

Aus der Kinderklinik und Poliklinik

der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. Christian P. Speer

Einfluss der Src-kinase-Inhibitoren

auf die TLR-4-induzierte IL-10 bzw. IL-12 Produktion

in Tumor-assoziierten Makrophagen

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Constanze Lotte-Marie Hölldorfer

aus München

Würzburg, Juli 2019



Referentenblatt

Referent: Prof. Dr. med. Matthias Wölfel

Korreferent: Prof. Dr. med. Andreas Beilhack

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung:

01.12.2020

Die Promovendin ist Ärztin.

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Immunsystem	1
1.1.1	Angeborenes Immunsystem	1
1.1.2	Erworbenes Immunsystem	2
1.2	Makrophagen	4
1.2.1	Subtypen von Makrophagen	5
1.2.1.1	Differenzierung von M1/M2 Makrophagen	5
1.2.2	Tumor-assoziierte Makrophagen	9
1.3	NK-Zellen	10
1.3.1	Definition und Eigenschaften	10
1.3.2	NK-Zell-Subtypen	12
1.3.3	CD25, CD69 und CD96 als Aktivierungsmarker von NK-Zellen	13
1.4	Tyrosinkinaseinhibitoren	14
1.4.1	Dasatinib	15
1.4.2	Src-kinase-inhibitor-I	16
1.4.3	Bosutinib	17
1.5	Interleukin 32	17
1.5.1	Funktion des IL-32 γ	18
1.5.2	Interaktion mit Makrophagen	18
1.6	Fragestellung dieser Arbeit	20
2	Methoden und Material	22
2.1	Material	22
2.1.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien	22
2.1.2	Chemikalien und Substanzen	23
2.1.3	Lösungen, Medien und Zellen:	24
2.1.4	Reagenzien und Antikörper für die Durchflusszytometrie	25
2.1.5	Reaktionssets	26
2.1.6	Computerprogramme	26
2.2	Methoden	27
2.2.1	Zellisolation durch Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation	27
2.2.2	Magnetische Zellseparation	28
2.2.3	Methoden zu Makrophagendifferenzierung, Aktivierung und Expansion	30
2.2.4	Methoden der NK-Zell-Versuchsreihe	33
2.2.5	Durchflusszytometrie	35
2.2.5.1	Hintergrund	35
2.2.5.2	Färben und Auswertung von Oberflächenmarkern	36
2.2.6	Gating und Reinheit der Zellen	36
2.2.7	Auswertung	40
2.2.8	Messung der Zytokinsekretion durch ELISA	41
2.2.8.1	Prinzip eines ELISAs	41
2.2.8.2	Versuchsablauf	42
3	Ergebnisse	44
3.1	Einfluss von Dasatinib, Src-kinase-inhibitor-I und Bosutinib	44
3.1.1	Modulation der Expression von Oberflächenmarkern	44
3.1.1.1	Modulation der Expression durch Dasatinib	45
3.1.1.1.1	Differenzierungsmarker	45
3.1.1.1.2	CD83 und Aktivierungsmarker CD80/CD86/HLA-DR	47
3.1.1.1.3	CD206	50
3.1.1.2	Modulation der Expression durch Src-kinase-inhibitor I	51
3.1.1.2.1	Differenzierungsmarker	51
3.1.1.2.2	CD83 und die Aktivierungsmarker CD80/CD86/HLA-DR	53
3.1.1.2.3	CD206	55

3.1.1.3	Modulation der Expression durch Bosutinib	56
3.1.1.3.1	Differenzierungsmarker	56
3.1.1.3.2	CD83 und die Aktivierungsmarker CD80/CD86/HLA-DR	58
3.1.1.3.3	CD206	60
3.2	Einfluss von Dasatinib, Src-kinase-inhibitor-I und Bosutinib auf die Zytokinproduktion (IL-10 und IL-12) von TAM	61
3.2.1	IL12-Produktion unter Einfluss von Dasatinib, Src-kinase-inhibitor-I und Bosutinib (ELISA)	61
3.2.1.1	Dasatinib	61
3.2.1.2	Src-kinase-inhibitor-I und Bosutinib	62
3.2.2	IL-10-Produktion unter Einfluss von Dasatinib und Src-kinase-inhibitor-I	64
3.3	NK-Zellen	67
3.3.1	Aktivierung von NK-Zellen in Ko-Kultur mit Makrophagen unter Dasatinib-Einfluss	67
3.3.2	Zytotoxizität von NK-Zellen in Ko-Kultur mit Makrophagen unter Dasatinib-Einfluss	69
3.4	IL-32γ	72
3.4.1	Modulation der Expression vom Oberflächenmarker durch IL-32γ	73
3.4.1.1	Differenzierungsmarker	73
3.4.1.2	CD83 und die Aktivierungsmarker CD80/CD86/HLA-DR	74
3.4.1.3	CD206	76
3.4.2	IL-10 Produktion unter Einfluss von IL-32γ	77
3.4.3	NK-Zellen	78
3.4.3.1	Expression von Aktivierungsmarkern von NK-Zellen in Ko-Kultur mit Makrophagen und IL-32γ	78
3.4.3.2	Zytotoxizität von NK-Zellen in Ko-Kultur mit Makrophagen und IL-32γ	79
4	Diskussion	81
4.1	Die Bedeutung von Tumor-assoziierten Makrophagen	81
4.1.1	Modulation der Oberflächenmarker durch Dasatinib/ Src-kinase-inhibitor-I/ Bosutinib	82
4.1.2	IL-12 in der Tumorthherapie	85
4.1.2.1	Zytokinproduktion von Makrophagen unter Einfluss von TKIs	86
4.1.3	Aktivierung und Zytotoxizität von NK-Zellen im Makrophagen-Milieu und Dasatinib-Inkubation	89
4.2	IL-32γ	92
4.2.1	Phänotyp von TAM unter IL-32γ-Einfluss	92
4.2.2	IL-10-Produktion unter IL-32γ	93
4.2.3	Aktivierung und Zytotoxizität von NK-Zellen in Makrophagen-Ko-Kultur und IL-32γ	94
5	Zusammenfassung	96
6	Literaturverzeichnis und Abbildungsverzeichnis	99

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das menschliche Immunsystem lässt sich in zwei Bereiche unterteilen: das angeborene, sogenannte „unspezifische“ und das erworbene oder auch „adaptive“ Immunsystem.

1.1.1 Angeborenes Immunsystem

Das angeborene Immunsystem, zeigt seine Wirkung innerhalb weniger Minuten und umfasst verschiedene Komponenten: hierzu zählen u.a. physikalische Schutzmechanismen der Epithelien (z.B. Flimmerepithelien der Trachea), sowie chemische Hindernisse (z.B. saures Milieu im Magen/Vagina, Sekretion von Lysozymen und Defensinen). Wenn diese natürliche Barriere trotzdem überwunden wird, kommen die zellulären Bestandteile des angeborenen Immunsystems zum Einsatz. Dazu zählen beispielsweise die neutrophilen Granulozyten, natürliche Killerzellen (NK-Zellen), Monozyten/Makrophagen und dendritische Zellen (DC).

Sie nehmen Mikroorganismen u.a. mit Hilfe von sogenannten Mustererkennungs-Rezeptoren (*pattern-recognition receptors*, PRRs) wahr. Diese PRRs erkennen beispielsweise sogenannte pathogen-assoziierte molekulare Muster (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMP). Ein wichtiger PAMP stellt das Lipopolysaccharid (LPS) dar, welches alle gram-negativen Bakterien auf ihrer äußeren Zellwand aufweisen.

Die PRRs kann man in intrazelluläre, lösliche und auf der Zelloberfläche exprimierte Rezeptoren unterteilen. (1) Die Hauptaufgaben dieser Rezeptoren nach Erkennung eines molekularen Musters liegen in der Aktivierung des Komplementsystems, der Phagozytose sowie der Induktion der Apoptose und der Opsonierung bakterieller Bestandteile. Außerdem induzieren sie proinflammatorische Signalkaskaden, wodurch sowohl Zellen des angeborenen als auch des erworbenen Immunsystems aktiviert werden. (2)

Zu den intrazellulären Mustererkennungs-Rezeptoren zählen beispielsweise die *NOD-like-Rezeptoren* (NLRs). Die oberflächlichen Rezeptoren setzen sich unter anderem aus der Gruppe der Scavenger (beispielsweise *cluster of differentiation*

(CD)163); C-type-Lektin (z.B. CD206) und der *toll-like-Rezeptoren* (TLR) zusammen.

TLR-4 wird am stärksten von Makrophagen, DCs und NK-Zellen exprimiert. Lipopolysaccharid stellt einen der wichtigsten Liganden des TLR-4 dar. Um eine starke Aktivierung von TLR-4 hervorrufen zu können, ist ein Komplex aus dem *LPS-bindenden Protein* (LPB), *myeloid differentiation protein 2* (MD2) sowie CD14 mit LPS notwendig. TLRs aktivieren den Transkriptionsfaktor NF- κ B (*Nuclear Factor kappa B*), was durch eine vermehrte Sekretion proinflammatorischer Zytokine (z.B. *Interleukin* (IL)-12) sowohl zur Aktivierung des angeborenen als auch des erworbenen Immunsystems führt. Sie sind demzufolge eine Brücke zwischen den beiden Komponenten des Immunsystems.

1.1.2 Erworbenes Immunsystem

Das adaptive Immunsystem hat die Aufgabe pathogene Substanzen, die nicht bereits durch die angeborene Abwehr eliminiert werden konnten, spezifisch zu erkennen und zu beseitigen. Die Spezifität dieser zusätzlichen Abwehr verlangt eine längere Reaktionszeit, führt jedoch zur Bildung eines immunologischen Gedächtnisses.

Eine - vereinfachte - Unterteilung in humorale und zelluläre Immunantwort ist möglich. B-Zellen und Plasmazellen stellen die humorale Immunantwort dar, deren Hauptmerkmal die Produktion von Antikörpern ist.

Nach Aktivierung durch CD4⁺-*T-Helfer*-Zellen (TH-Zellen) proliferieren bestimmte B-Zellen, welche gegen das präsentierte Antigen gerichtet sind und sich zu Plasmazellen sowie B-Gedächtniszellen differenzieren. Gedächtniszellen sorgen beim wiederholten Kontakt - teils auch ohne erneute Kostimulation mit CD4⁺-Zellen - mit dem Antigen für eine schnellere und spezifische Immunantwort. Dieser Mechanismus ist Teil des „immunologischen Gedächtnisses“. Verschiedenen Antikörperisotypen unterscheiden sich in ihrer Lokalisation sowie Aufgabe.

Die zelluläre spezifische Immunantwort beruht vor allem auf T-Zellen. Die Einteilung der T-Zellen erfolgt anhand von immunphänotypischen

Oberflächenmerkmalen (katalogisiert als „cluster of differentiation“). Es wird u.a. zwischen CD4⁺-TH-Zellen und CD8⁺-zytotoxischen T-Zellen unterschieden.

T-Lymphozyten exprimieren einen T-Zell-Antigen-Rezeptor (TCR-CD3, *t-cell-antigen-receptor*) -Komplex. Dieser TCR erkennt von MHC-Proteinen (*major histocompatibility complex*) präsentierte Antigene.

MHC-Proteine sind Oberflächenproteine von Zellen, welche Antigenfragmente präsentieren. MHC-I-Moleküle befinden sich auf jeder kernhaltigen Zelle, während MHC-II-Moleküle von antigenpräsentierenden Zellen (*antigen presenting cell*, APC), wie z.B. den Makrophagen, B-Zellen und DC, exprimiert werden.

Die CD8⁺-T-Zellen werden durch Antigene, die von MHC-I Molekülen auf beispielsweise virus-infizierten Zellen präsentiert werden, aktiviert. Die Sekretion von Granzyme und Perforine durch zytotoxische Zellen führt zur Apoptose der infizierten Zelle. CD4⁺-T-Zellen werden durch an MHC-II-Moleküle gebundene Antigene zur weiteren Differenzierung in TH1- bzw. TH2-Zellen angeregt. Anschließend wird unter anderem die humorale Immunreaktion veranlasst.

Es ist jedoch keineswegs möglich, eine klare Trennung des angeborenen und erworbenen Immunsystems vorzunehmen, da sie ineinander spielen, miteinander interagieren, sich gegenseitig hemmen oder aktivieren. Erst dadurch wird eine erfolgreiche Immunantwort möglich.

Ein geschwächtes Immunsystem bzw. eine inadäquate Immunantwort kann ein Prädispositionsfaktor für Infektionskrankheiten und Tumoren sein. Darauf wird in 1.2.1.2. genauer eingegangen.

1.2 Makrophagen

Als Teil der angeborenen Immunität spielen Makrophagen eine wichtige Rolle in der Kommunikation zwischen dem angeborenem und dem adaptiven Immunsystem.

Im Knochenmark entstehen zunächst aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen u.a. Monozyten. Monozyten gehören zu den Leukozyten und entwickeln sich gemeinsam mit dendritischen Zellen und Granulozyten aus einer myeloiden CD34⁺-Vorläuferzelle.

Nachdem sie das Knochenmark verlassen und im Blutstrom zirkulieren, wandern sie in ein Gewebe ein und reifen unter dem Einfluss verschiedener Signale in unterschiedliche Subtypen. Es entstehen –je nach Gewebe- hochspezifische Effektorzellen, welche sich in ihren Phänotypen und Funktionen unterscheiden. Es gibt ortsunabhängige, mobile Makrophagen, sowie ortsabhängige Gewebemakrophagen. In der Leber werden sie Kupffer-Zellen, in der Haut Langerhans-Zellen, im Gehirn Mikroglia, in der Lunge Alveolarmakrophagen sowie im Knochen Osteoklasten genannt.

Die komplexe Entstehung von Makrophagen ist jedoch immer noch nicht vollständig verstanden. Neuere Forschungsergebnisse wie beispielsweise von Sieweke et al. zeigen, dass ortsständige / gewebsspezifische Makrophagen eine Kapazität zur Selbsterneuerung -ähnlich der Stammzellen- besitzen. (3)

Eine der Kerneigenschaften der Makrophagen ist die Phagozytose, eine Form der Endozytose, worunter man die Aufnahme von festen Partikeln versteht. Sie dient der Elimination von Bakterien, Fremdkörpern, Viren, Tumorzellen und apoptotischen Zellen.

Damit gehören die Monozyten/Makrophagen gemeinsam mit den dendritischen Zellen und Granulozyten zu den Phagozyten und damit zum *mononukleären-phagozytären System* (MPS). Nach der Phagozytose präsentieren Makrophagen ingestierte Antigene über MHC-II Moleküle anderen Immunzellen wie den T-Zellen. Diese Antigenpräsentation ist eine wichtige Schaltstelle beispielsweise zwischen dem angeborenen und dem erworbenen Immunsystem.

Eine weitere wichtige Eigenschaft der Makrophagen ist die Zytokinproduktion. Als Reaktion auf eine Infektion können Makrophagen sowohl proinflammatorische Zytokine wie IL-2, IL-6, IL-12 und *Tumor- nekrose-Faktor- α*

(TNF- α) freisetzen. Bei Bedarf und abhängig vom umgebenden Mikromilieu können Makrophagen jedoch auch antiinflammatorische Zytokine, beispielsweise IL-10, freisetzen.

IL-12 spielt als proinflammatorisches Zytokin eine besondere Rolle in der Aktivierung anderer Immunzellen und setzt dadurch u.a. eine Entzündungs- bzw. antitumoralen Reaktion in Gang. Antiinflammatorische Zytokine vermindern eine solche Entzündung und tragen dazu bei, eine unkontrollierte Immunreaktion zu verhindern.

Makrophagen nehmen zudem eine zentrale Rolle bei der Wundheilung ein, indem sie durch Phagozytose Zelldetritus beseitigen und Wachstumsfaktoren produzieren. Dadurch werden Fibroblasten zur Proliferation angeregt und die Angiogenese stimuliert.

Im Kapitel 1.2.2. wird darauf noch genauer eingegangen.

1.2.1 Subtypen von Makrophagen

Makrophagen weisen eine hohe Diversität auf, die im Folgenden weiter beschrieben werden soll. Wichtig ist zu erwähnen, dass die in der Literatur verwendete und hier kurz dargestellte Klassifikation der folgenden Subtypen aus *in vitro* Versuchen entstanden ist und Extreme eines Kontinuums darstellen. *In vivo* zeigen Makrophagen eine ausgeprägte Plastizität. Eine völlig eindeutige Trennung zwischen den hier beschriebenen Subtypen *in vivo* ist wahrscheinlich nicht möglich. (4, 5)

1.2.1.1 Differenzierung von M1/M2 Makrophagen

Etwas vereinfacht werden Makrophagen in zwei funktionelle Typen unterschieden. Aufgrund der Historie werden M1 Makrophagen auch als „klassisch“ aktivierte, M2 Makrophagen auch als „alternativ“ aktivierte Makrophagen beschrieben. Die Hauptaufgaben der M1-Makrophagen bestehen in ihrer antimikrobiellen und antitumorösen Wirkung, deren Funktion als „Inflammation“ und Erregerabwehr beschrieben werden kann. M2-Makrophagen hingegen dienen der Immunsuppression und tragen zu Reparaturvorgängen bei, beispielsweise auch durch Stimulation der (Neo-)Angiogenese. (6, 7)

Klassische M1-Makrophagen werden u.a. durch bakterielles LPS oder *Interferon* (IFN)- γ , das beispielsweise von benachbarten Makrophagen, dendritische Zellen, NK-Zellen /oder TH1-Zellen freigesetzt wird, sowie durch den *granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) aktiviert.

M1-Makrophagen sezernieren unter anderem IL-6, IL-8, IL-12 und TNF- α . (8, 9) IL-12 stimuliert NK- und TH1-Zellen und ist ein wiederum ein wichtiger Marker zur Unterscheidung zwischen M1- und M2-Makrophagen. (10)

Durch die Expression von induzierbarer NO-Synthase (*nitric oxid*, NO) und von reaktiven Sauerstoffradikalen (*reactive oxygen species*, ROS), sowie ihrer antigenpräsentierenden Funktion wirken M1-Makrophagen zytotoxisch gegenüber Pathogenen und Tumorzellen.

In Zusammenschau mit der Sekretion der oben genannten Zytokine nehmen M1-Makrophagen eine proinflammatorische Funktion im Immunsystem ein.

HLA-Moleküle werden durch Aktivierung der Makrophagen heraufreguliert, um eine bessere und hochfrequente Antigen-Präsentation zu ermöglichen. Beispielsweise wird das HLA-II Molekül HLA-DR von antigen-präsentierenden Zellen exprimiert und ist ein Marker der Immunstimulation. Gemeinsam mit den Ko-Stimulatoren CD80 und CD86 aktiviert HLA-DR T-Lymphozyten. (11, 12)

Im Zusammenhang mit einer verstärkten Antigenpräsentation spielt auch CD83 als Oberflächenmolekül eine interessante Rolle.

CD83 ist ein Oberflächenmarker, der zuerst einmal mit aktivierten humanen DCs in Verbindung gebracht wird. (11, 13) Zhou et al. beschrieben erstmals 1995 CD83 als spezifischen und alleinigen Marker um DC zu identifizieren. (14)

Eine zeitweise, eher niedrige Expression von CD83 lässt sich auch auf Makrophagen feststellen. (15) In dieser Arbeit wurde die hohe Expression von CD83 als Marker zur Differenzierung zwischen Makrophagen und DCs verwendet.

Der erste beschriebene Mustererkennungsrezeptor (*Pattern Recognition Receptor*, PRR) war der lösliche Rezeptor CD14. Gemeinsam mit TLR4, LBP und MD2 bildet CD14 den LPS-Rezeptor. Bei Bindung des Liganden LPS an

diesen Rezeptoren-Komplex, kommt es zur Sekretion u.a. von TNF- α , IL-6, IL-12 und IFN- γ durch Makrophagen. (16)

Der Opsonierungsrezeptor Fc γ III -CD16- korreliert mit der Fähigkeit der Phagozytose von Makrophagen. Beide Rezeptoren lassen sich in unterschiedlicher Dichte auf Makrophagen nachweisen. Anhand dieser Expressionsdichte wurde eine *in vitro* Einteilung in drei verschiedene Typen vorgenommen. Die klassisch aktivierten Makrophagen, M1, exprimieren viel CD14 und geringe Mengen an CD16. (17)

Eine hohe Dichte an CD16 wird eher M2-Makrophagen zugeschrieben. (11, 12)

M2-Makrophagen stellen eine sehr heterogene Gruppe da, welche man *in vitro* in drei Subtypen M2a, b und c differenzieren kann. Wie oben erwähnt ist *in vivo* keine genaue Klassifikation möglich. Die Differenzierung der Makrophagensubtypen ist vom umliegenden Zytokinmilieu abhängig, welches *in vivo* zu komplex ist, um diese Einteilung vornehmen zu können.

M2a-Makrophagen entwickeln sich durch IL-4 und IL-13 Einwirkung (siehe Abb.2), M2b werden durch Immunkomplexbindung an den TLR aktiviert und M2c-Makrophagen durch antiinflammatorisch wirkende Einflüsse wie IL-10, Glukokortikoidhormone oder auch Prostaglandine (PGE₂) und *transforming growth factor* (TGF)- β .

PGE₂ und TGF- β spielen beispielsweise eine Rolle bei der Regulation der T-Zell-Aktivierung.

M2-Makrophagen produzieren, im Gegensatz zu M1-Makrophagen, hohe Mengen an IL-10 und dafür wenig bis gar kein IL-12. IL-10 aktiviert TH2-Zellen, welche ihrerseits IL-4 produzieren. Somit schließt sich ein positiver Feedback-Zirkel. (18)

Außerdem haben M2-Makrophagen eine hohe Phagozytoserate, jedoch resultiert daraus im Vergleich zu M1-Makrophagen eine geringere Antigenpräsentation. (19)

Wie in Abb.1 zusammengefasst, fördern M2-Makrophagen die Angiogenese, den Gewebeumbau, die Wundheilung sowie die Sekretion von antiinflammatorischen Zytokinen. Aufgrund dieser Eigenschaften und Funktionen wird ihnen im Tumorgewebe eine procancerogene Wirkung zugeschrieben.

Immunphänotypisch lassen sich M2-Makrophagen durch Expression des Hämoglobinscavenger-Rezeptors CD163, sowie des Mannose-Rezeptors CD206 charakterisieren. (8, 20, 21)

CD206 und CD163 gehören zu den PRRs und werden von Zellen monozytärer Abstammung exprimiert. Es sind vor allem Marker für die M2c-Makrophagen, da sie durch IL-10 verstärkt exprimiert werden. (19) Der Mannose-Rezeptor regt die Makrophagen selbst zur IL-10-Sekretion an und unterstützt dadurch ihre antiinflammatorische und tumorfördernde Wirkung.

CD163 ist ein Makrophagen-spezifisches Protein, mit dessen Hilfe der Anteil an zirkulierenden Haptoglobin-Hämoglobin-Komplexen verringert und dadurch die proinflammatorische Wirkung des Hämoglobins reduziert wird. (22)

Der Scavenger-Rezeptor wird unter IL-10 oder auch M-CSF-Einfluss vermehrt exprimiert. TNF- α , IL-4, IFN- γ und LPS hingegen reduzieren die Expression von CD163 auf Makrophagen. (19)

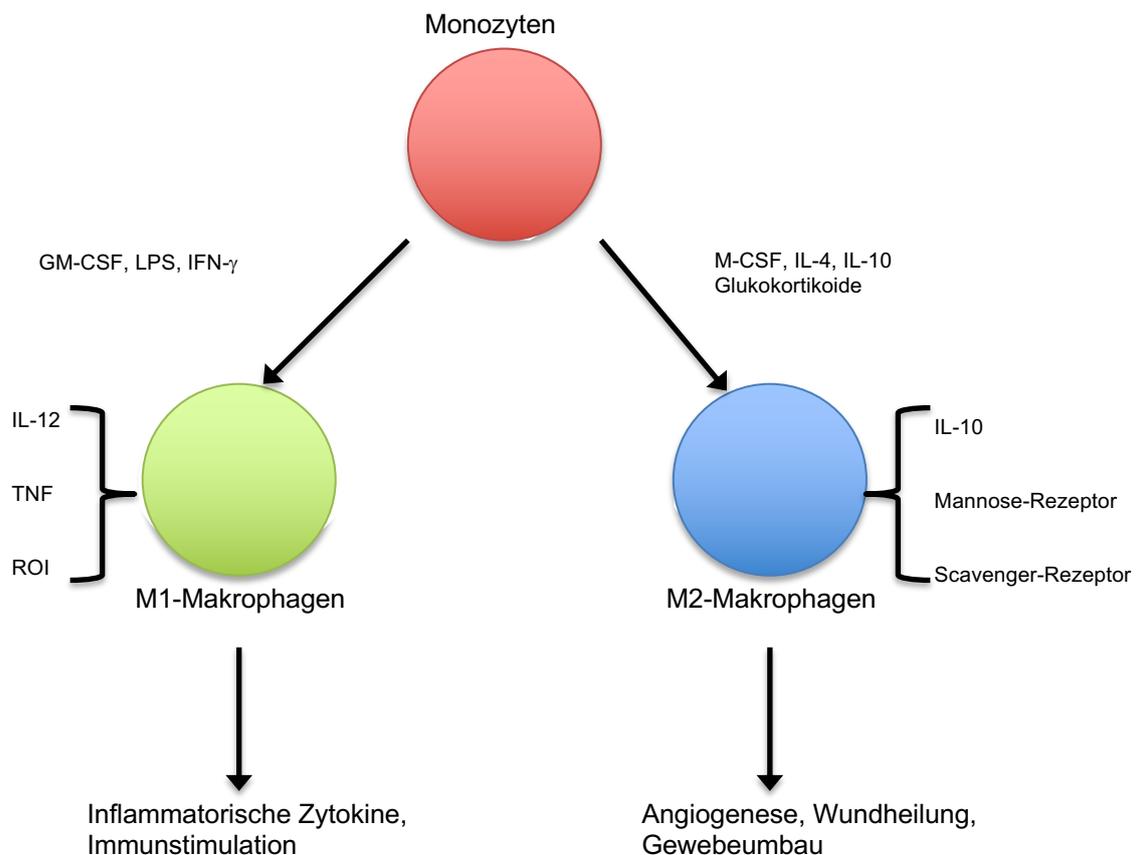


Abbildung 1: Makrophagen können klassisch durch LPS, IFN- γ aktiviert werden (M1) oder zu alternativen Makrophagen durch den Einfluss von IL-4, IL-10, Glukokortikoide differenzieren. M1-Makrophagen produzieren viel IL-12, TNF- α und reaktive Sauerstoffverbindungen. Die alternativen Makrophagen sezernieren vor allem IL-10, sowie Mannose und Scavenger-Rezeptoren. Sie fördern dadurch die Angiogenese, Gewebeumbau und die Wundheilung. Modifiziert nach Sicca et al. (23)

Eine strikte Trennung beider Populationen ist jedoch nicht möglich, es gibt eine Vielzahl an Phänotypen. (5, 10) Die Phänotypen sind sehr vielseitig und teilweise überlappend. Am ehesten stellen M1-Makrophagen auf der einen Seite und M2-Makrophagen auf der anderen Seite die Extreme dar. Mit neuen Methoden wie z.B. CyTOF (**Cytometry by time-of-flight**), was die Markierung zahlreicher Oberflächenantigene auf derselben Zelle ermöglicht, haben beispielsweise Roussel et al. eine Vielzahl von Makrophagensubklassen identifiziert. (24)

1.2.2 Tumor-assoziierte Makrophagen

Schon Rudolf Virchow beschrieb 1863 das Vorhandensein von Leukozyten in Tumoren und stellte einen Zusammenhang zwischen chronischen Entzündungen und der Entstehung von Malignomen fest. (25) Eine spezielle Untergruppe der Leukozyten im Tumorgewebe nennt man **tumor-associated macrophages** (TAM). (26) Diese TAM nehmen den größten Anteil an Immunzellen im Tumorstroma ein. Des Weiteren besteht das Tumorstroma noch aus Fibroblasten, der extrazellulären Matrix und Gefäßen. (27)

Makrophagen werden in ihrer Differenzierung stark vom umgebenden Milieu beeinflusst. Das Milieu eines Tumors weist in der Regel hohe Konzentrationen an IL-10, IL-4 und niedrige Mengen an LPS und IFN- γ auf. Die sich daraufhin differenzierenden Makrophagen entsprechen aufgrund des antiinflammatorischen Milieus eher dem M2-Phänotyp. (8) TAM charakterisiert eine Expression der Oberflächenproteine CD163 und CD206, sowie die Sekretion des Zytokins IL-10.

Unter hypoxischen Bedingungen wird der **Hypoxie-induzierte Faktor** (HIF)-1 intrazellulär frei, welcher TAM durch **macrophage-colony stimulating factor** (M-CSF) -Sekretion anlockt und zur **vascular endothelial growth factor** (VEGF)-Produktion anregt. Dadurch wird eine Versorgung der Tumorzellen mit Sauerstoff sowie Nährstoffen durch Neovaskularisation sichergestellt und somit eine Tumorprogression gefördert. (28)

Außerdem werden TH1-Zellen inhibiert und eine Immunantwort gegen den Tumor verhindert. (29)

Qian und Pollard (30) fassten 2010 viele Daten zusammen, die zeigten, dass das Vorkommen von M2-like TAM einen negativen Einfluss auf die Prognose hat. Nicht jedoch rein die Anzahl an TAM, sondern deren Zytokinproduktion ist für die Prognose von entscheidender Bedeutung. Dies wurde vor allem für Mammakarzinome und Bronchialkarzinome beschrieben, aber auch für Pankreaskarzinome, das Hepatocelluläre Karzinom und folliculäre Lymphome. (18, 28, 30)

Interessanterweise zeigen u.a. Stout et al. (31) oder Watkins et al. (32), dass die Funktionalität von TAM durch exogene Stimuli modifiziert werden kann.

Beispielsweise behandelte Watkins et al. (32) murine TAM *in vivo* mit IL-12, wodurch sie ihren Funktionalität von prokanzerogen und immunsuppressiv (viel Sekretion von IL-10 und TGF- β) zu proinflammatorisch (vermehrte Sekretion von TNF- α , IL-6, IL-15) änderten.

An diesem Punkt setzt diese Arbeit an und untersucht, ob sich durch externe Stimuli wie z.B. *Tyrosinkinaseinhibitoren* (TKIs) oder Zytokine wie IL-32 γ die TAM in Richtung M1 Makrophagen modifizieren lassen.

1.3 NK-Zellen

1.3.1 Definition und Eigenschaften

Im Knochenmark entstehen natürliche Killerzellen aus einer, mit den T-Zellen gemeinsam hervorgehenden, lymphatischen Vorläuferzelle. NK-Zellen sind mit 10-15% die drittgrößte Klasse in der Lymphozytenpopulation des peripheren Blutes. Sie spielen eine zentrale Rolle im angeborenen Immunsystem.

Als Bestandteil des angeborenen Immunsystems zeichnen sich NK-Zellen durch ihre Fähigkeit der direkten Elimination virusinfizierter oder maligne veränderter Zellen aus, ohne dass ein vorangegangener Kontakt (Priming) nötig wäre.

Eine Balance aus aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren reguliert die NK-Zell-Aktivierung. (33)

HLA-Klasse-I-Moleküle binden an inhibierende Rezeptoren der NK-Zellen und schützen die Zelle damit vor einer Lyse. HLA-I Moleküle werden von gesunden, kernhaltigen und körpereigenen Zellen exprimiert. Falls die HLA-I-Moleküle auf einer Zelle vermindert sind, fällt das inhibierende Signal weg und NK-Zellen werden aktiviert. Diese Hypothese nennt man „missing self“. (34)

Zu einer Suppression der HLA-I-Moleküle bzw. einem kompletten Verlust kommt es bei transformierten Zellen.

Es kann jedoch auch trotz unveränderter HLA-I-Moleküle zur NK-Zell-Aktivierung kommen: Zellen, die DNA-Schäden oder zellulären Stress haben, exprimieren verstärkt aktivierende Liganden für NK-Zell-Rezeptoren. Diese Aktivierung von NK-Zellen nennt man „induced self“.

Das Abtöten dieser Zellen basiert u.a. auf der Exozytose intrazellulärer Granula. Die Granula enthalten zytotoxische Effektormoleküle wie Perforine und Granzyme A/B. Bei der Ausschüttung dieser intrazellulären, zytotoxischen Granula gelangt CD107a an die Oberfläche von NK-Zellen. CD107a wird auch *lysosomen-assoziiertes Membranprotein*, LAMP-1, genannt. Die CD107a-Expression korreliert mit dem Ausmaß der Degranulation. (35, 36) Es kann auch direkt eine Apoptose beispielsweise mittels der FAS-Signalwege ausgelöst werden.

Phänotypisch kann man NK-Zellen durch ihre CD56 Expression - auch NCAM (*neutral cell adhesion molecule*) genannt - und das Fehlen von CD3 identifizieren. CD3 ist ein Marker der T-Zell-Population und mit dessen T-Zell-Rezeptor assoziiert. (37)

NK-Zellen exprimieren CD16 (FcγRIIIA), ein niedrigaffiner Rezeptor für Immunglobulin G. Kommt es zu einer Bindung von CD16 und dem Fc-Teil von IgG-Antikörpern, wird die NK-Zelle aktiviert und es kommt zur Ausschüttung zytotoxischer Moleküle. Diese Funktion der NK-Zellen wird als ADCC (*antibody-dependent cellular cytotoxicity*) bezeichnet (38).

Außerdem sezernieren NK-Zellen verschiedenste Zytokine und Chemokine. Die Zytokine TNF-α, GM-CSF, IL-13 sowie IFN-γ sind wichtige Beispiele. Die Produktion dieser Zytokine macht einen direkten Einfluss auf das adaptive Immunsystem durch Aktivierung von T-Zellen möglich. (39, 40)

Durch die IFN- γ -Sekretion aktivierter NK-Zellen wird die Reifung von DCs gefördert, welche wiederum u.a. IL-12 sezernieren und somit das adaptive Immunsystem aktivieren.

1.3.2 NK-Zell-Subtypen

Allen NK-Zell-Subtypen sind eine fehlende CD3-Expression sowie eine CD56-Expression gemeinsam. Anhand der Expressionsdichte von CD56 lassen sich die NK-Zellen in zwei Subpopulationen unterteilen: CD56^{dim}-NK-Zellen bezeichnet NK-Zellen mit geringer CD56-Expression, wobei CD56^{bright}-NK-Zellen hohe Mengen CD56 exprimieren.

Mit ca. 90% Anteil sind CD56^{dim}-NK-Zellen im peripheren Blut präsent, nur 10% sind CD56^{bright}-NK-Zellen. Nicht nur phänotypisch unterscheiden sich diese beiden Subpopulationen, sondern auch in ihrer Funktion gibt es Differenzen. CD56^{bright}-NK-Zellen weisen ein schwächeres zytotoxisches Potential im Vergleich zu CD56^{dim}-NK-Zellen auf. Im Gegensatz zu CD56^{dim}-NK-Zellen produzieren CD56^{bright}-NK-Zellen nach ihrer Aktivierung mehr immunregulatorische Zytokine wie beispielsweise IFN- γ , TNF- α , GM-CSF, IL-10 und IL-13. (41) Durch das sezernierte IFN- γ werden sowohl T-Zellen als auch Makrophagen aktiviert. Gegensätzlich dazu agiert IL-10: dieses Zytokin supprimiert beide genannten Zellpopulationen. (42)

CD56^{dim} NK-Zellen exprimieren zudem verstärkt CD16 auf der Zelloberfläche, wodurch sie eine gesteigerte ADCC aufweisen. (siehe Abbildung 2.) (43)

Die folgende Abbildung stellt die Unterschiede der beiden NK-Zell-Subtypen dar.

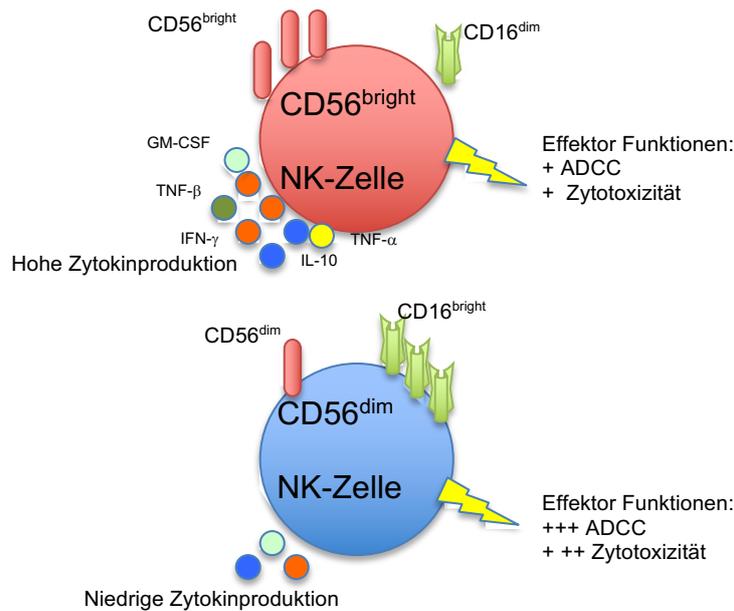


Abbildung 2: CD56^{dim} und CD56^{bright} unterscheiden sich in einigen Charakteristika: Oben dargestellt die CD56^{bright} NK-Zellen mit einer gesteigerten Zytokinsekretion. CD56^{dim}, der überwiegend präsente NK-Zell-Subtyp, zeichnet sich durch eine erhöhte zytotoxische Aktivität aus. Modifiziert nach Cooper et al. (2001). (44)

1.3.3 CD25, CD69 und CD96 als Aktivierungsmarker von NK-Zellen

Der Übersicht halber werden im folgenden Abschnitt ausschließlich die in dieser Arbeit untersuchten Aktivierungsrezeptoren genauer erläutert.

CD25 ist die α -Kette des IL-2-Rezeptors. Der IL-2-Rezeptor besteht aus α -, β - und γ -Ketten und ist somit ein heterotrimerer Rezeptor. (45) Von T-Zellen sezerniertes IL-2 bindet an CD25 auf NK-Zellen und führt zu einer vermehrten CD25-Expression auf NK-Zellen. Durch diese Koppelung werden NK-Zellen zur IFN- γ -Sekretion angeregt. (46)

CD69 wird sehr früh auf aktivierten (z.B. durch IL-2, IL-12) NK-Zellen exprimiert. Makrophagen, T-Zellen und weitere hämatopoetischen Zellen tragen diesen Oberflächenmarker ebenso auf ihrer Zelloberfläche. Neben der Beeinflussung der Zytotoxizität von NK-Zellen, hat CD69 eine proliferationsfördernde Wirkung, reguliert die TNF- α Produktion und lenkt die Expression anderer aktivierender Proteine wie zum Beispiel CD25. (47)

CD96, auch als TACTILE (*t cell-activation increased late expression*) bekannt, wird auf hämatopoetischen Stammzellen, T-Zellen und NK-Zellen präsentiert. Eine Erhöhung von CD96 konnte bei akuten myeloischen Leukämien, T-Zell akute lymphatische Leukämie (T-ALL) und beim *myelodysplastischen Syndrom* (MDS) festgestellt werden. Ein Hauptligand von CD96 ist CD155 (Poliovirusrezeptor); ein Oberflächenmarker, der auf vielen Krebszelllinien und Primärtumoren nachweisbar ist. (48) Die Interaktion von CD96 und CD155 vermittelt eine Zell-Zell-Adhäsion. (49) Fuchs et al. beschreiben, dass CD96 in humanen NK-Zellen eine Aktivierung fördert und die Zytotoxizität stimuliert. (49) Chan et al. wiederum beobachten eine gegensätzliche Funktion von CD96 bei *in vivo* Versuchen mit Mäusen. (50)

1.4 Tyrosinkinaseinhibitoren

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf der Beeinflussbarkeit des Phänotyps und der Zytokinproduktion von Makrophagen durch die Inkubation mit Tyrosinkinaseinhibitoren.

Tyrosinkinasen sind intrazelluläre Enzyme und katalysieren die Übertragung einer Phosphatgruppe von einem Nukleosidtriphosphat, in den meisten Fällen Adenosintriphosphat, ATP, auf eine Hydroxy-Seitenkette einer Aminosäure eines Proteins. (51)

Die Klasse der Tyrosinkinasen beinhaltet mehr als 90 verschiedene „Mitglieder“ mit steigender Tendenz, die u.a. nach ihrer Lokalisation unterteilt werden. (52) Die Familie der Src-Kinasen (*src-family-kinase*, SFK) gehört zu den zytoplasmatischen Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen. Sie besteht aus neun Mitgliedern (src, blk, yes, yrk, fgr, fyn, lyn, lck und hck). (53)

Die namensgebende Kinase Src wurde 1976 bei der Entdeckung des Rous-Sarkom-Virus erstmals beschrieben und als v-src - ein Proto-Onkogen bezeichnet. (54) Die unterschiedlichen Src-Kinasen haben verschiedene Expressionsorte. In hämatopoetischen Zellen findet man hck, fgr, blk und lck vermehrt vor, wohingegen fyn und src ubiquitär exprimiert wird. (55)

In ihrer Struktur ähneln sich alle Src-Kinasen: sie bestehen aus sechs funktionellen Abschnitten.

In der Regulation der Zellproliferation, Differenzierung, Zellmigration und Apoptose spielen Src-Kinasen eine wichtige Regulation. (56, 57)

Strenge Kontrollmechanismen sind aufgrund der entscheidenden Aufgaben von enormer Bedeutung. In vielen Neoplasien ist eine Dysregulation entweder in Form einer erhöhten Proteinexpression oder einer erhöhten Tyrosinkinaseaktivität zu finden. Beispiele dafür sind das Lungenkarzinom (58), Mamma (59)- und Ovariakarzinom (60).

