

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

**Direktor: Professor Dr. med. Hermann Einsele**



**Einfluss des Tyrosinkinase-Inhibitors Dasatinib auf Endozytose, Präsentation costimulatorischer Oberflächenmarker und Zytokinproduktion dendritischer Zellen**

**Inauguraldissertation**

**zur Erlangung der Doktorwürde der**

**Medizinischen Fakultät**

**der**

**Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von**

**Christoph Köchel**

**aus Schweinfurt**

**Würzburg, Januar 2021**

**Referentin:** Priv.-Doz. Dr. med. Ruth Seggewiß-Bernhardt

**Korreferent:** Prof. Dr. rer. nat. Manfred Lutz

**Dekan:** Prof. Dr. med. Matthias Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung:** 10. Dezember 2021

**Der Promovend ist Arzt.**

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Das Immunsystem.....	1
1.2	Dendritische Zellen (DZs).....	2
1.2.1	Costimulatorische Oberflächenmarker .....	6
1.2.2	Zytokine .....	7
1.3	Dasatinib, ein Multi-Tyrosinkinaseinhibitor (TKI).....	9
1.3.1	Tyrosinkinasen .....	9
1.3.2	Tyrosinkinaseinhibitoren .....	9
1.3.3	Dasatinib .....	10
1.4	Potenzielle Zielstrukturen von Dasatinib auf DZs .....	11
1.4.1	Kinasen der SRC-Familie (SFKs) .....	11
1.4.2	c-kit.....	14
1.4.3	RelB – ein Mitglied der NF- $\kappa$ B-Familie .....	14
1.5	Zielstellung der Dissertation .....	15
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>16</b>
2.1	Material.....	16
2.1.1	Geräte und Zubehör .....	16
2.1.2	Verbrauchsmaterial .....	18
2.1.3	Chemikalien .....	20
2.1.4	Zellkulturmedian und Zusätze.....	21
2.1.5	Reaktionssets (Kits).....	22
2.1.6	Monoklonale Antikörper für Durchflusszytometrie .....	22
2.1.7	Reagenzien und Puffer für Durchflusszytometrie .....	23
2.1.8	Puffer .....	23
2.1.9	Reagenzien und Puffer für Westernblot .....	24
2.2	Methoden .....	28
2.2.1	Blutprodukte.....	28
2.2.2	Generierung von dendritischen Zellen .....	28
2.2.2.1	Monozytenisolierung mittels Plastikadhärenz .....	28
2.2.2.2	Monozytenisolierung mittels MACS-Sort .....	29

2.2.3	moDZ-Zellkultur.....	30
2.2.4	Durchflusszytometrie.....	31
2.2.4.1	FACS-Färbungen mit monoklonalen Antikörpern .....	31
2.2.4.2	Untersuchung costimulatorischer Oberflächenmarker .....	32
2.2.4.3	Untersuchung der Endozytose .....	32
2.2.4.4	Apoptose/Nekrose-Untersuchung (Annexin V/7-AAD).....	33
2.2.5	Messung der Zytokinsekretion mittels ELISA.....	33
2.2.6	Westernblot.....	34
2.2.6.1	Proteinextraktion und Konzentrationsbestimmung .....	34
2.2.6.2	Elektrophoretische Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE .....	35
2.2.6.3	Proteintransfer auf Nitrozellulosemembran.....	36
2.2.6.4	Antigendetektion mittels HRP-gekoppelter Antikörper .....	36
2.2.7	Statistische Auswertung .....	37
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>38</b>
3.1	Hemmung der Generierung von moDZs unter 50 nm Dasatinib .....	38
3.2	Dasatinib induziert den Zelltod im Verlauf der DZ-Kultur.....	41
3.3	Keine Beeinflussung der Endozytose von Dextran-Partikeln.....	42
3.4	Einfluss von Dasatinib auf die costimulatorischen Oberflächenmarker CD40, CD80, CD83, CD86 und HLA-DR .....	43
3.5	Modulation der Interleukin-Produktion .....	45
3.6	Keine Modulation der nukleären Translokation von RelB unter Dasatinib .....	46
3.7	Modulation der LPS-abh. Tyrosin-Phosphorylierung Dasatinib .....	47
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>48</b>
4.1	Immunmodulatorische Effekte unter Langzeit-Behandlung mit Dasatinib auf die <i>in vitro</i> Generierung von moDZs.....	48
4.2	Immunmodulatorische Effekte von Dasatinib auf DZs <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> – eine Zusammenfassung der aktuellen Literatur.....	54
4.2.1	Effekte von Dasatinib auf humane DZ-Subgruppen <i>in vitro</i> :.....	54

4.2.2	Effekte von Dasatinib auf murine KM-DZs <i>in vivo</i> : .....	57
4.3	Immunmodulation unter Dasatinib im klinischen Kontext .....	60
4.3.1	Dasatinib-induzierte LGL-Expansion bei CML-Patienten korreliert mit tieferem molekularem Ansprechen – ein Schritt Richtung Langzeitremission/Heilung? .....	60
4.3.2	Dasatinib im Kontext der allogenen Transplantation (alloSZT) .....	62
4.3.3	Gehäufte Infektionen unter Dasatinib? .....	63
4.3.4	Kombination von Dasatinib und Blinatumumab bei Ph <sup>+</sup> ALL .....	65
4.3.5	Dasatinib zeigt in Kombination mit Immuncheckpointinhibitortherapie potenziell kontraproduktive Effekte .....	67
4.3.6	Dasatinib als An-/Aus-Schalter von CAR-T-Zelltherapien .....	67
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>69</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>70</b>
	<b>Appendix .....</b>	
	<b>I. Abkürzungsverzeichnis .....</b>	
	<b>II. Abbildungsverzeichnis .....</b>	
	<b>III. Danksagung .....</b>	
	<b>IV. Curriculum vitae .....</b>	
	<b>V. Publikationen und Kongressteilnahmen .....</b>	

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem ist Tag für Tag mit großen Herausforderungen konfrontiert. Es erkennt und eliminiert Krankheitserreger, aber auch andere körperfremde Substanzen sowie maligne transformierte Zellen, zeigt gegenüber den funktionstüchtigen körpereigenen Zellen jedoch Toleranz (Ausnahme: Autoimmunreaktionen).

Die angeborene Körperabwehr bildet eine erste Verteidigungslinie und steht bereits von Geburt an zur Verfügung (Abbas et al., 2012; Taguchi et Mukai, 2019; Takeuchi et Akira, 2019). Die Zellen des angeborenen Immunsystems können evolutionär konservierte, Pathogen-typische Molekülstrukturen sog. PAMPs („pathogen-associated molecular patterns“) erkennen. Diese bestehen bspw. aus Bestandteilen bakterieller Zellwände (Van Brussel et al., 2012; Takeuchi et Akira, 2019) und können über spezifische Rezeptoren auf den Immunzellen („pathogen-related receptors“, PRRs) registriert werden. Die Toll-ähnlichen Rezeptoren („toll-like receptors“, TLRs) stellen hierunter eine zentrale Gruppe dar (Iwasaki et Medzhitinov, 2015; Takeuchi et Akira, 2010 & 2019). Ihre Aktivierung initiiert zelluläre (Phagozytose, Zytotoxizität) als auch humorale (Komplement, Zytokine) Abwehrstrategien (Degn et Thiel, 2013; Sokol et Luster, 2013; Takeuchi et Akira, 2019). Zu den Zellen des angeborenen Immunsystems zählen u. a. Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, NK- und NKT-Zellen sowie dendritische Zellen (Gasteiger et al., 2017).

Im Rahmen der Evolution entwickelten bestimmte Spezies zusätzlich eine erworbene Immunabwehr. Dieses evolutionär jüngere System kann Antigen-spezifische Immunreaktionen generieren. Über eine fein regulierte Antigenpräsentation, u. a. durch dendritische Zellen, werden hierbei u. a. spezifische B- und T-Zellen aktiviert. Diese Zellen verfügen über eine ausgeprägte genetische Rekombinationsfähigkeit, welche sich im T-Zell-Rezeptor-Rearrangement und der Immunglobulinvielfalt der B-Zellen widerspiegelt. Hierüber wird eine große Vielfalt an Antigen-spezifischen Effektorzellen ermöglicht und dadurch sichergestellt, dass sich das erworbene Immunsystem an die ständig wechselnden Anforderungen der Umwelt adaptieren kann. Darüber hinaus verfügt es über die Fähigkeit, ein sog. „immunologisches Gedächtnis“ zu bilden, indem spezielle Effektorzellen in eine Art Ruhezustand übergehen und im Falle eines erneuten Antigen-Kontaktes reaktiviert werden können (van der Meer et al., 2015; Kirman et al., 2019).

Entgegen der lange vorherrschenden Annahme, dass das angeborene Immunsystem schnell, jedoch unspezifisch sei, das erworbene Immunsystem hingegen hocheffizient und -spezialisiert, scheint die Trennung des Immunsystems in ein angeborenes und ein erworbenes lediglich eine akademische Vereinfachung zu sein. Viele Zellen des Immunsystems übernehmen in beiden Teilen eine wichtige Rolle (Netea et van der Meer, 2017; Hajishengallis et al., 2019; Netea et al., 2020).

Analog der Anpassungsfähigkeit des erworbenen Immunsystems an Antigenwechsel durch Genrekombination und Ausbildung eines sog. „immunologischen Gedächtnisses“ gibt es auch beim angeborenen Immunsystem eine „trainierte Immunität“ mit rascher Reaktion bei Re-Exposition gegenüber Pathogenen (Netea et al., 2020). Hierzu zählen auch die inflammatorischen dendritischen Zellen („inflammatory dendritic cells“, infDZs), unter welchen die aus Monozyten generierten dendritischen Zellen („monocyte-derived“, moDZs) eine wichtige Gruppe darstellen (Segura et Amigorena, 2013; Gu et al., 2020). Sie erkennen u. a. via PAMPs allgemeine Gefahrensignale und können hierauf entsprechende Immunantworten generieren. Die Prozessierung intra- und extrazellulärer Proteine und die anschließende Präsentation des Antigens auf sog. Haupthistokompatibilitätskomplexmolekülen („major histocompatibility complex“; MHC) stellen hierbei wichtige Funktionen dar. Als Brücke zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem übernehmen DZs bei verschiedenen immunologischen Prozessen eine zentrale Rolle (Collin et Bigley; 2018).

## 1.2 Dendritische Zellen (DZs)

Dendritische Zellen (DZs, „dendritic cells“) werden aufgrund ihrer besonderen Fähigkeiten auch als „Wächter des Immunsystems“ bezeichnet und übernehmen eine zentrale Stellung im Immunsystem. Morphologisch 1868 erstmals von Paul Langerhans beschrieben, welcher sie fälschlicherweise für Nervenzellen der Haut hielt, brauchte es gut 100 Jahre, ehe Steinman und Cohen 1973 mit ihrer Arbeit den Begriff der dendritischen Zelle einführten. 1985 entdeckten Schuler und Steinman mit der Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen und der damit verbundenen Fähigkeit, T-Zell-Antworten zu generieren (sog. „mixed leukocyte reaction“, MLR), eine wesentliche Funktion der DZs. Diese Entdeckungen sowie nachfolgende Arbeiten, in denen die Funktion der DZs weiter beleuchtet wurde, führten 2011 zur Verleihung des „Nobelpreis für Physiologie oder Medizin“ an Ralph M. Steinman, als erstem Preisträger posthum.

DZs sind professionelle Antigen-präsentierende Zellen (APZs; „antigen-presenting cells“, APCs). Nach Aufnahme und Prozessierung präsentieren sie das Antigen anschließend den Effektorzellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems. Über weitere stimulatorische oder inhibitorische Signale kann die Generierung differenzierter Immunantworten moduliert werden (Constantino et al., 2017; Collin et Bigley; 2018). Ein funktionierendes Immunsystem ist das Ergebnis eines komplexen Zusammenspiels zwischen den unterschiedlichen Immunzellgruppen. Insbesondere bei der Generierung robuster Immunantworten, wie z. B. der Aktivierung naiver T-Zellen, übernehmen DZs eine zentrale Rolle (Palucka et al., 2012; Van Brussel et al., 2012; Enamorado et al., 2018).

Ebenso vielfältig wie die Bandbreite an Pathogenen, mit denen sie konfrontiert sind, ist die a. e. evolutionär zu erklärende Diversität der DZs (Klechevsky, 2015). Sie setzen sich aus unterschiedlichen Untergruppen zusammen, welche sich ontogenetisch, funktionell, aber auch in der Expression bestimmter Oberflächenmarker sowie ihrer Verteilung in den lymphatischen Geweben unterscheiden (Merad et al., 2013; Guilliams et al., 2016). Im immunologischen Gleichgewicht stellen klassische bzw. konventionelle DZs (cDZs) und plasmazytoide DZs (pDZs) die Hauptgruppen dar. cDZs migrieren nach Aufnahme und Prozessierung von mikrobiellem Antigen in lymphatisches Gewebe (Granucci et al., 2014). Dort aktivieren sie naive T-Zellen via Antigenpräsentation. Basierend auf ihrer Gewebsständigkeit und Expression unterschiedlicher Oberflächenmarker bzw. Transkriptionsfaktoren lassen sich cDZs weiter untergliedern (Satpathy et al., 2012; Merad et al. 2013). pDZs verfügen über geringere phagozytotische Kapazitäten, sind jedoch u. a. sehr effizient in der Erkennung von Viren und können diese u. a. durch Sekretion von Typ I Interferonen eliminieren (Swiecki et Colonna, 2015, Mitchel et al., 2018; Collin et Bigley, 2018).

In Gegenwart inflammatorischer Signale, wie beispielsweise bei Infektionen oder im Rahmen maligner Erkrankungen und auch bei Autoimmunerkrankungen (Segura et Amigorena, 2013 [a] + [b]; Gu et al., 2020) kommt es neben der klassischen DZ-Generierung aus hämatopoetischen Stammzellen zu einer Rekrutierung sog. inflammatorischer DZs (infDZs). Angelockte Monozyten können sich in Anwesenheit bestimmter Mediatoren zu Zellen mit funktionellen DZ-Eigenschaften (bspw. Aktivierung naiver T-Zellen) differenzieren, weshalb diese als monozytäre DZs (moDZs) bezeichnet werden (Cheong et al., 2010; Chow et al., 2017; Tang-Huau et Segura, 2018). Unter physiologischen Bedingungen lassen sich moDZs in Mensch und Maus kaum nachweisen (Jakubzick et al., 2013), zeigen jedoch eine erhebliche Präsenz während inflammatorischer Prozesse. Die



Pathogen-vermittelte Aktivierung von T-Zellen könnte durch Sekretion proinflammatorischer Mediatoren, wie beispielsweise GM-CSF und IL-4, die Generierung von moDZs fördern. Diese moDZs wiederum können anschließend spezifische T-Zellen aktivieren. Auf diesem Wege könnten die moDZs wesentlich zur Persistenz der Immunantwort beitragen. Dies wurde im „Windmühlenmodell“ beschrieben, wobei die moDZs so lange die Aufrechterhaltung der Immunantwort fördern, so lange der „Wind der Inflammation“ weht (Lutz et al., 2017).

Die klinische Relevanz der moDZ ergibt sich aus ihrem breiten Vorkommen in nahezu allen inflammatorischen Konstellationen. Neben Infektionen, Autoimmunität und Toleranz, wurde ihre Präsenz auch in verschiedenen Tumormodellen nachgewiesen (Eguiluz-Gracia et al., 2016; Segura et al., 2013; Laoni et al., 2016). Dabei konnte eine Korrelation zwischen der Frequenz von infDZs und der Aktivität CD8<sup>+</sup> T-Zellen nachgewiesen werden. In diesem Kontext konnte auch eine Korrelation mit einem besseren Therapieansprechen beschrieben werden (Segura et al., 2013).

Die Hypothese, dass sich alle DZ-Subtypen dichotomisch entwickeln, wurde mehr und mehr verlassen. cDZs und pDZs werden primär aus myeloiden und lymphozytären Vorläuferzellen generiert. Humane moDZs und Langerhans Zellen (LZs) hingegen zeigen transkriptionelle Überschneidungen und einen ontogenetischen Ursprung mit Makrophagen, teilen aber auch relevante Eigenschaften mit cDZ (Geismann et al., 2010). Insgesamt deuten zahlreiche Untersuchungen auf eine hohe Plastizität der DZ-Subgruppen hin, was deren Klassifizierung weiter erschwert (Paul et al., 2015; Notta et al., 2016, Velten et al., 2017, Karamitros et al., 2017).

Trotz ihrer zentralen Rolle stellt die Gesamtheit der DZs mit max. 2 % aller mononukleären Zellen im Blut („peripheral blood mononuclear cells“, PBMCs) nur eine kleine Population dar. Hierunter machen die moDZs mit ca. 0,005 % der kernhaltigen Zellen im Blut wiederum nur einen sehr kleinen Anteil aus (Draxler et al., 2017). Nichtsdestotrotz findet man sie in unterschiedlicher Zusammensetzung in nahezu jedem Gewebe (Waisman et al., 2016; Constantino et al., 2017; Solano-Galvez et al., 2018).

Nach wie vor gibt es keinen Konsens hinsichtlich der optimalen Methode, DZs *ex vivo* zu generieren. Generell stehen als mögliche Quelle zirkulierende DZs zur Verfügung, welche expandiert werden können (Sabado et Bhardwaj, 2010). Daneben können DZs aus CD34<sup>+</sup> hämatopoetische Stammzellen unter Zugabe bestimmter Wachstumsfaktoren generiert werden. Die Generierung von moDZs aus Monozyten des peripheren

Blutes stellt nach wie vor die am häufigsten angewandte Methode dar. Neben einer hohen Effizienz ist dabei auch die einfache Verfügbarkeit ein wesentliches Argument (Constantino et al., 2017). Bereits 1994 beschrieben Sallusto und Lanzavecchia die Möglichkeit, DZs *in vitro* aus Monozyten zu generieren. In der Gegenwart von GM-CSF und IL-4 können über 5-7 Tage unreife DZs („immature DCs“, iDZs) aus Monozyten generiert werden (Sabado et Bhardwaj, 2010; Han et al., 2019).

Im Zuge der iDZ-Generierung aus Monozyten kommt es zu einer vermehrten Expression typischer DZ-Marker, wie bspw. CD1a, wohingegen der monozytäre Marker CD14 herabreguliert wird bzw. gänzlich verschwindet (Collin et al., 2013). CD1a ist ein Oberflächenmarker, welcher in unterschiedlicher Ausprägung auf verschiedenen DZ-Subgruppen, u. a. auch auf moDZs präsentiert wird (Haniffa et al., 2012; Segura et al., 2013). Eine Koexpression des Monozyten-typischen Markers CD14 findet sich teilweise auf moDZs, aber auch auf einer Subgruppe von cDZ2. Genexpressionsuntersuchungen an CD1/CD14-koexprimierenden Zellen konnten relevante Übereinstimmungen mit cDZ2-typischen Genen nachweisen (Yin et al., 2017; Villani et al., 2017). Bei Entzündungen wie auch bei malignen Erkrankungen lassen sich CD1/CD14-koexprimierende Zellen in signifikantem Umfang nachweisen (Haniffa et al., 2012, McGovern et al.; 2014; Bakdash et al., 2016). Ihr Ursprung ist jedoch nach wie vor unklar, da sie, wie die moDZs, eine hohe phänotypische Plastizität zeigen (Balan et al., 2014).

iDZs sitzen im Gewebe und verfügen über eine ausgeprägte Endozytosekapazität, welche es ihnen erlaubt, Antigen aus ihrer Umwelt aufzunehmen, um es anschließend zu prozessieren (Van Brussel et al., 2012; Steinman und Bancherau, 2007). Die Expression costimulatorischer Moleküle und die Sekretion immunmodulatorischer Zytokine ist noch gering ausgeprägt (Trombetta et Mellmann, 2005; Steinman et al., 2003). Je nach Subtyp exprimieren die DZs unterschiedliche TLRs (1-8), welche die Erkennung unterschiedlicher PAMPs ermöglicht. pDZs übernehmen mit Hilfe von TLR7 und TLR9 eine wichtige Rolle in der Identifizierung viraler Infektionen (Bao et Liu, 2013; Swiecki et Colonna, 2015). Mit der Expression von TLR3, TLR9 und TLR10 verfügen cDZ1-Zellen, ähnlich den pDZs, über Rezeptoren zur Erkennung von viralen und intrazellulären Pathogenen (Villani et al., 2017; Hemont et al., 2013; Colletti et al., 2016; Liu et al., 2015; Lafaille et al., 2012). MoDZs, wie auch cDZ2, exprimieren hingegen v. a. TLR2, TLR4, TLR5 und TLR6. Hierüber können Immunantworten gegenüber Bakterien, Pilzen, Parasiten und Allergenen initiiert werden. Lipopolysaccharid (LPS), ein Bestandteil der äußeren Membran gramnegativer Bakterien, ist ein typischer TLR-4-Agonist (Park et Lee, 2013).

Nach Stimulation kommt es zur Entwicklung von reifen DZs („mature dendritic cells“; mDZs), welche spezifisch naive T-Zellen aktivieren können. Dies geschieht über drei Signale, welche in ihrer Komposition die Aktivierung, Funktion und auch den Phänotyp des entsprechenden T-Lymphozyten beeinflussen (Constantino et al., 2017; Van Brussel et al., 2012):

- Signal 1: Die Antigen-spezifische Erkennung des Antigen-MHC-Komplexes über den entsprechenden T-Zell-Rezeptor („T-cell-receptor“, TZR)
- Signal 2: Costimulatorische Signale über Oberflächenmarker wie z. B. CD80, CD86 auf der DZ, welche maßgeblich für die Aktivierung und Regulation der entsprechenden T-Zell-Antwort sind
- Signal 3: Sekretion pro- und/oder anti-inflammatorischer Zytokine; Polarisation der Immunantwort (z. B. Interleukin-12 (IL-12) oder IL-10)

Abhängig von diesen 3 Signalen kann eine einzelne DZ 100 – 3.000 T-Lymphozyten aktivieren (Banchereau, 2000; Amon et al., 2020).

### 1.2.1 Costimulatorische Oberflächenmarker

Die Interaktion zwischen der DZ und den T-Lymphozyten ist ein zentraler Schritt in der Generierung einer gezielten Immunantwort. Auf Seite der DZs wird das Antigen auf MHC-Molekülen präsentiert. Dessen Erkennung mit Hilfe des spezifischen TZR stellt einen unverzichtbaren Schritt in der DZ-T-Zell-Interaktion dar. HLA-DR ist ein wichtiges MHC-II-Molekül, auf welchem i. d. R. wirtsfremde Peptid-Antigene durch DZs präsentiert werden (Tang-Huau et Segura, 2018; Laoui et al., 2016).

Neben der Antigen-spezifischen Bindung bedarf es zur Aktivierung der T-Zelle weitere Signale. Die costimulatorischen Moleküle übernehmen dabei eine zentrale Rolle, welche zur Prägung des Begriffs der „immunologischen Synapse“ führte (Dustin, 2014; Finetti et Baldari, 2018). Hierbei handelt es sich mehrheitlich um membranständige Glykoproteine, die überwiegend zellspezifisch exprimiert werden und verschiedene Funktionen bei der interzellulären Kommunikation tragen. Auf die wichtigsten Oberflächenmoleküle der mDZs soll im Folgenden näher eingegangen werden:

Die Mitglieder der sog. B7-Familie, zu denen auf Seite der DZs CD80 und CD86 gehören, regulieren die Balance zwischen einer schlagkräftigen Immunabwehr und der

Vermeidung von Autoimmunität (Greaves et Gribben, 2013). Sie beeinflussen dabei maßgeblich die Aktivierung und auch das Überleben der interagierenden T-Zellen. 1991 bzw. 1992 beschrieben Linsley et al. zwei Liganden von B7 (CD80/86) mit aktivierenden (CD28), wie auch inhibierenden (CD152 = CTLA-4) Effekten auf die interagierenden T-Zellen. CD86 wurde dabei eine erhöhte Affinität zu CD28 und CD80 eine erhöhte Affinität zu CD152 zugeschrieben. Die CD80-CD152-Interaktion steht spätestens seit der Einführung des Immuncheckpointinhibitors Ipilimumab im Kontext maligner Erkrankungen auch klinisch im Rampenlicht. Eine alleinige Expression von CD80/86 reicht für eine effektive Tumormunität nicht aus, ihr Verlust hingegen kann zur Dysfunktion des Immunsystems im Rahmen von Tumorerkrankungen beitragen (Dakappagari et al., 2012).

Interaktionen von CD40 und CD154 (CD40L) zwischen DZs und T-Zellen (Ara et al., 2018) bzw. B-Zellen (Ma et al, 2009) stellen einen weiteren wichtigen Bestandteil bei der Induktion effizienter Immunantworten dar. Die Expression von CD40 auf der DZ trägt dabei zur Aktivierung von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei. Neben der Apoptosehemmung bewirken CD40-Interaktionen auch die DZ-Reifung, in Folge derer es zu einer Steigerung der Expression weiterer costimulatorischer Moleküle (z. B. CD80, CD86, HLA-DR) und der Produktion proinflammatorischer Moleküle (z. B. IL-12) kommt (Abdi et al., 2018; Gardner et al., 2018). Ihr Verlust resultiert in einer Verminderung von DZ-T-Zell-Interaktionen und damit auch einer reduzierten T-Zell-Antwort (Elizondo et al., 2017).

CD83 ist ein weiteres wichtiges costimulatorisches Molekül, welches auf moDZs nach Ausreifung hochreguliert wird und zur Familie der Immunglobuline gehört (Li et al., 2019). Eine stabile Expression von CD83 wird typischerweise auf DZs gesehen und reguliert homotypisch die DZ-Aktivierung. Insgesamt scheint es eher inhibitorische Funktionen zu übernehmen. Eine lokale CD83-Überexpression inhibiert entzündliche Prozesse, möglicherweise über eine verminderte Produktion von IL-12 (Bates et al., 2015).

## 1.2.2 Zytokine

Die Sekretion verschiedener pro- und anti-inflammatorischer Mediatoren stellt einen weiteren Aspekt der großen intrinsischen Plastizität der DZs dar. Auf diesem Weg können DZs die Differenzierung unterschiedlicher Th-Immunantworten modulieren. Anhand ihrer Funktion und Zytokinproduktion unterscheidet man verschiedene CD4<sup>+</sup> T-Helferzelltypen (Luckheeram et al., 2012, Schmitt et Ueno, 2015, Saravia et al., 2019).

1986 führte eine Reihe an Untersuchungen zur Formulierung des Th1/Th2 Paradigmas. Hierbei wurde postuliert, dass Th1-Zellen über die Produktion von IFN $\gamma$  eine Abwehr von intrazellulären Pathogenen und maligne entarteten Zellen bewirken. Th2 Zellen hingegen fördern die humorale Immunität und schützen u. a. vor Parasiten (van Panhuys et al., 2011). Neben diesen beiden lange etablierten Subtypen wurde 2005 eine weitere Th-Gruppe identifiziert, welche sich nach Differenzierung mit IL-23 durch die Produktion von IL-17 auszeichnet, weshalb sie als Th17-Gruppe bezeichnet wird (Luckheeram et al., 2012). Diese Zellen spielen bei der Abwehr von extrazellulären Pathogenen, Pilzen und auch im Kontext von Autoimmunität eine wichtige Rolle (Saravia et al., 2019).

Bei der Etablierung einer robusten Immunantwort im Kontext maligner Erkrankungen werden Th1-Zellen als primäre Th-Subgruppe angesehen. Über die Sekretion von IFN $\gamma$  fördern sie die Rekrutierung und Aktivierung von Immunzellen des angeborenen Immunsystems, wodurch die Freisetzung weiterer proinflammatorischer Mediatoren gefördert wird (Kim et al., 2011; Zhu et al., 2010). Als Grundlage einer starken Th1-Antwort wird eine stabile Produktion von IL-12 angesehen, welche nach Aktivierung von DZs via TLR-4 beschrieben wurde (Terhune et al., 2013). IL-12 hemmt die Differenzierung von Th2- und partiell auch Th17-Zellen (Hoeve et al., 2006; Acosta-Rodriguez et al., 2007). Erhöhte IL-12-Spiegel wurden hingegen bei zahlreichen inflammatorisch-autoimmunologischen Störungen und auch im Rahmen von Abstoßungsreaktionen (sog. GvHD) nach allogener Stammzelltransplantation beschrieben (Teng et al., 2015).

Um eine überschießende Immunität zu verhindern bzw. um eine erfolgreiche Immunreaktion zu beenden, bedarf es inhibierender Mediatoren. IL-10 ist ein immunsuppressives Zytokin, das wesentlich die Balance zwischen einer schlagkräftigen Immunität und einer lebensnotwendigen Toleranz beeinflusst (Sabatos-Peyton et al., 2010; Mauri et Bosina, 2012). Neben der Sekretion von IL-10 exprimieren DZs auch IL-10R. Über eine autokrine Verminderung der IL-12-Produktion und einer Hemmung der Proliferation und Zytokinproduktion von T-Zellen (Schülke, 2018) fördert es die Entwicklung und Expansion von regulatorischen T-Zellen (Tregs) (Ruffell et al., 2014; Verma et al., 2016; Schülke, 2018). Gregori et al. beschrieben 2010 eine Population von tolerogenen DZs, die IL-10 in Abwesenheit von IL-12 sezernierten und einen aberranten Phänotyp mit CD14 $^{+}$ /CD1a $^{-}$  zeigten. Durch ihre anti- bzw. pro-inflammatorischen Eigenschaften wirken IL-10 und IL-12 partiell als Antagonisten (Xiaojing et al., 2015).

## 1.3 Dasatinib, ein Multi-Tyrosinkinaseinhibitor (TKI)

### 1.3.1 Tyrosinkinasen

Als Proteinkinasen bezeichnet man Enzyme, welche die Übertragung von Phosphatgruppen, meist ATP, von einem Nucleosidtriphosphat auf die Hydroxy-Seitenkette einer Aminosäure katalysieren. Die Klasse der Tyrosinkinasen besteht im humanen Genom aus mehr als 90 Mitgliedern, welche in membranständige sowie zytoplasmatische Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen (nRTKs) unterteilt werden. Unter den bislang 32 identifizierten nRTKs befinden sich bekannte Zielstrukturen der Tumorthherapie, wie JAK2, BTK, SYK und Mitglieder der Src-Familie („src-family kinases“; SFKs) (Attwood, 2013).

### 1.3.2 Tyrosinkinaseinhibitoren

Eine übermäßige Tyrosinkinase-Aktivität kann zur unkontrollierten Zellteilung und somit malignen Entartung führen. Die Einführung der Tyrosinkinaseinhibitoren (TKIs) in die Tumorthherapie führte zu einer signifikanten Verbesserung der Behandlung von Krebspatienten (Du et Lovly, 2018).

Die Entdeckung des BCR-ABL-Fusionsproteins und dessen zentraler Rolle in der Pathogenese der chronisch myeloischen Leukämie (CML) durch eine gesteigerte Tyrosinkinase-Aktivität (Konopka et al., 1984; Kurzrock et al., 1988; Lugo et al., 1990) führte zu einer forcierten Suche nach einem geeigneten pharmakologischen Inhibitor (Levitzki et Gazit, 1995; Anafi et al., 1993; Kaur et al., 1994). 1996 wurde der TKI Imatinib entwickelt (Buchdunger et al., 1996; Druker et al., 1996). Dessen durchschlagende Therapieerfolge in klinischen Studien bei CML-Patienten führten 2001 zur Zulassung in der Behandlung der BCR-ABL positiven CML (Arnold, 2001; FDA Consum, 2001). Seine Entdeckung stellt bis heute einen wichtigen Meilenstein in der Hämatookologie dar. Neben den bis dato verfügbaren und vergleichsweise gering wirksamen Therapien mit INF $\alpha$  und Hydroxycarbamid sowie der, mit einer hohen Mortalität und Morbidität assoziierten, allogenen Stammzelltransplantation (alloSZT) stand nun eine potente und nebenwirkungsarme Therapiemöglichkeit zur Verfügung, welche bei 70-90 % aller Patienten zytogenetische Komplettremissionen („complete cytogenetic response“; CCyR) in chronischer Phase induzieren konnte (Druker et al., 2006). Trotz der beachtlichen Erfolge erforderte es aufgrund von primärem/sekundärem Therapieversagen (z. B. durch BCR-ABL-assoziierte Mutationen) oder intolerablen Nebenwirkungen alternative

Therapiemöglichkeiten. Dies führte u. a. zur Entwicklung des Zweitgenerations-TKIs Dasatinib (Hochhaus et al., 2008), welcher sich durch ein breiteres Wirkspektrum, u. a. auch durch Hemmung der SFKs (Rix et al., 2007), auszeichnete.

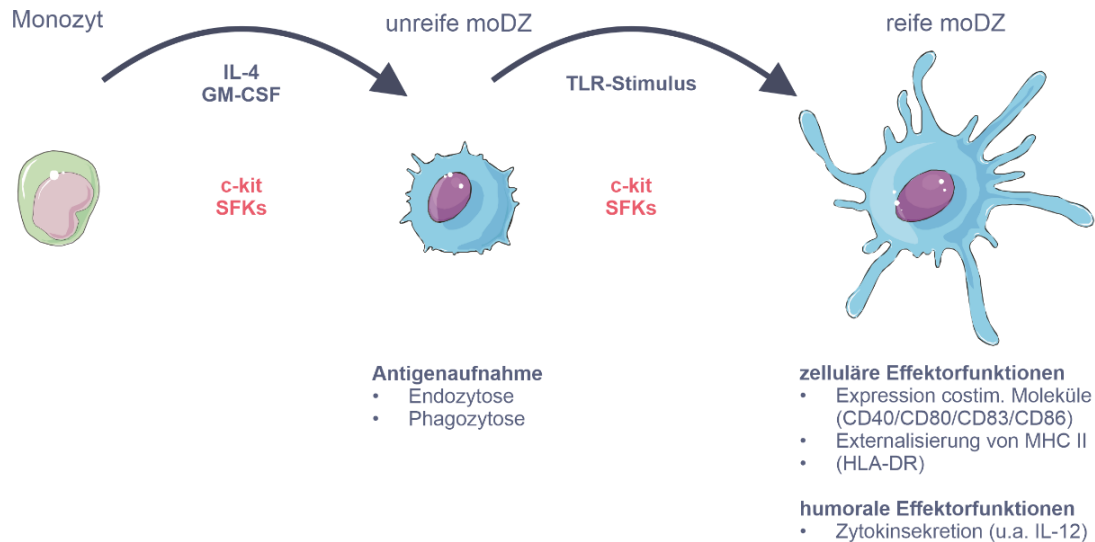
TKIs zeigen neben ihren antitumorösen Eigenschaften u. a. auch immunmodulatorische Effekte auf unterschiedliche Immunzell-Subgruppen (Climent und Plana, 2019; Rivera-Torres und San Jose, 2019). Dies gilt insbesondere für den Multi-Kinaseinhibitor Dasatinib, der an mehr als 30 verschiedene Kinasen bindet (Bantscheff et al., 2007; Rix et al., 2007). Die beiden anderen in Erstlinie der CML zugelassenen TKIs, Imatinib und Nilotinib, verfügen in diesem Kontext über ein wesentlich restriktiveres Zielstrukturprofil.

