

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II
der Universität Würzburg
Direktor: Prof. Dr. med. Hermann Einsele

**Einfluss von Dasatinib
auf die Expansion, Zytotoxizität und Zytokinproduktion
von humanen Natürlichen Killer-Zellen**

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Katharina Gertrud Seystahl
aus Mainstockheim
Würzburg, Juni 2010

Referent: Prof. Dr. med. Hermann Einsele

Koreferent: PD Dr. rer. nat. Jörg Wischhusen

Dekan: Prof. Dr. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 01.09.2010

Die Promovendin ist Ärztin

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Das Immunsystem: Zwischen Verteidigung und Selbsttoleranz ...	1
1.2	NK-Zellen	1
1.2.1	Definition	1
1.2.2	Eigenschaften von NK-Zellen	2
1.2.2.1	Expansion	2
1.2.2.2	Zytotoxizität.....	3
1.2.2.3	Zytokinproduktion	5
1.2.3	Interaktion mit anderen Immunzellen	5
1.2.4	Klinisch-therapeutische Relevanz von NK-Zellen.....	6
1.3	Tyrosinkinaseinhibitoren und NK-Zellen	7
1.3.1	Dasatinib als Multikinaseinhibitor	7
1.3.2	Src-Kinasen regulieren NK-Zellfunktionen	8
1.3.3	Fragestellung: Einfluss von Dasatinib auf NK-Zelleffektorfunktionen	8
2	MATERIAL UND METHODEN	10
2.1	Reagenzien	10
2.2	Lösungen, Medien und Zellen.....	11
2.3	Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	13
2.4	Präparation von Lymphozyten gesunder Blutspender	15
2.5	Polyklonale Expansion von NK-Zellen	16
2.6	Färbung von Zellen und Durchflusszytometrie	17
2.6.1	Darstellung von Zellpopulationen im Durchflusszytometer	17
2.6.2	Analyse spezifischer Zelleigenschaften und -funktionen	18
2.6.2.1	Identifikation von NK-Zellen, T-Zellen und Monozyten	18
2.6.2.2	Zytotoxizitätsversuch	18
2.6.2.2.1	PKH-26 und CFSE-Färbung von K562-Zellen.....	18
2.6.2.2.2	Zytotoxizitätsversuch: Durchführung und Auswertung.....	19
2.6.2.3	Zelltodanalyse mit Annexin-V-PE und 7-AAD.....	21

INHALTSVERZEICHNIS

2.6.2.4	Quantifizierung der Zytokinproduktion (IFN- γ , TNF- α), bzw. des Degranulationsmarkers CD107a/b der NK-Zellen.....	22
2.7	Methodenvalidierung: Ausschluss von direkten Effekten von Dasatinib auf die Zelllinie RPMI 8866.....	23
2.8	Statistische Auswertung	24
3	<i>ERGEBNISSE</i>.....	26
3.1	Langzeiteffekte von Dasatinib auf NK-Zellen	26
3.1.1	Dasatinib inhibiert dosisabhängig die Expansion von NK-Zellen.....	26
3.1.2	Dasatinib erhöht nicht die Gesamttodesrate von NK-Zellen	29
3.1.3	Expansion der NK-Zellen unter Dasatinib beeinflusst nicht die Zytotoxizität, aber steigert die Degranulation der NK-Zellen.....	30
3.1.4	Expansion der NK-Zellen unter Dasatinib führt zu gesteigerter Zytokinproduktion.....	33
3.2	Kurzzeiteffekte von Dasatinib auf NK-Zellen	35
3.2.1	Dasatinib inhibiert dosisabhängig die Zytotoxizität und die Degranulation von NK-Zellen	35
3.2.2	Dasatinib inhibiert dosisabhängig die Zytokinproduktion von NK-Zellen bei Stimulation mit K562-Zellen.....	37
3.3	Indirekte Effekte auf NK-Zelleffektorfunktionen nach Vorbehandlung von K562-Zellen mit Dasatinib.....	39
3.3.1	Dasatinib führt nach 24, aber nicht nach 4 Stunden zu einer erhöhten Spontanlyse von K562-Zellen	39
3.3.2	Vorbehandlung von K562-Zellen mit Dasatinib führt zu verminderter Zytotoxizität und Degranulation der NK-Zellen	40
3.3.3	Die Zytokinproduktion von NK-Zellen ist vermindert bei Stimulation mit Dasatinib vorbehandelten K562-Zellen.....	43
4	<i>DISKUSSION</i>.....	45
4.1	Dasatinib inhibiert die Expansion von NK-Zellen, deren Effektorfunktionen restaurierbar sind.....	45
4.2	Direkte Anwesenheit von Dasatinib inhibiert dosisabhängig die Zytotoxizität und Degranulation von NK-Zellen	48

INHALTSVERZEICHNIS

4.3	Direkte Anwesenheit von Dasatinib inhibiert spezifisch und dosisabhängig die Zytokinproduktion von NK-Zellen	52
4.4	Indirekte Effekte von Dasatinib: Vorbehandlung von K562-Zellen mit Dasatinib inhibiert NK-Zelleffektorfunktionen	53
4.5	Regulation von NK-Zelleffektorfunktionen durch Dasatinib birgt Chancen und Risiken bei der klinischen Anwendung.....	55
5	ZUSAMMENFASSUNG	58
6	ABKÜRZUNGEN	60
7	ABBILDUNGEN	62
8	LITERATURVERZEICHNIS	63
9	DANKSAGUNG	77
10	LEBENS LAUF	78

1 EINLEITUNG

1.1 Das Immunsystem: Zwischen Verteidigung und Selbsttoleranz

Das Immunsystem des Menschen besitzt effiziente Abwehrstrategien gegenüber einer Vielzahl von Krankheitserregern sowie gegenüber krankhaft veränderten Zellen des eigenen Körpers. Dies ist ein sensibles und komplexes Gleichgewicht, das eine feine Abstimmung der einzelnen Komponenten verlangt. Eine zu starke Immunreaktion kann sich in Allergien oder Autoimmunkrankheiten äußern, während ein geschwächtes Immunsystem für Infektionskrankheiten oder Tumoren prädisponieren kann. Traditionell wurde in der Wissenschaft unterschieden zwischen einer angeborenen Immunität, die ohne eine vorherige Sensibilisierung und Antigenerkennung funktioniert, und einer adaptiven Immunität, die gezielte und lernfähige Abwehrmechanismen besitzt [Cooper, Alder 2006]. Heute weiß man, dass diese Subsysteme in einer subtilen Interaktion stehen und erst das Zusammenspiel der beiden für eine erfolgreiche Immunabwehr verantwortlich ist [Clark, Kupper 2005].

1.2 NK-Zellen

1.2.1 Definition

Ein wichtiges Element der angeborenen Immunität sind die Natürlichen Killer (NK-) Zellen. Diese stellen 10 bis 15% der peripheren Blutlymphozyten dar und finden sich außer im Blut auch in lymphatischen Geweben sowie in der Leber und der Plazenta [Cerwenka, Lanier 2001].

Sie werden definiert über die Oberflächenmarker („Cluster of differentiation“, CD) CD56 und CD16 bei gleichzeitigem Fehlen des T-Zell-typischen Markers CD3 [Robertson, Ritz 1990]. 90% der NK-Zellen im peripheren Blut zeigen eine hohe Dichte an CD16 bei geringer Expression von CD56, sogenannte CD56^{dim}-Zellen, die vor allem zytotoxisch aktiv sind. Die andere Subpopulation, die vermehrt CD56 (CD56^{bright}) exprimiert, hat vor allem eine regulatorische

Funktion, die sich in der Produktion von Zytokinen manifestiert [Cooper, Fehniger, Caligiuri 2001; Caligiuri 2008] Neuere Arbeiten gehen davon aus, dass CD56^{bright}-Zellen und CD56^{dim}-Zellen nicht zwei verschiedene Subpopulationen, sondern Ausdruck unterschiedlicher Funktionszustände im Rahmen einer dynamischen Entwicklung sind [Chan et al. 2007; Romagnani et al. 2007; Caligiuri 2008].

Von den NK-Zellen abzugrenzen sind Natürliche Killer T-Zellen (NKT)-Zellen, die sowohl T-Zell-Rezeptoren (CD3) exprimieren, als auch NK-Zell-typische Oberflächenmarker (CD16, CD56, CD161) besitzen und funktionelle Eigenschaften beider Zellarten besitzen [Godfrey et al. 2004].

1.2.2 Eigenschaften von NK-Zellen

Die Rolle der NK-Zellen im Immunsystem ist vielfältig. Veränderungen der körpereigenen Zellen, die durch Viren oder Tumorzellen hervorgerufen werden, können aktivierende Signale für NK-Zellen darstellen [Biron et al. 1999; Vivier et al. 2008]. Die wichtigsten Eigenschaften der NK-Zelle sind die Zytotoxizität gegenüber krankhaft veränderten Zellen sowie die Produktion von Zytokinen, über die das Mikromilieu einer Entzündungsreaktion verändert wird.

1.2.2.1 Expansion

Die Expansion von NK-Zellen ist Teil des Aktivierungsprozesses der NK-Zellen und kann über Interleukine (IL), u. a. IL-12, IL-15 und IL-18 vermittelt werden [Biron et al. 1999]. Im Mausmodell wurde eine bis zu zehnfache Vermehrung der NK-Zellen als Reaktion auf eine murine CMV-Infektion beobachtet [Dokun et al. 2001]. Seit kurzem ist bekannt, dass nicht nur T- und B-Zellen ein immunologisches Gedächtnis haben, sondern auch NK-Zellen. Es konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass beim zweiten Kontakt mit dem CMV-Virus die erneute klonale Expansion der NK-Zellen mit einer verstärkten Effektorfunktion verbunden ist [Sun et al. 2009].

1.2.2.2 Zytotoxizität

Die Haupteffektorfunktion der NK-Zellen besteht in der zytotoxischen Wirkung gegebenüber transformierten Zellen wie virusinfizierten Zellen oder Tumorzellen. Die natürliche Zytotoxizität kann ohne vorherige Antikörperbildung stattfinden und ist damit eine frühe Antwort des Immunsystems. Der hauptsächliche Mechanismus der Zellzerstörung, d.h. die Lyse der Zelle, beruht auf der Exozytose von zytotoxischen Granula, die Perforin oder Granzyme enthalten [Smyth et al. 2005]. Zum anderen kann die Zytotoxizität über sogenannte Todesrezeptoren vermittelt werden, d.h. über den Fas/Fas-Liganden oder TRAIL, den TNF-related apoptosis-inducing ligand [Screpanti et al. 2001; Smyth et al. 2005]. IL-12, ein Signalmolekül, das vor allem von dendritischen Zellen, aber auch von bestimmten Tumorzellen sezerniert wird, regt NK-Zellen nicht nur zur Expansion an [Kobayashi et al. 1989], sondern steigert auch die Produktion von TRAIL und Perforin [Zhang et al. 2008]. Neben der natürlichen Zytotoxizität, die ohne Antikörperbildung möglich ist, gibt es auch antikörpervermittelte Zytotoxizität, d.h. NK-Zellen können mit Immunglobulinen markierte Zellen erkennen und zerstören [Vivier et al. 2008]. Bei der natürlichen Zytotoxizität der NK-Zellen, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde, besteht das wichtigste Prinzip der Erkennung von krankhaft veränderten Zellen im sogenannten „Missing-self“ [Kärre 2002]: Normale körpereigene Zellen exprimieren ein sogenanntes Histokompatibilitätskomplex-Klasse-I-Oberflächenmolekül („Major histocompatibility complex“-I, MHC-I), welches von inhibitorischen Rezeptoren der NK-Zelle („killer-cell immunoglobulin-like receptors“, KIRs) erkannt wird. Bei krankhaften Prozessen wird das MHC-I oft nicht mehr oder nur verändert exprimiert. Dies führt zu einer Aktivierung der NK-Zelle, da diese nun nicht mehr durch vorhandenes MHC-I über inhibierende KIR-Rezeptoren gehemmt wird. In Experimenten zur Messung der natürlichen Zytotoxizität werden daher traditionell K562-Zellen verwendet, die kein MHC-I exprimieren und somit gut durch NK-Zellen lysiert werden können [Lozzio, Lozzio 1975; Drexler 1994]. Die erythroleukämische Zelllinie K562 stammt von einer Patientin mit chronisch-myeloischer Leukämie (CML) in der Blastenkrise und kann daher als Modell für die immunologischen

Abwehr von Tumorzellen durch NK-Zellen verwendet werden [Lozzio, Lozzio 1975; Drexler 1994].

Die Zytotoxizität der NK-Zellen gegenüber zu lysierenden Zielzellen ist ein komplexer Prozess, der prinzipiell in folgende Phasen eingeteilt werden kann [Yatin M. Vyas 2002; Zompi, Colucci 2005]:

- (1) Bilden einer immunologischen Synapse
- (2) Interagieren von inhibierenden und aktivierenden Rezeptoren mit Liganden der Zielzelle
- (3) Signaltransduktion innerhalb der NK-Zelle
- (4) Polarisation der zytotoxischen Granula
- (5) Degranulation

Die dargestellten Phasen und ihre Regulationsmechanismen werden im Folgenden kurz näher charakterisiert.

Der Begriff der immunologischen Synapse soll versinnbildlichen, dass ein Kontakt zwischen der NK-Zelle und der Zielzelle notwendig ist, der über Adhäsionsmoleküle vermittelt wird [Riteau et al. 2003].

Nachdem der Kontakt zwischen NK-Zelle und Zielzelle hergestellt wurde, ist für die Aktivierung der NK-Zelle entscheidend, ob die Signale der aktivierenden oder inhibierenden Rezeptoren auf der Oberfläche der NK-Zellen überwiegen [Lanier 2003]. Als wichtiger aktivierender Rezeptor sei repräsentativ NKG2D erwähnt, der durch eine Vielzahl von Liganden aktiviert wird, die u.a. mit zellulärem Stress in Verbindung stehen [López-Larrea et al. 2008]. Die intrazelluläre Signalweiterleitung findet vor allem über Kinasen der Src- und Syk-Familie statt [Vivier et al. 2004]. Dies führt über die Aktivierung des ERK (extracellular signal-regulated kinase)-Signalwegs bzw. über die p38-MAP-Kinase oder die JNK (c-Jun N-terminale Kinase) zur Polarisation der Granula [Trotta et al. 2000; Yatin M. Vyas 2002; Chen et al. 2007].

Die Exozytose der zytotoxischen Granula ist abhängig von einem Anstieg des zytosolischen Calciums und wird induziert über Signalwege, die u.a. von Src-Kinasen und von der Proteinkinase C (PKC) abhängig sind [Ting et al. 1992; Yenan T. Bryceson 2006]. Während dieses Prozesses exprimieren NK-Zellen

CD107a und CD107b, die als Oberflächenmarker für die lysosomale Exozytose von Granula gelten [Betts et al. 2003; Alter et al. 2004].

1.2.2.3 Zytokinproduktion

Neben der Zytotoxizität ist die Produktion von Zytokinen die wichtigste Effektorfunktion der NK-Zellen, die typischerweise von CD56^{bright} Zellen ausgeübt wird [Caligiuri 2008]. Über Interferon (IFN)- γ und Tumornekrosefaktor (TNF)- α nehmen die NK-Zellen eine regulatorische Funktion im Immunsystem ein und beeinflussen andere Elemente des Immunsystems wie dendritische Zellen und T-Zellen (s. 1.2.3). Neben IFN- γ und TNF- α werden auch andere Signalmoleküle produziert, darunter der Granulozyten-Makrophagen Koloniestimulierende Faktor (GM-CSF), IL-10 und IL-13 [Cooper, Fehniger, Turner et al. 2001]. Dadurch ergibt sich für die NK-Zelle ein wichtiger Einfluss auf das Mikromilieu einer Entzündungsreaktion [Agaugue et al. 2008]. Nicht nur wegen des Einflusses auf andere Immunzellen stellt IFN- γ ein bedeutendes Zytokin der NK-Zelle da, sondern auch wegen des direkten Hemmeffekts auf die Proliferation von virusinfizierten Zellen und Tumorzellen [Maher et al. 2007]. NK-Zellen können zur Produktion von Zytokinen durch IL-12 zusammen mit anderen Costimulatoren aktiviert werden [Caligiuri 2008].

1.2.3 Interaktion mit anderen Immunzellen

Für eine erfolgreiche Immunabwehr ist ein komplexes Zusammenspiel der einzelnen Teile des Immunsystems von entscheidender Bedeutung. Über Zytokine, aber auch andere Mechanismen stehen NK-Zellen in gegenseitiger Interaktion mit anderen Immunzellen. NK-Zellen können dendritische Zellen über TNF- α , IFN- γ sowie über direkten Zell-Zellkontakt aktivieren und so die Reifung zu einer Antigen-präsentierenden Zelle induzieren [Mailliard et al. 2003; Walzer et al. 2005]. Dendritische Zellen wiederum regen NK-Zellen über die Sekretion von IFN- α/β , IL-12, IL-18 und IL-15 zur Zytokinproduktion und zur Proliferation an und können das zytotoxische Potential steigern [Walzer et al. 2005; Long 2007; Lucas et al. 2007]. Über IFN- γ oder indirekt über die Interaktion mit dendritischen Zellen geben NK-Zellen aktivierende Signale für

naive T-Zellen [Martin-Fontecha et al. 2004]. T-Zellen wiederum stimulieren NK-Zellen über die Sekretion von IL-2 zur Proliferation, Zytotoxizität und Zytokinproduktion [Fehniger et al. 2003]. NK-Zellen können auch die Immunantwort durch T-Zellen verändern, indem sie aktivierte T-Zellen zerstören [Rabinovich et al. 2003].

1.2.4 Klinisch-therapeutische Relevanz von NK-Zellen

Die Abwehr von virusinfizierten Zellen und Tumorzellen über die Zytotoxizität sowie die Interaktion der NK-Zellen mit den Zellen des adaptiven Immunsystems machen die NK-Zelle zu einem wichtigen Spieler eines funktionierenden Immunsystems. Medikamentöse Einflussnahme auf die Effektorfunktionen dieser Zelle kann sowohl von Vorteil sein als auch zu vermehrten unerwünschten Wirkungen führen. Eine Hemmung könnte eine erhöhte Infektanfälligkeit oder Tumorprogression verursachen. Bei einigen Autoimmunerkrankungen wiederum könnte sich eine kompromittierte NK-Zellfunktion positiv auswirken, da in aktuellen Publikationen eine Rolle von NK-Zellen und deren Rezeptoren in der Pathogenese von Autoimmunreaktionen belegt wurde [Bahram et al. 2005; Eagle, Trowsdale 2007].

NK-Zellen können außerdem bei der haploidentischen T-Zell-depletierten Stammzelltransplantation leukämische Zellen des Empfängers zerstören, ohne eine gefährliche Abstoßungsreaktion zu induzieren, die über T-Zellen vermittelt wird [Ruggeri et al. 2007]. Eine medikamentöse Modulierung der NK-Zell-Effektorfunktionen könnte diesen positiven Effekt verstärken.

Die Idee, das Potential von aktivierten NK-Zellen gegen Krebserkrankungen nutzbar zu machen, ist Gegenstand intensiver Forschung und zeigt zwar Fortschritte, ist aber leider bislang nicht so erfolgreich wie theoretisch denkbar [Terme et al. 2008]. So ist beispielsweise eine Immunstimulation mit IL-2 oder eine zelluläre Immuntherapie mit voraktivierten NK-Zellen, die bei 15-30% der Patienten mit Nierenzellkarzinom oder Melanom zu einem klinischen Ansprechen führt, u.a. durch schwere Nebenwirkungen limitiert [Rosenberg et al. 1993; Udai S. Kammula 1998].

1.3 Tyrosinkinaseinhibitoren und NK-Zellen

Krankheitsprozesse über eine geschickte medikamentöse Modulation des Immunsystems zu beeinflussen, ist weiterhin eine Herausforderung für die Wissenschaft. Für den Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib wurden in vitro NK-Zell-abhängige anti-Tumoreffekte beschrieben [Borg et al. 2004]. Außerdem wurde gezeigt, dass Imatinib die immunologische Synapse zwischen NK- und Zielzelle behindert, die NKG2D-Liganden verändert und so indirekt Einfluss auf die NK-Zell medierte Lyse gewinnt [Cebo et al. 2006]. Die immunmodulatorischen Effekte von Imatinib oder anderen Tyrosinkinaseinhibitoren sind noch unvollständig verstanden und daher bisher im klinischen Alltag noch nicht genutzt. Imatinib ist derzeit der Goldstandard in der Behandlung der CML, deren Prognose dadurch erheblich verbessert wurde [Druker et al. 2006]. Die BCR-ABL-Tyrosinkinase, die für die klonale Expansion von Leukozyten der myeloischen Linie verantwortlich ist, wird durch Imatinib gezielt gehemmt [Druker et al. 2001]. Leider treten bei einigen Patienten Resistenzen auf, die meist durch Punktmutationen bedingt sind [Apperley 2007]. Dies hat zur Entwicklung von Tyrosinkinaseinhibitoren der zweiten Generation geführt.

1.3.1 Dasatinib als Multikinaseinhibitor

Einen Tyrosinkinase-Inhibitor der zweiten Generation stellt Dasatinib (Sprycel®, BMS-354825, Bristol-Myers-Squibb) dar, der auch bei Imatinib-Resistenz Wirksamkeit zeigt [Shah et al. 2004]. Für diese Indikation, sowie bei Philadelphia-Chromosom-positiver akuter Leukämie ist das Medikament derzeit in Deutschland zugelassen. Dasatinib zeigt eine vielfach höhere Potenz gegenüber BCR-ABL und inhibiert darüber hinaus eine Vielzahl von Proteinkinasen, darunter Kinasen der Src-Familie wie Lyn, Fyn und Lck, außerdem den Stammzelleffektor-Rezeptor c-Kit, den Rezeptor für den Plättchen-Wachstumsfaktor (PDGF-R) und den Ephrin-Rezeptors EphA2 [Lombardo et al. 2004; Rix et al. 2007; Hantschel et al. 2008]. Aus dem breiten Inhibitionsspektrum von Dasatinib ergeben sich auch Risiken, da neben Tumorzellen auch gesunde Immunzellen gehemmt werden, was zu

Myelosuppression und Pleuraergüssen führen kann [Hochhaus et al. 2008; Goldblatt et al. 2009]. Als Ursache für die Pleuraergüsse wird eine immunmedierte Pathogenese diskutiert [Hugues de Lavallade 2008].

Aktuelle Publikationen belegen immunsuppressive, bzw. immunmodulatorische Effekte von Dasatinib: Bei T-Zellen wurde eine Hemmung der Proliferation, Aktivierung und Zytokinproduktion beobachtet, die auf eine Inhibition der Tyrosinkinase Lck zurückgeführt wird [Schade et al. 2008; Weichsel et al. 2008]. Außerdem wurde eine Inhibition der Zytotoxizität von NK-Zellen gezeigt [Blake et al. 2008]. Diese Beobachtungen können erste Schritte für den Einsatz als Immunsuppressivum bedeuten, zeigen aber auch potentielle Risiken im Sinne einer beeinträchtigten Immunabwehr während einer onkologischen Therapie auf.

1.3.2 Src-Kinasen regulieren NK-Zellfunktionen

Dasatinib ist ein potenter Inhibitor der Src-Kinasen, die an entscheidenden Schnittstellen der Aktivierung und der Vermittlung von Effektorfunktionen von NK-Zellen stehen. Die Src-Kinase Lck ist beteiligt an der Signaltransduktion von IL-12, das bei der Expansion und der Zytokinproduktion der NK-Zellen eine zentrale Rolle spielt [Pignata et al. 1995]. Außerdem wird der Prozess der Zytotoxizität von Src-Kinasen reguliert, sowohl auf der Ebene der immunologischen Synapse, als auch bei der intrazellulären Signaltransduktion der Rezeptoren der NK-Zelle und bei der Exozytose der zytotoxischen Granula [Yatin M. Vyas 2002; Bernardini et al. 2005; Yenan T. Bryceson 2006].

