

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II
der Universität Würzburg

Direktor: Prof. Dr. med. Hermann Einsele

**Paradoxerweise aktiviert Sorafenib in menschlichen polyklonal expandierten
NK-Zellen den MAPK/ERK- Signaltransduktionsweg und führt zeit- und
dosisabhängig zu einer Verstärkung der Effektorfunktionen**

Inaugural- Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius- Maximilians- Universität Würzburg

vorgelegt von

Julian Johannes Karl Lohmeyer

aus Laubach

Würzburg, Februar 2017

Referent: Priv. Doz. Dr. R. Seggewiß-Bernhardt

Koreferent: Prof. Dr. J. Wischusen

Dekan: Prof. Dr. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 16.02.2018

Der Promovend ist Arzt

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1) EINLEITUNG	1
1.1 Natürliche Killerzellen	2
1.1.2 Zytotoxizität	3
1.1.3 Zytokinproduktion	6
1.1.4 Rezeptoren und Signalwege.....	7
1.1.5 Tyrosinkinase.....	10
1.2 Sorafenib	13
1.3 Sunitinib	14
1.4 ZM336372	14
1.5 NK- Zell basierte Immuntherapie	15
1.6 Zielsetzung	16
2 MATERIAL UND METHODEN	17
2.1 Reagenzien und Kits	17
2.2 Antikörper	19
2.3 Lösungen, Medien, Puffer	20
2.4 Geräte und Verbrauchsmaterialien	23
2.5 Zelllinien	24
2.6 Methoden	25
2.6.2 Polyklonale Expansion von Natürlichen Killerzellen.....	26
2.6.2.1 Expansion im Fütterzellsystem	27
2.6.2.2 Expansion mit NK-Zell Isolations- und Aktivierungskit	27
2.6.3 Durchflusszytometrie	29
2.6.3.1 Apoptose-/ Nekrose- Assay mit Annexin-V und 7-AAD	29
2.6.3.2 Funktionelle Zytokinassays.....	30
2.6.4 Western Blot Analyse	31
2.6.5 Statistische Auswertung	33
3 ERGEBNISSE	34
3.1 Funktionelle Effekte von Sorafenib und ZM336372 auf menschliche, polyklonal expandierte NK- Zellen bei Langzeitbehandlung	34
3.1.1 Medikamenteninduzierte Effekte auf die Expansionsraten: Sorafenib hemmt dosisabhängig die NK-Zell Proliferation.....	34
3.1.2 Medikamenteninduzierte Effekte auf die Gesamttodesraten	36
3.1.3 Expansion der NK-Zellen unter Sorafenib- und ZM336372-Behandlung führt zu einer dosisabhängigen Erhöhung der Zytokinproduktion.....	38

3.2 Eine Kurzzeitbehandlung polyklonal expandierter NK-Zellen mit Sorafenib oder ZM336372 zeigt keinen Effekt auf Zytokinproduktion und Degranulation	43
3.3 Effekte von Sorafenib und ZM336372 auf die Signaltransduktion in menschlichen polyklonal expandierten NK- Zellen	46
3.3.1 Langzeitbehandlung mit Sorafenib und ZM336372 erhöhen dosisabhängig den Phosphorylierungsstatus von CRAF und ERK1/2	46
3.3.1.2 Bestätigung der Ergebnisse mittels hochaufgereinigter NK- Zellen	48
3.3.2 Der Phosphorylierungsstatus von ERK1/2 wird bereits durch Kurzzeitbehandlung beeinflusst	49
3.3.3 Effekte bei Stimulation mit Zielzellen	52
3.4 Kombination der Signalblockade mit CRAF- und MEK- Inhibitor	54
4 DISKUSSION	55
4.1 Sorafenib führt in NK- Zellen zu einer CRAF/ERK1/2 vermittelten, behandlungszeit- und dosisabhängigen Aktivierung	56
4.2 Erklärungsmodell: Transaktivierung von RAF- Dimeren und ERK-Signaltransduktion in Zellen mit Wildtyp BRAF	57
4.3 Klinische Relevanz: Sorafenib als Adjuvans in der NK- Zell- basierten Immuntherapie	61
4.4 Klinische Relevanz: Sorafenib bei Tumoren ohne BRAF ^{V600E} Mutation	63
5 ZUSAMMENFASSUNG	64
6 ABBILDUNGEN UND TABELLEN	66
7 LITERATURVERZEICHNIS	68

1) Einleitung

Etwa ein Viertel aller Menschen in der westlichen Welt stirbt an malignen Erkrankungen. Operation, Chemo-, Strahlen- und Immuntherapie stellen die Säulen der Therapie dar. Um die Therapieoptionen konsequent verbessern zu können bedarf es der Fortführung und Intensivierung der Erforschung von 1. Wirkprinzipien in Tumorzellen als auch 2. der Interaktion zwischen Tumorzellen und dem körpereigenen Immunsystem. Diesbezüglich sind unterschiedliche Ansätze Gegenstand aktueller Forschung. So wird unter anderem an Immuntherapien mit in vitro expandierten und aktivierten natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) geforscht.

Die natürlichen Killerzellen stehen seit langem als Bindeglied der angeborenen und adaptiven Immunabwehr mit direkt zytotoxischen sowie zytokin-vermittelten indirekten Anti-Tumoreffekten im Fokus der Forschung. Obwohl sie eine zentrale Rolle in der Erkennung und Elimination von entarteten Zellen spielen waren Therapieversuche bisher jedoch unbefriedigend (Zamai 2007, Abdel-Azim 2015, Chabannon 2016).

Die immunologische Tumorüberwachung hängt von der wechselseitigen Interaktion zwischen Tumorzellen und Immunzellen ab. Leider verhindert oft die Sekretion von immunsuppressiven Faktoren durch maligne entartetes Gewebe und der Mangel an Gefahrensignalen eine adäquate Aktivierung von Zellen des angeborenen Immunsystems wie natürlichen Killerzellen und dendritischen Zellen (DZ). Die vorherige Aktivierung des angeborenen Immunsystems ist für die Tumorerkennung durch Antigen-spezifische T-Zellen aber ein wichtiger Mechanismus. Konsequenterweise könnten bisher mäßig erfolgreiche zelluläre Immuntherapien durch pharmakologische Ansätze, die die NK-Zellfunktion verstärken oder Tumore gegenüber NK-Zell Effekten sensibilisieren, verbessert werden. Multi-zielorientierte Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKIs) stellen möglicherweise einen solchen Ansatz dar, da entscheidende Ziel-Tyrosinkinasen sowohl in Tumorzellen als auch in Immunzellen eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion spielen. In Versuchsreihen mit dem Multi-Tyrosinkinaseinhibitor Sorafenib wurden modulatorische Effekte auf NK-Zell- Aktivität beschrieben. Eine Kurzzeitbehandlung mit 10µg/ml Sorafenib zeigte eine Inhibition der NK-Zell-Effektorfunktionen (Krusch 2009). Im Gegensatz hierzu zeigte die Langzeitbehandlung von NK-Zellen mit Sorafenib in einem niedrigen Konzentrationsbereich erhöhte lytische Aktivität gegenüber Lymphomzelllinien mit

erhöhter Zytokinproduktion und Degranulation (Vorarbeiten aus eigenem Labor, Dotterweich et al, NK Zell meeting 2011). Bei anderen Tyrosinkinaseinhibitoren, wie beispielsweise Sunitinib, konnten keine modulatorischen Effekte beobachtet werden (Dotterweich 2011, Salih 2010). Der Hauptunterschied der beiden Multi-Tyrosinkinaseinhibitoren besteht darin, dass Sorafenib im Gegensatz zu Sunitinib ein potenter c-Raf-Inhibitor ist. Zudem wurden bereits paradoxe aktivierende Effekte von ZM336372, einem spezifischen CRAF-Inhibitor auf Zelllinien beschrieben (Hall-Jackson 1999). Ziel dieser Arbeit war es die beschriebenen modulatorischen Effekte von Sorafenib auf funktioneller Ebene und Signaltransduktionsebene zu untersuchen und somit ein besseres Verständnis der Sorafenib-vermittelten Effekte auf NK-Zell-Effektorfunktionen zu erlangen. Ein Verständnis der Wirkmechanismen dieser TKIs auf entscheidende Signaltransduktionswege der wichtigsten Spieler in der frühen Immunüberwachung stellt die Grundlage für eine adjuvante Anwendung (oder strikte Vermeidung) dieser Substanzen im Rahmen von immuntherapeutischen NK-Zell-Ansätzen dar.

1.1 Natürliche Killerzellen

Die natürlichen Killerzellen wurden im Jahre 1975 entdeckt und zunächst als ein einzigartiges Lymphozytensubset beschrieben, dessen Zellen sich in Größe und zytoplasmatischer Granulation von den bekannten T- und B- Zellen unterschieden (Herbermann 1975, Kiessling 1975). Sie unterscheiden sich funktionell von anderen bekannten Blutzellen durch ihre Fähigkeit Tumorzellen ohne vorherige Sensibilisierung erkennen und zerstören zu können (Kannan 2016). NK-Zellen entstehen im Knochenmark aus CD34⁺ hämatopoetischen Progenitorzellen (HPCs) (di Santo 2006, Caligiuri 2008). Es kommt zu einer Auswanderung der NK- Zellen in lymphatisches (z.B. Lymphknoten, Milz) sowie nicht lymphatisches Gewebe (z.B. peripheres Blut, Lunge und Leber) (Gregoire 2007). Im peripheren Blut machen sie einen Anteil von etwa 5- 15% aller mononukleären Zellen aus. Während man NK-Zellen als CD3⁻ / CD56⁺ Lymphozyten definiert, können sie nochmals in zwei Subpopulationen unterteilt werden: CD56^{bright} mit hoher Expression des Oberflächenrezeptors CD56 und CD56^{dim} mit verminderter CD56 Expression. CD56 ist eine Isoform des neuronalen Adhäsionsmoleküls NCAM.

Ca. 90% der NK- Zellen des peripheren Blutes und der Milz gehören der CD56^{dim} CD16⁺ Subpopulation an, welche eine hohe zytotoxische Aktivität nach Kontakt mit Zielzellen aufweist. Hierfür spielt der der Immunglobulin-G Rezeptor FcR γ (CD16) eine wichtige Rolle (Cooper 2001, Anfossi 2006). Im Gegensatz dazu gehören die meisten NK- Zellen in Lymphknoten und Tonsillen der CD56^{bright} CD16⁻ Subpopulation an. Sie übernehmen mittels Sekretion von Interferon (IFN)- γ und Tumornekrosefaktor (TNF) α nach Interleukinstimulation mit unter anderem IL-12, IL-15, IL-18 hauptsächlich immunmodulatorische Aufgaben (Cooper 2001, Ferlazzo 2004).

Zusammenfassend kann man die Hauptaufgaben der NK-Zellen einerseits in das direkte und schnelle Erkennen und Eliminieren von Fremdzellen und infizierten oder anderweitig veränderten körpereigenen Zellen sowie in die Interaktion und Immunmodulation mittels Zytokinen unterteilen. Mit diesen beiden Aufgabenbereichen nehmen sie eine Sonderstellung zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem ein.

1.1.2 Zytotoxizität

Ein für die direkte Zytotoxizität entscheidender Faktor besteht darin, dass transformierte Zellen zur Umgehung der T-Zell vermittelten Immunabwehr häufig eine reduzierte MHC- I Expression aufweisen. Gleichzeitig bewirkt zellulärer Stress oder DNA- Schädigung jedoch eine verstärkte Expression von NK-Zell aktivierenden Liganden auf der Tumorzelloberfläche (vgl. Abb.1). Diese Zellen mit verminderter MHC- I Expression und den „altered- self“- Stress- induzierten Proteinen stellen potentielle Ziele für NK-Zellen dar.

Die alleinige Abwesenheit von MHC-I Molekülen ist jedoch nicht ausreichend für eine effektive NK-Zell Aktivierung. Zusätzlich müssen Gefahrensignale auf der Zelloberfläche der Zielzelle vorhanden sein. C-Typ Lectinrezeptoren spielen hierbei eine übergeordnete Rolle. Sie können sowohl aktivierende wie auch inhibierende Signale vermitteln und als Homodimer oder Heterodimer auf den NK-Zellen vorliegen. Die Heterodimere setzen sich aus CD94 und einem Protein aus der Natural Killer Group 2 (NKG2) zusammen. Das NKG2 Protein bestimmt, ob ein aktivierendes oder inhibierendes Signal weitergeleitet wird. Diese Proteine besitzen eine aktivierende oder inhibitorische Domäne (immunotyrosine inhibitory motif: ITIM bzw.

immunotyrosine activating motif: ITAM). NKG2D, ein Homodimer das mit dem Adaptormolekül DAP10 eine aktivierende Funktion vermittelt, nimmt eine Sonderstellung innerhalb der C-Typ-Lectinrezeptoren ein: es kann im Gegensatz zu den heterodimeren Formen nicht nur humanes Leukozyten Antigen E (HLA-E) erkennen sondern erkennt unterschiedliche Stress-induzierte Proteine auf den Zielzellen. Hierzu gehören MHC I Chain- related proteins (MIC) A und MICB sowie die UL16 bindenden Proteine 1-6 (ULBP 1-6), die auf vielen maligne veränderten Zellen vorkommen (Kannan 2016). Zusätzlich gibt es eine Vielzahl weiterer aktivierender und inhibierender Rezeptoren (siehe Tabelle 1 und 2).

Von der direkten Zytotoxizität kann die indirekte, Antikörper-vermittelte Zytotoxizität (antibody- dependent cellular cytotoxicity ADCC) unterschieden werden. Bei dieser Antikörper- vermittelten Zytotoxizität interagieren die CD16 Rezeptoren der NK-Zellen mit spezifischen IgG Antikörpern der Zielzellen (Smyth 2002). Die Anwesenheit von Antikörpern auf der Zelloberfläche einer Zelle deutet darauf hin, dass diese Zelle bereits von B-Zellen als fremd bzw. gefährlich erkannt wurde. Der aktivierende Rezeptor FcγRIIIa (CD 16) der NK Zelle bindet das Fc Ende von IgG1 und IgG3 Antikörpern, die auf der Oberfläche der Zielzelle gebunden sind. Dies führt zu einem Überwiegen der aktivierenden Signale im Vergleich zu den inhibitorischen Signalen führen und eine Antwort auslösen (Kannan 2016).

Kommt es bei der Balance zwischen aktivierenden und inhibierenden Signalen zu einem Überwiegen der aktivierenden Signale wird eine zytotoxische Antwort ausgelöst. Die Mechanismen der Zytotoxizität bestehen aus der Freilassung zytotoxischer Granula (Degranulation), der Aktivierung von Todesrezeptor-Signalwegen (z.B. TNF- ähnlicher- Apoptose- induzierender Ligand TRAIL; FasL) und der Sekretion von Zytokinen wie Interferon (IFN) γ und Tumornekrosefaktor (TNF) α . Zum einen kann durch das Ausschütten von Perforin und Granzym enthaltender zytoplasmatischer Granula über Caspase- abhängige sowie Caspase- unabhängige Wege Apoptose in den Zielzellen induziert werden (Trapani 2000). Hierbei orientieren sich die zytoplasmatischen Granula nach NK-Zielzell- Interaktion unter Ausbildung einer immunologischen Synapse (IS) zu den Zielzellen hin und werden Ca^{2+} abhängig per Exozytose in den interzellulären Zwischenraum ausgeschüttet. Hierbei wird die Immunologische Synapse über Integrine (Lymphozyten- Funktions- Antigen 1 [LFA1,

CD11a/ CD18] und den Makrophagen- Rezeptor- 1 [MAC-1, CD11b/CD18] stabilisiert. Mittels Aktin- Reorganisation und Polarisierung des Mikrotubuli- Strukturzentrums erfolgt die gerichtete Exozytose in Richtung der IS (Orange 2008). Dabei wird auf der Zelloberfläche der NK-Zelle vermehrt CD107a/b exprimiert. Die Expression von CD107a/b kann als Degranulationsmarker verwendet werden (Uhrberg 2005). In NK-Zellen zählt CD107a als sensitiver Degranulationsmarker, welcher unabhängig von Zytokinsekretion exprimiert wird (Alter 2004) Über Perforin- induzierte Membrandefekte gelangen die Granzyme in die Zielzelle und lösen die Apoptoseinduktion aus.

Einige NK-Zellen können zudem über Todesrezeptoren Apoptose induzieren. Sie exprimieren FasL oder TRAIL, die via Interaktion mit den korrespondierenden Rezeptoren auf den Zielzellen zur Apoptoseinduktion führen können (Screpanti 2001, Cretney 2002).

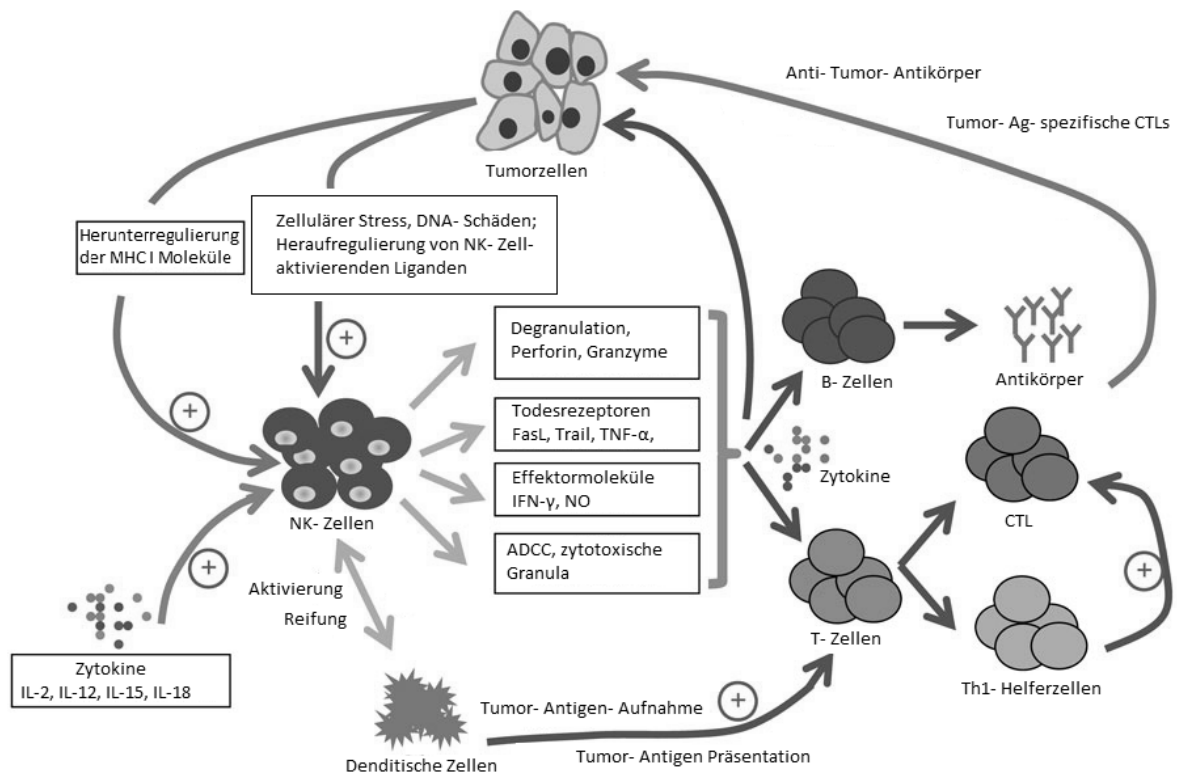


Abbildung 1) NK- Zell vermittelte Zytotoxizität (nach Cheng 2013)

Abbildung 1 stellt ein vereinfachtes Schema der NK-Zell vermittelten Zytotoxizität dar: nach Interleukinstimulation oder nach Kontakt zu Tumorzellen oder virusinfizierten Zellen mit veränderter Expression von Oberflächenmolekülen können NK-Zellen über eine Anzahl unterschiedlicher Effekte Zytotoxizität vermitteln. Sowohl direkt zytotoxische Effekte mit Ausschüttung von Perforin und Granzym aber auch über indirekte Antikörper vermittelte Zytotoxizität (ADCC) spielen hierbei eine Rolle. Zusätzlich werden Effektormoleküle ausgeschüttet und somit weitere Immunzellen rekrutiert.

1.1.3 Zytokinproduktion

Während unstimulierte $CD56^{\text{dim}}/CD16^+$ NK-Zellen, die wie bereits oben beschrieben, vor allem im peripheren Blut vorliegen, eine hohe direkte zytotoxische Aktivität aufweisen, kommt den $CD56^{\text{bright}}/CD16^{+/-}$ NK-Zellen primär eine immunmodulatorische

Funktion zu. Demensprechend ist diese Subpopulation besonders in sekundär lymphatischen Organen präsent, da hier aufgrund der Nähe zu Antigen-präsentierenden Zellen und T-Zellen die Signalvermittlung mittels Zytokinen wesentlich effizienter ablaufen kann. Allerdings konnte in neueren Versuchsreihen auch für CD56^{dim} NK-Zellen vor allem nach Zielzellkontakt eine hohe Zyto- und Chemokinproduktion nachgewiesen werden (Fauriat 2010). So wird außer Interferon- γ (IFN γ) auch Tumornekrosefaktor- α und β (TNF α/β), Transforming- Growth- Factor- β (TGF β), Granulozyten/ Makrophagen- Kolonie- stimulierender Faktor (GM- CSF), MCP-1 (CCL2), MIP-1 α (CCL3), MIP-1 β (CCL4), RANTES (CCL5), IP-10 (CXCL10) und Interleukine produziert (Fauriat 2010).

1.1.4 Rezeptoren und Signalwege

Für die Effektivität der NK-Zell- induzierten Zytotoxizität spielt die Geschwindigkeit mit der die Zellen eine infizierte oder entartete Zelle erkennen und eliminieren können eine entscheidende Rolle. Während T- und B- Zellen eine zeitraubende vorherige „Immunisierung“ benötigen, können NK- Zellen ohne vorherigen Antigenkontakt direkt aktiviert werden. Klas Kärre (Kärre 1985) postulierte erstmals die „missing- self“ Hypothese, wonach NK-Zellen über Major- Histocompatibility- Complex- I (MHC I) Moleküle, die körpereigene Peptide darstellen, körpereigene Zellen erkennen können und nur das Fehlen dieser körpereigenen Proteine zu einer Aktivierung der NK-Zellen führt. MHC I Moleküle werden auf fast allen menschlichen Zellen exprimiert. Unter zellulärem Stress, wie z.B. Infektion oder Entartung, kommt es in den betroffenen Zellen zu einer Herunterregulierung von MHC I und einer Heraufregulierung von Stressrezeptoren. Diese Zellen können von NK-Zellen als „nicht- selbst“ identifiziert werden (Vivier 2008). Dies kann auch als „stress induced non self“ bezeichnet werden. Mittlerweile weiß man, dass MHC I Moleküle zwar einen wichtigen Bestandteil in der NK-Zell Aktivierung bzw. Inhibition darstellen, dass die Regulation aber wesentlich komplexer ist und auf einer Balance vieler aktivierender und inhibierender Signale beruht (Miller 2001, Lanier 2008). So erkennen NK-Zellen ihre Zielzellen mittels einer Vielzahl an Rezeptoren (siehe auch Tab. 1 u. 2), die je nach Überwiegen von aktivierenden oder inhibierenden Signalen die Antwort bestimmen.

Zu den wichtigsten aktivierenden Rezeptoren gehört die Gruppe der natural-killer-group-2D (NKG2D) Rezeptoren. Die Expression dieser nicht NK-Zell-spezifischen Oberflächenrezeptoren kann durch Zytokine wie z.B. Interleukin 12 und Interleukin 15 verstärkt werden (Zhang 2008). Zu den Liganden gehören Stressmoleküle aus der Gruppe der „nicht-klassischen MHC Moleküle“ und die UL-16 Bindungsproteine 1-5. Der Ligand bindet an NKG2D, welches über das transmembranäre Adaptormolekül DAP10 das Signal nach intrazellulär weiterleitet.

Aktivierende Rezeptoren	Liganden
2B4 (CD244)	CD48
BY55 (CD160)	HLA-C
CD2	LFA-3 (CD58)
CD7	SECTM1, Galectin-1
CD11c/18	ICAM-1, iC3b
CD16 (FcγRIIIA)	IgG
CD44	Hyaluronsäure
CD59	CD8, CD9
CRACC (CD319)	CRACC (CD319)
DNAM-1 (CD226)	PVR (CD155), CD112
KIR2DL4 (CD158d)	HLA-G
KIR2DS3-6	Unbekannt
KIR3DS1	Unbekannt
LFA-1 (αLβ2, CD11a/18)	ICAM-1-5
MAC-1 (αLβ2, CD11b/18)	ICAM-1, iC3b, Fibrinogen
NKG2C (CD94/159c)	HLA-E
NKG2D (CD314)	ULBPs, MICA, MICB
NKp30 (CD337)	BAT-3
NKp44	virales Hämagglutinin
NKp46 (CD335)	virales Hämagglutinin
NTBA	NTBA
VLA-4 (α4β1, CD49d/29)	VCAM-1, Fibronectin
VLA-5 (α5β1, CD49e/29)	Fibronectin

Tabelle 1) Aktivierende NK-Zell-Rezeptoren und ihre Liganden (nach Hassold, 2011)

Inhibierende Rezeptoren	Liganden
CEACAM1	CEACAM1
IRp60 (CD300a)	Unbekannt
KIR2DL1 (CD158a)	HLA-C
KIR2DL5	unbekannt
KIR2DL2/3 (CD158b)	HLA-C
KIR3DL1	HLA- B und Bw4
KIR3DL2	HLA-A
KLRG1/MAFA	E/N/P-Cadherin
NKG2A (CD94/CD159a)	HLA-E
NKR-P1A (CD161)	LLT1
LAIR1	Kollagen
LIR-1/IL-T2 (CD85j)	HLA Klasse I
Siglec-7 (CD328)	Sialinsäure
Siglec-9 (CD329)	Sialinsäure

Tabelle 2) Inhibierende NK-Zell-Rezeptoren und ihre Liganden (nach Hassold, 2011)

Zu wichtigen intrazellulären Signalwegen für die Zytotoxizität zählen der Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K)/Akt- Signalweg, sowie der MAP/ERK- Signalweg, welcher das Signal über RAS-CRAF-MEK1/2-ERK1/2 weiterleitet (Lanier 2008, Vivier 2013, s. Abb. 2). Der MAP/ERK- Signaltransduktionsweg ist über membrangebundene Wachstumsrezeptoren ebenfalls ein zentraler Signaltransduktionsweg für die Zellproliferation. Da Mutationen von RAS bzw. RAF zu überschießender Zellproliferation führen und die Tumorentstehung begünstigen können, werden sie zu den wichtigsten Proto- Onkogenen gezählt (Hilger 2002).

