

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II
der Universität Würzburg**

Direktor: Professor Dr. med. Hermann Einsele

**Dasatinib moduliert Effektorfunktionen
Natürlicher Killerzellen über Einflüsse auf die
Signaltransduktion und CD16-Regulation**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Nicole Stephanie Hassold

aus Dinkelsbühl

Würzburg, **September 2011**

Referent : Prof. Dr. H. Einsele

Koreferent : Priv.-Doz. Dr. J. Wischhusen

Dekan : Prof. Dr. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung : 22.12.2011

Die Promovendin ist Ärztin

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG	1
1.1 Natürliche Killer-Zellen	2
1.2.1 Zytotoxizität.....	3
1.2.2 Zytokinproduktion	4
1.2.3 NK-Zell-Rezeptoren und Signalwege	5
1.2 Dasatinib	10
1.3 Zielsetzung	11
2 MATERIAL UND METHODEN	12
2.1 Material	12
2.1.1 Reagenzien, Kits	12
2.1.2 Antikörper.....	14
2.1.3 Puffer, Medien und Lösungen	15
2.1.4 Geräte	16
2.2 Methoden	20
2.2.1 Gewinnung von Lymphozyten aus Leukozytendepletaten	20
2.2.2 Expansion von natürlichen Killerzellen	21
2.2.3 Durchflusszytometrie	22
2.2.4 Zytotoxizitätsversuche	23
2.2.5 Zytokin- und Degranulationsversuche.....	25
2.2.6 Rezeptorexpressionsversuche	26
2.2.7 Western Blot, SDS-Page.....	26
2.2.8 Statistische Auswertung	28
3 ERGEBNISSE	30
3.1 Effekte von Dasatinib auf die Zytotoxizität	30
3.1.1 Inhibition der Zytotoxizität gegenüber Daudi-Zellen in Anwesenheit von Dasatinib.....	30

3.1.2 Steigerung der Zytotoxizität gegenüber b2m ⁺ /-Daudi-Zellen durch Vorbehandlung mit Dasatinib	32
3.1.3 Reversibilität der Zytotoxizitätssteigerung nach erneuter Dasatinib-Exposition	35
3.1.4 Effekte der Dasatinib-Vorbehandlung der Daudi-Zellen auf die NK-vermittelte Zytotoxizität.....	37
3.2 Steigerung der Degranulation und Zytokinproduktion der NK-Zellen durch Dasatinib-Vorbehandlung.....	39
3.3 Effekte von Dasatinib auf die Regulation von NK-Zell-Rezeptoren	42
3.3.1 Unveränderte Expression von NKG2D und LFA-1 nach Dasatinibbehandlung	42
3.3.2 Modulation der CD16-Regulation nach Dasatinib-Vorbehandlung	43
3.4 Einflüsse von Dasatinib auf Signalwege der NK-Zellen.....	45
3.4.1 Inhibition der Phosphorylierung von Tyrosinkinase durch Dasatinib.....	45
3.4.2 Analyse der Vav, Erk, p38 und Akt-Phosphorylierung nach Vorbehandlung mit Dasatinib	48
4 DISKUSSION	52
4.1 Inhibition von NK-Zellen in Gegenwart von Dasatinib	52
4.2 Verstärkung der NK-Zell-Funktionen durch Vorbehandlung mit Dasatinib	53
4.3 Klinische Relevanz und Ausblick	57
5 ZUSAMMENFASSUNG	60
6 ABBILDUNGEN UND TABELLEN	62
7 LITERATURVERZEICHNIS	64

1 EINLEITUNG

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) sind Zellen des angeborenen Immunsystems. Neben ihrer direkten zytotoxischen Wirkung auf durch Pathogene veränderte Körperzellen oder Tumorzellen sind NK-Zellen durch ihre Zytokinproduktion auch wichtige Bindeglieder zum adaptiven Immunsystem. Sie spielen eine zentrale Rolle bei der Erkennung und Eliminierung von Tumorzellen, sowie insbesondere auch bei der Bekämpfung von Leukämien und Lymphomen. Trotzdem konnten bisher mit Therapieansätzen unter Verwendung autologer NK-Zellen keine durchschlagenden Erfolge erzielt werden, so dass neue Wege in der auf NK-Zellen basierenden Anti-Tumor-Therapie notwendig sind. Vor allem die pharmakologische *in vivo* Modulation von NK-Zellen mit dem Ziel der Verstärkung der Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen kann hier ein Ansatz sein. Für immunregulatorische Chemotherapeutika wie Ciclosporin A, Lenalidomid oder den CD20-Antikörper Rituximab wurde bereits *in vitro* und z.T. auch *in vivo* eine Steigerung der zytotoxischen NK-Funktionen gezeigt (Wang 2007, Bhat 2007, Wu 2008). Auch Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI) wie Dasatinib könnten einen immunmodulatorischen Effekt auf NK-Zellen haben. Dasatinib greift nicht nur die für Lymphome oder Leukämien essentielle Tyrosinkinase wie z.B. Bcr/Abl an, sondern wirkt an einer Vielzahl von Tyrosinkinasen, insbesondere Src-Kinasen, die wesentliche Bestandteile der Signaltransduktion von aktivierenden aber auch inhibierenden Signalwegen von NK-Zellen darstellen (Bantscheff 2007, siehe auch Kapitel 1.2). Es wurde bereits gezeigt, dass die Zytotoxizität von NK-Zellen bei Kurzzeitbeobachtungen *in vitro* und im Mausmodell stark gehemmt wird (Blake 2009, Salih 2010). Im Gegensatz dazu wurde aber bei Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie (CML) bzw. Philadelphia Chromosom positiver akuten Leukämie, die mit Dasatinib behandelt wurden, eine bisher nicht genauer verstandene Expansion sowohl von NK-Zellen als auch von CD8-positiven großen granulären Lymphozyten (engl. large granular lymphocytes, LGL) beobachtet (Mustjoki 2009, Kreutzman 2010).

1.1 Natürliche Killer-Zellen

NK-Zellen, die etwa 5-15% der mononukleären Zellen des peripheren Blutes ausmachen (Caligiuri 2008), sind Lymphozyten des unspezifischen Immunsystems, deren Hauptaufgabe in der Erkennung und Eliminierung infizierter und anderweitig veränderter Körperzellen besteht. Kärre (Kärre 2002) postulierte die „missing-self“-Hypothese für NK-Zellen, wonach gesunde kernhaltige Körperzellen auf Grund der Expression von Haupthistokompatibilitätskomplex („major histocompatible complex“ MHC) Klasse-I-Molekülen, die wiederum zelleigene Peptide präsentieren, als „selbst“ erkannt werden. Fehlen MHC-Klasse-I-Moleküle auf Zellen, erkennen NK-Zellen diese nicht als „selbst“ und somit als Zielzelle. Infizierte Zellen und Tumorzellen nutzen die Abwesenheit von MHC-Molekülen um das Immunsystem zu umgehen (Smyth 2000). NK-Zellen nehmen somit eine Schlüsselrolle in der Bekämpfung von Pathogenen und Tumorzellen ein (Smyth 2002). Darüber hinaus sind sie über ähnliche Mechanismen ebenfalls an der Entstehung von Autoimmunkrankheiten beteiligt (Flodström-Tullberg 2009). Durch die Zytokinproduktion und durch Zell-Zell-Kontakte erhalten NK-Zellen eine zweite wichtige Funktion als regulatorische Zellen und fungieren als Bindeglied zwischen angeborenem und adaptativen Immunsystem. So interagieren NK-Zellen beispielsweise am Entzündungsherd und in Lymphknoten mit Dendritischen Zellen (DZ), die wiederum T-Zellen aktivieren (Cooper 2004, Degli-Esposti 2005, Moretta 2006).

NK-Zellen werden durch die Abwesenheit von CD3 und die Expression von CD56, die 149 kDa Isoform des neuronalen Adhäsionsmoleküls (neuronal cell adhesion molecule NCAM) klassifiziert (Caligiuri 2008, Lanier 1989). Ein weiteres für NK-Zellen charakteristisches Oberflächenmolekül ist der Immunglobulin G-(IgG) Rezeptor FcR γ (CD16). Der zur Familie der „natural cytotoxicity receptors“ (NCR) gehörende Rezeptor NKp46 scheint neueren Erkenntnissen zufolge speziesübergreifend bisher der spezifischste Rezeptor zur Identifikation von NK-Zellen zu sein (Sivori 1997, Walzer 2007, Caligiuri 2008). Etwa 95% der peripheren NK-

Zellen weisen nur eine geringe Expression von CD56 auf und werden daher auch als $CD56^{\text{dim}} CD16^+$ NK-Subpopulation bezeichnet. Diese Zellen besitzen zahlreiche Perforin-haltige Granula und zeichnen sich daher durch eine hohe zytotoxische Aktivität aus. Sie sezernieren jedoch nur geringe Mengen an Zytokinen. Im Gegensatz dazu produziert die Subpopulation der NK-Zellen, welche CD56 in hohem Maße exprimieren, dafür aber kaum oder kein CD16, die $CD56^{\text{bright}} CD16^-$ Zellen, deutlich mehr Interferon(IFN) γ und Tumornekrosefaktor (TNF) α (Cooper 2001, Poli 2009, Wilk 2008). Um Zielzellen zu erkennen besitzen NK-Zellen eine Vielzahl inhibitorischer und aktivierender Rezeptoren, durch deren Zusammenspiel die Aktivierung der NK-Zellen geregelt wird (siehe Kapitel 1.2.3).

1.2.1 Zytotoxizität

NK-Zellen verfügen über verschiedene Zytotoxizitätsmechanismen. Es wird die gerichtete Exozytose zytotoxischer Granula, welche Perforin und Granzyme als lytische Proteine enthalten, und die über so genannte Todesrezeptoren vermittelte Apoptoseinduktion unterschieden. Daneben kann die Zytotoxizität auch über Antikörper vermittelt werden, die an niedrig-affine IgG-Rezeptoren (CD16) binden (antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC). Zielzellen, an welche spezifische IgG-Antikörpern gebunden sind, können so von NK-Zellen erkannt und eliminiert werden (Caliguri 2008).

Als initialer Schritt der zytotoxischen Aktivität wird eine so genannte immunologische Synapse (IS) zwischen NK-Zelle und Ziel-Zelle gebildet. Erst durch diese Konjugatbildung ist die NK-Zelle in der Lage anhand des Zusammenspiels von aktivierenden, co-aktivierenden und inhibierenden Rezeptor-Liganden-Paaren gesunde Körperzellen von veränderten Zellen zu unterscheiden (Orange 2008). Bei Überwiegen der aktivierenden Signale kommt es zu einer Stabilisierung der IS vermittelt durch Integrine wie das Lymphozyten-Funktions-Antigen 1 (LFA-1, CD11a/CD18) und den Makrophagen-Rezeptor-1 (MAC-1, CD11b/CD18). Es erfolgt eine auf die IS gerichtet Aktin-Reorganisation,

eine Anreicherung der IS mit aktivierenden Rezeptoren und Signalmolekülen, wie z.B. Lck, sowie eine Polarisation des Mikrotubuli-Strukturzentrums und der lytischen Granula. Schließlich erfolgt die Fusion der Granula mit der Zellmembran und die Ausschüttung von Perforin und Granzymen in den intrazellulären Spalt (Bryceson 2005, Davis 2002, Vyas 2002, Orange 2008). Mit der Degranulation gelangen CD107a/b-Antigene auf die NK-Zelloberfläche, welche als Degranulationsmarker erfasst werden können (Bryceson 2005, Uhrberg 2005). Nach dem bisherigen Modell bilden Perforine in Anwesenheit von Ca^{2+} Polymere, die in der Membran der Zielzelle Poren bilden, durch welche extrazelluläre Flüssigkeit in die Zelle eindringt, wodurch die Integrität der Zelle verloren geht und Granzyme in die Zelle gelangt. Ein zweites Modell favorisiert die gemeinsame Aufnahme von Perforin und Granzym in die Zielzelle in Form von endozytotischen Vesikeln. (Voskoboinik 2010). Zudem konnte eine rezeptorabhängige Aufnahme von Granzymen über den Mannose-6-Phosphat-Rezeptor nachgewiesen werden (Veugelers 2006, Motyka 2000). Die Granzyme wiederum induzieren in der Zielzelle über Caspasen vermittelte Apoptose (Boivin 2009).

Ein weiterer Zytotoxizitätsmechanismus wird über Todesrezeptoren vermittelt: Das zur TNF-Gruppe zählende Protein FasL (CD95L) bindet an den Fas-Rezeptor, der auf Zielzellen exprimiert ist. Über intrazytoplasmatische Todesdomänen wird ebenfalls über Kaspasen die Apoptose eingeleitet. Die Wirkung von „TNF-related apoptosis-inducing ligand“ (TRAIL), welcher vor allem von unreifen NK-Zellen exprimiert wird, wird ebenfalls über Todesdomänen vermittelt (Zamai 1998, Oshima 2001).

1.2.2 Zytokinproduktion

NK-Zellen sezernieren eine Vielzahl von Zytokinen wie z.B. $IFN-\gamma$, $TNF-\alpha$ und $-\beta$, Transforming-Growth-Factor (TGF)- β , Granulozyten/Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF) und eine Vielzahl an Interleukinen (Fauriat 2010, Robertson 2002, Loza 2002). Hierdurch sind NK-Zellen ein wichtiges

Bindeglied zum adaptiven Immunsystem. Die Ausschüttung von IFN γ und TNF α erfordert mindestens zwei Signale. IL-12 ist ein Hauptvermittler der IFN γ Ausschüttung. Als zweites Signal können entweder die Interleukine IL-1, IL-2, IL-15 oder IL-18 bzw. aktivierende Rezeptoren wie CD16 oder NKG2D fungieren. (Caligiuri 2008, Bryceson 2005, Tomescu 2009). IFN γ besitzt antivirale Eigenschaften und steigert die Expression von MHC-Molekülen auf der Zelloberfläche (Schroder 2004). Bisher wurden CD56^{bright} NK-Zellen als Hauptproduzenten von Zytokinen angesehen. Neuere Untersuchungen belegten allerdings, dass insbesondere nach Stimulation mit Zielzellen IFN γ und TNF α auch durch die zahlenmäßig überlegenen CD56^{dim} NK-Zellen ausgeschüttet werden (Fauriat 2010, Zhang 2010).

1.2.3 NK-Zell-Rezeptoren und Signalwege

Um gesunde Körperzellen von infizierten oder veränderten Zellen unterscheiden zu können, besitzen NK-Zellen eine Vielzahl an inhibitorischen, aktivierenden und koaktivierender Rezeptoren (**Tab 1** und **2**). Aktivierende Rezeptoren erkennen vor allem Stress-Moleküle und „nicht-selbst“-Moleküle wie z.B. viral kodierte Proteine (Raulet 2007). Im Gegensatz zu T-Zellen, bei welchen ein dominanter Rezeptor die Aktivierung bzw. Hemmung bestimmt, entscheidet bei NK-Zellen vielmehr das komplexe Zusammenspiel der beteiligten inhibitorischen und aktivierenden Rezeptoren und die Summe der nachfolgenden hemmenden und aktivierenden Signalwege über die weitere Reaktion der NK-Zelle (Bryceson 2006, Lanier 2008).

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

Tab. 1 Inhibierende NK-Zell- Rezeptoren und ihre Liganden

(nach Empson 2009)

Aktivierende Rezeptoren	Liganden
2B4 (CD244)	CD48
BY55 (CD160)	HLA-C
CD2	LFA-3 (CD58)
CD7	SECTM1, Galectin-1
CD11c/18	ICAM-1, iC3b
CD16 (Fc γ R1IIIA)	IgG
CD44	Hyaluronsäure
CD59	C8, C9
CRACC (CD319)	CRACC (CD319)
DNAM-1 (CD226)	PVR (CD155), CD112
KIR2DL4 (CD158d)	HLA-G
KIR2DS1-2	HLA-C (niedrig affin)
KIR2DS3-6	Unbekannt
KIR3DS1	Unbekannt
LFA-1 (α L β 2, CD11a/18)	ICAM-1-5
MAC-1 (α L β 2, CD11b/18)	ICAM-1, iC3b, Fibrinogen
NKG2C (CD94/159c)	HLA-E
NKG2D (CD314)	ULBPs, MICA, MICB
NKp30 (CD337)	BAT-3
NKp44	virales Hämagglutinin
NKp46 (CD335)	virales Hämagglutinin
NTBA	NTBA
VLA-4 (α 4 β 1, CD49d/29)	VCAM-1, Fibronectin
VLA-5 (α 5 β 1, CD49e/29)	Fibronectin

Tab. 2 Aktivierende NK-Zell-Rezeptoren und ihre Liganden

(nach Empson 2009)

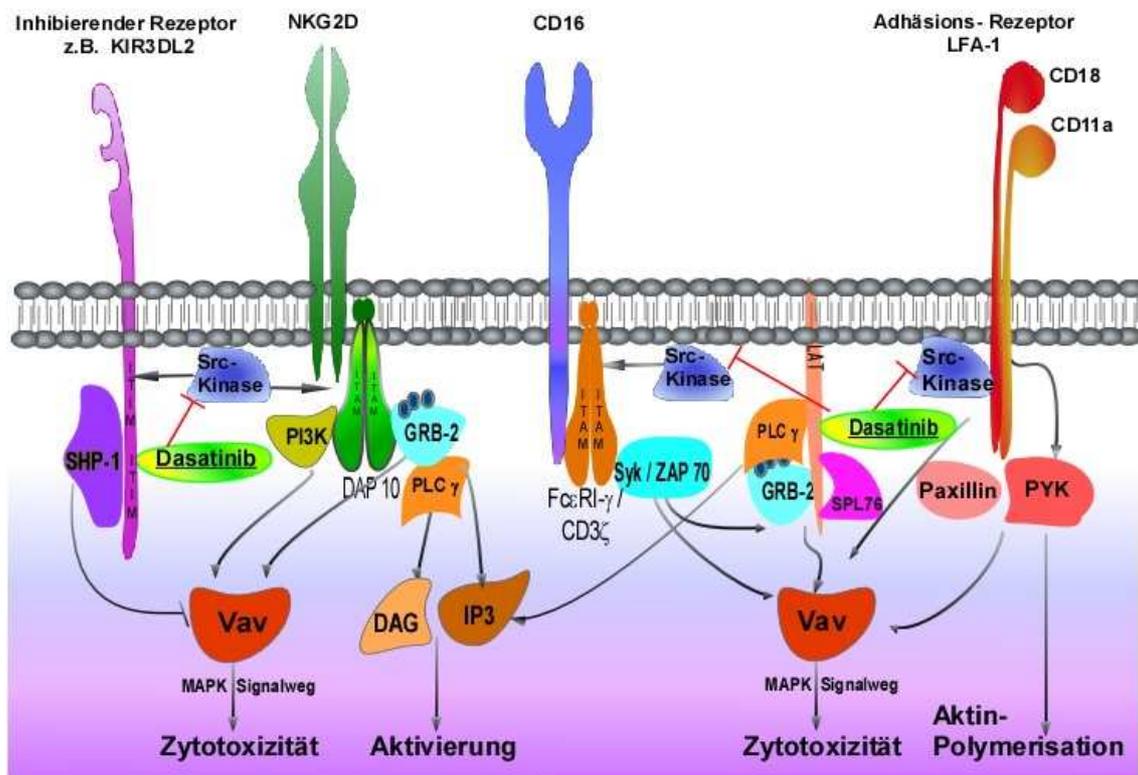


Abb. 1 Signalwege von NK-Zell-Rezeptoren

Dasatinib inhibiert Src-Kinasen, die sowohl an der Vermittlung aktivierender als auch inhibierender Signale beteiligt sind.

NKG2D

Einer der wichtigsten und am besten untersuchten aktivierenden Rezeptoren ist der „natural killer group 2D“- (NKG2D) Rezeptor, der neben NK-Zellen auch von verschiedenen T-Zellen wie NKT-Zellen, cytotoxischen CD8⁺-T-Zellen und $\gamma\delta$ -T-Zellen exprimiert wird (Bauer 1999). NKG2D-Rezeptoren, die zur Gruppe der „C-type lectin-like“-Rezeptoren gehören (Li 2008), sind auf der Oberfläche fast sämtlicher NK-Zellen vorhanden und können durch verschiedene Zytokine wie IL-12 und IL-15 heraufreguliert werden (Sutherland 2006, Zhang 2008). Bisher bekannte NKG2D-Liganden sind die nicht-klassischen MHC-Moleküle MIC („MHC-class-I chain-related“)-A, -B und -C sowie die UL-16-Bindungsproteine (ULBP)1-5. Diese Liganden werden bei viraler Infektion oder maligner

Transformation als Stressmoleküle vermehrt exprimiert (Sutherland 2006, Eagle 2009, Chalupny 2003). Nach Ligandenbindung an NKG2D wird zunächst über das transmembrane Adaptormolekül DAP10 die Phosphorylierung des Proteins Grb2 vermittelt, gefolgt von der Phosphorylierung von Vav. Die weiteren Signalwege sind noch nicht endgültig geklärt. Neben dem Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K)/Akt-Signalweg spielen auch der „mitogen activated protein kinase“ (MAPK)/„extracellular-signal related“ (Erk)-Signalweg, sowie die Signalkaskaden über die Phospholipase-C- γ eine Rolle (Lanier 2008, Giurisato 2007, Upshaw 2006, **Abb.1**). Die Bindung von Liganden an NKG2D alleine führt noch nicht zur Degranulation, sondern zunächst zu einer Aktivierung der NK-Zelle. Erst zusammen mit weiteren aktivierenden bzw. costimulierenden Rezeptoren wie z.B. dem Rezeptor 2B4 kommt es zur Degranulation bzw. Ausschüttung von Zytokinen (Bryceson 2006).

LFA-1

Das β_2 -Integrin LFA-1, ein Dimer bestehend aus CD11a und CD18, fungiert auf NK-Zellen als Adhäsions-Rezeptor, indem es „intracellular adhesion molecules“ (ICAM) 1-5 als Liganden auf den Zielzellen erkennt. LFA-1 ist daher für frühe Signale in der Erkennung von Zielzellen und der Ausbildung der IS verantwortlich (Barber 2004). Die LFA-1 vermittelte Adhäsion ist von Src-Kinasen wie Fyn und Lck, welche direkte Dasatinib-Zielmoleküle sind, abhängig (Barber 2003, Shibuya 1999, **Abb.1**). Auch die über Vav und den MAPK/Erk-Signalweg vermittelte Aktivierung zytolytischer Funktionen, insbesondere im Zusammenspiel mit anderen aktivierenden Rezeptoren wie „DNAX accessory molecule“ (DNAM)-1, ist für LFA-1 beschrieben (Perez 2004, Shibuya 1999).

