



**Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg**  
**Medizinische Fakultät Mannheim**  
**Dissertations-Kurzfassung**

**In vitro- und in vivo-Studien zur Pharmakodynamik des selektiven  
BCR-ABL-Inhibitors Nilotinib**

Autor: Susanne Holm-Eriksen  
Institut / Klinik: III. Medizinische Klinik  
Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. P. La Rosée

Durch die Entwicklung des selektiven BCR-ABL-gerichteten Tyrosinkinaseinhibitors Imatinib konnten signifikante Fortschritte in der Therapie von Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie erzielt werden. Trotzdem treten v. a. in fortgeschrittenen Stadien der CML Resistenzen gegenüber Imatinib auf, die in den meisten Fällen durch Punktmutationen in der BCR-ABL-Kinasedomäne hervorgerufen werden und eine Reaktivierung der BCR-ABL-Tyrosinkinase (TK) zur Folge haben. Mit Hilfe eines Western Blot-basierten Assays kann das Ausmaß der medikamentös induzierten BCR-ABL-Inhibition durch Messung des Phosphorylierungsstatus von CRKL, einem Surrogatprotein von BCR-ABL, überprüft werden.

Im ersten Teil dieser Arbeit erfolgte die Etablierung, Optimierung sowie Validierung des Phospho-CRKL-Shift-Assays nach bestehenden Protokollen im Mannheimer CML-Labor.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde eine vergleichende *in vitro*-Analyse der aus Gesamtleukozyten sowie CD34+ Progenitorzellen erhobenen P-CRKL-Daten unter Verwendung der TK-Inhibitoren Imatinib und Nilotinib durchgeführt. Es konnte eine äquivalente relative P-CRKL-Inhibition in den beiden Zellkompartimenten bei einer >20-fach erhöhten Aktivität von Nilotinib gegenüber Imatinib festgestellt werden, sodass die in Gesamtleukozyten gemessene relative P-CRKL-Inhibition die tatsächliche relative P-CRKL-Inhibition in Stammzellen widerspiegelt. Dabei zeigten die CD34+ Progenitorzellen eine im Mittel 5-fach erhöhte basale P-CRKL-Expression, welche mit der in der Literatur beschriebenen hohen BCR-ABL-Expression in unreifen Stammzellen zusammenpasst und somit eine erhöhte BCR-ABL-abhängige Signaltransduktion in diesem Kompartiment widerspiegelt.

Im dritten Teil dieser Arbeit wurde das etablierte Assay-System in einer klinischen Phase I-Studie des TK-Inhibitors Nilotinib zur Behandlung Imatinib-resistenter BCR-ABL-positiver Leukämien angewendet. Bei den Ph+ ALL-Patienten konnte erst in der Phase der Nilotinib-Resistenz ein nachweisbares P-CRKL-Signal im peripheren Blut detektiert werden, was auf die Kompartimentierung des leukämischen Klons im Knochenmark bei lymphatischen Leukämien zurückzuführen ist. Folglich kann der Assay bei diesen Patienten dazu beitragen, eine BCR-ABL-Reaktivierung als Resistenzmechanismus nachzuweisen, er liefert aber keine Informationen bezüglich der therapieabhängigen relativen Kinaseinhibition, wie sie für die CML als prognostisch relevant gezeigt werden konnte.

Eine Analyse der dosisabhängigen P-CRKL-Inhibition von drei Patienten mit unterschiedlichen Resistenzmutationen konnte die zuvor durch *in vitro*-Untersuchungen definierten relativen Resistenzgrade gegenüber Nilotinib bestätigen. Trotz der unterschiedlichen Ansprechraten auf Nilotinib war in allen drei Patienten eine effektive Kinaseinhibition mit Krankheitskontrolle assoziiert. Eine vergleichende Analyse der P-CRKL-Inhibition bei Patienten in Akzelerationsphase und Blastenkrise zeigte aber, dass eine effektive P-CRKL-Inhibition in der Blastenkrise nicht mit dauerhaftem Therapieansprechen verbunden ist. Dem liegt am ehesten die zunehmend BCR-ABL-unabhängige Krankheitsbiologie der vollständig transformierten CML zugrunde.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass der Phospho-CRKL-Shift-Assay ein geeignetes Mittel zur Messung der effektiven Kinaseinhibition *in vivo* und zum Nachweis einer BCR-ABL-Reaktivierung in Nilotinib-resistenten Patienten darstellt.