

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II der Universität Würzburg

Direktor: Prof. Dr. med. Hermann Einsele

**Einfluss des Tyrosinkinase-Inhibitors  
Dasatinib  
auf die  
Interleukinsekretion und Signaltransduktion  
dendritischer Zellen**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Vorgelegt von  
Daniel Jesper  
aus Freiburg im Breisgau  
Würzburg, November 2018



Referent: PD Dr. med. Ruth Seggewiß-Bernhardt

Koreferent: Prof. Dr. rer. nat. Manfred Lutz

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 9. November 2018

Der Promovend ist Arzt

# Inhaltsverzeichnis

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Inhaltsverzeichnis</b> .....  |           |
| <b>Abbildungsverzeichnis</b> .....   |           |
| <b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....   |           |
| <b>1 Einleitung</b> .....  | <b>1</b>  |
| 1.1 Angeborenes und adaptives Immunsystem.....                               | 1         |
| 1.2 Dendritische Zellen.....   | 2         |
| 1.3 T-Helferzellen und die Subtypen Th1, Th2, Th17 und Treg.....             | 3         |
| 1.4 T-Zell-Differenzierung durch die Interleukine 10 und 12.....             | 5         |
| 1.5 Intrazelluläre Signaltransduktion in dendritischen Zellen.....           | 6         |
| 1.6 Dasatinib .....  | 7         |
| 1.7 Lipopolysaccharide.....  | 8         |
| 1.8 Zymosan.....   | 9         |
| <b>2 Ziele der Arbeit</b> .....  | <b>11</b> |
| <b>3 Material und Methoden</b> .....   | <b>13</b> |
| 3.1 Material.....  | 13        |
| 3.1.1 Reagenzien/Kits .....  | 13        |
| 3.1.2 Medien und Lösungen .....  | 15        |
| 3.1.3 Primer und Sonden.....   | 16        |
| 3.1.4 Antikörper .....   | 17        |
| 3.2 Methoden .....   | 19        |
| 3.2.1 Generierung dendritischer Zellen .....                                 | 19        |
| 3.2.2 Stimulation der dendritischen Zellen.....                              | 21        |
| 3.2.3 Echtzeit-Polymerasekettenreaktion .....                                | 23        |
| 3.2.4 ELISA .....  | 24        |
| 3.2.5 Westernblot .....  | 24        |
| 3.2.6 Statistische Auswertung .....  | 26        |
| <b>4 Ergebnisse</b> .....  | <b>28</b> |
| 4.1 Interleukinsekretion .....   | 28        |
| 4.1.1 Interleukinsekretion nach Stimulation mit LPS oder Zymosan.....        | 28        |
| 4.1.2 Interleukinsekretion nach Stimulation mit LPS unter Dasatinib .....    | 29        |
| 4.1.3 Interleukinsekretion nach Stimulation mit Zymosan unter Dasatinib..... | 30        |
| 4.2 Intrazelluläre Signaltransduktion .....                                  | 31        |
| 4.2.1 ERK.....   | 31        |
| 4.2.2 p38. ....  | 33        |
| 4.2.3 c-jun, Akt und RelA/B .....  | 34        |

|          |                                   |           |
|----------|-----------------------------------|-----------|
| <b>5</b> | <b>Diskussion.....</b>            | <b>39</b> |
|          | <b>Literaturverzeichnis .....</b> | <b>45</b> |
| <b>6</b> | <b>Danksagung.....</b>            | <b>51</b> |
| <b>7</b> | <b>Curriculum vitae.....</b>      | <b>52</b> |

## **Abbildungsverzeichnis**

|   |    |
|---|----|
| <b>Abb. 1.</b> Differenzierung von T-Helferzellen durch dendritische Zellen .....   | 6  |
| <b>Abb. 2.</b> FACS-Analyse der Zellkulturen an Tag 6 .....   | 21 |
| <b>Abb. 3.</b> Phosphorylierung von p38 im zeitlichen Verlauf nach Stimulation mit LPS oder Zymosan.....                  | 22 |
| <b>Abb. 4.</b> Interleukinsekretion dendritischer Zellen vor und nach Stimulation mit LPS oder Zymosan.....               | 28 |
| <b>Abb. 5.</b> Interleukinsekretion nach Stimulation mit LPS unter Dasatinib.....   | 29 |
| <b>Abb. 6.</b> Interleukinsekretion nach Stimulation mit Zymosan unter Dasatinib....                                      | 30 |
| <b>Abb. 7.</b> Phosphorylierung von ERK nach Stimulation mit LPS oder Zymosan unter Dasatinib.....                        | 32 |
| <b>Abb. 8.</b> Phosphorylierung von p38 nach Stimulation mit LPS oder Zymosan unter Dasatinib.....                        | 33 |
| <b>Abb. 9.</b> Phosphorylierung von c-jun nach Stimulation mit LPS oder Zymosan unter Dasatinib.....                      | 34 |
| <b>Abb. 10.</b> Phosphorylierung von Akt nach Stimulation mit LPS oder Zymosan unter Dasatinib.....                       | 35 |
| <b>Abb. 11.</b> Translokation von RelA und RelB in den Nucleus nach Stimulation mit LPS oder Zymosan unter Dasatinib..... | 37 |
| <b>Abb. 12.</b> Modell der Signaltransduktion in dendritischen Zellen.....  | 42 |

## Abkürzungsverzeichnis

|                 |  |
|-----------------|--|
| ALAS            | Aminolävulinatsynthase   |
| ALL             | Akute lymphatische Leukämie  |
| AP-1            | Activator protein-1  |
| APC             | Antigen presenting cell (Antigenpräsentierende Zelle)  |
| ATP             | Adenosintriphosphat  |
| BSA             | Bovines Serumalbumin   |
| CD              | Cluster of differentiation (Unterscheidungsgruppen)  |
| CFSE            | Carboxyfluorescein-Succinimidyl-Ester  |
| CML             | Chronische myeloische Leukämie   |
| CO <sub>2</sub> | Kohlenstoffdioxid  |
| DC              | Dendritic cell (Dendritische Zelle)  |
| DC-SIGN         | DC-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin  |
| DMSO            | Dimethylsulfoxid   |
| DNS             | Desoxyribonukleinsäure   |
| EDTA            | Ethylendiamintetraessigsäure   |
| ELISA           | Enzyme-linked immunosorbent assay  |
| ERK             | Extracellular-signal regulated kinase  |
| FCS             | Fetal calf serum (Fetales Kälberserum)   |
| FACS            | Fluorescence-activated cell sorting (Durchflusszytometrie)   |
| FRET            | Fluorescence resonance energy transfer (Fluoreszenz/Förster-Resonanzenergietransfer)                         |
| GM-CSF          | Granulocyte macrophage colony stimulating factor<br>(Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor) |
| HRP             | Horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)   |
| IFN             | Interferon   |
| IL              | Interleukin  |
| ITAM/ITIM       | Immunoreceptor tyrosine-based activating/inhibitory motif  |

|                |   |
|----------------|---|
| JNK            | C-jun-N-terminale Kinase  |
| LDS            | Lithiumdodecylsulfat  |
| LGL            | Large granular lymphocyte   |
| LPS            | Lipopolysaccharide  |
| LRSC           | Leucoreduction system chambers  |
| MACS           | Magnetic-activated cell sorting (Magnetische Zellsortierung)                            |
| MAPK           | Mitogen-activated protein kinase (Mitogenaktivierte Proteinkinase)                      |
| MHC            | Major histocompatibility complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)                     |
| MOPS           | 3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure  |
| NF- $\kappa$ B | Nukleärer Faktor kappa B  |
| o.Z.           | Ohne Zusatz   |
| PAGE           | Polyacrylamid-Gelelektrophorese   |
| PBMC           | Peripheral blood mononuclear cell<br>(Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes)        |
| PBS            | Phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)                               |
| PLC            | Phospholipase C   |
| PMSF           | Phenylmethylsulfonylfluorid   |
| PFA            | Paraformaldehyd   |
| PI3K           | Phosphoinositid 3-Kinase  |
| PRR            | Pattern recognition receptor  |
| RIPA           | Radioimmunoprecipitation assay (Radioimmunopräzipitationsverfahren)                     |
| qPCR           | Real time quantitative polymerase chain reaction<br>(Echtzeit-Polymerasekettenreaktion) |
| RNS            | Ribonukleinsäure  |
| RT             | Reverse Transkriptase   |
| SDS            | Sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)   |
| TCR            | T-cell receptor (T-Zell-Rezeptor)   |

|              |                                     |
|--------------|-------------------------------------|
| TEMED        | Tetramethylethyldiamin              |
| TGF- $\beta$ | Transforming growth factor- $\beta$ |
| Th1/2/17     | T-Helferzelle Typ 1/2/17            |
| TKI          | Tyrosinkinaseinhibitor              |
| TLR          | Toll-like receptor                  |
| TNF          | Tumornekrosefaktor                  |
| Treg         | Regulatorische T-Helferzelle        |
| TRIS         | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan    |



# 1 Einleitung

## 1.1 Angeborenes und adaptives Immunsystem

Die Abwehr pathogener Krankheitserreger und die Bekämpfung körpereigener Tumorzellen werden im menschlichen Körper durch ein komplexes Immunsystem reguliert, das aus einer Vielzahl verschiedener Zellen mit spezifischen Funktionen besteht. Unterschieden wird dabei zwischen einem angeborenen und einem adaptiven Teil des Immunsystems. Hierbei handelt es sich jedoch nicht um zwei unabhängig voneinander agierende Systeme, sondern um sich gegenseitig verstärkende und ergänzende Teile einer koordinierten Immunantwort. Zu den Zellen der angeborenen Immunität werden Granulozyten, Makrophagen, Mastzellen, natürliche Killerzellen und dendritische Zellen gezählt. Sie können Pathogene mittels spezialisierter Rezeptoren erkennen und darauf mit unspezifischen Abwehrmechanismen wie der Phagozytose und der Sekretion von Zell-lyisierenden Perforinen und Apoptose-induzierenden Granzymen reagieren. Zudem werden Zytokine, Chemokine und Histamin ausgeschüttet, was zur Einwanderung weiterer Immunzellen in das Gebiet der Entzündung führt. Im Gegensatz zum adaptiven Immunsystem finden diese Reaktionen unmittelbar nach Erkennen des Pathogens statt. Das adaptive Immunsystem umfasst B- und T-Lymphozyten, welche auf die Präsentation von Antigenstrukturen, sogenannter Epitope, durch antigenpräsentierende Zellen (APC) der angeborenen Immunität angewiesen sind. Dies geschieht insbesondere durch dendritische Zellen. Auf diese Präsentation reagiert das adaptive Immunsystem mit einer Produktion von spezifischen Antikörpern. Diese binden an das erkannte Antigen und aktivieren so weitere Effektorzellen des angeborenen Immunsystems sowie das Komplementsystem. Hierdurch können Krankheitserreger, infizierte Zellen und Tumorzellen lysiert oder phagozytiert und somit unschädlich gemacht werden. Zudem sind sogenannte zytotoxische T-Zellen nach Antigenpräsentation in der Lage, in infizierten Zellen und Tumorzellen eine Apoptose auszulösen. Die Aktivierung und Antikörperproduktion des adaptiven Immunsystems benötigen im Gegensatz zur Reaktion des angeborenen Immunsystems Zeit. Dafür ist die hierdurch vermittelte Immunreaktion deutlich effektiver und damit in den meisten Fällen entscheidend für die Elimination des Pathogens. Zudem bildet das adaptive Immunsystem eine

sogenannte Gedächtnisfunktion aus, die bei erneuter Exposition mit einem bekannten Pathogen zu einer deutlichen Beschleunigung der Antikörperproduktion führt (Janeway, 2005).

## 1.2 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen wurden erstmalig 1973 in lymphatischem Gewebe der Maus als Zellen mit Bäumchen-artigen Ausläufern beschrieben (Steinman and Cohn, 1973). Sie sind ein wichtiger Bestandteil des angeborenen Immunsystems und befinden sich bevorzugt in Geweben, die mit Antigenen aus der Umwelt in Kontakt kommen, wie der Haut, dem Respirations- und Magen-Darm-Trakt. Sie lassen sich auch in der Milz und im peripheren Blut nachweisen (Banchereau and Steinman, 1998). Ihre Aufgabe ist es, Krankheitserreger und Tumorzellen zu identifizieren und eine adäquate Immunantwort einzuleiten. Hierfür exprimieren sie auf ihrer Oberfläche zahlreiche Rezeptoren, sogenannte „pattern-recognition receptors“ (PRR), mit denen sie in der Lage sind, körperfremde Antigenstrukturen zu erkennen (Trombetta and Mellman, 2005). Besonders wichtig sind hierbei die „toll-like“-Rezeptoren (TLR) (Pasare and Medzhitov, 2004) und C-Typ Lectin-Rezeptoren wie Dectin-1 (Gordon, 2002). Die Bindung eines Antigens an diese Rezeptoren führt zur Endozytose der Partikel und setzt einen Reifungsprozess der dendritischen Zellen in Gang. Sie wandeln sich hierbei von Zellen, die auf das Erkennen und die Phagozytose von Antigenen spezialisiert sind, um zu APC, die die adaptive Immunantwort vermitteln. Im Zuge der Ausreifung migrieren die dendritischen Zellen in lymphatisches Gewebe (Randolph et al., 2005), um dort die phagozytierten Antigene mittels des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) II zu präsentieren. T-Helferzellen binden mit ihrem T-Zell-Rezeptor (TCR) an den mit Antigenstrukturen beladenen MHC II. Zudem kommt es zur Bindung kostimulatorischer Moleküle wie CD40, CD80 und CD86 auf der Zelloberfläche dendritischer Zellen mit Liganden (CD28, CD40L) auf der T-Zell-Oberfläche. Man spricht dann von einer „immunologische Synapse“ (Banchereau et al., 2000, Creusot et al., 2002). Hierdurch kommt es zur Stimulation und Differenzierung der T-Helferzellen in verschiedene Subtypen, die dann zusammen mit B-Zellen die adaptive Immunantwort vermitteln (Pulendran et al., 2010). Eine Fehlsteuerung dieser Immunreaktion kann zur Entstehung und Aufrechterhaltung von Autoimmunerkrankungen und Allergien führen (Steinman and Banchereau, 2007). Dendritische Zellen spielen somit eine zentrale Rolle innerhalb des Immunsystems.

Wissenschaftliche Arbeiten haben gezeigt, dass die in der Onkologie eingesetzte Medikamentengruppe der Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI) nicht nur Auswirkungen auf Tumorzellen, sondern auch auf dendritische Zellen hat. So ließ sich unter dem TKI Sunitinib im Mausmodell eine reduzierte Ausreifung und Antigenpräsentation dendritischer Zellen nachweisen, die mit einer verminderten klinischen Aktivität mBSA (methylated bovine serum albumine)-induzierter Arthritis einherging (Dehlin et al., 2011). Ähnliche Auswirkungen waren in Mäusen beobachtet worden, die Sunitinib und eine Immuntherapie mit dendritischen Zellen für die Behandlung eines Mammakarzinoms erhalten hatten (Jaini et al., 2014). Für den TKI Sorafenib zeigte sich eine reduzierte Fähigkeit dendritischer Zellen zur Migration und Zytokinproduktion, die eine verminderte Aktivierung zytotoxischer T-Zellen zur Folge hatte (Hipp et al., 2008). In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe war der Einfluss des TKI Dasatinib auf dendritische Zellen untersucht worden. Hierbei hatte sich keine Auswirkung von Dasatinib auf die Phagozytosefähigkeit dendritischer Zellen nachweisen lassen. Diese war mittels Fluorescein-markiertem Dextran, das von dendritischen Zellen phagozytiert wird, durchflusszytometrisch gemessen worden. Für die durch Lipopolysaccharide (LPS) induzierte Ausreifung dendritischer Zellen hatte sich unter Dasatinib eine verminderte Expression der Kostimulatoren CD80, CD86 und CD40 gezeigt. In weiteren Untersuchungen, die auf diesen Versuchen und meiner Arbeit aufbauten, konnte inzwischen gezeigt werden, dass Dasatinib die Migration dendritischer Zellen in lymphatisches Gewebe verbessert, vermittelt durch eine Inhibition der Src-Kinase abhängigen Phosphorylierung der Immunrezeptoren Siglec 3 und 9 (Nerreter et al., 2014).