CD16

CD16 (Fc γ III) ist ein niedrig-affiner Rezeptor für das Fragment c (Fc) von IgG, der neben NK-Zellen, in besonders hohem Maße von CD56^{dim} NK-Zellen, auch von Monozyten exprimiert wird (Bryceson 2006). CD16 ist mit den Adaptormolekülen CD3 ζ bzw. Fc ϵ RI- γ assoziiert (Lanier 2009), welche drei (CD3 ζ) bzw. ein (Fc ϵ RI- γ) ITAM („immunoreceptor tyrosine activating motif“)

enthalten. Die Tyrosin-haltigen ITAMs werden durch Src-Kinasen phosphoryliert. Daraufhin werden die Proteinkinasen Syk und ZAP-70 gebunden und eine Vielzahl von Signalmoleküle, u.a. PLC- γ , PI3K und Vav aktiviert (Lanier 2009, Salcedo 1993, **Abb.1**). Im Gegensatz zu den meisten anderen aktivierenden Rezeptoren kann CD16 ohne die Hilfe weiterer Rezeptoren bzw. Co-Rezeptoren sowohl die ADCC-vermittelte Zytolyse als auch die Zytokinproduktion induzieren (Bryceson 2006).

1.2 Dasatinib

Dasatinib (BMS-354825; Bristol-MyersSquibb) ist ein oral verfügbarer Inhibitor der Bcr/Abl-Kinase. Seit 2006 ist Dasatinib unter dem Handelsnamen Sprycel® zur Behandlung der Imatinib-resistenten CML zugelassen, welche durch die reziproke Translokation t(9;22), das Philadelphia(Ph)-Chromosom, charakterisiert ist (Weisberg 2007). Das Ph-Chromosom kodiert das Fusionsprotein Bcr/Abl. Dasatinib ist im Gegensatz zu Imatinib kein selektiver Bcr/Abl-Inhibitor, sondern auch ein hochpotenter Inhibitor von Src-Kinasen wie c-Src, Lck, Fgr, Fyn, Hck, Lyn, Frk, Yes1 und Csk (Das 2006, Rix 2007). Andere bekannte Zielmoleküle sind z.B. die Tec-Kinasen Tec, Bmx, und Btk, sowie die DDR1-Kinase. Daneben bindet Dasatinib auch an mehrere nicht-Kinase Proteine wie z.B. die Src-homologe Inositolphosphatase 2 (SHIP-2) oder die Adapterproteine Grb2 und c-Cbl (Rix 2007), welche auch im Signalweg von NK-Rezeptoren eine Rolle spielen (Graham 2006). Anders als Imatinib vermag Dasatinib auch an die aktivierte Konformation der Abl-Kinase zu binden. Die Verabreichung von Dasatinib erfolgt je nach Studie 1-2mal täglich in Dosen von 70-100 mg. Hierdurch wird bei einer Plasma-Halbwertszeit von 3-4 h eine maximale Plasmakonzentration von 90 nM erreicht (Weisberg 2007). Bei der in aktuellen Studien üblichen einmal täglichen Gabe des Medikaments müssen somit bei der Untersuchung von Dasatinib-Effekten auf Immunzellen Kurz- und Langzeiteffekte betrachtet werden (Shah 2008).

1.3 Zielsetzung

Der Multikinase-Inhibitor Dasatinib könnte durch seine potentielle immunmodulatorische Wirkung auf NK-Zellen neue Therapiestrategien zur Behandlung von malignen Erkrankungen aber auch Autoimmunerkrankungen eröffnen. Ein weitergehendes Verständnis der Effekte von Dasatinib auf NK-Zellen birgt die Chance den bereits klinisch bewährten Einsatz von Dasatinib in der CML-Therapie weiter zu optimieren. Bisher sind die Wirkungsmechanismen von Dasatinib auf NK-Zellen noch unvollständig untersucht. Bei Patienten wurde eine Expansion von NK-, bzw. NKT-Zellen *in vivo* während der Dasatinib-Therapie beobachtet, was mit einer besseren Prognose assoziiert war (Kim 2009, Mustjoki 2009). Des weitern konnten bereits inhibierende Effekte von Dasatinib auf die Zytotoxizität von NK-Zellen *in vitro* nachgewiesen werden (Blake 2008, Salih 2010). Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Einflüsse von Dasatinib auf verschiedene Effektorfunktionen von NK-Zellen sowie die verantwortlichen Mechanismen untersucht. Aufbauend auf der Arbeit von K. Seystahl (Seystahl 2010), die inhibitorische Kurzzeiteffekte von Dasatinib auf die zytotoxische Funktion von polyklonalen *in vitro* expandierten NK-Zellen gegenüber der myeloischen Zelllinie K562-Zellen beobachtete, sollten diese Erkenntnisse auf die Burkitt-Lymphom-Zelllinie Daudi ausgedehnt werden. Daudi-Zellen zeigen im Gegensatz zu K562-Zellen trotz ihrer defizienten MHC-I-Expression (siehe Kapitel 2.1.6) eine relative Resistenz gegenüber NK-Zell vermittelter Lyse (Seong 1988). Für die *in vitro* Experimente wurden klinisch relevante Dasatinib-Konzentrationen von 10 nM und 50 nM verwendet, was bei der derzeit gängigen Dosierung etwa der Talkonzentration und einer hohen durchschnittlichen Konzentration entspricht (Wang 2008). Ein weiteres Ziel war die Evaluation von zeitabhängigen Effekten auf die NK-Zell-Funktionen, insbesondere die Einflüsse einer 24 h Vorbehandlung der NK-Zellen mit Dasatinib als *in vitro* Modell für die therapeutische einmal tägliche Gabe des Medikaments. Zu diesem Zweck wurden FACS-basierte Zytotoxizitäts- und Zytokinversuche durchgeführt. Im Zuge dieser Arbeit sollten die verantwortlichen Mechanismen dieser Effekte

beleuchtet werden. Mögliche Einflüsse von Dasatinib auf die Expression verschiedener NK-Zell-Rezeptoren wie NKG2D, LFA-1 und CD16 wurden mittels FACS-Analyse untersucht. Um Einflüsse auf die intrazelluläre Signaltransduktion zu eruieren, wurden Analysen der Phosphorylierung der für NK-Zellen relevanten Signalmoleküle, insbesondere Lck, Erk, Akt, Vav und p38 mittels Western Blot durchgeführt.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Reagenzien, Kits

Albumin Fraktion V, biotinfrei	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
Aprotinin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Beriglobin	CSL Behring, Marburg
BioRad D _c Protein Assay Reagent A, B, C	BioRad, München
Brefeldin A	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
CFSE (Carboxyfluoreszein-Succinimidyl-Ester)	Invitrogen, Karlsruhe
Cell Proliferation Kit	
Cytoperm/ Cytifix	R & D, Minneapolis, USA
Desoxycholsäure, Natriumsalz	Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Apotheke der Universitätsklinik Würzburg
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Fetal Bovine Serum (FCS), Lot K0036280	PAN Biotech, Aidenbach
Golgi Stop	BD, San Jose, USA
L-Glutamin 200 nM	PAN Biotech, Aidenbach
Luminol	Roth, Karlsruhe
Magermilchpulver	TSI, Zewen

MagicMark XP	Invitrogen, Karlsruhe
Methanol	Applichem, Darmstadt
3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure (MOPS)	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumfluorid (NaF)	Roth, Karlsruhe
Natriumorthovanadat (Na ₃ VO ₄)	Applichem, Darmstadt
Nonidet 40	Applichem, Darmstadt
NuPage Sample Reducing Agent	Invitrogen, Karlsruhe
NuPage LDS Sample Buffer	Invitrogen, Karlsruhe
p-Kumarinsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Pancoll, Dichte 1,077 g/ml	PAN Biotech, Aidenbach
Paraformaldehyd (PFA)	Roth, Karlsruhe
Penicillin 10.000 U/ml / Streptomycin 10 mg/ml	PAN Biotech, Aidenbach
Phenylmethylnsulfonfluorid (PMSF)	Roth, Karlsruhe
Phorbolmyristataacetat (PMA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PKH-26 Red Fluorescent Cell Linker Mini Kit	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ponceau S	Sigma- Aldrich, Taufkirchen
Rothiphorese Gel 30 (37, 5:1)	Roth, Karlsruhe
SeeBlue Plus2 Prestained Standard	Invitrogen, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Applichem, Darmstadt
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
TGF-β1	PeproTech, Hamburg
Tris (hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) Ultra	Roth, Karlsruhe
Tween 20 (Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat)	Applichem, Darmstadt
Trypanblau	Roth, Karlsruhe

Dasatinib (BMS-354825, Sprycel®) wurde von Dr. E. Greiner und Dr. J. Zezula (NIH, Bethesda, MD, USA) gemäß dem veröffentlichten Protokoll (Lombardo 2004) synthetisiert und hinsichtlich Reinheit und Identität analysiert. Als Lösemittel diente DMSO, welches auch in äquivalenter Menge als Kontrolle in allen Versuchen verwendet wurde. Dasatinib wurde im Rahmen einer Vereinbarung zur Weitergabe von Biomaterialien („Material Transfer Agreement“)

zwischen der Universitätsklinik Würzburg und den National Institutes of Health (NIH), Bethesda, MD, USA erhalten (Weichsel 2008).

2.1.2 Antikörper

Antikörper	Isotyp	Klon	Hersteller
CD3 Peridinin-Chlorophyl-Protein (PerCP)	Maus IgG1 γ	SK7	BD Bioscience, Heidelberg
CD3 Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)	Maus IgG1 γ	SK7	BD Bioscience, Heidelberg
CD3 FITC	Maus IgG2a	BW264/56	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CD11a Phycoerythrin (PE)	Maus IgG1	HI111	BioLegend, San Diego, USA
CD14 PE	Maus IgG2a	TÜK4	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CD16 Allophycocyanin (APC)	Maus IgM	VEP-13	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CD16 PerCP	Maus IgG1 γ	3G8	BioLegend, San Diego, USA
CD18 PE	Maus IgG1	TS1/18	BioLegend, San Diego, USA
CD56 APC	Maus IgG1 γ	N-CAM	BD Bioscience, Heidelberg
CD56 APC	Maus IgG1	AF12-7H3	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CD107a FITC	Maus IgG1 γ	H4A3	BD Bioscience, Heidelberg
CD107b FITC	Maus IgG1 γ	H4A4	BD Bioscience, Heidelberg
CD314 (NKG2D) PE	Maus IgG1	BAT221	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
INF γ PE	Maus IgG1 γ	B27	BD Bioscience, Heidelberg
Mouse IgG1 PE	Maus IgG1	MOPC-21	BioLegend, San Diego, USA
Mouse IgG1 PE	Maus IgG1	IS5-21F5	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
TNF α PE	Maus IgG1 γ	MAB11	BD Bioscience, Heidelberg

Tab. 3 Verwendete FACS-Antikörper

Antikörper	Isotyp	Hersteller
Akt	Kaninchen IgG	Cell Signaling, Danvers, USA
Beta-Actin	Maus IgG	Cell Signaling, Danvers, USA
Erk	Kaninchen IgG	Cell Signaling, Danvers, USA
Lck	Kaninchen IgG	Cell Signaling, Danvers, USA
P38 MAPK	Kaninchen IgG	Cell Signaling, Danvers, USA
pAkt	Kaninchen IgG	Cell Signaling, Danvers, USA
pErk	Kaninchen IgG	Cell Signaling, Danvers, USA
pLck	Kaninchen IgG	Cell Signaling, Danvers, USA
pp38 MAPK	Maus IgG	Cell Signaling, Danvers, USA
pTyr (pY99)	Maus IgG	Santa Cruz, Santa Cruz, USA
pTyr (pY20)	Maus IgG	Santa Cruz, Santa Cruz, USA
Vav	Kaninchen IgG	Cell Signaling, Danvers, USA
pVav pY174	Kaninchen IgG	Abcam, Cambridge, UK
pVav pY160	Kaninchen IgG	Abcam, Cambridge, UK
HRP- ("horse radish peroxidase" Meerrettich-peroxidase) Anti-Maus	Schaf IgG *	GE Healthcare, Freiburg
HRP- Anti-Kaninchen	Schaf IgG *	GE Healthcare, Freiburg

Tab. 4 Verwendete Western-Blot-Antikörper

*: polyklonale Antikörper, alle übrigen aufgeführten Antikörper sind monoklonal

2.1.3 Puffer, Medien und Lösungen

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)	PAN Biotech, Aidenbach
Lysis Buffer	BD Science, Heidelberg
RPMI 1640 (Hydrogencarbonat-Phosphatpuffer)	PAN Biotech, Aidenbach

- R10 Medium: RPMI 1640, 10% FCS, 2 mM L-Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin
- Einfriermedium: FCS, 10% DMSO
- FACS- Puffer: PBS, 0,2% BSA

- RIPA Lyse-Puffer: 50 mM Tris Ultra, 1% NP-40, 0,25 Natriumdesoxycholat, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 µg/ml Aprotinin/ Leupeptin/ Pepstatin, 1 mM Natriumorthovanadat, 1mM NaF, pH 7, 4
- Sammelgel für 1 Gel: 0,83 ml Rotiphorese 30, 0,58 ml TRIS pH 6,8 1 M, 3,5 ml H₂O, 50 µl 10% SDS, 50 µl 10% APS, 2, 5 µl TEMED
- Trenngel für 1 Gel: 3,3 ml Rothiphorese 30, 3,8 ml TRIS pH 8,8 1 M, 2,9 ml H₂O, 100 µl 10% SDS, 100 µl 10% APS, 5 µl TEMED
- MOPS Gellaufpuffer: H₂O, 1,0 M MOPS, 1,0M Tris Ultra, 69,3 mM SDS, 20,5 mM EDTA
- Transferpuffer 10x: 500 ml H₂O, 15,14 g TRIS, 72 g Glycin, 0,5 g SDS
- Transferpuffer 1x: H₂O, 10% Transferpuffer 10x, 10% Methanol für 1 Gel
20% Methanol für 2 Gele
- TBST-Puffer (Tris-buffered Saline Tween-20): H₂O, 20 mM Tris Ultra, 150 mM NaCl, pH 7,5, 0,05-0,1% Tween-20
- "Stripping Buffer": H₂O, 100 mM 2-Mercaptoethanol, 2% SDS, 62,5 mM Tris pH 6,8
- "Enhanced Chemoluminescence" (ECL) Lösung: ECL A: B 9:1, 0,003% H₂O₂ (30%)
- ECL A : 200 ml 0,1 M TRIS pH8, 6,5 mg Luminol
- ECL B: 10 ml DMSO, 11 mg para-Hydroxykumarinsäure

2.1.4 Geräte

Analysenwaage, d=0,0001 g	Sartorius, Göttingen
Analysenwaage, d=0,1 g	Kern&Sohn, Balingen
Blotting Modul XCell Blot Module	Invitrogen, Karlsruhe
Brutschrank, Hera Cell 150	Thermo Electron, Langenselbold
Durchflusszytometer, FACS Calibur	BD Science, Heidelberg
Filmentwickler	Agfa, Düsseldorf
Gelelektrophoresekammer	Invitrogen, Karlsruhe
XCell SureLock Mini-Cell	
Gefrier/Kühlschrank (-20°C/4°C)	Liebherr, Ochsenhausen

Heizblock, neoBlock 1	neoLab, Heidelberg
Heiz-/Rührplatte, MSH basic	IKA Werke, Staufen
Mehrkanalpipette, Research Pro 100µl	Eppendorf, Hamburg
Mikroskop, inverses, 5x,10x,40x	Leica, Solms
Mikrozentrifuge, Sigma 1-14	Sigma, Taufkirchen
Mikroplatten-Reader, Model 680	BioRad, München
Neubauerzählkammer	Hartenstein, Würzburg
pH-Meter, pH 211	Hanna, Kehl am Rhein
Pipetten 1-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipetten 2-20 µl, 20-200 µl	Gilson, Middleton, USA
Pipetierhilfe	Hirschmann, Eberstadt
Röntgengerät RT 200	C.H.F. Müller, Hamburg
Spannungsquelle , PowerEase 500	Invitrogen, Karlsruhe
Sterilwerkbank, Hera safe	Thermo Electron, Langenselbold
Stickstofftank (-160 - 180°C)	tec-lab, Königsstein
Vortexer, Vortex Genie2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Wasserbad, WB/OB 7-45	Memmert, Schwabach
Wippschüttler, MR-1	Hartenstein, Würzburg
Zentrifuge, Heraeus Multifuge 3 S-R	Thermo Electron, Langenselbold

2.1.5 Verbrauchsmaterialien

6-, 24-, 96-well (Vertiefungen)-Platten	Falcon, BD, Heidelberg
„Blue Caps“ 15ml und 50ml Röhrchen	Greiner bio-one, Frickenhausen
Einfrierröhrchen, CryoTube Vials	Nunc, Langenselbold
FACS-Röhrchen, Polysterol	Hartenstein, Würzburg
Gelkämme, 1,5 mm, 15 well	Invitrogen, Karlsruhe
Gelkassetten 1,5 mm	Invitrogen, Karlsruhe
Gelladungs-Pipettenspitzen	Hartenstein, Würzburg
Mikrotiterröhrchen	Hartenstein, Würzburg
Nitrocellulose-Tranfermembran, Protran	GE Healthcare, Freiburg
Pipettenspitzen 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Hartenstein, Würzburg

Reaktionsgefäße mit Deckel (Eppendorf), 0,5 ml, 1,5 ml	Hartenstein, Würzburg
Röntgenfilme, Super RX	Fujifilm, Düsseldorf
Stabpipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml	Corning-Costar, Corning, USA
Whatman paper	GE Healthcare, Freiburg
Zellkulturflaschen Cellstar 25 cm ² , 75 cm ² , 175 cm ²	Greiner bio-one, Frickenhausen
Zellsiebe, 70µm, Nylon	Falcon, BD, Heidelberg

2.1.6 Zelllinien

Die für die NK-Zell-Experimente ausgewählten Zelllinien unterscheiden sich in der Expression von NK-Zell-Rezeptor-Liganden (**Tab.5**), so dass Effekte auf verschiedene Aktivierungswege untersucht werden konnten.

Daudi/ Daudi β2m

Daudi-Zellen sind EBV-positive Burkitt-Lymphomzellen, die auf Grund der fehlenden β2m-Mikroglobulin-Expression keine vollständigen MHC-Klasse-I-Rezeptoren besitzen. Trotz der fehlenden MHC-Expression sind Daudi-Zellen gegenüber NK-Zellen weitestgehend resistent. Lediglich gegenüber aktivierten NK-Zellen besteht Sensitivität (Quilett 1988). In die Daudi β2m-positiven Zelllinie wurde das murine β2-Mikroglobulin transferiert, so dass diese Zellen intakte MHC-Klasse-I-Moleküle exprimieren und somit Liganden für inhibitorische KIR-Rezeptoren besitzen (Seong 1988). An bekannten NK-Zell-Rezeptor-Liganden sind für Daudi-Zellen z.B. ICAM-1 als LFA-1-Ligand und „signaling lymphocytic activating molecule“ (SLAM)-Liganden wie CD48 beschrieben. Bekannte NKG2D-Liganden werden auf Daudi-Zellen nicht exprimiert, allerdings gibt es Hinweise darauf, dass Daudi-Zellen bisher noch unbekannte NKG2D-Liganden besitzen (Giurisato 2006, Pende 2001). Die Daudi-Zelllinien wurden uns freundlicherweise von Prof. Dr. P. Fisch (Universität Freiburg) zur Verfügung gestellt.

K562

K562-Zellen, eine erythroleukämie CML-Zelllinie (Lozzio 1975), sind im Gegensatz zu Daudi-Zellen relativ sensibel gegenüber NK-Zellen. Hierzu trägt das Fehlen von MHC-Klasse-I-Rezeptoren sowie die Expression der NKG2D-Liganden MICA/B und ULBP-2 bei (Li 2008). K562-Zellen exprimieren zudem das Dasatinib Zielmolekül Bcr/Abl (Lozzio 1975, Lombardo 2004). Die verwendete K562-Zelllinie wurde uns freundlicherweise von Priv.-Doz. Dr. U. Kämmerer (Universität Würzburg) zur Verfügung gestellt.

RPMI 8866

RPMI 8866 ist eine EBV-positive humane B-Zelllinie, die als Feeder-Zellen zur Expansion von NK-Zellen eingesetzt wird. Sie produzieren IL-12, wodurch selektiv NK-Zellen stimuliert werden (Valiante 1992, Perussia 1987, Torelli 2005). Die verwendete RPMI 8866-Zelllinie wurden uns freundlicherweise von Priv.-Doz. Dr. J. Wischhusen (Universität Würzburg) zur Verfügung gestellt.

Rezeptor	Ligand	K562	Daudi	Referenz
NKG2D	ULBP2	+	-	Li 2008
	MICA/B	+	-	Eleme 2004
LFA-1	ICAM-1-5	ICAM-1	ICAM-2,-3	Perez 2004 Romanski 2005
KIR-Rezeptoren	HLA I	-	-	Seong 1988, Wang 2007
2B4	CD48	-	+	Parolini 2000 Endt 2007
CD69	CD69L	-	+	North 2009
CD161	LLT1	-	+	Azzoni 1998 Rosen 2008
DNAM-1	PVR	+	-	Fuchs 2004
	Nectin-2	+	-	Bottino 2003
TRAIL	DR4, DR5	+	+	Tafuku 2006 Hietakangas 2003

Tab. 5 NK-Zell-Rezeptor-Liganden von Daudi- und K562-Zellen

2.2 Methoden

2.2.1 Gewinnung von Lymphozyten aus Leukozytendepletaten

Für die Gewinnung peripherer Lymphozyten wurde nach schriftlichem Einverständnis das Blut gesunder Spender verwendet (Stellungnahme der Würzburger Ethikkommission 198/08, Genehmigung vom 24.02.2008). Als Ausgangsmaterial dienten Leukozytendepletate aus dem Institut für Transfusionsmedizin der Universitätsklinik Würzburg, welche als Nebenprodukt bei der Aufbereitung des gespendeten Blutes anfallen. Die durch Leukozytendepletionskammern gewonnenen Leukozytenkonzentrate sind in Zusammensetzung und Eigenschaften weitestgehend mit den so genannten „Buffy-Coats“ identisch (Dietz 2006). Der Inhalt der Depletionskammern wurde zunächst mit PBS auf 50 ml aufgefüllt und vorsichtig auf 25 ml Ficoll Gradienten-Lösung in 50 ml Falconröhrchen aufgeschichtet. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 30 min bei 1600 rpm ohne Bremse, wodurch sich eine Schichtung der Blutbestandteile entsprechend ihrer Dichte ausbildete: In der obersten Schicht befanden sich Thrombozyten und Blutplasma, darauf folgte die Lymphozytenschicht. Erythrozyten und Granulozyten setzen sich am Boden des Röhrchens ab (English 1974). Die Leukozytenschicht wurde abgenommen und zweimalig mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Lyse der noch vorhandenen Erythrozyten mit BD Lysis Buffer. Nach zwei weiteren Waschschritten mit PBS wurden die mononukleären peripheren Blutzellen („peripheral blood mononuclear cells“, PBMC) in R10-Medium aufgenommen. Zur Entfernung der CD14⁺ Monozyten wurde eine Plastikadhärenz wie beschrieben durchgeführt (Kelley 1987, Felzmann 2003). Hierzu wurden die PBMC mit einer Konzentration von $3,3 \times 10^6$ PBMC/ml in 6-well-Platten (je 1×10^7 Zellen/Vertiefung) überführt und 75 min bei 37°C/5%CO₂ im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abgenommen und die Zellkulturplatten vorsichtig mit PBS gespült. Nach einem Waschschriff mit PBS wurden die so gewonnenen Lymphozyten aus peripherem Blut („peripheral blood lymphocytes“, PBL) in R10-Medium aufgenommen.

