steigerung der Genexpression um das 6,5-fache ($p = 0,0023$) beziehungsweise das 3,1-fache ($p = 0,0027$) nach Initiierung der Imatinibtherapie (Abb. 13). Die Defensinexpression nahm dagegen hochsignifikant ab, für DEFA1-3 um das 97-fache ($p < 0,001$) und für DEFA4 um das 252-fache ($p < 0,001$) (Abb. 14).

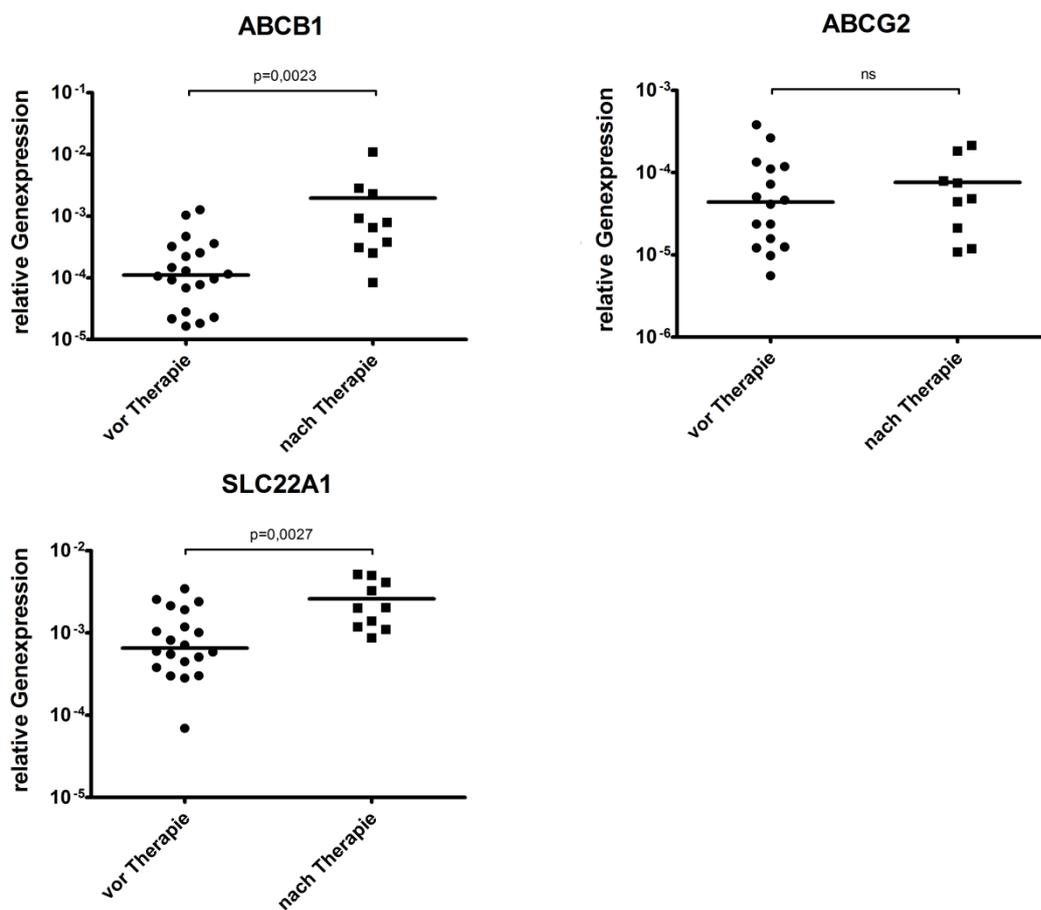


Abbildung 13: Vergleich der mRNA-Expressionsniveaus ausgewählter Transportproteine vor und nach Initiierung einer Imatinibtherapie.

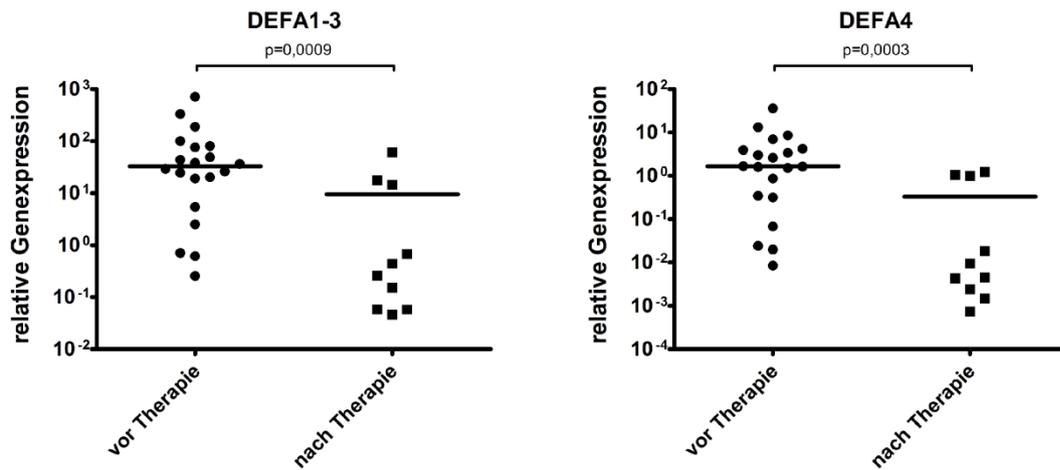


Abbildung 14: Vergleich der mRNA-Expressionsniveaus zweier α -Defensine vor und nach Initiierung einer Imatinibtherapie.

4. Diskussion

Die vorliegende Studie hat sich mit den Unterschieden der Expression von microRNAs sowie mRNAs in Abhängigkeit von der Response auf eine Imatinibbehandlung bei CML befasst. Dabei wurden drei signifikant unterschiedlich exprimierte microRNAs (miR-1, miR-142-5p und miR-365a-3p) gefunden, mit denen mit etwa 76-prozentiger Wahrscheinlichkeit die richtige Einordnung einer Patientenprobe in Responder oder Non-Responder vorgenommen werden konnte.

Die durch eine *in-silico*-Analyse ermittelten Zielgene dieser microRNAs sind vorwiegend an Regulationsvorgängen von Transkription und Genexpression sowie an Ionenbindung im Allgemeinen und insbesondere Zinkionenbindung beteiligt. Zudem sind die Zielgene in Krebs- und Signaltransduktionswegen, unter anderem in TGF- β -, WNT- und mTOR-Signaltransduktionswegen, angereichert. Allein 37 der Gene sind mit CML assoziiert.

Die Untersuchung der Expressionsprofile ausgewählter Transportproteine und Defensine im Vergleich zwischen Respondern und Non-Respondern offenbarte keine signifikanten Unterschiede. Allerdings konnte gezeigt werden, dass die Expression zweier Transporter (ABCB1 und hOCT1) im Laufe der Imatinibbehandlung zu- und die der Defensine abnahm.

4.1. MicroRNAs und Krebs

Die Bedeutung von microRNAs im Zusammenhang mit Krebserkrankungen wurde erstmals durch die Entdeckung spezifisch deletierter microRNA-Gene bei der Leukämie ersichtlich [133]. Inzwischen wurden in sehr vielen Krebsarten aberrant exprimierte microRNAs beschrieben [135]. Einige microRNAs beeinflussen nach neuen Erkenntnissen wichtige krebsassoziierte Signaltransduktionsmoleküle wie solche der p53-Familie [155,156], Retinoblastom (Rb) [157] und epidermal growth factor receptor (EGFR) [158]. MicroRNAs können durch Überexpression Tumorsuppressoren inhibieren und so als Onkogene fungieren, oder umgekehrt durch verminderte Expression Onkogene negativ regulieren und damit selbst tumorsuppressiv wirken [159-161]. Durch die vielfältigen Einflüsse, welche microRNAs auf Krebsart und -stadium, Ansprechen, Behandlung und Prognose haben, wird ihr Potenzial als Biomarker deutlich [162-167].

Für CML-Zellen wurde im Vergleich zu gesunden Proben eine abnormale Expression mehrerer microRNAs beschrieben (z.B. miR-15a, miR-16, miR-142-5p, miR-155, miR-181, miR-221, let7a und miR-17-92) [168-170]. In zwei Studien wurden die

Expressionsunterschiede zwischen bisher unbehandelten Respondern und Non-Respondern bei einer Imatinibtherapie untersucht. Bei dem Vergleich von 5 Respondern und 3 Non-Respondern ohne klinisch signifikante Mutationen wurden durch eine Studie 18 in Non-Respondern herunterregulierte (miR-7, miR-23a, miR-26a, miR-29a, miR-29c, miR-30b, miR-30c, miR-100, miR-126, miR-134, miR-141, miR-183, miR-196b, miR-199a, miR-224, miR-326, miR-422b und miR-520a) und eine hochregulierte microRNA (miR-191) identifiziert [171]. Eine weitere Studie mit 9 Patienten fand eine herunterregulierte microRNA (miR-181c) [172].

Ein Vorteil der hier durchgeführten Studie ist die im Gegensatz zu den genannten Arbeiten höhere Fallzahl mit 45 Patienten, davon 26 Respondern und 19 Non-Respondern. Es konnten einige Kandidaten-microRNAs gefunden werden, von denen sich die miR-1, miR-142-5p und miR-365a-3p als differentiell exprimierte microRNAs bestätigten, deren Assoziationen mit dem Therapieerfolg bzw. -misserfolg bisher noch nicht beschrieben wurden. Alle entdeckten microRNAs haben bekannte Einflüsse auf Tumorgenese und -progression in verschiedenen Krebsarten, wie im Folgenden beschrieben wird.

miR-1

Die miR-1 ist eine 22-nt lange microRNA, die in diversen Studien als muskelspezifische sogenannte myomiR charakterisiert wurde, welche hauptsächlich in Herz- und Skelettmuskulatur exprimiert wird [173,174]. Eine wichtige Funktion besteht in der Steuerung der Entwicklung des Herzens, wobei eine Dysregulation in dieser Phase zu schweren Entwicklungsfehlern führt [175,176]. Untergang von Herzmuskelgewebe im Rahmen eines Myokardinfarktes, Herzrhythmusstörungen und Herzinsuffizienz sind assoziierte Krankheiten, die zu vermehrter Freisetzung von miR-1 führen [177-181].

Für eine Vielzahl von Krebsarten ist eine aberrante Regulation beschrieben worden, in der Mehrheit der Fälle fand sich die miR-1 im Sinne einer tumorsuppressiven microRNA in entarteten Zellen herunterreguliert (Tab. 10).

Ektopische Expression von miR-1 inhibiert Zellwachstum und Invasion von Krebszellen, induziert Apoptose und kann einen Arrest des Zellzyklus herbeiführen [182-196]. *In vivo* wurde die tumorsuppressive Wirkung für Lungenkrebs und Rhabdomyosarkom in xenotransplantierten Mäusen nachgewiesen [184,185].

Eine Ausnahme bilden maligne, hämatologische Erkrankungen. Analog zu den Ergebnissen unserer Studie wurde in akute myeloide Leukämie (AML)-Zelllinien eine Überexpression von miR-1 als Hinweis auf eine onkogene Förderung der Zellproliferation gefunden [197]. Im

Gegensatz zu der üblicherweise verminderten Expression von miR-1 wurde in einer weiteren Studie eine spezifische Überexpression in Multiples-Myelom-Zellen festgestellt [198].

MiR-1 zirkuliert nach Herzinfarkt vermehrt im Blut, da sie hauptsächlich durch Myozyten freigesetzt wird [177-179], die Serumkonzentration kann aber zum Beispiel auch beim hepatozellulären Karzinom gesteigert sein [199]. Eine Arbeit fand einen Zusammenhang zwischen niedriger Konzentration von miR-1 im Serum und schlechter Prognose beim nichtkleinzelligem Bronchialkarzinom [200]. In Kombination mit weiteren Serum-microRNAs (miR-20a, miR-27a, miR-34 and miR-423) konnten Magenkarzinome/-adenome besser detektiert werden als durch konventionelle Marker wie CEA und CA19-9 [201].

miR-142-5p

Die miR-142-5p ist eine 21-nt lange microRNA, die spezifisch in Zellen der hämatopoietischen Zelllinien [128,168], in geringerer Konzentration auch in anderen Zellen [202] zu finden ist. Sie ist unter anderem an der Differenzierung von hämatopoietischen Stammzellen [203], Regulation der Apoptose [204] und Entwicklung und Funktion von Immunzellen [205] beteiligt. Außerdem hat die miR-142-5p eine regulatorische Funktion auf den Zellzyklus [206].

Sie ist mit verschiedenen Krankheiten assoziiert, dazu zählen Systemischer Lupus erythematodes [205], Chronisches Müdigkeitssyndrom/myalgische Enzephalomyelitis [207] und Diabetes mellitus Typen 1,2 und 4 [208]. Zirkulierende microRNA im Serum kann als Biomarker für Interstitielle Fibrose verwendet werden [209].

Auch in zahlreichen Krebsarten wurde eine aberrante Expression nachgewiesen, zum Beispiel in Lungenkrebs [210-212], Nierenkrebs [213], Plattenepithelkarzinomen [214], kolorektalem Karzinom [215] und im MALT-Lymphom [216] (Tab. 10). Als prognostischer Marker ist sie zur Vorhersage von Gemcitabinresistenz bei Pankreaskarzinom [217], Prognose des malignen Melanoms [218] und von Rezidiven nach Magenkrebs [219] geeignet.

miR-365a-3p

Die microRNA-365a-3p (miR-365a-3p) ist eine 22-nt lange microRNA, welche Zellproliferation, Apoptose und Differenzierung in verschiedenen Krebszelllinien [220,221], Keratinozyten [222], Chondrozyten [223] und Endothelzellen [224] reguliert. Im Mausmodell wurde ein Beitrag zur Differenzierung von Osteoklasten beobachtet [225]. Die Bildung von Neointima wird ebenfalls durch die microRNA moduliert [226]. Einige Arbeiten schlagen eine

Beteiligung der miR-365a-3p an der Differenzierung und Funktion von braunem Fettgewebe vor, es liegen allerdings auch widersprüchliche Ergebnisse vor [227,228]. MiR-365a-3p wurde als negativer Regulator von IL-6 im NF- κ B-Signalweg identifiziert [229]. Assoziierte Krankheiten wie Amyotrophe Lateralsklerose können deshalb eine inflammatorische Komponente aufweisen [230].

MiR-365a-3p partizipiert bekannterweise in der Entwicklung von Magenkrebs [231], Plattenepithelkarzinomen [222,232], Lungenkrebs [221,233], Kolonkarzinom [220,234], hepatozellulärem Karzinom [235], Brustkrebs [236-238] und Pankreaskarzinom [239] (Tab. 10).

4.2. Verwendung als Biomarker

Zahlreiche Studien versuchten, microRNAs zu identifizieren, die sich als Biomarker für Krankheiten und insbesondere für Krebs eignen. Beispielsweise ist es mithilfe der miR-1 möglich, Herzinfarkte zu identifizieren [177,179] oder bestimmte Krebsarten zu detektieren [201]. Weitere microRNAs können dazu verwendet werden, Subtypen einer Krebsart zu differenzieren [162,163], Aussagen über die Prognose der Patienten zu treffen [164,166,218] oder das Risiko des Auftretens von Rezidiven abzuschätzen [219]. Schließlich kann das Ansprechen auf die jeweilige Therapie evaluiert werden [163,217].

Diese Studie sollte microRNAs identifizieren, die zur Vorhersage des Ansprechens auf eine Imatinibtherapie von CML-Patienten dienen könnten. Die bereits erwähnte Studie von San José-Eneriz et al. konnte durch Messung der Expression von 19 microRNAs ihr kleineres Patientenkollektiv eindeutig in Responder und Non-Responder trennen [171], allerdings befindet sich darunter keine der durch die vorliegende Studie identifizierten microRNAs. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass mit allen drei diskutierten microRNAs eine Unterscheidung zwischen Respondern und Non-Respondern im untersuchten Patientenkollektiv möglich ist, die höchste Trennschärfe erhält man dabei, wenn die Expressionsdaten der microRNAs zusammengefasst werden. In diesem Fall kann bei optimal gewähltem Cut-Off-Wert eine Sensitivität des diagnostischen Tests von 73% und eine Spezifität von 84% erreicht werden. Hier besteht Potenzial, in weiteren Studien eine Verifizierung dieser microRNAs als potenzielle Biomarker mit größeren Patientenzahlen anzustreben.

Tabelle 10: Übersicht über veränderte microRNA-Expression bei verschiedenen Krebsarten. Der aufwärts gerichtete Pfeil (↑) signalisiert eine vermehrte, der abwärts gerichtete (↓) eine verminderte Expression in Tumorzellen verglichen mit gesundem Gewebe.