### 1.3.3 Dasatinib

Dasatinib wurde vom US-amerikanischen pharmazeutischen Unternehmen Bristol-Myers Squibb entwickelt und 2004 publiziert (Lombardo et al., 2004). Seine Zulassung erfolgte 2006 zur Behandlung der Imatinib-resistenten chronisch myeloischen Leukämie (CML) sowie der Philadelphia-Chromosom positiven akuten lymphatischen Leukämie (Ph<sup>+</sup> ALL) bei Erwachsenen, seit 2010 auch in der Erstlinientherapie der CML. 2018 erfolgte schließlich auch die Zulassung zur Behandlung von Kindern mit Ph<sup>+</sup> CML in chronischer Phase und Ph<sup>+</sup> ALL.

Neben dem für die CML sowie die Ph<sup>+</sup> ALL-pathognomonischen BCR-ABL-Fusionsprodukt interagiert Dasatinib mit weiteren Zielstrukturen, wie bspw. einigen Mitgliedern der SFKs, aber auch c-kit, BTK, CSK, MAP3K4, GAK, TEC, EPHB6 (Rix et al., 2007). Diese spielen u. a. bei der Signaltransduktion von Immunzellen eine wichtige Rolle (Scapini et al., 2009; Kuka et al., 2010).

## 1.4 Potenzielle Zielstrukturen von Dasatinib auf DZs



**Abbildung 1 – potenzielle Zielstrukturen von Dasatinib bei der Generierung von moDZs**

c-kit und SFKs sind potenzielle Zielstrukturen von Dasatinib, welche bei der Generierung und Reifung von moDZs wichtige Funktionen übernehmen (modifiziert nach Banchereau et al., 2000).

Die schematischen Abbildungen der Zellen wurden von Servier Medical Art (SMART; <http://smart.servier.com>) übernommen. SMART ist unter einer Creative Commons Lizenz vom Typ Namensnennung 3.0 Unported zugänglich.

### 1.4.1 Kinasen der SRC-Familie (SFKs)

Die Entdeckung von SRC erbrachte J. Michael Bishop und Harald E. Varmus 1989 den „Nobelpreis für Physiologie oder Medizin“ (Marx, 1989) und spiegelt seine zentrale Bedeutung wider. SFKs übernehmen in zahlreichen Signalwegen des angeborenen Immunsystems eine zentrale Rolle, häufig in unmittelbarer Nähe zu assoziierten Rezeptoren. Dabei tragen sie aktivierende, wie auch inhibierende Funktionen (Lowell, 2011).

Entgegen der gut erforschten Signalwege unter Beteiligung von SFKs bei T-Zellen, sind bezüglich DZs weit weniger Erkenntnisse publiziert. Verkompliziert wird die Situation dadurch, dass aktivierende wie auch inhibierende Signalwege bisweilen auch indirekt (i.e. durch Zytokine und Wachstumsfaktoren) miteinander interagieren. Die SFKs Hck, Fgr, Lyn und in geringerem Umfang auch Src werden in Monozyten und DZs exprimiert (Lowell, 2004).



Die Generierung von moDZs aus Monozyten erfolgt *in vitro* in der Gegenwart von GM-CSF und IL-4. Die Interaktion von GM-CSF und einer Untereinheit seines Rezeptors (GMR $\alpha$ ) führt zu einer Aktivierung von Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen, zu welchen auch c-Src und Lyn gehören, die u. a. den NF- $\kappa$ B-Signalwege regulieren (Perugini et al., 2010). Dasatinib führt zu einer Dephosphorylierung von Src und moduliert auf diesem Weg den GM-CSF-abhängigen Signalweg (Bunda et al., 2013). Eine Studie an murinen B-Zellen konnte für LYN, ein Mitglied der SFKs, eine regulatorische Rolle in der IL-4-Signaltransduktion nachweisen (Janas et al., 1999).

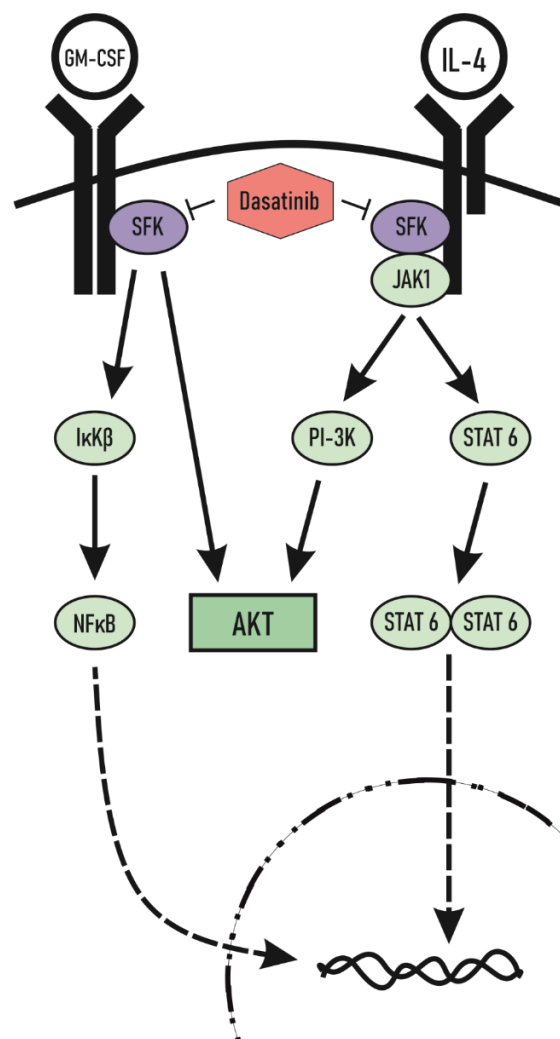


Abbildung 2 – Beteiligung von SFKs bei der Generierung von moDZs

SFKs übernehmen regulatorische Funktionen in der Signaltransduktion von GM-CSF und IL-4, welche wichtige Mediatoren bei der Generierung von moDZs darstellen. Dasatinib könnte über die Hemmung von SFKs Einfluss auf die Generierung von moDZs ausüben (eigene Darstellung nach Perugini et al., 2010; Krebs et al., 2012; Hurdal et al., 2017; Janas et al., 1999).

SFKs übernehmen auch eine wichtige Rolle in der Regulation pro- und anti-inflammatorischer Effekte nach TLR-Aktivierung (Lowell, 2011). Sie sind eine wichtige Stellenschraube an der MyD88-abhängigen Aktivierung von NF- $\kappa$ B (Xi et al., 2010), wodurch die Transkription von Genen inflammatorischer Zytokine initiiert wird (Glass et al., 2010). Die Stimulation mit LPS bewirkt in moDZs eine Aktivierung von c-Src und Lyn. Generell bewirkt LPS in unterschiedlichen Zellen des angeborenen Immunsystems eine Zunahme der gesamtzellulären Tyrosin-Phosphorylierung. Insbesondere Tyrosinkinaseinhibitoren mit einer breiten Affinität zu SFKs könnten hierbei wichtige zelluläre Signale auf LPS blockieren (Smolinska et al., 2008; Ryu et al., 2019). Untersuchungen mit SFK-Inhibitoren führten in mittels LPS ausgereiften moDZ zu einer signifikant verminderten Sekretion von IL-12 (Napolitani et al., 2003; Kuka et al., 2010).

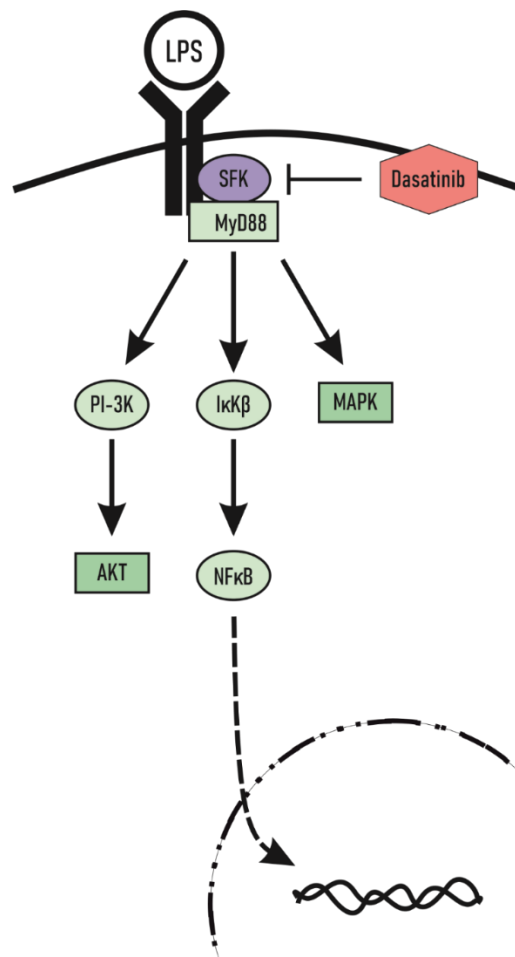


Abbildung 3 – SFKs zeigen eine direkte Assoziation mit TLR4

In der TLR-4-vermittelten Signaltransduktion übernehmen SFKs regulatorische Funktionen, u. a. über eine MyD88-vermittelte Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalwegs (modifiziert nach Byeon et al., 2012).

### 1.4.2 c-kit

c-kit wird auf hämatopoetischen Stammzellen stark exprimiert (Abbaspour Babaei et al., 2016). Die meisten reifen Zellen verlieren seine Expression jedoch im Rahmen der Differenzierung, wobei einige DZs seine Expression bewahren (Merad et al., 2013, Simonetti et al., 2019). Im Mausmodell konnten c-kit<sup>+</sup> moDZs nachgewiesen werden (Oriss et al., 2014).

Neben einer potenziellen Rolle von c-kit in der Regulation der IL-12 Produktion nach TLR-Aktivierung (Simonetti et al., 2019), in dessen Kontext auch synergetische Effekte durch SFKs beschrieben wurden (Ronnstrand, 2004; Masson et al., 2006), wird auch eine Apoptose-Induktion durch eine verminderte Expression von c-kit nach der DZ-Reifung diskutiert (Zanoni et Granucci, 2010; Fuertes Marraco et al., 2011; Zou et al., 2013)

### 1.4.3 RelB – ein Mitglied der NF- $\kappa$ B-Familie

Die Familie der NF- $\kappa$ B-Transkriptionsfaktoren übernimmt regulatorische Funktionen in der Koordination entzündlicher Prozesse, sowie in der Steuerung von Proliferation, Differenzierung und dem Überleben von Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems. Es besteht aus fünf Untereinheiten (RelA/p65, RelB, cRel, p50 und p52), welche als Homo- oder Heterodimere als Transkriptionsfaktoren fungieren (Hayden et Ghosh, 2012). Der klassische, kanonische NF- $\kappa$ B-Signalweg, wird v. a. durch Aktivierung von RelA initiiert, wohingegen RelB meist im Zusammenhang mit der nicht-klassischen, non-kanonischen Signaltransduktion genannt wird (Oeckinghaus et al., 2011). Insbesondere für infDZ wurde jedoch auch eine Assoziation von RelB mit I $\kappa$ B $\alpha$ , im Sinne einer klassischen, kanonischen Aktivierung beschrieben (Shih et al., 2012). Bei der TLR-vermittelten Maturation wurde dabei eine Beteiligung von RelB beschrieben.

RelB vermittelt sowohl immunogene wie auch tolerogene Effekte (Döhler et al., 2017; Vander Lugt et al., 2017). Es beeinflusst die Expression bestimmter Reifemarker und seine nukleäre Translokation wird durch Maturierungsreize hochreguliert (Azukizawa et al., 2011). Für den BCR/ABL-Inhibitor Imatinib, der im Vergleich zu Dasatinib über ein restriktiveres Spektrum an inhibierten Tyrosinkinasen verfügt, konnten immunmodulierende Effekte auf dem Boden einer verminderten nukleären RelB-Translokation nachgewiesen werden (Appel et al., 2004)

## 1.5 Zielstellung der Dissertation

Zu Beginn meiner Arbeit 2007 hatten Mitglieder unserer Arbeitsgruppe (Weichsel et al., 2008) als auch andere Arbeitsgruppen (Blake et al., 2008; Schade et al., 2008) gezeigt, dass Dasatinib *in vitro* inhibitorische Effekte auf T-Zellen zeigt. Die Inhibition Leukämie-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurde ebenfalls *in vitro* für Dasatinib beschrieben (Fei et al., 2008) und schürte Bedenken, ob der Einsatz von Dasatinib im Rahmen einer allogenen Blutstammzelltransplantation nicht zu einer Hemmung der hilfreichen Graft-versus-Leukämie-Reaktion führen könnte. Im Gegensatz dazu beobachteten andere Arbeitsgruppen oligoklonale T- oder NK-Zell-Expansionen, die zu Autoimmunphänomenen und anhaltenden Remissionen in CML-Patienten unter Dasatinib Monotherapie führten (Mustjoki et al., 2009; Kim et al., 2009). Dies unterstützte die Hypothese verstärkter anti-Leukämie-Antworten möglicherweise in Folge reduzierter regulatorischer T-Zell-Zahlen (Mustjoki et al., 2009).

Dasatinib, welches u. a. auch ein Inhibitor der SFKs und von c-kit ist (Rix et al., 2007), könnte entsprechend wichtige Funktionen von DZs modulieren.

Die Kernfragen, die im Rahmen der *in vitro* Untersuchungen bearbeitet werden sollten, werden im Folgenden dargestellt:

1. *Beeinflusst Dasatinib als SRC-Kinase-Inhibitor die Generierung von moDZs? Wenn ja, ist dieser Effekt konzentrationsabhängig und spielt hier ggf. der (programmierte) Zelltod eine Rolle?*
2. *Moduliert Dasatinib die Endozytose-Fähigkeit unreifer moDZs?*
3. *Beeinflusst Dasatinib wesentliche zelluläre und humorale Effektorfunktionen von reifen moDZs? Kommt es hier zu einer konzentrationsabhängigen Modulation wichtiger costimulatorischer Oberflächenmarker (CD40, CD80, CD83, CD86, HLA-DR), welche eine wichtige Rolle in der interzellulären Kommunikation mit den direkten Effektorzellen (z. B. T-Lymphozyten oder NK-Zellen) des Immunsystems darstellen?  
Führt die Behandlung mit Dasatinib zu einer konzentrationsabhängigen Variation der Zytokinproduktion? Exemplarisch wurden hierbei jeweils ein pro- (IL-12) und ein anti-inflammatorisches Zytokin (IL-10) analysiert.*
4. *Findet sich dabei analog zu Imatinib auf molekularer Ebene eine Modulation des NF-κB-Signalweges? Alteriert Dasatinib das Phosphorylierungsmuster von Tyrosinkinasen bei moDZs?*

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte und Zubehör

Geräteart	Type	Hersteller
Analysenwaage, d=0,0001 g	AEJ 120-4M	Kern&Sohn, Balingen
Analysenwaage, d=0,1g	440-33N	Kern&Sohn, Balingen
Autoklav	V75	Systec, Wettenberg
Durchflusszytometer	FACS-Calibur™	BD Biosciences, Heidelberg
Einfrierhilfe „Mr Frosty™“	5100-001	Fisher Scientific, Schwerte
Eismaschine, Scotsman®	AF80	Hubbard Ice Systems, Otley, Suffolk, UK
Filmentwicklermaschine	CP1000	AGFA, Düsseldorf
Gefrier-/Kühlschrank (-20°C/4°C)	CP4023	Liebherr, Ochsenhausen
Gefrierschrank (-20°C)	CP4023	Liebherr, Ochsenhausen
Gefrierschrank (-80°C)	MDF-U73	Panasonic Healthcare, Wood Dale, IL, USA
Gefrierbehälter für flüssigen Stickstoff	10K	Taylor-Wharton (tec-lab, Taunusstein)
Gelelektrophoresekammer und Blot-Modul	XCell Sure Lock®	
Heizblock „neoBlock 1“	2-2503	neoLab

---

Inkubator (37°C, 5 % CO <sub>2</sub> )	HeraCell 150	Thermo
Kühlschrank (4°C)	KTP 1740	Liebherr, Ochsenhausen
MACS-Zellseparator	QuadroMACS™	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Magnetrührer/Wärmplatte	MSH basic	yellow line
Microplate Reader	Model 680	BioRad, München
Mikroskop	Axio Imager Z1	Carl Zeiss Microscopy, Jena
pH-Meter	PH211	Hanna, Kehl am Rhein
Pipettierhilfe	SWIFT-PET+	Hirschmann, Eberstadt
Pipetten	1-10 / 10-100 / 100-1000 µl	Nerbe / Gilson / Eppendorf
	5 / 10 / 25 ml	costar
Reagenzgläser (Plastik)	15 / 50 ml	Greiner
Röntgenfilmkassetten	13x18 cm	Dr. Goos-Suprema, Heidelberg
Röntgenfilmverstärkerfolien	Special Rapid 200	Dr. Goos-Suprema, Heidelberg
Schüttler	Mini Rocker MR-1	Talron Biotech
Spannungsquelle, Power ease 500	PS0091	Life Technologies, Darmstadt
Steril-Werkbank, HERA-safe™	HS12	Fisher Scientific, Schwerte
Stickstofftank	XL240	Taylor-Wharton (tec-lab, Taunusstein)
Vortexer, VortexGenie2™	G560E	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA

---

Wasserbad	WB/OB 7-45	Memmert, Schwabach
Wippschüttler, Minirocker	MR-1	Lab4you, Berlin
Zählkammer	Neubauer Improved	Neubauer, Marienfeld
Zentrifugen:	Haeraeus Multifuge 3SR+	Thermo
	Haeraeus Multifuge 3 S-R	Thermo
	Haeraeus FRESCO 17	Thermo
	Sigma 1-14	Sigma, München

### 2.1.2 Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Type	Hersteller
Alufolie	AF30	Hartenstein, Würzburg
Autoklavier-Klebeband	STKD	Hartenstein, Würzburg
Bechergläser	diverse	VITLAB, Großostheim
Blotting paper, 550 g/m <sup>2</sup>	GB40	Hartenstein, Würzburg
Deckgläser	DK26	Hartenstein, Würzburg
Einfrierröhrchen, Nunc® CryoTube Vials	368632	Fisher Scientific, Schwerte
Gelkämme mini, 15 Taschen	NC3015	Life Technologies, Darmstadt

---

Gelkassetten mini, Novex	NC2015	Life Technologies, Darmstadt
Laborflaschen Duran®	diverse	Duran, Wertheim am Main
Nitrozellulosemembran, Protran® BA85, 0,45 µm	10401196	GE Healthcare, München
Pasteur-Pipette aus Glas	SAP10104985	Zentrallager der Universitätsklinik Würzburg, Würzburg
Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl, 1000 µl	PSK, PSM2, PSG, PSB	Hartenstein, Würzburg
Reagenzröhrchen, Polysterol (FACS-Röhrchen)	RE01	Hartenstein, Würzburg
Reaktionsgefäße mit Deckel (Eppendorf), 0,5 ml	72699	Sarstedt, Nürnberg
Reaktionsgefäße mit Deckel (Eppendorf), 1,5 ml	72690.011	Sarstedt, Nürnberg
Röntgenfilm, Super RX	47410 19230	Fujifilm, Düsseldorf
Säulen für MACS-Separation, LS	130-042-401	Miltenyi Biotec, Bergisch Glad- bach
Zellkulturplatte 6-Well	35322	BD Labware, Heidelberg
Zellkulturplatte 96-Well, U- Boden	650180	Greiner bio-One, Frickenhausen
Zentrifugenröhrchen, konisch ("Falcon"), Cellstar® 15 ml	188261	Greiner bio-One, Frickenhausen
Zentrifugenröhrchen, konisch ("Falcon"), Cellstar® 50 ml	227261	Greiner bio-One, Frickenhausen

---



## 2.1.3 Chemikalien

Bezeichnung	Lot	Hersteller
Albumin Fraktion V, biotinfrei (Bovines Serumalbumin, BSA)	0163.2	Carl Roth, Karlsruhe
<i>Aqua ad iniectabilia</i> ( <i>Aqua dest.</i> )	2138613	Braun, Melsungen
BD Pharm Lyse™ Lysepuffer	555899	BD Biosciences, Heidelberg
Dasatinib	D-3307	LC Laboratories, Woburn, MA, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	SAP707891	Klinikapotheke der Universitäts- klinik Würzburg, Würzburg
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	8040.1	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol 70 %, vergällt	SAP708078	Klinikapotheke der Universitäts- klinik Würzburg, Würzburg
Ficoll-Hypaque, Pancoll	P04-60500	PAN Biotech, Aidenbach
Incidin® perfekt	3011290	Ecolab, Düsseldorf
Natriumazid	K305.1	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	3957.1	Carl Roth, Karlsruhe
Phosphat-gepufferte Salzlö- sung (PBS)	P04-36500	PAN Biotech, Aidenbach
Trypanblaulösung (0,4 %)	93595	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

---

Tween 20 (Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat)	A1389	Applichem, Darmstadt
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	P95302	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

---

#### 2.1.4 Zellkulturmedian und Zusätze

---

Bezeichnung	Lot	Hersteller
RPMI 1640	P04-17500	PAN Biotech, Aidenbach
Fetales Kälberserum (fetal calf serum, FCS)	3302-P110403	PAN Biotech, Aidenbach
Bovines Serum Albumin (BSA)		Carl Roth, Karlsruhe
L-Glutamin 200 mM	P04-80100	PAN Biotech, Aidenbach
Lipopolysaccharid aus E. coli (LPS)	L2880	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Penicillin 10.000 U/ml + Streptomycin 10 mg/ml	P06-07100	PAN Biotech, Aidenbach
GM-CSF	#35-rHuGM-CSF	Gentaur, Aachen
Interleukin 4 (IL-4)	130-094-117	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

---

#### R10-Medium:

Die Herstellung von R10-Medium erfolgte als Zusammensetzung von RPMI-1640 mit 10 % FCS, 1 % L-Glutamin und 1 % Penicillin/Streptomycin.

### 2.1.5 Reaktionssets (Kits)

Bezeichnung	Lot	Hersteller
BioRad DC Protein Assay II	500-0112	BioRad, München
IL-10 ELISA, OptEIA™ Human IL-10 Set	555157	BD Biosciences, Heidelberg
IL-12 ELISA, OptEIA™ Human IL-12 (IL-12p70) Set	555183	BD Biosciences, Heidelberg
OptEIA™ Assay Diluten	555213	BD Biosciences, Heidelberg
OptEIA™ Substrate Reagent A	51-2606KC	BD Biosciences, Heidelberg
OptEIA™ Substrate Reagent B	51-2607KC	BD Biosciences, Heidelberg

### 2.1.6 Monoklonale Antikörper für Durchflusszytometrie

Spezifität	Klon	Isotyp	Fluorochrom	Hersteller
CD1a	HI149	IgG1	FITC	Biozol (Exbio)
CD3	UCHT1	IgG1 κ	APC	BD Pharmingen
CD14	TÜK4	IgG2A	PE	Miltenyi
CD40	5C3	IgG1 κ	APC	BD Pharmingen
CD80	L307.4	IgG1 κ	R-PE	BD Pharmingen
CD83	HB15e	IgG1 κ	APC	BD Pharmingen
CD86	2331 (FUN-1)	IgG1 κ	FITC	BD Pharmingen
HLA-DR	L243	IgG2A	PerCP	BD

### 2.1.7 Reagenzien und Puffer für Durchflusszytometrie

Bezeichnung	Lot	Hersteller
7-Aminoactinomycin D (7-AAD)	559925	BD Biosciences, Heidelberg
Annexin V binding buffer	556454	BD Biosciences, Heidelberg
Annexin V-PE	556422	BD Biosciences, Heidelberg
Dextran Conjugates		Molecular Probes (Invitrogen), Karlsruhe
FACS Clean	340345	BD Biosciences, Heidelberg
FACS Flow™ Sheath fluid	342003	BD Biosciences, Heidelberg
FACS Rinse Solutiion	340346	BD Biosciences, Heidelberg

### 2.1.8 Puffer

Puffer	Zusammensetzung
FACS-Puffer	0,2 % (m/v) BSA in PBS
MACS-Puffer	0,5 % (m/v) BSA in PBS 2 mM EDTA

### 2.1.9 Reagenzien und Puffer für Westernblot

Bezeichnung	Lot	Hersteller
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	9592.3	Carl Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	8040.1	Carl Roth, Karlsruhe
p-Kumarinsäure	C9908	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Luminol	4203.1	Carl Roth, Karlsruhe
Magermilchpulver	Sucofin®	TSI, Zeven
Natriumdeoxycolat	3484.1	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	A2572	Applichem, Darmstadt
Nonidet 40 (NP-40)	A1694	Applichem, Darmstadt
NuPage® Antioxidant	NP0005	Life Technologies, Darmstadt
NuPage® LDS Sample Buffer, 4x	NP0007	Life Technologies, Darmstadt
NuPage® Sample Reducing Agent, 10x	NP0009	Life Technologies, Darmstadt
Phosphatase Inhibitor Cocktail 2	P5726	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ponceau S	5938.1	Carl Roth, Karlsruhe
3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure (MOPS), Pufferansatz	6979.3	Carl Roth, Karlsruhe
Protease Inhibitor Cocktail	P8340	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Proteinmarker, PageRulfer Plus Prestained Protein Ladder	26620	Fisher Scientific, Schwerte
Rotiphorese Gel 30 (37, 5:1)	3029.1	Carl Roth, Karlsruhe

Material und Methoden

Tetramethylethyldiamin (TEMED)	2367.1	Carl Roth, Karlsruhe
Transferpuffer	1610774	Biorad, Feldkirchen
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) Ultra	5429.3	Carl Roth, Karlsruhe
TRIS-HCl	9090.2	Carl Roth, Karlsruhe
Tween 20 (Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat)	A1389	Applichem, Darmstadt

---

Antikörper	Lot	Hersteller
β-Actin (AC-74)	A2228	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Polyklonaler Kaninchen Antikörper gegen RelB (C-19), human	sc#226	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Polyklonaler Maus Antikörper pTyr (PY99)	sc#7020	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Polyklonaler Maus Antikörper p Tyr (PY20)	sc#508	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
HRP-Anti-Kaninchen	NXA931	GE Healthcare, München
HRP-Anti-Maus	NA9340V	GE Healthcare, München

---

Herstellung von Trenn- und Sammelgel:

Material	für 1 Trenngel	für 1 Sammelgel
Rotiphorese Gel 30	3,3 ml	0,83 ml
1M TRIS pH 8,8	3,8 ml	-
1M TRIS-HCl pH 6,8	-	0,58 ml
<i>Aqua dest.</i>	2,9 ml	3,5 ml
10 % SDS	100 µl	50 µl
10 % APS	100 µl	50 µl
TEMED	5 µl	2,5 µl

ECL-Lösung:

Die ECL-Lösung ist eine Dreikomponentenlösung, welche stets frisch aus den Einzelbestandteilen hergestellt wurde. Hierzu wurden 1 ml ECL-A-Lösung (200 ml 0,1 M TRIS pH 8,8 + 50 mg Luminol, 4°C) mit 200 µl ECL-B-Lösung (10 ml DMSO + 11 mg p-Kumarsäure, Raumtemperatur, dunkel) und 0,3 µl 30 %iges Wasserstoffperoxid (4°C, dunkel) gemischt.

MOPS-Laufpuffer (5x):

250 mM MOPS (26,15 g), 250 mM TRIS (15,15 g), 14 mM SDS (2,5 g), 5 mM EDTA (0,75 g) wurden in 500 ml *Aqua dest.* gelöst und bei Raumtemperatur gelagert. Für den Gellauf wurde eine 5-fache Verdünnung verwendet.

Puffer A:

10 mM HEPES (238 mg), 10 mM KCl (75 mg), 0,1 mM EDTA (3,7 mg) und 0,1 mM EGTA (3,8 mg) wurden in 100 ml *Aqua dest.* als Stock gelöst und bei Raumtemperatur gelagert. Vor Verwendung erfolgte die frische Zugabe von 1 mM DTT und 0,5 mM PMSF.

Puffer C:

20 mM HEPES (476 mg), 0,4 M NaCl (2,34 g), 1 mM EDTA (37 mg) und 1 mM EGTA (38 mg) wurden in 100 ml *Aqua dest.* als Stock gelöst und bei Raumtemperatur gelagert. Vor Verwendung erfolgte die frische Zugabe von 1 mM DTT und 1 mM PMSF.

RIPA-Puffer:

50 mM TRIS-HCl (790 mg) und 150 mM NaCl (900 mg) wurden in 75 ml *Aqua dest.* gelöst und es erfolgte die Zugabe von 10 ml 10 %iger NP-40-Lsg., 2,5 ml 10 %iger Nadeoxycholatlsg. und 1 ml 100 mM EDTA-Lsg. Anschließend wurde die Lösung gerührt, bis diese klar war, um anschließend das Volumen auf 100 ml mit *Aqua dest.* aufzufüllen. Die Lagerung erfolgte bei 4°C im Kühlschrank.

Stripping-Puffer:

200 mM Glycin (7,5 g) und 5 ml 10 %iges SDS wurden in *Aqua dest.* gelöst und nach dem Einstellen des pH-Wertes mit HCl auf 2,2 mit *Aqua dest.* auf 500 ml aufgefüllt. Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur.

TBS-T:

20 mM TRIS (2,42 g) und 150 mM NaCl (8,77 g) wurden in 700 ml *Aqua dest.* gelöst und der pH-Wert wurde auf 7,5 eingestellt. Anschließend erfolgte das Auffüllen mit *Aqua dest.* auf 1000 ml und die Zugabe von 0,1 % Tween 20 (1 ml). Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur



## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Blutprodukte

Anfänglich erfolgte der Bezug sog. „buffy coats“ (BCs) über den Blutspendedienst Hessen (Frankfurt am Main). Diese fallen als Nebenprodukt bei der Aufarbeitung von Vollblut zu Erythrozytenkonzentraten und Plasmaprodukten an. Im weiteren Verlauf erfolgte aufgrund der besseren Probenqualität, die Umstellung auf Leukozytenreduktionskammern („leukocyte reduction chambers“, LRCs) von gesunden Blutspendern des Institutes für klinische Transfusionsmedizin und Hämotherapie des Universitätsklinikums Würzburg (siehe auch Kap. 3.1, Abb. 5). Diese sind im Vergleich zu sog. "buffy coats" nachweislich gleichwertig (Dietz et al., 2006). Im Rahmen der Aufklärung zur Vollblutentnahme hatten die Spender eingewilligt, dass Teile ihres Blutes für die nicht genetische wissenschaftliche Forschung verwendet werden dürfen (Stellungnahme der Würzburger Ethikkommission 170/10, Genehmigung vom 24.02.2002).

### 2.2.2 Generierung von dendritischen Zellen

In unserer Arbeitsgruppe wurden bis zum Beginn meiner Labortätigkeit keine Untersuchungen an DZs durchgeführt. Aufgrund der in Kap. 1.2 beschriebenen Vorteile, entschieden wir uns zur Untersuchung der *in vitro*-Effekte von Dasatinib auf moDZs. Diesbezüglich testete ich verschiedene publizierte Protokolle (u. a. Appel et al., 2004; Brossart et al., 1998; Thurner et al., 1999) in kleinen Versuchsreihen an Eigenblut bzw. freiwilligen Blutspenden meiner Laborkollegen aus. Nach Separation von PBMCs mittels Dichtegradientenzentrifugation erfolgte die Monozytenisolierung mittels Plastikadhärenz.

#### 2.2.2.1 Monozytenisolierung mittels Plastikadhärenz

Aktiviert Monozyten und Neutrophile verfügen über Fähigkeiten an bestimmten Oberflächenstrukturen mittels bestimmter Proteine zu adhären. Diese Eigenschaft fehlt anderen Zellarten wie Lymphozyten (Davis, 1992). Orientierend an den Protokollen von Appel et al. (2005) und Brossart et al. (1998) führte ich die Plastikadhärenz in sog. 6-well-Platten durch.

Die Gewinnung von mononukleären Blutzellen erfolgte durch Ficoll-Dichtezentrifugation. Hierzu wurde 1 : 5 mit PBS verdünntes venöses Blut vorsichtig 1 : 1 auf Pancoll aufgeschichtet und für 30 min RT zentrifugiert (1600 rpm). Entsprechend ihrer unterschiedlichen Dichte setzen sich Erythrozyten und Granulozyten unterhalb, PBMCs oberhalb der Ficoll-Schicht ab. Nach Entnahme der PBMCs wurden diese zweimal mit PBS gewaschen (1600 rpm, 10 min). Anschließend erfolgte die Lyse weniger verbliebener Erythrozyten (6 min im Dunkeln bei RT), gefolgt von zweimaligem Waschen mit PBS. Die Gesamtzellzahl der in R10 Medium gelösten Zellen wurde in der sog. Neubauer'schen Zählkammer ermittelt. Dies ist ein Objektträger mit fest aufgebrachtem und standardisiertem Gitternetz, mit Hilfe dessen die Gesamtzellzahl nach folgender Formel berechnet werden:

$$\text{Mittelwert (aus 3 Bestimmungen) der gezählten Zellen} / 4 \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Gesamtvolumen} \times \text{Neubauersche Zahl} (10^4)$$

Zur Plastikadhärenz in Zellkulturplatten (6-well) wurden je Vertiefung  $1 \times 10^7$  PBMCs für 100 min im Brutschrank inkubiert. Die nicht-adhärenenten Zellen wurden anschließend durch dreimaliges Waschen mit PBS mit der elektrischen Pipette abgespült.

Orientierend an den Protokollen von Appel et al. (2005) und Brossart et al. (1998) konnte ich hierbei Reinheiten zwischen 61 % und 87 % (Median 73 %; n=6) erzielen. Diese Methodik wandte ich für sämtliche durchflusszytometrische Untersuchungen an (DZ-Generierung, Dextran-Aufnahme, Apoptose-/Nekrose-Induktion und Oberflächenmarkexpressionsanalyse).