2.2.2 Expansion von natürlichen Killerzellen

Zur Gewinnung polyklonaler NK-Zellen wurde der erstmalig von Perussia und Kollegen etablierte Expansionsansatz verwendet (Perussia 1987). Hierzu wurden RPMI 8866-Zellen, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befanden, mit 30 Gy bestrahlt und nach zweimaligem Waschen im Verhältnis 1:4 mit PBL in 24-well Platten für 8-11 Tage in R10-Medium kultiviert. An Tag 6 wurde jeweils frisches R10-Medium zugegeben. Die Reinheiten wurden erstmalig an Tag 8 bestimmt. Versuche wurden abhängig von der erzielten NK-Zell-Reinheit an Tag 8-11 der Expansion durchgeführt. Durch dieses Verfahren wurde eine NK-Zellreinheit am Versuchstag von $83 \pm 6\%$ (Mittelwert \pm Standardabweichung) erreicht (**Abb. 2**).

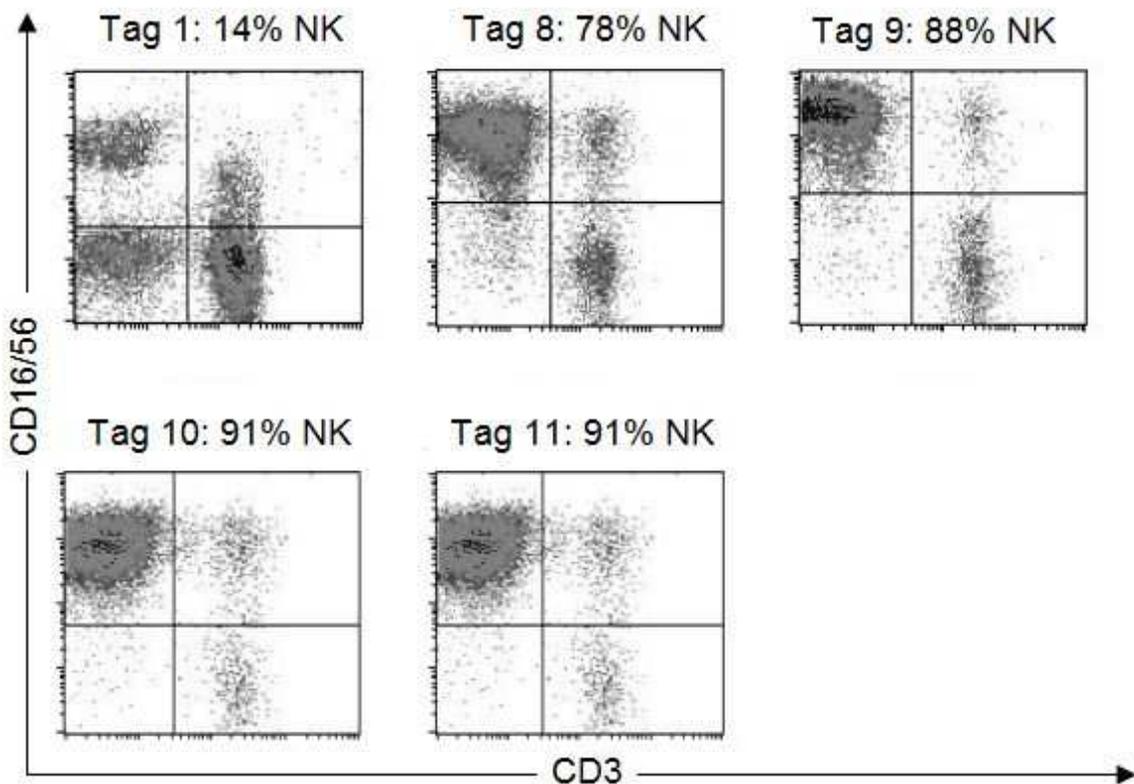


Abb. 2 Entwicklung der NK-Zell- Reinheit während der 11-tägigen Expansion mit RPMI 8866- Zellen (repräsentatives Beispiel)

2.2.3 Durchflusszytometrie

Allgemein

Die Durchflusszytometrie am „fluorescence activated cell sorter“ (FACS) ermöglicht eine Analyse der Expression bestimmter Zellmoleküle über Fluorochrom-gekoppelte monoklonale Antikörper. Das hier verwendete FACS Calibur ist mit zwei Lasern ausgestattet (488 nm Argon und 633 nm He/Ne), die bis zu 4 verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe anregen können. Diese emittieren nach Anregung Licht spezifischer Wellenlänge, welches von Photozellen in 4 Detektionskanälen registriert wird. Dadurch können die Farbe des emittierten Lichts und damit das Vorhandensein des mit diesem Farbstoff markierten Moleküls, sowie dessen Intensität, welche mit der Expressionsstärke des spezifischen Moleküls auf einer einzelner Zelle korreliert, bestimmt werden. Das Vorwärtsstreulicht (forward scatter, FSC) ermöglicht zusätzlich eine Aussage über die Größe, das Seitenstreulicht (sidescatter, SSC) über die Granularität der Zelle. Somit ist es möglich die Zellen nach Größe, Granularität und Expression bestimmter Moleküle einzuteilen. Monoklonale Antikörper, die für die durchgeführten FACS-Analysen verwendet wurden, waren mit FITC (Emissionsmaximum 530 nm), PE (Emissionsmaximum 585 nm), PerCP (Emissionsmaximum 660-680 nm), oder APC (Emissionsmaximum 767 nm) markiert. Als fluoreszierende Zellfarbstoffe kamen CFSE (Emissionsmaximum bei 517 nm) und PKH-26 red (Emissionsmaximum bei 567 nm) zum Einsatz.

Direkte FACS-Färbung

5×10^5 – 2×10^6 Zellen wurden mit FACS-Puffer in FACS-Röhrchen bei 1200 rpm für 5 min zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Eine definierte Antikörpermenge (vorher für jeden Antikörper austitriert, meist $1-20 \mu\text{l}/10^6$ x Zellen) wurde zugegeben und die Zellen 15 min im Kühlschrank bei 4°C inkubiert, erneut mit FACS-Puffer gewaschen und schließlich mit 50 μl 4%PFA fixiert. Die fixierten Zellen wurden bis zur Messung im Kühlschrank aufbewahrt.

Um unspezifische Bindungen und deren mögliche Modulation durch Dasatinib zu beurteilen, wurden Negativkontrollen mit Isotypen-Antikörpern mitgeführt.

Isotypen-Antikörper sind gegen irrelevante Antigene gerichtete monoklonale Antikörper, welche von der gleichen Spezies stammen und der gleichen Immunglobulin-Subklasse angehören wie der spezifische Antikörper. Die Expression des spezifischen Moleküls wurde auf die jeweilige Isotypen-Kontrolle bezogen.

Messung und Auswertung

Die Messung erfolgte am FACS Calibur. Die Analyse der Daten wurde mit CellQuest-Software von BD Bioscience vorgenommen.

2.2.4 Zytotoxizitätsversuche

Zur Untersuchung der NK-Zell vermittelten Zytotoxizität wurde eine modifizierte Methode verwendet, welche ursprünglich von Sheehy zur Ermittlung der Zytotoxizität von NKT-Zellen entwickelt wurde (Sheehy 2001, Marcusson-Stähl 2003, Gómez-Román 2006). Grundlage dieser Experimente war die Messung des intrazellulären Farbstoffes CFSE, welcher aus lysierten Zellen austritt. Um Zielzellen von Effektorzellen zu unterscheiden, wurden die Zielzellen zusätzlich mit dem Membranfarbstoff PKH-26 markiert. Zunächst wurden die Zielzellen am Vortag des Versuches nach folgendem Protokoll mit beiden Farbstoffen markiert: Die Zellen wurden in RPMI-1640-Medium gewaschen und mit RPMI-1640-Medium auf eine Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml eingestellt. Pro 1 ml Zellsuspension wurden 5 μ l PKH-26 (K562-Zellen) bzw. 5,5 μ l PKH-26 (Daudi-Zellen) zugegeben, gut durchmischt und 5 min im 37°C Wasserbad inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit R10-Medium wurde die Zellkonzentration mit PBS auf 1×10^6 Zellen/ml für die anschließende CFSE-Färbung eingestellt. Die folgenden Schritte wurden in lichtdichten Falconröhrchen und bei möglichst geringer Beleuchtung durchgeführt, da CFSE sehr lichtempfindlich ist. Pro 1×10^6 Zellen wurden 150 μ l einer 10 μ M CFSE-Lösung zugegeben und genau 7 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die Färbung wurde durch Zugabe von 1 ml FCS blockiert. Nach drei Waschschritten wurden die Zellen in R10-Medium aufgenommen und über Nacht im Brutschrank ruhen gelassen. Am Versuchstag

wurde die Zellzahl und Vitalität der Zielzellen bestimmt und mit R10-Medium eine Konzentration von 1×10^5 Zellen/ml eingestellt. Die expandierten Zellen wurden geerntet, die Reinheit der NK-Zellen bestimmt und die Zellen auf eine Zellzahl von 2×10^6 NK-Zellen/ml eingestellt. Effektor- und Zielzellen wurden in den Verhältnissen 40:1, 10:1, 2,5:1 und 0,6:1 in 96-well-Zellkulturplatten pipettiert und das Gesamtvolumen der Ansätze auf jeweils 200 μ l eingestellt. Zielzellen ohne Effektorzellen dienten als Negativkontrolle. Dasatinib bzw. DMSO wurde je nach Versuchsanordnung zu verschiedenen Zeitpunkten zugegeben. Bei der 24 h Vorbehandlungen der Zellen erfolgten vor Verwendung im Versuch zwei Waschschriffe mit PBS. Alle Ansätze wurden in Triplikaten durchgeführt, aus denen später ein arithmetisches Mittel errechnet wurde. Die Ansätze wurden bei 37°C/5 % CO₂ für 4 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die 96-well-Platte nach Zugabe von PBS bei 1200 rpm 5 min zentrifugiert und der Überstand abgeschüttet. Die Zellen wurden in 50 μ l 1% PFA resuspendiert und zur Messung in Mikrotiterröhrchen übertragen. Die Messung der Zellen erfolgte unmittelbar anschließend.

Auswertung: Da Ziel der Auswertung die Erfassung aller lysierten Zellen war, wurde abweichend vom ursprünglich publizierten Vorgehen (Sheehy 2001) auf eine Eingrenzung auf lebende Zellen verzichtet, da nur so auch bereits tote Zellen miteinbezogen wurden. Zunächst wurden die PKH-26 positiven Zellen (=Zielzellen) abgegrenzt. Innerhalb dieser Zellpopulation wurde die CFSE-Verteilung betrachtet. Um den Prozentsatz der durch NK-Zellen lysierten Zielzellen bestimmen zu können, musste berücksichtigt werden, dass ein gewisser Anteil der Zellen auch spontan lysiert und damit ebenfalls den CFSE-Farbstoff verliert. Die Spontanlyse wurde durch Analyse der CFSE-Histogramme der Negativkontrolle (nur Zielzellen) festgelegt (<14% für alle Experimente). Die so festgelegte Schwelle für die NK-vermittelte Lyse wurde auf alle CFSE-Histogrammen übertragen. Die spezifische Lyse wurde nun nach folgender Formel bestimmt werden (Kärre 2002, Marcusson-Ståhl 2003):

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

Die Berechnung der spezifischen Lyse erfolgte nach Übertragung der Rohdaten aus CellQuest in Microsoft Excel und Anwendung dieser Formel.

2.2.5 Zytokin- und Degranulationsversuche

Die Zytokinproduktion und Degranulation der NK-Zellen wurden unter Verwendung einer publizierten FACS-basierten Methode untersucht (Alter 2004). Die Zytokine TNF α und IFN γ wurden mittels intrazellulärer Färbung erfasst. Als Degranulationsmarker dienten CD107a/b, welche nach der Degranulation auf der Zelloberfläche exprimiert werden. $1,5 \times 10^5$ NK-Zellen wurden zunächst mit CD107a/b FITC gefärbt. Die Stimulation erfolgte mit 2×10^4 Zielzellen (K562- oder Daudi-Zellen) im Verhältnis NK-Zellen zu Zielzellen 7,5:1. Als Positivkontrolle erfolgte die Stimulation mit 1 nM PMA und 0,1 $\mu\text{g/ml}$ Ca $^{2+}$ -Ionophor. Zur Blockierung des Proteintransports vom Golgi-Apparat in das endoplasmatische Retikulum wurden pro Ansatz 0,25 μl des Antibiotikums Brefeldin A und 0,2 μl Golgi Stop zugegeben, so dass eine intrazelluläre Anreicherung und bessere Detektierbarkeit der Zytokine ermöglicht wurde (Mendes 2000). Die Ansätze wurden für 6 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert und anschließend mit CD3 PerCP und CD16/CD56 APC gefärbt. Bei diesem Vorgehen waren bei Verwendung eines 4-Farben FACS-Gerätes bereits 3 von 4 Kanälen besetzt, so dass für die Zytokin-Färbung IFN γ -PE- und TNF α -PE-Antikörper simultan eingesetzt wurden. Für die intrazelluläre Zytokin-Färbung wurden die Zellen zunächst unter Zuhilfenahme des Cytofix/Cytoperm-Kits nach Herstellerangaben permeabilisiert. Daraufhin erfolgte die intrazelluläre Färbung mit IFN γ PE und TNF α PE für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln. Je nach Versuchsanordnung wurde Dasatinib oder DMSO in äquimolarer Mengen zu verschiedenen Zeitpunkten den Ansätzen zugegeben. Zur Auswertung wurde mit

der Software CellQuest der Prozentanteil der CD107a/b- bzw. der TNF α /IFN γ -positiven NK-Zellen ermittelt.

2.2.6 Rezeptorexpressionsversuche

Die Expression von NK-Rezeptoren wurde mittels FACS-Analyse bestimmt. Um unspezifische Effekte auszuschließen, wurde zu jeder Kondition jeweils auch eine Isotypenkontrolle mitgeführt. Bei Verwendung des NKG2D-Antikörpers wurden zusätzlich vor der FACS-Färbung die FcR-Bindungsstellen durch Inkubation mit 5 μ g/ml Beriglobin abgesättigt. Um die NK-Zellpopulation eingrenzen zu können, wurden die Zellen mit CD3-, CD16- und CD56- Antikörper gefärbt. Die Rezeptorexpression wurde für die CD3 $^-$, CD16 $^+$ und/oder CD56 $^+$ -Population ermittelt. Bei Versuchen zur Rezeptorexpression nach Stimulation mit K562- oder Daudi-Zellen wurden Zielzellen zusammen mit NK-Zellen im Verhältnis 1:7,5 (analog zu Zytokinversuchen) inkubiert. Zur Auswertung wurden die spezifischen Fluoreszenzintensitäts- (SFI) Werte bestimmt, indem die Fluoreszenzintensität der mit spezifischen Antikörper gefärbten Zellen durch die Fluoreszenzintensität der mit unspezifischen Antikörper markierten Zellen dividiert wurde (Krockenberger 2008).

2.2.7 Western Blot, SDS-Page

Um die Mechanismen der durch Dasatinib modulierten Zytotoxizitätsreaktion und Zytokinausschüttung aufzuklären wurden Western Blots eingesetzt. Hierfür verwendete Proteinextrakte wurden nur von NK-Zellkulturen mit einer Reinheit von mindestens 85% gewonnen, um mögliche Beimengungen durch andere Zellen, insbesondere T-Zellen, zu minimieren. Alle Schritte wurden, soweit nicht anders aufgeführt, auf Eis durchgeführt um das Phosphorylierungsmuster nicht zu beeinflussen und um Proteindegradation vorzubeugen. Pro Ansatz wurden 5×10^6 Zellen verwendet. Die Zellen wurden je nach Versuchsanordnung für festgelegte Zeiten mit Dasatinib oder DMSO bei 37 $^{\circ}$ C im Wasserbad inkubiert. Bei Versuchen mit Stimulation durch Zielzellen wurden K562- oder Daudi-Zellen

für 30 min mit 4% PFA fixiert, dreimalig mit PBS gewaschen, in R10-Medium aufgenommen und ebenfalls auf Eis gestellt. Die fixierten Zellen sind in der Lage die NK-Zellen zu stimulieren, allerdings werden sie durch RIPA-Puffer nicht mehr lysiert, so dass die Proteine der fixierten Zellen das Zelllysat nicht verunreinigen können (Jiang 2002). In eigenen Versuchen konnte bestätigt werden, dass nach Behandlung der fixierten Zellen mit RIPA-Puffer nur minimale Proteinspuren im Bereich der unteren Nachweisgrenze des BioRad D_c-Proteindetektorsystems nachzuweisen waren. Die Stimulation erfolgte wie beschrieben im Verhältnis 1:1 für NK-Zellen und Zielzellen (Jiang 2002). Vor Beginn der eigentlichen Stimulation im 37°C Wasserbad wurden die Zellen, nachdem sie gut durchmischt wurden, zunächst für 5 min auf Eis gestellt um eine Synchronisation aller Zellen sicherzustellen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen zum Abstoppen der Reaktion sofort wieder auf Eis überführt und eiskaltes PBS zugegeben. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 13.500 rpm für 2 min wurde der Überstand komplett abgenommen und die Zellen mit 125 µl frisch hergestelltem RIPA-Puffer unter mehrmaligem Auf- und Abpipettieren innerhalb 1 h lysiert. Durch die anschließende Zentrifugation bei 2.500 rpm für 5 min erfolgte die Sedimentation der Nuklei. Zur Bestimmung des Proteingehalts wurde das BioRad D_c-Proteindetektorsystem nach Herstellerangaben verwendet. Die Proteinkonzentrate wurden bis zur Verwendung bei -20°C aufbewahrt. Für die SDS-Page wurden jeweils 10-20 µg Protein pro Probe verwendet. Für die Herstellung der Proben wurde 4xSDS Sample Buffer (Invitrogen) und 10x Reducing Agent (Invitrogen) verwendet. Die Proben wurden 10 min bei 70°C erhitzt und anschließend wieder auf Raumtemperatur abgekühlt. Für die Elektrophorese wurden selbstgegossene 10%ige Bis-Tris Gele verwendet. Der Gellauf wurde für 35 min bei 200 V und 120 mA durchgeführt. Anschließend wurden die Proteine bei 25 V und 200 mA innerhalb von 75 min auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Zur Transferkontrolle wurde die Membran kurz in Ponceau S-Lösung geschwenkt, durch welche alle Proteine unspezifisch und reversibel rot gefärbt werden. Nach Entfärben mit PBS wurde die Membran mit Blockierungslösung, einem TBST-Puffer mit je nach verwendetem Antikörper unterschiedlichen Milch- bzw. BSA-Anteilen, für 1 h inkubiert, um unspezifische

Bindungen der Antikörper zu vermeiden. Die Inkubation mit in Blockierungslösung verdünntem Primärantikörper erfolgte über Nacht bei 4°C im Kühlschrank auf der Schüttelplatte. Nach Waschen der Membran mit TBST wurde diese mit einem HRP-konjugierten sekundären Antikörper für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert, erneut mit TBST gewaschen, kurz mit destilliertem Wasser abgespült und für 1 min mit ECL-Lösung überschichtet und Röntgenfilme für 30 sec bis 2 h belichtet. Um die Membranen für eine Detektion mit einem weiteren Antikörper verwenden zu können, wurden diese zur Ablösung der vorherigen Antikörper für 30 min bei 50°C in Stripping Buffer gelegt und anschließend großzügig mit TBST gewaschen. Die Membranen wurden trocken in Alufolie eingeschlagen bei -20°C gelagert. Mit Hilfe des gemeinfreien Bildanalyseprogramms ImageJ (Version 1.44p) wurden die Intensitäten der Banden der eingescannten Blots bestimmt. Um die Banden phosphorylierter Proteine zu vergleichen, wurde die relative Intensität als Quotient aus der Intensität der Bande des phosphospezifischen Blots und –unspezifischen Blots bestimmt.

2.2.8 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms GraphPad Prism (Version 5.0, GraphPad Software), welches auch zur Erstellung der zugehörigen Graphen angewendet wurde. Soweit nicht anders angegeben erfolgte die Darstellung des arithmetischen Mittels aus n (Anzahl) Experimenten und des Standardfehlers des Mittelwertes (SfM). Der zweiseitige, gepaarte t-Test nach Student, welcher paarweise die Unterschiede in Mittelwerten vergleicht, wurde für Versuche mit einer veränderlichen Variable (z.B. Konzentrationen) angewandt. Für Experimente, welche zwei veränderliche Variablen beinhalteten wie z.B. das Zielzell:NK-Zell-Verhältnis und die Wirkstoffkonzentration wurde eine zweiseitige Analyse der Varianz, der „two-way ANOVA“- (analysis of variance) Test durchgeführt. Hiermit kann neben der Signifikanz der einzelnen Faktoren auch die gegenseitige Interaktion getestet werden. Das statistische Signifikanzniveau wurde für alle Tests auf $p < 0,05$ festgelegt, so dass die Wahrscheinlichkeit

fälschlicherweise ein zufälliges Ergebnis als signifikant zu bewerten geringer als 5% sein sollte. Das Signifikanzniveau $p < 0,05$ ist in allen Graphen mit *, $p < 0,01$ mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1% mit ** und das hoch signifikante Niveau $p < 0,001$ mit einer 0,1%igen Wahrscheinlichkeit für ein fälschlicherweise signifikant gewertetes Ergebnis mit *** gekennzeichnet.

3 ERGEBNISSE

3.1 Effekte von Dasatinib auf die Zytotoxizität

In der Arbeit von Katharina Seystahl wurde bereits gezeigt, dass die Zytotoxizität von NK-Zellen gegenüber K562-Zellen in Gegenwart von Dasatinib dosisabhängig inhibiert wird (Seystahl 2010). Da K562-Zellen insbesondere über NKG2D-Rezeptoren von NK-Zellen erkannt und lysiert werden, sollte im Vergleich dazu die gegenüber NK-Zellen resistenter B-Zell-Lymphomzelllinie Daudi untersucht werden, welche keine bekannten NKG2D-Liganden exprimiert und ein defektes MHC-Klasse-I-Molekül aufweist. Zum Vergleich der NK-Rezeptor-Liganden-Expression auf K562- und Daudi-Zellen siehe **Tab. 2**.