Krebsentität	miR-1	miR-142-5p	miR-365a-3p
Nicht-solide Tumoren			
CML, eigene Studie	↑	↓	↓
AML	↑ [197]		
CLL		↑ [240]	
MALT-Lymphom		↑ [216]	
Multiples Myelom	↑ [198]		
Karzinome			
Blasenkarzinom	↓ [193,241]		
Hepatozelluläres Karzinom	↓ [182]		↓ [235]
Hypopharynx-Karzinom	↓ [242]		
Kolorektales Karzinom	↓ [195,243-246]		↓ [220,234]
Lungenkarzinom	↓ [185,247]	↓ [210-212]	↓ [221,233]
Magenkarzinom			↓ [231]
Mammakarzinom			↓ [236-238]
Maxillarsinusplattenepithelkarzinom	↓ [186]		
Nierenzellkarzinom	↓ [194]	↑ [213]	
Ösophaguskarzinom	↓ [248]		
Pankreaskarzinom			↑ [239]
Plattenepithelkarzinom (Haut)			↑ [222,232]
Plattenepithelkarzinom (Kopf/Hals)	↓ [187]	↓ [214]	
Prostatakarzinom	↓ [192,249]		
Schilddrüsenkarzinom	↓ [189,191]		
Sarkome/Blastome			
Osteosarkom		↓ [250]	
Rhabdomyosarkom	↓ [183,184]		
Retinoblastom		↑ [251]	

4.3. Signaltransduktionsweg-Analyse

Zudem war von Interesse, wie die microRNAs in der Resistenzentwicklung involviert sein könnten. Dazu wurden durch eine *in-silico*-Analyse mögliche Zielgene ermittelt und deren Beteiligung an zellulären Prozessen und Stoffwechselfvorgängen untersucht. Auffällig ist zunächst, dass der Anteil der an der Transkriptionsregulation und Genexpression beteiligten Gene gegenüber der Gesamtheit des Genoms deutlich überrepräsentiert ist (Abb. 6-8). Es ist leicht nachvollziehbar, dass eine Dysregulation derart wichtiger zellulärer Prozesse fatale Folgen nach sich ziehen und insbesondere eine Krebsentstehung begünstigen kann. Weitere funktionelle Cluster finden sich insbesondere für Ionenbindung, aber auch Proteinkinaseaktivität und Phosphatmetabolismus als Ausdruck einer Beteiligung an intrazellulären Signalwegen tauchen in der Auswertung auf. Die im Anschluss durchgeführte Untersuchung einer Beteiligung der Zielgene an zellulären Prozessen und Signaltransduktionswegen offenbarte, dass die Gene außer an BCR-ABL noch an zahlreichen weiteren Krebs- und Signaltransduktionswegen beteiligt sind (Abb. 9, 10). Diese Ergebnisse sind kongruent zu den eingangs erwähnten zahlreichen Studien, die microRNAs mit verschiedenen Krebsarten assoziierten.

Die Signaltransduktion über *mitogen-activated protein kinases* (MAPK) oder den PI3/Akt/mTor-Weg wird normalerweise durch vorgeschaltete Kinasen eingeleitet, zu denen auch die ABL1/BCR-ABL-Tyrosinkinase gehört. Zahlreiche Studien fanden als Ursache von Imatinib-Resistenzen eine Dysregulation der MAPK- [252-255] und PI3/Akt/mTor- [78,256-262] Signaltransduktionswege, wodurch das Zellüberleben unabhängig vom BCR-ABL-Proliferationsreiz wurde. Weitere der potenziell von den untersuchten microRNAs regulierten Signalwege umfassen den TGF- β - [263-265], den Wnt- [266-273] und Insulin-Signalweg [274-276]. Für den ErbB-Signalweg wurde bisher ein Beitrag zur Resistenzentwicklung gegenüber Imatinib in BCR-ABL-positiver ALL nachgewiesen [277]. Neben diesen fanden sich auch Gene des Zellzyklus unter den Zielen der microRNAs, wobei insbesondere die miR-142-5p als Regulator des Zellzyklus bekannt ist [212].

Die mögliche Dysregulation der beteiligten Gene durch microRNAs und das onkogene Potenzial der hierdurch bedingten Veränderungen stellt einen interessanten Anhaltspunkt für weitere Forschung dar, allerdings lässt sich durch die bisher erhobenen Ergebnisse weder eine Aussage darüber treffen, ob die microRNAs einen biologisch relevanten Einfluss auf die beschriebenen Proteine ausüben, noch, ob sie die kausale Ursache einer möglichen Dysregulation sind oder sich die Expression der microRNAs reaktiv durch onkogene Prozesse verändert hat. So wird als eine Erklärung der Inaktivierung sowohl der miR-1 als auch der miR-142-5p eine übermäßige DNA-Methylierung herangezogen, zum Beispiel im

hepatozellulären Karzinom und im kolorektalen Adenom beziehungsweise Adenokarzinom [182,195,202]. In Lungenkrebszellen könnte die Suppression der miR-1 durch Hypoacetylierung nukleosomaler Histone bedingt sein [185]. Veränderte Expression von Histondeacetylasen und -acetyltransferasen mit der Folge aberranter Proteinacetylierung wurde in CML-Zellen als Ausweichmechanismus gegenüber Imatinib-bedingtem Zelltod beschrieben [81]. Insofern wäre es möglich, dass die epigenetische Modifikation der microRNA-Expression eine Folge der Veränderungen resistent gewordener Tumorzellen ist.

Weitere in der Einleitung dargelegte und im Verlauf untersuchte Resistenzmechanismen umfassen die veränderte Expression von Enzymen des Cytochrom-P450-Systems sowie von Transportproteinen. Tatsächlich finden sich unter den Zielgenen der Kandidaten-microRNAs einige Cytochrome (CYP24A1, CYP26A1, CYP1B1, CYP26B1, CYP27C1, CYP2U1), allerdings sind die für die Verstoffwechslung von Imatinib beschriebenen Schlüsselenzyme CYP2C8, CYP3A4 und CYP3A5 nicht darunter [53]. Die Suche nach Transportern der ABC-Familie ergab drei Treffer, ABCA1, ABCB7 und ABCG4. Eine Literaturrecherche ergab allerdings keine Hinweise auf Beteiligung dieser Transporter an Imatinibtransport oder Resistenzentwicklung. Der Schluss liegt daher nahe, dass ein Einfluss der microRNAs auf Metabolisierungs- und Transportprozesse bestenfalls marginal ist, im Gegensatz zur Regulierung von Signaltransduktionsvorgängen, welche in der Liste der Zielgene deutlich überrepräsentiert auftauchen.

4.4. Genexpressionsstudie

MicroRNAs spielen in der Expressionsregulation von Transportproteinen durchaus eine Rolle. Besonders gut untersucht sind die Proteine P-Glykoprotein und ABCG2. Die P-Glykoproteinexpression wird beispielsweise durch miR-27a und miR-331-5p in K562-Zellen herunterreguliert [278]. MiR-212 und miR-328 sind invers mit der ABCG2-mRNA und -proteinexpression korreliert [279]. Trotzdem konnte, wie oben beschrieben, kein Zusammenhang zwischen den identifizierten Kandidaten-microRNAs und genannten Transportern hergestellt werden.

Zur Frage des Einflusses von Transportern auf die Imatinibverfügbarkeit als weiteren möglichen Resistenzmechanismus wurden drei gut untersuchte Multidrug-Transporter (ABCB1/P-Glykoprotein, ABCG2/BCRP und SLC22A1/hOCT1) gewählt. Imatinib ist ein bekanntes Substrat der beiden ABC-Transporter [59-62] und wurde als solches auch für hOCT1 vorgeschlagen [280]. Mehrere Arbeiten legten einen Zusammenhang zwischen Ansprechen von Imatinib und der Expression und Polymorphismen von ABC-Transportern

und hOCT1 nahe [281-288]. Die neueste Studienlage zeigt jedoch, dass Imatinib unabhängig von hOCT1 auf bisher ungeklärte Weise in die Zielzelle gelangt [289]. In einem Versuch wurde die mRNA-Expression für die Transporter hOCT1, ABCB1 und ABCG2 bestimmt und zwischen Respondern und Non-Respondern verglichen. Hierbei konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede der Genexpression beider Gruppen festgestellt werden (Abb. 10). Dysregulierte Transportvorgänge scheinen daher als Ursache einer primären Resistenz keinen oder nur geringen Einfluss zu haben.

Mit einer zweiten, kleineren Kohorte wurde die Genexpression von neun Patientenproben von sowohl Respondern als auch Non-Respondern zum Zeitpunkt der Diagnosestellung mit Folgeproben nach Imatinibbehandlung verglichen. Hierbei zeigte sich für hOCT1 und P-Glykoprotein eine signifikante Steigerung der Expression, nicht jedoch für ABCG2. Insbesondere die Erhöhung der P-Glykoproteinexpression ist plausibel, da einerseits durch Imatinib eine Induktion der Expression bewirkt werden könnte, um die zelluläre Detoxifikation zu beschleunigen und andererseits auch Zellen mit höherer Expression durch verminderte intrazelluläre Imatinibkonzentration einen Überlebensvorteil gewinnen und auf diese Weise selektiert werden könnten.

Eine Studie von Etienne et al. konnte eine Verknüpfung des Ansprechens auf Imatinib mit der Expression der α -Defensine 1-3 und 4 herstellen [154]. Alpha-Defensine sind antimikrobielle Peptide mit vielfältigen Funktionen in der angeborenen und adaptativen Immunität. Ihre Eigenschaften umfassen Bakteriolyse, Antiviralität, Antitoxizität und Immunmodulation. Sie sind in verschiedenen Erkrankungen dysreguliert, unter anderem in autoimmun bedingten wie Morbus Crohn [290] und Colitis ulcerosa [291] sowie in Krebserkrankungen wie im kolorektalen Karzinom [292,293] oder Urothelkarzinom [294]. Das Tumorstadium können sie dabei auf zweierlei Weise beeinflussen. In geringer Konzentration fördern sie Tumorphilisation, -motilität und -invasivität, in höherer Konzentration sind sie in der Lage, immunkompetente Zellen zu rekrutieren und die Tumorstadium durch Hemmung der Angiogenese [295,296] und direkte Tumorzellschädigung [297-299] zu verlangsamen. Ein Vergleich der Genexpression in verschiedenen Phasen der CML und gesunden Proben zeigte überraschend, dass Antipathogene, unter anderem Defensine, in CML-Zellen reduziert exprimiert wurden [300], obwohl in anderen Krebserkrankungen eine erhöhte Expression gefunden wurde [292-294]. Im Vergleich zwischen Respondern und Non-Respondern auf Interferon- α -Therapie war die DEFA4-Expression in Non-Respondern erhöht [301]. In einem Versuch, die Ergebnisse dieser Studien zu reproduzieren, gelang es jedoch nicht, einen Unterschied der Defensinexpression von Respondern und Non-Respondern vor Beginn der Imatinibtherapie

nachzuweisen. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der zuvor erwähnten Studie nahm allerdings die Expression der untersuchten Defensine durch die Imatinibtherapie hochsignifikant ab. Zuvor wurde dargelegt, dass die Expression von Defensinen in malignen Zellen am ehesten reduziert ist, sodass ein Rückgang der Expression unter Therapie mutmaßlich durch einen anderen Effekt ausgelöst wird. Ein Erklärungsansatz sieht einen Rückgang von Defensin-produzierenden Immunzellen vor, welche die Tumorzellen begleiten und bei deren Rückgang ebenfalls weniger rekrutiert werden.

4.5. Limitationen dieser Studie

Bei der Interpretation der oben dargelegten Ergebnisse gilt es, zwei wesentliche Limitierungen dieser Studie zu beachten. Zunächst basieren die Resultate des Hauptteils der Studie mit insgesamt 45 eingeschlossenen Patienten auf einer nur geringen Probenanzahl, weitere Untersuchungen wie die Bestimmung des Einflusses der Imatinibtherapie auf die Genexpression wurden sogar an noch weniger Proben durchgeführt. Hierdurch ergibt sich eine eingeschränkte „Power“ bei der Aufdeckung von Gruppenunterschieden.

Zudem ist das Probenmaterial nicht homogen, sondern besteht sowohl aus Blut- als auch aus Knochenmarksproben. Es ist davon auszugehen, dass sich die Zellzusammensetzung insbesondere bezüglich Reifegrad und Blastenanteil unterscheiden. Von einer Differenzierung der Proben zum Beispiel mittels FACS-Analyse wurde im Rahmen dieser Studie abgesehen, sodass die Resultate mit entsprechend großer Zurückhaltung betrachtet werden müssen. Ein Versuch, die unterschiedliche Zusammensetzung der Proben zu berücksichtigen, wurde im Rahmen dieser Arbeit durch Vergleiche der Untergruppen, sortiert nach Probenherkunft, unternommen. Hierdurch sinkt die Probenanzahl naturgemäß weiter, sodass die Aussagekraft der Ergebnisse stark eingeschränkt wird.

Die Arbeit kann daher als explorative Untersuchung zur Identifizierung von Unterschieden zwischen Respondern und Non-Respondern einer klinischen Stichprobe interpretiert werden, für eine statistisch verlässliche Verifizierung der hier erhobenen Ergebnisse ist jedoch letztendlich die Untersuchung einer größeren Stichprobe nötig.

4.6. Ausblick

Die Identifizierung von molekularen Biomarkern hat zum besseren Verständnis von Subentitäten von malignen Erkrankungen beigetragen. Zunehmend gelingt es hierdurch, das Therapieansprechen auf gezielte Therapieregime besser vorherzusagen und den Verlauf zu

begleiten. Die Ergebnisse dieser Arbeit tragen dazu bei, neue Zielgene zu identifizieren, die mit dem Ansprechen von CML-Patienten auf eine Imatinib-Therapie korreliert sein könnten, ohne dass die Patienten bereits gegenüber diesem Tyrosinkinaseinhibitor exponiert waren. Untersuchungen an größeren Patientenkohorten und selektierten Leukozytenfraktionen könnten dazu beitragen, die hier erstmals identifizierten microRNAs zu bestätigen und Mechanismen der Therapieresistenz von BCR/ABL-Inhibitoren auf pharmakodynamischer wie auch pharmakokinetischer Ebene weiter zu untersuchen.

5. Zusammenfassung

Die Therapie der chronisch myeloischen Leukämie wurde durch die Entwicklung der Tyrosinkinaseinhibitoren revolutioniert. Bedauerlicherweise sprechen 20-30 % der Patienten nicht im gewünschten Ausmaß auf eine Therapie mit Imatinib an (sog. Non-Responder). Eine putative Rolle bei der Resistenzentstehung spielen microRNAs (nicht-kodierende RNAs mit einer Länge von ca. 22 Nukleotiden), welche an der Regulation wichtiger zellulärer Prozesse beteiligt sind und eine bedeutende Rolle bei der Entstehung von Krankheiten einschließlich Krebserkrankungen spielen. Über eine microRNA-vermittelte Dysregulation der Genexpression könnte eine Resistenzentwicklung begünstigt werden. Ziel der vorliegenden Dissertation war daher einerseits die Identifizierung von microRNAs, welche in Respondern und Non-Respondern differentiell exprimiert werden und deren Bestimmung eine Vorhersage des zukünftigen Therapieansprechens ermöglicht. Zudem sollten potenzielle Zielgene und Mechanismen diskutiert werden, über welche microRNAs an einer Resistenzentwicklung beteiligt sein könnten. Andererseits wurde die Expression ausgewählter Gene zwischen Respondern und Non-Respondern verglichen und der Einfluss einer Imatinibtherapie auf die Genexpression untersucht.

Aus Blut- oder Knochenmarksproben von 45 Patienten wurde RNA isoliert und revers in cDNA transkribiert. Im Anschluss wurde ein auf quantitativer real-time PCR basierendes microRNA-Array durchgeführt, um die Expression von 377 microRNAs zu bestimmen. Neun differentiell exprimierte microRNAs wurden ausgewählt und einer Validierung mittels Individualassays unterzogen, dabei wurde ein signifikanter Unterschied für drei microRNAs bestätigt (miR-1, miR-142-5p, miR-365a-3p). Durch eine ROC-Analyse wurde für einen diagnostischen Test, der die Expressionsprofile dieser microRNAs nutzt, zur Vorhersage des Therapieansprechens eine Sensitivität von 73% und Spezifität von 84% ermittelt. Eine *in-silico-Target Prediction* und Analyse der Zielgene offenbarte, dass vor allem an Genexpression und Transkription beteiligte Gene überrepräsentiert sind. 126 der vorhergesagten Gene finden sich in onkogenen Signaltransduktionswegen, 37 davon sind direkt im CML-Signaltransduktionsweg involviert. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde mittels real-time PCR die Genexpression von drei Transportergenen (ABCB1, ABCG2, SLC-22A1) und zwei α -Defensinen (DEFA1-3, DEFA4) in Respondern und Non-Respondern untersucht, jedoch konnten keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen den Gruppen nachgewiesen werden. Allerdings wurde gezeigt, dass nach Beginn einer Imatinibtherapie die Transporter hOCT1 und p-Glykoprotein vermehrt exprimiert wurden und die Expression der antipathogenen Defensine im Gegensatz hierzu sank. Hypothetisch werden die Zellen mit hoher p-Glykoproteinexpression aufgrund einer durch beschleunigte Detoxifikation

reduzierten Sensitivität für Imatinib selektiert, während der Abfall der Defensinexpression mutmaßlich auf einer verminderten Rekrutierung von Immunzellen als Folge eines Rückgangs der Tumorzellen zurückzuführen ist.

Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass signifikante Unterschiede zwischen den microRNA-Expressionsprofilen von Imatinib-Respondern und -Non-Respondern vorliegen. Eine Verwendung der gefundenen microRNAs als Biomarker zur Prädiktion des Therapieansprechens ist prinzipiell vorstellbar, hierdurch könnte bereits zum Zeitpunkt der Diagnosestellung eine individuell zugeschnittene Therapie mit der Folge einer Zeit- und Kostenersparnis angeboten werden. Die an 45 Patienten erhobenen Daten sollten vor klinischem Einsatz jedoch zunächst an einem größeren Patientenkollektiv validiert werden. Eine aberrante Expression von microRNAs, einschließlich der in dieser Studie identifizierten, wurde bereits in einer Vielzahl von Krebsentitäten beschrieben. Viele der Zielgene dieser microRNAs sind an onkogenen Signalwegen beteiligt und könnten über deren Aktivierung ein Zellüberleben unabhängig vom BCR-ABL-Signalweg sicherstellen und so zu einer Imatinibresistenz führen. Die Größenordnung dieses Einflusses ist bislang unbekannt und stellt einen vielversprechenden Ansatzpunkt für weitere Forschung dar. Hingegen fanden sich unter den Zielgenen weder Imatinibtransporter noch am Imatinibstoffwechsel beteiligte CYP-Enzyme. Auch die Genexpression der Transporter wies keine signifikanten Unterschiede zwischen Respondern und Non-Respondern auf, sodass sich in dieser Studie kein Anhalt für eine Beteiligung dieser Gene an einer Resistenzentstehung ergibt.

6. Literaturverzeichnis

- 1 Zentrum für Krebsregisterdaten, URL: <http://www.krebsdaten.de/> (Stand: 17.12.2015).
- 2 Chapter 14: Acute and Chronic Myeloid Leukemia. Meir Wetzler, JCB, Clara D. Bloomfield in *Harrison's Hematology and Oncology*, Dan L. Longo (Herausgeber) McGraw-Hill, New York, 2010. pp 166-182.
- 3 Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie. Chronische myeloische Leukämie, Leitlinie, URL: <http://www.dgho-onkopedia.de/de/onkopedia/leitlinien/cml> (Stand: Januar 2013).
- 4 Nowell, P & Hungerford, D. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science*. 1960; 132: 1497.
- 5 de Klein, A, van Agthoven, T, Groffen, C, Heisterkamp, N, Groffen, J & Grosveld, G. Molecular analysis of both translocation products of a Philadelphia-positive CML patient. *Nucleic Acids Res*. 1986; 14: 7071-7082.
- 6 Heisterkamp, N, Stephenson, JR, Groffen, J, Hansen, PF, de Klein, A, Bartram, CR & Grosveld, G. Localization of the c-ab1 oncogene adjacent to a translocation break point in chronic myelocytic leukaemia. *Nature*. 1983; 306: 239-242.
- 7 Stam, K, Heisterkamp, N, Grosveld, G, de Klein, A, Verma, RS, Coleman, M, Dosik, H & Groffen, J. Evidence of a new chimeric bcr/c-abl mRNA in patients with chronic myelocytic leukemia and the Philadelphia chromosome. *N Engl J Med*. 1985; 313: 1429-1433.
- 8 Shtivelman, E, Lifshitz, B, Gale, RP & Canaani, E. Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukaemia. *Nature*. 1985; 315: 550-554.
- 9 Nagar, B, Hantschel, O, Young, MA, Scheffzek, K, Veach, D, Bornmann, W, Clarkson, B, Superti-Furga, G & Kuriyan, J. Structural basis for the autoinhibition of c-Abl tyrosine kinase. *Cell*. 2003; 112: 859-871.
- 10 Konopka, JB, Watanabe, SM & Witte, ON. An alteration of the human c-abl protein in K562 leukemia cells unmasks associated tyrosine kinase activity. *Cell*. 1984; 37: 1035-1042.
- 11 Groffen, J, Stephenson, JR, Heisterkamp, N, de Klein, A, Bartram, CR & Grosveld, G. Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell*. 1984; 36: 93-99.

- 12 Heisterkamp, N, Stam, K, Groffen, J, de Klein, A & Grosveld, G. Structural organization of the bcr gene and its role in the Ph' translocation. *Nature*. 1985; 315: 758-761.
- 13 Ben-Neriah, Y, Daley, GQ, Mes-Masson, AM, Witte, ON & Baltimore, D. The chronic myelogenous leukemia-specific P210 protein is the product of the bcr/abl hybrid gene. *Science*. 1986; 233: 212-214.
- 14 Konopka, JB & Witte, ON. Detection of c-abl tyrosine kinase activity in vitro permits direct comparison of normal and altered abl gene products. *Molecular and cellular biology*. 1985; 5: 3116-3123.
- 15 Konopka, JB, Watanabe, SM, Singer, JW, Collins, SJ & Witte, ON. Cell lines and clinical isolates derived from Ph1-positive chronic myelogenous leukemia patients express c-abl proteins with a common structural alteration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985; 82: 1810-1814.
- 16 Deininger, MW, Goldman, JM & Melo, JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2000; 96: 3343-3356.
- 17 Daley, GQ, Van Etten, RA & Baltimore, D. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Science*. 1990; 247: 824-830.
- 18 Lugo, TG, Pendergast, AM, Muller, AJ & Witte, ON. Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. *Science*. 1990; 247: 1079-1082.
- 19 Goldman, JM & Melo, JV. Chronic myeloid leukemia--advances in biology and new approaches to treatment. *N Engl J Med*. 2003; 349: 1451-1464.
- 20 Nagar, B, Bornmann, WG, Pellicena, P, Schindler, T, Veach, DR, Miller, WT, Clarkson, B & Kuriyan, J. Crystal structures of the kinase domain of c-Abl in complex with the small molecule inhibitors PD173955 and imatinib (STI-571). *Cancer Res*. 2002; 62: 4236-4243.
- 21 Levinson, NM, Kuchment, O, Shen, K, Young, MA, Koldobskiy, M, Karplus, M, Cole, PA & Kuriyan, J. A Src-like inactive conformation in the abl tyrosine kinase domain. *PLoS Biol*. 2006; 4: e144.
- 22 Frazer, R, Irvine, AE & McMullin, MF. Chronic Myeloid Leukaemia in The 21st Century. *Ulster Med J*. 2007; 76: 8-17.

- 23 Marley, SB & Gordon, MY. Chronic myeloid leukaemia: stem cell derived but progenitor cell driven. *Clin Sci (Lond)*. 2005; 109: 13-25.
- 24 Kapitel Leukämien. Gerd Herold und Mitarbeiter in *Innere Medizin*, Gerd Herold (Herausgeber), Gerd Herold (Verlag), Köln, 2012. pp 92-94.
- 25 Bao, F, Munker, R, Lowery, C, Martin, S, Shi, R, Veillon, DM, Cotelingam, JD & Nordberg, ML. Comparison of FISH and quantitative RT-PCR for the diagnosis and follow-up of BCR-ABL-positive leukemias. *Mol Diagn Ther*. 2007; 11: 239-245.
- 26 Branford, S, Hughes, TP & Rudzki, Z. Monitoring chronic myeloid leukaemia therapy by real-time quantitative PCR in blood is a reliable alternative to bone marrow cytogenetics. *Br J Haematol*. 1999; 107: 587-599.
- 27 Sokal, JE, Baccarani, M, Russo, D & Tura, S. Staging and prognosis in chronic myelogenous leukemia. *Semin Hematol*. 1988; 25: 49-61.
- 28 Hasford, J, Pffirmann, M, Hehlmann, R, Allan, NC, Baccarani, M, Kluin-Nelemans, JC, Alimena, G, Steegmann, JL & Ansari, H. 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: 850-858.
- 29 Hasford, J, Baccarani, M, Hoffmann, V, Guilhot, J, Saussele, S, Rosti, G, Guilhot, F, Porkka, K, Ossenkoppele, G, Lindoerfer, D, Simonsson, B, Pffirmann, M & Hehlmann, R. Predicting complete cytogenetic response and subsequent progression-free survival in 2060 patients with CML on imatinib treatment: the EUTOS score. *Blood*. 118: 686-692.
- 30 Baccarani, M, Cortes, J, Pane, F, Niederwieser, D, Saglio, G, Apperley, J, Cervantes, F, Deininger, M, Gratwohl, A, Guilhot, F, Hochhaus, A, Horowitz, M, Hughes, T, Kantarjian, H, Larson, R, Radich, J, Simonsson, B, Silver, RT, Goldman, J & Hehlmann, R. Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. *J Clin Oncol*. 2009; 27: 6041-6051.
- 31 Cross, NC, White, HE, Muller, MC, Saglio, G & Hochhaus, A. Standardized definitions of molecular response in chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 26: 2172-2175.
- 32 Interferon alfa versus chemotherapy for chronic myeloid leukemia: a meta-analysis of seven randomized trials: Chronic Myeloid Leukemia Trialists' Collaborative Group. *J Natl Cancer Inst*. 1997; 89: 1616-1620.

- 33 Druker, BJ, Tamura, S, Buchdunger, E, Ohno, S, Segal, GM, Fanning, S, Zimmermann, J & Lydon, NB. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med.* 1996; 2: 561-566.
- 34 Schindler, T, Bornmann, W, Pellicena, P, Miller, WT, Clarkson, B & Kuriyan, J. Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase. *Science.* 2000; 289: 1938-1942.
- 35 Azam, M, Latek, RR & Daley, GQ. Mechanisms of autoinhibition and STI-571/imatinib resistance revealed by mutagenesis of BCR-ABL. *Cell.* 2003; 112: 831-843.
- 36 Gambacorti-Passerini, C, le Coutre, P, Mologni, L, Fanelli, M, Bertazzoli, C, Marchesi, E, Di Nicola, M, Biondi, A, Corneo, GM, Belotti, D, Pogliani, E & Lydon, NB. Inhibition of the ABL kinase activity blocks the proliferation of BCR/ABL+ leukemic cells and induces apoptosis. *Blood Cells Mol Dis.* 1997; 23: 380-394.
- 37 Buchdunger, E, Cioffi, CL, Law, N, Stover, D, Ohno-Jones, S, Druker, BJ & Lydon, NB. 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: 139-145.
- 38 Buchdunger, E, Zimmermann, J, Mett, H, Meyer, T, Muller, M, Regenass, U & Lydon, NB. Selective inhibition of the platelet-derived growth factor signal transduction pathway by a protein-tyrosine kinase inhibitor of the 2-phenylaminopyrimidine class. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92: 2558-2562.
- 39 O'Brien, SG, Guilhot, F, Larson, RA, Gathmann, I, Baccarani, M, Cervantes, F, Cornelissen, JJ, Fischer, T, Hochhaus, A, Hughes, T, Lechner, K, Nielsen, JL, Rousselot, P, Reiffers, J, Saglio, G, Shepherd, J, Simonsson, B, Gratwohl, A, Goldman, JM, Kantarjian, H, Taylor, K, Verhoef, G, Bolton, AE, Capdeville, R & Druker, BJ. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2003; 348: 994-1004.
- 40 Hochhaus, A, O'Brien, SG, Guilhot, F, Druker, BJ, Branford, S, Foroni, L, Goldman, JM, Muller, MC, Radich, JP, Rudoltz, M, Mone, M, Gathmann, I, Hughes, TP & Larson, RA. Six-year follow-up of patients receiving imatinib for the first-line treatment of chronic myeloid leukemia. *Leukemia.* 2009; 23: 1054-1061.
- 41 Druker, BJ, Guilhot, F, O'Brien, SG, Gathmann, I, Kantarjian, H, Gattermann, N, Deininger, MW, Silver, RT, Goldman, JM, Stone, RM, Cervantes, F, Hochhaus, A, Powell,

BL, Gabilove, JL, Rousselot, P, Reiffers, J, Cornelissen, JJ, Hughes, T, Agis, H, Fischer, T, Verhoef, G, Shepherd, J, Saglio, G, Gratwohl, A, Nielsen, JL, Radich, JP, Simonsson, B, Taylor, K, Baccarani, M, So, C, Letvak, L & Larson, RA. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2006; 355: 2408-2417.

42 Berman, E, Nicolaidis, M, Maki, RG, Fleisher, M, Chanel, S, Scheu, K, Wilson, BA, Heller, G & Sauter, NP. Altered bone and mineral metabolism in patients receiving imatinib mesylate. *N Engl J Med.* 2006; 354: 2006-2013.

43 Kerkela, R, Grazette, L, Yacobi, R, Iliescu, C, Patten, R, Beahm, C, Walters, B, Shevtsov, S, Pesant, S, Clubb, FJ, Rosenzweig, A, Salomon, RN, Van Etten, RA, Alroy, J, Durand, JB & Force, T. Cardiotoxicity of the cancer therapeutic agent imatinib mesylate. *Nat Med.* 2006; 12: 908-916.

44 Ault, P, Kantarjian, H, O'Brien, S, Faderl, S, Beran, M, Rios, MB, Koller, C, Giles, F, Keating, M, Talpaz, M & Cortes, J. Pregnancy among patients with chronic myeloid leukemia treated with imatinib. *J Clin Oncol.* 2006; 24: 1204-1208.

45 Europäische Arzneimittel-Agentur (EMA), URL: <http://www.ema.europa.eu/> (Stand: September 2016)

46 Preudhomme, C, Guilhot, J, Nicolini, FE, Guerci-Bresler, A, Rigal-Huguet, F, Maloisel, F, Coiteux, V, Gardembas, M, Berthou, C, Vekhoff, A, Rea, D, Jourdan, E, Allard, C, Delmer, A, Rousselot, P, Legros, L, Berger, M, Corm, S, Etienne, G, Roche-Lestienne, C, Eclache, V, Mahon, FX, Guilhot, F, Investigators, S & France Intergroupe des Leucemies Myeloides, C. Imatinib plus peginterferon alfa-2a in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2010; 363: 2511-2521.

47 Hochhaus, A. Cytogenetic and molecular mechanisms of resistance to imatinib. *Semin Hematol.* 2003; 40: 69-79.

48 Quintas-Cardama, A, Kantarjian, HM & Cortes, JE. Mechanisms of primary and secondary resistance to imatinib in chronic myeloid leukemia. *Cancer control : journal of the Moffitt Cancer Center.* 2009; 16: 122-131.

49 Alvarado, Y, Kantarjian, H, O'Brien, S, Faderl, S, Borthakur, G, Burger, J, Wierda, W, Garcia-Manero, G, Shan, J & Cortes, J. Significance of suboptimal response to imatinib, as defined by the European LeukemiaNet, in the long-term outcome of patients with early chronic myeloid leukemia in chronic phase. *Cancer.* 2009; 115: 3709-3718.