#### **2.2.2.2 Monozytenisolierung mittels MACS-Sort**

Nach Separation der PBMCs mittels Ficoll führte ich die magnetische Zellseparation gemäß Herstellerangaben durch. Nach Waschen mit MACS-Puffer (300 x g, 10 min) erfolgte die Inkubation der Zellen in CD14 MicroBeads und MACS-Puffer für 15 min bei 4°C. Anschließend wurden die Zellen in MACS-Puffer gewaschen (300 x g, 10 min) und das Pellet in 500 µl MACS-Puffer je  $1 \times 10^8$  PBMCs resuspendiert. Nach Vorbereitung der LS MACS Säulen erfolgte die Zugabe der vorbehandelten PBMCs nach dreimaligem Spülen mit MACS-Puffer. Anschließend konnten die verbliebenen CD14<sup>+</sup> Zellen aus der Säule mit MACS-Puffer ausgespült werden. Die Reinheit wurde durchflusszytometrisch überprüft.

Aufgrund der höheren Materialkosten, aber auch besserer Reinheit, beschränkten wir die Anwendung des MACS-Sort auf die Versuche zur Zytokinmessung im Zellüberstand mittels ELISA und die Westernblotexperimente. Die erzielten Reinheiten lagen zwischen 87 % und 95 % (Median 91 %, n=6).

### 2.2.3 moDZ-Zellkultur

Die Generierung von moDZs testete ich zunächst mit zwei verschiedenen Konzentrationen von GM-CSF und IL-4 aus, wobei ich den Erfolg der Zellkultur unter regelmäßiger mikroskopischer Kontrolle verfolgte (Anteil von moDZs mit typischem Phänotyp mit verästelten Zellausläufern).

	Protokoll A	Protokoll B
IL-4	75 ng/ml	20 ng/ml
GM-CSF	140 ng/ml	100 ng/ml
	Austausch von 50 % des Mediums an Tag 4 (inkl. Zytokinen)	Nochmalige Zytokinzugabe (Tag 4) entsprechend der Ausgangskonzentration

Aufgrund der höheren Vitalität von im Median 87,5 % (Protokoll B) im Vgl. zu 66,7 % (Protokoll A) erfolgte im Folgenden die moDZ-Generierung analog Protokoll B.

Die angereicherten Monozyten wurden für 7 Tage in 3 ml R10 Medium pro well in 6-well-Zellkulturplatten im Brutschrank inkubiert. Die Generierung erfolgte in Anwesenheit unterschiedlicher Dasatinib-Konzentrationen (10/20/50 nM, ab Tag 0) unter Zugabe von GM-CSF (100 ng/ml) und IL-4 (20 ng/ml) an Tag 0, 2, 4 und 6. An Tag 6 erfolgte die Ausreifung durch Zugabe von LPS (*E. coli*; 3,3 µg/ml). Die Generierung und Ausreifung der DZs wurde stichprobenartig am Mikroskop überprüft. Um Lösungsmittelleffekte auszuschließen erfolgte die Mitführung einer Kontrolle (DMSO entsprechend der höchsten Dasatinib-Konzentration).

## 2.2.4 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie („fluorescence activated cell sorting“ = FACS) ist eine Methode, welche die Analyse verschiedener physikalischer Eigenschaften von Partikeln (üblicherweise Zellen) ermöglicht. Dabei können Partikelgröße, Granularität (innere Komplexität/Dichte) und Fluoreszenz analysiert werden. Der Durchflusszytometer besteht aus drei Hauptkomponenten: Das Flüssigkeitssystem (Komponente 1) führt die Partikel in einem laminaren Probenstrom am optischen System (Komponente 2) vorbei. Zentrales Element des optischen Systems ist ein (oder mehrere) Laser, dessen fokussiertes Licht die Proben in der Trägerflüssigkeit anstrahlt. Die auf diesem Wege generierten Lichtsignale werden über optische Filter dem elektronischen System (Komponente 3) weitergeleitet. Dort können die optischen Informationen mittels Detektoren in elektronische bzw. digitale Signale umgewandelt werden. Anschließend erfolgt die Auswertung der Analysen durch den Benutzer an einem Computer. Die Größe der zu untersuchenden Partikel darf hierbei zwischen 0,2 und 150  $\mu\text{m}$  betragen und ist somit zur Analyse korpuskulärer Blutbestandteile geeignet.

Neben der Fluoreszenzmessung, auf welche im folgenden Kapitel näher eingegangen wird, findet über die Detektoren (Photomultiplier) auch die Analyse der Lichtstreuung statt. Trifft das Licht des Lasers auf einen Partikel, wird es abhängig von dessen physikalischen Eigenschaften (z. B. Größe und Granularität) gestreut. Das Vorwärtsstreulicht („forward scatter“, FSC) korreliert direkt mit der Zelloberfläche/-größe. Jeder Partikel im Lichtstrahl erzeugt ein FSC-Signal, so dass dadurch auch die Bestimmung der Partikelzahl in einer Probe möglich ist. Das Seitwärtsstreulicht („side scatter“, SSC) entspricht dem gebrochenen/reflektierten Licht und verhält sich proportional zur Granularität der analysierten Zelle. Trägt man in einem Koordinatensystem nun FSC gegen SSC entsprechender Blutproben auf, so erhält man eine Auftrennung in bestimmte Subpopulationen, die sich in Zellgröße und -granularität unterscheiden.

### 2.2.4.1 FACS-Färbungen mit monoklonalen Antikörpern

Ein fluoreszierendes Molekül kann Lichtenergie in einem typischen Spektrum aufnehmen und damit eines seiner Elektronen auf ein höheres Energielevel heben. Dieses angeregte Elektron springt umgehend wieder auf den energetischen Grundzustand zurück und emittiert dabei freiwerdende Energie in Form von einem Lichtquant, welche durch

ein optisches System als Lichtsignal gemessen werden kann. Auf diese Weise können unter Hinzunahme farbkonjugierter monoklonaler Antikörper auch bestimmte Oberflächenstrukturen und intrazelluläre Moleküle nachgewiesen werden.

Im Rahmen meiner Versuche arbeitete ich mit einem 4-Farben-Durchflusszytometer (FACS Calibur), welcher über zwei Laser verfügte: 488 nm Argon und 633 nm He/Ne. Diese Laser können bis zu 4 verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe anregen und ermöglichen damit die gleichzeitige Analyse von 4 Eigenschaften aus einer Probe, in meinem Fall FITC, PE, PerCP und APC.

Vor Beginn der eigentlichen Versuche mit Zugabe der unterschiedlichen TKI-Konzentrationen erfolgte die Titration der Fluoreszenz-gekoppelten Durchflusszytometrie-Antikörper für CD1a, CD40, CD80, CD83, CD86 und HLA-DR, welche bis dato noch keine Anwendung in der Arbeitsgruppe gefunden hatten. Hierdurch wurde eine optimale Trennschärfe der Messungen ermöglicht. Zusätzlich wurde für jedes Experiment eine neue Kompensation durchgeführt.

#### ***2.2.4.2 Untersuchung costimulatorischer Oberflächenmarker***

Zunächst erfolgten Analysen zum Einfluss von Dasatinib auf die Expression der costimulatorischen Oberflächenmarker in den klinisch relevanten Konzentrationen von 10 / 20 / 50 nM. Bei Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit nach oraler Einnahme von Dasatinib konnten im Patientenserum Konzentrationen zwischen 30 – 90 nM gemessen werden (Weisberg et al., 2007; Brave et al., 2008; Furlong et al., 2012). Die für die Analysen verwendeten Konzentrationen von 10 bzw. 20 nM liegen dabei eher im unteren Bereich, 50 nM entspricht einem mittlerem Serumspiegel nach Einnahme von Dasatinib 70 mg 2x tgl. im Serum von Patienten, welcher in der Spitze bis 90 nM erreicht (Furlong et al., 2012). Parallel führte ich bei den ersten Versuchsreihen Imatinib 3 µM als interne Kontrolle mit, in Analogie zu den publizierten Daten von Appel et al. (2004 & 2006).

#### ***2.2.4.3 Untersuchung der Endozytose***

Seit der Veröffentlichung von Schröder et al. aus dem Jahr 1976 stellt die Anwendung von Farb-konjugierten Dextranen eine häufig angewandte Methode dar, das Endozytoseverhalten von Antigen-aufnehmenden Zellen zu untersuchen. Neben seiner

thermischen und chemischen Stabilität zeichnet sich Dextran vor allem auch durch fehlende toxische, pyrogene und allergene Eigenschaften aus (Gronwall et Ingelman, 1945; Ingelman, 1947). Mittels entsprechend Fluoreszenz-gekoppelter Dextranpartikel können Untersuchungen zu Phagozytose, Makropinozytose, Mikropinozytose und der Manno- serezeptor-vermittelten Antigenaufnahme durchgeführt werden (Gaudin et al., 2013; Fiegl et al., 2013; Zhang et al., 2013; Bauer et al., 2011; Comissio et al., 2013).

Mit FITC-konjugierten Dextranpartikeln analysierte ich das Endozytoseverhalten unreifer moDZs: Hierfür wurden je  $1 \times 10^5$  DZs in 100  $\mu$ l asserviertem Medium für 1,5 h vortem- periert und anschließend für 1 h in 1 mg/ml FITC-Dextran inkubiert. Nach Waschen der Proben (3 x 2 ml FACS-Puffer, 1200 rpm, 4 min) erfolgte die Analyse am Durchflusszy- tometer. Als Negativkontrolle dienten bei 4°C inkubierte sowie reife moDZs (beide zeigen physiologischerweise keine Endozytose).

#### **2.2.4.4 Apoptose/Nekrose-Untersuchung (Annexin V/7-AAD)**

Um spezifische von toxischen Effekten zu unterscheiden, führte ich Apoptose- und Nek- roseuntersuchungen zu den unterschiedlichen Dasatinib-Konzentrationen durch. An Tag 5, 6 und 7 wurden Proben von unreifen bzw. reifen moDZs mit Annexin V bzw. 7-AAD gefärbt und analysiert. Annexin V bindet an Phosphatidylserin, das sich normalerweise in den Zellen befindet. Bei der Apoptose wird Phosphatidylserin auf die Außenseite der Zellmembran transloziert (Vermees et al., 1995). 7-Aminoactinomycin (7AAD) interkaliert mit der DNA im Bereich zwischen Cytosin und Guanin und verändert dabei seine Flu- oreszenzeigenschaften, jedoch nur bei Zellen, deren Zellmembran beschädigt wurde, wie es im spätapoptotischen/nekrotischen Zellstadium der Fall ist (Schmid et al., 1992; Schmid et al, 1994).

Annexin V<sup>+</sup> / 7AAD<sup>-</sup> Zellen werden als frühapoptotische Zellen gewertet, Annexin V<sup>+</sup> / 7AAD<sup>+</sup> Zellen als spätapoptotisch bzw. nekrotisch, sei es aufgrund toxischer Effekte oder als finales Stadium der Apoptose.

#### **2.2.5 Messung der Zytokinsekretion mittels ELISA**

Die Analyse der Zytokinsekretion von Interleukin 10 und 12 erfolgte mittels ELISA Im- munoassays von BD OptEIA™ ELISA-Kits nach Herstellerangaben. Nach erfolgreicher

modZ-Generierung und optionaler Ausreifung (LPS) wurden die Überstände und die korrelierenden Zellen kryokonserviert (Überstände:  $-80^{\circ}\text{C}$ ; Zellen: im flüssigen Stickstoff bei ca.  $-200^{\circ}\text{C}$ ). Die Überstände wurden für die Analysen jeweils 1:2 bzw. 1:10 verdünnt.

Zunächst wurden die 96-Well-ELISA-Platten mittels 200  $\mu\text{l}$ /well Assay Diluent für 1 h bei Raumtemperatur zur Absättigung unspezifischer Bindungen geblockt. Vor- und nachher wurden die Vertiefungen jeweils 5-mal mit 200  $\mu\text{l}$ /well PBS/Tween 0,05 % gewaschen. Anschließend wurden die Proben sowie die rekombinanten IL-10- bzw. IL-12-Standards auf die Platten ausgebracht. Für die Standards wurde eine 1:2-Verdünnungsreihe (beginnend mit 1000 pg/ml) angelegt. Nach einer 2-stündigen Inkubation bei Raumtemperatur, sowie nach erneutem 5-maligen Waschen mit PBS/Tween 0,05 % erfolgte die Zugabe des Working Agent (40  $\mu\text{l}$  Enzyme Reagent in 10 ml unverdünntem detection Ab, Herstellung mind. 15 min vor Zugabe) von 100  $\mu\text{l}$ /well, sowie eine erneute 1-stündige Inkubation bei Raumtemperatur. Anschließend erfolgte die Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  Substrate Solution (1:1 Substrate Solution A und B, Herstellung mind. 15 min vor Zugabe) nach 7-maligem Waschen PBS/Tween 0,05 % für mindestens 30s. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln erfolgte die Zugabe von 50  $\mu\text{l}$  Stop Solution (2N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) und die anschließende Messung am BioRad Model 680 Microplate Reader bei 450 nm gegen 0 nm. Am Gerät wurde die Standardkurve sowie die Berechnung der Messwerte mittels der Microplate Manager™-Software erstellt.

## 2.2.6 Westernblot

### 2.2.6.1 Proteinextraktion und Konzentrationsbestimmung

Zur Analyse der Proteinphosphorylierungsmuster unter Dasatinib erfolgte die Herstellung und Kryokonservierung von Gesamtzellextrakten. Hierzu erntete ich die vorbehandelten modZs und zentrifugierte sie mit kaltem PBS (13.000 rpm, 2 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ). Anschließend wurden die Zellen in 150  $\mu\text{l}$  eines vorbereiteten Puffers (10 ml RIPA + 10  $\mu\text{l}$  Aprotinin/Leupeptin/Pepstatin + 50  $\mu\text{l}$  PMSF/NaF/NaVO<sub>3</sub>) für 1h auf Eis gelagert und alle 15 min verwirbelt. Nach Sedimentation der Nuclei (3.000 rpm, 5 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ) erfolgte die Kryokonservierung der entsprechenden Aliquots bis zur Auftrennung mittels SDS-PAGE bei  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Im Gegensatz zu Proteinkinasen wird RelB bei Aktivierung nicht phosphoryliert, sondern in den Nukleus transloziert. Entsprechend ist zur Bestimmung des Aktivierungsgrades

der intranukleäre Proteinanteil maßgeblich, so dass zur Bestimmung des Einflusses von Dasatinib auf intrazelluläre Signalwege die Herstellung nukleärer Extrakte aus DZs gemäß Protokoll erfolgte. Hierzu wurden die unterschiedlich vorbehandelten moDZs geerntet und mit 10 ml TBS unter Zentrifugation (1.500 rpm, 5 min) vom Zellüberstand separiert. Anschließend erfolgte die Resuspension der Zellen in 1 ml TBS sowie der Transfer in ein Mikroreaktionsgefäß („Eppendorf cup“). Nach erneuter Zentrifugation und Abpipettieren des Überstandes erfolgte die Resuspension in 400 µl kaltem Puffer A, welcher für 15 min auf Eis gestellt wurde. Zur Zerstörung der Zellwand erfolgte eine regelmäßige mechanische Scherung der Zellen mittels einer feinen Kanüle. Durch Zugabe von Nonidet P-40 wurden die freigesetzten Proteine denaturiert. Nach erneuter Zentrifugation und Entfernung des Zytoplasma-Überstandes wurden die nukleären Extrakte in 50 µl kaltem Puffer C resuspendiert und durch 15-minütiges Verwirbeln im Vortexer auf Eis freigesetzt. Nach erneuter Zentrifugation (13.000 rpm, 5 min, 4°C) erfolgte die Proteinbestimmung sowie die Konservierung entsprechender Aliquots im Gefrierschrank.

Die Proteinmenge der einzelnen Proben wurde mit Hilfe des BioRad DC Protein™ Testset bestimmt. Nach Herstellung von Reagenz A' (Zugabe von 20 µl Reagenz S zu 1 ml Reagenz A) und Titration einer BSA-Verdünnungsreihe von 10 µg/ml bis 0,09 µg/ml in 1:2 Schritten mit RIPA-Puffer erfolgte die Verteilung der Proben auf einer 96-well-Platte. Hierzu wurden 5 µl der jeweiligen Probe mit 25 µl Reagenz A' und 200 µl Reagenz B vermischt und nach 15-minütiger Inkubation mittels eines Tecan GENios™ Microplate Reader bei 620 nm gegen 0 nm analysiert. Die Erstellung der Standardkurve anhand der BSA-Verdünnungsreihe sowie die Berechnung der Proteinkonzentration der jeweiligen Proben erfolgte mittels der Microplate Manager™ Software von BioRad München.

Zur statistischen Auswertung der belichteten Westerblotfilme wurde die Intensität der einzelnen Banden mit Hilfe der „ImageJ“ © Software (Version 1.53f) analysiert. Den mittels LPS ausgereiften unbehandelten Zellen wurde dabei die Referenzgröße 100 % zugeordnet und die weiteren Ansätze in ein entsprechendes Verhältnis gesetzt und mittels der Statistik-Software GraphPad Prism 8 ® ausgewertet.

### ***2.2.6.2 Elektrophoretische Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE***

Die Proteine wurden nach ihrem Molekulargewicht mittels diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970) aufgetrennt. Hierzu



wurden die Proteine in einem pH-neutralen Sammelgel aufkonzentriert und anschließend nach ihrem Molekulargewicht in einem basischen Trenngel aufgetrennt. Hierzu wurden 10 %ige Bis-Tris-Gele verwendet, welche frisch nach Protokoll (siehe 2.1.9) hergestellt wurden. Nach Einlage des Gels wurde die innere Kammer komplett mit 1x MOPS-Puffer unter Zugabe von 500 µl NuPage® Antioxidans geflutet. Die äußere Kammer wurde zunächst bis knapp unter die Taschen mit 1x MOPS-Puffer gefüllt. Parallel wurden die Proteinextrakte aufgetaut und mittels RIPA-Puffer auf die gleiche Konzentration gebracht, wobei die im Gellauf eingesetzten Proteinmengen zwischen 1 – 10 µg schwankten. 13 µl der eingestellten Proben wurden anschließend mit 5 µl NuPage® LDS Sample Puffer und 2 µl NuPage® Sample Reducing Agenz für 10 min im Heizblock auf 70°C erhitzt. Nach Zentrifugation im Kurzlaufprogramm erfolgte die Lagerung bis zum Laden auf Eis. Nach dem Probentransfer wurde auch die äußere Kammer bis zum Rand mit 1x MOPS-Puffer aufgefüllt. Anschließend erfolgte der Gellauf für 40-70 min bei einer konstanten Spannung von 200 V (bei variabler Stromstärke).

#### **2.2.6.3 Proteintransfer auf Nitrozellulosemembran**

Nach elektrophoretischer Proteinauftrennung wurde das Gel aus der Kassette entfernt und in das Blotting Modul transferiert (Aufbau: 2 Schwämme - Whatman Filterpapier – Gel – Nitrozellulosemembran – Whatman Filterpapier – 3 Schwämme), wobei ggf. entstandene Luftbläschen ausgestrichen wurden. Anschließend wurde die innere Kammer mit Transferpuffer (40 ml Biorad Transfer Puffer + 40 ml Methanol + 320 ml *Aqua dest.*), die äußere Kammer mit reinem *Aqua dest.* geflutet. Der Proteintransfer vom Gel auf die Nitrozellulosemembran erfolgte für 75 min bei 25 V und rund 200 mA. Mittels einer Ponceau S-Färbung wurde der Transfer kontrolliert. Dabei wird die reversible Bindung von Ponceau S an positiv geladene Aminogruppen genutzt.

#### **2.2.6.4 Antigendetektion mittels HRP-gekoppelter Antikörper**

Alle Inkubationsschritte erfolgten in einem Kunststoffgefäß auf einem Wippschüttler. Nach mehrfachem Waschen der Nitrozellulosemembran mit TBS-T erfolgte die Inkubation in Milchpulver bzw. BSA für 1h. Das Waschen mit Milchpulver und BSA soll dabei unspezifische Bindungen absättigen, so dass der Antikörper keine unspezifischen Bindungen eingeht. Anschließend wurden die Proben mit verdünntem Primärantikörper

über Nacht bei 4°C im Kühlschrank inkubiert. Am nächsten Morgen erfolgte nach erneutem Waschen mit TBS-T die Inkubation mit dem HRP-Konjugierten sekundären Antikörper für 1h bei Raumtemperatur. Nach erneutem Waschen mit TBS-T und Spülen mit *Aqua dest.* erfolgte die Benetzung der Membran mit ECL-Lösung und eine einminütige Inkubation. Anschließend wurde die Membran abgetropft, luftblasenfrei in Klarsichtfolie verpackt und in eine Röntgenfilmkassette eingelegt. In der Dunkelkammer wurden die Ergebnisse durch Belichten auf Röntgenfilme übertragen und mit Hilfe der Entwicklermaschine sichtbar gemacht. Um eine erneute Verwendung der Membranen zu ermöglichen wurde die Membran nach erneutem Waschen in TBS-T in Strippingpuffer für 30 min inkubiert.

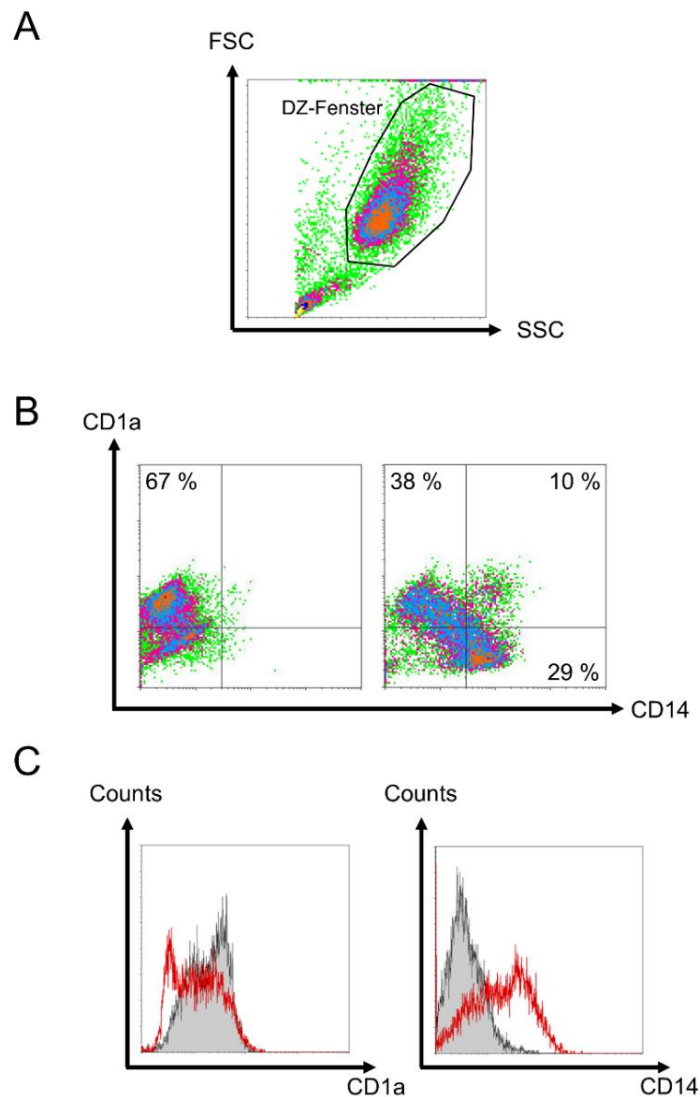
### **2.2.7 Statistische Auswertung**

Die statistischen Berechnungen mit Bestimmung von Mittelwert (Mean), Zentralwert (Median), Standardfehler (SEM) und p-Wert wurden mit Hilfe der Statistik-Software GraphPad Prism 8® vorgenommen.

Statistische Signifikanzen wurden hierbei mittels des zweiseitig gepaarten „student's t-test“ ermittelt, wobei p-Werte < 0.05 als statistisch signifikant bewertet wurden.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Hemmung der Generierung von moDZs unter 50 nm Dasatinib



**Abbildung 4 - Modulation der DZ-Generierung unter Dasatinib 50 nM**

Exemplarische Darstellung eines von  $n = 6$  unabhängigen DZ-Generierungs-Experiments aus LRCs

- A: Beispiel eines sog. DZ-Fensters, zur Eingrenzung der DZs mittels ihrer typischen Größe (FSC) und Granularität (SSC).
- B: 50 nM Dasatinib (rechts) führte im Vergleich zur unbehandelten Probe (links) zu einer verminderten Expression von CD1a bei Persistenz von CD14. Hierbei fand sich auch eine Population mit einem intermediären Phänotyp von ca. 10 % (CD1a<sup>+</sup> CD14<sup>+</sup>).
- C: Zwischen der unbehandelten Probe (schwarz) und der mit 50 nM Dasatinib inkubierten Probe (rot) fand sich eine Reduktion der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) für CD1a (59,3 vs. 17,5) sowie für CD14 ein fehlender Abfall der MFI in der mit 50 nM Dasatinib behandelten Probe (19,6 vs. 65,6).

Der Einfluss von Dasatinib auf die Generierung von moDZs wurde mit Hilfe eines typischen moDZ- bzw. Monozytenmarkers (CD1a bzw. CD 14) evaluiert. Nach Vorselektion über das sog. DZ-Fenster (Bereich mit für moDZ typischem FSC und SSC; Abb. 4A) konnten moDZs und Monozyten unter Ausschluss von Zelltrümmern hinsichtlich der CD1a- bzw. CD14-Expression analysiert werden. Neben der prozentualen Verteilung von moDZs (CD1a<sup>+</sup> CD14<sup>-</sup>) und Monozyten (CD1a<sup>-</sup> CD14<sup>+</sup>) (Abb. 4B) wurde auch die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der CD1a- und CD14-Expression (Abb. 4C) ermittelt.

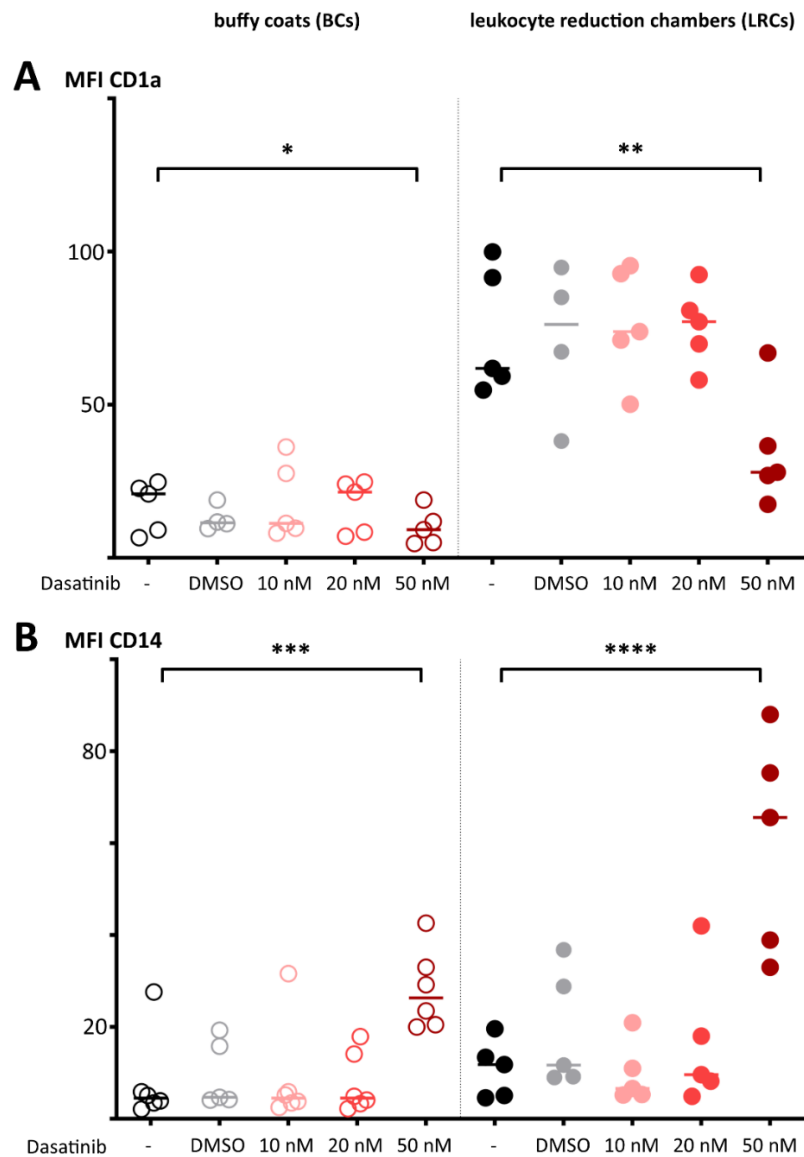
Hierbei zeigte sich ein verändertes Expressionsmuster der DZ- bzw. Monozyten-typischen Marker CD1a bzw. CD14. Die Hauptpopulation der moDZ (CD1a<sup>+</sup>, CD14<sup>-</sup>) nahm von durchschnittlich 68 % in der unbehandelten Probe auf 38 % unter 50 nM Dasatinib ab. Die statistische Auswertung (n = 6) konnte für 50 nM Dasatinib eine signifikant verminderte Population CD1a<sup>+</sup>/CD14<sup>-</sup> Zellen ermitteln (10 nM: p = 0,3589; 20 nM: p = 0,9333; 50 nM: p = 0,0003). Parallel konnte eine Persistenz der CD1a<sup>-</sup>/CD14<sup>+</sup> Population unter 50 nM Dasatinib nachgewiesen werden. In der unbehandelten Kontrolle fand sich hingegen nur eine geringe Frequenz von Monozyten (Mittelwert: 3 %). Unter 50 nM Dasatinib zeigte sich eine Population mit Monozyten-typischer Expression von durchschnittlich 29 %. Die statistische Auswertung zeigte eine signifikante Persistenz der CD1a<sup>-</sup>/CD14<sup>+</sup> Population unter 50 nM Dasatinib (p = 0,0017). Die Dasatinib-Dosierungen von 10 bzw. 20 nM erreichten keine signifikante Abweichung im Vergleich zur unbehandelten Probe (10 nM: p = 0,4465; 20 nM: p = 0,8919).

Unter 50 nM Dasatinib fand sich darüber hinaus eine zusätzliche Population mit einem aberranten Phänotyp (CD1a<sup>+</sup> CD14<sup>+</sup> Zellen) von durchschnittlich etwa 10 %.

Auch für die MFI von CD1a und CD14 zeigte Dasatinib statistisch signifikante Effekte. In den Dichte-Diagrammen („density plots“, Abb. 2B) wie auch den Histogrammen (Abb. 2C) führte Dasatinib in einer Konzentration von 50 nM zu einer signifikanten Modulation der Expression von CD1a und CD14. Die schwarze Kurve repräsentiert die unbehandelten Zellen, die rote Kurve entspricht der korrelierenden, mit 50 nM Dasatinib behandelten Probe.

Für zwei unterschiedliche Monozytenquellen (buffy coats vs. leukocyte reduction chambers) konnte kongruent eine statistisch signifikante Verminderung der MFI von CD1a unter 50 nM Dasatinib (BC p = 0,0272; LRC p = 0,0399) bei Persistenz der MFI für CD14 (BC p = 0,0232; LRC p = 0,0049) nachgewiesen werden (Abb. 5). Diese Experimente

zeigten reproduzierbar, dass Dasatinib in einer Konzentration von 50 nM, die *in vitro* Generierung von moDZ hemmt. Für die niedrigen Dasatinib-Konzentrationen (10 und 20 nM) fand sich hingegen kein signifikanter Effekt.



**Abbildung 5 – Einfluss von Dasatinib auf die moDZ-Generierung aus BCs vs. LRCs**

50 nM Dasatinib führte bei der moDZ-Generierung sowohl aus „buffy coats“ (BCs), als auch aus „leukocyte reduction chambers“ (LRCs) zu einer statistisch signifikant verminderten CD1a-Expression (\* $p = 0,0272$  bzw. \*\* $p = 0,0399$ ), bei simultan verminderten Herabregulation von CD14 (\*\* $p = 0,0232$  bzw. \*\*\*\* $p = 0,0049$ ). Abgebildet werden Median (Linie) und die Einzelwerte der Experimente (Punkte).

### 3.2 Dasatinib induziert den Zelltod im Verlauf der DZ-Kultur

Bei den Experimenten zur moDZ-Generierung wurden durch Selektion über das DZ-Fenster primär vitale Zellen analysiert. Im Kontext der verminderten Generierung von moDZs aus Monozyten stellte sich die Frage, inwiefern diese auf toxischen und/oder pro-apoptotischen Effekten beruht. Dies wurde mittels Annexin V / 7AAD Färbungen ermittelt. Neben der Konzentration spielt bei der Apoptose/Nekrose auch die Kinetik eine wichtige Rolle, weshalb Analysen an Tag 5, 6 und 7 der DZ-Generierung durchgeführt wurden. An Tag 7 erfolgte die Evaluation ohne LPS sowie nach 24h LPS-Behandlung.

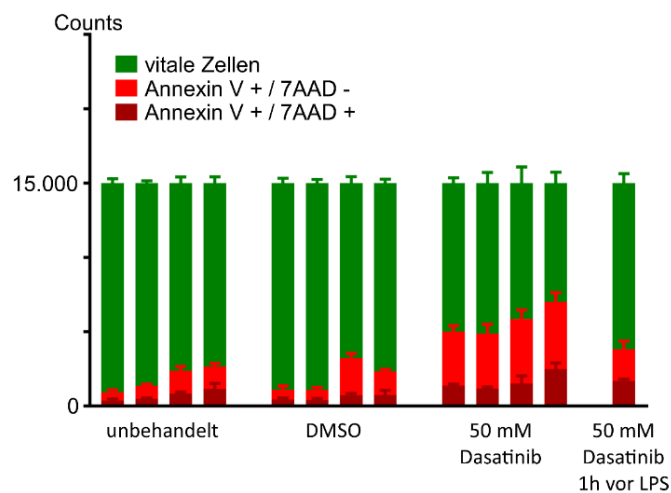


Abbildung 6 - Apoptose / Nekrose

Apoptose- bzw. Nekroseinduktion unter dem Einfluss von 50 nM Dasatinib von  $n = 4$  unabhängigen Experimenten an Tag 5, 6 und 7 (Tag 7 jeweils ohne bzw. mit LPS-Zugabe) bzw. der Kurzzeit-behandelten Proben. Abgebildet werden Mean (Säulen) und SEM (Balken) der vitalen (grün), apoptotischen (Annexin V<sup>+</sup> / 7AAD<sup>-</sup>; hellrot) und spät-apoptotisch/nekrotischen Zellen (Annexin V<sup>+</sup> / 7AAD<sup>+</sup>; dunkelrot).