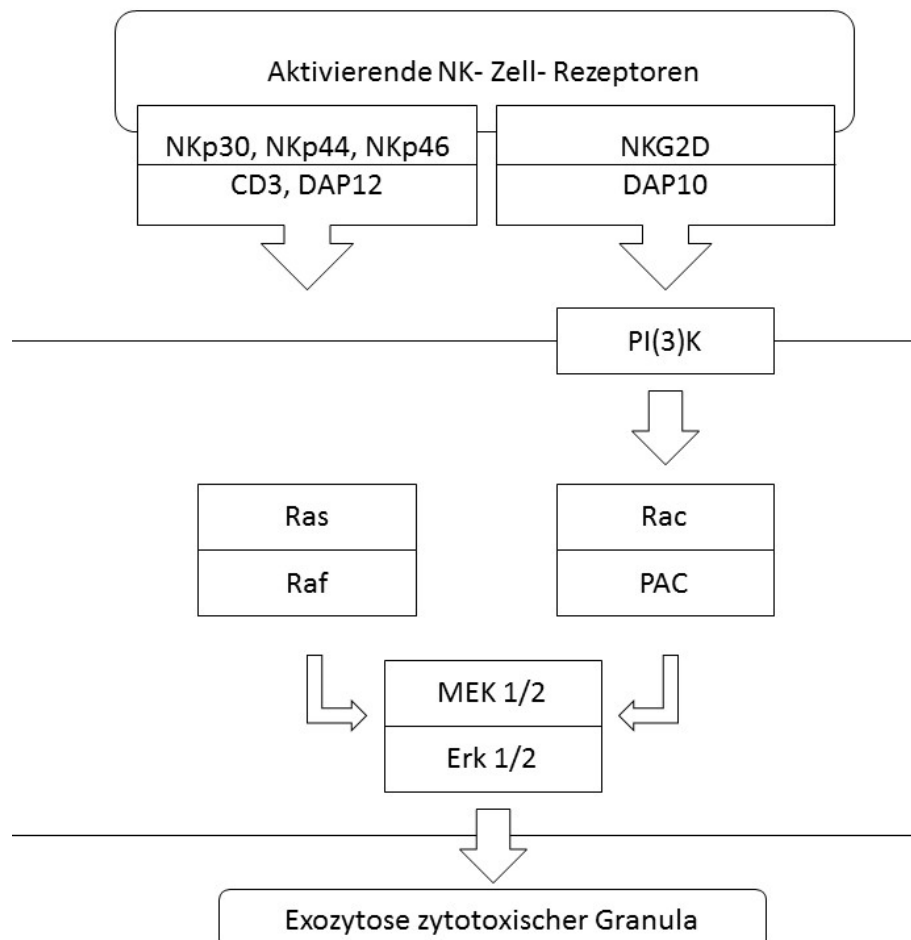


Abbildung 2) Vereinfachtes Schema der RAS/RAF-abhängigen aktivierenden Signaltransduktion in NK-Zellen (nach Vivier 2013)

1.1.5 Tyrosinkinasen

Tyrosinkinasen sind eine Gruppe von Enzymen aus der Familie der Proteinkinasen. Als Teile von Rezeptorsystemen und Signalstransduktionswegen besteht ihre Hauptaufgabe in der reversiblen Phosphorylierung bestimmter Zielproteine. Man unterscheidet membrangebundene (z.B. c-Kit, EGF- Rezeptor, Insulinrezeptor, HER2/neu) von nicht- membrangebundenen Tyrosinkinasen (z.B. Abl, Src, Januskinasen). Die Bindung eines passenden Liganden an einen Rezeptor führt zu einer Konformationsänderung und die Bildung von Homo- bzw. Heterodimeren wird

induziert. An der zytosolischen Seite des Rezeptors werden Tyrosinkinase aktiviert. Dies führt zur Autophosphorylierung des Rezeptors. An den Phosphatresten können Proteine mit SH2- Domänen binden (Malarkey 1995). Diese Proteine haben entweder selbst eine enzymatische Funktion (z.B. PI3- Kinase) oder leiten das Signal über eine Strukturänderung, die von intrazellulären Zielproteinen erkannt wird, weiter (Dettmer 2005).

Rapidly accelerated fibrosarcoma (RAF-) Proteine sind Serin-/Threonin-Proteinkinase. Es werden ARAF, BRAF und CRAF (auch Raf-1) unterschieden. Sie sind vor allem im RAS-RAF-MEK1/2-ERK1/2- Signaltransduktionsweg (s. Abb.2) von besonderer Bedeutung. In ca. 30% aller Tumorerkrankungen lassen sich Mutationen in diesem Signalweg nachweisen (Garnett 2004).

Das CRAF Protein ist aus multiplen Domänen aufgebaut. Am N-terminalen Ende des Proteins befindet sich die RAS-bindende Domäne (RBD) und eine C-kinase homologe Domäne 1 (C1 Domäne). Die RBD bindet ausschließlich Guanosintriphosphat (GTP) gebundenes RAS. Die C1 Domäne ist ein Zinkfingerprotein und bewirkt eine Autoinhibition solange kein GTP-RAS gebunden ist. Dementsprechend wird die RBD zusammen mit der C1 Domäne auch autoinhibitorischer Domäneblock genannt. Regulatorische Proteine (14-3-3 Proteine) stabilisieren zusätzlich CRAF im inaktiven Zustand. Das inaktive und autoinhibierte CRAF liegt als Monomer vor (Cutler 1998). Zwischen der autoinhibitorischen Domäne und der katalytischen Domäne befindet sich eine Gelenkregion, die reich an Serin ist und Konformationsänderungen des Proteins ermöglicht. Das C-terminale Ende besteht aus der katalytischen Domäne (Hmitou 2007). Die wichtigsten Substrate stellen hier MEK 1 und MEK 2 dar.

Vereinfacht lässt sich die Funktionsweise von RAF wie folgend beschreiben:

Bindet GTP-RAS an die RBD kommt es zu einer Konformationsänderung des Proteins und CRAF transloziert zu der Zellmembran. Das Protein besitzt jedoch noch keine hohe katalytische Aktivität. Durch die nun offene Konformation des Proteins formen zwei membrangebundene RAF Monomere Dimere. Hierbei können neben CRAF-CRAF Dimeren auch BRAF-CRAF Dimere entstehen. Die Dimere phosphorylieren sich gegenseitig in ihrer aktivierenden Schleife und liegen somit im vollständig aktivierten Zustand vor. Die Substrate MEK1/2 können phosphoryliert werden und das Signal an ERK1/2 weiterleiten. Das phosphorylierte ERK1/2 leitet das Signal an nachgeschaltete Proteine weiter, unter anderem auch an nukleäre Proteine wie Transkriptionsfaktoren

(siehe auch Abbildung 16). Zusätzlich führt phosphoryliertes ERK1/2 im Sinne eines negativen Antwort- Mechanismus (negativer Feedback- Mechanismus) zu einer Dephosphorylierung in der Ankerregion von CRAF und zu einer Dissoziation von der Membran. Es formen sich erneut inaktive RAF Monomere (Motallanas 2011, Alexa 2010).

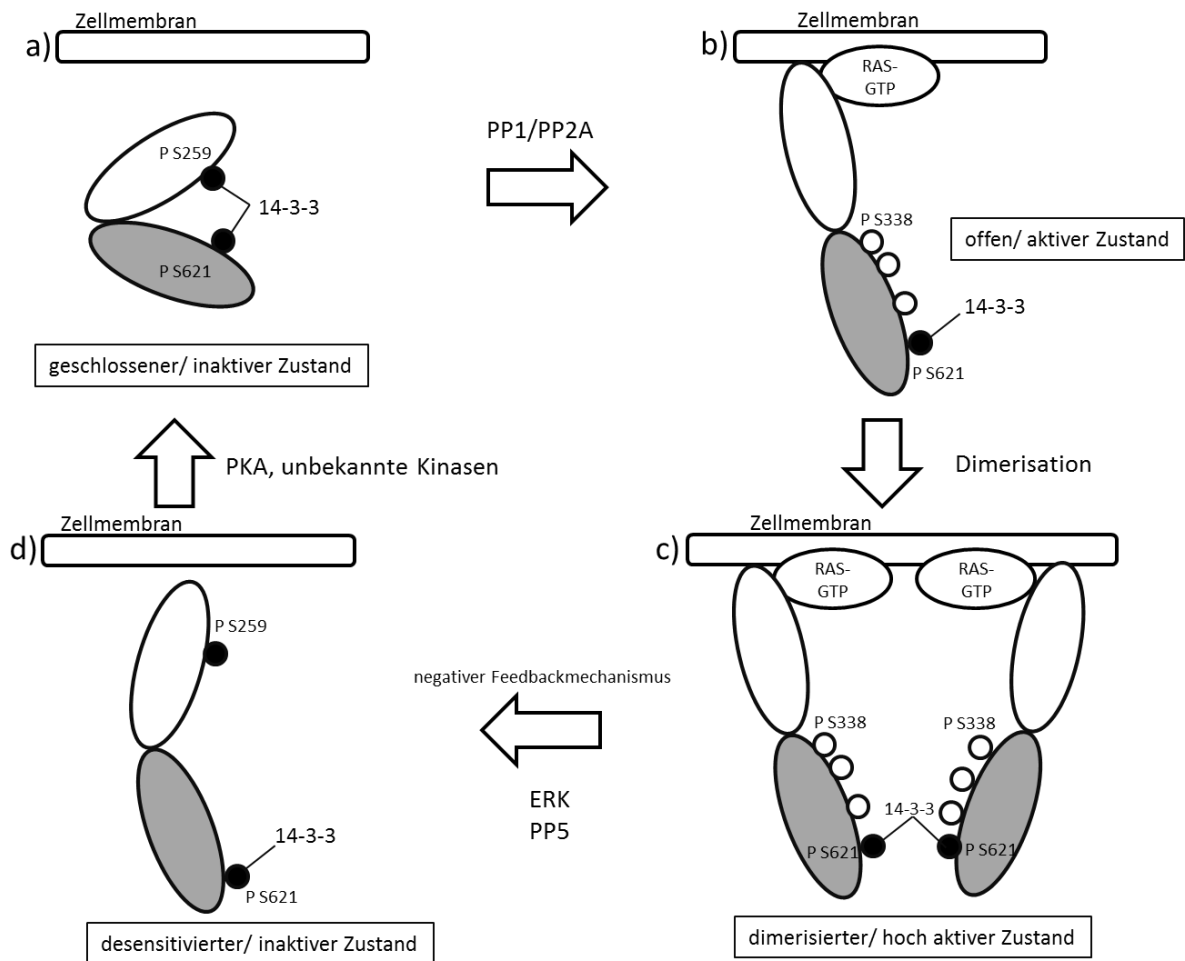


Abbildung 3) Vereinfachtes Schema des CRAF Aktivierungskreislaufs (nach Matallanas 2011)

Schwarze Kreise stehen hierbei für Phosphorylierung mit inhibitorischem Effekt, weiße Kreise für Phosphorylierungsstellen mit aktivierendem Potential. a) zeigt das inaktive CRAF-Monomer. Über das 14-3-3 Protein erfolgt eine Stabilisierung der

autoinhibitorischen Domäne. Bindet GTP-RAS an die RBD-Domäne des CRAF Monomers kommt es zu einer Transformationsänderung und das Monomer transloziert an die Zellmembran. P S259 wird dephosphoryliert (b). Das Monomer liegt nun im offenen aber nur wenig aktiven Zustand vor. An der Zellmembran kommt es zu einer Dimerbildung, erneut stabilisiert durch 14-3-3 Proteine. Durch die Dimerbildung (c) liegen sich beide aktivierenden Schleifen gegenüber, es besteht ein hoch aktiver Zustand. Die Substrate (v.a. MEK-ERK1/2) werden phosphoryliert und das Signal weitergeleitet. Über pERK erfolgt im Sinne einer negativen Rückkopplung die Phosphorylierung der inhibitorisch wirkenden Stelle S259. Bei dem Übergang des aktiven in den inaktiven Zustand stellt die Dephosphorylierung des P S338 ein zentrales Ereignis dar. Über P S259 wird die inhibitorische Domäne stabilisiert und das CRAF Monomer kehrt in den inaktiven Zustand zurück (d) (modifiziert nach Matallanas 2011).

1.2 Sorafenib

Sorafenib (Nexavar, BAY 43-9006, Bayer AG) ist ein oraler Multi-Tyrosinkinaseinhibitor, der seit 2006 in der EU für die Behandlung des fortgeschrittenen Nierenzellkarzinoms sowie des inoperablen hepatozellulären Karzinoms zugelassen ist. Im Juni 2014 wurde die Zulassung in der EU um die Behandlung von metastasierten, Radiojodtherapie-resistenten, differenzierten Schilddrüsenkarzinomen erweitert. Die empfohlene Dosierung beträgt 2x 400mg täglich. Die orale Bioverfügbarkeit beträgt 38- 49% mit einer t_{max} nach 3 Stunden. Die Halbwertszeit liegt bei 25- 48 Stunden. Ein steady- state wird nach sieben Tagen der Behandlung erreicht (Greil 2006). Die Plasmakonzentrationen unterliegen interindividuellen Schwankungen, eine Studie von Patientin mit fortgeschrittenem Leberzellkarzinom zeigte eine Plasmakonzentration mit einem Mittelwert von 6,22 +/- 5,92 µg/ml 3 Stunden nach Medikamenteneinnahme (Fucile 2015).

Als vertikaler TKI inhibiert Sorafenib sowohl membrangebundene Rezeptorkinasen als auch intrazelluläre Elemente der nachgeschalteten Signalkaskaden. Zu den wichtigsten Zielstrukturen zählen die RAF- Kinasen, die vascular epithelial growth factor receptors 2 und 3 (VEGFR2, VEGFR3), der platelet- derived growth factor receptor-β (PDGF-β), der Stammzelleffektor- Rezeptor c-Kit und die FMS- like tyrosine

kinase 3 (FLT3). So kann Sorafenib sowohl über antiangiogenetische (VEGFR, PDGF), sowie antiproliferative (RAF, Kit, FLT3) Mechanismen die Tumorerkrankung beeinflussen (Murphy 2006). Es wurde eine CRAF Aktivierung durch Sorafenib in polyzystin-2 defizienten Mäusen beschrieben (Spirli 2012).

1.3 Sunitinib

Sunitinib (Sutent, Pfizer) ist ein TKI der zur Behandlung nicht resezierbarer und/oder metastasierter maligner gastrointestinaler Stromatumoren (GIST) des Erwachsenen eingesetzt werden kann, wenn eine Behandlung mit Imatinib wegen Resistenz oder Unverträglichkeit fehlgeschlagen ist. Zudem besitzt das Medikament die Zulassung zur Behandlung fortgeschrittener/ metastasierter Nierenzellkarzinome und nicht resezierbarer oder metastasierter, gut differenzierter pankreatischer neuroendokriner Tumoren (pNET) mit Krankheitsprogression (European Medicines Agency Produktinformation Sutent). Sunitinib inhibiert als horizontaler Tyrosinkinaseinhibitor multiple Rezeptor-Tyrosinkinasen (z.B. PDGFR, VEGFR2/3) (Radulovic 2007). Ein für diese Dissertation wichtiger Unterschied zu Sorafenib besteht darin, dass CRAF nicht zu den Zielstrukturen von Sunitinib gehört.

1.4 ZM336372

Im Gegensatz zu dem Multi-Tyrosinkinaseinhibitor Sorafenib ist das für Forschungszwecke genutzte ZM336372 (CAS 208260-29-1, Calbiochem) ein sehr spezifischer Inhibitor von CRAF ($IC_{50} = 70\text{nM}$). Die Wirkung ist reversibel und ATP-kompetitiv. Es inhibiert CRAF zehnfach stärker als BRAF. Bis auf SAPK2a/p38 α ($IC_{50} = 2\ \mu\text{M}$) und SAPK2b/p38 β ($IC_{50} = 2\ \mu\text{M}$) zeigt es bis zu Dosierungen von 50 μM keine inhibitorischen Wirkungen auf andere getestete Kinasen. In vitro konnte ebenfalls eine paradoxe RAF Aktivierung beobachtet werden (Hall Jackson 1999).

1.5 NK- Zell basierte Immuntherapie

Da in den letzten Jahren die Wichtigkeit von NK- Zell- vermittelten Prozessen in der Tumortherapie erkannt wurde, werden aktuell Strategien zur NK-Zell basierten Tumortherapie evaluiert. Es gibt Hinweise, dass die Wirksamkeit von einigen bereits klinisch eingesetzten Antikörpern wie Rituximab (anti- CD20- mAK), Trastuzumab (anti- Her2 mAK) und Cetuximab (anti- EGFR mAK) zumindest teilweise auf der Aktivierung von NK- Zell- vermittelter ADCC- Aktivität basiert (Campbell 2013).

Während das Wissen über die molekularen Grundlagen und Regulationsmechanismen in NK-Zellen ständig wächst, rückt auch der Therapieansatz einer NK-Zell basierten Immuntherapie mit ex- vivo expandierten reifen NK- Zellen weiter in den Fokus der Forschung (Rubnitz 2010, Curti 2011).

Die NK-Zellen können direkt aus peripherem Blut und Nabelschnurblut oder indirekt aus Knochenmark oder hämatopoetischen Stammzellen gewonnen werden. Für die Expansion aus direkt aus dem peripheren Blut oder Nabelschnurblut gewonnenen NK-Zellen existieren bereits etablierte Expansionsprotokolle. Die Expansion und Aufreinigung der NK-Zellen kann durch Kokultur mit Fütterzelllinien mit oder ohne Zugabe von Interleukin-15 und Interleukin-21 erfolgen. Alternativ kann für NK-Zellen aus Nabelschnurblut eine Kokultur mit einer Einzelschicht mesenchymaler Stromazellen mit Zugabe von Interleukin-2, -3 und -15 sowie FMS-ähnliche Tyrosinkinase-3 Ligand (Flt3L) verwendet werden (Yoon 2015).

Für die Expansion von NK-Zellen aus CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen aus Knochenmark oder Nabelschnurblut stehen Protokolle mit Fütterzelllinien oder Kulturmedien mit Zytokinen und Kälberserum, mit denen das Knochenmark-Mikromillieu nachgeahmt wird, zur Verfügung.

Ansätze der NK-Zell basierten Immuntherapie bestehen aus der Aktivierung von körpereigenen NK-Zellen in vivo oder der Transplantation von ex vivo expandierten NK-Zellen (Yoon 2015). Oft weisen NK-Zellen von Tumorpatienten funktionale Mängel auf. NKG2D Expression auf Tumorzellen kann zusätzlich die Effektivität körpereigener NK-Zellen verringern. In der Langzeit-Kokultur von NK-Zellen mit akute myeloische Leukämie (AML) Blasten konnte eine Apoptoseinduktion in NK-Zellen beobachtet werden (Arriga 2016). Autologe ex-vivo expandierte und zytokinstimulierte NK-Zellen können diese Effekte umgehen (Sinha 2016). Haploidente ex-vivo expandierte und IL-2 stimulierte NK-Zellinfusionen konnten in einem Teil von Patienten mit Hochrisiko-

AML eine komplette Remission (CR) bewirken. Bei der Infusion von KIR-Liganden unpassenden NK-Zellen zeigte sich eine signifikant höhere Remissionsrate (Miller 2005).

In Kombination hierzu konnten bereits einige Medikamente wie Proteasom- Inhibitoren ermittelt werden, die die Aktivität von NK-Zellen stimulieren bzw. die Sensitivität von Tumorzellen gegenüber NK-Zell vermittelter Zytotoxizität erhöhen konnten. So führte im Mausmodell eine Infusionstherapie mit ex- vivo expandierten NK-Zellen in Kombination mit Bortezomib zu einem verlängerten Überleben und verringertem Tumorwachstum im Vergleich zu einer Einfachtherapie mit NK-Zellen bzw. Bortezomib (Lundqvist 2009). Zudem spielt die genetische Modifikation von chimären Antigenrezeptoren (CAR) auch in NK-Zellen eine zunehmende Rolle. Abhängig von der Tumorentität wird versucht durch in-vitro Modifikation der Antigenrezeptoren eine maximale Anti-Tumorantwort zu induzieren (Borrego 2016).

1.6 Zielsetzung

Eine mögliche Methode die Effizienz von NK-Zell basierten Immuntherapien zu steigern liegt in der medikamentösen Aktivierung und somit der Steigerung der zytotoxischen Wirkung von NK- Zellen auf ihre Zielzellen. Tyrosinkinaseinhibitoren (TKIs) scheinen hierfür besonders geeignet zu sein, da sie sowohl auf wichtige Signaltransduktionswege in NK-Zellen, als auch in Tumorzellen wirken. Während Sorafenib in therapeutischen Konzentrationen eine inhibitorische Wirkung zeigt, zeigen NK-Zellen, die während einer Expansion von 7 bis 14 Tagen mit einer niedrigeren Konzentration Sorafenib (bis 3µg/ml) behandelt wurden, paradoxerweise eine erhöhte Zytotoxizität nach Zielzellkontakt (Dotterweich 2011). Dieser paradoxe Effekt konnte bei Sunitinib nicht nachgewiesen werden (Vorarbeiten aus eigenem Labor von J. Dotterweich). Der Hauptunterschied zwischen Sorafenib und Sunitinib besteht darin, dass Sorafenib als vertikaler TKI RAF inhibiert. Deshalb wurde in dieser Arbeit die Wirkung von Sorafenib und dem spezifischen CRAF Inhibitor ZM336372 auf polyklonal expandierte NK-Zellen verglichen. Zunächst erfolgten funktionelle Untersuchungen um zu überprüfen, ob die beobachteten Sorafenib-induzierten paradoxen Effekte auf funktioneller Ebene auch mit dem spezifischen CRAF Inhibitor ausgelöst werden können. Hierzu wurden NK-Zellen von gesunden menschlichen

Spendern ex vivo polyklonal expandiert und während der Expansion bzw. in den letzten 24 Stunden der Expansion mit Sorafenib (0,1; 1,0; 3,0 µg/ml) und ZM336372 (0,05; 0,5; 1,5 µg/ml) behandelt. Bei höheren Medikamentenkonzentrationen zeigte sich eine erhöhte Apoptose-/Nekroserate mit relevanter Inhibition der NK-Zell-Proliferation. Mittels FACS- Analyse wurde die Produktion von IFN γ /TNF α und der Degranulationsmarker CD107a gemessen. Zusätzlich erfolgte eine Auswertung nach Zielzellstimulation. K562-Zellen dienten als Vertreter für eine NK-Zell sensitive Zelllinie und Daudi-Zellen als Vertreter einer wenig NK-Zell sensitiven Zelllinie. In einem zweiten Schritt wurde der Phosphorylierungsstatus von wichtigen Zielstrukturen (CRAF, ERK, AKT) mittels Western- Blot Analyse verglichen.

Ziel dieser Arbeit war es durch besseres Verständnis der paradoxen Wirkweise von Sorafenib auf ex vivo expandierte NK- Zellen eine mögliche Rationale für einen potentiellen Einsatz von Sorafenib als Adjuvans in der NK-Zell basierten Immuntherapie zu entwickeln.