- 50 Picard, S, Titier, K, Etienne, G, Teilhet, E, Ducint, D, Bernard, MA, Lassalle, R, Marit, G, Reiffers, J, Begaud, B, Moore, N, Molimard, M & Mahon, FX. Trough imatinib plasma levels are associated with both cytogenetic and molecular responses to standard-dose imatinib in chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2007; 109: 3496-3499.
- 51 Larson, RA, Druker, BJ, Guilhot, F, O'Brien, SG, Riviere, GJ, Krahnke, T, Gathmann, I, Wang, Y & Group, IS. Imatinib pharmacokinetics and its correlation with response and safety in chronic-phase chronic myeloid leukemia: a subanalysis of the IRIS study. *Blood*. 2008; 111: 4022-4028.
- 52 Zhong, JS, Meng, FY, Xu, D, Zhou, HS & Dai, M. Correlation between imatinib trough concentration and efficacy in Chinese chronic myelocytic leukemia patients. *Acta haematologica*. 2012; 127: 221-227.
- 53 Nebot, N, Crettol, S, d'Esposito, F, Tattam, B, Hibbs, DE & Murray, M. Participation of CYP2C8 and CYP3A4 in the N-demethylation of imatinib in human hepatic microsomes. *British journal of pharmacology*. 2010; 161: 1059-1069.
- 54 Green, H, Skoglund, K, Rommel, F, Mirghani, RA & Lotfi, K. CYP3A activity influences imatinib response in patients with chronic myeloid leukemia: a pilot study on in vivo CYP3A activity. *Eur J Clin Pharmacol*. 66: 383-386.
- 55 Gambacorti-Passerini, C, Barni, R, le Coutre, P, Zucchetti, M, Cabrita, G, Cleris, L, Rossi, F, Gianazza, E, Brueggen, J, Cozens, R, Pioltelli, P, Pogliani, E, Corneo, G, Formelli, F & D'Incalci, M. Role of alpha1 acid glycoprotein in the in vivo resistance of human BCR-ABL(+) leukemic cells to the abl inhibitor STI571. *J Natl Cancer Inst*. 2000; 92: 1641-1650.
- 56 Jorgensen, HG, Elliott, MA, Allan, EK, Carr, CE, Holyoake, TL & Smith, KD. Alpha1-acid glycoprotein expressed in the plasma of chronic myeloid leukemia patients does not mediate significant in vitro resistance to STI571. *Blood*. 2002; 99: 713-715.
- 57 Gambacorti-Passerini, C, Zucchetti, M, Russo, D, Frapolli, R, Verga, M, Bungaro, S, Tornaghi, L, Rossi, F, Pioltelli, P, Pogliani, E, Alberti, D, Corneo, G & D'Incalci, M. Alpha1 acid glycoprotein binds to imatinib (STI571) and substantially alters its pharmacokinetics in chronic myeloid leukemia patients. *Clin Cancer Res*. 2003; 9: 625-632.
- 58 Larghero, J, Leguay, T, Mourah, S, Madelaine-Chambrin, I, Taksin, AL, Raffoux, E, Bastie, JN, Degos, L, Berthaud, P, Marolleau, JP, Calvo, F, Chomienne, C, Mahon, FX & Rousselot, P. Relationship between elevated levels of the alpha 1 acid glycoprotein in

chronic myelogenous leukemia in blast crisis and pharmacological resistance to imatinib (Gleevec) in vitro and in vivo. *Biochemical pharmacology*. 2003; 66: 1907-1913.

59 Dohse, M, Scharenberg, C, Shukla, S, Robey, RW, Volkmann, T, Deeken, JF, Brendel, C, Ambudkar, SV, Neubauer, A & Bates, SE. Comparison of ATP-binding cassette transporter interactions with the tyrosine kinase inhibitors imatinib, nilotinib, and dasatinib. *Drug Metab Dispos*. 2010; 38: 1371-1380.

60 Dai, H, Marbach, P, Lemaire, M, Hayes, M & Elmquist, WF. Distribution of STI-571 to the brain is limited by P-glycoprotein-mediated efflux. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003; 304: 1085-1092.

61 Mahon, FX, Belloc, F, Lagarde, V, Chollet, C, Moreau-Gaudry, F, Reiffers, J, Goldman, JM & Melo, JV. MDR1 gene overexpression confers resistance to imatinib mesylate in leukemia cell line models. *Blood*. 2003; 101: 2368-2373.

62 Thomas, J, Wang, L, Clark, RE & Pirmohamed, M. Active transport of imatinib into and out of cells: implications for drug resistance. *Blood*. 2004; 104: 3739-3745.

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

64 Soverini, S, Branford, S, Nicolini, FE, Talpaz, M, Deininger, MW, Martinelli, G, Muller, MC, Radich, JP & Shah, NP. Implications of BCR-ABL1 kinase domain-mediated resistance in chronic myeloid leukemia. *Leuk Res*. 2014; 38: 10-20.

65 Apperley, JF. Part I: mechanisms of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia. *Lancet Oncol*. 2007; 8: 1018-1029.

66 Soverini, S, Colarossi, S, Gnani, A, Rosti, G, Castagnetti, F, Poerio, A, Iacobucci, I, Amabile, M, Abruzzese, E, Orlandi, E, Radaelli, F, Ciccone, F, Tiribelli, M, di Lorenzo, R, Caracciolo, C, Izzo, B, Pane, F, Saglio, G, Baccarani, M, Martinelli, G & Leukemia, GWPoCM. Contribution of ABL kinase domain mutations to imatinib resistance in different subsets of Philadelphia-positive patients: by the GIMEMA Working Party on Chronic Myeloid Leukemia. *Clin Cancer Res*. 2006; 12: 7374-7379.

67 Jabbour, E, Kantarjian, H, Jones, D, Talpaz, M, Bekele, N, O'Brien, S, Zhou, X, Luthra, R, Garcia-Manero, G, Giles, F, Rios, MB, Verstovsek, S & Cortes, J. Frequency and

clinical significance of BCR-ABL mutations in patients with chronic myeloid leukemia treated with imatinib mesylate. *Leukemia*. 2006; 20: 1767-1773.

68 Soverini, S, Hochhaus, A, Nicolini, FE, Gruber, F, Lange, T, Saglio, G, Pane, F, Muller, MC, Ernst, T, Rosti, G, Porkka, K, Baccarani, M, Cross, NC & Martinelli, G. BCR-ABL kinase domain mutation analysis in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors: recommendations from an expert panel on behalf of European LeukemiaNet. *Blood*. 2011; 118: 1208-1215.

69 Gorre, ME, Mohammed, M, Ellwood, K, Hsu, N, Paquette, R, Rao, PN & Sawyers, CL. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science*. 2001; 293: 876-880.

70 O'Hare, T, Eide, CA & Deininger, MW. Bcr-Abl kinase domain mutations, drug resistance, and the road to a cure for chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2007; 110: 2242-2249.

71 Corbin, AS, La Rosee, P, Stoffregen, EP, Druker, BJ & Deininger, MW. Several Bcr-Abl kinase domain mutants associated with imatinib mesylate resistance remain sensitive to imatinib. *Blood*. 2003; 101: 4611-4614.

72 Khorashad, JS, Kelley, TW, Szankasi, P, Mason, CC, Soverini, S, Adrian, LT, Eide, CA, Zabriskie, MS, Lange, T, Estrada, JC, Pomicter, AD, Eiring, AM, Kraft, IL, Anderson, DJ, Gu, Z, Alikian, M, Reid, AG, Foroni, L, Marin, D, Druker, BJ, O'Hare, T & Deininger, MW. BCR-ABL1 compound mutations in tyrosine kinase inhibitor-resistant CML: frequency and clonal relationships. *Blood*. 2013; 121: 489-498.

73 Johansson, B, Fioretos, T & Mitelman, F. Cytogenetic and molecular genetic evolution of chronic myeloid leukemia. *Acta haematologica*. 2002; 107: 76-94.

74 Jennings, BA & Mills, KI. c-myc locus amplification and the acquisition of trisomy 8 in the evolution of chronic myeloid leukaemia. *Leuk Res*. 1998; 22: 899-903.

75 Gaiger, A, Henn, T, Horth, E, Geissler, K, Mitterbauer, G, Maier-Dobersberger, T, Greinix, H, Mannhalter, C, Haas, OA, Lechner, K & Lion, T. Increase of bcr-abl chimeric mRNA expression in tumor cells of patients with chronic myeloid leukemia precedes disease progression. *Blood*. 1995; 86: 2371-2378.

76 Wendel, HG, de Stanchina, E, Cepero, E, Ray, S, Emig, M, Fridman, JS, Veach, DR, Bornmann, WG, Clarkson, B, McCombie, WR, Kogan, SC, Hochhaus, A & Lowe, SW. Loss

of p53 impedes the antileukemic response to BCR-ABL inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103: 7444-7449.

77 Lahaye, T, Riehm, B, Berger, U, Paschka, P, Muller, MC, Kreil, S, Merx, K, Schwindel, U, Schoch, C, Hehlmann, R & Hochhaus, A. Response and resistance in 300 patients with BCR-ABL-positive leukemias treated with imatinib in a single center: a 4.5-year follow-up. *Cancer*. 2005; 103: 1659-1669.

78 Burchert, A, Wang, Y, Cai, D, von Bubnoff, N, Paschka, P, Muller-Brusselbach, S, Ottmann, OG, Duyster, J, Hochhaus, A & Neubauer, A. Compensatory PI3-kinase/Akt/mTor activation regulates imatinib resistance development. *Leukemia*. 2005; 19: 1774-1782.

79 Hu, Y, Liu, Y, Pelletier, S, Buchdunger, E, Warmuth, M, Fabbro, D, Hallek, M, Van Etten, RA & Li, S. Requirement of Src kinases Lyn, Hck and Fgr for BCR-ABL1-induced B-lymphoblastic leukemia but not chronic myeloid leukemia. *Nat Genet*. 2004; 36: 453-461.

80 Wu, J, Meng, F, Lu, H, Kong, L, Bornmann, W, Peng, Z, Talpaz, M & Donato, NJ. Lyn regulates BCR-ABL and Gab2 tyrosine phosphorylation and c-Cbl protein stability in imatinib-resistant chronic myelogenous leukemia cells. *Blood*. 2008; 111: 3821-3829.

81 Lee, SM, Bae, JH, Kim, MJ, Lee, HS, Lee, MK, Chung, BS, Kim, DW, Kang, CD & Kim, SH. Bcr-Abl-independent imatinib-resistant K562 cells show aberrant protein acetylation and increased sensitivity to histone deacetylase inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007; 322: 1084-1092.

82 Corbin, AS, Agarwal, A, Loriaux, M, Cortes, J, Deininger, MW & Druker, BJ. Human chronic myeloid leukemia stem cells are insensitive to imatinib despite inhibition of BCR-ABL activity. *The Journal of clinical investigation*. 2011; 121: 396-409.

83 Graham, SM, Jorgensen, HG, Allan, E, Pearson, C, Alcorn, MJ, Richmond, L & Holyoake, TL. Primitive, quiescent, Philadelphia-positive stem cells from patients with chronic myeloid leukemia are insensitive to STI571 in vitro. *Blood*. 2002; 99: 319-325.

84 Bentwich, I, Avniel, A, Karov, Y, Aharonov, R, Gilad, S, Barad, O, Barzilai, A, Einat, P, Einav, U, Meiri, E, Sharon, E, Spector, Y & Bentwich, Z. Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. *Nat Genet*. 2005; 37: 766-770.

85 Berezikov, E, Guryev, V, van de Belt, J, Wienholds, E, Plasterk, RH & Cuppen, E. Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes. *Cell*. 2005; 120: 21-24.

- 86 Lee, RC, Feinbaum, RL & Ambros, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993; 75: 843-854.
- 87 Wightman, B, Ha, I & Ruvkun, G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*. 1993; 75: 855-862.
- 88 Guarnieri, DJ & DiLeone, RJ. MicroRNAs: a new class of gene regulators. *Ann Med*. 2008; 40: 197-208.
- 89 Ambros, V, Bartel, B, Bartel, DP, Burge, CB, Carrington, JC, Chen, X, Dreyfuss, G, Eddy, SR, Griffiths-Jones, S, Marshall, M, Matzke, M, Ruvkun, G & Tuschl, T. A uniform system for microRNA annotation. *Rna*. 2003; 9: 277-279.
- 90 Griffiths-Jones, S. miRBase: the microRNA sequence database. *Methods Mol Biol*. 2006; 342: 129-138.
- 91 Friedman, RC, Farh, KK, Burge, CB & Bartel, DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome research*. 2009; 19: 92-105.
- 92 Lee, Y, Jeon, K, Lee, JT, Kim, S & Kim, VN. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *Embo J*. 2002; 21: 4663-4670.
- 93 Lee, Y, Ahn, C, Han, J, Choi, H, Kim, J, Yim, J, Lee, J, Provost, P, Radmark, O, Kim, S & Kim, VN. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*. 2003; 425: 415-419.
- 94 Denli, AM, Tops, BB, Plasterk, RH, Ketting, RF & Hannon, GJ. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature*. 2004; 432: 231-235.
- 95 Gregory, RI, Yan, KP, Amuthan, G, Chendrimada, T, Doratotaj, B, Cooch, N & Shiekhattar, R. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature*. 2004; 432: 235-240.
- 96 Landthaler, M, Yalcin, A & Tuschl, T. The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and its *D. melanogaster* homolog are required for miRNA biogenesis. *Curr Biol*. 2004; 14: 2162-2167.
- 97 Berezikov, E, Chung, WJ, Willis, J, Cuppen, E & Lai, EC. Mammalian mirtron genes. *Mol Cell*. 2007; 28: 328-336.

- 98 Okamura, K, Hagen, JW, Duan, H, Tyler, DM & Lai, EC. The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*. *Cell*. 2007; 130: 89-100.
- 99 Ruby, JG, Jan, CH & Bartel, DP. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature*. 2007; 448: 83-86.
- 100 Yi, R, Qin, Y, Macara, IG & Cullen, BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev*. 2003; 17: 3011-3016.
- 101 Bernstein, E, Caudy, AA, Hammond, SM & Hannon, GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*. 2001; 409: 363-366.
- 102 Grishok, A, Pasquinelli, AE, Conte, D, Li, N, Parrish, S, Ha, I, Baillie, DL, Fire, A, Ruvkun, G & Mello, CC. Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell*. 2001; 106: 23-34.
- 103 Hutvagner, G, McLachlan, J, Pasquinelli, AE, Balint, E, Tuschl, T & Zamore, PD. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science*. 2001; 293: 834-838.
- 104 Ketting, RF, Fischer, SE, Bernstein, E, Sijen, T, Hannon, GJ & Plasterk, RH. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev*. 2001; 15: 2654-2659.
- 105 Knight, SW & Bass, BL. A role for the RNase III enzyme DCR-1 in RNA interference and germ line development in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 2001; 293: 2269-2271.
- 106 Chendrimada, TP, Gregory, RI, Kumaraswamy, E, Norman, J, Cooch, N, Nishikura, K & Shiekhattar, R. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature*. 2005; 436: 740-744.
- 107 Maniataki, E & Mourelatos, Z. A human, ATP-independent, RISC assembly machine fueled by pre-miRNA. *Genes Dev*. 2005; 19: 2979-2990.
- 108 Romero-Cordoba, S, Rodriguez-Cuevas, S, Rebollar-Vega, R, Quintanar-Jurado, V, Maffuz-Aziz, A, Jimenez-Sanchez, G, Bautista-Pina, V, Arellano-Llamas, R & Hidalgo-Miranda, A. Identification and pathway analysis of microRNAs with no previous involvement in breast cancer. *PloS one*. 2012; 7: e31904.

- 109 Orom, UA, Nielsen, FC & Lund, AH. MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Mol Cell*. 2008; 30: 460-471.
- 110 Guo, H, Ingolia, NT, Weissman, JS & Bartel, DP. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature*. 2010; 466: 835-840.
- 111 Hutvagner, G & Zamore, PD. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science*. 2002; 297: 2056-2060.
- 112 Zeng, Y, Wagner, EJ & Cullen, BR. Both natural and designed micro RNAs can inhibit the expression of cognate mRNAs when expressed in human cells. *Mol Cell*. 2002; 9: 1327-1333.
- 113 Zeng, Y, Yi, R & Cullen, BR. MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100: 9779-9784.
- 114 Doench, JG, Petersen, CP & Sharp, PA. siRNAs can function as miRNAs. *Genes Dev*. 2003; 17: 438-442.
- 115 Saxena, S, Jonsson, ZO & Dutta, A. Small RNAs with imperfect match to endogenous mRNA repress translation. Implications for off-target activity of small inhibitory RNA in mammalian cells. *J Biol Chem*. 2003; 278: 44312-44319.
- 116 Vasudevan, S & Steitz, JA. AU-rich-element-mediated upregulation of translation by FXR1 and Argonaute 2. *Cell*. 2007; 128: 1105-1118.
- 117 Kim, DH, Saetrom, P, Snove, O, Jr. & Rossi, JJ. MicroRNA-directed transcriptional gene silencing in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105: 16230-16235.
- 118 Matsui, M, Chu, Y, Zhang, H, Gagnon, KT, Shaikh, S, Kuchimanchi, S, Manoharan, M, Corey, DR & Janowski, BA. Promoter RNA links transcriptional regulation of inflammatory pathway genes. *Nucleic Acids Res*. 2013; 41: 10086-10109.
- 119 Place, RF, Li, LC, Pookot, D, Noonan, EJ & Dahiya, R. MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105: 1608-1613.
- 120 Younger, ST & Corey, DR. Transcriptional gene silencing in mammalian cells by miRNA mimics that target gene promoters. *Nucleic Acids Res*. 2011; 39: 5682-5691.