1.3.3 Fragestellung: Einfluss von Dasatinib auf Funktionen von NK-Zellen

Eine potentielle Modulation der zytotoxischen Aktivität und Zytokinproduktion von NK-Zellen durch Dasatinib als Inhibitor von Src-Kinasen birgt Chancen, neue Therapiestrategien gegenüber malignen Erkrankungen oder Autoimmunerkrankungen zu identifizieren sowie die bereits bewährte Therapie der CML zu optimieren. Die Wirkung von Dasatinib auf NK-Zellen ist bislang noch unvollständig untersucht. So wurde eine Expansion von NK-, bzw. NKT-Zellen

in vivo bei Patienten während einer Dasatinib-Therapie beobachtet, was mit einer besseren Prognose verbunden war [Kim et al. 2009; Mustjoki et al. 2009]. Blake und Kollegen beobachteten einen inhibierenden Effekt von Dasatinib auf die Zytotoxizität von NK-Zellen [Blake et al. 2008]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden darüber hinausgehend die Wirkung von Dasatinib auf die Effektorfunktionen von NK-Zellen *in vitro* nach Kurz- und Langzeiteffekten differenziert und neben der Zytotoxizität auch die Expansionskapazität und die Zytokinproduktion der NK-Zellen evaluiert.

Dabei wurden klinisch relevante Konzentrationen von 10 nM und 50 nM verwendet, was bei der derzeit üblichen Dosierung von 2 x 70 mg pro Tag etwa der Talkonzentration und einer hohen durchschnittlichen Konzentration entspricht [Brave et al. 2008; Wang et al. 2008].

Die Wirkung von Dasatinib auf NK-Zellen wurde anhand folgender Fragestellungen analysiert:

1. Beeinflusst Dasatinib die Expansion von NK-Zellen aus den Lymphozyten gesunder Spender?
2. Zeigen sich Langzeiteffekte auf die Zytotoxizität, Degranulation und Zytokinproduktion von NK-Zellen, die während der Expansion mit Dasatinib behandelt wurden?
3. Induziert Dasatinib Apoptose und Nekrose bei NK-Zellen?
4. Wird die Zytotoxizität, Degranulation und Zytokinproduktion von NK-Zellen gegenüber K562-Zellen bei direkter Anwesenheit von Dasatinib beeinflusst?
5. Ändert sich die zytotoxische Aktivität, Degranulation und die Zytokinproduktion der NK-Zellen durch eine Vorbehandlung der Zielzellen K562 mit Dasatinib?

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Reagenzien

Reagenz	Hersteller
7-Aminoactinomycin D (7-AAD)	Becton Dickinson, Heidelberg
Albumin Fraktion V, biotinfrei (Bovines Serumalbumin, BSA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Annexin V binding buffer	Becton Dickinson, Heidelberg
Annexin V- Phycoerythrin (Annexin V-PE)	Becton Dickinson, Heidelberg
Aqua destillata	Delta Select, Dreieich
Brefeldin A	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Calcium Ionophor A23187	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Carboxyfluorescein Diacetat Succinimidylester (CFSE) CellTrace™	Invitrogen, Karlsruhe
Cytofix wash	Becton Dickinson, Heidelberg
Cytofix/Cytoperm™	Becton Dickinson, Heidelberg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Klinikapotheke der Medizinischen Klinik und Poliklinik II, Würzburg
Erythrozyten-Lysepuffer	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS Clean, Flow, Rinse	Becton Dickinson, Heidelberg
Fetales Kälberserum (FCS) - Chargen-Nr. S0115/0452H (Experimente zur NK-Zellexpansion, Zytotoxizität, Zytokinproduktion und Degranulation bei Stimulation mit PMA/Ca ²⁺ Ionophor) - Chargen-Nr. K003628D (Experimente zur Zytokinproduktion von NK-Zellen bei Stimulation mit K562-Zellen)	Biochrom AG, Berlin PAN Biotech, Aidenbach

MATERIAL UND METHODEN

Ficoll-Hypaque	PAN Biotech, Aidenbach
Golgi Stop	Becton Dickinson, Heidelberg
IL-12 ELISA (p70) OptEIA™	Becton Dickinson, Heidelberg
Interferon (IFN γ)-PE	Becton Dickinson, Heidelberg
L-Glutamin	PAN Biotech, Aidenbach
LightCycler™ t(9;22) Quantifikation Kit	Roche, Mannheim
monoklonale Antikörper: - CD16-Allophycocyanin (APC); Klon VEP13 - CD56-APC; Klon AF12-7H3 - CD3-Peridinin-Chlorophyll-Protein (PerCP); Klon SK7 - CD14-Phycoerythrin (PE); Klon TÜK 4 -CD 107a-Fluorescein-Isothiocyanat (FITC); Klon H4A3 - CD 107b-FITC; Klon H4B4	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach BD Biosciences, San Jose, USA Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach Becton Dickinson, Heidelberg Becton Dickinson, Heidelberg
Paraformaldehyd (PFA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	PAN Biotech, Aidenbach
Phorbol-12-Myristat-13-Azetat (PMA)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	PAN Biotech, Aidenbach
PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Mini Kit	Sigma Aldrich, Taufkirchen
RPMI 1640	PAN Biotech, Aidenbach
TNF- α -PE	Becton Dickinson, Heidelberg
Trypanblaulösung (0,2 %)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Tween 20	AppliChem GmbH, Darmstadt

2.2 Lösungen, Medien und Zellen

Dasatinib:

- synthetisiert von Dr. Elisabeth Greiner und Dr. Josef Zezula (NIH, Bethesda, MD, USA) gemäß dem veröffentlichtem Verfahren [Lombardo

MATERIAL UND METHODEN

et al. 2004] erhalten im Rahmen einer Vereinbarung zur Weitergabe von Biomaterialien („Material Transfer Agreement“)

- gelöst in DMSO (Stammkonzentration 1 mM), für Experimente zu den Konzentrationen 10 nM, 20 nM und 50 nM mit RPMI oder R10-Medium verdünnt
- dauerhaft gelagert bei -20 °C; bei 4 °C für nicht mehr als 4 Wochen
- biologische Aktivität getestet im Zelltod-Titrationsversuch [Seggewiss et al. 2005]

Zellkultur (R10) - Medium:

- RPMI 1640 wurde unter sterilen Bedingungen 10% FCS, 2 mM L-Glutamin, 100 Einheiten/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin zugesetzt

FACS-Puffer:

- Zur Herstellung wurden je 2 g bovines Serumalbumin in je 1 Liter PBS gelöst

Paraformaldehyd (PFA) 4%ig:

- Bei etwa 60 °C wurden je 2 g Paraformaldehyd in je 50 ml PBS mit Hilfe des Magnetrührers gelöst. Die Lösung wurde alle zwei Wochen neu hergestellt.

K562-Zellen

- von Frau PD Dr. U. Kämmerer (Frauenklinik der Universität Würzburg) freundlich zur Verfügung gestellt.
- Die erythroleukämische Zelllinie K562 wurde 1970 von einer CML-Patientin in der Blastenkrise isoliert. Die Zellen tragen das Philadelphia-Chromosom sowie das BCR-ABL Fusionsgen und besitzen keine MHC-I-Expression [Lozzio, Lozzio 1975; Drexler 1994].
- Aussaat nach mikroskopischer Kontrolle alle zwei bis drei Tage bei einer Dichte von $3-7 \times 10^5$ Zellen/ml in R10-Medium

RPMI 8866-Zellen

- von Herrn PD Dr. J. Wischhusen (Frauenklinik der Universität Würzburg) freundlich überlassen

MATERIAL UND METHODEN

- Aussaat nach mikroskopischer Kontrolle alle zwei bis drei Tage bei einer Dichte von $3-9 \times 10^5$ Zellen/ml in R10-Medium

Zellen zählen

- Zellen wurden mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer nach Verdünnung mit Trypanblau gezählt und dabei gleichzeitig auf ihre Vitalität geprüft. Abgestorbene Zellen färben sich dunkelblau, da ihre Zellmembran permeabel ist. Die Zellzahl der Suspension wurde wie folgt berechnet:
Zellzahl = $m * 10^4 * \text{Verdünnungsfaktor} * \text{Volumen [ml]}$
(m als mittlere Anzahl vitaler Zellen je 16 Kleinquadrate der Neubauer Zählkammer; 10^4 als Kammerfaktor; *Verdünnungsfaktor* entsprechend der Verdünnung der Suspension mit Trypanblau; *Volumen* als Suspensionsvolumen)

Zellkultur

- Zellen wurden in R10-Medium unter sterilen Bedingungen kultiviert und befanden sich während der Kultur, bzw. bei Inkubationsschritten, wenn nicht anders angegeben, bei 37 °C und 5% CO₂ im Inkubator.

2.3 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Gerät/ Verbrauchsmaterial	Hersteller
Alufolie	Hartenstein, Würzburg
Autoklav	Systec, Weltenberg
Autoklavier-Klebeband	Hartenstein, Würzburg
Durchflusszytometer (FACS-Calibur™), 4-Farb-basiert	BD Immunocytometry Systems, San Jose, USA
Eppendorf-Röhrchen 0,5 ml; 1,5 ml	Hartenstein, Würzburg
FACS-Analysenröhrchen 4 ml	Hartenstein, Würzburg
Gefrierschrank (-20 °C)	Liebherr, Ochsenhausen
Gefrierschrank (-80 °C)	Thermo Electron, Langenselbold
Inkubator Hera cell 150 (37 °C, 5% CO ₂)	Thermo Electron, Langenselbold
Kühlschrank (4 °C)	Liebherr, Ochsenhausen

MATERIAL UND METHODEN

LightCycler 1.5 TM	Roche, Mannheim
Microplate Reader 680	Biorad, München
Mikroskop „eclipse TS 100“	Nikon, Düsseldorf
Neubauer-Zählkammer	Hartenstein, Würzburg
Pipetten 1000 µl, 100 µl, 10 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Hartenstein, Würzburg
Röntgenbestrahlungsgerät RT 200 (30 Gray/15 min)	C. H. F. Müller, Hamburg
Rührwärmplatte „Yellowline Typ MSH basic“	IKA-Werke, Staufen
Serologische Pipetten „Costar Stripette“ TM (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Zentrallager, Universitätsklinik Würzburg
Software Durchflusszytometer „CellQuest“ TM	Becton Dickinson, Heidelberg
sterile Arbeitsbank „Hera safe“ TM	Thermo Electron, Langenselbold
Stickstofftank (-160 °C – 180 °C)	tec-lab, Königsstein
Test-Röhrchen (Polypropylen) 50 ml, 15 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen
Trockenschrank	Thermo Electron, Langenselbold
Vortex-Schüttler „VortexGenie2“ TM	Scientific Industries Inc., Bohemia, USA
Waage (Ablesbarkeit 0,01 g)	Kern&Sohn, Balingen
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Zellkulturflaschen Cellstar TM 25 cm ² , 75 cm ² , 175 cm ²	Greiner bio-one, Frickenhausen
Zellkulturplatte 24 Vertiefungen („wells“), Flachboden („24-well-Platte“)	Falcon BD (Omnilab, München)
Zellkulturplatte 6 Vertiefungen, Flachboden	Falcon BD (Omnilab, München)
Zellkulturplatte 96 Vertiefungen, Flachboden	Falcon BD (Omnilab, München)
Zellkulturplatte 96 Vertiefungen, Rundboden	Falcon BD (Omnilab, München)

Zentrifugen: Multifuge 3SR+™ Multifuge 3SR™ Microzentrifuge Typ 1-14™	Thermo Electron, Langenselbold Thermo Electron, Langenselbold Sigma Laborzentrifugen, Osterode
--	--

2.4 Präparation von Lymphozyten gesunder Blutspender

Für die Gewinnung von NK-Zellen wurden Lymphozyten aus dem Blut gesunder Spender nach schriftlicher Einverständniserklärung verwendet. Dabei wurde zunächst auf sogenannte Buffy-Coats des Blutspendedienstes des Roten Kreuzes in Frankfurt zurückgegriffen. Diese fallen bei der Aufbereitung des gespendeten Blutes als Nebenprodukte an und enthalten einen erhöhten Anteil an Leukozyten und Thrombozyten. Im Verlauf der Arbeit wurde auf sogenannte Leukozytenreduktionskammern („leukoreduction system chambers“, LRSCs) umgestellt, da diese im Institut für Transfusionsmedizin vor Ort hergestellt wurden und so eine bessere Verfügbarkeit gewährleisteten. Für die LRSCs wurde gezeigt, dass sie sowohl bezüglich der Zellzusammensetzung als auch hinsichtlich der Zelleigenschaften vergleichbar mit Buffy Coats sind [Dietz et al. 2006].

Zur Isolierung der Lymphozyten wurde eine Ficoll-Hypaque Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Dazu wurde das Blut der Buffy-Coats 1:1 und das der LRSCs 1:4 mit PBS verdünnt und jeweils 25 ml des Blut-PBS-Gemischs auf 25 ml Ficoll-Hypaque-Lösung aufgeschichtet. Nach 30 Minuten (min) Zentrifugation war eine Auftrennung der Zellen sichtbar, wobei sich die Population der mononukleären Blutzellen (PBMC) als weißliche Schicht abgrenzt. Die PBMC-Schicht, die neben den Lymphozyten auch Monozyten enthält, wurde abpipettiert und weiter aufbereitet, d.h. zweimal für 10 min mit PBS gewaschen, danach kontaminierende Erythrozyten durch Lysepuffer zerstört und erneut zweimal für 10 min mit PBS gewaschen.

Nach Aufnahme der Zellen in R10-Kulturmedium wurden die PBMC in einer Neubauer-Zählkammer gezählt und dabei gleichzeitig über die Färbung mit

Trypanblau auf ihre Vitalität überprüft und nur dann weiterverwendet, wenn mehr als 90% der Zellen vital waren.

2.5 Polyklonale Expansion von NK-Zellen

Um eine erhöhte Konzentration an NK-Zellen in der PBMC-Suspension zu erreichen, wurde eine Plastikadhärenz durchgeführt, um so die nicht adhärenen Zellen weiterzuverwenden. Es wurde gezeigt, dass Monozyten in der Lage sind, sich an Plastik anzuheften [Kelley et al. 1987; Felzmann T 2003]. Daher wurden jeweils $2,5 \times 10^7$ Zellen in 2,5 ml R10-Medium in eine Vertiefung einer Zellkulturplatte (6-well-Platte) und für 60 bis 75 min in den Inkubator gegeben. Der Überstand, d.h. die nicht adhärenen Zellen bestehen hauptsächlich aus Lymphozyten und werden im Folgenden als PBL (peripheral blood lymphocytes) bezeichnet.

Die polyklonale Expansion von NK-Zellen wurde mit einer Kokultur von PBL mit RPMI 8866-Zellen über acht bis elf Tage erreicht. Die Zelllinie RPMI 8866 hat die Eigenschaft, NK-Zellen zur Expansion anzuregen und gleichzeitig zu aktivieren, was auf IL-12 als „NK-Zell stimulierender Faktor“ zurückzuführen ist [Perussia et al. 1987; Kobayashi et al. 1989; Valiante et al. 1992]. Auf den genannten Publikationen basierend wurde folgendes Protokoll durchgeführt (nach PD Dr. J. Wischhusen, Universität Würzburg, Frauenklinik): 4×10^5 PBL wurden mit 1×10^5 RPMI 8866-Zellen in insgesamt 500 μ l R10-Medium zusammen in 24-well-Platten gegeben. Die RPMI 8866-Zellen wurden vorher bei 30 Gray während 15 min bestrahlt und danach zweimal mit PBS gewaschen, um so die Proliferation der Zellen einzuschränken bei erhaltener Vitalität und Zytokinproduktion. Am 6. Tag der Kokultur wurde je 1 ml R10-Medium zu den Ansätzen gegeben und zwischen Tag 8 und Tag 10 wurde die Reinheit an NK-Zellen sowie der prozentuale Anteil von Monozyten, T- und NKT-Zellen mit Durchflusszytometrie gemessen (s. 2.6.1).

Die mittlere Reinheit an NK-Zellen, die für Experimente zur Messung der Zytotoxizität eingesetzt wurden, lag bei 72,1% (Streubreite 65-80%; n=9), was vergleichbar ist mit publizierten Reinheitsgraden [Torelli et al. 2005]. Die

Kontamination mit Monozyten lag durchschnittlich bei 3,6%, mit T-Zellen bei 15,3% und mit NKT-Zellen bei 8,3% (n=9).

Bei den Experimenten zur Analyse der Degranulation und der Zytokinproduktion der NK-Zellen lag die mittlere NK-Zellreinheit bei 78,5% (Streubreite 58-91%; n=18) und die Kontamination mit Monozyten bei durchschnittlich 4,9%, mit T-Zellen bei 15,3% und mit NKT-Zellen bei 1,2% (n=18).

Neben der Expansion von unbehandelten NK-Zellen erfolgte dieses Experiment auch unter dem Zusatz von Dasatinib. Dabei wurde wie auch bei allen anderen Experimenten konsistent eine Lösungsmittelkontrolle mitgeführt, die soviel Dimethylsulfoxid (DMSO) enthielt, wie in der höchsten Konzentration von Dasatinib enthalten war. Dadurch wurden spezifische Effekte von Dasatinib von Lösungsmittelleffekten differenziert.

2.6 Färbung von Zellen und Durchflusszytometrie

2.6.1 Darstellung von Zellpopulationen im Durchflusszytometer

Zur Charakterisierung und Quantifizierung von Zelleigenschaften bietet die Durchflusszytometrie („Fluorescence activated cell sorting“, FACS) viele Möglichkeiten. Die Zellen werden von einem Kapillarröhrchen angesaugt und das Gerät analysiert die Zellsuspensionen, indem über einen Laserstrahl anhand der Streuung des Lichts Rückschlüsse auf die Größe und die Granularität der Zellen gezogen werden können. Die Messwerte ergeben dabei keine absoluten Werte, sondern stellen relative Aussagen dar, die über die Software gewichtet werden müssen, um z.B. die Größe der Zellen der Empfindlichkeit des Geräts anzupassen.

Daneben können auch spezifische Eigenschaften der Zellen gemessen werden. Dazu müssen die Zellen vorher mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern (z.B. Phycoerythrin gekoppeltes CD 14) oder Farbstoffen (z.B. PKH-26) behandelt werden. Das in dieser Arbeit verwendete Gerät FACS-Calibur kann Fluoreszenzen in vier verschiedenen Wellenlängenbereichen detektieren. Über die Software wurden dabei die Einstellungen sorgfältig auf die Messproben abgestimmt, da die verwendeten Farbstoffe Überlagerungen in ihrem jeweiligen

Wellenlängenbereich zeigen, so dass dieser Effekt vor jeder Messung mit entsprechenden Kontrollen kompensiert werden muss.

2.6.2 Analyse spezifischer Zelleigenschaften und -funktionen

2.6.2.1 Identifikation von NK-Zellen, T-Zellen und Monozyten

Der prozentuale Anteil von NK-, T-, NKT-Zellen und Monozyten wurde über eine Standardfärbung mit monoklonalen Antikörpern am Durchflusszytometer wie folgt bestimmt: 1×10^5 bis 1×10^6 Zellen wurden in FACS-Analyseröhrchen zunächst mit FACS-Puffer gewaschen, dann mit ausreichender Menge an Antikörper für 15 min bei 4 °C inkubiert, danach erneut mit FACS-Puffer gewaschen und mit 100 µl Paraformaldehyd (4%ig) fixiert.

Mit Hilfe der Software des Durchflusszytometers wurden Zelltrümmer von der Analyse ausgeschlossen und danach die Zellen anhand der typischen Oberflächenmarker differenziert. Gemäß gängigen Standards wurden T-Zellen als $CD3^+, CD16^-/56^-$, NK-Zellen als $CD16^+$ und/oder $CD56^+$ („ $CD16^+/CD56^+$ “) sowie $CD3^-$, NKT-Zellen als $CD3^+$ und $CD16^+/CD56^+$ und Monozyten als $CD14^+$ definiert.

2.6.2.2 Zytotoxizitätsversuch

Die Zytotoxizität der NK-Zellen wurde gegenüber K562-Zellen als Zielzellen analysiert, die durch das Fehlen eines MHC-I-Oberflächenmolekül empfindlich für eine Lyse durch die NK-Zellen sind. Dabei wurde als Methode das Prinzip des FATAL-Experiments [Sheehy et al. 2001] mit Modifikationen [Marcusson-Ståhl, Cederbrant 2003; Gómez-Román et al. 2006] verwendet, was eine nicht-radioaktive Alternative zu dem traditionell verwendeten $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungstest darstellt.

2.6.2.2.1 PKH-26 und CFSE-Färbung von K562-Zellen

Das Prinzip der Methode besteht in einer Doppelfärbung der Zielzellen vor der Kokultur von NK-Zellen und Zielzellen, um danach mit Durchflusszytometrie den Anteil an lysierten Zielzellen zu messen. Möglich wird dies durch einen Membranfarbstoff (PKH-26), den die Zellen auch im lysierten Zustand behalten

MATERIAL UND METHODEN

und eines Zytoplasmafarbstoff (CFSE), dessen Intensität sich vermindert, wenn die gefärbte Zelle durch die NK-Zellen lysiert wurde. Das heißt, die Zielzellen wurden durch PKH-26 von den in der Zellsuspension ebenfalls vorhandenen NK-Zellen differenziert und die Zytotoxizität wurde durch den Verlust an CFSE-Farbstoff gemessen.

Die Färbung der K562-Zellen wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Die Zellen wurden mit serumfreiem RPMI gewaschen und in RPMI bei einer Zelldichte von 1×10^6 Zellen/ml resuspendiert. Dann inkubierten die Zellen in 5 μ M PKH-26 für 5 min, wurden dreimal mit R10-Medium, das 10% FCS enthält, gewaschen (1500 rpm, 5 min). Für die Kompensation am Durchflusszytometer wurden ca. 1×10^5 Zellen als eine nur mit PKH-26 gefärbte Kontrolle separiert und mit 100 μ l 4%igem PFA fixiert. Die übrigen PKH-26 positiven K562-Zellen und für eine weitere FACS-Kontrolle auch ungefärbte Zellen wurden wie folgt mit CFSE gefärbt: Zu mit PBS gewaschenen Zellen wurden bei einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml PBS je 25 μ l einer 10 μ M-CFSE-Lösung je 1×10^6 Zellen zugegeben. Nach einer Inkubation von genau 7 min wurde 1 ml FCS zugefügt, um die Färbung zu stoppen, und die Suspensionen wurden dreimal mit PBS gewaschen (1600 rpm, 8 min). Danach wurden die Zellen in der Dichte 1×10^5 Zellen/ml in R10 Medium aufgenommen und ruhten in 24-well Platten (1 ml pro well) über Nacht im Inkubator.

2.6.2.2.2 Zytotoxizitätsversuch: Durchführung und Auswertung

Für den Zytotoxizitätsversuch wurden NK-Zellen und die gefärbten K562-Zellen in 96-well-Platten (mit Rundboden) für 4h bei 37 °C und 5% CO₂ zusammen inkubiert. Variiert wurde das Verhältnis von NK- zu K562-Zellen von 40:1, 10:1, 2,5:1 zu 0,6:1, wobei immer 5000 Zielzellen pro Ansatz eingesetzt wurden. Um dieses Verhältnis möglichst genau zu erreichen, wurde die durchflusszytometrisch ermittelte Reinheit an NK-Zellen mitberücksichtigt, d.h. die absolute Zellzahl mit dem prozentualen Anteil an NK-Zellen multipliziert. Die Messung zur NK-Zellreinheit wurde aus technischen Gründen immer am Vortag des Versuchs durchgeführt, d.h. acht bis zehn Tage nach dem Ansetzen der Kokulturen. Nach den 4h wurden die Zellsuspensionen in FACS-Analysenröhrchen transferiert, einmal mit FACS-Puffer gewaschen und mit

MATERIAL UND METHODEN

4%igem PFA fixiert und umgehend am Durchflusszytometer gemessen. Während der Messung befanden sich die Proben auf Eis und lichtgeschützt unter Alufolie, um Schwankungen der Messergebnisse möglichst gering zu halten, da die Farbstoffe lichtempfindlich sind.

Die Auswertung der Messungen am Durchflusszytometer erfolgte wie erstmals beschrieben von Sheehy et al. (2001) mit Modifikationen [Marcusson-Ståhl, Cederbrant 2003; Gómez-Román et al. 2006].

Die K562-Zellen werden als PKH-26-positive Population von den NK-Zellen abgegrenzt und mit CFSE-Histogrammen analysiert. Abbildung 1 zeigt, wie die Schwelle für die Spontanlyse, d.h. für den spontanen CFSE-Verlust, festgelegt wurde.