In vier unabhängigen Experimenten zeigte sich eine signifikante Zunahme apoptotischer Zellen (Annexin V<sup>+</sup> / 7AAD<sup>-</sup>) (Tag 5:  $p = 0,0046$ ; Tag 6:  $p = 0,0255$ ; Tag 7 ohne LPS:  $p = 0,0239$ ; Tag 7 mit LPS:  $p = 0,0336$ ). Auch der Anteil an nekrotischen bzw. spät-apoptotischen Zellen (Annexin V<sup>+</sup> / 7AAD<sup>+</sup>) zeigte sich erhöht, jedoch wurde nur an Tag 5 ( $p = 0,0001$ ) und Tag 6 ( $p = 0,0066$ ) eine statistische Signifikanz erreicht. Erfolgte die Zugabe erst kurz vor LPS-Ausreifung, fand sich keine Steigerung der frühen/späten Apoptose bzw. Nekrose (Apoptose:  $p = 0,2073$ ; Nekrose:  $p = 0,3489$ ).

Für die Gesamttodesrate (Summe aus Annexin V<sup>+</sup> / 7AAD<sup>-</sup> und Annexin V<sup>+</sup> / 7AAD<sup>+</sup> Zellen) konnte eine signifikante Induktion des Zelltodes an Tag 5 ( $p = 0,0019$ ), Tag 6 ( $p = 0,0190$ ) und Tag 7 mit LPS ( $p = 0,0291$ ) nachgewiesen werden. Dasatinib scheint somit bei einer kontinuierlichen Konzentration von 50 nM toxische Effekte auf Monozyten bzw. moDZs zu haben.

### 3.3 Keine Beeinflussung der Endozytose von Dextran-Partikeln

In sechs unabhängigen Experimenten führte weder die Zugabe von 10 nM ( $p = 0,3683$ ) noch 50 nM Dasatinib ( $p = 0,8710$ ) zu einer signifikanten Modulation der Endozytose von FITC-konjugierten Dextran-Partikeln (Abb. 7).

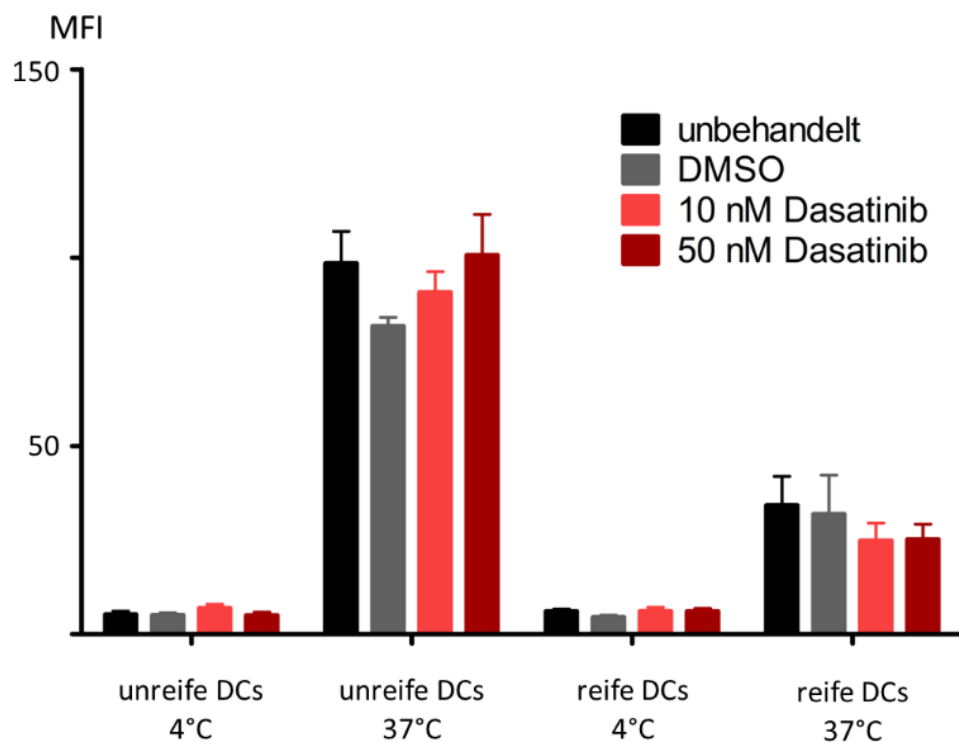
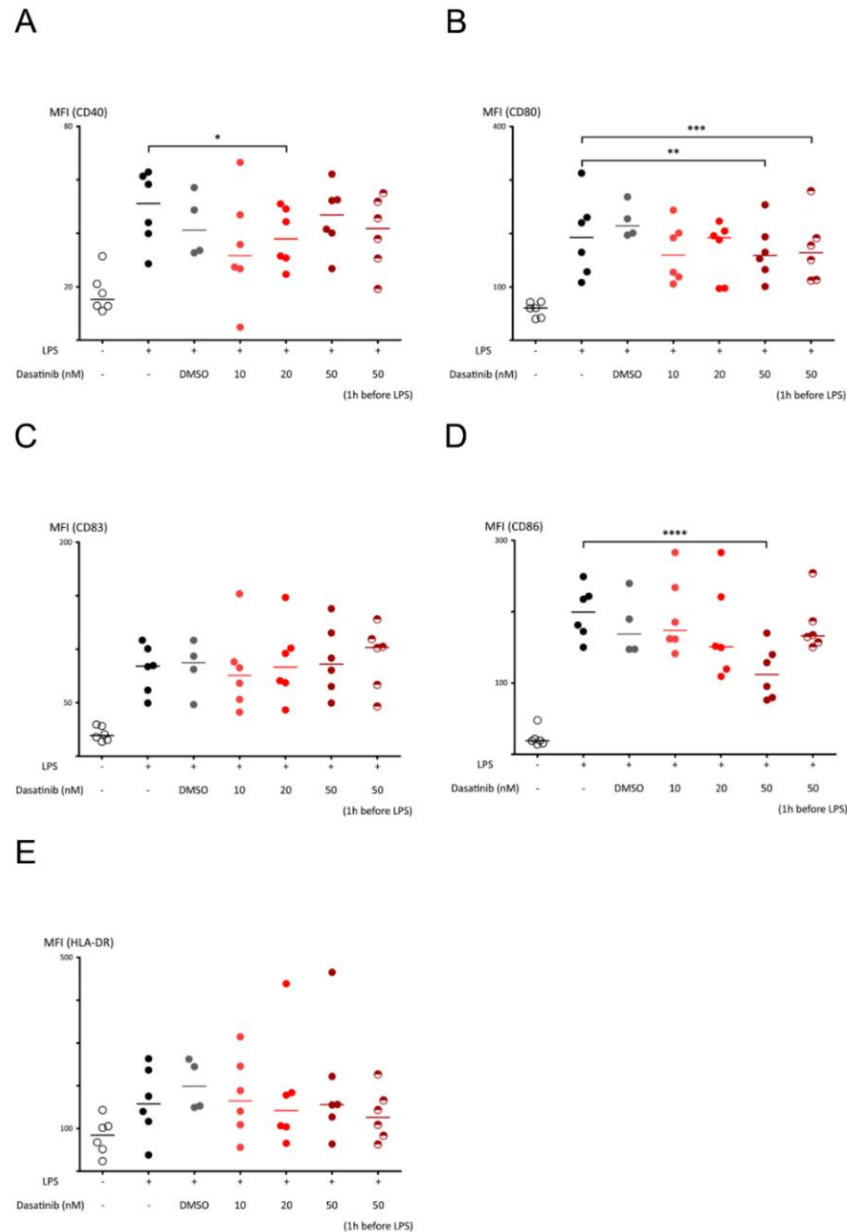


Abbildung 7 - Keine Beeinflussung der Endozytose von Dextranpartikeln unter dem Einfluss von Dasatinib

Endozytose von farbgekoppelten Dextranpartikeln durch iDZs von  $n = 4$  unabhängigen Experimenten unter physiologischen Bedingungen (37°C) inkl. Negativkontrolle (4°C). Abgebildet werden Mean (Säule) sowie SEM (Balken) der einzelnen Versuchsbedingungen. In den durchgeführten Untersuchungen fand sich kein Einfluss von Dasatinib auf die Endozytose von Dextranpartikeln.

### 3.4 Einfluss von Dasatinib auf die costimulatorischen Oberflächenmarker CD40, CD80, CD83, CD86 und HLA-DR



**Abbildung 8 - Dasatinib moduliert die Expression costimulatorischer Moleküle auf modZ**

Abgebildet werden Median (Linie) sowie Einzelwerte (Punkte) der MFI ausgewählter costimulatorischer Moleküle von modZs aus  $n = 6$  unabhängigen Experimenten:

- A: Statistisch signifikant verminderte CD40-Expression (\* $p = 0,0010$ ) für Dasatinib 20 nM.
- B: Statistisch signifikante Reduktion der Expression von CD80 (\*\* $p = 0,0500$  bzw. \*\*\* $p = 0,0233$ ) unter Kurz- und Langzeitbehandlung mit Dasatinib 50 nM.
- C: Keine statistisch signifikante Modulation der CD83 Expression unter Dasatinib.
- D: Konzentrationsabhängiger Effekt von Dasatinib auf die Expression von CD86, mit hochsignifikanter Reduktion unter 50 nM (\*\*\*\* $p < 0,0001$ ).
- E: Keine relevante Modulation der HLA-DR-Expression unter Dasatinib.



Der Einfluss der unterschiedlichen Dasatinib-Konzentrationen auf die Expression costimulatorischer Moleküle wurde durchflusszytometrisch analysiert (Abb. 8).

Nach Zugabe des Reifungsinduktors LPS zeigten die ausgereiften moDZs eine physiologische, signifikant gesteigerte Expression der untersuchten costimulatorischen Oberflächenmarker, verglichen mit den unreifen Zellen (CD40:  $p = 0,0005$ ; CD80:  $p = 0,0041$ ; CD83:  $p = 0,0007$ ; CD86:  $p = 0,0001$ ; HLA-DR:  $p = 0,0057$ ).

Die Expression von CD40 auf reifen DZs wurde von Dasatinib in einer konzentrationsabhängigen Weise beeinflusst (Abb. 8A). Graphisch aufgetragen schien die Inhibition der niedrigsten Dasatinib-Konzentration (10 nM) am stärksten ausgeprägt, jedoch ließ sich nur für die mittlere Konzentration (20 nM) eine statistische Signifikanz ( $*p = 0,0010$ ) bestimmen. Möglicherweise könnte die große Streuung der Einzelergebnisse unter 10 nM Dasatinib ursächlich für die fehlende statistische Signifikanz sein. Für 50 nM Dasatinib, fiel die Inhibition insgesamt am schwächsten aus und erreichte ebenfalls kein signifikantes Niveau ( $p = 0,1154$ ).

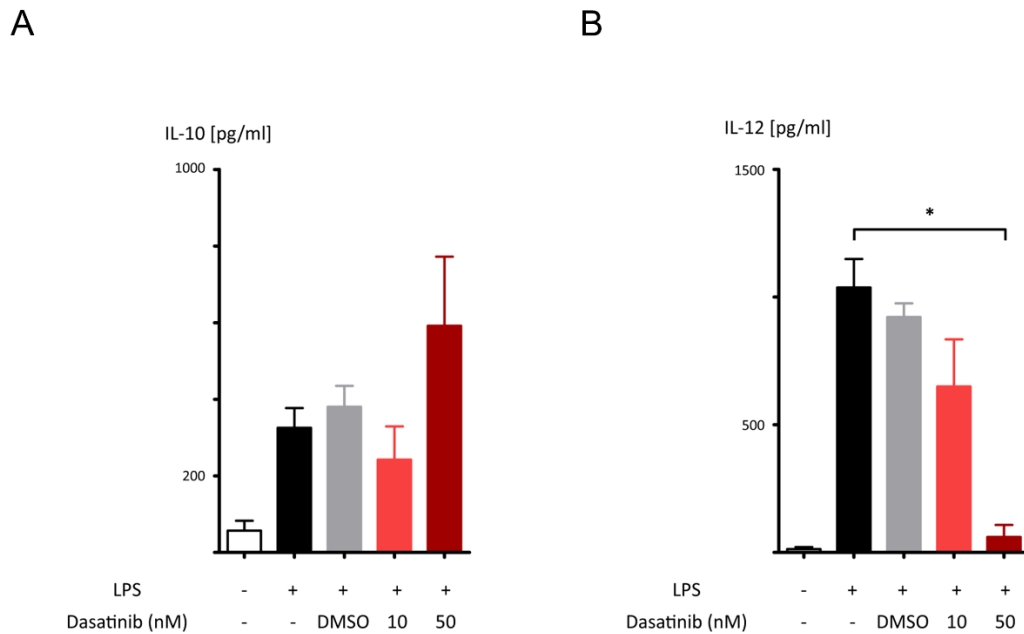
Hinsichtlich der Expression von CD80 konnte unter 50 nM Dasatinib eine signifikante Inhibition berechnet werden (Abb. 8B). Sowohl bei einer Inkubation mit Dasatinib über die gesamte DZ-Kultur (ab Tag 0) ( $**p = 0,0500$ ), als auch nach Zugabe von Dasatinib 1h vor der DZ-Reifung (ab Tag 6) konnte eine signifikante Reduktion der CD80 Expression ermittelt werden ( $***p = 0,0233$ ). Für die niedrige (10 nM;  $p = 0,2574$ ) und mittlere (20 nM;  $p = 0,2047$ ) Dasatinib-Konzentration ergab sich keine statistisch signifikante Modulation.

Keine der verwendeten Dasatinib-Konzentrationen konnte eine statistisch signifikante Modulation der CD83-Expression bewirken (Abb. 8C).

Für die Expression von CD86 zeigte sich unter 50 nM Dasatinib eine hochsignifikante Reduktion ( $****p < 0,0001$ ) (Abb. 8D), allerdings ausschließlich unter Langzeitbehandlung mit Dasatinib (ab Tag 0). Wurde Dasatinib erst 1h vor Ausreifung mit LPS zugegeben ( $p = 0,0873$ ), fand sich analog der niedrigeren Konzentrationen von 10 nM ( $p = 0,7022$ ) oder 20 nM ( $p = 0,1515$ ) keine signifikante Modulation.

Bei den Analysen der Expression von HLA-DR ließ sich für sämtlich verwendete Dasatinib-Konzentrationen keine signifikante Modulation feststellen (Abb. 8E).

### 3.5 Modulation der Interleukin-Produktion



**Abbildung 9 - Modulation der Interleukinkonzentration im Zellüberstand**

Abgebildet werden Mean (Säule) und SEM (Balken) zur Modulation von Interleukinen unter Dasatinib nach 24-stündiger Stimulation mit LPS aus n = 6 unabhängigen Experimenten:

A: Keine statistisch signifikante Modulation der IL-10-Konzentration unter Dasatinib.

B: Konzentrationsabhängiger Effekt von Dasatinib auf IL-12 im Zellüberstand mit einer statistisch signifikanten Verminderung unter Dasatinib 50 nM (\*p = 0,0289).

In allen Experimenten zeigte sich nach 24-stündiger Stimulation mit LPS ein signifikanter Anstieg der IL-10 Konzentration im Überstand ( $p = 0,0030$ ; Abb. 9A). Nach 6-stündiger Stimulation mit LPS konnte noch keine wesentliche Zunahme beobachtet werden (nicht abgebildet). Die Behandlung mit Dasatinib führte weder in der hohen (50 nM,  $p = 0,2712$ ) noch in der niedrigen Konzentration (10 nM,  $p = 0,1336$ ) zu einer statistisch signifikanten Veränderung der IL-10 Sekretion. Die unter 50 nM Dasatinib generierten dendritischen Zellen zeigten nach 24-stündiger LPS-Stimulierung eine Tendenz zu einer stärkeren IL-10-Sekretion, als die unbehandelten bzw. die unter 10 nM Dasatinib generierten moDZs.

Im Gegensatz zur Sekretion von IL-10 zeigte sich hinsichtlich der Konzentration von IL-12 in der unbehandelten Probe bereits eine signifikante Steigerung nach 6 h ( $p = 0,0310$ ; nicht abgebildet) und auch nach 24 h ( $p = 0,0277$ ; Abb. 9B). In Gegenwart von Dasatinib ließ sich für die unter 50 nM Dasatinib generierten moDZs sowohl nach 6 h ( $p = 0,0282$ , nicht abgebildet) als auch nach 24 h ( $p = 0,0289$ ) eine signifikante Inhibition der IL-12-Sekretion im Vergleich zu den unbehandelten Proben nachweisen. Die niedrigere Dasatinib-Konzentration von 10 nM führte ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion der IL-12 Produktion, hier jedoch nur nach 24h ( $p = 0,0310$ ; nicht abgebildet).

### 3.6 Keine Modulation der nukleären Translokation von RelB unter Dasatinib

Unter dem Einfluss von 50 nM Dasatinib zeigte sich im Vergleich zur unbehandelten Probe eine verminderte Translokation von RelB in den Nucleolus der unreifen moDZs ( $p = 0,0199$ ). Dieser Effekt wurde unter Ausreifung mit LPS für 24h nivelliert ( $p = 0,9844$ ).

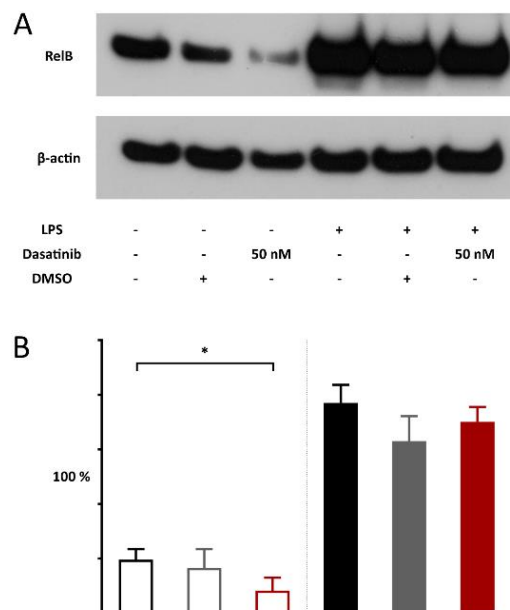
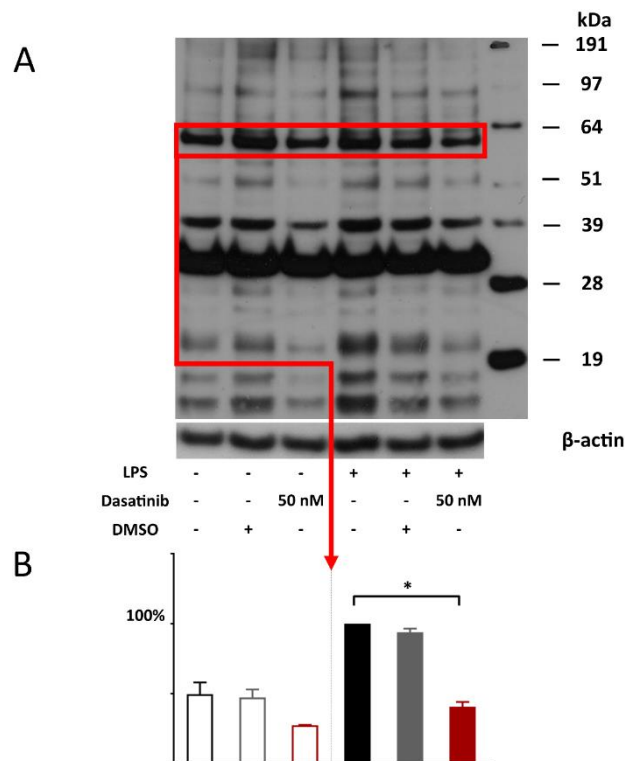


Abbildung 10 - nukleäre Translokation von RelB

- A** Exemplarische Darstellung eines von  $n = 5$  unabhängigen Experimenten zum Einfluss von Dasatinib auf die nukleäre Translokation der NF- $\kappa$ B Untereinheit RelB. Beladungskontrolle mit  $\beta$ -actin. Nach Stimulation mit LPS kam es unter Dasatinib zu keiner relevanten Änderung der Translokation von RelB.
- B** Statistische Auswertung der mit „ImageJ“ analysierten Intensitäten der einzelnen Banden. Abgebildet wird Mean (Säule) und SEM (Balken). Den mittels LPS ausgereiften unbehandelten Proben (schwarzer

Balken) wurde die Intensität 100 % zugeordnet und alle anderen Intensitäten darauf bezogen. Unreife moDZs zeigten unter 50 nM Dasatinib eine signifikant verminderte RelB-Translokation (\*p = 0,0199).

### 3.7 Modulation der LPS-abh. Tyrosin-Phosphorylierung Dasatinib



**Abbildung 11 - Modulation der LPS-abh. Tyrosin-Phosphorylierung unter 50 nM Dasatinib**

- A** Exemplarische Darstellung eines von n = 5 unabhängigen Experimenten zum Einfluss von Dasatinib auf die Tyrosin-Phosphorylierung von Gesamtzelextrakten aus moDZs mit Hilfe der anti-Phosphotyrosin-Antikörper PY20 und PY99. Beladungskontrolle mittels  $\beta$ -actin.
- B** Statistische Auswertung der mit „ImageJ“ analysierten Intensitäten der einzelnen Banden im rot markierten Bereich. Abgebildet wird Mean (Säule) und SEM (Balken). Den mittels LPS ausgereiften unbehandelten Proben (schwarzer Balken) wurde die Intensität 100 % zugeordnet und alle anderen Intensitäten darauf bezogen. Insbesondere im für die SFKs typischen Bereich von ca. 60 kDa ließ sich nach Stimulation mit LPS für 50 nM Dasatinib eine verminderte Tyrosinphosphorylierung nachweisen (p = 0,0034).

Dasatinib adressiert als Multikinaseinhibitor sowohl membrangebundene, als auch nicht-membrangebundene Tyrosinkinasen. Mittels Westernblot analysierte ich das Tyrosinphosphorylierungsmuster der Gesamtzelextrakte von moDZs unter dem Einfluss von Dasatinib.

Abb. 11 zeigt exemplarisch eines von 5 unabhängigen Experimenten, in welchen sich unter 50 nM Dasatinib eine verminderte Tyrosinphosphorylierung von Proteinen unterschiedlicher Molekülmasse nachweisen ließ. Insbesondere im Bereich mit einer Molekülmasse von rund 60 kDa findet sich eine verminderte Tyrosinphosphorylierung. Eine

Reihe der SFKs, welche als potenzielle Zielstrukturen von Dasatinib in moDZs angesehen werden, liegen in diesem Bereich.

## 4 Diskussion

### 4.1 Immunmodulatorische Effekte unter Langzeit-Behandlung mit Dasatinib auf die *in vitro* Generierung von moDZs

Für den Multi-TKI Dasatinib beschrieben zahlreiche *in vitro* Untersuchungen immunmodulatorische Effekte auf Effektorzellen des Immunsystems, wie beispielsweise T- und NK-Zellen (Weichsel et al., 2008; Blake et al., 2008; Schade et al., 2008; Fei et al., 2008; Mustjoki et al., 2009; Kim et al., 2009; Salih et al., 2010; Hassold et al., 2012; Chang et al., 2018). Zusammen mit den zu Imatinib publizierten Daten, die immunmodulatorische Effekte auf moDZs nachweisen konnten (Sato et al., 2003; Appel et al., 2004 & 2005; Boissel et al., 2004), bildeten sie die Rationale zur Analyse der Effekte von Dasatinib auf Generierung und ausgewählten Funktionen von moDZs.

Im Rahmen meiner Arbeit untersuchte ich den Einfluss unterschiedlicher, klinisch relevanter Dasatinib-Konzentrationen auf die Generierung von moDZs (1). Die für unreife moDZs typische Endozytose analysierte ich modellhaft an der Internalisierung von Dextranpartikeln (2). Darüber hinaus evaluierte ich, nach Ausreifung mit LPS, die Expression costimulatorischer Oberflächenmoleküle, sowie exemplarisch je eines immunstimulatorischen (IL-12) und immunsuppressiven (IL-10) Zytokins, deren Zusammenspiel die Aktivierung von Immuneffektorzellen reguliert (3). Nachdem ich potenziell immunmodulierende Effekte von Dasatinib auf wichtige DZ-Funktionen nachweisen konnte, untersuchte ich Dasatinib-assoziierte Änderungen des Tyrosinphosphorylierungsmusters und der nukleären Translokation von RelB, als wichtiger Bestandteil des NF- $\kappa$ B-Signalwegs (4).

**Ad 1:** Bei der Generierung von moDZs aus Monozyten konnte ich bei 50 nM Dasatinib eine verminderte Expression des DZ-typischen Oberflächenmarkers CD1a bei persistierender Expression von CD14 nachweisen. Dabei fand sich zusätzlich eine Population mit einem aberranten Phänotyp (CD1a<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>), welche einen Anteil von ca. 10 % ausmachten.

Konventionelle DZs exprimieren gewöhnlich CD1a in Abwesenheit von CD14 (Collin et al., 2013). Die Expression von CD1a kann *in vitro* durch unterschiedliche Kulturbedingungen beeinflusst werden, wobei eine direkte Korrelation mit der Sekretion von IL-12 nachgewiesen werden konnte (Shinichiro et al., 2012). CD14 wird typischerweise auf Monozyten exprimiert, kann jedoch gelegentlich auch auf DZ-Subtypen nachgewiesen werden (Yin et al., 2017; Villani et al., 2017). In zahlreichen Publikationen wird die Koexpression von CD14 mit einem tolerogenen Phänotyp in Zusammenhang gebracht (Torres-Aguilar et al., 2010) und neben einer gesteigerten IL-10 Sekretion als ein Hauptmerkmal sog. tolerogener DZs angesehen (Kalinski et al., 2009; Pulendran et al., 2010). In einer 2017 von Castiello et al. publizierten DZ-Vakzinierungsstudie bei Prostatakarzinompatienten konnte zwischen der Koexpression von CD14 und einer gesteigerten Sekretion von IL-10 eine direkte Assoziation nachgewiesen werden. Klinisch korrelierte dies mit einem deutlich schlechteren therapeutischen Ergebnis. Die Autoren folgerten, dass dies der Ausdruck eines tolerogenen Phänotyps sein könnte, wofür sie auch ein entsprechendes Genexpressionsmuster nachweisen konnten.

Besonders bei Tumoren im fortgeschrittenen Stadium wurden immunmodulierende Mechanismen beschrieben, die es ihnen ermöglichen, dem Zugriff des Immunsystems zu entgehen bzw. die generierte Immunantwort zu ihrem Vorteil abzuwandeln. In einem Modell des hepatozellulären Karzinoms wurden immunmodulatorische Effekte durch CD14<sup>+</sup> DZs beschrieben. Eine Untergruppe an DZs mit Koexpression von CD14 konnte T-Zell-vermittelte Immunantworten *in vitro* supprimieren (Yanmei et al., 2014). Morphologische und funktionelle Analysen zeigten dabei hohe Übereinstimmungen mit moDZs. Im Gegensatz zu klassischen moDZs, sezernierten diese nach Stimulation mit LPS deutlich mehr IL-10 und inhibierten dadurch die Proliferation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Nach Neutralisierung durch einen monoklonalen IL-10-Antikörper zeigte sich dieser Effekt partiell reversibel.

In einer Untersuchung an Tumorproben von Patientinnen mit serösem high-grade Ovarialkarzinom zeigte sich eine direkte Korrelation zwischen der Anwesenheit von reifen DZs im Tumorumfeld und einem deutlich besseren Gesamtüberleben. Dieser Effekt war unabhängig von der Anwesenheit von CD8<sup>+</sup> T-Zellen, NK-Zellen oder CD20<sup>+</sup> B-Zellen (Truxova et al., 2018).

Die verminderte Expression von CD1a bei persistierender CD14-Expression könnte somit zusammen mit dem aberranten Phänotyp (CD1a<sup>+</sup> CD14<sup>+</sup>) auf eine Generierung von tolerogenen moDZs unter 50 nM Dasatinib *in vitro* hindeuten.

**Ad 2:** Die Endozytose Farb-gekoppelter Dextranpartikeln *in vitro* generierter moDZs wurde in den analysierten Dasatinib-Konzentrationen nicht beeinflusst. In dieser modellhaften Untersuchung der Antigenaufnahme von iDZs fand sich kein Hinweis auf eine relevante Modulation durch Dasatinib.

**Ad 3:** In meinen Analysen hinsichtlich wichtiger Funktionen reifer moDZs konnte ich unter 50 nM Dasatinib eine verminderte Expression von CD80 und CD86, sowie eine verringerte Produktion von IL-12 nachweisen. Für CD40 zeigte sich ein inhibitorischer Effekt für die niedrigen Dasatinib-Konzentrationen, wenn auch die klinische Relevanz aufgrund der großen Streubreite fraglich bleibt. Hierbei ließ sich nur für 20 nM Dasatinib eine statistische Signifikanz berechnen. Die Expression von CD83 und HLA-DR zeigte keine relevante Veränderung unter TKI-Behandlung. Die Sekretion von IL-10 zeigte sich unter 50 nM Dasatinib gesteigert, ohne ein statistisch signifikantes Niveau zu erreichen.

Die Expression costimulatorischer Moleküle stellt, neben der Sekretion bestimmter Zytokine, eine wichtige Stellschraube in der Induktion spezifischer Immunantworten dar. Neben der Koexpression von CD14 und einer vermehrten Sekretion von IL-10, konnte bei tolerogenen DZs auch eine verminderte Expression costimulatorischer Oberflächenmarker (u. a. CD80 und CD86) sowie eine deutlich verminderte Produktion von IL-12 beschrieben werden (Collin et al., 2013; Gregori et al., 2010;).

Ähnliche Veränderungen konnte ich partiell an den unter 50 nM Dasatinib *in vitro* generierten moDZs nachweisen. Dies könnte darauf hinweisen, dass die kontinuierliche Präsenz einer Dasatinib-Konzentration von 50 nM, einen tolerogenen Phänotyp bei *in vitro* generierten moDZs induziert.

Im Kontext von malignen Erkrankungen können derartige Veränderungen unter Umständen fatale Folgen haben. Eine 2018 publizierte SEER-Database-Analyse (Kumar et al., 2018), welche 9.200 CML-Patienten unter TKI-Therapie zwischen den Jahren 2002-2014 untersuchte, fand in dieser Population ein um 30 % erhöhtes Risiko für sekundäre Malignome. Der genaue Zusammenhang blieb zwar unklar, die Autoren verwiesen aber darauf, dass immunsuppressive Effekte der TKIs, u. a. auch auf DZs, eine mögliche Erklärung sein könnten.

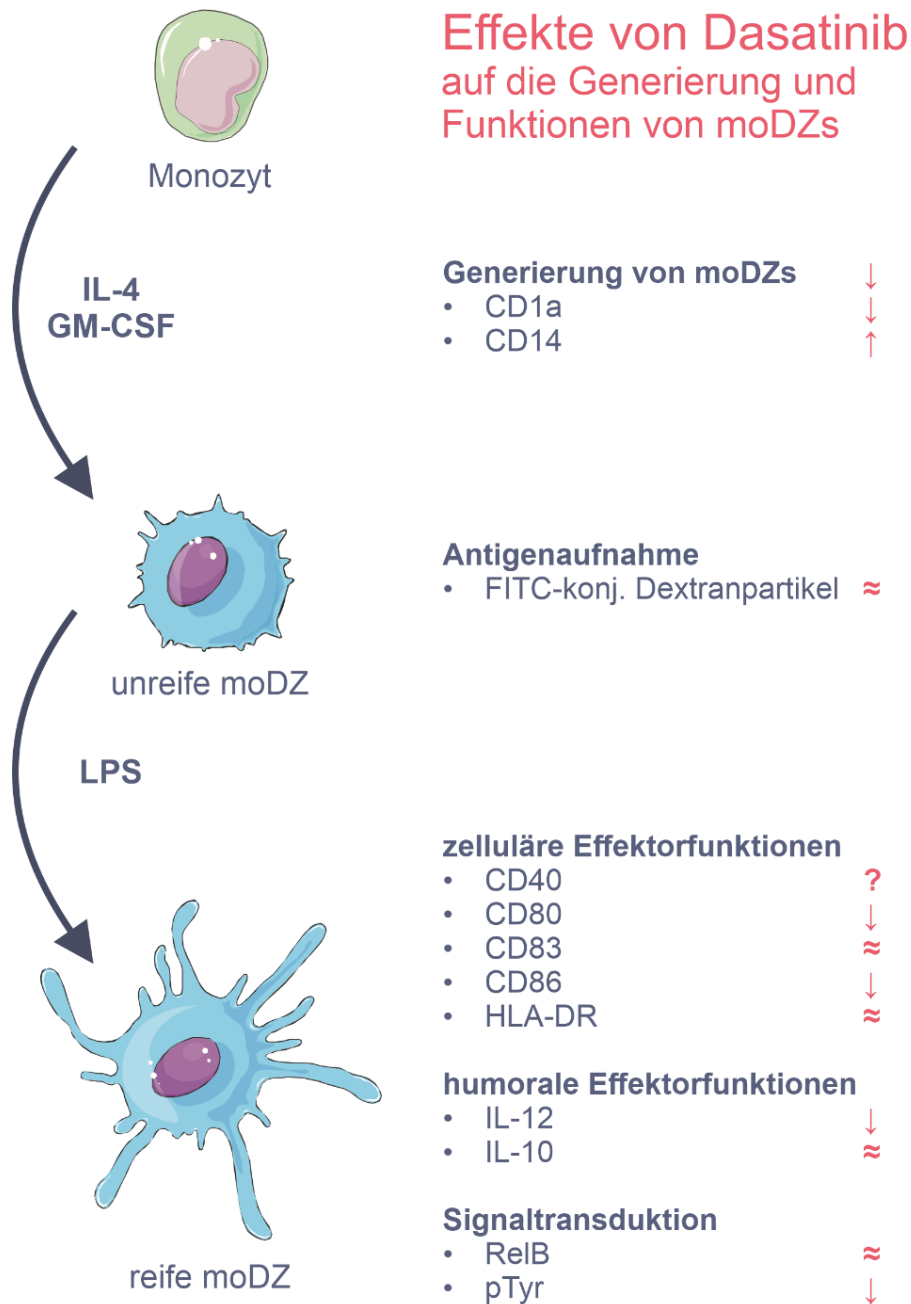
Auch Pathogene nutzen immunmodulierende Strategien. In Zellkultur generierte DZs, von Patienten mit chronischer Hepatitis B, zeigten ebenfalls eine verminderte Expression von CD1a, CD80 und CD83, sowie eine reduzierte Sekretion von IL-12 (Ma et al., 2013).