3.1.1 Inhibition der Zytotoxizität gegenüber Daudi-Zellen in Anwesenheit von Dasatinib

Zur Quantifizierung der Zytotoxizität wurde ein FACS-basierter Ansatz verwendet (siehe 2.2.4). NK-Zellen mit einer Reinheit von $86 \pm 6\%$ (Mittelwert \pm Standardabweichung) wurden an Tag 8-11 in unterschiedlichen Effektor:Zielzellen- („effector:target“, E:T) Verhältnissen (40:1, 10:1, 2,5:1 und 0,6:1) mit den CFSE und PKH-26 gefärbten Zielzellen für 4 h inkubiert. Zur Beurteilung kurzfristiger Effekte wurde Dasatinib bzw. als Lösungsmittelkontrolle DMSO in unterschiedlichen Konzentrationen unmittelbar vor Zugabe der Zielzellen zu den NK-Zellen pipettiert. Für eine Dasatinib-Konzentration von 50 nM ergab sich für Daudi-Zellen bei einem Verhältnis von 40:1 und 10:1 analog zu den vorhergehenden Ergebnissen mit K562-Zellen eine signifikante Reduktion der NK-Zell-vermittelten Lyse ($n=3$, $p<0,001$ für E:T=40:1, $p<0,05$ für E:T=10:1). Bei einem E:T-Verhältnis von 40:1 reduzierte sich die spezifische Zytolyse in Gegenwart von Dasatinib 50 nM um 74% von $25,3 \pm 5,5\%$ auf $6,4 \pm 3,1\%$, bei 20 nM Dasatinib um 66% auf $8,7 \pm 3,3\%$ und selbst bei der niedrigsten Konzentration 10 nM noch um 52% auf $12,1 \pm 2,5\%$. Eine ähnlich starke Inhibition wurde auch für das Verhältnis 10:1 mit einer Reduktion der Zytolyse um 77% von $10,3 \pm 1,1\%$ auf

2,4±1,4% für 50 nM, um 70% auf 3,1±1,0% für 20 nM bzw. um 64% auf 3,7±0,9% für 10 nM beobachtet. Für die Verhältnisse 2,5:1 und 0,6:1 zeigte sich eine komplette Inhibition der Zytotoxizität. Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Dasatinib-Konzentrationen erwiesen sich als statistisch nicht signifikant. Ein Lösungsmittelleffekt durch DMSO konnte ausgeschlossen werden. (Abb. 3).

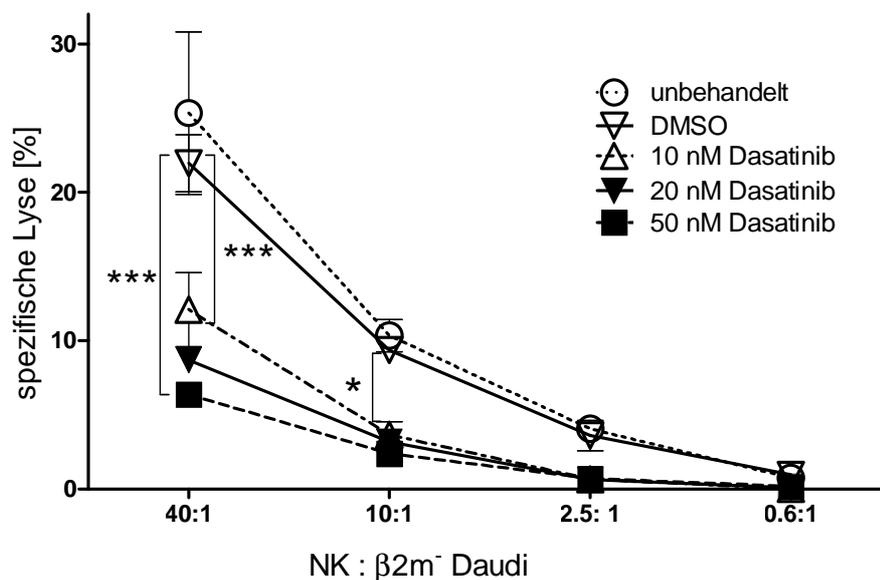


Abb. 3 Zytotoxizität gegenüber Daudi-Zellen in Gegenwart von Dasatinib

Die Zytotoxizität gegenüber Daudi-Zellen ist bei verschiedenen NK-Zellen: Daudi-Zellen-Verhältnissen in Gegenwart von verschiedenen Dasatinib-Konzentrationen (10, 20 und 50 nM) bzw. DMSO dargestellt (Mittelwert±SfM) (***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$).

3.1.2 Steigerung der Zytotoxizität gegenüber $\beta 2m^{+}$ -Daudi-Zellen durch Vorbehandlung mit Dasatinib

Im nächsten Schritt wurden Effekte auf die zytotoxische Funktion der NK-Zellen nach einer Vorbehandlung mit Dasatinib untersucht. Als Vorbehandlungszeit wurden 24 h gewählt, da Dasatinib in der aktuellen klinischen Anwendung einmal täglich verabreicht wird (Shah 2008). In eigenen Vorversuchen zeigte sich bereits, dass sich die Effekte bei einer Vorbehandlung mit 10 nM nicht signifikant von einer Vorbehandlung mit 50 nM unterscheiden, so dass die folgenden Zytotoxizitätsversuche nur mit 50 nM Dasatinib durchgeführt wurden. Die expandierten NK-Zellen wurden zwischen Tag 8 und 10 der Expansion für 24 h mit 50 nM Dasatinib bzw. der äquivalenten Menge DMSO inkubiert. Nach 2maligem Auswaschen mit PBS erfolgte sofort der Ansatz für einen 4 h Zytotoxizitätsversuch. Wurden K562-Zellen als Zielzellen verwendet wurde kein Einfluss von Dasatinib auf die Zytotoxizität beobachtet (n=3, **Abb. 4**).

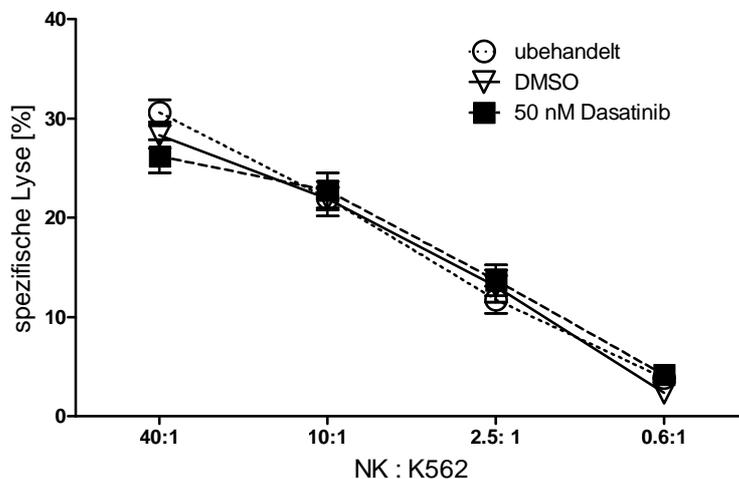


Abb. 4 Zytotoxizität gegenüber K562 nach Vorbehandlung der NK-Zellen

Dargestellt ist die spezifische Lyse von K562-Zellen (n=3; Mittelwert \pm SfM), nachdem die NK-Zellen 24 h mit Dasatinib (schwarzes Quadrat) bzw. mit DMSO (weißes Dreieck) behandelt wurden oder unbehandelt geblieben sind (weißer Kreis).

Im Gegensatz dazu zeigte sich aber gegenüber Daudi-Zellen eine deutliche Zunahme der Zytotoxizität ($n=11$, $p<0,01$ für $E:T=10:1$, $p<0,05$ für $E:T=2,5:1$ **Abb. 5A**) Die Lyserate wurde durch die Dasatinib-Vorbehandlung für das Effektor-Zielzell-Verhältnis 40:1 um 33% von $24,8\pm 3,4\%$ auf $32,8\pm 4,2\%$ gesteigert. Für das Verhältnis 10:1 zeigte sich sogar ein Zunahme der Zytotoxizität um 88% von $12,9\pm 1,8\%$ auf $24,3\pm 3,8\%$. Unabhängig von den individuell sehr unterschiedlichen Ausgangsniveaus der Lyserate (13,0-48,3%) wurde eine ähnlich hohe absolute Steigerung der Zytotoxizität bei allen Spendern beobachtet. Daudi-Zellen sind auf Grund eines defekten $\beta 2m$ -Moleküls nicht in der Lage komplette MHC-Moleküle auf ihrer Oberfläche zu exprimieren. Daher wurden die Zytotoxizitätsversuche mit $\beta 2m$ -transfizierten und somit MHC-positiven Daudi-Zellen wiederholt um die Effekte einer wiederhergestellten MHC-Expression zu untersuchen. Auch gegenüber diesen $\beta 2m$ -positiven Daudi-Zellen bestätigte sich die erhöhte Zytotoxizität nach Vorbehandlung der NK-Zellen mit Dasatinib ($n=3$, $p<0,001$ für $E:T=40:1$, $p<0,01$ für $E:T=10:1$, **Abb. 5B**). Die Zytotoxizität lag mit einem Ausgangswert von $14,4\pm 1,3\%$ deutlich niedriger als bei den $\beta 2m$ -negativen Daudi-Zellen. Die relative Steigerung der spezifischen Lyse um 36% bei einem Verhältnis von 40:1 bzw. die annähernde Verdopplung der Zytolyse bei 10:1 stimmt mit den Ergebnissen für $\beta 2m$ -negative Daudi-Zellen gut überein.

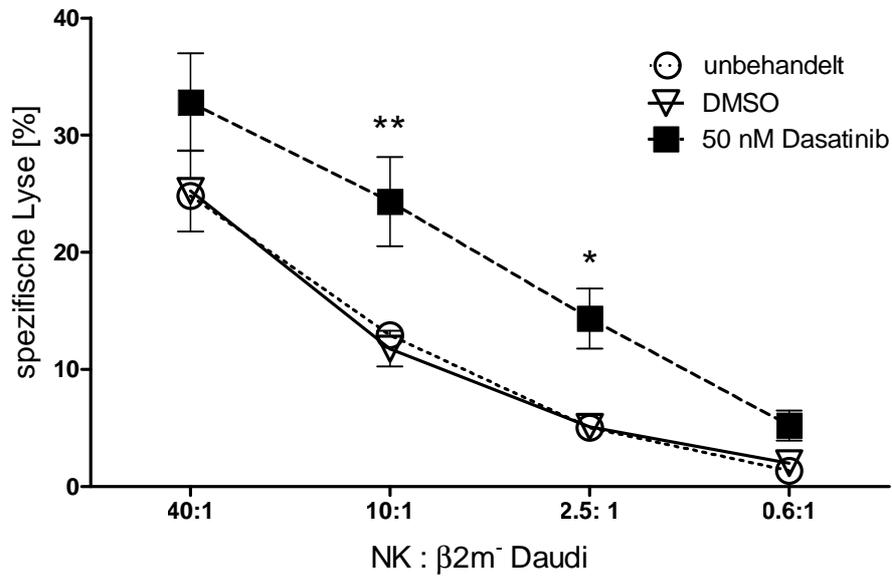
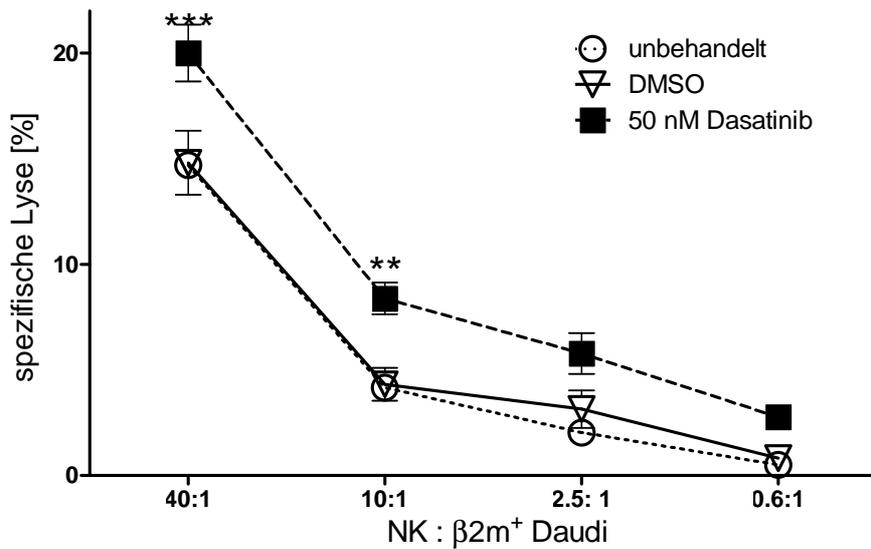
A**B**

Abb. 5 Zytotoxizität gegenüber Daudi $\beta 2m^\pm$ -Zellen nach Dasatinib-Behandlung der NK-Zellen

Dargestellt ist die spezifische Lyse (Mittelwert \pm SfM) $\beta 2m^-$ negativer Daudi-Zellen (**A**) (n=11) und MHC-positiven $\beta 2m^+$ Daudi-Zellen (**B**) (n=3) nach 24 h Vorbehandlung der NK-Zellen mit 50 nM Dasatinib (schwarzes Quadrat), DMSO (weißes Dreieck) bzw. ohne Behandlung (weißer Kreis).

3.1.3 Reversibilität der Zytotoxizitätssteigerung nach erneuter Dasatinib-Exposition

Um die Reversibilität des verstärkenden Effekts zu prüfen, wurde nach der Vorbehandlung der NK-Zellen Dasatinib wieder während des Versuches zum Ansatz zugegeben. Expandierte polyklonale NK-Zellen wurden für 24 h mit 50 nM Dasatinib oder als Kontrolle mit der äquimolaren Menge DMSO inkubiert. Nach dem Auswaschen wurde unmittelbar vor Zugabe der Zielzellen nochmals die gleiche Menge Dasatinib bzw. DMSO wie für die Vorbehandlung zu den NK-Zellen pipettiert. Diese Behandlung führte sowohl gegenüber β 2m-positiven als auch β 2m-negativen Daudi-Zellen wiederum zu einer signifikanten Inhibition der Zytotoxizität (n=3 für beide Zelllinien). Nach der erneuten Zugabe von Dasatinib zeigte sich eine annähernd identische Zytotoxizitätsrate beider Zielzellen. Diese stimmte mit den Ergebnissen der Versuche, bei welchen Dasatinib lediglich im Zytotoxizitätsansatz gegenwärtig war, überein. So reduzierte sich die spezifische Lyse von β 2m-negativen Daudi-Zellen nach der erneuten Zugabe von 50 nM Dasatinib um 83% von $34,0 \pm 5,3\%$ auf $5,7 \pm 1,2\%$ bei einem E:T-Verhältnis von 40:1 ($p < 0,001$) auf ähnlich niedrige Werte wie in den Versuchen, in denen Dasatinib lediglich im Zytotoxizitätsansatz vorhanden war ($6,4 \pm 3,1\%$). Für das Verhältnis 10:1 zeigte sich ebenfalls eine deutliche Inhibition der Zytolyse um 90% von $16,3 \pm 4,2\%$ auf $1,1 \pm 0,4\%$ ($p < 0,001$ für 10 nM, Zytolyserate ohne Vorbehandlung: $2,4 \pm 1,4\%$). Ebenfalls analog zu den Versuchen mit Dasatinib lediglich im Zytotoxizitätsversuch zeigte sich eine komplette Inhibition der Zytotoxizität bei den Verhältnissen 2,5:1 und 0,6:1 (**Abb. 6A**). Auch die Zytotoxizität gegenüber β 2m-positiven Daudi-Zellen wurde deutlich inhibiert. Bei 50 nM Dasatinib reduzierte sich die Zytolyse um 77% von $30 \pm 5,0\%$ auf $6,7 \pm 1,0\%$ bei einem E:T-Verhältnis von 40:1 ($p < 0,001$) bzw. um 79% von $14,3 \pm 3,6\%$ auf $3,0 \pm 0,3\%$ für das Verhältnis 10:1 ($p < 0,01$). Für 2,5:1 und 0,6:1 wurde wiederum eine fast vollständige Inhibition beobachtet (**Abb. 6B**).

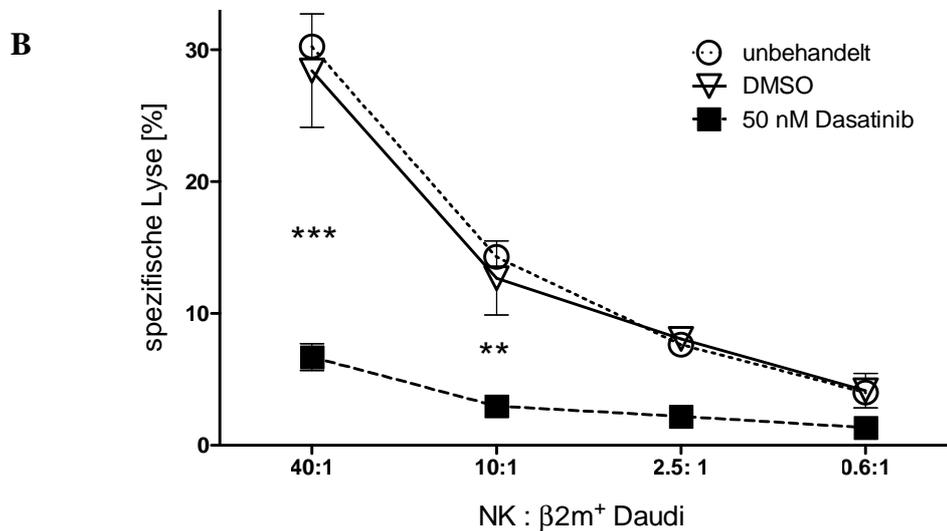
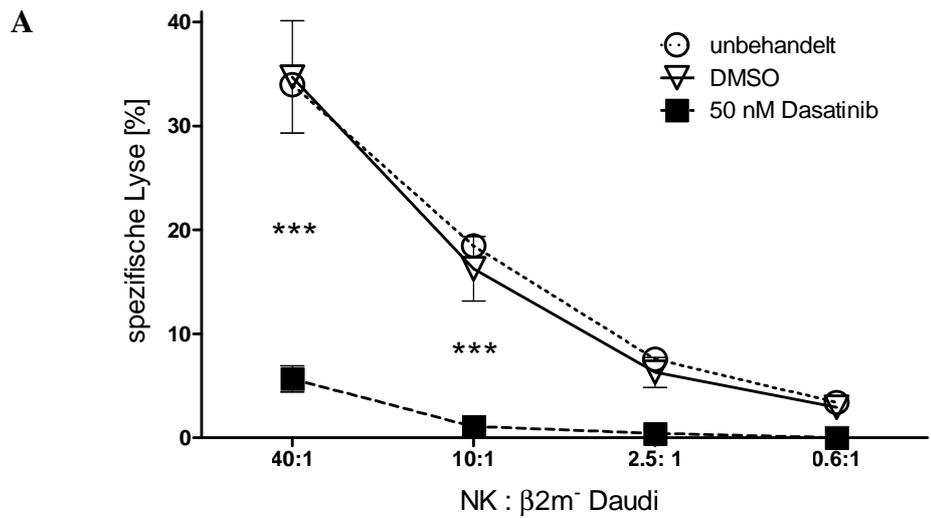


Abb.6 Zytotoxizität gegenüber Daudi $\beta 2m^\pm$ -Zellen nach Dasatinib-Behandlung der NK-Zellen und erneuter Gegenwart von Dasatinib im Versuch

NK-Zellen wurden 24 h mit Dasatinib (schwarzes Quadrat) inkubiert. Nach Herauswaschen des Wirkstoffes wurde dieser wieder im Versuch zugesetzt. Dargestellt ist die Zytolyse von $\beta 2m$ -negativen Daudi-Zellen (**A**) und $\beta 2m$ -positiven Daudi-Zellen (**B**). Als Kontrolle dienen unbehandelte (weißer Kreis) bzw. mit DMSO behandelte (weißes Dreieck) NK-Zellen.

3.1.4 Effekte der Dasatinib-Vorbehandlung der Daudi-Zellen auf die NK-vermittelte Zytotoxizität

Neben dem Einfluss von Dasatinib auf die Funktion der Effektorzellen sind bei der Zytotoxizität von NK-Zellen auch potentielle Effekte auf die Zielzellen von Bedeutung. Es wurde bereits gezeigt, dass Dasatinib die Oberflächenexpression der NKG2D-Liganden MICA/B auf Tumorzellen herabsetzen kann (Salih 2010). Dies konnten wir bestätigen (Daten nicht gezeigt). In der Vorarbeit von K. Seystahl wurde eine signifikante Inhibition der Zytotoxizität gegenüber mit Dasatinib vorbehandelten K562-Zellen beobachtet. Hier wurden nun β 2m-negative Daudi-Zellen, nachdem sie mit den Farbstoffen PKH-26 bzw. CFSE markiert wurden und über Nacht im Brutschrank ruhten, mit Dasatinib bzw. DMSO für 24 h vorbehandelt. Das Auswaschen des Wirkstoffs erfolgte durch zweimaliges Waschen mit PBS unmittelbar vor dem Zytotoxizitätsansatz. Gegenüber unbehandelten Daudi-Zellen wurde bei Vorbehandlung mit 50 nM Dasatinib eine geringfügige aber für das E:T-Verhältnis 40:1 statistisch signifikante Inhibition mit einer Reduktion der spezifischen Lyse um 17% von $19,8 \pm 0,9$ auf $16,5 \pm 0,7\%$ beobachtet (n=3, **Abb. 7**). Im Vergleich zu den beobachteten Effekten bei K562-Zellen, welche im Gegensatz zu Daudi-Zellen das direkte Dasatinib-Zielmolekül Bcr/Abl exprimieren (Lozzio 1975, Lombardo 2004), ist die nachgewiesene Hemmung der Lyse von mit Dasatinib behandelten Daudi-Zellen aber wesentlich schwächer.

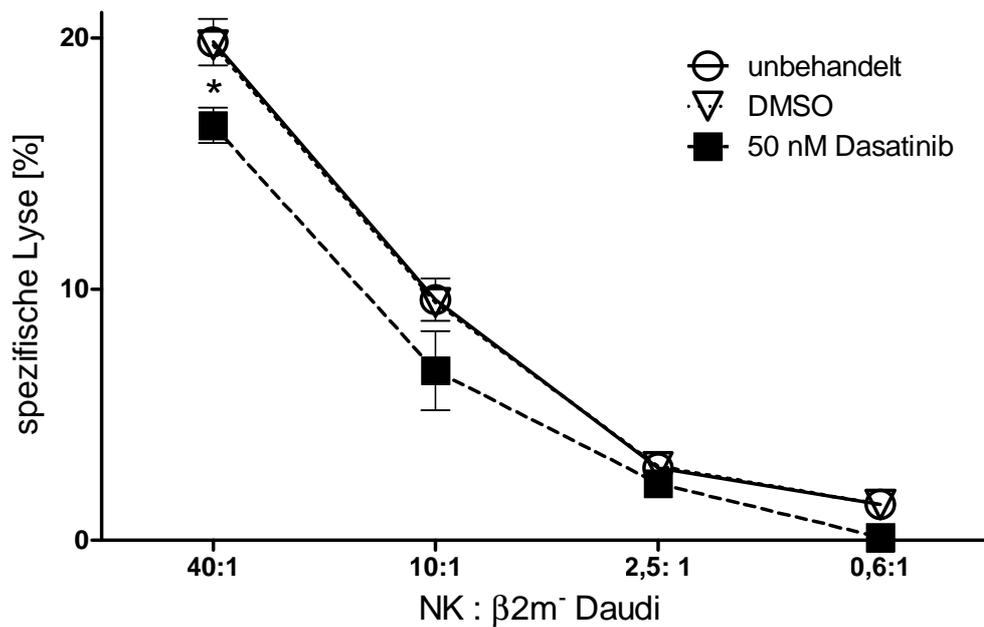


Abb. 7 Spezifische Lyse gegenüber 24 h vorbehandelter Daudi-Zellen

Dargestellt ist die spezifische Lyse (Mittelwert \pm SfM) von Daudi-Zellen die 24 h mit Dasatinib 50 nM (schwarzes Symbol) oder DMSO (weißes Dreieck) vorbehandelt wurden oder nicht behandelt wurden (weißer Kreis). Dasatinib und DMSO wurden mit PBS ausgewaschen und waren im Zytotoxizitätsversuch nicht anwesend.