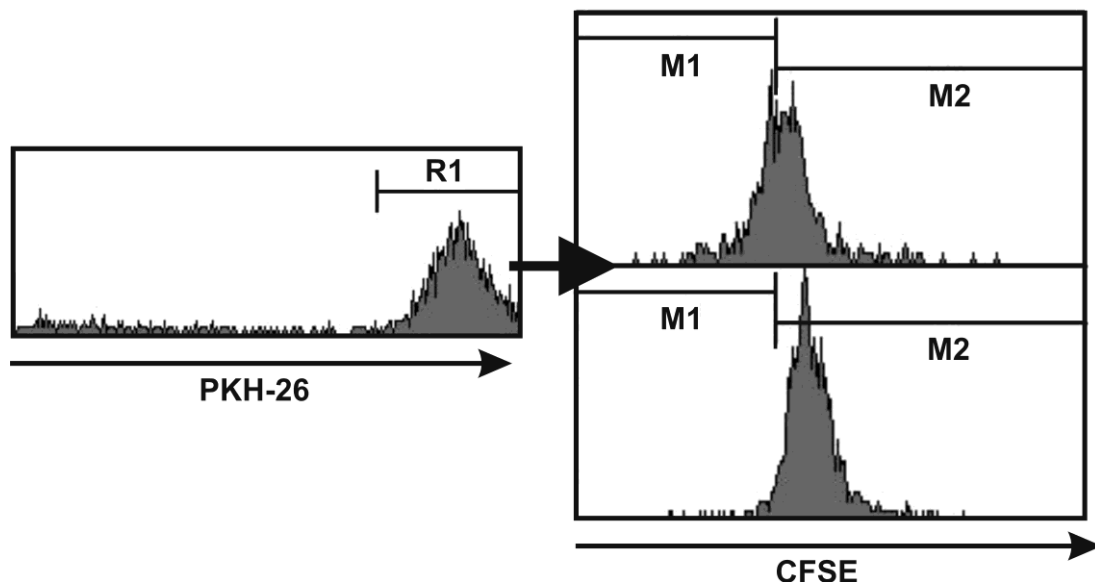


Abbildung 1: Auswertung der Messungen des Zytotoxizitätsversuchs

Über die Abgrenzung „R1“ wurde die PKH-26-positive Zellpopulation, d.h. die K562-Zellen von den ungefärbten NK-Zellen unterschieden und mit CFSE-Histogrammen der Anteil an lysierten K562-Zellen bestimmt. Aus dem Vergleich der Kontrollen mit K562-Zellen alleine (exemplarisches Diagramm rechts unten) mit der höchsten Ratio „40:1“ (rechts oben) erfolgte die Festlegung der Marker M1 und M2, wobei der Bereich M1 den lysierten K562-Zellen entspricht. Damit ergibt sich die Spontanlyse aus dem Zellanteil im Bereich M1 der Kontrollen, die nur K562-Zellen enthalten.

Aus den Triplikaten mit K562-Zellen alleine wurde der mittlere Spontanverlust über das arithmetischen Mittel des im M1-Bereich befindlichen Zellanteils

MATERIAL UND METHODEN

berechnet. Die festgelegte Schwelle, d.h. die Marker M1 und M2, wurde auf alle CFSE-Histogramme der Messproben übertragen, um den CFSE-Verlust von jedem Experimentansatz als den Zellanteil im Bereich M1 bestimmen zu können.

Der effektive Anteil an durch die NK-Zellen lysierten K562-Zellen wurde mit folgender Formel entsprechend zu anderen Publikationen berechnet [Marcusson-Ståhl, Cederbrant 2003]., wobei „x“ dabei als Symbol für den jeweiligen Experimentansatz gilt:

$$\text{Spezifische Lyse (x)} = \frac{\text{CFSE-Verlust (x) [\%]} - \text{mittlerer spontaner CFSE-Verlust [\%]}}{100 - \text{mittlerer spontaner CFSE-Verlust [\%]}}$$

Diese Formel wurde für jeden Experimentansatz über Microsoft Excel angewendet, nachdem die Rohdaten aus CellQuest übertragen worden waren. Die mittlere Spontanlyse von unbehandelten K562-Zellen nach 4h betrug zwischen 3,4 und 10,1% (n=6 in Triplikaten), vergleichbar mit publizierten Daten zu dieser Methode [Marcusson-Ståhl, Cederbrant 2003].

Je nach Versuchsanordnung wurde Dasatinib zugegeben und dabei konsistent eine Lösungsmittelkontrolle mitgeführt. Außerdem wurden sämtliche Ansätze der Zytotoxizitätsversuche in Triplikaten, d.h. dreimal parallel angesetzt, durchgeführt und mindestens dreimal unabhängig voneinander wiederholt.

2.6.2.3 Zelltodanalyse mit Annexin-V-PE und 7-AAD

Um zu evaluieren, ob Dasatinib einen spezifischen Einfluss auf die NK-Zelleffektorfunktionen hat, wurde der Effekt von Dasatinib auf die Viabilität von NK-Zellen und RPMI 8866-Zellen (s. 2.7) analysiert. Dabei muss unterschieden werden zwischen der Apoptose, dem programmierten Zelltod, der über regulierte Signalwege ausgelöst wird, und der Nekrose, die Form des Zelltodes, die eher einer toxischen Schädigung entspricht bzw. auch das Endstadium einer Apoptose darstellt.

Zellen, die sich in der frühen Phase der Apoptose befinden, können durch fluoreszenzmarkiertes Annexin-V (AnnV) durchflusszytometrisch erfasst werden. AnnV bindet an Phospholipide, die während des Apoptosevorgangs an der

MATERIAL UND METHODEN

Plasmamembran der Zelle freigesetzt werden [Schmid et al. 1992; Sgonc, Gruber 1998]. Über den Farbstoff 7AAD wird DNA detektiert, die nicht durch intakte Plasmamembranen geschützt ist. Abgestorbene und nekrotische Zellen sind sowohl 7AAD-positiv als auch AnnV-positiv, während apoptotische Zellen in der frühen Phase nur AnnV-positiv sind und später auch doppelt positiv werden [Sgonc, Gruber 1998]. Demnach wurden apoptotische Zellen als 7-AAD⁻/AnnV⁺ und spätapoptotische, bzw. nekrotische Zellen als 7-AAD⁺ /AnnV⁺ definiert.

Die Färbung erfolgte nach Angaben des Herstellers: Je 1×10^5 Zellen wurden zweimal mit kaltem PBS gewaschen, in 100 μ l Annexin-V-Bindungspuffer resuspendiert, 15 min mit je 2,5 μ l Ann-V-PE und 7-AAD bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde jeweils 200 μ l des Bindungspuffers zugegeben und die Proben wurden innerhalb einer Stunde am Durchflusszytometer gemessen. Zur Identifikation der NK-Zellen wurden jeweils 3 μ l CD16/CD56-APC zum gleichen Zeitpunkt wie AnnV-PE und 7AAD zugegeben.

2.6.2.4 Quantifizierung der Zytokinproduktion (IFN- γ , TNF- α), bzw. des Degranulationsmarkers CD107a/b der NK-Zellen

Um die Produktion von IFN- γ und TNF- α unter Einfluss von Dasatinib zu evaluieren, wurden die mit Hilfe der RPMI 8866-Zellen aus PBL expandierten NK-Zellen mit K562-Zellen oder PMA und Calcium-Ionophor (Ca²⁺-Ionophor) stimuliert und IFN- γ und TNF- α intrazellulär über Durchflusszytometrie wie publiziert gemessen [Alter et al. 2004]. Im Rahmen dieses Experimentes wurde auch die Expression von CD107a/b gemessen, ein Oberflächenmolekül, das als Marker für Degranulation und NK-Zell-Aktivität gilt [Betts et al. 2003; Alter et al. 2004]. Im Detail wurden je $1,5 \times 10^5$ NK-Zellen in 0,2 ml mit Dasatinib, bzw. DMSO für 1h bei 37 °C inkubiert und danach 5 μ l CD107a-FITC und 5 μ l CD107b-FITC zugegeben. Zur Stimulation wurden 2×10^4 K562-Zellen in 10 μ l bzw. als Positivkontrolle PMA (1 nM) und Ca²⁺-Ionophor (0,1 μ g/ml) sowie jeweils 0,2 μ l Golgi Stop und 0,25 μ l Brefeldin A zugegeben. Nach 6h Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen einmal mit 2 ml FACS-Puffer gewaschen (1200 rpm, 5 min), dann mit 5 μ l CD3 PerCP, 3 μ l CD16/CD56 APC

MATERIAL UND METHODEN

gefärbt und 15 min bei 4 °C inkubiert. Im Folgenden wurden die Zellen mit 2 ml FACS-Puffer gewaschen (1200 rpm, 4 min), danach 250 µl BD Cytofix/Cytoperm zugegeben und 20 min bei 4 °C inkubiert. Nach zweimaligen Waschen mit je 2 ml Cytofix (1800 rpm, 4 min) inkubierten die Ansätze mit IFN- γ -PE (0,6 µl) und TNF- α -PE (1,2 µl) für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln und wurden danach mit 2 ml Cytofix wash gewaschen (1800 rpm, 4 min). Die Messung erfolgte am nächsten Tag am Durchflusszytometer, es wurden mindestens 1×10^5 Zellen aufgenommen. Nach Eingrenzung auf alle CD16⁺/CD56⁺ Zellen wurde IFN- γ sowie TNF- α gemeinsam über den PE-Kanal gemessen. Die Ergebnisse stellen daher die Produktion von IFN- γ und/oder TNF- α dar.

Im Rahmen dieses Experimentes wurde auch die Expression von des Oberflächenmoleküls CD107a/b gemessen, das als Marker für die Degranulation und somit die NK-Zell-Aktivität gilt [Betts et al. 2003; Alter et al. 2004]. Die Färbung mit 5 µl CD107a/b-FITC je Ansatz erfolgte nach der Zugabe von Dasatinib, bzw. DMSO. Die Analyse der CD107a/b-Expression wurde ebenfalls eingegrenzt auf CD16⁺/CD56⁺ Zellen ausgewertet.

2.7 Methodvalidierung: Ausschluss von direkten Effekten von Dasatinib auf die Zelllinie RPMI 8866

Für die Aussage, dass Dasatinib einen spezifischen Einfluss auf die NK-Zellen ausübt, ist es notwendig, indirekte Effekte auf die RPMI 8866-Zellen auszuschließen. Da dies eine B-Zelllinie von einer CML-Patientin ist, wurde über mittels RT-PCR (LightCyclerTM t(9;22) Quantifikation Kit) nachgewiesen, dass die Zellen nicht das BCR-ABL Fusionsgen, ein wesentliches Zielmolekül von Dasatinib, besitzen (n=2).

Zum Ausschluss einer zelltodinduzierenden Wirkung von Dasatinib auf die RPMI 8866-Zellen wurden die Zellen in der Dichte 2×10^5 /ml mit 10 nM und 50 nM Dasatinib, bzw. der entsprechenden Menge DMSO behandelt und nach 24h, 48h, 72h und 96h über die AnnexinV/7AAD-Färbung

MATERIAL UND METHODEN

durchflusszytometrisch analysiert. Die Gesamttodesrate war nicht signifikant unterschiedlich bezüglich der unbehandelten Kontrolle ($p > 0,05$; $n=3$; t-Test).

Um einen Effekt auf die IL-12-Sekretion der RPMI 8866-Zellen durch Dasatinib auszuschließen, wurden aus den behandelten und unbehandelten Ansätzen zur NK-Zellexpansion nach 1, 3, 6 und 9 Tagen 400 μ l Zellsuspension entnommen, abzentrifugiert und der zellfreie Überstand bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ tiefgefroren. Mit den Überständen wurde ein ELISA zur Detektion von (p70) IL-12 nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Menge an IL-12 in den unbehandelten Ansätzen lag im Mittel bei 11 pg/ml (Streuung 9 bis 16 pg/ml), was mit der mittleren Zytokinmenge von 21 pg/ml unter 50 nM Dasatinib vergleichbar war (Streuung 7,5 bis 43 pg/ml; jeweils $n=2$). Die gemessene Zytokinmenge entspricht publizierten Daten [Valiante et al. 1992].

2.8 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung und Erstellung der zugehörigen Grafiken erfolgte mit Hilfe des Programms GraphPad Prism (Version 5.0, GraphPad Software, San Diego, CA). Mit „n“ wurde die Anzahl der durchgeführten Experimente bezeichnet. In Grafiken wurde, wenn nicht anders angegeben, das arithmetische Mittel der Einzelwerte sowie der Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt.

Für Experimente, bei denen ein Messwiederholungsfaktor (z.B. Medikament) als Variable vorlag, wurde die statistische Signifikanz auf Basis des t-Tests (zweiseitig, gepaart) von Student berechnet. Dieser Test vergleicht Unterschiede in den Mittelwerten über paarweisen Vergleich. Das statistische Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt, d.h. die Fehlerwahrscheinlichkeit ein zufälliges Ergebnis fälschlich als signifikant zu interpretieren, sollte geringer als 5% sein.

Der Zytotoxizitätsversuch beinhaltete zwei Variablen: das Effektorzell-Zielzell-Verhältnis (Ratio) und das Medikament. Daher wurde hier kein t-Test, sondern „two-way“-ANOVA, d.h. die zweiseitige Analyse der Varianz durchgeführt. Dieser Test analysiert jeden Faktor auf einen signifikanten Effekt, sowie auf gegenseitige Interaktion. Für Einzelvergleiche zwischen den Gruppen wurden

MATERIAL UND METHODEN

Post-Tests nach Bonferroni angewendet, eine Variante des t-Tests mit einer zusätzlichen Fehlerkorrektur für Mehrfachvergleiche. Auch hier galt $p < 0,05$ als statistisches Signifikanzniveau.

Sowohl für den two-way-ANOVA als auch für den t-Test wird eine Normalverteilung als Voraussetzung verlangt. Dies wurde, wenn nicht anders angegeben, bei den Experimenten dieser Arbeit angenommen, soweit die Güte der Daten es zuließ.

Bei der statistischen Testung in dieser Arbeit wurde jeweils der unbehandelte Experimentansatz als Referenzpunkt verwendet und auch die Lösungsmittelkontrolle gegen diese Referenz getestet.

3 ERGEBNISSE

3.1 Langzeiteffekte von Dasatinib auf NK-Zellen

Bei der Untersuchung des Einflusses von Dasatinib auf die Effektorfunktionen von NK-Zellen aus dem Blut gesunder Spender wurde differenziert nach Langzeit- und Kurzzeitwirkungen. Im Folgenden werden der Effekt von Dasatinib auf die Expansion der NK-Zellen und davon abhängige Folgen für die Zytotoxizität und Zytokinproduktion evaluiert, während unter 3.2 die kurzfristige Wirkung von Dasatinib auf unbehandelt expandierte NK-Zellen dargestellt wird. Außerdem wurde unter 3.3 eine indirekte Beeinflussung der Effektorfunktionen von NK-Zellen durch eine Wirkung von Dasatinib auf die Zielzellen K562 evaluiert.

3.1.1 Dasatinib inhibiert dosisabhängig die Expansion von NK-Zellen

In der frühen Phase einer Immunantwort können ruhende NK-Zellen durch Zytokine oder virusinfizierte Zellen aktiviert und zur Expansion angeregt werden.

Um das proliferative Potential von NK-Zellen unter dem Einfluss von Dasatinib zu beurteilen, wurden PBL gesunder Blutspender mit RPMI 8866-Zellen als aktivierenden Stimulus kokultiviert (n=4). Unbehandelt erhöhte sich der NK-Zellanteil der PBL um das 7 bis 38-fache, und es wurde nach 8 Tagen ein prozentualer Anteil von 71% (2,3% SEM) NK-Zellen erreicht. Wurde den Kokulturen an Tag 0, d.h. am Tag der Ansätze, 50 nM Dasatinib zugesetzt, war der mittlere NK-Zell-Anteil nach 8 Tagen mit 9% (3,6% SEM) signifikant erniedrigt (n=4; $p < 0,0001$), und es kam zu keiner Erhöhung der Zellzahl von NK-Zellen. Nach einer Behandlung mit 10 nM Dasatinib war der Anteil von NK-Zellen mit den unbehandelten Experimentansätzen vergleichbar ($p > 0,05$; n=4). Lösungsmittelleffekte konnten ausgeschlossen werden ($p > 0,05$; n=4). Abbildung 2 zeigt den Anteil an NK-Zellen nach der Kokultur von PBL mit RPMI 8866-Zellen nach acht Tagen mit und ohne Zusatz von Dasatinib.

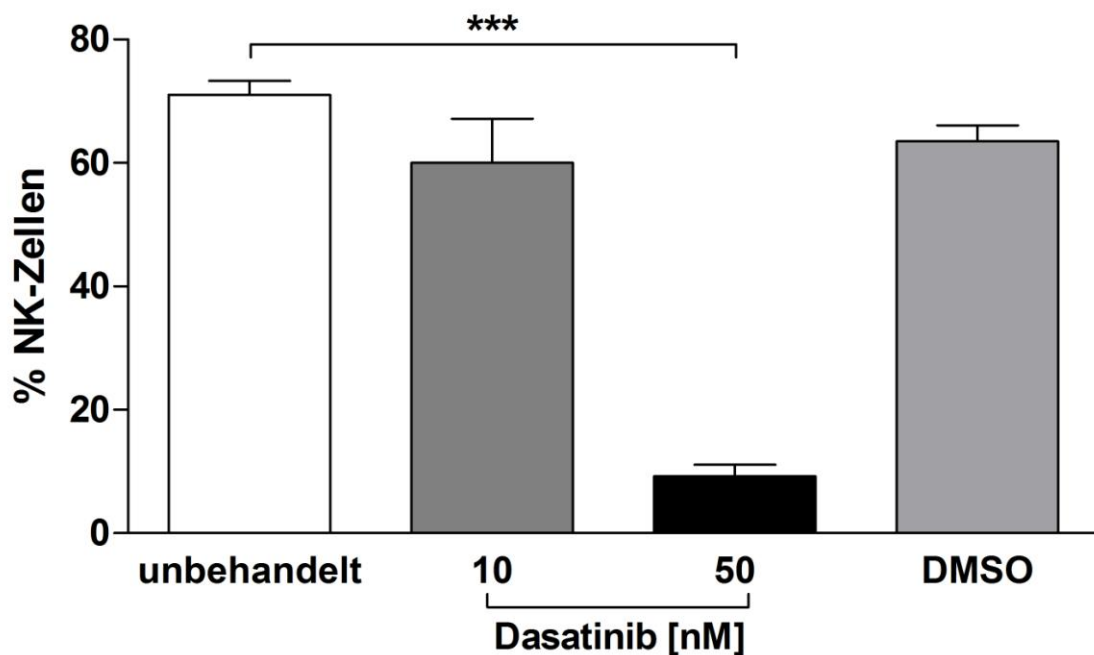


Abbildung 2: Prozentualer Anteil an NK-Zellen (CD16⁺/CD56⁺, CD3⁻) nach 8 Tagen Kokultur von PBL und RPMI 8866-Zellen

Der prozentuale Anteil an NK-Zellen unter 50 nM Dasatinib (schwarzer Balken) war erniedrigt (***) $p < 0,0001$ in Bezug zu der unbehandelten Kontrolle (weißer Balken), während die Unterschiede unter 10 nM Dasatinib (dunkelgrauer Balken) statistisch nicht signifikant waren ($p > 0,05$; jeweils t-Test). Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehler ($n=4$). Die Lösungsmittelkontrolle DMSO (hellgrauer Balken) war mit den unbehandelten Ansätzen vergleichbar ($p > 0,05$).

Die absoluten Zahlen an NK-Zellen in den Kokulturen zeigten eine korrespondierende Entwicklung (vgl. Abb. 3) und gleichzeitig führt Dasatinib nicht zu einem Absterben der Zellen (s. 3.1.2). In der mit 50 nM Dasatinib behandelten Kultur fand keine Vermehrung der NK-Zellen statt ($p=0,016$; $n=4$; vgl. Abb. 3). Die Zellzahlen unter 10 nM Dasatinib und unter dem Einfluss des Lösungsmittels waren mit der unbehandelten Kontrolle vergleichbar, jedoch zeigte sich bei 10 nM Dasatinib ein Trend zu einer geringeren Proliferation ($p > 0,05$; $n=4$).

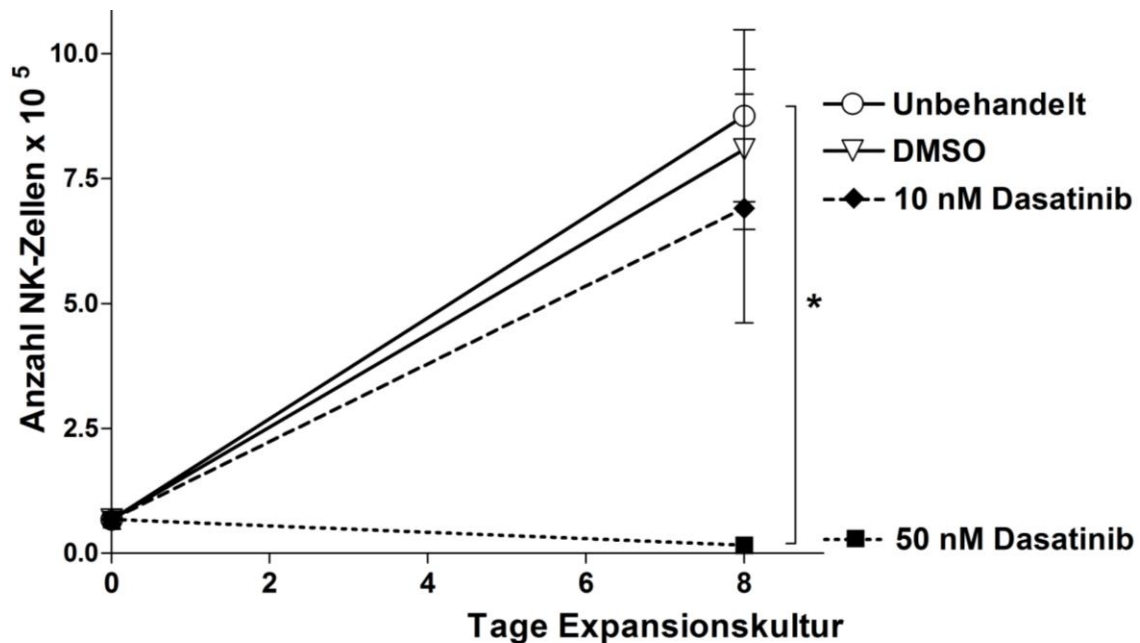


Abbildung 3: Entwicklung der absoluten Zahlen der NK-Zellen in der Expansionskultur

Dargestellt sind die Mittelwerte (+/- SEM) der Anzahl an NK-Zellen bezüglich eingesetzter 4×10^5 PBL und 1×10^5 RPMI 8866-Zellen jeweils initial und nach acht Tagen der Expansionskultur ($n=4$); Die absolute NK-Zellzahl war unter 50 nM Dasatinib (schwarzes Rautensymbol) nach acht Tagen signifikant niedriger bezüglich der unbehandelten Kontrolle (weißes Kreissymbol) (* $p=0,016$). Unter 10 nM Dasatinib (schwarzes Quadrat) zeigte sich ein nicht signifikanter Trend zu einer niedrigeren NK-Zellzahl ($p>0,05$). Lösungsmittelleffekte durch DMSO (weißes Dreieck) lagen nicht vor ($p>0,05$; jeweils t-Test).

Unter 50 nM Dasatinib kam es wie bereits aus der Entwicklung der absoluten Zellzahl ersichtlich zu einer Verringerung der NK-Zellen, wobei, wie unter 3.2 gezeigt wird, kein vermehrtes Absterben der NK-Zellen vorlag, sondern die Proliferation gehemmt wurde.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass Dasatinib dosisabhängig die Proliferation von NK-Zellen aus dem peripheren Blut in Gegenwart von RPMI 8866-Zellen hemmt, wobei unter der hohen Konzentration von 50 nM Dasatinib die Vermehrung der NK-Zellen komplett inhibiert ist, während unter der niedrigen Konzentration von 10 nM noch eine Expansion möglich ist.

3.1.2 Dasatinib erhöht nicht die Gesamttodesrate von NK-Zellen

Die unter 3.1.1 beschriebene Inhibition der Expansion von NK-Zellen durch Dasatinib wurde dahingehend untersucht, ob dieser Effekt auf ein Absterben der Zellen durch Dasatinib zurückgeführt werden kann, bzw. ob die Kinetik der Induktion von Apoptose und Nekrose der NK-Zellen verändert wird. Daher wurden die Experimentansätze zur Expansion der NK-Zellen, d.h. PBL in Gegenwart von RPMI 8866-Zellen nach 24h, 48h, 72h und 96h hinsichtlich apoptotischer (7-AAD⁻/AnnV⁺) und spätapoptotischer, bzw. nekrotischer NK-Zellen (7-AAD⁺/AnnV⁺) analysiert. Die Zugabe von Dasatinib (10 nM, 50 nM), bzw. DMSO erfolgte hierbei in Stunde 0 (n=4).

