

Aleksandar Radujković

Dr. med.

**Experimentelle Untersuchungen zur Kombinationstherapie der chronischen myeloischen Leukämie mit Imatinib, Farnesyltransferaseinhibitoren und 17-AAG mit Schwerpunkt auf Überwindung der Imatinibresistenz**

Geboren am 12.01.1980 in Mannheim

Staatsexamen am 06.12.2006 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Innere Medizin

Doktorvater: Prof. Dr. med. Stefan Frühauf

Die chronische myeloische Leukämie (CML) ist eine klonale myeloproliferative Erkrankung, die durch eine reziproke Translokation der Chromosomen 9 und 22 verursacht wird. Dadurch kommt es zur Entstehung eines BCR-ABL-Fusionsgens, das für das BCR-ABL-Onkoprotein kodiert, welches wiederum eine konstitutiv erhöhte Tyrosinkinaseaktivität aufweist. Die Entwicklung bzw. Anwendung von Imatinib, einem potenten und spezifischen Tyrosinkinaseinhibitor, führte zu beispiellosen hämatologischen und zytogenetischen Ansprechraten in nahezu allen Phasen der Erkrankung und hat die medikamentöse Therapie der CML revolutioniert. Dennoch lässt sich unter der Imatinibmonotherapie insbesondere in fortgeschrittenen Phasen der CML ein Auftreten einer Resistenz gegenüber Imatinib häufig beobachten. Bislang konnten verschiedene zelluläre Mechanismen, unter anderem eine Überexpression des BCR-ABL-Onkoproteins und eine Überexpression und damit gesteigerte Aktivität von P-Glykoprotein, als Ursachen der Imatinibresistenz identifiziert werden. Daher stellen Kombinationstherapieansätze mit Imatinib und Substanzen, die einen von Imatinib abweichenden Wirkmechanismus haben bzw. in ihrem Angriffspunkt der Imatinibwirkung vor- oder nachgeschaltet sind, eine Strategie zur Resistenzüberwindung dar.

In dieser Arbeit wurden jeweils die Aktivitäten von 17-AAG, einem Inhibitor des Hitzeschockproteins 90 (Hsp90), und zwei Farnesyltransferaseinhibitoren (L-744,832 und LB42918) sowohl in Monotherapie als auch in Kombination mit Imatinib in verschiedenen Imatinib-sensitiven und -resistenten Zellen systematisch untersucht. Untersuchungen zur Wachstumshemmung mittels MTT-Assays und Untersuchungen der Effekte auf die Klonogenität primärer CML-Zellen mit Hilfe von Colony-Forming-Cell-(CFC)-Assays

ergaben eine im Vergleich zur jeweiligen Monotherapie verbesserte antileukämische Wirkung der Kombinationsansätze. Weitergehende Analysen der Substanzinteraktionen in Imatinib-sensitiven Zellen zeigten gemäß der Median-Effect-Methode von Chou und Talalay additive ( $CI=1$ ) bis geringfügig antagonistische ( $CI>1$ ) Effekte der Kombination Imatinib plus 17-AAG. In beiden untersuchten Imatinib-resistenten Zelllinien wirkten Imatinib und 17-AAG klar synergistisch ( $CI<1$ ). Die verbesserten antiproliferativen Effekte der Kombination Imatinib plus FTI beruhten entweder auf einem Synergismus ( $CI<1$ ) oder auf einer Sensitivierung gegenüber Imatinib (Potenzierung der Imatinibwirkung). Quantitative Untersuchungen zur Apoptoseinduktion, die durchflusszytometrisch unter Anwendung von Annexin-V/Propidiumjodid-Färbungen erfolgten, zeigten im Vergleich zur jeweiligen Monotherapie gesteigerte Apoptoseraten für alle Kombinationsansätze. Die im Falle von 17-AAG zur genaueren Beschreibung des Wirkmechanismus durchgeführten weitergehenden Untersuchungen auf Proteinebene zeigten, dass eine Kombinationstherapie mit Imatinib und 17-AAG im Vergleich zur 17-AAG-Monotherapie zu einer stärkeren Reduktion der BCR-ABL-Proteinexpression führt. Des Weiteren konnte in funktionellen Untersuchungen zur Pgp-Aktivität erstmals gezeigt werden, dass eine Behandlung mit 17-AAG in der Lage ist, konzentrationsabhängig die Funktion von Pgp zu hemmen, was im Umkehrschluss zu einer Steigerung der intrazellulären Imatinibkonzentrationen und somit möglicherweise zu einer Sensitivierung der mit 17-AAG behandelten Zellen gegenüber Imatinib führen kann.

Die in dieser Arbeit vorgestellten präklinischen Daten deuten darauf hin, dass sowohl Farnesyltransferaseinhibitoren als auch 17-AAG in Kombination mit Imatinib das Potential zur Überwindung einer Resistenz gegenüber Imatinib besitzen. Die Ergebnisse dieser Arbeit stellen somit eine Erweiterung der Therapieoptionen der CML dar und schaffen dadurch die Grundlage für das Design klinischer Studien zur Kombinationstherapie mit Imatinib und den hier vorgestellten Substanzen.