- 121 Krek, A, Grun, D, Poy, MN, Wolf, R, Rosenberg, L, Epstein, EJ, MacMenamin, P, da Piedade, I, Gunsalus, KC, Stoffel, M & Rajewsky, N. Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet.* 2005; 37: 495-500.
- 122 Tay, YM, Tam, WL, Ang, YS, Gaughwin, PM, Yang, H, Wang, W, Liu, R, George, J, Ng, HH, Perera, RJ, Lufkin, T, Rigoutsos, I, Thomson, AM & Lim, B. MicroRNA-134 modulates the differentiation of mouse embryonic stem cells, where it causes post-transcriptional attenuation of Nanog and LRH1. *Stem Cells.* 2008; 26: 17-29.
- 123 Enright, AJ, John, B, Gaul, U, Tuschl, T, Sander, C & Marks, DS. MicroRNA targets in Drosophila. *Genome biology.* 2003; 5: R1.
- 124 John, B, Enright, AJ, Aravin, A, Tuschl, T, Sander, C & Marks, DS. Human MicroRNA targets. *PLoS Biol.* 2004; 2: e363.
- 125 Landgraf, P, Rusu, M, Sheridan, R, Sewer, A, Iovino, N, Aravin, A, Pfeffer, S, Rice, A, Kamphorst, AO, Landthaler, M, Lin, C, Socci, ND, Hermida, L, Fulci, V, Chiaretti, S, Foa, R, Schliwka, J, Fuchs, U, Novosel, A, Muller, RU, Schermer, B, Bissels, U, Inman, J, Phan, Q, Chien, M, Weir, DB, Choksi, R, De Vita, G, Frezzetti, D, Trompeter, HI, Hornung, V, Teng, G, Hartmann, G, Palkovits, M, Di Lauro, R, Wernet, P, Macino, G, Rogler, CE, Nagle, JW, Ju, J, Papavasiliou, FN, Benzing, T, Lichter, P, Tam, W, Brownstein, MJ, Bosio, A, Borkhardt, A, Russo, JJ, Sander, C, Zavolan, M & Tuschl, T. A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell.* 2007; 129: 1401-1414.
- 126 Lagos-Quintana, M, Rauhut, R, Yalcin, A, Meyer, J, Lendeckel, W & Tuschl, T. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol.* 2002; 12: 735-739.
- 127 Naguibneva, I, Ameyar-Zazoua, M, Poleskaya, A, Ait-Si-Ali, S, Groisman, R, Souidi, M, Cuvellier, S & Harel-Bellan, A. The microRNA miR-181 targets the homeobox protein Hox-A11 during mammalian myoblast differentiation. *Nat Cell Biol.* 2006; 8: 278-284.
- 128 Chen, CZ, Li, L, Lodish, HF & Bartel, DP. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science.* 2004; 303: 83-86.
- 129 Krichevsky, AM, Sonntag, KC, Isacson, O & Kosik, KS. Specific microRNAs modulate embryonic stem cell-derived neurogenesis. *Stem Cells.* 2006; 24: 857-864.
- 130 Esau, C, Kang, X, Peralta, E, Hanson, E, Marcusson, EG, Ravichandran, LV, Sun, Y, Koo, S, Perera, RJ, Jain, R, Dean, NM, Freier, SM, Bennett, CF, Lollo, B & Griffey, R. MicroRNA-143 regulates adipocyte differentiation. *J Biol Chem.* 2004; 279: 52361-52365.

- 131 Giraldez, AJ, Cinalli, RM, Glasner, ME, Enright, AJ, Thomson, JM, Baskerville, S, Hammond, SM, Bartel, DP & Schier, AF. MicroRNAs regulate brain morphogenesis in zebrafish. *Science*. 2005; 308: 833-838.
- 132 Kosik, KS. The neuronal microRNA system. *Nat Rev Neurosci*. 2006; 7: 911-920.
- 133 Calin, GA, Dumitru, CD, Shimizu, M, Bichi, R, Zupo, S, Noch, E, Aldler, H, Rattan, S, Keating, M, Rai, K, Rassenti, L, Kipps, T, Negrini, M, Bullrich, F & Croce, CM. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99: 15524-15529.
- 134 Takamizawa, J, Konishi, H, Yanagisawa, K, Tomida, S, Osada, H, Endoh, H, Harano, T, Yatabe, Y, Nagino, M, Nimura, Y, Mitsudomi, T & Takahashi, T. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res*. 2004; 64: 3753-3756.
- 135 Calin, GA, Sevignani, C, Dumitru, CD, Hyslop, T, Noch, E, Yendamuri, S, Shimizu, M, Rattan, S, Bullrich, F, Negrini, M & Croce, CM. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101: 2999-3004.
- 136 Kartha, RV & Subramanian, S. MicroRNAs in cardiovascular diseases: biology and potential clinical applications. *Journal of cardiovascular translational research*. 2010; 3: 256-270.
- 137 Willeit, P, Zampetaki, A, Dudek, K, Kaudewitz, D, King, A, Kirkby, NS, Crosby-Nwaobi, R, Prokopi, M, Drozdov, I, Langley, SR, Sivaprasad, S, Markus, HS, Mitchell, JA, Warner, TD, Kiechl, S & Mayr, M. Circulating microRNAs as novel biomarkers for platelet activation. *Circulation research*. 2013; 112: 595-600.
- 138 O'Donnell, WT & Warren, ST. A decade of molecular studies of fragile X syndrome. *Annu Rev Neurosci*. 2002; 25: 315-338.
- 139 Schaefer, A, O'Carroll, D, Tan, CL, Hillman, D, Sugimori, M, Llinas, R & Greengard, P. Cerebellar neurodegeneration in the absence of microRNAs. *J Exp Med*. 2007; 204: 1553-1558.
- 140 Perkins, DO, Jeffries, C & Sullivan, P. Expanding the 'central dogma': the regulatory role of nonprotein coding genes and implications for the genetic liability to schizophrenia. *Mol Psychiatry*. 2005; 10: 69-78.

- 141 Erenér, S, Mojibian, M, Fox, JK, Denroche, HC & Kieffer, TJ. Circulating miR-375 as a biomarker of beta-cell death and diabetes in mice. *Endocrinology*. 2013; 154: 603-608.
- 142 Jiang, Q, Wang, Y, Hao, Y, Juan, L, Teng, M, Zhang, X, Li, M, Wang, G & Liu, Y. miR2Disease: a manually curated database for microRNA deregulation in human disease. *Nucleic Acids Res*. 2009; 37: D98-104.
- 143 Livak, KJ & Schmittgen, TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001; 25: 402-408.
- 144 R Core Team (2014). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. (<http://www.R-project.org/>).
- 145 Sing, T, Sander, O, Beerenwinkel, N & Lengauer, T. ROCr: visualizing classifier performance in R. *Bioinformatics*. 2005; 21: 3940-3941.
- 146 Grimson, A, Farh, KK, Johnston, WK, Garrett-Engele, P, Lim, LP & Bartel, DP. MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell*. 2007; 27: 91-105.
- 147 Lewis, BP, Burge, CB & Bartel, DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*. 2005; 120: 15-20.
- 148 Paraskevopoulou, MD, Georgakilas, G, Kostoulas, N, Vlachos, IS, Vergoulis, T, Reczko, M, Filippidis, C, Dalamagas, T & Hatzigeorgiou, AG. DIANA-microT web server v5.0: service integration into miRNA functional analysis workflows. *Nucleic Acids Res*. 2013; 41: W169-173.
- 149 Anders, G, Mackowiak, SD, Jens, M, Maaskola, J, Kuntzagk, A, Rajewsky, N, Landthaler, M & Dieterich, C. doRiNA: a database of RNA interactions in post-transcriptional regulation. *Nucleic Acids Res*. 2012; 40: D180-186.
- 150 Selbach, M, Schwanhausser, B, Thierfelder, N, Fang, Z, Khanin, R & Rajewsky, N. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature*. 2008;455(7209):58-63.
- 151 Huang da, W, Sherman, BT & Lempicki, RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature protocols*. 2009; 4: 44-57.

- 152 Huang da, W, Sherman, BT & Lempicki, RA. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res.* 2009; 37: 1-13.
- 153 Kanehisa, M & Goto, S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res.* 2000; 28: 27-30.
- 154 Etienne, G, Dupouy, M, Costaglioli, P, Chollet, C, Lagarde, V, Pasquet, JM, Reiffers, J, Garbay, B, Mahon, FX & Turcq, B. alpha-defensin 1-3 and alpha-defensin 4 as predictive markers of imatinib resistance and relapse in CML patients. *Disease markers.* 2011; 30: 221-227.
- 155 Inui, M, Martello, G & Piccolo, S. MicroRNA control of signal transduction. *Nature reviews. Molecular cell biology.* 2010; 11: 252-263.
- 156 Ory, B & Ellisen, LW. A microRNA-dependent circuit controlling p63/p73 homeostasis: p53 family cross-talk meets therapeutic opportunity. *Oncotarget.* 2011; 2: 259-264.
- 157 Noonan, EJ, Place, RF, Basak, S, Pookot, D & Li, LC. miR-449a causes Rb-dependent cell cycle arrest and senescence in prostate cancer cells. *Oncotarget.* 2010; 1: 349-358.
- 158 Erkan, EP, Breakefield, XO & Saydam, O. miRNA signature of schwannomas: possible role(s) of "tumor suppressor" miRNAs in benign tumors. *Oncotarget.* 2011; 2: 265-270.
- 159 Davis-Dusenbery, BN & Hata, A. MicroRNA in Cancer: The Involvement of Aberrant MicroRNA Biogenesis Regulatory Pathways. *Genes & cancer.* 2010; 1: 1100-1114.
- 160 Esquela-Kerscher, A & Slack, FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nature reviews. Cancer.* 2006; 6: 259-269.
- 161 Mavrakis, KJ, Leslie, CS & Wendel, HG. Cooperative control of tumor suppressor genes by a network of oncogenic microRNAs. *Cell cycle.* 2011; 10: 2845-2849.
- 162 Chan, E, Patel, R, Nallur, S, Ratner, E, Bacchiocchi, A, Hoyt, K, Szpakowski, S, Godshalk, S, Ariyan, S, Sznol, M, Halaban, R, Krauthammer, M, Tuck, D, Slack, FJ & Weidhaas, JB. MicroRNA signatures differentiate melanoma subtypes. *Cell cycle.* 2011; 10: 1845-1852.

- 163 Chan, E, Prado, DE & Weidhaas, JB. Cancer microRNAs: from subtype profiling to predictors of response to therapy. *Trends in molecular medicine*. 2011; 17: 235-243.
- 164 Li, X, Zhang, Y, Zhang, Y, Ding, J, Wu, K & Fan, D. Survival prediction of gastric cancer by a seven-microRNA signature. *Gut*. 2010; 59: 579-585.
- 165 Radojicic, J, Zaravinos, A, Vrekoussis, T, Kafousi, M, Spandidos, DA & Stathopoulos, EN. MicroRNA expression analysis in triple-negative (ER, PR and Her2/neu) breast cancer. *Cell cycle*. 2011; 10: 507-517.
- 166 Rossi, S, Shimizu, M, Barbarotto, E, Nicoloso, MS, Dimitri, F, Sampath, D, Fabbri, M, Lerner, S, Barron, LL, Rassenti, LZ, Jiang, L, Xiao, L, Hu, J, Secchiero, P, Zauli, G, Volinia, S, Negrini, M, Wierda, W, Kipps, TJ, Plunkett, W, Coombes, KR, Abruzzo, LV, Keating, MJ & Calin, GA. microRNA fingerprinting of CLL patients with chromosome 17p deletion identify a miR-21 score that stratifies early survival. *Blood*. 2010; 116: 945-952.
- 167 Smits, M, Nilsson, J, Mir, SE, van der Stoop, PM, Hulleman, E, Niers, JM, de Witt Hamer, PC, Marquez, VE, Cloos, J, Krichevsky, AM, Noske, DP, Tannous, BA & Wurdinger, T. miR-101 is down-regulated in glioblastoma resulting in EZH2-induced proliferation, migration, and angiogenesis. *Oncotarget*. 2010; 1: 710-720.
- 168 Ramkissoon, SH, Mainwaring, LA, Ogasawara, Y, Keyvanfar, K, McCoy, JP, Jr., Sloand, EM, Kajigaya, S & Young, NS. Hematopoietic-specific microRNA expression in human cells. *Leuk Res*. 2006; 30: 643-647.
- 169 Lu, J, Getz, G, Miska, EA, Alvarez-Saavedra, E, Lamb, J, Peck, D, Sweet-Cordero, A, Ebert, BL, Mak, RH, Ferrando, AA, Downing, JR, Jacks, T, Horvitz, HR & Golub, TR. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*. 2005; 435: 834-838.
- 170 Venturini, L, Battmer, K, Castoldi, M, Schultheis, B, Hochhaus, A, Muckenthaler, MU, Ganser, A, Eder, M & Scherr, M. Expression of the miR-17-92 polycistron in chronic myeloid leukemia (CML) CD34+ cells. *Blood*. 2007; 109: 4399-4405.
- 171 San Jose-Eneriz, E, Roman-Gomez, J, Jimenez-Velasco, A, Garate, L, Martin, V, Cordeu, L, Vilas-Zornoza, A, Rodriguez-Otero, P, Calasanz, MJ, Prosper, F & Agirre, X. MicroRNA expression profiling in Imatinib-resistant Chronic Myeloid Leukemia patients without clinically significant ABL1-mutations. *Molecular cancer*. 2009; 8: 69.
- 172 Mosakhani, N, Mustjoki, S & Knuutila, S. Down-regulation of miR-181c in imatinib-resistant chronic myeloid leukemia. *Molecular cytogenetics*. 2013; 6: 27.

- 173 Townley-Tilson, WH, Callis, TE & Wang, D. MicroRNAs 1, 133, and 206: critical factors of skeletal and cardiac muscle development, function, and disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2010; 42: 1252-1255.
- 174 Chen, JF, Mandel, EM, Thomson, JM, Wu, Q, Callis, TE, Hammond, SM, Conlon, FL & Wang, DZ. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat Genet*. 2006; 38: 228-233.
- 175 Heidersbach, A, Saxby, C, Carver-Moore, K, Huang, Y, Ang, YS, de Jong, PJ, Ivey, KN & Srivastava, D. microRNA-1 regulates sarcomere formation and suppresses smooth muscle gene expression in the mammalian heart. *eLife*. 2013; 2: e01323.
- 176 Zhao, Y, Ransom, JF, Li, A, Vedantham, V, von Drehle, M, Muth, AN, Tsuchihashi, T, McManus, MT, Schwartz, RJ & Srivastava, D. Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2. *Cell*. 2007; 129: 303-317.
- 177 Ai, J, Zhang, R, Li, Y, Pu, J, Lu, Y, Jiao, J, Li, K, Yu, B, Li, Z, Wang, R, Wang, L, Li, Q, Wang, N, Shan, H, Li, Z & Yang, B. Circulating microRNA-1 as a potential novel biomarker for acute myocardial infarction. *Biochemical and biophysical research communications*. 2010; 391: 73-77.
- 178 Kuwabara, Y, Ono, K, Horie, T, Nishi, H, Nagao, K, Kinoshita, M, Watanabe, S, Baba, O, Kojima, Y, Shizuta, S, Imai, M, Tamura, T, Kita, T & Kimura, T. Increased microRNA-1 and microRNA-133a levels in serum of patients with cardiovascular disease indicate myocardial damage. *Circulation. Cardiovascular genetics*. 2011; 4: 446-454.
- 179 Long, G, Wang, F, Duan, Q, Chen, F, Yang, S, Gong, W, Wang, Y, Chen, C & Wang, DW. Human circulating microRNA-1 and microRNA-126 as potential novel indicators for acute myocardial infarction. *International journal of biological sciences*. 2012; 8: 811-818.
- 180 Belevych, AE, Sansom, SE, Terentyeva, R, Ho, HT, Nishijima, Y, Martin, MM, Jindal, HK, Rochira, JA, Kunitomo, Y, Abdellatif, M, Carnes, CA, Elton, TS, Gyorke, S & Terentyev, D. MicroRNA-1 and -133 increase arrhythmogenesis in heart failure by dissociating phosphatase activity from RyR2 complex. *PLoS one*. 2011; 6: e28324.
- 181 Kumarswamy, R, Lyon, AR, Volkmann, I, Mills, AM, Bretthauer, J, Pahuja, A, Geers-Knorr, C, Kraft, T, Hajjar, RJ, Macleod, KT, Harding, SE & Thum, T. SERCA2a gene therapy restores microRNA-1 expression in heart failure via an Akt/FoxO3A-dependent pathway. *European heart journal*. 2012; 33: 1067-1075.