### **1.3 T-Helferzellen und die Subtypen Th1, Th2, Th17 und Treg**

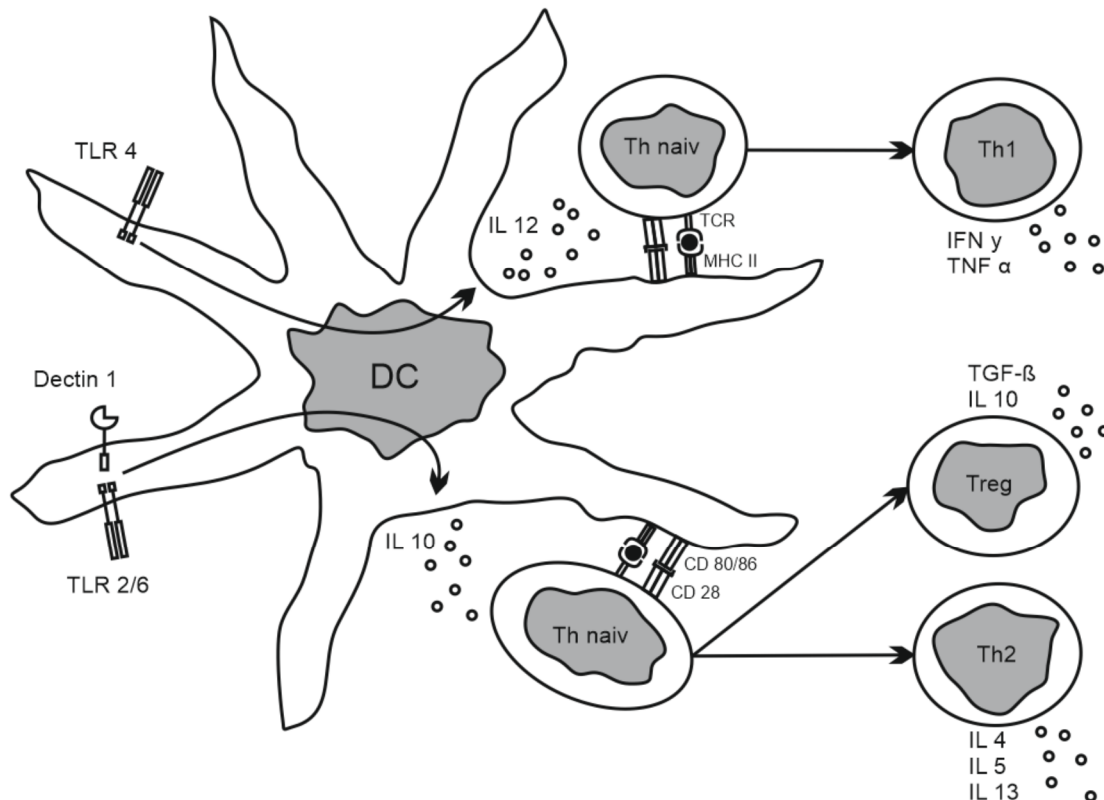
T-Zellen werden in CD8-exprimierende, zytotoxische T-Zellen und CD4-positive T-Helferzellen unterteilt. Zytotoxische T-Zellen können Antigene erkennen, die im intrazellulären Stoffwechsel der Zelle anfallen und mittels MHC der Klasse I präsentiert werden. Auf diese Weise werden Tumorzellen und Zellen, die von intrazellulären Krankheitserregern befallen sind, von zytotoxischen T-Zellen erkannt und zur Apoptose gezwungen. T-Helferzellen erkennen hingegen an MHC der Klasse II gebundene Antigene, die von APC präsentiert werden. Dabei handelt es sich vor allem um phagozytierte Antigene von Tumorzellen und extrazellulären Krankheitserregern. Die T-Helferzellen werden durch die Antigenpräsentation aktiviert und induzieren anschließend die

Antikörperproduktion in B-Zellen. Sie modulieren außerdem die weitere Immunantwort durch Ausschüttung von Interleukinen und Rekrutierung weiterer Effektorzellen. Im Jahr 1986 wurden erstmalig zwei T-Helferzell-Subtypen beschrieben, die sich anhand ihres Zytokinprofils und ihrer Aufgaben im adaptiven Immunsystem unterscheiden ließen. Sie werden als Th1 bzw. Th2-Zellen bezeichnet (Mosmann et al., 1986). Th1-Zellen zeichnen sich durch Sekretion von Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) und Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- $\alpha$ ) aus, rekrutieren Makrophagen und sind für die Entstehung zytotoxischer, CD8-positiver T-Gedächtniszellen verantwortlich. Mit diesen Funktionen sind sie essentiell für die Abwehr intrazellulärer Erreger wie Viren oder Bakterien und vermitteln die körpereigene Tumorzellabwehr. Sie wirken aber auch an der Entstehung und Aufrechterhaltung von Autoimmunerkrankungen wie Diabetes mellitus Typ I oder rheumatoider Arthritis mit. Th2-Zellen schütten vor allem die Interleukine 4, 5 und 13 aus und sind essentiell für die Abwehr extrazellulärer Parasiten wie Helminthen. Hierfür können sie einen Antikörper-Klassenwechsel in B-Zellen hin zu Immunglobulin E induzieren, was zu einer vermehrten Aktivierung von basophilen Granulozyten und Mastzellen führt. Sie tragen mit dieser Funktion aber auch zur Entstehung und Aufrechterhaltung allergischer Erkrankungen wie Asthma bronchiale bei. Einen weiteren Subtyp stellen Th17-Zellen dar, die ihren Namen von dem Zytokin ableiten, das sie überwiegend sekretieren, Interleukin 17. Sie können neutrophile Granulozyten rekrutieren, Zellen der angeborenen Immunität aktivieren und die Sekretion proinflammatorischer Zytokine fördern. Wissenschaftliche Arbeiten haben gezeigt, dass sie eine entscheidende Rolle in der Abwehr extrazellulärer Bakterien und Pilze spielen. Sie werden zudem in Zusammenhang mit der Entstehung einer Reihe von Autoimmunerkrankungen gebracht. Regulatorische T-Zellen (Treg) bilden die vierte Gruppe der T-Helferzell-Subtypen. Sie halten eine besondere Funktion im adaptiven Immunsystem inne, indem sie mit der Sekretion von Interleukin 10 (IL 10) und transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) suppressiv auf andere Immunzellen, insbesondere Mastzellen, Makrophagen und APC wirken. Auf der anderen Seite können sie unter bestimmten Voraussetzungen auch immunstimulatorisch, z.B. auf B-Zellen wirken. Sie sind somit ein regulierender Faktor des adaptiven Immunsystems und sind protektiv für die Entstehung allergischer und autoimmuner Erkrankungen wie Asthma bronchiale, multiple Sklerose und Typ-1 Diabetes. Die von den jeweiligen Th-Subtypen ausgeschütteten Interleukine wirken meist antagonistisch auf die Entstehung der T-Helferzellen anderer Subtypen

und verstärkend auf die des eigenen Typs. Eine einmal induzierte T-Zell-Differenzierung verstärkt sich auf diese Weise selbst (Zhu and Paul, 2008, Raphael et al., 2014).

#### **1.4 T-Zell-Differenzierung durch die Interleukine 10 und 12**

Die Differenzierung der T-Helferzellen in ihre Subtypen wird maßgeblich vom Interleukinmilieu, das während ihrer Aktivierung durch dendritische Zellen vorherrscht, bestimmt. Interleukin 12 (IL 12) spielt hierbei eine wichtige Rolle, es wird von allem von dendritischen Zellen und Makrophagen ausgeschüttet. Unter Einfluss von IL 12 differenzieren sich naive T-Helferzellen zum Subtyp 1. Th1-Zellen schütten IFN- $\gamma$  aus, was durch Bindung an antigenpräsentierende Zellen deren Sekretion von IL 12 im Sinne einer positiven Rückkoppelung verstärkt. IL 10 ist ein Gegenspieler von IL 12. Es wird nicht nur von APC, sondern auch von natürlichen Killerzellen, B-Zellen, Granulozyten und Mastzellen sowie allen Untergruppen der T-Zellen produziert. Naive T-Helferzellen differenzieren sich unter Einfluss von IL 10 zum Subtyp 2 und regulatorischen T-Zellen. Zu erwähnen ist außerdem das von dendritischen Zellen produzierte Interleukin 23 (IL 23), unter dessen Einfluss sich Th17-Zellen differenzieren. Welche Interleukine dendritische Zellen im Rahmen einer Aktivierung naiver T-Helferzellen ausschütten, hängt vom erkannten Pathogen ab. So führt die Bindung bakterieller Antigenstrukturen an TLR 4 zur Sekretion von IL 12. Die Erkennung von Pilzantigenen durch TLR 2/6 oder Dectin-1 hat hingegen vor allem eine Ausschüttung von IL 10 und IL 23 zur Folge. Es existieren viele weitere PRR auf der Oberfläche dendritischer Zellen, die unterschiedliche Muster an ausgeschütteten Interleukinen hervorrufen. Dendritische Zellen sind so in der Lage, die jeweils adäquate Immunantwort für das erkannte Pathogen zu induzieren (Abb. 1) (Ma et al., 2015, Pulendran et al., 2010).



**Abb. 1.** Differenzierung von T-Helferzellen durch dendritische Zellen. Die Abbildung wurde mit Hilfe der Software CorelDRAW 2017 ® selbst erstellt.

### 1.5 Intrazelluläre Signaltransduktion in dendritischen Zellen

Die Sekretion von Interleukinen nach Erkennung eines Antigens in dendritischen Zellen wird durch komplexe intrazelluläre Signalkaskaden vermittelt. Eine wichtige Rolle spielen hierbei mitogenaktivierte Proteinkinasen (MAPK), zu denen die Kinase p38, die „extracellular-signal regulated“-Kinase (ERK) und die c-jun-N-terminale Kinase (JNK) gehören. Sie sind die Schlüsselproteine der nach ihnen benannten Signalwege. Nach Bindung von Liganden an Transmembranrezeptoren wie TLR werden sie über Zwischenschritte phosphoryliert und bewirken in weiteren Schritten die Translokation von Transkriptionsfaktoren in den Zellkern. Hierdurch wird die Genexpression im Zellkern verändert, was u.a. zur Veränderung der Interleukinsynthese und –sekretion führt. Ein weiterer wichtiger intrazellulärer Signalweg in der Interleukinsekretion dendritischer Zellen wird über die Serin/Threonin-spezifische Kinase Akt vermittelt, die von

der Phosphoinositid 3-Kinase (PI3K) aktiviert wird. Sie verändert ebenfalls über mehrere Zwischenschritte die Genexpression im Zellkern. Eine zentrale Rolle in der Aktivierung dendritischer Zellen spielt außerdem der nukleäre Faktor kappa B (NF- $\kappa$ B). Hierbei handelt es sich um einen intrazellulären Transkriptionsfaktor, der aus einem Dimer aus fünf möglichen Untereinheiten (RelA, RelB, NF- $\kappa$ B1, NF- $\kappa$ B2, c-Rel) zusammengesetzt ist. Die Abspaltung einer inhibitorischen Komponente durch extrazelluläre Signale führt zu seiner Aktivierung, woraufhin er in den Zellkern transloziert und dort die Genexpression verändert. Wissenschaftliche Arbeiten mit spezifischen Inhibitoren haben die Funktion der genannten Signalwege in der Interleukinsekretion dendritischer Zellen gezeigt. So wird die Sekretion von IL 10 über die Kinasen p38 und Akt vermittelt. Eine Aktivierung des p38-abhängigen Signalweges führt hierbei zu einer vermehrten Sekretion von IL 10, wohingegen Akt Teil eines gegensinnigen Signalweges ist, der eine verminderte Sekretion von IL 10 zur Folge hat. Die IL 12-Sekretion wird über Signalkaskaden gesteuert, welche die Proteine ERK, NF- $\kappa$ B und JNK beinhalten. Die Aktivierung von NF- $\kappa$ B und JNK hat dabei eine vermehrte IL 12-Sekretion zur Folge. Ein über die Phosphorylierung von ERK vermittelter Signalweg führt hingegen zu einer Abnahme der Sekretion (Nakahara et al., 2004, Neves et al., 2009, Dillon et al., 2004).

## 1.6 Dasatinib

Dasatinib (Sprycel®) ist ein kompetitiver Enzyminhibitor, der entwickelt wurde, um als sogenanntes "small molecule" in der ATP-Bindungsstelle von BCR-Abl, der mutierten Kinase der chronisch myeloischen Leukämie (CML) zu binden und diese zu inhibieren. Es wurde als Nachfolgesubstanz des Tyrosinkinaseinhibitors Imatinib (Gleevec®) entwickelt, der die Behandlung der CML revolutioniert hat. Die Substanz ist seit 2006 für die Behandlung der chronischen Phase einer Philadelphia-Chromosom-positiven CML zugelassen. Zudem darf sie in der akzelerierten Phase oder Blastenkrise einer CML und bei Philadelphia-Chromosom-positiver akuter lymphatischer Leukämie (ALL) bei Unverträglichkeit oder fehlender Wirksamkeit einer vorherigen Therapie angewendet werden. Bei der üblichen Dasatinib-Dosierung von 140 mg pro Tag liegt der Spitzenspiegel im Serum bei ca. 90 nM. Die Konzentrationen 10 nM und 50 nM entsprechen dem Talspiegel und einer hohen durchschnittlichen Serumkonzentration (Nicaise et al., 2008, Weisberg et al., 2007). Dasatinib zeichnet sich durch eine höhere Affinität zur BCR-Abl-Kinase als Imatinib aus und ist daher auch bei mutierten Formen wirksam

(Tokarski et al., 2006). Im Unterschied zu Imatinib besitzt Dasatinib zudem eine hohe Affinität zur Familie der Src-Kinasen, die als Bestandteil intrazellulärer Signalwege wichtige Funktionen in Zellen des Immunsystems besitzen (Rix et al., 2007). In dendritischen Zellen sind vier Kinasen aus dieser Familie nachgewiesen worden: Fgr, Hck, Src und Lyn. Src-Kinasen stehen in ihrer Funktion weit oben in der intrazellulären Signalkaskade, die nach Bindung von Liganden an Transmembranrezeptoren in Gang gesetzt wird. So sind die in B- und T-Zellen verantwortlich für die in Folge einer Aktivierung des B- oder T-Zell-Rezeptors stattfindende Phosphorylierung inhibitorischer oder aktivierender Proteinkomplexe (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory/activating motif, ITIM/ITAM). Dies führt zur Aktivierung von Signalkaskaden, die über viele weitere Schritte die Funktionen der Zelle modifizieren (Lowell, 2004, Korade-Mirnic and Corey, 2000). In dendritischen Zellen und Makrophagen sind Src-Kinasen vor allem involviert in die durch TLR und Dectin vermittelte Aktivierung nach Bindung einer Antigenstruktur (Byeon et al., 2012, Page et al., 2009). Es gibt Hinweise darauf, dass Dasatinib als Src-Kinase-Inhibitor immunmodulatorisch wirkt. So haben sich *in vitro* suppressierende Eigenschaften von Dasatinib auf die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen gezeigt, vermittelt durch die Hemmung der Src-Kinase Lck (Weichsel et al., 2008). Die verbesserte Migration dendritischer Zellen unter Einfluss von Dasatinib kann auf eine verminderte Src-Kinase abhängige Aktivierung der Immunorezeptoren Siglec-3 und Siglec-9 zurückgeführt werden (Nerreter et al., 2014). Auch *in vivo* haben sich Hinweise für immunmodulatorische Eigenschaften von Dasatinib gezeigt. Bei Patienten unter Dasatinib-Therapie wurden vermehrt Autoimmunphänomene und opportunistische Infektionen beobachtet (Wolfl et al., 2013, Sillaber et al., 2009). Zudem kommt es bei einem Teil der mit Dasatinib behandelten Patienten zu einer Expansion spezieller zytotoxischer T-Zellen, sogenannter „large granular lymphocytes“ (LGL). Diese T-Zell-Expansion geht mit einem verbesserten klinischen Ansprechen einer CML einher, führt aber auch zu einer erhöhten Rate an autoimmunen Nebenwirkungen (Mustjoki et al., 2009, Kim et al., 2009).

## 1.7 Lipopolysaccharide

Die äußere Zellmembran gramnegativer Bakterien besteht zum Großteil aus Lipopolysacchariden (LPS). Hierbei handelt es sich um langkettige Moleküle, die aus Fettsäu-



ren und komplexen Zuckerverbindungen bestehen. Sie sind verantwortlich für die Stabilität und Struktur der bakteriellen Zellmembran. Bei der Zerstörung gramnegativer Bakterien werden diese Membranbestandteile freigesetzt, sie verlassen die Zellmembran aber auch physiologischerweise als Vesikel (Kulp and Kuehn, 2010). Die Freisetzung von LPS ruft eine systemische Entzündungsreaktion im Körper hervor, die bis zur lebensbedrohlichen Sepsis führen kann. Eine entscheidende Rolle spielen dabei dendritische Zellen, die LPS mittels TLR 4 erkennen und daraufhin durch vermehrte Sekretion von IL 12 eine Th1-Immunantwort vermitteln, die zur Elimination der Erreger führen soll (Poltorak et al., 1998). Gleichzeitig kommt es aber auch zu einer Bildung regulatorischer T-Zellen, um eine überschießende Antwort des Immunsystems zu vermeiden (den Haan et al., 2007). LPS wird *in vitro* zur Simulation einer Interaktion dendritischer Zellen mit gramnegativen Bakterien verwendet.