2 Material und Methoden

2.1 Reagenzien und Kits

3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure	Roth, Karlsruhe
7- Aminoactinomycin D (7- AAD)	Becton Dickinson, Heidelberg
Albumin Fraktion V, biotinfrei	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
Annexin- V Bindungspuffer	Becton Dickinson, Heidelberg
Annexin-V- Pycoerythrin (PE)	Becton Dickinson, Heidelberg
Aprotinin	Sigma- Aldrich, Taufkirchen
BioRad DC Protein Assay	BioRad, München
Brefeldin A	Sigma- Aldrich, Taufkirchen
Ca ²⁺ - Ionophor	Sigma Aldrich, Taufkirchen
CellGro SCGM	CellGenix, Freiburg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Apotheke der Uniklinik Würzburg

Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Erythrozyten Lysepuffer	BD Bioscience, Heidelberg
Fötale Kälberserum (FKS), Lot P30-1405	PAN Biotech, Aidenbach
Golgi Stop	BD, San Jose, USA
L- Glutamin 200nM	PAN Biotech, Aidenbach
Leupeptin	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Magermilchpulver	
Methanol	Applichem, Darmstadt
Natriumazid	Applichem, Darmstadt
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Applichem, Darmstadt
Natriumorthovanadat Na ₃ VO ₄	Applichem, Darmstadt
NK- Cell Activation/ Expansion Kit	Miltenyi Biotec, Gladbach
NK- Cell Isolation Kit	Miltenyi Biotec, Gladbach
NuPage LDS Sample Buffer	Invitrogen, Karlsruhe
NuPage Sample Reducing Agent	Invitrogen, Karlsruhe
Pancoll, Dichte 1,077 g/ml	PAN Biotech, Aidenbach
Paraformaldehyd (PFA)	Roth, Karlsruhe
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	PAN Biotech, Aidenbach
PD0325901	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Penicillin 10.000U/ml	PAN Biotech, Aidenbach
Pepststatin	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Phorbolmyristataacetat (PMA)	Roth, Karlsruhe
Phosphatase Inhibitor Cocktail II	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Ponceau S	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Protease Inhibitor Cocktail complete <u>04693116001</u>	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe
RPMI 1640	PAN Biotech, Aidenbach
Saponin	Roth, Karlsruhe

SeeBlue Plus2 Prestained Standard	Invitrogen, Karlsruhe
Sorafenib	LC Labs, Woburn, USA
Sunitinib	LC Labs, Woburn, USA
Streptomycin 10mg/ml	PAN Biotech, Aidenbach
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl)aminomethanUltra	Roth, Karlsruhe
Trypanblau	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Tween 20	Roth, Karlsruhe
ZM336372	Calbiochem, Lot: D00098014

2.2 Antikörper

Antikörper	Isotyp	Klon	Konjugation	Hersteller
CD107a	Maus IgG1 γ	H4A3	FITC	BD Pharmingen
CD14	Maus IgG2a	TÜK4	PE	Miltenyi Biotec
CD16	Maus IgM	VEP-13	APC	Miltenyi Biotec
CD16	Maus IgG1 γ	3G8	PerCP	BioLegend
CD3	Maus IgG1 γ	SK7	PerCP	BioLegend
CD3	Maus IgG1 γ	SK7	FITC	ImmunoTools
CD3	Maus IgG2a	BW264/56	FITC	Miltenyi Biotec
CD56	Maus IgG1 γ	N-CAM	APC	BioLegend
CD56	Maus IgG1	AF12-7H3	APC	Miltenyi Biotec
IFN γ	Maus IgG1 γ	MOPC-21	PE	BD Pharmingen
TNF α	Maus IgG1 γ	MAb11	PE	BD Pharmingen

Tabelle 3) Übersicht über die verwendeten FACS- Antikörper

Antikörper	Isotyp	Hersteller
Akt	Kaninchen IgG	Cell Signaling, Danvers, USA
Beta- Aktin	Maus IgG	Sigma Aldrich
CRAF (C-12)*	Kaninchen IgG	Santa Cruz Biotechnology
HRP Anti- Kaninchen*	Schaf IgG	GE Healthcare, Freiburg
HRP Anti- Maus*	Schaf IgG	GE Healthcare, Freiburg
p44/42 MAPK (ERK1/2)	Kaninchen IgG	Cell Signaling, Danvers, USA
Phospho-c-Raf (Ser338) (56A6)	Kaninchen IgG	Cell Signaling, Danvers, USA
Phospho- p44/42 MAPK (ERK1/2) (Thr202/Tyr204)	Kaninchen IgG	Cell Signaling, Danvers, USA
Phospho-AKT (Ser473) (193H12)	Kaninchen IgG	Cell Signaling, Danvers, USA

Tabelle 4) Übersicht über die verwendeten Western- Blot- Antikörper

*Bei den mit * gekennzeichneten Antikörpern handelt es sich um polyklonale Antikörper, die übrigen sind monoklonal*

2.3 Lösungen, Medien, Puffer

Antikörper- Entfernungspuffer ("stripping buffer")

ddH₂O, 100mM 2-Mercaptoethanol, 2% SDS, 62,5 mM Tris pH 6,8

CellGro SCGM Medium

SCGM CellGro Medium, 10%FCS, 1% Penicillin/ Streptomycin, 500 U/ml rIL-2

ECL A

200mM 0,1M TRIS pH 8, 6,5mg Luminol

ECL B

10ml DMSO, 11mg para- Hydroxykumarinsäure

Enhanced Chemoluminescence (ECL) Lösung

ECL A:B 9:1, 0,003% H₂O₂

FACS- Puffer

PBS, 0,2% BSA

MACS- Puffer

500ml PBS, 2,5g BSA, 2ml 0,5M EDTA, steril filtrieren

MOPS Gellaufpuffer

H₂O, 1,0M MOPS, 1,0 M TRIS Ultra, 69,3mM SDS, 20,5 mM EDTA

R10 Medium

RPMI 1640, 10% FCS, 2mM L- Glutamin, 1% Penicillin/ Streptomycin

RIPA Lyse- Puffer

50mM Tris Ultra, 1% NP-40, 0,25% Natriumdesoxycholat, 150mM NaCl,
1mM EDTA, 1mM PMSF, 1µg/ml Aprotinin/ Leupeptin/ Pepstatin, 1mM
Natriumorthovanadat, 1mM NaF, pH 7,4

Sammelgel 5% (pro Kassette)

Für 5ml: 0,83ml Rotiphorese 30, 0,58ml TRIS pH 6,8 1M, 3,5ml H₂O, 50µl
10% SDS, 50µl 10% APS, 2,5µl TEMED

Sorafenib Stocklösung

20mM in DMSO

Sunitinib Stocklösung

10mM in DMSO

TBST Puffer

ddH₂O, 20mM Tris Ultra, 150mM NaCl, pH 7,5, 0,05-0,1% Tween 20

Transferpuffer 1x

700 ml ddH₂O, 100ml Transferpuffer 10x, 200ml Methanol

Transferpuffer 10x

500ml ddH₂O, 15,14g TRIS, 72g Glycin, 0,5g SDS

Trenngel 10% (pro Kassette)

Für 10,25ml: 3,3ml Rotiphorese 30; 3,8ml TRIS pH 8,8 1M; 2,9ml H₂O;
100µl 10% SDS; 100µl 10% APS; 5µl TEMED

ZM336372 Stocklösung

25mM in DMSO

2.4 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Geräte

Analysenwaage, d=0,0001g	Sartorius, Göttingen
Analysenwaage, d=0,1g	Kern&Sohn, Balingen
Blotting Module XCell Blot	Invitrogen, Karlsruhe
Brutschrank, Hera Cell 150	Thermo Electron, Langenselbold
Durchflusszytometer, FACS Calibur	BD Science, Heidelberg
Filmentwickler	Agfa, Düsseldorf
Gelelektrophoresekammer XCell	Invitrogen, Karlsruhe
SureLock Mini-Cell	Invitrogen, Karlsruhe
Gefrier-/ Kühlschranks (-20°C/ 4°C)	Liebherr, Ochsenhausen
Heizblock, neoBlock1	neoLab, Heidelberg
Heiz-/ Rührplatte, MSH basic	IKA Werke, Staufen
Mikroskop, inverses, 5x,10x,40x	Leica, Solms
Mikrozentrifuge, Sigma1-14	Sigma, Taufkirchen
Mikroplatten- Reader, Model680	BioRad, München
Neubauer Zählkammer	Hartenstein, Würzburg
pH-Meter	Hanna, Kehl am Rhein
Pipetten 1-10µl, 10-100µl, 100-1000µl	Eppendorf, Hamburg
Pipetten 2-20µl, 20-200µl	Gilson, Middleton, USA
Röntgengerät RT200	C.H.F. Müller, Hamburg
Spannungsquelle, PowerEase500	Invitrogen, Karlsruhe
Sterilwerkbank, Hera safe	ThermoElectron, Langenselbold
Stickstofftank (-180°C)	Tec-lab, Königsstein
Vortexer, Vortex Genie2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Wasserbad, WB/OB 7-45	Memmert, Schwabach
Wippschüttler Mini Rocker, MR-1	Lab-4-you
Zentrifuge, Heraeus Multifuge 3 S-R	ThermoElectron, Langenselbold
MACS Multistand quadro	Miltenyi Biotec, Gladbach
Swift Pet+, Pipettierhilfe	abimed, Langenfeld

Verbrauchsmaterialien

Cellstar Röhrchen 15ml, 50ml	greiner bio-one, Frickenhausen
FACS Röhrchens, Polysterol	Hartenstein, Würzburg
6-, 24-, 96- well Zellkulturplatten	Falcon, Heidelberg
Gelkämme, 1,5mm, 15 well	Invitrogen, Karlsruhe
Gelkassetten 1,5mm	Invitrogen, Karlsruhe
Gel- Loadertips 1-200µl	Hartenstein+ Gilson, Würzburg
Nitrocellulose- Transfermembran	GE Healthcare, Freiburg
Pipettenspitzen 10µl, 100µl, 1000µl	Hartenstein, Würzburg
Reagiergefäß 0,5ml, 1,5ml	Sarstedt, Nümbrecht
Röntgenfilme, SuperRX	Fujifilm, Düsseldorf
Stabpipetten 5ml, 10ml, 50ml	greiner bio-one, Frickenhausen
Whatman Paper	GE Healthcare, Freiburg
Zellkulturflaschen Cellstar 75cm ²	greiner bio-one, Frickenhausen
Zellsiebe, 70µm, Nylon	Falcon BD, Heidelberg
MACS Columns LS	Miltenyi Biotec, Gladbach

2.5 Zelllinien

RPMI 8866

Die Fütterzelllinie RPMI 8866 wurde freundlicherweise von Prof. Dr. J. Wischhusen (Universitätsklinik Würzburg) zur Verfügung gestellt.

Die EBV- transformierte B-Zelllinie wurde als Fütterzelle für die polyklonale Expansion menschlicher NK- Zellen in vitro genutzt. Die Zellen sezernieren diverse Wachstumsfaktoren, unter Anderem Interleukin 12, wodurch selektiv die NK- Zell-Proliferation angeregt werden kann (Perussia, 1987; Valiante, 1992).

K562

Die K562-Zelllinie wurde freundlicherweise von Prof. Dr. U. Kämmerer (Universitätsklinik Würzburg) zur Verfügung gestellt.

K562 Zellen sind eine erythroleukämie Zelllinie eines Patienten mit bcr/abl positiver CML (Lozzio, 1975). Diese Zellen exprimieren keine MHC I Moleküle. Allerdings

verfügen sie auf ihrer Oberfläche über die Liganden des aktivierenden NKG2D-Rezeptors MICA und MICB, deren Expression mit der Sensibilität einer Zelle für NK-zell- vermittelte Zytotoxizität korreliert (Bae DS, 2012). Deshalb reagieren sie sehr sensibel auf NK- Zell- vermittelte Effekte.

Daudi JP

Die Daudi-Zelllinie wurde freundlicherweise von Prof. Dr. P. Fisch (Universitätsklinik Freiburg) zur Verfügung gestellt.

Daudi-Zellen sind Burkitt- Lymphomzellen, die aufgrund einer defizienten β 2-Mikroglobulin- Synthese keine vollständigen MHC-I- Rezeptoren synthetisieren und exprimieren können (Quillet, 1988). Sie sind EBV positiv, exprimieren aber keine NKG2D- Liganden wie MICA/B. Deshalb sind sie recht resistent gegenüber NK-Zell-vermittelter Zytotoxizität (Hermann 1992).

2.6 Methoden

2.6.1 Isolierung peripherer Lymphozyten (PBL) aus Leukozyten-depletionskammern (LRSC) mittels Dichtegradientenzentrifugation und Plastikadhärenzverfahren

Die Lymphozyten wurden aus Leukozytendepletionskammern gesunder Blutspender nach schriftlicher Einverständniserklärung der Spender isoliert (Stellungnahme der Würzburger Ethikkommission Nr. 170/10, vom Dezember 2010). Leukozytendepletionskammern oder „leukoreduction system chambers (LRSCs)“ sind ein Nebenprodukt der Vollblutspende. Die Zellen dieser Leukozytenkonzentrate sind in Eigenschaft und Zusammensetzung vergleichbar mit denen eines buffy-coats (Dietz, 2006).

In einem ersten Schritt zur Gewinnung peripherer Blutlymphozyten (PBLs) wurden mittels Ficoll- Hypaque Dichtegradientenzentrifugation die peripheren mononukleären Blutzellen oder „peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)“ von den restlichen Blutbestandteilen getrennt. Der Inhalt des LRSCs wurde mit 10ml PBS in einem 50ml Röhrchen gemischt. Ein zweites 50ml Röhrchen wurde mit 20ml Ficoll- Gradientenlösung befüllt. Das Blut/PBS- Gemisch wurde vorsichtig auf die

Gradientenlösung pipettiert. Es folgte eine 30-minütige Zentrifugation bei 1600rpm ohne Bremse. Hiermit wurde eine Schichtung der Blutbestandteile entsprechend ihrer Dichte erreicht. In der oberen Phase befand sich das Blutplasma und Thrombozyten, darunter eine Grenzschicht aus PBMCs. Am Boden des Röhrchens setzten sich Erythrozyten und Granulozyten ab. Die PBMC Schicht wurde vorsichtig abpipettiert und zwei Mal in jeweils 30ml PBS für 10 Minuten bei 1600rpm mit Bremse gewaschen. Zwischen den beiden Waschschrritten wurde der Überstand verworfen und das Zellpellett in neuem PBS resuspendiert. Anschließend erfolgte die Lyse der verbliebenen Erythrozyten mit BD Lysis Puffer. Nach zwei weiteren Waschschrritten mit 30ml PBS für 10 Minuten bei 1600rpm wurden die PBMCs in R10 Medium aufgenommen. Zur Entfernung der verbliebenen Monozyten wurde eine Plastikadhärenz durchgeführt. Hierzu wurden die PBMC auf $0,33 \times 10^7$ Zellen/ml eingestellt und zu jeweils 2,5ml auf 6-well-Platten transferiert. Die Platten wurden für 75 Minuten im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. In dieser Zeit adhärten die Monozyten am Boden der Wells, sodass mit dem Überstand die PBLs isoliert werden konnten (Kelley, 1987). Die Überstände wurden ein weiteres Mal gewaschen und in R10 Medium aufgenommen.

2.6.2 Polyklonale Expansion von Natürlichen Killerzellen

Für die Versuche wurden zwei unterschiedliche Expansionsansätze verwendet. Die Expansion im Fütterzellsystem (Perussia 1987) stellt eine unkomplizierte und kostengünstige Möglichkeit zur Gewinnung von polyklonalen NK- Zellen dar. Allerdings verbleibt eine geringe Kontamination mit T- Zellen, Monozyten und NKT-Zellen. In FACS- Analysen kann spezifisch die CD16/56⁺ und CD3⁻ Zellpopulation ausgewählt und analysiert werden (gaten). Um Effekte durch Kontamination mit T-Zellen, Monozyten oder NKT-Zellen zu minimieren wurden für die Western-Blot Versuche zusätzlich zu den Experimenten mit NK- Zellen aus Fütterzellexpansionen Bestätigungsversuche mit hoch aufgereinigten NK- Zellen durchgeführt. Hierfür wurde ein kommerzielles NK- Zell- Aktivierungs- und Isolationskit von Miltenyi eingesetzt und die Expansion nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die durchschnittliche Reinheit an CD16/56⁺ und CD3⁻ Zellen betrug >95%.

2.6.2.1 Expansion im Fütterzellensystem

Die PBLs wurden wie unter 2.6.1 beschrieben isoliert und auf 1×10^6 Zellen/ml eingestellt. Die Zellen der Fütterzelllinie RPMI8866 wurden mit 30 Gy bestrahlt. Durch die Bestrahlung werden die Fütterzellen am Wachstum gehindert, sezernieren jedoch weiterhin die benötigten Zytokine und Wachstumsfaktoren für die NK-Zell-expansion. Nach zweimaligem Waschen der bestrahlten Fütterzellen und Konzentrationseinstellung auf 1×10^6 Zellen/ml wurden PBLs mit Fütterzellen im Verhältnis von 4:1 gemischt und auf 24-well-Platten a 500µl/well ausplattiert. Die Fütterzellen sezernieren proliferationsfördernde Zytokine wie IL-12, die spezifisch die NK-Zell Proliferation anregen können (Perussia, 1987; Kobayashi, 1989; Valiante, 1992). Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C und 5%CO₂ inkubiert. Am fünften Tag der Kokultur wurde pro Ansatz 1ml R10-Medium addiert. Die Reinheiten, bei denen NK-Zellen definiert waren als CD3⁻, CD16/56⁺, wurden erstmalig an Tag sieben bestimmt. Die Ziel-Reinheit betrug >70%. Abhängig von der ermittelten Reinheit wurden die Versuche zwischen Tag 7-9 durchgeführt. Da die Expansion mit Fütterzellen eine hohe Schwankbreite bezüglich der erzielten Reinheiten ($75\% \pm 7\%$ Mittelwert \pm Standardabweichung) und Expansionsraten aufzeigte, wurden Bestätigungsversuche mit hoch aufgereinigten NK-Zellen durchgeführt (s. 2.6.2.2). Neben der Expansion von unbehandelten Zellen erfolgte die Expansion auch unter dem Zusatz von Sorafenib (0,1µg/ml, 1µg/ml, 3µg/ml), Sunitinib (50ng/ml, 200ng/ml) und ZM336372 (0,01µg/ml, 0,05µg/ml, 0,1µg/ml, 0,5µg/ml, 1µg/ml, 1,5µg/ml, 10µg/ml). Außerdem wurde stets eine Lösungsmittelkontrolle mit DMSO mitgeführt. An Tag fünf wurde 1ml R10-Medium mit der jeweils entsprechenden Medikamentenkonzentration addiert. Für einige Versuche wurden die genannten Medikamente erst 24h bzw. 4h vor dem Versuch beigefügt.

2.6.2.2 Expansion mit NK-Zell Isolations- und Aktivierungskit

Bei diesem Verfahren zur polyklonalen Expansion humaner NK-Zellen wurden PBMCs (isoliert wie unter 2.2.1 beschrieben) in einem ersten Schritt mittels einer magnetischen Zellisolation und-separation („magnetic cell isolation und cell separation

MACS“) basierten Negativsortierung hoch aufgereinigt und anschließend während der Expansion über die Rezeptoren CD2 und CD335 (NKp46) aktiviert.

Das verwendete Protokoll richtete sich nach den Herstellerangaben (Miltenyi Biotec):

Isolation: Alle genannten Angaben gelten pro 1×10^7 PBMCs. Es wurden 40 μ l MACS Puffer und 10 μ l NK- cell Biotin Antikörper Cocktail (Mischung von Biotin-konjugierten monoklonalen humanen Antikörpern gegen Antigene, die nicht auf NK-Zellen vorkommen) hinzugefügt, gut gemischt und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 300 μ l MACS Puffer und 200 μ l NK- cell MikroBead Cocktail addiert, gemischt und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden mit 10ml MACS- Puffer bei 1500rpm für 10 Minuten abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 500 μ l MACS Puffer resuspendiert, die MACS- Säule LS mit 3ml MACS Puffer äquilibriert. Die Zellsuspension wurde auf die Säule im MACS- Separator geladen und der Durchlauf in einem 50ml Röhrchen aufgefangen. Die Säule wurde anschließend noch dreimal mit 500 μ l MACS- Puffer beladen.

Bei diesem Schritt wurden die nicht-NK- Zellen über Biotin- gekoppelte Antikörper indirekt mit magnetischen Teilchen gekoppelt. Bei dem Durchlauf durch den MACS Separator, der einen starken Magneten beinhaltet, wurden alle magnetisch gekoppelten Zellen in der Säule zurückgehalten. Als Durchlauf erhielt man die nicht magnetisch beladenen Zellen, in diesem Ansatz die NK-Zellen (=Negativsortierung). Die NK-Zellen wurden in SCGM- CellGro Medium aufgenommen und auf 1×10^6 Zellen/ml eingestellt.

Aktivierung: CD335-Biotin- und CD2- Biotin- Antikörper wurden mit Anti-Biotin MACSiBead Partikeln beladen und auf 1×10^8 Antikörper/ml MACS- Puffer eingestellt. Pro 1×10^6 NK- Zellen wurden 5 μ l beladene Anti- Biotin MACSiBead Partikel addiert. Die Zellen wurden zu je 500 μ l mit einer Dichte von 1×10^6 Zellen/ml auf einer 24-well-Platte ausplattiert. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂. Am Tag 5 wurde 1ml Medium addiert. Ab Tag 7 musste täglich die Zellzahl ermittelt und mit SCGM CellGro Medium inkl. der entsprechenden Medikamentenkonzentration auf 1×10^6 Zellen/ ml verdünnt werden. Die Reinheiten, bei denen NK- Zellen definiert waren als CD3⁻, CD16/56⁺, wurden erstmalig am Tag 12 bestimmt. Die Zielreinheit betrug 95%. Die NK-Reinheiten mit diesem Expansionsansatz betrug 97% ($97 \pm 2\%$ Mittelwert \pm Standardabweichung). Die Versuche wurden zwischen Tag 12-14 der Expansion durchgeführt. Neben der Expansion von unbehandelten Zellen erfolgte die

Expansion auch unter dem Zusatz von Sorafenib (0,1µg/ml, 1µg/ml, 3µg/ml) und ZM336372 (0,05µg/ml, 0,5µg/ml, 1,5µg/ml). Außerdem wurde stets eine Lösungsmittelkontrolle mit DMSO mitgeführt. An Tag fünf wurde 1ml Medium mit der jeweils entsprechenden Medikamentenkonzentration addiert.

2.6.3 Durchflusszytometrie

Mit der Durchflusszytometrie per „fluorescence activated cell sorting“ (FACS) können quantitative Aussagen zu Oberflächenmolekülen, intrazellulären Proteinen, Peptiden und DNA getroffen werden. Somit können auch Zellpopulationen voneinander unterschieden werden. Hierbei werden gewünschte Zielstrukturen spezifisch durch eine Antigen- Antikörper vermittelte Reaktion mit einem Fluoreszenzfarbstoff beladen. Bei der Messung am Gerät lässt man die suspendierten Einzelzellen an einem Lichtstrahl vorbeifließen. Das Streulicht und die Fluoreszenzintensität jeder einzelnen Zelle werden so detektiert. Aus dem Streulicht können Informationen über die Größe („forward scatter“) und Granularität („side scatter“) gewonnen werden, während die Fluoreszenzintensität die Expressionsstärke des spezifischen Moleküls widerspiegelt. Das hier verwendete FACS Calibur besitzt zwei Laser (488nm Argon und 633nm He/Ne) und kann bis zu vier verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe anregen (4- Farben FACS). Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe waren Fluoresceinisothiocyanat (FITC, Emissionsmaximum 530nm), Phycoerythrin (PE, Emissionsmaximum 585nm), Peridinin Chlorophyll Protein (PerCP, Emissionsmaximum 660-680nm) und Allophycocyanin (APC, Emissionsmaximum 767nm).

2.6.3.1 Apoptose-/ Nekrose- Assay mit Annexin-V und 7-AAD

Um potentielle toxische Wirkungen der Medikamentenbehandlung auf die NK- Zellen während der Expansion aufzudecken, wurden an den Tagen eins, fünf und acht der Expansion Apoptose-/ Nekrose- Assays durchgeführt. Hierzu wurden unbehandelte bzw. mit Sorafenib (1µg/ml; 3µg/ml), ZM336372 (0,4µg/ml; 1,5µg/ml; 3,75µg/ml) oder DMSO behandelte NK- Zellen an besagten Tagen untersucht. Gemäß den Angaben der Hersteller wurden je 1×10^5 Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen, in 100 µl

Annexin-V-Bindungspuffer resuspendiert und 15 min mit je 2,5 µl Ann-V-PE und 7-AAD bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde jeweils 200 µl des Bindungspuffers zugegeben und die Proben innerhalb einer Stunde am Durchflusszytometer gemessen. Zur Identifikation der NK-Zellen wurden jeweils 3 µl CD16/CD56-APC zum gleichen Zeitpunkt wie AnnV-PE und 7AAD zugegeben. Annexin-V bindet an Phosphatidylserin (PS). Bei vitalen Zellen ist PS an der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran lokalisiert. Im Rahmen der Apoptose tritt dies vermehrt auf die extrazelluläre Seite über und kann mittels Annexin- V detektiert werden (Schutte 1998). 7-AAD färbt DNA, die bei spätapoptotischen und nekrotischen Zellen aus dem Zellkern austritt (Wadkins 1991). Frühapoptotische Zellen sind also Annexin-V⁺ / 7AAD⁻ während sich spätapoptotische bzw. nekrotische Zellen sowohl Annexin-V⁺ als auch 7AAD⁺ darstellen. Eine Differenzierung zwischen spätapoptotischen und nekrotischen Zellen ist mit dieser Methode nicht möglich.

2.6.3.2 Funktionelle Zytokinassays

Um eine Aussage über die Medikamentenwirkung und die Interaktion von expandierten NK-Zellen mit Zielzellen auf funktioneller Ebene zu ermöglichen wurden intrazelluläre Zytokinversuche durchgeführt. Mittels dieses Versuchsaufbaus wurde basierend auf der Publikation von Alter et al. (Alter 2004) die Produktion von IFN γ , TNF α und des Degranulationsmarkers CD107a gemessen. Die wie in den Punkten 2.6.1 und 2.6.2 beschrieben, gewonnen und expandierten Zellen wurden ab dem achten Tag der Expansion auf ihre NK-Zell Reinheit überprüft.

Reinheitsfärbung: Pro Bedingung wurden je 100µl Zellsuspension mit 2ml FACS-Puffer in einem FACS- Röhrchen 5 min bei 1200 rpm mit Bremse zentrifugiert, der Überstand verworfen. Anschließend erfolgte die Färbung mit 5µl CD3 FITC, 3µl CD56-APC und 1µl CD16-PerCP. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei 4°C wurden erneut 2ml FACS- Puffer pro Röhrchen addiert und 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und 100µl 4% Paraformaldehyd (PFA) addiert. Anschließend erfolgte die zügige Auswertung, wobei die NK-Zell-Reinheit als prozentualer Anteil der CD16/56⁺ CD3⁻ Zellen an der Gesamtzellzahl definiert wurde.

Zytokinassay: Bei einer NK-Zell- Reinheit von mind. 70% wurde mit dem funktionellen Assay fortgeführt: Pro Bedingung wurden je 3.0×10^5 NK-Zellen in ein FACS- Röhrchen

vorgelegt und in die entsprechenden Röhren 4x10⁴ K562- bzw. Daudi Zellen addiert. Die Positivkontrolle erfolgte mit unbehandelten NK-Zellen + 800nM PMA und 0.1µg/ml Calciumionophor. Zusätzlich wurde eine Negativkontrolle mit unbehandelte NK- Zellen und eine DMSO- Kontrolle mitgeführt. Anschließend Zugabe von 5µl CD107a-FITC , 4µl Golgi-Stop und 5µl Brefeldin A. Es erfolgte eine 6-stündige Inkubation bei 37°C 5% CO₂. Nach der Inkubation wurden die Oberflächenantigene gefärbt: die Zellen wurden einmal mit 2 ml FACS-Puffer gewaschen (1200 rpm, 5 min), dann mit 5 µl CD3 PerCP, 3 µl CD16/CD56 APC gefärbt und 15 min bei 4 °C inkubiert. Nach Zugabe von 250µl 4%- PFA erfolgte eine weitere Inkubation über 20 min bei 4°C. Nach erneutem Waschen mit 2 ml FACS- Puffer (1200 rpm, 5 min) wurden die Zytokine gelabelt: pro Röhren wurde 1,0 ml Permeabilisierungslösung (0,5% Saponin) zugefügt und das Zellpellet vorsichtig resuspendiert. Während der erneuten 12-minütigen Inkubationsphase im Dunkeln bei Raumtemperatur (RT) wurde die Zellsuspension mehrfach sanft gevortext. Anschließend Zugabe von 1,0 ml Permeabilisierungslösung (0,5% Saponin), waschen mit 2 ml FACS- Puffer (1200 rpm, 5 min, Überstand verwerfen), Zugabe von 2,0 ml Permeabilisierungslösung (0.5% Saponin), waschen mit 2 ml FACS- Puffer (1200 rpm, 5 min, Überstand verwerfen). Addition der Cytokinantikörper IFN γ -PE (0.7µl) und TNF α - PE (0.75µl). Es erfolgte eine 30- minütige Inkubation bei 4°C im Dunkeln und anschließend drei weitere Waschschritte (+2ml FACS-Puffer, 1200 rpm, 5 min, Überstand wurde verworfen). Direkt im Anschluss erfolgte das Messen am FACS- Calibur. Da Saponin eine Eigenfluoreszenz besitzt, wurde stets eine entsprechende Kompensation durchgeführt. Die Messungen wurden auf CD16/56⁺ Zellen begrenzt. Zur Auswertung wurde der Anteil an CD107a bzw. TNF α / IFN γ positiven NK-Zellen in % ermittelt.