Andererseits können aber auch erhöhte Spiegel von IL-12 fatale Auswirkungen haben. Bei verschiedenen autoimmun bedingten Krankheitsbildern konnten erhöhte IL-12 Konzentrationen nachgewiesen werden, bspw. bei Psoriasis, atopischer Dermatitis, rheumatoider Arthritis, M. Crohn, primär biliärer Zirrhose, Sarkoidose, systemischem Lupus erythematodes, Multipler Sklerose und GvHD (Teng et al., 2015). In diesem Kontext könnte die Generierung tolerogener DZs einen therapeutischen Ansatz darstellen. Im Mausmodell konnte in diesem Zusammenhang ein positiver Effekt von Dasatinib auf eine Autoimmunarthritis (Guo et al. 2019) und Autoimmunencephalitis (Azizi et al., 2015) nachgewiesen werden. Die Autoren beschrieben dabei eine Verminderung pro-inflammatorischer Zytokine, wie bspw. IL-6 und TNF- $\alpha$ , und eine Steigerung anti-inflammatorischer Zytokine, u. a. von IL-10.

**Ad 4:** Dasatinib verfügt als Multikinaseinhibitor über ein breites Spektrum potenziell therapeutischer Zielstrukturen. Auf DZs werden in diesem Zusammenhang u. a. HCK, FGR und LYN, allesamt SFKs, genannt (Lowell, 2004). In Westernblot-Analysen der Gesamtzell-extrakte von moDZs konnte ich ein vermindertes Tyrosinphosphorylierungsmuster unter Dasatinib beschreiben, insbesondere in dem für SFKs typischen Bereich um 60 kDa (Hck: 59 kDa, Fgr: 56 kDa, Lyn: 56 kDa). SFKs, insbesondere c-Src und Lyn, übernehmen im TLR4-Signalwegs eine wichtige Rolle in der Regulation der Zytokinproduktion. Ihre Hemmung kann eine verminderte Produktion wichtiger Zytokine wie, z. B. IL-12 bewirken (Napolitani et al., 2003; Kuka et al., 2010).

Unter dem Erstgenerations-TKI Imatinib wurde eine verminderte Generierung von moDZs mit einer reduzierten Expression von costimulatorischen Molekülen und von IL-12 nachgewiesen (Appel et al., 2004 & 2005). Auf molekularer Ebene wurde dabei eine verminderte Translokation verschiedener Mitglieder der NF- $\kappa$ B-Familie beschrieben. Nachdem ich ähnliche Effekte auf moDZs beschreiben konnte, stellte sich die Frage, ob sich in Analogie zu Imatinib, eine Modulation der Translokation von RelB nachweisen ließe. Dabei konnte ich unter 50 nM Dasatinib zwar einen inhibitorischen Effekt auf unreife moDZs beschreiben, welcher sich nach Ausreifung mit LPS nicht mehr nachweisen ließ.





**Abbildung 12- Einfluss von Dasatinib auf Generierung und wichtige Funktionen von moDCs**

In den durchgeführten Versuchen fand sich unter 50 nM Dasatinib eine verminderte Generierung von moDCs mit einer reduzierten CD1a-Expression bei Persistenz von CD14. Die Endozytose von Dextranpartikeln wurde nicht moduliert. In Bezug auf zelluläre Effektorfunktionen fand sich eine signifikante Verminderung der Expression von CD80 und CD86. Die Produktion von IL-12 zeigte sich unter 50 nM Dasatinib signifikant reduziert. Auf molekularer Ebene konnte eine verminderte Phosphorylierung von Tyrosinresten nachgewiesen werden. In Bezug auf das NF-κB-Mitglied RelB konnte keine signifikante Modulation nachgewiesen werden.

Die schematischen Abb. der Zellen wurden von Servier Medical Art (SMART; <http://smart.servier.com>) übernommen. SMART ist unter einer Creative Commons Lizenz vom Typ Namensnennung 3.0 Unported zugänglich.

Die von mir beschriebenen, potenziell immunsuppressiven Effekte von Dasatinib auf *in vitro* generierte moDZs (siehe Abb. 12), eröffneten die Frage, inwieweit auch andere grundlegende DZ-Eigenschaften, wie z. B. das Migrationsverhalten, beeinflusst werden und welche molekularen Mechanismen den beschriebenen Effekten zugrunde liegen. Diesen Aspekten widmeten sich im weiteren Verlauf meine Nachfolger, Daniel Jesper und Thomas Nerreter, im Rahmen ihrer medizinischen bzw. naturwissenschaftlichen Dissertationen und der daraus resultierenden gemeinsamen Publikation (Nerreter et al., 2014).

*In vitro* Experimente sind im Vergleich zur Situation *in vivo* eine stark reduzierte Vereinfachung. Inwieweit sich diese Effekte auf das komplexe System eines menschlichen Individuums übertragen lassen, könnte in Cokulturen aus DZs und Immuneffektorzellen, wie T- und NK-Zellen, sowie im *in vivo* Modell, z. B. von Mäusen, weiter evaluiert werden. In zwei unabhängigen Publikationen zu DZ-T-Zell-Effekten unter Dasatinib wurde einerseits eine verminderte Stimulation allogener T-Zellen (Schwarzbich et al., 2011), aber auch eine gesteigerte T-Zell-Antwort auf einen Melanomzellklon (Wölfl et al., 2013) beschrieben.

Pharmakokinetische Analysen zeigten für Dasatinib vergleichsweise kurze Plasmahalbwertszeit von unter 4h (Levêque et al., 2020). Im Rahmen der Zulassung erfolgt die Einnahme von Dasatinib als tägliche Einmalgabe, so dass hier von einem Dosisgefälle auszugehen ist. Bei CML-Patienten, die mit Dasatinib behandelt wurden, konnte innerhalb von 4-8h nach Einnahme der Medikation ein Abfall der Plasmakonzentration auf Werte unter 5 nM nachgewiesen werden (Shah et al., 2008). Im Kontext von *in vitro* Untersuchungen zur CAR-T-Zell Therapie konnte für Dasatinib ein inhibitorischer Effekt auf überschießende Immunität beschrieben werden (Weber et al., 2018; Mestermann et al., 2019). In diesem Zusammenhang postulierten die Autoren, dass eine intermittierende und oder niedrig dosierte Dasatinib-Gabe einerseits immuninhibitorische Effekte zeigt, ohne dabei aber die anti-leukämische Wirksamkeit zu supprimieren. Auch im Rahmen der moDZ-Generierung zeigt sich abhängig vom Zeitpunkt der Dasatinib-Zugabe ein inhibitorischer Effekt (s. Kap. 4.2). Inwiefern veränderte pharmakokinetische Änderungen die immunmodulatorischen Eigenschaften von Dasatinib beeinflusst, sollte daher weiter untersucht werden

## 4.2 Immunmodulatorische Effekte von Dasatinib auf DZs *in vitro* und *in vivo* – eine Zusammenfassung der aktuellen Literatur

TKI-Therapien erreichen als zielgerichtete onkologische Strategie beeindruckende Erfolge bei vergleichsweise geringen unerwünschten Nebenwirkungen. Zahlreiche onkogene Signalwege, die durch TKIs moduliert werden, spielen auch bei der Regulierung von Proliferation und Differenzierung verschiedener Immunzellen eine wichtige Rolle. Dasatinib kann im Vergleich zu anderen BCR/ABL-Inhibitoren ein breiteres Spektrum an Tyrosinkinasen inhibieren, welche u. a. wichtige Funktionen in DZs regulieren. Inwieweit dies Auswirkungen auf spezifische DZ-Funktionen hat, untersuchten neben uns auch andere Arbeitsgruppen.

### 4.2.1 Effekte von Dasatinib auf humane DZ-Subgruppen *in vitro*:

Im Rahmen einer pubmed-Recherche (Stand: Dezember 2020) konnte ich vier publizierte *in vitro* Arbeiten zum Einfluss von Dasatinib auf humane DZs identifizieren. Neben moDZs (Schwarzbich et al., 2011; Nerreter et al., 2014) und slan<sup>+</sup> bzw. CD1c<sup>+</sup> DZs (Wöfl et al., 2013) wurden auch Effekte auf pDZs analysiert (Fujita et al., 2013).

Wie Abb. 10 zusammenfasst, wurden unter klinisch relevanten Dasatinib-Konzentrationen (10-100 nM) überwiegend (immun-)inhibitorische Effekte auf DZs beschrieben. Erfolgte die Zugabe von Dasatinib ab Beginn der DZ-Zellkultur, fand sich darüber hinaus auch eine Hemmung der DZ-Generierung mit einer reduzierten Expression von CD1a sowie einer partiellen Persistenz von CD14 (Schwarzbich et al., 2011).

In Bezug auf die Expression costimulatorischer Moleküle zeigte sich kein einheitlicher Effekt, wobei insgesamt eine leicht verminderte Expression beschrieben wurde (Schwarzbich et al., 2011; Wöfl et al., 2013). Nachdem in unserer Arbeitsgruppe eine Versuchsmodifikation vorgenommen wurde (Zugabe von Dasatinib 24h vor Ausreifung mit LPS vs. ab Beginn der Zellkultur in meinen Versuchen) konnte nunmehr nur noch eine signifikant verminderte Expression von CD86 auf moDZ unter 50 nM Dasatinib nachgewiesen werden (Nerreter et al., 2014).

In den publizierten Untersuchungen konnten für verschiedene Dasatinib-Konzentrationen inhibitorische Effekte auf unterschiedliche Zytokine beschrieben werden. Hierbei zeigte sich auch eine gewisse Abhängigkeit des Ergebnisses von dem verwendeten

Reifungsinduktor. Fujita et al. konnten unter Dasatinib eine konzentrationsabhängige Hemmung verschiedener Mediatoren nach Aktivierung von pDZs durch TLR7-Agonisten nachweisen. Die Stimulation mit CpG-A führte ab einer Konzentration von 10 nM Dasatinib zu einer verminderten Sekretion von TNF- $\alpha$  und IL-6. Die Zugabe des Reifungsstimulus CpG-B bewirkte eine verminderte Sekretion von INF $\alpha$  und TNF- $\alpha$ , allerdings erst ab einer Konzentration von 100 nM, ohne die Sekretion von IL-6 zu beeinflussen. Nach Stimulation mit dem Influenzavirus zeigte sich eine reduzierte Freisetzung von INF $\alpha$ . Bei moDZs bewirkte die Zugabe von 50 nM Dasatinib eine verminderte Sekretion von IL-12 nach Stimulation mit LPS (Nerreter et al., 2014). Wurde zusätzlich zu LPS auch IFN $\gamma$  zugegeben, konnte eine gesteigerte IL-12-Sekretion nach TLR2- und TLR4-Stimulation nachgewiesen werden (Wöfl et al., 2013). Dieser Effekt ließ sich nicht reproduzieren, wenn die Reifung mit IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  und Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) induziert wurde. IFN $\gamma$  wird im Kontext eines inflammatorischen Umfelds v. a. durch die Effektorzellen des Immunsystems, vornehmlich T- und NK-Zellen, sezerniert und nimmt eine positive Feedback-Funktion in der Verstärkung einer Th1-Antwort ein (de Jong et al., 2015; Wehner et al., 2011). Insbesondere für die Sekretion von IL-12 durch DZs wurde ein stimulatorischer Effekt von IFN $\gamma$  beschrieben (Kalinski et al., 2009).

Schwarzbich et al. (2011) konnten auf molekularer Ebene unter Dasatinib eine Überexpression von Osteoactivin in den moDZs nachweisen. Osteoactivin ist ein Glykoprotein, welches neben Osteoklasten und Makrophagen auch auf DZs exprimiert wird und eine essenzielle Rolle in der Hemmung von T-Zellen durch APZs spielt (Chung et al., 2007 & 2009). Bei DZ-T-Zell-Kulturen ging dies mit einer Verminderung der T-Zell-Stimulation in MLRs einher. Durch einen Osteoactivin-Antikörper konnte dieser Effekt nicht nur aufgehoben werden, sondern es zeigte sich sogar eine Verdoppelung der T-Zell-Proliferation (Schwarzbich et al., 2011).

Für Dasatinib wurde ferner eine mehr als verdoppelte Frequenz an moDZs beschrieben, welche entlang eines CCL19-Gradienten migrierten (Nerreter et al., 2014). Auf molekularer Ebene konnte hierbei eine Dephosphorylierung von SFKs nachgewiesen werden, welche nachfolgend eine komplette Dephosphorylierung von Siglec-9 und Siglec-3 bewirkten. Basierend auf diesen Daten wurde für diesen Signalweg eine wichtige regulatorische Funktion auf das Migrationsverhalten von moDZs postuliert.

Die Reifung entsprechender DZ-Subgruppen über unterschiedliche TLR-Agonisten bedingt die Translokation bestimmter Transkriptionsfaktoren, wie bspw. NF- $\kappa$ B und IRF7, welche wiederum die Sekretion proinflammatorischer Zytokine regulieren (Gomard et al.,

2010; Kaisho et Tanaka, 2008). Fujita et al. (2013) beschrieben bei pDZs eine reduzierte Translokation von IRF7 und NF- $\kappa$ B, welche mit einer verminderten Sekretion proinflammatorischer Zytokine (u. a. IFN $\alpha$ , TNF- $\alpha$  und IL-6) einherging. Wöfl et al. (2013) konnten bei moDZs eine Steigerung der NF- $\kappa$ B-Aktivität nach kombinierter Stimulation mit LPS und IFN $\gamma$  zeigen, welche mit einer vermehrten Produktion von IL-12 korrelierte.

	Schwarzbich et al. 2011	Fujita et al. 2013	Wöfl et al. 2013	Nerretter et al. 2014
DZ-Subtyp	humane moDZ Plastikadhärenz	humane pDZ FACS-Sorter	slan+ DZs, CD1c+ DZs, CD14+ Monozyten Miltenyi isolation kits	humane moDZ Plastikadhärenz
Zellkultur	R10-Medium 100 ng/ml GM-CSF 20 ng/ml IL-4 jeden 2. Tag	R10-Medium	Cellgenix DC Medium GM-CSF IL-4	R10-Medium 100 ng/ml GM-CSF 20 ng/ml IL-4
Reifung	100 ng/ml LPS Tag 6	CpG-A, CpG-B, Influenzavirus	LPS + IFN $\gamma$	1 $\mu$ g/ml LPS Tag 6
Dasatinibzugabe	10 / 20 / 50 nM ab Tag 0	1h vor Reifung	zur DZ-Reifung	10 / 50 nM Tag 5
DZ-Generierung	CD14 $\uparrow$ CD1a $\downarrow$			
costim. Moleküle	kein einheitlicher Effekt auf CD80/CD86/DC- SIGN/CCR7	> CpG-A: CD86 $\downarrow$ > CPG-B: CD86 $\approx$	CD40/CD54/CD80/ CD83/CD86/HLA-DR	CD86 $\downarrow$
Zytokine		> CpG-A: ab 10 nM INF $\alpha$ /TNF- $\alpha$ /IL-6 $\downarrow$ > CpG-B: ab 100 nM INF $\alpha$ /TNF- $\alpha$ $\downarrow$ , IL-6 $\approx$ > Influenza virus: IFN- $\alpha$ $\downarrow$ > INF- $\alpha$ $\downarrow$ bei CML- Patienten	> INF $\gamma$ : TLR2, TLR4: IL-12 $\uparrow$ TLR3/7/8: IL-12 $\approx$  > IL-1 $\beta$ /TNF $\alpha$ /PGE2: IL-12 $\approx$	IL-12 $\downarrow$
DZ-T-Zell-Effekt	$\downarrow$ Stimulation allogener T-Zellen		T-Zell-Antwort auf Melanomzellreihe FM55 $\uparrow$	
molekularer Mechanismus	Expression von Osteoactivin $\uparrow$	CpG-A: $\downarrow$ Translokation IRF7 und NF- $\kappa$ B	phospho-I $\kappa$ B $\alpha$ / $\beta$ $\uparrow$ I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteinexpr. $\downarrow$ $\rightarrow$ NF- $\kappa$ B Aktivität $\uparrow$	komplette De- phosphorylierung von Siglec-9 und 3
Sonstiges			kein Effekt bei DZs von Mäusen bzw. Makaken	Migration entlang CCL19 Gradient $\uparrow$ (verdoppelt bei 50 nM)

Abbildung 13 – *in vitro* Effekte von Dasatinib auf humane moDZs

Datenextraktionstabelle einer Literaturrecherche (Stand: Dezember 2020) zu immunmodulatorischen Effekten von Dasatinib auf humane moDZs *in vitro*. Hierbei zeigt Dasatinib in klinisch relevanten Konzentrationen überwiegend inhibitorische Effekte auf wichtige DZ-Funktionen.

#### 4.2.2 Effekte von Dasatinib auf murine KM-DZs *in vivo*:

Murine DZs, die aus Knochenmarkszellen generiert werden (KM-DZs), zeigen große Ähnlichkeiten zu humanen moDZs und werden von einigen Autoren als funktionelle Homologe angesehen (Xu et al., 2007; Segura et al. 2013; Anderson et al., 2018). Es wäre vermessen, diese Ergebnisse aus Untersuchungen zu murinen KM-DZs uneingeschränkt auf das humane System zu übertragen, jedoch erschwert die geringe Präsenz der DZ-Subgruppen im peripheren Blut *in vivo* Analysen im Menschen. Inwieweit Dasatinib bei Mäusen *in vivo* immunmodulatorische Effekte auf KM-DZs zeigt und wie sich dies auf das Zusammenspiel mit anderen Immuneffektorzellen auswirkt, überprüften mehrere Arbeitsgruppen. In einer pubmed-Literaturrecherche (Stand: Dezember 2020) ließen sich diesbezüglich vier relevante Publikationen identifizieren, deren Ergebnisse Abb. 13 zusammenfasst. Drei Veröffentlichungen arbeiteten dabei mit C57BL/6 Mäusen. Diese zeichnen sich durch ihre Immunogenität aus, da sie ursprünglich für Untersuchungen zu Krebs und Immunantworten gezüchtet wurden (Song et Hwang, 2017). Hu und Kollegen (2016) untersuchten die Effekte an homo- und heterozygoten Itgam-knockout-Mäusen, welche eine Defizienz von CD11b aufweisen. Sie sind anfälliger für Autoimmunität und werden daher u. a. als Modell für chronisch entzündliche Darmerkrankungen verwendet. Sie zeigen eine erhöhte TNF- $\alpha$ -Produktion bei erniedrigter IL-10-Expression (Hu et al., 2016). Die Generierung von KM-DZs erfolgte kongruent aus KM-Vorläuferzellen, entweder mit Hilfe von GM-CSF/IL-4 (Lowe et al., 2014; Hu et al., 2016; Chu et al., 2020) oder PGE2 (Sundberg et al., 2014).

Lowe et al. untersuchten die Auswirkung von Dasatinib (orale Applikation von 0,1 mg/Tag), sowie eines genetisch modifizierten DZ-Vakzins, auf das Tumorstadium von Melanom-Zellen MO5 (B16.OVA). Zur Herstellung des DZ-Vakzins wurden dabei zunächst murine KM-DZs generiert, welche anschließend mit einem Adenovirus-Vektor für murines IL12p70 transfiziert und mit OVA257-264 Peptid beladen wurden. Hierbei konnte nach Dasatinib-Behandlung oder DZ-Vakzinierung eine signifikante Reduktion von CD4+ T-Helferzellen bei signifikanter Steigerung zytotoxischer CD8+ T-Zellen und CD11c+ DZs im Tumorumfeld nachgewiesen werden. Die Kombination von Dasatinib und DZ-Vakzin konnte diesen Effekt potenzieren, was in einer signifikant reduzierten Tumormasse resultierte. Dasatinib schien eine Verstärkung der Vakzinierung über verschiedene immunologische Effekte zu bewirken, u. a. über eine Verminderung immuninhibierender Zellen (myeloiden Suppressorzellen (MDSZs) und Tregs), aber auch über eine Steigerung wichtiger Immuneffektorzellen (CD8+ T-Zellen und CD11c+ DZs). Daneben

wurde auch eine Steigerung proinflammatorischer Mediatoren (u. a. IFN $\gamma$ , CXCL9, CXCL10 und CXCL11) beschrieben. Die simultane Anwendung von Dasatinib mit der Vakzinierungstherapie förderte die Rekrutierung von DZs mit einer gesteigerten Produktion von IL-12 und einer verminderten Freisetzung von IL-10.

Chu et al. (2020) analysierten den Einfluss von Dasatinib auf DZ-T-Zell-Interaktionen im Rahmen DZ-basierter onkologischer Immuntherapien. Unter Dasatinib konnten sie bei murinen KM-DZs eine leicht reduzierte Expression costimulatorischer Oberflächenmarker (CD40, CD80, CD86 und MHC II) nach Stimulation mit LPS und IFN $\gamma$  nachweisen. Wurden die vorbehandelten DZs mit allogenen T-Zellen in Co-Kultur gebracht, führte dies zu einer signifikant gesteigerten Produktion von IFN $\gamma$ . Nach Zugabe Dasatinib-vorbehandelter DZs konnten sie bei mit B16.OVA Melanomzellen beimpften Mäusen eine Reduktion der Tumorgröße nachweisen. Die zusätzliche Applikation von T-Zellen konnten diesen Effekt nochmals verstärken. Mäuse mit Dasatinib-vorbehandelten KM-DZs zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe höhere Frequenzen von Effektor-T-Zellen bei einer Reduktion von Tregs und MDSZs. Auf molekularer Ebene konnte dabei eine verminderte Phosphorylierung von IDO1, Src, Lyn, Fyn und Akt nachgewiesen werden.

Im Kontext von entzündlichen Darmerkrankungen übernimmt IL-10 eine zentrale Rolle (Jostins et al., 2012). Sundberg et al. analysierten an murinen DZs den Einfluss von mehr als 150 Substanzen, auf ihre IL-10 modulierenden Eigenschaften. Dabei identifizierten sie Dasatinib als den effizientesten und stärksten Stimulator der IL-10-Sekretion. Parallel beschrieben sie eine Reduktion proinflammatorischer Mediatoren, wie beispielsweise IL-12. Auf molekularer Ebene konnten sie hierbei einen Zusammenhang zwischen der Produktion von IL-10 und der Hemmung von SIK1 und SIK2 nachweisen. SIKs („Salt-inducible kinases“) sind eine Subgruppe von Serin-Threonin-Kinasen. Ihre Hemmung führt bei myeloiden Zellen zu einer verminderten Produktion pro-inflammatorischer Zytokine (u. a. TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-12) und Steigerung der IL-10-Expression nach Behandlung mit TLR-2- und TLR-4-Agonisten (Lombardi et al., 2016).

Auch Hu et al. (2016) beschrieben Effekte von Dasatinib auf die Freisetzung pro- und anti-inflammatorischer Zytokine. In der Darmschleimhaut homozygoter Itgam-knockout-Mäuse konnten sie nach peritonealer Applikation von Dasatinib eine, im Vergleich zu den heterozygoten Nachkommen, erniedrigte Expression der IL-10-mRNA nachweisen. Als potenziellen Pathomechanismus beschrieben die Autoren in diesem Kontext eine CD11b-vermittelte Aktivierung von Src, welche mit einer Hemmung des NF- $\kappa$ B-Signalweges einherging.

	Lowe et al. 2014	Sundberg et al. 2014	Hu et al. 2016	Chu et al. 2020
DZ-Subtyp	C57BL/6 Mäuse KM-DZs	C57BL/6 Mäuse KM-DZs	Itgam-knockout- Mäuse KM-DZs	C57BL/6 Mäuse KM-DZs
Zellkultur	(rm)GM-CSF (rm)IL-4	PGE2 2 Tage vor Reifung	R10-Medium 20 ng/ml GM-CSF 10 ng/ml IL-4	R10-Medium (rM)GM-CSF
Reifung	Kombination mit genet. mod. IL-12 überexpr. DZ-Vaktin	Zymosan LPS	100 ng/ml LPS	1 ng/ml LPS 1 ng/ml IFN $\gamma$ für 24h
Dasatinibzugabe	0,1 mg/Tag oral	24h vor Reifung	15 mg/kg tgl. peritoneal	24h vor den Versuchen
costim. Moleküle				CD40/CD80/ CD86/MHC II ↓
Zytokine	IFN $\gamma$ ↑	IL-10 ↑ IL-12 & TNF- $\alpha$ ↓	IL-10 ↓	TNF- $\alpha$ ≈
DZ-T-Zell-Effekt				IFN $\gamma$ ↑ hemmen B16 Tumorwachstum
molekularer Mechanismus	Hemmung von c-kit in MDSZs	Hemmung von SIK2	Hemmung des Src-Akt-Signalwegs mRNA IL-10 ↓ mRNA TNF- $\alpha$ ↑	Phosphoryl. ↓ IDO1 Src Lyn Fyn Akt
Sonstiges	im Tumor: zytotox. T-Zellen ↑ DZs ↑			im Tumor: T-Zellen ↑ Treg ↓ MDSC ↓

**Abbildung 144 – immunmodulatorische Effekte von Dasatinib auf murine DZs *in vivo***

Datenextraktionstabelle einer Literaturrecherche (Stand Dezember 2020) zu immunmodulatorischen Effekten von Dasatinib auf murine KM-DZs *in vivo*.

Entgegen den überwiegend immuninhibitorischen Effekten der *in vitro* Analysen an humanen DZs, konnten die *in vivo* Experimente im Mausmodell mehrheitlich immunstimulatorische Effekte an DZs nachweisen. Die potenziell inhibitorischen Effekte die Sundberg und Kollegen (2014) beschrieben, könnten durch ein diskrepantes DZ-Generierungsprotokoll unter Hinzunahme von PGE<sub>2</sub>, einem Entzündungsmediator, bedingt sein. Dies unterstreicht die Hypothese, dass die Anwesenheit bestimmter Mediatoren, in Abhängigkeit des vorherrschenden immunologischen Milieus, einen wesentlichen Faktor für die durch Dasatinib vermittelten Effekte auf DZs darstellt.



### 4.3 Immunmodulation unter Dasatinib im klinischen Kontext

Als „Wächter des Immunsystems“ übernehmen DZs eine zentrale Stellung im Immunsystem. Unter den PBMCs im peripheren Blut stellt ihre Gesamtheit mit max. 2 % nur eine sehr kleine Population dar (Draxler et al., 2017). Die Aufteilung in unterschiedliche Subtypen mit spezifischen Funktionen, wie bspw. die moDZs, erschweren genauere Analysen beim Menschen *in vivo* nochmals.

Dasatinib verfügt als sog. Multikinaseinhibitor über ein Wirkspektrum, welches neben der zugelassenen Behandlung der BCR-ABL-pos. CML und ALL, auch im Kontext anderer klinischer Anwendungen von Interesse ist. Nachfolgend sollen immunmodulierende Effekte von Dasatinib im Rahmen aktueller Studien, insbesondere vor dem Hintergrund einer Beteiligung/Beeinflussung von DZs, diskutiert werden.

#### 4.3.1 Dasatinib-induzierte LGL-Expansion bei CML-Patienten korreliert mit tieferem molekularem Ansprechen – ein Schritt Richtung Langzeitremission/Heilung?

Entgegen den überwiegend inhibitorischen Effekten von Dasatinib auf Immunzellen *in vitro* machten Mustjoki et al. (2009) die bahnbrechende Entdeckung, dass Dasatinib bei einem Teil der untersuchten CML-Patienten einen immunstimulatorischen Effekt im Sinne einer LGL-Expansion bewirkte. Dabei konnte eine Zusammensetzung aus zytotoxischen Zellen, u. a. CD8<sup>+</sup> T-Zellen,  $\gamma\delta$ T-Zellen und NK-Zellen, nachgewiesen werden. Nachfolgend wurden diese Beobachtung durch weitere Arbeitsgruppen bestätigt (u. a. Kim et al., 2009; Nagata et al., 2010; Lee et al., 2011; Tanaka et al., 2012) und es fand sich eine positive Korrelation der LGL-Expansion mit einem tiefen molekularen Therapieansprechen (Hughes et al., 2017). Je nach Studie fand sich eine LGL-Expansion bei 27 bis 73 % der mit Dasatinib behandelten CML-Patienten (Qui et al., 2014), wobei dieser Effekt eine Dosisabhängigkeit zeigte und durch keinen anderen TKI hervorgerufen werden konnte. Einige Autoren postulierten einen Zusammenhang mit vorausgegangenen Immunreaktionen gegenüber CMV (Kreuzman et al., 2010 & 2011), da sich für die NK-Zell-Expansion eine hohe Assoziation mit einer CMV-Seropositivität nachweisen ließ (Ishiyama et al., 2017). Ursächlich könnte hierbei eine subklinische CMV-Reaktivierung sein, welche der Leukämie und der Dasatinib-Behandlung vorausging (Kadowaki et al., 2017).

CML-Patienten, die mit Dasatinib behandelt wurden, zeigten erhöhte Frequenzen bestimmter NK-Subpopulationen (El Missiry et al., 2016), welche eine gesteigerte Reaktivität aufwiesen (Hayashi et al., 2012). Dies wurde insbesondere bei Patienten in majorer molekularer Remission (MMR) gehäuft beobachtet und als Rekonstitution der NK-Funktion gedeutet, welche initial durch die CML kompromittiert war (Hughes et al., 2017). In Bezug auf das T-Zell-Kompartiment zeigten mit Dasatinib behandelte Patienten eine Steigerung sowohl der Frequenzen, als auch der absoluten Zahlen der  $\gamma\delta$ -T-Zellen sowie eine Verminderung der Tregs (Rohon et al., 2010), was ebenfalls auf eine gesteigerte Immunität schließen lässt.

Bei bestimmten CML-Patienten konnte eine therapiefreie Remission (TFR) trotz TKI-Unterbrechung nachgewiesen werden. Hierfür wurde eine TKI-induzierte, gesteigerte vermutlich NK-Zell-getriggerte antileukämische-Immunität postuliert (Kimura, 2016). Dieser durchschlagende Therapieerfolg eröffnete die Frage, ob nach Erreichen einer tiefen molekularen Remission (DMR) die Therapie möglicherweise unterbrochen bzw. sogar abgesetzt werden könnte. Hierauf folgten zahlreiche Diskontinuationsstudien, u. a. die DADI-Studie (Okada et al., 2018; Kimura et al., 2020), in welchen nachgewiesen wurde, dass eine Steigerung von NK-Zellen und CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit einer besseren TFR korreliert (Jo et al., 2018). Parallel fand sich bei Patienten mit verminderten Treg-Frequenzen auch ein geringeres Rezidivrisiko (Takaku et al., 2018)

Rohon und Kollegen (2010) beschrieben dabei als einzige Arbeitsgruppe Effekte auf einzelne DZ-Subgruppen unter den verschiedenen TKIs, wobei es insgesamt große interindividuelle Schwankungen gab und einige Patienten keine messbaren Werte zeigten. In Knochenmark wie auch peripherem Blut fand sich im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe sowohl bei Diagnose wie auch unter Dasatinib-Therapie ein verminderter Anteil an cDZ1. Der signifikant verminderte Anteil an cDZ2 zu Beginn der CML-Diagnose regenerierte sich unter Dasatinib im Gegensatz zu anderen TKIs nicht. Auch in Bezug auf die pDZ blieb diese Erholung unter Dasatinib aus.

Zusammenfassend lässt die Steigerung wichtiger Effektorzellen, wie NK- und  $\gamma\delta$ -T-Zellen sowie die Verminderung der immuninhibitorischen Tregs unter Therapie mit Dasatinib bei den untersuchten CML-Patienten auf eine gesteigerte Immunogenität schließen, welche mit einer besseren Krankheitskontrolle korreliert. In Bezug auf die DZs zeigt sich unter Behandlung mit Dasatinib, im Gegensatz zu den anderen TKIs keine Rekonstitution. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte auf der breiteren Inhibition von Tyrosinkinasen, wie z. B. den SFKs, durch Dasatinib beruhen.

#### 4.3.2 Dasatinib im Kontext der allogenen Transplantation (alloSZT)

Als Schnittstelle zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem nehmen DZs auch eine kritische Stellung in der Pathophysiologie des gewünschten Transplantat-gegen-Leukämie („graft versus leukemia“, GvL) und des gefürchteten Transplantat-gegen-Wirt („graft versus host disease“, GvHD) Effektes ein (Blazar et al., 2012; Ferrara et al., 2009; Shlomchik et al., 2007). Hierbei wurde sowohl für DZs des Spenders, als auch des Empfängers, eine relevante Rolle beschrieben (Shlomchik et al., 1999; Teshima et al., 2002; Matte et al., 2004). Akute und chronische GvHD (aGvHD bzw. cGvHD) sind häufige Komplikationen der alloSZT, welche in ihren klinischen Symptomen und den zugrunde liegenden Pathomechanismen Überschneidungen mit Autoimmunerscheinungen zeigen und zahlreiche Organe in typischem Muster betreffen (Ferrara et al., 2009).

In einem Fallbericht von Breccia et al. (2009) vermuteten die Autoren immun-modulatorische Effekte von Dasatinib auf die cGvHD einer Patientin nach haploidenter SZT. Die Behandlung eines Imatinib-resistenten CML-Rezidivs mit Dasatinib bewirkte simultan auch eine Besserung der synchron bestehenden cGvHD der Leber.

Eine Analyse von 28 Patienten, die vor alloSZT einen TKI der zweiten Generation (Dasatinib oder Nilotinib) erhielten, konnte keinen relevanten Unterschied im Auftreten der venösen okklusiven Leberkrankheit (VOD, „veno occlusive disease“), einer gefürchteten Komplikation nach alloSZT, nachweisen. Im Vergleich zu Imatinib wurde dabei jedoch eine gering niedrigere aGvHD-Rate beschrieben (Piekarska et al., 2015). Eine Subgruppen-Analyse zwischen den Patienten, die Dasatinib bzw. Nilotinib erhielten, wurde nicht durchgeführt.

Bei einer kleinen Kohorte von 9 Ph<sup>+</sup> ALL Patienten, die nach alloSZT eine Dasatinib-Behandlung erhielten, konnte bei 6 Patienten eine LGL-Expansion beschrieben werden (Ito et al., 2015). In Analogie zu den Erkenntnissen der CML-Behandlung korrelierte dies mit einem besseren therapeutischen Ergebnis: Nur einer dieser sechs Patienten bekam ein Rezidiv. Synchron wurde dabei das Auftreten von Auto-Immunphänomenen beschrieben (Fieber unklarer Ursache, Pleuraergüsse), welche teilweise eine Therapieunterbrechung erforderlich machten. In der Therapiepause zeigte sich die LGL-Expansion rückläufig, regenerierte sich aber rasch nach Wiederaufnahme der Therapie. Für die drei Patienten ohne LGL-Expansion, die allesamt rezidierten, wurden keine immunologischen Nebenwirkungen beschrieben.