## 1.8 Zymosan

Zymosan ist ein Bestandteil der Zellwand von Hefepilzen. Er besteht aus Glukoseeinheiten, die über eine  $\beta$ -1,3 Bindung miteinander verbunden sind. Zymosan gehört damit zur Gruppe der  $\beta$ -Glukane. Zymosan kann *in vitro* benutzt werden, um eine Exposition des Immunsystems mit Hefepilzen zu simulieren. Es wird von dendritischen Zellen mit den Rezeptoren Dectin-1, DC-SIGN (DC-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin) und TLR 2 erkannt. Eine Bindung von Zymosan an diese Rezeptoren führt, ähnlich wie die Bindung von LPS an TLR 4, zur Induktion einer systemischen Immunreaktion des Körpers. Diese Immunantwort ist differenzierter als die durch LPS hervorgerufene. So ist für Zymosan einerseits beschrieben, dass es die Differenzierung der T-Helferzellen zum Subtyp Th17 durch Induktion der IL 23-Sekretion dendritischer Zellen fördert, aber in geringerem Maße auch eine Th1-Differenzierung durch Induktion von IL 12 hervorruft. Beide Subgruppen sind für eine effektive Bekämpfung pathogener Pilze wichtig (Wei et al., 2011, Lyakh et al., 2008, Chen et al., 2013). Andererseits kommt es nach Erkennung von Zymosan durch dendritische Zellen aber auch zu einer vermehrten Sekretion von IL 10 mit Ausbildung regulatorischer T-Zellen. Auftrag dieser regulatorischen T-Zellen könnte es sein, eine überschießende Immunantwort auf Pilzantigene zu vermeiden. Es könnte sich hierbei aber auch um einen Weg der Pilze handeln, einer effizienten Immunantwort zu entgehen (Pulendran et al., 2010, Rogers et al., 2005). Zusätzlich gibt es Hinweise darauf, dass

Pilzantigene wie Zymosan auch die Ausbildung von Th2-Zellen fördern, indem sie zu einer vermehrten Sekretion von IL 10 und IL 4 in dendritischen Zellen führen. Die Rolle der Th2-Zellen ist hierbei nicht ganz klar, da sie nicht zu einer effizienten Bekämpfung pathogener Pilze führen. Eventuell könnte es sich auch hierbei um einen Ausweichmechanismus der Pilze vor dem Immunsystem handeln (Brown, 2006, Romani, 2004, Dillon et al., 2006, Dillon et al., 2004).

## 2 Ziele der Arbeit

Kinaseinhibitoren wie Dasatinib haben als zielgerichtete Therapie neue Möglichkeiten in der Behandlung onkologischer Erkrankungen eröffnet. Sie sind besser verträglich als bisher verfügbare Therapien, dennoch haben auch sie unerwünschte Wirkungen. In mit Dasatinib behandelten Patienten haben sich klinische Auswirkungen gezeigt (siehe Abschnitt 1.6), die eine immunsuppressive bzw. immunmodulatorische Wirkung nahelegen. So kam es neben dem Auftreten von opportunistischen Infektionen auch zur vermehrten Entwicklung von Autoimmunphänomenen. Der zugrunde liegende Mechanismus ist bislang nicht geklärt. Vorarbeiten innerhalb unserer Arbeitsgruppe hatten bereits Auswirkungen von Dasatinib auf T-Zellen und dendritische Zellen untersucht. In T-Zellen hatte sich eine dosisabhängige Reduktion der Effektorfunktionen gezeigt. Die Aktivierung, Proliferation, Zytokinproduktion und Degranulation war unter Dasatinib vermindert gewesen, vermittelt über eine Hemmung von Src-Kinasen (Weichsel et al., 2008). Für dendritische Zellen hatte sich in weiteren Versuchen eine beeinträchtigte Ausreifung unter Dasatinib gezeigt (siehe Abschnitt 1.2). Bislang waren also vor allem immunsuppressive Effekte von Dasatinib auf dendritische Zellen und T-Zellen bekannt, die zwar ein vermehrtes Auftreten opportunistischer Infektionen, nicht aber autoimmuner Erkrankungen erklären konnten. In meiner auf diesen Vorversuchen aufbauenden Arbeit sollte daher der Einfluss von Dasatinib auf die Sekretion von Interleukinen dendritischer Zellen untersucht werden, welche die T-Zell-Differenzierung steuern. Eine Verschiebung der Interleukinsekretion durch Dasatinib könnte immunmodulatorische Eigenschaften, wie ein vermehrtes Auftreten von Autoimmunphänomenen, erklären. Die Interleukine 10 und 12 sind die wichtigsten, antagonistisch wirkenden Induktoren einer Th1-(IL 12) bzw. Treg/Th2-Differenzierung (IL 10), die von dendritischen Zellen ausgeschüttet werden. Dementsprechend wurde die Sekretion von IL 10 und 12 durch dendritischen Zellen unter dem Einfluss von Dasatinib auf Ebene der Ribonukleinsäure (RNS) mittels Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (real time quantitative polymerase chain reaction, qPCR) und auf Proteinebene mittels „enzyme-linked immunosorbent assay“ (ELISA) quantitativ bestimmt. Um den Einfluss von Dasatinib auf beide Differenzierungswege zu untersuchen wurden Substanzen als Stimulus verwendet, die physiologischerweise gegensätzliche T-Zell-Antworten hervorrufen. LPS als Bestandteil der bakteriellen Zellwand wurde zur Induktion einer IL 12-Sekretion und Zymosan als Bestandteil der Hefepilz-Zellwand zur Stimulation einer IL

10-Sekretion verwendet. Zum Verständnis der pharmakodynamischen Auswirkungen von Dasatinib auf die Zytokinsekretion dendritischer Zellen wurde zudem die durch die Stimuli LPS und Zymosan induzierte Signaltransduktion in dendritischen Zellen untersucht, die zur Interleukinsekretion führt. Hierfür wurden die intrazellulären Proteine der dendritischen Zellen nach Stimulation mit LPS oder Zymosan mittels Westernblot aufgetrennt und der Anteil phosphorylierter und/oder in den Zellkern translozierter Proteinanteile mit und ohne Einfluss von Dasatinib verglichen.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Reagenzien/Kits/Geräte

| Reagenz/Kit/Gerät   | Hersteller   |
|---|--|
| Aprotinin   | Sigma-Aldrich  |
| Bovines Serumalbumin (BSA), biotinfrei  | Carl Roth  |
| CD14 Microbeads, human  | Miltenyi Biotec  |
| Cell Extraction Buffer  | Invitrogen   |
| CFSE (Carboxyfluorescein-Succinimidyl-Ester)<br>Cell Proliferation Kit                | Invitrogen   |
| DC Protein Assay Reagent Kit  | Bio-Rad  |
| Dimethylsulfoxid (DMSO)   | Klinikapotheke der<br>Medizinischen Klinik<br>II, Universitätsklinik<br>Würzburg |
| Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)   | Carl Roth  |
| Erythrozyten-Lysepuffer   | Becton Dickinson   |
| Fetal calf serum (Fetales Kälberserum, FCS)   | PAN Biotech  |
| Ficoll-Hypaque  | PAN Biotech  |
| Gel-Kamm für 15 Taschen, 1,5 mm   | Invitrogen   |
| Gel-Kassetten 1,5 mm  | Invitrogen   |
| Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor<br>(GM-CSF), rekombinant human | Gentaur  |
| IL-10 ELISA-Kit, human  | BD Biosciences   |
| IL-12 (p70) ELISA-Kit, human  | BD Biosciences   |

|  |                 |
|--|-----------------|
| Interleukin 4 (IL 4), rekombinant human                            | Gentaur         |
| L-Glutamin 200 nM  | PAN Biotech     |
| LightCycler 480  | Roche           |
| Lipopolysaccharid (LPS) von E.Coli 055:B5                          | Sigma-Aldrich   |
| Luminol  | Carl Roth       |
| Lysing Buffer (Lysepuffer)   | BD Biosciences  |
| MACS (magnetic cell sorting)-Kit                                   | Miltenyi Biotec |
| MagicMark XP Western Protein Standard                              | Invitrogen      |
| Magermilchpulver   | TSI GmbH        |
| Microplate Reader  | Bio-Rad         |
| 3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure (MOPS)                          | Carl Roth       |
| Natriumchlorid   | Carl Roth       |
| Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate, SDS)                 | Applichem       |
| Natriumfluorid   | Carl Roth       |
| Natriumorthovanadat ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ )                   | Applichem       |
| Nonidet P40  | Applichem       |
| NuPage Sample Reducing Agent                                       | Invitrogen      |
| NuPage Lithiumdodecylsulfat (LDS) Sample Buffer                    | Invitrogen      |
| p-Hydroxykumarinsäure  | Sigma-Aldrich   |
| Pancoll (1,077 g/ml)   | PAN-Biotech     |
| Paraformaldehyd (PFA)  | Carl Roth       |
| Penicillin 10.000 U/ml / Streptomycin 10 mg/ml                     | PAN-Biotech     |
| Phenylmethansulfonfluorid (PMSF)                                   | Carl Roth       |
| Phosphat-gepufferte Salzlösung<br>(phosphate-buffered saline, PBS) | PAN-Biotech     |

|   |                          |
|---|--------------------------|
| Ponceau S   | Sigma-Aldrich            |
| QuantiFast Probe PCR + ROX Vial Kit               | Qiagen                   |
| QuantiTect Reverse Transcription Kit              | Qiagen                   |
| RNaseZap  | Thermo Fisher Scientific |
| RNeasy Mini Kit                                   | Qiagen                   |
| Rotipherese Gel 30 (37, 5:1)                      | Carl Roth                |
| RPMI 1640   | PAN-Biotech              |
| Tetramethylethyldiamin (TEMED)                    | Carl Roth                |
| Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) Ultra     | Carl Roth                |
| Tween 20 (Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat) | Applichem                |
| Trypanblau  | Carl Roth                |

Dasatinib wurde von Dr. Elisabeth Greiner und Dr. Josef Zezula (NIH, Bethesda, MD, USA) nach veröffentlichtem Schema (Lombardo et al., 2004) synthetisiert. Gelöst wurde Dasatinib in DMSO (Dimethylsulfoxid, Stammkonzentration 1 mM). Die Weitergabe an die Universitätsklinik Würzburg erfolgte im Rahmen der Vereinbarung mit den National Institutes of Health (NIH) zur Weitergabe von Biomaterialien („Material Transfer Agreement“).

### 3.1.2 Medien und Lösungen

| Medium/Lösung                            | Bestandteile  |
|--|---|
| EC (Enhanced Chemoluminescence) - Lösung | ECL A: 200 ml 0,1 M TRIS pH 8, 6,5 mg Luminol;<br>ECL B: 10 ml DMSO, 11 mg para-Hydroxykumarsäure;<br>ECL A:B 9:1, 0,003% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30%) |
| Einfriermedium                           | FCS, 10% DMSO   |
| FACS-Puffer                              | 2 g bovines Serumalbumin gelöst in 1 Liter PBS  |

|                                      |  |
|--------------------------------------|--|
| MOPS Gellaufpuffer                   | H <sub>2</sub> O, 1,0 M MOPS, 1,0 M Tris Ultra, 69,3 mM SDS, 20,5 mM EDTA  |
| Paraformaldehyd 4%                   | 2 g Paraformaldehyd gelöst in 50 ml H <sub>2</sub> O   |
| R10                                  | RPMI 1640 mit 10% FCS, 2 mM L-Glutamin, 100 Einheiten/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin   |
| RIPA Lyse-Puffer                     | 50 mM Tris Ultra, 1% NP-40, 0,25 Natriumdesoxycholat, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 µg/ml Aprotinin/Leupeptin/Pepstatin, 1 mM Natriumorthovanadat, 1mM NaF, pH 7, 4 |
| Sammelgel 4%                         | 0,83 ml Rotiphorese 30, 0,58 ml TRIS pH 6,8 1 M, 3,5 ml H <sub>2</sub> O, 50 µl 10% SDS, 50 µl 10% APS, 2, 5 µl TEMED  |
| Stripping Puffer                     | H <sub>2</sub> O, 100 mM 2-Mercaptoethanol, 2% SDS, 62,5 mM Tris pH 6,8  |
| TBST (Tris-buffered Saline Tween-20) | H <sub>2</sub> O, 20 mM Tris Ultra, 150 mM NaCl, pH 7,5, 0,05-0,1% Tween-20  |
| Transferpuffer 10x                   | 500 ml H <sub>2</sub> O, 15,14 g TRIS, 72 g Glycin, 0,5 g SDS  |
| Trenngel 12%                         | 3,3 ml Rothiphorese 30, 3,8 ml TRIS pH 8,8 1 M, 2,9 ml H <sub>2</sub> O, 100 µl 10% SDS, 100 µl 10% APS, 5 µl TEMED  |

### 3.1.3 Primer und Sonden (TIB Molbiol, Berlin)

| Gen               | Sequenz   |
|-------------------|---|
| IL 12 - sense     | 5' - gAg AgA CCT CTT TCA TAA CTA ATg gg                   |
| IL 12 - antisense | 5' - TCA Agg gAg gAT TTT TgT gg                           |
| IL 12 - LC640     | 5' - LC640 - CAg TTA TTg ATg AgC TgA TgC CAg gCC C - - PH |
| IL 12 - FL        | 5' - Agg CAg ATC TTT CTA gAT CAA AAC ATg CTg - - FL       |
| IL 10 - sense     | 5' - AgC TgA gAA CCA AgA CCC AgA                          |



|                   |  |
|-------------------|--|
| IL 10 - antisense | 5' - ggg CTg ggT CAg CTA TCC                           |
| IL 10 - LC640     | 5' - LC640 - TgA AAA CAA gAg CAA ggC CgT ggA gC - - PH |
| IL 10 - FL        | 5' - Cgg CgC TgT CAT CgA TTT CTT CCC T - - FL          |
| ALAS - sense      | 5' - AAT gAg TCg CCA CCC ACg                           |
| ALAS - anti-sense | 5' - CAg CTC CCg CTC TAA gTC CA                        |
| ALAS - LC640      | 5' - LC640 - gTg TCC ATA ACT gCC CCA CAC ACC - - PH    |
| ALAS - FL         | 5' - CCT gCC CCA gCA CCA TgT TgT TTC - - FL            |

### 3.1.4 Antikörper

| <b>FACS-Antikörper</b>   | <b>Hersteller</b> |
|--|-------------------|
| Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-konjugierter Maus Antikörper gegen CD1a, human, Clone #HI149 | EXBIO Antibodies  |
| R-Phycoerythrin (PE)-konjugierter Maus Antikörper gegen CD14, human, Clone #TÜK4             | Miltenyi Biotec   |

| <b>Westernblot-Antikörper</b>  | <b>Hersteller</b>        |
|--|--------------------------|
| Monoklonaler Maus Antikörper gegen Phospho-c-Jun (KM-1), human, sc#822   | Santa Cruz Biotechnology |
| Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen c-Jun (H-79), human, sc#1694     | Santa Cruz Biotechnology |
| Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen RelB (C-19), human, sc#226       | Santa Cruz Biotechnology |
| Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen NF-κB p65 (RelA), human, #06-418 | Millipore                |

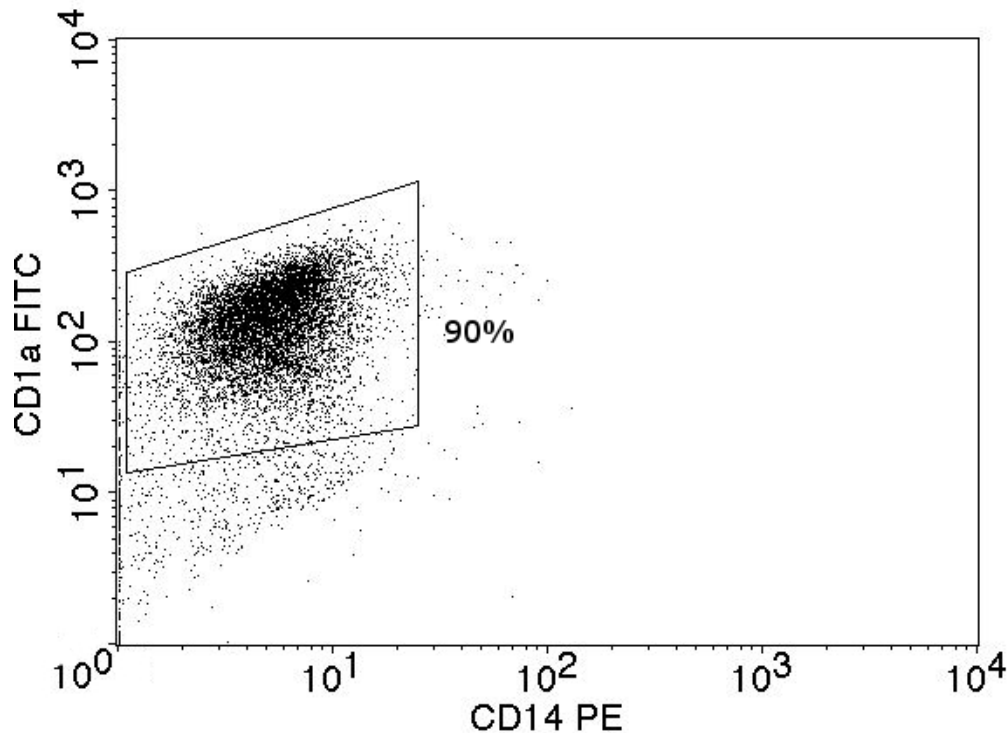
|  |                           |
|--|---------------------------|
| Monoklonaler Kaninchen-Antikörper gegen phospho-p38 (Thr180/Tyr182), D3F9 XP, human, #4511         | Cell Signaling Technology |
| Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen p38, human, #9212  | Cell Signaling Technology |
| Monoklonaler Kaninchen-Antikörper gegen Phospho-Akt (Ser473), human, 193H12, #4058                 | Cell Signaling Technology |
| Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen Akt, human, #9272  | Cell Signaling Technology |
| Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204), human, #9101 | Cell Signaling Technology |
| Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen p44/42 MAPK (Erk1/2), human, #9102                         | Cell Signaling Technology |
| HRP - ("horse radish peroxidase", Meerrettich-peroxidase) Anti-Kaninchen                           | GE Healthcare             |
| HRP - Anti-Maus  | GE Healthcare             |