3.2 Steigerung der Degranulation und Zytokinproduktion der NK-Zellen durch Dasatinib-Vorbehandlung

Als essentieller Bestandteil der Granzym/Perforin-vermittelten Zytotoxizität wurde die Degranulation der NK-Zellen durch Bestimmung der Oberflächenmarker CD107a und CD107b ermittelt. Wenn die Granula, welche Perforin und Granzym enthalten, mit der Zellmembran während der Exozytose verschmolzen sind, ist CD107a/b auf der NK-Zelloberfläche nachweisbar (Yu 2008). Mit diesem Ansatz werden neben der Perforin/Granzym-vermittelten Zytotoxizität auch die ineffektive Degranulation und Vorstufen der Zytotoxizität erfasst. Parallel kann mittels intrazellulärer Färbung die Produktion von $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IFN}\gamma$ detektiert werden. K. Seystahl wies bereits nach, dass in Anwesenheit von Dasatinib die Degranulation und Zytokinproduktion inhibiert wurde (Seystahl 2010). In Analogie zu den vorausgegangenen Zytotoxizitätsversuchen wurden die NK-Zellen für 24 h vorbehandelt und nach Auswaschen des Wirkstoffs im Verhältnis 7,5:1 mit K562- bzw. Daudi-Zellen stimuliert. Bei der Stimulation durch K562-Zellen wurde nach der Dasatinib-Vorbehandlung der NK-Zellen eine Steigerung sowohl der Degranulation ($n=8$, $p<0,05$ für 50 nM Dasatinib gegenüber DMSO, $p<0,01$ für 10 nM Dasatinib gegenüber DMSO) als auch der $\text{TNF}\alpha/\text{IFN}\gamma$ -Produktion erreicht ($n=8$, $p<0,01$ für 50 nM Dasatinib gegenüber DMSO, $p<0,05$ für 10 nM Dasatinib gegenüber DMSO) (**Abb. 8A**). Wurde Dasatinib im Versuchsansatz wieder zugegeben, wurde dieser Effekt wieder aufgehoben und es resultierte eine Inhibition der Degranulation und Zytokinproduktion (CD107a/b: $n=3$, $p<0,01$ für 50 nM Dasatinib gegenüber DMSO) (**Abb. 8B**). Nach Stimulation mit Daudi-Zellen wurde durch die 24 h Vorbehandlung ein Trend zur Steigerung der CD107a/b-Expression und Zytokinproduktion beobachtet, insbesondere bei der Vorbehandlung mit 50 nM Dasatinib ($n=3$) (**Abb. 9A**). Bei erneuter Zugabe von Dasatinib zum Versuchsansatz zeigte sich nur eine geringe Abnahme sowohl der CD107a/b-Expression als auch der Zytokinproduktion, aber im Gegensatz zur Stimulation mit K562-Zellen keine Inhibition unter das Ausgangsniveau (**Abb. 9B**). Für $\beta 2\text{m}$ -positive Daudi-Zellen wurden die gleichen Veränderungen beobachtet (Daten nicht gezeigt).

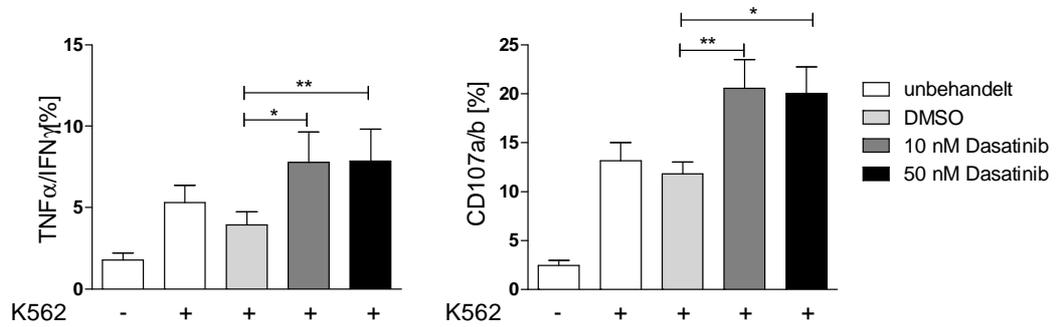
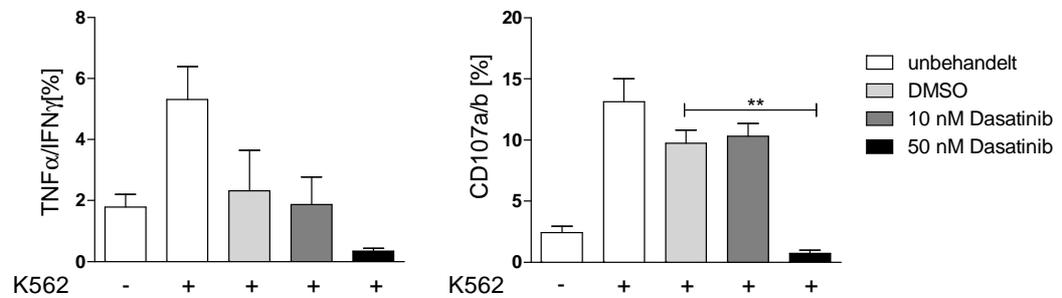
A**B**

Abb. 8 TNF α /IFN γ -Produktion und Degranulation nach Stimulation der NK-Zellen mit K562-Zellen

Nach 24 h Vorbehandlung der NK-Zellen mit 10 nM oder 50 nM Dasatinib (**A**) bzw. nach 24 h Vorbehandlung und erneuter Zugabe von Dasatinib während des Versuches (**B**) wurden die NK-Zellen mit K562-Zellen für 6 h stimuliert. Dargestellt ist der Anteil der C107a/b-positiven (Diagramme rechts), bzw. der nach simultaner intrazytoplasmatischer FACS-Färbung TNF α /IFN γ -positiven (Diagramme links) NK-Zellen nach Vorbehandlung mit 50 nM (schwarzer Balken) und 10 nM Dasatinib (dunkelgraue Balken). Als Kontrolle dienten unbehandelte (weiße Balken) bzw. mit DMSO behandelte NK-Zellen (hellgraue Balken), jeweils n=3.

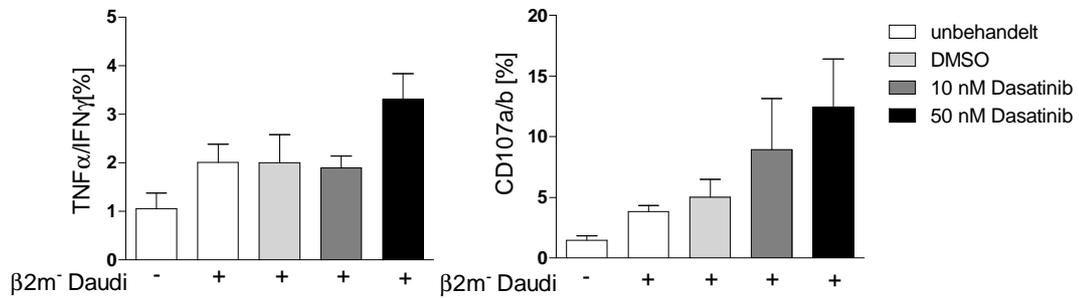
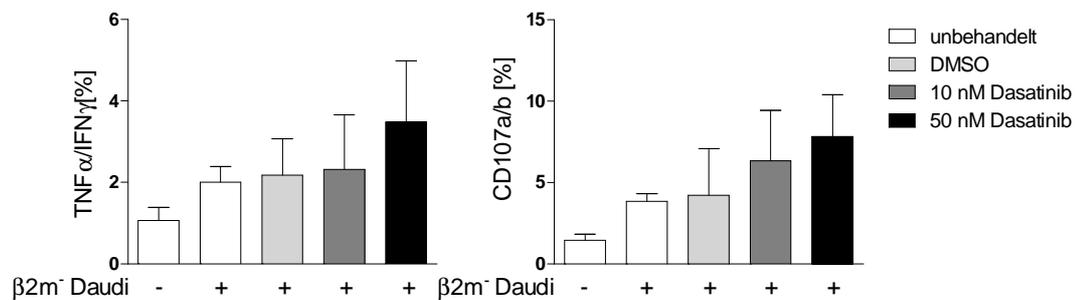
A**B**

Abb. 9 TNF α /IFN γ -Produktion und Degranulation nach Stimulation der NK-Zellen mit Daudi-Zellen

Nach 24 h Vorbehandlung der NK-Zellen mit 10 nM oder 50 nM Dasatinib (**A**) bzw. nach 24 h Vorbehandlung und erneuter Zugabe von Dasatinib während des Versuches (**B**) wurden die NK-Zellen mit β 2m-negativen Daudi-Zellen für 6 h stimuliert. Dargestellt ist der Anteil CD107a/b-positiver (Diagramme rechts) bzw. der nach simultaner intrazytoplasmatischer FACS-Färbung TNF α /IFN γ -positiven NK-Zellen (Diagramme links) nach Vorbehandlung mit 50 nM (schwarzer Balken) bzw. 10 nM Dasatinib (dunkelgrauer Balken). Als Kontrolle dienten unbehandelte (weiße Balken) bzw. mit DMSO behandelte NK-Zellen (hellgraue Balken), jeweils n=3.

3.3 Effekte von Dasatinib auf die Regulation von NK-Zell-Rezeptoren

Da verstärkende Effekte insbesondere bei der 24 h Vorbehandlung beobachtet wurden, kommt eine Modulation der Rezeptorexpression, welche innerhalb weniger Minuten bis mehrerer Stunden stattfindet, als möglicher Mechanismus in Betracht.

3.3.1 Expression von NKG2D und LFA-1 nach Dasatinib-Behandlung unverändert

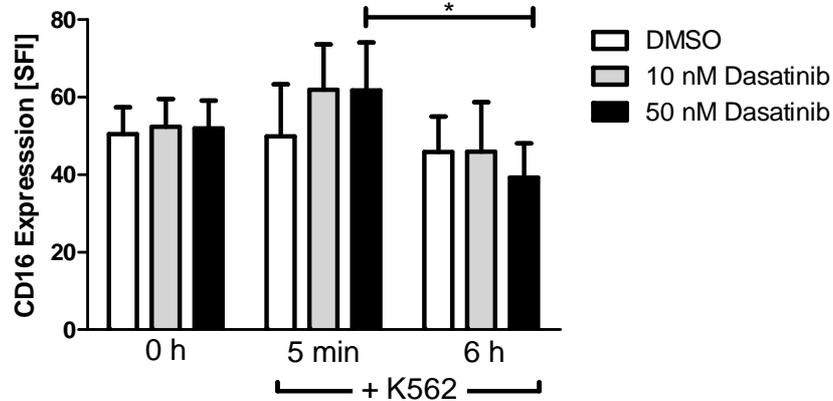
Der LFA-1-Rezeptor, welcher sich als Heterodimer aus den CD11a und CD18 Untereinheiten zusammensetzt, ist an der primären Adhärenz der NK-Zellen an den Zielzellen sowie an der Ausbildung der immunologischen Synapse beteiligt (Barber 2004). NKG2D ist einer der am besten untersuchten aktivierenden Rezeptoren, dessen Liganden von K562- aber nicht von Daudi-Zellen exprimiert werden (Lanier 2008, Giurisato 2007, Upshaw 2006, Bryceson 2006). Um eine mögliche Modulation dieser Rezeptoren durch Dasatinib zu testen, wurden polyklonale expandierte NK-Zellen für 0-72 h mit 10 nM und 50 nM Dasatinib bzw. mit DMSO behandelt und zu den Zeitpunkten 0 h, 6 h, 24 h, 48 h und 72 h die Expression der Oberflächenmoleküle CD11a, CD18 und NKG2D mittels FACS-Analyse ermittelt. Zunächst wurden CD3⁺ lebende Lymphozyten und im nächsten Schritt CD16⁺ und/oder CD56⁺ Zellen eingegrenzt. Die NKG2D- bzw. LFA-1-Expression dieser NK-Zell-Population wurde ermittelt. Zu keinem der untersuchten Zeitpunkte wurde eine signifikante durch Dasatinib verursachte Modulation der Expression beobachtet (n=3 unabhängige Versuche). Auch bei 24 h Vorbehandlung und anschließender Stimulation mit K562- oder Daudi-Zellen im Verhältnis 7,5:1 (analog zu den Zytokinversuchen) wurde weder zum Zeitpunkt 5 min noch nach 6 h ein Dasatinib-Einfluss auf die CD11a/CD18 Regulation beobachtet (n=3 unabhängige Versuche). Bei analogen Stimulationsversuchen zu NKG2D, wobei Staurosporin und TGFβ als Positivkontrollen dienten (Kruckenberg 2009, Kopp 2009), wurde kein

reproduzierbarer *in vitro* Dasatinib-Effekt nachgewiesen (n=3 unabhängige Versuche).

3.3.2 Modulation der CD16-Regulation nach Dasatinib-Vorbehandlung

Um Einflüsse der Dasatinib-Vorbehandlung auf die Regulation des CD16-Rezeptors zu evaluieren, wurden expandierte NK-Zellen an Tag 8-10 mit Dasatinib vorbehandelt und nach 24 h mit K562- bzw. Daudi-Zellen im Verhältnis NK-Zellen:Zielzellen 7,5:1 stimuliert. FACS-Färbungen erfolgten bei Stunde 0 (entspricht Zeitpunkt nach 24 h-Vorbehandlung), sowie 5 min bzw. 6 h nach Stimulation. Als NK-Zellen wurden wiederum CD3⁺ Zellen, welche CD56 und/oder CD16 exprimieren, definiert. Nach der Vorbehandlung mit 10 nM und 50 nM Dasatinib wurde kein Einfluss auf die Expression von CD16 beobachtet. Wurden aber die vorbehandelten NK-Zellen mit den Zielzellen inkubiert, so zeigte sich sowohl bei Stimulation mit K562- als auch mit Daudi-Zellen nach 5 min eine vorübergehende leichte Erhöhung der Oberflächenexpression von CD16. Nach dem 6 h Intervall konnte für die mit Dasatinib vorbehandelten NK-Zellen eine signifikant höhere Abnahme der CD16-Oberflächenexpression als bei den mit DMSO behandelten Zellen sowohl in Gegenwart von Daudi-Zellen (**Abb.10A**, n=6, p<0,05 für Dasatinib 50 nM, p<0,01 für Dasatinib 10 nM) als auch von K562-Zellen nachgewiesen werden (**Abb.10B** n=6, p<0,05 für Dasatinib 50 nM).

A



B

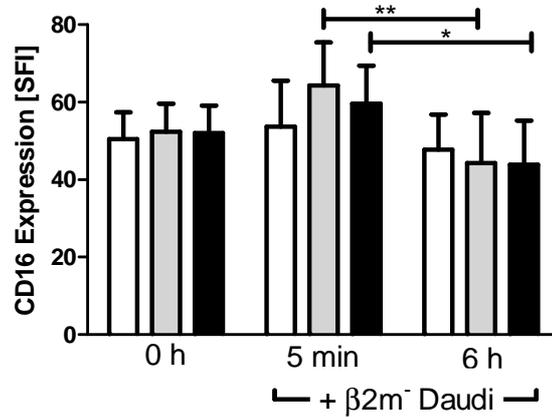


Abb. 10 CD16 Expression Dasatinib-vorbehandelter NK-Zellen nach Stimulation mit Daudi- und K562-Zellen

Dargestellt ist die CD16-Expression von NK-Zellen nach 24 h Vorbehandlung (entspricht Zeitpunkt 0 h), sowie nach 5 min und 6 h Stimulation mit K562-Zellen (**A**) bzw. β 2m-negativen Daudi-Zellen (**B**). Die NK-Zellen wurden mit 50 nM Dasatinib (schwarzer Balken) oder 10 nM Dasatinib (grauer Balken) bzw. mit DMSO (weißer Balken) vorbehandelt. Die dargestellten SFI-Werte wurden durch Division der Fluoreszenzintensität der mit CD16-Antikörper gefärbten Zellen durch die Fluoreszenzintensität der mit einem unspezifischen Kontrollantikörper gefärbten Zellen bestimmt.

3.4 Einflüsse von Dasatinib auf Signalwege der NK-Zellen

Aufgrund seiner Eigenschaft als Multikinase-Inhibitor ist Dasatinib in der Lage die Phosphorylierung einer Vielzahl von Signalmolekülen auf unterschiedlichen Stufen der Signaltransduktion zu beeinflussen. Neben dem direkten Dasatinib-Zielmolekül Lck wurden die Signalmoleküle Erk, Akt, p38 und Vav untersucht. Diese spielen in den Signalwegen von NK-Zellen eine entscheidende Rolle. Auch wird deren Phosphorylierung von Src-Kinasen, welche den genannten Molekülen in der Signaltransduktionskette vorangehen, maßgeblich beeinflusst.

3.4.1 Inhibition der Phosphorylierung von Tyrosinkinasen durch Dasatinib

Um die Signalwege zu analysieren, wurden Western Blots unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt. Da eine Vielzahl an Tyrosinkinasen wie die Src-Kinasen Lck, Fyn oder Lyn (Bantscheff 2007) sowohl eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion von NK-Zellrezeptoren spielen, als auch Zielmoleküle von Dasatinib sind, wurden zunächst die Einflüsse von Dasatinib auf die Phosphorylierung von Tyrosinresten mit Hilfe eines Pan-Phosphotyrosin-Blots untersucht. Nach 15 min bzw. 1 h Inkubation der expandierten polyklonalen NK-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an Dasatinib zeigte sich eine ausgeprägte konzentrationsabhängige Senkung des Phosphorylierungsniveaus der Tyrosinreste. In eigenen Vorversuchen zur Zeitkinetik mit Dasatinib-Behandlungszeiten zwischen 5 min und 4 h wurde zuvor nachgewiesen, dass nach 1 h eine maximale Inhibition erreicht wurde. Eine Inhibition wurde insbesondere auch für Lck, welches für die ersten Schritte der Signaltransduktionskette wie z.B. der Phosphorylierung von NK-Zell-Rezeptoren von Bedeutung ist, beobachtet (**Abb. 11**, repräsentatives Beispiel für n=3 unabhängige Versuche).

Im nächsten Schritt wurden die NK-Zellen nach 1 h Vorbehandlung mit Dasatinib mit PFA (4%)-fixierten und somit durch RIPA-Puffer nicht lysierbaren K562-Zellen bei 37°C stimuliert, nachdem sie mit diesen auf Eis synchronisiert worden

sind. Es resultierte, wie aus den vorausgegangenen funktionellen zellulären Versuchen zu erwarten war, eine ebenfalls dosisabhängige Inhibierung des Stimulationseffekts. Das Phosphorylierungsniveau der Tyrosinreste, insbesondere von Lck, blieb auch nach Stimulation noch deutlich unter dem Ausgangsniveau der unbehandelten unstimulierten NK-Zellen (**Abb. 12**, repräsentatives Beispiel für n=4 unabhängige Versuche). Das Maximum der Stimulation lag sowohl bei unbehandelten als auch bei behandelten Zellen bei 5 min.

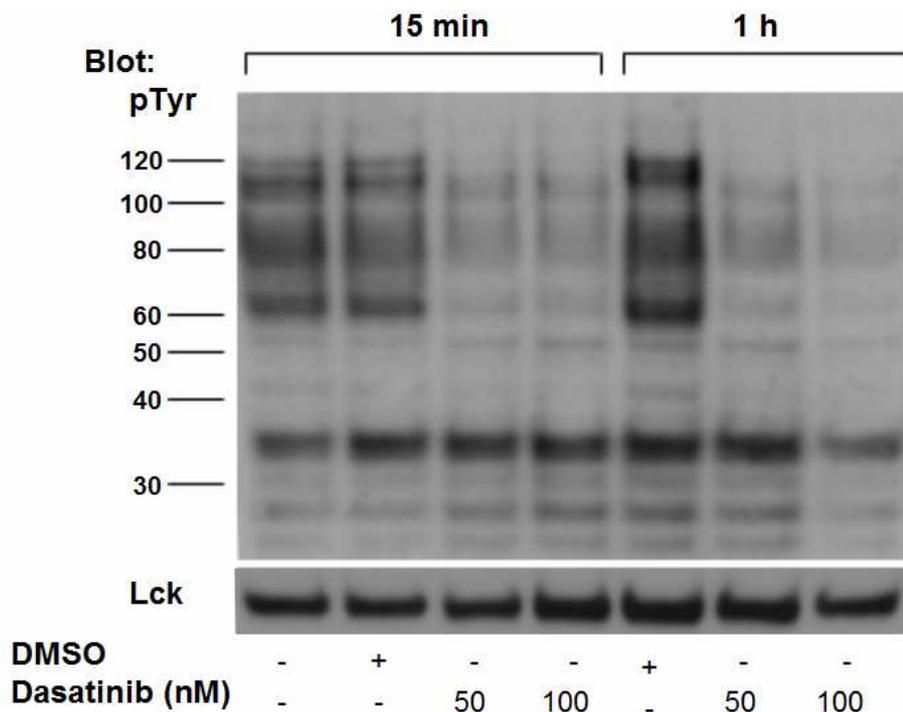


Abb. 11 Phosphorylierung von Tyrosinresten in Gegenwart von Dasatinib

Expandierte NK-Zellen wurden 15 min oder 1 h mit 50 nM oder 100 nM Dasatinib bzw. der Kontrolle DMSO inkubiert, anschließend sofort lysiert und bezüglich der Phosphorylierung von Tyrosinresten bzw. der Expression von Lck (56kDa) analysiert (repräsentativer Blot für n=3 unabhängige Versuche). Molekülgrößenangaben links des Blots in kDa.