Es ließ sich zeigen, dass durch Dasatinib weder eine spezifische Erhöhung der Apoptoserate noch der Gesamttodesrate als Summe der 7-AAD⁻/AnnV⁺- und 7-AAD⁺/AnnV⁺-Zellen induziert wurde.

Im Detail waren die Apoptoseraten der NK-Zellen unter 50 nM Dasatinib nach 24h und 48h vergleichbar mit der unbehandelten Referenzkultur ($p > 0,05$) und nach 72h und 96h sogar erniedrigt ($p < 0,02$). Unter 10 nM Dasatinib ($p > 0,05$) sowie bei der Lösungsmittelkontrolle ($p > 0,05$) zeigten sich zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede im Apoptoseverhalten. Der Anteil von spätapoptotischen, bzw. nekrotischen NK-Zellen war weder unter 50 nM, noch unter 10 nM Dasatinib signifikant verändert ($p > 0,05$; Lösungsmittelkontrolle $p > 0,05$). Unter Dasatinib gab es im Vergleich mit den unbehandelten Ansätzen keine Unterschiede in der Gesamttodesrate ($p > 0,05$) bis auf teilweise geringere Raten in den behandelten Experimentansätzen (nach 72h bei 10 nM $p = 0,045$; nach 96h bei 50 nM $p = 0,03$).

Abbildung 4 stellt die Entwicklung der Gesamttodesrate von NK-Zellen in An- oder Abwesenheit von Dasatinib dar. Betrachtet man die Kinetik der Gesamttodesrate der NK-Zellen, so ist der Anteil der toten Zellen in den unbehandelten Ansätzen ansteigend und nach 96h signifikant höher als nach 24h ($p = 0,01$; Lösungsmittelkontrolle $p = 0,04$). Unter 10 nM Dasatinib zeigt sich ebenfalls dieser Trend, wenn auch nicht statistisch signifikant ($p > 0,05$). Die Gesamttodesrate der Ansätze unter 50 nM verändert sich in dieser Zeit kaum ($p > 0,05$). Entsprechend zeigte sich in den Zellkulturen unter 50 nM Dasatinib

nach 96h kein verbrauchtes Medium und eine geringere Zelldichte unter dem Lichtmikroskop im Vergleich zu den entsprechenden Experimentansätzen ohne Zusätze, respektive 10 nM Dasatinib bzw. DMSO.

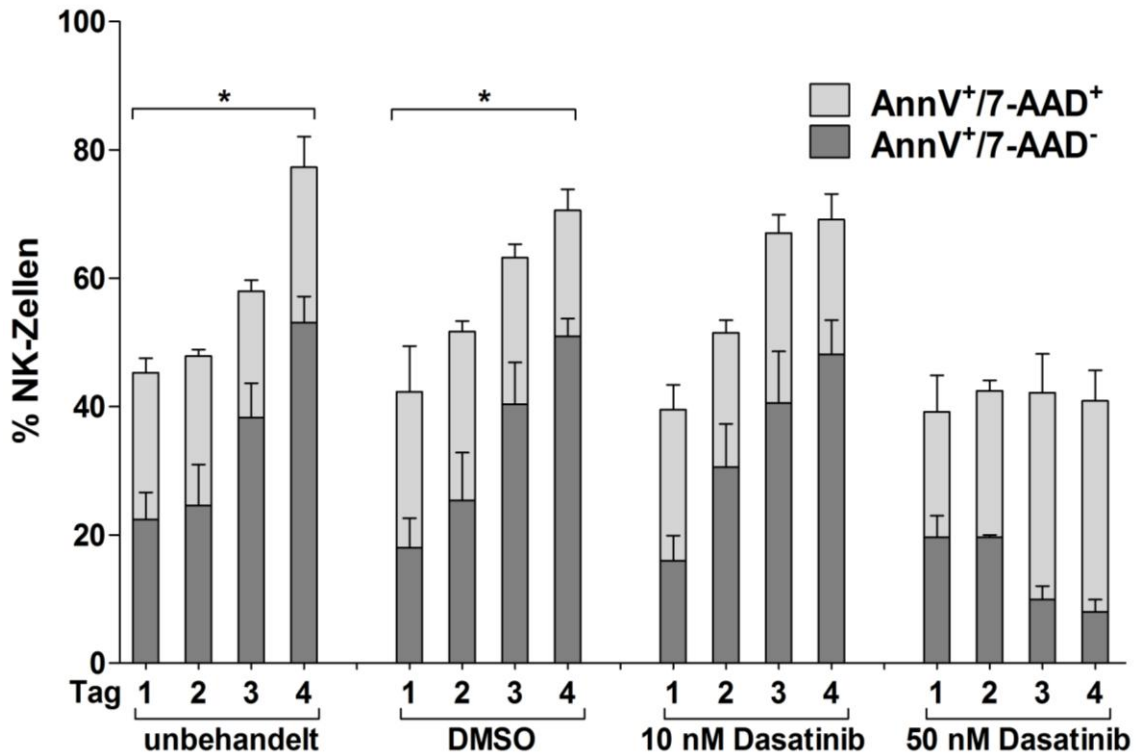


Abbildung 4: Gesamttodesraten von NK-Zellen unter Dasatinib

Dargestellt ist die Gesamttodesrate als Summe der NK-Zellen in Apoptose (AnnV⁻/7-AAD⁺; dunkle Balken) und in später Apoptose/Nekrose (AnnV⁺/7-AAD⁺; helle Balken); NK-Zellen wurden über CD16⁺/CD56⁺ identifiziert und AnnV/7AAD nach 24h, 48h, 72h und 96h gemessen (Mittelwerte mit SEM; n=4). In den unbehandelten Kulturen stieg die Anzahl der toten Zellen im Zeitverlauf an (*p=0,01; DMSO p=0,04), während unter 50 nM Dasatinib konstante Gesamttodesraten (p>0,05) zu sehen waren (jeweils t-Test, Vergleich je nach 24h und 96h).

3.1.3 Expansion der NK-Zellen unter Dasatinib beeinflusst nicht die Zytotoxizität, aber steigert die Degranulation der NK-Zellen

Zur Beurteilung eines protrahierten Effekts von Dasatinib auf NK-Zellen, die unter Dasatinib expandiert sind, wurde die Zytotoxizität gegenüber der MHC-I-defizienten Zelllinie K562 und die Degranulation anhand des

Oberflächenmarkers CD107a/b gemessen. Da die Expansion von NK-Zellen unter 50 nM Dasatinib vollständig inhibiert war (s. 3.1.1), wurden NK-Zellen untersucht, die unter 10 nM Dasatinib in der Kokultur von PBL mit RPMI 8866-Zellen expandiert waren. Vor der Bestimmung der Zytotoxizität und der Degranulationsmarker wurden die behandelten und unbehandelten Experimentansätze zweimal gewaschen und die Experimente ohne weitere Zusätze wie beschrieben durchgeführt. Zur Messung der Zytotoxizität wurden NK-Zellen mit K562-Zellen in den Verhältnissen („Ratio“, jeweils „NK:K562“) „40:1“, „10:1“, „2,5:1“ und „0,6:1“ über 4h inkubiert und die spezifische Lyse über durchflusszytometrische Messung des Verlustes an CFSE-Farbstoff der K562-Zellen quantifiziert.

Die Zytotoxizität war nicht signifikant verändert bei den NK-Zellen, die über acht Tage unter 10 nM Dasatinib oder dem Lösungsmittel expandiert waren ($p > 0,05$, zweiseitige ANOVA, vgl. Abb. 5).

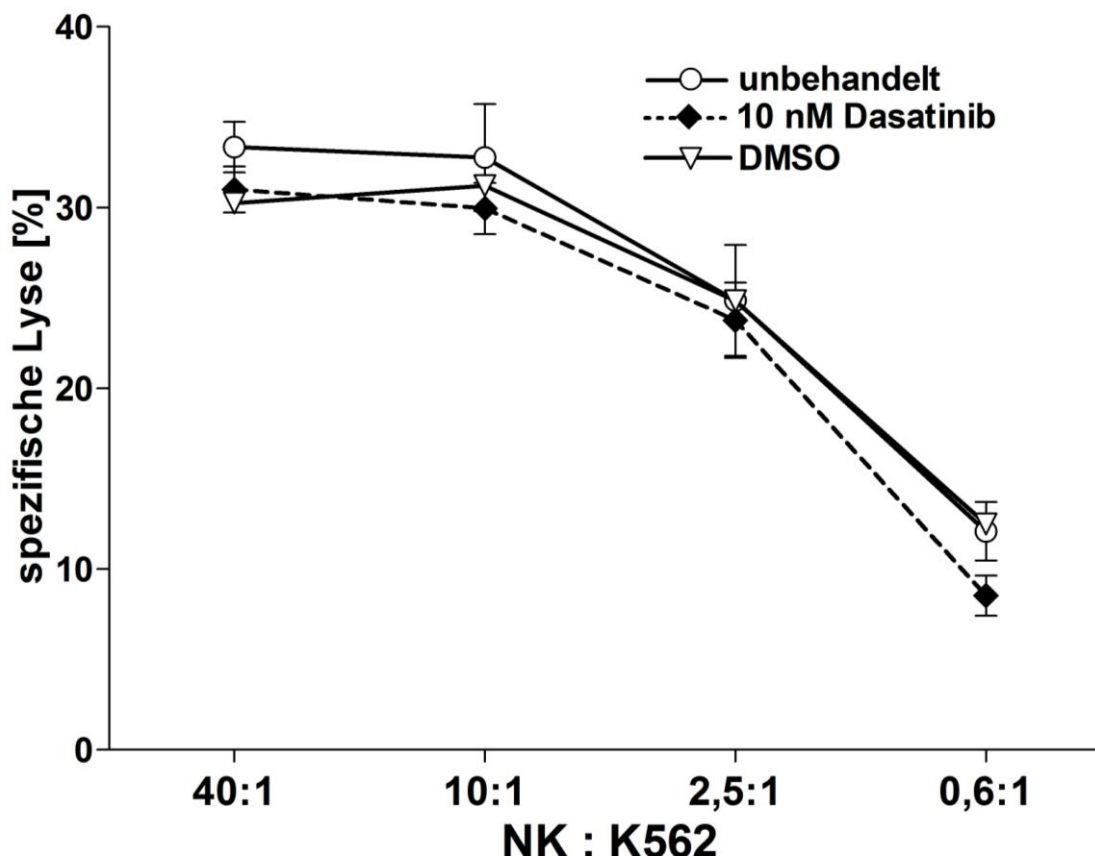


Abbildung 5: Zytotoxizität von NK-Zellen nach Expansion unter 10 nM Dasatinib

Die Zytotoxizität von NK-Zellen, die unbehandelt (weiße Kreissymbole) oder behandelt (schwarze Symbole) expandiert waren, gegenüber K562-Zellen war nicht signifikant verändert (Mittelwerte mit SEM, $p > 0,05$; zweiseitige ANOVA; $n=3$ in Triplikaten). Lösungsmittelleffekte durch DMSO (weißes Dreieckssymbol) wurden ausgeschlossen ($p > 0,05$). Die Zytotoxizität nach einer Expansion unter 50 nM Dasatinib konnte nicht evaluiert werden, da bei dieser Konzentration keine NK-Zellen expandiert waren (s. 3.1.1).

Ein wesentlicher Mechanismus der Zytotoxizität von NK-Zellen ist die Zelllyse über zytotoxische Granula. Während dieses Prozesses wird CD107a/b ein Marker für die lysosomale Exozytose von Granula, auf der Oberfläche der NK-Zellen exprimiert [Alter et al. 2004]. Über die Messung von CD107a/b mit Durchflusszytometrie kann die Degranulation der NK-Zellen quantifiziert werden. Dazu wurden die NK-Zellen während 6h mit K562-Zellen zusammen inkubiert und so zur Degranulation stimuliert. Bei NK-Zellen, die unter 10 nM

Dasatinib expandiert waren und nach Entfernen des Medikaments mit K562-Zellen stimuliert wurden, war die Expression von CD107a/b signifikant gesteigert gegenüber den unbehandelt expandierten NK-Zellen ($p=0,02$; $n=5$; vgl. Abb. 6). Lösungsmittelleffekte konnten ausgeschlossen werden ($p>0,05$; $n=5$).

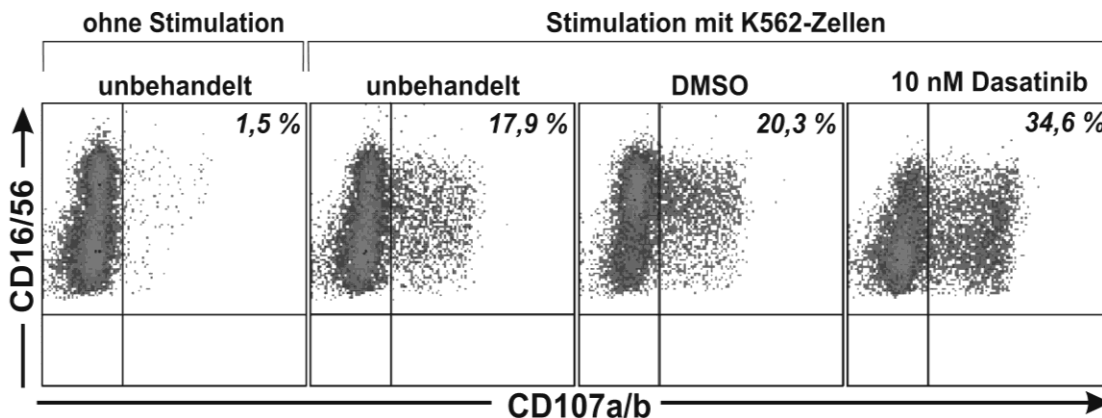


Abbildung 6: Steigerung des Degranulationsmarkers CD107a/b nach NK-Zellexpansion unter 10 nM Dasatinib

Dargestellt sind FACS-Diagramme eines repräsentativen von insgesamt 5 unabhängigen Experimenten, welche die Expression von CD107a/b bei NK-Zellen ($CD16^+/CD56^+$) zeigen. Ohne Stimulation durch K562-Zellen (linkes Diagramm) fand sich nur ein kleiner Anteil an NK-Zellen, die CD107a/b exprimieren (1,5%). Mit Stimulation zeigte sich eine signifikante Hochregulation von CD107a/b bei NK-Zellen, die unter 10 nM Dasatinib expandiert waren (34,6%, s. rechtes Diagramm; $p=0,02$; t-Test; $n=5$) gegenüber unbehandelt expandierten NK-Zellen (17,9%). Lösungsmittelleffekte durch DMSO lagen nicht vor ($p>0,05$).

3.1.4 Expansion der NK-Zellen unter Dasatinib führt zu gesteigerter Zytokinproduktion

Die Zytokinproduktion stellt neben der Zytotoxizität die wichtigste Effektorfunktion der NK-Zellen dar. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Zytokine $IFN-\gamma$ sowie $TNF-\alpha$ in der durchflusszytometrischen Messung zusammengefasst, d. h. es wird die Produktion von $IFN-\gamma$ und/oder $TNF-\alpha$ dargestellt. Um einen langfristigen Einfluss von Dasatinib auf die Produktion

von IFN- γ bzw. TNF- α zu evaluieren, wurden NK-Zellen, die behandelt oder unbehandelt über neun bis zehn Tage expandiert waren, nach zweimaligem Waschen mit K562-Zellen stimuliert und die nachfolgende Produktion von Zytokinen gemessen. Bei den NK-Zellen, die unter 10 nM Dasatinib expandiert waren, war die Produktion von TNF- α /IFN- γ signifikant gesteigert gegenüber der unbehandelten Kontrolle ($p=0,049$; $n=4$; t-Test; vgl. Abb. 7). Lösungsmittelleffekte konnten ausgeschlossen werden ($p>0,05$; $n=4$). Die Zytokinproduktion nach einer Expansion unter 50 nM Dasatinib konnte nicht evaluiert werden, da bei dieser Konzentration keine NK-Zellen expandiert waren (s. 3.1.1).

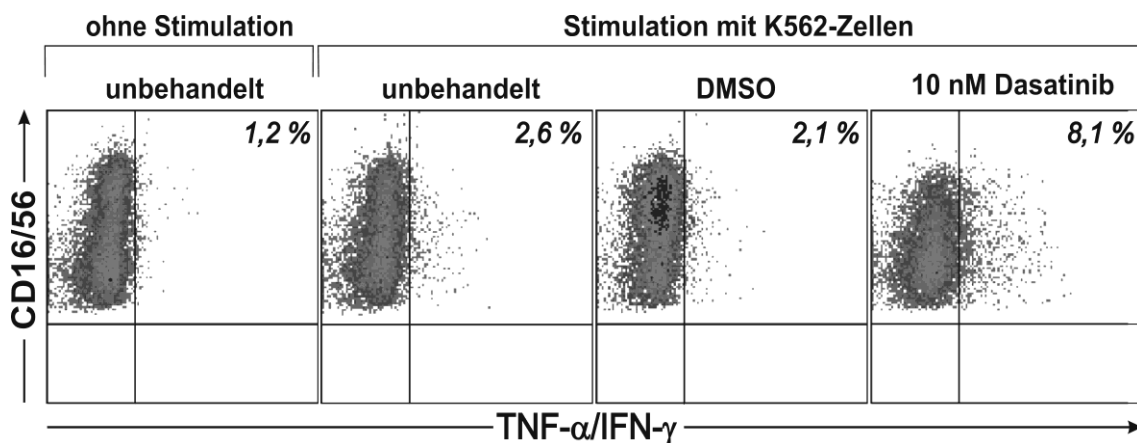


Abbildung 7: Zytokinproduktion von NK-Zellen nach Expansion unter Dasatinib

Dargestellt sind exemplarische FACS-Diagramme eines von vier unabhängigen Experimenten. Über Durchflusszytometrie wurde intrazelluläres TNF- α und IFN- γ bei NK-Zellen ($CD16^+/CD56^+$) gemessen. Ohne Stimulation durch K562-Zellen fand sich kaum Zytokinproduktion (1,2%; linkes Diagramm), während sich unter Stimulation eine Steigerung auf 2,6% bei unbehandelt expandierten NK-Zellen zeigte. NK-Zellen, die unter 10 nM Dasatinib expandiert waren, produzierten signifikant mehr TNF- α bzw. IFN- γ im Vergleich mit der unbehandelten stimulierten Kontrolle (8,1%; rechtes Diagramm; $p=0,049$; $n=4$, t-Test). Bei der Lösungsmittelkontrolle DMSO fand sich keine signifikante Steigerung ($p>0,05$; $n=4$).

3.2 Kurzzeiteffekte von Dasatinib auf NK-Zellen

Bei Anwesenheit von Dasatinib während der Expansion der NK-Zellen im Sinne einer langfristigen Exposition konnte eine Inhibition der Proliferation ohne Auswirkung auf die Zytotoxizität der NK-Zellen gegenüber K562-Zellen gezeigt werden. Dagegen fand sich eine Steigerung der Degranulation sowie der Zytokinproduktion. Um die Wirkung von Dasatinib auf NK-Zellen umfassend zu beurteilen, wurde außerdem der Einfluss auf die Effektorfunktionen von expandierten NK-Zellen bei kurzfristiger Exposition evaluiert.

3.2.1 Dasatinib inhibiert dosisabhängig die Zytotoxizität und die Degranulation von NK-Zellen

Zur Evaluation einer kurzfristigen Wirkung von Dasatinib auf die Zytotoxizität wurde das Medikament während des Experiments (4h) zugesetzt. Die verwendeten NK-Zellen stammten aus einer unbehandelten Expansionskultur.

Ohne Medikamentenzusatz fand sich bei einer Ratio von 40:1 eine mittlere spezifische Lyse von 33,6% (SEM 1,5%), während unter 50 nM Dasatinib die mittlere spezifische Lyse bei 14,8% lag (SEM 4,0%; $p < 0,001$; zweiseitige ANOVA; jeweils $n=3$ in Triplikaten).

Die Zytotoxizität der NK-Zellen war bezüglich aller verwendeten NK-Zell:K562-Zell Ratios bei 20 nM und 50 nM Dasatinib signifikant erniedrigt ($p < 0,5$). Bei einer Konzentration von 10 nM Dasatinib war der inhibitorische Effekt insgesamt geringer ausgeprägt, jedoch fanden sich signifikant niedrigere Werte der spezifischen Lyse bei einer Ratio von 10:1 und 2,5:1 ($p < 0,01$). Unter der Lösungsmittelkontrolle DMSO wurden für jede Experimentbedingung Einflüsse ausgeschlossen ($p > 0,05$; jeweils $n=3$ in Triplikaten).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass Dasatinib dosisabhängig die spezifische Lyse von K562-Zellen durch unbehandelt expandierte NK-Zellen inhibiert (vgl. Abb. 8).

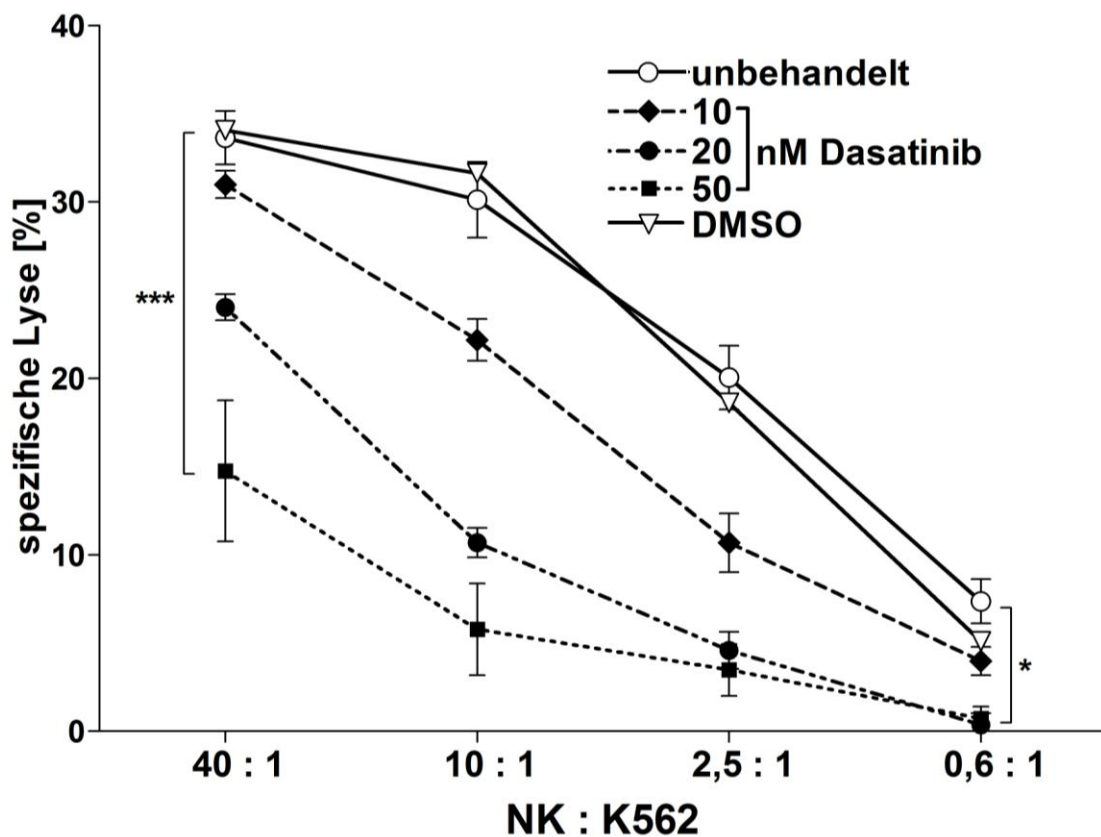


Abbildung 8: Einfluss von Dasatinib auf die Zytotoxizität von unbehandelt expandierten NK-Zellen

Dargestellt ist die spezifische Lyse (Mittelwerte mit SEM) von K562-Zellen durch NK-Zellen in den angezeigten NK-Zell-K562-Ratios („NK : K562“). Unter Dasatinib war die spezifische Lyse dosisabhängig verringert. Bei einer Konzentration von 20 nM (schwarze Kreissymbole) und 50 nM Dasatinib (schwarze Quadrate) war der inhibitorische Effekt in jeder Ratio signifikant gegenüber der unbehandelten (weiße Kreissymbole) Kontrolle (jeweils $***p < 0,001$ für „40:1“, „10:1“, „2,5:1“ und $*p < 0,05$ für „0,6:1“). Für 10 nM Dasatinib (schwarze Rauten) zeigte sich bei den Ratios von „10:1“ und „2,5:1“ zu einer signifikanten Inhibition ($p < 0,01$). Einflüsse der Lösungsmittelkontrolle (weißes Dreieckssymbol) konnten für jede Experimentbedingung ausgeschlossen werden ($p > 0,05$). Die Signifikanztestung erfolgte jeweils mit zweiseitiger ANOVA ($n=3$ in Triplikaten).