2.6.4 Western Blot Analyse

Zur Analyse der medikamenteninduzierten Veränderungen auf die Signalwege der NK-Zellen auf Proteinebene wurden Western Blot Analysen durchgeführt. Die Durchführung erfolgte nach einem in unserem Labor gut etablierten und bereits mehrfach beschriebenen Protokoll. Zur Proteingewinnung wurden nur Fütterzell Expansionsansätze mit einer NK-Zell- Reinheit von mind. 75% verwendet (Median 77%, Streuung von 75% bis 84%) Bestätigungsblots mit hoch aufgereinigten NK-

Zellen mittels Kit- Expansion hatten stets eine NK-Zell Reinheit von über 95% (Median 98%, Streuung von 95 bis 98%). Sofern nicht anders beschrieben wurden alle Teilschritte auf Eis durchgeführt. Pro Ansatz wurden 5×10^6 Zellen verwendet. Für einige Experimente mit Kurzzeitbehandlung wurden polyklonal expandierte NK-Zellen mit Sorafenib, ZM336372 oder DMSO für eine, je nach Versuchsanordnung definierte Zeit im Wasserbad bei 37°C inkubiert.

Stimulation mit Zielzellen: Bei Versuchen mit Stimulation durch Zielzellen erfolgte vor dem Versuch eine Fixierung der K562- bzw. Daudi- Zellen für 30 min mit 4% PFA, anschließend dreimaliges Waschen mit PBS und Lagerung auf Eis. So fixierte Zellen werden durch RIPA- Puffer nicht lysiert. Beim Blotten kommt es zu keiner Verunreinigung durch Proteine der Zielzellen (Jiang 2002). Die Effizienz dieses Verfahrens wurde durch eigene Versuche mit fixierten Zellen kontrolliert. Hier konnten nach Behandlung der Zellen mit RIPA- Puffer nur minimale Proteinspuren im unteren Bereich der Nachweisgrenze des Proteindetektorsystems nachgewiesen werden. Die Stimulation erfolgte wie beschrieben im Verhältnis 1:1 für NK-Zellen und Zielzellen (Jiang 2002).

Es erfolgte eine Synchronisation der NK-Zellen mit den Zielzellen hinsichtlich Ausbildung der sog. Immunologischen Synapse für 5 min auf Eis. Nach Inkubation wurde bei 13500 rpm 2 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 125 µl RIPA- Puffer aufgenommen. Während der einstündigen Lyse auf Eis wurde das Zelllysat alle 10 min vorsichtig aufgemischt. Anschließend Zentrifugation bei 3000 rpm für 5 min. Zur Bestimmung des Proteingehalts wurde das BioRad D_c- System nach Herstellerangaben verwendet. Die Aufbewahrung der aliquotierten Proteinkonzentrate erfolgte bis zur Verwendung bei -20°C.

SDS- Page: Es wurde 4xSDS Sample Buffer (Invitrogen) und 10x Reducing Agent (Invitrogen) verwendet. Die Proben wurden vor Verwendung 10 min bei 70°C erhitzt. Für die Elektrophorese wurden selbstgegossene 10%ige Bis-Tris Gele verwendet. Der Gellauf wurde für 35 min bei 200 V und 120 mA durchgeführt. Der Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte bei 25 V und 200 mA innerhalb von 75 min. Die Transferkontrolle erfolgte mit Einfärben der Membran mit Ponceau- S- Lösung. Nach Entfärben mit PBS wurde die Membran mit Blockierungslösung, einem TBST-Puffer mit je nach verwendetem Antikörper unterschiedlichen Milch- bzw. BSA- Anteilen, für ein bis zwei Stunden inkubiert. Dies diente zur Vermeidung von unspezifischer Bindung der Antikörper an die Membran. Die Inkubation mit in

Blockierungslösung verdünntem Primärantikörper erfolgte über Nacht bei 4°C im Kühlschrank auf der Schüttelplatte. Es erfolgte ein Waschen der Membran mit TBST und Inkubation mit einem HRP-konjugierten sekundären Antikörper für ein bis zwei Stunden (je nach verwendetem Primärantikörper) bei Raumtemperatur. Anschließend erneutes Waschen mit TBST, Spülung mit destilliertem Wasser und Beschichtung für 1 min mit ECL-Lösung. Die Belichtung erfolgte in der Dunkelkammer für 30 Sekunden bis 6 Stunden, variierend je nach Antikörper und Intensität des spezifischen Signals. Für weitere Detektionen wurde der benutzte Antikörper mittels eines Antikörper-Entfernungspuffers von der Membran gelöst und vier Mal für 10 Minuten in TBST gewaschen. Für die Auswertung wurden die Intensitäten der Banden mit Hilfe des Bildanalyseprogramms ImageJ (Version 1.44) (Schneider 2012) bestimmt. Die relative Intensität wurde aus dem Quotienten aus der Intensität der Bande des Phosphoantikörpers und der Bande des nicht- Phosphoantikörpers bestimmt und auf β -Actin bezogen.

2.6.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung und die Erstellung der Graphen erfolgten mit der Software GraphPad Prism (Version 5.0). Die Darstellung des arithmetischen Mittels erfolgte - sofern nicht anders beschrieben- aus der Anzahl der Experimente (n) und des Standardfehlers des Mittelwertes (SEM). Bei Versuchen mit einer Variablen wurde der zweiseitige gepaarte Student t-Test verwendet. Für Experimente mit zwei unterschiedlichen Variablen erfolgte die statistische Auswertung mit dem two-way-ANOVA- Test. Das statistische Signifikanzniveau wurde für alle Tests auf $p < 0.05$ definiert. Die Wahrscheinlichkeit für ein falsch signifikantes Ergebnis beträgt so weniger als 5%. In den Graphen steht * für das Signifikanzniveau $p < 0.05$ und ** für $p < 0.01$ mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 1%.

3 Ergebnisse

3.1 Funktionelle Effekte von Sorafenib und ZM336372 auf menschliche, polyklonal expandierte NK-Zellen bei Langzeitbehandlung

Paradoxe Effekte von Kinaseinhibitoren wurden bereits für Sorafenib (Hatzivassiliou 2010) und ZM336372 (Hall- Jackson 1999) in einigen malignen Zelllinien beschrieben. Bei anderen Kinaseinhibitoren ohne CRAF-Zielaktivität konnte keine paradoxe Aktivierung beobachtet werden. In unserem Labor konnten aktivierende Effekte von Sorafenib auch auf gesunde menschliche NK-Zellen beobachtet werden. In dieser Dissertation sollte die Hypothese, dass die gesehenen Effekte CRAF-vermittelt waren überprüft werden. Deshalb wurde die Wirkung von Sorafenib auf polyklonal expandierte NK- Zellen gesunder menschlicher Spender auf funktioneller und Signaltransduktionsebene untersucht und mit den Effekten des spezifischen CRAF Inhibitors ZM336372 verglichen. Für die Evaluation wurde zwischen Effekten durch Langzeit- und Kurzzeitbehandlung unterschieden. Für die Langzeitbehandlung befand sich das Medikament in der jeweils entsprechenden Konzentration über die gesamte Expansionsdauer in dem Medium der Zellkultur. Für die Kurzeiteffekte wurde das Medikament am Ende der Expansion für einen, je nach Versuchsanordnung variierenden, Zeitraum der Expansion zugesetzt. Die Medikamente wurden vor der Durchführung von funktionellen Versuchen bzw. Signaltransduktionsversuchen stets herausgewaschen.

3.1.1 Medikamenteninduzierte Effekte auf die Expansionsraten: Sorafenib hemmt dosisabhängig die NK-Zell Proliferation

Zur Beurteilung des proliferativen Potentials von NK-Zellen unter dem Einfluss von Sorafenib bzw. ZM336372 wurden periphere Blutlymphozyten gesunder Blutspender (PBLs, s. 2.6.1) mit RPMI 8866 Zellen wie beschrieben kokultiviert. Die NK-Zellen wurden wie unter 2.6.1 beschrieben isoliert und wie unter 2.6.2.1 im Fütterzellsystem expandiert. An Tag 1, der hier als Tag des Ansatzes definiert wurde, erfolgte bei den entsprechenden Expansionsansätzen der Zusatz von DMSO als Lösungsmittelkontrolle, Sorafenib 1 µg/ml, Sorafenib 3 µg/ml, ZM336372 0.5 µg/ml,

ZM336372 1.5 µg/ml bzw. ZM336372 3.75 µg/ml. Die Wahl der Medikamentenkonzentrationen für Sorafenib erfolgte basierend auf Vorarbeiten in unserem Labor. Die Konzentration sollte möglichst nah am klinisch relevanten Dosisbereich liegen ohne jedoch zu einer Apoptose-/ Nekroseinduktion zu führen. Die Langzeitbehandlung mit 5 und 10µg/ml Sorafenib führte zu einer erhöhten Toxizität, während Konzentrationen von 1 und 3 µg/ml keine signifikanten Unterschiede aufwiesen (Dotterweich 2011). Die Wahl der Konzentrationen für ZM336372 erfolgte basierend auf Vorpublikationen (Hall- Jackson 1999). Zusätzlich erfolgten mit den gleichen Expansionsansätzen Apoptose-/Nekroseversuche (s.3.1.2).

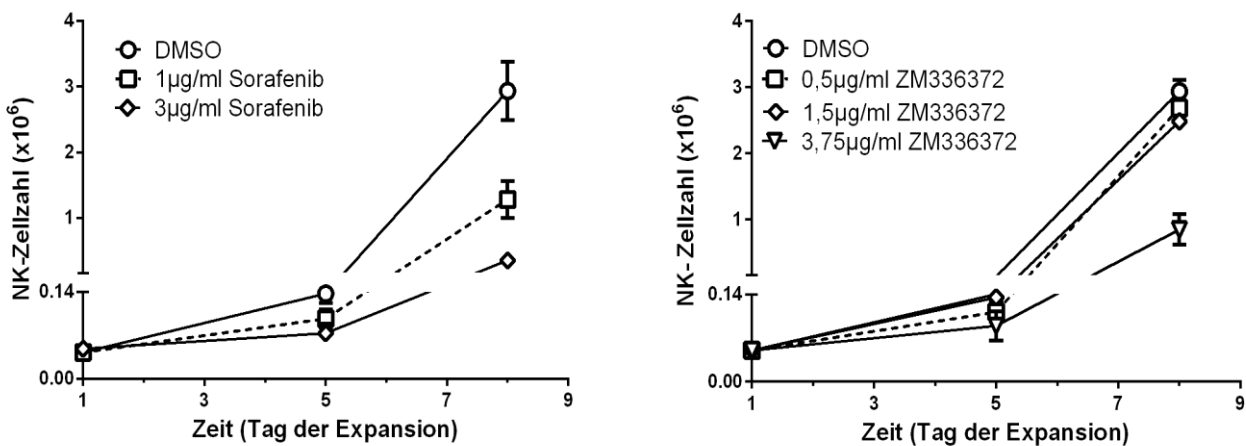


Abbildung 4) Absolute Zellzahlen der polyklonal expandierten NK-Zellen im Fütterzellsystem

An den Tagen 1,5 und 8 wurde bei polyklonal expandierten NK-Zellen gesunder Blutspender während der Langzeitbehandlung mit Sorafenib und ZM336372 in oben genannten Konzentrationen der Anteil an CD16⁺/56⁺ CD3⁻ Zellen durchflusszytometrisch ermittelt und die Gesamtzellzahl nach Vitalitätsbestimmung mit Trypanblau am Lichtmikroskop ausgezählt. Somit konnte die Gesamtzahl an NK-Zellen berechnet werden (Mittelwert und SEM, n=3). Sorafenib führte im Vergleich zur mitgeführten Lösungsmittelkontrolle zu einer dosisabhängigen Hemmung der NK-Zell Proliferation. Unter der Behandlung mit ZM336372 konnte bei den Ansätzen mit 3.75µg/ml eine Hemmung der Proliferation beobachtet werden.

Die unbehandelten Expansionsansätze zeigten an Tag 8 eine 58.27 ± 2.89 (Mittelwert \pm SEM, n= unabhängige Versuche³) -fach erhöhte NK- Zellzahl im Vergleich zu dem Ausgangswert an Tag 1. Im Vergleich hierzu waren die Expansionsraten bei $3.75 \mu\text{g/ml}$ (entspricht ca $10 \mu\text{M}$) ZM336372 mit 16.93 ± 4.59 –facher Erhöhung (Mittelwert \pm SEM n=3 unabhängige Versuche) und Sorafenib $3 \mu\text{g/ml}$ mit 8.89 ± 1.1 –facher Erhöhung (Mittelwert \pm SEM n=3 unabhängige Versuche) deutlich reduziert.

3.1.2 Medikamenteninduzierte Effekte auf die Gesamttodesraten

In einem weiteren Schritt wurde untersucht, ob die beobachteten Unterschiede auf die NK-Zell Expansionsraten durch ein erhöhtes Absterben der NK-Zellen bzw. eine veränderte Kinetik der Apoptose-/Nekroseinduktion bedingt waren. Im Apoptose/ Nekroseversuch mit Annexin-V und 7AAD zeigten die Ergebnisse von J. Dotterweich (Dotterweich 2011) eine **-signifikant ($p < 0,01$) erhöhte Gesamttodesrate an Tag 8 der Expansion bei Konzentrationen von Sorafenib $5 \mu\text{g/ml}$, während bei $1 \mu\text{g/ml}$ und $3 \mu\text{g/ml}$ Sorafenib keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden konnten. Diese Ergebnisse konnte ich bestätigen. Für die weiteren Versuche wurden die Sorafenib-Konzentrationen von 1 und $3 \mu\text{g/ml}$ gewählt bei denen keine erhöhte Gesamttodesrate beobachtet werden konnte (Dotterweich 2011).

Zur Klärung, ob die beobachtete reduzierte Expansionsrate durch $3.75 \mu\text{g/ml}$ ZM336372 auf toxische Effekte bzw. eine gesteigerte Apoptose-/ Nekroseinduktion zurückzuführen war, wurden die Expansionen bezüglich apoptotischer ($7\text{-AAD}^- / \text{AnnV}^+$) und spätapoptotischer, bzw. nekrotischer NK-Zellen ($7\text{-AAD}^+ / \text{AnnV}^+$) untersucht.

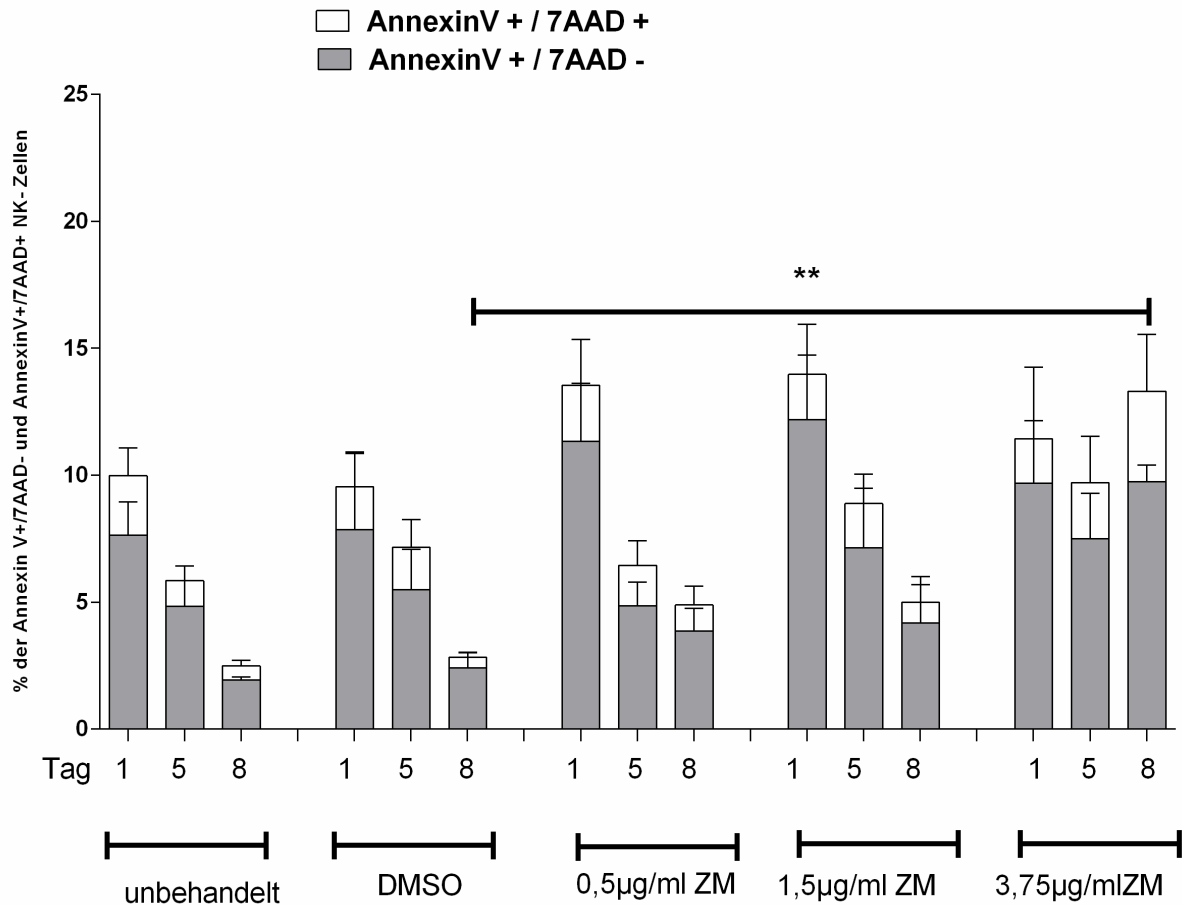


Abbildung 5) Apoptose/ Nekroseversuch mit AnnexinV und 7AAD bei polyklonal expandierten NK-Zellen gesunder Blutspender bei Langzeitbehandlung im Fütterzellsystem. Die Zellkulturansätze wurden während der Expansion mit o.g. Konzentrationen ZM336372 behandelt. DMSO wurde als Lösungsmittelkontrolle mitgeführt. Die Versuche wurden an den Tagen 1, 5 und 8 durchgeführt. (Mittelwert und SEM, n=4). Für ZM336372 zeigten sich an Tag 8 bei Konzentrationen von 3.75 µg/ml ******-signifikant erhöhte Werte der Gesamttodesrate. Bei den niedrigeren Konzentrationen von 0.5 µg/ml und 1.5 µg/ml ZM336372 zeigten sich im Vergleich zu den unbehandelten bzw. mit DMSO behandelten Zellen keine signifikanten Unterschiede.

Für die weiteren Versuche wurde ZM336372 in Konzentrationen von 0.5 und 1.5 µg/ml verwendet. Auf die höhere Konzentration von 3.75 µg/ml wurde aufgrund der gemessenen toxischen Effekte verzichtet.

3.1.3 Expansion der NK-Zellen unter Sorafenib- und ZM336372-Behandlung führt zu einer dosisabhängigen Erhöhung der Zytokinproduktion

Zytokinproduktion und direkte Zytotoxizität mittels Degranulation stellen wichtige Effektorfunktionen von NK-Zellen dar. Um den Effekt der Langzeitbehandlung von Sorafenib und ZM336372 auf funktioneller Ebene zu evaluieren wurden bei NK-Zellexpansionen mit und ohne Behandlung nach acht bis neun Tagen die IFN γ / TNF α -Produktion und die Expression des Degranulationsmarkers CD107a durchflusszytometrisch bestimmt (Evaluation des „steady state“ Aktivierungsniveaus). Hierbei wurden die Zytokine IFN γ und TNF α in der durchflusszytometrischen Untersuchung gemessen. Mit Zellen aus den jeweils selben Ansätzen wurden zudem funktionelle Versuche nach Stimulation durch K562- bzw. Daudi- Zellen zum Ausschluss einer möglichen Erschöpfung „exhaustion“ der NK-Zellen durch die Voraktivierung durchgeführt. Zur Durchführung s. 2.6.2.3.

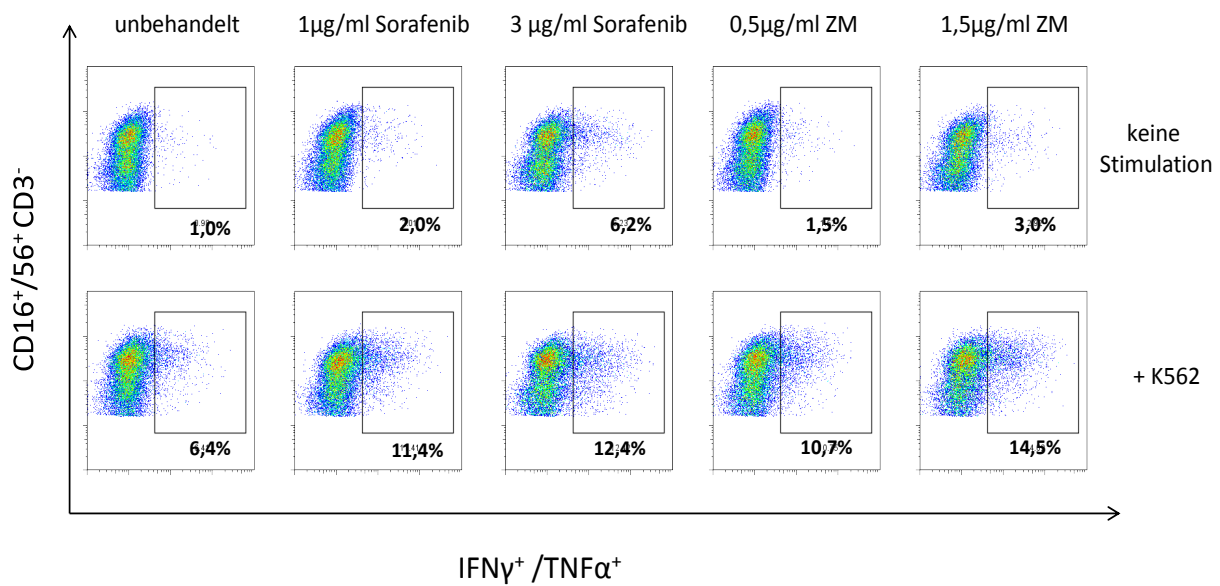


Abbildung 6) Repräsentative Darstellung der FACS- Diagramme einer intrazellulären Zytokinfärbung (n=3 unabhängige Versuche) mit Messung von Interferon γ und Tumornekrosefaktor α bei CD16⁺/56⁺ und CD3⁻ Zellen unter Langzeitbehandlung. Sowohl die Langzeitbehandlung mit Sorafenib als auch ZM336372 führte zu einer dosisabhängig erhöhten Zytokinproduktion. Die Stimulation mit Zielzellen über sechs Stunden (hier gezeigt für die K562-Zelllinie) führte zu einer weiteren Verstärkung dieses Effekts. Unbehandelte und nicht stimulierte NK-Zellen wiesen in diesem Versuch mit 1.0% eine geringe Zytokinproduktion auf. Die Behandlung mit Sorafenib 3μg/ml erhöhte den IFN γ /TNF α ⁺ Anteil auf 6.2%. Die Stimulation der K562-Zelllinie erhöhte diesen Effekt auf 12.4% (siehe auch Abb. 7).

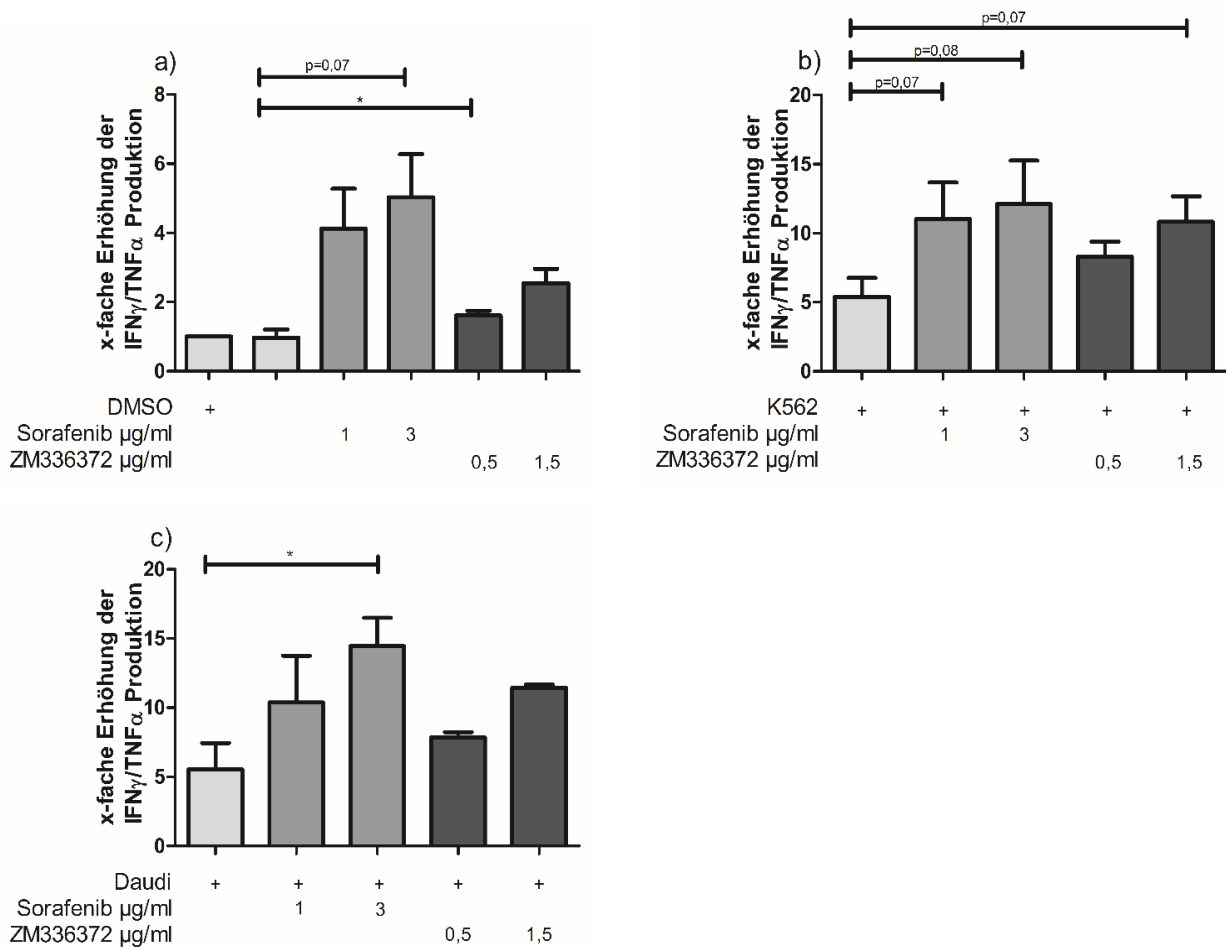


Abbildung 7) IFN_γ/TNF_α- Produktion bei Langzeitbehandlung Dargestellt ist die relative Erhöhung der IFN_γ/TNF_α positiven NK-Zellen durch Langzeitvorbehandlung mit Sorafenib bzw. ZM336372 (a) und bei zusätzlicher Stimulation mit K562 (b) bzw. Daudi- Zellen (c) bezogen auf unbehandelte und nicht stimulierte NK-Zellen (Mittelwert und SEM n=3). Aufgrund hoher interindividueller Unterschiede in dem Anteil der basalen IFN_γ/TNF_α positiven NK-Zellen gesunder menschlicher Blutspender wurde die relative Erhöhung der Zytokinproduktion auf die unbehandelten und nicht stimulierten NK-Zellen berechnet.