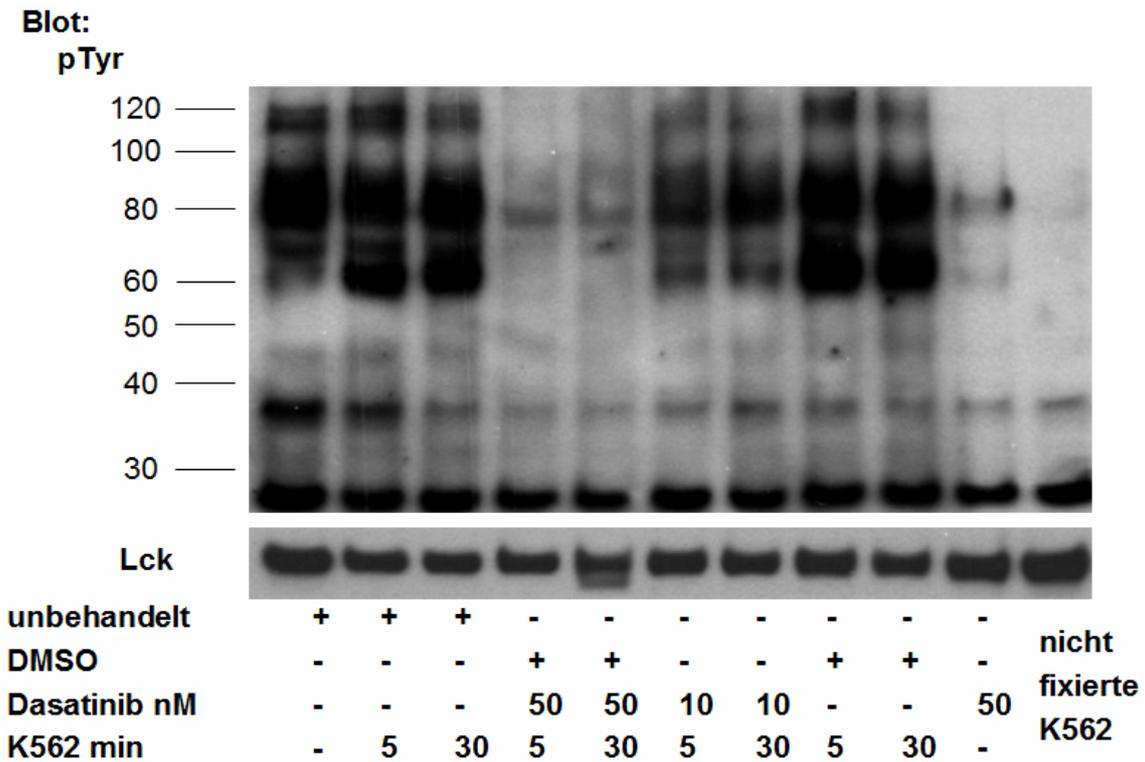


Abb. 12 Phosphorylierung von Tyrosinresten stimulierter NK- Zellen in Gegenwart von Dasatinib

Expandierte NK-Zellen wurden 1 h mit 10 nM bzw. 50 nM Dasatinib inkubiert und anschließend für 5 bzw. 30 min mit PFA (4%)-fixierten K562-Zellen stimuliert, lysiert und bezüglich der Expression von Lck bzw. phosphorylierten Tyrosinresten analysiert (repräsentativer Blot für n=4 unabhängige Versuche). Die Molekülgrößen links des Blots sind in kDa angegeben.

3.4.2 Vav, Erk, p38 und Akt-Phosphorylierung nach Vorbehandlung mit Dasatinib

Um die molekularen Mechanismen der verstärkenden Effekte der 24 h Dasatinib-Vorbehandlung zu erfassen, wurde die Phosphorylierung wichtiger Signalmoleküle, die in der Signalkaskade den als Dasatinib-Zielmoleküle bekannten Src-Kinasen folgen, analysiert. Vav steht in der Signalkette noch relativ am Anfang, integriert aber bereits aktivierende und inhibierende Signale. Akt ist essentiell für den Phosphoinositol-3-Kinase-Signalweg, während die MAP-Kinasen Erk und p38 näher am Endpunkt ihrer jeweiligen Signalwege stehen (siehe auch **Abb. 1**).

Polyklonale expandierte NK-Zellen mit einer Reinheit von min. 85% wurden analog zu den vorangegangenen funktionellen Versuchen 24 h mit Dasatinib bzw. DMSO vorbehandelt und der Wirkstoff durch zweimaliges Waschen der NK-Zellen entfernt. Nachdem die NK-Zellen zusammen mit den PFA (4%)-fixierten K562- oder Daudi-Zellen auf Eis synchronisiert wurden, wurden sie für 5 bzw. 15 min bei 37°C stimuliert. Dabei zeigte sich, dass es durch die Stimulierung mit Daudi-Zellen zu einer Reduktion der Autophosphorylierung von Erk kommt, während nach Stimulation mit K562-Zellen sowohl nach 5 als auch nach 15 min eine deutliche Steigerung der Erk-Phosphorylierung beobachtet wurde. Die Vorbehandlung der NK-Zellen hatte auf dieses Aktivierungsmuster keinen Einfluss. Ein umgekehrtes Muster zeigte sich für Akt. Hier führte die Stimulation mit Daudi-Zellen zu einer vermehrten Phosphorylierung und mit K562-Zellen zu einer Dephosphorylierung. Zumindest die Vorbehandlung mit Dasatinib 50 nM führte, obwohl das Medikament sich nicht mehr im Versuchsansatz befand, zu einer reduzierten Autophosphorylierung von Akt. Die Stimulation mit Daudi-Zellen führte trotzdem sowohl bei unbehandelten als auch bei vorbehandelten NK-Zellen zu einer fast gleich starken Phosphorylierung, wobei insbesondere bei der Vorbehandlung mit 10 nM Dasatinib eine tendenziell stärkere Phosphorylierung von Akt beobachtet wurde. Durch beide Zelllinien, stärker aber durch Daudi-Zellen, kam es zu einer vermehrten p38-Phosphorylierung mit einem Maximum nach 5 min. Während bei K562-Stimulation das Phosphorylierungsniveau der mit

10 nM und 50 nM Dasatinib vorbehandelten NK-Zellen nach 15 min unter das Niveau der unbehandelten Zellen absank, konnten bei Stimulation mit Daudi-Zellen auch zu diesem Zeitpunkt zwischen den verschiedenen Behandlungen nur graduelle Unterschiede festgestellt werden (**Abb. 13A/B**).

Die Vorbehandlung mit Dasatinib 50 nM hatte eine deutliche Reduktion der Grundphosphorylierung von Vav (pY160 und pY174) zur Folge. Auch nach Stimulation mit beiden Zelllinien blieb die Phosphorylierung noch deutlich inhibiert. Im Gegensatz dazu wurde die Grundphosphorylierung durch 10 nM Dasatinib nicht wesentlich beeinflusst. Tendenziell wurde für die Stimulation mit K562 nach 15 min eine vermehrte Vav-Phosphorylierung beobachtet (**Abb. 14 A/B**).

Da die funktionellen Versuche jeweils einen Zeitraum von 4-6 h berücksichtigten, wurde untersucht, ob der Zeitpunkt der Stimulation einen Einfluss auf den Stimulationserfolg hat. Die mit 50 nM Dasatinib vorbehandelten Zellen wurden dazu, nachdem das Medikament ausgewaschen wurde, vor der Stimulation für 1 h oder 4 h bei 37°C ruhen gelassen oder sofort verwendet. Weder für Erk, Akt noch für p38 wurde ein Unterschied für die verschiedenen Zeitpunkte festgestellt. Für Vav zeigte sich unmittelbar nach Herauswaschen des Medikaments eine weitgehend persistierende Inhibition der Phosphorylierung nach Stimulation mit Zielzellen. 1 h nach Herauswaschen von Dasatinib wurde eine deutliche Zunahme der Phosphorylierung des Vav-Serin-Rest pY160 beobachtet. Für den Vav-Serin-Rest pY174 war zu diesem Zeitpunkt kein nennenswerten Unterschied im Phosphorylierungsniveau behandelter und unbehandelter NK-Zellen mehr nachzuweisen. Nach 4 h zeigte sich tendenziell eine geringfügig höhere Vav-Phosphorylierung der Dasatinib vorbehandelten Zellen sowohl bei Stimulation mit K562- als auch mit Daudi-Zellen (**Abb. 14C**).

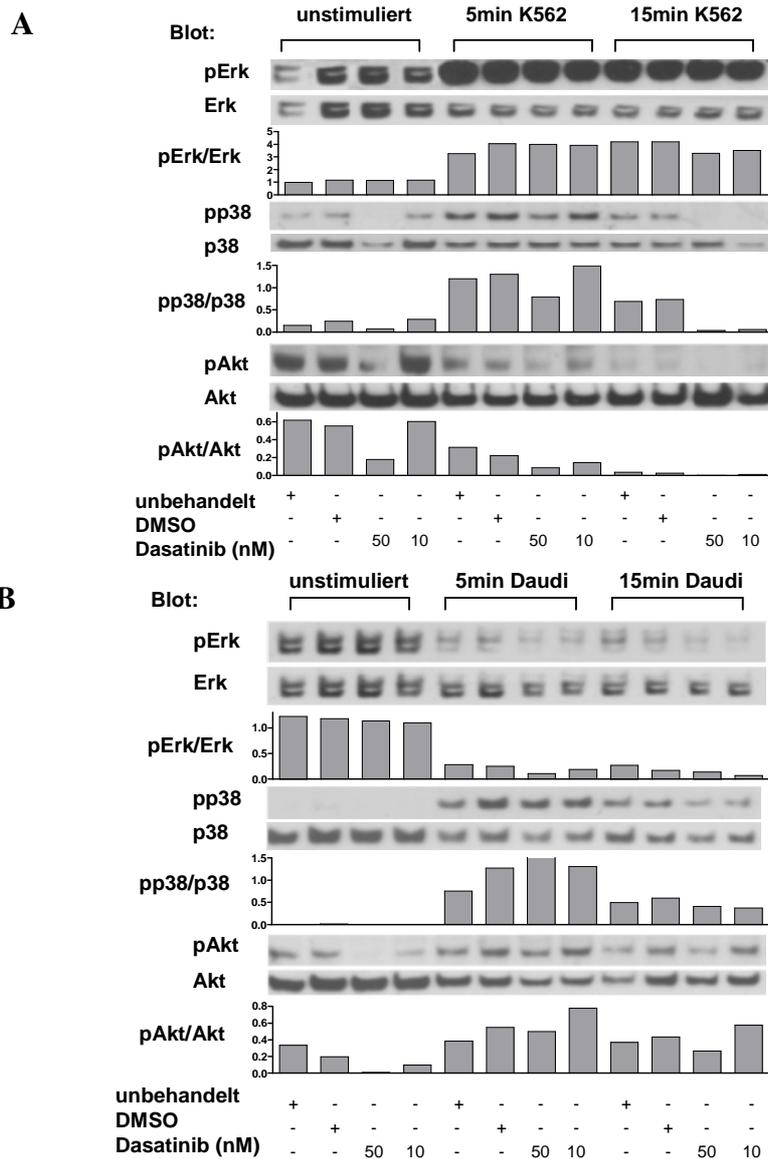


Abb. 13 Erk-, p38- und Akt- Phosphorylierung stimulierter NK-Zellen nach 24 h Dasatinib-Vorbehandlung

NK-Zellen wurden 24 h mit Dasatinib bzw. DMSO vorbehandelt und nach dem Herauswaschen des Wirkstoffes für 5 bzw. 15 min mit PFA (4%)-fixierten K562-(A) bzw. Daudi-Zellen(B) im Verhältnis 1:1 stimuliert und anschließend lysiert. Die Lysate wurden jeweils auf die Gegenwart von Erk, p38 und Akt und ihrer phosphorylierten Form (pErk, pp28, pAkt) hin analysiert (repräsentatives Beispiel für n=2 Versuche). Zusätzlich sind jeweils die relativen Intensitäten (Auswertung mit ImageJ) der Banden dargestellt.

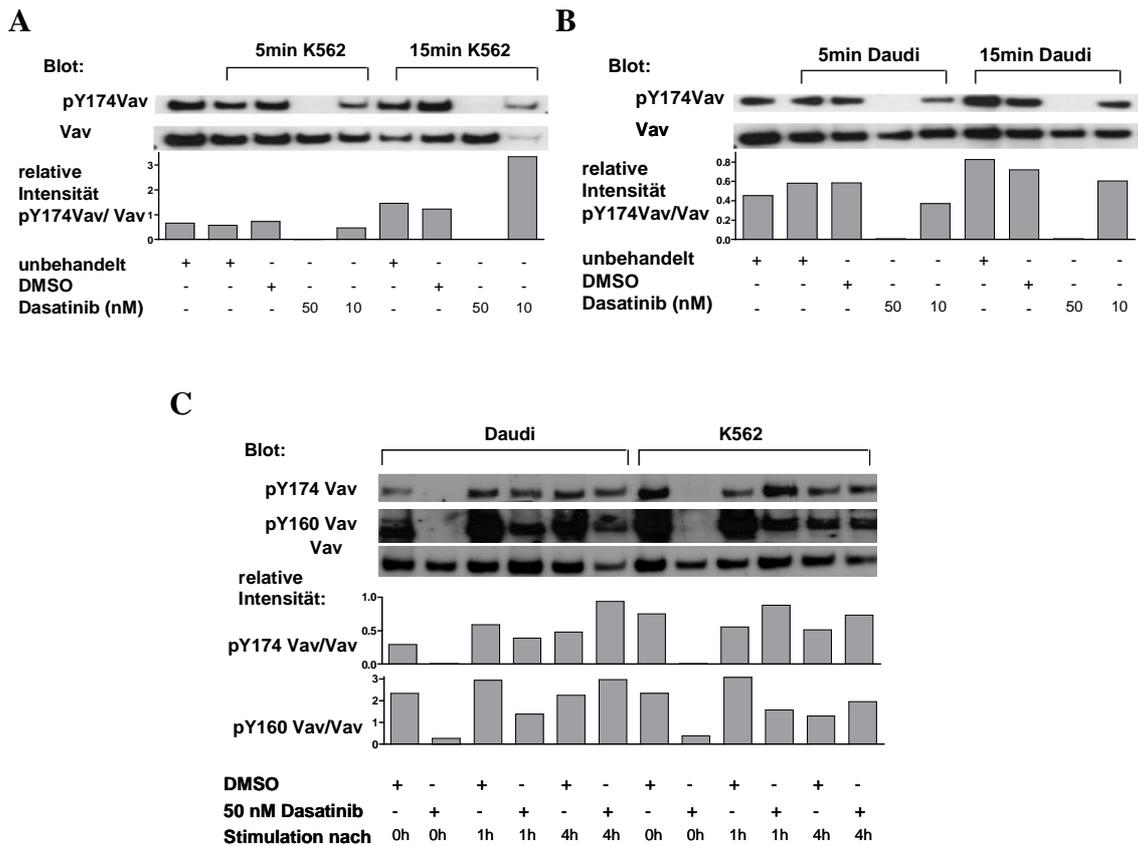


Abb. 14 Vav-Phosphorylierung stimulierter NK-Zellen nach 24 h Vorbehandlung mit Dasatinib

Polyklonale expandierte NK-Zellen wurden 24 h mit Dasatinib oder DMSO behandelt bzw. unbehandelt gelassen. Nach Herauswaschen des Wirkstoffs wurden die NK-Zellen im Verhältnis 1:1 mit PFA (4%)-fixierten K562- (A) oder Daudi-Zellen (B) stimuliert, lysiert und Western Blots mit Antikörper gegen Vav bzw. gegen den phosphorylierten Serin-Rest 174 (pY174Vav) durchgeführt. Für den in (C) gezeigten Blot ruhten die NK-Zellen, nachdem Dasatinib entfernt wurde, 0-4h bei 37°C im Brutschrank und wurden zum angegebenen Zeitpunkt stimuliert, lysiert und Western Blots mit Antikörper gegen Vav bzw. gegen die phosphorylierten Serin-Reste 174 (pY174Vav) bzw. 160 (pY160 Vav) getestet, jeweils repräsentativer Blot für n=2. Zusätzlich sind jeweils die relativen Intensitäten (Auswertung mit ImageJ) der Banden als dargestellt.

4 DISKUSSION

4.1 Inhibition von NK-Zellen in Gegenwart von Dasatinib

NK-Zellen spielen eine herausragende Rolle in der Erkennung und Eliminierung maligner Körperzellen. Allerdings führten NK-Zell-basierte Therapieansätze bei Tumorerkrankungen bisher nicht zu den erhofften Ergebnissen. Daher stellt die Erprobung von Adjuvantien wie TKIs zur Verbesserung von Immuntherapien eine medizinische Notwendigkeit dar. Für T-Zellen wurden bereits umfassende immunmodulatorische Effekte durch Dasatinib beobachtet (Schade 2008, Weichsel 2008). In klinischen Studien wurden ebenfalls immunmodulatorische Effekte von Dasatinib auf NK-Zellen belegt (Mustjoki 2009, Kim 2009, Kreutzman 2010).

K. Seystahl zeigte in ihrer Vorarbeit bereits, dass in der Gegenwart von Dasatinib sowohl die Zytotoxizität gegenüber K562-Zellen als auch die Degranulation und Zytokinausschüttung *in vitro* dosisabhängig inhibiert wurde (Seystahl 2010). Dies wurde nun für die Burkitt-Lymphomzelllinie Daudi, die im Vergleich zu der myeloischen Zelllinie K562 resistenter gegenüber der NK-Zell vermittelten Zytotoxizität ist, bestätigt. Im Gegensatz zu K562-Zellen wird aber die Zytotoxizität gegenüber Daudi-Zellen auch schon bei niedrigeren Dasatinib-Konzentrationen fast komplett inhibiert (**Abb. 3**). Diese unterschiedlich starke Inhibition ist am ehesten durch differente Stimulationswege durch die verschiedenen Zielzellen erklärbar. Während die NKG2D-vermittelte Zytolyse bei den K562-Zellen eine entscheidende Rolle spielt, besitzen Daudi-Zellen keine bekannten NKG2D-Liganden. Vielmehr führen hier z.B. SLAM-Rezeptoren wie 2B4 über verschiedene Signalwege vermittelt zur Zytolyse (vgl. **Tab. 2**). Auf Proteinebene wurde gezeigt, dass Dasatinib dosisabhängig zu einer ausgeprägten Inhibition der Phosphorylierung von Tyrosinresten führt. Insbesondere die Src-Kinase Lck, ein bekanntes Zielmolekül von Dasatinib, welches insbesondere in den frühen Abschnitten der Signalkaskaden der NK-Zellen eine entscheidende Rolle spielt, wird durch Dasatinib inhibiert. Aus der

Inhibition dieser frühen Signale resultiert die Hemmung der Phosphorylierung von Signalmolekülen, die in der Signalkaskade den Src-Kinasen folgen. Durch die Stimulation mit K562-Zellen lässt sich die durch Dasatinib verursachte Inhibition nicht aufheben. Diese beobachteten kurzfristigen Effekte bestätigen die zwischenzeitlich veröffentlichten Berichte über die inhibitorische Wirkung von Dasatinib auf NK-Zellen (Blake 2008, Fraser 2008, Salih 2010).

4.2 Verstärkung der NK-Zell-Funktionen durch Vorbehandlung mit Dasatinib

Neben den bekannten inhibierenden Effekten konnten wir zum ersten Mal *in vitro* unter Verwendung von Zellen von gesunden Spendern auch eine stimulierende Wirkung von Dasatinib auf NK-Zellen beobachten. Wurden expandierte NK-Zellen 24 h mit Dasatinib vorbehandelt und Dasatinib unmittelbar vor Beginn der Versuche ausgewaschen, zeigte sich sowohl eine verstärkte Zytokinproduktion und Degranulation als auch eine Verstärkung der Zytolyse von Daudi-Lymphomzellen. Diese 24 h Vorbehandlung wurde gewählt, da in aktuellen Therapieprotokollen nur noch einmal täglich 100 mg statt wie bisher zweimal täglich 70 mg Dasatinib verabreicht werden. Da Dasatinib im Körper eine Halbwertszeit von lediglich 3-4 h aufweist, wurde - um vergleichbare *in vitro*-Bedingungen zu schaffen - Dasatinib nach der 24 h Vorbehandlung ausgewaschen (Shah 2008). Während die Verstärkung der Zytokinproduktion als auch die Steigerung der Degranulation bei Stimulation mit K562- und Daudi-Zellen nachgewiesen wurde, wurde die Zytolyse von K562-Zellen im Gegensatz zu Daudi-Zellen nicht gesteigert. Diese Diskrepanz ist möglicherweise durch die unterschiedliche Sensitivität der verwendeten Versuchssysteme zu erklären. Neben der effektiven Degranulation von Perforin/Granzym-haltigen Granula erfasst die Messung der Expression von CD107a/b auch die ineffektive Degranulation und Vorstufen der Degranulation (Jacobi 2009). K562-Zellen sind im Vergleich zu Daudi-Zellen sehr empfindlich gegenüber NK-Zellen. Möglicherweise ist die Zytolyse gegenüber K562 schon ohne Vorbehandlung maximal und kann auch durch die Vorbehandlung der NK-Zellen nicht weiter gesteigert werden.

Denkbar ist auch eine unterschiedliche Sensitivität von K562- und Daudi-Zellen gegenüber Zytokinen. Im Gegensatz zu K562-Zellen wurde für Daudi-Zellen eine Korrelation der Zytokinausschüttung mit der Zytolyse beobachtet (Özdemir 2005). Zudem ist ebenfalls bekannt, dass von NK-Zellen produzierte Zytokine wie $TNF\alpha$ auf Daudi-Zellen zytotoxisch wirken (Di Pietro 1997). Sicherlich spielen auch die unterschiedlich auf Daudi- bzw. K562-Zellen exprimierte NK-Zell-Rezeptor-Liganden eine entscheidende Rolle für diese differenten Effekte.

Die unterschiedliche Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen auf Zielzellen beeinflusst diese verstärkenden Effekte nicht. Daudi-Zellen exprimieren auf Grund eines defekten $\beta 2m$ -Moleküls keine intakten MHC-Klasse-I-Moleküle. Auch K562-Zellen präsentieren keine MHC-Moleküle auf ihrer Oberfläche. Zwischen $\beta 2m$ -negativen und mit $\beta 2m$ -transfizierten Daudi-Zellen wurde kein Unterschied bezüglich der Steigerung der Zytolyseraten als auch der Zytokinproduktion und Degranulation nach Dasatinib-Vorbehandlung festgestellt. $\beta 2m$ -positive Daudi-Zellen zeigten gegenüber den nicht-transfizierten Daudi-Zellen eine etwas geringere Zytolyse, da auf Grund der nun exprimierten MHC-Moleküle inhibierende KIR-Rezeptoren auf NK-Zellen stimuliert werden und somit die Zytotoxizität partiell blockiert wird. Die Ausstattung von NK-Zellen mit verschiedenen KIR-Rezeptoren variiert erheblich zwischen verschiedenen Individuen. Die Beobachtung, dass bezüglich der stimulierenden Wirkung von Dasatinib nur geringe interindividuelle Unterschiede zwischen den verschiedenen Spendern vorlagen, macht es sehr unwahrscheinlich, dass eine Inhibition von KIR-Rezeptoren eine entscheidende Rolle spielt. Daher wurde auf die Untersuchung dieser Rezeptoren verzichtet.