Vielen onkogene Signalkaskaden wie z.B. *human epidermal growth receptor 2* (Her2)/neu, *platelet-derived growth factor receptor* (PDGFR) und *epidermal growth factor receptor* (EGFR) haben eine Erhöhung bzw. Aktivierung von c-src zur Folge. (57) Aufgrund dessen kann durch die Inhibition von Src-Kinasen ein anormaler Signalweg gehemmt werden und somit eine Transformation zu malignen Zellen sowie die Krebszellaktivität vermindert werden.

Im Folgenden sollen drei Src-Kinase-Inhibitoren, die in dieser Arbeit verwendet wurden, etwas genauer beschrieben werden.

1.4.1 Dasatinib

Dasatinib (Sprycel, BMS- 354825) ist ein dualer Tyrosinkinaseinhibitor, der sowohl die bcr-abl-Kinase als auch Src-Kinasen hemmt. Dasatinib bindet sowohl an die aktive als auch die inaktive Konformation von bcr-abl. Des Weiteren hemmt Dasatinib auch den Stammzellofaktor-Rezeptor c-kit, die Brutons-tyrosinkinase (BTK), die TEC-Kinase und PDGF- β . (61, 62)

Dasatinib wirkt proapoptotisch und antiproliferativ auf Zellen von hämatologischen und soliden Tumoren. Diesem proapoptotischen Effekt liegt eine Inhibition von Kinasen, die in der bcr-Signalkaskade eingeschlossen sind, durch Dasatinib zu Grunde. (62, 63)

Kürzlich konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass der Präsenz von Dasatinib während einer TLR-Aktivierung der DCs zu einer gesteigerten IL-12-Produktion führt. (64)

In der Klinik kommt Dasatinib vor allem bei der Behandlung der chronisch myeloischen Leukämie dann zur Anwendung, wenn eine Resistenz gegen

Imatinib vorliegt sowie zur Behandlung einer Philadelphia-Chromosom-positiven (=bcr-abl positiven) ALL.

Die Therapie mit Dasatinib zeigt Nebenwirkungen, weil auch gesunde Zellen inhibiert werden. Eine Myelosuppression mit entsprechenden Symptomen oder Pleuraergüsse kann die Folge sein. (65) Außerdem wird Dasatinib eine erhöhte Kardiotoxizität zugeschrieben. (66)

Dasatinib, als potenter Inhibitor der Src-Kinasen, wirkt an wichtigen Schlüsselstellen der NK-Zell-Aktivierung.

Blake et al. beschreiben eine dosis-abhängige Suppression der Zytotoxizität von NK-Zellen. (67) Demgegenüber stehen die Ergebnisse von Uchiyama et al., die eine gesteigerte Zytotoxizität unter Dasatinib dokumentieren konnten. (68) Tanaka et al. beobachteten eine gesteigerte Expansion von NK-Zellen unter Dasatinib. (68, 69)

Hassold et al. beobachteten *in vitro* in der Gegenwart von Dasatinib eine Inhibition der NK-Zell-Effektorfunktionen. Allerdings zeigten sie nach 24h Vorbehandlung mit Dasatinib eine signifikante Steigerung der Zytotoxizität (gegenüber Daudi-Lymphomzellen) sowie der Zytokinproduktion und NK-Zell-Degranulation. (70) Zusammenfassend ist aufgrund der unterschiedlichen Ergebnisse zu vermuten, dass es auf die Dauer der Dasatinib-Inkubation bzw. die direkte Wirkung von Dasatinib im Assay ankommt.

1.4.2 Src-kinase-inhibitor-I

Ein weiterer Inhibitor der Src-Kinase-Familie ist der Src-kinase-inhibitor-I und gilt als „Gold-Standard“ der src-Inhibition.

Src-kinase-inhibitor-I reduziert das Überleben von Zellen und inhibiert die Wnt-Aktivität via c-src-Inhibition. (71) Der Wnt-Signalweg ist oftmals bei Tumorzellen aktiviert, β -Catenin liegt dann kontinuierlich anstatt stimulusabhängig vor. Dieses intrazelluläre Protein wirkt proliferationsfördernd und ist ein wichtiges Schlüsselprotein im Zellzyklus. Dies erklärt, warum eine erhöhte Aktivität dieser Substanz entscheidend zur Entstehung von Neoplasien beiträgt.

1.4.3 Bosutinib

Bosutinib ist ebenfalls ein Tyrosinkinaseinhibitor und genau wie Dasatinib als second-line Therapeutikum bei Imatinibresistenz bei CML zugelassen. Im Vergleich mit Imatinib führt Bosutinib zu einer 100-fach stärkeren Inhibition der bcr-abl-Tyrosinkinase und hemmt auch Kinasen der src-Familie. Im Unterschied zu Dasatinib hemmt Bosutinib aber nicht die Rezeptoren wie c-KIT und PDGFR. (72) Bosutinib besitzt genauso wie Dasatinib die Fähigkeit bcr-abl sowohl in der aktiven als auch inaktive Konformation zu binden.

1.5 Interleukin 32

Neben TKIs können u.a. auch körpereigene Zytokine zu einer erhöhten Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen führen und damit das Tumormikromilieu und dessen Zellen beeinflussen. In den hier durchgeführten Versuchen wurde die Wirkung von IL-32 γ auf TAM sowie NK-Zellen untersucht.

Das Zytokin Interleukin 32 wurde 1992 erstmals beschrieben und auch als „*natural killer cell transkript 4*“ (NK4) benannt. (73) 2005 beschrieben Kim et al, dass NK4 ein inflammatorisches Zytokin ist und nannten es in Interleukin-32 um. IL-32 wird hauptsächlich von T-Zellen, NK-Zellen, Monozyten und Epithelzellen unter Einfluss von IL-2, IL-18 oder IFN- γ produziert.

IL-32 wiederum induziert die Synthese in Monozyten, NK-Zellen und T-Zellen u.a. von TNF- α , CXCL8, CXCL2 und IL-8 durch die Aktivierung von NF- κ B und p38-*mitogen-aktivierte-Protein* (MAP)-Kinasen. (74)

Man kann IL-32 in sechs verschiedene Isotypen IL-32 α , IL-32 β , IL-32 γ , IL-32 δ , IL-32 ϵ und IL-32 ζ einteilen. Die verschiedenen IL-32-Isotypen entstehen durch alternatives Splicing beispielsweise in aktivierten T-Zellen oder NK-Zellen. (75) Es stellte sich heraus, dass das ursprünglich bekannte NK4-Transkript dem IL-32 γ Varianten entspricht. (74) IL-32 γ weist sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die höchste Zytokinproduktion auf. (76) IL-32 α befindet sich intrazellulär, IL-32 β wird extrazellulär und am meisten aller Isoformen sezerniert. (77)

In aktivierten T-Zellen ist IL-32 β die dominante Splicevariante und spielt dort eine wichtige Rolle bei der Apoptose von T-Zellen.

Die genauen funktionellen Unterschiede der verschiedenen Isotypen sind noch nicht im Detail erforscht, ebenso der IL-32-Rezeptor.

1.5.1 Funktion des IL-32 γ

IL-32 γ zeigt von den vier Subtypen des Interleukins-32 die höchste biologische Aktivität und ist die längste Isoform. (76) IL-2 induziert eine hohe IL-32 γ Expression in NK- und T-Zellen. (78) IL-32 γ wiederum induziert die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α , IL-6, IL-1 β und IL-1 α . (79) Des Weiteren ist IL-32 γ ein starker Induktor der Prostaglandin E2 Synthese in Maus-Makrophagen und menschlichen Blutmonozyten. (80) Diese Eigenschaft unterstreicht das proinflammatorische Wirkprofil von IL-32 γ .

1.5.2 Interaktion mit Makrophagen

Zellen, die unter IL-32 γ differenzieren, exprimieren den DC-Marker CD83, entsprechen aber in ihrem funktionellen Phänotyp mehr den Makrophagen-ähnliche Zellen als den dendritischen Zellen. (81, 82)

IL-32 γ -differenzierte Zellen zeigen eine weitere charakteristische Eigenschaft von Makrophagen: sie phagozytieren. (83)

Osman et al. untersuchten unter anderem den Einfluss von IL-32 γ auf Makrophagen. (84) Sie fanden heraus, dass M-CSF und IL-32 γ einen additiven Effekt auf das Überleben der Makrophagen haben.

Unter Einfluss von M-CSF entstehen M2-artige Makrophagen. (85) Bei IL-32 γ ging man davon aus, dass es als proinflammatorisches Zytokin die ebenfalls proinflammatorischen M1-Makrophagen stimuliert. (74) Humane Makrophagen unter Zusatz von IL-32 γ produzieren mehr IL-6, IL-8 und CD80 als M-CSF behandelte Makrophagen. Diese IL-32 γ behandelten Makrophagen weisen jedoch eine geringere Expression von CD86, einem M1-Marker, als M-CSF behandelte Makrophagen auf. Erstaunlicherweise exprimieren IL-32 γ behandelte Makrophagen mehr CD14 und CD163 als die M-CSF Makrophagen. Unter

Zusatz von IL-32 γ entstehen demnach Makrophagen mit einem gemischten M1 und M2 Phänotyp. (84)

1.6 Fragestellung dieser Arbeit

Neben den bisher gängigen Therapieoptionen in der Onkologie sind in den letzten Jahrzehnten vermehrt die Möglichkeiten der Tumormunologie in den Vordergrund und Fokus der Forschung gerückt. Eine vielversprechende Möglichkeit ist die Immunantwort des Körpers gegen Tumorzellen zu stimulieren, indem man z.B. Makrophagen mittels TKIs in eine proinflammatorische Richtung moduliert. Tyrosinkinaseinhibitoren, welche vor allem durch den bahnbrechenden Erfolg in der CML-Behandlung bekannt sind, modulieren TAM in ihrer Funktionalität und ihrem Phänotyp.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob durch Dasatinib, Src-kinase-inhibitor-I oder Bosutinib eine Modulation von M2-Makrophagen in M1-Makrophagen möglich ist. Neben dem Phänotyp wurden auch funktionelle Unterschiede analysiert.

So konnte in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe eine gesteigerte IL-12-Produktion von Makrophagen unter Einfluss von Dasatinib gezeigt werden. Wir haben die IL-10 und IL-12 Produktion der modifizierten Makrophagen weiter analysiert mit der Frage, ob es sich um einen off-target Effekt von Dasatinib handelt oder ob es sich prinzipiell auf weitere TKIs übertragen lässt.

Als weiteren funktionellen Assay haben wir die Beeinflussung von NK-Zellen durch modifizierte Makrophagen gewählt. Wir gingen der Hypothese nach, dass die verstärkte IL-12 Sekretion der Makrophagen eine verbesserte Aktivierung und Zytotoxizität von NK-Zellen in Ko-Kultur zur Folge hat.

Im zweiten Abschnitt der Arbeit sollten nicht nur TKIs, sondern auch die Rolle neuer Zytokine insbesondere IL-32 γ bei der Modifikation von Makrophagen untersucht werden. IL-32 γ ist einerseits proinflammatorisch und potenziert die Sekretion weiterer proinflammatorischer Zytokine. (86)

Wir beschäftigten uns deshalb mit dem Einfluss von IL-32 γ auf die Phänotypisierung der verschiedenen Makrophagensubtypen. Auch hier mit besonderem Augenmerk auf den Vergleich zwischen M1 und M2-Makrophagen. Außerdem haben wir uns gefragt, ob die IL10-Produktion durch IL-32 γ beeinflusst

wird. Auch hier wurde die NK-Zell Ko-Kultur mit Makrophagen als komplexes, funktionelles Read-out-System genutzt.

2 Methoden und Material

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Geräte

Automatischer Zellzähler („Countess“)	Invitrogen GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Durchflusszytometer FACS Canto II	BD (New Jersey, USA)
MACS Multi Ständer	Miltenyi Biotec (Bergisch-Gladbach, Deutschland)
NALGENE™ Cryo1°Freezing Container	Thermo Fisher Scientific Inc (Massachusetts, USA)
Pipette 12-Kanal 20-200 acura 855	Socorex (Ecublens, Schweiz)
Pipetten 0,1-2,1-10µ,10-100µ,20-200µ,100-1000µ	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Pipettierhilfe Multipipette plus	Eppendorf AG
QuadroMACS™ -Separator	Miltenyi Biotec
Zählkammer, Neubauer improved	Marienfeld (Lauda-Königshofen, Deutschland)
Zentrifuge Rotanta 460 RS	Hettich (Tuttlingen, Deutschland)
Zentrifuge, Microzentrifuge	Eppendorf AG

Verbrauchsmaterial

Countess™ Cell counting chamber slides	Invitrogen
Deckgläser	Hartenstein (Würzburg, Deutschland)
Dispenser 5ml 1=100µl	Eppendorf AG
Einfrierröhrchen, Nunc CryoTube Vials	Biozym Scientific (Hessisch Oldendorf, Deutschland)
Pipette Cellstar, 10ml	Greiner Bio-one (Kremsmünster, Österreich)
Pipette Cellstar, 25ml	Greiner Bio-one
Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl, 1000 µl	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland)
Polyethylen Röhrchen	Greiner Bio-one
Reagenzröhrchen, Polysterol (FACS-Röhrchen)	Greiner Bio-one
Reaktionsgefäße mit Decker (Eppendorf)	Eppendorf AG
Safe seal Gefäß 1,5 ml	Sarstedt AG & Co.
Säulen für MACS-Separation, LS	Miltenyi Biotec
Stabpipette Cellstar 5ml	Greiner Bio-one

Zellkulturflasche Cellstar	Greiner Bio-one
Zellkulturplatte 12-well, Flachboden	Greiner Bio-one
Zellkulturplatte 6-well, Flachboden	Greiner Bio-one
Zellkulturplatte 96-well, Flachboden	Greiner Bio-one
Zellkulturplatte 96-well, U-Boden steril	Thermo Fisher Scientific Inc
Zellkulturplatte 96-well, U-Boden unsteril	Thermo Fisher Scientific Inc
Zentrifugenröhrchen 15ml	Greiner Bio-one
Zentrifugenröhrchen 50ml	Greiner Bio-one

2.1.2 Chemikalien und Substanzen

Chemikalien

Accutase	PAA (Pasching, Österreich)
Albumin Fraktion V, biotinfrei	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Aqua ad iniectabilia CD	Sigma Aldrich (St.Louis, USA)
CD 14 MicroBeads, human 2ml	Miltenyi Biotec
CD 56 MicroBeads, human 2ml	Miltenyi Biotec
CellGro DC Medium	Cell Genix (Freiburg, Deutschland)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich
DMEM Medium (4,5g/L Glukose, +L-Glutamin, Pyruvat)	Gibco by Life Technologies (Kalifornien, USA)
Ethanol 70%	FISCHAR GmbH&Co. KG (Saarbrücken, Deutschland)
Fixation Buffer	Biologend (San Diego, USA)
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) no Calcium, no Magnesium, no Phenolred	Gibco by Life Technologies (Kalifornien, USA)
Schwefelsäure 1M (H ₂ SO ₄)	Carl Roth GmbH
Trypanblaulösung	Gibco by Life Technologies
Tween 20	Carl Roth GmbH

Substanzen

Bicoll Separation Solution, isotonisch, Dichte 1.077 g/ml	Biochrom GmbH (Berlin, Deutschland)
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco by life technologies™
rHu GM-CSF	Gentaur (Kampenhout, Belgien)
Human IL-10	PeptoTech (New Jersey, USA)
Human IL-15	PeptoTech
Human IL-2	PeptoTech
Human IL-4	PeptoTech
IFN- γ	PeptoTech

LPS (Lipopolysaccharide aus Escherichia coli) 055:B5	Sigma
Human M-CSF	PeptoTech (New Jersey, USA)
Penicillin/Streptomycin	PAA

2.1.3 Lösungen, Medien und Zellen:

Dasatinib: Selleckchem (Houston, USA), Stocklösung (DMSO): 10 μ M,
Arbeitskonzentration: 50 nM.

Src-kinase-Inhibitor-I: Selleckchem (Houston, USA), Stocklösung (DMSO): 12,5
nM, Arbeitskonzentration: 100nM.

Bosutinib: Selleckchem (Houston, USA), Stocklösung (DMSO): 10mM,
Arbeitskonzentration 50nM.

IL-32 γ : R&D Systems (Minneapolis, USA), Stocklösung (PBS/1%HS)
Arbeitskonzentration 100ng/ μ l =2 μ l/ml.

K562-Zellen:

Die Zellen wurden freundlicherweise von Frau PD DR. U. Kämmerer
(Universitätsfrauenklinik Würzburg) zur Verfügung gestellt.

Diese Zelllinien wurden bei Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie
während einer Blastenkrise generiert. K562 exprimieren keine MHC-I-Moleküle
und stellen deshalb ein gutes NK-Zell-Target dar. (87, 88).

K562 wurde in DMEM unter Zusatz von 10% FCS und 1% P/S bei 5% CO₂-
Atmosphäre und 95% Luftfeuchtigkeit und 37° kultiviert. Alle 2-4 Tage wurden die
Kulturen gesplittet.

Zellzahlbestimmung:

Für die Bestimmung der Zellzahlen wurde eine Neubauer-Zählkammer benutzt
und folgende Formel verwendet:

Zelldichte (Zellen/ml) = [Zellzahl (aus 4 Großquadraten) / (4 (Großquadrate) x
0,1 μ l (=ausgezähltes Volumen))] x 1000 x Verdünnungsfaktor

Der Verdünnungsfaktor entspricht der Verdünnung der Zellsuspension mit Trypanblau: 10µl der Zellprobe mit 90µl Trypanblau (1:10 mit Verdünnung).

Es wurde jeweils die Anzahl vitaler und toter Zellen in den vier Großquadranten (=16 Kleinquadranten) der Neubauer Zählkammer gezählt. Tote Zellen färben sich dunkelblau, da ihre Zellmembran permeabel ist. Durch das gleichzeitige Zählen der lebenden und toten Zellen konnte eine Aussage zur Vitalität der Zellen getroffen werden.

Zählgerät:

Bei Versuchen mit NK-Zellen und K562 wurde der automatische Zählzähler „Countess“ von Invitrogen GmbH Karlsruhe, Deutschland verwendet. Mit Hilfe der Trypanblaufärbung ist eine Lebend/Tot-Diskrimination der Zellen möglich.

2.1.4 Reagenzien und Antikörper für die Durchflusszytometrie

Reagenzien

Annexin V Binding Buffer	Thermo Fisher Scientific Inc
Brefeldin A Solution	Biologend (San Diego, USA)
OneComp eBeads	Thermo Fisher Scientific Inc
Perm/Wash Buffer	Biologend

Antigene

Alle hier verwendeten Antikörper waren ausschließlich anti-human Antikörper.

Fluorochrom	Klone	Hersteller
CD107a anti-human (FITC)	eBioH4A3	Thermo Fisher Scientific Inc
CD14 anti-human (APC)	61D3	Biologend / Thermo Fisher Scientific Inc
CD16 anti-human (PerCP/Cy5.5)	3G8	Biologend
CD161 anti-human (FITC)	HP-3G10	Biologend
CD163 anti-human (PE)	GHI/61	Biologend
CD206 anti-human (FITC)	15-2	Biologend
CD25 anti-human (PE)	BC96	Thermo Fisher Scientific Inc
CD3 anti-human (eFlour450)	OKT3	Thermo Fisher Scientific Inc

CD56 anti-human (APC)	CMSSB	Biolegend / Thermo Fisher Scientific Inc
CD56 anti-human (PE)	HCD56	Biolegend
CD69 anti-human (FITC)	FN50	Thermo Fisher Scientific Inc
CD80 anti-human (FITC)	2D10	Biolegend
CD83 anti-human (PE)	HB15e	Biolegend
CD86 anti-human (APC)	IT2.2	Biolegend
CD96 (TACTILE) anti-human (PE)	NK92.39	Biolegend / Thermo Fisher Scientific Inc
HLA-DR anti-human (PerCP/Cy5.5)	L243	Biolegend
IL12 anti-human (FITC)	C8.6	Biolegend / Thermo Fisher Scientific Inc
7-AAD Viability Staining Solution (eflour450)		Biolegend

2.1.5 Reaktionssets

CD 14 MicroBeads, human 2ml	Miltenyi Biotec
CD 56 MicroBeads, human 2ml	Miltenyi Biotec
Human IL-10 ELISA Ready-SET-Go!®	Thermo Fisher Scientific Inc
Human IL-12 p70 ELISA Ready-SET-Go!®	Thermo Fisher Scientific Inc
NK-Cell-Isolation-Kit, human	Miltenyi Biotec

2.1.6 Computerprogramme

FlowJo® 5.6.2	Tress Star (Ashland, OR, USA)
GraphPad Prism ® 7	GraphPad Software (La Jolla, CA, USA)
Magella™	Tecan (Crailsheim, Deutschland)

2.2 Methoden

2.2.1 Zellisolation durch Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation

Die Zellen wurden mit Hilfe der Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation aus venösem Blut isoliert.

Das Institut für Transfusionsmedizin und Hämotherapie des Universitätsklinikums Würzburg stellte freundlicherweise Leukozytendepletate zu Verfügung. (Stellungnahme der Würzburger Ethikkommission 04/09, Genehmigung vom 19.01.2009)

Diese Leukozytendepletate sind ein Nebenprodukt, welche bei der Thrombozytenspende im Rahmen der Leukozytendepletion mit LRSC (*Leukoreduction system chambers*) anfallen.

Nachdem man die Leukozytendepletate gleichmäßig in verschiedene 50ml Zentrifugenröhrchen (jeweils ca. mit 5ml befüllt) aufteilt, gibt man 10ml PBS/1%HS dazu. Anschließend unterschichtet man den Inhalt des Zentrifugenröhrchens vorsichtig mit 12ml raumtemperiertem Ficoll.

Es folgt eine 15-minütige Zentrifugation bei 1400 RPM (330g), 20° und einer deutlichen reduzierten Beschleunigung und Abbremsung.

Durch die Zentrifugation kommt es zu einer Aufschichtung der Blutbestandteile: Erythrozyten und Granulozyten setzen sich auf Grund ihrer höheren Dichte am Boden ab, es folgt die Ficollschicht, über welcher sich ein weißer Ring von Leukozyten ansammelt. Die Oberschicht bilden die Thrombozyten und das Blutplasma, da sie bei der gewählten Geschwindigkeit nicht abzentrifugiert werden.

Der weiße Ring von Leukozyten wird vorsichtig abgenommen und zweimal mit PBS/1%HS bei 1600 RPM (430g) 10 Minuten bei 4° gewaschen.

Nachdem das Leukozytenpellet in 40ml PBS/1%HS resuspendiert wird, bestimmt man die Zellzahl der aufgereinigten Leukozyten.

Nach einem weiteren Waschschrift werden die aufgereinigten mononukleären peripheren Blutzellen (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*, PBMC) in dem gewünschten Volumen in 40% „CellGro“ -Medium, 40% Humanserum und 10%

DMSO zunächst bei -80°C kontrolliert abgekühlt und dann bei -153°C eingefroren.

2.2.2 Magnetische Zellseparation

Mit Hilfe der magnetischen Zellsortierung ist es möglich, eine gewünschte Zellpopulation mit bestimmten Oberflächenstrukturen aus einem Zellgemisch zu isolieren.

Das Prinzip der magnetischen Separation kann -gemäß der Herstellerprotokolle- wie folgt zusammengefasst werden: die gewünschten Zellen werden mit einem dafür typischen MicroBead inkubiert. Ein MicroBead ist ein Partikel, der mit einem Antikörper gegen spezifische Oberflächenstrukturen der Zellen gekoppelt ist. Diese Partikel sind eisenhaltig und werden in einem starken Magnetfeld zurückgehalten.

Für die Separation der Monozyten werden CD14 MicroBeads verwendet, für die Separation der NK-Zellen CD 56 MicroBeads bzw. ein NK-Isolation Kit. Für die magnetische Separation wird eine LS-Säule in den Magneten QuadroMACS™ eingespannt und mit 2 x 3ml PBS/1%HS vorgespült. Eine Säule enthält ferromagnetisches Material, welches die magnetische Wirkung des Magnetfeldes um ein Vielfaches verstärkt. MicroBead-gekoppelte Zellen werden in der Säule zurückgehalten, wohingegen nicht gekoppelte Zellen die Säule passieren.

CD14⁺/CD56⁺-Isolation:

Die Ausgangszellen werden in einem 50ml Falcon-Röhrchen abzentrifugiert und anschließend mit CD14-MicroBeads bzw. CD56-MicroBeads inkubiert. Dazu werden pro 10^7 Zellen je $40\mu\text{l}$ kaltes PBS/1%HS und $20\mu\text{l}$ Antikörper-Cocktail zugegeben und die Zellen gut resuspendiert. Nach einer 20-minütigen Inkubationszeit auf Eis sind die Antikörper mit ihren spezifischen Bindungsstellen gekoppelt.

Vor dem Auftragen der Zellen auf die LS Säule werden diese mit 3ml PBS/1%HS gespült. Durch das Durchfließen der Säulen, die sich in einem Magnetfeld befinden, werden die mit MicroBeads gekoppelten Zellen zurückgehalten. Es folgte ein zweifaches Nachspülen der Säulen mit 2 x jeweils 3 ml PBS/1%HS.

Im Anschluss daran werden die Säulen von dem Magnetfeld entfernt und die gesuchten Zellen mit Hilfe eines Kolbens aus der Säule herausgespült (2 x jeweils 3ml PBS/1%HS). Diese Separationsstrategie nennt man positive Selektion.

Die Zellzahlbestimmung erfolgt mittels Neubauer-Zählkammer.

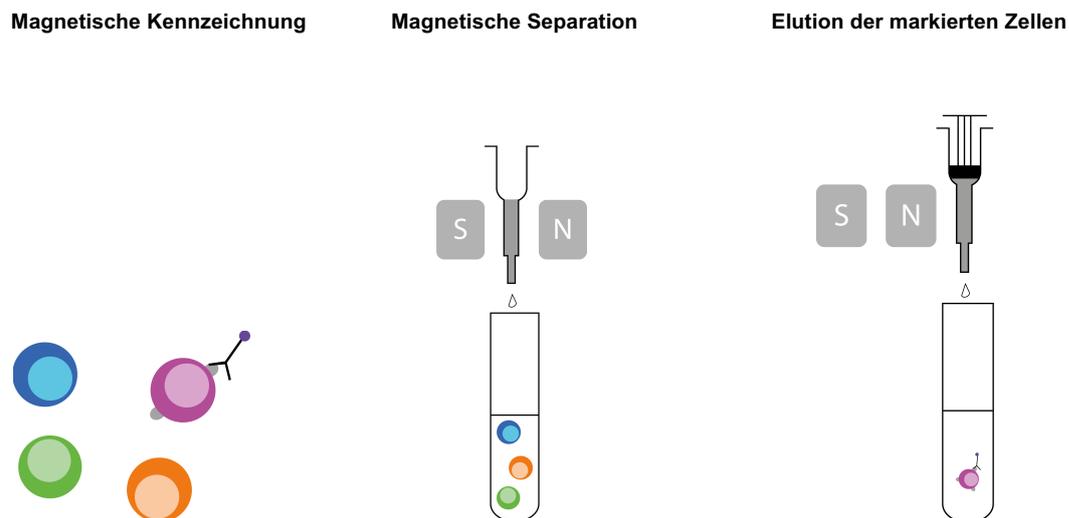


Abbildung 3: Prinzip der Isolation von CD14⁺ bzw. CD56⁺-Zellen. Die an Antikörper gekoppelten Zellen verbleiben in der Säule und werden erst beim Spülen dieser mit Hilfe eines Kolbens frei. Modifiziert nach Miltenyii biotec.

NK-Isolation-Kit:

Die Ausgangszellen werden in einem 50ml Falcon-Röhrchen abzentrifugiert und dann mit dem NK-Zell-Biotin-Antikörper-Cocktail inkubiert. Dazu werden pro 10⁷ Zellen je 40µl kaltes PBS/1%HS und 10µl NK-Zell-Biotin-Antikörper-Cocktail zugegeben und die Zellen gut resuspendiert. Es folgt eine 5-minütige Inkubationszeit auf Eis. Anschließend werden pro 10⁷ Zellen je 30µl kaltes PBS/1%HS und 20µl NK-Zell MicroBead-Cocktail zur Suspension gegeben. Die hinzugegebenen Beads sind Streptavidin markiert und binden an die im ersten Schritt hinzugefügten biotinylierten Antikörper. Es folgt eine 10-minütige Inkubationszeit auf Eis.

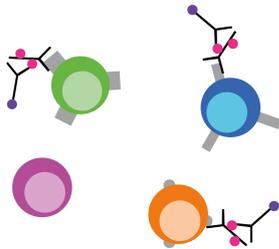
Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Falcon-Röhrchen bis auf ca. 10 ml Gesamtvolumen mit PBS/1%HS aufgefüllt.

Ebenso wie bei der CD14⁺-Isolation werden auch hier die LS Säule mit 3ml PBS/1%HS gespült und anschließend die Zellsuspension auf die Säulen pipettiert. Danach werden die Säulen abermals mit 3ml PBS/1%HS gespült. Der

Antikörper-Cocktail enthält Linien-spezifische Antikörper, die alle Zellarten außer den NK-Zellen markieren. Die durchgelaufenen, nicht gekoppelten Zellen, sind die NK-Zellen.

Dieses Verfahren nennt „untouched isolation“. Die Zellzahlbestimmung erfolgte mittels Neubauer-Zählkammer.

Magnetische Kennzeichnung



Magnetische Separation

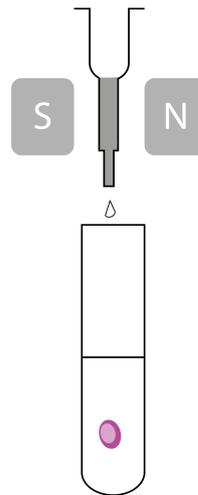


Abbildung 4: Prinzip der „untouched Isolation“. Nur Zellen, die nicht an einen Antikörper gekoppelt sind, durchlaufen die Säule und finden sich in der Suspension wieder. Modifiziert nach Miltenyii biotec.

Für die ersten 3 Versuche mit NK-Zellen wurde eine CD56⁺-Isolation vorgenommen, in den folgenden Versuchen die untouched Isolation mit Hilfe des NK-Isolation-Kits verwendet.

2.2.3 Methoden zu Makrophagendifferenzierung, Aktivierung und Expansion

Das verwendete Protokoll wurde in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe angepasst und erweitert. (6)

Am Tag 0 (d0) wurde eine CD14-Isolation mit Hilfe der magnetischen Zellseparation durchgeführt (siehe 2.2.2.). Nach Bestimmung der Zellzahl, wurden die Zellen auf 1 Mio. Zellen/ml „CellGro“-Medium eingestellt. Je nach gewünschtem Makrophagensubtyp wurden unterschiedlichen Zusätzen zum Medium „CellGro“ hinzugegeben:

M1: 1Mio. Zellen/ml Medium + GM-CSF (800IU/ml)

M2a: 1Mio. Zellen/ml Medium + M-CSF (10ng/ml) + IL-4 (10ng/ml)

M2c: 1Mio. Zellen/ml Medium + M-CSF (10ng/ml) + IL-10 (40ng/ml)

Die Zellen wurden auf einer 6-*well*-Platte à 10^6 /ml ausgesät. Pro *well* waren das zwischen $3,5-4,5 \times 10^6$ Zellen in 3,5-4,5 ml.

Nach drei Tagen der Kultivierung bei 37°C wurde das Medium ausgetauscht, indem der Überstand in ein 50ml Falcon-Röhrchen abpipettiert und abzentrifugiert wurde. Ein mögliches Pellet wurde in dem neu hergestellten Medium resuspendiert und anschließend auf die mit Makrophagen behafteten *wells* pipettiert. Zusätzlich zum Medium wurden dieselben Stimulanzen wie an Tag 0 hinzugegeben, außer bei M1 wurde noch 1 µl/ml IFN-γ hinzugefügt.

Die 6-*well*-Platten kamen erneut für weitere drei Tage bei 37° zur Inkubation in den Brutschrank.

Am Tag 6 (d6) wurde der Überstand in 50ml Falcon-Röhrchen abgenommen und die Makrophagen von den *well*-Platten mit Hilfe von 500µl Accutase/*well* gelöst. Accutase ist ein Gemisch aus proteolytischen und kollagenolytischen Enzymen und dient der Adhäsionolyse von Zellen. Die mit Accutase beschichteten Platten wurden für mehrere Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde 1ml PBS/1% HS /*well* hinzugefügt und durch Suspendieren die Zellen gelöst. Nachdem man die Zellen gelöst und abzentrifugiert hat, wurde die Zellzahl bestimmt. Besonders relevant war die Adhärenz bei M2c-Makrophagen, wodurch die Versuchsgröße teilweise limitiert war.

Nach einer erneuten Zentrifugation wurden die Zellen auf 10^6 Zellen/ml „CellGro“-Medium eingestellt. Im Anschluss wurden pro experimentelle Gruppe unterschiedliche Substanzen zum Medium entsprechend dem Versuchsaufbau hinzugefügt:

- 1.) „CellGro“-Medium → stellt die Standardgruppe in allen Versuchen dar.
- 2.) LPS (10ng/ml) + IFN-γ (100 IU/ml)
- 3.) Dasatinib (50ng/ml) + LPS (10ng/ml) + IFN-γ (100 IU/ml)
- 4.) Scr-kinase-inhibitor -I (100 ng/ml) + LPS (10ng/ml) + IFN-γ (100 IU/ml)
- 5.) Bosutinib (50ng/ml) + LPS (10ng/ml) + IFN-γ (100 IU/ml)
- 6.) IL-32γ (100ng/µl) + IFN-γ (100 IU/ml)

Es wurden je 500µl Zellsuspension auf sterile 48-*well*-Platten pipettiert.

Falls eine intrazelluläre Färbung am Versuchstag 7 durchgeführt wurde, wurden noch 10µl Brefeldin A/well (50 mg/ml) hinzugefügt. Im Falle einer Phänotypisierung am Tag 7 wurde kein Brefeldin A hinzugegeben.

Die Platten kamen zur Inkubation in Brutschränke bei 37°C.

An Versuchstag 7 wurde für einen späteren ELISA die Überstände der Phänotypisierungsansätze in 15ml Falcons abpipettiert und abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, in Eppendorfer Gefäßen à ca. 200µl gefüllt und bei -25°C eingefroren.

Phänotypisierung:

Mit Hilfe einer Enzym-basierten Lösung -Accutase- wurden die Zellen gelöst und abzentrifugiert. Die Zellen wurden mit 150 µl /well Accutase für drei Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen wurden in 300 µl PBS/1%HS aufgenommen und auf eine 96-well-Platte à 100µl pipettiert. Nachdem die Zellen abzentrifugiert wurden, wurden sie in 50µl /well Antikörperlösung aufgenommen. Die Antikörperlösung setzte sich für jedes Panel wie folgt zusammen: Anzahl der einzelnen Gruppen (= Anzahl well) x 1µl je Antikörper + Anzahl der einzelnen Gruppen x 50µl Viability Dye-Färbung (im Verhältnis 1:50 PBS zu Viability Dye). Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur, folgten mehrere Zentrifugationsschritte, die Zellen wurden in 180µl /well PBS/1%HS aufgenommen und in FACS-Röhrchen übertragen.

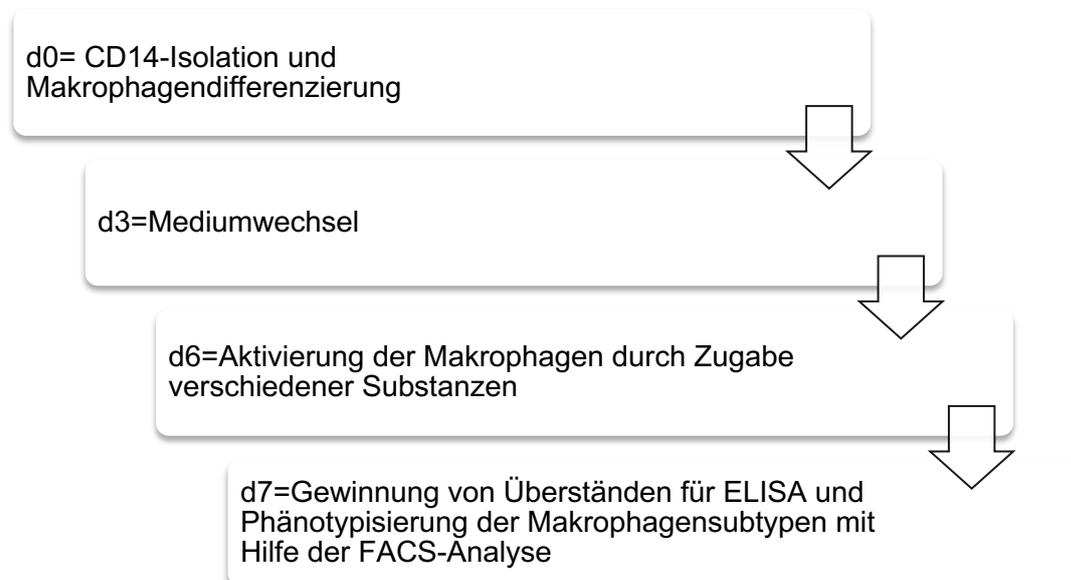


Abbildung 5: Veranschaulichung des Versuchsablaufs „Phänotypisierung von TAM“

2.2.4 Methoden der NK-Zell-Versuchsreihe

In einer weiteren Versuchsreihe wurden NK-Zellen in Ko-Kultur mit bereits differenzierten Makrophagen gebracht. Es wurden mögliche Veränderungen der Expression von Aktivierungsmarkern und der Zytotoxizität mit Hilfe eines Degranulationsassays von NK-Zellen in Ko-Kultur mit Makrophagen und unter gleichzeitiger Dasatinib-Inkubation gemessen.

Des Weiteren wurden am 7. Versuchstag des Degranulationsassays für 4h K562 hinzugefügt. K562 exprimieren kein MHC-I und sind deshalb ein klassisches NK-Zell-Target. In den Versuchen stellen sie die Zielzelle der NK-Zellen dar.

An Tag 5 wurde eine NK-Zell-Isolation mit Hilfe des NK-Cell-Isolation Kits durchgeführt. Nach der Bestimmung der Zellzahl, wurden die Zellen auf 2×10^6 Zellen/ml „CellGro“ + 5% HS (beim CD107a Assay: zusätzlich + $0,5 \mu\text{l/ml}$ IL-2) eingestellt. Je 5 ml/well wurden auf eine 6-well-Platte verteilt.

Vor Inkubation erfolgte eine Kontrolle der NK-Zell-Aufreinigung aus einem entsprechenden Aliquot (2×10^5 Zellen).

An Tag 6 wurden die Makrophagen wie in 2.2.3. beschrieben gelöst, abzentrifugiert und auf 10^6 Zellen/ml eingestellt. Die NK-Zellen wurden ebenfalls durch Accutase gelöst und abzentrifugiert. Die Zellen werden auf 10^6 Zellen/ml „CellGro“ eingestellt. Im Anschluss wurden Makrophagen und NK-Zellen im Verhältnis 1:1 in 10^6 Makrophagen/ml „CellGro“ aufgenommen.

Die Zellsuspension wurde anschließend pro Makrophagenpopulation in je 4 Gruppen à 1ml in 15ml Zentrifugenröhrchen aufgeteilt und jeweils folgendes hinzugefügt:

- 1.) „CellGro“-Medium → Standardgruppe
- 2.) LPS (10ng/ml) + IFN- γ (100IU/ml)
- 3.) Dasatinib (50ng/ml) + LPS (10ng/ml) + IFN- γ (100IU/ml)
- 4.) IL-32 γ (100ng/ μl) + IFN- γ (100IU/ml)

Anschließend wurde für jede Gruppe ein Milliliter der aktivierten Zellen auf eine 12-well-Platte pipettiert und diese zur Inkubation bei 37°C in den Brutschrank gegeben.

An Tag 7 wurde der Überstand abpipettiert und vorsichtig suspendiert, um nur die NK-Zellen abzunehmen und die sehr adhärennten Makrophagen auf der *well*-Platte zu belassen. Nach der Zentrifugation der Zellen und zweimaligem Waschen, wurden sie in 500µl PBS/1%HS aufgenommen und gezählt. Anschließend wurden die Zellen auf 10^6 Zellen/ml „CellGro“ + 5%HS eingestellt und im Verhältnis 1:1 mit K562 für 4 h bei 37°C auf einer 96-*well*-Platte inkubiert.

Für das CD107a-Assay wurden zu jedem *well* Brefeldin A (5mg/ml) hinzugefügt. Der Degranulationsmarker CD107a wird auf der Zelloberfläche von NK-Zellen während der Exozytose von Perforinen und Granzymen nachweisbar. Durch die Zugabe von Brefeldin A werden erneute Endozytoseprozesse gestoppt, frisch exprimierte Proteine akkumulieren und beispielsweise CD107a wird in seiner Gänze messbar.

Im Anschluss wurden die Zellen abzentrifugiert und je nach Panel eine Antikörperlösung hinzugefügt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Antikörperlösung setzte sich aus 1µl/*well* des jeweiligen Antikörpers und 50µl PBS/1%HS bzw. Viability-Dye-Färbung (im Verhältnis 1:50) zusammen. Nachdem 100µl/*well* PBS/1%HS hinzugegeben wurden, wurden die Zellen abzentrifugiert. Nun wurden sie in 180µl /*well* PBS/1%HS aufgenommen und in FACS-Röhrchen übertragen.