Abbildung 7) zeigt die durchflusszytometrisch ermittelte relative Erhöhung der IFN γ /TNF α Positivität der langzeitbehandelten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten und nicht stimulierten NK- Zellen. Die Stimulation mit den Zielzellen erfolgte über 6 Stunden. Ohne Stimulation mit Zielzellen zeigten die Behandlungen mit Sorafenib 1 und 3 $\mu\text{g/ml}$ sowie mit ZM336372 1.5 $\mu\text{g/ml}$ eine erhöhte, aber rechnerisch nicht signifikante Erhöhung der Zytokinproduktion. Die Behandlung mit ZM336372 0.5 $\mu\text{g/ml}$ zeigte eine *-signifikante Erhöhung der Zytokinproduktion. Unter der Behandlung mit Sorafenib 1 $\mu\text{g/ml}$ zeigte sich eine 4.12 ± 1.16 (Mittelwert \pm SEM) fache Erhöhung der Zytokinproduktion. Sorafenib 3 $\mu\text{g/ml}$ führte zu einer weiteren Steigerung um das 5.03 ± 1.24 (Mittelwert \pm SEM) fache gegenüber unbehandelten NK-Zellen. Unter ZM336372 1.5 $\mu\text{g/ml}$ erhöhte sich der Anteil IFN γ /TNF α positiver NK-Zellen um den Faktor 2.54 ± 0.42 (Mittelwert \pm SEM). Die Stimulation mit Zielzellen führte zu einer weiteren Verstärkung der Effekte. Die Stimulation mit K562- Zellen führte zu einer Erhöhung um das 5.40 ± 1.38 (Mittelwert \pm SEM) fache. Die Behandlung mit 1 und 3 $\mu\text{g/ml}$ Sorafenib sowie 0.5 und 1.5 $\mu\text{g/ml}$ ZM336372 führten zu einer weiteren Erhöhung im Vergleich zu unbehandelten K562- stimulierten NK-Zellen, diese Effekte blieben aber ohne rechnerische Signifikanz (11.03 ± 2.7 , $p=0.07$ für Sorafenib 1 $\mu\text{g/ml}$; 12.10 ± 3.2 , $p=0.08$ für Sorafenib 3 $\mu\text{g/ml}$; 10.82 ± 1.85 , $p=0.07$ für ZM336372 1.5 $\mu\text{g/ml}$). Die Stimulation mit Daudi- Zellen wies einen ähnlichen Trend auf, die Behandlungen mit Sorafenib 3 $\mu\text{g/ml}$ zeigte einen rechnerisch *-signifikanten Effekt. Die Stimulation mit Daudi Zellen führte zu einer 5.54 ± 1.90 fachen Erhöhung der IFN γ /TNF α positiven NK-Zellen im Vergleich zu unbehandelten und nicht stimulierten NK Zellen. Die Behandlungen mit Sorafenib 1 $\mu\text{g/ml}$ ($10,38 \pm 3.37$ Mittelwert \pm SEM) und 3 $\mu\text{g/ml}$ (14.44 ± 2.05 Mittelwert \pm SEM) führte zu einer nochmaligen Verstärkung. Gleichsinnig erhöhte auch die Behandlung mit ZM336372 0.5 $\mu\text{g/ml}$ (7.85 ± 0.38 Mittelwert \pm SEM) und 1.5 $\mu\text{g/ml}$ (11.45 ± 0.23 Mittelwert \pm SEM). Es konnte also eine Sorafenib und ZM336372 induzierte, dosisabhängige Erhöhung der Zytokinproduktion festgestellt werden. Sowohl die Stimulation mit K562- Zellen, als auch mit den nicht NKG2D exprimierenden Daudi- Zellen führte zu einer nochmaligen Steigerung der Zytokinfreisetzung.

Aus Zellen derselben Zellexpansionen wurde parallel dazu als Surrogatmarker für die Degranulation die Expression von CD107a ermittelt (n=3). Die Sekretion von lytischen Granula ist eine Voraussetzung für einen wichtigen NK-Zell vermittelten

Tötungsmechanismus. Während dieses Prozesses wird CD107a/b vorübergehend hochreguliert und ist auf der Zellmembran messbar. Daher eignet sich die Expressionsstärke dieses Rezeptors als Surrogatmarker für die NK-Zell Degranulation wie beschrieben (Betts 2003, Alter 2004).

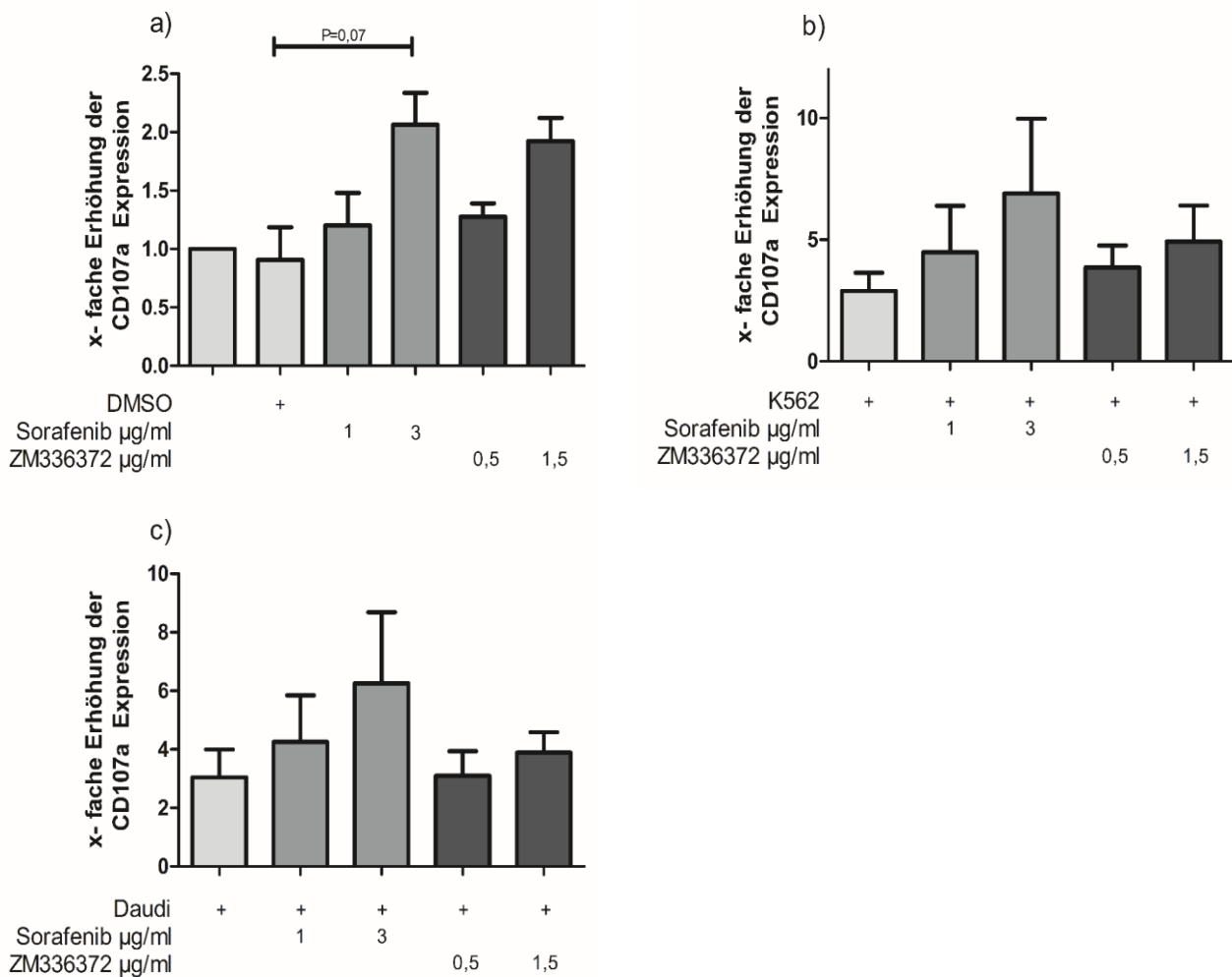


Abbildung 8) CD 107a Expression bei Langzeitbehandlung. Dargestellt ist die relative Erhöhung der Expression von CD 107a durch Langzeitvorbehandlung mit Sorafenib bzw. ZM336372 und bei Stimulation mit K562- bzw. Daudi- Zellen bezogen auf unbehandelte und nicht stimulierte NK-Zellen (Mittelwert und SEM n=3). Sorafenib 3µg/ml und ZM336372 1,5µg/ml führen zu einer Steigerung der CD107a Expression (a). Diese Effekte können durch Stimulation mit K562 (b) und Daudi Zellen (c) nochmals verstärkt werden.

Auch bei der Degranulation zeigte sich ein deutlicher Trend zu einer konzentrationsabhängigen Erhöhung der CD107a Expression durch Sorafenib und ZM336372. Es zeigte sich kein DMSO vermittelter Effekt (0.91 ± 0.28 Mittelwert \pm SEM). Die Behandlung mit Sorafenib $3\mu\text{g/ml}$ (2.06 ± 0.27 Mittelwert \pm SEM) und ZM336372 $1.5\ \mu\text{g/ml}$ (1.92 ± 0.20 Mittelwert \pm SEM) führten in etwa zu einer Verdopplung der CD107a exprimierenden Zellen im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle. Die Stimulation mit Zielzellen konnte diese Effekte nochmals verstärken (unbehandelt + K562 2.90 ± 0.75 ; Sorafenib $3\mu\text{g/ml}$ 6.91 ± 3.06 ; ZM 336372 $1.5\mu\text{g/ml}$ 4.93 ± 1.48 Mittelwert \pm SEM). Es zeigte sich ein Trend zu dosisabhängig erhöhter Degranulation. Dass keine rechnerische Signifikanz erreicht wurde liegt am ehesten an einer relativ großen inter-individuellen Streubreite zwischen den einzelnen Expansionen unterschiedlicher humaner Spender bei einer geringen Fallzahl von $n=3$.

3.2 Eine Kurzzeitbehandlung polyklonal expandierter NK-Zellen mit Sorafenib oder ZM336372 zeigt keinen Effekt auf Zytokinproduktion und Degranulation

Für das weitere Verständnis der paradoxen Aktivierung erfolgten parallel zu den Langzeitexperimenten Versuche, bei denen die NK-Zellen zunächst ohne Behandlung expandiert wurden und der Medikamentenzusatz erst gegen Ende der Expansion erfolgte. Die Behandlungsphase erstreckte sich hierbei über sechs Stunden.

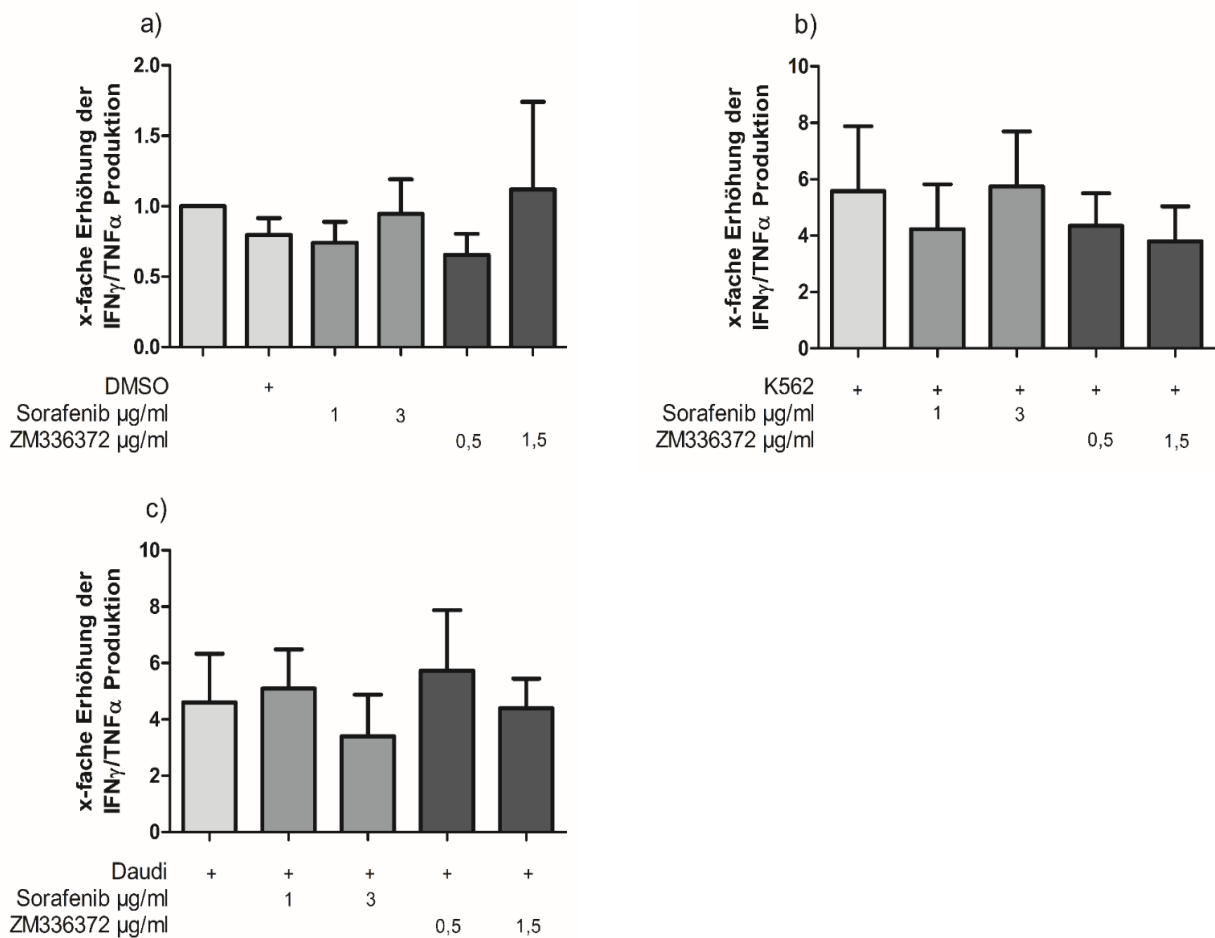


Abbildung 9) IFN γ /TNF α - Produktion bei Kurzzeitbehandlung.

Dargestellt ist die relative Veränderung der IFN γ /TNF α - Produktion durch 6- stündige Behandlung mit Sorafenib bzw. ZM336372 und bei Stimualtion mit K562- bzw. Daudi-Zellen bezogen auf unbehandelte und nicht stimulierte NK-Zellen (Mittelwert und SEM, n=3). Die Medikamente wurden vor Durchführung des Versuchs aus dem Medium ausgewaschen. Bei der Behandlung über sechs Stunden konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen unbehandelten und behandelten Zellen beobachtet werden. Die Stimulation mit den Zielzellen K562 (b) und Daudi (c) führte zu einer Erhöhung, es konnten jedoch keine medikamenteninduzierte Unterschiede beobachtet werden.

Abbildung 9) zeigt die durchflusszytometrisch ermittelte relative Veränderung der IFN γ /TNF α - Produktion der kurzzeitbehandelten NK-Zellen im Vergleich zu den unbehandelten und nicht stimulierten NK-Zellen. Weder die Kurzzeitbehandlung mit Sorafenib noch mit ZM336372 hatte einen signifikanten Einfluss auf die Zytokinproduktion. Die Stimulation der NK-Zellen mit Zielzellen führte zu einer gleichsinnigen Aktivitätserhöhung, ohne jedoch zu Unterschieden innerhalb der einzelnen Behandlungsbedingungen zu führen. Chemokine wie MIP-1 α (CCL3) und RANTES (CCL5) werden innerhalb der ersten Stunde nach Aktivierung über NK-Zellrezeptoren freigesetzt. Die Freisetzung von IFN γ und TNF α dauert zwar etwas länger, ist jedoch im Rahmen der angeborenen Immunantwort innerhalb der ersten Stunden zu erwarten (Montaldo 2013). Unbehandelte und behandelte NK-Zellen aus diesem Versuch zeigen eine vergleichbare Zytokinproduktion zu den unbehandelten NK-Zellen aus den Langzeitversuchen. Dies gilt auch für die Zellen nach Zielzellkontakt.

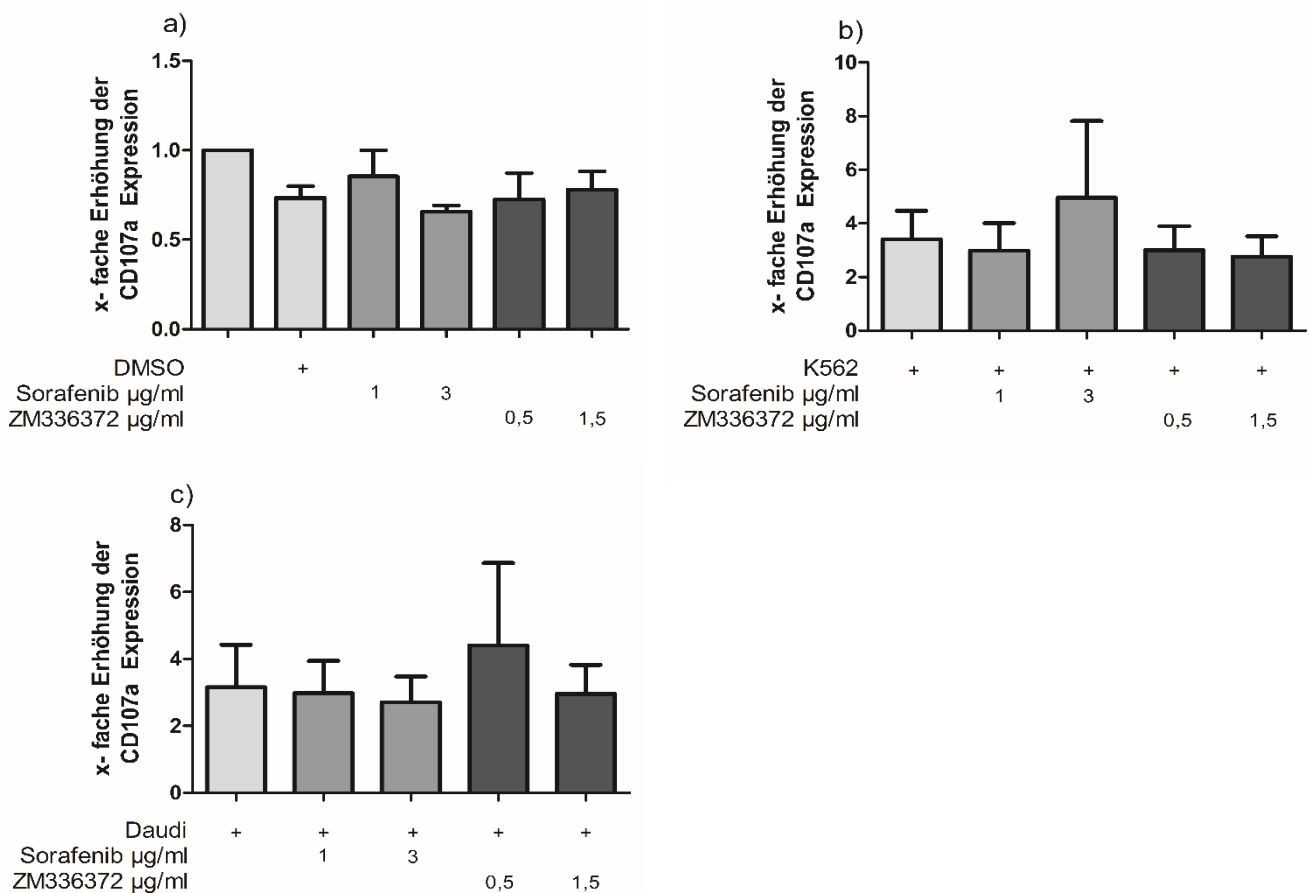


Abbildung 10) CD 107a Expression bei Kurzzeitbehandlung (Mittelwert und SEM, n=3)

In Abb. 10 ist die relative Veränderung der CD107a-Expression durch 6- stündige Behandlung mit Sorafenib bzw. ZM336372 und bei Stimulation mit K562 (b)- bzw. Daudi (c)- Zellen dargestellt, bezogen auf unbehandelte und nicht stimulierte NK-Zellen (Mittelwert und SEM, n=3). Bei der Behandlung über sechs Stunden konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen unbehandelten und behandelten NK Zellen beobachtet werden.

Zwar führte die Stimulation mit Zielzellen zu einer Erhöhung der CD107a Expression aber es konnten keine medikamenteninduzierten Unterschiede ermittelt werden. Unbehandelte und behandelte NK-Zellen aus diesem Versuch zeigen eine vergleichbare CD107a Expression zu den unbehandelten NK-Zellen aus den Langzeitversuchen. Dies gilt auch für die NK-Zellen nach Zielzellkontakt.

3.3 Effekte von Sorafenib und ZM336372 auf die Signaltransduktion in menschlichen polyklonal expandierten NK- Zellen

Um die Effekte des Multityrosinkinaseinhibitors Sorafenib mit dem spezifischen CRAF-Inhibitor ZM336372 auf molekularer Ebene zu vergleichen wurden die Einflüsse auf die Signalmoleküle CRAF, ERK1/2 und AKT mittels Western- Blot Analyse untersucht. Während CRAF und ERK1/2 wichtige Bestandteile des MAPK-Signaltransduktionsweges sind, wurde mit der Evaluation des Phosphorylierungsgrades von AKT der Einfluss auf einen weiteren, in NK-Zellen wichtigen Signaltransduktionsweg analysiert. Dieser kann ebenfalls RAS- vermittelt die Genregulation und die NK-Zellfunktionen beeinflussen. Über aktivierende Membranrezeptoren erfolgt die Signaltransduktion entweder direkt über PI3K-AKT-mTOR oder über RAS-PI3K-AKT-mTOR (LeBlanc 2013).

3.3.1 Langzeitbehandlung mit Sorafenib und ZM336372 erhöhen dosisabhängig den Phosphorylierungsstatus von CRAF und ERK1/2

Auf funktioneller Ebene konnte für Sorafenib und ZM336372 eine dosis- und zeitabhängige Verstärkung der Effektorfunktionen beobachtet werden. Um den

zugrundeliegenden Mechanismus genauer verstehen zu können, erfolgten Western-Blot Analysen der für Effektorfunktionen in NK-Zellen wichtigen Signalwege.

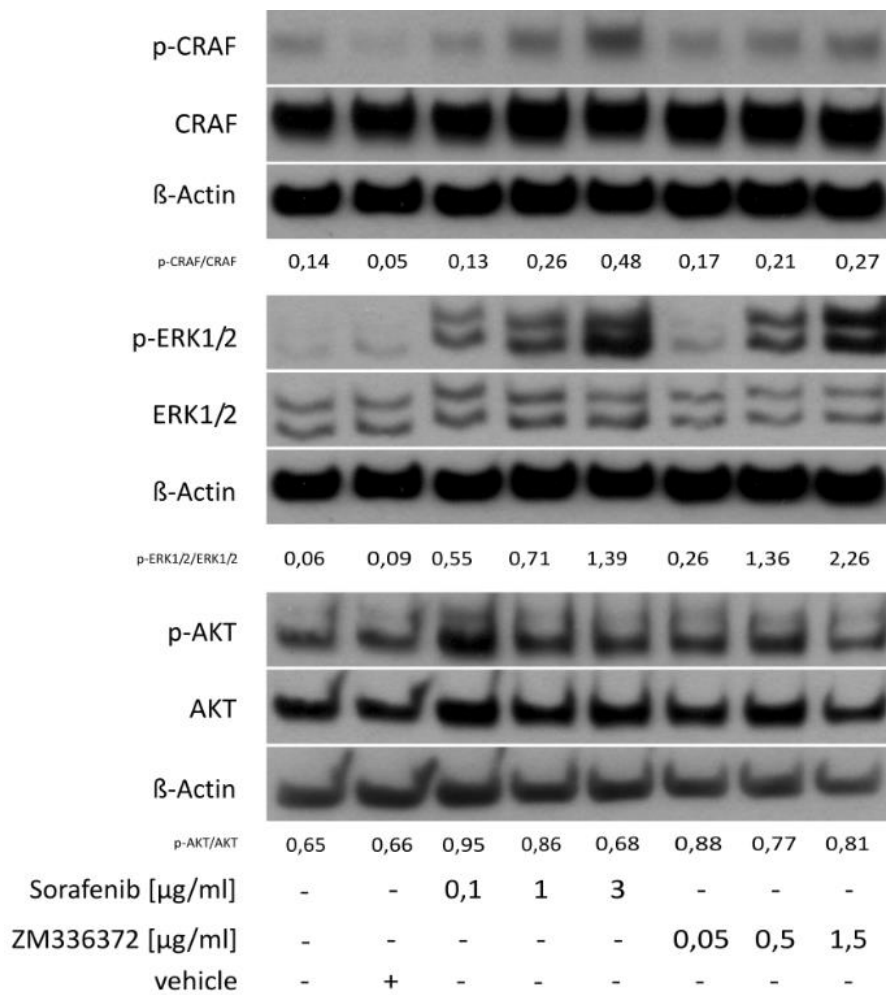


Abbildung 11) Phosphorylierung von CRAF, ERK1/2 und AKT bei Langzeitbehandlung mit Sorafenib 0,1; 1 und 3 µg/ml bzw. ZM336372 0,05; 0,5 und 1,5 µg/ml im Fütterzellsystem. Während der Expansion behandelte NK-Zellen wurden bezüglich der Phosphorylierung von CRAF, ERK1/2 und AKT analysiert (repräsentativer Blot für n= 5 unabhängige Versuche, die Reinheit an CD16/56⁺ CD3 betrug im Median 77%, Streuung von 75% bis 84%). DMSO wurde als Lösungsmittelkontrolle mitgeführt. Die relative Intensität wurde aus dem Quotienten aus der Intensität der Bande des Phosphoantikörpers und der Bande des nicht-Phosphoantikörpers bestimmt und auf β-Actin bezogen.

Langzeitbehandelte NK-Zellen im Fütterzellensystem zeigten eine dosisabhängige verstärkte Phosphorylierung von CRAF und ERK1/2. Die Unterschiede im Phosphorylierungsstatus kommen bei dem in der Signalkette weiter unterhalb gelegenen ERK1/2 deutlicher zur Geltung. Dies kann damit erklärt werden, dass phosphoryliertes ERK1/2 zu einem negativen rückwärtsgerichteten Signal (negativer Feedbackmechanismus) führt, wodurch RAF an pS338 dephosphoryliert wird. Auf AKT konnte durch die Behandlung keine signifikante Veränderung des Phosphorylierungsstatus beobachtet werden.