Eine Zentrumsanalyse aus Duarte (Kalifornien, USA) beschrieb 5 Ph<sup>+</sup> ALL Patienten mit Episoden einer Dasatinib-assoziierten Colitis (Aldoss et al., 2016). Nach Unterbrechung der TKI-Therapie und optionaler Therapie mit Glukokortikoiden erholten sich die Patienten rasch. LGL-Expansionen konnten hierbei nicht nachgewiesen werden. Die Autoren vermuteten jedoch ebenfalls einen immunologischen Mechanismus analog der GvHD. Histologisch konnten die Befunde dabei nicht von einer GvHD unterschieden werden. Aufgrund der raschen Regredienz nach Absetzen von Dasatinib ging man jedoch von einem medikamentösen Effekt aus.

IL-12 spielt als proinflammatorisches Zytokin eine wichtige Rolle in der Pathogenese der GvHD (Bastian et al., 2019). In Bezug auf das Auftreten einer GvHD konnte IL-12 als prädiktiver Faktor beschrieben werden (Kamel et al., 2019). Unter SFK-Inhibitoren wurden erniedrigte IL-12 Spiegel nachgewiesen (Napolitani et al., 2003; Kuka et al., 2010). Inwiefern dies zusammen mit weiteren immunmodulatorischen Effekten das verminderte Auftreten von GvHD unter Dasatinib im Vergleich zu Imatinib erklären könnte (Piekarska et al., 2015), ist schwer zu sagen und bedürfte weiterer wissenschaftlicher Untersuchungen. Nachdem im murinen System eine Colitis-Aggravierung, mit erniedrigter IL-10 Produktion durch DZs beschrieben wurde (Hu et al., 2016), wäre es interessant, inwiefern ähnliche Veränderungen bei der Dasatinib-assoziierten Colitis nach alloSZT (Aldoss et al., 2016) nachgewiesen werden können.

#### **4.3.3 Gehäufte Infektionen unter Dasatinib?**

Infektiöse Komplikationen stellen für Tumorpatienten eine häufige und bisweilen lebensbedrohliche Gefahr dar (Zembower, 2014). Insbesondere im Kontext hämatologischer Neoplasien sind sie eine der Hauptursachen für die Nicht-Rezidiv-bezogene Mortalität (Augustson et al., 2005).

Aufgrund des breiten Spektrums an potenziellen Zielstrukturen von Dasatinib, verglichen mit anderen TKIs, bestanden zunächst Bedenken hinsichtlich der Häufung von Infektionskomplikationen. Die Analysen zur Sicherheit von Dasatinib an 1150 CML-Patienten aus zwei Phase II bzw. Phase III Studien beschrieben diese jedoch als selten. Insgesamt wurde nur eine <sup>o</sup>III-IV opportunistische Infektion beobachtet (Al-Ameri et al., 2009). 11 % der Patienten zeigten unter Dasatinib milde Infektionen, unter Imatinib-Behandlung lag

dieser Anteil bei 7 % der Patienten (Kantarjian et al., 2012). Nur ein geringer Prozentsatz der Infektionen ereignete sich dabei in Neutropenie.

Eine retrospektiven Zentrumsanalyse (Houston, Texas, USA) von 69 Patienten mit hämatologischen Neoplasien postulierte einen möglichen Effekt von Dasatinib auf infektiologische Nebenwirkungen. Für Patienten, die mehr als drei Zyklen Dasatinib erhielten, konnte ein signifikant gesteigertes Risiko für bakterielle Infekte ermittelt werden (Rodriguez et al., 2012).

Die Auswertung der großen klinischen Studien (u. a. DASISION), welche u. a. die Grundlage für die Erstlinienzulassung darstellten, zeigten keine relevante Häufung von schwerwiegenden Infekt komplikationen unter Dasatinib (Al Ameri et al, 2009). Einzelne Zentrumsanalysen konnten jedoch Häufungen bestimmter Infekt komplikationen beschreiben, die im Zusammenhang einer Medikation mit Dasatinib geschildert wurden und auf welche im Folgenden eingegangen werden soll:

Chang et al. (2014) berichteten über zwei Fälle opportunistischer Infektionen mit *Pneumocystis jirovecii* (PJP). Beide Patienten erhielten die Dasatinib-Therapie zum Zeitpunkt der PJP-Diagnose bereits über mehrere Monate (7 bzw. 12 Monate) und waren in hämatologischer Remission. Sie erhielten jedoch zusätzlich Steroide und ein Patient auch Chemotherapie, welche als unabhängige Risikofaktoren für das Auftreten opportunistischer Infektionen angesehen werden. Zur Rolle von DZs im Kontext der Immunität gegenüber PJP sind nur begrenzte Daten publiziert. Diese deuten jedoch auf eine DZ-vermittelte T-Zell-Aktivierung nach Kontakt mit  $\beta$ -Glucan, einem Bestandteil der PJP-Sporen (Otieno-Odhiambo et al., 2019).

Eine weitere Fallserie beschrieb bei 5 von 231 Patienten unter Dasatinib eine CMV-Colitis (Choi et al., 2018). Nach antiviraler Behandlung konnte die Medikation mit Dasatinib ohne Komplikationen fortgesetzt werden. Ein anderer Fallbericht beschrieb eine CMV-Hepatitis unter Dasatinib (Davalos et al., 2016).

CMV-Reaktivierungen stellen insbesondere im Kontext der alloSZT eine häufige Komplikation dar. In einer Untersuchung von 109 Patienten mit CML oder Ph<sup>+</sup> ALL, welche sich einer alloSZT unterzogen wurde die Häufigkeit einer CMV-Reaktivierung untersucht (Prestes et al., 2017). Unter 13 CMV Seropositiven, die Dasatinib erhielten, fanden sich 8 Reaktivierungen (61,5 %). In der Kontrollgruppe, die keine TKI-Therapie benötigte, fanden sich unter den 50 CMV Seropositiven lediglich 17 Reaktivierungen (34 %). Hieraus berechneten sie eine 1-Jahres-Inzidenz für das Auftreten einer CMV-Reaktivierung

unter Dasatinib von 0,75 (95 % CI, 0,33-0,99) vs. 0,33 (95 % CI, 0,23-0,48) in der unbehandelten Gruppe. Die meisten CMV-Reaktivierungen traten in Abwesenheit einer Immunsuppression oder GvHD auf.

T- und NK-Zellen spielen nicht nur bei der Primärinfektion, sondern auch bei CMV-Reaktivierungen eine tragende Rolle (Miletić et al., 2013). Deren Aktivierung im Kontext viraler Infektionen wird wiederum von DZs reguliert (Tyznik et al., 2014). Die CMV-Reaktivierungen könnten dabei möglicherweise durch eine unter Dasatinib beschriebene Hemmung der T-Zell- (Weichsel et al., 2008; Blake et al., 2008; Schade et al., 2008; Fei et al., 2008), NK-Zell- (Salih et al., 2010; Hassold et al., 2012) oder DZ-Funktion bedingt sein.

#### **4.3.4 Kombination von Dasatinib und Blinatumumab bei Ph<sup>+</sup> ALL**

Auch bei der Behandlung der Ph<sup>+</sup> ALL führte die Hinzunahme der TKIs zur zytotoxischen Chemotherapie zu einer deutlichen Verbesserung der Therapieerfolge mit einem 3-Jahres OS von 56-83 % (Ravandi et al., 2010; Rousselot et al., 2016, Sasaki et al., 2016). Nach wie vor finden sich jedoch Rezidive, die eine intensivere Therapie erforderlich machen. In einer Phase II Studie bei rezidivierten/refraktären Ph<sup>+</sup> ALL Patienten konnte eine Therapie mit Blinatumumab, einem bispezifischen CD3/CD19 Antikörper, eine CR-Rate von 36 % erreichen (Martinelli et al., 2015). Inwieweit die Kombination aus TKI und Blinatumumab die bisherigen Therapieerfolge noch weiter verbessern und dabei optimalerweise den Bedarf an zytostatischer Chemotherapie minimieren könnte, ist Gegenstand aktueller Untersuchungen. Die Gruppen um Assi (2017) und King (2019) untersuchten die Kombination aus TKI und Blinatumumab an 12 bzw. 11 Patienten im Rahmen eines Ph<sup>+</sup> ALL Rezidivs. Beide Gruppen beschrieben dabei erfolgversprechende Ergebnisse. In der Untersuchung von Assi und Kollegen kam es zwar zu einem Todesfall, mit einer schweren Pneumonie unter Dasatinib und Blinatumumab, insgesamt zeigte sich mit einem 1-Jahres-OS von 73 % ein beachtliches Resultat. Die Gruppe um King beschrieb bei 10 Patienten (91 %) ein anhaltendes Therapieansprechen nach einer Nachbeobachtung von 10,8 Monaten. Auch hier kam es zu einem Todesfall, welcher jedoch als Komplikation der konsolidierenden alloSZT gewertet wurde.

2020 publizierten Foa et al. die Ergebnisse aus einer einarmigen Phase II Studie, welche 63 Erwachsene mit neu diagnostizierter Ph<sup>+</sup> ALL einschloss. Die Patienten erhielten

zunächst eine Induktion mit Dasatinib und Glucocorticoiden über 85 Tage, gefolgt von einer Konsolidierung mit 2 Zyklen Blinatumumab. Nach einer medianen Nachbeobachtung von 18 Monaten zeigte sich ein Gesamtüberleben von 95 % und ein krankheitsfreies Überleben von 88 %. In der Nachbeobachtungszeit kam es lediglich zu 6 Rezidiven. Insgesamt zeigten sich nur wenig höhergradige Toxizitäten und die einzigen Nebenwirkungen  $\geq$  Grad 3 waren 6 CMV-Reaktivierungen.

Die Wirksamkeit des bispezifischen CD3/CD19-Antikörpers Blinatumumab wird u. a. über eine Proliferation spezifischer T-Zellen vermittelt. Nachdem für Dasatinib immunmodulatorische Effekte auf T-Zellen beschrieben wurden (Weichsel et al., 2008; Blake et al., 2008; Schade et al., 2008) untersuchten Foa et al. (2020) die *in vitro* Effektivität der Kombinationstherapie von TKIs und Blinatumumab auf Zellen von Ph<sup>+</sup> ALL Patienten. Im Vergleich zur Blinatumumab-Monotherapie beschrieben sie für die Kombination mit den ABL/Src-Inhibitoren Dasatinib und Ponatinib eine verminderte T-Zell-Proliferation sowie erniedrigte IFN $\gamma$ -Konzentrationen *in vitro*. Diese Beobachtungen konnten für Imatinib und Nilotinib nicht bestätigt werden, so dass sie von einem Src-vermittelten Effekt ausgingen. Nach Auswaschen der ABL/Src-Inhibitoren aus dem Medium zeigte sich eine partielle Reversibilität. Bei CML-Patienten, die mit Dasatinib behandelt wurden, konnte innerhalb von 4-8h nach Einnahme der Medikation ein Abfall der Plasmakonzentration auf Werte unter 5 nM nachgewiesen werden (Shah et al., 2008). Inwiefern die kurze Halbwertszeit der ABL/Src TKIs zu einer Wiederherstellung der Wirkung von Blinatumumab in Phasen niedriger Serumspiegel ausreicht oder inwiefern die wiederholte Unterbrechung der T-Zell-Proliferation und Zytokinproduktion zu einer verminderten Blinatumumab-Wirksamkeit führen könnte, blieb unklar und bedarf weiterer wissenschaftlicher Untersuchungen.

Blinatumumab adressiert als bispezifischer CD3/CD19-Antikörper primär T- und B-Zellen. In einer Publikation konnten synergistische Effekte von Blinatumumab im Zusammenhang einer DZ-Vakzinierung nachgewiesen werden (Wu et al., 2019). Zu direkten Auswirkungen der Behandlung mit Blinatumumab auf DZs gibt es bislang keine publizierten Daten. Inwieweit eine zielgerichtete Antikörpertherapie eine anhaltende DZ-vermittelte Immunogenität bewirken könnte, wäre von klinischer Relevanz.

#### **4.3.5 Dasatinib zeigt in Kombination mit Immuncheckpointinhibitortherapie potenziell kontraproduktive Effekte**

CTLA-4 ist ein Molekül mit überwiegend tolerogenen Eigenschaften, welches in der DZ-T-Zell-Interaktion eine wichtige Rolle übernimmt (Chen et Flies, 2013; Walker et Sansom, 2015). Die Einführung des Immuncheckpointinhibitors Ipilimumab und dessen breiter klinischer Einsatz rückte es noch weiter in den Focus wissenschaftlichen Interesses. Die Expression von CTLA-4 auf Tregs führt zu einer verminderten Expression von CD80 und CD86 auf DZs, was wiederum tolerogene Eigenschaften der DZs fördert (Oderup et al., 2006, Wing et al., 2008).

Es gibt Hinweise, dass die Zugabe myeloider DZs zu einer Verbesserung des Therapieerfolgs einer Immuncheckpointinhibitortherapie beitragen könnte. Hiervon könnten auch Patienten profitieren, die kein oder nur ein unzureichendes Ansprechen auf alleinige Immuntherapie zeigten (Schwarze et al., 2020). Eine Phase Ib Studie untersuchte Effekte einer Kombination von Ipilimumab und Dasatinib (D'Angelo et al., 2017) bei 28 refraktären Patienten mit gastrointestinalen Stromatumoren (GIST) und anderen Sarkomen. Die Autoren beschrieben hierbei zwar eine gute Verträglichkeit der Kombinationstherapie von Dasatinib/Ipilimumab, jedoch ließ sich kein verbessertes Therapieansprechen belegen. Möglicherweise bewirkt die Medikation mit Dasatinib in diesem Zusammenhang einen immuninhibitorischen Effekt.

Weitere Kombinationen aus Immuncheckpointinhibitoren und Dasatinib befinden sich derzeit in klinischer Erprobung, inwiefern sich die bereits hier publizierten Ergebnisse reproduzieren lassen, bleibt abzuwarten.

#### **4.3.6 Dasatinib als An-/Aus-Schalter von CAR-T-Zelltherapien**

Adaptive Immuntherapie mit genetisch veränderten CAR („chimeric antigen receptor“) T-Zellen ist eine relativ neue Therapiesäule in der Hämatookologie. CD19-spezifische CAR-T-Zellen wurden bereits zur Behandlung von B-Zell-Malignomen für Kinder und Erwachsene zugelassen (June et Sadelain, 2018; Sadelain et al., 2017). Daneben befinden sich zahlreiche CAR-T-Zellprodukte, welche gegen unterschiedliche Malignome eingesetzt werden könnten, in klinischer Erprobung. Als „lebendige“ Medizin besitzen sie bereits als Einmalgabe die Fähigkeit über Jahre im Empfänger zu persistieren und sich nach spezifischer Antigen-Exposition zu expandieren (Turtle et al., 2016; Park et al.,



2018). Einzelne Patienten erleiden jedoch ernsthafte und bisweilen lebensbedrohliche Toxizitäten. Zu diesen zählt v. a. das Zytokinfreisetzungssyndrom („cytokine releasing syndrome“, CRS), welches über die Freisetzung bestimmter proinflammatorischer Zytokine (u. a. IL-6) vermittelt wird. Hieran sind T-Zellen, aber auch Zellen des angeborenen Immunsystems beteiligt (Hay et al., 2017; Giavridis et al., 2018; Norelli et al., 2018). Bisherige Therapieansätze bestehen aus Antagonisierung von IL-6 sowie systemischer Immunsuppression mit Glukokortikoiden (Neelapu et al., 2018). Die Signalweitergabe i. R. des CRS ähnelt sehr dem klassischen Aktivierungsweg über den TZR und beinhaltet die Autophosphorylierung von SFKs (Karlsson et al., 2015; Rydzek et al., 2019).

Weber und Kollegen (2019) beschrieben *in vitro* ab 10 nM Dasatinib eine verminderte Tumorlyse, welche mittels Biolumineszenz gemessen wurde. Dies korrelierte auch mit einer verminderten Zytokinsekretion. Ab einer Dosis von 100 nM blockierte Dasatinib vollständig wichtige CAR-T-Zell-Funktionen. Nach kurzer wie auch längerer Behandlung führte das Absetzen der Dasatinib-Therapie zu einer Erholung der CAR-T-Zell-vermittelten Effekte. Die Autoren schlossen hieraus eine vollständige und rasche Reversibilität. An Biolumineszenzuntersuchungen im Mausmodell beschrieben sie unter Dasatinib eine Expansionshemmung der CAR-T-Zellen. Auch humorale Mediatoren, welche bei Patienten mit CRS nachgewiesen werden können, wurden durch Dasatinib supprimiert.

In einer weiteren Publikation (Mestermann et al., 2019) wurde eine komplette Blockade der Zell-Lyse mit 100 nM Dasatinib beschrieben. Parallel konnte dabei auch eine vollständige Inhibition der IFN $\gamma$ - und GM-CSF-Produktion nachgewiesen werden. Unter Dexamethason hingegen, welches bisher die Erstlinientherapie i. R. eines CRS darstellt, wurde selbst in hohen Dosen nur eine verzögerte und unvollständige Hemmung beschrieben. Auch eine Stimulation des endogenen T-Zell-Rezeptors konnte die Dasatinib-vermittelte Wirkung nicht kompromittieren. Bereits 2h nach Auswaschen von Dasatinib aus dem Zellmedium konnte eine spezifische Lysefähigkeit von 50 % der initialen Intensität gemessen werden. Innerhalb von 7h zeigte sich die Funktion vollständig erholt. Für einen anhaltenden Effekt war eine kontinuierliche Konzentration von  $\geq 40$  nM erforderlich. In einem Xenograft-Modell eines Lymphoms konnten die Autoren dabei einen negativen Einfluss auf den Therapieerfolg i. R. einer 48-stündigen Blockade der CAR-T-Zell Therapie ausschließen.

*Unisono* schlossen die beiden Arbeitsgruppen aus den Ergebnissen, dass eine intermittierende und/oder niedrig dosierte Dasatinib-Gabe die CAR-T-Zell-assoziierte Toxizität vermindern könnte, ohne dabei die Antigen-spezifische Wirksamkeit zu supprimieren.

## 5 Zusammenfassung

Der Multikinase-Inhibitor Dasatinib zeigt *in vitro* und *in vivo* immunmodulatorische Effekte. In der Generierung von Immunantworten übernehmen DZs eine zentrale Rolle. Ziel dieser Arbeit war es, Effekte von Dasatinib auf die *in vitro* Generierung und grundlegende Funktionen von moDZs zu untersuchen.

Dasatinib modulierte dosisabhängig die moDZ-Generierung. Die Anwesenheit von 50 nM Dasatinib während der Zellkultur führte zu einer Expressionsreduktion von CD1a bei Persistenz von CD14. Dabei fand sich eine aberrante Population (CD1a<sup>+</sup> CD14<sup>+</sup>) von ca. 10 %. Teilweise könnte die Hemmung der moDZ-Generierung durch toxische Effekte bedingt sein, da unter 50 nM Dasatinib eine signifikant erhöhte Apoptose-/Nekroserate der moDZs induziert wurde. Die Endozytosefähigkeit unreifer moDZs blieb unter Dasatinib unverändert. Dasatinib beeinflusste jedoch wichtige Effektorfunktionen von reifen moDZs. Auf zellulärer Ebene bewirkte 50 nM Dasatinib eine signifikante Inhibition der Expression von CD80 und CD86. Auf humoraler Ebene zeigte sich dabei eine signifikant verminderte IL-12 Konzentration. Diese Effekte wurden in der Literatur mit tolerogenen Eigenschaften von moDZs in Verbindung gebracht.

Im Gegensatz zu den für Imatinib publizierten Daten, fand sich auf molekularer Ebene keine verminderte nukleäre Translokation von RelB nach Stimulation mit LPS. Dagegen ließ sich eine breite Modulation der Tyrosinphosphorylierung im Westernblot nachweisen, u. a. in dem für die SFKs typischen Bereich um 60 kDa.

Zwischenzeitlich beschrieben verschiedene Arbeitsgruppen *in vitro* und *in vivo* immunmodulatorische Effekte von Dasatinib auf DZs. Aus den publizierten Daten ergaben sich Hinweise, dass Dasatinib neben seiner Funktion als BCR-ABL-Inhibitor auch als Immunmodulator oder als immunologisches Adjuvanz eingesetzt werden könnte. Hierbei ergaben sich Anhaltspunkte, dass immunologische Co-Mediatoren und Unterschiede in der pharmakokinetischen Applikation diese Effekte wesentlich beeinflussen könnten.

## 6 Literaturverzeichnis

Abbas AK, Litchman AH, Pillai S. Cellular and molecular immunology. Philadelphia: Elsevier/Saunders, 2012.

Abbaspour Babaei M, Kamalidehghan B, Saleem M, Huri HZ, Ahmadipour F. Receptor tyrosine kinase (c-Kit) inhibitors: a potential therapeutic target in cancer cells. *Drug Des Devel Ther.* 2016 Aug 1;10:2443-59.

Abdi K, Laky K, Padhan K, Petrovas C, Skinner J, Kabat J, Dorward DW, Brzostowski J, Long EO, Trinchieri G, Varma R. Cutting Edge: Quantitative Determination of CD40L Threshold for IL-12 and IL-23 Production from Dendritic Cells. *J Immunol.* 2018 Nov 15;201(10):2879-2884.

Acosta-Rodriguez, E.V.; Napolitani, G.; Lanzavecchia, A.; Sallusto, F. Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat. Immunol.* 2007, 8, 942–949.

Al-Ameri A, Kantarijan H, Burton E, O'Brien S, Ravandi F, Borthakur G, Walker B, Rios MB, Cortes J. Low risk of infectious events in patients (pts) with chronic myeloid leukemia (CML) in chronic phase (CP) treated with dasatinib. *ASH Annual Meeting 2009, December 7, 2009, Abstract 3291, New Orleans, USA.* 2015.

Aldoss I, Gaal K, Al Malki MM, Ali H, Nakamura R, Forman SJ, Pullarkat V. Dasatinib-Induced Colitis after Allogeneic Stem Cell Transplantation for Philadelphia Chromosome-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2016 Oct;22(10):1900-1903.

Amon L, Hatscher L, Heger L, Dudziak D, Lehmann CHK. Harnessing the Complete Repertoire of Conventional Dendritic Cell Functions for Cancer Immunotherapy. *Pharmaceutics.* 2020 Jul 14;12(7):663.

Anafi M, Gazit A, Zehavi A, Ben-Neriah Y, Levitzki A. Tyrphostin-induced inhibition of p210bcr-abl tyrosine kinase activity induces K562 to differentiate. *Blood.* 1993;82:3524-3529

Anderson DA, Murphy KM, Briseño CG. Development, Diversity, and Function of Dendritic Cells in Mouse and Human. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2018 Nov 1;10(11):a028613.

Appel S, Boehmler AM, Grünebach F, Müller MR, Rupf A, Weck MM, Hartmann U, Reichardt VL, Kanz L, Brümmendorf TH, Brossart P. Imatinib mesylate affects the development and function of dendritic cells generated from CD34+ peripheral blood progenitor cells. *Blood.* 2004 Jan 15;103(2):538-44.

Appel S, Rupf A, Weck MW, Schoor O, Brümmendorf TH, Weinschenk T, Grünebach F, Brossart P. Effects of imatinib on monocyte-derived dendritic cells are mediated by inhibition of nuclear factor-kappaB and Akt signaling pathways. *Clin Cancer Res* 2005;11(5):1928-40

Ara A, Ahmed KA, Xiang J. Multiple effects of CD40-CD40L axis in immunity against infection and cancer. *Immunotargets Ther.* 2018 Jun 28;7:55-61.

Arnold K. After 30 Years of Laboratory Work, a Quick Approval for STI571. *Journal of the National Cancer Institute.* 2001;93:972

Assi R, Kantarjian H, Short NJ, Daver N, Takahashi K, Garcia-Manero G, DiNardo C, Burger J, Cortes J, Jain N, Wierda W, Chamoun S, Konopleva M, Jabbour E. Safety and Efficacy of Blinatumomab in Combination With a Tyrosine Kinase Inhibitor for the Treatment of Relapsed Philadelphia Chromosome-positive Leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2017 Dec;17(12):897-901.

Attwood PV. Histidine kinases from bacteria to humans. *Biochem Soc Trans.* 2013;41:1023-1028

Augustson BM, Begum G, Dunn JA, et al. Early mortality after diagnosis of multiple myeloma: analysis of patients entered onto the United Kingdom Medical Research Council trials between 1980 and 2002 – Medical Research Council Adult Leukaemia Working Party. *J Clin Oncol.* 2005;23:9219–26.

Azizi G, Goudarzvand M, Afraei S, Sedaghat R, Mirshafiey A. Therapeutic effects of dasatinib in mouse model of multiple sclerosis. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2015 Jun;37(3):287-94.

Azukizawa H, Dohler A, Kanazawa N, Nayak A, Lipp M, Malissen B, Autenrieth I, Katayama I, Riemann M, Weih F, Berberich-Siebelt F, Lutz MB. Steady state migratory RelB<sup>+</sup> langerin<sup>+</sup> dermal dendritic cells mediate peripheral induction of antigen-specific CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells. *Eur J Immunol* 2011;41:1420–34.

Bakdash G, Buschow SI, Gorris MA, Halilovic A, Hato SV, Sköld AE et al Expansion of a BDCA1<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> myeloid cell population in melanoma patients may attenuate the efficacy of dendritic cell vaccines. *Cancer Res* 2016; 76:4332–46.

Balan S, Ollion V, Colletti N, Chelbi R, Montanana-Sanchis F, Liu H et al Human XCR1<sup>+</sup> dendritic cells derived in vitro from CD34<sup>+</sup> progenitors closely resemble blood dendritic cells, including their adjuvant responsiveness, contrary to monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 2014; 193:1622–35.

Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K.. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000;18:767-811.

Bantscheff M, Eberhard D, Abraham Y, Bastuck S, Boesche M, Hobson S, Mathieson T, Perrin J, Raida M, Rau C, Reader V, Sweetman G, Bauer A, Bouwmeester T, Hopf C, Kruse U, Neubauer G, Ramsden N, Rick J, Kuster B, Drewes G. Quantitative chemical proteomics reveals mechanisms of action of clinical ABL kinase inhibitors. *Nat Biotechnol.* 2007 Sep;25(9):1035-44.

Bao M, Liu YJ. Regulation of TLR7/9 signaling in plasmacytoid dendritic cells. *Protein Cell* 2013; 4:40–52.

Bastian D, Wu Y, Betts BC, Yu XZ. The IL-12 Cytokine and Receptor Family in Graft-vs.-Host Disease. *Front Immunol.* 2019 May 8;10:988.

Bates JM, Flanagan K, Mo L, Ota N, Ding J, Ho S, Liu S, Roose-Girma M, Warming S, Diehl L. Dendritic cell CD83 homotypic interactions regulate inflammation and promote mucosal homeostasis. *Mucosal Immunol.* 2015 Mar;8(2):414-28.

Bauer R, Mezger M, Blockhaus C, Schmitt A-L, Kurzai O, Einsele H, et al. 40-O-[2-Hydroxyethyl] rapamycin modulates human dendritic cell function during exposure to *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Basic Microbiology.* 2011;52(3):269–76.

BD Biosciences. Einführung in die Durchflusszytometrie: Trainingsvorbereitung. 2014

Blake SJ, Bruce Lyons A, Fraser CK, Hayball JD, Hughes TP. Dasatinib suppresses in vitro natural killer cell cytotoxicity. *Blood* 2008;111(8):4415-6

Blazar BR, Murphy WJ, Abedi M. Advances in graft-versus-host disease biology and therapy. *Nat Rev Immunol* 2012;12:443–581

Boissel N, Rousselot P, Raffoux E, Cayuela JM, Soulier J, Mooney N, Charron D, Dombret H, Toubert A, Rea D. Imatinib mesylate minimally affects bcr-abl+ and normal monocyte-derived dendritic cells but strongly inhibits T cell expansion despite reciprocal dendritic cell-T cell activation. *J Leukoc Biol.* 2006;79(4):747-56.

Buchdunger E, Zimmermann J, Mett H, Meyer T, Müller M, Druker BJ, Lydon NB. Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylaminopyrimidine derivative. *Cancer Res.* 1996;56:100-104

Brave M, Goodman V, Kaminskas E, Farrell A, Timmer W, Pope S, Harapanhalli R, Saber H, Morse D, Bullock J, Men A, Noory C, Ramchandani R, Kenna L, Booth B, Gobburu J, Jiang X, Sridhara R, Justice R, Pazdur R.. Sprycel for chronic myeloid leukemia and Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia resistant to or intolerant of imatinib mesylate. *Clin Cancer Res* 2008;14:352-9

Breccia M, Cannella L, Stefanizzi C, Carotti A, Santopietro M, Alimena G. Efficacy of dasatinib in a chronic myeloid leukemia patient with disease molecular relapse and chronic GVHD after haploidentical BMT: an immunomodulatory effect? *Bone Marrow Transplant.* 2009 Sep;44(5):331-2.

Brossart P, Grünebach F, Stuhler G, Reichardt VL, Möhle R, Kanz L, Brugger W. Generation of functional human dendritic cells from adherent peripheral blood monocytes by CD40 ligation in the absence of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood.* 1998 Dec 1;92(11):4238-47.

Byeon SE, Yi YS, Oh J, Yoo BC, Hong S, Cho JY. The role of Src kinase in macrophage-mediated inflammatory responses. *Mediators Inflamm.* 2012;2012:512926.

Castiello L, Sabatino M, Ren J, Terabe M, Khuu H, Wood LV, Berzofsky JA, Stroncek DF. Expression of CD14, IL10, and Tolerogenic Signature in Dendritic Cells Inversely Correlate with Clinical and Immunologic Response to TARP Vaccination in Prostate Cancer Patients. *Clin Cancer Res.* 2017 Jul 1;23(13):3352-3364.

Chang H, Hung YS, Chou WC. Pneumocystis jiroveci pneumonia in patients receiving dasatinib treatment. *Int J Infect Dis.* 2014 Aug;25:165-7.

Chang MC, Cheng HI, Hsu K, Hsu YN, Kao CW, Chang YF, Lim KH, Chen CG. NKG2A Down-Regulation by Dasatinib Enhances Natural Killer Cytotoxicity and Accelerates Effective Treatment Responses in Patients With Chronic Myeloid Leukemia. *Front Immunol.* 2018; 9: 3152.

Chen L, Flies DB. Molecular mechanisms of T-cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol* 2013;13(4):227–42.

Cheong C, Matos I, Choi J-H, Dandamudi DB, Shrestha E, Longhi MP, Jeffrey KL, Anthony RM, Kluger C, Nchinda G, Koh H, Rodriguez A, Idoyaga J, Pack M, Velinzon K, Park CG, Steinman RM. Microbial stimulation fully differentiates monocytes to DC-SIGN/CD209(+) dendritic cells for immune T cell areas. *Cell* 2010;143:416–29.

Choi JK, Cho SY, Choi SM, Kim GH, Lee SE, Lee S, Kim DW, Lee DG. Cytomegalovirus Colitis during Dasatinib Treatment for Patients with Hematologic Malignancy: Case Series and Literature Review. *Infect Chemother.* 2018;50(2):153-159

Chow KV, Sutherland RM, Zhan Y, Lew AM. Heterogeneity, functional specialization and differentiation of monocyte-derived dendritic cells. *Immunol Cell Biol.* 2017 Mar;95(3):244-251.

Christiansson L, Söderlund S, Mangsbo S, Hjorth-Hansen H, Höglund M, Markevärn B, Richter J, Stenke L, Mustjoki S, Loskog A, Olsson-Strömberg U. The Tyrosine Kinase Inhibitors Imatinib and Dasatinib Reduce Myeloid Suppressor Cells and Release Effector Lymphocyte Responses. *Mol Cancer Ther.* 2015;14(5):1181-91.

Chu CL, Lee YP, Pang CY, Lin HR, Cheng CS, You RI. Tyrosine kinase inhibitors modulate dendritic cell activity via confining c-Kit signaling and tryptophan metabolism. *Int Immunopharmacol.* 2020 Mar 6;82:106357.

Chung JS, Sato K, Dougherty II, Cruz PD Jr, Ariizumi K. DC-HIL is a negative regulator of T lymphocyte activation. *Blood.* 2007 May 15;109(10):4320-7.

Chung JS, Bonkobara M, Tomihari M, Cruz PD Jr, Ariizumi K. The DC-HIL/syndecan-4 pathway inhibits human allogeneic T-cell responses. *Eur J Immunol.* 2009;39(4):965-974.

Climent N and Plana M. Immunomodulatory Activity of Tyrosine Kinase Inhibitors to Elicit Cytotoxicity Against Cancer and Viral Infection. *Front Pharmacol.* 2019 Oct 18;10:1232.

Coffman RL. Origins of the T(H)1-T(H)2 model: a personal perspective. *Nat Immunol* 2006;7: 539–541.

Collett MS, Purchio AF, Erikson RL. Avian sarcoma virus-transforming protein, pp60src shows protein kinase activity specific for tyrosine. *Nature.* 1980;285:167-169

Colletti NJ, Liu H, Gower AC, Alekseyev YO, Arendt CW, Shaw MH. TLR3 signaling promotes the induction of unique human BDCA-3 dendritic cell populations. *Front Immunol* 2016; 7:88.

Collin M, Bigley V, Human dendritic cell subsets: an update. *Immunology.* 2018 May;154(1):3-20.

Collin M, MCGovern N, Haniffa M. Human dendritic cell subsets. *Immunology.* 2013;140:22–30.

Constantino J, Gomes C, Falcão A, Neves BM, Cruz MT. Dendritic cell-based immunotherapy: a basic review and recent advances. *Immunol Res.* 2017 Aug;65(4):798-810.

Dakappagari N, Ho SN, Gascoyne RD, Ranuio J, Weng AP, Tangri S. CD80 (B7.1) is expressed on both malignant B cells and nonmalignant stromal cells in non-Hodgkin lymphoma. *Cytometry B Clin Cytom.* 2012;82(2):112–119.

Davalos F, Chaucer B, Zafar W, Salman S, Nfonoyim J. Dasatinib-Induced CMV Hepatitis in an Immunocompetent Patient: A Rare Complication of a Common Drug. *Transl Oncol.* 2016 Jun; 9(3): 248–250.

Davis GE. The Mac-1 and p150,95 beta 2 integrins bind denaturated proteins to mediate leukocyte cell-substrate adhesion. *Exp Cell Res Jun* 1992; 200(2); 242-52

de Jong ED, Smits HH, Kapsenberg ML. Dendritic cell-mediated T cell polarization, Springer *Semin Immun.* 2005; 26; 289-307

Degn SE, Thiel S: Humoral pattern recognition and the complement system. *Scand J Immunol* 2013;78:181-193.