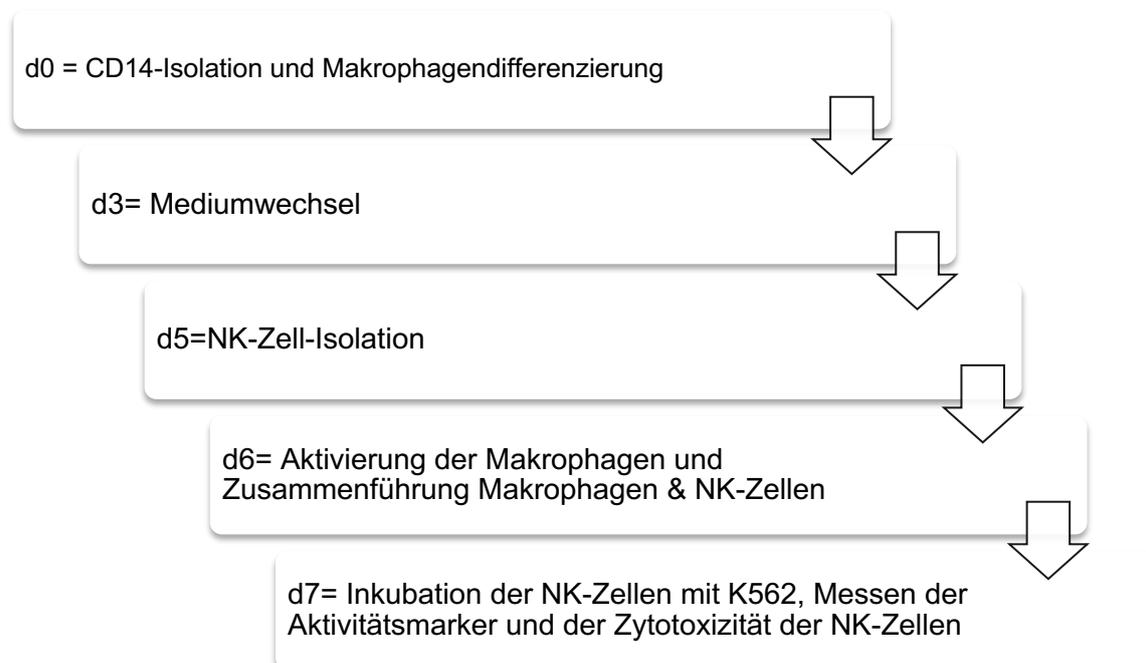


Abbildung 6: Darstellung des Versuchsablaufs zur Messung der Aktivitätsmarker und Zytotoxizität von NK-Zellen.

2.2.5 Durchflusszytometrie

2.2.5.1 Hintergrund

Die Durchflusszytometrie, Synonym FACS (*fluorescence activated cell sorting*), ist eine Methode, die es möglich macht, Aussagen über die einzelnen Zellen sowie deren physikalischer und biochemischer Eigenschaften zu machen. Mit Hilfe der hydrodynamischen Fokussierung passiert jede Zelle einzeln die Analysekommer und wird einzeln durch den Laser gemessen. Es wird ermöglicht jede Zelle separat zu analysieren. Je nach Eigenschaft der Zellen wird eine bestimmte Streuung des Laserlichtstrahls hervorgerufen.

Das Vorwärtsstreulicht (FSC, *forward light scatter*) ist ein Maß für die Zellgröße und das Seitwärtsstreulicht (SSC, *side scatter*) dient als Maß für die Granularität und Struktur einer Zelle.

Diese Eigenschaften werden unabhängig von einer Fluorochromanfärbung erfasst. Mit Hilfe dieser beiden Parameter ist es unter anderem möglich verschiedenen Zellgruppen des Blutes zu differenzieren.

Neben Größe und Granularität kann vor allem die Oberflächenexpression von Proteinen durch fluorochrommarkierte Antikörper bestimmt werden. Spezifische Detektoren für verschiedene fluoreszierende Farbstoffe konvertieren die gemessene Intensität des Fluoreszenzlichtes, welches durch einen Spiegel und Filter aufgetrennt werden, in ein elektrisches Signal um.

Bei der Kombination verschiedener Fluorochrome sollten die Emissionsspektren beachtet und möglichst weit auseinanderliegende Spektren gewählt werden. Um trotzdem mögliche Überlappungen zwischen verschiedenen Fluorochromen zu minimieren, wird eine sogenannte Kompensation durchgeführt.

Voreinstellungen wurden anhand Einzelfärbungen nachjustiert. Es wurden sowohl Kompensationsbeads als auch ungefärbte Zellpopulationen für die Kontrolle verwendet.

Das hier verwendete Gerät FACS Canto II (BD) ist mit insgesamt drei Lasern ausgestattet. Ein Laser emittiert violettes Licht mit einer Wellenlänge von 405 nm.

Dieser Laser regt u.a. die Fluorochrome Pacific Blue oder Brilliant Violet an. Die Fluorochrome FITC, PE, PerCP/Cy 5.5 oder PE/Cy7 werden –neben anderen– von einem Laser für blaues Licht mit einer Wellenlänge von 488nm angeregt. Der dritte, rote Laser regt mit seiner Wellenlänge von 633 nm die Fluorochrome beispielsweise APC und APC/Cy7 an.

2.2.5.2 Färben und Auswertung von Oberflächenmarkern

Um die Zellen mit den gewünschten Antikörpern zu färben, wurden die Zellen in 100µl PBS/1%HS pro *well* auf einer 96-*well*-Platte aufgenommen und abzentrifugiert. Es wurde je nach Fragestellung und Ausgangsmaterial zwischen 1×10^5 und 2×10^5 Zellen verwendet.

Anschließend wurden die Zellen in 1µl/*well* des jeweiligen Antikörpers und 50µl PBS/1%HS bzw. Viability-Dye-Färbung (Verhältnis 1:50) für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. In einem darauffolgenden Waschschrift wurden alle nicht gebundenen Antikörper entfernt und die Zellen zum Messen am FACS Canto II in 180µl PBS/1%HS in FACS-Röhrchen aufgenommen.

Die Auswertung der Daten erfolgten mit Hilfe der FACS DIVA II Software (BD) und anschließend mit dem PC-Programm FlowJo® 5.6.2. Die Messstrategie inklusive des Gating wird im Folgenden weiter erläutert.

2.2.6 Gating und Reinheit der Zellen

Die Bestimmung der Expression diverser Oberflächenmarker erfolgt mit Hilfe durchflusszytometrischer Analysen.

Um die zu untersuchende Population genauer festzulegen, wurde ein „Gating“ vorgenommen. Unter dem Begriff Gating versteht man eine Abgrenzung einer bestimmten Population mit Hilfe der Auswertungssoftware.

Vor Messung der Oberflächenmarker wurde zudem die Vitalität der Makrophagen gemessen. Beispielhaft zeigt Abbildung 7, dass nur lebende Zellen innerhalb des Monozyten/Makrophagengates ausgewählt und in den folgenden Expressionsanalysen verwendet wurden.

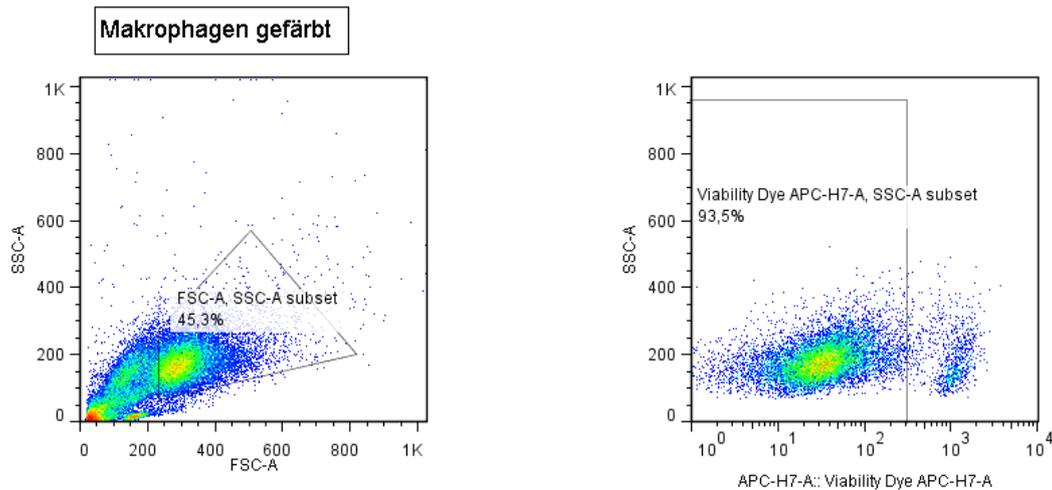
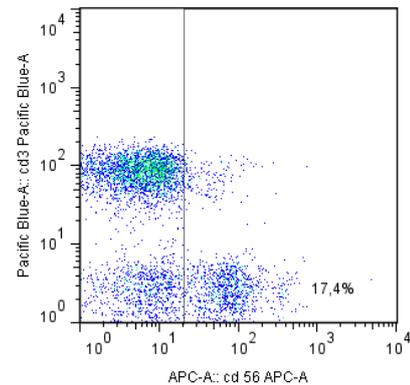
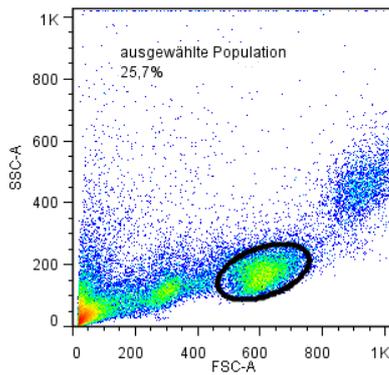


Abbildung 7: FACS-Analyse für Makrophagen: Gating-Strategie anhand eines Beispiels. Unterhalb der ausgewählten Gruppe sind vermutlich Zelldetritus, undifferenzierte Monozyten und andere verbliebene Lymphozytenpopulationen. Setzung des Gates bei der ungefärbten Gruppe und Übertragung auf alle anderen Proben. Anschließend Messung der Vitalität durch Färbung mit „Viability Dye“. Der Anteil der Ziel-Population beträgt in diesem Beispiel ca. 45%. Die Vitalität dieser Population liegt bei >90%.

Bei Experimenten mit NK-Zellen wurde nach der Isolation mittels eines NK-Zell-Isolation-Kits (siehe Kapitel 2.2.2) stets eine Messung der Reinheit durchgeführt. Als NK-Zellen wurden $CD56^+$ -Zellen definiert, die gleichzeitig kein CD3 exprimieren (37) (Beispielhaft Vgl. Abbildung 8.)

Die NK-Zellzahlen sowie deren Vitalität wurden am siebten Versuchstag vor der Inkubation mit K562 mit Hilfe eines Zellzählers bestimmt. Die Vitalität der NK-Zellen lag in allen Versuchen >80 %, im Mittel bei 93%.

PBMC



NK-Zellen

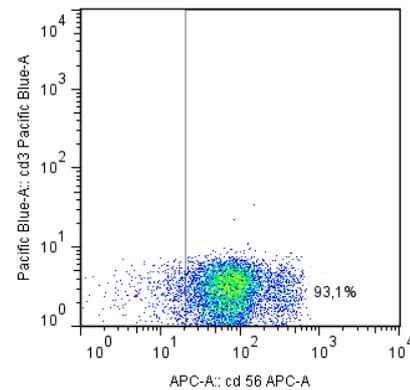
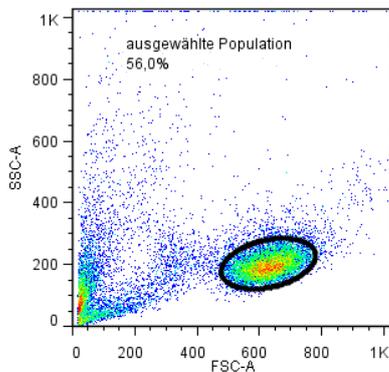
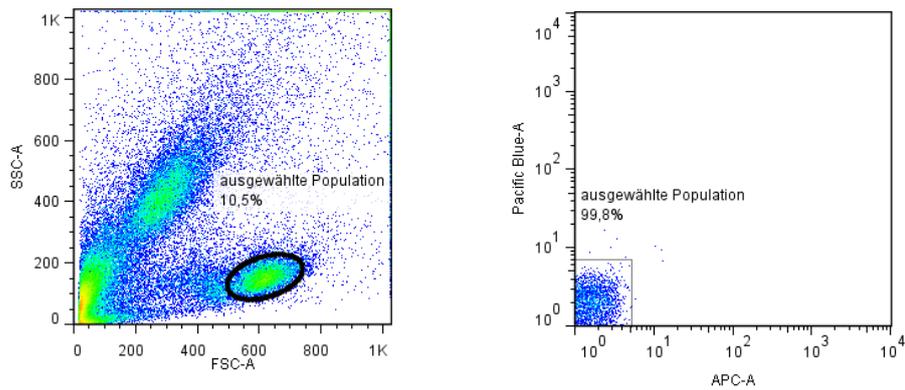


Abbildung 8: Gatingbeispiel von a.) PBMC und b.) den daraus isolierten NK-Zellen im Vergleich. Darstellung der FACs-Analyse am Tag der Isolierung von NK-Zellen aus PBMCs. a.) die PBMC zeigen in der ausgewählten Population sowohl CD56⁺ als auch CD3⁺-Zellen. Links unterhalb der ausgewählten Population befinden sich andere Lymphozyten-Populationen. Ganz unten befindet sich Zelldetritus. b.) Nach Isolierung der NK-Zellen durch das NK-Cell-Isolation-Kit (vgl. Kap 2.2.2) ist die CD3⁺-Population depletiert.

Bei Degranulationsmessungen wurde außerdem eine bekannte Unterteilung in CD56^{bright} und CD56^{dim} vorgenommen. Hierbei nimmt, wie auch schon in vielen Publikationen beschrieben, CD56^{dim} mit ca. 60% die deutlich größere Subpopulation ein. CD56^{bright} definiert eine deutlich kleinere Subpopulation (Mittelwert ca. 5%). (43)

NK-Zellen ungefärbt



NK-Zellen gefärbt

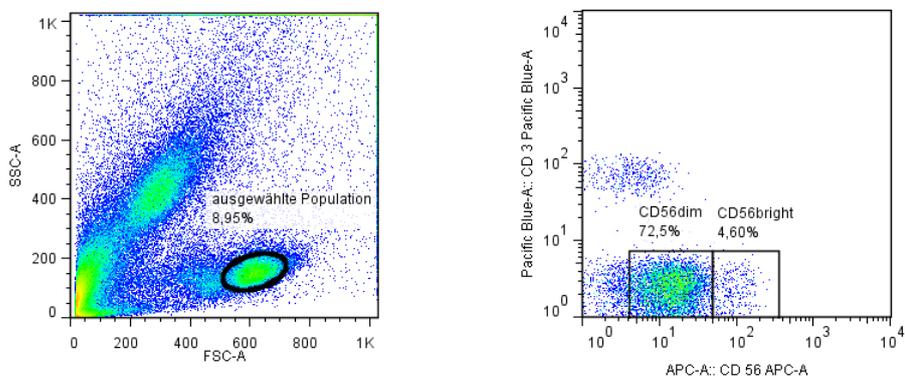


Abbildung 9: Gating-Beispiel von NK-Zellen nach Aktivierung mit M2c und Inkubation mit K562. 1.) oberen beiden Grafiken: Auswahl der Population in der ungefärbten Probe. Die NK-Zellen befinden sich auf der ersten Grafik rechts unten im markierten Bereich. Links unten befinden sich Detritus, andere undifferenzierte Makrophagen und Lymphozyten. 2.) unteren beiden Grafiken: Übertragung dieser Gating-Strategie auf die gefärbten Proben und Unterteilung in CD56^{dim} und CD56^{bright}

2.2.7 Auswertung

Ein Maß für die Menge gebundener Fluoreszenzfarbstoffen/Partikel ist die mittlere Fluoreszenzintensität MFI.

Durch die Bearbeitung der Messergebnisse durch das Programm FlowJo® konnten die MFIs (*mean fluorescence intensity*) der einzelnen Messwerte berechnet werden.

Mit Hilfe des Programms GraphPad Prism wurden die Daten statistisch ausgewertet und die Grafiken erstellt.

Die Grafiken von CD107a repräsentieren das arithmetische Mittel der Einzelwerte \pm Standardabweichung (Standard Deviation, SD).

Da sich bei FACS-Untersuchungen die MFI logarithmisch darstellt und die Intensität zum Teil auch von der Helligkeit des einzelnen Farbstoffs darstellt, ist ein Vergleich der Absolutwerte weniger aussagekräftig als eine Wertung in Relation zu einer Kontrollgruppe. Deshalb wurde die unbehandelte Kontrollgruppe (Standardgruppe „Medium“), die für jeden Versuch mitgeführt wurde, als Referenz gesetzt und ein Anstieg oder Abfall in Prozent dieses Referenzwertes ausgedrückt (Normalisierung). Dies gilt für die Grafiken von CD80/CD86/CD206 und HLA-DR sowie der Aktivierungsmarker von NK-Zellen.

Die statistische Signifikanz wurde auf Basis des t-Tests (zweiseitig und gepaart) von Student berechnet. $P < 0,05$ wurde als statistisch signifikant festgelegt und in den Graphen mit * kenntlich gemacht. Ein Signifikanzniveau von $p < 0,01$ ist mit ** und von $p < 0,001$ mit *** gekennzeichnet

2.2.8 Messung der Zytokinsekretion durch ELISA

2.2.8.1 Prinzip eines ELISAs

Ein ELISA (engl. enzyme-linked-immunosorbent-Assay) basiert auf dem Prinzip einer enzymatischen Farbreaktion. In den hier gezeigten Versuchen wurde ein Sandwich ELISA durchgeführt und im Folgenden genauer erklärt:

Zu Beginn wird ein sogenannter Capture Antikörper an die Mikrotiterplatte gebunden. Anschließend wird die das nachzuweisende Antigen enthaltende Lösung hinzugegeben. Das darin enthaltene zu detektierende Antigen bindet an den Capture Antikörper und verbleibt somit an der Mikrotiterplatte und geht durch die nachfolgenden Waschvorgänge nicht verloren. Ein weiterer für dieses Antigen spezifischer Antikörper bindet nun an das an der Mikrotiterplatte haftende Suchantigen. Dieser „detection Antikörper“ ist meist biotinyliert. An der Wand der Mikrotiterplatte liegt nun der folgende Komplex vor: Capture Antikörper – zu quantifizierendes Antigen – „detection Antikörper“ (biotinyliert).

Die Quantifizierung erfolgt nun mit Hilfe eines Streptavidin-Peroxidase-Konjugats, das spezifisch an Biotin bindet. Die Peroxidase wandelt das ebenfalls hinzugegeben Tetramethylbenzidin (TMB) in einen Farbstoff um, was zu einem Farbumschlag führt. Die Reaktion wird durch Hinzugabe von Schwefelsäure abgestoppt. Die optische Dichte wird photometrisch gemessen.

Der erfolgte Farbumschlag ist proportional zur Konzentration des zu detektierenden Antigens in der ursprünglichen Lösung. Mit Hilfe einer Standardkurve kann man die Konzentrationen des nachgewiesenen Antigens durch Extrapolation abschätzen.

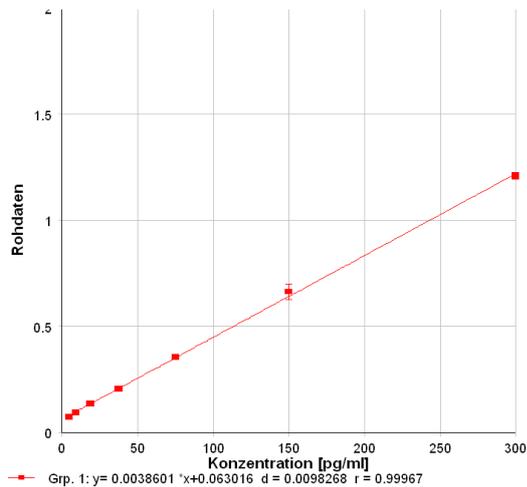


Abbildung 10: Standardkurve aus einem IL10-ELISA. Sie ergibt sich aus bekannten Antigenkonzentrationen und dient als Kalibrierungskurve.

2.2.8.2 Versuchsablauf

Mit Hilfe des ELISA (Enzyme-linkes Immunosorbent Assay) -Verfahrens kann man die Zytokinsekretion der Zellen messen. In dieser Arbeit wurden ELISA-Kits von Thermo Fisher verwendet.

Die Proben werden durch Abnahme des Kulturüberstandes 24 Stunden nach der Stimulation mit:

- LPS + IFN- γ
- Dasatinib + LPS + IFN- γ
- Src-inhibitor-I + LPS + IFN- γ
- Bosutinib + LPS + IFN- γ
- IL-32 γ + IFN- γ

gewonnen und eingefroren. Für den ELISA werden die Proben je nach Versuch im Verhältnis 1:4 /1:5 /1:10 verdünnt. Diese Verdünnungen werden vorgenommen, damit möglichst alle Ergebnisse im Nachweisbereich liegen. Ziel ist die Messung der IL-12-Produktion bzw. die IL-10-Produktion.

Der ELISA wird gemäß folgendem Protokoll durchgeführt:

Am Tag vor Ansetzen des ELISAs wird eine 96-well-ELISA-Platte mit 100 μ l/well der Capture Antikörper (Fängerantikörper) in Coating Buffer beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Morgen wird die ELISA-Platte mit einer Waschlösung

aus PBS und 0,05% Tween20 gewaschen. Anschließend gibt man 200µl/well Assay Diluent-Lösung (10ml 5xAssay Diluent +40ml DI Wasser) hinzu und inkubiert es für eine Stunde bei Raumtemperatur. Assay Diluent ist ein Blockpuffer und verhindert unspezifische Bindungen. Nach Ablauf der Inkubationszeit folgt ein weiterer Waschschrift. Im Anschluss werden 100µl/well Standard bzw. 100µl/well der verdünnten Probe auf die 96-well-Platte pipettiert. Die Proben inkubieren für zwei Stunden bei Raumtemperatur. Nach einem erneuten Waschschrift, werden 100µl/well detection antibody (1:250 verdünnt (48µl Antikörper + 12ml Assay Diluent) hinzugefügt. Nachdem die einstündige Inkubationszeit abgelaufen ist, findet ein Waschschrift statt und es werden 100µl/well Avidin-HRP (1:250 verdünnt (48µl Enzym + 12 ml Assay Diluent)) hinzu pipettiert. Für diesen Schritt ist eine Inkubationszeit von 30 Minuten vorgesehen. Nach zweimaligem Waschen, werden 100µl/well TMB (Tetramethylbenzidine)-Substrat Solution für 15 Minuten hinzugefügt. Es kommt zu einem Farbumschlag. Nun wird die Reaktion mit 50µl /well 2N Schwefelsäure gestoppt und die Proben an einem ELISA-Reader gemessen. Die Werte werden bei 450 nm mit Hilfe des Standards und der zum ELISA-Reader zugehörigen Software ausgewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss von Dasatinib, Src-kinase-inhibitor-I und Bosutinib

3.1.1 Modulation der Expression von Oberflächenmarkern

Es wurde untersucht, wie der Anteil an CD163⁺/CD14⁺/CD16⁺-Makrophagen unter Einfluss von Dasatinib, Src-kinase-inhibitor-I und Bosutinib variiert. Außerdem wurden die Oberflächenmarker CD80/CD86 und HLA-DR in Abhängigkeit ihrer CD83-Expression sowie unter Inkubation der drei verwendeten Tyrosinkinaseinhibitoren untersucht. Nachdem sich drei verschiedene Makrophagensubtypen durch Zugabe verschiedener Stimuli differenzierten, wurde sie am 6. Versuchstag mit dem jeweiligen Tyrosinkinaseinhibitor inkubiert. Am 7. Versuchstag folgte eine durchflusszytometrische Messung der zuvor gefärbten Oberflächenmarker.

Die ausschließlich mit „Medium“ behandelten Proben stellen die Standard-Gruppe in allen Versuchsreihen da. Eine Aktivierung der polarisierten Zellen wurde mit LPS + IFN- γ durchgeführt.

Im Folgenden werden die Vergleiche immer zwischen ausschließlich mit „Medium“ und den mit LPS + IFN- γ aktivierten bzw. zwischen aktivierten und mit Dasatinib /Src-kinase-inhibitor-I/Bosutinib behandelten Zellen vollzogen. Der Übersicht halber wird im weiteren Verlauf des Textes eine Inkubation mit LPS + IFN- γ und dem jeweiligen TKI, nur mit dem TKI benannt (beispielsweise Dasatinib meint die Inkubation mit LPS + IFN- γ und Dasatinib). Eine alleinige Inkubation mit einem TKI hat in den hier gezeigten Versuchen nie stattgefunden.

Des Weiteren werden Makrophagen, welche während der Differenzierung den Kulturbedingungen von M1-Makrophagen durch GM-CSF Stimulation ausgesetzt wurden, nachfolgend als M1 dargestellt. Makrophagen, die in einem M2a-Milieu mit M-CSF und IL-4 inkubiert wurden, werden als M2a abgekürzt. M2c präsentiert die Zellen, welche mit M-CSF und IL-10 inkubiert wurden.

3.1.1.1 Modulation der Expression durch Dasatinib

3.1.1.1.1 Differenzierungsmarker

CD163, CD14 und CD16 gehören zu den Oberflächenmarkern anhand derer sich die verschiedenen Makrophagensubtypen differenzieren lassen. Die Expression des Scavenger-Rezeptor -CD163- auf Makrophagen führt beispielsweise zu einer vermehrten Sekretion von IL-10 und wird vor allem als Marker für M2c-Makrophagen angesehen. (Vergleiche Kapitel 1.2.1.1) (89, 90) Der Oberflächenmarker CD14 induziert nach Bindung von LPS an den Rezeptor-Komplex die Sekretion von u.a. IL-12 und IFN- γ . Eine hohe Dichte an CD14 auf der Zelloberfläche wird M1-Makrophagen zugeschrieben. (17) In Abbildung 11 ist ein Gatingbeispiel dargestellt. Der Oponierungsrezeptor CD16 wird hingegen verstärkt von M2-Makrophagen exprimiert. (Vergleiche 1.2.1.1)

Der Anteil an positiven Zellen der jeweiligen Differenzierungsmarker CD163, CD14 und CD16 wurden prozentual bestimmt.

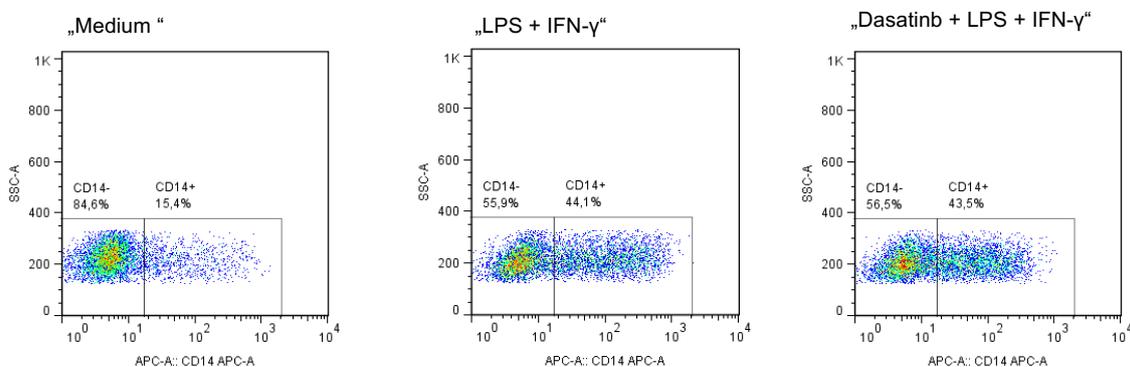


Abbildung 11: Anteil an CD14⁺-M2a-Makrophagen. Der erste Plot stellt nur mit „Medium“ behandelte Makrophagen dar, wovon 15,4% der M2a-Makrophagen CD14⁺ sind. Bei Makrophagen, welche mit LPS + IFN- γ stimuliert wurden, waren 44,1% CD14⁺, unter LPS + IFN- γ und Dasatinib-Einfluss 43,5%.

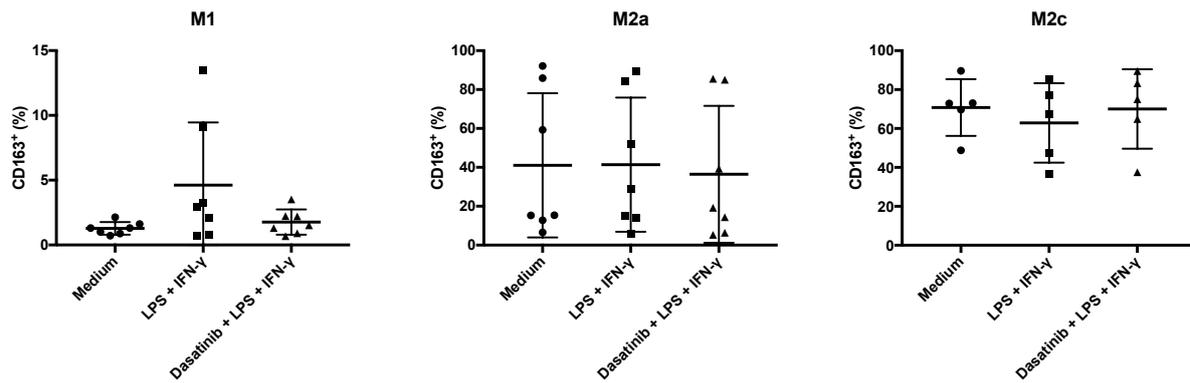


Abbildung 12: Regulation von CD163 in unterschiedlich polarisierten Populationen in Abhängigkeit vom aktivierenden Stimulus. Abgebildet ist der Anteil an CD163⁺-Zellen in Prozent aus M1 und M2a n=7, M2c n=5 Versuchen.

Der Oberflächenmarker CD163 wird, wie auch in der Literatur beschrieben, vermehrt auf M2-Makrophagen exprimiert. Der Anteil an CD163⁺-mit Medium behandelten-Makrophagen beträgt bei Makrophagen im M1-Milieu 1,3%, im M2a-Milieu 41% und bei M2c-polarisierten Makrophagen 70,8%. Bei M1-polarisierten Makrophagen induziert die Aktivierung mit LPS + IFN-γ die Expression von CD163. Dieser Effekt geht unter Zugabe von Dasatinib verloren.

M2c-polarisierte Makrophagen erfahren durch die Aktivierung eine geringe CD163-Expression. Diese Reduktion wird durch die Inkubation mit Dasatinib aufgehoben.

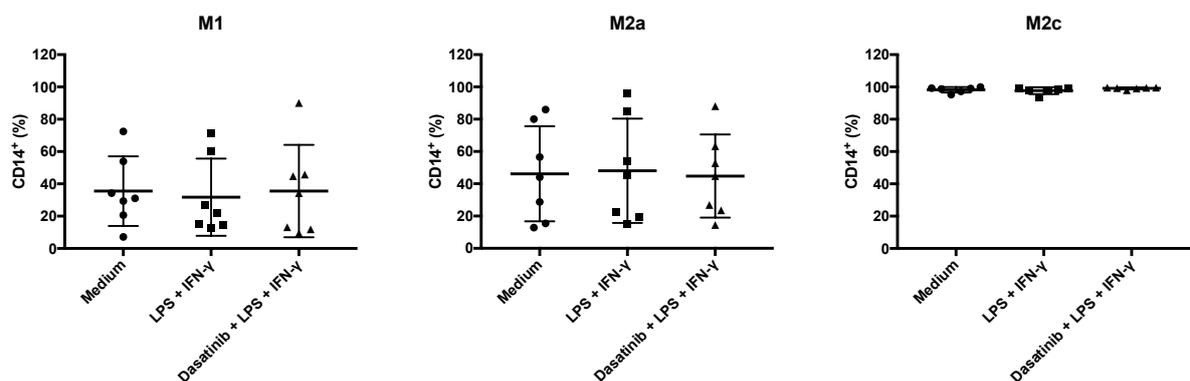


Abbildung 13: Regulation von CD14 in unterschiedlich polarisierten Populationen in Abhängigkeit vom aktivierenden Stimulus. Abgebildet ist der Anteil an CD14⁺-Zellen in Prozent aus M1; M2a n=7 und M2c n=6 Versuchen.

Aus der Abbildung 13 wird ersichtlich, dass M2c-Makrophagen im Vergleich zu M2a und M1-Makrophagen den größten Anteil an CD14⁺-Zellen exprimieren. (Durchschnittlich „Medium“: M1: 35,5%, M2a: 46,2%, M2c: 98,3%). Durch die Aktivierung mit LPS + IFN-γ und auch Dasatinib kommt es bei allen drei

Makrophagenpopulationen zu keinen bemerkenswerten Veränderungen des prozentualen Anteils der Expression des untersuchten Differenzierungsmarkers.

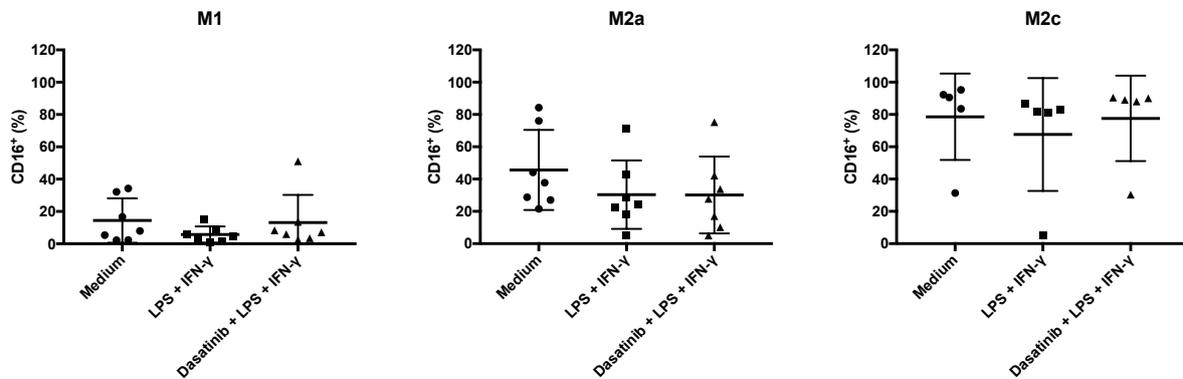


Abbildung 14: Regulation von CD16 in unterschiedlich polarisierten Populationen in Abhängigkeit vom aktivierenden Stimulus. Abgebildet ist der Anteil an CD16⁺-Zellen in Prozent aus M1, M2a n=7 und M2c n=5 Versuchen.

M2-Makrophagen - M2a mit 45,6% und M2c mit 78,6% CD16⁺-Zellen- exprimieren im Vergleich mit M1-Makrophagen (MW 14,4%) einen höheren Anteil an CD16. Durch die Aktivierung mit LPS + IFN-γ exprimieren alle drei untersuchten Subtypen weniger CD16 als nicht-aktivierte. Durch zusätzliche Inkubation mit Dasatinib geht dieser Effekt bei M1 und M2c-polarisierten Makrophagen weitgehend verloren.

3.1.1.1.2 CD83 und Aktivierungsmarker CD80/CD86/HLA-DR

Der Oberflächenmarker CD83 wird typischerweise von DCs exprimiert. (91) Anhand einer Differenzierung in CD83⁻ und CD83⁺-Zellen, wurde in Makrophagen oder DC-ähnliche Zellen unterteilt. So konnte deutlich unterschieden werden, ob eine Veränderung der Oberflächenmarker bei Makrophagen stattfindet oder bei DC-ähnlichen Zellen.

Im nächsten Schritt wurden anhand des durchgeführten Gatings die drei weiteren Oberflächenmarker CD80, CD86 und HLA-DR untersucht. Die unbehandelte Kontrollgruppe (Standardgruppe „Medium“) wurde als Referenz gesetzt und ein Anstieg oder Abfall in Prozent dieses Referenzwertes ausgedrückt (Normalisierung). (Vergleiche Kapitel 2.2.7)

Die Höhe der Expression der drei genannten Differenzierungsmarker wurde jeweils für die CD83⁻ und CD83⁺-Population gemessen. Zellen, welche auf ihrer Zelloberfläche CD80, CD86 und HLA-DR tragen, präsentieren Antigene und sind u.a. Marker für eine Immunstimulation.

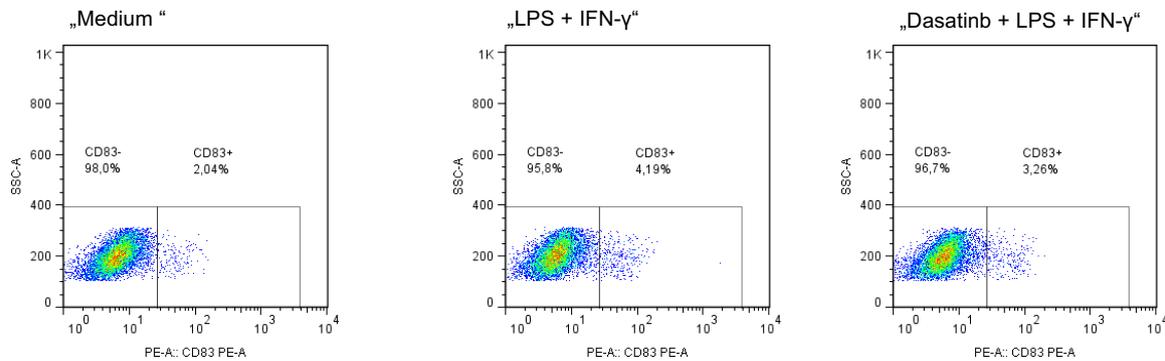


Abbildung 15: Anteil an CD83⁻ und CD83⁺-Zellen von M2a Makrophagen im Standard „Medium“, unter Inkubation mit LPS + IFN-γ sowie Dasatinib + LPS + IFN-γ. Der Anteil an CD83⁺-Zellen beträgt in der Standardgruppe 2,04%, mit LPS + IFN-γ 4,19% und mit Dasatinib + LPS + IFN-γ 3,26%.

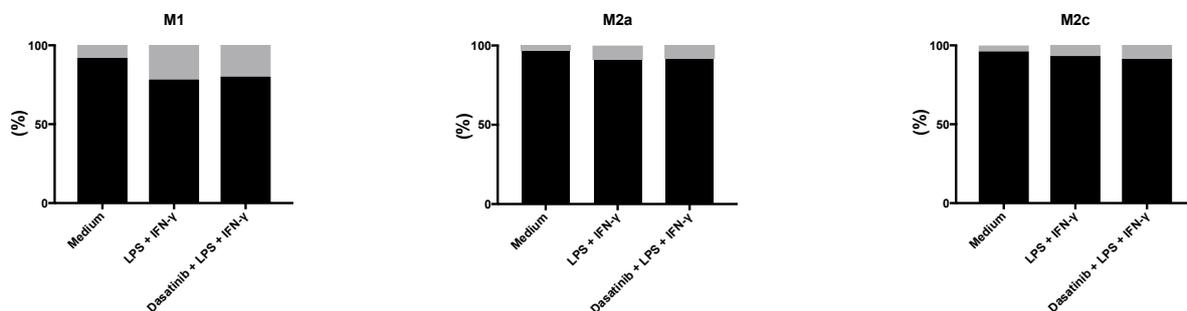


Abbildung 16: Anteil der unterschiedlich polarisierten Makrophagen in Abhängigkeit der aktivierenden Stimuli an CD83⁻ und CD83⁺-Zellen in Prozent. Der schwarze Balken stellt jeweils die CD83⁻-Population, der graue Balken jeweils die CD83⁺-Population dar. M1, M2a und M2c n=6 Versuchen.

Bei allen drei Makrophagenpopulationen ist der Anteil an CD83⁺-Zellen sehr gering (M1 8,1%, M2a 3,6%, M2c 3,9%). Unter LPS + IFN-γ -Stimulation nimmt der Anteil der CD83⁺ Population vor allem bei M1-Makrophagen etwas zu: von 8,1 % auf 22%. Durch die Inkubation mit Dasatinib wird die Expression von CD83 nicht wesentlich beeinflusst.

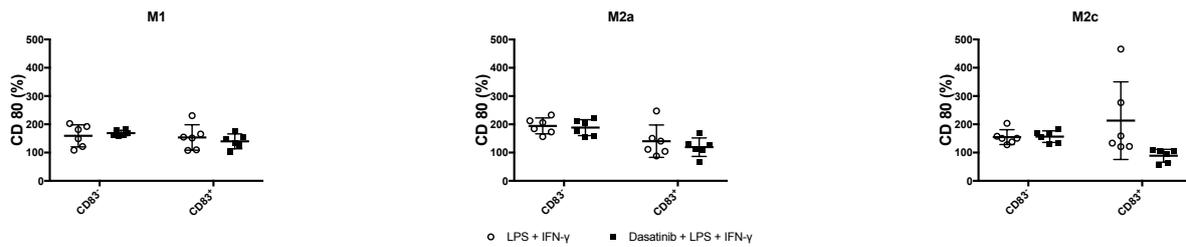


Abbildung 17: Regulation von CD80 in unterschiedlich polarisierten Populationen in Abhängigkeit vom aktivierenden Stimulus sowie ihrer CD83-Expression. Hier werden die normalisierten MFI's der CD80 Expression von jeweils CD83⁻- und CD83⁺-Makrophagen unter Inkubation mit LPS + IFN-γ (unausgefüllte Kreise) und Dasatinib + LPS + IFN-γ (ausgefüllte Rechtecke) in Prozent gezeigt. n=6 Versuche.

Wie aus der Literatur zu erwarten, präsentieren alle drei Makrophagensubtypen -M1, M2a und M2c- eine Steigerung der Expression des Oberflächenmarkers CD80 durch die Aktivierung mit LPS + IFN-γ im Vergleich zur den nicht-aktivierten Makrophagen. Dieser Effekt geht in der CD83⁺-Population bei den M2a und M2c-polarisierten Makrophagen unter Dasatinib-Inkubation verloren.

Eine zusätzliche Inkubation mit Dasatinib führt bei den CD83⁻-Populationen im Vergleich zu den aktivierten Makrophagen zu keiner Veränderung der CD80-Expression bei den untersuchten Makrophagensubtypen auf.