Zur näheren Charakterisierung des inhibitorischen Effekts von Dasatinib auf die Zytotoxizität auf NK-Zellen wurde die Expression des Degranulationsmarkers

CD107a/b evaluiert. Dazu wurden unbehandelt expandierte NK-Zellen mit K562-Zellen stimuliert und die Ausprägung von CD107a/b mit und ohne Zusatz von Dasatinib gemessen. Es ließ sich ebenfalls eine dosisabhängige Hemmung der Expression von CD107a/b durch Dasatinib feststellen (Bei 50 nM $p=0,002$; bei 10 nM $p=0,0068$; Lösungsmittelkontrolle $p>0,05$; t-Test; jeweils $n=9$). Bei einer Stimulation der NK-Zellen mit PMA/Ca²⁺Ionophore an Stelle von K562-Zellen konnte kein signifikanter Einfluss von Dasatinib in den Konzentrationen 100 nM, 50 nM und 10 nM festgestellt werden ($p>0,05$; $n=3$).

3.2.2 Dasatinib inhibiert dosisabhängig die Zytokinproduktion von NK-Zellen bei Stimulation mit K562-Zellen

Die Zytotoxizität und Degranulation von NK-Zellen ist bei direkter Anwesenheit von Dasatinib dosisabhängig inhibiert. Um den Einfluss auf die Produktion der Zytokine TNF- α bzw. IFN- γ zu beurteilen, wurde Dasatinib unbehandelt expandierten NK-Zellen in den Konzentrationen 10 und 50 nM zugesetzt. Neben IL-12, welchem die NK-Zellen im Rahmen der Kokultur mit RPMI 8866-Zellen ausgesetzt waren, wurden als Stimulantien K562-Zellen, bzw. PMA/Ca²⁺Ionophor verwendet. Bei einer Stimulation mit K562-Zellen war die Zytokinproduktion in Anwesenheit von Dasatinib dosisabhängig gehemmt gegenüber dem unbehandelten stimulierten Kontrollansatz ($p=0,0016$ für 50 nM; $p=0,0042$ für 10 nM Dasatinib; $n=10$; vgl. Abb. 9A). Lösungsmittelleffekte konnten ausgeschlossen werden ($p>0,05$; $n=10$). Dagegen kam es zu keiner signifikanten Veränderung durch Dasatinib in der Zytokinproduktion, wenn die NK-Zellen durch PMA/Ca²⁺Ionophor stimuliert wurden ($p>0,05$; $n=3$; vgl. Abb. 9B; jeweils t-Test).

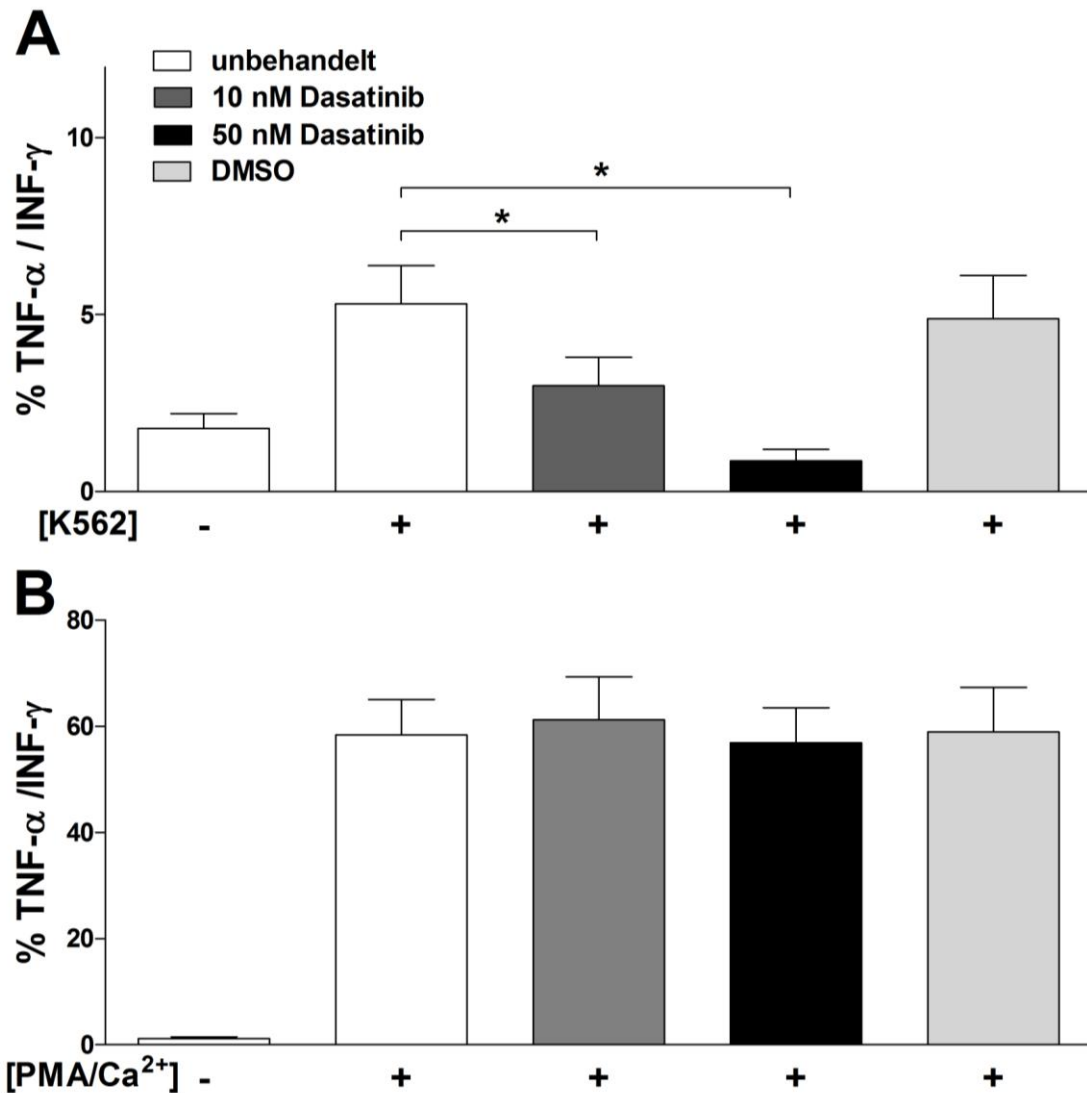


Abbildung 9: Inhibition der Zytokinproduktion von NK-Zellen durch Dasatinib bei Stimulation mit K562-Zellen

In einer Kokultur mit K562-Zellen („K562“, obere Grafik „A“) bzw. nach Zugabe von PMA/Ca²⁺ Ionophor („PMA/Ca²⁺“, untere Grafik „B“) für 6h wurden unbehandelte NK-Zellen zur Produktion von TNF- α bzw. INF- γ stimuliert (Stimulation: „+“; unbehandelt: weiße Balken). Zugabe von Dasatinib (dunkle Balken) 1h vor dem Stimulanz führte zur einer Hemmung der Zytokinproduktion bei Stimulation durch K562-Zellen ($p=0,0016$ für 50 nM; $p=0,0042$ für 10 nM Dasatinib; $n=10$), nicht aber bei Stimulation durch PMA/Ca²⁺ Ionophor ($p>0,05$; $n=3$; jeweils t-Test). Dargestellt sind Mittelwerte mit SEM an intrazellulär mit Durchflusszytometrie gemessenem TNF- α bzw. INF- γ . Lösungsmittelleffekte durch DMSO (hellgraue Balken) konnten jeweils ausgeschlossen werden ($p>0,05$; $n=10$ für „A“; $p>0,05$; $n=3$ für „B“).

3.3 Indirekte Effekte auf NK-Zelleffektorfunktionen nach Vorbehandlung von K562-Zellen mit Dasatinib

Um eine indirekte Wirkung von Dasatinib auf die Effektorfunktionen von NK-Zellen durch eine Beeinflussung der K562-Zellen zu evaluieren, wurden die Experimente zur Zytotoxizität und Zytokinproduktion mit K562-Zellen durchgeführt, die 24h mit Dasatinib vorbehandelt wurden und außerdem die Spontanlyse von K562-Zellen unter Dasatinib analysiert.

3.3.1 Dasatinib führt nach 24, aber nicht nach 4 Stunden zu einer erhöhten Spontanlyse von K562-Zellen

K562-Zellen wurden mit Dasatinib über 4 bzw. 24h behandelt, um Veränderungen der Spontanlyse durch das Medikament zu beurteilen.

Die Spontanlyse von K562-Zellen unter Dasatinib wurde im Rahmen der Experimente zur Zytotoxizität durchgeführt, d.h. der spontane Verlust des CFSE-Farbstoffes als Spontanlyse der K562-Zellen gemessen. Die Spontanlyseraten von K562-Zellen nach 4h lag in den unbehandelten Ansätzen im Mittel bei 5,8% (SEM 0,85%) und war vergleichbar mit der mittleren Spontanlyse von 6,6% (SEM 1,2%) unter 50 nM Dasatinib ($p > 0,05$; jeweils $n=3$ in Triplikaten; vgl. Abb. 11A). Nach 24h dagegen führte die Behandlung mit 50 nM Dasatinib zu einer Erhöhung der Spontanlyse von K562-Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ($p=0,035$; $n=3$ in Triplikaten; vgl. Abb. 11B).

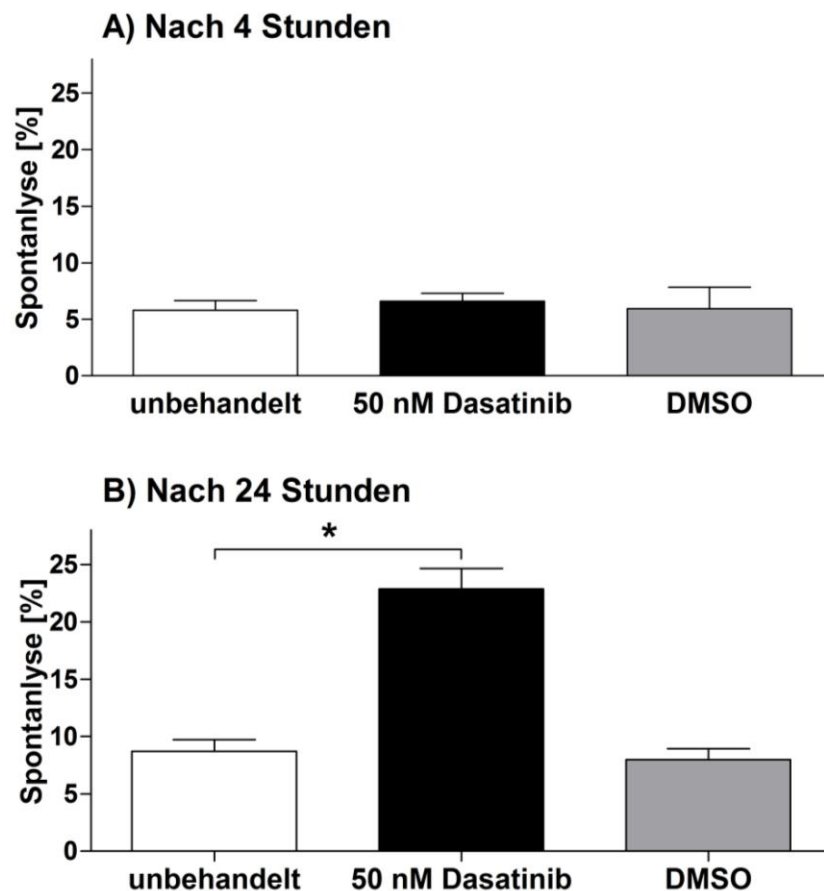


Abbildung 10: Spontanlyse von K562-Zellen

Dargestellt ist der Anteil von spontan lysierten K562-Zellen nach A) 4h, bzw. B) 24h Behandlung mit 50 nM Dasatinib (Mittelwerte mit SEM). Die Spontanlyse wurde als spontaner Verlust des CFSE-Farbstoffes über Durchflusszytometrie analysiert. Nach 24h, aber nicht nach 4h war die Spontanlyse unter 50 nM Dasatinib (schwarze Balken) signifikant erhöht gegenüber der unbehandelten (weiße Balken) Kontrolle (* $p=0,035$; jeweils $n=3$ in Triplikaten; t-Test). Lösungsmittelleffekte durch DMSO (hellgrauer Balken) konnten ausgeschlossen werden ($p>0,05$).

3.3.2 Vorbehandlung von K562-Zellen mit Dasatinib führt zu verminderter Zytotoxizität und Degranulation der NK-Zellen

Um eine Veränderung des NK-Zell-Lyseverhaltens durch Effekte von Dasatinib auf die Zielzellen K562 zu evaluieren, wurden die zytotoxische Aktivität von unbehandelten NK-Zellen gegenüber K562-Zellen, die 24h mit 50 nM Dasatinib vorbehandelt wurden, gemessen. Dazu wurden die Zielzellen wie beschrieben

mit CFSE und PKH-26 gefärbt und nach einer Ruhephase über Nacht für 24h mit 50 nM Dasatinib behandelt. Vor dem Zytotoxizitätsversuch wurde das Medikament durch zweimaliges Waschen von den Ansätzen entfernt und das Experiment mit unbehandelten NK-Zellen und ohne Zusätze durchgeführt. Die mit 50 nM Dasatinib vorbehandelten K562-Zellen wurden signifikant weniger durch die NK-Zellen lysiert ($p < 0,001$ für Ratio „10:1“, „2,5:1“, „0,6:1“; $n=3$ in Triplikaten; zweiseitige ANOVA; vgl. Abb. 11).

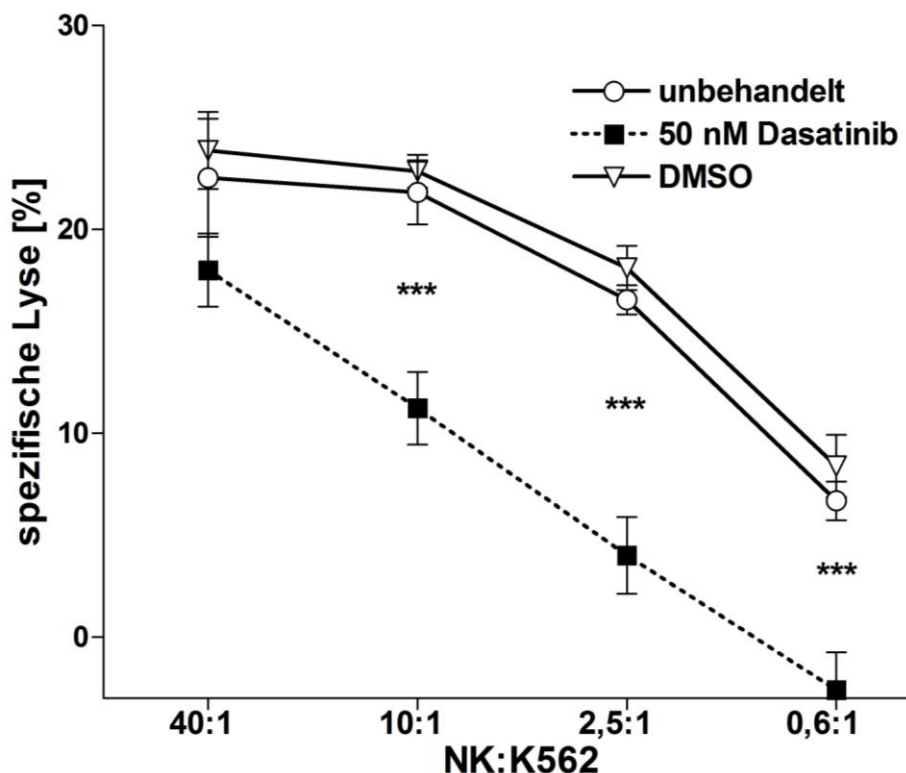


Abbildung 11: Spezifische Lyse von K562-Zellen nach Vorbehandlung mit Dasatinib

Dargestellt ist die spezifische Lyse von K562-Zellen (Mittelwerte \pm SEM), die 24h mit 50 nM Dasatinib vorbehandelt wurden (schwarze Symbole, unbehandelte Kontrolle mit weißen Kreissymbolen). Dasatinib war im Zytotoxizitätsversuch nicht anwesend und die NK-Zellen waren unbehandelt expandiert. Die spezifische Lyse war bei den mit 50 nM Dasatinib vorbehandelten K562-Zellen signifikant erniedrigt mit Ausnahme der Ratio „40:1“ (***) $p < 0,001$; $n=3$ in Triplikaten, zweiseitige ANOVA). Lösungsmittelleffekte konnten für jede Experimentbedingung ausgeschlossen werden ($p > 0,05$; weißes Dreieckssymbol). Die Werte kleiner 0 bei der Ratio „0,6:1“ sind dadurch bedingt, dass die mittlere Spontanlyse teilweise geringfügig höher war als die jeweilige spezifische Lyse [Borg et al. 2004].

Die Degranulationsaktivität von unbehandelten NK-Zellen, gemessen als Expression von CD107a/b, war ebenfalls signifikant erniedrigt, wenn die NK-Zellen mit K562-Zellen stimuliert wurden, die mit 10 nM, bzw. 50 nM Dasatinib über 24h vorbehandelt worden waren ($p=0,004$ für 10 nM; $p=0,0006$ für 50 nM Dasatinib; $n=7$). Das Medikament wurde dabei vor dem Experiment zur Analyse von CD107a/b von den K562-Zellen über zweimaliges Waschen entfernt. Die Lösungsmittelkontrolle war nicht signifikant verändert ($p>0,05$; $n=7$; jeweils t-Test; vgl. Abb. 12)

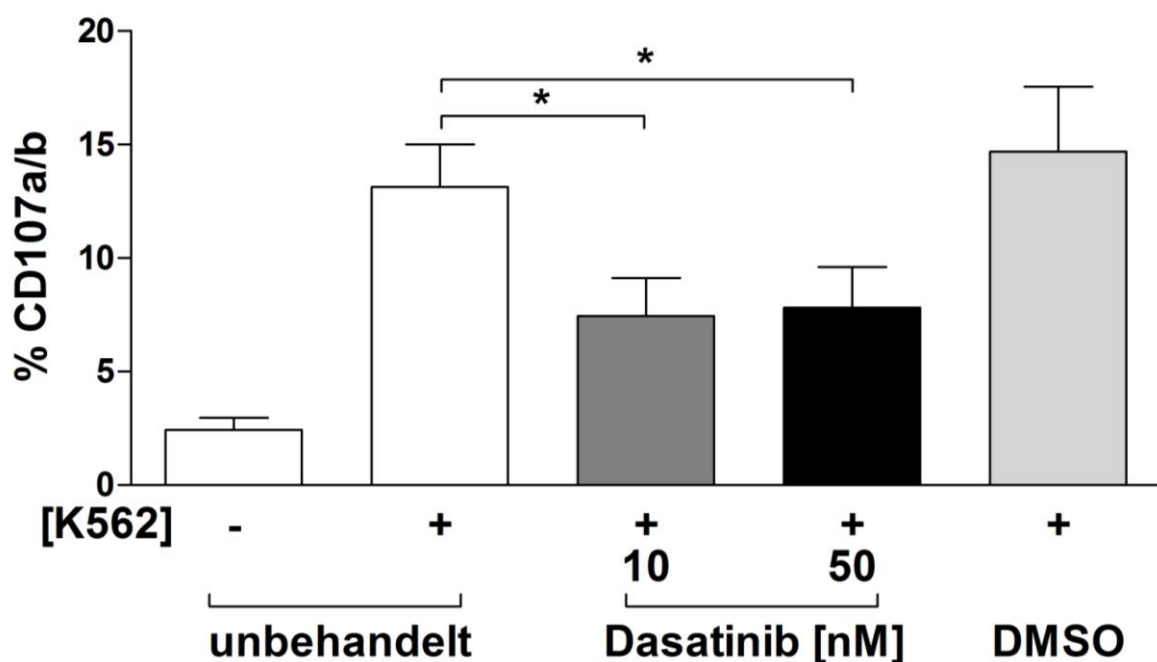


Abbildung 12: Expression von CD107a/b von unbehandelten NK-Zellen nach Stimulation mit vorbehandelten K562-Zellen

Unbehandelte NK-Zellen wurden mit K562-Zellen stimuliert, die 24h mit 10 nM und 50 nM Dasatinib vorbehandelt worden waren. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehler von CD107a/b exprimierenden NK-Zellen ohne („-“ und mit Stimulation („+“). Eine Vorbehandlung der K562-Zellen mit 10 nM (dunkelgrauer Balken) und 50 nM (schwarzer Balken) Dasatinib über 24h führte zu einer signifikanten Inhibition der Expression von CD107a/b gegenüber einer Stimulation mit unbehandelten (weißer Balken) K562-Zellen (* $p<0,004$; $n=7$; t-Test); Lösungsmittelleffekte durch DMSO (hellgrauer Balken) konnten ausgeschlossen werden ($p>0,05$; $n=7$).

3.3.3 Die Zytokinproduktion von NK-Zellen ist vermindert bei Stimulation mit Dasatinib vorbehandelten K562-Zellen

Nicht nur die Zytotoxizität und Degranulationsaktivität von NK-Zellen ist supprimiert gegenüber mit Dasatinib vorbehandelten K562-Zellen. Auch die Zytokinproduktion von unbehandelten NK-Zellen ist signifikant erniedrigt, wenn K562-Zellen für die Stimulation verwendet werden, die 24h mit 10 nM und 50 nM Dasatinib vorbehandelt wurden. Der Hemmeffekt ist dosisabhängig ausgeprägt: Bei einer Vorbehandlung der K562-Zellen mit 50 nM Dasatinib lag die Produktion von TNF- α bzw. IFN- γ auf dem Niveau der unstimulierten Kontrolle ($p > 0,05$; $n=8$). Dagegen zeigte der Vergleich mit den Kontrollen, bei der mit unbehandelten K562-Zellen stimuliert wurde, eine ausgeprägte Hemmung der Zytokinproduktion durch Dasatinib ($p=0,008$; $n=8$). Eine Vorbehandlung mit 10 nM Dasatinib führte zu einem geringer ausgeprägten, aber signifikanten Hemmeffekt ($p=0,01$; $n=8$). Lösungsmittelleffekte konnten ausgeschlossen werden ($p > 0,05$; $n=8$).

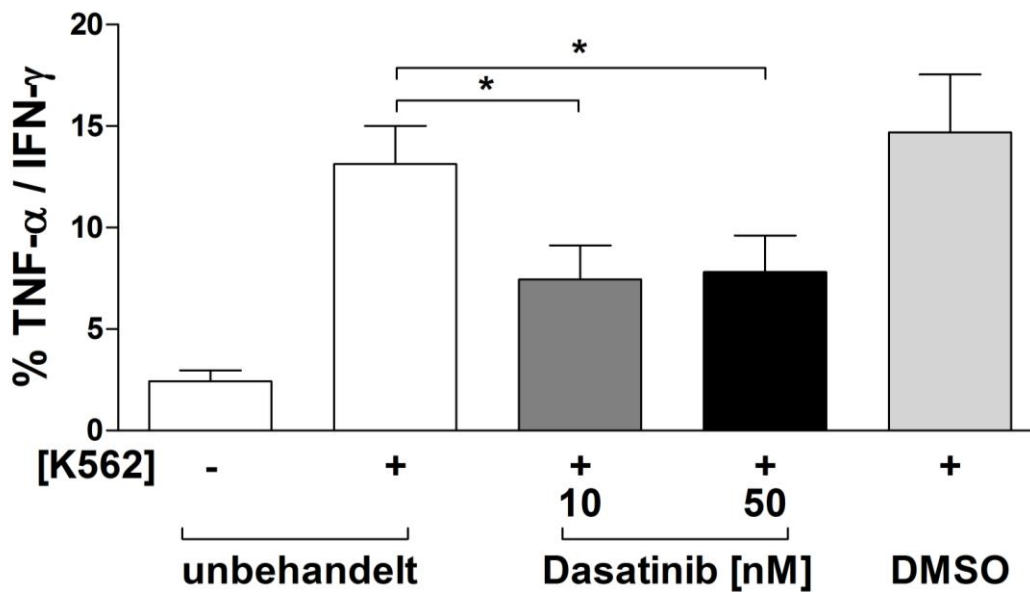


Abbildung 13: Zytokinproduktion von NK-Zellen nach Stimulation mit vorbehandelten K562-Zellen

Dargestellt ist der Anteil an NK-Zellen, bei denen die Produktion von TNF- α bzw. IFN- γ durchflusszytometrisch über eine intrazelluläre Färbung gemessen wurde (Mittelwerte mit SEM; n=8). Bei einer Stimulation mit K562-Zellen („+“), die mit 10 nM (dunkelgrauer Balken) und 50 nM Dasatinib (schwarzer Balken) vorbehandelt worden waren, zeigte sich signifikant weniger Zytokinproduktion im Vergleich mit der Kontrolle, bei der mit unbehandelten K562-Zellen stimuliert wurde (* p=0,008 für 50 nM; p=0,01 für 10 nM; jeweils n=8; t-Test). Eine Vorbehandlung der K562-Zellen mit 50 nM Dasatinib führte zu einem Absinken der Zytokinproduktion auf das Niveau der unstimulierten („-“, weißer Balken) Kontrolle (p>0,05; n=8). Für das Lösungsmittel DMSO (hellgrauer Balken) konnten Einflüsse ausgeschlossen werden (p>0,05; n=8).