Dietz AB, Bulur PA, Emery RL, Winters JL, Epps DE, Zubair AC, Vuk-Pavlovic S. A novel source of viable peripheral blood mononuclear cells from leukoreduction system chambers. *Transfusion* 2006;46(12);2083-9

Döhler A, Schneider T, Eckert I, Ribechini E, Andreas N, Riemann M, Reizis B, Weih F, Lutz MB. RelB+ Steady-State Migratory Dendritic Cells Control the Peripheral Pool of the Natural Foxp3+ Regulatory T Cells. *Front Immunol.* 2017;8: 726.

Draxler DF, Madondo MT, Hanafi G, Plebanski M, Medcalf RL. A flowcytometric analysis to efficiently quantify multiple innate immune cells and T Cell subsets in human blood. *Cytometry A.* 2017 Apr;91(4):336-350.

Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, et al. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2006;355:2408–17.

Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal GM, Fanning S, Zimmermann J, Lydon NB. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med.* 1996;2:561-566

Du Z, Lovly CM. Mechanisms of receptor tyrosine kinase activation in cancer. *Mol Cancer.* 2018 Feb 19;17(1):58.

Dustin ML. The immunological synapse. *Cancer Immunol Res.* 2014 Nov;2(11):1023-33.

Eguíluz-Gracia I, Bosco A, Dollner R, Melum GR, Lexberg MH, Jones AC, Dheyauldeen SA, Holt PG, Bækkevold ES, Jahnsen FL. Rapid recruitment of CD14(+) monocytes in experimentally induced allergic rhinitis in human subjects. *J Allergy Clin Immunol.* 2016 Jun;137(6):1872-1881.e12.

El Missiry M, Adnan Awad S, Rajala HL, Al-Samadi A, Ekblom M, Markevén B, Åstrand-Grundström I, Wold M, Rabben Svedahl E, Ravn Juhl B, Weis Bjerrum O, Haulin I, Porkka K, Olsson-Strömberg U, Hjorth-Hansen H, Mustjoki S. Assessment of bone marrow lymphocytic status during tyrosine kinase inhibitor therapy and its relation to therapy response in chronic myeloid leukaemia. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2016.142, 1041–1050.

Elizondo DM, Andargie TE, Kubhar DS, Gugssa A, Lipscomb MW. CD40-CD40L cross-talk drives fascin expression in dendritic cells for efficient antigen presentation to CD4+ T cells. *Int Immunol.* 2017 Mar 1;29(3):121-131.

Enamorado M, Khouili SC, Iborra S, Sancho D. Genealogy, Dendritic Cell Priming, and Differentiation of Tissue-Resident Memory CD8<sup>+</sup> T Cells. *Front Immunol.* 2018 Jul 31;9:1751.

FDA approves Gleevec for leukemia treatment. *FDA Consum.* 2001;35:6

Fei F, Yu Y, Schmitt A, Rojewski MT, Chen B, Greiner J, Götz M, Guillaume P, Döhner H, Bunjes D, Schmitt M. Dasatinib exerts an immunosuppressive effect on CD8<sup>+</sup> T cells specific for viral and leukemia antigens. *Exp Hematol.* 2008 Oct;36(10):1297-308.

Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. *Lancet.* 2009;373:1550-1561.

Fiegl D, Kagebein D, Liebler-Tenorio EM, Weisser T, Sens M, Gutjahr M, et al. Amphisomal Route of MHC Class I Cross-Presentation in Bacteria-Infected Dendritic Cells. *The Journal of Immunology.* 2013;190(6):2791–806.

Finetti F, Baldari CT. The immunological synapse as a pharmacological target. *Pharmacol Res.* 2018 Aug;134:118-133.

Foà R, Bassan R, Vitale A, Elia L, Piciocchi A, Puzzolo MC, Canichella M, Viero P, Ferrara F, Lunghi M, Fabbiano F, Bonifacio M, Fracchiolla N, Di Bartolomeo P, Mancino A, De Propriis MS, Vignetti M, Guarini A, Rambaldi A, Chiaretti S. Dasatinib-Blinatumomab for Ph-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia in Adults. *N Engl J Med.* 2020 Oct 22;383(17):1613-1623.

Fuertes Marraco SA, Scott CL, Bouillet P, Ives A, Masina S, Vremec D, Jansen ES, O'Reilly LA, Schneider P, Fasel N, Shortman K, Strasser A, Acha-Orbea H. Type I interferon drives dendritic cell apoptosis via multiple BH3-only proteins following activation by PolyIC in vivo. *PLoS One* 2011. 6: e20189

Fujita H, Kitawaki T, Sato T, Maeda T, Kamihira S, Takaori-Kondo A, Kadowaki N. The tyrosine kinase inhibitor dasatinib suppresses cytokine production by plasmacytoid dendritic cells by targeting endosomal transport of CpG DNA. *Eur J Immunol.* 2013;43:93-103

Furlong MT, Agrawal S, Hawthorne D, Lago M, Unger S, Krueger L, Stouffer B. A validated LC-MS/MS assay for the simultaneous determination of the anti-leukemic agent

dasatinib and two pharmacologically active metabolites in human plasma: application to a clinical pharmacokinetic study. *J Pharm Biomed Anal* 2012;25:130-5

Gardner JK, Cornwall SMJ, Musk AW, Alvarez J, Mamotte CDS, Jackaman C, Nowak AK, Nelson DJ. Elderly dendritic cells respond to LPS/IFN- $\gamma$  and CD40L stimulation despite incomplete maturation. *PLoS One*. 2018 Apr 13;13(4):e0195313.

Gasteiger G, D'Oswaldo A, Schubert DA, Weber A, Bruscia EM, Hartl D. Cellular Innate Immunity: An Old Game with New Players. *J Innate Immun*. 2017;9(2):111-125.

Gaudin R, Berre S, Cunha de Alencar B, Decalf J, Schindler M, Gobert FX, Jouve M, Benaroch P. Dynamics of HIV-Containing Compartments in Macrophages Reveal Sequestration of Virions and Transient Surface Connections. *PLoS One*. 2013 Jul 29;8(7):e69450.

Giavridis T, van der Stegen SJC, Eyquem J, Hamieh M, Piersigilli A, Sadelain M. CAR T cell-induced cytokine release syndrome is mediated by macrophages and abated by IL-1 blockade. *Nat. Med.* 2018.24, 731–738.

Glass CK, Saijo K. Nuclear receptor transrepression pathways that regulate inflammation in macrophages and T cells. *Nat Rev Immunol* 2010;10(5):365–76.

Gomard T, Michaud HA, Tempé D, Thiolon K, Pelegrin M, Piechaczyk M. An NF-kappaB-dependent role for JunB in the induction of proinflammatory cytokines in LPS-activated bone marrow-derived dendritic cells. *PLoS One*. 2010 Mar 8;5(3):e9585.

Granucci F, Lutz MB, Zanoni I. The Nature of Activatory and Tolerogenic Dendritic Cell-Derived Signal 2. *Front Immunol*. 2014;5:42.

Greaves P, Gribben JG. The role of B7 family molecules in hematologic malignancy. *Blood*. 2013 Jan 31;121(5):734-44.

Gregori S, Tomasoni D, Pacciani V, Scirpoli M, Battaglia M, Magnani CF, et al. Differentiation of type 1 T regulatory cells (Tr1) by tolerogenic DC-10 requires the IL-10-dependent ILT4/HLA-G pathway. *Blood* 2010;116:935–44.

Gronwall A, Ingelman B. Dextran as a substitute for plasma. *Nature*. 1945;155:45.

Gu FF, Wu JJ, Liu YY, Hu Y, Liang JY, Zhang K, Li M, Wang Y, Zhang YA, Liu L. Human inflammatory dendritic cells in malignant pleural effusions induce Th1 cell differentiation. *Cancer Immunol Immunother.* 2020 May;69(5):779-788.

Guilliams M, Dutertre CA, Scott CL, McGovern N, Sichien D, Chakarov S, Van Gassen S, Chen J, Poidinger M, De Prijck S, Tavenier SJ, Low I, Irac SE, Mattar CN, Sumatoh HR, Low GHL, Chung TJK, Chan DKH, Tan KK, Hon TLK, Fossum E, Bogen B, Choolani M, Chan JKY, Larbi A, Luche H, Henri S, Saeys Y, Newell EW, Lambrecht BN, Malissen B, Ginhoux F. Unsupervised high-dimensional analysis aligns dendritic cells across tissues and species. *Immunity* 2016; 45:669–84.

Guo K, Bu X, Yang C, Cao X, Bian H, Zhu Q, Zhu J, Zhang D. Treatment Effects of the Second-Generation Tyrosine Kinase Inhibitor Dasatinib on Autoimmune Arthritis. *Front Immunol.* 2019 Jan 10;9:3133.

Hajishengallis G, Li X, Mitroulis I, Chavakis T. Trained Innate Immunity and Its Implications for Mucosal Immunity and Inflammation. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1197:11-26.

Han P, Hanlon D, Sobolev O, Chaudhury R, Edelson RL. Ex vivo dendritic cell generation-A critical comparison of current approaches. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2019;349:251-307.

Haniffa M, Shin A, Bigley V, McGovern N, Teo P, See P, Wasan PS, Wang XN, Malinarich F, Malleret B, Larbi A, Tan P, Zhao H, Poidinger M, Pagan S, Cookson S, Dickinson R, Dimmick I, Jarrett RF, Renia L, Tam J, Song C, Connolly J, Chan JK, Gehring A, Bertoletti A, Collin M, Ginhoux F. Human tissues contain CD141<sup>hi</sup> cross-presenting dendritic cells with functional homology to mouse CD103<sup>+</sup> nonlymphoid dendritic cells. *Immunity.* 2012 Jul 27;37(1):60-73.

Hantschel O, Rix U, Superti-Furga G. Target spectrum of the BCR-ABL inhibitors imatinib, nilotinib and dasatinib. *Leuk Lymphoma.* 2008 Apr;49(4):615-9.

Hassold N, Seystahl K, Kempf K, Urlaub D, Zekl M, Einsele H, Watzl C, Wischhusen J, Seggewiss-Bernhardt R. Enhancement of natural killer cell effector functions against selected lymphoma and leukemia cell lines by dasatinib. *Int. J. Cancer.* 2012;131(6):E916-27

Hay KA, Hanafi L-A, Li D, Gust J, Liles WC, Wurfel MM, López JA, Chen J, Chung D, Harju-Baker S, Cherian S, Chen X, Riddell SR, Maloney DG, Turtle CJ. Kinetics and

biomarkers of severe cytokine release syndrome after CD19 chimeric antigen receptor-modified T-cell therapy. *Blood* 2017.130, 2295–2306.

Hayashi Y, Nakamae H, Katayama T, Nakane T, Koh H, Nakamae M, Hirose A, Hagihara K, Terada Y, Nakao Y, Hino M. Different immunoprofiles in patients with chronic myeloid leukemia treated with imatinib, nilotinib or dasatinib. *Leukemia & Lymphoma* 2012;53(6): 1084–1089

Hayden MS, Ghosh S. NF-kappaB, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes Dev* 2012;26:203–34.

Hemont C, Neel A, Heslan M, Braudeau C, Josien R. Human blood mDC subsets exhibit distinct TLR repertoire and responsiveness. *J Leukoc Biol* 2013; 93:599–609.

Hochhaus A, Baccarani M, Deininger M, et al. Dasatinib induces durable cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in chronic phase with resistance or intolerance to imatinib. *Leukemia* 2008;22:1200–6.

Hoeve MA, Savage ND, de Boer T, Langenberg DM, de Waal Malefyt R, Ottenhoff TH, Verreck FA. Divergent effects of IL-12 and IL-23 on the production of IL-17 by human T-cells. *Eur. J. Immun.* 2006, 36, 661–670.

Hu X, Han C, Jin J, Qin K, Zhang H, Li T, Li N, Cao X. Integrin CD11b attenuates colitis by strengthening Src-Akt pathway to polarize anti-inflammatory IL-10 expression. *Sci Rep.* 2016 May 18;6:26252.

Hughes A, Clarson J, Tang C, Vidovic L, White DL, Hughes TP, Yong AS. CML patients with deep molecular responses to TKI have restored immune effectors and decreased PD-1 and immune suppressors. *Blood.* 2017 Mar 2;129(9):1166-1176.

Hughes A, Yong ASM. Immune Effector Recovery in Chronic Myeloid Leukemia and Treatment-Free Remission. *Front Immunol.* 2017 Apr 24;8:469.

Hurdoyal R, Brombacher F. Interleukin-4 Receptor Alpha: From Innate to Adaptive Immunity in Murine Models of Cutaneous Leishmaniasis. *Front Immunol.* 2017 Nov 10;8:1354.

Ingelman B. Dextran and its use as a plasma substitute. *Acta chem scand.* 1947;1:731–8.

Ishiyama K, Kitawaki T, Sugimoto N, Sozu T, Anzai N, Okada M, Nohgawa M, Hatanaka K, Arima N, Ishikawa T, Tabata S, Onaka T, Oka S, Nakabo Y, Amakawa R, Matsui M, Moriguchi T, Takaori-Kondo A, Kadowaki N. Principal component analysis uncovers cytomegalovirus-associated NK cell activation in Ph+ leukemia patients treated with dasatinib. *Leukemia* 2017;31, 268.

Ito Y, Miyamoto T, Kamimura T, Aoki K, Henzan H, Aoki T, Shiratsuchi M, Kato K, Nagafuji K, Ogawa R, Eto T, Iwasaki H, Akashi K. Characteristics of patients with development of large granular lymphocyte expansion among dasatinib-treated patients with relapsed Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia after allogeneic stem cell transplantation. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2015 Mar;15(3):e47-54.

Iwasaki A, Medzhitov R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nat Immunol* 2015; 16:343–53.

Jakubzick C, Gautier EL, Gibbings SL, Sojka DK, Schlitzer A, Johnson TE, Ivanov S, Duan Q, Bala S, Condon T, van Rooijen N, Grainger JR, Belkaid Y, Ma'ayan A, Riches DWH, Yokoyama WM, Ginhoux F, Henson PM, Randolph GJ. Minimal differentiation of classical monocytes as they survey steady-state tissues and transport antigen to lymph nodes. *Immunity* 2013;39:599–610.

Janas ML, Hodgkin P, Hibbs M, Tarlinton D. Genetic Evidence for Lyn as a Negative Regulator of IL-4 Signaling. *J Immunol* October 15, 1999, 163 (8) 4192-4198.

Jo T, Noguchi K, Hayashi S, Irie S, Hayase R, Shioya H, Kaneko Y, Horio K, Taguchi J. Longlasting memory of cellular immunity in a chronic myeloid leukemia patient maintains molecular response 5 after cessation of dasatinib. *Oncol Lett* 2018;15,2935–2938.

Jostins L, Ripke S, Weersma RK, Duerr RH, McGovern DP, Hui KY, Lee JC, Schumm LP, Sharma Y, Anderson CA, Essers J, Mitrovic M, Ning K, Cleynen I, Theatre E, Spain SL, Raychaudhuri S, Goyette P, Wei Z, Abraham C, Achkar JP, Ahmad T, Amininejad L, Ananthakrishnan AN, Andersen V, Andrews JM, Baidoo L, Balschun T, Bampton PA, Bitton A, Boucher G, Brand S, Büning C, Cohain A, Cichon S, D'Amato M, De Jong D, Devaney KL, Dubinsky M, Edwards C, Ellinghaus D, Ferguson LR, Franchimont D, Franzen K, Geary R, Georges M, Gieger C, Glas J, Haritunians T, Hart A, Hawkey C, Hedl M, Hu X, Karlsten TH, Kupcinskis L, Kugathasan S, Latiano A, Laukens D, Lawrance IC, Lees CW, Louis E, Mahy G, Mansfield J, Morgan AR, Mowat C, Newman W, Palmieri O, Ponsioen CY, Potocnik U, Prescott NJ, Regueiro M, Rotter JI, Russell RK, Sanderson

JD, Sans M, Satsangi J, Schreiber S, Simms LA, Sventoraityte J, Targan SR, Taylor KD, Tremelling M, Verspaget HW, De Vos M, Wijmenga C, Wilson DC, Winkelmann J, Xavier RJ, Zeissig S, Zhang B, Zhang CK, Zhao H; International IBD Genetics Consortium (IBDGC), Silverberg MS, Annese V, Hakonarson H, Brant SR, Radford-Smith G, Mathew CG, Rioux JD, Schadt EE, Daly MJ, Franke A, Parkes M, Vermeire S, Barrett JC, Cho JH. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature* 491(7422):119–124.

June CH, Sadelain M. Chimeric Antigen Receptor Therapy. *N. Engl. J. Med* 2018;379, 64–73.

Kadowaki N, Ishiyama K, Kitawaki T. Cytomegalovirus pulls strings behind NK cells. *Oncotarget* 2017;8,93297–93298.

Kaisho T et Tanaka T. Turning NF- $\kappa$ B and IRFs on and off in DC. *Trends Immunol.* 2008. 29: 329–336.

Kalinski P, Urban J, Narang R, Berk E, Wieckowski E, Muthuswamy R. Dendritic cell-based therapeutic cancer vaccines: what we have and what we need. *Future Oncol.* 2009;5:379–90.

Kamel AM, Elsharkawy NM, Abdelfattah EK, Abdelfattah R, Samra MA, Wallace P, Mahmoud HK. IL12 and IFN $\gamma$  secretion by donor mononuclear cells in response to host antigens may predict acute GVHD after HSCT. *Immunobiology.* 2019 Sep;224(5):659-665.

Kantarjian HM, Shah NP, Cortes JE, Baccarani M, Agarwal MB, Undurraga MS, Wang J, Ipiña JJ, Kim DW, Ogura M, Pavlovsky C, Junghanss C, Milone JH, Nicolini FE, Robak T, Van Droogenbroeck J, Vellenga E, Bradley-Garelik MB, Zhu C, Hochhaus A. Dasatinib or imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia: 2-year follow-up from a randomized phase 3 trial (DASISION). *Blood.* 2012;119:1123–9.

Karamitros D, Stoilova B, Aboukhalil Z, Hamey F, Reinisch A, Samitsch M et al Single-cell analysis reveals the continuum of human lympho-myeloid progenitor cells. *Nat Immunol* 2017; 19:85–97.

Karlsson H, Svensson E, Gigg C, Jarvius M, Olsson-Strömberg U, Savoldo B, Dotti G, Loskog A. Evaluation of Intracellular Signaling Downstream Chimeric Antigen Receptors. *PLoS One* 2015.10, e0144787.

Kaur G, Gazit A, Levitzki A, Stowe E, Cooney DA, Sausville EA. Tyrphostin induced growth inhibition: correlation with effect on p210bcr-abl autokinase activity in K562 chronic myelogenous leukemia. *Anticancer Drugs*. 1994;5:213-222

Kim DH, Kamel-Reid S, Chang H, Sutherland R, Jung CW, Kim HJ, Lee JJ, Lipton JH. Natural killer or natural killer/T cell lineage large granular lymphocytosis associated with dasatinib therapy for Philadelphia chromosome positive leukemia. *Haematologica*. 2009 Jan;94(1):135-9.

Kim HJ, Song DE, Lim SY, Lee SH, Kang JL, Lee SJ, Benveniste EN, Choi YH. Loss of the promyelocytic leukemia protein in gastric cancer: Implications for IP-10 expression and tumor-infiltrating lymphocytes. *PLoS One* 2011, 6, e26264.

Kimura S. Current status of ABL tyrosine kinase inhibitors stop studies for chronic myeloid leukemia. *Stem Cell Investig*. 2016;3, 36.

Kimura S, Imagawa J, Murai K, Hino M, Kitawaki T, Okada M, Tanaka H, Shindo M, Kumagai T, Ikezoe T, Uoshima N, Sato T, Watanabe R, Kowata S, Hayakawa M, Hosoki T, Ikeda K, Kobayashi T, Kakinoki Y, Nishimoto T, Takezako N, Shibayama H, Takaori-Kondo A, Nakamae H, Kawaguchi A, Ureshino H, Sakamoto J, Ishida Y. Treatment-free remission after first-line dasatinib discontinuation in patients with chronic myeloid leukaemia (first-line DADI trial): a single-arm, multicentre, phase 2 trial. *Lancet Haematol*. 2020 Mar;7(3):e218-e225.

King AC, Pappacena JJ, Tallman MS, Park JH, Geyer MB. Blinatumomab administered concurrently with oral tyrosine kinase inhibitor therapy is a well-tolerated consolidation strategy and eradicates measurable residual disease in adults with Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res*. 2019 Apr;79:27-33.

Kirman JR, Quinn KM, Seder RA. Immunological memory. *Immunol Cell Biol*. 2019 Aug;97(7):615-616.

Klechevsky E. Functional Diversity of Human Dendritic Cells. *Adv Exp Med Biol*. 2015;850:43-54.

Konopka JB, Watanabe SM, Witte ON. An alteration of the human c-abl protein in K562 leukemia cells unmask associated tyrosine kinase activity. *Cell*. 1984;37:1035-1042



Kuka M, Baronio R, Valentini S, Monaci E, Muzzi A, Aprea S, De Gregorio E, D'oro U. Src kinases are required for a balanced production of IL-12/IL-23 in human dendritic cells activated by Toll-like receptor agonists. *PLoS One*. 2010;5:e11491

Krebs DL, Chehal MK, Sio A, Huntington ND, Da ML, Ziltener P, Inglese M, Kountouri N, Priatel JJ, Jones J, Tarlinton DM, Anderson GP, Hibbs ML, Harder KW. Lyn-Dependent Signaling Regulates the Innate Immune Response by Controlling Dendritic Cell Activation of NK Cells. *J Immunol* May 15, 2012, 188 (10) 5094-5105.

Kreutzman A, Juvonen V, Kairisto V, Ekblom M, Stenke L, Seggewiss R, Porkka K, Mustjoki S. Mono/oligoclonal T and NK cells are common in chronic myeloid leukemia patients at diagnosis and expand during dasatinib therapy. *Blood*. 2010 Aug 5;116(5):772-82.

Kreutzman A, Rohon P, Faber E, Indrak K, Juvonen V, Kairisto V, Voglova J, Sinisalo M, Flochova E, Vakkila J, Arstila P, Porkka K, Mustjoki S. Chronic myeloid leukemia patients in prolonged remission following interferon- $\alpha$  monotherapy have distinct cytokine and oligoclonal lymphocyte profile. *PLoS One*. 2011;6(8):e23022

Kumar V, Garg M, Chaudhary N, Chandra AB. An observational study on risk of secondary cancers in chronic myeloid leukemia patients in the TKI era in the United States. *PeerJ*. 2018 Feb 12;6:e4342.

Kurzrock R, Gutterman JU, Talpaz M. The molecular genetics of Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N Engl J Med*. 1988;319:990-998

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227:680-685.

Lafaille FG, Pessach IM, Zhang SY, Ciancanelli MJ, Herman M, Abhyankar A et al Impaired intrinsic immunity to HSV-1 in human iPSC-derived TLR3-deficient CNS cells. *Nature* 2012; 491:769–73.

Langerhans P. Über die Nerven der menschlichen Haut. *Virchows Archiv* 1868;44:325-337

Laoui D, Keirsse J, Morias Y, Van Overmeire E, Geeraerts X, Elkrim Y, Kiss M, Bolli E, Lahmar Q, Sichien D, Serneels J, Scott CL, Boon L, De Baetselier P, Mazzone M, Guillems M, Van Ginderachter JA. The tumour microenvironment harbours ontogenically

distinct dendritic cell populations with opposing effects on tumour immunity. *Nat Commun.* 2016;7:13720.

Lau AF, Krzyzek RA, Faras AJ. Loss of tumorigenicity correlates with a reduction in pp60src kinase activity in a revertant subclone of avian sarcoma virus-infected field vole cells. *Cell.* 1981;23:815-823

Lee SJ, Jung CW, Kim DY, Lee KH, Sohn SK, Kwak JY, Kim HJ, Kim IH, Park S, Kim DHD. Retrospective multicenter study on the development of peripheral lymphocytosis following second-line dasatinib therapy for chronic myeloid leukemia. *Am. J. Hematol.* 2011;86 (4), 346–350.

León B, López-Bravo M, Ardavín C. Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against *Leishmania*. *Immunity.* 2007 Apr;26(4):519-31. *Blood.* 2020 Sep 8;blood.2020005655

Levêque D, Becker G, Bilger K, Natarajan-Amé S. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Dasatinib. *Clin Pharmacokinet.* 2020 Jul;59(7):849-856.

Levinson AD, Oppermann H, Levintow L, Varmus HE, Bishop JM. Evidence that the transforming gene of avian sarcoma virus encodes a protein kinase associated with a phosphoprotein. *Cell.* 1978;15:561-572

Levitzki A, Gazit A. Tyrosine kinase inhibition: an approach to drug development. *Science.* 1995;267:1782-1788

Li Z, Ju X, Silveira PA, Abadir E, Hsu WH, Hart DNJ, Clark GJ. CD83: Activation Marker for Antigen Presenting Cells and Its Therapeutic Potential. *Front Immunol.* 2019 Jun 7;10:1312.

Linsley PS, Brady W, Urnes M, Grosmaire LS, Damle NK, Ledbetter JA. CTLA-4 is a second receptor for the B-cell activation antigen B7. *J Exp Med.* 1991;174(3):561–569.

Linsley PS, Wallace PM, Johnson J, et al. Immunosuppression in vivo by a soluble form of the CTLA-4 T-cell activation molecule. *Science.* 1992;257(5071):792–795.

Liu S, Cai X, Wu J, Cong Q, Chen X, Li T et al Phosphorylation of innate immune adaptor proteins MAVS, STING, and TRIF induces IRF3 activation. *Science* 2015; 347:aaa2630.

Lombardi MS, Gilliéron C, Dietrich D, Gabay C. SIK inhibition in human myeloid cells modulates TLR and IL-1R signaling and induces an anti-inflammatory phenotype. *J Leukoc Biol.* 2016 May;99(5):711-21.

Lombardo LJ, Lee FY, Chen P, Norris D, Barrish JC, Behnia K, Castaneda S, Cornelius LA, Das J, Doweiko AM, Fairchild C, Hunt JT, Inigo I, Johnston K, Kamath A, Kan D, Klei H, Marathe P, Pang S, Peterson R, Pitt S, Schieven GL, Schmidt RJ, Tokarski J, Wen ML, Wityak J & Borzilleri RM. 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.* 2004;47:6658-6661

Lowe DB, Bose A, Taylor JL, Tawbi H, Lin Y, Kirkwood JM, Storkus WJ. Dasatinib promotes the expansion of a therapeutically superior T-cell repertoire in response to dendritic cell vaccination against melanoma. *Oncoimmunology* 2014;3(1):e27589.

Lowell CA. Src-family kinases: rheostats of immune cell signaling. *Mol Immunol.* 2004;41:631-643

Lowell CA. Src-family and Syk kinases in activating and inhibitory pathways in innate immune cells: signaling cross talk. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011;3

Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD, Xia B. CD4+ T-cells: Differentiation and functions. *Clin. Develop. Immun.* 2012, 2012, doi:10.1155/2012/925135.

Lugo TG, Pendergast AM, Muller AJ, Witte ON. Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. *Science* 1990;247:1079-1082

Lutz MB, Strobock H, Schuler G, Romani N. GM-CSF Monocyte-Derived Cells and Langerhans Cells As Part of the Dendritic Cell Family. *Front Immunol.* 2017 Oct 23;8:1388.

Ma DY, Clark EA. The role of CD40 and CD154/CD40L in dendritic cells. *Semin Immunol.* 2009 Oct;21(5):265-72.

Ma YJ, He M, Han JA, Yang L, Ji XY. A clinical study of HBsAg-activated dendritic cells and cytokine-induced killer cells during the treatment for chronic hepatitis B. *Scand J Immunol.* 2013;78(4):387-93.

Manz MG, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL, Akashi K. Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors. *Blood* 2001;97:3333-41.

Martinelli G, Dombret H, Chevallier P, Ottmann O, Goekbuget N, Topp MS, Fielding AK, Rambaldi A, Ritchie EK, Papayannidis C, Sterling LR, Benjamin J, Stein A. Complete molecular and hematologic response in adult patients with relapsed/refractory (R/R) Philadelphia chromosome-positive B-precursor acute lymphoblastic leukemia (ALL) following treatment with blinatumomab: results from a phase 2 singlearm, multicenter study (ALCANTARA). *Blood*. 2015;126:679.

Marx JL. Cancer gene research wins medicine Nobel. *Science*. 1989;246:326-327

Masson K, Heiss E, Band H, Rönstrand L. Direct binding of Cbl to Tyr568 and Tyr936 of the stem cell factor receptor/c-Kit is required for ligand-induced ubiquitination, internalization and degradation. *Biochem J*. 2006 Oct 1;399(1):59-67.

Matte CC, Liu J, Cormier J, Anderson BE, Athanasiadis I, Jain D, McNiff J, Shlomchik WD. Donor APCs are required for maximal GVHD but not for GVL. *Nat Med* 2004;10:987–92

Mauri C, Bosma A: Immune regulatory function of B cells. *Annu Rev Immunol*. 2012;30:221–41.

McGovern N, Schlitzer A, Gunawan M, Jardine L, Shin A, Poyner E et al Human dermal CD14<sup>+</sup> cells are a transient population of monocyte-derived macrophages. *Immunity* 2014; 41:465–77.

Merad M, Sathe P, Helft J, Miller J, Mortha A. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu Rev Immunol*. 2013; 31:563–604.

Mestermann K, Giavridis T, Weber J, Rydzek J, Frenz S, Nerreter T, Mades A, Sadelain M, Einsele H, Hudecek M. The tyrosine kinase inhibitor dasatinib acts as a pharmacologic on/off switch for CAR-T cells. *Sci Transl Med*. 2019 Jul 3;11(499):eaau5907.

Miletić A, Krmpotić A, Jonjić S. The evolutionary arms race between NK cells and viruses: who gets the short end of the stick? *Eur J Immunol*. 2013 Apr;43(4):867-77.

Mitchell D, Chintala S, Dey M. Plasmacytoid dendritic cell in immunity and cancer. *J Neuroimmunol*. 2018 Sep 15;322:63-73.

Mustjoki S, Auvinen K, Kreutzman A, Rousselot P, Hernesniemi S, Melo T, Lahesmaa-Korpinen AM, Hautaniemi S, Bouchet S, Molimard M, Smykla R, Lee FY, Vakkila J,

Jalkanen S, Salmi M, Porkka K. Rapid mobilization of cytotoxic lymphocytes induced by dasatinib therapy. *Leukemia*. 2013 Apr;27(4):914-24.

Mustjoki S, Ekblom M, Arstila TP, Dybedal I, Epling-Burnette PK, Guilhot F, Hjorth-Hansen H, Höglund M, Kovanen P, Laurinolli T, Liesveld J, Paquette R, Pinilla-Ibarz J, Rauhala A, Shah N, Simonsson B, Sinisalo M, Steegmann JL, Stenke L, Porkka K. Clonal expansion of T/NK-cells during tyrosine kinase inhibitor dasatinib therapy. *Leukemia*. 2009 Aug;23(8):1398-405.

Mustjoki S, Hernesniemi S, Rauhala A, Kähkönen M, Almqvist A, Lundán T, Porkka K. A novel dasatinib-sensitive RCSD1-ABL1 fusion transcript in chemotherapy-refractory adult pre-B lymphoblastic leukemia with t(1;9)(q24;q34). *Haematologica*. 2009 Oct;94(10):1469-71.

Nagata Y, Ohashi K, Fukuda S, Kamata N, Akiyama H, Sakamaki H. Clinical features of dasatinib-induced large granular lymphocytosis and pleural effusion. *Int. J. Hematol*. 2010.91 (5), 799–807.

Napolitani G, Bortoletto N, Racioppi L, Lanzavecchia A & D'oro U. Activation of src-family tyrosine kinases by LPS regulates cytokine production in dendritic cells by controlling AP-1 formation. *Eur J Immunol*. 2003;33:2832-2841

Neelapu SS, Tummala S, Kebriaei P, Wierda W, Gutierrez C, Locke FL, Komanduri KV, Lin Y, Jain N, Daver N, Westin J, Gulbis AM, Loghin ME, de Groot JF, Adkins S, Davis SE, Rezvani K, Hwu P, Shpall EJ. Chimeric antigen receptor T-cell therapy - assessment and management of toxicities. *Nat. Rev. Clin. Oncol* 2018.15, 47–62.

Nerreter T, Köchel C, Jesper D, Eichelbrönner I, Putz E, Einsele H, Seggewiss-Bernhardt R. Dasatinib enhances migration of monocyte-derived dendritic cells by reducing phosphorylation of inhibitory immune receptors Siglec-9 and Siglec-3. *Exp. Hematol*. 2014;773-82

Netea MG , Domínguez-Andrés J, Barreiro LB, Chavakis T, Divangahi M, Fuchs E, Joosten LAB, van der Meer JW, Mhlanga MM, Mulder WJM, Riksen NP, Schlitzer A, Schultze JL, Stabell Benn C, Sun JC, Xavier RJ, Latz E. Defining trained immunity and its role in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2020 Jun;20(6):375-388.

Netea MG, van der Meer JW. Trained Immunity: An Ancient Way of Remembering. *Cell Host Microbe*. 2017 Mar 8;21(3):297-300.

Nicaise C, Wang S, Roy A, et al. Dasatinib pharmacokinetics and ex-posure–response (E-R): relationships to efficacy and safety in patients with chronic myelogenous leukemia in chronic phase (CML-CP) [abstract no.1098]. 13th EHA Congress; 2008 Jun 12-15; Copenhagen

Notta F, Zandi S, Takayama N, Dobson S, Gan OI, Wilson G, Kaufmann KB, McLeod J, Laurenti E, Dunant CF, McPherson JD, Stein LD, Dror Y, Dick JE. Distinct routes of lineage development reshape the human blood hierarchy across ontogeny. *Science*. 2016 Jan 8;351(6269):aab2116.

Norelli M, Camisa B, Barbiera G, Falcone L, Purevdoij A, Genua M, Sanvito F, Ponzoni M, Doglioni C, Cristofori P, Traversari C, Bordignon C, Ciceri F, Ostuni R, Bonini C, Casucci M, Bondanza A. Monocyte-derived IL-1 and IL-6 are differentially required for cytokine-release syndrome and neurotoxicity due to CAR T cells. *Nat Med*. 2018 Jun;24(6):739-748.

Oeckinghaus A, Hayden MS, Ghosh S. Crosstalk in NF-kappaB signaling pathways. *Nature immunology*. 2011;12:695–708.