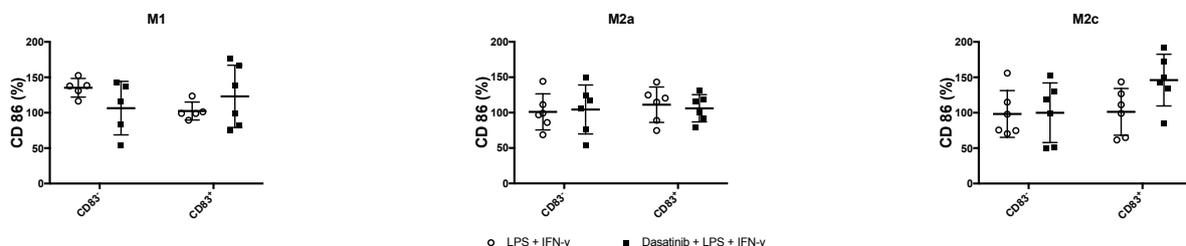


Abbildung 18: Regulation von CD86 in unterschiedlich polarisierten Populationen in Abhängigkeit vom aktivierenden Stimulus sowie ihrer CD83-Expression. Abgebildet sind die normalisierten MFIs in Prozent aus n=6 Versuchen. Unausgefüllte Kreise: LPS + IFN-γ; ausgefüllte Rechtecke: Dasatinib + LPS + IFN-γ.

M1-polarisierte Makrophagen exprimieren nach Aktivierung durch LPS + IFN-γ mehr CD86 als nicht-aktivierte. Dieser Effekt wird durch die Inkubation mit Dasatinib in der CD83⁻ Population abgeschwächt und in der CD83⁺-Population verstärkt.

Bei den M2a-polarisierten Makrophagen kommt es weder durch die Aktivierung noch unter Dasatinib-Einfluss zu einer deutlichen Änderung der CD86-Expression.

Durch eine Inkubation mit Dasatinib wird CD86 im Vergleich zur aktivierten Gruppe bei der CD83⁺-Population der M2c-Makrophagen verstärkt exprimiert.

Gemessen an der Standardabweichung ist nur bei der CD83⁺-Population der M2c-Makrophagen ein eindeutig signifikanter Unterschied mit $p=0,02$ zu sehen.

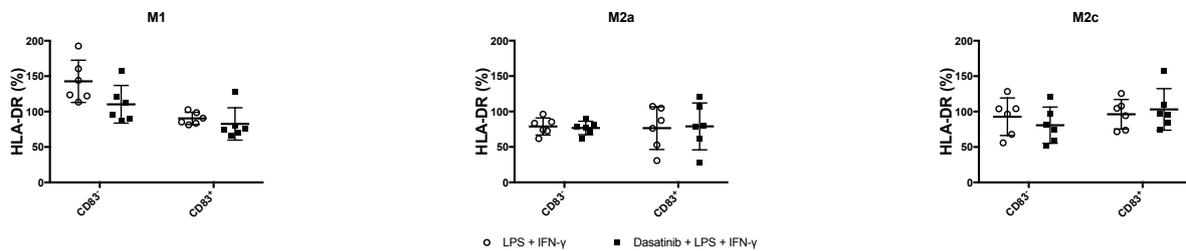


Abbildung 19: Regulation von HLA-DR in unterschiedlich polarisierten Populationen in Abhängigkeit vom aktivierenden Stimulus sowie ihrer CD83-Expression. Es wurde in CD83⁻ und CD83⁺-Zellen unterteilt. N=6. Unausgefüllte Kreise: LPS + IFN-γ; ausgefüllte Rechtecke: Dasatinib + LPS + IFN-γ.

Nur bei C83⁻ - M1-polarisierten Makrophagen kommt es durch die Aktivierung mit LPS + IFN-γ zu einer vermehrten HLA-DR-Expression. Dieser Effekt geht unter Zugabe von Dasatinib weitgehend verloren.

3.1.1.1.3 CD206

Die Höhe der Expression des Mannose-Rezeptor CD206 wurde anhand der gesamten Makrophagenpopulation bestimmt und normalisiert. Anhand der Abbildungen ist durch die durchgeführte Normalisierung ein Vergleich innerhalb des jeweiligen Makrophagentypes zwischen Medium und mit LPS + IFN-γ aktivierten, sowie zwischen aktivierten und zusätzlich mit Dasatinib inkubierten Zellen möglich.

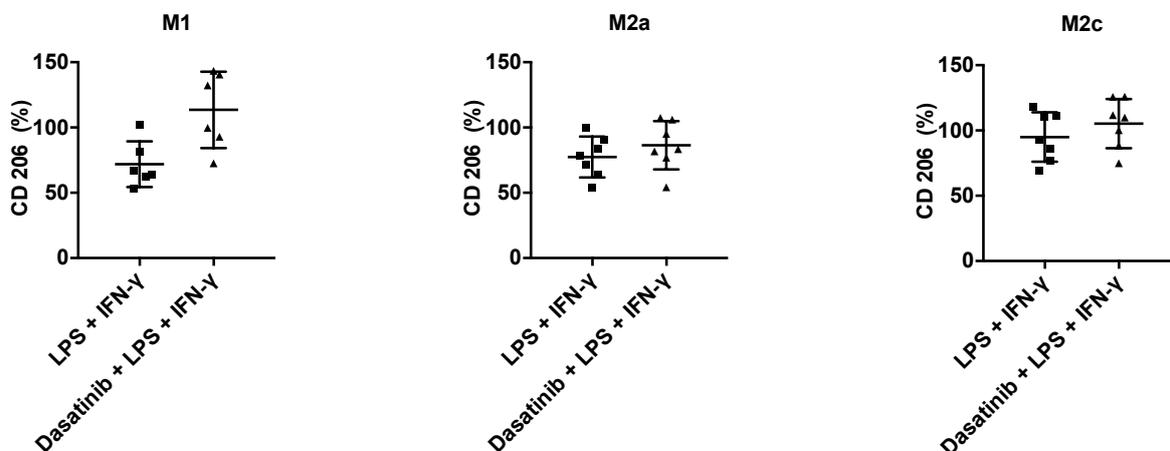


Abbildung 20: Regulation von CD206 in unterschiedlich polarisierten Populationen in Abhängigkeit vom aktivierenden Stimulus. Abgebildet sind die prozentualen Werte der normalisierten MFIs aus M1, M2a, M2c n=7 Versuchen.

Eine Aktivierung LPS + IFN- γ mit führt bei allen drei Subpopulationen zu einer geringeren CD206-Expression. Durch Dasatinib-Inkubation kann diese verringerte Expression weitestgehend aufgehoben und bei M1-Makrophagen gesteigert werden.

3.1.1.2 Modulation der Expression durch Src-kinase-inhibitor I

Der Src-kinase-inhibitor-I zeigt Ähnlichkeiten in der Modulation der Oberflächenmarkern wie Dasatinib oder Bosutinib. Auf eine Erläuterung des Vergleiches zwischen „Medium“ und „LPS + IFN- γ “ wird im Folgenden verzichtet, da dieser bereits in Kapitel 3.2.2. mit Dasatinib vorgenommen wurde.

3.1.1.2.1 Differenzierungsmarker

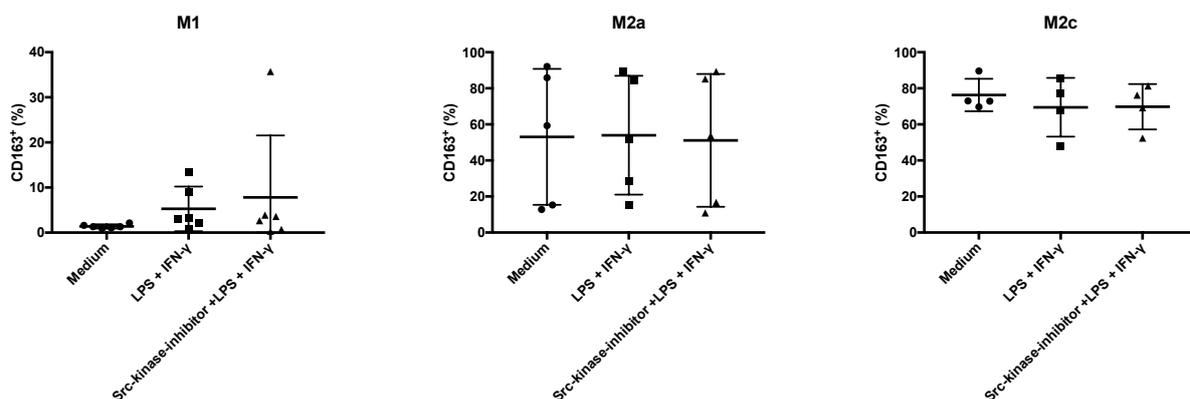


Abbildung 21: Regulation von CD163 in unterschiedlich polarisierten Populationen in Abhängigkeit vom aktivierenden Stimulus. Abgebildet ist der Anteil an CD163⁺-Zellen in Prozent aus M1 n=6; M2a n=5 und M2c n=4 Versuchen.

Unter Einfluss des Src-kinase-inhibitor-I nehmen bei M1 die Anteile an CD163⁺-Zellen im Vergleich zu den mit LPS + IFN- γ aktivierten Populationen zu. Hingegen hat eine Inkubation mit Dasatinib bei M1 im Vergleich mit der aktivierten Gruppe zu einer geringeren Expression des Differenzierungsmarkers geführt. Bei M2a und M2c-Makrophagen zeigt eine zusätzliche Inkubation mit Src-kinase-inhibitor-I keine Veränderung der CD163-Expression.

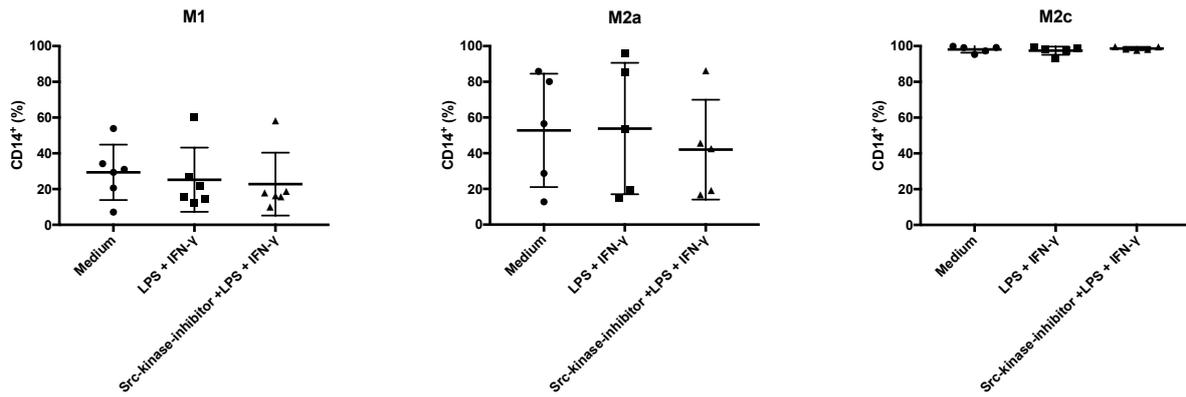


Abbildung 22: Regulation von CD14 in unterschiedlich polarisierten Populationen in Abhängigkeit vom aktivierenden Stimulus. Abgebildet ist der Anteil an CD14⁺-Zellen in Prozent aus M1 n=6; M2a und M2c n=5 Versuchen.

Der Anteil an CD14⁺-Zellen nimmt unter Inkubation mit dem Src-kinase-inhibitor-I bei M2a Makrophagen im Vergleich mit LPS + IFN-γ geringfügig ab.

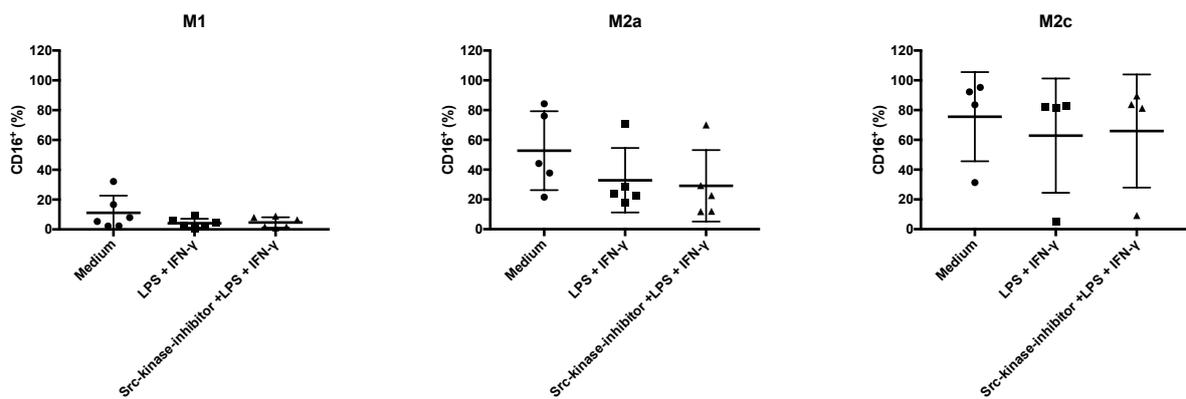


Abbildung 23: Regulation von CD16 in unterschiedlich polarisierten Populationen in Abhängigkeit vom aktivierenden Stimulus. Abgebildet ist der Anteil an CD16⁺-Zellen in Prozent aus M1 n=6, M2a n=5 und M2c n=4 Versuchen.

Der Anteil an CD16⁺-Makrophagen verändert sich unter Einfluss von Src-kinase-inhibitor-I im Vergleich mit LPS + IFN-γ-Behandlung nicht wesentlich. Diese Beobachtung von CD16⁺-Zellen gleicht der unter Dasatinib-Einfluss für M2a-Makrophagen.

3.1.1.2.2 CD83 und die Aktivierungsmarker CD80/CD86/HLA-DR

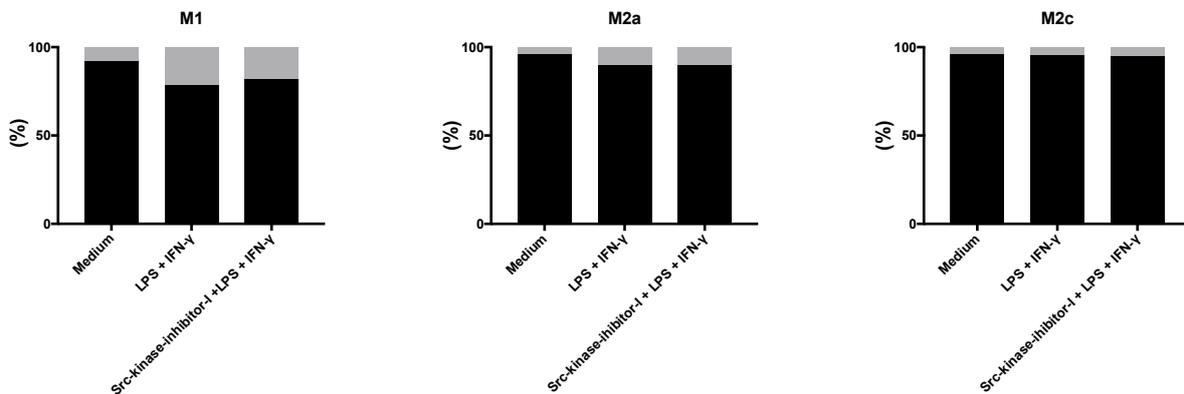


Abbildung 24: Anteil der unterschiedlich polarisierten Makrophagen in Abhängigkeit der aktivierenden Stimuli an CD83⁻ und CD83⁺-Zellen. Der schwarze Balken stellt jeweils die CD83⁻-Population, der graue Balken jeweils die CD83⁺-Population dar. Abgebildet sind die Anteile CD83⁻ und CD83⁺-Zellen in Prozent aus M1 n=6; M2a und M2c n=5 Versuchen. Der schwarze Balken stellt jeweils die CD83⁻-Population, der graue Balken jeweils die CD83⁺-Population dar.

Unter Einfluss von Src-kinase-inhibitor-I wird der Anteil an CD83⁻/CD83⁺-Zellen im Vergleich nach Aktivierung mit LPS + IFN- γ bei M1 und M2-polarisierten nicht wesentlich geändert.

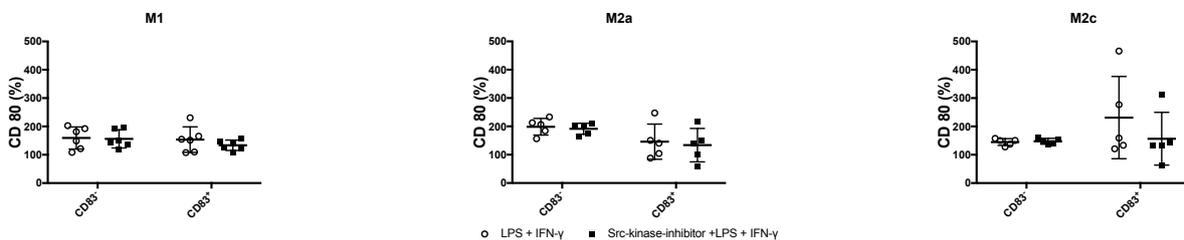


Abbildung 25: Regulation von CD80 in unterschiedlich polarisierten Populationen in Abhängigkeit vom aktivierenden Stimulus sowie ihrer CD83-Expression. Hier werden die normalisierten MFI's der CD80 Expression von jeweils CD83⁻ und CD83⁺-Makrophagen unter Inkubation mit LPS + IFN- γ (unausgefüllte Kreise) und Dasatinib + LPS + IFN- γ (ausgefüllte Rechtecke) in Prozent gezeigt. M1 n=6; M2a und M2c n=5 Versuche.

Die Veränderungen von CD80 unter dem Einfluss von Src-kinase-inhibitor-I lässt sich wie folgt beschreiben: Die gesteigerte Expression von CD80 bei der CD83⁺-Population der M2c-polarisierten Makrophagen nach Aktivierung mit LPS + IFN- γ geht unter Src-kinase-inhibitor-I weitgehend verloren. Diese Modulation stimmt für alle drei Makrophagensubtypen mit der unter Dasatinib überein.

Die Inkubation mit Src-kinase-inhibitor-I –wie auch bei Inkubation mit Dasatinib– hat keinen Einfluss auf die Expression von CD80 in der CD83-Population im Vergleich mit der Aktivierung durch LPS + IFN- γ .

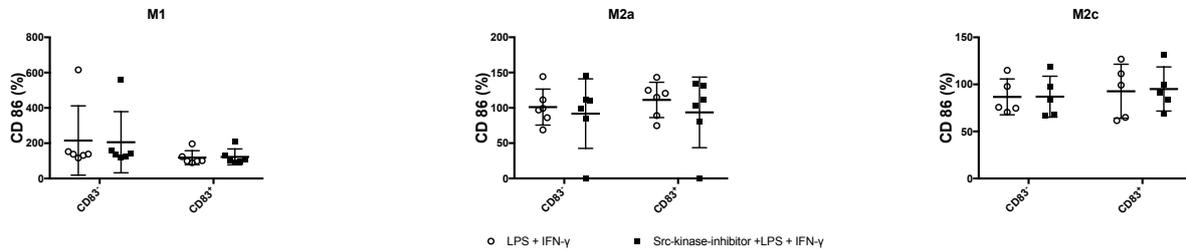


Abbildung 26: Regulation von CD86 in unterschiedlich polarisierten Populationen in Abhängigkeit vom aktivierenden Stimulus sowie ihrer CD83-Expression. Abgebildet sind die normalisierten MFIs in Prozent aus M1 n=6; M2a und M2c n=5 Versuchen. Unausgefüllte Kreise: LPS + IFN- γ ; ausgefüllte Rechtecke: Dasatinib + LPS + IFN- γ .

Die gesteigerte CD86-Expression der CD83⁺-M2a-polarisierten Makrophagen durch die Aktivierung mit der LPS + IFN- γ wird durch Inkubation mit Src-kinase-Inhibitor-I weitgehend aufgehoben. Diese Veränderung kann man auch unter Dasatinib-Einfluss beobachten. M1 und M2c Makrophagen zeigen keine wesentlichen Änderungen der CD86-Expression.

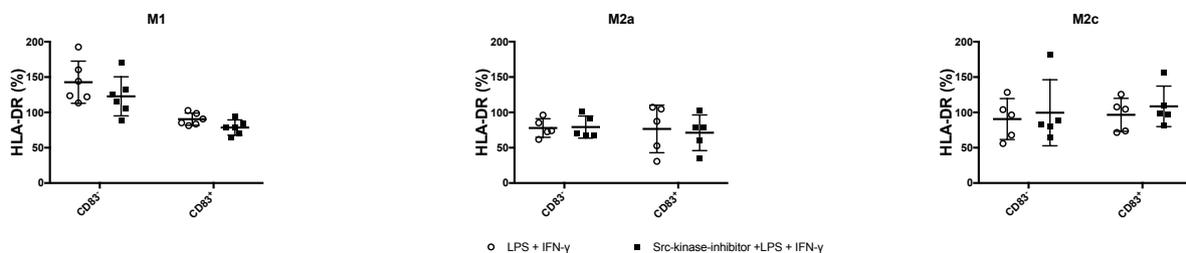


Abbildung 27: Regulation von HLA-DR in unterschiedlich polarisierten Populationen in Abhängigkeit vom aktivierenden Stimulus sowie ihrer CD83-Expression. Es wurde in CD83⁺ und CD83⁻-Zellen unterteilt. M1 n=6; M2a und M2c n= 5 Versuche. Unausgefüllte Kreise: LPS + IFN- γ ; ausgefüllte Rechtecke: Dasatinib + LPS + IFN- γ .

Unter dem Einfluss von Src-kinase-inhibitor-I kommt es in der CD83⁺- und CD83⁻-Population zu einer Abnahme der HLA-DR-Expression bei der M1-Population im Vergleich zur LPS + IFN- γ –Inkubation. Die verminderte Expression von HLA-DR der CD83⁻-Population von M1- Makrophagen sind unter Src-kinase-inhibitor-I und Dasatinib-Inkubation gleich.

Die M2a-Makrophagen lassen – wie auch unter Dasatinib- keine deutlichen Expressionsveränderung erkennen. M2c-Makrophagen zeigen eine geringe Zunahme

in der CD83⁺-und CD83⁻ Population durch Src-kinase-inhibitor-I Einfluss *versus* LPS + IFN- γ .

3.1.1.2.3 CD206

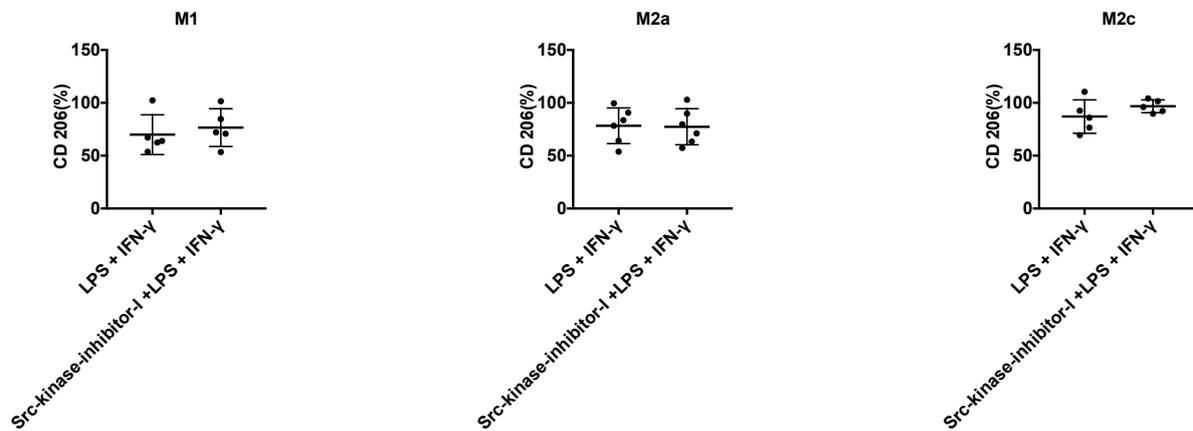


Abbildung 28: Regulation von CD206 in unterschiedlich polarisierten Populationen in Abhängigkeit vom aktivierenden Stimulus. Abgebildet sind die prozentualen Werte der normalisierten MFIs aus M1:n=6/5; M2a: n=6; M2c: n= 6 Versuchen.

Unter Src-kinase-inhibitor-I wird der hemmende Effekt durch LPS + IFN- γ auf die CD206-Expression bei M2c-Mkrophagen aufgehoben.

Dasatinib hat zu einer Steigerung der CD206-Expression in allen Subpopulationen geführt.

3.1.1.3 Modulation der Expression durch Bosutinib

Um einen off-target Effekt von Dasatinib auszuschließen wurde ergänzend als dritter Tyrosinkinaseinhibitor Bosutinib verwendet.

3.1.1.3.1 Differenzierungsmarker

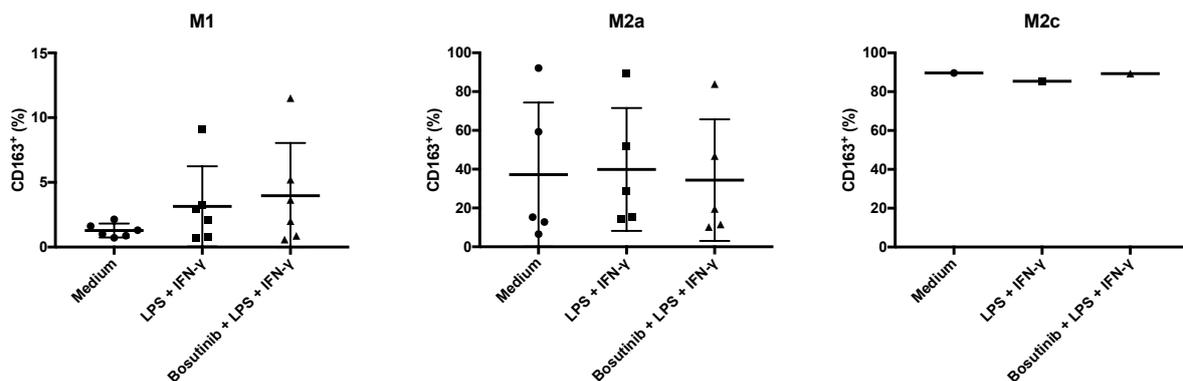


Abbildung 29: Regulation von CD163 in unterschiedlich polarisierten Populationen in Abhängigkeit vom aktivierenden Stimulus. Abgebildet ist der Anteil an CD163⁺-Zellen in Prozent aus M1 n=6; M2a n=5; M2c n=1 Versuchen.

Unter Bosutinib-Inkubation kann die gesteigerte CD163-Expression nach Aktivierung mit LPS + IFN-γ bei M1- polarisierten Makrophagen verstärkt werden.

Bei M2c-polarisierten Makrophagen wird der verringernde Effekt durch LPS + IFN-γ nahezu vollständig aufgehoben.

Damit gleicht die Modulation an CD163⁺-M2a und M2c-Makrophagen der unter Einfluss von Dasatinib. Durch Inkubation mit Src-kinase-inhibitor-I kann ebenfalls ein verstärkter Anteil an CD163⁺-M1-Makrophagen beobachtet werden.

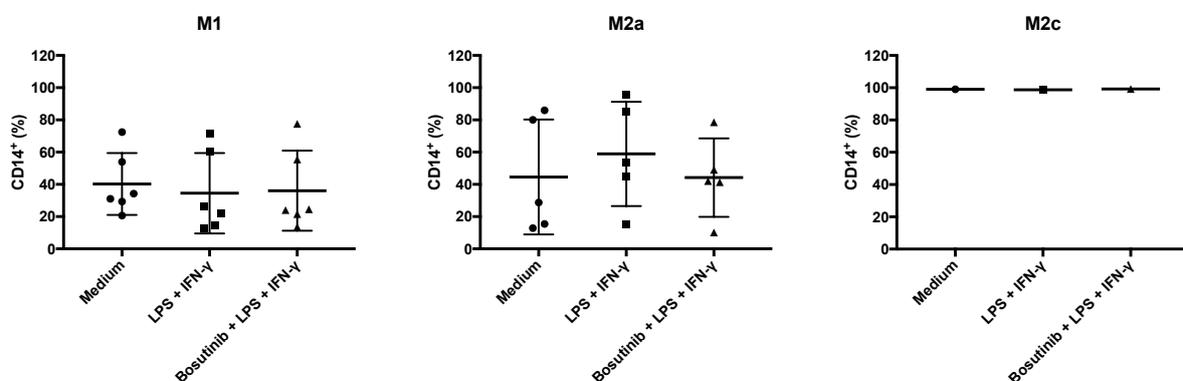


Abbildung 30: Regulation von CD14 in unterschiedlich polarisierten Populationen in Abhängigkeit vom aktivierenden Stimulus. Abgebildet ist der Anteil an CD14⁺-Zellen in Prozent aus M1 n=6; M2a n=5; M2c n=1 Versuchen.

Unter Bosutinib-Inkubation wird bei M1-Makrophagen keine wesentliche Modulation des CD14⁺-Anteils gemessen. Die vermehrte CD14-Expression durch die Aktivierung mit LPS + IFN- γ wird unter zusätzlicher Bosutinib-Inkubation bei M2-polarisierten Makrophagen weitestgehend aufgehoben. Derselbe Effekt ist unter Src-kinase-inhibitor-I auch zu beobachten.

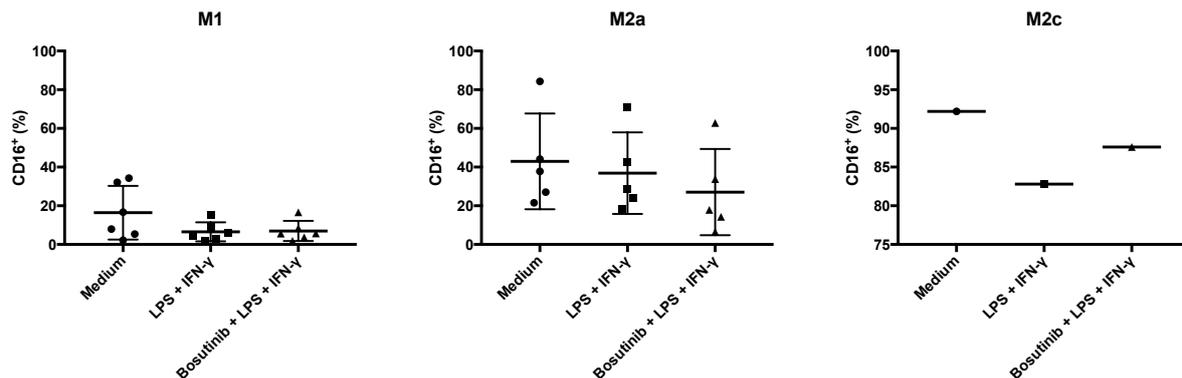


Abbildung 31: Regulation von CD16 in unterschiedlich polarisierten Populationen in Abhängigkeit vom aktivierenden Stimulus. Abgebildet ist der Anteil an CD16⁺-Zellen in Prozent aus M1 n=6; M2a n=5; M2c n=1 Versuchen.

M1-Makrophagen zeigen unter Bosutinib-Inkubation ebenso wie unter Src-kinase-inhibitor-I Einfluss keine Veränderung des Anteils an CD16⁺-Zellen. Eine Abnahme des Anteils an CD16⁺-Zellen ist bei der M2a-Subpopulation unter Bosutinib-Inkubation im Vergleich mit LPS + IFN- γ -aktivierten Zellen festzustellen.

Die Aktivierung mit LPS + IFN- γ führt bei M2c zu einem verringertem Anteil CD16⁺-Zellen. Dieser Effekt geht unter Zugabe von Bosutinib fast gänzlich verloren.

3.1.1.3.2 CD83 und die Aktivierungsmarker CD80/CD86/HLA-DR

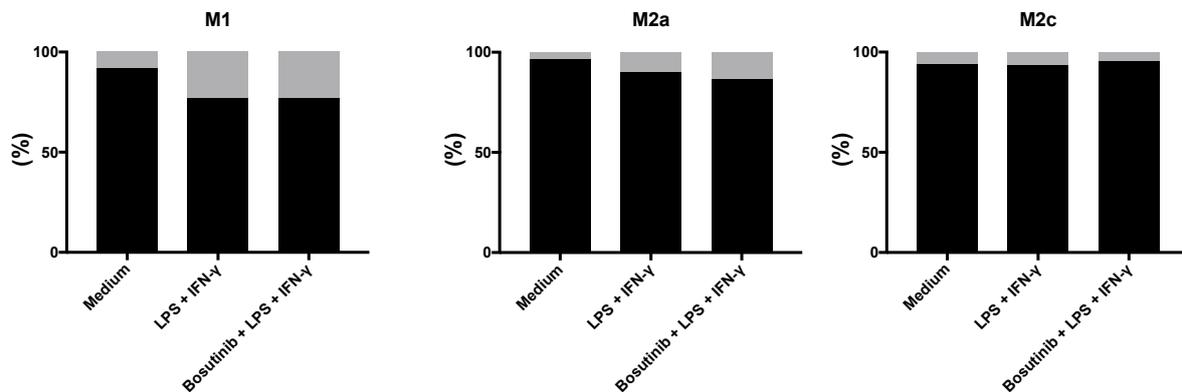


Abbildung 32: Anteil der unterschiedlich polarisierten Makrophagen in Abhängigkeit der aktivierenden Stimuli an CD83⁻ und CD83⁺-Zellen. Der schwarze Balken stellt jeweils die CD83⁻-Population, der graue Balken jeweils die CD83⁺-Population dar. Abgebildet sind die Anteile CD83⁻ und CD83⁺-Zellen in Prozent aus M1 n=5; M2a n=4; M2c: n= 2 Versuchen.

Wie auch unter Dasatinib und Src-kinase-Inhibitor-I-Einfluss ist auch unter Bosutinib-Inkubation im Vergleich zur Aktivierung mit LPS + IFN-γ die Veränderung des Anteils an CD83⁺-Makrophagen in allen drei Makrophagensubtypen sehr gering.

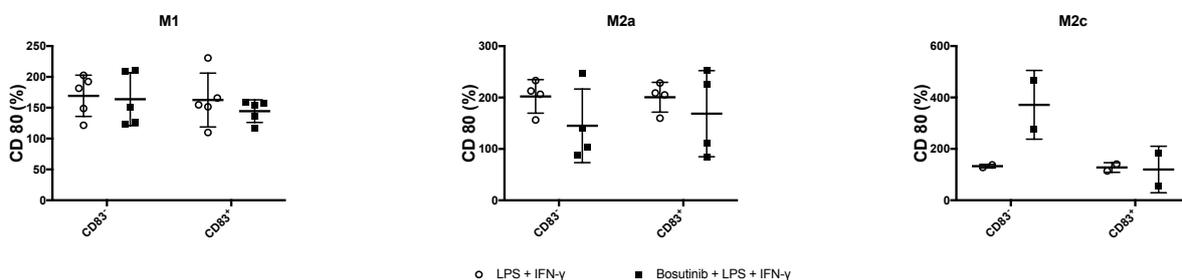


Abbildung 33: Regulation von CD80 in unterschiedlich polarisierten Populationen in Abhängigkeit vom aktivierenden Stimulus sowie ihrer CD83-Expression. Hier werden die normalisierten MFI's der CD80 Expression von jeweils CD83⁻ und CD83⁺-Makrophagen unter Inkubation mit LPS + IFN-γ (unausgefüllte Kreise) und Dasatinib + LPS + IFN-γ (ausgefüllte Rechtecke) in Prozent gezeigt. M1 n=5; M2a n=4; M2c: n= 2 Versuche.

Bosutinib führt in den CD83⁺-Populationen der M1 und M2a-polarisierten Makrophagen zu einer Abschwächung der gesteigerten CD80-Expression durch die Aktivierung mit LPS + IFN-γ. Die anderen beiden untersuchten Tyrosinkinaseinhibitoren – Dasatinib und Src-kinase-inhibitor-I- zeigen in allen drei Makrophagensubtypen eine Abnahme der CD80-Expression.

Die vermehrte CD80-Expression durch die Aktivierung mit LPS + IFN- γ wird in der CD83⁻-Population der M2a-Makrophagen durch Bosutinib verringert, dagegen bei M2c-Makrophagen verstärkt.

Die anderen beiden untersuchten Tyrosinkinasen haben bei allen Makrophagensubtypen keine bemerkenswerte Veränderung in der Expression von CD80 bei der CD83⁻-Population gezeigt.

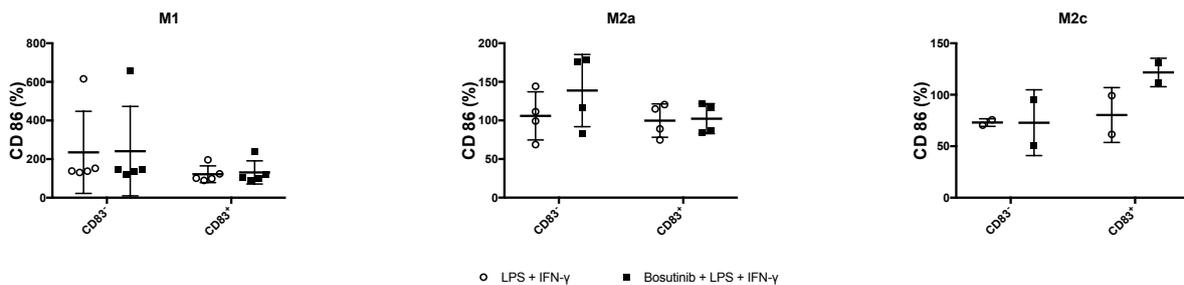


Abbildung 34: Regulation von CD86 in unterschiedlich polarisierten Populationen in Abhängigkeit vom aktivierenden Stimulus sowie ihrer CD83-Expression. Abgebildet sind die normalisierten MFIs in Prozent aus M1 n=5; M2a n=4; M2c: n= 2 Versuchen. Unausgefüllte Kreise: LPS + IFN- γ ; ausgefüllte Rechtecke: Dasatinib + LPS + IFN- γ .

M1-Makrophagen zeigen bei zusätzlicher Inkubation mit Bosutinib keine Veränderung der CD86-Expression.

Eine Inkubation mit Bosutinib führt bei aktivierten M2a-Makrophagen, welche kein CD83 exprimieren, zu einer gesteigerten CD86-Expression. Diese Modulation ist gegensätzlich zu der unter Dasatinib und Src-kinase-inhibitor-I.

M2c-polarisierte Makrophagen, welche durch LPS + IFN- γ aktiviert wurde und CD83 exprimieren, zeigen unter Bosutinib-Inkubation eine verstärkte CD86-Expression. Diese Beobachtung gleicht den Ergebnissen unter Dasatinib-Inkubation.

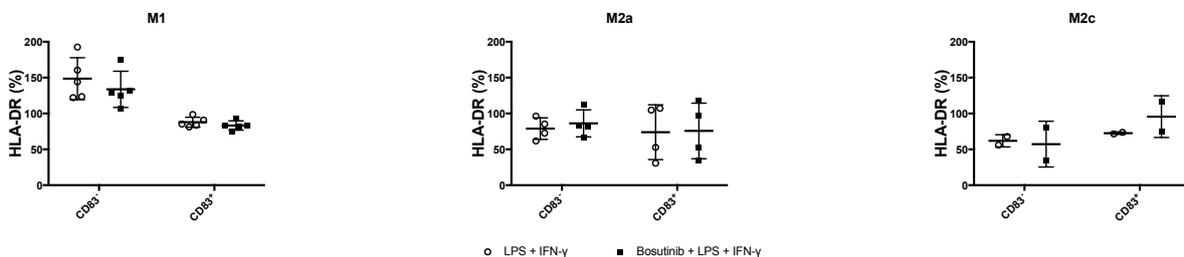


Abbildung 35: Regulation von HLA-DR in unterschiedlich polarisierten Populationen in Abhängigkeit vom aktivierenden Stimulus sowie ihrer CD83-Expression. Es wurde in CD83⁻ und CD83⁺-Zellen unterteilt. M1 n=5; M2a n=4; M2c: n= 2 Versuche. Unausgefüllte Kreise: LPS + IFN- γ ; ausgefüllte Rechtecke: Bosutinib + LPS + IFN- γ .

Bosutinib führt –wie auch die andere beiden Tyrosinkinaseinhibitoren- bei M1 zu einer Suppression der HLA-DR-Präsentation bei den CD83-Zellen. M2c-polarisierte Makrophagen, welche durch LPS + IFN- γ aktiviert wurde und CD83 exprimieren, zeigen unter Bosutinib-Inkubation eine verstärkte HLA-DR-Expression.

Diese Veränderung des HLA-DR-Expression ist Bosutinib und Dasatinib gemeinsam.

3.1.1.3.3 CD206

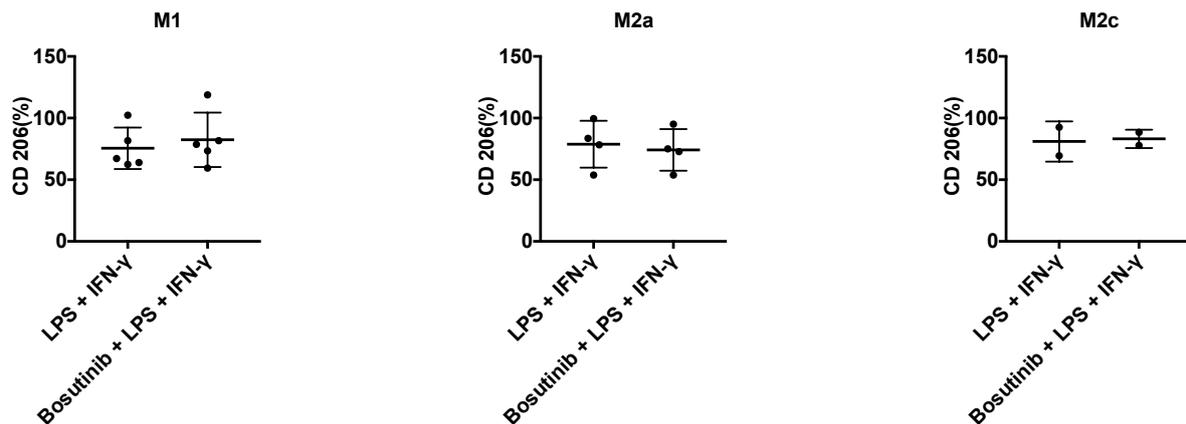


Abbildung 36: Regulation von CD206 in unterschiedlich polarisierten Populationen in Abhängigkeit vom aktivierenden Stimulus. Abgebildet sind die prozentualen Werte der normalisierten MFIs aus M1:n=5; M2a: n=4; M2c: n= 2 Versuche.