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Generierung dendritischer Zellen

Dendritische Zellen und ihre Vorläuferzellen kommen nur in geringer Menge im peripheren Blut vor und können deshalb für wissenschaftliche Versuche nicht in ausreichender Menge hieraus isoliert werden (Bernhard et al., 1995). Monozyten, die aus dem peripheren Blut gesunder Spender in ausreichender Menge gewonnen werden können, reifen unter Zugabe von Interleukin 4 (IL 4) und Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF) jedoch zu dendritischen Zellen aus. Die so generierten Zellen besitzen die charakteristische Morphologie und Oberflächenmarker dendritischer Zellen und sind in der Lage eine effiziente T-Zellantwort auszulösen (Romani et al., 1994). Zur Gewinnung von Monozyten aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes (peripheral blood mononuclear cell, PBMC) wurden Leukozytenkonzentrate aus sogenannten „leucoreduction system chambers“ (LRSC) vom Institut für Transfusionsmedizin der Universitätsklinik Würzburg verwendet. Diese ähneln in Qualität und Zusammensetzung den aus „buffy coats“ gewonnenen Konzentraten und sind eine geeignete Quelle für die Gewinnung von PBMC (Dietz et al., 2006). Sie fallen als Nebenprodukt beim Spenden von Blutbestandteilen an. Die gesunden Spender willigten vor Verwendung der Konzentrate gemäß Votum der Ethikkommission vom 24.04.02 ein (Referenznummer 179/10). Nach dem Verdünnen der Leukozytenkonzentrate in phosphatgepufferter Salzlösung (phosphate buffered saline, PBS) erfolgte die Auftrennung entlang eines Dichtegradienten. Dazu wurden jeweils 25 ml des Leukozyten-PBS-Gemisches auf 25 ml Ficoll-Hypaque-Medium geschichtet und 30 Minuten bei 3600 Umdrehungen pro Minute ungebremst zentrifugiert. Hierbei setzen sich die PBMC in einer Schicht ab und lassen sich so von Erythrozyten, Granulozyten und Plasmabestandteilen trennen (English and Andersen, 1974). Nach Abpipettieren dieser Schicht wurde das entstandene Zellpellet mit PBS gewaschen und anschließend verbleibende Erythrozyten mittels Erythrozyten-Lysepuffer aufgelöst. Nach erneutem Waschen wurden die verbleibenden Zellen in R10-Kulturmedium aufgenommen. Das Zählen in einer Neubauer-Zählkammer in Trypanblau-Färbung ergab eine spenderabhängige Gesamtzahl von durchschnittlich 5 bis  $10 \times 10^8$  Zellen mit einer Vitalität von  $> 90\%$ . Für die Generierung von dendritischen Zellen werden nur Monozyten benötigt. Eine Isolierung dieser aus den PBMC kann durch Markierung mit einem magnetischen,

Monozyten-spezifischen Antikörper gegen den Zellrezeptor CD14 und anschließende magnetische Zellseparation (MACS) mittels eines vorgefertigten Kits (Miltenyi Biotec) erreicht werden. Hierfür wurde die gewünschte Anzahl an PBMC für 10 Minuten bei 300 g zentrifugiert und der Überstand komplett abpipettiert. Das resultierende Zellpellet wurde nach Herstellerangaben in 80 µl MACS-Puffer und 10 µl CD14-Microbeads pro  $1 \times 10^7$  Zellen resuspendiert und für 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde das Pellet mit MACS-Puffer gewaschen und in 500 ml MACS-Puffer pro  $1 \times 10^8$  Zellen resuspendiert. Nach Einsetzen einer LS-Säule in einen Midi-MACS-Separator wurde diese mit 2 ml MACS-Puffer gespült und anschließend die Zellsuspension in die Säule gegeben. Der Anteil CD14-positiver Monozyten an den so gewonnenen Zellen wurde mittels Phycoerythrin(PE)-konjugierter Maus-Antikörper gegen CD14 per FACS-Durchflusszytometrie überprüft und lag durchschnittlich bei >95%. Anschließend wurden die Zellen in einer Konzentration von  $1 \times 10^7$  Zellen/ml in R10-Kulturmedium aufgenommen und auf Zellkultur-Multiplatten verteilt, jeweils 3 ml pro Schale,  $3 \times 10^7$  Zellen entsprechend. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1000 U/ml IL 4 und 50 ng/ml GM-CSF gemäß dem beschriebenen Verfahren (Sallusto and Lanzavecchia, 1994). Diese Stimulation mit IL 4 und GM-CSF wurde an den Tagen 2, 4 und 6 wiederholt. Die so behandelten Monozyten differenzierten sich im Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> innerhalb von 6 Tagen zu dendritischen Zellen. Die erfolgreiche Differenzierung geht auf mikroskopischer Ebene mit morphologischen Veränderung einher, die Zellen bilden Ausläufer und nehmen die typische dendritische Form an (Bender et al., 1996, Romani et al., 1996). Diese morphologischen Veränderungen wurden während der Ausreifungsphase regelmäßig lichtmikroskopisch überprüft und die Zellkulturen bei fehlender Differenzierung verworfen. Auf Proteinebene kommt es mit der Ausreifung zu dendritischen Zellen zu einer zunehmenden Expression des Glykoproteins CD1a auf der Zelloberfläche, das für die Präsentation lipider Antigene notwendig ist. Der für Monozyten typische Rezeptor CD14 verschwindet (Zhou and Tedder, 1996). An Tag 6 der Ausreifung wurde daher in der FACS-Analyse der Anteil CD1a-positiver und CD 14-negativer Zellen und somit der Anteil erfolgreich generierter dendritischer Zellen bestimmt (Abb. 2). Zudem erfolgte eine Vitalitätskontrolle mittels Trypanblau-Färbung. Alle nachfolgenden Versuche wurden nur bei Konzentrationen von mehr als 90% vitaler dendritischer Zellen durchgeführt.

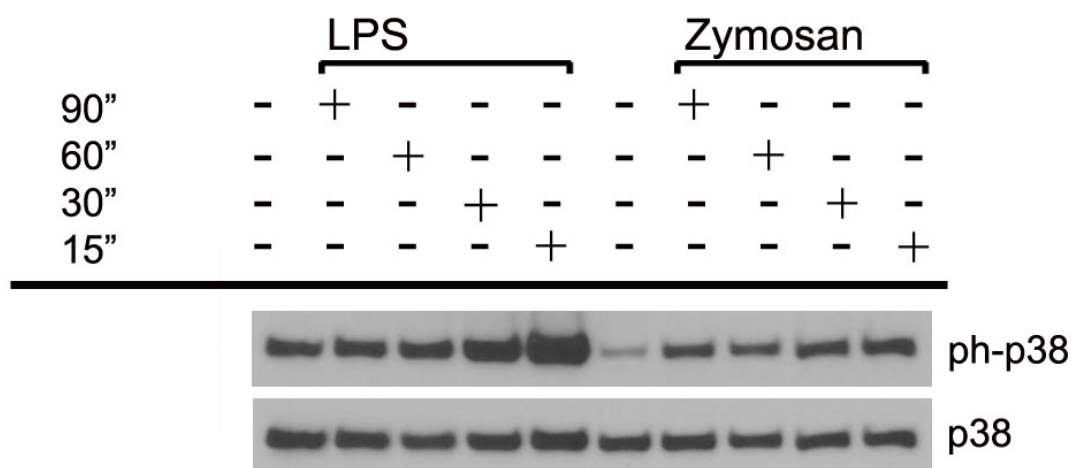


**Abb. 2:** FACS-Analyse der Zellkulturen an Tag 6 (Repräsentatives Beispiel).

### 3.2.2 Stimulation der dendritischen Zellen

Nach erfolgreicher Generierung der dendritischen Zellen wurde an Tag 6 Dasatinib in Konzentrationen von 10 nM und 50 nM zu den Zellkulturen gegeben. Eine mit einer zu 50 nM Dasatinib äquivalenten Menge DMSO behandelte Kultur wurde in allen Versuchen als Lösungsmittelkontrolle mitgeführt. Die Zellen wurden anschließend für eine Stunde bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert, um eine Wirkungsentfaltung von Dasatinib sicherzustellen. Danach erfolgte die Stimulation der Zellkulturen mit Lipopolysaccharid oder Zymosan. Da in der Literatur verschiedene Konzentrationen von LPS und Zymosan zur Stimulation dendritischer Zellen beschrieben worden sind, wurden zunächst Versuche mit den üblicherweise verwendeten Konzentrationen durchgeführt. Für LPS waren dies 100 ng/ml, 1 µg/ml und 3 µg/ml, für Zymosan 10 µg/ml und 25 µg/ml (Lore et al., 1998, Handley et al., 2007). Anhand des Phosphorylierungsgrades der durch Zymosan und LPS aktivierten intrazellulären Proteinkinase p38 zeigte sich, dass mit 100 ng/ml LPS oder 25 µg/ml Zymosan eine maximale Phosphorylierung von p38 erreicht werden kann. Dementsprechend wurden diese Konzentrationen in allen nachfolgenden Versuchen zur Stimulation der dendritischen Zellen verwendet. Zusätzlich

zur Konzentration musste die Stimulationsdauer für die Versuche festgelegt werden. Für die Messung der Interleukinsekretion mittels ELISA wurde gemäß publizierter Daten aus der wissenschaftlichen Literatur eine Stimulationsdauer von 24 h verwendet, um alle in den Zellüberstand abgegebenen Interleukine sicher erfassen zu können (Kwan et al., 2007). Für die Untersuchung der intrazellulären Signaltransduktion mittels Westernblot wurden aufgrund mangelnder Daten in der Literatur zunächst zeitkinetische Versuche durchgeführt. Die dendritischen Zellen wurden hierfür für 15, 30, 60 oder 90 Minuten mit LPS oder Zymosan stimuliert und erneut der phosphorylierte Anteil des Proteins p38 gemessen. Hierbei zeigte sich eine maximale Phosphorylierung bereits nach 15 Minuten, bei längerer Inkubationszeit nahm der Phosphorylierungsgrad ab. Für die Versuche, in denen die Phosphorylierung intrazellulärer Signalproteine gemessen werden sollte, wurde dementsprechend eine Stimulationsdauer von 15 Minuten verwendet (Abb. 3).



**Abb. 3.** Phosphorylierung von p38 im zeitlichen Verlauf nach Stimulation mit LPS oder Zymosan. Repräsentatives Beispiel aus 3 Westernblots.

Für den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B ist die Translokation in den Zellkern der entscheidende Schritt, der zur Veränderung der Genexpression führt. Dieser Prozess findet langsamer statt, als die Phosphorylierung extranukleärer Signalproteine. Für die NF- $\kappa$ B-Untereinheit RelB ist bekannt, dass die nukleäre Translokation in dendritischen Zellen erst 18 bis 24 Stunden nach Stimulation mit LPS ihr Maximum erreicht (Hofer et al., 2001). Wir konnten diese Daten in unseren Versuchen bestätigen. Wir sahen nach 24 Stunden eine deutliche Zunahme des nukleär translozierten Anteils, nicht nur nach Stimulation mit LPS, sondern auch nach Stimulation mit Zymosan. Dementsprechend

erfolgte die Extraktion und damit die Bestimmung der intranukleären NF- $\kappa$ B-Fraktion nach einer 24-stündigen Stimulation mit LPS oder Zymosan.

### **3.2.3 Echtzeit-Polymerasekettenreaktion**

Um den Einfluss von Dasatinib auf die Interleukinsekretion dendritischer Zellen zu untersuchen, wurde zunächst qPCR eingesetzt. Nach Stimulation der Zellkulturen mit Zymosan oder LPS und Vorbehandlung mit Dasatinib erfolgte die Isolation der RNS aus den Zellen mit dem RNeasy Mini Kit<sup>®</sup> und die anschließende Umschreibung in komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNS) im Thermozykler mit dem QuantiTect Reverse Transcription Kit<sup>®</sup> der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers. Anschließend wurden der QuantiFast Probe PCR Master Mix<sup>®</sup> (Quiagen), sowie spezifische sense und antisense-Primer und sogenannte FRET (fluorescence resonance energy transfer, Förster-Resonanzenergietransfer) - Sonden der Firma TIB Molbiol für die Gene IL 10 und 12 und Aminolävulinatsynthase (ALAS) zugegeben. Hierbei handelt es sich um einsträngige DNS-Abschnitte, die im Rahmen der PCR nebeneinander an den gesuchten Genabschnitt binden. Am 5'-Ende der einen Sonde befindet sich dabei der Farbstoff LC640, am 3'-Ende der anderen Sonde Fluorescein. Durch die benachbarte Anlagerung der beiden Sonden an die gesuchten Abschnitte der cDNS kommt es zum FRET zwischen Fluorescein und LC640, was zur Emission von Licht führt. Die Durchführung der qPCR und die visuelle Registrierung der so generierten Fluoreszenz erfolgten in einem LightCycler<sup>®</sup>-System der Firma Roche. Durch den Vergleich der Laufzeitunterschiede der einzelnen Proben bis zur Fluoreszenz-Detektion konnte so auf die initial vorhandene RNS-Menge in den Proben rückgeschlossen werden. Die Untersuchung der ALAS-RNS diente dabei zur Korrektur zwischen den einzelnen Proben, da es sich hierbei um ein in allen Proben konstant exprimiertes Gen handelt. Die Auswertung der erhobenen Daten zeigte dennoch eine große Varianz, auch innerhalb der mitgeführten Lösungsmittelkontrollen, am ehesten bedingt durch methodische Schwierigkeiten wie z.B. die ungenügende Elimination von Ribonukleasen im Versuchsablauf. Daher fanden die Daten keinen Eingang in diese Arbeit, stattdessen wurde auf die direkte Messung der Interleukinkonzentration in den Zellkulturen mittels „Enzyme-linked Immunosorbent Assay“ (ELISA) zurückgegriffen.

### **3.2.4 ELISA**

Die Interleukinkonzentrationen im Überstand der dendritischen Zellkulturen wurden mittels ELISA bestimmt. Hierfür wurden die Zellkulturen nach Vorbehandlung mit Dasatinib für 24 Stunden einer Stimulation mit LPS oder Zymosan ausgesetzt. Die Konzentrationen von IL 12 und 10 wurden anschließend im Überstand der Zellkulturen mittels des ELISA-Kit von BD Biosciences nach Angaben des Herstellers ermittelt. Hierfür wurde der Überstand der Zellkulturen auf Multiplatten gegeben, die mit einem Antikörper gegen IL 12 oder 10 beschichtet sind. Anschließend erfolgte nach mehrmaligem Waschen die Inkubation mit einem zweiten, Biotin-gekoppelten Antikörper gegen IL 12 oder 10 und die Hinzugabe von Streptavidin-Meerrettichperoxidase. Nach erneutem Waschen wird eine Detektionslösung zugegeben, die sich proportional zu der vorhandenen Menge des gesuchten Interleukins blau verfärbt. Die entstandene Farbinintensität wurde dann in einem Multiplatten-Lesegerät gemessen und so die Interleukinkonzentration im Überstand quantifiziert.