3.3.1.2 Bestätigung der Ergebnisse mittels hochaufgereinigter NK-Zellen

Bei der Expansion im Fütterzellensystem kommt es regelhaft zu einer ungewollten Verunreinigung der NK-Zellen durch einen geringen Anteil an mitexpandierenden T- und NK/T-Zellen. Deshalb wurden zusätzlich Western- Blot- Versuche mit hochaufgereinigten NK- Zellen als Bestätigungstest durchgeführt, um so die Validität der Blots aus Fütterzellexpansionen zu gewährleisten. Hierzu diente die Expansion mit einem KIT- System, bei dem NK-Zellen zunächst über einen MACS-Sort isoliert und anschließend per Stimulation mit MicroBeads über die Rezeptoren CD2 und CD335 (NKp46) expandiert wurden (Durchführung s. 2.6.2.2). Bei diesen Versuchen war die NK- Zell Reinheit stets über 95% (Median 98%, Streuung von 95-98% n=3). Die Medikamente in den Konzentrationen Sorafenib 1 und 3 µg/ml und ZM336372 1.5 µg/ml wurden ab Tag 1 den Expansionsansätzen zugefügt. Die Proteinextraktion erfolgte an Tag 14.

Die Bestätigungsblobs für die Langzeitbehandlung (n=3) mit hochaufgereinigten NK-Zellen mittels KIT- Expansion zeigten gleichsinnige Ergebnisse verglichen mit den Blots aus Fütterzellexpansionen. Es war eine konzentrationsabhängige Verstärkung des Phosphorylierungssignals von ERK1/2 bei unverändertem AKT- Phosphorylierungsstatus zu beobachten.

3.3.2 Der Phosphorylierungsstatus von ERK1/2 wird bereits durch Kurzzeitbehandlung beeinflusst

In den funktionellen Untersuchungen konnte bei einer kurzen Behandlungsdauer von sechs Stunden kein signifikanter Unterschied der Zytokinproduktion oder Degranulation beobachtet werden. Für die weitere Untersuchung dieser zeitabhängigen Phänomene auf funktioneller Ebene erfolgten Western Blots, bei denen die Medikamente in unten genannten Konzentrationen 4 bzw. 24 Stunden vor der Proteinextraktion den Expansionen zugefügt wurden. DMSO wurde als Lösungsmittelkontrolle mitgeführt.

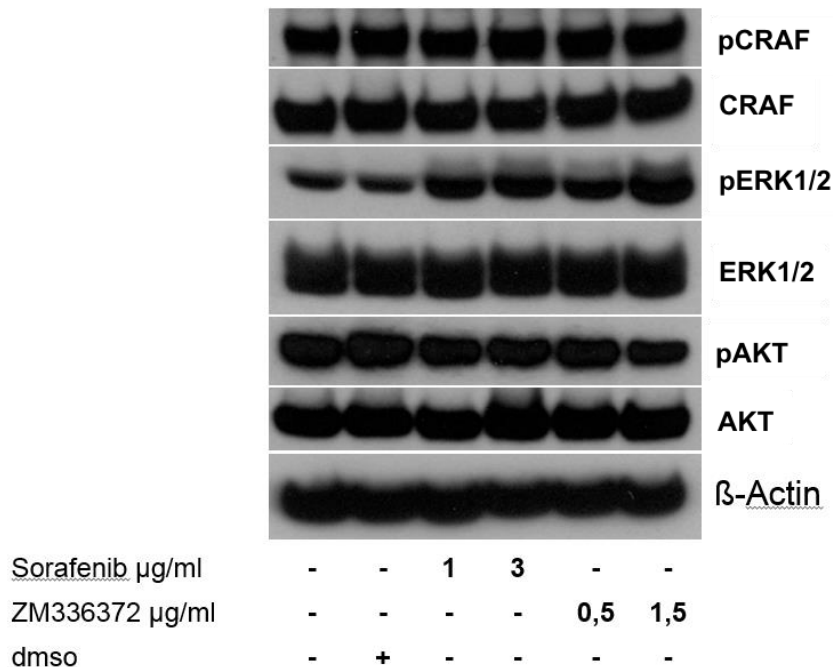


Abbildung 12) Phosphorylierungsstatus von CRAF, ERK1/2 und AKT bei 4-h Vorbehandlung

mit Sorafenib 1 und 3 $\mu\text{g/ml}$ bzw. ZM336372 0.5 und 1.5 $\mu\text{g/ml}$ im Fütterzellsystem. Dem Medium der während der Expansion unbehandelten NK- Zellen wurden vier Stunden vor der Proteinextraktion Sorafenib bzw. ZM336372 in genannten Konzentrationen zugesetzt und bei 37°C 5% CO₂ für weitere vier Stunden inkubiert. Anschließend erfolgte die Analyse bezüglich der Phosphorylierung von CRAF, ERK1/2 und AKT (repräsentativer Blot für n= 2 unabhängige Versuche).

Abbildung 12) zeigt einen repräsentativen Western Blot bei einer 4-h Vorbehandlung der NK- Zellexpansion. Es zeigten sich keine Unterschiede für phosphoryliertes CRAF. ERK1/2 zeigte bei Behandlung mit Sorafenib und ZM336372 einen erhöhten Phosphorylierungsstatus. Auf den Phosphorylierungsstatus von AKT hatte die Behandlung keinen Einfluss.

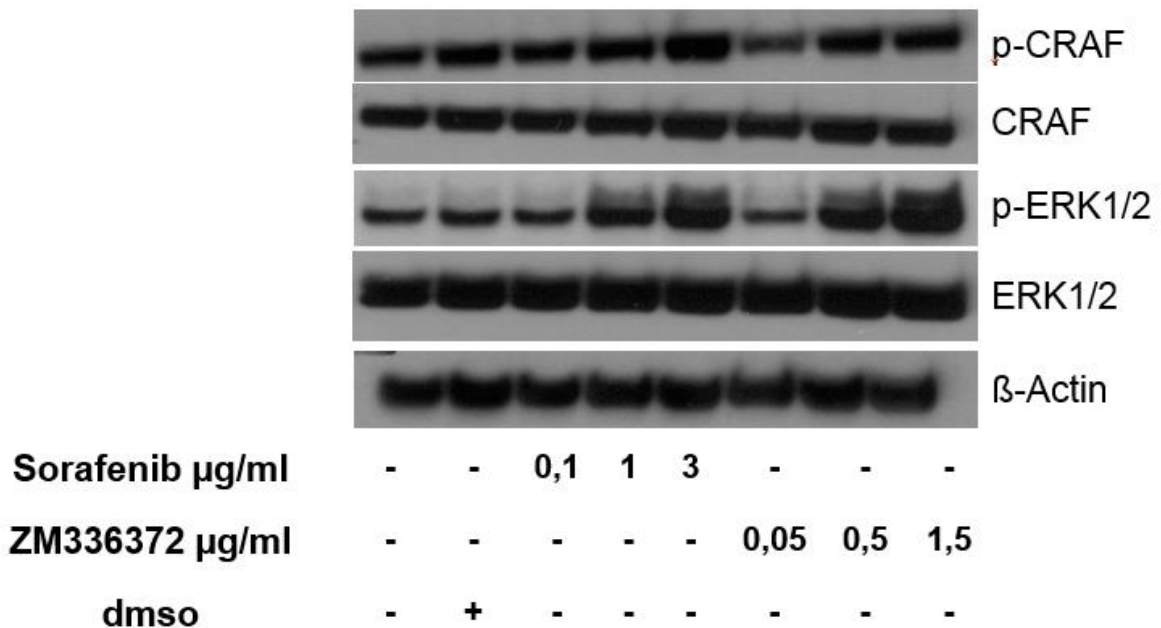


Abbildung 13) Phosphorylierung von CRAF und ERK1/2 bei 24h-Vorbehandlung mit Sorafenib 0.1; 1 und 3 µg/ml bzw. ZM336372 0.05; 0.5 und 1.5 µg/ml im Fütterzellsystem. Den während der Expansion unbehandelten NK- Zellen wurden 24 Stunden vor Proteinextraktion Sorafenib bzw. ZM336372 in genannten Konzentrationen zugesetzt. Anschließend erfolgte die Auswertung bezüglich der Phosphorylierung von CRAF und ERK1/2 (repräsentativer Blot für n= 2 unabhängige Versuche).

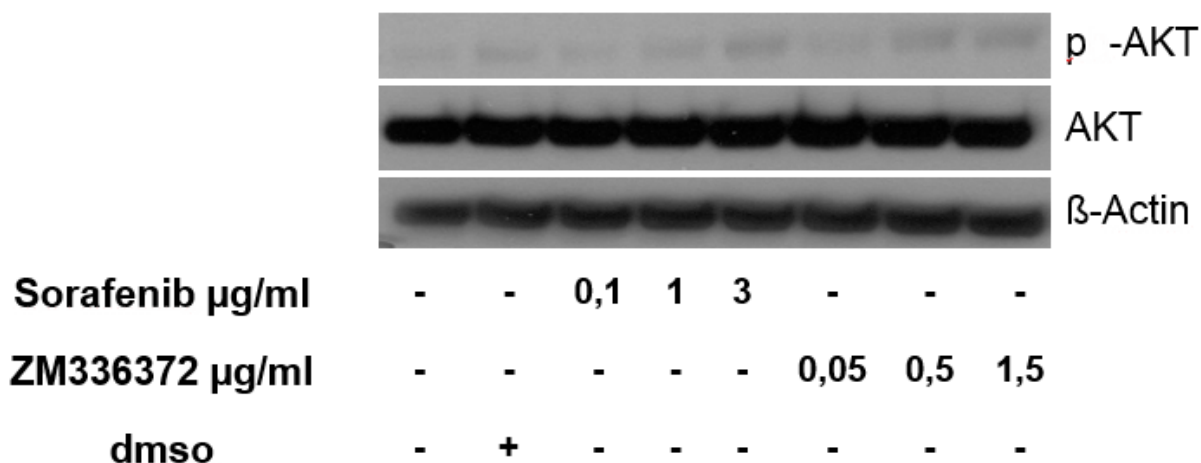


Abbildung 14) Phosphorylierung von AKT bei 24h-Vorbehandlung

mit Sorafenib 0.1; 1 und 3 μg/ml bzw. ZM336372 0.05; 0.5 und 1.5 μg/ml im Fütterzellsystem. Den während der Expansion unbehandelten NK- Zellen wurden 24 Stunden vor Proteinextraktion Sorafenib bzw. ZM336372 in genannten Konzentrationen zugesetzt. Anschließend erfolgte die Auswertung bezüglich der Phosphorylierung von AKT (repräsentativer Blot für n= 2 unabhängige Versuche).

Abbildungen 13) und 14) zeigen den Phosphorylierungsstatus von CRAF, ERK1/2 und AKT bei NK- Zellen, die für 24-Stunden mit Sorafenib bzw. ZM336372 vorbehandelt wurden. Entsprechend der 4h- Vorbehandlung konnten Signalunterschiede für phosphoryliertes ERK1/2 beobachtet werden. Weder CRAF noch AKT wiesen signifikante Phosphorylierungsunterschiede auf.

Während die Kurzzeitbehandlung in den funktionellen Experimenten noch zu keinen Veränderungen der Effektorfunktionen führte, konnten auf molekularer Ebene bereits bei einer Behandlungsdauer von vier Stunden ein erhöhtes pERK1/2 Niveau detektiert werden. Nach 24h- Vorbehandlung erschienen diese Effekte nochmals verstärkt. Behandelte man die Zellen über den gesamten Expansionszeitraum waren die Effekte maximal und zeigten auch bei CRAF Unterschiede im Phosphorylierungsmuster. Die Behandlung führte bei AKT zu keiner Veränderung des Phosphorylierungsstatus. Höhere Medikamentenkonzentrationen führten zu verstärkter CRAF und ERK1/2 Phosphorylierung. Die Dosisabhängigkeit korreliert zusätzlich mit den funktionellen Ergebnissen. Dies weist darauf hin, dass Sorafenib und der spezifische CRAF-

Inhibitor ZM336372 die Zellaktivität zeit- und dosisabhängig CRAF-ERK1/2- vermittelt modulieren können.

3.3.3 Effekte bei Stimulation mit Zielzellen

Für die weitere Analyse erfolgte eine Stimulation der langzeitbehandelten NK- Zellen mit K562- und Daudi- Targetzellen. Die NK-Zellen wurden zusammen mit den PFA (4%)-fixierten K562- oder Daudi-Zellen auf Eis synchronisiert und anschließend für 5 min bei 37°C stimuliert.

Bei den K562- stimulierten NK- Zellen zeigte sich unter der Sorafenibbehandlung ein erhöhtes pCRAF und pERK1/2 bei unverändertem AKT. Die Behandlung mit ZM336372 zeigte bei K562- stimulierten NK- Zellen ein leicht erhöhtes Signal bei pCRAF, eine deutliche Signalanhebung bei ERK1/2 und auch eine verstärkte AKT Phosphorylierung. Bei Stimulation mit Daudi- Zellen zeigte die Behandlung mit Sorafenib ein dosisabhängig verstärktes Phosphorylierungsmuster bei CRAF und ERK, auf AKT waren keine Effekte nachweisbar. Unerwarteterweise schien die Behandlung mit dem spezifischen CRAF- Inhibitor ZM336372 bei Stimulation mit Daudi- Zellen im Vergleich zu unbehandelten Daudi- stimulierten NK- Zellen keine Auswirkung auf den Phosphorylierungsstatus von weder CRAF und ERK1/2 noch AKT zu haben. Diese Ergebnisse wurden auch mittels hochaufgereinigter NK- Zellen mittels KIT- Expansion bestätigt.

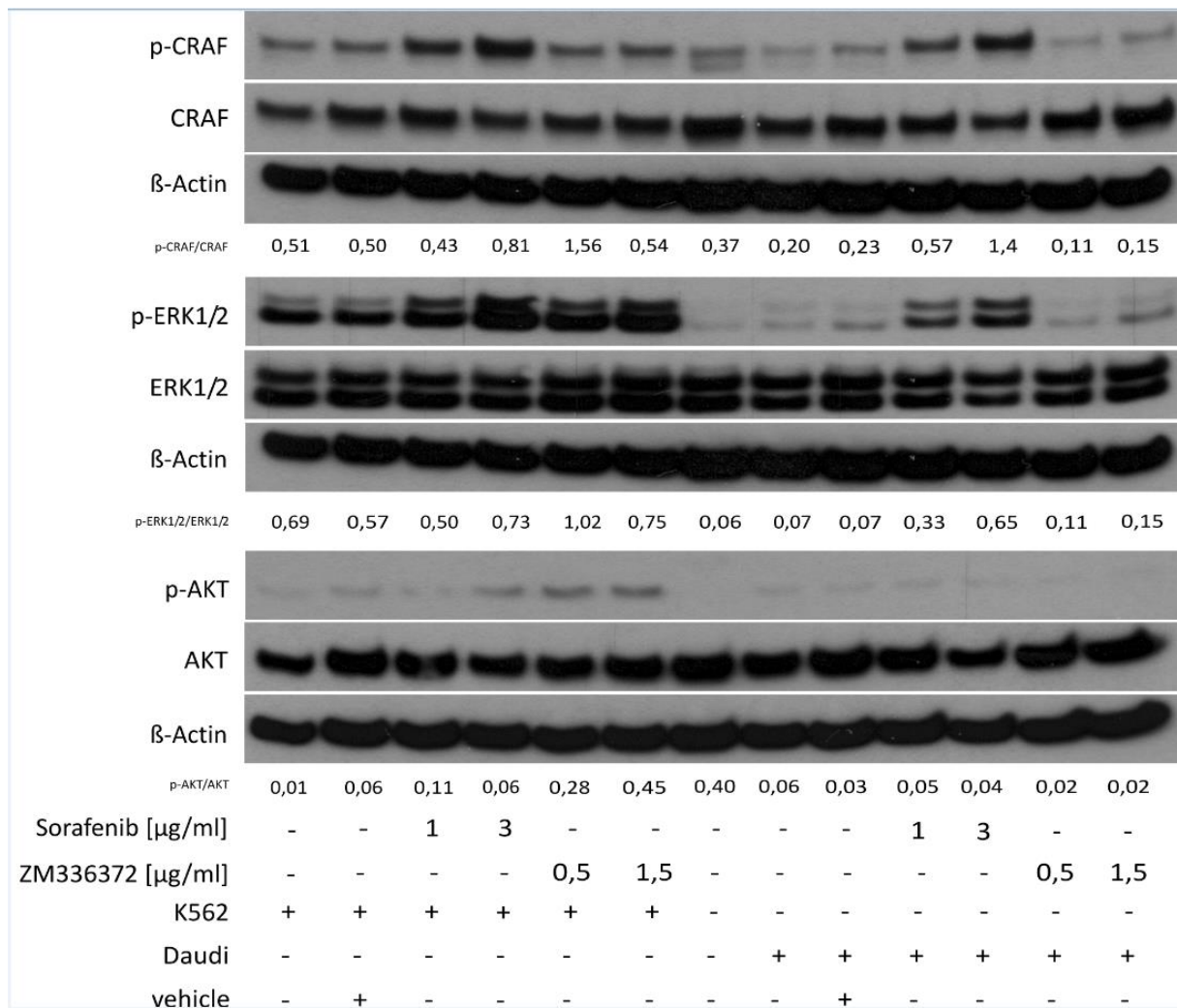


Abbildung 15) Phosphorylierungsmuster von CRAF, ERK1/2 und AKT bei langzeitbehandelten NK- Zellen nach Targetzellstimulation mit K562- bzw. Daudi-Zellen. Die während der Expansion mit Sorafenib bzw. ZM336372 behandelten NK-Zellen wurden vor der Proteinextraktion für fünf Minuten mit PFA(4%)- fixierten K562 bzw. Daudi- Zellen stimuliert (repräsentatives Beispiel für n=3 unabhängige Experimente).

3.4 Kombination der Signalblockade mit CRAF- und MEK1/2- Inhibitor

Zur weiteren Überprüfung der Hypothese, dass die beobachteten Effekte CRAF vermittelt waren, wurden in einem weiteren Schritt die Effekte einer kombinierten Blockade von CRAF und MEK1/2 durchgeführt. Die Hypothese: Sollten die beobachteten Effekte über eine paradoxe Aktivierung von CRAF im MAPK/ERK Signaltransduktionsweg vermittelt sein müsste eine vollständige Inhibition von MEK1/2, welches im Signalweg RAF nach- aber ERK1/2 vorgeschaltet ist die paradoxen Effekte aufheben können. Als CRAF- Inhibitoren dienten hierzu Sorafenib und der spezifische CRAF- Inhibitor ZM336372. Für die MEK Blockade wurde PD0325901 (Pfizer) benutzt. PD0325901 ist ein MEK1/2 Inhibitor der zweiten Generation mit einem IC_{50} Wert von 1 nM bezogen auf reines MEK1/2.

Zur Untersuchung der Effekte der kombinierten Blockade auf NK- Zellen wurde zunächst die geringste PD0325901 Konzentration ermittelt, die zu spezifischen inhibitorischen Effekten auf die NK-Zell-Signaltransduktion führte. Hierbei zeigte sich im Western Blot bei 100 nM PD0325901 und 30 minütiger Behandlungsdauer eine vollständige ERK1/2 Inhibition.

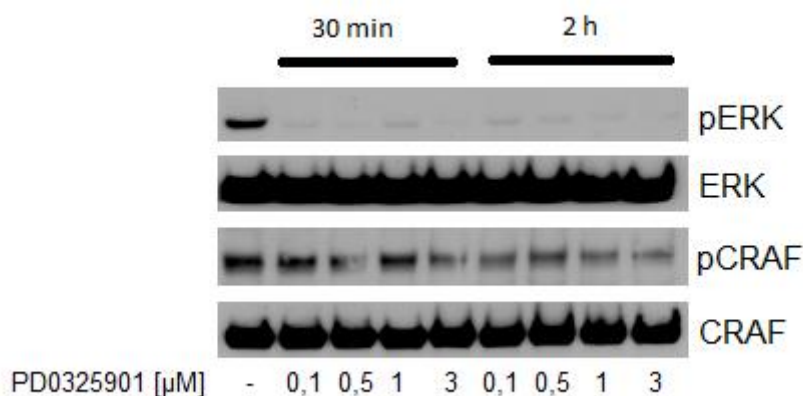


Abbildung 16) ERK1/2 Phosphorylierungstatus in unbehandelten expandierten NK- Zellen nach MEK Inhibition mit PD0325901. Die unbehandelten NK- Zellen wurden vor Proteinextraktion über 30 bzw. 120 min mit dem MEK Inhibitor bei 37°C inkubiert.

Bei 30 minütiger Inkubation mit 100 nM PD0325901 war ERK1/2 vollständig inhibiert. Für die folgenden funktionellen Assays wurde eine 30 minütige Inkubation mit 100 nM

verwendet. Es wurden durchflusszytometrisch die IFN γ /TNF α -Produktion und der Degranulationsmarker CD107a bestimmt. Die NK-Zellen wurden während der Expansion mit Sorafenib 1 μ g/ml und 3 μ g/ml sowie ZM336372 0,5 μ g/ml und 1,5 μ g/ml behandelt. 30 Minuten vor Beginn des Assays erfolgte eine zusätzliche MEK1/2-Blockade mit PD0325901 bei 37°C und 5% CO $_2$. Eine Stimulation mit den Zielzellen K562 und Daudi erfolgte anschließend für 5 Min. bei 37°C im Wasserbad (n=3). Unter der Behandlung mit dem spezifischen CRAF-Inhibitor ZM336372 über den Zeitraum der Expansion und PD0325901 über 30min konnte keine signifikanten Änderungen in Zytokin- oder Degranulationsversuchen beobachtet werden. Die Behandlung mit dem unspezifischen Multityrosinkinaseinhibitor Sorafenib und MEK1/2 Blockade führte jedoch zu einem signifikanten Verlust der Viabilität der Zellen, sodass eine Auswertung nicht möglich war. Dies könnte auf eine erhöhte Toxizität bei effektiver MAPK/ERK Doppelblockade und Inhibition möglicher Auweichsignalwege durch den Multityrosinkinaseinhibitor Sorafenib vermittelt sein. Eine Doppelblockade von RAF und MEK wird bereits klinisch eingesetzt und zeigt eine erhöhte antitumoröse Effektivität (Hu-Lieskovan 2015).

4 Diskussion

Mit dem immer besser werdenden Verständnis für die Bedeutung von NK-Zellen in der Tumorkontrolle stieg das Interesse an NK-Zell-basierten immuntherapeutischen Ansätzen. Darunter auch die NK-Zell-basierte Immuntherapie. Allerdings führten solche NK-Zell-basierten Immuntherapieansätze bisher nur zu unbefriedigenden Ergebnissen, sodass die Erprobung von Adjuvantien wie z.B. Tyrosinkinaseinhibitoren eine wichtige Weiterentwicklung darstellen könnte. In unserem Labor konnte Julia Dotterweich zeigen, dass eine Vorbehandlung primärer NK-Zellen durch den Tyrosinkinaseinhibitor Sorafenib im Gegensatz zu Sunitinib zu einer verstärkten Tumorlyse durch NK-Zellen auf ausgewählte maligne Zelllinien führte. Da Sorafenib im Gegensatz zu Sunitinib RAF inhibitiert, untersuchte ich in meiner Dissertation die Hypothese, dass CRAF die entscheidene Zielstruktur für die Vermittlung der Sorafenib-Effekte war. Hierfür wurden die Effekte von Sorafenib auf zunächst funktioneller Ebene und anschließend Signaltransduktionsebene mit einem

spezifischen CRAF Inhibitor verglichen. Durch Aufklärung der Mechanismen dieser scheinbar paradoxen CRAF Aktivierung sollte eine Grundlage für die Entwicklung eines rationalen Konzepts zum möglichen Einsatz von Sorafenib als Adjuvans in der NK- Zell-basierten Immuntherapie geschaffen werden. In der folgenden Diskussion werden die neuen Erkenntnisse der Sorafenib-induzierten paradoxen Aktivierung in NK- Zellen erläutert und schließlich auf eine klinisch relevante Komplikation von Tyrosinkinaseinhibitoren die CRAF als Zielstruktur besitzen, hingewiesen.

4.1 Sorafenib führt in NK-Zellen zu einer CRAF/ERK1/2 vermittelten, behandlungszeit- und dosisabhängigen Aktivierung

Paradoxerweise führte der Tyrosinkinaseinhibitor Sorafenib sowie der spezifische CRAF Inhibitor ZM336372 bei einer Langzeitbehandlung während der Expansion zu einer erhöhten Zytokinproduktion und Degranulation. Diese Aktivierung war dosisabhängig und trat nicht bei einer Kurzzeitbehandlung von 6 Stunden auf. Die Stimulation mit K562 Zellen führte zu einer nochmals signifikant erhöhten Zytokinproduktion und zu einer gleichsinnig -allerdings nicht signifikant- erhöhten Degranulation. Die Stimulation mit Daudi Zellen erhöhte die Zytokinproduktion, aber nicht- signifikant die Degranulation. Zum weiteren Verständnis könnten Experimente mit Behandlungspausen („drug holiday“) zum Einsatz kommen. Somit könnte die Reversibilität sowie ggf. die mögliche erneute Stimulation durch Medikamentenbehandlung geprüft werden. Die Behandlung mit Sunitinib zeigte keine aktivierenden Effekte auf polyklonal expandierte NK-Zellen. Der Hauptunterschied hinsichtlich der Zielyrosinkinasen von Sorafenib und Sunitinib stellt RAF dar. Basierend auf diesem Wissen erfolgten Western-Blot Versuche fokussierend auf den RAF-Signaltransduktionweg. Sowohl mit Sorafenib als auch mit dem spezifischen CRAF-Inhibitor ZM336372 behandelte NK-Zell-Proteinextrakte wiesen im Western-Blot ähnliche Phosphorylierungsmuster auf. Hierbei ist zu anzu merken, dass in dieser Arbeit nur CRAF untersucht wurde, zusätzliche Versuche mit getrennter Analyse der Phosphorylierung von BRAF und CRAF zur genaueren Beurteilung der Signalweiterleitung erscheinen sinnvoll. Bei den Behandlungen mit Sorafenib und ZM336372, die zu einer Erhöhung der Aktivität auf funktioneller Ebene führten, ließ sich gleichzeitig eine verstärkte Phosphorylierung von CRAF und ERK1/2 erkennen.