4 DISKUSSION

Dasatinib reguliert die Haupteffektorfunktionen von NK-Zellen gesunder Blutspender: Die Expansionskapazität von NK-Zellen aus peripheren Blutlymphozyten wird dosisabhängig und bei 50 nM Dasatinib vollständig inhibiert, ohne dass dies zu einem Absterben der NK-Zellen führt. Die Zytotoxizität ist nach Entfernen des Medikamentes restauriert, bzw. die Degranulationskapazität und die Zytokinproduktion sogar gesteigert.

Bei unbehandelt expandierten NK-Zellen hemmt Dasatinib dosisabhängig die zytotoxische Aktivität und Degranulation gegenüber K562-Zellen und führt zu einer geringeren Zytokinproduktion bei einer Stimulation mit K562-Zellen. Eine indirekte Veränderung des Lyseverhaltens der NK-Zellen durch Effekte von Dasatinib auf die K562-Zellen findet sich nicht nach vier, aber nach 24h im Sinne einer erhöhten Spontanlyse, aber geringeren spezifischen Lyse. Eine 24h-Vorbehandlung der K562-Zellen mit Dasatinib führt außerdem zu einer verminderten Degranulationsaktivität und Zytokinproduktion der NK-Zellen.

4.1 Dasatinib inhibiert die Expansion von NK-Zellen, deren Effektorfunktionen restaurierbar sind

Es konnte gezeigt werden, dass Dasatinib in der hohen Konzentration von 50 nM die Expansion von NK-Zellen in Gegenwart von RPMI 8866-Zellen vollständig inhibiert. Da dieser Effekt nicht auf ein Absterben der NK-Zellen durch das Medikament zurückgeführt werden kann, ist dies ein spezifischer Effekt auf das proliferative Potential der NK-Zellen. Unter der niedrigen Konzentration von 10 nM Dasatinib konnte eine Proliferation von NK-Zellen stattfinden, auch wenn ein Trend zu niedrigeren Zellzahlen sichtbar war. Demnach inhibiert Dasatinib die Expansion der NK-Zellen dosisabhängig und lässt bei 10 nM, aber nicht bei 50 nM, noch eine Proliferation zu.

In der Kinetik des Apoptoseverhaltens von NK-Zellen fanden sich nach drei und vier Tagen in den unbehandelten Expansionskulturen höhere Apoptoseraten als bei Behandlung mit 50 nM Dasatinib. Möglicherweise ist dies durch die Hochregulation des sogenannten Todesrezeptors Fas auf den unbehandelten

NK-Zellen erklärbar, über den bei IL-12-aktivierten NK-Zellen Apoptose im Sinne eines sogenannten „activation-induced cell death“ induziert wird [Leite-de-Moraes et al. 2000]. Die Aktivierung und auch der Zelltod nach bzw. durch die Aktivierung könnte durch Dasatinib bei den mit 50 nM behandelten NK-Zellen gestört sein.

Möglicherweise kann dieser Effekt über eine Hemmung von Src-Kinasen erklärt werden, die in die Signaltransduktion einer über IL-12 stimulierten Proliferation von NK-Zellen involviert sind. Eine wichtige Rolle könnte dabei die Tyrosinkinase Lck spielen, die von Dasatinib in klinisch relevanten Konzentrationen inhibiert wird [Hantschel et al. 2008]. Es wurde gezeigt, dass eine Stimulation mit IL-12 in vitro eine Lck-Autophosphorylierung bewirkt und somit Lck in den Signaltransduktionsweg einer IL-12-Aktivierung von NK-Zellen involviert ist [Pignata et al. 1995]. Wie bereits dargelegt wurde IL-12 als der NK-stimulierende Faktor in der Kokultur von RPMI 8866 und PBL identifiziert [Kobayashi et al. 1989] und ein direkter Einfluss von IL-12 auf die Proliferation von NK-Zellen belegt [Perussia et al. 1992].

Betrachtet man die Effektorfunktionen von NK-Zellen, die unter 10 nM Dasatinib expandiert sind, so war nach Entfernen des Medikaments die Zytotoxizität gegenüber K562-Zellen vollständig restauriert und die Degranulationskapazität und Zytokinproduktion sogar gesteigert. Die Diskrepanz einer erhöhten Degranulation bei einer nicht gesteigerten Zytotoxizität könnte durch eine erhöhte Sensitivität der Messung der Degranulationsmarker CD107a/b im Vergleich mit dem Zytotoxizitätsversuch erklärt werden. Möglicherweise wird aber auch durch das Entfernen des Medikamentes nach der Expansion unter 10 nM Dasatinib eine reaktive Überexpression von CD107a/b induziert, die nicht zu einer erhöhten Lyseaktivität führt im Sinne eines Verbrauchs der zytotoxischen Granula. Eine ähnliche These einer „nicht-produktiven Degranulation“ wurde von Jacobi und Kollegen formuliert, die einen inhibitorischen Effekt von intravenösen Immunglobulinen (IVIg) auf die Zytotoxizität von NK-Zellen bei gleichzeitig vermehrter Expression von CD107a zeigten [Bhat, Watzl 2007; Jacobi et al. 2009].

Im Hinblick auf die klinische Anwendung von Dasatinib könnten diese Ergebnisse ein Hinweis sein, dass nach Absetzen des Medikaments die Effektorfunktionen der NK-Zellen vollständig erhalten sind, bzw. für die Zytokinproduktion sogar eine Steigerung erwartet werden kann. Die Rolle der NK-Zellen in der Immunabwehr wäre dann nicht kompromittiert, bzw. es liegt möglicherweise auch eine gewisse Aktivierung durch eine erhöhte Zytokinproduktion vor. Eine reversible Wirkung des Medikaments würde eine gute Steuerbarkeit im klinischen Einsatz bedeuten. Sowohl unerwünschte als auch erwünschte Wirkungen könnten so balanciert werden. Myelosuppression oder Pleuraergüsse, die zu den schwerwiegenden Nebenwirkungen von Dasatinib gehören, sind im Allgemeinen bei Dosisreduktion oder Pausieren der Medikation rückläufig [Cortes et al. 2007; Brave et al. 2008].

Auf molekularer Ebene ist die Reversibilität der Wirkung von Dasatinib am ehesten dadurch bedingt, dass Dasatinib ein kompetitiver Enzyminhibitor ist und somit aus der Bindung an ATP-Bindungsstellen in der Kinasedomäne verschiedener Tyrosinkinase wieder verdrängt werden kann [Shah et al. 2004]. Prinzipiell wäre es denkbar, dass eine verminderte Expansionsfähigkeit der NK-Zellen unter Dasatinib negative Auswirkungen auf die Immunantwort gegenüber Tumorzellen hat. Zunächst widersprüchlich zu den Daten meiner Arbeit erscheinen Veröffentlichungen, die von einer plötzlich auftretenden klonalen Expansion von NK- oder NKT-Zellen bei Patienten berichten, die mit Dasatinib im Rahmen einer CML oder einer Ph(+)-ALL behandelt wurden, was mit einer besseren Prognose verbunden war [Kim et al. 2009; Mustjoki et al. 2009]. Diskutiert wurde als Ursache eine transitorische Immunmodulation durch Dasatinib [Mustjoki et al. 2009], bzw. dass NK-Zellen, die über die BCR-ABL Mutation in ihrer Aktivität gehemmt wurden, durch Dasatinib ihr Potential restaurieren [Kim et al. 2009]. Es gibt Hinweise für eine veränderte Funktion von NK-Zellen im Rahmen einer CML, die auf BCR-ABL zurückgeführt wird [Nakajima et al. 2002]. In der Studie von Mustjoki und Kollegen haben einige Patienten vor der Therapie mit Dasatinib und der nachfolgend beobachteten Expansion einzelner Klone von Lymphozyten eine allogene Stammzelltransplantation erhalten [Mustjoki et al. 2009]. Der Effekt von

Dasatinib auf das Expansionspotential von NK-Zellen ist daher möglicherweise abhängig vom präexistenten Status des Immunsystems, der im Rahmen der CML oder ALL, iatrogen oder den Prozess der Stammzelltransplantation verändert sein kann. Die inhibitorische Wirkung von Dasatinib auf die Expansion der NK-Zellen, die im Rahmen dieser Arbeit gezeigt wurden, ist möglicherweise durch ein anderes Verhalten der NK-Zellen von gesunden Spendern im Gegensatz zu den NK-Zellen von Leukämiepatienten zu erklären. Denkbar wäre auch die Induktion einer reaktiven Dynamik im proliferativen Potential der NK-Zellen durch Dasatinib. In der Studie von Mustjoki und Kollegen zeigte sich die NK/T-Lymphozytose nach einem Zeitraum von etwa drei Monaten [Mustjoki et al. 2009]. Möglicherweise ging diesem Ereignis eine Periode von supprimierter NK-Zellexpansion voraus, der durch unbekannte Faktoren eine reaktive überschießende Expansion folgt. Kim und Kollegen stellten neben einer Expansion der NK/NKT-Zellen während der Dasatinib-Therapie zusätzlich eine gesteigertes zytotoxisches Potential der NK-Zellen fest [Kim et al. 2009]. Die Daten dieser Arbeit belegen eine gesteigerte Degranulationskapazität bei erhaltener Zytotoxizität sowie eine gesteigerte Zytokinproduktion, nachdem NK-Zellen über acht Tage mit Dasatinib behandelt wurden und das Medikament entfernt wurde. Möglicherweise kam es zu einem Absinken der Serumkonzentration von Dasatinib und nachfolgend zu einer gesteigerten Aktivität und Expansion der NK-Zellen, was das gute klinische Ansprechen der Patienten in diesen Publikationen erklären könnte.

4.2 Direkte Anwesenheit von Dasatinib inhibiert dosisabhängig die Zytotoxizität und Degranulation von NK-Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ich, ebenso wie Blake (2008) und Salih und Kollegen (2010), nachweisen, dass Dasatinib in vitro dosisabhängig die Zytotoxizität von NK-Zellen aus dem Blut gesunder Spender gegenüber K562-Zellen inhibiert [Blake et al. 2008; Salih et al. 2010]. Darüber hinaus konnte ich

für Dasatinib eine Hemmung der Degranulation der NK-Zellen bei Stimulation mit K562-Zellen, nicht aber bei Stimulation mit PMA/Ca²⁺Ionophor zeigen. Für die Zielzellen K562 stellt die Exozytose von zytotoxischen Granula den relevanten Mechanismus der Lyse durch NK-Zellen dar [Smyth et al. 2005]. PMA stimuliert die Proteinkinase C (PKC) und Ca²⁺Ionophor transportiert Calcium über biologische Membranen [Pressman 1976; Gerard 1986]. Calcium ist essentiell für die Degranulation und wird direkt durch Ca²⁺Ionophor intrazellulär erhöht. Die PKC spielt in einer späteren Phase der Signaltransduktion der NK-Zellen eine Rolle als die Src-Kinasen [Yatin M. Vyas 2002; Lanier 2008]. Werden die NK-Zellen durch K562-Zellen zur Degranulation stimuliert, findet im Gegensatz zu einer Stimulation mit PMA der gesamte Prozess der Signalübertragung statt. Dieser schließt die Rezeptorinteraktion und deren intrazelluläre Signalweiterleitung ein, bei der Dasatinib-empfindliche Src-Kinasen an entscheidenden Schnittstellen stehen. Der inhibitorische Effekt von Dasatinib auf die Degranulation bei einer Stimulation mit K562-Zellen im Gegensatz zur Stimulation mit PMA/Ca²⁺Ionophor spricht für eine spezifische Aktion auf die SRC-Kinasen in der frühen Phase der Signalübertragung. Dazu passt eine andere Publikation, die für den Src-Kinasen-Inhibitor PP2 eine Inhibition der Degranulation zeigen konnte, wobei hier die NK-Zellen durch Antikörper von CD16 oder sowohl von 2B4 als auch von NKG2D aktiviert wurden [Yenan T. Bryceson 2006]. Nicht nur auf der Ebene der Degranulation gibt es potentielle Zielmoleküle, über die der inhibitorische Effekt von Dasatinib auf die Zytotoxizität der NK-Zellen vermittelt werden kann. Die Adhäsion zwischen NK-Zelle und Zielzelle wird über die Interaktion von Rezeptoren, z.B. LFA-1 der NK-Zelle und ICAM-1 der Zielzelle, vermittelt, deren Signaltransduktion von der Dasatinib-empfindlichen Src-Kinase Fyn abhängig ist [Bernardini et al. 2005; Hantschel et al. 2008]. Das Wirkspektrum von Dasatinib umfasst außerdem eine Reihe von Src-Kinasen, die bei den inhibierenden und aktivierenden Rezeptoren auf der Oberfläche der NK-Zellen an entscheidenden Stellen der Signalübertragung stehen. Eine Rolle könnten dabei Lck und Fyn spielen, die bei vielen aktivierenden Rezeptoren, u.a. NKG2D, für die Signalweiterleitung zu ERK- und MAP-Kinase-assoziierten

Signalwegen verantwortlich sind [Yatin M. Vyas 2002; Billadeau et al. 2003; Raffaella Augugliaro 2003]. Unter Dasatinib wurde eine verminderte Aktivierung des ERK-Signalweg in NK-Zellen gezeigt [Salih et al. 2010].

Die Übertragbarkeit des inhibitorischen Effekts von Dasatinib auf die Zytotoxizität von NK-Zellen in vitro auf die klinische Anwendung wird gestützt von einer aktuellen Publikation, die für Dasatinib im Mausmodell eine Hemmung der zytotoxischen Aktivität von NK-Zellen zeigt [Fraser et al. 2009].

Klinisch könnte sich eine reduzierte Zytotoxizität der NK-Zellen für den Patienten ungünstig auswirken, da die NK-Zellen die erste Instanz bei der Abwehr von Tumor- und virusinfizierten Zellen darstellen. Bei Patienten mit Myelodysplastischem Syndrom, einer Stammzellerkrankung mit ineffektiver Blutbildung und potentieller Progression zu einer akuten myeloischen Leukämie, scheint es einen Zusammenhang zwischen einer reduzierten zytotoxischen Aktivität der NK-Zellen und der Prognose zu geben [Epling-Burnette et al. 2007]. Bisläng gibt es keine Daten, die ein Auftreten von Sekundärtumoren oder einen Tumorprogress, der auf Dasatinib zurückzuführen ist, belegen. Da das Medikament erst seit 2006 zugelassen ist, muss in weiteren klinischen Studien evaluiert werden, ob der Effekt auf die NK-Zellen ein reales Risiko für den Patienten darstellt. In einer aktuellen klinischen Studie zur Anwendung bei CML zeigte sich nach zwei Jahren ein dauerhaftes und gutes Therapieansprechen sowie ein gegenüber Imatinib besseres progressionsfreies Überleben [Kantarjian et al. 2009].

Während einer Behandlung mit Dasatinib kann es zu einem gehäuften Auftreten von Infektionen kommen, darunter auch von atypischen Erregern wie *Pneumocystis carinii*, wobei in diesem Zusammenhang vor allem eine potentiell gleichzeitig vorliegende Myelosuppression ursächlich sein kann [Talpaz et al. 2006; Steinberg 2007; Sillaber et al. 2009]. Aber auch eine verringertes zytotoxisches Potential der NK-Zellen könnte eine erhöhte Rate an viralen Infekten erklären. Patienten mit einer kompromittierten NK-Zellfunktion leiden an rezidivierenden Infektionen, hauptsächlich durch Viren bedingt [Biron et al. 1999; Janka 2007]. Im Zusammenhang mit einer eingeschränkten NK-Zellfunktion könnte auch ein Einzelfall einer akuten Parvovirus B19-Infektion

sowie einer Reaktivierung von Cytomegalivirus und Herpesvirus 6 während einer Dasatinib-Therapie stehen [Garcia-Munoz et al. 2007].

Möglicherweise stellt Dasatinib eine Therapiealternative bei einigen Autoimmunerkrankungen wie rheumatoide Arthritis, Zöliakie, multipler Sklerose und Diabetes Typ I dar, bei denen eine Rolle von NK-Zellen gezeigt wurde [Bahram et al. 2005; Eagle, Trowsdale 2007]. Für den Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib wurden eine positive Beeinflussung einer therapie-refraktären rheumatoiden Arthritis nachgewiesen [Eklund, Joensuu 2003]. Möglicherweise kann Dasatinib aber auch über bisher noch ungeklärte Mechanismen autoimmune Reaktionen begünstigen. So wird in einem Einzelfallbericht von systemischem Lupus bei einem Patienten nach einer Behandlung mit Dasatinib das immunmodulatorische Potential des Medikamentes dafür verantwortlich gemacht [Rea et al. 2008]. Bei Patienten mit systemischen Lupus erythematodes wurde im Gegensatz zu Patienten mit rheumatoider Arthritis eine erniedrigte zytotoxische Aktivität von NK-Zellen festgestellt [Park et al. 2009]. Möglicherweise erklärt die Inhibition der NK-Zellfunktionen durch Dasatinib, insbesondere der Zytotoxizität, die Entwicklung eines systemischen Lupus in dem publizierten Einzelfall.

Um Autoimmunerkrankungen besser zu behandeln, ist das Verständnis der Pathogenese entscheidend. Bei der Multiplen Sklerose wird die Rolle der NK-Zellen kontrovers diskutiert. Einige Autoren sehen die NK-Zelle als pathogenen Faktor, da sie autoreaktive T-Zellen stimulieren, während andere Studien eine protektive Rolle der NK-Zellen belegen [Lünemann et al. 2008; Winkler-Pickett et al. 2008; Lünemann et al. 2009]. Da Dasatinib neben der Hemmung von NK-Zellfunktionen zusätzlich wesentliche T-Zellfunktionen inhibiert [Schade et al. 2008; Weichsel et al. 2008], kann möglicherweise durch eine effiziente synergistische Immunmodulation eine Besserung der autoreaktiven Krankheitsprozesse erreicht werden.

4.3 Direkte Anwesenheit von Dasatinib inhibiert spezifisch und dosisabhängig die Zytokinproduktion von NK-Zellen

Die Produktion der Zytokine TNF- α bzw. IFN- γ ist neben der Zytotoxizität die wichtigste Effektorfunktion der NK-Zellen. Dasatinib inhibiert dosisabhängig und spezifisch die Zytokinproduktion von NK-Zellen, was ich und kürzlich auch Salih und Kollegen zeigen konnten [Salih et al. 2010]. Die Daten dieser Arbeit belegen dabei eine differentielle Rolle von Dasatinib: Bei einer Stimulation mit K562-Zellen, nicht aber mit PMA/Ca²⁺ Ionophor wird die Zytokinproduktion der NK-Zellen gehemmt. Es wurde bereits dargestellt, dass die Stimulantien PMA/Ca²⁺ Ionophor in einer späteren Phase der Signaltransduktion, d.h. nach der Rekrutierung der PKC wirken. Daher kann auch hier von einem spezifischen Effekt von Dasatinib auf die SRC-Kinasen in der frühen Phase der intrazellulären Signaltransduktion der Rezeptoren der NK-Zelle ausgegangen werden.

Aktivierende Signale für die Zytokinproduktion werden vor allem über IL-12 zusammen mit Kostimulatoren vermittelt [Caligiuri 2008]. Die verwendeten NK-Zellen wurden mit der IL-12 produzierenden Zelllinie RMPI 8866 expandiert. Daher kommt bei einer Stimulation mit K562-Zellen am ehesten der NKG2D-Rezeptor als Koaktivator in Betracht, der durch die Liganden MIC-A bzw. MIC-B (MHC-class-I-polypeptide-related sequence A bzw. B) und ULBPs (UL-16-binding proteins) auf der Oberfläche der K562-Zellen aktiviert wird [Li et al. 2008]. Sowohl die Signaltransduktion des IL-12-Rezeptors als auch des NKG2D-Rezeptors ist abhängig von Dasatinib-empfindlichen Src-Kinasen [Lombardo et al. 2004; Manley et al. 2005; Ilaria Tassi 2006].

Eine Hemmung der Zytokinproduktion der NK-Zellen könnte das Mikromilieu einer Immunreaktion beeinflussen, da die NK-Zellen über IFN- γ T-Zellen und über TNF- α dendritische Zellen aktivieren [Agaugue et al. 2008]. Auf diesem Weg könnte sich indirekt eine immunsuppressive Wirkung manifestieren. Auch die direkte Wirkung von IFN- γ auf virusinfizierte Zellen könnte so durch

geringere Zytokinspiegel vermindert sein und damit die Abwehr von Virusinfektionen beeinträchtigen.

4.4 Indirekte Effekte von Dasatinib: Vorbehandlung von K562-Zellen mit Dasatinib inhibiert NK-Zelleffektorfunktionen

Der inhibitorische Effekt bei direkter Anwesenheit von Dasatinib auf die Zytotoxizität der NK-Zellen gegenüber K562-Zellen kann bei einer Expositionsdauer von 4h Dasatinib nicht auf eine erhöhte Spontanlyse der K562-Zellen zurückgeführt werden und somit als eine Wirkung auf die NK-Zellen gewertet werden. Nach 24h jedoch induzierte Dasatinib bei den K562-Zellen sowohl eine erhöhte Spontanlyse, als auch eine verringerte Empfindlichkeit gegenüber der Zytotoxizität der NK-Zellen.

Die Erhöhung der Spontanlyse nach 24h lässt sich am ehesten mit einer erhöhten Apoptoserate erklären, da gezeigt wurde, dass Dasatinib bei den K562-Zellen Apoptose induziert, was mit einer Blockade von des Transkriptionsfaktors STAT5 („signal transducer and activator of transcription 5“) in Verbindung gebracht wird. Signalwege, die über STAT5 laufen, sind sowohl von BCR-ABL als auch von Src-Kinasen abhängig, welche von Dasatinib inhibiert werden [Nam et al. 2007].

Die spezifische Lyse von mit 50 nM Dasatinib vorbehandelten K562-Zellen durch unbehandelte NK-Zellen ist signifikant vermindert. Dieser Effekt ist unabhängig von der erhöhten Spontanlyse nach 24h Dasatinib, da bei der Berechnung der spezifischen Lyse (s. 2.6.2) die Spontanlyse von der Gesamtyse subtrahiert und das Ergebnis auf die Zellen, die nicht spontan lysiert sind, bezogen wird. Das heißt, dass Dasatinib nach 24h die Empfindlichkeit der K562-Zellen vermindert und dies nicht auf die erhöhte Spontanlyse zurückzuführen ist.