Mechanistisch kommen als Erklärung für die beobachteten aktivierenden Effekte mehrere Ursachen in Frage. Eine geänderte Regulation von NK-Zell-Rezeptoren wie eine erhöhte Expression von aktivierenden bzw. eine geringere Expression von inhibierenden Rezeptoren könnte diese Effekte erklären. Einerseits wird die Oberflächenexpression vieler NK-Zell-Rezeptoren im Zeitbereich weniger Minuten bis weniger Tagen reguliert, andererseits spielen Dasatinib-Zielmoleküle

wie Src-Kinasen bei der Internalisierung wie auch der Degradation von Oberflächenrezeptoren eine Rolle (Paolini 1999). Die Expression von NKG2D auf expandierten NK-Zellen aber auch von aus PBMC isolierten NK-Zellen (Daten nicht gezeigt) wurde durch die Dasatinib-Behandlung nicht signifikant beeinflusst. Einzelne Spender zeigten zwar eine leichte Herabregulierung von NKG2D durch Dasatinib, allerdings wurde in der Zusammenschau aller Spender kein signifikanter Effekt beobachtet. Im Gegensatz dazu konnte im Vorfeld aber schon gezeigt werden (Salih 2010) und in unserem Labor bestätigt werden (Daten nicht gezeigt), dass die von K562-Zellen exprimierten NKG2D-Liganden MICA/B durch Dasatinib herunterreguliert werden.

Für LFA-1, ein Oberflächenrezeptor, der einerseits an der initialen Adhäsion der NK-Zellen an Zielzellen, andererseits aber ebenfalls an der Aktivierung der Zytolyse insbesondere auch von Daudi-Zellen beteiligt ist, wurde ebenso kein Dasatinib-Effekt nachgewiesen. Im Gegensatz dazu wurden bei der Expression von CD16 mehrere Effekte beobachtet. Durch die 24 h Dasatinib-Vorbehandlung von NK Zellen alleine wurde kein signifikanter Einfluss auf die CD16-Expression erzielt. Hingegen zeigte sich nach 5 min Stimulation mit Zielzellen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen eine leichte Heraufregulierung von CD16. Nach 6 h Stimulation der vorbehandelten NK-Zellen mit K562- und Daudi-Zellen war eine verstärkte Herabregulierung der CD16-Expression nachweisbar. Primär vermittelt der CD16-Rezeptor als FcR-Rezeptor die ADCC. Allerdings wurde bereits gezeigt, dass CD16 auch direkt ohne die Beteiligung von Antikörpern die Zytolyse von NK-Zielzellen auslösen kann (Mandelboim 1999). In mehreren Arbeiten wurde beschrieben, dass CD16 nach Zellkontakt bzw. nach Aktivierung der NK-Zellen entweder mit Hilfe von Metalloproteinasen von der Oberfläche abgespalten wird oder alternativ die CD16-Rezeptoren internalisiert werden (Grzywacz 2007). Bisher wurde nur für Melanomzellen *in vitro* eine Herabregulierung von Metalloproteinasen durch Dasatinib-Behandlung nachgewiesen (Buettner 2009). Bei der Internalisierung und Degradation von CD16-Rezeptoren wurde die Beteiligung des Dasatinib-Zielmoleküls Lck belegt (Paolini 2001). Denkbar ist in diesem Zusammenhang eine Blockierung der

CD16-Umsetzung während der 24 h Vorbehandlung. Nach dem Herauswaschen von Dasatinib könnte dann als Rebound-Effekt die Internalisierung bzw. die Abspaltung der CD16-Rezeptoren verstärkt werden.

Die nach der Vorbehandlung beobachteten stimulierenden Dasatinib-Effekte in den funktionellen Versuchen waren durch erneute Zugabe von Dasatinib während der Versuche innerhalb kürzester Zeit komplett reversibel, so dass wiederum eine Inhibition der NK-Zellen resultierte, die sich nicht von der Inhibition ohne Vorbehandlung unterschied. Auch diese Beobachtung spricht für ein Rebound-Phänomen als mögliche Erklärung der verstärkenden Effekte.

Die Resultate der Proteinanalyse stützen ebenfalls diese Hypothese. Zunächst führte Dasatinib innerhalb 1 h zu einer maximalen Inhibition der Phosphorylierung von Tyrosinresten einer Vielzahl von Signalmolekülen (**Abb. 12**). Nach 24 h Vorbehandlung und anschließendem Auswaschen von Dasatinib ist die Grundphosphorylierung der untersuchten Signalmoleküle p38, Akt, Erk und Vav reduziert, wohingegen sich nach Stimulation zu diesem Zeitpunkt die Phosphorylierungsniveaus der unbehandelten und der vorbehandelten NK-Zellen kaum unterschieden. Bei Vorbehandlung der NK-Zellen mit 10 nM Dasatinib wurde für Akt nach Stimulation mit Daudi-Zellen, bzw. Vav nach Stimulation mit K562-Zellen tendenziell ein gegenüber den unbehandelten Zellen erhöhtes Phosphorylierungsniveau beobachtet (**Abb. 13**). Dies könnte zumindest teilweise für die erhöhte Aktivierung der NK-Zell-Funktionen verantwortlich sein. Da sich die Versuche zur Betrachtung der funktionellen Eigenschaften aber über einen Zeitraum von 4 h bei den Zytotoxizitäts- bzw. 6 h bei den Zytokinversuchen erstreckten, wurde auch untersucht, ob der Abstand zwischen dem Ende der Dasatinib-Behandlung und dem Zeitpunkt der Stimulation der NK-Zellen einen Einfluss auf die Aktivierung der Signalkaskaden hat. Für Akt, p38 und Erk konnte dies ausgeschlossen werden. Zumindest für Vav, welches Signale verschiedener Rezeptoren integriert (siehe **Abb. 1**), wurde erst nach 1 h eine Normalisierung bzw. für nach 4 h eine geringe Erhöhung der Phosphorylierung beobachtet, wenn die Zellen mit 50 nM Dasatinib behandelt wurden (**Abb. 14**). Dies impliziert, dass

die Restitution bzw. die beobachtete Erhöhung der Zytotoxizität nicht unmittelbar nach Auswaschen des Medikaments erfolgt. Es liegt nahe, dass Dasatinib eine reversible Hemmung sowohl aktivierender als auch inhibierender Signalwege bewirkt. Möglicherweise ergibt sich nach Auswaschen von Dasatinib ein Zeitfenster, in dem aktivierende Rezeptoren bzw. deren Signalwege bereits wieder stimuliert werden können, während inhibierende Rezeptoren noch nicht ansprechbar sind, womit sich insgesamt eine vorübergehende erhöhte Aktivierung der vorbehandelten NK-Zellen ergeben würde.

4.3 Klinische Relevanz und Ausblick

Die hier dargestellten *in vitro* Beobachtung legen nahe, dass bei Behandlung mit Dasatinib sowohl die Dosierung als auch die Zeitintervalle zwischen den einzelnen Dosen mögliche positive immuntherapeutische Effekte beeinflussen. In klinischen Studien wurde nachgewiesen, dass eine einmal tägliche Gabe die Rate unerwünschter Wirkungen senken kann, ohne die Effektivität der Therapie zu vermindern (Shah 2008, Condorelli 2010). Nebenwirkungen wie die unter Dasatinib auftretenden Pleuraergüsse, für die eine immunologische Genese diskutiert wird, treten bei der Hochdosispulstherapie seltener auf (De Lavallade 2008, Shah 2008). Möglicherweise können Patienten durch ein optimal angepasstes zeitliches Regime und die damit verbundene NK-Zell-Modulation profitieren. Die Tatsache, dass sowohl die NK-vermittelte Zytolyse als auch die Zytokinproduktion nicht nur wiederherstellbar sind, sondern auch gesteigert werden können, legen nahe, dass die immunologische Tumorabwehr abhängig vom gewählten Dosisregime verbessert werden könnte.

Zytokine beeinflussen wesentlich das Mikromileu einer Infektion. Neben der antiviralen Eigenschaft von IFN γ aktiviert dieses auch T-Zellen, TNF α wiederum vermag Dendritische Zellen zu stimulieren (Agaugue 2008). Bei immunkomprimierten Patienten könnte ein optimiertes Therapieregime somit günstig auf die Verhinderung von Virusinfektionen wirken. Allerdings birgt die Steigerung der Zytokinausschüttung auch das Risiko des Auftretens von

Autoimmunerkrankungen durch die Aktivierung autoreaktiver T-Zellen. Bisher existieren jedoch nur Einzelfallberichte über das Auftreten eines systemischen Lupus bzw. von autoimmunen interstitiellen Lungenerkrankungen unter Dasatinib-Therapie (Bergeron 2007, Rea 2008).

Denkbar wäre auch der Einsatz von Dasatinib in der autologen NK-Zell-Therapie von Leukämien um die anti-leukämische Funktion von NK-Zellen zu steigern.

Zur Überprüfung dieser Hypothesen sind weiterführende Studien im *in vitro* System wie auch *in vivo* z.B. am Mausmodell und letztendlich am Patienten nötig. Im *in vitro* System kann das Zusammenspiel von NK-Zellen mit anderen Körperzellen unter Dasatinib-Behandlung weitergehend untersucht werden. In diesem Zusammenhang stellt sich z.B. die Frage, ob und wie die Interaktion zwischen NK-Zellen und dendritischen Zellen, welche die Proliferation und Aktivierung von NK-Zellen wesentlich beeinflussen, durch Dasatinib moduliert wird. Zudem ist auch zu klären, in wie weit Dasatinib die Sensitivität von Tumorzellen gegenüber NK-Zellen beeinflusst, indem z.B. die Expression von NK-Zell-Rezeptor-Liganden moduliert wird. Im Rahmen dieser Arbeit konnte zumindest für die Daudi-Zellen gezeigt werden, dass die Effektivität der NK-Zytolyse auch nach Behandlung der Daudi-Zellen mit Dasatinib nur minimal reduziert wurde (**Abb. 7**).

Neben den funktionellen Zytotoxizitäts- und Zytokinversuchen geben die durchgeführten Western Blot- und Rezeptorversuche erste Hinweise auf den molekularen Mechanismen der gesteigerten NK-Zell-Aktivierung durch Dasatinib. Auf Grund der Komplexität der Interaktion zwischen NK-Zellen und Tumorzellen einerseits und der Vielzahl der möglichen Dasatinib-Zielmoleküle andererseits, ist der genaue molekulare Mechanismus, der die Verstärkung der NK-Zellfunktion erklären kann nur schwer voraussagbar. Auch kommen für diese Interaktion eine Vielzahl bekannter, aber zum Teil auch noch unbekannter Rezeptor-Liganden-Paare in Betracht. Insbesondere, da die Steigerung der Zytotoxizität gegenüber unterschiedlichen Zielzellen differiert, könnten Stimulationsversuche mit Anti-

körpern gegen bestimmte NK-Zell-Rezeptoren Aufschluss über die beteiligten Rezeptor-Liganden-Paare geben. Rezeptoren, wie z.B. SLAM-Rezeptoren, deren Liganden im Gegensatz zu K562-Zellen insbesondere von Daudi-Zellen exprimiert werden, sollten in diesem Zusammenhang noch näher betrachtet werden. Neben der Modulation von Rezeptoren sind auch Einflüsse von Dasatinib auf die initiale Kontaktaufnahme und Immunsynapsenbildung zwischen NK-Zellen und Zielzellen denkbar. Diese könnten beispielsweise mit Hilfe von Konjugationsexperimenten untersucht werden. Auf Proteinebene könnten, wie z.B. für SLAM-Rezeptoren wie 2B4, beschrieben alternative Signalwege bei der Verstärkung der NK-Funktion beteiligt sein (Eissmann 2005). Neben den schon untersuchten Signalmolekülen spielen bei einigen bereits bekannten antileukämischen Dasatinib-Effekten auch Transkriptionsfaktoren wie STAT 3 und 5 eine wichtige Rolle (Johnson 2007, Nam 2007). Insbesondere um die Rebound-Hypothese zu überprüfen ist die Quantifizierung des Granzym- und Perforingehalts von mit Dasatinib behandelten NK-Zellen vor und nach Stimulation mit Zielzellen sinnvoll, da möglicherweise während des 24 h-Behandlungsintervalls eine in Gegenwart der RPMI 8866-Zellen stattfindende Spontandegranulation verhindert wird und so der Gehalt an intrazellulärem Granzym bzw. Perforin ansteigt.

5 ZUSAMMENFASSUNG

NK-Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der Erkennung und Eliminierung von virusinfizierten Zellen aber vor allem auch von Tumorzellen. Neue Therapieformen wie die autologe NK-Zell-Therapie versuchen sich diese Eigenschaften der NK-Zellen zu Nutze zu machen. Allerdings zeigten diese Methoden bisher nur mäßige Erfolge. Als weitere Strategie wäre die direkte Modulation der NK-Zellen denkbar. Dasatinib ist ein potenter Inhibitor einer Vielzahl von Kinasen, welche maßgeblich an der Vermittlung und Regulation von NK-Zell-Effektorfunktionen beteiligt sind. Bisher ist einerseits eine unmittelbare Inhibition der NK-Zell-Funktionen in Gegenwart von Dasatinib beschrieben, andererseits finden sich aber in klinischen Studien Hinweise auf eine Erhöhung der anti-leukämischen NK-Zell-Aktivität bei mit Dasatinib behandelten Patienten. Um ein besseres Verständnis dieser differenten Effekte zu erlangen, wurden im Rahmen dieser Arbeit neben der Zytotoxizität, Degranulation und Zytokinproduktion auch die möglichen Dasatinib-Einflüsse auf NK-Zell-Rezeptoren sowie auf molekularer Ebene die Einflüsse auf Signalmoleküle untersucht. Während in Gegenwart von Dasatinib eine Inhibition der NK-Zell-Effektorfunktionen gezeigt werden konnte, wurde nach 24 h Vorbehandlung eine signifikante Steigerung der Zytotoxizität gegenüber Daudi-Lymphomzellen als auch eine Zunahme der Zytokinproduktion und NK-Zell-Degranulation beobachtet. Diese aktivierenden Effekte waren unabhängig von der MHC-Klasse-I-Expression der Zielzellen nachweisbar. Während die Expression der NK-Rezeptoren NKG2D und LFA-1 durch Dasatinib nicht beeinflusst wurde, wurde CD16 nach der Stimulation mit K562- oder Daudi-Zellen auf Dasatinib- vorbehandelten NK-Zellen schneller herunterreguliert. Auf Proteinebene wurde die Phosphorylierung von Tyrosinresten, insbesondere auch von Lck, welches in der frühen Signaltransduktion von NK-Zellen eine wichtige Rolle spielt, in Gegenwart von Dasatinib inhibiert, während sich nach 24 h Vorbehandlung und nach Stimulation mit Zielzellen kaum Unterschiede im Phosphorylierungsniveau von p38, Akt und Erk zwischen unbehandelten und Dasatinib-behandelten NK-Zellen finden ließen.

Zum Teil führte die Vorbehandlung sogar zu einer leichten Erhöhung der Phosphorylierung der Signalmoleküle Akt und Vav. Insgesamt scheint die Erhöhung der NK-Zell-Aktivität in erster Linie ein Rebound-Effekt zu sein. Die Ergebnisse der funktionellen Untersuchungen verdeutlichen die Wichtigkeit des Zeitpunktes der Dasatinib-Gabe um sich die immunmodulatorischen Effekte dieses Medikaments in der Lymphom bzw. Leukämie-therapie zu Nutze zu machen.

6 ABBILDUNGEN UND TABELLEN

Abbildungen

Abb. 1 Signalwege von NK-Zell-Rezeptoren	8
Abb. 2 Entwicklung der NK-Zell- Reinheit während der 11-tägigen Expansion mit RPMI 8866- Zellen (repräsentatives Beispiel)	21
Abb. 3 Zytotoxizität gegenüber Daudi-Zellen in Gegenwart von Dasatinib.....	31
Abb. 4 Zytotoxizität gegenüber K562 nach Vorbehandlung der NK-Zellen.....	32
Abb. 5 Zytotoxizität gegenüber Daudi $\beta 2m\pm$ -Zellen nach Dasatinib- Behandlung der NK-Zellen.....	34
Abb.6 Zytotoxizität gegenüber Daudi $\beta 2m\pm$ -Zellen nach Dasatinib-Behandlung der NK-Zellen und erneuter Gegenwart von Dasatinib im Versuch.....	36
Abb. 7 Spezifische Lyse gegenüber 24 h vorbehandelter Daudi-Zellen	38
Abb. 8 $TNF\alpha$ / $IFN\gamma$ -Produktion und Degranulation nach Stimulation der NK- Zellen mit K562-Zellen	40
Abb. 9 $TNF\alpha$ / $IFN\gamma$ -Produktion und Degranulation nach Stimulation der NK- Zellen mit Daudi-Zellen	41
Abb. 10 CD16 Expression Dasatinib-vorbehandelter NK-Zellen nach Stimulation mit Daudi- und K562-Zellen.....	44
Abb. 11 Phosphorylierung von Tyrosinresten in Gegenwart von Dasatinib.....	46
Abb. 12 Phosphorylierung von Tyrosinresten stimulierter NK- Zellen in Gegenwart von Dasatinib	47
Abb. 13 Erk-, p38- und Akt- Phosphorylierung stimulierter NK-Zellen nach 24 h Dasatinib-Vorbehandlung.....	50
Abb. 14 Vav-Phosphorylierung stimulierter NK-Zellen nach 24 h Vorbe- handlung mit Dasatinib.....	51

Tabellen

Tab. 1 Inhibierende NK-Zell- Rezeptoren und ihre Liganden	6
Tab. 2 Aktivierende NK-Zell-Rezeptoren und ihre Liganden	7
Tab. 3 Verwendete FACS-Antikörper	14
Tab. 4 Verwendete Western-Blot-Antikörper	15
Tab. 5 NK-Zell-Rezeptor-Liganden von Daudi- und K562-Zellen	19

5 LITERATURVERZEICHNIS

- Agaugue, Marcenaro, Ferranti, Moretta, Moretta (2008). "Human natural killer cells exposed to IL-2, IL-12, IL-18, or IL-4 differently modulate priming of naive T cells by monocyte-derived dendritic cells." Blood 112(5): 1776-1783.
- Alter, Malenfant, Altfeld (2004). "CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity." Journal of Immunological Methods 294(1-2): 15-22.
- Azzoni, Zatssepina, Abebe, Bennett, Kanakaraj, Perussia (1998). "Differential Transcriptional Regulation of CD161 and a Novel Gene, 197/15a, by IL-2, IL-15, and IL-12 in NK and T Cells." J Immunol 161(7): 3493-3500.
- Bantscheff, Eberhard, Abraham, Bastuck, Boesche, Hobson, Mathieson, Perrin, Raida, Rau, Reader, Sweetman, Bauer, Bouwmeester, Hopf, Kruse, Neubauer, Ramsden, Rick, Kuster, Drewes (2007). "Quantitative chemical proteomics reveals mechanisms of action of clinical ABL kinase inhibitors." Nat Biotech 25(9): 1035-1044.
- Barber, Faure, Long (2004). "LFA-1 Contributes an Early Signal for NK Cell Cytotoxicity." J Immunol 173(6): 3653-3659.
- Barber, Long (2003). "Coexpression of CD58 or CD48 with Intercellular Adhesion Molecule 1 on Target Cells Enhances Adhesion of Resting NK Cells." The Journal of Immunology(170): 294–299.
- Bauer, Groh, Wu, Steinle, Phillips, Lanier, Spies (1999). "Activation of NK Cells and T Cells by NKG2D, a Receptor for Stress-Inducible MICA." Science 285(5428): 727-729.
- Bergeron, Rea, Levy, Picard, Meignin, Tamburini, Bruzzoni-Giovanelli, Calvo, Tazi, Rousselot (2007). "Lung Abnormalities after Dasatinib Treatment for Chronic Myeloid Leukemia: A Case Series." Am. J. Respir. Crit. Care Med. 176(8): 814-818.
- Bhat, Watzl (2007). "Serial Killing of Tumor Cells by Human Natural Killer Cells – Enhancement by Therapeutic Antibodies." PLoS ONE 2(3): e326.

- Blake, Bruce Lyons, Fraser, Hayball, Hughes (2008). "Dasatinib suppresses in vitro natural killer cell cytotoxicity." Blood 111(8): 4415-4416.
- Bloushtain, Qimron, Bar-Ilan, Hershkovitz, Gazit, Fima, Korc, Vlodaysky, Bovin, Porgador (2004). "Membrane-Associated Heparan Sulfate Proteoglycans Are Involved in the Recognition of Cellular Targets by NKp30 and NKp46." The Journal of Immunology 173(4): 2392-2401.
- Boivin, Cooper, Hiebert, Granville (2009). "Intracellular versus extracellular granzyme B in immunity and disease: challenging the dogma." 89(11): 1195-1220.
- Bottino, Castriconi, Pende, Rivera, Nanni, Carnemolla, Cantoni, Grassi, Marcenaro, Reymond, Vitale, Moretta, Lopez, Moretta (2003). "Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as Cell Surface Ligands for the Human DNAM-1 (CD226) Activating Molecule." The Journal of Experimental Medicine 198(4): 557-567.
- Bryceson, March, Barber, Ljunggren, Long (2005). "Cytolytic granule polarization and degranulation controlled by different receptors in resting NK cells." The Journal of Experimental Medicine 202(7): 1001-1012.
- Bryceson, March, Ljunggren, Long (2006). "Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion." Blood 107(1): 159-166.
- Caligiuri (2008). "Human natural killer cells." Blood 112(3): 461-469.
- Condorelli, Genazzani (2010). "Dasatinib: Is it All in the Dose?" BioDrugs 24(3): 157-163.
- Cooper, Fehniger, Caligiuri (2001). "The biology of human natural killer-cell subsets." Trends in Immunology 22(11): 633-640.
- Cooper, Fehniger, Fuchs, Colonna, Caligiuri (2004). "NK cell and DC interactions." Trends in Immunology 25(1): 47-52.
- Davis (2002). "Assembly of the immunological synapse for T cells and NK cells." Trends in Immunology 23(7): 356-363.
- De Lavallade, Punnialingam, Milojkovic, Bua, Khorashad, Gabriel, Chaidos, Olavarria, Goldman, Apperley, Marin (2008). "Pleural effusions in patients with chronic myeloid leukaemia treated with dasatinib may have

- an immune-mediated pathogenesis." British Journal of Haematology 141(5): 745-747.
- Degli-Esposti, Smyth (2005). "Close encounters of different kinds: Dendritic cells and NK cells take centre stage." Nat Rev Immunol 5(2): 112-124.
- Di Pietro, Santavenere, Centurione, Stuppia, Centurione, Vitale, Rana (1997). "TNF- α -induced apoptosis in Daudi cells: Multiparametric analysis." Cytokine 9(7): 463-470.
- Dietz, Bulur, Emery, Winters, Epps, Zubair, Vuk-Pavlovi (2006). "A novel source of viable peripheral blood mononuclear cells from leukoreduction system chambers." Transfusion 46(12): 2083-2089.
- Eagle, Flack, Warford, Martínez-Borra, Jafferji, Traherne, Ohashi, Boyle, Barrow, Caillat-Zucman, Young, Trowsdale (2009). "Cellular Expression, Trafficking, and Function of Two Isoforms of Human ULBP5/RAET1G." PLoS ONE 4(2): e4503.
- Eissmann, Beauchamp, Wooters, Tilton, Long, Watzl (2005). "Molecular basis for positive and negative signaling by the natural killer cell receptor 2B4 (CD244)." Blood 105(12): 4722-4729.
- Eleme, Taner, Önfelt, Collinson, Mccann, Chalupny, Cosman, Hopkins, Magee, Davis (2004). "Cell Surface Organization of Stress-inducible Proteins ULBP and MICA That Stimulate Human NK Cells and T Cells via NKG2D." The Journal of Experimental Medicine 199(7): 1005-1010.
- Empson, Mcqueen, Dalbeth (2009). "The natural killer cell: a further innate mediator of gouty inflammation." Immunol Cell Biol 88(1): 24-31.
- Endt, Eissmann, Hoffmann, Meinke, Giese, Watzl (2007). "Modulation of 2B4 (CD244) activity and regulated SAP expression in human NK cells." European Journal of Immunology 37(1): 193-198.
- English, Andersen (1974). "Single-step separation of red blood cells, granulocytes and mononuclear leukocytes on discontinuous density gradients of Ficoll-Hypaque." Journal of Immunological Methods 5(3): 249-252.