Es fiel auf, dass die Signale auf der ERK1/2 Ebene deutlich stärker ausgeprägt waren. Als Erklärungsmodell könnte hier ein negativer Feedbackmechanismus in RAF-Wildtyp-Zellen dienen: aufgrund der medikamenteninduzierten Daueraktivierung kommt es zu einer regulierenden rückwärtsgerichteten Hemmung von RAF. Dieser physiologische Rückkopplungsmechanismus ist bei Tumoren mit BRAF^{V600E} Mutation gestört (Lito 2012). Bei den Konzentrationen Sorafenib 5 µg/ml und ZM336372 3,75 µg/ml kam es zu toxischen Effekten, die eine Expansion verhinderten (s. Abb. 3 und 4). Weder bei Sorafenib noch bei ZM336372 konnten signifikante Effekte auf das Phosphorylierungsniveau von AKT detektiert werden. Zur weiteren Evaluation dieses alternativen Signalwegs wäre die Untersuchung von weiteren Zielen des PI3K-abhängigen AKT/mTOR Signaltransduktionsweg notwendig (z.B. pAMPK, pmTORc1/2). Im Western-Blot waren keine signifikanten Phosphorylierungsunterschiede von AKT erkennbar. Allerdings wurden, wie bereits erwähnt, in dieser Dissertation nur drei gezielt ausgewählte Phosphorylierungsstellen untersucht. Für eine höhere Aussagekraft könnten massenspektrometrische Versuche mit Erstellung eines Phosphoproteoms und Vergleich aller Phosphorylierungsstellen in unbehandelten und behandelten Zellen dienen.

Bei einer kombinierten Blockade von CRAF mit Sorafenib bzw. ZM336372 und MEK mit dem spezifischen MEK Inhibitor PD0325901 kam es durch am ehesten toxische Effekte nicht zu konklusiven Ergebnissen. Weitere Versuche mit Optimierung des Versuchsaufbaus sind hier notwendig. Auch in diesem Rahmen könnten Versuche mit Erstellung des Proteoms/ Phosphoproteoms die Signalweiterleitung und im Besonderen alternative Signalwege unter Inhibitorbehandlung offenbaren.

Für den spezifischen CRAF Inhibitor wurde eine paradoxe Aktivierung bereits 1999 publiziert (Hall- Jackson 1999). In der jüngeren Vergangenheit konnten solche Effekte auch bei einigen Tumorzelllinien entdeckt werden. Hierbei zeigte sich, dass RAF-Inhibitoren auf Zellen mit BRAF^{V600E} Mutation inhibitorisch und auf Zellen mit Wildtyp-RAF paradox aktivierend wirken (Hatzivasilliou 2010). Dies konnte ich erstmals für ein humanes in vitro NK Zell System nachweisen.

4.2 Erklärungsmodell: Transaktivierung von RAF-Dimeren und ERK-Signaltransduktion in Zellen mit Wildtyp BRAF

Als Erklärungsansatz auf molekularer Ebene kann hier die Arbeit von Poulikakos et al. helfen. Zum leichteren Verständnis dieser Arbeit ist es wichtig, das Prinzip des MAPK-Signalwegs in Wildtyp und in BRAF^{V600E} mutierten Zellen zu unterscheiden.

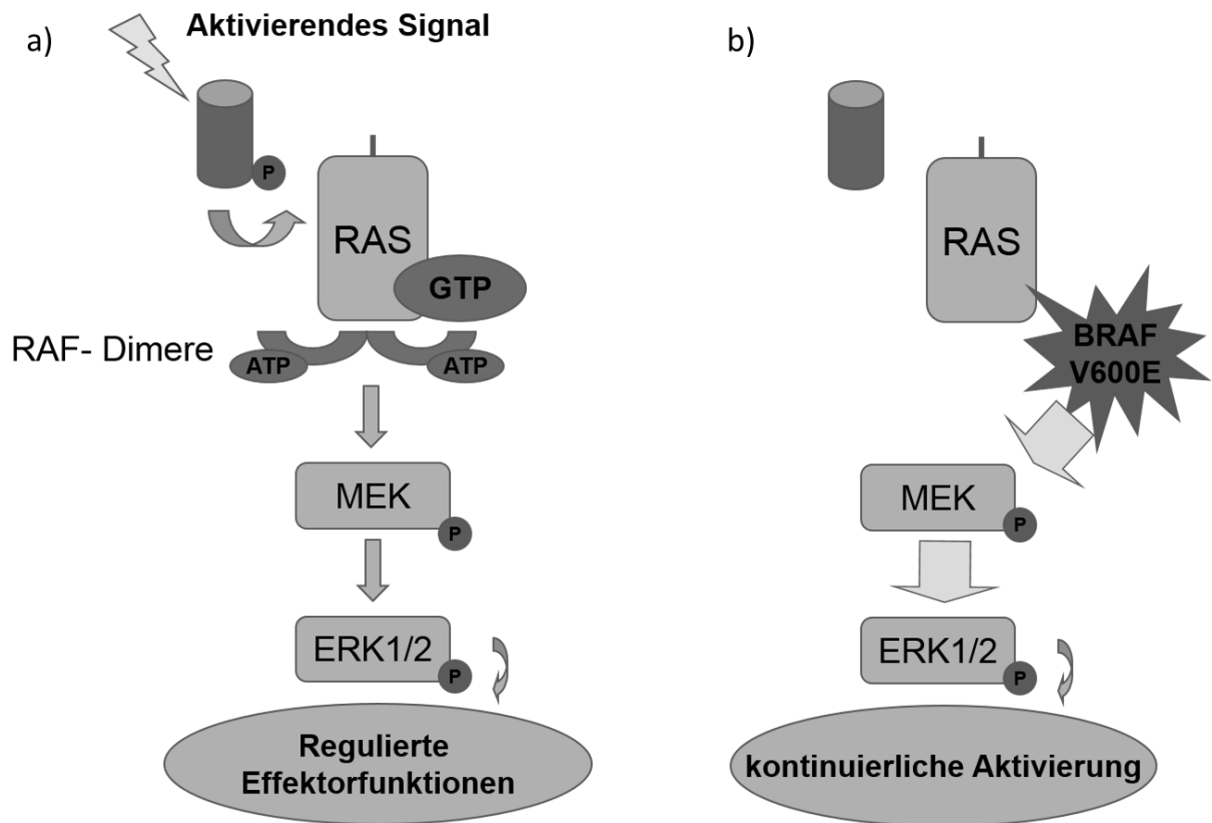


Abbildung 17) Vereinfachtes Schema der intrazellulären Signaltransduktion über den MAPK- Signalweg unter physiologischen Bedingungen (a) und bei BRAF^{V600E}-Mutation (b). Details siehe Text. Modifiziert nach Nichols und Arceci, 2010.

In Abb. 17a ist vereinfacht der regelhafte Ablauf des MAPK- Signaltransduktionswegs in einer nicht mutierten Zelle dargestellt. Über membrangebundene Rezeptoren wird ein aktivierendes Signal weitergeleitet. RAS bindet GTP, wird somit aktiviert und induziert eine Dimerisierung von RAF. Hierbei können RAF- Homodimere (CRAF/CRAF) oder RAF Heterodimere (CRAF/BRAF) entstehen. Über weitere Phosphorylierungsschritte wird das Signal über MEK und ERK1/2 weitergeleitet und

die Effektorfunktionen reguliert. Vergleicht man dieses Schema mit der Signaltransduktion in BRAF^{V600E} mutierten Zellen (Abb. 17b), lassen sich entscheidende Unterschiede feststellen. Für die Aktivierung ist kein physiologisches Signal ausschlaggebend. RAS ist nicht aktiviert. Es kommt somit zu keiner RAS-induzierten Dimerbildung, das Signal wird über das mutierte und konstitutiv aktive BRAF weitergeleitet (Nichols 2010). Bereits 2006 wurde vermutet, dass über BRAF Mutationen die Sensitivität für eine erfolgreiche MEK Inhibition vorhergesagt werden könne (Solit 2006).

Zum weiteren Verständnis kann nun die Arbeit von Poulikakos et al (Poulikakos 2010) herangezogen werden: Während der Behandlung mit ATP kompetitiven RAF-Inhibitoren wie Sorafenib kommt es zu einer Interaktion des Medikaments mit den RAF Monomeren. Der Tyrosinkinaseinhibitor bindet kompetitiv an der ATP-Bindungsstelle (katalytische Domäne) eines RAF-Monomers.

Wildtyp RAF: In Zellen mit Wildtyp RAF liegen im aktiven Zustand CRAF/CRAF- bzw. CRAF/BRAF- Dimere vor (vgl. Abb.20a). Sorafenib bindet an die ATP Bindungsstelle der katalytischen Domäne eines RAF Monomers und inhibiert dieses, transaktiviert dabei aber den Promotor des zweiten RAF- Monomers und führt zu dessen konstitutiver Aktivierung (Abb. 20a). Während Sorafenib also die ATP-Bindungsstelle des einen RAF- Monomers und die Signalweiterleitung hierüber inhibiert, kommt es über die aktivierende Schleife des zweiten RAF- Monomers zu einer verstärkten Signalweiterleitung. Dieses Phänomen kann nur bei RAF- Dimerbildung, also bei aktiviertem RAS, erfolgen (Poulikakos 2010).

BRAF^{V600E}: In BRAF^{V600E} mutierten Zellen läuft der Signalweg über das mutierte BRAF- Monomer ab. RAS ist nicht aktiviert, deswegen kommt es zu keiner Dimerbildung. In diesen Zellen inhibiert Sorafenib die katalytische Aktivität des konstitutiv aktivierten RAF- Monomers und führt somit zu einer tatsächlichen Inhibition da keine Transaktivierung erfolgen kann. In Zellen mit kombinierter RAS und BRAF^{V600E} Mutation ist RAS jedoch wieder aktiviert. Es kommt zur Dimerisierung und zu einer möglichen Medikamentenresistenz der Tumorzellen auf Sorafenib (Poulikakos 2010).

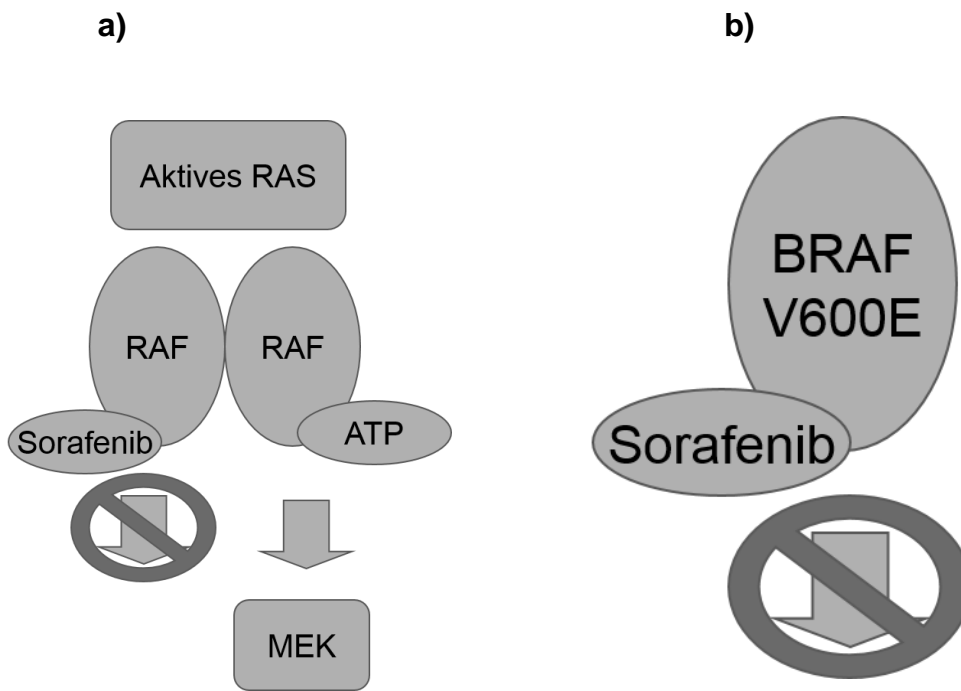


Abbildung 18) Vereinfachtes Schema der Wirkung von Sorafenib auf die Signalweiterleitung in Zellen mit Wildtyp RAF (a) und Zellen mit BRAF^{V600E} Mutation. In Zellen mit wild type RAF kommt es über das aktivierte GTP-RAS zu einer CRAF/CRAF- bzw. CRAF/BRAF- Dimerbildung. Sorafenib kann die Bindungsstelle des einen RAF- Monomers blockieren, dabei kommt es aber zu einer Transaktivierung mit konsekutiv dauerhafter Aktivierung der aktivierenden Schleife des zweiten RAF- Monomers (siehe auch Abb3). Sorafenib führt zu einer Aktivierung des Signalwegs (a). Wird die Sorafenibkonzentration weiter erhöht, kann auch die zweite ATP-Bindungsstelle durch Sorafenib im Sinne einer kompetitiven Hemmung blockiert und die Signalweiterleitung gehemmt werden. In Zellen mit BRAF^{V600E} Mutation ohne RAS-Mutation ist RAS nicht aktiviert. Es kommt zu keiner RAF- Dimerisierung. Sorafenib wirkt inhibitorisch auf die RAF- Monomere und es kommt zu einer Signalinhibition (b). Modifiziert nach Poulidakos, 2010 und Holderfield 2014.

Mit diesem Modell können die Ergebnisse dieser Dissertationsarbeit plausibel erklärt werden. Da menschliche NK-Zellen gesunder Blutspender für die Zwecke verwendet wurden, ist davon auszugehen, dass diese den RAF Wildtyp aufgewiesen haben. Hier

konnte Sorafenib über die Transaktivierung zu einer RAF- vermittelten Verstärkung der Effektorfunktionen führen. Höhere Sorafenibkonzentrationen führen wiederum zu einer Proliferationsinhibition. Durch kompetitive Hemmung sind die aktivierenden Schleifen beider RAF Monomere blockiert, die Signalweiterleitung ist blockiert und die proliferationsfördernden Signale werden nicht weitergeleitet. (Holderfield 2014). In meinen Versuchen konnte ich zeigen, dass eine Sorafenibkonzentration zwischen 1 und 3 µg/ml eine zuverlässige Expansionsfähigkeit der NK- Zellen zulässt und die Zytokinproduktion relevant erhöht.

4.3 Klinische Relevanz: Sorafenib als Adjuvans in der NK-Zell-basierten Immuntherapie

Die Ergebnisse dieser Arbeit geben einen Hinweis darauf, dass Sorafenib bzw CRAF-Inhibitoren wie ZM336372 bei Langzeitbehandlung in einem eingeschränkten Dosisbereich ex vivo expandierte NK-Zellen aktivieren können. Wichtig hierbei scheint eine längerfristige Anwendung in niedrigen Dosierungen zu sein, um die medikamenteninduzierte Erhöhung der Zytokinproduktion und Degranulation zu maximieren ohne eine Apoptoseinduktion zu vermitteln. Bei abweichenden Versuchsbedingungen (z.B. höhere Sorafenibkonzentration, kurze Vorbehandlung) konnten diese Effekte nicht bzw. inhibierende Effekte beobachtet werden (Krusch 2009). Diese Aussage kann allerdings natürlich nicht direkt auf die klinische in vivo Situation übertragen werden. Hier ist die Regulation durch Interaktion mit Immunzellen, körpereigenen Strukturen und ggf. Veränderungen durch maligne Entartung deutlich komplexer. Bei Stimulation mit K562 oder Daudi-Zielzellen zeigte sich bereits ein deutlich verändertes Phosphorylierungsmuster von CRAF, ERK1/2 und AKT, sodass diese Aussagen nur in den durch unseren Versuchsaufbau eingeschränkten Grenzen Gültigkeit besitzt. Derzeit existieren diverse Ansätze der NK- Zell-basierten Immuntherapie. Zum einen wurden Versuche mit autologer in- vivo Expansion mit IL-2 Stimulation unternommen (Atkins 2000). Andere Versuche basierten auf der ex vivo Expansion und Aktivierung mit IL-2 und anschließender Retransfusion (Krause 2004). Bei beiden Settings waren die Ergebnisse unbefriedigend, da unter IL- 2 Therapie eine hohe Zytotoxizität (Ma 2014) und Rekrutierung regulatorischer T- Zellen (Ralainirina 2007) beobachtet wurde, die die NK-Zellwirkung negativ beeinflussten.

Meine Ergebnisse deuten darauf hin, dass gerade in Hinblick auf die Methode der ex-vivo Expansion mit Aktivierung der NK-Zellen durch Sorafenib bzw. einen spezifischen CRAF-Inhibitor eine potente Alternative zu Interleukin-2 darstellen könnte. Die gute Steuerbarkeit der benötigten Medikamentenkonzentrationen über den Expansionszeitraum ohne zytotoxische Nebeneffekte in Kombination mit den immer besser werdenden Expansionstechniken (Lapteva 2014) könnte eine Weiterentwicklung dieser Methode darstellen. Ein spezifischer CRAF Inhibitor könnte hier ungewünschte Interaktionen mit anderen Kinasen und proliferationshemmenden Effekten, wie sie unter Sorafenibbehandlung zu erwarten sind, minimieren. Die Behandlung mit ZM336372 zeigte eine höhere Proliferationsrate als die Behandlung mit Sorafenib 3µg/ml bei vergleichbaren Effekten auf Zytokinproduktion und Degranulation. Natürlich muss bei diesem Ansatz die klinische Relevanz überprüft werden. Ein nächster Schritt könnte in der Etablierung eines Mausmodells bestehen, in dem die Effekte nicht stimulierter und stimulierter NK-Zellen auf tumorinfizierte Mäuse verglichen wird. Es konnte beobachtet werden, dass NK- Zellen, die ex vivo eine hohe Zytotoxizität aufwiesen, in vivo rasch an Effizienz verloren. Als möglicher Mechanismus ist hier die MHC-I Interaktion in vivo zu nennen (Eguizabal 2014).

Ein weiterer theoretischer Ansatz könnte in der Gabe von Sorafenib als Adjuvans nach Stammzelltransplantation bei Patienten mit FLT3 ITD positiver AML bestehen. Diese Überlegung ist rein hypothetischer Natur, eine Überprüfung der Effektivität, Sicherheit und Übertragbarkeit der Ergebnisse müsste vorher in komplexeren Modellen sowie Mausversuchen überprüft werden. Es wurde bereits in mehreren klinischen Studien nachgewiesen, dass Patienten mit akuter Leukämie von einer Stammzelltransplantation mit haploidentischem KIR- ligand- mismatch profitieren. Gerade bei Patienten mit einer hochrisiko AML führte dies zu einem signifikanten Überlebensvorteil (Ruggeri 1999, Willemze 2009). Da NK-Zellen in dieser Phase eine sehr wichtige Funktion übernehmen, wäre der Einsatz einer niedrigen Sorafenibkonzentration nach haploidentischer T- cell depleted KIR- ligand- mismatched Stammzelltransplantation zur zusätzlichen Stimulation und Aktivierung der NK- Zellen zu diskutieren. Sorafenib wirkt zusätzlich inhibierend auf die FLT3 ITD Mutation, die eine Hochrisikomutation darstellt und wird bereits klinisch in dieser Situation eingesetzt. Zusätzliche Hinweise für die klinische Relevanz dieser Überlegung lieferte eine 2016 publizierte klinische Studie: eine retrospektive Analyse von Patienten mit FLT3 ITD positiver AML nach allogener Stammzelltransplantation

zeigte ein signifikant längeres Gesamtüberleben für Patienten die nach Stammzelltransplantation eine Sorafenib Erhaltungstherapie erhielten (Brunner 2016). Die Studie war retrospektiver Natur und die Kohorte an Patienten mit Sorafenib Erhaltungstherapie mit 26 Patienten klein, sodass auch hier weitere Validierung erfolgen müsste. Unter Studienbedingungen wurden bereits präventive NK-Zell-basierte Immuntherapien nach haploidentischer Stammzelltransplantation unternommen (Stern 2013), auch in diesem Setting könnten CRAF- Inhibitoren als Adjuvans fungieren.

4.4 Klinische Relevanz: Sorafenib bei Tumoren ohne BRAF^{V600E} Mutation

Während bei dem Einsatz von Sorafenib als Adjuvans in der NK- Zell- basierten Immuntherapie die Aktivierung und Proliferation der Zellen erwünscht ist, ist bei dem Einsatz von Sorafenib in der Tumortherapie solider Tumore das Gegenteil der Fall. Denn auch auf Tumorzellen ohne BRAF^{V600E}- Mutation bzw. mit kombinierter RAS- Mutation kann Sorafenib ein aktivierendes und proliferationsförderndes Potential besitzen und somit den Krankheitsverlauf negativ beeinflussen (Robubi 2010). In vitro konnten solche proliferationsfördernde Effekte in malignen Melanom-, Lungenkarzinom- und Colonkarzinomzelllinien gezeigt werden (Hatzivassiliou 2010). Auch in klinischen Studien gibt es Hinweise auf einen möglichen negativen Einfluss von Tyrosinkinaseinhibitoren auf Patienten mit Wildtyp RAF oder RAS- Mutationen (Holderfield 2014). Besonders bei den neuentwickelten BRAF Inhibitoren Vemurafenib und Dabrafenib, bei denen ebenfalls ähnliche paradoxe RAF-vermittelte Effekte beschrieben wurden, konnte das Entstehen von kutanen squamösen Zellkarzinomen (cSCC) und Keratoakanthomen beobachtet werden (Oberholzer 2012). Seltener kam es zur Neuentstehung von primären malignen Melanomen. Diese Vorgänge könnten Ausdruck der paradoxen Wirkung der Medikamente mit erhöhtem Karzinogeneserisiko in Wildtyp BRAF Zellen sein (Dalle 2011, Zimmer 2012). Es gibt Hinweise, dass vorbestehende RAS-Mutationen in diesen Zellen zur BRAF-Inhibitor induzierten Karzinomentstehung beitragen (Oberholzer 2012). Diesbezüglich wird der kombinierte Einsatz von BRAF Inhibitoren in Kombination mit MEK- Inhibitoren getestet (Long 2014).

5 Zusammenfassung

Ein möglicher Ansatz zur Weiterentwicklung und Effektivitätssteigerung NK-Zell basierter Immuntherapie besteht in der medikamentösen Stimulation und somit der direkten Aktivierung von NK-Zell-Effektorfunktionen. In dieser Arbeit konnte erstmals eine Aktivierung von polyklonal expandierten NK-Zellen durch Sorafenib und den spezifischen CRAF-Inhibitor ZM336372 gezeigt werden. Während Sorafenib in klinisch relevanten Konzentrationen eine inhibitorische und antiproliferative Wirkung aufweist, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass NK-Zellen, die während einer Expansionszeit von 7 bis 12 Tagen mit einer niedrigeren Konzentration Sorafenib (1.0 µg/ml, 3µg/ml) oder ZM336372 (0.5 µg/ml 1.5 µg/ml) behandelt wurden, paradoxerweise eine erhöhte Zytokinproduktion und Degranulation durch MAPK/ERK Signaltransduktionsweg-Aktivierung aufwiesen. Die Effekte waren zeit- und dosisabhängig: 3,0 µg/ml Sorafenib führte zu einer stärkeren Erhöhung als 1,0 µg/ml Sorafenib. Diese Effekte konnten durch Zielzellkontakt mit K562 und Daudi-Zellen nochmals verstärkt werden. Eine Steigerung der Dosis über 3,0µg/ml Sorafenib oder 3.75 µg/ml ZM336372 führte jedoch zu toxischen Effekten mit Erhöhung der Apoptose- / Nekroserate und Proliferationshemmung. Bei einer kürzeren Behandlungszeit von 6 Stunden konnten keine Unterschiede auf funktioneller Ebene festgestellt werden. Auch die Behandlung der NK-Zellen mit dem spezifischen CRAF-Inhibitor ZM336372 (0,5µg/ml, 1,5µg/ml) führte zu gleichsinnigen funktionellen Ergebnissen. Dies deutete bereits darauf hin, dass dem MAPK-Signaltransduktionsweg über RAF-MEK-ERK eine übergeordnete Rolle in der Entstehung dieser Effekte zukommt. Auf molekularer Ebene zeigte sich eine dosisabhängige Erhöhung der Phosphorylierung von CRAF und ERK1/2, sowohl bei Sorafenib als auch bei ZM336372. Nach einer Behandlungszeit von 6 Stunden konnte bereits ein erhöhtes Phosphorylierungsniveau von ERK1/2 detektiert werden, zu diesem Zeitpunkt waren auf funktioneller Ebene noch keine Unterschiede feststellbar. Bei Langzeitbehandlung war eine dosisabhängig verstärkte Phosphorylierung von ERK1/2 erkennbar. Zur Evaluation der Einflüsse auf den AKT/mTor Signaltransduktionsweg sind weitere Versuche notwendig. Die Analyse des Phosphorylierungsstatus weiterer wichtiger ober- und unterhalb von AKT gelegener Ziele der Signaltransduktionskette ist notwendig (z.B. pAMPK, mTORc1/2). Des Weiteren können massenspektrometrische Phosphoproteomanalysen wichtige Einsichten in die Signaltransduktion unter RAF-Inhibition ermöglichen. Als

Erklärungsansatz auf molekularer Ebene kann die Arbeit von Poulidakos et al. (Poulidakos 2010) dienen. In Zellen mit Wildtyp RAF ohne RAS Mutation werden RAS vermittelt CRAF/CRAF bzw. CRAF/BRAF- Dimere gebildet. Sorafenib und ZM336372 binden kompetitiv an die ATP- Bindungsstelle von RAF. Während die Medikamente die Signalweiterleitung über das RAF- Molekül, an die es gebunden haben, inhibieren, induzieren sie eine Transaktivierung des anderen RAF- Moleküls. Dieses wird konstitutiv aktiviert. In höheren Dosisbereichen sind beide ATP- Bindungsstellen von Sorafenib bzw. ZM336372 besetzt und die Signaltransduktion wird inhibiert (s. 4.2). Die Ergebnisse legen nahe, dass CRAF-Inhibitoren geeignete Adjuvantien für die NK-Zell- basierte Immuntherapie darstellen könnten. Wichtig hierbei scheint eine längerfristige Anwendung in niedrigen Dosierungen zu sein, um die Sorafenib-induzierte Erhöhung der Zytokinproduktion und Degranulation zu maximieren ohne toxische Effekte zu induzieren.