Eine verminderte Suszeptibilität im Zeitfenster von 24h ist am ehesten durch Veränderungen in der Rezeptorexpression der K562-Zellen bedingt, da eine relevante Hoch- oder Runterregulation ein Zeitfenster von mindestens 4 bis 24h

beansprucht [Gasser et al. 2005]. Von Salih und Kollegen wurde eine Verminderung der Expression der Liganden des NKG2D-Rezeptors MIC-A/B auf K562-Zellen durch Dasatinib belegt [Salih et al. 2010]. Diese zeigten ebenso wie ich eine verminderte Zytotoxizität und eine verminderte Zytokinproduktion der NK-Zellen bei Stimulation mit K562-Zellen, die 24h mit Dasatinib vorbehandelt wurden, was möglicherweise auf eine verminderte Expression MICA/B zurückgeführt werden kann. Veränderungen in der Expression des aktivierenden NKG2D-Rezeptors werden mit der Immunevasion von Tumorzellen in Verbindung gebracht [Krockenberger et al. 2008], was auch bei den korrespondierenden Liganden, wie beispielsweise MIC-A beobachtet wurde [Friese et al. 2004; Oppenheim et al. 2005]. Eine verminderte Suszeptibilität der K562-Zellen als BCR-ABL-positive CML-Zelllinie gegenüber der Zytotoxizität von NK-Zellen könnte ein Modell für die Evasion von Tumorzellen sein. Eine verminderte Stimulation zur Zytokinproduktion kann zu diesem Effekt beitragen, da sowohl weniger proinflammatorische Moleküle vorhanden sind, als auch T-Zellen und dendritische Zellen weniger für ihre Aktivierung essentielle Signale erhalten. NK-Zellen spielen bei leukämischen Erkrankungen eine wichtige Rolle bei der Eradikation von ruhenden Stammzellen (CD34+), die für eine nicht komplette Heilung der CML-Erkrankung verantwortlich gemacht werden. Zwar zeigt Dasatinib Effektivität gegenüber bestimmten Vorläuferzellen, die durch Imatinib nicht beeinflusst werden, aber nicht gegenüber der ruhenden Fraktion der Stammzellen [Copland et al. 2006]. Möglicherweise besteht hier ein Zusammenhang mit der Aktivität der NK-Zellen, da gezeigt wurde, dass die ruhenden CD34+ Zellen bei der CML eine geringere Suszeptibilität gegenüber NK-Zellen haben [Yong et al. 2008].

4.5 Regulation von NK-Zelleffektorfunktionen durch Dasatinib birgt Chancen und Risiken bei der klinischen Anwendung

Die Effektorfunktionen von NK-Zellen werden durch Dasatinib differentiell reguliert: Bei direkter Anwesenheit von Dasatinib wird die Expansion, Zytotoxizität und Zytokinproduktion inhibiert, während nach einer langfristigen Exposition und Entfernen des Medikaments die NK-Zelle wieder eine vollständige zytotoxische Wirkung zeigt und vermehrt Zytokine produziert. Aus diesen Resultaten ergeben sich möglicherweise Folgen für die klinische Anwendung von Dasatinib.

Bei der Behandlung der CML erscheint eine kompromittierte NK-Zellfunktion aus pathogenetischen Gesichtspunkten eher ungünstig, da die NK-Zellen wichtig sind für die Eradikation der ruhenden Stammzellen und für eine effiziente Immunabwehr. Möglicherweise lässt sich aber die Wirkung von Dasatinib auf die NK-Zellen durch ein verändertes Dosisregime positiv nutzbar machen. Aktuelle Studien belegen eine äquivalente klinische Wirksamkeit von einmalig 100 mg pro Tag zu der bisher üblichen zweimaligen Verabreichung von 70 mg pro Tag, obwohl Dasatinib nur eine Plasmahalbwertszeit von etwa 4h hat [Bullock JM 2006; Shah, Kantarjian et al. 2008]. Denn für die Elimination der CML-Zellen scheint eine transiente BCR-ABL-Inhibition durch eine Hochdosis-Pulstherapie ausreichend zu sein [Shah, Kasap et al. 2008; Snead et al. 2009]. So könnten möglicherweise auch immunmodulatorische Effekte von Dasatinib zu klinischem Nutzen führen und unerwünschte Wirkungen minimiert werden. Nach einer Behandlung bzw. Expansion der NK-Zellen mit Dasatinib wurde nach Entfernen des Medikamentes eine wiederhergestellte zytotoxische Aktivität und eine gesteigerte Zytokinproduktion beobachtet werden, was möglicherweise zu einer vermehrten immunologischen Tumorabwehr führen könnte. Dies könnte ebenfalls eine Ursache für die gute Wirksamkeit einer Hochdosispulstherapie sein. Außerdem treten unerwünschte Wirkungen von Dasatinib unter diesem Dosisregime weniger häufig auf [Shah, Kantarjian et al. 2008]. Auch hier kann ein Zusammenhang mit der Restauration

des immunmodulatorischen Effekts vermutet werden, da für die Pleuraergüsse während einer Therapie mit Dasatinib eine immunmedierte Genese diskutiert wird [Hugues de Lavallade 2008]. Die Wirkung von Dasatinib auf die NK-Zellen *in vivo* scheint aber auch von einer bestimmten Dynamik geprägt zu sein, die noch unvollständig verstanden ist: Die bereits in 4.1 diskutierten Studien von Kim und Kollegen bzw. Mustjoki und Kollegen zeigten eine abrupte Expansion von NK-, bzw. NKT-Zellen bei Patienten während einer Dasatinib-Therapie nach etwa drei Monaten, was mit einer verbesserten Prognose verbunden war [Kim et al. 2009; Mustjoki et al. 2009].

Dass nach Absetzen der Therapie keine Kompromittierung der NK-Zellen zu erwarten ist, ist auch sehr relevant für die Option einer Stammzelltransplantation. Es gibt bereits Daten, dass eine Behandlung mit Dasatinib nicht die Toxizität bei einer Stammzelltransplantation erhöht, die durch die vorherige Therapie zudem in einem früheren Stadium effektiv zu sein scheint [Shimoni et al. 2008].

Eine funktionelle Einschränkung der NK-Zellen könnte bei anderen Krankheitsbildern eine neue Therapieoption darstellen. Da bei direkter Anwesenheit von Dasatinib die Zytotoxizität und die Zytokinproduktion stark vermindert sind und außerdem bei der Konzentration von 50 nM die Proliferation der NK-Zellen *in vitro* vollständig gehemmt ist, kann großes Potential in der Therapie von NK-Zell-Lymphomen erwartet werden. NK-Zellneoplasien sind eine seltene und heterogene Gruppe von Krankheiten, die teilweise sehr aggressiv und gefährlich verlaufen können [Xiayuan Liang 2008]. Die Therapiemöglichkeiten sind beschränkt und kaum wissenschaftlich untersucht. Es kann sehr vielversprechend sein, mit Hilfe von Dasatinib die unkontrollierte Proliferation von NK-Zellen sowie die teilweise auftretende delitäre Zytotoxizität zu hemmen. Die Behandlung mit Dasatinib wäre möglicherweise eine Alternative zu aggressiven Chemotherapien oder einer Stammzelltransplantation.

Wie bereits unter 4.2 diskutiert wurde, besitzt der Multikinaseinhibitor Dasatinib möglicherweise Potential in der Therapie von Autoimmunerkrankungen. Eine potentiell immunsuppressive Wirkung von Dasatinib kann bedingt sein durch

eine verringerte Expansion, Zytotoxizität und Zytokinproduktion von NK-Zellen. Darüber hinaus hemmt Dasatinib auch die Proliferation, Aktivierung und Zytokinproduktion von T-Zellen [Weichsel et al. 2008]. T-Zellen und NK-Zellen stehen nicht nur über deren Zytokinsekretion in einer wechselseitigen Interaktion. Über den NKG2D-Rezeptor und seine Liganden werden möglicherweise T-Zellen zu autoimmunen Reaktionen stimuliert [Groh et al. 2003]. Eine eingeschränkte NK-Zellfunktion könnte indirekt autoreaktive Pathomechanismen der T-Zellen reduzieren. Die immunsuppressiven Eigenschaften von Dasatinib sind daher wahrscheinlich *in vivo* noch von weiteren Synergien geprägt. Dies macht Dasatinib zu einer attraktiven Therapiealternative für Autoimmunkrankheiten, was durch klinische Forschungsprojekte weiter evaluiert werden sollte.

5 ZUSAMMENFASSUNG

NK-Zellen spielen eine wichtige Rolle im menschlichen Immunsystem, insbesondere durch die Zerstörung von virusinfizierten Zellen und Tumorzellen sowie durch die Produktion von Zytokinen. Eine gezielte Modulation der Effektorfunktionen von NK-Zellen kann den Weg für neue Therapiestrategien gegenüber malignen Erkrankungen oder auch Autoimmunerkrankungen bahnen. Dasatinib ist ein potenter Inhibitor einer Vielzahl von Kinasen, die an der Regulation von NK-Zelleffektorfunktionen beteiligt sind und für die bereits eine Inhibition von T-Zelleffektorfunktionen gezeigt werden konnte [Schade et al. 2008; Weichsel et al. 2008]. Ein besseres Verständnis der immunmodulatorischen Eigenschaften von Dasatinib kann nicht nur neue Einsatzbereiche identifizieren, sondern auch die bereits bewährte Therapie der CML optimieren. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss von Dasatinib auf die Expansion, Zytotoxizität und Zytokinproduktion von humanen NK-Zellen analysiert.

Dazu wurden aus peripheren Blutlymphozyten gesunder Spender polyklonale NK-Zellen in Kokultur mit bestrahlten RPMI 8866-Zellen mit und ohne Dasatinib expandiert und NK-Zelleffektorfunktionen mit Durchflusszytometrie-basierten Experimenten untersucht. Im Detail wurde die Zytotoxizität nach dem Prinzip des FATAL-Experiments [Sheehy et al. 2001], die Degranulationsaktivität über die Expression von CD107a/b, die Produktion von TNF- α bzw. IFN- γ mit einer intrazellulären Färbung und die Apoptose- und Zelltodanalyse über Annexin-V und 7-AAD gemessen.

Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass Dasatinib die Haupteffektorfunktionen von NK-Zellen gesunder Blutspender in vitro reguliert: Die Expansionskapazität von NK-Zellen wird dosisabhängig und bei 50 nM Dasatinib vollständig inhibiert, ohne dass dies durch ein Absterben der NK-Zellen bedingt ist. Die Zytotoxizität von NK-Zellen, die unter 10 nM Dasatinib expandiert sind, ist nach Entfernen des Medikamentes restauriert, und die Degranulationskapazität und die Zytokinproduktion sind gesteigert.

ZUSAMMENFASSUNG

Bei unbehandelt expandierten NK-Zellen führt die direkte Anwesenheit von Dasatinib zu einer dosisabhängigen Hemmung der Zytotoxizität gegenüber K562-Zellen. Darüber hinaus inhibiert Dasatinib dosisabhängig die Degranulation und Zytokinproduktion von NK-Zellen bei einer Stimulation mit K562-Zellen nicht aber bei einer Stimulation mit PMA/Ca²⁺Ionophor. Eine indirekte Veränderung des Lyseverhaltens der NK-Zellen durch Effekte von Dasatinib auf die K562-Zellen zeigt sich nicht nach 4h, aber nach 24h im Sinne einer erhöhten Spontanlyse, aber geringeren spezifischen Lyse. Eine 24h-Vorbehandlung von K562-Zellen mit Dasatinib führt außerdem zu einer verminderten Degranulationsaktivität und Zytokinproduktion von unbehandelten NK-Zellen.

Die Hemmung der NK-Zelleffektorfunktionen bei direkter Anwesenheit von Dasatinib und deren Restauration respektive Steigerung nach Entfernen des Medikaments ist am ehesten auf eine reversible Inhibition von Src-Kinase-abhängigen Prozessen der intrazellulären Signalübertragung zurückzuführen. Eine kompromittierte NK-Zellfunktion könnte während einer Behandlung mit Dasatinib zu einer Verminderung der Infektabwehr und der immunologischen Tumorüberwachung führen. Möglicherweise lassen sich jedoch die unerwünschten Wirkungen durch ein verändertes Dosisregime, wie eine Hochdosispulstherapie, bei guter Therapieeffizienz minimieren. Eine supprimierte Aktivität der NK-Zellen durch Dasatinib könnte dagegen bei der Therapie von NK-Zelllymphomen oder auch von Autoimmunerkrankungen eine neue Behandlungsoption darstellen. Aufgrund der bereits bekannten inhibitorischen Wirkung auf T-Zellfunktionen gibt es dabei möglicherweise Synergien in der immunsuppressiven Wirkung. Das immunmodulatorische Potential von Dasatinib birgt daher große Chancen sowohl im Einsatz als Immunsuppressivum, als auch in der Optimierung der bereits bewährten Therapie der CML.

6 ABKÜRZUNGEN

7-AAD	7-Aminoactinomycin D
Abb.	Abbildung
AnnV	Annexin-V
ANOVA	analysis of variance
APC	Allophycocyanin
BSA	Bovines Serum Albumin
Ca ²⁺ Ionophor	Calcium-Ionophor
CD	Cluster of differentiation
CFSE	Carboxyfluoresceinsuccinimidylester
CML	chronisch myeloische Leukämie
ELISA	Enzyme linked immuno sorbent assay
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
g	Gramm
Gy	Gray
h	Stunde(n)
ICAM	Intercellular adhesion molecule
IFN	Interferon
Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
KIR	killer-cell immunoglobulin-like receptors
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MHC	Major histocompatibility complex
MIC-A/MIC-B	MHC class I chain-related antigen A/B
min	Minute(n)
ml	Milliliter
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
Nr.	Nummer
PBL	Peripheral blood lymphocytes
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PE	R-Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd

ABKÜRZUNGEN

PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Azetat
rpm	rotations per minute (Umdrehungen pro Minute)
SEM	Standardfehler ("standard error of the mean")
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
ULBP	UL-16 bindendes Protein
vgl.	vergleiche

7 ABBILDUNGEN

Abbildung 1: Auswertung der Messungen des Zytotoxizitätsversuchs 20

Abbildung 2: Prozentualer Anteil an NK-Zellen (CD16⁺/CD56⁺, CD3⁻) nach 8
Tagen Kokultur von PBL und RPMI 8866-Zellen..... 27

Abbildung 3: Entwicklung der absoluten Zahlen der NK-Zellen in der
Expansionskultur 28

Abbildung 4: Gesamttodesraten von NK-Zellen unter Dasatinib 30

Abbildung 5: Zytotoxizität von NK-Zellen nach Expansion unter 10 nM Dasatinib
..... 32

Abbildung 6: Steigerung des Degranulationsmarkers CD107a/b nach NK-
Zellexpansion unter 10 nM Dasatinib 33

Abbildung 7: Zytokinproduktion von NK-Zellen nach Expansion unter Dasatinib
..... 34

Abbildung 8: Einfluss von Dasatinib auf die Zytotoxizität von unbehandelt
expandierten NK-Zellen..... 36

Abbildung 9: Inhibition der Zytokinproduktion von NK-Zellen durch Dasatinib bei
Stimulation mit K562-Zellen 38

Abbildung 10: Spontanlyse von K562-Zellen..... 40

Abbildung 11: Spezifische Lyse von K562-Zellen nach Vorbehandlung mit
Dasatinib 41

Abbildung 12: Expression von CD107a/b von unbehandelten NK-Zellen nach
Stimulation mit vorbehandelten K562-Zellen..... 42

Abbildung 13: Zytokinproduktion von NK-Zellen nach Stimulation mit
vorbehandelten K562-Zellen 44

8 LITERATURVERZEICHNIS

- Agaugue, Marcenaro, Ferranti, Moretta, Moretta (2008). "Human natural killer cells exposed to IL-2, IL-12, IL-18, or IL-4 differently modulate priming of naive T cells by monocyte-derived dendritic cells." Blood **112**(5): 1776-1783.
- Alter, Malenfant, Altfeld (2004). "CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity." Journal of Immunological Methods **294**(1-2): 15-22.
- Apperley (2007). "Part I: Mechanisms of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia." The Lancet Oncology **8**(11): 1018-1029.
- Bahram, Inoko, Shiina, Radosavljevic (2005). "MIC and other NKG2D ligands: from none to too many." Current Opinion in Immunology **17**(5): 505-509.
- Bernardini, Kim, Gismondi, Butcher, Santoni (2005). "Chemoattractant induces LFA-1 associated PI 3K activity and cell migration that are dependent on Fyn signaling." FASEB J. **19**(10): 1305-1307.
- Betts, Brenchley, Price, De Rosa, Douek, Roederer, Koup (2003). "Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation." Journal of Immunological Methods **281**(1-2): 65-78.
- Bhat, Watzl (2007). "Serial Killing of Tumor Cells by Human Natural Killer Cells - enhancement by Therapeutic Antibodies." PLoS ONE **2**(3): e326.
- Billadeau, Upshaw, Schoon, Dick, Leibson (2003). "NKG2D-DAP10 triggers human NK cell-mediated killing via a Syk-independent regulatory pathway." Nat Immunol **4**(6): 557-564.
- Biron, Nguyen, Pien, Cousens, Salazar-Mather (1999). "NATURAL KILLER CELLS IN ANTIVIRAL DEFENSE: Function and Regulation by Innate Cytokines." Annual Review of Immunology **17**(1): 189-220.
- Blake, Bruce Lyons, Fraser, Hayball, Hughes (2008). "Dasatinib suppresses in vitro natural killer cell cytotoxicity." Blood **111**(8): 4415-4416.

LITERATURVERZEICHNIS

- Borg, Terme, Taieb, Menard, Flament, Robert, Maruyama, Wakasugi, Angevin, Thielemans, Le Cesne, Chung-Scott, Lazar, Tchou, Crepineau, Lemoine, Bernard, Fletcher, Turhan, Blay, Spatz, Emile, Heinrich, Mecheri, Tursz, Zitvogel (2004). "Novel mode of action of c-kit tyrosine kinase inhibitors leading to NK cell-dependent antitumor effects." J Clin Invest **114**(3): 379-88.
- Brave, Goodman, Kaminskas, Farrell, Timmer, Pope, Harapanhalli, Saber, Morse, Bullock, Men, Noory, Ramchandani, Kenna, Booth, Gobburu, Jiang, Sridhara, Justice, Pazdur (2008). "Sprycel for Chronic Myeloid Leukemia and Philadelphia Chromosome-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia Resistant to or Intolerant of Imatinib Mesylate." Clin Cancer Res **14**(2): 352-359.
- Bullock JM (2006). "Clinical pharmacology review: Sprycel, dasatinib. Application number 21-986." U.S. Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research.
- Caligiuri (2008). "Human natural killer cells." Blood **112**(3): 461-469.
- Cebo, Da Rocha, Wittnebel, Turhan, Abdelali, Caillat-Zucman, Bourhis, Chouaib, Caignard (2006). "The Decreased Susceptibility of Bcr/Abl Targets to NK Cell-Mediated Lysis in Response to Imatinib Mesylate Involves Modulation of NKG2D Ligands, GM1 Expression, and Synapse Formation." J Immunol **176**(2): 864-872.
- Cerwenka, Lanier (2001). "Natural killer cells, viruses and cancer." Nat Rev Immunol **1**(1): 41-49.
- Chan, Hong, Atzberger, Kollnberger, Filer, Buckley, McMichael, Enver, Bowness (2007). "CD56^{bright} Human NK Cells Differentiate into CD56^{dim} Cells: Role of Contact with Peripheral Fibroblasts." J Immunol **179**(1): 89-94.
- Chen, Trivedi, Ge, Krzewski, Strominger (2007). "Many NK cell receptors activate ERK2 and JNK1 to trigger microtubule organizing center and granule polarization and cytotoxicity." Proceedings of the National Academy of Sciences **104**(15): 6329-6334.

LITERATURVERZEICHNIS

- Clark, Kupper (2005). "Old Meets New: The Interaction Between Innate and Adaptive Immunity." J Investig Dermatol **125**(4): 629-637.
- Cooper, Alder (2006). "The Evolution of Adaptive Immune Systems." Cell **124**(4): 815-822.
- Cooper, Fehniger, Caligiuri (2001). "The biology of human natural killer-cell subsets." Trends in Immunology **22**(11): 633-640.
- Cooper, Fehniger, Turner, Chen, Ghaheri, Ghayur, Carson, Caligiuri (2001). "Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56^{bright} subset." Blood **97**(10): 3146-3151.
- Copland, Hamilton, Elrick, Baird, Allan, Jordanides, Barow, Mountford, Holyoake (2006). "Dasatinib (BMS-354825) targets an earlier progenitor population than imatinib in primary CML but does not eliminate the quiescent fraction." Blood **107**(11): 4532-9.
- Cortes, Rousselot, Kim, Ritchie, Hamerschlag, Coutre, Hochhaus, Guilhot, Saglio, Apperley, Ottmann, Shah, Erben, Branford, Agarwal, Gollerkeri, Baccarani (2007). "Dasatinib induces complete hematologic and cytogenetic responses in patients with imatinib-resistant or -intolerant chronic myeloid leukemia in blast crisis." Blood **109**(8): 3207-3213.
- Dietz, Bulur, Emery, Winters, Epps, Zubair, Vuk-Pavlovic (2006). "A novel source of viable peripheral blood mononuclear cells from leukoreduction system chambers." Transfusion **46**(12): 2083-2089.
- Dokun, Kim, Smith, Kang, Chu, Yokoyama (2001). "Specific and nonspecific NK cell activation during virus infection." Nat Immunol **2**(10): 951-956.
- Drexler (1994). "Leukemia cell lines: In vitro models for the study of chronic myeloid leukemia." Leukemia Research **18**(12): 919-927.
- Druker, Guilhot, O'Brien, Gathmann, Kantarjian, Gattermann, Deininger, Silver, Goldman, Stone, Cervantes, Hochhaus, Powell, Gabilove, Rousselot, Reiffers, Cornelissen, Hughes, Agis, Fischer, Verhoef, Shepherd, Saglio, Gratwohl, Nielsen, Radich, Simonsson, Taylor, Baccarani, So, Letvak, Larson, the (2006). "Five-Year Follow-up of Patients Receiving Imatinib for Chronic Myeloid Leukemia." N Engl J Med **355**(23): 2408-2417.

LITERATURVERZEICHNIS

- Druker, Talpaz, Resta, Peng, Buchdunger, Ford, Lydon, Kantarjian, Capdeville, Ohno-Jones, Sawyers (2001). "Efficacy and Safety of a Specific Inhibitor of the BCR-ABL Tyrosine Kinase in Chronic Myeloid Leukemia." N Engl J Med **344**(14): 1031-1037.
- Eagle, Trowsdale (2007). "Promiscuity and the single receptor: NKG2D." Nat Rev Immunol **7**(9): 737-744.
- Eklund, Joensuu (2003). "Treatment of rheumatoid arthritis with imatinib mesylate: clinical improvement in three refractory cases." Ann Med **35**(5): 362-7.
- Epling-Burnette, Bai, Painter, Rollison, Salih, Krusch, Zou, Ku, Zhong, Boulware, Moscinski, Wei, Djeu, List (2007). "Reduced natural killer (NK) function associated with high-risk myelodysplastic syndrome (MDS) and reduced expression of activating NK receptors." Blood **109**(11): 4816-24.
- Fehniger, Cooper, Nuovo, Cella, Facchetti, Colonna, Caligiuri (2003). "CD56^{bright} natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity." Blood **101**(8): 3052-3057.
- Felzmann T (2003). "Monocyte enrichment from leukapheresis products for the generation of DCs by plastic adherence, or by positive or negative selection." Cytotherapy **5**(5): 391 - 398.
- Fraser, Blake, Diener, Lyons, Brown, Hughes, Hayball (2009). "Dasatinib inhibits recombinant viral antigen-specific murine CD4+ and CD8+ T-cell responses and NK-cell cytolytic activity in vitro and in vivo." Experimental Hematology **37**(2): 256-265.
- Friese, Wischhusen, Wick, Weiler, Eisele, Steinle, Weller (2004). "RNA Interference Targeting Transforming Growth Factor- β Enhances NKG2D-Mediated Antiglioma Immune Response, Inhibits Glioma Cell Migration and Invasiveness, and Abrogates Tumorigenicity In vivo." Cancer Res **64**(20): 7596-7603.
- Garcia-Munoz, Galar, Moreno, Rodriguez-Otero, Panizo-Morgado, Ponz-Sarvis^Á, Fernandez-Alonso, Rubio, Merino, Cuesta, Panizol, Prosper (2007). "Parvovirus B19 acute infection and a reactivation of

LITERATURVERZEICHNIS

- cytomegalovirus and herpesvirus 6 in a chronic myeloid leukemia patient during treatment with dasatinib (BMS-354825)." Leukemia and Lymphoma **48**(12): 2461 - 2464.
- Gasser, Orsulic, Brown, Raulet (2005). "The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor." Nature **436**(7054): 1186-1190.
- Gerard (1986). "Role of protein kinases in stimulation of human polymorphonuclear leukocyte oxidative metabolism by various agonists. Differential effects of a novel protein kinase inhibitor." J. Clin. Invest. **77**(1): 61-65.
- Godfrey, MacDonald, Kronenberg, Smyth, Kaer (2004). "NKT cells: what's in a name?" Nat Rev Immunol **4**(3): 231-237.
- Goldblatt, Huggins, Doelken, Gurung, Sahn (2009). "Dasatinib-Induced Pleural Effusions: A Lymphatic Network Disorder?" The American Journal of the Medical Sciences **338**(5): 414-417 10.1097/MAJ.0b013e3181ae9227.
- Gómez-Román, Florese, Patterson, Peng, Venzon, Aldrich, Robert-Guroff (2006). "A simplified method for the rapid fluorometric assessment of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity." Journal of Immunological Methods **308**(1-2): 53-67.
- Groh, Brahl, El-Gabalawy, Nelson, Spies (2003). "Stimulation of T cell autoreactivity by anomalous expression of NKG2D and its MIC ligands in rheumatoid arthritis." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **100**(16): 9452-9457.
- Hantschel, Rix, Superti-Furga (2008). "Target spectrum of the BCR-ABL inhibitors imatinib, nilotinib and dasatinib." Leukemia and Lymphoma **49**(4): 615 - 619.
- Hochhaus, Baccarani, Deininger, Apperley, Lipton, Goldberg, Corm, Shah, Cervantes, Silver, Niederwieser, Stone, Dombret, Larson, Roy, Hughes, Muller, Ezzeddine, Countouriotis, Kantarjian (2008). "Dasatinib induces durable cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in chronic phase with resistance or intolerance to imatinib." Leukemia.