### **3.2.5 Westernblot**

Die pharmakodynamische Wirkung von Dasatinib auf intrazelluläre Signalwege dendritischer Zellen wurde im Westernblot untersucht. Die in der Einleitung beschriebenen intrazellulären Signalproteine lassen sich in zwei Gruppen einteilen. Zum einen handelt es sich um die Gruppe der Proteinkinasen p38, ERK und Akt, die im Zytoplasma liegen und durch Phosphorylierung aktiviert werden. Gleiches gilt für das Protein c-jun, das allerdings keine Proteinkinase, sondern Teil des Transkriptionsfaktors activator protein 1 (AP-1). Bei diesen Proteinen kann der Grad der Aktivierung mittels spezifischer, gegen die phosphorylierte Form der Proteine gerichtete Antikörper gemessen werden. Für die Westernblots dieser Proteine wurden dementsprechend Proteinextrakte aus dem gesamten Zytoplasma, nicht aber dem Nukleus verwendet. Die andere Gruppe besteht aus den Untereinheiten des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B, beispielhaft RelA und RelB. Sie werden nicht phosphoryliert, sodass keine spezifischen Antikörper zur Detektion der Aktivierung wie bei den Proteinkinasen und c-jun eingesetzt werden können. Da sie nach Aktivierung in den Nukleus translozieren, kann stattdessen der nukleäre Anteil als Marker für den Grad der Aktivierung herangezogen werden. Dementsprechend wurden für die Bestimmung der Aktivierung von RelA und RelB nur der



intranukleäre Proteinanteil nach entsprechendem Protokoll aus den dendritischen Zellen extrahiert und im Westernblot analysiert. Alle Schritte wurden, soweit nicht anders aufgeführt, auf Eis durchgeführt, um die Phosphorylierung nicht zu beeinflussen. Nach dem Abzentrifugieren der Zellkulturen bei 13.500 U/min für zwei Minuten wurde der Überstand verworfen und die Zellen mit 125 µl frisch hergestelltem RIPA-(radioimmunoprecipitation assay; Radioimmunopräzipitationsverfahren)-Puffer lysiert. Durch erneute Zentrifugation bei 2.500 U/min für fünf Minuten erfolgte die Sedimentation der Nuklei. Für die Gesamtzellextrakte zur Bestimmung von p38, ERK, Akt und c-jun wurde der Überstand verwendet, für die nukleären Extrakte wurde das verbleibende Pellet in 50 µl „Cell Extraction Buffer“ für 30 Minuten resuspendiert und dabei in 10-minütigen Abständen mit einem Vortexmischer vermischt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 14.000 U/min für 30 Minuten wurde der resultierende Überstand aliquotiert und eingefroren. Vor dem Auftrennen der Proteine im Gellauf wurde zur Bestimmung des Proteingehalts das BioRad DC-Proteindetektorsystem nach Angaben des Herstellers verwendet. Für die SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) wurden jeweils 10-20 µg Protein pro Bahn aufgetragen. Für die Herstellung der Proben wurden 4 x SDS Sample Buffer und 10x Reducing Agent von Invitrogen verwendet. Die Proben wurden für 10 min bei 70°C denaturiert und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Der Gellauf wurde für etwa 35 min, bei 200 V und 120 mA unter Verwendung von selbst angefertigten, 10%-Bis-Tris Gelen durchgeführt. Im nächsten Schritt wurden die Proteine bei 25 V und 200 mA für 75 min auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Anschließend wurde die Membran mit Blockierungslösung, Tris-buffered Saline Tween-20 (TBST)-Puffer und, in Abhängigkeit des Antikörpers, unterschiedlichen Milch- bzw. bovinem Serumalbumin(BSA)-Anteilen für 1 h inkubiert, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu vermeiden. Die Inkubation mit in Blockierungslösung verdünntem Primärantikörper erfolgte über Nacht bei 4°C auf der Schüttelplatte. Nach Waschen der Membran mit TBST wurde diese mit einem HRP-konjugierten sekundären Antikörper für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert, erneut mit TBST gewaschen und nach Abspülen mit destilliertem Wasser für 1 min mit Enhanced Chemoluminescence-Lösung (ECL) überschichtet. Die Röntgenfilme wurden je nach Antikörper zwischen 15 Sekunden und 2 h belichtet. Um die Membranen für eine Detektion mit einem weiteren Antikörper verwenden zu können, wurden diese für 30 min bei 50°C in Stripping

Buffer eingelegt und anschließend mit TBST gewaschen, um die gebundenen Antikörper wieder abzulösen.

### **3.2.6 Statistische Auswertung**

In den Ergebnissen der durchgeführten Versuche bestand eine deutliche Varianz zwischen den einzelnen Spendern, sowohl für die mittels ELISA gemessenen, absoluten Interleukinkonzentrationen, als auch für die im Westernblot bestimmte Proteinphosphorylierung bzw. Translokation der Proteine in den Zellkern. Um die Auswirkungen von Dasatinib auf dendritische Zellen zwischen den Spendern dennoch vergleichen zu können, wurden für die statistische Auswertung daher die relativen Veränderungen der mit Dasatinib behandelten Zellkulturen im Vergleich zu den unbehandelten Zellkulturen berechnet. Hierfür wurden die belichteten Filme der Westernblots eingescannt und mit Hilfe des Bildanalyseprogramms „ImageJ“ ©, Version 1.48v, die Intensität der einzelnen Banden gemessen. Diese absoluten Werte der einzelnen Versuche wurden in eine Tabelle des Programms „Microsoft Excel 2013“ © übertragen und den Ansätzen der mit LPS oder Zymosan stimulierten Zellen die Referenzgröße 100% zugeordnet. Die absoluten Werte der weiteren Ansätze (unstimulierte und mit Dasatinib behandelte Zellen sowie die DMSO-Lösungsmittelkontrolle) wurden dann in ein prozentuales Verhältnis hierzu gesetzt. Gleiches gilt für die in den einzelnen Versuchen mittels ELISA gemessenen Interleukinsekretionen. Für die Westernblot-Versuche erfolgte zudem eine Korrektur der Gesamtbeladungsmenge. Hierfür wurden bei den Proteinen p38, ERK, c-jun und Akt die Bandenintensitäten der phosphorylierten Proteine in Verhältnis zum unphosphorylierten Anteil gesetzt. Für die NF- $\kappa$ B-Untereinheiten RelA und RelB wurde die in den Zellkern translozierte Gesamtmenge in Verhältnis zu  $\beta$ -Aktin gesetzt, das in konstanter Menge in den Zellen vorliegt. Die so ermittelten prozentualen Veränderungen der einzelnen Spender wurden mit Hilfe des Programmes „GraphPad Prism“ ©, Version 5.01, statistisch ausgewertet und Unterschiede zwischen den Spendern verglichen. Mittels gepaartem, zweiseitigem t-Test von Student wurde dabei die statistische Signifikanz berechnet. Als signifikant wurde ein p-Wert kleiner 0,05 festgelegt, sodass die statistische Wahrscheinlichkeit eines falsch positiven Zusammenhanges bei weniger als 5% liegt. Signifikante Ergebnisse sind in den Grafiken mit einem Asterisken (\*) gekennzeichnet. In den grafischen Darstellungen der Ergebnisse wurden der arithmetische Mittelwert und der Standardfehler des Mittelwertes abgebildet und

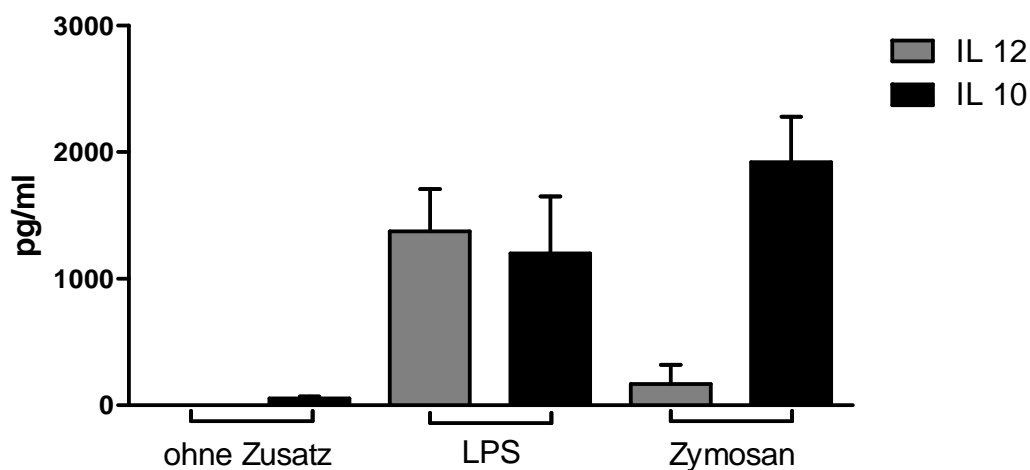
zusätzlich die auf ganze Zahlen gerundeten Werte im Text wiedergegeben, wobei „±“ den Standardfehler des Mittelwertes angibt. Die Anzahl der durchgeführten Versuche wurde mit „n“ bezeichnet.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Interleukinsekretion

#### 4.1.1 Interleukinsekretion nach Stimulation mit LPS oder Zymosan

Im Überstand der dendritischen Zellkulturen ließ sich ohne Stimulation mit LPS oder Zymosan keine signifikante Menge IL 12 nachweisen. Die durchschnittliche Konzentration von IL 10 in den unstimulierten Zellkulturen lag bei  $54 \pm 14$  pg/ml. Nach Hinzugabe von LPS stieg die IL12-Konzentration durchschnittlich auf  $1374 \pm 335$  pg/ml und die IL 10-Konzentration auf  $1199 \pm 451$  pg/ml an. Wurden die dendritischen Zellen mit Zymosan stimuliert, lag die mittlere Konzentration von IL 12 bei  $226 \pm 196$  pg/ml, die mittlere Konzentration von IL 10 bei  $1922 \pm 358$  pg/ml,  $n=5$  (Abb. 4).

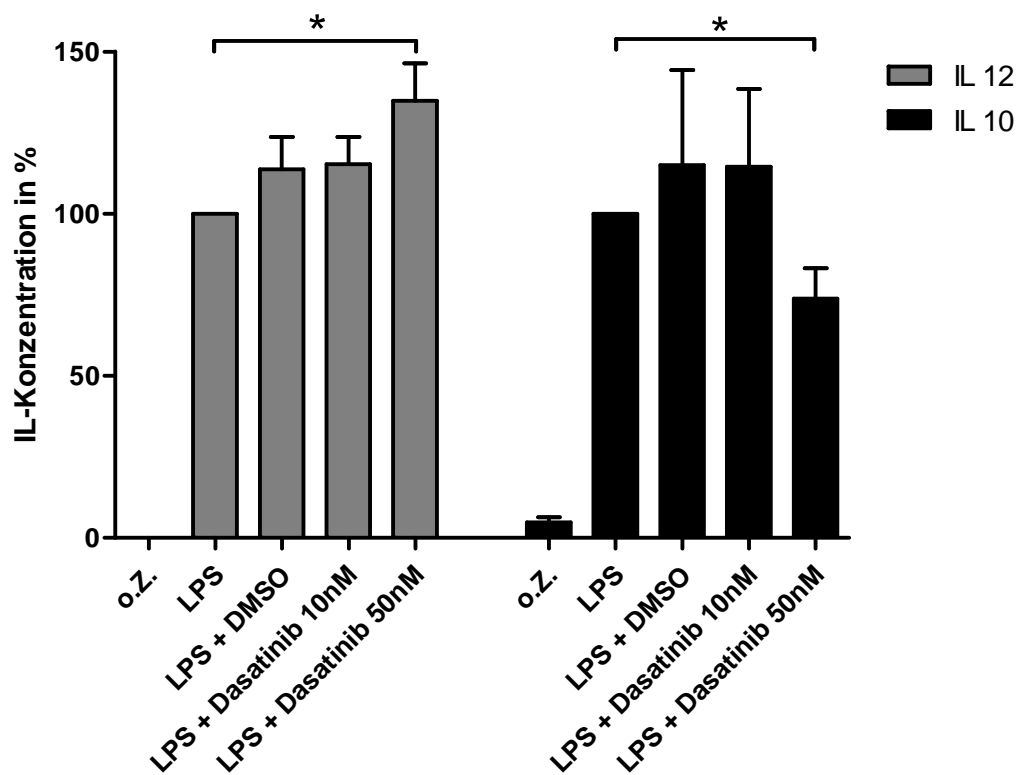


**Abb. 4.** Interleukinsekretion dendritischer Zellen vor und nach Stimulation mit LPS oder Zymosan. Gemessen mittels ELISA,  $n=5$ .

Zusammengefasst reagierten die dendritischen Zellen auf eine LPS-Stimulation also mit Sekretion von IL 12 und IL 10. Die Hinzugabe von Zymosan führte zu einer starken Ausschüttung von IL 10 und wenig IL 12. Damit konnten Daten aus der Literatur zur Interleukinsekretion dendritischer Zellen bestätigt werden (Hoarau et al., 2008, Gerosa et al., 2008).

#### 4.1.2 Interleukinsekretion nach Stimulation mit LPS unter Dasatinib

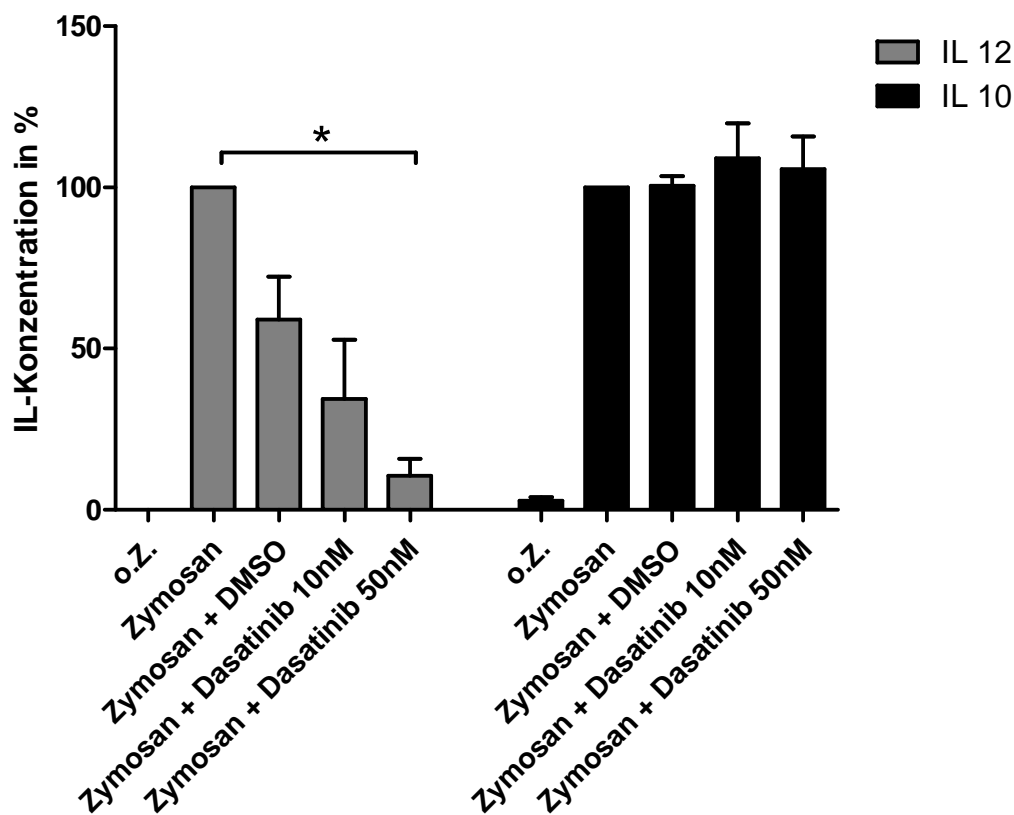
Unter Einfluss von Dasatinib 50 nM führte die Stimulation der dendritischen Zellen mit LPS zu einem größeren Konzentrationsanstieg von IL 12 als in der unbehandelten Kontrolle (135 ±11%, p=0,039). Für Dasatinib 10 nM war ebenfalls ein Konzentrationsanstieg zu verzeichnen, dieser war allerdings nicht statistisch signifikant (115 ±8%, p=0,14), n=5. Für IL 10 zeigte sich unter Dasatinib 50 nM nach Stimulation mit LPS eine signifikante Abnahme der Konzentration im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (74 ±9%, p=0,049). Für die Konzentration von 10 nM lag kein signifikanter Unterschied vor (115 ±24%, p=0,58), n=5 (Abb. 5).



**Abb. 5.** Interleukinsekretion nach Stimulation mit LPS unter Dasatinib. Gemessen mittels ELISA, n=5.

### 4.1.3 Interleukinsekretion nach Stimulation mit Zymosan unter Dasatinib

Die Vorbehandlung der dendritischen Zellen mit Dasatinib 50 nM führte zu einer signifikant reduzierten Sekretion von IL 12 nach Stimulation mit Zymosan im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ( $7 \pm 5\%$ ,  $p=0,0003$ ). Unter Dasatinib 10 nM bestand ebenfalls eine reduzierte Konzentration, die allerdings nicht statistisch signifikant war ( $31 \pm 23\%$ ,  $p=0,059$ ),  $n=4$ . Auf die Sekretion von IL 10 nach Stimulation mit Zymosan hatte die Behandlung mit Dasatinib keinen signifikanten Einfluss (Dasatinib 10 nM:  $109 \pm 11\%$ ,  $p=0,47$ ; Dasatinib 50 nM  $106 \pm 10\%$ ,  $p=0,61$ ;  $n=4$ ) (Abb. 6).



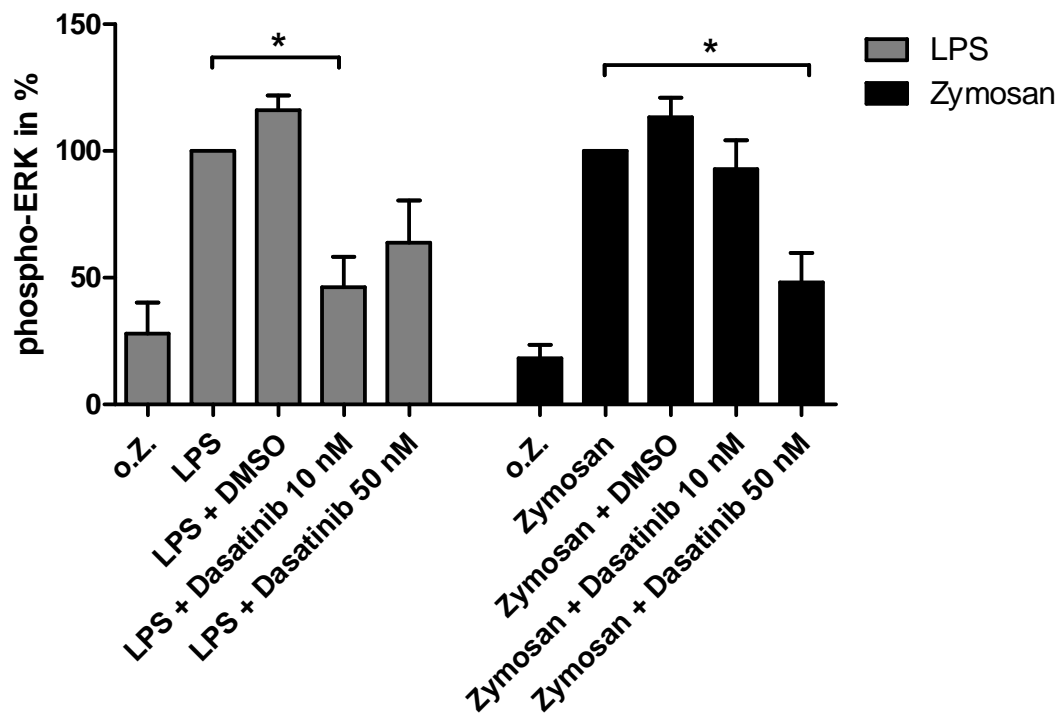
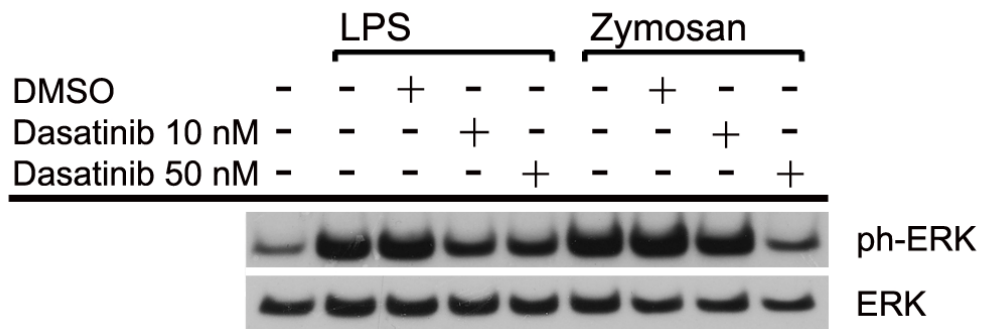
**Abb. 6.** Interleukinsekretion nach Stimulation mit Zymosan unter Dasatinib. Gemessen mittels ELISA,  $n=4$ .