Der Mannoserezeptor wird unter Bosutinib-Inkubation bei M1-Makrophagen geringfügig vermehrt exprimiert. M2a und M2c zeigen keine Expressionsänderung von CD206 unter Bosutinib im Vergleich mit LPS + IFN- γ aktivierten Makrophagen.

3.2 Einfluss von Dasatinib, Src-kinase-inhibitor-I und Bosutinib auf die Zytokinproduktion (IL-10 und IL-12) von TAM

3.2.1 IL12-Produktion unter Einfluss von Dasatinib, Src-kinase-inhibitor-I und Bosutinib (ELISA)

3.2.1.1 Dasatinib

Interleukin-12 wird hauptsächlich von Monozyten, Makrophagen und DCs sezerniert. Dieses Zytokin ist ein klassischer Marker der M1-Population.

IL-12 besitzt die Fähigkeit sowohl das angeborene –durch NK-Zellen -, als auch das erworbene –durch T-Zellen- Immunsystem zu aktivieren.

Eine der wichtigsten Funktionen des Interleukins liegt in der Zerstörung von Tumorzellen durch Aktivierung von T-Killerzellen. (92)

Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnten eine IL-12 Steigerung durch Dasatinib sowohl in DCs als auch in TAM zeigen (→ Vergleiche Einleitung 1.4.1.).

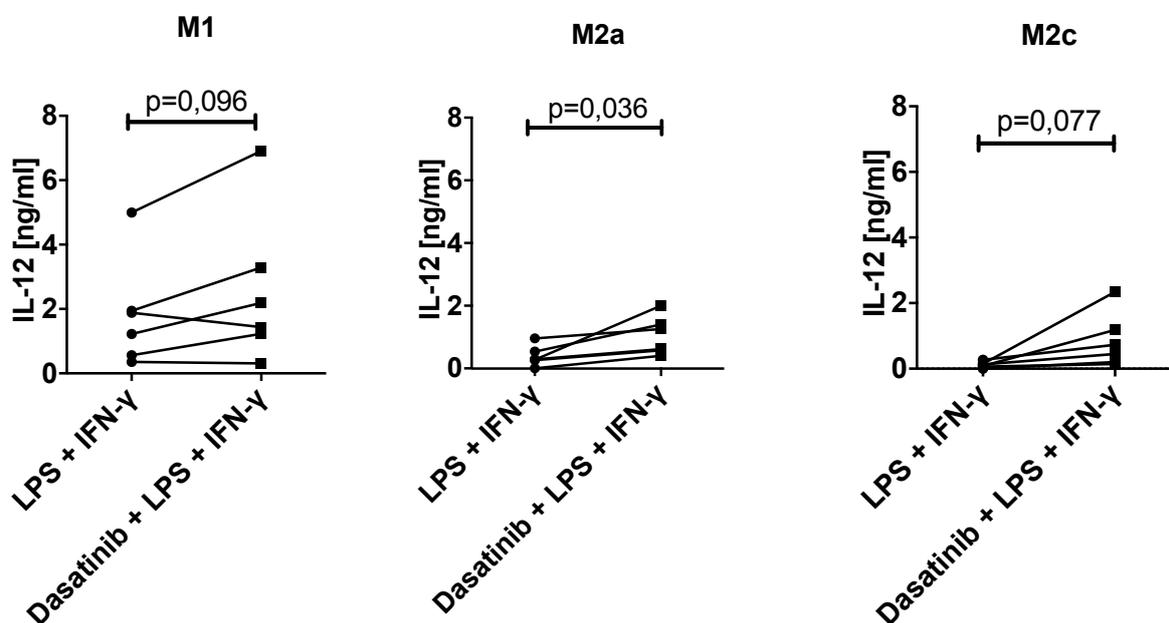


Abbildung 37: Die Grafiken zeigen die Ergebnisse des IL-12-ELISAs. Die Einheit der IL-12-Produktion ist in ng/ml angegeben. Die Materialien für die ELISAs wurden aus den Überständen der Medien von Phänotypisierungs-Versuchen gewonnen und eingefroren. Die M1-Makrophagen zeigen eine Steigerung der IL-12-Produktion unter *Dasatinib*-Inkubation mit einem p-Wert $p=0,096$ (paired t-test). Die Steigerung bei M2a ist mit $p=0,036$ signifikant. M2c verzeichnet ebenfalls eine Steigerung, hier ist $p=0,077$. Anzahl der Duplikate M1: $n=6$ und M2a; M2c $n=7$

Der durchgeführte IL-12-ELISA zeigt in allen drei Populationen, d.h. M1, M2a sowie M2c-Makrophagen, einen Anstieg der IL-12-Produktion von Dasatinib behandelten Zellen im Vergleich zu Zellen, die ausschließlich mit LPS + IFN- γ behandelt wurden. M1-Makrophagen produzierten unter LPS + IFN- γ Kultivierung im Durchschnitt 1,8 ng/ml IL-12, mit Dasatinib-Zugabe 2,6 ng/ml IL-12. Diese Erhöhung ist mit einem p-Wert von 0,096 nicht signifikant.

M2a verzeichnen eine signifikante Zunahme ($p=0,036$) der IL-12 Produktion unter Dasatinib: von durchschnittlich 0,372 ng/ml auf 0,980 ng/ml.

Bei der letzten untersuchten Population, den M2c-Makrophagen, kann man auch eine Steigerung ($p=0,077$) der IL-12 -Produktion erkennen: der Mittelwert unter LPS+ IFN- γ beträgt 0,162 ng/ml, wohingegen unter LPS + IFN- γ und Dasatinib im Durchschnitt 0,764 ng/ml IL-12 produziert werden.

3.2.1.2 Src-kinase-inhibitor-I und Bosutinib

Src-kinase-inhibitor-I:

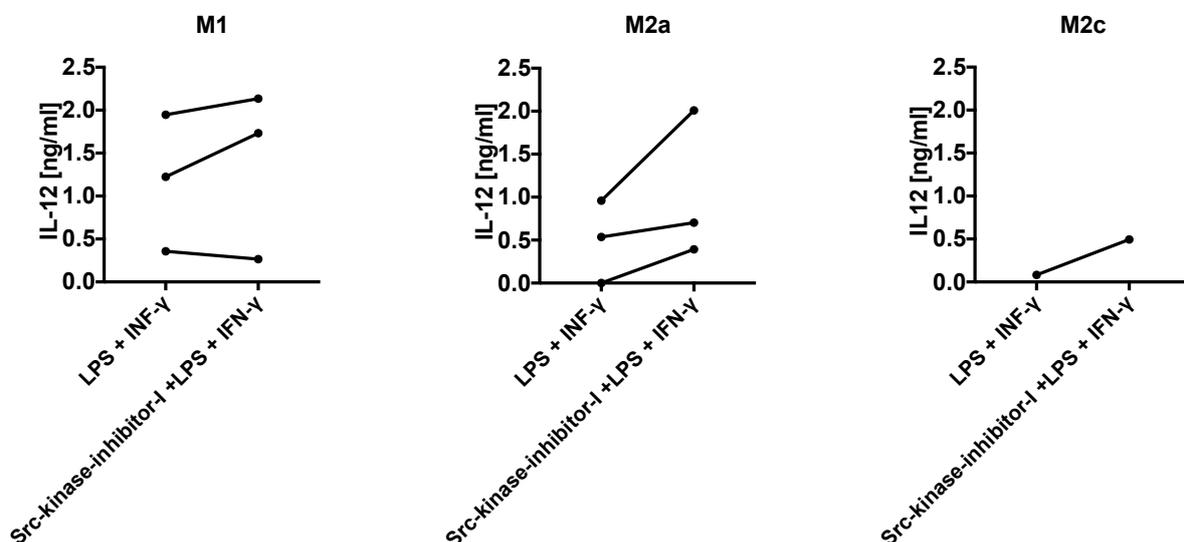


Abbildung 38: Die Grafiken zeigen die Ergebnisse des IL-12-ELISAS unter Src-kinase-inhibitor-I-Kultivierung. Die Einheit der IL-12-Produktion ist in ng/ml angegeben. Die Grafiken zeigen eine Tendenz zur vermehrten IL-12-Produktion unter Src-kinase-inhibitor-I-Inkubation. Anzahl der Duplikate M1; M2a: n=3 und M2c: n=1.

Die Daten der Kultivierung mit dem Src-kinase-inhibitor-I weisen ebenfalls eine Tendenz zur verstärkten IL-12-Produktion auf.

Bei M1 nimmt die IL-12-Produktion von 1,18 ng/ml (Mean) unter LPS + IFN- γ auf 1,38 ng/ml (Mean) unter Src-kinase-inhibitor-I-Inkubation zu.

M2a-Makrophagen verzeichnen eine Zunahme von 0,5 ng/ml unter LPS + IFN- γ auf 1,04 ng/ml mit Src-kinase-inhibitor-I.

M2c hat in einem Versuch einen Anstieg von 0,08 ng/ml unter LPS + IFN- γ auf 0,5 ng/ml unter dem Src-kinase-inhibitor-I gezeigt.

Da das Hauptaugenmerk der Arbeit auf den Einfluss von Dasatinib lag, wurden mit dem Src-kinase-inhibitor-I nur eine begrenzte Anzahl an Versuchen durchgeführt. Die Versuche weisen daraufhin, dass die Erhöhung der IL-12 Produktion tatsächlich über eine Inhibition einer Src-Kinase zustande kommt und nicht durch einen off-target Effekt des Dasatinibs.

Bosutinib:

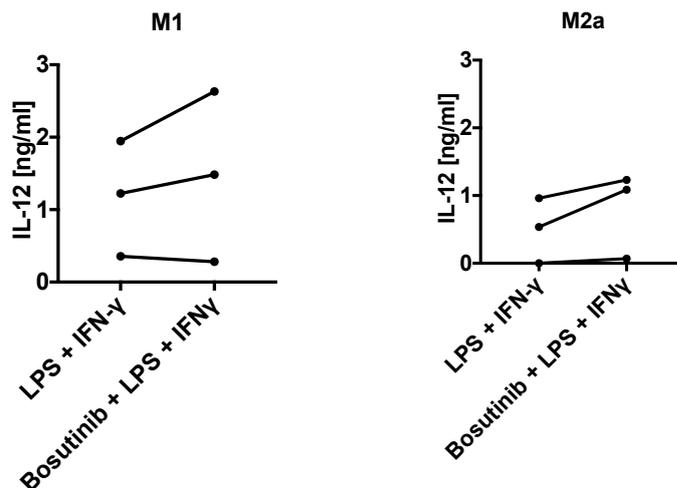


Abbildung 39: Der IL-12-ELISA unter Bosutinib-Kultivierung zeigt bei M1 und M2a eine Tendenz zur Steigerung der IL-12-Produktion. Die IL-12-Menge ist in ng/ml angegeben. Anzahl der Duplikate n=3.

Die Ergebnisse der IL-12-Produktion deuten eine Steigerung der IL-12-Produktion unter Bosutinib an. Bei M1 kann man eine durchschnittliche Steigerung von IL-12 von 1,18 ng/ml Mean durch LPS + IFN- γ auf 1,47 ng/ml Mean durch Bosutinib feststellen. In den drei durchgeführten Versuchen zeigt M2a eine Zunahme von 0,5 ng/ml unter LPS + IFN- γ auf 0,8 ng/ml unter Bosutinib. Der Effekt war aber allenfalls mild und bei der begrenzten Zahl der Experimente nicht signifikant.

3.2.2 IL-10-Produktion unter Einfluss von Dasatinib und Src-kinase-inhibitor-I

IL-10 ist ein antiinflammatorisches Zytokin und wird hauptsächlich von Monozyten sezerniert. Die Antigenpräsentation wird herabgesetzt, wohingegen Makrophagen unter IL-10 Einfluss vermehrt phagozytieren.

Hier wurde untersucht, ob durch Dasatinib, Src-kinase-inhibitor-I und Bosutinib die IL-10-Produktion beeinflusst wird.

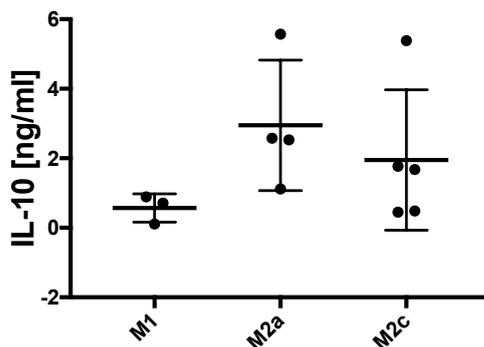


Abbildung 40: IL-10-ELISA aus Überständen der Versuchsreihe zur Phänotypisierung von Makrophagen. Diese Grafik verdeutlicht die erhöhte IL-10-Produktion der beiden M2-Makrophagen im Vergleich mit M1-Makrophagen. Unter LPS + IFN- γ -Kultivierung produzieren M1 durchschnittlich 0,57 ng/ml, M2a 2,95 ng/ml und M2c 1,95 ng/ml IL-10. Anzahl der Duplikate: M1: n=3, M2a: n=4, M2c: n=5.

Die Menge an sezerniertem antiinflammatorischem Zytokin IL-10 wurde durch einen ELISA gemessen. Wie aus der Literatur zu erwarten, produzieren M2a und M2c-Makrophagen deutlich mehr IL-10 als M1-Makrophagen (LPS+ IFN- γ M2a: MW 2,95 ng/ml bzw. M2c: 1,95 ng/ml versus M1: 0,57 ng/ml IL-10.)

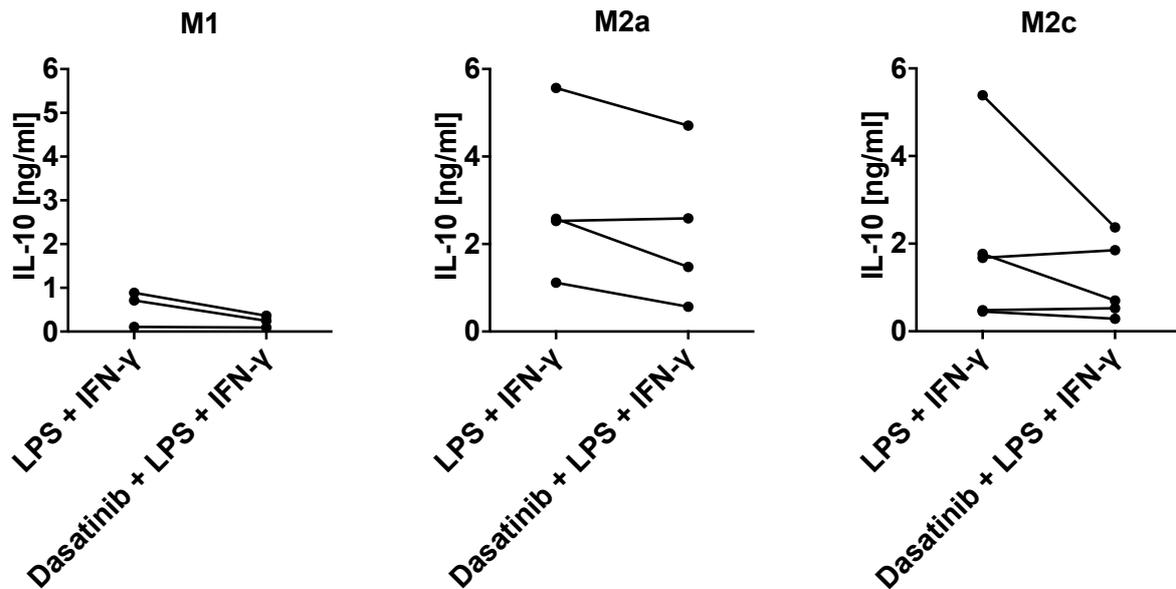


Abbildung 41: ELISA zur Messung der IL-10-Produktion. Dieser zeigt eine konstante Abnahme der IL-10-Produktion in allen drei Gruppen sowie eine von Grund auf höhere Menge an IL-10 bei den M2-Makrophagen. Anzahl der Duplikate: M1: n=3, M2a: n=4, M2c: n=5

Die gezeigten Daten lassen eine Abnahme an IL-10 bei Inkubation mit Dasatinib- im Vergleich zu alleinigem LPS + IFN- γ -Zusatz beobachtet.

Durch die Anwesenheit von Dasatinib während der LPS-Inkubation fallen die oben genannten Werte in allen drei Populationen: M1: von 0,57 ng/ml auf 0,23 ng/ml, M2a: 2,95 ng/ml \rightarrow 2,33 ng/ml bzw. M2c. 1,95 ng/ml \rightarrow 1,15 ng/ml IL-10.

Src-kinase-inhibitor-I:

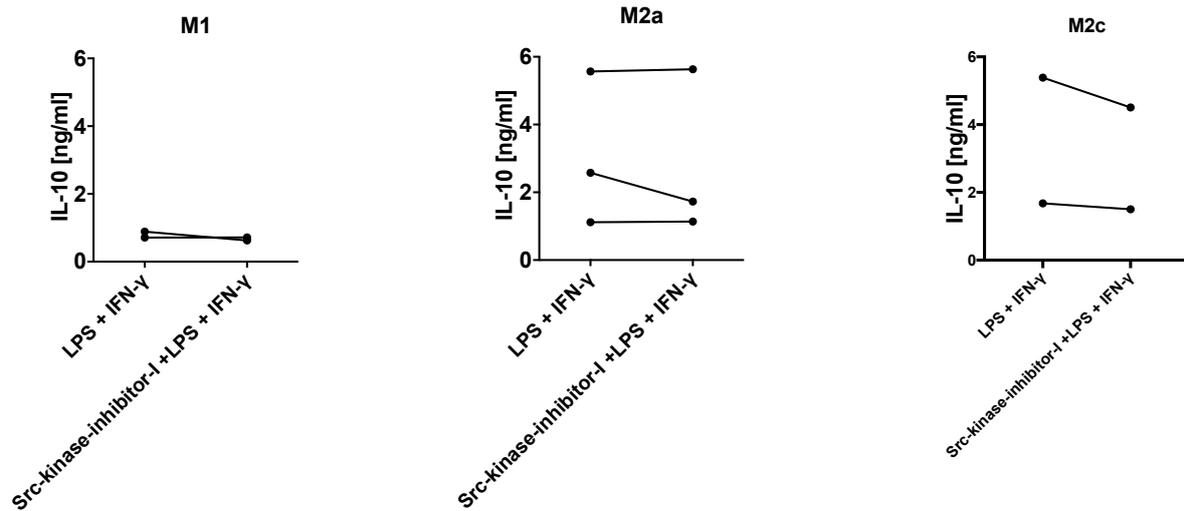


Abbildung 42: IL-10-ELISA aus Überständen der Versuchsreihe zur Phänotypisierung von Makrophagen (Kapitel 3.2.1) Die zwei durchgeführten IL-10-Messungen unter Src-kinase-inhibitor-I-Inkubation deuten eine verringerte IL-10-Produktion an. M1 n=2, M2a n=3 und M2c n=2.

Unter dem Src-kinase-inhibitor-I ist eine Tendenz zur verringerten IL-10-Produktion bei M1 und M2a- Makrophagen erkennbar.

3.3 NK-Zellen

3.3.1 Aktivierung von NK-Zellen in Ko-Kultur mit Makrophagen unter Dasatinib-Einfluss

Eine Inkubation von Dasatinib mit NK-Zellen im Makrophagen-Milieu kann sowohl eine Veränderung der Aktivierung von NK-Zellen durch den direkten Dasatinib-Einfluss, als auch die durch Dasatinib-veränderten Makrophagen bewirken. Auf der einen Seite kann die gesteigerte IL-12-Produktion/ bzw. das veränderte Milieu der Makrophagen unter Dasatinib-Inkubation die NK-Zell-Aktivierung beeinflussen. Auf der anderen Seite wirkt Dasatinib auch direkt auf NK-Zellen und kann dadurch Veränderungen hervorrufen.

Nachdem die Makrophagen mit ihren verschiedenen Stimulanzen (z.B. IL-4/IL-10, vergleiche Kapitel 2.2.3) fünf Tage gemeinsam in Kultur waren, wurden am sechsten Tag NK-Zellen im Verhältnis 1:1 hinzugegeben. Zum gleichen Zeitpunkt wurden die NK-Zellen im unterschiedlichen Makrophagen-Milieu zusätzlich mit dem TKI Dasatinib inkubiert. Am Tag der Färbung und Messung wurden die isolierten NK-Zellen für 4 Stunden mit K562 im Verhältnis 1:1 inkubiert. (siehe Kapitel 2.2.4) Die Zellpopulation K562, welche kein MHC-I exprimieren und ein klassisches NK-Zell-Target ist, stellt in den Versuchen die Zielzelle der NK-Zellen dar. (88)

Als Marker für die Aktivität von NK-Zellen wurde in dieser Versuchsreihe CD25, CD69 und CD96 verwendet. Die genauen Funktionen dieser Oberflächenmoleküle sind in Kapitel 1.3.3. beschrieben.

Es wurde eine Normalisierung zur besseren Vergleichbarkeit durchgeführt. (siehe Kapitel 2.2.7.)

Es werden die LPS + IFN- γ aktivierten Zellen mit der Standardgruppe „Medium“ verglichen ebenso wie LPS + IFN- γ mit Dasatinib-inkubierten- und Makrophagen kokultivierten NK-Zellen.

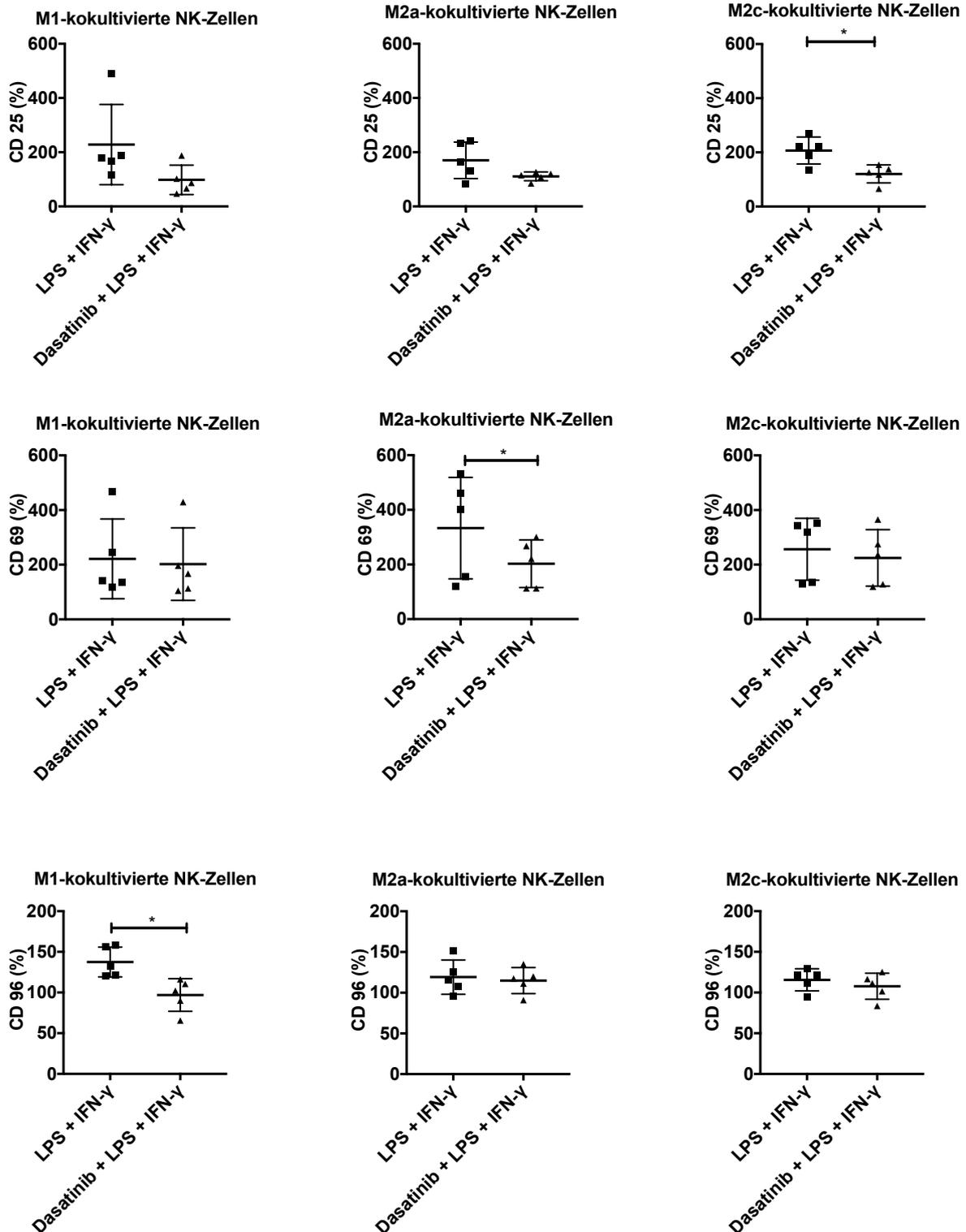


Abbildung 43: Regulation der Aktivierungsmarker von NK-Zellen in Ko-Kultur mit unterschiedlich polarisierten Populationen in Abhängigkeit vom aktivierenden Stimulus. Es gibt drei Subtypen: NK-Zellen im M1-Makrophagen-Milieu; NK-Zellen im M2a-Makrophagen-Milieu und NK-Zellen im M2c-Makrophagen-Milieu. Die Abbildungen zeigen die normalisierten MFIs in Bezug auf die Standardgruppe „Medium“. Alle Subtypen n=5 Versuche.

Durch eine Aktivierung mit LPS + IFN- γ kommt es in allen Subpopulationen zu einer vermehrten Expression der untersuchten Oberflächenmarker CD25, CD69 und CD96. Dieser Effekt geht durch die zusätzliche Inkubation mit Dasatinib mehr oder weniger stark verloren.

Im M2c- Milieu wird die CD25-Expression durch zusätzliche Dasatinib-Inkubation statistisch signifikant mit $p=0,0085$ verringert.

Die gesteigerte CD69-Expression von aktivierten NK-Zellen im M2-Milieu wird durch zusätzliche Dasatinib-Inkubation mit $p=0,043$ signifikant verringert.

CD69 ist ein Oberflächenmolekül, welches kurz nach ihrer Aktivierung auf NK-Zellen exprimiert wird (93) und damit ihr zytotoxisches und immunregulatorisches Potential vervielfacht. (94)

Ebenfalls exprimieren NK-Zellen im M1-Milieu, welche zusätzlich mit Dasatinib inkubiert wurden, weniger CD96 als die aktivierte Vergleichsgruppe. Diese Suppression ist mit einem p-Wert von $p=0,026$ signifikant.

Dasatinib hebt somit -teilweise sogar fast vollständig- den positiven Effekt auf die verstärkte Expression der Oberflächenmarker durch die Aktivierung mit LPS + IFN- γ auf.

3.3.2 Zytotoxizität von NK-Zellen in Ko-Kultur mit Makrophagen unter Dasatinib-Einfluss

Die Aktivierung der zytotoxischen Effektormechanismen wird durch die Bestimmung des Degranulationsmarkers -CD107a- gemessen. CD107a wird bei der Exozytose von Perforinen und Granzymen auf die Zelloberfläche der NK-Zellen transportiert. Die Messung von CD107a wurde mit Hilfe des durchflusszytometrischen Degranulationstestes durchgeführt. (35) (36) Die NK-Zellen wurden in dieser Versuchsreihe vier Stunden mit K562 inkubiert. K562 werden von NK-Zellen erkannt und lysiert. (88)

Um die in der Literatur mehrmals beschriebene erhöhte Zytotoxizität von CD56^{dim} nachzuweisen, wurde in dieser Versuchsreihe eine Unterscheidung in CD56^{bright} und CD56^{dim} vorgenommen. Im Folgenden wurde auf eine Normalisierung verzichtet, da alle Versuchsreihen mit der gleichen Geräteeinstellung gemessen wurden. Des Weiteren kann man so, die unterschiedliche Höhe der MFI-Werte von CD107a auf der

Zelloberfläche der verschiedenen Makrophagensubtypen ablesen.

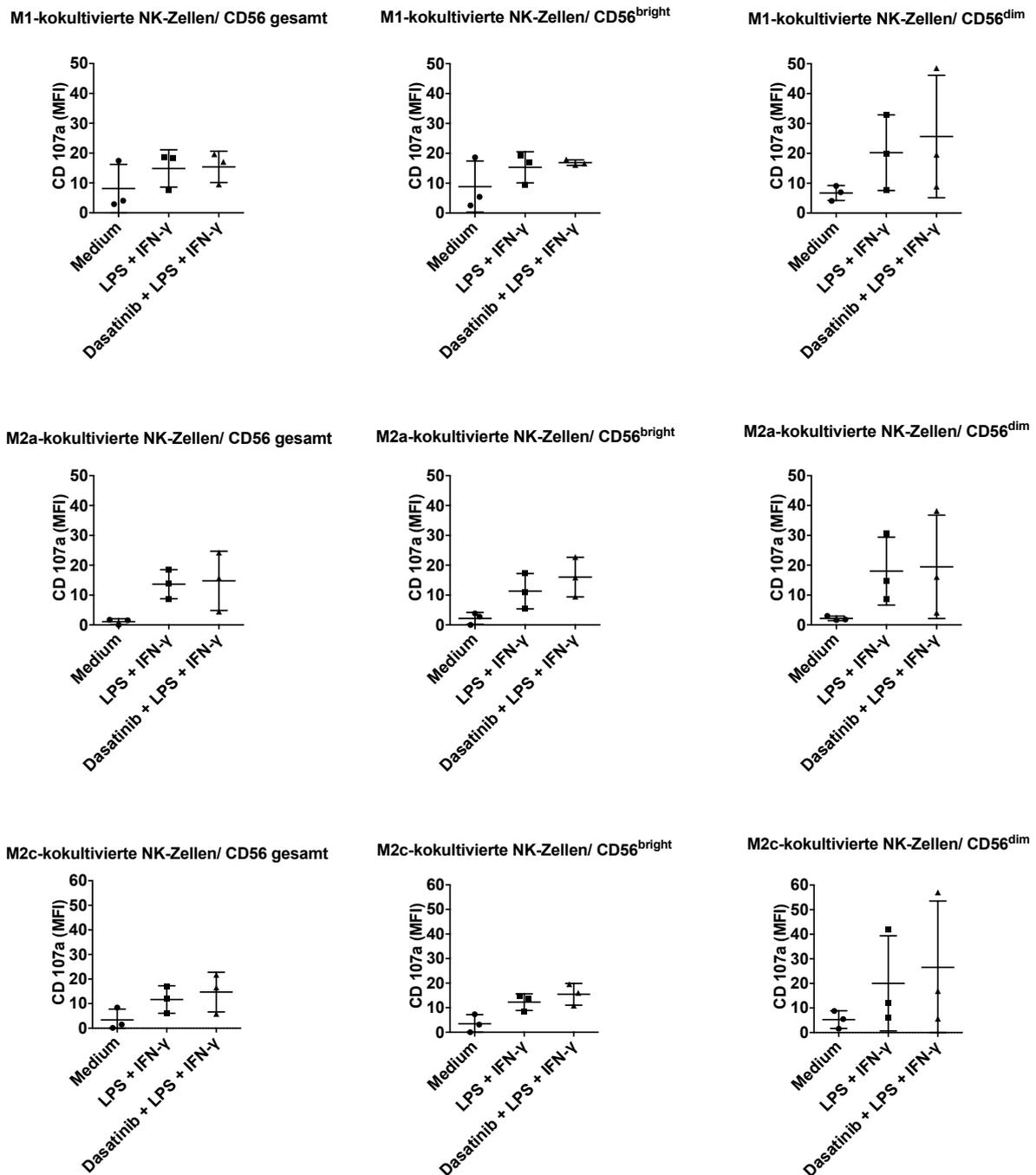


Abbildung 44: Degranulationsmessung von NK-Zellen nach K562-Kultivierung und in Ko-Kultur mit M1-Makrophagen, M2a und M2c-Makrophagen. Gezeigt sind die MFI-Werte, n=3 in allen Gruppen.

In den hier abgebildeten Grafiken wird eine Erhöhung von CD107a in allen Subpopulationen unter LPS + IFN-γ im Vergleich zur Standardgruppe „Medium“ ersichtlich.

Die hier gezeigten MFI-Werte von CD107a zeigen in allen drei Gruppen eine insgesamt deutlich höhere Zytotoxizität von den CD56^{dim}-NK-Zellen (MFI-Werte bis max. 57) im Vergleich zu den CD56^{bright}-NK-Zellen (MFI-Werte bis max. 22,7 mit Dasatinib).

Innerhalb der NK-Zellen in ihren unterschiedlichen Makrophagenkokulturen sowie Untergruppen deutet sich lediglich eine Tendenz zur vermehrten Degranulation an. Wenn man jedoch alle NK-Zellen sowie CD56^{dim} und CD56^{bright}-Unterteilungen zusammenfasst, ist eine Signifikanz mit $p=0,0103$ zwischen der mit LPS + IFN- γ aktivierten und der mit Dasatinib + LPS + IFN- γ inkubierten Untergruppe zu verzeichnen.

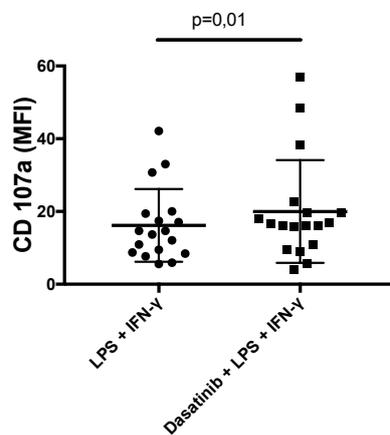


Abbildung 45: Regulation der CD107a-Expression von allen NK-Zellen in Ko-Kultur mit den jeweilig polarisierten Populationen unabhängig der CD56-Expression. Die verstärkte Degranulation unter LPS + IFN- γ + Dasatinib- Einfluss ist mit $p=0,01$ signifikant. N=18 Versuche.

3.4 IL-32 γ

Interleukin-32 ist ein erst kürzlich intensiver erforschtes Interleukin. Interleukin-32 γ weist unter den verschiedenen Subtypen des IL-32 die höchste Zytokinproduktion auf. Dieses Interleukin induziert die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen. (Vergleiche Kapitel 1.5)

In den hier durchgeführten Versuchen sollte die Modulation von Oberflächenmarkern auf den Makrophagensubtypen durch IL-32 γ untersucht werden.

Eine weitere Fragestellung lautete, ob IL-32 γ die Makrophagen zu einer verstärkten IL-12-Produktion anregt bzw. die IL-10-Produktion hemmt.

Außerdem haben wir den Einfluss auf die Aktivierung und Degranulation von mit Makrophagen kokultivierten NK-Zellen durch IL-32 γ betrachtet.

Bei einer Versuchsreihe wurden die Makrophagen mit IL-32 γ stimuliert. Die Ergebnisse werden im Vergleich zur Zellreihe ohne zusätzliche Stimulatoren (Standardgruppe „Medium“) gewertet.

Es wurde eine Normalisierung der MFI-Werte bei CD80/CD86 und HLA-DR in Abhängigkeit von CD83⁻/CD83⁺ sowie bei CD206 vorgenommen, um mögliche Störfaktoren durch z.B. unterschiedliche Kompensierungen auszuschließen. Die unbehandelte Kontrollgruppe („Medium“) wurde als Referenz gesetzt und ein Abfall bzw. Anstieg in Prozent dieses Referenzwertes ausgedrückt.

3.4.1 Modulation der Expression vom Oberflächenmarker durch IL-32 γ

3.4.1.1 Differenzierungsmarker

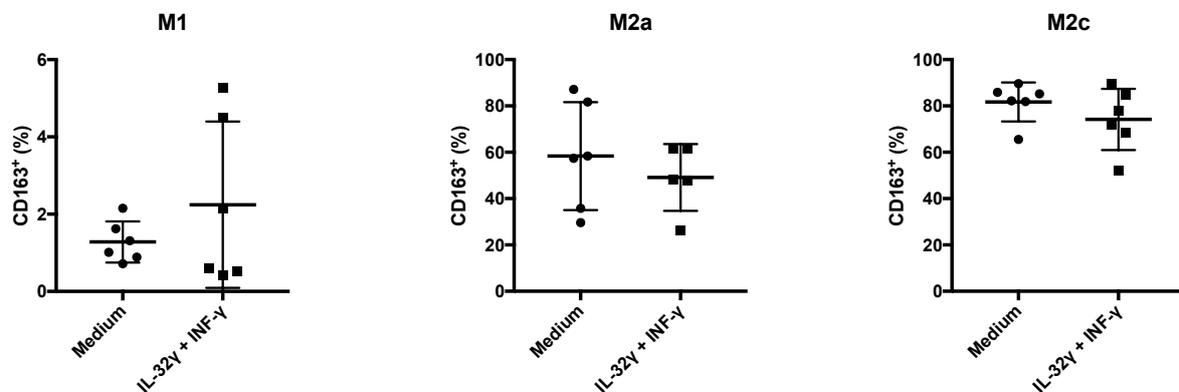


Abbildung 46: Regulation von CD163 in unterschiedlich polarisierten Populationen in Abhängigkeit vom aktivierenden Stimulus. Abgebildet ist der Anteil an CD163⁺-Zellen in Prozent aus M1 n=6; M2a n=6; M2c n=5 Versuchen.

M1- Makrophagen weisen im Vergleich mit M2-Makrophagen eine sehr geringe CD163-Expression auf (1,3 % M1 vs. 58% M2a bzw. 82% M2c).

M1-Makrophagen, welche mit IL-32 γ stimuliert wurden, exprimieren mehr CD163.

In beiden M2-polarisierten Makrophagen führt die Stimulation mit IL-32 γ zu einer verringerten CD163-Expression.

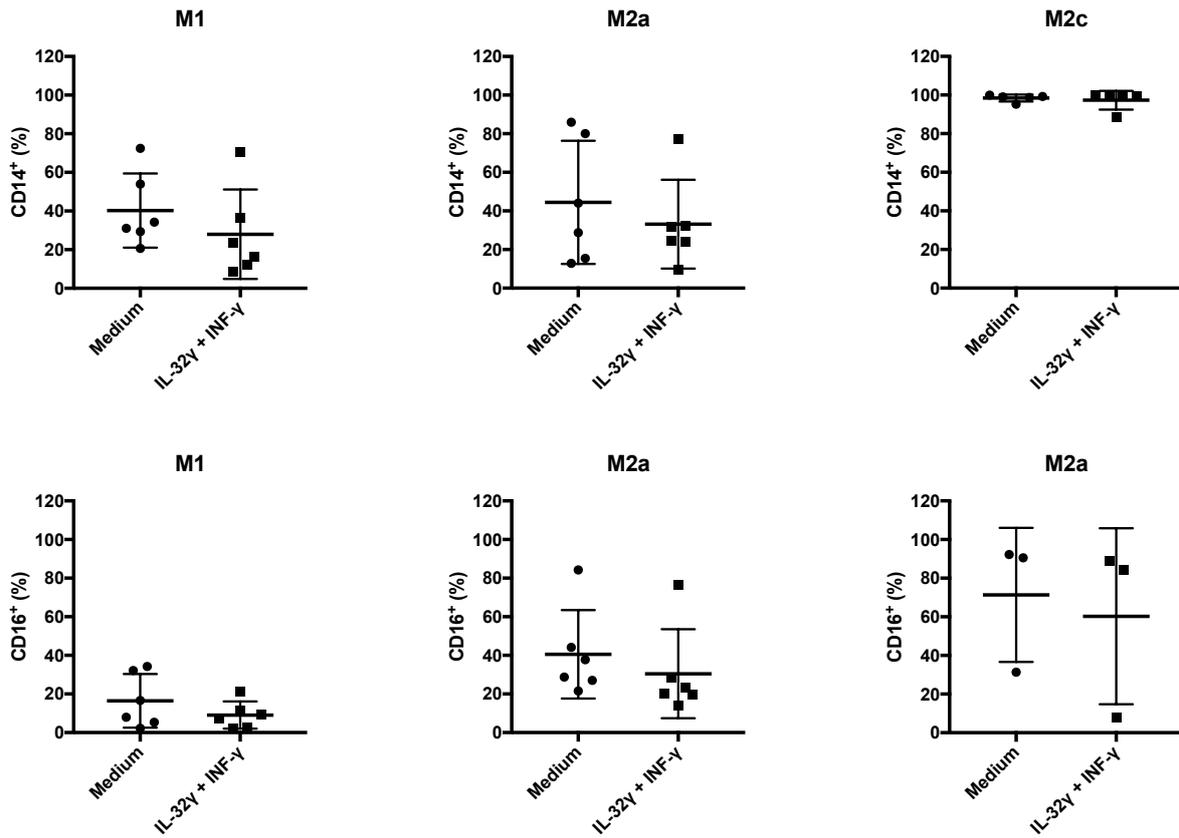


Abbildung 47: Regulation von CD14 und CD16 in unterschiedlich polarisierten Populationen in Abhängigkeit vom aktivierenden Stimulus. Abgebildet ist der Anteil an CD14⁺- bzw. CD16⁺-Zellen in Prozent aus Versuchsanzahl M1 n=6; M2a n=6; M2c n=5/3.

