

Bernd Kasper

Dr. med.

Präklinische Untersuchungen zur Wirksamkeit eines selektiven Inhibitors der BCR-ABL-Tyrosinkinase auf Linien-determinierte und primitive Vorläuferzellen der chronischen myeloischen Leukämie

Geboren am 10.01.1974 in Offenbach am Main

Reifeprüfung am 15.06.1993 in Großkrotzenburg

Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1994 bis SS 2000

Physikum am 12.09.1996 an der Universität Heidelberg

Klinisches Studium in Heidelberg

Praktisches Jahr in Heidelberg und Winterthur, Schweiz

Staatsexamen am 26.10.2000 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ)

Doktorvater: Prof. Dr. med. W.J. Zeller

In der Behandlung der chronischen myeloischen Leukämie (CML) als klonale Erkrankung der hämatopoetischen Stammzelle kann derzeit nur die allogene Knochenmarktransplantation als potentiell kurative Therapie gelten. Aufgrund zahlreicher Restriktionen und Komplikationen dieser Methode stehen molekulare Therapieansätze wie beispielsweise die Hemmung der Signaltransduktion durch selektive Inhibitoren im Mittelpunkt des Interesses.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde ein selektiver Inhibitor der bei der CML erhöhten Tyrosinkinase-Aktivität, STI 571, untersucht. Der Effekt dieser Substanz auf *Linien-determinierte* und *Langzeithämatopoese-initiierende* Blutzellen sollte *in vitro* untersucht werden. Dazu wurden Kolonie-bildende Assays und Stroma-abhängige Langzeitkulturen in einem geeigneten experimentellen Design kombiniert. Zudem wurde für das molekularbiologische Monitoring der CML-Proben eine Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) auf Kolonieebene etabliert.

Als Modell für einen möglichen Purgung-Einsatz der Substanz wurden Kurzzeitinkubationsmethoden (≤ 1 Woche) verglichen, von denen sich zwei als besonders wirksam herausstellten: a) eine 48-stündige Inkubation in Flüssigkultur mit 100 μ M STI 571 und b) eine 1-wöchige Inkubation der CML-Zellen unter Langzeitkultur-Bedingungen bei einer

Dosis von 10 μ M STI 571. Bei der zweitägigen, hochdosierten Substanzexposition konnten die noch verbleibenden BCR-ABL-positiven Vorläuferzellen auf etwa 5% reduziert werden, bei der 10 μ Molaren, 1-wöchigen Exposition unter LTC-Bedingungen ergab sich eine Reduktion auf durchschnittlich 10% verbleibender BCR-ABL-positiver Kolonien.

Als Modell für eine systemische Gabe von STI 571 wurde eine Langzeitinkubation (≥ 2 Wochen) gewählt, bei der eine über acht Wochen *anhaltende* Reduktion BCR-ABL-positiver Linien-determinierter sowie Langzeithämatopoese-initiiender Blutzellen um bis zu 90% erreicht werden konnte.

Weiterhin wurde der Aufbau eines CML-Xenograftmodells in immundefizienten Mäusen durchgeführt.

Nach der intravenösen Transplantation von mittels Leukapherese gewonnenen, kryokonservierten, unselektierten Blutstammzellen von CML-Patienten in der chronischen Phase der Erkrankung konnten in mehr als 70% der „*non-obese diabetic/severe combined immunodeficiency*“ (NOD/SCID)-Mäuse humane CD45⁺ Leukozyten bis zu acht Wochen nach Transplantation nachgewiesen werden. Eine immunphänotypische Subklassifizierung der Leukozyten ergab ein differenziertes Anwachsen von Zellen der myeloischen, der lymphatischen Reihe sowie von CD34⁺ Blutstammzellen. Dieses Ergebnis läßt den Schluß zu, daß die transplantierten Zellen in den Mäusen zu menschlicher Hämatopoese mit Ausdifferenzierung in einzelne Linien-determinierte Zellen geführt haben. Die molekularbiologische Analyse der aus dem Knochenmark der Tiere gewonnenen Proben ergab lediglich einen Anteil von 22% BCR-ABL-positiver und damit CML-spezifischer Kolonien und legt ein defizitäres „homing“ humaner maligner Blutstammzellen in den immundefizienten Mäusen nahe.

Dennoch stellt ein derartiges Xenograftmodell eine grundlegende Voraussetzung zur präklinischen Austestung neuer Purgings-Ansätze sowie neuer Behandlungsstrategien bei der CML dar.

Die in dieser Arbeit dargestellten *In-vitro*-Ergebnisse mit dem selektiven Tyrosinkinase-Inhibitor STI 571 erlauben die Schlußfolgerung, daß es sich um eine neue wirksame Verbindung für die CML-Therapie handelt. Neben der kontinuierlichen oralen Administration der Substanz sollte auch der mögliche Einsatz zur *In-vitro*-Aufreinigung (Purgings) gesammelter Blutzellen nicht außer acht gelassen werden. Die endgültige Entscheidung über den therapeutischen Nutzen und Erfolg von STI 571 bedarf aber trotz vielversprechender erster klinischer Ergebnisse noch umfangreicher Studien.