Zusammengefasst führte Dasatinib 50 nM also zu einer vermehrten Sekretion von IL 12 und einer verminderten Ausschüttung von IL 10 als Antwort auf eine Stimulation mit LPS in dendritischen Zellen. Nach Stimulation mit Zymosan war die IL 12-Sekretion unter Dasatinib vermindert, während die Sekretion von IL 10 unverändert blieb.

## 4.2 Intrazelluläre Signaltransduktion

### 4.2.1 ERK

Eine Vorbehandlung der Zellkulturen mit Dasatinib 10 nM führte zu einer reduzierten Phosphorylierung von ERK nach Stimulation mit LPS ( $46\% \pm 12\%$ ,  $p=0,02$ ). Für Dasatinib 50 nM war ebenfalls eine reduzierte Phosphorylierung zu verzeichnen, allerdings lag diese unter dem Signifikanzniveau ( $64\% \pm 17\%$ ,  $p=0,08$ ),  $n=3$ . Für die Stimulation mit Zymosan zeigte sich unter Dasatinib 50 nM eine signifikant reduzierte Phosphorylierung von ERK ( $48\% \pm 12\%$ ,  $p=0,047$ ), nicht aber für Dasatinib 10 nM ( $93\% \pm 11\%$ ,  $p=0,6$ ),  $n=3$  (Abb. 7).

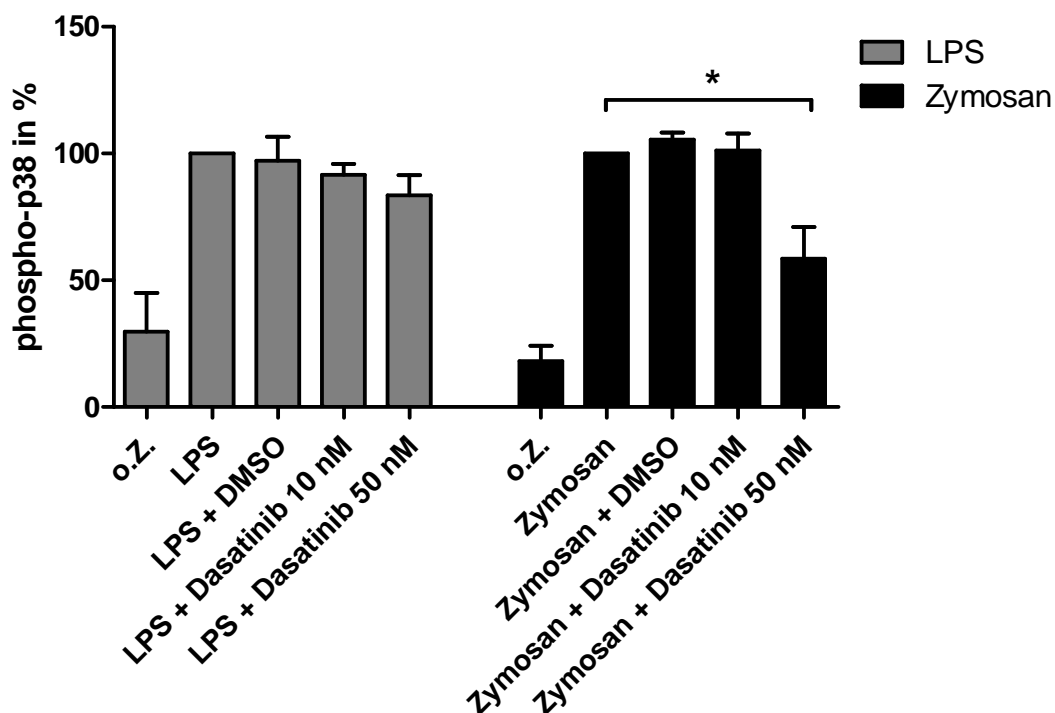
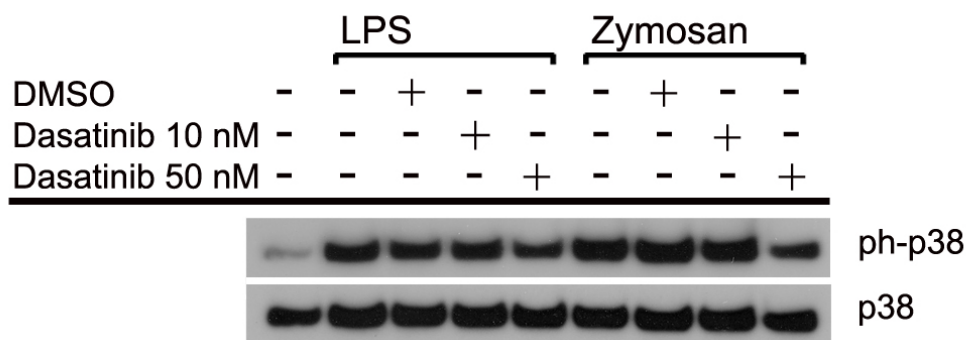


**Abb. 7.** Phosphorylierung von ERK nach Stimulation mit LPS oder Zymosan unter Dasatinib. Oben: Repräsentatives Beispiel aus 3 Westernblots. Unten: Prozentuale Auswertung aus n=3 Westernblots.



#### 4.2.2 p38

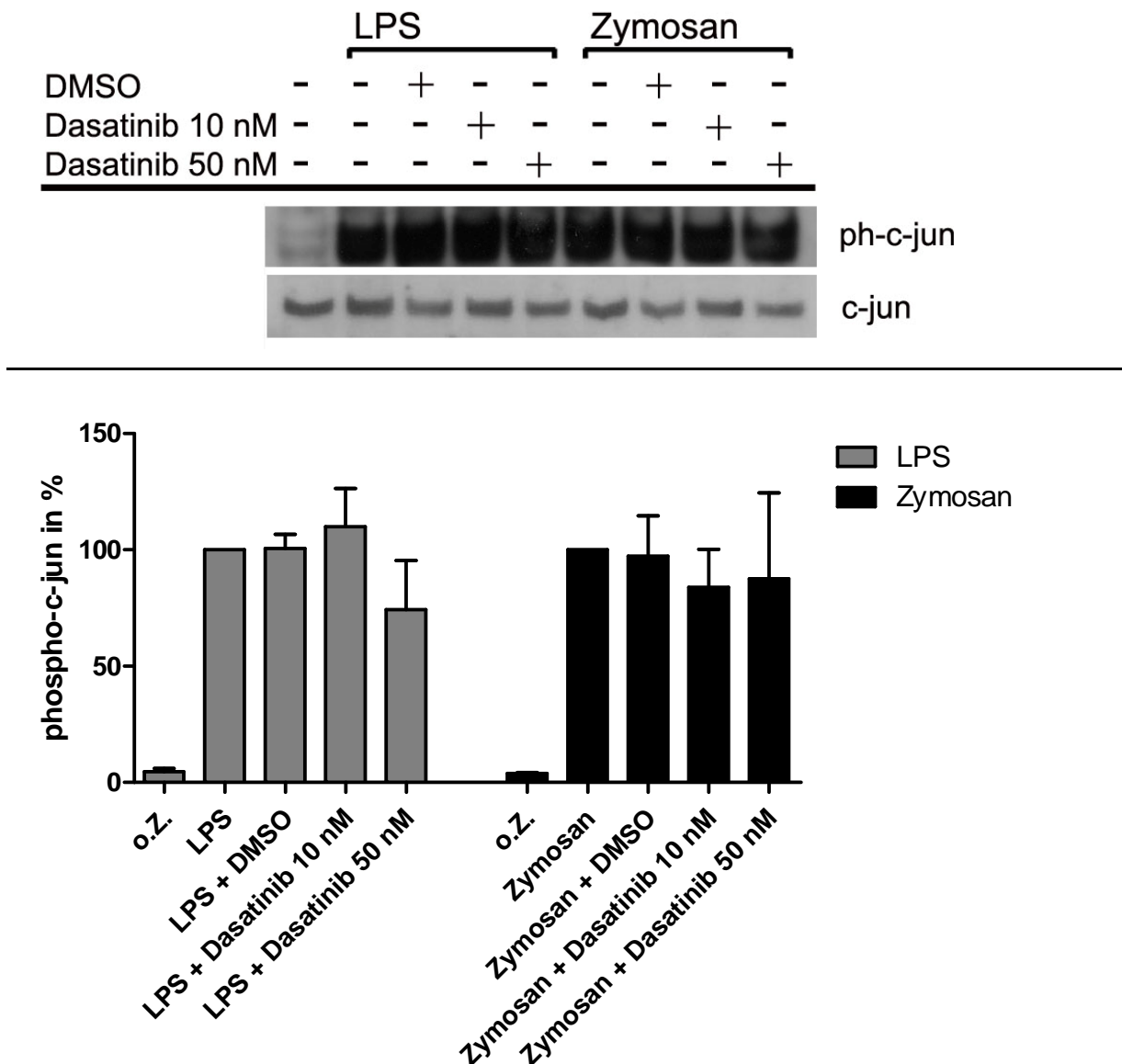
Dasatinib hatte keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von p38 nach Stimulation mit LPS (Dasatinib 10 nM:  $91 \pm 4\%$ , Dasatinib 50 nM:  $84 \pm 8\%$ ,  $p=0,09$ ;  $n=3$ ). Die Phosphorylierung von p38 nach Stimulation mit Zymosan war unter Dasatinib 50 nM hingegen signifikant reduziert ( $59 \pm 13\%$ ,  $p=0,045$ ). Dasatinib 10 nM hatte keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von p38 durch Zymosan ( $101 \pm 7\%$ ,  $p=0,9$ ),  $n=4$  (Abb. 8).



**Abb. 8.** Phosphorylierung von p38 nach Stimulation mit LPS oder Zymosan unter Dasatinib. Oben: Repräsentatives Beispiel eines Westernblots. Unten: Prozentuale Auswertung aus  $n=3$  (LPS) bzw.  $n=4$  (Zymosan) Westernblots.

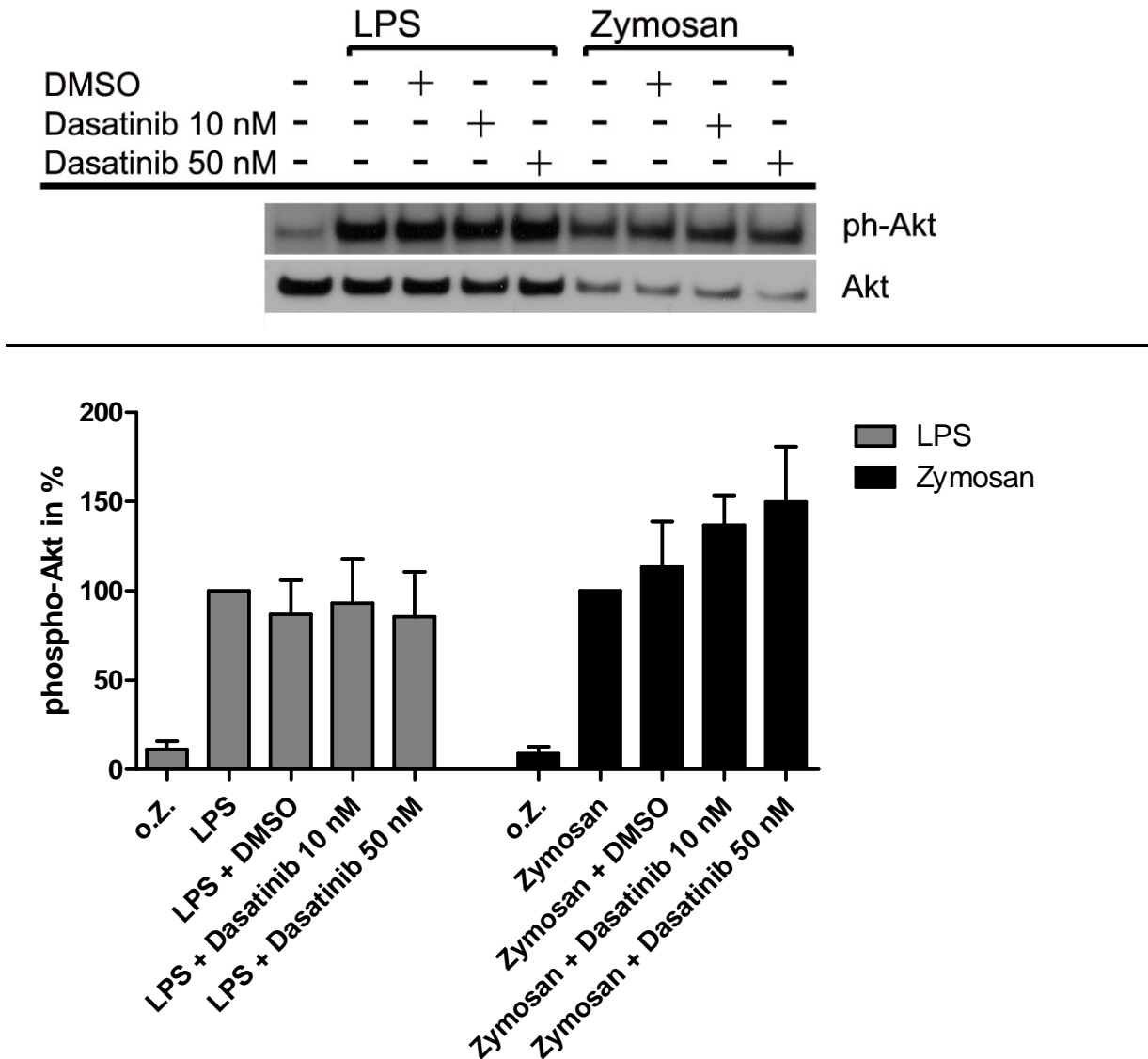
### 4.2.3 c-jun, Akt und RelA/B

Die durch LPS induzierte Phosphorylierung von c-jun wurde von Dasatinib nicht signifikant beeinflusst (Dasatinib 10 nM:  $110 \pm 17\%$ ,  $p=0,6$ ; Dasatinib 50 nM:  $74 \pm 21\%$ ,  $p=0,3$ ;  $n=3$ ). Gleiches gilt für Zymosan (Dasatinib 10 nM:  $84 \pm 16\%$ ,  $p=0,4$ ; Dasatinib 50 nM:  $88 \pm 37\%$ ,  $p=0,8$ ),  $n=3$  (Abb. 9).