- 182 Datta, J, Kutay, H, Nasser, MW, Nuovo, GJ, Wang, B, Majumder, S, Liu, CG, Volinia, S, Croce, CM, Schmittgen, TD, Ghoshal, K & Jacob, ST. Methylation mediated silencing of MicroRNA-1 gene and its role in hepatocellular carcinogenesis. *Cancer Res.* 2008; 68: 5049-5058.
- 183 Rao, PK, Missiaglia, E, Shields, L, Hyde, G, Yuan, B, Shepherd, CJ, Shipley, J & Lodish, HF. Distinct roles for miR-1 and miR-133a in the proliferation and differentiation of rhabdomyosarcoma cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.* 2010; 24: 3427-3437.
- 184 Yan, D, Dong Xda, E, Chen, X, Wang, L, Lu, C, Wang, J, Qu, J & Tu, L. MicroRNA-1/206 targets c-Met and inhibits rhabdomyosarcoma development. *J Biol Chem.* 2009; 284: 29596-29604.
- 185 Nasser, MW, Datta, J, Nuovo, G, Kutay, H, Motiwala, T, Majumder, S, Wang, B, Suster, S, Jacob, ST & Ghoshal, K. Down-regulation of micro-RNA-1 (miR-1) in lung cancer. Suppression of tumorigenic property of lung cancer cells and their sensitization to doxorubicin-induced apoptosis by miR-1. *J Biol Chem.* 2008; 283: 33394-33405.
- 186 Nohata, N, Hanazawa, T, Kikkawa, N, Sakurai, D, Sasaki, K, Chiyomaru, T, Kawakami, K, Yoshino, H, Enokida, H, Nakagawa, M, Okamoto, Y & Seki, N. Identification of novel molecular targets regulated by tumor suppressive miR-1/miR-133a in maxillary sinus squamous cell carcinoma. *International journal of oncology.* 2011; 39: 1099-1107.
- 187 Nohata, N, Sone, Y, Hanazawa, T, Fuse, M, Kikkawa, N, Yoshino, H, Chiyomaru, T, Kawakami, K, Enokida, H, Nakagawa, M, Shozu, M, Okamoto, Y & Seki, N. miR-1 as a tumor suppressive microRNA targeting TAGLN2 in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget.* 2011; 2: 29-42.
- 188 Wang, F, Song, G, Liu, M, Li, X & Tang, H. miRNA-1 targets fibronectin1 and suppresses the migration and invasion of the HEP2 laryngeal squamous carcinoma cell line. *FEBS letters.* 2011; 585: 3263-3269.
- 189 Leone, V, D'Angelo, D, Rubio, I, de Freitas, PM, Federico, A, Colamaio, M, Pallante, P, Medeiros-Neto, G & Fusco, A. MiR-1 is a tumor suppressor in thyroid carcinogenesis targeting CCND2, CXCR4, and SDF-1alpha. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2011; 96: E1388-1398.

- 190 Leone, V, D'Angelo, D, Ferraro, A, Pallante, P, Rubio, I, Santoro, M, Croce, CM & Fusco, A. A TSH-CREB1-microRNA loop is required for thyroid cell growth. *Molecular endocrinology*. 2011; 25: 1819-1830.
- 191 Yip, L, Kelly, L, Shuai, Y, Armstrong, MJ, Nikiforov, YE, Carty, SE & Nikiforova, MN. MicroRNA signature distinguishes the degree of aggressiveness of papillary thyroid carcinoma. *Annals of surgical oncology*. 2011; 18: 2035-2041.
- 192 Kojima, S, Chiyomaru, T, Kawakami, K, Yoshino, H, Enokida, H, Nohata, N, Fuse, M, Ichikawa, T, Naya, Y, Nakagawa, M & Seki, N. Tumour suppressors miR-1 and miR-133a target the oncogenic function of purine nucleoside phosphorylase (PNP) in prostate cancer. *British journal of cancer*. 2012; 106: 405-413.
- 193 Yoshino, H, Chiyomaru, T, Enokida, H, Kawakami, K, Tatarano, S, Nishiyama, K, Nohata, N, Seki, N & Nakagawa, M. The tumour-suppressive function of miR-1 and miR-133a targeting TAGLN2 in bladder cancer. *British journal of cancer*. 2011; 104: 808-818.
- 194 Kawakami, K, Enokida, H, Chiyomaru, T, Tatarano, S, Yoshino, H, Kagara, I, Gotanda, T, Tachiwada, T, Nishiyama, K, Nohata, N, Seki, N & Nakagawa, M. The functional significance of miR-1 and miR-133a in renal cell carcinoma. *European journal of cancer*. 2012; 48: 827-836.
- 195 Suzuki, H, Takatsuka, S, Akashi, H, Yamamoto, E, Nojima, M, Maruyama, R, Kai, M, Yamano, HO, Sasaki, Y, Tokino, T, Shinomura, Y, Imai, K & Toyota, M. Genome-wide profiling of chromatin signatures reveals epigenetic regulation of MicroRNA genes in colorectal cancer. *Cancer Res*. 2011; 71: 5646-5658.
- 196 Wu, CD, Kuo, YS, Wu, HC & Lin, CT. MicroRNA-1 induces apoptosis by targeting prothymosin alpha in nasopharyngeal carcinoma cells. *Journal of biomedical science*. 2011; 18: 80.
- 197 Gomez-Benito, M, Conchillo, A, Garcia, MA, Vazquez, I, Maicas, M, Vicente, C, Cristobal, I, Marcotegui, N, Garcia-Orti, L, Bandres, E, Calasanz, MJ, Alonso, MM & Odero, MD. EVI1 controls proliferation in acute myeloid leukaemia through modulation of miR-1-2. *British journal of cancer*. 2010; 103: 1292-1296.
- 198 Gutierrez, NC, Sarasquete, ME, Misiewicz-Krzeminska, I, Delgado, M, De Las Rivas, J, Ticona, FV, Ferminan, E, Martin-Jimenez, P, Chillon, C, Risueno, A, Hernandez, JM, Garcia-Sanz, R, Gonzalez, M & San Miguel, JF. Deregulation of microRNA expression in the

different genetic subtypes of multiple myeloma and correlation with gene expression profiling. *Leukemia*. 2010; 24: 629-637.

199 Koberle, V, Kronenberger, B, Pleli, T, Trojan, J, Imelmann, E, Peveling-Oberhag, J, Welker, MW, Elhendawy, M, Zeuzem, S, Piiper, A & Waidmann, O. Serum microRNA-1 and microRNA-122 are prognostic markers in patients with hepatocellular carcinoma. *European journal of cancer*. 2013; 49: 3442-3449.

200 Hu, Z, Chen, X, Zhao, Y, Tian, T, Jin, G, Shu, Y, Chen, Y, Xu, L, Zen, K, Zhang, C & Shen, H. Serum microRNA signatures identified in a genome-wide serum microRNA expression profiling predict survival of non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2010; 28: 1721-1726.

201 Liu, R, Zhang, C, Hu, Z, Li, G, Wang, C, Yang, C, Huang, D, Chen, X, Zhang, H, Zhuang, R, Deng, T, Liu, H, Yin, J, Wang, S, Zen, K, Ba, Y & Zhang, CY. A five-microRNA signature identified from genome-wide serum microRNA expression profiling serves as a fingerprint for gastric cancer diagnosis. *European journal of cancer*. 2011; 47: 784-791.

202 Skarn, M, Baroy, T, Stratford, EW & Myklebost, O. Epigenetic regulation and functional characterization of microRNA-142 in mesenchymal cells. *PloS one*. 2013; 8: e79231.

203 Jin, HL, Kim, JS, Kim, YJ, Kim, SJ, Broxmeyer, HE & Kim, KS. Dynamic expression of specific miRNAs during erythroid differentiation of human embryonic stem cells. *Molecules and cells*. 2012; 34: 177-183.

204 Xu, R, Bi, C, Song, J, Wang, L, Ge, C, Liu, X & Zhang, M. Upregulation of miR-142-5p in atherosclerotic plaques and regulation of oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis in macrophages. *Molecular medicine reports*. 2015; 11: 3229-3234.

205 Ding, S, Liang, Y, Zhao, M, Liang, G, Long, H, Zhao, S, Wang, Y, Yin, H, Zhang, P, Zhang, Q & Lu, Q. Decreased microRNA-142-3p/5p expression causes CD4+ T cell activation and B cell hyperstimulation in systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism*. 2012; 64: 2953-2963.

206 Kee, HJ, Park, S, Kwon, JS, Choe, N, Ahn, Y, Kook, H & Jeong, MH. B cell translocation gene, a direct target of miR-142-5p, inhibits vascular smooth muscle cell proliferation by down-regulating cell cycle progression. *FEBS letters*. 2013; 587: 2385-2392.

- 207 Brenu, EW, Ashton, KJ, Batovska, J, Staines, DR & Marshall-Gradisnik, SM. High-throughput sequencing of plasma microRNA in chronic fatigue syndrome/myalgic encephalomyelitis. *PloS one*. 2014; 9: e102783.
- 208 Collares, CV, Evangelista, AF, Xavier, DJ, Rassi, DM, Arns, T, Foss-Freitas, MC, Foss, MC, Puthier, D, Sakamoto-Hojo, ET, Passos, GA & Donadi, EA. Identifying common and specific microRNAs expressed in peripheral blood mononuclear cell of type 1, type 2, and gestational diabetes mellitus patients. *BMC research notes*. 2013; 6: 491.
- 209 Yuchuan, H, Ya, D, Jie, Z, Jingqiu, C, Yanrong, L, Dongliang, L, Changguo, W, Kuoyan, M, Guangneng, L, Fang, X, Lanlan, T & Bo, Q. Circulating miRNAs might be promising biomarkers to reflect the dynamic pathological changes in smoking-related interstitial fibrosis. *Toxicology and industrial health*. 2014; 30: 182-191.
- 210 Liu, X, Sempere, LF, Galimberti, F, Freemantle, SJ, Black, C, Dragnev, KH, Ma, Y, Fiering, S, Memoli, V, Li, H, DiRenzo, J, Korc, M, Cole, CN, Bak, M, Kauppinen, S & Dmitrovsky, E. Uncovering growth-suppressive MicroRNAs in lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2009; 15: 1177-1183.
- 211 Sempere, LF, Liu, X & Dmitrovsky, E. Tumor-suppressive microRNAs in Lung cancer: diagnostic and therapeutic opportunities. *TheScientificWorldJournal*. 2009; 9: 626-628.
- 212 Su, YH, Zhou, Z, Yang, KP, Wang, XG, Zhu, Y & Fa, XE. MIR-142-5p and miR-9 may be involved in squamous lung cancer by regulating cell cycle related genes. *European review for medical and pharmacological sciences*. 2013; 17: 3213-3220.
- 213 Muller, S & Nowak, K. Exploring the miRNA-mRNA regulatory network in clear cell renal cell carcinomas by next-generation sequencing expression profiles. *BioMed research international*. 2014; 2014: 948408.
- 214 Wald, AI, Hoskins, EE, Wells, SI, Ferris, RL & Khan, SA. Alteration of microRNA profiles in squamous cell carcinoma of the head and neck cell lines by human papillomavirus. *Head & neck*. 2011; 33: 504-512.
- 215 Wang, F, Wong, SC, Chan, LW, Cho, WC, Yip, SP & Yung, BY. Multiple regression analysis of mRNA-miRNA associations in colorectal cancer pathway. *BioMed research international*. 2014; 2014: 676724.
- 216 Saito, Y, Suzuki, H, Tsugawa, H, Imaeda, H, Matsuzaki, J, Hirata, K, Hosoe, N, Nakamura, M, Mukai, M, Saito, H & Hibi, T. Overexpression of miR-142-5p and miR-155 in

gastric mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma resistant to *Helicobacter pylori* eradication. *PLoS one*. 2012; 7: e47396.

217 Ohuchida, K, Mizumoto, K, Kayashima, T, Fujita, H, Moriyama, T, Ohtsuka, T, Ueda, J, Nagai, E, Hashizume, M & Tanaka, M. MicroRNA expression as a predictive marker for gemcitabine response after surgical resection of pancreatic cancer. *Annals of surgical oncology*. 2011; 18: 2381-2387.

218 Tembe, V, Schramm, S, Stark, MS, Patrick, E, Jayaswal, V, Tang, YH, Barbour, A, Hayward, NK, Thompson, JF, Scolyer, RA, Yang, YH & Mann, GJ. MicroRNA and mRNA expression profiling in metastatic melanoma reveal associations with BRAF mutation and patient prognosis. *Pigment cell & melanoma research*. 2014.

219 Zhang, X, Yan, Z, Zhang, J, Gong, L, Li, W, Cui, J, Liu, Y, Gao, Z, Li, J, Shen, L & Lu, Y. Combination of hsa-miR-375 and hsa-miR-142-5p as a predictor for recurrence risk in gastric cancer patients following surgical resection. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2011; 22: 2257-2266.

220 Nie, J, Liu, L, Zheng, W, Chen, L, Wu, X, Xu, Y, Du, X & Han, W. microRNA-365, down-regulated in colon cancer, inhibits cell cycle progression and promotes apoptosis of colon cancer cells by probably targeting Cyclin D1 and Bcl-2. *Carcinogenesis*. 2012; 33: 220-225.

221 Kang, SM, Lee, HJ & Cho, JY. MicroRNA-365 regulates NKX2-1, a key mediator of lung cancer. *Cancer Lett*. 2013; 335: 487-494.

222 Zhou, M, Liu, W, Ma, S, Cao, H, Peng, X, Guo, L, Zhou, X, Zheng, L, Guo, L, Wan, M, Shi, W, He, Y, Lu, C, Jiang, L, Ou, C, Guo, Y & Ding, Z. A novel onco-miR-365 induces cutaneous squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis*. 2013; 34: 1653-1659.

223 Guan, YJ, Yang, X, Wei, L & Chen, Q. MiR-365: a mechanosensitive microRNA stimulates chondrocyte differentiation through targeting histone deacetylase 4. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2011; 25: 4457-4466.

224 Qin, B, Xiao, B, Liang, D, Xia, J, Li, Y & Yang, H. MicroRNAs expression in ox-LDL treated HUVECs: MiR-365 modulates apoptosis and Bcl-2 expression. *Biochemical and biophysical research communications*. 2011; 410: 127-133.

- 225 Franceschetti, T, Dole, NS, Kessler, CB, Lee, SK & Delany, AM. Pathway analysis of microRNA expression profile during murine osteoclastogenesis. *PloS one*. 2014; 9: e107262.
- 226 Zhang, P, Zheng, C, Ye, H, Teng, Y, Zheng, B, Yang, X & Zhang, J. MicroRNA-365 inhibits vascular smooth muscle cell proliferation through targeting cyclin D1. *International journal of medical sciences*. 2014; 11: 765-770.
- 227 Mori, MA, Thomou, T, Boucher, J, Lee, KY, Lallukka, S, Kim, JK, Torriani, M, Yki-Jarvinen, H, Grinspoon, SK, Cypess, AM & Kahn, CR. Altered miRNA processing disrupts brown/white adipocyte determination and associates with lipodystrophy. *The Journal of clinical investigation*. 2014; 124: 3339-3351.
- 228 Feuermann, Y, Kang, K, Gavrilova, O, Haetscher, N, Jang, SJ, Yoo, KH, Jiang, C, Gonzalez, FJ, Robinson, GW & Hennighausen, L. MiR-193b and miR-365-1 are not required for the development and function of brown fat in the mouse. *RNA biology*. 2013; 10: 1807-1814.
- 229 Xu, Z, Xiao, SB, Xu, P, Xie, Q, Cao, L, Wang, D, Luo, R, Zhong, Y, Chen, HC & Fang, LR. miR-365, a novel negative regulator of interleukin-6 gene expression, is cooperatively regulated by Sp1 and NF-kappaB. *J Biol Chem*. 2011; 286: 21401-21412.
- 230 Parisi, C, Arisi, I, D'Ambrosi, N, Storti, AE, Brandi, R, D'Onofrio, M & Volonte, C. Dysregulated microRNAs in amyotrophic lateral sclerosis microglia modulate genes linked to neuroinflammation. *Cell death & disease*. 2013; 4: e959.
- 231 Guo, SL, Ye, H, Teng, Y, Wang, YL, Yang, G, Li, XB, Zhang, C, Yang, X, Yang, ZZ & Yang, X. Akt-p53-miR-365-cyclin D1/cdc25A axis contributes to gastric tumorigenesis induced by PTEN deficiency. *Nature communications*. 2013; 4: 2544.
- 232 Zhou, M, Zhou, L, Zheng, L, Guo, L, Wang, Y, Liu, H, Ou, C & Ding, Z. miR-365 promotes cutaneous squamous cell carcinoma (CSCC) through targeting nuclear factor I/B (NFIB). *PloS one*. 2014; 9: e100620.
- 233 Qi, J, Rice, SJ, Salzberg, AC, Runkle, EA, Liao, J, Zander, DS & Mu, D. MiR-365 regulates lung cancer and developmental gene thyroid transcription factor 1. *Cell cycle*. 2012; 11: 177-186.
- 234 Wang, XY, Wu, MH, Liu, F, Li, Y, Li, N, Li, GY & Shen, SR. Differential miRNA expression and their target genes between NGX6-positive and negative colon cancer cells. *Molecular and cellular biochemistry*. 2010; 345: 283-290.