- Fauriat, Long, Ljunggren, Bryceson (2010). "Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition." Blood 115(11): 2167-2176.
- Felzmann, Witt, Wimmer, Ressmann, Wagner, Paul, Hüttner, Fritsch (2003). "Monocyte enrichment from leukapheresis products for the generation of DCs by plastic adherence, or by positive or negative selection." Cytotherapy 5(5): 391-398.
- Flodström-Tullberg, Bryceson, Shi, Höglund, Ljunggren (2009). "Natural killer cells in human autoimmunity." Current Opinion in Immunology 21(6): 634-640.
- Fuchs, Cella, Giurisato, Shaw, Colonna (2004). "Cutting Edge: CD96 (Tactile) Promotes NK Cell-Target Cell Adhesion by Interacting with the Poliovirus Receptor (CD155)." J Immunol 172(7): 3994-3998.
- Garg, Barnes, Porgador, Roy, Wu, Nanda, Griffith, Girard, Rawal, Shetty, Vankayalapati (2006). "Vimentin Expressed on Mycobacterium tuberculosis-Infected Human Monocytes Is Involved in Binding to the Nkp46 Receptor." The Journal of Immunology 177(9): 6192-6198.
- Giurisato, Cella, Takai, Kurosaki, Feng, Longmore, Colonna, Shaw (2007). "Phosphatidylinositol 3-Kinase Activation Is Required To Form the NKG2D Immunological Synapse." Mol. Cell. Biol. 27(24): 8583-8599.
- Gómez-Román, Florese, Patterson, Peng, Venzon, Aldrich, Robert-Guroff (2006). "A simplified method for the rapid fluorometric assessment of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity." Journal of Immunological Methods 308(1-2): 53-67.
- Graham, Cella, Giurisato, Fujikawa, Miletic, Kloeppel, Brim, Takai, Shaw, Colonna, Swat (2006). "Vav1 Controls DAP10-Mediated Natural Cytotoxicity by Regulating Actin and Microtubule Dynamics." J Immunol 177(4): 2349-2355.
- Grzywacz, Kataria, Verneris (2007). "CD56^{dim}CD16⁺ NK cells downregulate CD16 following target cell induced activation of matrix metalloproteinases." Leukemia 21(2): 356-359.

- Hietakangas, Poukkula, Heiskanen, Karvinen, Sistonen, Eriksson (2003). "Erythroid Differentiation Sensitizes K562 Leukemia Cells to TRAIL-Induced Apoptosis by Downregulation of c-FLIP." Mol. Cell. Biol. 23(4): 1278-1291.
- Jacobi, Claus, Wildemann, Wingert, Korporal, Römisch, Meuer, Watzl, Giese (2009). "Exposure of NK cells to intravenous immunoglobulin induces IFN γ release and degranulation but inhibits their cytotoxic activity." Clinical Immunology 133(3): 393-401.
- Jan Chalupny, Sutherland, Lawrence, Rein-Weston, Cosman (2003). "ULBP4 is a novel ligand for human NKG2D." Biochemical and Biophysical Research Communications 305(1): 129-135.
- Jiang, Zhong, Gilvary, Corliss, Vivier, Hong-Geller, Wei, Djeu (2002). "Syk regulation of phosphoinositide 3-kinase-dependent NK cell function." J Immunol 168(7): 3155-3164.
- Kärre (2002). "NK cells, MHC Class I Molecules and the Missing Self." Scandinavian Journal of Immunology 55(3): 221-228.
- Kaur, Voss, Gupta, Schell, Fisch, Sondel (1993). "Human peripheral $\gamma\delta$ -T cells recognize hsp60 molecules on Daudi Burkitt's lymphoma cells." J Immunol 150(5): 2046-2055.
- Kelley, Rozek, Suenram, Schwartz (1987). "Activation of human blood monocytes by adherence to tissue culture plastic surfaces." Exp Mol Pathol. 46(3): 266-278.
- Kim, Kamel-Reid, Chang, Sutherland, Jung, Kim, Lee, Lipton (2009). "Natural killer or natural killer/T cell lineage large granular lymphocytosis associated with dasatinib therapy for Philadelphia chromosome positive leukemia." Haematologica 94(1): 135-139.
- Kopp, Placke, Salih (2009). "Platelet-derived Transforming Growth Factor- β down-regulates NKG2D thereby inhibiting natural killer cell antitumor reactivity." Cancer Research 69(19): 7775-7783.
- Kreutzman, Juvonen, Kairisto, Ekblom, Stenke, Seggewiss, Porkka, Mustjoki (2010). "Mono/oligoclonal T- and NK-cells are common in chronic

- myeloid leukemia patients at diagnosis and expand during dasatinib therapy." Blood 116(5): 772-82.
- Krockenberger, Dombrowski, Weidler, Ossadnik, Honig, Hausler, Voigt, Becker, Leng, Steinle, Weller, Bucala, Dietl, Wischhusen (2008). "Macrophage Migration Inhibitory Factor Contributes to the Immune Escape of Ovarian Cancer by Down-Regulating NKG2D." J Immunol 180(11): 7338-7348.
- Lanier (2008). "Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition." Nat Immunol 9(5): 495-502.
- Lanier, Testi, Bindl, Phillips (1989). "Identity of Leu-19 (CD56) leukocyte differentiation antigen and neural cell adhesion molecule." The Journal of Experimental Medicine 169(6): 2233-2238.
- Li, Ge, Nicotra, Stern, Kopcow, Chen, Strominger (2008). "JNK MAP kinase activation is required for MTOC and granule polarization in NKG2D-mediated NK cell cytotoxicity." Proceedings of the National Academy of Sciences 105(8): 3017-3022.
- Lombardo, Lee, Chen, Norris, Barrish, Behnia, Castaneda, Cornelius, Das, Dowejko, Fairchild, Hunt, Inigo, Johnston, Kamath, Kan, Klei, Marathe, Pang, Peterson, Pitt, Schieven, Schmidt, Tokarski, Wen, Wityak, Borzilleri (2004). "Discovery of N-(2-Chloro-6-methyl- phenyl)-2-(6-(4-(2-hydroxyethyl)- piperazin-1-yl)-2-methylpyrimidin-4- ylamino)thiazole-5-carboxamide (BMS-354825), a Dual Src/Abl Kinase Inhibitor with Potent Antitumor Activity in Preclinical Assays." Journal of Medicinal Chemistry 47(27): 6658-6661.
- Loza, Zamai, Azzoni, Rosati, Perussia (2002). "Expression of type 1 (interferon gamma) and type 2 (interleukin-13, interleukin-5) cytokines at distinct stages of natural killer cell differentiation from progenitor cells." Blood 99(4): 1273-1281.
- Lozzio, Lozzio (1975). "Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome." Blood 45(3): 321-334.
- Mandelboim, Malik, Davis, Jo, Boyson (1999). "Human CD16 as a lysis receptor mediating direct natural killer cell cytotoxicity." Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 5640-5644.

- Marcusson-Ståhl, Cederbrant (2003). "A flow-cytometric NK-cytotoxicity assay adapted for use in rat repeated dose toxicity studies." Toxicology 193(3): 269-279.
- Mendes, Bromelow, Westby, Galea-Lauri, Smith, O'brien, Souberbielle (2000). "Flow cytometric visualisation of cytokine production by CD3⁻CD56⁺ NK cells and CD3⁺CD56⁺ NK-T cells in whole blood." Cytometry 39(1): 72-78.
- Moldovan, Galon, Maridonneau-Parini, Roman Roman, Mathiot, Fridman, Sautès-Fridman (1999). "Regulation of production of soluble Fc[gamma] receptors type III in normal and pathological conditions." Immunology Letters 68(1): 125-134.
- Moretta, Ferlazzo, Bottino, Vitale, Pende, Mingari, Moretta (2006). "Effector and regulatory events during natural killer-dendritic cell interactions." Immunological Reviews 214(1): 219-228.
- Mota, Moldovan, Calugaru, Hirt, Kozma, Galatiuc, Brasoveanu, Boltz-Nitulescu (2004). "Interaction of Human Immunoglobulin G with CD16 on Natural Killer Cells: Ligand Clearance, FcγRIIIA Turnover and Effects of Metalloproteinases on FcγRIIIA-Mediated Binding, Signal Transduction and Killing." Scandinavian Journal of Immunology 59(3): 278-284.
- Motyka, Korbutt, Pinkoski, Heibei, Caputo, Hobman, Barry, Shostak, Sawchuk, Holmes, Gauldie, Bleackley (2000). "Mannose 6-Phosphate/Insulin-like Growth Factor II Receptor Is a Death Receptor for Granzyme B during Cytotoxic T Cell Induced Apoptosis." Cell 103(3): 491-500.
- Mustjoki, Ekblom, Arstila, Dybedal, Epling-Burnette, Guilhot, Hjorth-Hansen, Hoglund, Kovanen, Laurinolli, Liesveld, Paquette, Pinilla-Ibarz, Rauhala, Shah, Simonsson, Sinisalo, Steegmann, Stenke, Porkka (2009). "Clonal expansion of T/NK-cells during tyrosine kinase inhibitor dasatinib therapy." Leukemia 23(8): 1398-1405.
- Orange (2008). "Formation and function of the lytic NK-cell immunological synapse." Nat Rev Immunol 8(9): 713-725.

- Oshima, Yanase, Ibukiyama, Yamashina, Kayagaki, Yagita, Mizuguchi (2001). "Involvement of TRAIL/TRAIL-R interaction in IFN-alpha-induced apoptosis of Daudi B lymphoma cells." Cytokine 14(4): 193-201.
- Özdemir, Ravindranath, Savasan (2005). "Mechanisms of Superior Anti-Tumor Cytotoxic Response of Interleukin 15-Induced Lymphokine-Activated Killer Cells." Journal of Immunotherapy 28(1): 44-52.
- Paolini, Serra, Molfetta, Piccoli, Frati, Santoni (1999). "Tyrosine kinase-dependent ubiquitination of CD16 ζ subunit in human NK cells following receptor engagement." European Journal of Immunology 29(10): 3179-3187.
- Parolini, Bottino, Falco, Augugliaro, Giliani, Franceschini, Ochs, Wolf, Bonnefoy, Biassoni, Moretta, Notarangelo, Moretta (2000). "X-Linked Lymphoproliferative Disease." The Journal of Experimental Medicine 192(3): 337-346.
- Pende, Cantoni, Rivera, Vitale, Castriconi, Marcenaro, Nanni, Biassoni, Bottino, Moretta, Moretta (2001). "Role of NKG2D in tumor cell lysis mediated by human NK cells: cooperation with natural cytotoxicity receptors and capability of recognizing tumors of nonepithelial origin." European Journal of Immunology 31(4): 1076-1086.
- Perez, Mitchell, Jager, Nolan (2004). "LFA-1 signaling through p44/42 is coupled to perforin degranulation in CD56⁺CD8⁺ natural killer cells." Blood 104(4): 1083-1093.
- Perussia, Bennett (1996). "Purification of Peripheral Blood Natural Killer Cells." Methods in Molecular Medicine 2: 161-171.
- Perussia, Ramoni, Anegon, Cuturi, Faust, Trinchieri (1987). "Preferential proliferation of natural killer cells among peripheral blood mononuclear cells co-cultured with B lymphoblastoid cell lines." Nat Immun Cell Growth Regul 6(4): 171-188.
- Poli, Michel, Thérésine, Andrès, Hentges, Zimmer (2009). "CD56^{bright} natural killer (NK) cells: an important NK cell subset." Immunology 126(4): 458-465.

- Quillet, Presse, Marchiol-Fournigault, Harel-Bellan, Benbunan, Ploegh, Fradelizi (1988). "Increased resistance to non-MHC-restricted cytotoxicity related to HLA A, B expression. Direct demonstration using beta 2-microglobulin-transfected Daudi cells." J Immunol 141(1): 17-20.
- Raulet, Guerra (2009). "Oncogenic stress sensed by the immune system: role of natural killer cell receptors." 9(8): 568-580.
- Rea, Anne, Claire, Djaouida, Eric, Hervé (2008). "Dasatinib-induced lupus." The Lancet 372(9640): 713-714.
- Romanski, Bug, Becker, Kampfmann, Seifried, Hoelzer (2005). "Mechanisms of resistance to natural killer cell-mediated cytotoxicity in acute lymphoblastic leukemia." Experimental Hematology 33(3): 344-352.
- Rosen, Cao, Avery, Tangye, Liu, Houchins, Lanier (2008). "Functional Consequences of Interactions between Human NKR-P1A and Its Ligand LLT1 Expressed on Activated Dendritic Cells and B Cells." J Immunol 180(10): 6508-6517.
- Salcedo, Kurosaki, Kanakaraj, Ravetch, Perussia (1993). "Physical and functional association of p56lck with Fc gamma RIIIA (CD16) in natural killer cells." The Journal of Experimental Medicine 177(5): 1475-1480.
- Salih, Hilpert, Placke, Grünebach, Steinle, Salih, Krusch (2010). "The BCR/ABL-inhibitors imatinib, nilotinib and dasatinib differentially affect NK cell reactivity." International Journal of Cancer 127(9): 2119-28.
- Schade, Schieven, Townsend, Jankowska, Susulic, Zhang, Szpurka, Maciejewski (2008). "Dasatinib, a small-molecule protein tyrosine kinase inhibitor, inhibits T-cell activation and proliferation." Blood 111(3): 1366-1377.
- Schroder, Hertzog, Ravasi, Hume (2004). "Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions." J Leukoc Biol 75(2): 163-189.
- Seong, Clayberger, Krensky, Parnes (1988). "Rescue of Daudi cell HLA expression by transfection of the mouse beta 2-microglobulin gene." The Journal of Experimental Medicine 167(2): 288-299.

- Seystahl (2010). Einfluss von Dasatinib auf die Expansion, Zytotoxizität und Zytokinproduktion von humanen Natürlichen Killer-Zellen. Würzburg, Universitätsbibliothek der Universität Würzburg.
- Shah, Kantarjian, Kim, Rea, Dorlhiac-Llacer, Milone, Vela-Ojeda, Silver, Khoury, Charbonnier, Khoroshko, Paquette, Deininger, Collins, Otero, Hughes, Bleickardt, Strauss, Francis, Hochhaus (2008). "Intermittent Target Inhibition With Dasatinib 100 mg Once Daily Preserves Efficacy and Improves Tolerability in Imatinib-Resistant and -Intolerant Chronic-Phase Chronic Myeloid Leukemia." J Clin Oncol 26(19): 3204-3212.
- Sheehy, McDermott, Furlan, Klenerman, Nixon (2001). "A novel technique for the fluorometric assessment of T lymphocyte antigen specific lysis." Journal of Immunological Methods 249(1-2): 99-110.
- Shibuya, Lanier, Phillips, Ochs, Shimizu, Nakayama, Nakauchi (1999). "Physical and Functional Association of LFA-1 with DNAM-1 Adhesion Molecule." Immunity 11(9): 615-623.
- Sivori, Vitale, Morelli, Sanseverino, Augugliaro, Bottino, Moretta, Moretta (1997). "p46, a Novel Natural Killer Cell-specific Surface Molecule That Mediates Cell Activation." The Journal of Experimental Medicine 186(7): 1129-1136.
- Smyth, Hayakawa, Takeda, Yagita (2002). "New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer." Nat Rev Cancer 2(11): 850-861.
- Smyth, Thia, Street, Cretney, Trapani, Taniguchi, Kawano, Pelikan, Crowe, Godfrey (2000). "Differential Tumor Surveillance by Natural Killer (Nk) and Nkt Cells." The Journal of Experimental Medicine 191(4): 661-668.
- Sutherland, Rabinovich, Chalupny, Brawand, Miller, Cosman (2006). "ULBPs, human ligands of the NKG2D receptor, stimulate tumor immunity with enhancement by IL-15." Blood 108(4): 1313-1319.
- Tafuku, Matsuda, Kawakami, Tomita, Yagita, Mori (2006). "Potential mechanism of resistance to TRAIL-induced apoptosis in Burkitt's lymphoma." European Journal of Haematology 76(1): 64-74.

- Tomescu, Chehimi, Maino, Montaner (2009). "Retention of viability, cytotoxicity, and response to IL-2, IL-15, or IFN- γ by human NK cells after CD107a degranulation." Journal of Leukocyte Biology 85: 871–876.
- Torelli, Guarini, Maggio, Alfieri, Vitale, Foa (2005). "Expansion of natural killer cells with lytic activity against autologous blasts from adult and pediatric acute lymphoid leukemia patients in complete hematologic remission." Haematologica 90(6): 785-792.
- Uhrberg (2005). "The CD107 mobilization assay: viable isolation and immunotherapeutic potential of tumor-cytolytic NK cells." Leukemia 19(5): 707-709.
- Upshaw, Arneson, Schoon, Dick, Billadeau, Leibson (2006). "NKG2D-mediated signaling requires a DAP10-bound Grb2-Vav1 intermediate and phosphatidylinositol-3-kinase in human natural killer cells." Nat Immunol 7(5): 524-532.
- Valiante, Rengaraju, Trinchieri (1992). "Role of the production of natural killer cell stimulatory factor (NKSF/IL-12) in the ability of B cell lines to stimulate T and NK cell proliferation." Cellular Immunology 145(1): 187-198.
- Veugelers, Motyka, Goping, Shostak, Sawchuk, Bleackley (2006). "Granule-mediated Killing by Granzyme B and Perforin Requires a Mannose 6-Phosphate Receptor and Is Augmented by Cell Surface Heparan Sulfate." Molecular Biology of the Cell 17(2): 623-633.
- Voskoboinik, Dunstone, Baran, Whisstock, Trapani (2010). "Perforin: structure, function, and role in human immunopathology." Immunological Reviews 235(1): 35-54.
- Vyas, Maniar, Dupont (2002). "Cutting Edge: Differential Segregation of the Src Homology 2-Containing Protein Tyrosine Phosphatase-1 Within the Early NK Cell Immune Synapse Distinguishes Noncytolytic from Cytolytic Interactions." J Immunol 168(7): 3150-3154.
- Walzer, Jaeger, Chaix, Vivier (2007). "Natural killer cells: from CD3⁻NKp46⁺ to post-genomics meta-analyses." Current Opinion in Immunology 19(3): 365-372.

- Wang, Grzywacz, Sukovich, Mccullar, Cao, Lee, Blazar, Cornfield, Miller, Verneris (2007). "The unexpected effect of cyclosporin A on CD56⁺CD16⁻ and CD56⁺CD16⁺ natural killer cell subpopulations" Blood 110(5): 1530-1539.
- Weichsel, Dix, Wooldridge, Clement, Fenton-May, Sewell, Zezula, Greiner, Gostick, Price, Einsele, Seggewiss (2008). "Profound Inhibition of Antigen-Specific T-Cell Effector Functions by Dasatinib." Clinical Cancer Research 14(8): 2484-2491.
- Weisberg, Manley, Cowan-Jacob, Hochhaus, Griffin (2007). "Second generation inhibitors of BCR-ABL for the treatment of imatinib-resistant chronic myeloid leukaemia." Nat Rev Cancer 7(5): 345-356.
- Wilk, Kalippke, Buyny, Schmidt, Jacobs (2008). "New aspects of NK cell subset identification and inference of NK cells' regulatory capacity by assessing functional and genomic profiles." Immunobiology 213(3-4): 271-283.
- Wu, Adams, Carter, Chen, Muller, Stirling, Schafer, Bartlett (2008). "Lenalidomide Enhances Natural Killer Cell and Monocyte-Mediated Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity of Rituximab-Treated CD20⁺ Tumor Cells." Clinical Cancer Research 14(14): 4650-4657.
- Yu, Su, Zou, Liu, Wu, Kong, Zhuang, Sun, Liu, Hu, Li, Strominger, Zang, Pei, Ge (2008). "An essential function for β -arrestin 2 in the inhibitory signaling of natural killer cells." Nat Immunol 9(8): 898-907.
- Zamai, Ahmad, Bennett, Azzoni, Alnemri, Perussia (1998). "Natural Killer (NK) Cell-mediated Cytotoxicity: Differential Use of TRAIL and Fas Ligand by Immature and Mature Primary Human NK Cells." The Journal of Experimental Medicine 188(12): 2375-2380.
- Zhang, Yu (2010). "Target recognition-induced NK-cell responses." Blood 115(11): 2119-2120.
- Zhang, Zhang, Niu, Zhou, Zhang, Tian (2008). "Interleukin-12 improves cytotoxicity of natural killer cells via upregulated expression of NKG2D." Human Immunology 69(8): 490-500.

DANKSAGUNG

Besonderer Dank gilt Frau Priv.-Doz. Dr. Ruth Seggwiß, Leiterin der Arbeitsgruppe „Immune Recovery“ für die Überlassung des Themas und die im höchsten Maße engagierte, intensive Betreuung und Anleitung, sowie die vielen konstruktiven Diskussionen. Ihr Engagement und steter Enthusiasmus hat wesentlich zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Hermann Einsele danke ich für die Übernahme des Referats, die Betreuung und Unterstützung meiner Forschungsaktivität im Rahmen meiner Dissertation und für die Gewährung einer Stelle als wissenschaftliche Hilfskraft. Herrn Priv.-Doz. Dr. Jörg Wischhusen danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferats sowie für die konstruktive Zusammenarbeit.

Frau Carolin Köchel danke ich für die Hilfe bei funktionellen Assays. Mit ihrer ihrem umfassenden technischen Wissen und fröhlichen Art stand sie stets mit Rat und Tat zur Seite.

Frau Carolin Gosa Hock danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung einiger Western-Blot-Experimente.

Dank gilt auch meinen Mitdoktoranden Christoph Köchel, Michael Zekl, Daniel Jepser und Kristina Kempf für die kollegiale Zusammenarbeit und gegenseitige Hilfe. Katharina Seystahl gilt hier besonderer Dank für die Überlassung der von ihr optimierten Protokolle und die gemeinsame Erstellung unserer Posterpräsentation.

Nicht zuletzt gilt Dank auch meiner Familie für ihre Unterstützung und Geduld.