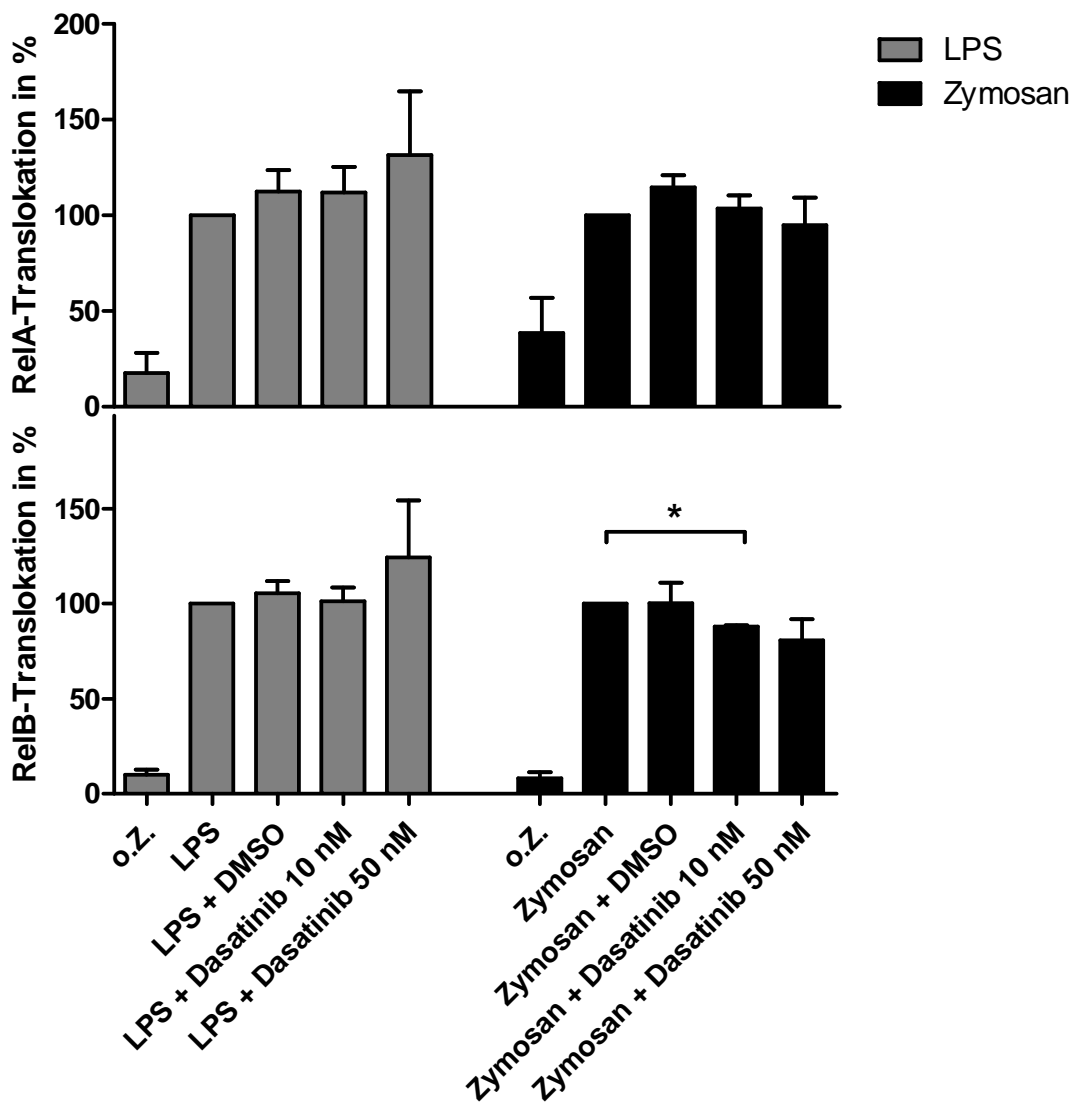
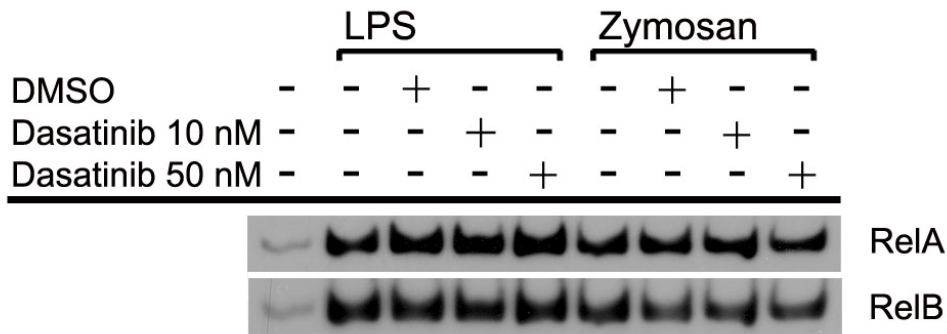
**Abb. 9.** Phosphorylierung von c-jun nach Stimulation mit LPS oder Zymosan unter Dasatinib. Oben: Repräsentatives Beispiel eines Westernblots. Unten: Prozentuale Auswertung aus  $n=3$  Westernblots.

Die Aktivierung der Kinase Akt wurde von Dasatinib nicht beeinflusst, weder nach Stimulation mit LPS (Dasatinib 10 nM: 93%  $\pm$ 25%,  $p=0,8$ ; Dasatinib 50 nM: 86%  $\pm$ 25%,  $p=0,6$ ;  $n=3$ ) noch nach Stimulation mit Zymosan (Dasatinib 10 nM: 137%  $\pm$ 17%,  $p=0,2$ ; Dasatinib 50 nM: 150%  $\pm$ 31%,  $p=0,3$ ;  $n=3$ ) (Abb. 10).



**Abb. 10.** Phosphorylierung von Akt nach Stimulation mit LPS oder Zymosan unter Dasatinib. Oben: Repräsentatives Beispiel eines Westernblots. Unten: Prozentuale Auswertung aus  $n=3$  Westernblots.

Die Translokation der NF- $\kappa$ B-Untereinheit RelA in den Zellkern nach 24 Stunden war unter Dasatinib im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle unverändert sowohl nach Stimulation mit LPS (Dasatinib 10 nM: 112%  $\pm$ 13%,  $p=0,5$ ; Dasatinib 50 nM: 132%  $\pm$ 33%,  $p=0,4$ ;  $n=3$ ), als auch nach Stimulation mit Zymosan (Dasatinib 10 nM: 104%  $\pm$ 7%,  $p=0,7$ ; Dasatinib 50 nM: 95%  $\pm$ 14%,  $p=0,6$ ;  $n=4$ ). Für die Untereinheit RelB zeigte sich nach Stimulation mit LPS unter Dasatinib ebenfalls keine signifikante Veränderung der nukleären Translokation (Dasatinib 10 nM: 101%  $\pm$ 7%,  $p=0,85$ ; Dasatinib 50 nM: 124%  $\pm$ 30%,  $p=0,5$ ;  $n=3$ ). Nach Stimulation mit Zymosan war unter Dasatinib 10 nM eine statistisch signifikante, aber sehr geringe Abnahme der Translokationsrate zu sehen (88%  $\pm$ 1%,  $p=0,002$ ), nicht jedoch für Dasatinib 50 nM (81%  $\pm$ 11%,  $p=0,23$ ),  $n=3$  (Abb. 11).



**Abb. 11.** Translokation von RelA und RelB in den Nucleus nach Stimulation mit LPS oder Zymosan unter Dasatinib. Oben: Repräsentatives Beispiel jeweils eines Westernblots. Unten: Prozentuale Auswertung aus n=3 (LPS) bzw. n=4 (Zymosan) Versuchen (RelA), bzw. n=3 Westernblots (RelB).

Zusammengefasst war die durch LPS und Zymosan induzierte Phosphorylierung der Kinase p38 in Anwesenheit von Dasatinib reduziert. Dasatinib inhibierte zudem die Phosphorylierung von ERK nach Stimulation der dendritischen Zellen mit Zymosan. Die über c-jun, Akt und NFκB ablaufenden Signalwege scheinen von Dasatinib nicht wesentlich beeinflusst zu werden.

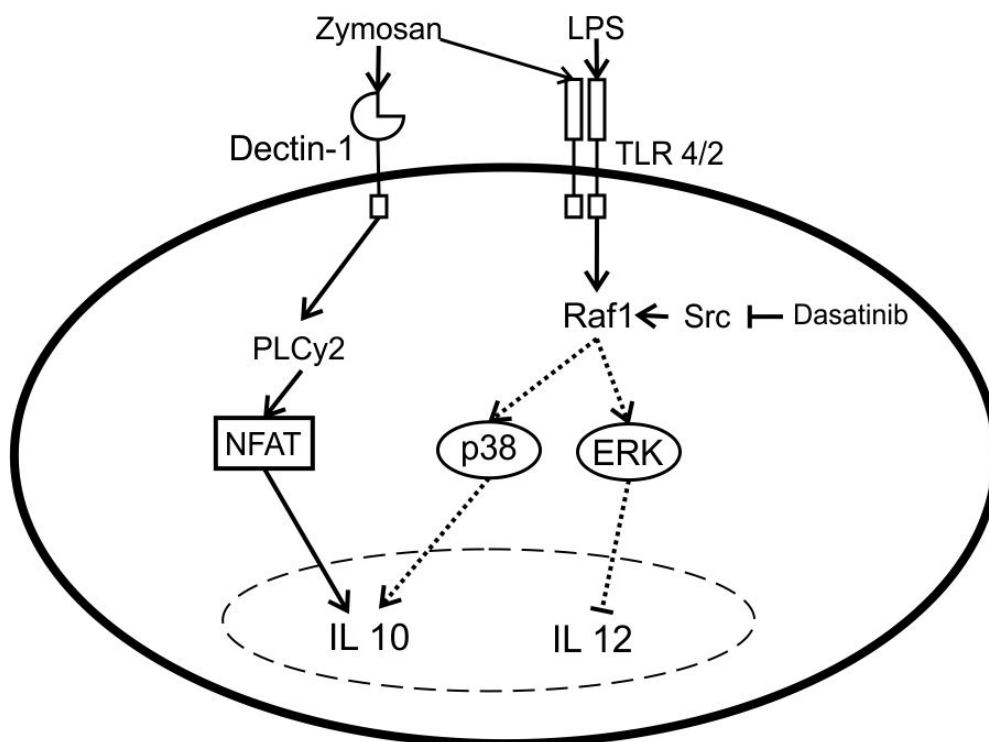
## 5 Diskussion

Die Gruppe der Tyrosinkinaseinhibitoren hat die Behandlung einiger hämato-onkologischer Erkrankungen revolutioniert. So wurde die CML durch die Einführung von Imatinib zu einer Erkrankung, die in den meisten Fällen durch eine orale medikamentöse Therapie kontrolliert werden kann. Durch lebenslange Einnahme des Medikamentes werden 10-Jahres Überlebensraten von mehr als 80% erreicht. Im Gegensatz zur zytotoxischen Chemotherapie treten Nebenwirkungen dabei in deutlich geringerem Umfang auf (Hochhaus et al., 2017). Für Patienten mit mangelndem Ansprechen einer CML unter Imatinib bietet Dasatinib eine wirksame, therapeutische Alternative. Das Nebenwirkungsprofil von Dasatinib unterscheidet sich dabei von dem Imatinibs. So wurden Erkrankungen bei Patienten unter Therapie mit Dasatinib beobachtet, die sonst nur unter Immunsuppression auftreten. So kommt es z.B. zu Pneumocystis jirovecii-Pneumonien oder EBV-assoziierten lymphoproliferativen Erkrankungen (Wolff et al., 2013, Sillaber et al., 2009). Eine immunmodulatorische Wirkung von Dasatinib muss daher angenommen werden. Einige zu Grunde liegende Mechanismen dieser Immunmodulation wurden bereits entschlüsselt. So konnte gezeigt werden, dass wichtige Effektorzellen des Immunsystems von Dasatinib beeinflusst werden. Versuche mit T-Zellen haben ergeben, dass Dasatinib die Aktivierung, Zytokinausschüttung und Proliferation dieser Zellen beeinträchtigt (Weichsel et al., 2008, Schade et al., 2008). Für basophile Granulozyten wurde gezeigt, dass Dasatinib zu einer verminderten Ausschüttung von Interleukinen und Histamin führt (Kneidinger et al., 2008). Natürliche Killerzellen haben unter Einfluss von Dasatinib eine verminderte zytotoxische Aktivität und werden ebenfalls in der Sekretion von Zytokinen gehemmt, vermittelt über eine verminderte Aktivierung der Kinase ERK (Salih et al., 2010, Hassold et al., 2012). Für die Auswirkungen von Dasatinib auf dendritische Zellen lagen zu Beginn dieser Arbeit keine publizierten wissenschaftlichen Daten vor. Es gab jedoch bereits Versuche aus der gleichen Arbeitsgruppe, die eine verminderte Ausreifung, einhergehend mit einer verminderten Expression der Zellmarker CD 40, 80 und 86, sowie eine erhöhte Apoptoserate dendritischer Zellen unter Dasatinib gezeigt hatte. Inzwischen konnten weitere Auswirkungen von Dasatinib auf dendritische Zellen gefunden werden. So kommt es unter Dasatinib zu einer verbesserten Migration dendritischer Zellen entlang eines CCL19-Gradienten *in vitro*, was auf eine verbesserte Migration in lymphatische

Gewebe *in vivo* schließen lässt. Teile meiner Arbeit fanden Eingang in diese Publikation (Nerreter et al., 2014). Im Mausmodell ist bekannt, dass Dasatinib die Rekrutierung Melanom-infiltrierender T-Zellen durch vakzinierte dendritische Zellen verbessert (Lowe et al., 2014). Trotz supprimierender Wirkung von Dasatinib auf wichtige T-Zell-Funktionen (s.o.), konnte eine verbesserte Aktivierung von T-Zellen durch dendritische Zellen unter Dasatinib *in vitro* gezeigt werden, die mit einer vermehrten Ausschüttung von IL 12 einhergeht (Wolfl et al., 2013). In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob Dasatinib eine der wichtigsten Funktionen von dendritischen Zellen, die durch Pathogene hervorgerufene T-Zell-Aktivierung, beeinflusst. Tatsächlich konnten Veränderungen in der Interleukinsekretion dendritischer Zellen unter Dasatinib nachgewiesen werden. Die durch den bakteriellen Zellmembranbestandteil LPS hervorgerufene Sekretion von IL 12 wurde in Anwesenheit von Dasatinib verstärkt und die Ausschüttung von IL 10 abgeschwächt. Da es sich hierbei um die Schlüssel-Interleukine für die Differenzierung von T-Helferzellen zu Th1 bzw. Treg/Th2 Zellen handelt, könnte es unter Dasatinib zu einer verstärkten Rekrutierung von Th1-Helferzellen bzw. zu einer Verschiebung der T-Helferzell-Reaktion in Richtung einer Typ 1-Reaktion als Antwort auf eine Exposition mit LPS kommen. Die durch verminderte IL 10-Sekretion beeinträchtigte Differenzierung regulatorischer T-Helferzellen könnte zusätzlich eine proinflammatorische Immunantwort begünstigen. So konnte für Patienten unter Dasatinibtherapie inzwischen gezeigt werden, dass diese mit zunehmender Therapiedauer einen Abfall regulatorischer T-Helferzellen erfahren (Najima et al., 2018). Die vom Hefepilzbestandteil Zymosan physiologischerweise ausgelöste Differenzierung von T-Helferzellen zu regulatorischen und Typ 2-Helferzellen wird von Dasatinib hingegen vermutlich nicht beeinflusst, da die Sekretion des hierfür verantwortlichen Haupteffektors IL 10 durch dendritische Zellen unverändert bleibt und die Ausschüttung von IL 12 zwar inhibiert wird, aber auch ohne Dasatinib nur in sehr geringer Menge stattfindet (Abb. 4). Ob eine Veränderung der Differenzierung von Th17-Zellen nach Stimulation dendritischer Zellen mit Zymosan durch Dasatinib induziert wird, kann anhand der vorliegenden Daten nicht beurteilt werden, da die Sekretion des hierfür notwendigen Haupteffektors IL 23 nicht gemessen wurde. Um die Effekte von Dasatinib auf dendritische Zellen auf Ebene der intrazellulären Signaltransduktion zu verstehen, wurde die Aktivierung wichtiger intrazellulärer Signalwege im Westernblot untersucht. Hierbei fanden sich zwei



Kinasen, deren Phosphorylierung von Dasatinib inhibiert wurde, ERK und p38. In wissenschaftlichen Arbeiten mit spezifischen Kinaseinhibitoren war bereits gezeigt worden, dass die Aktivierung dieser Proteine in dendritischen Zellen eine gesteigerte Sekretion von IL 10 und eine verminderte Sekretion von IL 12 zur Folge hat (siehe Absatz 4.2). Die Auswirkungen von Dasatinib auf die Interleukinsekretion dendritischer Zellen könnte also über die Inhibierung dieser Kinasen erklärt werden, insbesondere da die Aktivierung anderer wichtiger Signalproteine (c-Jun, Akt, NF- $\kappa$ B) von Dasatinib in den Versuchen unbeeinflusst blieb. Wahrscheinlich wirkt Dasatinib nicht direkt auf die Phosphorylierung von ERK und p38, sondern auf vorgeschaltete Proteine. In der Signalkaskade, die zur Phosphorylierung von ERK und p38 führt, befindet sich auch die Kinase Raf. Diese wird auch über Src-Kinasen aktiviert, welche ein bekanntes Ziel von Dasatinib darstellen (Hilger et al., 2002, Usluoglu et al., 2007). Interessant ist dabei, dass die durch Dasatinib hervorgerufene verminderte Phosphorylierung von p38 und ERK nach Stimulation mit Zymosan ebenfalls zu sehen war, dies aber nicht zu einer signifikanten Veränderung der Interleukinsynthese führte. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte darin liegen, dass Zymosan nicht ausschließlich an TLR bindet, sondern auch an die extrazellulären Rezeptoren Dectin-1 und DC-SIGN. Für Dectin-1 wurde gezeigt, dass eine Aktivierung dieses Rezeptors über die Phospholipase C gamma 2 (PLC $\gamma$ 2) zur intrazellulären Freisetzung von Calcium führt. Mittels Aktivierung von Calcineurin hat diese Freisetzung eine Translokation des Transkriptionsfaktor NFAT (nuclear factor of activated T-cells) in den Zellkern zur Folge, wodurch es zu einer gesteigerten Synthese von IL 10 kommt (Kock et al., 2011, Drummond and Brown, 2011). Dectin-1 kann so unabhängig vom MAP-Kinase-Signalweg eine IL 10-Sekretion in dendritischen Zellen hervorrufen. Hierdurch könnte eine Raf-1 vermittelte Hemmung von ERK und p38 durch Dasatinib kompensiert werden (Abb. 12).