- 235 Tao, J, Ji, J, Li, X, Ding, N, Wu, H, Liu, Y, Wang, X, Calvisi, DF, Song, G & Chen, X. Distinct anti-oncogenic effect of various microRNAs in different mouse models of liver cancer. *Oncotarget*. 2015;6(9):6977-88.
- 236 Seviour, EG, Sehgal, V, Lu, Y, Luo, Z, Moss, T, Zhang, F, Hill, SM, Liu, W, Maiti, SN, Cooper, L, Azencot, R, Lopez-Berestein, G, Rodriguez-Aguayo, C, Roopaimoole, R, Pecot, C, Sood, AK, Mukherjee, S, Gray, JW, Mills, GB & Ram, PT. Functional proteomics identifies miRNAs to target a p27/Myc/phospho-Rb signature in breast and ovarian cancer. *Oncogene*. 2015 ;35(6):691-701.
- 237 Yan, LX, Huang, XF, Shao, Q, Huang, MY, Deng, L, Wu, QL, Zeng, YX & Shao, JY. MicroRNA miR-21 overexpression in human breast cancer is associated with advanced clinical stage, lymph node metastasis and patient poor prognosis. *RNA*. 2008; 14: 2348-2360.
- 238 Kodahl, AR, Lyng, MB, Binder, H, Cold, S, Gravgaard, K, Knoop, AS & Ditzel, HJ. Novel circulating microRNA signature as a potential non-invasive multi-marker test in ER-positive early-stage breast cancer: a case control study. *Molecular oncology*. 2014; 8: 874-883.
- 239 Hamada, S, Masamune, A, Miura, S, Satoh, K & Shimosegawa, T. MiR-365 induces gemcitabine resistance in pancreatic cancer cells by targeting the adaptor protein SHC1 and pro-apoptotic regulator BAX. *Cellular signalling*. 2014; 26: 179-185.
- 240 Zhu, DX, Zhu, W, Fang, C, Fan, L, Zou, ZJ, Wang, YH, Liu, P, Hong, M, Miao, KR, Liu, P, Xu, W & Li, JY. miR-181a/b significantly enhances drug sensitivity in chronic lymphocytic leukemia cells via targeting multiple anti-apoptosis genes. *Carcinogenesis*. 2012; 33: 1294-1301.
- 241 Song, T, Xia, W, Shao, N, Zhang, X, Wang, C, Wu, Y, Dong, J, Cai, W & Li, H. Differential miRNA expression profiles in bladder urothelial carcinomas. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*. 2010; 11: 905-911.
- 242 Kikkawa, N, Hanazawa, T, Fujimura, L, Nohata, N, Suzuki, H, Chazono, H, Sakurai, D, Horiguchi, S, Okamoto, Y & Seki, N. miR-489 is a tumour-suppressive miRNA target PTPN11 in hypopharyngeal squamous cell carcinoma (HSCC). *British journal of cancer*. 2010; 103: 877-884.

- 243 Hu, G, Chen, D, Li, X, Yang, K, Wang, H & Wu, W. miR-133b regulates the MET proto-oncogene and inhibits the growth of colorectal cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer biology & therapy*. 2010; 10: 190-197.
- 244 Sarver, AL, French, AJ, Borralho, PM, Thayanithy, V, Oberg, AL, Silverstein, KA, Morlan, BW, Riska, SM, Boardman, LA, Cunningham, JM, Subramanian, S, Wang, L, Smyrk, TC, Rodrigues, CM, Thibodeau, SN & Steer, CJ. Human colon cancer profiles show differential microRNA expression depending on mismatch repair status and are characteristic of undifferentiated proliferative states. *BMC cancer*. 2009; 9: 401.
- 245 Ma, Y, Zhang, P, Yang, J, Liu, Z, Yang, Z & Qin, H. Candidate microRNA biomarkers in human colorectal cancer: systematic review profiling studies and experimental validation. *International journal of cancer. Journal international du cancer*. 2012; 130: 2077-2087.
- 246 Bandres, E, Cubedo, E, Agirre, X, Malumbres, R, Zarate, R, Ramirez, N, Abajo, A, Navarro, A, Moreno, I, Monzo, M & Garcia-Foncillas, J. Identification by Real-time PCR of 13 mature microRNAs differentially expressed in colorectal cancer and non-tumoral tissues. *Molecular cancer*. 2006; 5: 29.
- 247 Crawford, M, Batte, K, Yu, L, Wu, X, Nuovo, GJ, Marsh, CB, Otterson, GA & Nana-Sinkam, SP. MicroRNA 133B targets pro-survival molecules MCL-1 and BCL2L2 in lung cancer. *Biochemical and biophysical research communications*. 2009; 388: 483-489.
- 248 Kano, M, Seki, N, Kikkawa, N, Fujimura, L, Hoshino, I, Akutsu, Y, Chiyomaru, T, Enokida, H, Nakagawa, M & Matsubara, H. miR-145, miR-133a and miR-133b: Tumor-suppressive miRNAs target FSCN1 in esophageal squamous cell carcinoma. *International journal of cancer. Journal international du cancer*. 2010; 127: 2804-2814.
- 249 Ambs, S, Prueitt, RL, Yi, M, Hudson, RS, Howe, TM, Petrocca, F, Wallace, TA, Liu, CG, Volinia, S, Calin, GA, Yfantis, HG, Stephens, RM & Croce, CM. Genomic profiling of microRNA and messenger RNA reveals deregulated microRNA expression in prostate cancer. *Cancer Res*. 2008; 68: 6162-6170.
- 250 Jones, KB, Salah, Z, Del Mare, S, Galasso, M, Gaudio, E, Nuovo, GJ, Lovat, F, LeBlanc, K, Palatini, J, Randall, RL, Volinia, S, Stein, GS, Croce, CM, Lian, JB & Aqeilan, RI. miRNA signatures associate with pathogenesis and progression of osteosarcoma. *Cancer Res*. 2012; 72: 1865-1877.

- 251 Jo, DH, Kim, JH, Park, WY, Kim, KW, Yu, YS & Kim, JH. Differential profiles of microRNAs in retinoblastoma cell lines of different proliferation and adherence patterns. *Journal of pediatric hematology/oncology*. 2011; 33: 529-533.
- 252 Chu, S, Holtz, M, Gupta, M & Bhatia, R. BCR/ABL kinase inhibition by imatinib mesylate enhances MAP kinase activity in chronic myelogenous leukemia CD34+ cells. *Blood*. 2004; 103: 3167-3174.
- 253 Kirschner, KM & Baltensperger, K. Erythropoietin promotes resistance against the Abl tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) in K562 human leukemia cells. *Molecular cancer research : MCR*. 2003; 1: 970-980.
- 254 Ohmine, K, Nagai, T, Tarumoto, T, Miyoshi, T, Muroi, K, Mano, H, Komatsu, N, Takaku, F & Ozawa, K. Analysis of gene expression profiles in an imatinib-resistant cell line, KCL22/SR. *Stem Cells*. 2003; 21: 315-321.
- 255 Parmar, S, Katsoulidis, E, Verma, A, Li, Y, Sassano, A, Lal, L, Majchrzak, B, Ravandi, F, Tallman, MS, Fish, EN & Plataniias, LC. Role of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in the generation of the effects of imatinib mesylate (STI571) in BCR-ABL-expressing cells. *J Biol Chem*. 2004; 279: 25345-25352.
- 256 Airiau, K, Mahon, FX, Josselin, M, Jeanneteau, M & Belloc, F. PI3K/mTOR pathway inhibitors sensitize chronic myeloid leukemia stem cells to nilotinib and restore the response of progenitors to nilotinib in the presence of stem cell factor. *Cell death & disease*. 2013; 4: e827.
- 257 Ding, J, Romani, J, Zaborski, M, MacLeod, RA, Nagel, S, Drexler, HG & Quentmeier, H. Inhibition of PI3K/mTOR overcomes nilotinib resistance in BCR-ABL1 positive leukemia cells through translational down-regulation of MDM2. *PLoS one*. 2013; 8: e83510.
- 258 Okabe, S, Tauchi, T, Tanaka, Y, Kitahara, T, Kimura, S, Maekawa, T & Ohyashiki, K. Efficacy of the dual PI3K and mTOR inhibitor NVP-BEZ235 in combination with nilotinib against BCR-ABL-positive leukemia cells involves the ABL kinase domain mutation. *Cancer biology & therapy*. 2014; 15: 207-215.
- 259 Quentmeier, H, Eberth, S, Romani, J, Zaborski, M & Drexler, HG. BCR-ABL1-independent PI3Kinase activation causing imatinib-resistance. *Journal of hematology & oncology*. 2011; 4: 6.

- 260 Stoklosa, T, Glodkowska-Mrowka, E, Hoser, G, Kielak, M, Seferynska, I & Wlodarski, P. Diverse mechanisms of mTOR activation in chronic and blastic phase of chronic myelogenous leukemia. *Experimental hematology*. 2013; 41: 462-469.
- 261 Tsurutani, J, West, KA, Sayyah, J, Gills, JJ & Dennis, PA. Inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin pathway but not the MEK/ERK pathway attenuates laminin-mediated small cell lung cancer cellular survival and resistance to imatinib mesylate or chemotherapy. *Cancer Res*. 2005; 65: 8423-8432.
- 262 Wohrle, FU, Halbach, S, Aumann, K, Schwemmers, S, Braun, S, Auberger, P, Schramek, D, Penninger, JM, Lassmann, S, Werner, M, Waller, CF, Pahl, HL, Zeiser, R, Daly, RJ & Brummer, T. Gab2 signaling in chronic myeloid leukemia cells confers resistance to multiple Bcr-Abl inhibitors. *Leukemia*. 2013; 27: 118-129.
- 263 Miyazono, K. Tumour promoting functions of TGF-beta in CML-initiating cells. *Journal of biochemistry*. 2012; 152: 383-385.
- 264 Smith, PG, Tanaka, H & Chantry, A. A novel co-operative mechanism linking TGFbeta and Lyn kinase activation to imatinib resistance in chronic myeloid leukaemia cells. *Oncotarget*. 2012; 3: 518-524.
- 265 Zhu, X, Wang, L, Zhang, B, Li, J, Dou, X & Zhao, RC. TGF-beta1-induced PI3K/Akt/NF-kappaB/MMP9 signalling pathway is activated in Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukaemia hemangioblasts. *Journal of biochemistry*. 2011; 149: 405-414.
- 266 Chang, G, Zhang, H, Wang, J, Zhang, Y, Xu, H, Wang, C, Zhang, H, Ma, L, Li, Q & Pang, T. CD44 targets Wnt/beta-catenin pathway to mediate the proliferation of K562 cells. *Cancer cell international*. 2013; 13: 117.
- 267 Gregory, MA, Phang, TL, Neviani, P, Alvarez-Calderon, F, Eide, CA, O'Hare, T, Zaberezhnyy, V, Williams, RT, Druker, BJ, Perrotti, D & Degregori, J. Wnt/Ca2+/NFAT signaling maintains survival of Ph+ leukemia cells upon inhibition of Bcr-Abl. *Cancer cell*. 2010; 18: 74-87.
- 268 Kleppe, M & Levine, RL. Targeting beta-catenin in CML: leukemia stem cells beware! *Cell stem cell*. 2012; 10: 351-353.

- 269 Niu, CC, Zhao, C, Zhang, XL, Pan, J, Zhao, C, Wu, WR, Li, ZQ, Liu, T, Yang, Z & Si, WK. Wnt5a enhances the response of CML cells to Imatinib Mesylate through JNK activation and gamma-catenin inhibition. *Leuk Res.* 2013; 37: 1532-1537.
- 270 Rens, A & Moelling, K. Bcr is a negative regulator of the Wnt signalling pathway. *EMBO reports.* 2005; 6: 1095-1100.
- 271 Scheller, M, Schonheit, J, Zimmermann, K, Leser, U, Rosenbauer, F & Leutz, A. Cross talk between Wnt/beta-catenin and Irf8 in leukemia progression and drug resistance. *J Exp Med.* 2013; 210: 2239-2256.
- 272 Schurch, C, Riether, C, Matter, MS, Tzankov, A & Ochsenbein, AF. CD27 signaling on chronic myelogenous leukemia stem cells activates Wnt target genes and promotes disease progression. *The Journal of clinical investigation.* 2012; 122: 624-638.
- 273 Zhang, B, Li, M, McDonald, T, Holyoake, TL, Moon, RT, Campana, D, Shultz, L & Bhatia, R. Microenvironmental protection of CML stem and progenitor cells from tyrosine kinase inhibitors through N-cadherin and Wnt-beta-catenin signaling. *Blood.* 2013; 121: 1824-1838.
- 274 Lakshmikuttyamma, A, Takahashi, N, Pastural, E, Torlakovic, E, Amin, HM, Garcia-Manero, G, Voralia, M, Czader, M, DeCoteau, JF & Geyer, CR. RIZ1 is potential CML tumor suppressor that is down-regulated during disease progression. *Journal of hematology & oncology.* 2009; 2: 28.
- 275 Machado-Neto, JA, Favaro, P, Lazarini, M, Costa, FF, Olalla Saad, ST & Traina, F. Knockdown of insulin receptor substrate 1 reduces proliferation and downregulates Akt/mTOR and MAPK pathways in K562 cells. *Biochim Biophys Acta.* 2011; 1813: 1404-1411.
- 276 Pastural, E, Takahashi, N, Dong, WF, Bainbridge, M, Hull, A, Pearson, D, Huang, S, Lowsky, R, DeCoteau, JF & Geyer, CR. RIZ1 repression is associated with insulin-like growth factor-1 signaling activation in chronic myeloid leukemia cell lines. *Oncogene.* 2007; 26: 1586-1594.
- 277 Irwin, ME, Nelson, LD, Santiago-O'Farrill, JM, Knouse, PD, Miller, CP, Palla, SL, Siwak, DR, Mills, GB, Estrov, Z, Li, S, Kornblau, SM, Hughes, DP & Chandra, J. Small molecule ErbB inhibitors decrease proliferative signaling and promote apoptosis in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *PLoS one.* 2013; 8: e70608.

- 278 Feng, DD, Zhang, H, Zhang, P, Zheng, YS, Zhang, XJ, Han, BW, Luo, XQ, Xu, L, Zhou, H, Qu, LH & Chen, YQ. Down-regulated miR-331-5p and miR-27a are associated with chemotherapy resistance and relapse in leukaemia. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2011; 15: 2164-2175.
- 279 Turrini, E, Haenisch, S, Laechelt, S, Diewock, T, Bruhn, O & Cascorbi, I. MicroRNA profiling in K-562 cells under imatinib treatment: influence of miR-212 and miR-328 on ABCG2 expression. *Pharmacogenetics and genomics*. 2012; 22: 198-205.
- 280 White, DL, Saunders, VA, Dang, P, Engler, J, Zannettino, AC, Cambareri, AC, Quinn, SR, Manley, PW & Hughes, TP. OCT-1-mediated influx is a key determinant of the intracellular uptake of imatinib but not nilotinib (AMN107): reduced OCT-1 activity is the cause of low in vitro sensitivity to imatinib. *Blood*. 2006; 108: 697-704.
- 281 Bazeos, A, Marin, D, Reid, AG, Gerrard, G, Milojkovic, D, May, PC, de Lavallade, H, Garland, P, Rezvani, K, Apperley, JF, Goldman, JM, Feroni, L & Khorashad, JS. hOCT1 transcript levels and single nucleotide polymorphisms as predictive factors for response to imatinib in chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2010; 24: 1243-1245.
- 282 de Lima, LT, Vivona, D, Bueno, CT, Hirata, RD, Hirata, MH, Luchessi, AD, de Castro, FA, de Lourdes, FCM, Zanichelli, MA, Chiattoni, CS, Hungria, VT & Guerra-Shinohara, EM. Reduced ABCG2 and increased SLC22A1 mRNA expression are associated with imatinib response in chronic myeloid leukemia. *Medical oncology (Northwood, London, England)*. 2014; 31: 851.
- 283 Di Paolo, A, Polillo, M, Capecchi, M, Cervetti, G, Barate, C, Angelini, S, Guerrini, F, Fontanelli, G, Arici, R, Ciabatti, E, Grassi, S, Bocci, G, Hrelia, P, Danesi, R, Petrini, M & Galimberti, S. The c.480C>G polymorphism of hOCT1 influences imatinib clearance in patients affected by chronic myeloid leukemia. *The pharmacogenomics journal*. 2014; 14: 328-335.
- 284 Giannoudis, A, Wang, L, Jorgensen, AL, Xinarianos, G, Davies, A, Pushpakom, S, Liloglou, T, Zhang, JE, Austin, G, Holyoake, TL, Feroni, L, Kottaridis, PD, Muller, MC, Pirmohamed, M & Clark, RE. The hOCT1 SNPs M420del and M408V alter imatinib uptake and M420del modifies clinical outcome in imatinib-treated chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2013; 121: 628-637.
- 285 Sacha, T, Czekalska, S, Foryciarz, K, Zawada, M, Florek, I, Cwynar, D, Wator, G, Balwierz, W & Skotnicki, AB. [H-oCT1 gene expression as a predictor of major and complete

molecular response to imatinib of chronic myeloid leukemia. Single center experience]. *Przegląd Lekarski*. 2011; 68: 191-195.