Okada M, Imagawa J, Tanaka H, Nakamae H, Hino M, Murai K, Ishida Y, Kumagai T, Sato S, Ohashi K, Sakamaki H, Wakita H, Uoshima N, Nakagawa Y, Minami Y, Ogasawara M, Takeoka T, Akasaka H, Utsumi T, Uike N, Sato T, Ando S, Usuki K, Mizuta S, Hashino S, Nomura T, Shikami M, Fukutani H, Ohe Y, Kosugi H, Shibayama H, Maeda Y, Fukushima T, Yamazaki H, Tsubaki K, Kukita T, Adachi Y, Nataduka T, Sakoda H, Yokoyama H, Okamoto T, Shirasugi Y, Onishi Y, Nohgawa M, Yoshihara S, Morita S, Sakamoto J, Kimura S. Final 3-year Results of the Dasatinib Discontinuation Trial in Patients With Chronic Myeloid Leukemia Who Received Dasatinib as a Second-line Treatment. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2018 May;18(5):353-360.e1.

O'Sullivan B, Thomas R. Recent advances on the role of CD40 and dendritic cells in immunity and tolerance. *Curr Opin Hematol*. 2003 Jul;10(4):272-8.

Otieno-Odhiambo P, Wasserman S, Hoving JC. The Contribution of Host Cells to Pneumocystis Immunity: An Update. *Pathogens*. 2019 Apr 19;8(2):52.

Park BS et Lee JO. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. *Exp Mol Med*. 2013 Dec 6;45(12):e66.

Park JH, Rivière I, Gonen M, Wang X, Sénéchal B, Curran KJ, Sauter C, Wang Y, Santomasso B, Mead E, Roshal M, Maslak P, Davila M, Brentjens RJ, Sadelain M. Long-Term Follow-up of CD19 CAR Therapy in Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med*. 2018 Feb 1;378(5):449-459.

Paul F, Arkin Y, Giladi A, Jaitin DA, Kenigsberg E, Keren-Shaul H et al Transcriptional heterogeneity and lineage commitment in myeloid progenitors. *Cell* 2015; 163:1663–77.

Pene J, Chevalier S, Preisser L, Venereau E, Guilleux MH, Ghannam S, Moles JP, Danger Y, Ravon E, Lesaux S, Yssel H, Gascan H. Chronically inflamed human tissues are infiltrated by highly differentiated Th17 lymphocytes. *J. Immunol*. 2008, 180, 7423–7430.

Perugini M, Brown AL, Salerno DG, Booker GW, Stojkoski C, Hercus TR, Lopez AF, Hibbs ML, Gonda TJ, D'Andrea RJ. Alternative modes of GM-CSF receptor activation revealed using activated mutants of the common beta-subunit. *Blood* 2010;115:3346–53.

Prestes DP, Arbona E, Nevett-Fernandez A, Woolley AE, Ho VT, Koo S, Baden LR, Koreth J, Hammond SP, Issa NC, Marty FM. Dasatinib Use and Risk of Cytomegalovirus Reactivation After Allogeneic Hematopoietic-Cell Transplantation. *Clin Infect Dis*. 2017 Aug 1;65(3):510-513.

Pulendran B, Tang H, Manicassamy S. *Nat Immunol*. Vol. 11. Nature Publishing Group; 2010. Programming dendritic cells to induce T(H)2 and tolerogenic responses; pp. 647–55.

Qui ZY, Xu W, Li JY. Large granular lymphocytosis during dasatinib therapy. *Cancer Biol Ther*. 2014 Mar 1;15(3):247-55.

Ravandi F, O'Brien S, Thomas D, Faderl S, Jones D, Garris R, Dara S, Jorgenson J, Kebriaei P, Champlin R, Borthakur G, Burger J, Ferrajoli A, Garcia-Manero, G, Wierda W, Cortes J, Kantarjan H. First report of phase 2 study of dasatinib with hyper-CVAD for the frontline treatment of patients with Philadelphia chromosome-positive (Ph+) acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2010;116:2070-7.

Rivera-Torres J and San Jose E. Src Tyrosine Kinase Inhibitors: New Perspectives on Their Immune, Antiviral, and Senotherapeutic Potential. *Front Pharmacol*. 2019 Sep 18;10:1011.

Rix U, Hantschel O, Durnberger G, Remsing Rix LL, Planyavsky M, Fernbach NV, Kaupe I, Bennett KL, Valent P, Colinge J, Kocher T & Superti-Furga G. Chemical proteomic profiles of the BCR-ABL inhibitors imatinib, nilotinib, and dasatinib reveal novel kinase and nonkinase targets. *Blood*. 2007;110:4055-4063

Rodriguez GH, Ahmed SI, Al-akhrass F, Rallapalli V, Safdar A. Characteristics of, and risk factors for, infections in patients with cancer treated with dasatinib and a brief review of other complications. *Leuk Lymphoma*. 2012 Aug;53(8):1530-5.

Ronnstrand L. Signal transduction via the stem cell factor receptor/c-Kit. *Cell Mol Life Sci*. 2004; 61:2535–2548.

Rousselot P, Coude MM, Gokbuget N, Passerini CG, Hayette S, Cayuela JM, Huguet F, Leguay T, Chevallier P, Salanoubat C, Bonmati C, Alexis M, Hunault M, Glaisner S, Agape P, Berthou C, Jourdan E, Fernandes J, Sutton L, Banos A, Reman O, Lioure B, Thomas X, Ifrah N, Lafage-Pochitaloff M, Bornand A, Morisset L, Robin V, Pfeifer H, Delannoy A, Ribera J, Bassan R, Delord M, Hoelzer D, Dombret H, Ottmann OG. Dasatinib and low-intensity chemotherapy in elderly patients with Philadelphia chromosome-positive ALL. *Blood* 2016;128:774-82.

Ruffell B, Chang-Strachan D, Chan V, Rosenbusch A, Ho CMT, Pryer N, Daniel D, Hwang ES, Rugo HS, Coussens LM. Macrophage IL-10 blocks CD8+ T cell-dependent responses to chemotherapy by suppressing IL-12 expression in intratumoral dendritic cells. *Cancer Cell*. 2014 November 10; 26(5): 623–637.

Rydzek J, Nerreter T, Peng H, Jutz S, Leitner J, Steinberger P, Einsele H, Rader C, Hudecek M, Chimeric Antigen Receptor Library Screening Using a Novel NF- $\kappa$ B/NFAT Reporter Cell Platform. *Mol. Ther* 2019.27, 287–299.

Ryu KY, Lee HJ, Woo H, Kang RJ, Han KM, Park H, Lee SM, Lee JY, Jeong YJ, Nam HW, Nam Y, Hoe HS. Dasatinib regulates LPS-induced microglial and astrocytic neuroinflammatory responses by inhibiting AKT/STAT3 signaling. *J Neuroinflammation*. 2019 Oct 26;16(1):190.

Sabado RL, Bhardwaj N. Directing dendritic cell immunotherapy towards successful cancer treatment. *Immunotherapy*. 2010;2:37–56.4.

Sabatos-Peyton CA, Verhagen J, Wraith DC: Antigen-specific immunotherapy of autoimmune and allergic diseases. *Curr Opin Immunol*. 2010;22(5):609–15.



Sadelain M, Rivière I, Riddell S. Therapeutic T cell engineering. *Nature* 2017;545, 423–431

Salih J, Hilpert J, Placke T, Grünebach F, Steinle A, Salih HR, Krusch M. The BCR/ABL-inhibitors imatinib, nilotinib and dasatinib differentially affect NK cell reactivity. *Int J Cancer*. 2010 Nov 1;127(9):2119-28.

Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte-macrophage-colony-stimulation factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor  $\alpha$ . *J. Exp. Med.* 1994;179:1109-1118.

Saravia J, Chapman NM, Chi H. Helper T cell differentiation. *Cell Mol Immunol*. 2019 Jul;16(7):634-643.

Sasaki K, Jabbour EJ, Ravandi F, Short NJ, Thomas D, Garcia-Manero G, Daver N, Kadia T, Konopleva M, Jain N, Issa GC, Jeanis V, Moore G, Garris R, Pemmaraju N, Cortes JE, O'Brien S, Kantarjian H. Hyper-CVAD plus ponatinib versus hyper-CVAD plus dasatinib as frontline therapy for patients with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: A propensity score analysis. *Cancer*. 2016;122:3650-3656.

Sato N, Narita M, Takahashi M, Yagisawa K, Liu A, Abe T, Nikkuni K, Furukawa T, Toba K, Aizawa Y. The effects of STI571 on antigen presentation of dendritic cells generated from patients with chronic myelogenous leukemia. *Hematol Oncol*. 2003;21(2):67-75.

Satpathy AT, Wu X, Albring JC, Murphy KM. Re(de)fining the dendritic cell lineage. *Nat Immunol* 2012;13:1145–54.

Scapini P, Pereira S, Zhang H, Lowell CA. Multiple roles of Lyn kinase in myeloid cell signaling and function. *Immunol Rev*. 2009 Mar;228(1):23-40.

Schade AE, Schieven GL, Townsend R, Jankowska AM, Susulic V, Zhang R, Szpurka H, Maciejewski JP. Dasatinib, a small-molecule protein tyrosine kinase inhibitor, inhibits T-cell activation and proliferation. *Blood* 2008;111(3):1366-77

Schmid I, Krall WJ, Uittenbogaart CH, Braun J, Giorgi JV. Dead cell discrimination with 7-amino-actinomycin D in combination with dual color immunofluorescence in single laser flow cytometry. *Cytometry* 1992;132,04–208.

Schmid I, Uittenbogaart CH, Giorgi JV. Sensitive method for measuring apoptosis and cell surface phenotype in human thymocytes by flow cytometry. *Cytometry* 1995;151, 12–20.

Schmitt N, Ueno H. Regulation of human helper T cell subset differentiation by cytokines. *Curr Opin Immunol.* 2015 Jun;34:130-6.

Schuler G, Steinman RM. Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro. *J Exp Med.* 1985;161(3):526-46.

Schülke S. Induction of Interleukin-10 Producing Dendritic Cells As a Tool to Suppress Allergen-Specific T Helper 2 Responses. *Front Immunol.* 2018 Mar 19;9:455.

Schwarzlich MA, Gutknecht M, Salih J, Salih HR, Brossart P, Rittig SM, Grunebach F. The immune inhibitory receptor osteoactivin is upregulated in monocyte-derived dendritic cells by BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Immunol Immunother.* 2012;61:193-202

Segura E, Amigorena S. Inflammatory dendritic cells in mice and humans. *Trends Immunol.* 2013; 34(9):440–5.

Segura E, Touzot M, Bohineust A, Cappuccio A, Chiochia G, Hosmalin A, Dalod M, Soumelis V, Amigorena S. Human inflammatory dendritic cells induce Th17 cell differentiation. *Immunity.* 2013; 38(2):336–48.

Shih VF, Davis-Turak J, Macal M, et al. Control of RelB during dendritic cell activation integrates canonical and noncanonical NF- $\kappa$ B pathways. *Nat Immunol.* 2012;13(12):1162-1170. doi:10.1038/ni.2446

Shinichiro I, Yashuhiro N, Seiya S, Akira Y, Mitsutoshi M, Katsuyuki Y, Heiichiro U, Susumu E, Tahaschi K. Dendritic Cells Loaded with Tumor Antigen with Heat-shock Cognate Protein-70. *Anticancer Research* 2012;32:4897-4904

Shlomchik WD. Graft-versus-host disease. *Nat Rev Immunol* 2007;7:340–52

Shlomchik WD, Couzens MS, Tang CB, McNiff J, Robert ME, Liu J, Shlomchik MJ, Emerson SG. Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. *Science* 1999;285:412–5

Simonetti S, Seijas ABB, Natalini A, Vitale S, Runci D, Soriani A, Di Virgilio A, Aricò E, Gabriele L, Santoni A, Di Rosa F. Dendritic cells modulate c-kit expression on the edge between activation and death. *Eur J Immunol*. 2019 Apr;49(4):534-545.

Smolinska MJ, Horwood NJ, Page TH, Smallie T, Foxwell BM. Chemical inhibition of Src family kinases affects major LPS-activated pathways in primary human macrophages. *Mol Immunol* 2008;45: 990–1000.

Sokol CL, Luster AD: The chemokine system in innate immunity. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2015;7:a016303.

Solano-Gálvez SG, Tovar-Torres SM, Tron-Gómez MS, Weiser-Smeke AE, Álvarez-Hernández DA, Franyuti-Kelly GA, Tapia-Moreno M, Ibarra A, Gutiérrez-Kobeh L, Vázquez-López R. Human Dendritic Cells: Ontogeny and Their Subsets in Health and Disease. *Med Sci (Basel)*. 2018;6(4).

Song HK et Hwang DY. Use of C57BL/6N mice on the variety of immunological researches. *Lab Anim Res*. 2017;33(2):119-123.

Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med*. 1973;137:1142-1162

Steinman RM, Banchereau J. Taking dendritic cells into medicine. *Nature*. 2007;449:419–26.

Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2003; 21:685–711.

Steinman RM, Nussenzweig MC. Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:351–8.

Sundberg TB, Choi HG, Song JH, Russell CN, Hussain MM, Graham DB, Khor B, Gagnon J, O'Connell DJ, Narayan K, Dancik V, Perez JR, Reinecker HC, Gray NS, Schreiber SL, Xavier RJ, Shamji AF. Small-molecule screening identifies inhibition of salt-inducible kinases as a therapeutic strategy to enhance immunoregulatory functions of dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(34):12468-73

Swiecki M, Colonna M. The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells. *Nat Rev Immunol* 2015; 15:471–85.

Taguchi T et Mukai K. Innate immunity signalling and membrane trafficking. *Curr Opin Cell Biol.* 2019 Aug;59:1-7.

Tanaka H, Nakashima S, Usuda M. Rapid and sustained increase of large granular lymphocytes and rare cytomegalovirus reactivation during dasatinib treatment in chronic myelogenous leukemia patients. *Int J Hematol.* 2012 Sep;96(3):308-19.

Tang-Huau TL, Segura E. Human in vivo-differentiated monocyte-derived dendritic cells. *Semin Cell Dev Biol.* 2019 Feb;86:44-49.

Takaku T, Iriyama N, Mitsumori T, Sato E, Gotoh A, Kirito K, Noguchi M, Koike M, Sakamoto J, Oba K, Komatsu N. Clinical efficacy and safety of first-line dasatinib therapy and the relevance of velocity of BCR-ABL1 transcript decline for achievement of molecular responses in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia: report from the juntendo yamanashi cooperative study group. *Oncology* 2018;94, 85–91.

Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 2010; 140:805–20.

Teng MW, Bowman EP, McElwee JJ, Smyth MJ, Casanova JL, Cooper AM, Cua DJ. IL-12 and IL-23 cytokines: from discovery to targeted therapies for immune-mediated inflammatory diseases. *Nat Med.* 2015;21:719–29.

Terhune J, Berk E, Czerniecki BJ. Dendritic Cell-Induced Th1 and Th17 Cell Differentiation for Cancer Therapy. *Vaccines (Basel).* 2013 Nov 21;1(4):527-49.

Teshima T, Ordemann R, Reddy P, Gagin S, Liu C, Cooke KR, Ferrara JLM. Acute graft-versus-host disease does not require alloantigen expression on host epithelium. *Nat Med* (2002) 8:575–81

Thurner B, Röder C, Dieckmann D, Heuer M, Kruse M, Glaser A, Keikavoussi P, Kämpgen E, Bender A, Schuler G. Generation of large numbers of fully mature and stable dendritic cells from leukapheresis products for clinical application. *J Immunol Methods.* 1999 Feb 1;223(1):1-15.

Torres-Aguilar H, Aguilar-Ruiz SR, González-Pérez G, Munguía R, Bajaña S, Meraz-Ríos Ma, et al. Tolerogenic dendritic cells generated with different immunosuppressive cytokines induce antigen-specific anergy and regulatory properties in memory CD4+ T cells. *J Immunol.* 2010;184:1765–75.

Trombetta ES, Mellman I. Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu Rev Immunol.* 2005; 23:975–1028.

Truxova I, Kasikova L, Hensler M, Skapa P, Laco J, Pecen L, Belicova L, Praznovec I, Halaska MJ, Brtnicky T, Salvoka E, Rob L, Kodet R, Goc J, Sautes-Fridman C, Fridman WH, Ryska A, Galluzzi L, Spisek R, Fucikova J. Mature dendritic cells correlate with favorable immune infiltrate an improved prognosis in ovarian carcinoma patients. *J Immunother Cancer.* 2018;6(1):139.

Turtle CJ, Hanafi L-A, Berger C, Hudecek M, Pender B, Robinson E, Hawkins R, Chaney C, Cherian S, Chen X, Soma L, Wood B, Li D, Heimfeld S, Riddell SR, Maloney DG. Immunotherapy of non-Hodgkin's lymphoma with a defined ratio of CD8+ and CD4+ CD19-specific chimeric antigen receptor-modified T cells., *Sci. Transl. Med* 2016.8, 355ra116

Tyznik AJ, Verma S, Wang Q, Kronenberg M, Benedict CA. Distinct requirements for activation of NKT and NK cells during viral infection. *J Immunol.* 2014 Apr 15;192(8):3676-85.

Van Brussel I, Berneman ZN, Cools N. Optimizing dendritic cellbased immunotherapy: tackling the complexity of different arms of the immune system. *Mediat Inflamm.* 2012;2012:1–14.

van der Meer JW, Joosten LA, Riksen N, Netea MG: Trained immunity: a smart way to enhance innate immune defence. *Mol Immunol* 2015;68:40-44.

van Panhuys N, Prout M, Forbes E, Min B, Paul WE, Le Gros G. Basophils are the major producers of IL-4 during primary helminth infection. *J. Immunol.* 2011, 186, 2719–2728.

Vander Lugt B, Riddell J, Khan AA, Hackney JA, Lesch J, DeVoss J, Weirauch MT, Singh H, Mellman I. Transcriptional determinants of tolerogenic and immunogenic states during dendritic cell maturation. *J Cell Biol* 2017;216(3):779–92.

Veglia F, Gabrilovich DI. Dendritic cells in cancer: the role revisited. *Curr Opin Immunol.* 2017 Apr;45:43-51.

Velten L, Haas SF, Raffel S, Blaszkiewicz S, Islam S, Hennig BP et al Human haematopoietic stem cell lineage commitment is a continuous process. *Nat Cell Biol* 2017; 19:271–81.

Verma R, Balakrishnan L, Sharma K, Khan AA, Advani J, Gowda H, et al. A network map of Interleukin-10 signaling pathway. *J Cell Commun Signal* 2016;10:61–7.

Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled annexin V. *J. Immunol. Methods* 1995;184 1 , 39–51.

Waisman A, Lukas D, Clausen BE, Yogev N. Dendritic cells as gatekeepers of tolerance. *Semin Immunopathol.* 2017 Feb;39(2):153-163.

Walker LSK, Sansom DM. Confusing signals: Recent progress in CTLA-4 biology. *Trends Immunol* 2015;36(2):63–70.

Weber EV, Lynn RC, Sotillo E, Lattin J, Xu P, Mackall CL. Pharmacologic control of CAR-T cell function using dasatinib. *Blood Adv.* 2019 Mar 12;3(5):711-717.

Wehner R, Dietze K, Bachmann M, Schmitz M. The bidirectional crosstalk between human dendritic cells and natural killer cells. *J Innate Immun.* 2011;3(3):258-63.

Weichsel R, Dix C, Wooldridge L, Clement M, Fenton-May A, Sewell AK, Zezula J, Greiner E, Gostick E, Price DA, Einsele H, Seggewiss R. Profound inhibition of antigen-specific T-cell effector functions by dasatinib. *Clin Cancer Res* 2008;14(8):2484-91

Weisberg E, Manley PW, Cowan-Jacob SW, Hochhaus A, Griffin JD. Second generation inhibitors of BCR-ABL for the treatment of imatinib-resistant chronic myeloid leukaemia. *Nat Rev Cancer* 2007;7:345-56

Wölfel M, Langhammer F, Wiegering V, Eyrich M, Schlegel PG. Dasatinib medication causing profound immunosuppression in a patient after haploidentical SCT: functional assays from whole blood as diagnostic clues. *Bone Marrow Transplant.* 2013 Jun;48(6):875-7.

Wölfel M, Schwinn S, Yoo YE, Ress ML, Braun M, Chopra M, Schreiber SC, Ayala VI, Ohlen C, Eyrich M, Beilhack A, Schlegel PG. Src-kinase inhibitors sensitize human cells of myeloid origin to Toll-likereceptor-induced interleukin 12 synthesis. *Blood.* 2013;122:1203-1213

Wu M, Zhang L, Zhang H, Ning J, Tu S, He Y, Li Y. CD19 chimeric antigen receptor-redirected T cells combined with epidermal growth factor receptor pathway substrate 8 peptide-derived dendritic cell vaccine in leukemia. *Cytotherapy.* 2019 Jun;21(6):659-670.

Xi CX, Xiong F, Zhou Z, Mei L, Xiong WC. PYK2 interacts with MyD88 and regulates MyD88-mediated NF- $\kappa$ B activation in macrophages. *J Leukoc Biol* 2010;87(3):415–23.

Xiaojing M, Wenjun Y, Hua Z, Qinglin D, Lixing T, Yi B, Na L, Fang W. Regulation of IL-10 and IL-12 production and function in macrophages and dendritic cells. Version 1. *F1000Res*. 2015; 4: F1000 Faculty Rev-1465.

Xu Y, Zhan Y, Lew AM, Naik SH, Kershaw MH. Differential development of murine dendritic cells by GM-CSF versus Flt3 ligand has implications for inflammation and trafficking. *J Immunol* 2007;179:7577–84.

Yanmei H, Zubo C, Yuan Y, Zhengping J, Yan G, Yangfang L, Chuan L, Zeya P, Yizhi Y, Minghong J, Weiping Z & Xueta C. Human CD14<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup> Regulatory Dendritic Cells Suppress T-Cell Response by Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen-4-Dependent IL-10 and Indoleamine-2,3-Dioxygenase Production in Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology*, 2014;59(2):567-79

Yin X, Yu H, Jin X, Li J, Guo H, Shi Q et al Human blood CD1c<sup>+</sup> dendritic cells encompass CD5<sup>high</sup> and CD5<sup>low</sup> subsets that differ significantly in phenotype, gene expression, and functions. *J Immunol* 2017; 198:1553–64.

Zanoni I, Granucci F. Regulation of antigen uptake migration and lifespan of dendritic cell by Toll-like receptors. *J Mol Med (Berl)* 2010. 88:873–880.

Zembower TR. Epidemiology of infections in cancer patients. *Cancer Treat Res*. 2014;161:43–89.

Zhang Z, Meng Y, Guo Y, He X, Li'u Q, Wan'g X, et al. *Rehmannia glutinosa* polysaccharide induces maturation of murine bone marrow derived Dendritic cells (BMDCs) *International Journal of Biological Macromolecules*. 2013;54:136–43.

Zhu, X, Fallert-Junecko BA, Fujita M, Ueda R, Kohanbash G, Kastenhuber ER, McDonald HA, Liu Y, Kalinski P, Reinhart, TA, Salazar AM, Okada H. Poly-ICLC promotes the infiltration of effector T-cells into intracranial gliomas via induction of CXCL10 in IFN- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  dependent manners. *Cancer Immunol. Immunother.* 2010, 59, 1401–1409.

Zimmerman LM, Vogel LA, Bowden RM. Understanding the vertebrate immune system: insights from the reptilian perspective. *J Exp Biol* 2010; 213:661–71.

Zou J, Kawai T, Tsuchida T, Kozaki T, Tanaka H, Shin KS, Kumar H, Akira S. Poly IC triggers a cathepsin D- and IPS-1-dependent pathway to enhance cytokine production and mediate dendritic cell necroptosis. *Immunity* 2013. 38: 717–728.



## Appendix

### I. Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	<u>7</u> - <u>A</u> mino- <u>a</u> ctinomycin <u>D</u>
°C	Grad Celsius
μ	Mikro (x 10 <sup>-6</sup> )
Abb.	<u>A</u> bbildung
Ak	<u>A</u> nti <u>k</u> örper
ALL	<u>a</u> kute <u>l</u> ymphatische <u>L</u> eukämie
APZ	antigenpräsentierende Zelle („ <u>a</u> ntigen <u>p</u> resenting <u>c</u> ell“, APC)
APS	<u>A</u> mmonium <u>p</u> ersulfat
Aqua dest.	<u>A</u> qua <u>d</u> estillata (einfach destilliertes Wasser)
BC	Leukozytenfilm aus Vollblutspende („ <u>b</u> uffy <u>c</u> oat“)
BS	<u>B</u> ru <u>t</u> schrank (37°C, 5 % CO <sub>2</sub> )
BSA	<u>B</u> ovines <u>S</u> erum <u>a</u> lbumin
bspw.	<u>b</u> eis <u>s</u> piels <u>w</u> eise
CAR	chimärer Antigenrezeptor („ <u>c</u> himeric <u>a</u> ntigen <u>r</u> eceptor“)
CCyR	komplette zytogenetische Remission („ <u>c</u> omplete <u>c</u> ytogenetic <u>r</u> emission“)
CD	Differenzierungsmarker („ <u>c</u> luster of <u>d</u> ifferentiation“)
CML	<u>c</u> hronisch <u>m</u> yeloische <u>L</u> eukämie
CMV	<u>C</u> ytomegalie <u>v</u> irus
DZ	<u>d</u> endritische <u>Z</u> elle („dendritic cell“)
DMSO	<u>D</u> imethylsulfoxid

## Abkürzungsverzeichnis

ECL	verstärkte Chemielumineszenz („ <u>e</u> n <u>h</u> anced <u>c</u> hem <u>i</u> lum <u>i</u> nescence“)
EDTA	<u>E</u> thylend <u>a</u> min <u>t</u> etra <u>a</u> acetat
FACS	Durchflusszytometer (“ <u>f</u> luorescence <u>a</u> ctivated <u>c</u> ell <u>s</u> orter“)
FCS	fetales Kälberserum („ <u>f</u> etal <u>c</u> alf <u>s</u> erum“)
FITC	<u>F</u> luoresze <u>i</u> n <u>i</u> s <u>o</u> th <u>i</u> o <u>c</u> yanat
FSC	Vorwärtsstreulicht („ <u>f</u> orward <u>s</u> catter“)
g	Gramm
GM-CSF	<u>G</u> ranulocyte- <u>M</u> onocyte- <u>C</u> olony <u>S</u> timulating <u>F</u> actor
GvHD	Abstoßungsreaktion nach Stammzelltransplantation (“ <u>g</u> raft- <u>v</u> ersus- <u>h</u> ost- <u>d</u> isease“)
GvL	antileukämischer Effekt (“ <u>g</u> raft- <u>v</u> ersus- <u>l</u> eukemia“)
h	hora (lat.: Stunde)
HEPES	2-(4-(2- <u>H</u> ydroxy <u>e</u> thyl)-1-piperaziny)- <u>E</u> thansulfonsäure
Hu., hu.	human
iDZ	unreife dendritische Zelle („ <u>i</u> mmature <u>d</u> endritic <u>c</u> ell“)
IL	<u>I</u> nterleukin
INF	<u>I</u> nterferon
Kap.	<u>K</u> apitel
KM-DZ	aus <u>K</u> nochen <u>m</u> ark gewonnene <u>d</u> endritische <u>Z</u> ellen
KS	<u>K</u> ühl <u>s</u> chrank (4°C)
l	<u>L</u> iter
LGL	große granulierte Lymphozyten (“ <u>l</u> arge <u>g</u> ranular <u>l</u> ymphocytes“)
LPS	<u>L</u> ipopolysaccharide
LRC	Leukozytendepletionskammer (“ <u>l</u> eukocyte <u>r</u> eduction <u>c</u> hamber“)

LZ	<u>L</u> angerhans <u>Z</u> ellen
m	milli ( $\times 10^{-3}$ )
M	molar (mol/l)
MACS	magnetische Zellsortierung (“ <u>m</u> agnetic <u>c</u> ell <u>s</u> orting”)
mDZ	reife dendritische Zelle (“ <u>m</u> ature <u>d</u> endritic <u>c</u> ell”)
moDZ	aus Monozyten generierte dendritische Zelle (“ <u>m</u> onocyte-derived <u>d</u> endritic <u>c</u> ell”)
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität (“ <u>m</u> ean <u>f</u> luorescence <u>i</u> ntensity”)
MHC I	Haupthistokompatibilitätskomplex I (“ <u>m</u> ajor <u>h</u> istocompability <u>c</u> omplex”) I
MHC II	Haupthistokompatibilitätskomplex II (“ <u>m</u> ajor <u>h</u> istocompability <u>c</u> omplex”) II
min	<u>M</u> inute(n)
MW	<u>M</u> ittel <u>w</u> ert
NaCl	<u>N</u> atrium <u>ch</u> lorid
n	<u>n</u> ano ( $\times 10^{-9}$ )
nRTK	<u>n</u> icht- <u>R</u> ezeptor- <u>T</u> yrosin <u>k</u> inasen
OS	Gesamtüberleben (“ <u>o</u> verall <u>s</u> urvival”)
PAMP	Pathogen-typische Molekülstrukturen („ <u>p</u> athogen- <u>a</u> ssociated <u>m</u> olecular <u>p</u> atterns“)
PBMC	mononukleären Zellen im Blut (“ <u>p</u> eripheral <u>b</u> lood <u>m</u> ononuclear <u>c</u> ell”)
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (“ <u>p</u> hosphate <u>b</u> uffered <u>s</u> aline”)
PE	<u>P</u> hyco <u>e</u> rythrin
Pen/Strep	<u>P</u> enicillin/ <u>S</u> treptomy <u>c</u> in
PFA	<u>p</u> ara- <u>F</u> ormal <u>d</u> ehyd
PGE <sub>2</sub>	<u>P</u> rostaglandin <u>E</u> <sub>2</sub>

## Abkürzungsverzeichnis

Ph <sup>+</sup>	<u>Ph</u> iladelphia-Chromosom positive
PMSF	<u>P</u> henyl <u>m</u> ethyl <u>s</u> ulfonylfluorid
PRR	Pathogen-spez. Rezeptoren (“ <u>p</u> athogen- <u>r</u> elated <u>r</u> eceptors“)
rpm	Umdrehungen pro Minute (“ <u>r</u> ounds <u>p</u> er <u>m</u> inute“)
RT	<u>R</u> aum <u>t</u> emperatur (ca. 22°C)
SD	Standardabweichung (“ <u>s</u> tandard <u>d</u> evelopment“)
SDS	<u>s</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate
SFK	Kinasen der Src-Familie („ <u>s</u> rc-family <u>k</u> inases“)
SSC	Seitwärtsstreulicht („ <u>s</u> ide <u>s</u> catter“), Messparameter des Durchflusszytometers für die Granularität und Oberflächenbeschaffenheit von Partikeln
Tab.	<u>T</u> abelle
Th	<u>T</u> H-Helferzellen
TKI	<u>T</u> yrosin <u>k</u> inase <u>i</u> nhibitoren
TLR	Toll-ähnlicher Rezeptor („ <u>T</u> oll-like <u>r</u> eceptor“)
TNF	<u>T</u> umor <u>n</u> ekrose <u>f</u> aktor
Treg	<u>r</u> egulatorische <u>T</u> -Zellen
TZR	<u>T</u> - <u>Z</u> ell- <u>R</u> ezeptor
x g	multipliziert mit der Erdbeschleunigung (9,81 m/s <sup>2</sup> )

## II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 – potenzielle Zielstrukturen von Dasatinib bei der Generierung von moDZs .....	11
Abbildung 2 – Beteiligung von SFKs bei der Generierung von moDZs .....	12
Abbildung 3 – SFKs zeigen eine direkte Assoziation mit TLR4 .....	13
Abbildung 4 - Modulation der DZ-Generierung unter Dasatinib 50 nM.....	38
Abbildung 5 – Einfluss von Dasatinib auf die moDZ-Generierung aus BCs vs. LRCs .....	40
Abbildung 6 - Apoptose / Nekrose .....	41
Abbildung 7 - Keine Beeinflussung der Endozytose von Dextranpartikeln unter dem Einfluss von Dasatinib .....	42
Abbildung 8 - Dasatinib moduliert die Expression costimulatorischer Moleküle auf moDZ .....	43
Abbildung 9 - Modulation der Interleukinkonzentration im Zellüberstand.....	45
Abbildung 10 - nukleäre Translokation von RelB .....	46
Abbildung 11 - Modulation der LPS-abh. Tyrosin-Phosphorylierung unter 50 nM Dasatinib .....	47
Abbildung 12- Einfluss von Dasatinib auf Generierung und wichtige Funktionen von moDZs.....	52
Abbildung 13 – <i>in vitro</i> Effekte von Dasatinib auf humane moDZs .....	56
Abbildung 14 – immunmodulatorische Effekte von Dasatinib auf murine DZs <i>in vivo</i> .....	59

### III. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Priv.-Doz. Dr. med. Ruth Seggewiß-Bernhardt für die Stellung des Themas, sowie die umfassende Betreuung und den fruchtbaren Austausch bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch bei Solveig Daecke aus der damaligen Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. P. Brossart in Tübingen, welche uns in der Etablierung der Methoden immer wieder hilfreiche Tipps zukommen ließ.

Ferner möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe „Immune Recovery“ unter der Leitung von PD Dr. med. R. Seggewiß-Bernhardt sowie meinen Mitstreitern im Labor Katharina Seystahl, Nicole Hassold, Daniel Jesper und Thomas Nerreter für die schöne Zeit und den intensiven Austausch bedanken. Unseren technischen Assistentinnen Irina Eichelbrönnner und insbesondere auch Carolin Köchel danke ich für ihre umfassende Unterstützung.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern für die immerwährende und fortdauernde Unterstützung, sowie an Linda, die mir bei der Vollendung der Arbeit eine beständige Motivation war, mir uneingeschränkt den Rücken freigehalten hat und sich unermüdlich im Korrekturlesen zeigte.

**IV. Curriculum vitae**

## V. Publikationen und Kongressteilnahmen

Ein Großteil dieser Arbeit wurde 2009 auf dem jährlichen EBMT Meeting in Göteborg, im Rahmen eines Vortrages der „Infectious Complications“ Session mit dem Titel „Dasatinib differentially modulates key effector functions of monocyte-derived dendritic cells“ sowie 2009 auf dem jährlichen DGHO-Kongress in Form eines Posters mit dem Titel „Dasatinib inhibits generation and maturation of monocyte-derived dendritic cells but does not impair their phagocytic activity“ vorgestellt.

Ferner flossen meine Ergebnisse in die 2014 von Nerreter et al. veröffentlichte Publikation „Dasatinib enhances migration of monocyte-derived dendritic cells by reducing phosphorylation of inhibitory immune receptors Siglec-9 and Siglec-3“ mit ein. Sie stellten hierbei die Basis für weiterführende Untersuchungen dar.