Im Vergleich mit der Standardgruppe führt eine Inkubation mit IL-32 γ zu einem geringeren Anteil CD14⁺ sowie CD16⁺-Makrophagen bei allen drei untersuchten Makrophagensubtypen.

3.4.1.2 CD83 und die Aktivierungsmarker CD80/CD86/HLA-DR

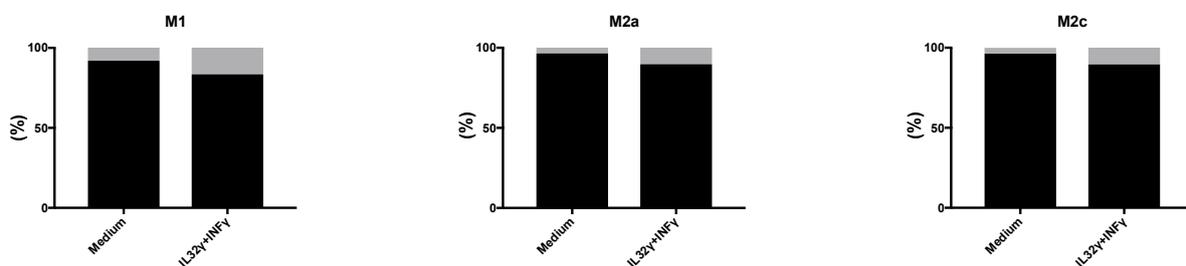


Abbildung 48: Anteil der unterschiedlich polarisierten Makrophagen in Abhängigkeit der aktivierenden Stimuli an CD83⁻ und CD83⁺-Zellen in Prozent. Der schwarze Balken stellt jeweils die CD83⁻-Population, der graue Balken jeweils die CD83⁺-Population dar. M1 n=5; M2a n=6; M2c: n=5 Versuche.

Der Anteil an CD83⁺-Zellen ist bei allen drei Makrophagensubtypen sehr gering und nimmt unter Stimulation mit IL-32 γ gering zu. Die Abbildung 49 veranschaulicht dies anhand eines Beispiels der FACs-Auswertung.

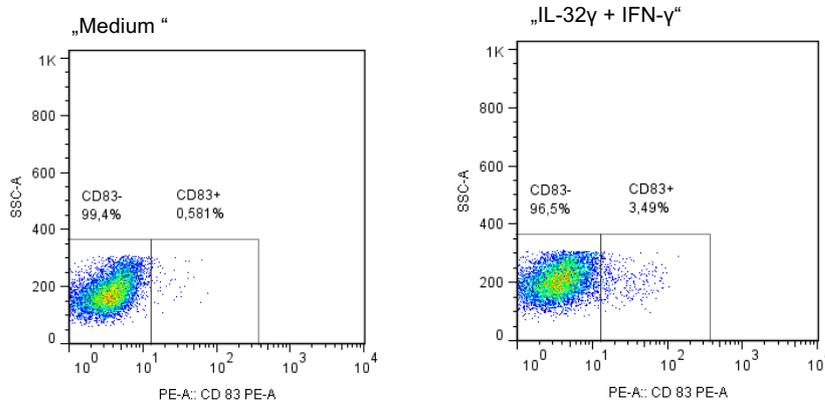


Abbildung 49 : Anteil an CD83⁺-Zellen der Standardgruppe sowie unter IL-32 γ + IFN- γ -Einfluss.

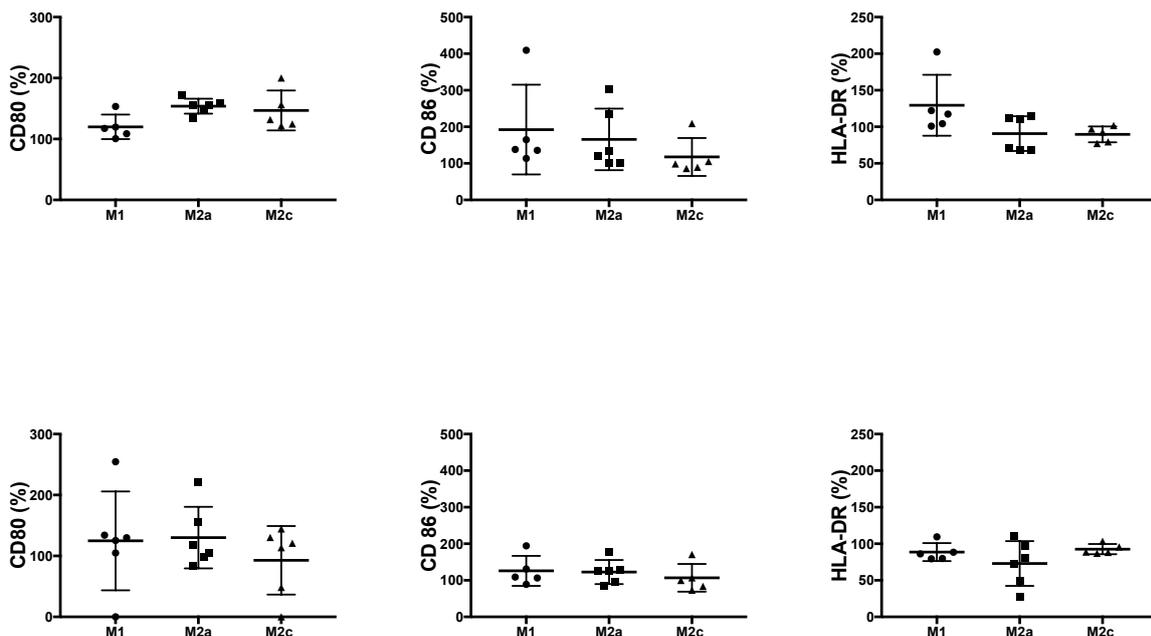


Abbildung 50: Regulation von CD80/CD86/HLA-DR in unterschiedlich polarisierten Populationen in Abhängigkeit vom aktivierenden Stimulus sowie ihrer CD83-Expression. Abgebildet sind die normalisierten MFIs in Prozent. Die obere Reihe zeigt die Ergebnisse für die CD83⁻-Population. Die untere Reihe für die CD83⁺-Population. M1 n=5; M2a n=6; M2c: n=5 Versuche.

IL-32 γ führt sowohl bei der CD83⁻-, als auch CD83⁺-Population, bei allen drei Makrophagensubtypen zu einer verstärkten Expression des Oberflächenmarkers CD80 im Vergleich zur Standardgruppe. Bei M2a-Makrophagen nimmt der Anteil an CD80-Expression unter IL-32 γ *versus* Medium am Stärksten zu.

Die CD83⁺-Zellen zeigen im Vergleich zu den CD 83⁻-Zellen eine deutlich höhere CD86-Expression (siehe Versuche mit Dasatinib Kapitel 3.1.1.1.2.). Der Aktivierungsmarker CD86 wird ebenfalls unter IL-32 γ -Einfluss *versus* Medium vermehrt von M1, M2a und M2c-Makrophagen exprimiert. Dies gilt für beide CD83-Populationen.

M1-Makrophagen zeigen bei der CD83⁻-Populationen eine Zunahme, bei der CD83⁺-Population eine Abnahme der Expression von HLA-DR. Die beiden M2-Makrophagen zeigen für beide CD83-Populationen eine Abnahme der HLA-DR-Expression.

3.4.1.3 CD206

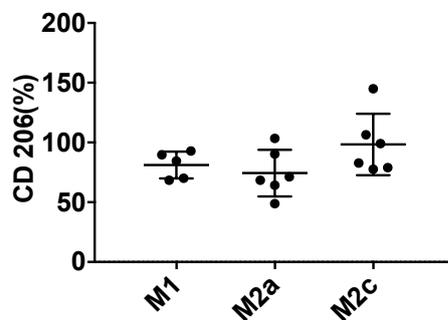


Abbildung 51: Regulation von CD206 in unterschiedlich polarisierten Populationen in Abhängigkeit vom aktivierenden Stimulus. Abgebildet sind die prozentualen Werte der normalisierten MFI-Werte mit einer Versuchszahl von M1 n=5; M2a und M2c n=6 Versuchen.

Die MFI-Werte der CD206-Expression unter IL-32 γ wurden anhand der MFI-Werte der Standardgruppe normalisiert. Die Werte der unterschiedlichen Subtypen sind deshalb nicht vergleichbar, sondern nur jede Gruppe einzeln für sich zu bewerten.

IL-32 γ führt bei M1 und M2a-Makrophagen zu einer verringerten CD206-Expression. M2c-Makrophagen weisen keine wesentliche Veränderung der CD206 Expression unter IL-32 γ *versus* „Medium“ auf.

3.4.2 IL-10 Produktion unter Einfluss von IL-32 γ

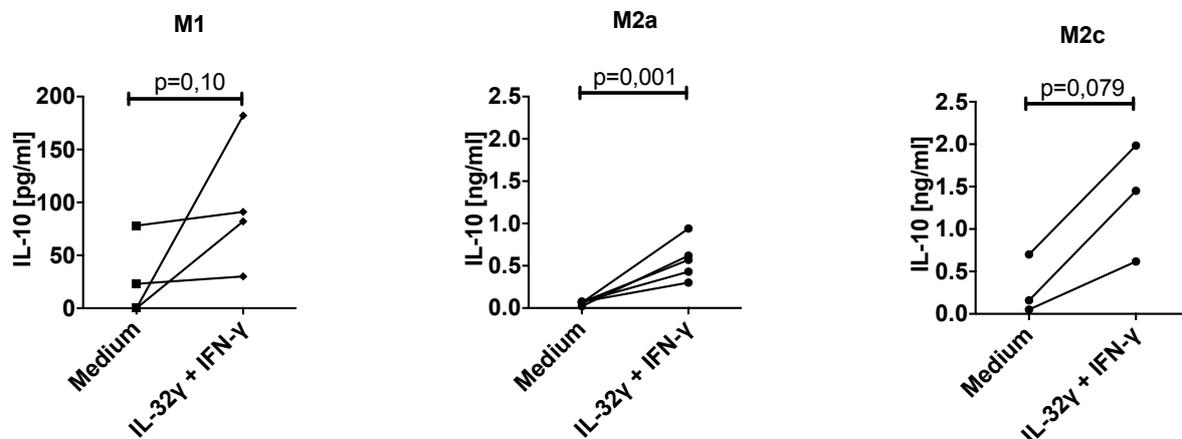


Abbildung 52: IL10-ELISA im Vergleich „Medium“ versus IL-32 γ + IFN- γ Kultivierung. Es deutet sich eine Tendenz zur Steigerung der IL-10-Produktion an. Die IL-10-Produktion der M1-Makrophagen ist in pg/ml, die von M2a und M2c in ng/ml angegeben. M1 n=4; M2a n=5 und M2c: n=3 Versuche.

Der durchgeführte ELISA zeigt eine Tendenz zur gesteigerten Produktion von IL-10 unter IL-32 γ -Stimulation. M1-Makrophagen produzieren im Vergleich zu den M2-Makrophagen deutlich weniger IL-10. Deshalb sind in den Graphen unterschiedlichen Einheiten gewählt –pg/ml versus ng/ml-. M2c-Makrophagen weisen in den durchgeführten Versuchen die höchste IL-10-Produktion unter IL-32 γ -Stimulation auf. Die IL-10-Zunahme der M2a-Makrophagen weist eine statistische Signifikanz von $p=0,001$ auf, im Mittel ist die IL-10-Produktion von $0,06 \pm 0,02$ ng/ml auf $0,58 \pm 0,24$ ng/ml gestiegen. IL-32 γ führt demnach bei allen drei Makrophagensubtypen zu einer vermehrten IL-10-Produktion.

3.4.3 NK-Zellen

3.4.3.1 Expression von Aktivierungsmarkern von NK-Zellen in Ko-Kultur mit Makrophagen und IL-32 γ

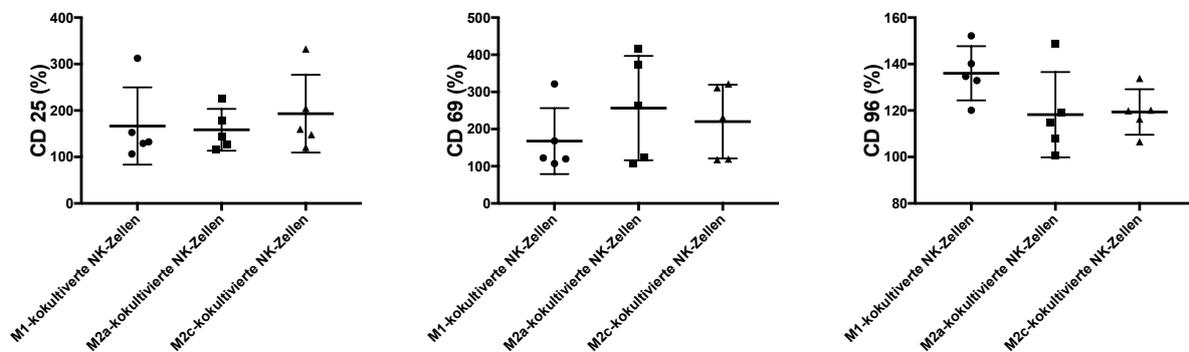


Abbildung 53: Regulation der Aktivierungsmarker von NK-Zellen in Ko-Kultur mit unterschiedlich polarisierten Populationen in Abhängigkeit vom aktivierenden Stimulus. Es gibt drei Subtypen: NK-Zellen im M1-Makrophagen-Milieu; NK-Zellen im M2a-Makrophagen-Milieu und NK-Zellen im M2c-Makrophagen-Milieu. Die Abbildungen zeigen die normalisierten MFIs in Bezug auf die Standardgruppe „Medium“. Alle Subtypen n=5 Versuche.

NK-Zellen exprimieren mehr CD25, CD 69 und CD96 bei gleichzeitiger Ko-Kultivierung mit Makrophagen und IL-32 γ .

Bei NK-Zellen im M2-Milieu ist die Steigerung der CD25-Expression unter IL-32 γ -Inkubation mit $p=0,044$ signifikant.

CD69 wird vor allem bei IL-32 γ -behandelten NK-Zellen im M2-Makrophagen-Milieu vermehrt exprimiert. Die statistische Auswertung ergibt für M2a $p=0,067$ und M2c $p=0,054$. Bei NK-Zellen im M1-Milieu ist die vermehrte Expression von CD96 mit $p=0,002$ und bei M2a mit $p=0,012$ statistisch signifikant.

IL-32 γ unterstützt demnach deutlich die Aktivierung von NK-Zellen.

3.4.3.2 Zytotoxizität von NK-Zellen in Ko-Kultur mit Makrophagen und IL-32 γ

Wie bereits beschrieben (Vgl. Kapitel 1.3.2.), wurde eine bekannte Unterteilung der NK-Zellen nach CD56^{bright} und CD56^{dim} vorgenommen.

In einer Versuchsreihe wurde die CD107a-Expression gemessen, wodurch eine Quantifizierung der Degranulation von NK-Zellen mithilfe der Durchflusszytometrie möglich ist.

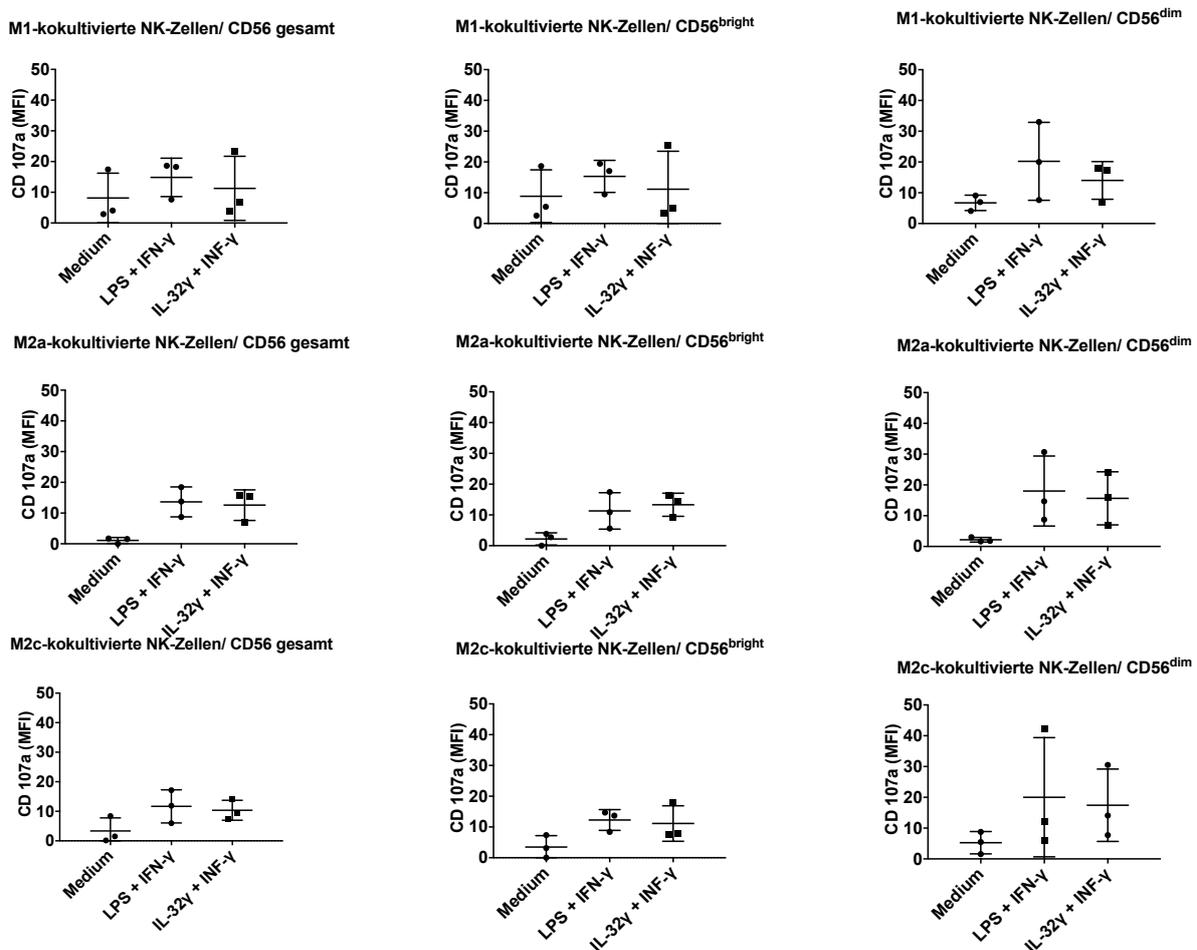


Abbildung 54: Degranelationsassay von NK-Zellen in Ko-Kultur mit unterschiedlich polarisierten Populationen in Abhängigkeit vom aktivierenden Stimulus anhand des Markers CD107a. Gezeigt sind die MFI-Werte, n=3 in allen Gruppen.

IL-32 γ führt bei allen untersuchten Untergruppen zu einer vermehrten Degranulation im Vergleich zur unbehandelten Standardgruppe.

Die oben dargestellten Grafiken mit MFI-Werten zeigen höhere Werte bei der CD56^{dim}-Population im Vergleich zu CD56^{bright}.

Bei NK-Zellen im M1-Milieu steigt die CD107a-Expression auf der Zelloberfläche von 8,14 („Medium“) auf 11,3 unter IL-32 γ . Bei den CD56^{bright} gateden NK-Zellen von 5 auf 8,43, hingegen bei CD56^{dim} von 10,6 auf 25,3.

Demnach kommt es bei CD56^{dim} NK-Zellen, unabhängig mit welchem Makrophagensubtyp eine Ko-Kultivierung stattgefunden hat, zur vermehrten Degranulation durch IL-32 γ im Vergleich zur unbehandelten Gruppe.

Vergleicht man allerdings die mit LPS + IFN- γ aktivierte Gruppe mit der IL-32 γ stimulierten Gruppe, zeigt sich - außer bei M2a CD56^{bright} – keine vermehrte CD107a-Expression. Die Degranulation von NK-Zellen ist demnach unter IL-32 γ zwar verstärkt, aber dem Effekt von einer Aktivierung mit LPS + IFN- γ größtenteils unterlegen.

4 Diskussion

4.1 Die Bedeutung von Tumor-assoziierten Makrophagen

Die Bedeutung von Tumor-assoziierten Makrophagen bei Tumorerkrankungen lässt sich in drei große Gruppen unterteilen: TAM als diagnostischer Marker, TAM als prognostischer Marker und als Drittes TAM als therapeutischer Angriffspunkt.

Makrophagen nehmen einen großen Anteil der Zellen des Tumorstromas ein, wo sie überwiegend antiinflammatorische Eigenschaften und Funktionen besitzen. Im Mikromilieu des Tumors finden sich hohe Konzentrationen an IL-10 und IL-4, was dazu führt, dass die TAM ein M2-ähnliches Profil annehmen. TAM fördern beispielsweise durch ihre sezernierten Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren die Tumorprogression durch Induktion der Angiogenese, Wundheilung und Förderung von Metastasen. (Vergleiche Kapitel 1.2.2.) (95)

Im Folgenden wird die Bedeutung der TAM als Target für neue Therapieansätze mit dem Ziel einer Beeinflussung des Tumor-Mikromilieus genauer erläutert.

Auf der einen Seite kann therapeutisch die Monozyten-Rekrutierung bzw. die Makrophagenanzahl vermindert bzw. verhindert werden. Beispielsweise führt das Chemotherapeutikum Trabectedin zur Apoptose von Makrophagen und dadurch zu einer verringerten Anzahl an TAM in der Tumorumgebung. (96)

Außerdem kann die Aktivierung der Makrophagen beeinflusst werden, indem zum Beispiel der CSF1/CSF-Rezeptor-Komplex gehemmt wird. (97, 98) Ein Inhibitor des Rezeptors stellt u.a. Dasatinib dar. (99)

Eine weitere Therapiestrategie ist die „Reprogrammierung“ von TAM zu antitumoralen Makrophagen, über die Yang et al. eine ausführliche Übersicht gibt. (97)

Beispielhaft werden einige der dort vorgestellten Optionen hier aufgeführt:

- Anti-CD40 führt zu einer gesteigerten Expression von Aktivierungsmarker (HLA-DR, CD86) auf Makrophagen, die wiederum eine Reaktion des adaptiven Immunsystems hervorrufen. (100)

- Vor allem NF- κ B und die STAT-Signalkaskaden sind für die Regulation der Transkription von TH₁-Zytokinen verantwortlich. (101, 102) Die Aktivierung des NF- κ B-Signalweges kann zu einem Wechsel von protumoralen Makrophagen in antitumorale Phänotypen führen. (103) Hier setzen ebenfalls TKIs an.
- STAT1 wird durch IFN- γ aktiviert und reguliert die Produktion von IL-12. Durch eine Aktivierung der STAT1-Signalkaskade wird eine M1-Polarisation gefördert. (104) (105)
 Durch Inhibition von STAT3 (WP1066) kommt es zu einer verstärkten Produktion proinflammatorischer Zytokine und Expression von antigenpräsentierender Oberflächenmolekülen. (100, 106) Es wird demnach eine Modulation von TAM in Richtung M1-Makrophagen bewirkt.
- DMSO und DMXAA (5,6- Dimethylxanthenone-4-acetic acid) inhibieren das Tumorwachstum, indem sie TAM in Richtung M1-Makrophagen modulieren. (101, 107)

4.1.1 Modulation der Oberflächenmarker durch Dasatinib/ Src-kinase-inhibitor- / Bosutinib

Die Frage, ob durch die Inkubation mit den drei verwendeten TKIs eine Repolarisierung von M2-Makrophagen in einen M1-ähnlichen-proinflammatorischen/anti-tumor-Makrophagentyp möglich ist, kann mit den hier durchgeführten Versuchen nicht eindeutig geklärt werden.

Die phänotypischen Veränderungen der Makrophagen unter Inkubation mit einem der drei verwendeten TKIs war in den hier durchgeführten Experimenten nicht so stabil und ausgeprägt, als dass von einer andauernden Modulation des Phänotyps durch einen einzelnen TKI ausgegangen werden könnte.

Eine wichtige Schlüsselstelle der Modulation von TAM nehmen der CSF1-Rezeptor und die dadurch ablaufende Signalkasakade ein. CSF1 - auch M-CSF genannt - reguliert die Differenzierung und Funktion von Makrophagen. (108) Durch Inhibition des CSF1-Rezeptors konnten Pyonteck et al, Zhu et. al und Rebelo et al (109-111) eine verminderte Expression von CD163 und CD206 auf TAM zeigen und interpretierten dies als Repolarisierung in Richtung M1-ähnliche-Makrophagen.

Außerdem zeigte Zhu et al. eine gesteigerte MHC-II-Expression auf den untersuchten Makrophagen nach einer Inkubation mit einem CSF1-Rezeptor-Inhibitor - in diesem Fall PLX3397 - ein dualer cFMS und c-kit-rezeptor-tyrosin-kinase-inhibitor. (110) Der hier verwendete TKI Dasatinib inhibiert den CSF1-Rezeptor ebenfalls. (99) Vergleichbar mit Pyonteck, Zhu und Rebelo konnten wir bei M2a-Makrophagen einen erniedrigten Anteil an CD163⁺-Makrophagen durch alle drei TKIs feststellen. (109-111) Für den Mannose-Rezeptor CD206 zeigten wir im Gegensatz zu Zhu und Pyonteck eine erhöhte Expression durch Inkubation mit den TKIs auf M2c-Makrophagen. (109-111) Die unterschiedlichen Ergebnisse können an unterschiedlichen Versuchsabläufen und -bedingungen wie z.B. murine vs. humane Zellen sowie den verschiedenen Inhibitoren – BLZ945/PLX3397 *versus* Dasatinib/Src-kinase-Inhibitor-I/Bosutinib liegen.

Zhu et al beschrieben außerdem eine gesteigerte MHCII-Expression durch Inhibition von CSF1. (110) Dies können wir hier für HLA-DR nur bei M2c-Makrophagen, welche mit dem Src-kinase-inhibitor-I inkubiert wurden, und M2a-Makrophagen unter Bosutinib-Einfluss beobachten. Eine geringe HLA-DR-Expression wurde in verschiedenen Tumoren mit einer Immunsuppression assoziiert. (112) Es wird zudem diskutiert, ob IL-10 zu einer verringerten HLA-DR-Expression im Tumormikromilieu führt. (112)

Neben den oben genannten Oberflächenmarker wurden in den hier durchgeführten Versuchen noch Weitere untersucht.

Bei CD86 konnten wir bei M2a-Makrophagen eine verstärkte Expression durch Inkubation mit den TKIs feststellen.

Buhtoiarov et al. beschreiben eine positive Korrelation zwischen einer erhöhten Expression von CD86 auf TAM und einer rückläufigen Tendenz des Tumorwachstums durch verstärkte IL-12-Produktion. (113) Demnach könnte diese Modulation in Richtung proinflammatorische/tumorbekämpfende M1-Makrophagen gewertet werden.

Makrophagen, welche hohe Mengen CD16 exprimieren, werden je nach Nomenklatur als alternative Makrophagen bezeichnet. (114) CD16 ist ein wichtiger Bestandteil der ADCC und für einige Tumore konnte eine positive Korrelation zwischen Prognose und Anteil an CD16⁺-Monozyten hergestellt werden. (115) In den hier gezeigten

Versuchen konnte eine Zunahme an CD16⁺-Makrophagen M1 und M2c-Makrophagen unter Dasatinib gemessen werden.

Dasatinib und Src-kinase-inhibitor-I führen bei M2c-Makrophagen zu einem erhöhten Anteil an CD14⁺-Zellen. CD14⁺-Makrophagen wird eine proinflammatorische Eigenschaft zugesprochen, sodass eine vermehrte CD14-Expression unter den TKIs eine Tendenz in Richtung M1-like-Makrophagen anzeigen könnte.

In der aktuellen Literatur lassen sich nur Ergebnisse über das Verhalten anderer Zellen unter Dasatinib oder von Makrophagen in Inkubation mit anderen Inhibitoren finden. Es ist anzumerken, dass die Makrophagenmodulation durch TKIs noch nicht endgültig verstanden wurde und aktuell noch weitergehend untersucht wird. Weitere *in vivo* Versuche sind notwendig.

Obgleich die Daten zu den Versuchen mit Aszites von Ovarial-Carcinom-Patientinnen hier nicht gezeigt werden, sollen sie nicht gänzlich unerwähnt bleiben.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Versuche mit TAM durchgeführt, welche aus Aszites von Ovarial-Carcinom-Patientinnen isoliert wurden. Der Aszites von Ovarial-Carcinomen eignet sich dafür sehr gut aufgrund der hohen Mengen an TAM. (116) Die Daten wurden hier nicht gezeigt, da diese Versuchsreihen noch genauere technische Ausreifungen benötigen. Die Anzahl der isolierten Zellen war wegen der vielseitigen Zusammensetzung des Aszites sehr unterschiedlich. Es ergaben sich große Differenzen in der Vitalität, welche die Aussagekraft stark einschränkten.

Des Weiteren können trotz unverändertem Phänotyp Zellen unter Dasatinib-Einfluss eine veränderte Funktionalität aufweisen, wie es Wölfl et al. für DC zeigten: CD80, CD83, CD86 und HLA-DR wiesen unter Dasatinib-Behandlung keine Veränderung der Expression auf, aber es kam zu einer vermehrten IL-12 Produktion der Dasatinib-inkubierten DCs. (64)

Als Konsequenz wurde deshalb auch für die Makrophagen die IL-12-Produktion unter TKIs gemessen, mit der Frage, ob ebenfalls eine Änderung der Funktionalität bei gleichbleibendem Phänotyp festgestellt werden kann.

4.1.2 IL-12 in der Tumorthherapie

Als ein proinflammatorisches Schlüsselzytokin des Immunsystems spielt IL-12 in Tumoren eine wichtige Rolle. Bereits 1994 beschrieben Brunda et al. anhand von diversen murinen Tumormodellen die potentielle Rolle von IL-12 in der Krebstherapie. (117)

Yue et al. zeigten *in vivo* am Beispiel vom murinen Lewis Lungencarcinom eine Hemmung des Tumorwachstums durch IL-12. (118)

Lasek et al. unterteilt die Therapie mit IL-12 in drei Gruppen: IL-12 als aktive nicht-spezifische Immuntherapie, IL-12 als Impfstoff und das Zytokin in der Gentherapie. (92)

Ursächlich für die teilweise eindrucklichen klinischen Erfolge von IL-12 ist u.a. die Hemmung der Angiogenese. IL-12 führt bei aktivierten NK-Zellen zu einer vermehrten Sekretion von IFN- γ , welches u.a. die Angiogenese hemmt. (118) Außerdem werden durch IL-12 das Wachstum und die Zytotoxizität von NK-Zellen stimuliert, die ADCC gegen Tumorzellen verstärkt, sowie eine Differenzierung zu CD4⁺-TH₁-Zellen gefördert und vermehrt IgG von B-Zellen produziert. (92)

In mehreren Tumorentitäten zeigte sich eine Regression des Tumors unter der Behandlung mit IL-12, beispielsweise fassten Lasek et al. die Erfolge bei Lymphompatienten zusammen. (92)

Vor allem bei Patienten mit einer verringerten oder defekten IL-12-Produktion erhofft man sich große Erfolge.

Leider konnten die präklinischen Erfolge der antitumoralen Wirkung von IL-12 noch nicht gänzlich auf die klinische Behandlung am Patienten übertragen werden. Patienten, welche mit IL-12 behandelt wurden, litten unter starken Nebenwirkungen, die im weiteren Sinne als ein Zytokin-Release Syndrom verstanden werden können.

Makrophagen und DC werden durch IL-12 zu einer antitumoralen Funktion angeregt und sorgen dadurch für eine Tumorregression. (119)

Eine mögliche Erklärung hierfür könnten die Ergebnisse von Walkins et al. sein. Sie zeigten *in vitro* und *in vivo*, dass sich TAM durch IL-12-Gabe in M1-Richtung verändern. Sie produzierten vermehrt proinflammatorische Zytokine wie beispielsweise IL-15, IL-18, und weniger antiinflammatorische Zytokine wie beispielsweise IL-10, TGF- β . (32) Um die Nebenwirkungen durch eine Therapie mit

exogenem IL-12 zu verringern, wäre stattdessen die Anregung der endogenen IL12-Produktion im Tumormikromilieu eine Option. Eine Möglichkeit, dies zu erreichen, wäre die Stimulation der IL12 Produktion von TAM durch die Gabe von TKI. Hierdurch käme es zu einer autologen Stimulation der Makrophagen im Tumormikromilieu durch das produzierte IL12 hin zu einem proinflammatorischen Phänotyp. In den hier durchgeführten Versuchen wurde die Veränderung der IL-12-Produktion unter TKI-Inkubation untersucht.

4.1.2.1 Zytokinproduktion von Makrophagen unter Einfluss von TKIs

IL12

Die Expression des proinflammatorischen Interleukins 12 wird sowohl durch den LPS-TLR-4-Komplex als auch direkten Zell-Zell-Kontakt mit anderen Immunzellen (z.B. CD40L-CD40) induziert. (92) Eine Erhöhung der TLR-4 vermittelten IL-12-Produktion durch Dasatinib bestätigte sich in den hier durchgeführten Versuchen für Makrophagen. Vorarbeiten der Arbeitsgruppe zeigten dies bereits für DC. (64) Wie von Wölfel et al. beschrieben, setzt Dasatinib bzw. die SFK wahrscheinlich an negativen Kontrollpunkten des NF- κ B-Signalweges an. Die Signalkaskade wird dadurch verstärkt aktiviert und es kommt zu einer gesteigerten IL-12-Produktion. (64)

Die anderen beiden untersuchten Tyrosinkinaseinhibitoren Src-kinase-inhibitor-I und Bosutinib führten im Vergleich zur nur mit LPS +IFN- γ -stimulierten Gruppe ebenso zu einer Verstärkung der IL-12- Ausschüttung. Man kann demnach von einem Klasseneffekt und keinem Monosubstanzeffekt sprechen.

Edwards et al. sowie Sprinzl et al. zeigten eine vermehrte IL-12-Produktion von Makrophagen durch die Behandlung mit dem TKI Sorafenib. (120) (121)

Sorafenib, ein Multi-Tyrosinkinaserzeptor-Inhibitor, aktiviert den NF- κ B-Signalweg, welcher die Zytokin-Produktion fördert und dadurch TAM in Richtung M1-Makrophagen polarisiert. Sorafenib inhibiert neben diverse Tyrosinkinasen wie beispielsweise VEGFR auch die Raf-Signalkaskade und den STAT3-Signalweg. Das Wirkungsspektrum unterscheidet sich teilweise von den hier untersuchten TKIs.

Die Behandlung mit Dasatinib bzw. anderen TKIs, die zu einer durch Makrophagen erhöhten IL-12-Produktion führt, kann demnach eine Modulation der TAM bewirken. Da IL-12 sowohl NK-Zellen als auch T-Zellen aktiviert, führt im Umkehrschluss eine erhöhte IL-12-Produktion von Makrophagen zu einer vermehrten Aktivierung der beiden Zelltypen. (122) In den hier durchgeführten Experimenten konnte eine vermehrte Aktivierung nicht im Sinne einer vermehrten Expression von bestimmten Aktivierungsmarkern, sondern nur im Rahmen einer vermehrten Zytotoxizität gezeigt werden. (Vergleiche 4.1.4)

IL-10

IL-10, ein antiinflammatorisches Zytokin, hemmt hingegen eine antitumorale Immunantwort. Passend hierzu inhibiert IL-10 die Expression von IL-12 sowohl in DCs als auch Makrophagen und reduziert dadurch die Aktivierung von Immunzellen wie z.B. CD8⁺ T-Zellen. (123) In den durchgeführten Versuchen ließ sich eine erhöhte Produktion von IL-10 seitens der TAM bestätigen.

Durch Dasatinib-Inkubation konnte – neben der gesteigerten IL12 Produktion- auch eine verminderte IL-10-Produktion beobachtet werden. Ein wichtiges Ergebnis, da hierdurch die IL-12/IL-10-Ratio nochmals zusätzlich zugunsten einer proinflammatorischen Antwort verschoben wird.

Durch Wegfallen dieser negativen Beeinflussung durch IL-10 wird eine antitumorale Immunreaktion möglich und gefördert.

Bei den anderen beiden TKIs lagen letztlich zu wenige Versuche um eine genaue Aussage treffen zu können, obwohl der Src-kinase-inhibitor ebenfalls eine Tendenz zur verringerten IL-10-Produktion zeigt.

Eine verringerte IL-10-Produktion durch eine Anti-IL-10 Antikörper-Therapie in Kombination mit Chemotherapie erhöht das Ansprechen auf die Chemotherapie erheblich. (123) Ruffel et al. zeigten dies *in vivo* bei murinen Mammacarcinomen.

Hu et al. zeigten in murinen Makrophagen und DC, dass die TLR-induzierte IL-10-Produktion von src- und akt-Signalwegen abhängig ist und durch deren z.B. durch Dasatinib die IL-10-Produktion gehemmt wird. (124) Ebenso ließ sich eine verringerte IL-10-Produktion durch den TKI Sorafenib nachweisen. (120) Im Gegensatz dazu

beschreiben Ozanne et al. eine dosisabhängig erhöhte IL-10-Produktion und verringerte IL-12-Produktion von murinen Makrophagen durch Dasatinib und Bosutinib. (125) Ozanne et al. zeigten diesen Effekt anhand von Makrophagen aus dem Knochenmark von Mäusen und bestimmten die Zytokin-Produktion.

Ebenso zeigte Fraser et al. eine Zunahme der IL-10-Produktion im Serum *in vivo* in Mäusen durch Dasatinib-Behandlung. (126)

Van Dogen et al. konnte *in vitro* eine erhöhte IL-10-Produktion von humanen M1-Makrophagen durch Imatinib und Sunitinib-Behandlung zeigen. (127) Die hohe IL-12-Produktion der M1-Makrophagen blieb davon unberührt.

Diese widersprüchlichen Ergebnisse könnten auf die unterschiedlichen Abstammungen der Zellen -human *versus* murin- sowie unterschiedlicher Stimuli beruhen. Des Weiteren stellt die hohe Plastizität von Makrophagen eine Schwierigkeit beim Vergleich verschiedener Studien dar. (128)

Aufgrund der zahlreichen Src-Kinasen ist unklar, wie sich Verteilung und Bindungsverhalten zwischen den Spezies unterscheiden.

Dasatinib inhibiert neben den Src-Kinasen noch viele weitere Kinasen, welchen wichtige Rollen in komplexen Zellvorgängen zukommen.

Im Falle der Ergebnisse von Ozanne et al. wird die antiinflammatorische Wirkung der beiden TKIs durch die Hemmung von salt-induced-Kinasen gezeigt. Es handelt sich demnach um eine andere Wirkung von Dasatinib und Bosutinib durch unterschiedliche Angriffspunkte. (125)

Diese gegensätzlichen Daten unterstreichen die Vielfalt der TKIs in deren immunmodulatorischer Wirkung. Die Komplexität der diversen Angriffspunkte von TKIs mit ihren Wirkungen und Nebenwirkungen stellt die Übertragung der Erfolge auf die klinische Therapie vor große Aufgaben.

4.1.3 Aktivierung und Zytotoxizität von NK-Zellen im Makrophagen-Milieu und Dasatinib-Inkubation

Die verschiedenen Zellen des Immunsystems interagieren stark miteinander und so beeinflussen TAM auch die Aktivität und Zytotoxizität von NK-Zellen. TAM, in ihren den M2-Makrophagen ähnlichen Funktionen, haben vor allem einen immunsupprimierenden Effekt auf NK-Zellen. Krneta et al. zeigten, dass M2-Makrophagen sowie TAM die NK-Zell-Aktivierung und Zytotoxizität vor allem durch das von ihnen sezernierte TGF- β inhibieren. (129) Außerdem wird durch die Ko-Kultivierung mit M2/TAM der Phänotyp der NK-Zellen verändert. Das Tumormikromilieu, vor allem TAM, moduliert demnach die NK-Zellfunktion. Die Interaktion zwischen NK-Zellen und Makrophagen eröffnet neue therapeutische Möglichkeiten.

Aktivierungsmarker von NK-Zellen unter Ko-Kultivierung mit Dasatinib-behandelten Makrophagen

Erwartungsgemäß führte eine Ko-Kultivierung in unseren Versuchen von Makrophagen und LPS + IFN- γ -Stimulation zu einer verstärkten Aktivierung der NK-Zellen. (130)

Durch Ko-Kultivierung der NK-Zellen mit Makrophagen und Dasatinib im Vergleich mit LPS + IFN- γ konnte keine signifikant verstärkte Aktivierung der NK-Zellen festgestellt werden.

Im Gegenteil: tendenziell war der Aktivierungsgrad der NK-Zellen unter Dasatinib geringer. Diese geringere Aktivierung kann durch die Anwesenheit von Dasatinib während der Inkubation erklärt werden, da Dasatinib die Aktivierung von NK-Zellen inhibiert. In den hier durchgeführten Experimenten wurden Makrophagen und NK-Zellen in Ko-Kultur gebracht und gemeinsam mit Dasatinib inkubiert.

Eine Inhibition der NK-Zell-Funktion konnte ebenfalls von Hassold et al. beobachtet werden, wenn Dasatinib während der Messung gegenwärtig war. (70) Erst durch die fehlende Präsenz von Dasatinib während der Messungen konnten stimulierende Effekte des TKIs gezeigt werden.

Eine weitere Erklärung für die nicht-verstärkte Expression der Aktivierungsmarker unter Dasatinib könnte sein, dass die CD25 und CD69-Regulation nicht von IL-12-abhängig ist. (130) Bereits 1992 beschrieben Miller et al., dass vor allem der direkte Zell-Zell-Kontakt von Makrophagen und NK-Zellen zu einer Aktivierung der NK-Zellen führt. (131) In den hier gezeigten Versuchen lag ein direkter Zell-Zell-Kontakt für nur 20 Stunden vor, im Gegensatz zu einer 18-tägigen Ko-Kultur von Miller. (131)

Bei NK-Zellen, die mit M1-Makrophagen ko-kultiviert wurden, führte Dasatinib zu einer Abnahme der CD96-Expression.