LITERATURVERZEICHNIS

- Hugues de Lavallade (2008). "Pleural effusions in patients with chronic myeloid leukaemia treated with dasatinib may have an immune-mediated pathogenesis." British Journal of Haematology **141**(5): 745-747.
- Ilaria Tassi (2006). "Dissecting natural killer cell activation pathways through analysis of genetic mutations in human and mouse." Immunological Reviews **214**(1): 92-105.
- Jacobi, Claus, Wildemann, Wingert, Korporal, Römisch, Meuer, Watzl, Giese (2009). "Exposure of NK cells to intravenous immunoglobulin induces IFN[gamma] release and degranulation but inhibits their cytotoxic activity." Clinical Immunology **133**(3): 393-401.
- Janka (2007). "Hemophagocytic syndromes." Blood Reviews **21**(5): 245-253.
- Kantarjian, Pasquini, Lévy, Jootar, Holowiecki, Hamerschlak, Hughes, Bleickardt, Dejardin, Cortes, Shah (2009). "Dasatinib or high-dose imatinib for chronic-phase chronic myeloid leukemia resistant to imatinib at a dose of 400 to 600 milligrams daily." Cancer **115**(18): 4136-4147.
- Kärre (2002). "NK Cells, MHC Class I Molecules and the Missing Self." Scandinavian Journal of Immunology **55**(3): 221-228.
- Kelley, Rozek, Suenram, Schwartz (1987). "Activation of human blood monocytes by adherence to tissue culture plastic surfaces." Exp Mol Pathol **46**(3): 266-78.
- Kim, Kamel-Reid, Chang, Sutherland, Jung, Kim, Lee, Lipton (2009). "Natural killer or natural killer/T cell lineage large granular lymphocytosis associated with dasatinib therapy for Philadelphia chromosome positive leukemia." Haematologica **94**(1): 135-139.
- Kobayashi, Fitz, Ryan, Hewick, Clark, Chan, Loudon, Sherman, Perussia, Trinchieri (1989). "Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes." J Exp Med **170**(3): 827-45.
- Krockenberger, Dombrowski, Weidler, Ossadnik, Honig, Hausler, Voigt, Becker, Leng, Steinle, Weller, Bucala, Dietl, Wischhusen (2008). "Macrophage Migration Inhibitory Factor Contributes to the Immune Escape of Ovarian Cancer by Down-Regulating NKG2D." J Immunol **180**(11): 7338-7348.

LITERATURVERZEICHNIS

- Lanier (2003). "Natural killer cell receptor signaling." Current Opinion in Immunology **15**(3): 308-314.
- Lanier (2008). "Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition." Nat Immunol **9**(5): 495-502.
- Leite-de-Moraes, Herbelin, Gouarin, Koezuka, Schneider, Dy (2000). "Fas/Fas Ligand Interactions Promote Activation-Induced Cell Death of NK T Lymphocytes." J Immunol **165**(8): 4367-4371.
- Li, Ge, Nicotra, Stern, Kopcow, Chen, Strominger (2008). "JNK MAP kinase activation is required for MTOC and granule polarization in NKG2D-mediated NK cell cytotoxicity." Proceedings of the National Academy of Sciences **105**(8): 3017-3022.
- Lombardo, Lee, Chen, Norris, Barrish, Behnia, Castaneda, Cornelius, Das, Dowejko, Fairchild, Hunt, Inigo, Johnston, Kamath, Kan, Klei, Marathe, Pang, Peterson, Pitt, Schieven, Schmidt, Tokarski, Wen, Wityak, Borzilleri (2004). "Discovery of N-(2-Chloro-6-methyl- phenyl)-2-(6-(4-(2-hydroxyethyl)- piperazin-1-yl)-2-methylpyrimidin-4- ylamino)thiazole-5-carboxamide (BMS-354825), a Dual Src/Abl Kinase Inhibitor with Potent Antitumor Activity in Preclinical Assays." Journal of Medicinal Chemistry **47**(27): 6658-6661.
- Lombardo, Lee, Chen, Norris, Barrish, Behnia, Castaneda, Cornelius, Das, Dowejko, Fairchild, Hunt, Inigo, Johnston, Kamath, Kan, Klei, Marathe, Pang, Peterson, Pitt, Schieven, Schmidt, Tokarski, Wen, Wityak, Borzilleri (2004). "Discovery of N-(2-Chloro-6-methyl- phenyl)-2-(6-(4-(2-hydroxyethyl)- piperazin-1-yl)-2-methylpyrimidin-4- ylamino)thiazole-5-carboxamide (BMS-354825), a Dual Src/Abl Kinase Inhibitor with Potent Antitumor Activity in Preclinical Assays." J. Med. Chem. **47**(27): 6658-6661.
- Long (2007). "Ready for Prime Time: NK Cell Priming by Dendritic Cells." Immunity **26**(4): 385-387.
- López-Larrea, Suárez-Alvarez, López-Soto, López-Vázquez, Gonzalez (2008). "The NKG2D receptor: sensing stressed cells." Trends in Molecular Medicine **14**(4): 179-189.

LITERATURVERZEICHNIS

- Lozzio, Lozzio (1975). "Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome." Blood **45**(3): 321-334.
- Lucas, Schachterle, Oberle, Aichele, Diefenbach (2007). "Dendritic Cells Prime Natural Killer Cells by trans-Presenting Interleukin 15." Immunity **26**(4): 503-517.
- Lünemann, Lünemann, Münz (2009). "Regulatory NK-cell functions in inflammation and autoimmunity." Mol Med **15**(9-10): 352-8.
- Lünemann, Lünemann, Roberts, Messmer, da Silva, Raine, Munz (2008). "Human NK Cells Kill Resting but Not Activated Microglia via NKG2D- and NKp46-Mediated Recognition." J Immunol **181**(9): 6170-6177.
- Maher, Romero-Weaver, Scarzello, Gamero (2007). "Interferon: cellular executioner or white knight?" Current Medicinal Chemistry **14**(12): 1279-1289.
- Mailliard, Son, Redlinger, Coates, Giermasz, Morel, Storkus, Kalinski (2003). "Dendritic Cells Mediate NK Cell Help for Th1 and CTL Responses: Two-Signal Requirement for the Induction of NK Cell Helper Function." J Immunol **171**(5): 2366-2373.
- Manley, Cowan-Jacob, Mestan (2005). "Advances in the structural biology, design and clinical development of Bcr-Abl kinase inhibitors for the treatment of chronic myeloid leukaemia." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics **1754**(1-2): 3-13.
- Marcusson-Ståhl, Cederbrant (2003). "A flow-cytometric NK-cytotoxicity assay adapted for use in rat repeated dose toxicity studies." Toxicology **193**(3): 269-279.
- Martin-Fontecha, Thomsen, Brett, Gerard, Lipp, Lanzavecchia, Sallusto (2004). "Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN- γ for TH1 priming." Nat Immunol **5**(12): 1260-1265.
- Mustjoki, Ekblom, Arstila, Dybedal, Epling-Burnette, Guilhot, Hjorth-Hansen, Hoglund, Kovanen, Laurinolli, Liesveld, Paquette, Pinilla-Ibarz, Rauhala, Shah, Simonsson, Sinisalo, Steegmann, Stenke, Porkka (2009). "Clonal expansion of T/NK-cells during tyrosine kinase inhibitor dasatinib therapy." Leukemia **23**(8): 1398-1405.

LITERATURVERZEICHNIS

- Nakajima, Zhao, Lund, Ward, Dolan, Hirsch, Miller (2002). "The BCR/ABL Transgene Causes Abnormal NK Cell Differentiation and Can Be Found in Circulating NK Cells of Advanced Phase Chronic Myelogenous Leukemia Patients." J Immunol **168**(2): 643-650.
- Nam, Williams, Vultur, List, Bhalla, Smith, Lee, Jove (2007). "Dasatinib (BMS-354825) inhibits Stat5 signaling associated with apoptosis in chronic myelogenous leukemia cells." Mol Cancer Ther **6**(4): 1400-1405.
- Oppenheim, Roberts, Clarke, Filler, Lewis, Tigelaar, Girardi, Hayday (2005). "Sustained localized expression of ligand for the activating NKG2D receptor impairs natural cytotoxicity in vivo and reduces tumor immunosurveillance." Nat Immunol **6**(9): 928-937.
- Park, Kee, Cho, Lee, Lee, Kim, Shin, Park, Kim, Lee, Yoo, Kang (2009). "Impaired differentiation and cytotoxicity of natural killer cells in systemic lupus erythematosus." Arthritis & Rheumatism **60**(6): 1753-1763.
- Perussia, Chan, D'Andrea, Tsuji, Santoli, Pospisil, Young, Wolf, Trinchieri (1992). "Natural killer (NK) cell stimulatory factor or IL-12 has differential effects on the proliferation of TCR-alpha beta+, TCR-gamma delta+ T lymphocytes, and NK cells." J Immunol **149**(11): 3495-3502.
- Perussia, Ramoni, Anegón, Cuturi, Faust, Trinchieri (1987). "Preferential proliferation of natural killer cells among peripheral blood mononuclear cells cocultured with B lymphoblastoid cell lines." Nat Immun Cell Growth Regul **6**(4): 171-88.
- Pignata, Prasad, Hallek, Druker, Rudd, Robertson, Ritz (1995). "Phosphorylation of src Family Ick Tyrosine Kinase Following Interleukin-12 Activation of Human Natural Killer Cells." Cellular Immunology **165**(2): 211-216.
- Pressman (1976). "Biological Applications of Ionophores." Annual Review of Biochemistry **45**(1): 501-530.
- Rabinovich, Li, Shannon, Hurren, Chalupny, Cosman, Miller (2003). "Activated, But Not Resting, T Cells Can Be Recognized and Killed by Syngeneic NK Cells." J Immunol **170**(7): 3572-3576.

LITERATURVERZEICHNIS

- Raffaella Augugliaro (2003). "Selective cross-talk among natural cytotoxicity receptors in human natural killer cells." European Journal of Immunology **33**(5): 1235-1241.
- Rea, Bergeron, Fieschi, Bengoufa, Oksenhendler, Dombret (2008). "Dasatinib-induced lupus." The Lancet **372**(9640): 713-714.
- Riteau, Barber, Long (2003). "Vav1 Phosphorylation Is Induced by β 2 Integrin Engagement on Natural Killer Cells Upstream of Actin Cytoskeleton and Lipid Raft Reorganization." J Exp Med **198**(3): 469-474.
- Rix, Hantschel, Durnberger, Rensing Rix, Planyavsky, Fernbach, Kaupe, Bennett, Valent, Colinge, Kocher, Superti-Furga (2007). "Chemical proteomic profiles of the BCR-ABL inhibitors imatinib, nilotinib, and dasatinib reveal novel kinase and nonkinase targets." Blood **110**(12): 4055-63.
- Robertson, Ritz (1990). "Biology and clinical relevance of human natural killer cells." Blood **76**(12): 2421-2438.
- Romagnani, Juelke, Falco, Morandi, D'Agostino, Costa, Ratto, Forte, Carrega, Lui, Conte, Strowig, Moretta, Munz, Thiel, Moretta, Ferlazzo (2007). "CD56^{bright}CD16⁻ Killer Ig-Like Receptor- NK Cells Display Longer Telomeres and Acquire Features of CD56dim NK Cells upon Activation." J Immunol **178**(8): 4947-4955.
- Rosenberg, Lotze, Yang, Topalian, Chang, Schwartzentruber, Aebersold, Leitman, Linehan, Seipp, White, Steinberg (1993). "Prospective Randomized Trial of High-Dose Interleukin-2 Alone or in Conjunction With Lymphokine-Activated Killer Cells for the Treatment of Patients With Advanced Cancer." J. Natl. Cancer Inst. **85**(8): 622-632.
- Ruggeri, Mancusi, Burchielli, Aversa, Martelli, Velardi (2007). "Natural killer cell alloreactivity in allogeneic hematopoietic transplantation." Curr Opin Oncol **19**(2): 142-7.
- Salih, Hilpert, Placke, Grünebach, Steinle, Salih, Krusch (2010). "The BCR/ABL-inhibitors imatinib, nilotinib and dasatinib differentially affect

LITERATURVERZEICHNIS

- NK cell reactivity." International Journal of Cancer(Epub ahead of print): NA.
- Schade, Schieven, Townsend, Jankowska, Susulic, Zhang, Szpurka, Maciejewski (2008). "Dasatinib, a small-molecule protein tyrosine kinase inhibitor, inhibits T-cell activation and proliferation." Blood **111**(3): 1366-77.
- Schmid, Krall, Uittenbogaart, Braun, Giorgi (1992). "Dead cell discrimination with 7-amino-actinomycin D in combination with dual color immunofluorescence in single laser flow cytometry." Cytometry **13**(2): 204-8.
- Seggewiss, Lore, Greiner, Magnusson, Price, Douek, Dunbar, Wiestner (2005). "Imatinib inhibits T-cell receptor-mediated T-cell proliferation and activation in a dose-dependent manner." Blood **105**(6): 2473-2479.
- Sgonc, Gruber (1998). "Apoptosis detection: an overview." Experimental Gerontology **33**(6): 525-533.
- Shah, Kantarjian, Kim, Rea, Dorlhiac-Llacer, Milone, Vela-Ojeda, Silver, Khoury, Charbonnier, Khoroshko, Paquette, Deininger, Collins, Otero, Hughes, Bleickardt, Strauss, Francis, Hochhaus (2008). "Intermittent Target Inhibition With Dasatinib 100 mg Once Daily Preserves Efficacy and Improves Tolerability in Imatinib-Resistant and -Intolerant Chronic-Phase Chronic Myeloid Leukemia." J Clin Oncol **26**(19): 3204-3212.
- Shah, Kasap, Weier, Balbas, Nicoll, Bleickardt, Nicaise, Sawyers (2008). "Transient Potent BCR-ABL Inhibition Is Sufficient to Commit Chronic Myeloid Leukemia Cells Irreversibly to Apoptosis." Cancer Cell **14**(6): 485-493.
- Shah, Tran, Lee, Chen, Norris, Sawyers (2004). "Overriding imatinib resistance with a novel ABL kinase inhibitor." Science **305**(5682): 399-401.
- Sheehy, McDermott, Furlan, Klenerman, Nixon (2001). "A novel technique for the fluorometric assessment of T lymphocyte antigen specific lysis." J Immunol Methods **249**(1-2): 99-110.
- Shimoni, Leiba, Schleuning, Martineau, Renaud, Koren-Michowitz, Ribakovski, le Coutre, Arnold, Guilhot, Nagler (2008). "Prior treatment with the

LITERATURVERZEICHNIS

- tyrosine kinase inhibitors dasatinib and nilotinib allows stem cell transplantation (SCT) in a less advanced disease phase and does not increase SCT Toxicity in patients with chronic myelogenous leukemia and philadelphia positive acute lymphoblastic leukemia." Leukemia.
- Sillaber, Herrmann, Bennett, Rix, Baumgartner, Böhm, Herndlhofer, Tschachler, Superti-Furga, Jäger, Valent (2009). "Immunosuppression and atypical infections in CML patients treated with dasatinib at 140 mg daily." European Journal of Clinical Investigation **39**(12): 1098-1109.
- Smyth, Cretney, Kelly, Westwood, Street, Yagita, Takeda, Dommelen, Degli-Esposti, Hayakawa (2005). "Activation of NK cell cytotoxicity." Molecular Immunology **42**(4): 501-510.
- Snead, O'Hare, Adrian, Eide, Lange, Druker, Deininger (2009). "Acute dasatinib exposure commits Bcr-Abl-dependent cells to apoptosis." Blood **114**(16): 3459-3463.
- Steinberg (2007). "Dasatinib: A tyrosine kinase inhibitor for the treatment of chronic myelogenous leukemia and philadelphia chromosome--positive acute lymphoblastic leukemia." Clinical Therapeutics **29**(11): 2289-2308.
- Sun, Beilke, Lanier (2009). "Adaptive immune features of natural killer cells." Nature **457**(7229): 557-561.
- Talpaz, Shah, Kantarjian, Donato, Nicoll, Paquette, Cortes, O'Brien, Nicaise, Bleickardt, Blackwood-Chirchir, Iyer, Chen, Huang, Decillis, Sawyers (2006). "Dasatinib in Imatinib-Resistant Philadelphia Chromosome-Positive Leukemias." N Engl J Med **354**(24): 2531-2541.
- Terme, Ullrich, Delahaye, Chaput, Zitvogel (2008). "Natural killer cell-directed therapies: moving from unexpected results to successful strategies." Nat Immunol **9**(5): 486-494.
- Ting, Schoon, Abraham, Leibson (1992). "Interaction between protein kinase C-dependent and G protein-dependent pathways in the regulation of natural killer cell granule exocytosis." J. Biol. Chem. **267**(33): 23957-23962.
- Torelli, Guarini, Maggio, Alfieri, Vitale, Foa (2005). "Expansion of natural killer cells with lytic activity against autologous blasts from adult and pediatric

LITERATURVERZEICHNIS

- acute lymphoid leukemia patients in complete hematologic remission." Haematologica **90**(6): 785-792.
- Trotta, Fettucciari, Azzoni, Abebe, Puorro, Eisenlohr, Perussia (2000). "Differential Role of p38 and c-Jun N-Terminal Kinase 1 Mitogen-Activated Protein Kinases in NK Cell Cytotoxicity." J Immunol **165**(4): 1782-1789.
- Udai S. Kammula (1998). "Trends in the safety of high dose bolus interleukin-2 administration in patients with metastatic cancer." Cancer **83**(4): 797-805.
- Valiante, Rengaraju, Trinchieri (1992). "Role of the production of natural killer cell stimulatory factor (NKSF/IL-12) in the ability of B cell lines to stimulate T and NK cell proliferation." Cell Immunol **145**(1): 187-98.
- Vivier, Nunes, Vely (2004). "Natural Killer Cell Signaling Pathways." Science **306**(5701): 1517-1519.
- Vivier, Tomasello, Baratin, Walzer, Ugolini (2008). "Functions of natural killer cells." Nat Immunol **9**(5): 503-510.
- Walzer, Dalod, Robbins, Zitvogel, Vivier (2005). "Natural-killer cells and dendritic cells: "l'union fait la force"." Blood **106**(7): 2252-2258.
- Wang, Hochhaus, Kantarjian, Agrawal, Chen, Bleickardt, Nicaise, Shah (2008). "Dasatinib Pharmacokinetics and Exposure-response (E-R): Relationship to Safety and Efficacy in Patients (pts) with Chronic Myeloid Leukemia (CML)." Poster presented at the 44th ASCO Annual Meeting, May 30 - June 3, Chicago, Illinois, USA.
- Weichsel, Dix, Wooldridge, Clement, Fenton-May, Sewell, Zezula, Greiner, Gostick, Price, Einsele, Seggewiss (2008). "Profound Inhibition of Antigen-Specific T-Cell Effector Functions by Dasatinib." Clin Cancer Res **14**(8): 2484-2491.
- Winkler-Pickett, Young, Cherry, Diehl, Wine, Back, Bere, Mason, Ortaldo (2008). "In Vivo Regulation of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by NK Cells: Alteration of Primary Adaptive Responses." J Immunol **180**(7): 4495-4506.

LITERATURVERZEICHNIS

- Xiayuan Liang (2008). "Natural killer cell neoplasms." Cancer **112**(7): 1425-1436.
- Yatin M. Vyas (2002). "Visualization of signaling pathways and cortical cytoskeleton in cytolytic and noncytolytic natural killer cell immune synapses." Immunological Reviews **189**(1): 161-178.
- Yenan T. Bryceson (2006). "Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells." Immunological Reviews **214**(1): 73-91.
- Yong, Keyvanfar, Hensel, Eniafe, Savani, Berg, Lundqvist, Adams, Sloan, Goldman, Childs, Barrett (2008). "Primitive quiescent CD34+ cells in chronic myeloid leukemia are targeted by in vitro expanded natural killer cells, which are functionally enhanced by bortezomib." Blood: blood-2008-05-158253.
- Zhang, Zhang, Niu, Zhou, Zhang, Tian (2008). "Interleukin-12 improves cytotoxicity of natural killer cells via upregulated expression of NKG2D." Human Immunology **69**(8): 490-500.
- Zompi, Colucci (2005). "Anatomy of a murder--signal transduction pathways leading to activation of natural killer cells." Immunology Letters **97**(1): 31-39.

9 DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Hermann Einsele danke ich für die Übernahme des Referats und die Betreuung und Unterstützung meiner Forschungsaktivität im Rahmen meiner Dissertation.

Besonderer Dank gilt Frau Dr. Ruth Seggewiß, Leiterin der Arbeitsgruppe „Immune Recovery“, für die Überlassung des Themas, die engagierte Anleitung zu selbstständigem wissenschaftlichem Arbeiten, für wertvolle Diskussionen und intensive Betreuung. Ihr Enthusiasmus und ihre Zuverlässigkeit war ein integraler Bestandteil der motivierenden Atmosphäre in unserer Arbeitsgruppe.

Dazu trug auch die immer freundliche Unterstützung von Carolin Dix bei. Ihr Humor und Rückhalt sowie die technische Hilfe und Durchführung einiger Experimente waren von unschätzbarem Wert. Herzlich danken möchte ich auch Nicole Hassold und Christoph Köchel für die stets kollegiale Teamarbeit und das Teilen von Freude und Leid im Leben eines forschenden Medizinstudenten.

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

Für die freundliche Beratung bei der statistischen Auswertung der Experimente bedanke ich mich herzlich bei Herrn Dipl.-Psych. Dr. Arne Schäfer.

Der bayerischen Staatsregierung und dem Stipendienreferat an der Universität Würzburg danke ich für die finanzielle Unterstützung meines Studiums.

Meinen Eltern und meinen Freunden gilt mein besonderer Dank für alles.

10 LEBENS LAUF

Persönliches

Name Katharina Gertrud Seystahl

Ausbildung

01.06.2010 Approbation als Ärztin
04/2003 – 06/2010 Studium der Humanmedizin, Universität
Würzburg
09/2006 – 07/2007 Auslandsstudienjahr (Humanmedizin) an der
Universidad de Salamanca (Spanien)
06/2002 Allgemeine Hochschulreife

Praktische Erfahrung

Praktisches Jahr:

07/2009 – 10/2009 Innere Medizin, Spital Schwyz
03/2009 – 07/2009 Chirurgie, Hospital de Clínicas, Buenos Aires
12./2008 – 03/2009 Neurologie, Universitätsklinik Würzburg

Famulaturen:

08/2008 – 08/2008 Gynäkologie, Hospital Lam Wah Ee, Penang
02/2008 – 04/2008 Hämatologische Ambulanz, Medizinische
Universitätsklinik Würzburg
03/2006 – 03/2006 Neurologie, Bürgerspital des Klinikums Stuttgart
09/2005 – 10/2005 Innere Medizin, Missionsärztliche Klinik Würzburg

Kongressbeitrag

N. Hassold**, K. Seystahl**, C. Dix, J. Wischhusen, H. Einsele, R. Seggewiss:
„Pre-treating human NK cells with dasatinib increases cytotoxicity against
resistant Daudi but not sensitive K562 or Jurkat cells – An example for
differential immunomodulation.” ** contributed equally to this work
EBMT meeting, Göteborg, Sweden, Mar 26-Apr 1st 2009, BMT, Vol. 43, suppl.
1: 745a, S1