286 Singh, O, Chan, JY, Lin, K, Heng, CC & Chowbay, B. SLC22A1-ABCB1 haplotype profiles predict imatinib pharmacokinetics in Asian patients with chronic myeloid leukemia. *PloS one*. 2012; 7: e51771.

287 Vine, J, Cohen, SB, Ruchlemer, R, Goldschmidt, N, Levin, M, Libster, D, Gural, A, Gatt, ME, Lavie, D, Ben-Yehuda, D & Rund, D. Polymorphisms in the human organic cation transporter and the multidrug resistance gene: correlation with imatinib levels and clinical course in patients with chronic myeloid leukemia. *Leukemia & lymphoma*. 2014; 55: 2525-2531.

288 White, DL, Saunders, VA, Dang, P, Engler, J, Venables, A, Zrim, S, Zannettino, A, Lynch, K, Manley, PW & Hughes, T. Most CML patients who have a suboptimal response to imatinib have low OCT-1 activity: higher doses of imatinib may overcome the negative impact of low OCT-1 activity. *Blood*. 2007; 110(12):4064-72.

289 Nies, AT, Schaeffeler, E, van der Kuip, H, Cascorbi, I, Bruhn, O, Kneba, M, Pott, C, Hofmann, U, Volk, C, Hu, S, Baker, SD, Sparreboom, A, Ruth, P, Koepsell, H & Schwab, M. Cellular uptake of imatinib into leukemic cells is independent of human organic cation transporter 1 (OCT1). *Clin Cancer Res*. 2014; 20: 985-994.

290 Yamaguchi, N, Isomoto, H, Mukae, H, Ishimoto, H, Ohnita, K, Shikuwa, S, Mizuta, Y, Nakazato, M & Kohno, S. Concentrations of alpha- and beta-defensins in plasma of patients with inflammatory bowel disease. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]*. 2009; 58: 192-197.

291 Kanmura, S, Uto, H, Numata, M, Hashimoto, S, Moriuchi, A, Fujita, H, Oketani, M, Ido, A, Kodama, M, Ohi, H & Tsubouchi, H. Human neutrophil peptides 1-3 are useful biomarkers in patients with active ulcerative colitis. *Inflammatory bowel diseases*. 2009; 15: 909-917.

292 Albrethsen, J, Moller, CH, Olsen, J, Raskov, H & Gammeltoft, S. Human neutrophil peptides 1, 2 and 3 are biochemical markers for metastatic colorectal cancer. *European journal of cancer*. 2006; 42: 3057-3064.

293 Albrethsen, J, Bogebo, R, Gammeltoft, S, Olsen, J, Winther, B & Raskov, H. Upregulated expression of human neutrophil peptides 1, 2 and 3 (HNP 1-3) in colon cancer serum and tumours: a biomarker study. *BMC cancer*. 2005; 5: 8.

- 294 Gunes, M, Gecit, I, Pirincci, N, Kemik, AS, Purisa, S, Ceylan, K & Aslan, M. Plasma human neutrophil proteins-1, -2, and -3 levels in patients with bladder cancer. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2013; 139: 195-199.
- 295 Chavakis, T, Cines, DB, Rhee, JS, Liang, OD, Schubert, U, Hammes, HP, Higazi, AA, Nawroth, PP, Preissner, KT & Bdeir, K. Regulation of neovascularization by human neutrophil peptides (alpha-defensins): a link between inflammation and angiogenesis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2004; 18: 1306-1308.
- 296 Economopoulou, M, Bdeir, K, Cines, DB, Fogt, F, Bdeir, Y, Lubkowski, J, Lu, W, Preissner, KT, Hammes, HP & Chavakis, T. Inhibition of pathologic retinal neovascularization by alpha-defensins. *Blood*. 2005; 106: 3831-3838.
- 297 Barker, E & Reisfeld, RA. A mechanism for neutrophil-mediated lysis of human neuroblastoma cells. *Cancer Res*. 1993; 53: 362-367.
- 298 McKeown, ST, Lundy, FT, Nelson, J, Lockhart, D, Irwin, CR, Cowan, CG & Marley, JJ. The cytotoxic effects of human neutrophil peptide-1 (HNP1) and lactoferrin on oral squamous cell carcinoma (OSCC) in vitro. *Oral oncology*. 2006; 42: 685-690.
- 299 Muller, CA, Markovic-Lipkovski, J, Klatt, T, Gamper, J, Schwarz, G, Beck, H, Deeg, M, Kalbacher, H, Widmann, S, Wessels, JT, Becker, V, Muller, GA & Flad, T. Human alpha-defensins HNPs-1, -2, and -3 in renal cell carcinoma: influences on tumor cell proliferation. *The American journal of pathology*. 2002; 160: 1311-1324.
- 300 Nowicki, MO, Pawlowski, P, Fischer, T, Hess, G, Pawlowski, T & Skorski, T. Chronic myelogenous leukemia molecular signature. *Oncogene*. 2003; 22: 3952-3963.
- 301 Hagberg, A, Olsson-Stromberg, U, Wickenberg-Bolin, U, Goransson, H, Isaksson, A, Bengtsson, M, Hoglund, M, Simonsson, B & Barbany, G. Gene expression analysis identifies a genetic signature potentially associated with response to alpha-IFN in chronic phase CML patients. *Leuk Res*. 2007; 31: 931-938.

7. Anhang

7.1. Ethikvotum

MEDIZINISCHE FAKULTÄT
DER CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITÄT ZU KIEL

ETHIK-KOMMISSION



Universitäts-Kinderklinik · Schwanenweg 20 · 24105 Kiel

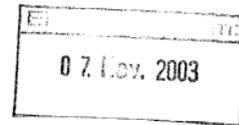
Herrn
Prof. Dr. Dr. med. M. Kneba
II. Medizinische Klinik und Poliklinik
im Städtischen Krankenhaus Kiel
Chemnitzstr. 33
24116 Kiel

Schwanenweg 20
D-24105 Kiel

Telefon 04 31 / 597-18 09
Telefax 04 31 / 597-18 31

Datum:

6.11.2003



AZ: D 426/03

Studienplan:

**Entnahme von Blut-, Knochenmark- oder Lymphknotenproben
von Patienten mit hämatologischen Systemerkrankungen zur
Anlage einer Materialbank für wissenschaftliche Untersuchun-
gen**

Ihr Schreiben

vom:

24.10.2003

Lieber Herr Kneba,

vielen Dank für Ihr Schreiben zu dem obengenannten Projekt mit der Patienteninformation und Einverständniserklärung zu der Anlage einer Materialbank für wissenschaftliche Untersuchungen.

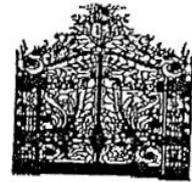
Nach Durchsicht der Unterlagen durch mich als Vorsitzenden der Ethik-Kommission bestehen gegen das Vorhaben keine berufsethischen und berufsrechtlichen Bedenken.

Mit freundlichen kollegialen Grüßen

Prof. Dr. med. Jürgen Schaub
Vorsitzender der Ethik-Kommission
der Medizinischen Fakultät der CAU zu Kiel



RUPRECHT - KARLS - UNIVERSITÄT HEIDELBERG
MEDIZINISCHE ETHIK-KOMMISSION II
FAKULTÄT FÜR KLINISCHE MEDIZIN MANNHEIM



Die Ethik-Kommission der Fakultät für Klinische Medizin Mannheim der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg hat im Umlaufverfahren, an dem die Professoren

Dr. med. Jens-Peter Striebel, apl. Professor für Anaesthesiologie als Vorsitzender

Dr. med. Dr. h.c. Björn Lemmer, Ordinarius für Pharmakologie und Toxikologie
Dr. jur. Reinhard Mußgnug, Ordinarius an der Juristischen Fakultät Heidelberg
Dr. rer. soc., Dipl.-Psych. Eibe-Rudolf Rey, Leiter Klinische Psychologie
Dr. med. Peter Schmiedek, Ordinarius für Neurochirurgie und
Gernot Ziegler, Dekan i. R. der Evangelischen Landeskirche Baden

als Beisitzer teilgenommen haben, zu dem Antrag

„Entnahme von Blut- oder Knochenmarkproben von Patienten mit akuten und chronischen Leukämien, chronischen myeloproliferativen und myelodysplastischen Erkrankungen zur Anlage einer Materialbank für wissenschaftliche Untersuchungen“

von PD Dr. Andreas Hochhaus, III. Med. Klinik, Universitätsklinikum Mannheim gGmbH, Eingang 06.11.00

Stellung genommen und folgenden Beschluß gefaßt:

Votum für den Leiter der klinischen Prüfung (LKP)

Gegen das Vorhaben sind aus ethischer und berufsrechtlicher Sicht keine Bedenken zu erheben.

Für dieses Votum gelten die nachfolgend formulierten Auflagen und Empfehlungen:

1. In der Patienteninformation ist der Begriff „Knochenmarkaspiration“ laienverständlich zu übersetzen.
2. Die Medizinische Ethik-Kommission II regt an, zu überlegen, ob der Patient/Patientin über die erhaltenen genetischen Daten informiert werden soll oder muss und ob sich darauf eventuell Konsequenzen für den Patienten ergeben.
3. Der Ethik-Kommission sind Mitteilungen über schwerwiegende oder unerwartete unerwünschte Ereignisse, die während der Studie auftreten und die Sicherheit der Studienteilnehmer, oder die Durchführung der Studie beeinträchtigen könnten (§ 40, Abs. 1, Satz 4 AMG) nur in Verbindung mit einer ggf. biometrisch begründeten Stellungnahme des Leiters der klinischen Prüfung zu übersenden und mit dem Hinweis zu versehen, ob aus seiner Sicht die Nutzen/Risiko-Relation des Vorhabens verändert worden ist.

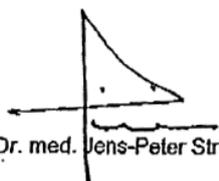
4. Ethisch relevante Änderungen im Prüfplan und in der Phase der Umsetzung bitten wir der Kommission mitzuteilen; geänderten Passagen sollten deutlich kenntlich gemacht werden.
5. Der Kommission ist die Beendigung des Vorhabens anzuzeigen.
6. Der Antragsteller hat sicherzustellen, daß die Akten und Unterlagen nach dem Abschluß des Vorhabens in seinem derzeitigen Arbeitsbereich verwahrt und ordnungsgemäß verwaltet werden.

Dieser Beschluß wurde einstimmig gefaßt.

Unabhängig vom Beratungsergebnis der Ethik-Kommission mache ich darauf aufmerksam, daß die ethische und rechtliche Verantwortung für die Durchführung einer klinischen Prüfung beim Leiter der klinischen Prüfung und auch bei allen an der Prüfung teilnehmenden Ärzten liegt.

Die Ethik-Kommission erwartet, daß ihr nach Abschluß der Prüfung ohne Aufforderung ein kurzer, einseitiger Bericht übermittelt wird. Er soll mitteilen, ob das Ziel der Studie erreicht wurde, ob ethische, ärztliche oder rechtliche Probleme aufgetreten sind, und ob das Ergebnis publiziert ist/wird.

Mannheim, den 15.12.2000



Prof. Dr. med. Jens-Peter Striebel

8. Danksagung

Für meine Dissertation bin ich einigen Personen zu herzlichstem Dank verpflichtet.

Zunächst möchte ich mich sehr herzlich bei Herrn Prof. Dr. Dr. Ingolf Cascorbi für die Überlassung eines spannenden Themas, für die Verfügungstellung exzellenter wissenschaftlicher Forschungsbedingungen in seinem Labor und seine wertvollen Hilfestellungen zur Lösung auftauchender Fragen und Probleme bedanken. Auch für die Förderung meiner wissenschaftlichen Karriere durch Ermöglichung der Teilnahme an Kongressen sowie der Koautorenschaft mehrerer Publikationen bin ich ihm dankbar.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Oliver Bruhn für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung und vertrauensvolle Zusammenarbeit. Insbesondere dankbar bin ich für die umfangreiche Einführung in molekularbiologische Arbeitsverfahren. Seine intensive und stets motivierte Anleitung und Betreuung machten die Durchführung dieser Doktorarbeit erst möglich und dazu zu einem Vergnügen. Bei der Verfassung wissenschaftlicher Arbeiten, insbesondere dieser Dissertation, ließ er mich an seiner Erfahrung teilhaben und erleichterte mir so die Umsetzung meine Arbeit erheblich. Auch hatte er jederzeit ein offenes Ohr für Probleme und konnte immer hilfreiche Lösungsansätze anbieten.

Meike Kähler möchte ich insbesondere für die kritische Durchsicht des Manuskripts und ihre durchdachten Verbesserungsvorschläge danken. Die anregenden Diskussionen mit ihr leisteten zudem einen wertvollen Beitrag zur Entwicklung neuer Ideen.

Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Experimentelle und Klinische Pharmakologie danke ich für die hervorragende Zusammenarbeit und die jederzeit vorhandene Hilfsbereitschaft. Ihre Geduld und Unterstützung nicht nur beim Erlernen molekularbiologischer Methoden wurden von mir dankend in Anspruch genommen.

Überdies gilt mein Dank meiner Familie und meinen Freunden für die fortdauernde Unterstützung und Ermunterung. Nicht zuletzt durch ihre Ermutigungen war es mir möglich, diese Dissertation anzufertigen.

9. Lebenslauf

Name: Tobias Diewock

Geburtsdatum: 16.11.1989

Geburtsort: Schleswig

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:	1996 – 1999	Grundschule Schleswig
	1999 – 2007	Gymnasium Lornsenschule, Schleswig
	2007	Allgemeine Hochschulreife
Zivildienst:	10/2007 - 06/2008	Martin-Luther-Krankenhaus, Schleswig
Hochschulausbildung:	10/2008 - 10/2014	Studium der Humanmedizin mit Abschluss Staatsexamen an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Beruflicher Werdegang:	seit 05/2015	Assistenzarzt der Klinik für Innere Medizin III (Kardiologie und Angiologie) am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel Chefarzt: Prof. Dr. Norbert Frey

Publikationen:

Turrini E, Haenisch S, Laechelt S, Diewock T, Bruhn O and Cascorbi I. MicroRNA profiling in K-562 cells under imatinib treatment: influence of miR-212 and miR-328 on ABCG2 expression. *Pharmacogenet Genomics*, 2012;22:198-205

Bruhn O, Diewock T, Pott C, Kneba M, Cascorbi I and Haenisch S. Chronic myeloid leukemia: Prediction of response to imatinib therapy using microRNA expression. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2012;385 (Suppl):16

Bruhn O, Diewock T, Pott C, Kneba M, Cascorbi I and Haenisch S. MicroRNA expression in white blood cells of CML patients: Differential expression in responders and non-responders to imatinib. *Cancer Res* 2012; 72 (Suppl. 8) Abstract 1097

Bruhn O, Diewock T, Pott C, Kneba M, Haenisch S. and Cascorbi I. MicroRNA expression profiling of responding and non-responding CML-patients to imatinib therapy. *Basic and Clin Pharmacol Toxicol* 2014;115 (Suppl. 1) 310-311 Abstract 1004

Diewock T, Kaehler M, Pott C, Kneba M, Haenisch S, Cascorbi I, Bruhn O. MicroRNA expression profiling of responding and non-responding CML-patients to imatinib therapy. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2015;388 (Suppl 1):S46 Abstract 185