CD96 ist in seiner Funktion noch nicht gänzlich verstanden, aktiviert aber in humanen Modellen die NK-Zellen und fördert Zell-Zell-Kontakte. (132)

Chan et al. beobachteten bei Mäusen, die kein CD96-exprimieren eine hyperinflammatorische Reaktion auf LPS, sowie eine Resistenz gegen Tumoren und Metastasen. (50) Blake et al. zeigten ebenfalls, dass Mäuse, die weniger bis kein CD96 exprimieren, resistent gegen Lungenmetastasen sind. (133) Diese beiden Feststellungen sowie die hier gemessenen erniedrigten CD96-Werte könnten ein Hinweis darauf sein, dass NK-Zellen mit einer geringeren CD96-Expression gegebenenfalls antitumorale Funktionen besitzen.

Zytotoxizität unter Inkubation mit Dasatinib von NK-Zellen im Makrophagen-Milieu

Gottschalk et al. zeigten anhand eines CD107a-Assays, dass die Ko-Kultivierung von Makrophagen mit NK-Zellen zu einer erhöhten Zytotoxizität führen. (134) Diese Ergebnisse waren die Grundlage der vorgenommenen Modulation mit TKIs.

In den hier gezeigten Versuchen zeigen NK-Zellen in Kultur mit Makrophagen und unter Dasatinib+ LPS + IFN- γ -Einfluss im Vergleich zur alleinigen LPS + IFN- γ -Stimulation nochmals eine verstärkte Degranulation von zytotoxisch wirksamen Substanzen (beispielsweise Granzyme).

Die Ko-Kultur von NK-Zellen und Makrophagen wurde in den durchgeführten Versuchen für 24 Stunden mit Dasatinib+ LPS + IFN- γ inkubiert. Eine gemeinsame Ko-Kultur und gleichzeitige Inkubation wurden gewählt um das jeweilige Makrophagen-Milieu optimal vorliegen zu haben. Dasatinib konnte somit sowohl auf die NK-Zellen direkt als auch auf die Makrophagen und dadurch indirekt auf NK-Zellen wirken.

Die in der Literatur beschriebene erhöhte Zytotoxizität von CD56^{dim}-NK-Zellen konnte hier bestätigt werden. (43, 44)

Es ist bekannt, dass IL-12 bei NK-Zellen zu einer erhöhten Zytotoxizität führt. (122) Trinchieri fasste bereits 1994 den positiven Einfluss von IL-12 auf die Zytotoxizität von NK-Zellen zusammen. (135)

Außerdem werden NK-Zellen durch hohe Mengen IL-12 zur Sekretion von IFN- γ stimuliert, welches wiederum sowohl das angeborene als auch erworbene Immunsystem aktiviert.

Nicht nur das durch Makrophagen sezernierte IL-12 stimuliert NK-Zellen, sondern auch Dasatinib selbst kann die Zytotoxizität der NK-Zellen beeinflussen.

Beispielsweise beschrieben Hassold et al. den Zusammenhang der Präsenz von Dasatinib im Assay und dessen Wirkung auf die NK-Zellen. Sie konnten eine Steigerung der NK-Zell-Degranulation nach Dasatinib -Vorbehandlung zeigen. (70)

Diese Ergebnisse decken sich mit dem hier Gezeigten, da in beiden Assays Dasatinib vor der Messung ausgewaschen wurde.

Die Steigerung der Zytotoxizität durch Dasatinib wurde durch Mustjoki et al. in einem *in vivo* Experiment bestätigt. (136) Die hier gezeigte Steigerung der Zytotoxizität wird demnach am ehesten als Effekt von Dasatinib gewertet.

Im gleichen Experiment fanden Mustjoki et al. heraus, dass Dasatinib zu einer Lymphozytenmobilisierung führt, welche u.a. eine Erklärung für Nebenwirkungen wie beispielsweise Pleuragüsse sein könnten. Auch in den hier durchgeführten Versuchen wurde eine (signifikante) Steigerung der NK-Zellzahl unter Dasatinib-Inkubation registriert (Ergebnisse nicht gezeigt). Eine erhöhte NK-Zellzahl wiesen auch Uchiyama et al. auf, welche mit einer besseren Prognose durch gesteigerte Zytotoxizität einhergeht. (68) Uchiyama et al. fasste die bereits publizierten Daten bei unterschiedlichen Zellidentitäten, sowie verschiedene Versuchsaufbauten inklusive ihrer gegensätzlichen Ergebnisse zusammen. (68) Blake et al. beschrieben eine Hemmung durch Dasatinib der Proliferation, Zytokinproduktion von T-Zellen, sowie ihrer Aktivierung *in vitro* (137), was Schadeet et al. bei einem *in vivo* Versuch bestätigen konnte. (138) Blake et al. zeigten eine dosisabhängige und reversible Reduktion der Zytotoxizität von NK-Zellen durch Dasatinib. (67) Im Gegensatz dazu berichteten Kim et al. eine erhöhte Zytotoxizität bei Patienten mit Dasatinib-bedingter Leukozytose. (139) Die Ergebnisse von Kreutzman et al. beschreiben eine erhöhte

Aktivität und Zytotoxizität von NK-Zellen durch Dasatinib sowohl im Rahmen einer verstärkten Immunantwort als auch durch eine direkte Inhibition von bcr-abl. (140)

Diese teils unterschiedlichen Ergebnisse erklärten Uchiyama et al. mit verschiedenen experimentellen Bedingungen, angefangen bei unterschiedlichen Ausgangszellen *in vitro* vs. *in vivo*, gesunder vs. kranker Spender und Konzentrationen und Expositionsdauer der verwendeten TKIs.

4.2 IL-32 γ

IL-32 γ ist ein seit 2005 bekanntes Zytokin, dem eine proinflammatorische Eigenschaft zugeschrieben wird. (Vergleiche 1.5.1)

Die bisher bekannten Wirkungen des Zytokins sind vielfältig:

IL-32 hat Einfluss auf die Zelldifferenzierung sowie Apoptose und stimuliert die Sekretion vor allem von proinflammatorischen Zytokinen. (86)

Wir haben uns mit den Auswirkungen durch Stimulation mit IL-32 γ auf die Modulation der verschiedenen Makrophagensubtypen beschäftigt. Außerdem haben wir die Zytokinproduktion von IL-10 unter IL-32 γ -Einfluss sowie die NK-Zell-Aktivierung und Zytotoxizität untersucht.

4.2.1 Phänotyp von TAM unter IL-32 γ -Einfluss

Ohmatsu et al. zeigen, dass sich aus CD14⁺ Monozyten unter IL-32 γ -Stimulation CD68⁺ CD163⁺-Makrophagen entwickeln. (141) In unseren Versuchen konnte eine Zunahme der CD163⁺-Makrophagen nur für die M1-Subpopulation durch IL-32 γ *versus* der Standardgruppe beobachtet werden. Die beiden M2-Makrophagensubpopulationen zeigen unter IL-32 γ -Einfluss im Vergleich mit der Standardgruppe einen geringeren Anteil CD163⁺-Zellen auf. Da CD163 als Marker für M2-Makrophagen beschrieben wird, kann eine Reduktion der Expression dieses Markers als eine Modulation in Richtung M1-Makrophagen bzw. eine geringere Aktivierung der M2-Makrophagen gedeutet werden.

Osman et al. und Netea et al. (83, 142) beschreiben eine gesteigerte CD14-Expression durch IL-32 γ . Bei unseren durchgeführten Versuchen lässt sich keine

gesteigerte Expression, sondern eine Abnahme des LPS-Co-Rezeptors bei allen drei Makrophagenpopulationen feststellen.

Die Aktivierungsmarker (CD80 und CD86) wurden unter IL-32 γ -Stimulation im Vergleich zur Standardgruppe bei beiden CD83-Populationen vermehrt exprimiert. Osman et al. zeigten ebenso eine erhöhte Expression von CD80 unter IL-32 γ Einfluss bei M-CSF-Makrophagen. (84) Bei CD86 sind die Ergebnisse gegensätzlich zu Osman et al., welcher eine geringere Expression dieses Oberflächenmoleküls auf Makrophagen unter IL-32 γ vermerkte.

Die insgesamt erhöhte Präsentation der Aktivierungsmarker sprechen allesamt dafür, dass IL-32 γ bei den Makrophagen zu einer effektiveren Antigenpräsentation führt.

Anhand der Betrachtung des Einflusses von IL-32 γ auf die untersuchten Oberflächenmarker der Makrophagen lässt sich noch keine eindeutige Tendenz feststellen. Es lässt sich jedoch erkennen, dass IL-32 γ im Vergleich zur Standardgruppe zu einer effektiveren Antigenpräsentation durch Hochregulation der untersuchten Aktivierungsmarker - CD80 und CD86 - führt. Die verringerte Expression von CD16 unter IL-32 γ könnte mit einer geringeren Phagozytoserate einhergehen.

4.2.2 IL-10-Produktion unter IL-32 γ

Im Vergleich zur Standardgruppe führte die Inkubation mit IL-32 γ zu einer vermehrten IL-10-Produktion bei allen drei Populationen M1, M2a und M2c. Bei M2a zeigte sich ein signifikanter Anstieg mit $p=0,01$.

Ohmatsu et al. zeigten einen Zusammenhang zwischen erhöhter IL-10-Produktion in Tumorzellen (mykosis fungoides) und IL-32 β sowie IL32 γ . IL-32 stellt einen potentiellen Regulator der IL-10-Produktion dar. Die vermehrte IL-10-Produktion könnte Ausdruck einer Homöostase zwischen pro-und antiinflammatorischen Zytokinen sein. (143)

Ein weiterer Punkt für die gesteigerte IL-10-Produktion könnte die Modulation von IL-32 γ zu CD163⁺-Makrophagen sein. CD163 wird vor allem auf M2a-Markophagen exprimiert, welche wiederum erhöhte IL-10-Produktion verzeichnen. (142)

Bislang liegen keine Daten über die Interaktion von IL-32 γ und IL-10 vor. Nur bei IL-32 β konnte eine verringerte IL-10-Produktion gezeigt werden. (144, 145)

4.2.3 Aktivierung und Zytotoxizität von NK-Zellen in Makrophagen-Ko-Kultur und IL-32 γ

Unabhängig mit welchem Makrophagensubtyp alle NK-Zellen aktiviert wurden, zeigen sie eine erhöhte Expression der untersuchten Aktivierungsmarker CD25, CD69 und CD96 bei gleichzeitiger Inkubation mit IL-32 γ . Einerseits könnte IL-32 γ die NK-Zellen direkt aktivieren. Andererseits werden Makrophagen durch IL-32 γ -Stimulation vermehrt aktiviert und sezernieren daraufhin vermehrt Zytokine, die NK-Zellen aktivieren. Außerdem inhibiert IL-10 das Zytokin TGF- β , welches NK-Zellen hemmt. (146) Die prozentual veränderte Expression der gemessenen Aktivitätsmarker gleicht unter IL-32 γ -Stimulation der Selbigen unter LPS + IFN- γ -Zugabe.

NK-Zellen in Ko-Kultur Makrophagen zeigten unter IL-32 γ -Inkubation durchgehend eine erhöhte Präsentation des Degranulationsmarkers CD107a auf der Oberfläche der NK-Zellen.

Park et al. zeigten, dass IL-32 γ die Zytotoxizität von NK-Zellen erhöht; allerdings nicht aufgrund erhöhter Degranulation, sondern durch Aktivierung des Caspase-3-Weges und des Death receptor/Ligand Signalweges. (147)

Eine Erklärung für die vermehrte Zytotoxizität in unserem Versuch könnte eine verstärkte Aktivierung der Makrophagen durch IL-32 γ -Stimulation sein. Die Makrophagen wiederum sezernieren daraufhin vermehrte Zytokine (beispielsweise IL-2, IL-12, IL-18 etc.), welche NK-Zellen aktivieren und zur vermehrte Degranulation anregen.

Es liegen jedoch auch Daten vor, die beschreiben, dass IL-10 NK-Zellen zu einer vermehrten Zytotoxizität anregt. Einerseits besitzen NK-Zellen einen eigenen IL-10-Rezeptor (146, 148), andererseits werden durch IL-10 MHC-I-Moleküle auf Zellen herunterreguliert, wodurch NK-Zellen vermehrt aktiviert werden und diese Zellen lysieren. (148)

Einschränkend muss allerdings auch diskutiert werden, inwieweit die beobachteten Effekte Wirkung des IL-32 γ -Signalings sind, oder ob zusätzliche Effekte durch Unreinheiten in der Proteinpräparation des Herstellers erklärt werden können.

Der Endotoxingehalt in der IL-32 γ -Präparation wird laut Hersteller mit <1,0 EU per 1 μ g Protein nach der LAL (Limulus-Amöbozyten-Lysat) -Methode angegeben und wäre

somit an sich unbedenklich. Allerdings weisen vorläufige Ergebnisse der Arbeitsgruppe darauf hin, dass zumindest für dendritische Zellen möglicherweise eine Koaktivierung durch kontaminierendes Endotoxin/LPS denkbar ist.

5 Zusammenfassung

Die Tumormikroumgebung spielt wichtige Rollen in Bezug auf das Ansprechen von Therapien, Tumorwachstum und die Bildung von Metastasen.

In den letzten Jahren konnte belegt werden, dass TKIs Einfluss auf Zellen des TME haben und man vor allem die dort vorherrschenden Zellen TAM durch die TKIs moduliert werden können. Sie entsprechen meist dem M2-Phänotyp, sezernieren antiinflammatorische Zytokine und sind protumoral, indem sie u.a. die Metastasierung und das Tumorwachstum unterstützen.

Zentrale Targets für die Reprogrammierung von Makrophagen stellen sowohl der NF- κ B als auch die Inhibition des CSF1-Rezeptors dar. An diesen beiden Schlüsselstellen wirken u.a. TKIs.

In den durchgeführten Versuchen wurden drei TKIs verwendet Dasatinib/Src-Kinase-Inhibitor-I/Bosutinib, um die Ergebnisse von Vorarbeiten zu verifizieren und um zu untersuchen, ob ein Klasseneffekt vorliegen könnte.

Ein wichtiger Ansatzpunkt in der Bekämpfung von Tumoren, ist die Aktivierung von Immunzellen gegen Tumorzellen, in unserem Fall eine Modulation von TAM in Richtung M1-Makrophagen. Eine signifikante Änderung des Phänotypes konnte nicht festgestellt werden. Allerdings wurde eine gesteigerte IL-12-Produktion aller Makrophagensubtypen durch die Inkubation mit Dasatinib- bzw. Src-kinase-inhibitor-I/Bosutinib gezeigt.

IL-12 ist ein wichtiges proinflammatorisches Schlüsselzytokin des Immunsystems, indem es u.a. NK-Zellen und T-Zellen aktiviert. Die funktionellen Auswirkungen der verstärkten IL-12-Produktion in Hinblick auf NK-Zellen haben wir untersucht. Eine deutlich verstärkte Aktivierung anhand Aktivierungsmarker von NK-Zellen konnten wir nicht beweisen. Allerdings wurde eine erhöhte Zytotoxizität durch Ko-Kultivierung der NK-Zellen mit den unterschiedlichen Makrophagensubtypen und gleichzeitiger Inkubation mit Dasatinib demonstriert. Der Einfluss von Dasatinib auf die Zytotoxizität ist vielseitig und teils auch konträr beschrieben. Es hat sich gezeigt, dass die Anwesenheit von Dasatinib sowie dessen Konzentration und Inkubationszeit auf die Funktionalität große Auswirkungen hat.

Die erhöhte IL-12-Produktion von APCs sowie verringerte IL-10-Produktion und der Einfluss auf andere Immunzellen hier am Beispiel der NK-Zellen zeigen u.a. das therapeutische Potential der Tyrosinkinaseinhibitoren als antineoplastisch wirksames Zytostatikum.

Als alleinige Therapie ist deren Wirkungsbereich nach den hier vorliegenden Ergebnissen jedoch noch zu gering. In Kombination mit anderen Therapieoptionen stellen die TKIs allerdings ein mögliches Therapieregime dar. Der genaue Wirkmechanismus und die dadurch entstehenden Veränderungen sind noch genauer zu untersuchen. Ein weiteres Ziel ist *in vitro* etablierte Ergebnisse auch in die klinische Anwendung einfließen zu lassen. Ein Beispiel hierfür ist die klinische Anwendung von Dasatinib in einem multimodalem Therapiekonzept stellt das RIST-Protokoll von Prof. Dr. med. Corbacioglu (Universitätsklinikum Regensburg), das bei Pineoblastom oder Neuroblastom zur Anwendung kommt. Darin wird **Rapamune** (Sirolimus), Irinotecan, **Sprycel** (Dasatinib) und **Temodal** (Temozolamid) metronomisch im Wechsel verabreicht.

Der zweite Teil der Arbeit befasste sich mit einem proinflammatorischen Zytokin IL-32 γ und dessen Wirkung auf Makrophagen. Wie bereits auch bei den TKIs wurde der Einfluss des Interleukins auf das Tumormikromilieu und dessen Auswirkungen untersucht.

Es gibt Studien, die eine Hemmung des Krebswachstums unter IL-32 γ durch Inhibition der NF- κ B und STAT3-Signalwege beschreiben. (149) Auf der anderen Seite demonstrieren Wang et al. einen stärkeren Wachstum von Brustkrebszellen und Metastasierung vom Colorektalen Karzinom durch IL-32 γ . (150) (151) Yan et al. fassten die unterschiedlichen IL-32-Expressionen und deren Prognosen in verschiedenen Tumoridentitäten zusammen. (152) Hierbei wurde teilweise nicht in die diversen Isoformen von IL-32 differenziert. Neben der Onkologie rückt IL-32 auch in den Bereichen der Autoimmunerkrankungen, Viruserkrankungen und Allergologie in den Fokus des Interesses der Forschung. (153-155)

IL-32 γ wirkt nicht nur selbst als proinflammatorischen Zytokin, sondern reguliert eine Vielzahl an weiteren Zytokinen. Der Einfluss von IL-32 auf das Tumormikromilieu und dessen Zellen stellt einen der zentralen Interessenspunkte dar. In unseren Versuchen konnte unter IL-32 γ eine effektivere Antigenpräsentation der Makrophagen - gemessen an einer verstärkten Expression von CD80 und CD86- gezeigt werden. Auf

der anderen Seite wurde das antiinflammatorische Zytokin, IL-10, von IL-32 γ -stimulierten Makrophagen ebenfalls verstärkt sezerniert.

Eine Ko-Kultivierung von Makrophagen und NK-Zellen und gleichzeitige Inkubation mit IL-32 γ führte bei NK-Zellen zu einer verstärkten Aktivierung sowie zu einer erhöhten Zytotoxizität. Die Auswirkungen auf NK-Zellen deuten eine antitumorale Wirkung von IL-32 γ an.

Die bereits kontrovers beschriebenen Wirkungen von IL-32 können einerseits auf die verschiedenen Isoformen, andererseits auf die verschiedenen Tumoridentitäten zurückzuführen sein. Das breite Wirkspektrum des Interleukins ist vielversprechend und könnte neue Therapiestrategien eröffnen, wofür allerdings weitere Versuche sowohl *in vitro* als auch *in vivo* notwendig sind, um das Interleukin und seine Wirkungen genauestens zu verstehen.

6 Literaturverzeichnis und Abbildungsverzeichnis

1. Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*. 2010;140(6):805-20.
2. Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:197-216.
3. Sieweke MH, Allen JE. Beyond stem cells: self-renewal of differentiated macrophages. *Science*. 2013;342(6161):1242974.
4. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*. 2004;25(12):677-86.
5. Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdt S, et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*. 2014;41(1):14-20.
6. Rey-Giraud F, Hafner M, Ries CH. In vitro generation of monocyte-derived macrophages under serum-free conditions improves their tumor promoting functions. *PLoS One*. 2012;7(8):e42656.
7. Heusinkveld M, de Vos van Steenwijk PJ, Goedemans R, Ramwadhoebe TH, Gorter A, Welters MJ, et al. M2 macrophages induced by prostaglandin E2 and IL-6 from cervical carcinoma are switched to activated M1 macrophages by CD4+ Th1 cells. *J Immunol*. 2011;187(3):1157-65.
8. Solinas G, Germano G, Mantovani A, Allavena P. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *J Leukoc Biol*. 2009;86(5):1065-73.
9. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature*. 2008;454(7203):436-44.
10. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(12):958-69.
11. Verreck FA, de Boer T, Langenberg DM, van der Zanden L, Ottenhoff TH. Phenotypic and functional profiling of human proinflammatory type-1 and anti-inflammatory type-2 macrophages in response to microbial antigens and IFN-gamma- and CD40L-mediated costimulation. *J Leukoc Biol*. 2006;79(2):285-93.

12. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(1):23-35.
13. Horvatinovich JM, Grogan EW, Norris M, Steinkasserer A, Lemos H, Mellor AL, et al. Soluble CD83 Inhibits T Cell Activation by Binding to the TLR4/MD-2 Complex on CD14+ Monocytes. *J Immunol.* 2017;198(6):2286-301.
14. Zhou LJ, Tedder TF. Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily. *J Immunol.* 1995;154(8):3821-35.
15. Cao W, Lee SH, Lu J. CD83 is preformed inside monocytes, macrophages and dendritic cells, but it is only stably expressed on activated dendritic cells. *Biochem J.* 2005;385(Pt 1):85-93.
16. Schumann RR. Function of lipopolysaccharide (LPS)-binding protein (LBP) and CD14, the receptor for LPS/LBP complexes: a short review. *Res Immunol.* 1992;143(1):11-5.
17. Italiani P, Boraschi D. From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Front Immunol.* 2014;5:514.
18. Quatromoni JG, Eruslanov E. Tumor-associated macrophages: function, phenotype, and link to prognosis in human lung cancer. *Am J Transl Res.* 2012;4(4):376-89.
19. Roszer T. Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:816460.
20. Biswas SK, Sica A, Lewis CE. Plasticity of macrophage function during tumor progression: regulation by distinct molecular mechanisms. *J Immunol.* 2008;180(4):2011-7.
21. Herrmann MD, Lennerz JK, Bullinger L, Bartholomae S, Holzmann K, Westhoff MA, et al. Transitory dasatinib-resistant states in KIT(mut) t(8;21) acute myeloid leukemia cells correlate with altered KIT expression. *Exp Hematol.* 2014;42(2):90-100.
22. Zani IA, Stephen SL, Mughal NA, Russell D, Homer-Vanniasinkam S, Wheatcroft SB, et al. Scavenger receptor structure and function in health and disease. *Cells.* 2015;4(2):178-201.
23. Sica A, Schioppa T, Mantovani A, Allavena P. Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour

- progression: potential targets of anti-cancer therapy. *Eur J Cancer*. 2006;42(6):717-27.
24. Roussel M, Ferrell PB, Jr., Greenplate AR, Lhomme F, Le Gallou S, Diggins KE, et al. Mass cytometry deep phenotyping of human mononuclear phagocytes and myeloid-derived suppressor cells from human blood and bone marrow. *J Leukoc Biol*. 2017;102(2):437-47.
25. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*. 2001;357(9255):539-45.
26. Mantovani A, Bottazzi B, Colotta F, Sozzani S, Ruco L. The origin and function of tumor-associated macrophages. *Immunol Today*. 1992;13(7):265-70.
27. Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med*. 2013;19(11):1423-37.
28. Condeelis J, Pollard JW. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell*. 2006;124(2):263-6.
29. Murdoch C, Giannoudis A, Lewis CE. Mechanisms regulating the recruitment of macrophages into hypoxic areas of tumors and other ischemic tissues. *Blood*. 2004;104(8):2224-34.
30. Qian BZ, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell*. 2010;141(1):39-51.
31. Stout RD, Jiang C, Matta B, Tietzel I, Watkins SK, Suttles J. Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences. *J Immunol*. 2005;175(1):342-9.
32. Watkins SK, Egilmez NK, Suttles J, Stout RD. IL-12 rapidly alters the functional profile of tumor-associated and tumor-infiltrating macrophages in vitro and in vivo. *J Immunol*. 2007;178(3):1357-62.
33. Ravetch JV, Lanier LL. Immune inhibitory receptors. *Science*. 2000;290(5489):84-9.
34. Karre K. NK cells, MHC class I molecules and the missing self. *Scand J Immunol*. 2002;55(3):221-8.
35. Alter G, Malenfant JM, Altfeld M. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J Immunol Methods*. 2004;294(1-2):15-22.

36. Bryceson YT, March ME, Barber DF, Ljunggren HG, Long EO. Cytolytic granule polarization and degranulation controlled by different receptors in resting NK cells. *J Exp Med*. 2005;202(7):1001-12.
37. Robertson MJ, Ritz J. Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood*. 1990;76(12):2421-38.
38. Perussia B. Fc receptors on natural killer cells. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1998;230:63-88.
39. Shi FD, Wang HB, Li H, Hong S, Taniguchi M, Link H, et al. Natural killer cells determine the outcome of B cell-mediated autoimmunity. *Nat Immunol*. 2000;1(3):245-51.
40. Biron CA, Nguyen KB, Pien GC, Cousens LP, Salazar-Mather TP. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol*. 1999;17:189-220.
41. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol*. 2001;22(11):633-40.
42. Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, et al. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science*. 2011;331(6013):44-9.
43. Nagler A, Lanier LL, Cwirla S, Phillips JH. Comparative studies of human FcRIII-positive and negative natural killer cells. *J Immunol*. 1989;143(10):3183-91.
44. Cooper MA, Fehniger TA, Turner SC, Chen KS, Ghaheri BA, Ghayur T, et al. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. *Blood*. 2001;97(10):3146-51.
45. Dunne J, Lynch S, O'Farrelly C, Todryk S, Hegarty JE, Feighery C, et al. Selective expansion and partial activation of human NK cells and NK receptor-positive T cells by IL-2 and IL-15. *J Immunol*. 2001;167(6):3129-38.
46. Fehniger TA, Cooper MA, Nuovo GJ, Cella M, Facchetti F, Colonna M, et al. CD56bright 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*. 2003;101(8):3052-7.
47. Borrego F, Robertson MJ, Ritz J, Pena J, Solana R. CD69 is a stimulatory receptor for natural killer cell and its cytotoxic effect is blocked by CD94 inhibitory receptor. *Immunology*. 1999;97(1):159-65.

48. Blake SJ, Dougall WC, Miles JJ, Teng MW, Smyth MJ. Molecular Pathways: Targeting CD96 and TIGIT for Cancer Immunotherapy. *Clin Cancer Res.* 2016;22(21):5183-8.
49. Fuchs A, Cella M, Giurisato E, Shaw AS, Colonna M. Cutting edge: CD96 (tactile) promotes NK cell-target cell adhesion by interacting with the poliovirus receptor (CD155). *J Immunol.* 2004;172(7):3994-8.
50. Chan CJ, Martinet L, Gilfillan S, Souza-Fonseca-Guimaraes F, Chow MT, Town L, et al. The receptors CD96 and CD226 oppose each other in the regulation of natural killer cell functions. *Nat Immunol.* 2014;15(5):431-8.
51. Besant PG, Tan E, Attwood PV. Mammalian protein histidine kinases. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003;35(3):297-309.
52. Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. The protein kinase complement of the human genome. *Science.* 2002;298(5600):1912-34.
53. Brown MT, Cooper JA. Regulation, substrates and functions of src. *Biochim Biophys Acta.* 1996;1287(2-3):121-49.
54. Stehelin D, Varmus HE, Bishop JM, Vogt PK. DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature.* 1976;260(5547):170-3.
55. Bolen JB, Rowley RB, Spana C, Tsygankov AY. The Src family of tyrosine protein kinases in hemopoietic signal transduction. *FASEB J.* 1992;6(15):3403-9.
56. Biscardi JS, Tice DA, Parsons SJ. c-Src, receptor tyrosine kinases, and human cancer. *Adv Cancer Res.* 1999;76:61-119.
57. Yeatman TJ. A renaissance for SRC. *Nat Rev Cancer.* 2004;4(6):470-80.
58. Mazurenko NN, Kogan EA, Zborovskaya IB, Kissel'jov FL. Expression of pp60c-src in human small cell and non-small cell lung carcinomas. *Eur J Cancer.* 1992;28(2-3):372-7.
59. Muthuswamy SK, Muller WJ. Activation of the Src family of tyrosine kinases in mammary tumorigenesis. *Adv Cancer Res.* 1994;64:111-23.
60. Wiener JR, Nakano K, Kruzelock RP, Bucana CD, Bast RC, Jr., Gallick GE. Decreased Src tyrosine kinase activity inhibits malignant human ovarian cancer tumor growth in a nude mouse model. *Clin Cancer Res.* 1999;5(8):2164-70.

61. Lombardo LJ, Lee FY, Chen P, Norris D, Barrish JC, Behnia K, et al. 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.* 2004;47(27):6658-61.
62. Rix U, Hantschel O, Durnberger G, Rensing Rix LL, Planyavsky M, Fernbach NV, et al. Chemical proteomic profiles of the BCR-ABL inhibitors imatinib, nilotinib, and dasatinib reveal novel kinase and nonkinase targets. *Blood.* 2007;110(12):4055-63.
63. McCaig AM, Cosimo E, Leach MT, Michie AM. Dasatinib inhibits CXCR4 signaling in chronic lymphocytic leukaemia cells and impairs migration towards CXCL12. *PLoS One.* 2012;7(11):e48929.
64. Wolf M, Schwinn S, Yoo YE, Ress ML, Braun M, Chopra M, et al. Src-kinase inhibitors sensitize human cells of myeloid origin to Toll-like-receptor-induced interleukin 12 synthesis. *Blood.* 2013;122(7):1203-13.
65. Goldblatt M, Huggins JT, Doelken P, Gurung P, Sahn SA. Dasatinib-induced pleural effusions: a lymphatic network disorder? *Am J Med Sci.* 2009;338(5):414-7.
66. Chen MH, Kerkela R, Force T. Mechanisms of cardiac dysfunction associated with tyrosine kinase inhibitor cancer therapeutics. *Circulation.* 2008;118(1):84-95.
67. Blake SJ, Bruce Lyons A, Fraser CK, Hayball JD, Hughes TP. Dasatinib suppresses in vitro natural killer cell cytotoxicity. *Blood.* 2008;111(8):4415-6.
68. Uchiyama T, Sato N, Narita M, Yamahira A, Iwabuchi M, Furukawa T, et al. Direct effect of dasatinib on proliferation and cytotoxicity of natural killer cells in in vitro study. *Hematol Oncol.* 2013;31(3):156-63.
69. Tanaka J, Sugita J, Shiratori S, Shigematsu A, Imamura M. Dasatinib enhances the expansion of CD56+CD3- NK cells from cord blood. *Blood.* 2012;119(25):6175-6.
70. Hassold N, Seystahl K, Kempf K, Urlaub D, Zekl M, Einsele H, et al. Enhancement of natural killer cell effector functions against selected lymphoma and leukemia cell lines by dasatinib. *Int J Cancer.* 2012;131(6):E916-27.
71. Timmermans-Sprang EP, Gračanin A, Mol JA. High basal Wnt signaling is further induced by PI3K/mTor inhibition but sensitive to cSRC inhibition in

- mammary carcinoma cell lines with HER2/3 overexpression. *BMC Cancer*. 2015;15:545.
72. Rensing Rix LL, Rix U, Colinge J, Hantschel O, Bennett KL, Stranzl T, et al. Global target profile of the kinase inhibitor bosutinib in primary chronic myeloid leukemia cells. *Leukemia*. 2009;23(3):477-85.
73. Dahl CA, Schall RP, He HL, Cairns JS. Identification of a novel gene expressed in activated natural killer cells and T cells. *J Immunol*. 1992;148(2):597-603.
74. Kim SH, Han SY, Azam T, Yoon DY, Dinarello CA. Interleukin-32: a cytokine and inducer of TNFalpha. *Immunity*. 2005;22(1):131-42.
75. Goda C, Kanaji T, Kanaji S, Tanaka G, Arima K, Ohno S, et al. Involvement of IL-32 in activation-induced cell death in T cells. *Int Immunol*. 2006;18(2):233-40.
76. Choi JD, Bae SY, Hong JW, Azam T, Dinarello CA, Her E, et al. Identification of the most active interleukin-32 isoform. *Immunology*. 2009;126(4):535-42.
77. Shoda H, Fujio K, Yamamoto K. Rheumatoid arthritis and interleukin-32. *Cell Mol Life Sci*. 2007;64(19-20):2671-9.
78. Panelli MC, Wang E, Phan G, Puhlmann M, Miller L, Ohnmacht GA, et al. Gene-expression profiling of the response of peripheral blood mononuclear cells and melanoma metastases to systemic IL-2 administration. *Genome Biol*. 2002;3(7):RESEARCH0035.
79. Netea MG, Azam T, Ferwerda G, Girardin SE, Walsh M, Park JS, et al. IL-32 synergizes with nucleotide oligomerization domain (NOD) 1 and NOD2 ligands for IL-1beta and IL-6 production through a caspase 1-dependent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(45):16309-14.
80. Joosten LA, Netea MG, Kim SH, Yoon DY, Oppers-Walgreen B, Radstake TR, et al. IL-32, a proinflammatory cytokine in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(9):3298-303.
81. Zhou LJ, Tedder TF. CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(6):2588-92.

82. Delneste Y, Charbonnier P, Herbault N, Magistrelli G, Caron G, Bonnefoy JY, et al. Interferon-gamma switches monocyte differentiation from dendritic cells to macrophages. *Blood*. 2003;101(1):143-50.
83. Netea MG, Lewis EC, Azam T, Joosten LA, Jaekal J, Bae SY, et al. Interleukin-32 induces the differentiation of monocytes into macrophage-like cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(9):3515-20.
84. Osman A, Bhuyan F, Hashimoto M, Nasser H, Maekawa T, Suzu S. M-CSF inhibits anti-HIV-1 activity of IL-32, but they enhance M2-like phenotypes of macrophages. *J Immunol*. 2014;192(11):5083-9.
85. Becker S, Warren MK, Haskill S. Colony-stimulating factor-induced monocyte survival and differentiation into macrophages in serum-free cultures. *J Immunol*. 1987;139(11):3703-9.
86. Khawar B, Abbasi MH, Sheikh N. A panoramic spectrum of complex interplay between the immune system and IL-32 during pathogenesis of various systemic infections and inflammation. *Eur J Med Res*. 2015;20:7.
87. Drexler HG. Leukemia cell lines: in vitro models for the study of chronic myeloid leukemia. *Leuk Res*. 1994;18(12):919-27.
88. Lozzio CB, Lozzio BB. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood*. 1975;45(3):321-34.
89. Fabrick BO, van Bruggen R, Deng DM, Ligtenberg AJ, Nazmi K, Schornagel K, et al. The macrophage scavenger receptor CD163 functions as an innate immune sensor for bacteria. *Blood*. 2009;113(4):887-92.
90. Alvarado-Vazquez PA, Bernal L, Paige CA, Grosick RL, Moracho Vilrriales C, Ferreira DW, et al. Macrophage-specific nanotechnology-driven CD163 overexpression in human macrophages results in an M2 phenotype under inflammatory conditions. *Immunobiology*. 2017;222(8-9):900-12.
91. Zhou LJ, Tedder TF. A distinct pattern of cytokine gene expression by human CD83+ blood dendritic cells. *Blood*. 1995;86(9):3295-301.
92. Lasek W, Zagozdzon R, Jakobisiak M. Interleukin 12: still a promising candidate for tumor immunotherapy? *Cancer Immunol Immunother*. 2014;63(5):419-35.
93. Carnaud C, Lee D, Donnars O, Park SH, Beavis A, Koezuka Y, et al. Cutting edge: Cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells. *J Immunol*. 1999;163(9):4647-50.

94. Testi R, D'Ambrosio D, De Maria R, Santoni A. The CD69 receptor: a multipurpose cell-surface trigger for hematopoietic cells. *Immunol Today*. 1994;15(10):479-83.
95. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol*. 2002;23(11):549-55.
96. Germano G, Frapolli R, Belgiovine C, Anselmo A, Pesce S, Liguori M, et al. Role of macrophage targeting in the antitumor activity of trabectedin. *Cancer Cell*. 2013;23(2):249-62.
97. Yang L, Zhang Y. Tumor-associated macrophages: from basic research to clinical application. *J Hematol Oncol*. 2017;10(1):58.
98. Pyonteck SM, Gadea BB, Wang HW, Gocheva V, Hunter KE, Tang LH, et al. Deficiency of the macrophage growth factor CSF-1 disrupts pancreatic neuroendocrine tumor development. *Oncogene*. 2012;31(11):1459-67.
99. Brownlow N, Mol C, Hayford C, Ghaem-Maghami S, Dibb NJ. Dasatinib is a potent inhibitor of tumour-associated macrophages, osteoclasts and the FMS receptor. *Leukemia*. 2009;23(3):590-4.
100. Chan LL, Cheung BK, Li JC, Lau AS. A role for STAT3 and cathepsin S in IL-10 down-regulation of IFN-gamma-induced MHC class II molecule on primary human blood macrophages. *J Leukoc Biol*. 2010;88(2):303-11.
101. Tariq M, Zhang J, Liang G, Ding L, He Q, Yang B. Macrophage Polarization: Anti-Cancer Strategies to Target Tumor-Associated Macrophage in Breast Cancer. *J Cell Biochem*. 2017;118(9):2484-501.
102. Biswas SK, Lewis CE. NF-kappaB as a central regulator of macrophage function in tumors. *J Leukoc Biol*. 2010;88(5):877-84.
103. Cook J, Hagemann T. Tumour-associated macrophages and cancer. *Curr Opin Pharmacol*. 2013;13(4):595-601.
104. Lawrence T, Natoli G. Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(11):750-61.
105. Sica A, Bronte V. Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development. *J Clin Invest*. 2007;117(5):1155-66.
106. Nielsen SR, Schmid MC. Macrophages as Key Drivers of Cancer Progression and Metastasis. *Mediators Inflamm*. 2017;2017:9624760.

107. Deng R, Wang SM, Yin T, Ye TH, Shen GB, Li L, et al. Dimethyl Sulfoxide Suppresses Mouse 4T1 Breast Cancer Growth by Modulating Tumor-Associated Macrophage Differentiation. *J Breast Cancer*. 2014;17(1):25-32.
108. Sherr CJ, Rettenmier CW, Sacca R, Roussel MF, Look AT, Stanley ER. The c-fms proto-oncogene product is related to the receptor for the mononuclear phagocyte growth factor, CSF-1. *Cell*. 1985;41(3):665-76.
109. Pyonteck SM, Akkari L, Schuhmacher AJ, Bowman RL, Sevenich L, Quail DF, et al. CSF-1R inhibition alters macrophage polarization and blocks glioma progression. *Nat Med*. 2013;19(10):1264-72.
110. Zhu Y, Knolhoff BL, Meyer MA, Nywening TM, West BL, Luo J, et al. CSF1/CSF1R blockade reprograms tumor-infiltrating macrophages and improves response to T-cell checkpoint immunotherapy in pancreatic cancer models. *Cancer Res*. 2014;74(18):5057-69.
111. Rebelo SP, Pinto C, Martins TR, Harrer N, Estrada MF, Loza-Alvarez P, et al. 3D-3-culture: A tool to unveil macrophage plasticity in the tumour microenvironment. *Biomaterials*. 2018;163:185-97.
112. Lin Y, Gustafson MP, Bulur PA, Gastineau DA, Witzig TE, Dietz AB. Immunosuppressive CD14+HLA-DR(low)/- monocytes in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2011;117(3):872-81.
113. Buhtoiarov IN, Lum H, Berke G, Paulnock DM, Sondel PM, Rakhmilevich AL. CD40 ligation activates murine macrophages via an IFN-gamma-dependent mechanism resulting in tumor cell destruction in vitro. *J Immunol*. 2005;174(10):6013-22.
114. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*. 2010;116(16):e74-80.
115. Yeap WH, Wong KL, Shimasaki N, Teo EC, Quek JK, Yong HX, et al. CD16 is indispensable for antibody-dependent cellular cytotoxicity by human monocytes. *Sci Rep*. 2016;6:34310.
116. Milliken D, Scotton C, Raju S, Balkwill F, Wilson J. Analysis of chemokines and chemokine receptor expression in ovarian cancer ascites. *Clin Cancer Res*. 2002;8(4):1108-14.
117. Brunda MJ. Interleukin-12. *J Leukoc Biol*. 1994;55(2):280-8.