6 Abbildungen und Tabellen

Abbildungen

Abbildung 1 NK- Zell vermittelte Zytotoxizität (nach Cheng 2013).....	6
Abbildung 2 Vereinfachtes Schema der RAS/RAF- abhängigen aktivierenden Signaltransduktion in NK- Zellen (nach Vivier 2013)	10
Abbildung 3 Vereinfachtes Schema des CRAF Aktivierungskreislaufs	12
Abbildung 4 Absolute Zellzahlen der polyklonal expandierten NK-Zellen im Fütterzellsystem	35
Abbildung 5 Apoptose/ Nekroseversuch mit AnnexinV und 7AAD bei polyklonal expandierten NK- Zellen gesunder Blutspender bei Langzeitbehandlung im Fütterzellsystem.	37
Abbildung 6 Repräsentative Darstellung der FACS- Diagramme einer intrazellulären Zytokinfärbung.....	39
Abbildung 7 IFN γ /TNF α - Produktion bei Langzeitbehandlung.....	40
Abbildung 8 CD 107a Expression bei Langzeitbehandlung.	42
Abbildung 9 IFN γ /TNF α - Produktion bei Kurzzeitbehandlung.....	44
Abbildung 10 CD 107a Expression bei Kurzzeitbehandlung.....	45
Abbildung 11 Phosphorylierung von CRAF, ERK1/2 und AKT bei Langzeitbehandlung	47
Abbildung 12 Phosphorylierungsstatus von CRAF, ERK1/2 und AKT bei 4-h Vorbehandlung	49
Abbildung 13 Phosphorylierung von CRAF und ERK1/2 bei 24h-Vorbehandlung ..	50
Abbildung 14 Phosphorylierung von AKT bei 24h-Vorbehandlung	51
Abbildung 15 Phosphorylierungsmuster von CRAF, ERK1/2 und AKT bei langzeitbehandelten NK- Zellen nach Zielzellstimulation mit K562- bzw. Daudi- Zellen.	53
Abbildung 16 ERK1/2 Phosphorylierungsstatus in unbehandelten expandierten NK- Zellen nach MEK Inhibition mit PD0325901.	54
Abbildung 17 Vereinfachtes Schema der intrazellulären Signaltransduktion über den MAPK- Signalweg.....	58
Abbildung 18 Vereinfachtes Schema der Wirkung von Sorafenib auf die Signalweiterleitung	60

Tabellen

Tabelle 1) Aktivierende NK- Zell- Rezeptoren und ihre Liganden (nach Hassold, 2011)	8
Tabelle 2) Inhibierende NK- Zell- Rezeptoren und ihre Liganden (nach Hassold, 2011)	9
Tabelle 3) Übersicht über die verwendeten FACS- Antikörper	19
Tabelle 4) Übersicht über die verwendeten Western- Blot- Antikörper	20

7 Literaturverzeichnis

- Abdel-Azim H, Heisterkamp N. "Potential of autologous NK cell therapy to eradicate leukemia: "Education is [not] the best provision for old age" – Aristotle." *Oncoimmunology* 2015; 4(2):e984549.10.4161/2162402X.2014.984549.
- Alexa A, Varga J, Reményi A. "Scaffolds are 'active' regulators of signaling modules." *FEBS J* 11 2010: 277(21):4376-82.
- Alter, Malenfant, Altfeld. "CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity." *Journal of Immunological Methods* 2004: 294(1-2): 15-22.
- Anfossi N, Andre P, Guia S, Falk CS, Roetynck S, Steward CA et al. "Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I." *Immunity* 2006: 25: 331-342.
- Arriga R, Caratelli S, Coppola A, Spagnoli GC, Venditti A, Amadori S, Lanzilli G, Lauro D, Palomba P, Sconocchia T, Del Principe MI, Maurillo L, Buccisano F, Capuani B, Ferrone S, Sconocchia G. "Enhancement of anti-leukemia activity of NK cells in vitro and in vivo by inhibition of leukemia cell-induced NK cell damage." *Oncotarget* 12 01 2016: 7(2):2070-9.
- Atkins MB, Kunkel L, Sznol M, Rosenberg SA. "High-dose recombinant interleukin-2 therapy in patients with metastatic melanoma: long-term survival update." *Cancer J Sci Am* 2000: 1: 11-4.
- Bae DS, Hwang YK, Lee JK. "Importance of NKG2D-NKG2D ligands interaction for cytolytic activity of natural killer cell." *Cell Immunol* 2012: 276(1-2): 122-7.
- Betts, Brechley, Price, De Rosa, Douek, Roederer, Koup. "Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation." *J Immunol Methods* 01 10 2003: 281(1-2):65-78.
- Borrego, Larrucea, Solana, Tarazona. "Editorial: NK Cell-Based Cancer Immunotherapy." *Front Immunol* 27 06 2016: 7: 249.
- Brunner AM, Li S, Fathi AT, Wadleigh M, Ho VT, Collier K, Connolly C, Ballen KK, Cutler CS, Dey BR, El-Jawahri A, Nikiforow S, McAfee SL, Koreth J, Deangelo DJ, Alyea EP, Antin JH, Spitzer TR, Stone RM, Soiffer RJ, Chen YB. "Haematopoietic cell transplantation with and without sorafenib maintenance for patients with FLT3-ITD acute myeloid leukaemia in first complete remission." *Br J Haematol.* 11 2016: 175(3):496-504. doi: 10.1111/bjh.14260.
- Caligiuri. "Human natural killer cells." *Blood* 2008: 112(3): 461-469.
- Campbell KS, Jun Hasegawa. "NK cell biology: An update and future directions." *J Allergy Clin Immunol* 2013: 132(3): 536-544.
- Chabannon C, Mfarrej B, Guia S, Ugolini S, Raynier D, Didier B, Vivier E, B Calmels. "Manufacturing Natural Killer Cells as Medicinal Products." *Front Immunol* 2016: 7: 504. doi: 10.3389/fimmu.2016.00504.
- Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. "The biology of human killer- cell subsets." *Trends Immunol* 2001: 22: 633-640.
- Cretney E, Takeda K, Yagita H, Glaccum M, Peschon JJ, Smyth MJ. "Increased susceptibility to tumor initiation and metastasis in TNF- related apoptosis- inducing ligand- deficient mice." *J Immunol* 2002: 168: 1356-1361.
- Curti A, Ruggeri L, D'Addio A, Bontadini A, Dan E, Motta MR, et al. "Successful transfer of alloreactive haploidentical KIR ligand- mismatched natural killer cells after infusion in elderly high risk acute leukemia patients." *Blood* 2011: 118(12): 3273-9.
- Cutler RE Jr, Stephens RM, Saracino MR, Morrison DK. "Autoregulation of the Raf-1 serine/threonine kinase." *Proc Natl Acad Sci U S A* 04 08 1998: 95(16):9214-9.
- Dalle S, Poulalhon N, Thomas L. "Vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation." *N Engl J Med* 2011: 365(15): 1448-9.
- Dettmer U, Folkerts M, Kächler E, Sönnichsen A., *Intensivkurs Biochemie 1. Auflage.* München: Elsevier-Verlag, 2005.
- di Santo JP. "Natural killer cell developmental pathways: a question of balance." *Annu Rev Immunol Rev* 2006: 24: 257-286.
- Dietz, Bulur, Emery, Winters, Epps, Zubair, Vuk-Pavlovi. "A novel source of viable peripheral blood mononuclear cells from leucoreduction system chambers." *Transfusion* 2006: 46(12): 2083-2089.
- Dotterweich, J and R Seggewiß-Bernhard. *Immunomodulatory effect of tyrosine kinase inhibitors on natural killer cell effector functions.* Mainz/ Germany: Natural Killer Cell Symposium, 2011.
- Eguizabal C, Olatz Zenaruzabeitia, Jorge Monge, Silvia Santos, Miguel Angel Vesga, Natalia Maruri, Arantza Arrieta, Marta Rifiñón, Estibaliz Tamayo-Orbegozo, Laura Amo, Susana Larrucea, Francisco Borrego.

- "Natural Killer Cells for Cancer Immunotherapy: Pluripotent Stem Cells-Derived NK Cells as an Immunotherapeutic Perspective." *Front Immunol* 2014; 5: 439.
- Fauriat, Long, Ljunggren, Bryceson. "Regulation of human NK- cell cytokine and chemokine production by target cell recognition." *Blood* 2010; 115(11): 2167-2176.
- Ferlazzo G, Munz C. "NK cell compartments and their activation by dendritic cells." *J. Immunol* 2004; 172: 1333-1339.
- Fucile C1, Marengo S, Bazzica M, Zuccoli ML, Lantieri F, Robbiano L, Marini V, Di Gion P, Pieri G, Stura P, Martelli A, Savarino V, Mattioli F, Picciotto A. "Measurement of sorafenib plasma concentration by high-performance liquid chromatography in patients with advanced hepatocellular carcinoma: is it useful the application in clinical practice? A pilot study." *Med Oncol* 2015; 32(1):335.
- Garnett MJ, Marais R. "Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene." *Cancer Cell* 2004; 6: 313-319.
- Gregoire C, Chasson L, Luci C, Tomasello E, Geissmann F, Vivier E et al. "The trafficking of natural killer cells." *Immunol Rev* 2007; 220: 169.182.
- Greil R, Micksche M. "Sorafenib, Arzneimittelprofil." *Medizin Medien Austria*. 2006.
- Hall-Jackson CA, Eyers PA, Cohen P, Goedert M, Boyle FT, Hewitt N, Plant H, Hedge P. "Paradoxical activation of Raf by a novel Raf inhibitor." *Chem Biol* 1999; 6(8): 559-68.
- Hassold N. "Dasatinib moduliert Effektorfunktionen Natürlicher Killerzellen über Einflüsse auf die Signaltransduktion und CD16- Regulation." *Dissertation* 2011.
- Hatzivassiliou G, Song K, Yen I, Brandhuber BJ, Anderson DJ, Alvarado R, Ludlam MJ, Stokoe D, Gloor SL, Vigers G, Morales T, Aliagas I, Liu B, Sideris S, Hoeflich KP, Jaiswal BS, Seshagiri S, Koeppen H, Belvin M, Friedman LS, Malek S. "RAF inhibitors prime wild-type RAF to activate the MAPK pathway and enhance growth." *Nature* 2010; 464(7287): 431-5.
- Herbermann RB, Nunn M, Lavrin DH. "Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic acid allogeneic tumors. I. Distribution of reactivity and specificity." *Int J Cancer* 1975; 16: 216. 229.
- Hermann GG, Zeuthen J, Claesson MH. "LAK-cell-mediated cytotoxicity against tumor cell targets used to monitor the stimulatory effect of interleukin-2: cytotoxicity, target recognition and phenotype of effector cells lysing the Daudi, T24 and K562 tumor cell lines." *Nat Immun* 1992; 11(1): 7-16.
- Hilger RA, Scheulen ME, Strumberg D. "The Ras-Raf-MEK-ERK pathway in the treatment of cancer." *Onkologie* 2002; 25(6): 511-8.
- Hmitou I, Druillennec S, Valluet A, Peyssonnaud C, Eychène A. "Differential regulation of B-raf isoforms by phosphorylation and autoinhibitory mechanisms." *Mol Cell Biol* 27 11 2007: 31-43.
- Holderfield M, Nagel TE, Stuart DD. "Mechanism and consequences of RAF kinase activation by small-molecule inhibitors." *Br J Cancer* 2014; 111(4): 640-645.
- Hu-Lieskovan S, Mok S, Moreno BH et al. "Improved antitumor activity of immunotherapy with BRAF and MEK inhibitors in BRAFV600E melanoma." *Science translational medicine* 18 03 2015: 7(279):279ra41. doi:10.1126/scitranslmed.aaa4691.
- Jiang, Zhong, Gilvary, Corliss, Vivier, Hong-Geller, Wei, Djeu. "Syk regulation of phosphoinositide 3-kinase-dependent NK cell function." *J. Immunol* 2002; 168(7): 3155-3164.
- Kannan GS, Aquino-Lopez A, Lee DA. "Natural killer cells in malignant hematology: A primer for the non-immunologist." *Blood Rev*. 09 09 2016: S0268-960X(16)30070-4. doi: 10.1016/j.blre.2016.08.007. Review.
- Kelley, Rozek, Suenram, Schwartz. "Activation of human blood monocytes by adherence to tissue culture plastic surfaces." *Exp Mol Pathol* 1987; 46(3)- 266-278.
- Kiessling R., Klein E., Wigzell H. ""Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. ." *EUR J Immunol* 1975; 5: 112- 117.
- Kobayashi, Fitz, Ryan, Hewick, Clark, Chan, Loudon, Sherman, Perussia, Trinchieri. "Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes." *J Exp Med* 1989; 170(3): 827-45.
- Krause SW, Gastpar R, Andreesen R, Gross C, Ullrich H, Thonigs G, Pfister K, Multhoff G. "Treatment of colon and lung cancer with ex vivo heat shock protein 70- peptide- activated, autologous natural killer cells: a clinical phase I trial." *Clin Cancer Res* 2004; 10(11): 3699-707.
- Lanier LL. "Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition." *Nat Immunol* 2008; 9(5): 495-502.
- Lapteva N, Szmania SM, van Rhee F, Rooney CM. "Clinical grade purification and expansion of natural killer cells." *Crit Rev Oncog* 2014; 19(1-2): 121-32.
- LeBlanc F, Dan Zhang, Xin Liu, Thomas P, Loughran JR. "Large granular lymphocyte leukemia: from dysregulated pathways to therapeutic targets." *Future Oncol* 2013; 8(7): 787-801.
- Lito P, Pratilas CA, Joseph EW, Tadi M, Halilovic E, Zubrowski M, Huang A, Wong WL, Callahan MK, Merghoub T, Wolchok JD, de Stanchina E, Chandarlapaty S, Poulikakos PI, Fagin JA, Rosen N. "Relief

- of profound feedback inhibition of mitogenic signaling by RAF inhibitors attenuates their activity in BRAF600E melanomas." *Cancer Cell* 2012; 22(5): 668-82.
- Long GV, Stroyakovskiy D, Gogas H, Levchenko E, de Braud F, Larkin J, Garbe C, Jouary T, Hauschild A, Grob JJ, Sileni VC, Lebbe C, Mandalà M, Millward M, Arance A, Bondarenko I, Haanen JB, Hansson J, Utikal J, Ferraresi V, Kovalenko N, Mohr P, Probachai. "Combined BRAF and MEK Inhibition versus BRAF Inhibition Alone in Melanoma ." *N Engl J Med* 2014: Epub ahead of print.
- Lozzio, Lozzio. "Human chronic myelogenous leukemia cell- line with positive Philadelphia chromosome." *Blood* 1975; 45(3): 321-334.
- Lundqvist A, Yokoyama H, Smith A, Berg M, Childs R. "Bortezomib treatment and regulatory T- cell depletion enhance the antitumor effects of adoptively infused NK cells." *Blood* 2009; 113(24): 6120-7.
- Ma C, Armstrong AW,. "Severe adverse events from the treatment of advanced melanoma: a systematic review of severe side effects associated with ipilimumab, vemurafenib, interferon alfa-2b, dacarbazine and interleukin-2." *J Dermatolog Treat* 2014; 25(5): 401-8.
- Malarkey K, Belham CM, Paul A, Graham A, McLees A, Scott PH, Plevin R,. "The regulation of tyrosine kinase signalling pathways by growth factor and G- protein- coupled receptors." *Biochem J* 1995; 309(2): 361-75.
- Martin- Liberal J, Larkin J. "New RAF kinase inhibitors in cancer therapy." *Expert Opin Pharmacother.* 2014; 15(9): 1235-45.
- Matallanas D, Birtwistle M, Romano D, Zebisch A, Rauch J, von Kriegsheim A, Kolch W. "Raf family kinases: old dogs have learned new tricks." *Genes Cancer* 2 03 2011: 232-60.
- Miller JS. "The biology of natural killer cells in cancer, infection and pregnancy." *Exp Hematol* 2011.
- Miller JS, Soignier Y, Panoskaltis-Mortari A, McNearney SA, Yun GH, Fautsch SK, McKenna D, Le C, Defor TE, Burns LJ, Orchard PJ, Blazar BR, Wagner JE, Slungaard A, Weisdorf DJ, Okazaki IJ, McGlave PB. "Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer." *Blood* 15 04 2005; 105(8):3051-7.
- Min Cheng, Yongyan Chen, Weihua Xiao, Rui Sun, Zhigang Tian,. "NK cell- based immunotherapy for malignant diseases." *Cellular & Molecular Immunology* 2013; 10: 230-252.
- Min Cheng, Yongyan Chen. "NK cell based immunotherapie for malignant disease." *Cellular & Molecular Immunology* 2013; 10: 230-252.
- Montaldo E, Zotto GD, Chiesa MD, Mingari MC, Moretta A, Maria AD, Moretta L,. "Human NK cell receptors/markers: A tool to analyze NK cell development, subsets and function." *Cytometry* 2013; 83A: 702-713.
- Murphy DA, Makonnen S, Lassoued W, Feldman MD, Carter C, Lee WM. "Inhibition of tumor endothelial ERK activation, angiogenesis, and tumor growth by sorafenib (BAY43-9006)." *AM J Pathol* 2006; 169(5): 1875-1885.
- Nichols KE, Arceci RJ,. "BRAF, a piece of the LCH puzzle." *Blood* 2010; 116(11): 1825-7.
- Oberholzer PA, Kee D, Dziunycz P, Sucker A, Kamsukom N, Jones R, Roden C, Chalk CJ, Ardlie K, Palescandolo E, Piris A, MacConaill LE, Robert C, Hofbauer GF, McArthur GA, Schadendorf D, Garraway LA. "RAS mutations are associated with the development of cutaneous squamous cell tumors in patients treated with RAF inhibitors." *J Clin Oncol* 2012; 30(3): 316-21.
- Orange. "Formation and function of the lytic NK- cell immunological synapse." *Nat Rev Immunol* 2008; 8(9): 713-725.
- Orange JS. "Human natural killer cell deficiencies." *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2006; 6: 399-409.
- Perussia, Ramoni, Anegon, Cuturi, Faust, Trinchieri. "Preferential proliferation of natural killer cells among peripheral blood mononuclear cells co cultured with B lymphoblastoid cell lines." *Nat Immun Cell Growth Regul* 1987; 6(4): 171-188.
- Poulikakos PI, Zhang C, Bollag G, Shokat KM, Rosen N,. "RAF inhibitors transactivate RAF dimers and ERK signalling in cells with wild-type BRAF." *Nature* 2010; 464(7287): 427-30.
- Quillet, Presse, Marchiol-Fournigault, Harel-Bellan, Benbunan, Ploegh, Fradelizi. "Increased resistance to non-MHC- restricted cytotoxicity related to HLA A, B expression. Direct demonstration using beta 2- microglobulintransfected Daudi cells." *J Immunol* 1988; 141(1): 17-20.
- Radulovic S, Bjelogrić SK. "Sunitinib, sorafenib and mTOR inhibitors in renal cancer." *J BUON* 12 09 2007; Suppl 1:S151-62.
- Ralainirina N, Poli A, Michel T, Poos L, Andrès E, Hentges F, Zimmer J. "Control of NK cell functions by CD4+CD25+ regulatory T cells." *J Leukoc Biol* 2007; 81(1): 144-53.
- Rubnitz JE, Inaba H, Ribeiro RC, Pounds S, Rooney B, Bell T, et al. "NKAML: a pilot study to determine the safety and feasibility of haploidentical natural killer cell transplantation in childhood acute myeloid leukemia." *Journal of clinical oncology* 2010; 28(6): 955-9.
- Ruggeri L, Aversa F, Martelli MF, Velardi A,. "Allogeneic hematopoietic transplantation and natural killer cell recognition of missing self." *Immunol Rev* 2006; 214: 202-218.

- Ruggeri L, Capanni M, Casucci M, Volpi I, Tosti A, Perruccio K, Urbani E, Negrin RS, Martelli MF, Velardi A. "Role of natural killer cell alloreactivity in HLA- mismatched hematopoietic stem cell transplantation." *Blood* 1999; 94(1): 333-9.
- Ruggeri L, Mancusi A, Capanni M et al., "Donor natural killer cell allorecognition of missing self in haploidentical hematopoietic transplantation for acute myeloid leukemia: challenging its predictive value. ." *Blood* 2007; 110: 433-440.
- Salih et al. "The Kinase Inhibitors Sunitinib and Sorafenib Differentially Affect NK Cell Antitumor Reactivity In Vitro." *The Journal of Immunology* 2009.
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. "NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis." *Nat Methods* 09 07 2012; (7):671-5.
- Schuttle et al. "Annexin V binding assay as a tool to measure apoptosis in differentiated neuronal cells. ." *J Neurosci Methods* 1998; 86: 63-69.
- Screpanti V, Wallin RP, Ljunggren HG, Grandien A. "A central role for death receptor- mediated apoptosis in the rejection of tumors by NK cells." *J Immunol* 2001.
- Sinha C, Cunningham LC. "An overview of the potential strategies for NK cell-based immunotherapy for acute myeloid leukemia." *Pediatr Blood Cancer* 12 2016; 63(12):2078-2085.
- Smyth MJ, Hayakawa Y, Takeda K, Yagita H. "New aspects of natural- killer cell surveillance and therapy of cancer." *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 850-861.
- Solit DB, Garraway LA, Pratilas CA, Sawai A, Getz G, Basso A, Ye Q, Lobo JM, She Y, Osman I, Golub TR, Sebolt-Leopold J, Sellers WR, Rosen N. "BRAF mutation predicts sensitivity to MEK inhibition." *Nature* 2006; 439(7074): 358-62.
- Spirli C, Morell CM, Locatelli L, Okolicsanyi S, Ferrero C, Kim AK, Fabris L, Fiorotto R, Strazzabosco M. "Cyclic AMP/PKA- dependent paradoxical activation of Raf/MEK/ERK signaling in polycystin-2 defective mice treated with sorafenib." *Hepatology* 2012; 56(6): 2363-74.
- Stern M, Passweg JR, Meyer-Monard S, Esser R, Tonn T, Soerensen J, Paulussen M, Gratwohl A, Klingebiel T, Bader P, Tichelli A, Schwabe D, Koehl U. "Pre- emptive immunotherapy with purified natural killer cells after haploidentical SCT: a prospective phase II study in two centers." *Bone Marrow Transplant* 2013; 48(3): 433-8.
- Sutent, Europeans Medicines Agency: Produktinformation. "EMEA/H/C/000687-110038." n.d.
- Trapani JA, Davis J, Sutton VR, Smyth MJ. "Proapoptotic functions of cytotoxic lymphocyte granule constituents in vitro and in vivo." *Curr Opin Immunol* 2000; 12: 323-329.
- Uhrberg. "The CD107 mobilization assay: viable isolation and immunotherapeutic potential of tumor- cytolytic NK cells." *Leukemia* 2005; 19(5): 707-709.
- Valiante, Rengaraju, Trinchieri,. "Role of the production of natural killer cells stimulatory factor (NKSF/IL-12) in the ability of B cell lines to stimulate T and NK cell proliferation." *Cellular Immunology* 1992; 145(1): 187-198.
- Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. "Functions of natural killer cells." *Nat Immunol* 2008; 9: 503-510.
- Vivier E, Ugolini S, Nunes JA,. "ADAPted secretion of cytokines in NK cells." *Nature Immunology* 2013; 14: 1108-1110.
- Wadkins RM, Jovin TM,. "Actinomycin D and 7-aminoactinomycin D binding to single-stranded DNA." *Biochemistry* 1991; 30(39): 9469-9478.
- Willemze R, Rodrigues CA, Labopin M, Sanz G, Michel G, Socié G, Rio B, Sirvent A, Renaud M, Madero L, Mohty M, Ferra C, Garnier F, Loiseau P, Garcia J, Lecchi L, Kögler G, Beguin Y, Navarrete C, Devos T, Ionescu I, Boudjedir K, Herr AL, Gluckman E, Rocha. "KIR- ligand incompatibility in the graft-versus- host direction improves outcomes after umbilical cord blood transplantation for acute leukemia." *Leukemia* 2009; 23(3): 492-500.
- Yoon SR, Kim TD, Choi. "Understanding of molecular mechanisms in natural killer cell therapy." *Exp Mol Med* 13 02 2015; 47:e141.
- Yu YY, George T, Dorfman JR, Roland J, Kumar V, Bennett M,. "The role of Ly49A and 5E6(Ly49C) molecules in hybrid resistance mediated by murine natural killer cells against normal T cell blasts." *Immunity* 1996; 4: 67-76.
- Zamai, Ponti, Mirandola, Gobbi, Papa, Galeotti, Cocco, Vitale. "NK cells and Cancer." *The journal of immunology* 01 04 2007; 178 no. 7 4011-4016 .
- Zhang, Zhang, Niu, Zhou, Zhang, Tian. "Interleukin-12 improves cytotoxicity of natural killer cells via upregulated expression of NKG2D." *Human Immunology* 2008; 69(8): 490-500.
- Zimmer, Hillen, Livingstone, Lacouture, Busam, Carvajal, Egberts, Hauschild, Kashani-Sabet, Goldinger, Dummer, Long, McArthur, Scherag. "Atypical Melanocytic Proliferations and New Primary Melanomas in Patients With Advanced Melanoma Undergoing Selective BRAF Inhibition." *J. Clin oncol* 01 07 2012; 30(19): 2375–2383.

8 Danksagung

Besonderer Dank gilt Frau PD Dr. Ruth Seggewiß-Bernhardt. Als Leiterin der Arbeitsgruppe „Immune Recovery“ war sie entscheidend für die Themenwahl und Entstehung dieser Dissertation. Ihre engagierte Anleitung zu selbstständigem wissenschaftlichen Arbeiten mit lebhaften Diskussionen und intensiver Betreuung legten der Grundstein dieser Arbeit. Durch intensive Betreuung und konstruktive Gespräche herrschte stets eine motivierende und engagierte Stimmung.

Herrn Prof. Dr. Hermann Einsele danke ich für die Unterstützung meiner Forschungsaktivität im Rahmen meiner Dissertation.

Für technische und emotionale Unterstützung bedanke ich mich bei Carolin Köchel und Irina Eichelbrönnner. Sie vermittelten stets eine freundliche und kooperative Atmosphäre.

Herzlich danken möchte ich zudem Thomas Nerreter und Sarah Lill für die stets kollegiale und freundschaftliche Zusammenarbeit im Labor.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Jörg Wischhusen danke ich herzlich für die konstruktiven Diskussionen und die Überlassung des Protokolls und der Zelllinie RPMI 8866 zur Expansion von NK-Zellen sowie die Übernahme des Ko-Referates.

Herrn Dr. med. Thorsten Stühmer danke ich für wertvolle Diskussionen und die Bereitstellung des MEK Inhibitors PD0325901.

Herrn Prof. Dr. phil Eilers danke ich für die konstruktive Kritik im Rahmen der Funktion des Berichterstatters.

Meinen Eltern, meiner Familie und meinen Freunden gilt mein besonderer Dank für alles!

Publikationen:

„SAMHD1 is a biomarker for cytarabine response and a therapeutic target in acute myeloid leukemia“ Schneider C, Oellerich T, Baldauf HM, Schwarz SM, Thomas D, Flick R, Bohnenberger H, Kaderali L, Stegmann L, Cremer A, Martin M, **Lohmeyer J**, Michaelis M, Hornung V, Schliemann C, Berdel WE, Hartmann W, Wardelmann E, Comoglio F, Hansmann ML, Yakunin AF, Geisslinger G, Ströbel P, Ferreirós N, Serve H, Keppler OT, Cinatl J Jr (**Nature Medicine (2016) doi: 10.1038/nm.4255**)

Frankfurt im Februar 2018

Julian Lohmeyer