118. Yue T, Zheng X, Dou Y, Zheng X, Sun R, Tian Z, et al. Interleukin 12 shows a better curative effect on lung cancer than paclitaxel and cisplatin doublet chemotherapy. *BMC Cancer*. 2016;16:665.
119. Kerkar SP, Goldszmid RS, Muranski P, Chinnasamy D, Yu Z, Reger RN, et al. IL-12 triggers a programmatic change in dysfunctional myeloid-derived cells within mouse tumors. *J Clin Invest*. 2011;121(12):4746-57.
120. Edwards JP, Emens LA. The multikinase inhibitor sorafenib reverses the suppression of IL-12 and enhancement of IL-10 by PGE(2) in murine macrophages. *Int Immunopharmacol*. 2010;10(10):1220-8.
121. Sprinzl MF, Reisinger F, Puschnik A, Ringelhan M, Ackermann K, Hartmann D, et al. Sorafenib perpetuates cellular anticancer effector functions by modulating the crosstalk between macrophages and natural killer cells. *Hepatology*. 2013;57(6):2358-68.
122. Fehniger TA, Shah MH, Turner MJ, VanDeusen JB, Whitman SP, Cooper MA, et al. Differential cytokine and chemokine gene expression by human NK cells following activation with IL-18 or IL-15 in combination with IL-12: implications for the innate immune response. *J Immunol*. 1999;162(8):4511-20.
123. Ruffell B, Chang-Strachan D, Chan V, Rosenbusch A, Ho CM, Pryer N, et al. Macrophage IL-10 blocks CD8+ T cell-dependent responses to chemotherapy by suppressing IL-12 expression in intratumoral dendritic cells. *Cancer Cell*. 2014;26(5):623-37.
124. Hu X, Han C, Jin J, Qin K, Zhang H, Li T, et al. Integrin CD11b attenuates colitis by strengthening Src-Akt pathway to polarize anti-inflammatory IL-10 expression. *Sci Rep*. 2016;6:26252.
125. Ozanne J, Prescott AR, Clark K. The clinically approved drugs dasatinib and bosutinib induce anti-inflammatory macrophages by inhibiting the salt-inducible kinases. *Biochem J*. 2015;465(2):271-9.
126. Fraser CK, Lousberg EL, Kumar R, Hughes TP, Diener KR, Hayball JD. Dasatinib inhibits the secretion of TNF-alpha following TLR stimulation in vitro and in vivo. *Exp Hematol*. 2009;37(12):1435-44.
127. van Dongen M, Savage ND, Jordanova ES, Briaire-de Bruijn IH, Walburg KV, Ottenhoff TH, et al. Anti-inflammatory M2 type macrophages characterize

- metastasized and tyrosine kinase inhibitor-treated gastrointestinal stromal tumors. *Int J Cancer*. 2010;127(4):899-909.
128. Abram CL, Lowell CA. The diverse functions of Src family kinases in macrophages. *Front Biosci*. 2008;13:4426-50.
129. Krneta T, Gillgrass A, Poznanski S, Chew M, Lee AJ, Kolb M, et al. M2-polarized and tumor-associated macrophages alter NK cell phenotype and function in a contact-dependent manner. *J Leukoc Biol*. 2017;101(1):285-95.
130. Bellora F, Castriconi R, Dondero A, Pessino A, Nencioni A, Liggieri G, et al. TLR activation of tumor-associated macrophages from ovarian cancer patients triggers cytolytic activity of NK cells. *Eur J Immunol*. 2014;44(6):1814-22.
131. Miller JS, Oelkers S, Verfaillie C, McGlave P. Role of monocytes in the expansion of human activated natural killer cells. *Blood*. 1992;80(9):2221-9.
132. Dougall WC, Kurtulus S, Smyth MJ, Anderson AC. TIGIT and CD96: new checkpoint receptor targets for cancer immunotherapy. *Immunol Rev*. 2017;276(1):112-20.
133. Blake SJ, Stannard K, Liu J, Allen S, Yong MC, Mittal D, et al. Suppression of Metastases Using a New Lymphocyte Checkpoint Target for Cancer Immunotherapy. *Cancer Discov*. 2016;6(4):446-59.
134. Gottschalk N, Lang S, Kimmig R, Singh M, Brandau S. Monocytes and the 38kDa-antigen of mycobacterium tuberculosis modulate natural killer cell activity and their cytotoxicity directed against ovarian cancer cell lines. *BMC Cancer*. 2012;12:451.
135. Trinchieri G. Interleukin-12: a cytokine produced by antigen-presenting cells with immunoregulatory functions in the generation of T-helper cells type 1 and cytotoxic lymphocytes. *Blood*. 1994;84(12):4008-27.
136. Mustjoki S, Auvinen K, Kreutzman A, Rousselot P, Hernesniemi S, Melo T, et al. Rapid mobilization of cytotoxic lymphocytes induced by dasatinib therapy. *Leukemia*. 2013;27(4):914-24.
137. Blake S, Hughes TP, Mayrhofer G, Lyons AB. The Src/ABL kinase inhibitor dasatinib (BMS-354825) inhibits function of normal human T-lymphocytes in vitro. *Clin Immunol*. 2008;127(3):330-9.

138. Schade AE, Schieven GL, Townsend R, Jankowska AM, Susulic V, Zhang R, et al. Dasatinib, a small-molecule protein tyrosine kinase inhibitor, inhibits T-cell activation and proliferation. *Blood*. 2008;111(3):1366-77.
139. Kim DH, Kamel-Reid S, Chang H, Sutherland R, Jung CW, Kim HJ, et al. Natural killer or natural killer/T cell lineage large granular lymphocytosis associated with dasatinib therapy for Philadelphia chromosome positive leukemia. *Haematologica*. 2009;94(1):135-9.
140. Kreutzman A, Vakkila J, Porkka K, Mustjoki S. Dasatinib Has a Dual Mode of Action: Direct BCR-ABL1 Mediated Anti-Leukemic Effects Are Complemented by Promotion of Th1-Type and NK-Cell Mediated Cellular Immune Responses,. *Blood*. 2011;118:3760-.
141. Ohmatsu H, Humme D, Gonzalez J, Gulati N, Mobs M, Sterry W, et al. IL-32 induces indoleamine 2,3-dioxygenase(+)CD1c(+) dendritic cells and indoleamine 2,3-dioxygenase(+)CD163(+) macrophages: Relevance to mycosis fungoides progression. *Oncoimmunology*. 2017;6(2):e1181237.
142. Ohmatsu H, Humme D, Gonzalez J, Gulati N, Mobs M, Sterry W, et al. IL-32 induces indoleamine 2,3-dioxygenase+CD1c+ dendritic cells and indoleamine 2,3-dioxygenase+CD163+ macrophages: Relevance to mycosis fungoides progression. *Oncoimmunology*. 2017;6(2):e1181237.
143. Ma X, Yan W, Zheng H, Du Q, Zhang L, Ban Y, et al. Regulation of IL-10 and IL-12 production and function in macrophages and dendritic cells. *F1000Res*. 2015;4.
144. Qu Y, Taylor JL, Bose A, Storkus WJ. Therapeutic effectiveness of intratumorally delivered dendritic cells engineered to express the pro-inflammatory cytokine, interleukin (IL)-32. *Cancer Gene Ther*. 2011;18(9):663-73.
145. Kang JW, Choi SC, Cho MC, Kim HJ, Kim JH, Lim JS, et al. A proinflammatory cytokine interleukin-32beta promotes the production of an anti-inflammatory cytokine interleukin-10. *Immunology*. 2009;128(1 Suppl):e532-40.
146. Zheng LM, Ojcius DM, Garaud F, Roth C, Maxwell E, Li Z, et al. Interleukin-10 inhibits tumor metastasis through an NK cell-dependent mechanism. *J Exp Med*. 1996;184(2):579-84.

147. Park MH, Song MJ, Cho MC, Moon DC, Yoon DY, Han SB, et al. Interleukin-32 enhances cytotoxic effect of natural killer cells to cancer cells via activation of death receptor 3. *Immunology*. 2012;135(1):63-72.
148. Kundu N, Fulton AM. Interleukin-10 inhibits tumor metastasis, downregulates MHC class I, and enhances NK lysis. *Cell Immunol*. 1997;180(1):55-61.
149. Oh JH, Cho MC, Kim JH, Lee SY, Kim HJ, Park ES, et al. IL-32gamma inhibits cancer cell growth through inactivation of NF-kappaB and STAT3 signals. *Oncogene*. 2011;30(30):3345-59.
150. Wang S, Chen F, Tang L. IL-32 promotes breast cancer cell growth and invasiveness. *Oncol Lett*. 2015;9(1):305-7.
151. Yang Y, Wang Z, Zhou Y, Wang X, Xiang J, Chen Z. Dysregulation of over-expressed IL-32 in colorectal cancer induces metastasis. *World J Surg Oncol*. 2015;13:146.
152. Yan H, He D, Huang X, Zhang E, Chen Q, Xu R, et al. Role of interleukin-32 in cancer biology. *Oncol Lett*. 2018;16(1):41-7.
153. Keswani A, Chustz RT, Suh L, Carter R, Peters AT, Tan BK, et al. Differential expression of interleukin-32 in chronic rhinosinusitis with and without nasal polyps. *Allergy*. 2012;67(1):25-32.
154. Khawar MB, Abbasi MH, Sheikh N. IL-32: A Novel Pluripotent Inflammatory Interleukin, towards Gastric Inflammation, Gastric Cancer, and Chronic Rhino Sinusitis. *Mediators Inflamm*. 2016;2016:8413768.
155. Kim DH, Park ES, Lee AR, Park S, Park YK, Ahn SH, et al. Intracellular interleukin-32gamma mediates antiviral activity of cytokines against hepatitis B virus. *Nat Commun*. 2018;9(1):3284.

<p>ABBILDUNG 1: MAKROPHAGEN KÖNNEN KLASSISCH DURCH LPS, IFN-γ AKTIVIERT WERDEN (M1) ODER ZU ALTERNATIVEN MAKROPHAGEN DURCH DEN EINFLUSS VON IL-4, IL-10, GLUKOKORTIKOIDE DIFFERENZIEREN. M1-MAKROPHAGEN PRODUZIEREN VIEL IL-12, TNF-α UND REAKTIVE SAUERSTOFFVERBINDUNGEN. DIE ALTERNATIVEN MAKROPHAGEN SEZERNIEREN VOR ALLEM IL-10, SOWIE MANNOSE UND SCAVENGER-REZEPTOREN. SIE FÖRDERN DADURCH DIE ANGIOGENESE, GEWEBEUMBAU UND DIE WUNDHEILUNG. MODIFIZIERT NACH SICCA ET AL. (23).....</p>	8
<p>ABBILDUNG 2: CD56^{DIM} UND CD56^{BRIGHT} UNTERSCHIEDEN SICH IN EINIGEN CHARAKTERISTIKA: OBEN DARGESTELLT DIE CD56^{BRIGHT} NK-ZELLEN MIT EINER GESTEIGERTEN ZYTOKINSEKRETION. CD56^{DIM}, DER ÜBERWIEGEND PRÄSENTE NK-ZELL-SUBTYP, ZEICHNET SICH DURCH EINE ERHÖHTE ZYTOTOXISCHE AKTIVITÄT AUS. MODIFIZIERT NACH COOPER ET AL. (2001). (44).....</p>	13
<p>ABBILDUNG 3: PRINZIP DER ISOLATION VON CD14⁺ BZW. CD56⁺-ZELLEN. DIE AN ANTIKÖRPER GEKOPPELTEN ZELLEN VERBLEIBEN IN DER SÄULE UND WERDEN ERST BEIM SPÜLEN DIESER MIT HILFE EINES KOLBENS FREI. MODIFIZIERT NACH MILTENYII BIOTEC.....</p>	29
<p>ABBILDUNG 4: PRINZIP DER „UNTOUCHED ISOLATION“. NUR ZELLEN, DIE NICHT AN EINEN ANTIKÖRPER GEKOPPELT SIND, DURCHLAUFEN DIE SÄULE UND FINDEN SICH IN DER SUSPENSION WIEDER. MODIFIZIERT NACH MILTENYII BIOTEC.....</p>	30
<p>ABBILDUNG 5: VERANSCHAULICHUNG DES VERSUCHSABLAUFS „PHÄNOTYPISIERUNG VON TAM“</p>	32
<p>ABBILDUNG 6: DARSTELLUNG DES VERSUCHSABLAUFS ZUR MESSUNG DER AKTIVITÄTSMARKER UND ZYTOTOXIZITÄT VON NK-ZELLEN.</p>	34
<p>ABBILDUNG 7: FACS-ANALYSE FÜR MAKROPHAGEN: GATING-STRATEGIE ANHAND EINES BEISPIELS. UNTERHALB DER AUSGEWÄHLTEN GRUPPE SIND VERMUTLICH ZELLDETRITUS, UNDIFFERENZIERTE MONOZYTEN UND ANDERE VERBLIEBENE LYMPHOZYTENPOPULATIONEN. SETZUNG DES GATES BEI DER UNGEFÄRBTEN GRUPPE UND ÜBERTRAGUNG AUF ALLE ANDEREN PROBEN. ANSCHLIEßEND MESSUNG DER VITALITÄT DURCH FÄRBUNG MIT „VIABILITY DYE“. DER ANTEIL DER ZIEL-POPULATION BETRÄGT IN DIESEM BEISPIEL CA. 45%. DIE VITALITÄT DIESER POPULATION LIEGT BEI >90%.</p>	37
<p>ABBILDUNG 8: GATINGBEISPIEL VON A.) PBMC UND B.) DEN DARAUS ISOLIERTEN NK-ZELLEN IM VERGLEICH. DARSTELLUNG DER FACS-ANALYSE AM TAG DER ISOLIERUNG VON NK-ZELLEN AUS PBMCS. A.) DIE PBMC ZEIGEN IN DER AUSGEWÄHLTEN POPULATION SOWOHL CD56⁺- ALS AUCH CD3⁺-ZELLEN. LINKS UNTERHALB DER AUSGEWÄHLTEN POPULATION BEFINDEN SICH ANDERE LYMPHOZYTEN-POPULATIONEN. GANZ UNTEN BEFINDET SICH ZELLDETRITUS. B.) NACH ISOLIERUNG DER NK-ZELLEN DURCH DAS NK-CELL-ISOLATION-KIT (VGL. KAP 2.2.2) IST DIE CD3⁺-POPULATION DEPLETIERT.....</p>	38
<p>ABBILDUNG 9: GATING-BEISPIEL VON NK-ZELLEN NACH AKTIVIERUNG MIT M2C UND INKUBATION MIT K562. 1.) OBEREN BEIDEN GRAFIKEN: AUSWAHL DER POPULATION IN DER UNGEFÄRBTEN PROBE. DIE NK-ZELLEN BEFINDEN AUF DER ERSTEN GRAFIK RECHTS UNTEN IM MARKIERTEN BEREICH. LINKS UNTEN BEFINDEN SICH DETRITUS, ANDERE UNDIFFERENZIERTE MAKROPHAGEN UND LYMPHOZYTEN. 2.) UNTEREN BEIDEN GRAFIKEN: ÜBERTRAGUNG DIESER GATING-STRATEGIE AUF DIE GEFÄRBTEN PROBEN UND UNTERTEILUNG IN CD56^{DIM} UND CD56^{BRIGHT}</p>	39
<p>ABBILDUNG 10: STANDARDKURVE AUS EINEM IL10-ELISA. SIE ERGIBT SICH AUS BEKANNTEN ANTIGENKONZENTRATIONEN UND DIENT ALS KALIBRIERUNGSKURVE.</p>	42
<p>ABBILDUNG 11: ANTEIL AN CD14⁺-M2A-MAKROPHAGEN. DER ERSTE PLOT STELLT NUR MIT „MEDIUM“ BEHANDELTE MAKROPHAGEN DAR, WOVON 15,4% DER M2A-MAKROPHAGEN CD14⁺ SIND. BEI MAKROPHAGEN, WELCHE MIT LPS + IFN-γ STIMULIERT WURDEN, WAREN 44,1% CD14⁺, UNTER LPS + IFN-γ UND DASATINIB-EINFLUSS 43,5%.</p>	45
<p>ABBILDUNG 12: REGULATION VON CD163 IN UNTERSCHIEDLICH POLARISIERTEN POPULATIONEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM AKTIVIERENDEN STIMULUS. ABGEBILDET IST DER ANTEIL AN CD163⁺-ZELLEN IN PROZENT AUS M1 UND M2A N=7, M2C N=5 VERSUCHEN.....</p>	46
<p>ABBILDUNG 13: REGULATION VON CD14 IN UNTERSCHIEDLICH POLARISIERTEN POPULATIONEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM AKTIVIERENDEN STIMULUS. ABGEBILDET IST DER ANTEIL AN CD14⁺-ZELLEN IN PROZENT AUS M1; M2A N=7UND M2C N=6 VERSUCHEN.....</p>	46

ABBILDUNG 14: REGULATION VON CD16 IN UNTERSCHIEDLICH POLARISIERTEN POPULATIONEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM AKTIVIERENDEN STIMULUS. ABGEBILDET IST DER ANTEIL AN CD16 ⁺ -ZELLEN IN PROZENT AUS M1, M2A N=7 UND M2C N=5 VERSUCHEN.....	47
ABBILDUNG 15: ANTEIL AN CD83 ⁻ - UND CD83 ⁺ -ZELLEN VON M2A MAKROPHAGEN IM STANDARD „MEDIUM“, UNTER INKUBATION MIT LPS + IFN- γ SOWIE DASATINIB + LPS + IFN- γ . DER ANTEIL AN CD83 ⁺ -ZELLEN BETRÄGT IN DER STANDARDGRUPPE 2,04%, MIT LPS + IFN- γ 4,19% UND MIT DASATINIB + LPS + IFN- γ 3,26%.....	48
ABBILDUNG 16: ANTEIL DER UNTERSCHIEDLICH POLARISIERTEN MAKROPHAGEN IN ABHÄNGIGKEIT DER AKTIVIERENDEN STIMULI AN CD83 ⁻ UND CD83 ⁺ -ZELLEN IN PROZENT. DER SCHWARZE BALKEN STELLT JEWEILS DIE CD83 ⁻ -POPULATION, DER GRAUE BALKEN JEWEILS DIE CD83 ⁺ -POPULATION DAR. M1, M2A UND M2C N=6 VERSUCHEN.	48
ABBILDUNG 17: REGULATION VON CD80 IN UNTERSCHIEDLICH POLARISIERTEN POPULATIONEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM AKTIVIERENDEN STIMULUS SOWIE IHRER CD83-EXPRESSION. HIER WERDEN DIE NORMALISIERTEN MFI'S DER CD80 EXPRESSION VON JEWEILS CD83 ⁻ - UND CD83 ⁺ -MAKROPHAGEN UNTER INKUBATION MIT LPS + IFN- γ (UNAUSGEFÜLLTE KREISE) UND DASATINIB + LPS + IFN- γ (AUSGEFÜLLTE RECHTECKE) IN PROZENT GEZEIGT. N=6 VERSUCHE.	49
ABBILDUNG 18: REGULATION VON CD86 IN UNTERSCHIEDLICH POLARISIERTEN POPULATIONEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM AKTIVIERENDEN STIMULUS SOWIE IHRER CD83-EXPRESSION. ABGEBILDET SIND DIE NORMALISIERTEN MFIS IN PROZENT AUS N=6 VERSUCHEN. UNAUSGEFÜLLTE KREISE: LPS + IFN- γ ; AUSGEFÜLLTE RECHTECKE: DASATINIB + LPS + IFN- γ	49
ABBILDUNG 19: REGULATION VON HLA-DR IN UNTERSCHIEDLICH POLARISIERTEN POPULATIONEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM AKTIVIERENDEN STIMULUS SOWIE IHRER CD83-EXPRESSION. ES WURDE IN CD83 ⁻ UND CD83 ⁺ -ZELLEN UNTERTEILT. N=6. UNAUSGEFÜLLTE KREISE: LPS + IFN- γ ; AUSGEFÜLLTE RECHTECKE: DASATINIB + LPS + IFN- γ	50
ABBILDUNG 20: REGULATION VON CD206 IN UNTERSCHIEDLICH POLARISIERTEN POPULATIONEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM AKTIVIERENDEN STIMULUS ABGEBILDET SIND DIE PROZENTUALEN WERTE DER NORMALISIERTEN MFIS AUS M1, M2A, M2C N=7 VERSUCHEN.....	50
ABBILDUNG 21: REGULATION VON CD163 IN UNTERSCHIEDLICH POLARISIERTEN POPULATIONEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM AKTIVIERENDEN STIMULUS. ABGEBILDET IST DER ANTEIL AN CD163 ⁺ -ZELLEN IN PROZENT AUS M1 N=6; M2A N=5 UND M2C N=4 VERSUCHEN.....	51
ABBILDUNG 22: REGULATION VON CD14 IN UNTERSCHIEDLICH POLARISIERTEN POPULATIONEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM AKTIVIERENDEN STIMULUS. ABGEBILDET IST DER ANTEIL AN CD14 ⁺ -ZELLEN IN PROZENT AUS M1 N=6; M2A UND M2C N=5 VERSUCHEN.....	52
ABBILDUNG 23: REGULATION VON CD16 IN UNTERSCHIEDLICH POLARISIERTEN POPULATIONEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM AKTIVIERENDEN STIMULUS. ABGEBILDET IST DER ANTEIL AN CD16 ⁺ -ZELLEN IN PROZENT AUS M1 N=6, M2A N=5 UND M2C N=4 VERSUCHEN.....	52
ABBILDUNG 24: ANTEIL DER UNTERSCHIEDLICH POLARISIERTEN MAKROPHAGEN IN ABHÄNGIGKEIT DER AKTIVIERENDEN STIMULI AN CD83 ⁻ UND CD83 ⁺ -ZELLEN. DER SCHWARZE BALKEN STELLT JEWEILS DIE CD83 ⁻ -POPULATION, DER GRAUE BALKEN JEWEILS DIE CD83 ⁺ -POPULATION DAR. ABGEBILDET SIND DIE ANTEILE CD83 ⁻ UND CD83 ⁺ -ZELLEN IN PROZENT AUS M1 N=6; M2A UND M2C N=5 VERSUCHEN. DER SCHWARZE BALKEN STELLT JEWEILS DIE CD83 ⁻ -POPULATION, DER GRAUE BALKEN JEWEILS DIE CD83 ⁺ -POPULATION DAR.	53
ABBILDUNG 25: REGULATION VON CD80 IN UNTERSCHIEDLICH POLARISIERTEN POPULATIONEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM AKTIVIERENDEN STIMULUS SOWIE IHRER CD83-EXPRESSION. HIER WERDEN DIE NORMALISIERTEN MFI'S DER CD80 EXPRESSION VON JEWEILS CD83 ⁻ - UND CD83 ⁺ -MAKROPHAGEN UNTER INKUBATION MIT LPS + IFN- γ (UNAUSGEFÜLLTE KREISE) UND DASATINIB + LPS + IFN- γ (AUSGEFÜLLTE RECHTECKE) IN PROZENT GEZEIGT. M1 N=6; M2A UND M2C N=5 VERSUCHE.....	53
ABBILDUNG 26: REGULATION VON CD86 IN UNTERSCHIEDLICH POLARISIERTEN POPULATIONEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM AKTIVIERENDEN STIMULUS SOWIE IHRER CD83-EXPRESSION. ABGEBILDET SIND DIE NORMALISIERTEN MFIS IN PROZENT AUS M1 N=6; M2A UND M2C N=5 VERSUCHEN. UNAUSGEFÜLLTE KREISE: LPS + IFN- γ ; AUSGEFÜLLTE RECHTECKE: DASATINIB + LPS + IFN- γ	54

ABBILDUNG 27: REGULATION VON HLA-DR IN UNTERSCHIEDLICH POLARISIERTEN POPULATIONEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM AKTIVIERENDEN STIMULUS SOWIE IHRER CD83-EXPRESSION. ES WURDE IN CD83 ⁻ UND CD83 ⁺ -ZELLEN UNTERTEILT. M1 N=6; M2A UND M2C N= 5 VERSUCHE. UNAUSGEFÜLLTE KREISE: LPS + IFN- γ ; AUSGEFÜLLTE RECHTECKE: DASATINIB + LPS + IFN- γ	54
ABBILDUNG 28: REGULATION VON CD206 IN UNTERSCHIEDLICH POLARISIERTEN POPULATIONEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM AKTIVIERENDEN STIMULUS ABGEBILDET SIND DIE PROZENTUALEN WERTE DER NORMALISIERTEN MFIS AUS M1:N=6/5; M2A: N=6; M2C: N= 6 VERSUCHEN.	55
ABBILDUNG 29: REGULATION VON CD163 IN UNTERSCHIEDLICH POLARISIERTEN POPULATIONEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM AKTIVIERENDEN STIMULUS. ABGEBILDET IST DER ANTEIL AN CD163 ⁺ -ZELLEN IN PROZENT AUS M1 N=6; M2A N=5; M2C N=1 VERSUCHEN.....	56
ABBILDUNG 30: REGULATION VON CD14 IN UNTERSCHIEDLICH POLARISIERTEN POPULATIONEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM AKTIVIERENDEN STIMULUS. ABGEBILDET IST DER ANTEIL AN CD14 ⁺ -ZELLEN IN PROZENT AUS M1 N=6; M2A N=5; M2C N=1 VERSUCHEN.....	56
ABBILDUNG 31: REGULATION VON CD16 IN UNTERSCHIEDLICH POLARISIERTEN POPULATIONEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM AKTIVIERENDEN STIMULUS. ABGEBILDET IST DER ANTEIL AN CD16 ⁺ -ZELLEN IN PROZENT AUS M1 N=6; M2A N=5; M2C N=1 VERSUCHEN.....	57
ABBILDUNG 32: ANTEIL DER UNTERSCHIEDLICH POLARISIERTEN MAKROPHAGEN IN ABHÄNGIGKEIT DER AKTIVIERENDEN STIMULI AN CD83 ⁻ UND CD83 ⁺ -ZELLEN. DER SCHWARZE BALKEN STELLT JEWEILS DIE CD83 ⁻ -POPULATION, DER GRAUE BALKEN JEWEILS DIE CD83 ⁺ -POPULATION DAR. ABGEBILDET SIND DIE ANTEILE CD83 ⁻ UND CD83 ⁺ -ZELLEN IN PROZENT AUS M1 N=5; M2A N=4; M2C: N= 2 VERSUCHEN.	58
ABBILDUNG 33: REGULATION VON CD80 IN UNTERSCHIEDLICH POLARISIERTEN POPULATIONEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM AKTIVIERENDEN STIMULUS SOWIE IHRER CD83-EXPRESSION. HIER WERDEN DIE NORMALISIERTEN MFI'S DER CD80 EXPRESSION VON JEWEILS CD83 ⁻ UND CD83 ⁺ -MAKROPHAGEN UNTER INKUBATION MIT LPS + IFN- γ (UNAUSGEFÜLLTE KREISE) UND DASATINIB + LPS + IFN- γ (AUSGEFÜLLTE RECHTECKE) IN PROZENT GEZEIGT. M1 N=5; M2A N=4; M2C: N= 2 VERSUCHE.....	58
ABBILDUNG 34: REGULATION VON CD86 IN UNTERSCHIEDLICH POLARISIERTEN POPULATIONEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM AKTIVIERENDEN STIMULUS SOWIE IHRER CD83-EXPRESSION. ABGEBILDET SIND DIE NORMALISIERTEN MFIS IN PROZENT AUS M1 N=5; M2A N=4; M2C: N= 2 VERSUCHEN UNAUSGEFÜLLTE KREISE: LPS + IFN- γ ; AUSGEFÜLLTE RECHTECKE: DASATINIB + LPS + IFN- γ	59
ABBILDUNG 35: REGULATION VON HLA-DR IN UNTERSCHIEDLICH POLARISIERTEN POPULATIONEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM AKTIVIERENDEN STIMULUS SOWIE IHRER CD83-EXPRESSION. ES WURDE IN CD83 ⁻ UND CD83 ⁺ -ZELLEN UNTERTEILT. M1 N=5; M2A N=4; M2C: N= 2 VERSUCHE. UNAUSGEFÜLLTE KREISE: LPS + IFN- γ ; AUSGEFÜLLTE RECHTECKE: BOSUTINIB + LPS + IFN- γ	59
ABBILDUNG 36: REGULATION VON CD206 IN UNTERSCHIEDLICH POLARISIERTEN POPULATIONEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM AKTIVIERENDEN STIMULUS ABGEBILDET SIND DIE PROZENTUALEN WERTE DER NORMALISIERTEN MFIS AUS M1:N=5; M2A: N=4; M2C: N= 2 VERSUCHE.....	60
ABBILDUNG 37: DIE GRAFIKEN ZEIGEN DIE ERGEBNISSE DES IL-12-ELISAS. DIE EINHEIT DER IL-12-PRODUKTION IST IN NG/ML ANGEGEBEN. DIE MATERIALIEN FÜR DIE ELISAS WURDEN AUS DEN ÜBERSTÄNDEN DER MEDIEN VON PHÄNOTYPSISIERUNGS-VERSUCHEN GEWONNEN UND EINGEFROREN. DIE M1-MAKROPHAGEN ZEIGEN EINE STEIGERUNG DER IL-12-PRODUKTION UNTER <i>DASATINIB</i> -INKUBATION MIT EINEM P-WERT P=0,096 (PAIRED T-TEST). DIE STEIGERUNG BEI M2A IST MIT P=0,036 SIGNIFIKANT. M2C VERZEICHNET EBENFALLS EINE STEIGERUNG, HIER IST P=0,077. ANZAHL DER DUPLIKATE M1: N=6 UND M2A; M2C N=7	61
ABBILDUNG 38: DIE GRAFIKEN ZEIGEN DIE ERGEBNISSE DES IL-12-ELISAS UNTER SRC-KINASE-INHIBITOR-I-KULTIVIERUNG. DIE EINHEIT DER IL-12-PRODUKTION IST IN NG/ML ANGEGEBEN. DIE GRAFIKEN ZEIGEN EINE TENDENZ ZUR VERMEHRTEN IL-12-PRODUKTION UNTER SRC-KINASE-INHIBITOR-I-INKUBATION. ANZAHL DER DUPLIKATE M1; M2A: N=3 UND M2C: N=1.	62
ABBILDUNG 39: DER IL-12-ELISA UNTER BOSUTINIB-KULTIVIERUNG ZEIGT BEI M1 UND M2A EINE TENDENZ ZUR STEIGERUNG DER IL-12-PRODUKTION. DIE IL-12-MENGE IST IN NG/ML ANGEGEBEN. ANZAHL DER DUPLIKATE N=3.	63

ABBILDUNG 40: IL-10-ELISA AUS ÜBERSTÄNDEN DER VERSUCHSREIHE ZUR PHÄNOTYPISIERUNG VON MAKROPHAGEN. DIESE GRAFIK VERDEUTLICHT DIE ERHÖHTE IL-10-PRODUKTION DER BEIDEN M2-MAKROPHAGEN IM VERGLEICH MIT M1-MAKROPHAGEN. UNTER LPS + IFN- γ - KULTIVIERUNG PRODUZIEREN M1 DURCHSCHNITTLICH 0,57 NG/ML, M2A 2,95 NG/ML UND M2C 1,95 NG/ML IL-10. ANZAHL DER DUPLIKATE: M1: N=3, M2A: N=4, M2C: N=5.	64
ABBILDUNG 41: ELISA ZUR MESSUNG DER IL-10-PRODUKTION. DIESER ZEIGT EINE KONSTANTE ABNAHME DER IL-10-PRODUKTION IN ALLEN DREI GRUPPEN SOWIE EINE VON GRUND AUF HÖHERE MENGE AN IL-10 BEI DEN M2-MAKROPHAGEN. ANZAHL DER DUPLIKATE: M1: N=3, M2A: N=4, M2C: N=5	65
ABBILDUNG 42: IL-10-ELISA AUS ÜBERSTÄNDEN DER VERSUCHSREIHE ZUR PHÄNOTYPISIERUNG VON MAKROPHAGEN (KAPITEL 3.2.1) DIE ZWEI DURCHGEFÜHRTEN IL-10-MESSUNGEN UNTER SRC-KINASE-INHIBITOR-I-INKUBATION DEUTEN EINE VERRINGERTE IL-10-PRODUKTION AN. M1 N=2, M2A N=3 UND M2C N=2.....	66
ABBILDUNG 43: REGULATION DER AKTIVIERUNGSMARKER VON NK-ZELLEN IN KO-KULTUR MIT UNTERSCHIEDLICH POLARISIERTEN POPULATIONEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM AKTIVIERENDEN STIMULUS. ES GIBT DREI SUBTYPEN: NK-ZELLEN IM M1-MAKROPHAGEN-MILIEU; NK-ZELLEN IM M2A-MAKROPHAGEN-MILIEU UND NK-ZELLEN IM M2C-MAKROPHAGEN-MILIEU. DIE ABBILDUNGEN ZEIGEN DIE NORMALISIERTEN MFIS IN BEZUG AUF DIE STANDARDGRUPPE „MEDIUM“. ALLE SUBTYPEN N=5 VERSUCHE.	68
ABBILDUNG 44: DEGRANULATIONSMESSUNG VON NK-ZELLEN NACH K562-KULTIVIERUNG UND IN KO-KULTUR MIT M1-MAKROPHAGEN, M2A UND M2C-MAKROPHAGEN. GEZEIGT SIND DIE MFI-WERTE, N=3 IN ALLEN GRUPPEN.	70
ABBILDUNG 45: REGULATION DER CD107A-EXPRESSION VON ALLEN NK-ZELLEN IN KO-KULTUR MIT DEN JEWEILIG POLARISIERTEN POPULATIONEN UNABHÄNGIG DER CD56-EXPRESSION. DIE VERSTÄRKTE DEGRANULATION UNTER LPS + IFN- γ + DASATINIB- EINFLUSS IST MIT P=0,01 SIGNIFIKANT. N=18 VERSUCHE.	71
ABBILDUNG 46: REGULATION VON CD163 IN UNTERSCHIEDLICH POLARISIERTEN POPULATIONEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM AKTIVIERENDEN STIMULUS. ABGEBILDET IST DER ANTEIL AN CD163 ⁺ -ZELLEN IN PROZENT AUS M1 N=6; M2A N=6; M2C N=5 VERSUCHEN.....	73
ABBILDUNG 47: REGULATION VON CD14 UND CD16 IN UNTERSCHIEDLICH POLARISIERTEN POPULATIONEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM AKTIVIERENDEN STIMULUS. ABGEBILDET IST DER ANTEIL AN CD14 ⁺ - BZW. CD16 ⁺ -ZELLEN IN PROZENT AUS VERSUCHSANZAHL M1 N=6; M2A N=6; M2C N=5/3.	74
ABBILDUNG 48: ANTEIL DER UNTERSCHIEDLICH POLARISIERTEN MAKROPHAGEN IN ABHÄNGIGKEIT DER AKTIVIERENDEN STIMULI AN CD83 ⁻ UND CD83 ⁺ -ZELLEN IN PROZENT. DER SCHWARZE BALKEN STELLT JEWEILS DIE CD83 ⁻ -POPULATION, DER GRAUE BALKEN JEWEILS DIE CD83 ⁺ -POPULATION DAR. M1 N=5; M2A N=6; M2C: N=5 VERSUCHE.	74
ABBILDUNG 49 : ANTEIL AN CD83 ⁺ -ZELLEN DER STANDARDGRUPPE SOWIE UNTER IL-32 γ + IFN- γ -EINFLUSS.	75
ABBILDUNG 50: REGULATION VON CD80/CD86/HLA-DR IN UNTERSCHIEDLICH POLARISIERTEN POPULATIONEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM AKTIVIERENDEN STIMULUS SOWIE IHRER CD83-EXPRESSION. ABGEBILDET SIND DIE NORMALISIERTEN MFIS IN PROZENT. DIE OBERE REIHE ZEIGT DIE ERGEBNISSE FÜR DIE CD83 ⁻ -POPULATION. DIE UNTERE REIHE FÜR DIE CD83 ⁺ -POPULATION. M1 N=5; M2A N=6; M2C: N=5 VERSUCHE.....	75
ABBILDUNG 51: REGULATION VON CD206 IN UNTERSCHIEDLICH POLARISIERTEN POPULATIONEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM AKTIVIERENDEN STIMULUS. ABGEBILDET SIND DIE PROZENTUALEN WERTE DER NORMALISIERTEN MFI-WERTE MIT EINER VERSUCHSANZAHL VON M1 N=5; M2A UND M2C N=6 VERSUCHEN.	76
ABBILDUNG 52: IL10-ELISA IM VERGLEICH „MEDIUM“ VERSUS IL-32 γ +IFN- γ KULTIVIERUNG. ES DEUTET SICH EINE TENDENZ ZUR STEIGERUNG DER IL-10-PRODUKTION AN. DIE IL-10-PRODUKTION DER M1-MAKROPHAGEN IST IN PG/ML, DIE VON M2A UND M2C IN NG/ML ANGEGEBEN. M1 N=4; M2A N=5 UND M2C: N=3 VERSUCHE.....	77
ABBILDUNG 53: REGULATION DER AKTIVIERUNGSMARKER VON NK-ZELLEN IN KO-KULTUR MIT UNTERSCHIEDLICH POLARISIERTEN POPULATIONEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM AKTIVIERENDEN	

STIMULUS. ES GIBT DREI SUBTYPEN: NK-ZELLEN IM M1-MAKROPHAGEN-MILIEU; NK-ZELLEN IM M2A-MAKROPHAGEN-MILIEU UND NK-ZELLEN IM M2C-MAKROPHAGEN-MILIEU. DIE ABBILDUNGEN ZEIGEN DIE NORMALISIERTEN MFIS IN BEZUG AUF DIE STANDARDGRUPPE „MEDIUM“. ALLE SUBTYPEN N=5 VERSUCHE.	78
ABBILDUNG 54: DEGRANULATIONSASSAY VON NK-ZELLEN IN KO-KULTUR MIT UNTERSCHIEDLICH POLARISIERTEN POPULATIONEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM AKTIVIERENDEN STIMULUS ANHAND DES MARKERS CD107A. GEZEIGT SIND DIE MFI-WERTE, N=3 IN ALLEN GRUPPEN.	79

Abkürzungen

ADCC= antibody-depedent cellular cytotoxitiy
ALL= akute lymphatische Leukämie
APC= antigenpräsentierenden Zellen
BTK= brutin tyrosin-kinase
CD= Cluster of Differentiation
CG= CellGro
CML= chronisch myeloische Leukämie
CyTOF= Cytometry by time-of-flight
DC= dendritische Zellen
EGFR= Epidermal Growth Factor Receptor
ELISA= enzyme-linked-immunosorbent-Assay
FACS= Fluorescence Activated Cell Sorting
FSC= forward light scatter
GM-CSF= granulocyte macrophage colony-stimulating factor
Her2/neu= human epidermal growth factor receptor2
HIF= Hypoxie-induzierter-Faktor
HLA-DR= Human Leukocyte Antigen - antigen D Related
IFN- γ = Interferon- γ
IL= Interleukin
LAMP= lysosomen-assoziertes Membranprotein
LPS= Lipopolysacchariden
LRSC= Leukoreduction system chambers
M-CSF= monozyten colony-stimulating Faktor
MAP= mitogen-aktivierte-Protein
MDP= muramyl Dipeptide
MDS= myelodysplastisches Syndrom
MD2= myeloid differentiation protein 2
MFI= mean flourescence intinsity
MHC= major histocompatability complex
MPS= mononukleären-phagozytären Systems
NCAM=neutral cell adhesion molecule
NF- κ B= nuclear factor kappa B

NK-Zellen= natürliche killer Zellen
NK4= natural killer cell transkript 4
NLR= NOD-like-Rezeptor
NO= Stickstoffmonoxid
NOD= nucleotide oligomerization domain
LPB= LPS-bindendes Protein
PAMP= Pathogen-associated molecular patterns
PBMC= peripheral Blood mononuclear cell
PDGF= Platelet-derived growth factor
PGE₂= Prostaglandine
PRR= Pattern-recognition receptors
ROS= reaktiven Sauerstoffradikalen
SD= Standard Deviation
SFK= src-family-kinase
SSC= Side scatter
TACTILE= t cell-activated increased late expression
TAM= tumor-assoziierte Makrophagen
TCR= T-Cell-Receptor
TGF= Tumor-growth-Factor
TH-Zellen= T-Helfer-Zellen
TK= Tyrosinkinase
TKI= Tyrosinkinaseinhibitor
TLR= toll-like-Rezeptor
TMB= Tetramethylbenzidine
TNF- α = Tumor-nekrose-Faktor- α
VEGF= vascular endothelial growth factor

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. med. Matthias Wölfl für die Überlassung des Themas und sein Engagement, seine Zeit und seine Geduld.

Matthias Braun danke ich für die Betreuung, Anleitung und Korrekturen.

Frau Marie-Luise Crescimone danke ich für ihr allzeit offenes Ohr, ihren fachlichen Rat und vor allem ihre Freundschaft.

Dank gilt auch meinen Mitdoktoranden Sebastian und Andrej. Besonderer Dank gilt hier vor allem Fiona Fritsch für die Überlassung der Protokolle und guten Einarbeitung.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für ihre stetige Geduld und ihre Liebe.

Constanze Lotte-Marie Hölldorfer

01.04.1991, Ingolstadt, Deutschland

Facharztausbildung

10/2017- heute

Assistenzärztin für Gynäkologie und Geburtshilfe Rotkreuzklinikum München,
Prof. Dr. med. Michael Braun, Dr. med. Nikolaus von Obernitz, PD. Dr. med. Martin Pölcher

Studium

21/06/2017

Approbation als Ärztin

30/05/2017– 07/2015

Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Note: sehr gut

14/04/2016

Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Note: gut

04/2014 – 07/2019

Dissertation

Thema: "Einfluss der Src-kinase-Inhibitoren auf die TLR-4-induzierte IL-10 bzw. IL-12 Produktion in Tumor-assoziierten Makrophagen" unter der Leitung von Prof. Dr. med. Matthias Wöfl, pädiatrische Tumorummunologie, Universitätsklinik Würzburg

08/03/2013

Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Note: gut

04/2011 – 07/2017

Studium der Humanmedizin, Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Schulbildung

09/2001 – 06/2010

Gymnasium in Pfarrwiesen, Sindelfingen

Qualifikation: Abitur.

Abschluss: 06/2010, Note: 1,6

Praktisches Jahr

12/2016 – 04/2017

Innere Medizin

Katharinenhospital Stuttgart

Prof Dr. med. Dr. h.c. Wolfram G. Zoller

3. Tertial

09/2016 – 12/2016

Viszeral- und Unfallchirurgie

Klinikum Kempten

Prof. Dr. med. Peter BÜchler und

Prof. Dr. med. Georg Täger,

2. Tertial

05/2016 – 08/2016

Wahlfach Gynäkologie und Geburtshilfe

Rotkreuzkrankenhaus München

Prof. Dr. med. Michael Braun, Dr. med. Ulrich

Hamann, Dr. med. Nikolaus von Obernitz, PD. Dr.

med. Martin Pölcher

1. Tertial