**Abb. 12.** Modell der Signaltransduktion in dendritischen Zellen.

Diese *in vitro* beobachteten Auswirkungen auf dendritische Zellen könnten ein Erklärungsmodell für einige Besonderheiten in der Therapie mit Dasatinib bieten. So konnte gezeigt werden, dass es unter Dasatinib *in vivo* zu einer Verstärkung der Th1-Immunantwort kommt. Im Blut von mit Dasatinib behandelten Patienten fanden sich signifikant mehr zytotoxische T-Zellen vom Gedächtnistyp und T-Helferzellen mit einem Th1-gewichteten Zytokinprofil als bei unbehandelten oder mit Imatinib behandelten Patienten (Kreuzman et al., 2014). Th1-Zellen sind wichtige Mediatoren in der Vermittlung von Autoimmunerkrankungen und unter Dasatinib-Therapie können einige autoimmune Erkrankungen als unerwünschte Wirkung auftreten. So sind autoimmune Hypothyreosen und verschiedene immunologisch vermittelte Hauterkrankungen beschrieben worden (Kim et al., 2010, Drucker et al., 2013). Patienten können eine durch zytotoxische T-Zellen vermittelte hämorrhagische Kolitis entwickeln (Patodi et al., 2012, Saito et al., 2014). Th1-Zellen sind aber nicht nur an der Entstehung von Autoimmunerkrankungen beteiligt, mit der Sekretion von IFN-gamma und TNF-alpha sind die auch essentiell für die Bekämpfung von Lymphomzellen (Corthay et al., 2005). Eine durch Dasatinib verstärkte Th1-Zell-Expansion könnte eine Erklärung dafür bieten, dass Pa-

tienten mit Dasatinib in der Erstlinientherapie der CML ein schnelleres und vollständigeres zytogenetisches Ansprechen als Imatinib haben (Kantarjian et al., 2010). Interessant ist auch, dass einige Patienten unter Therapie mit Dasatinib eine chronische Lymphozytose mit sogenannten großen granulären Lymphozyten „large granular lymphocytes“ (LGL) entwickeln. Hierbei handelt es sich um CD8-positive, zytotoxische T-Zellen oder natürliche Killerzellen, die ihren Namen aufgrund der im Zytoplasma befindlichen azurophilen Granula tragen (Semenzato et al., 1997). Sie sind Teil des adaptiven Immunsystems und machen ca. 10-15% der PBMC aus. Durch Antigen-Exposition kommt es physiologischerweise zur Expansion dieser Zellen. Eine unkontrollierte, chronische Expansion der LGL führt zur leukämischen Verlaufsform mit teils schwerem, bis tödlichen Krankheitsverlauf (Steinway et al., 2014). In einem Teil der mit Dasatinib behandelten Patienten wurde eine mono- oder oligoklonale Expansion dieser Zellen beobachtet, ohne dass diese Patienten die typischen Symptome einer LGL-Leukämie wie Neutropenie, Lymphadenopathie oder Fieber hatten. Diese Patienten unterschieden sich signifikant von Patienten ohne eine solche LGL-Expansion: Einerseits kam es zu einem schnelleren und besseren zytogenetischen Ansprechen der Grunderkrankung (Ph+-ALL und CML), auf der anderen Seite hatten diese Patienten eine signifikant höhere Rate an Pleuraergüssen und Kolitiden, beides bekannte Nebenwirkungen einer Dasatinib-Therapie. In Darmbiopsien und zytologischen Untersuchungen der Pleuraergüsse der betroffenen Patienten konnten dabei die klonalen, zytotoxischen T-Zellen nachgewiesen werden, die sich auch im peripheren Blut befanden, was eine durch expandierte LGL vermittelte Genese der Erkrankungen nahe legt (Mustjoki et al., 2009, Kim et al., 2009). Für die Expansion von LGL ist IL 12 als wichtiger Kofaktor beschrieben worden (Lamy and Loughran, 1999). Eine Dasatinib-vermittelte, vermehrte Sekretion von IL 12 durch dendritische Zellen könnte so zur Expansion der LGL beitragen. Bei all diesen möglichen Zusammenhängen muss betont werden, dass sich die in meiner Arbeit *in vitro* beobachteten Auswirkungen von Dasatinib auf dendritische Zellen nicht einfach auf Patienten übertragen lassen. Das verwendete Modell der aus Monozyten generierten dendritischen Zellen, deren Interleukinsekretion ohne Zusammenspiel mit anderen Zellen gemessen wurde, hat sehr begrenzte Aussagekraft über tatsächliche Auswirkungen im menschlichen Körper und kann nur Hinweise auf mögliche pathophysiologische Zusammenhänge geben. Eine weitere Limitation der Arbeit ist die Tatsache, dass mit IL 12 und 10 nur zwei wichtige Interleukine, die

von dendritischen Zellen sekretiert werden, untersucht wurden. Zum besseren Verständnis der immunmodulatorischen Eigenschaften von Dasatinib wäre gerade im Falle der Stimulation mit Zymosan die Messung der IL 23-Sekretion interessant gewesen, um einen möglichen Einfluss auf die Differenzierung von Th17-Helferzellen festzustellen. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass unter Behandlung mit Dasatinib immunologische Phänomene auftreten, die positiv für den Verlauf der behandelten Grunderkrankung sind, aber auch unerwünschte Wirkungen mit sich bringen. Die in meiner Arbeit gezeigten Auswirkungen von Dasatinib auf dendritische Zellen *in vitro* könnten hierbei eine wichtige Rolle spielen. Weitere wissenschaftliche Arbeiten sind notwendig, um die immunmodulatorische Wirkung von Dasatinib zu verstehen.

## Literaturverzeichnis

- BANCHEREAU, J., BRIERE, F., CAUX, C., DAVOUST, J., LEBECQUE, S., LIU, Y. J., PULENDRAN, B. & PALUCKA, K. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*, 18, 767-811.
- BANCHEREAU, J. & STEINMAN, R. M. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392, 245-52.
- BENDER, A., SAPP, M., SCHULER, G., STEINMAN, R. M. & BHARDWAJ, N. 1996. Improved methods for the generation of dendritic cells from nonproliferating progenitors in human blood. *J Immunol Methods*, 196, 121-35.
- BERNHARD, H., DISIS, M. L., HEIMFELD, S., HAND, S., GRALOW, J. R. & CHEEVER, M. A. 1995. Generation of immunostimulatory dendritic cells from human CD34+ hematopoietic progenitor cells of the bone marrow and peripheral blood. *Cancer Res*, 55, 1099-104.
- BROWN, G. D. 2006. Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nat Rev Immunol*, 6, 33-43.
- BYEON, S. E., YI, Y. S., OH, J., YOO, B. C., HONG, S. & CHO, J. Y. 2012. The role of Src kinase in macrophage-mediated inflammatory responses. *Mediators Inflamm*, 2012, 512926.
- CHEN, Y., LIU, F., WENG, D., SONG, L., LI, C., TANG, W., YU, Y., DAI, W. & CHEN, J. 2013. T(reg) cells may regulate interleukin-17 production by modulating TH1 responses in 1,3-beta-glucan-induced lung inflammation in mice. *J Immunotoxicol*, 10, 253-61.
- CORTHAY, A., SKOVSETH, D. K., LUNDIN, K. U., ROSJO, E., OMHOLT, H., HOFGAARD, P. O., HARALDSEN, G. & BOGEN, B. 2005. Primary antitumor immune response mediated by CD4+ T cells. *Immunity*, 22, 371-83.
- CREUSOT, R. J., MITCHISON, N. A. & TERAZZINI, N. M. 2002. The immunological synapse. *Mol Immunol*, 38, 997-1002.
- DEHLIN, M., ANDERSSON, S., ERLANDSSON, M., BRISLERT, M. & BOKAREWA, M. 2011. Inhibition of fms-like tyrosine kinase 3 alleviates experimental arthritis by reducing formation of dendritic cells and antigen presentation. *J Leukoc Biol*, 90, 811-7.
- DEN HAAN, J. M., KRAAL, G. & BEVAN, M. J. 2007. Cutting edge: Lipopolysaccharide induces IL-10-producing regulatory CD4+ T cells that suppress the CD8+ T cell response. *J Immunol*, 178, 5429-33.
- DIETZ, A. B., BULUR, P. A., EMERY, R. L., WINTERS, J. L., EPPS, D. E., ZUBAIR, A. C. & VUK-PAVLOVIC, S. 2006. A novel source of viable peripheral blood mononuclear cells from leukoreduction system chambers. *Transfusion*, 46, 2083-9.
- DILLON, S., AGRAWAL, A., VAN DYKE, T., LANDRETH, G., MCCAULEY, L., KOH, A., MALISZEWSKI, C., AKIRA, S. & PULENDRAN, B. 2004. A Toll-like receptor 2 ligand stimulates Th2 responses in vivo, via induction of extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase and c-Fos in dendritic cells. *J Immunol*, 172, 4733-43.
- DILLON, S., AGRAWAL, S., BANERJEE, K., LETTERIO, J., DENNING, T. L., OSWALD-RICHTER, K., KASPROWICZ, D. J., KELLAR, K., PARE, J., VAN DYKE, T., ZIEGLER, S., UNUTMAZ, D. & PULENDRAN, B. 2006. Yeast zymosan, a stimulus for TLR2 and dectin-1, induces regulatory antigen-presenting cells and immunological tolerance. *J Clin Invest*, 116, 916-28.

- DRUCKER, A. M., WU, S., BUSAM, K. J., BERMAN, E., AMITAY-LAISH, I. & LACOUTURE, M. E. 2013. Rash with the multitargeted kinase inhibitors nilotinib and dasatinib: meta-analysis and clinical characterization. *Eur J Haematol*, 90, 142-50.
- DRUMMOND, R. A. & BROWN, G. D. 2011. The role of Dectin-1 in the host defence against fungal infections. *Curr Opin Microbiol*, 14, 392-9.
- ENGLISH, D. & ANDERSEN, B. R. 1974. Single-step separation of red blood cells. Granulocytes and mononuclear leukocytes on discontinuous density gradients of Ficoll-Hypaque. *J Immunol Methods*, 5, 249-52.
- GEROSA, F., BALDANI-GUERRA, B., LYAKH, L. A., BATONI, G., ESIN, S., WINKLER-PICKETT, R. T., CONSOLARO, M. R., DE MARCHI, M., GIACHINO, D., ROBBIANO, A., ASTEGIANO, M., SAMBATARO, A., KASTELEIN, R. A., CARRA, G. & TRINCHIERI, G. 2008. Differential regulation of interleukin 12 and interleukin 23 production in human dendritic cells. *J Exp Med*, 205, 1447-61.
- GORDON, S. 2002. Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell*, 111, 927-30.
- HANDLEY, M. E., RASAIYAAH, J., BARNETT, J., THAKKER, M., POLLARA, G., KATZ, D. R. & CHAIN, B. M. 2007. Expression and function of mixed lineage kinases in dendritic cells. *Int Immunol*, 19, 923-33.
- HASSOLD, N., SEYSTAHL, K., KEMPF, K., URLAUB, D., ZEKL, M., EINSELE, H., WATZL, C., WISCHHUSEN, J. & SEGGEWISS-BERNHARDT, R. 2012. Enhancement of natural killer cell effector functions against selected lymphoma and leukemia cell lines by dasatinib. *Int J Cancer*, 131, E916-27.
- HILGER, R. A., SCHEULEN, M. E. & STRUMBERG, D. 2002. The Ras-Raf-MEK-ERK pathway in the treatment of cancer. *Onkologie*, 25, 511-8.
- HIPP, M. M., HILF, N., WALTER, S., WERTH, D., BRAUER, K. M., RADSAK, M. P., WEINSCHENK, T., SINGH-JASUJA, H. & BROSSART, P. 2008. Sorafenib, but not sunitinib, affects function of dendritic cells and induction of primary immune responses. *Blood*, 111, 5610-20.
- HOARAU, C., MARTIN, L., FAUGARET, D., BARON, C., DAUBA, A., AUBERT-JACQUIN, C., VELGE-ROUSSEL, F. & LEBRANCHU, Y. 2008. Supernatant from bifidobacterium differentially modulates transduction signaling pathways for biological functions of human dendritic cells. *PLoS One*, 3, e2753.
- HOCHHAUS, A., LARSON, R. A., GUILHOT, F., RADICH, J. P., BRANFORD, S., HUGHES, T. P., BACCARANI, M., DEININGER, M. W., CERVANTES, F., FUJIHARA, S., ORTMANN, C. E., MENSSEN, H. D., KANTARJIAN, H., O'BRIEN, S. G., DRUKER, B. J. & INVESTIGATORS, I. 2017. Long-Term Outcomes of Imatinib Treatment for Chronic Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*, 376, 917-927.
- HOFER, S., RESCIGNO, M., GRANUCCI, F., CITTERIO, S., FRANCOLINI, M. & RICCIARDI-CASTAGNOLI, P. 2001. Differential activation of NF-kappa B subunits in dendritic cells in response to Gram-negative bacteria and to lipopolysaccharide. *Microbes Infect*, 3, 259-65.
- JAINI, R., RAYMAN, P., COHEN, P. A., FINKE, J. H. & TUOHY, V. K. 2014. Combination of sunitinib with anti-tumor vaccination inhibits T cell priming and requires careful scheduling to achieve productive immunotherapy. *Int J Cancer*, 134, 1695-705.
- JANEWAY, C. 2005. *Immunobiology : the immune system in health and disease*, New York, Garland Science.

- KANTARJIAN, H., SHAH, N. P., HOCHHAUS, A., CORTES, J., SHAH, S., AYALA, M., MOIRAGHI, B., SHEN, Z., MAYER, J., PASQUINI, R., NAKAMAE, H., HUGUET, F., BOQUE, C., CHUAH, C., BLEICKARDT, E., BRADLEY-GARELIK, M. B., ZHU, C., SZATROWSKI, T., SHAPIRO, D. & BACCARANI, M. 2010. Dasatinib versus imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*, 362, 2260-70.
- KIM, D. H., KAMEL-REID, S., CHANG, H., SUTHERLAND, R., JUNG, C. W., KIM, H. J., LEE, J. J. & LIPTON, J. H. 2009. Natural killer or natural killer/T cell lineage large granular lymphocytosis associated with dasatinib therapy for Philadelphia chromosome positive leukemia. *Haematologica*, 94, 135-9.
- KIM, T. D., SCHWARZ, M., NOGAI, H., GRILLE, P., WESTERMANN, J., PLOCKINGER, U., BRAUN, D., SCHWEIZER, U., ARNOLD, R., DORKEN, B. & LE COUTRE, P. 2010. Thyroid dysfunction caused by second-generation tyrosine kinase inhibitors in Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia. *Thyroid*, 20, 1209-14.
- KNEIDINGER, M., SCHMIDT, U., RIX, U., GLEIXNER, K. V., VALES, A., BAUMGARTNER, C., LUPINEK, C., WEGHOFER, M., BENNETT, K. L., HERRMANN, H., SCHEBESTA, A., THOMAS, W. R., VRTALA, S., VALENTA, R., LEE, F. Y., ELLMEIER, W., SUPERTI-FURGA, G. & VALENT, P. 2008. The effects of dasatinib on IgE receptor-dependent activation and histamine release in human basophils. *Blood*, 111, 3097-107.
- KOCK, G., BRINGMANN, A., HELD, S. A., DAECKE, S., HEINE, A. & BROSSART, P. 2011. Regulation of dectin-1-mediated dendritic cell activation by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand troglitazone. *Blood*, 117, 3569-74.
- KORADE-MIRNICS, Z. & COREY, S. J. 2000. Src kinase-mediated signaling in leukocytes. *J Leukoc Biol*, 68, 603-13.
- KREUTZMAN, A., ILANDER, M., PORKKA, K., VAKKILA, J. & MUSTJOKI, S. 2014. Dasatinib promotes Th1-type responses in granzyme B expressing T-cells. *Oncoimmunology*, 3, e28925.
- KULP, A. & KUEHN, M. J. 2010. Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. *Annu Rev Microbiol*, 64, 163-84.
- KWAN, W. H., BOIX, C., GOUGELET, N., FRIDMAN, W. H. & MUELLER, C. G. 2007. LPS induces rapid IL-10 release by M-CSF-conditioned tolerogenic dendritic cell precursors. *J Leukoc Biol*, 82, 133-41.
- LAMY, T. & LOUGHRAN, T. P., JR. 1999. Current concepts: large granular lymphocyte leukemia. *Blood Rev*, 13, 230-40.
- LOMBARDO, L. J., LEE, F. Y., CHEN, P., NORRIS, D., BARRISH, J. C., BEHNIA, K., CASTANEDA, S., CORNELIUS, L. A., DAS, J., DOWEYKO, A. M., FAIRCHILD, C., HUNT, J. T., INIGO, I., JOHNSTON, K., KAMATH, A., KAN, D., KLEI, H., MARATHE, P., PANG, S., PETERSON, R., PITT, S., SCHIEVEN, G. L., SCHMIDT, R. J., TOKARSKI, J., WEN, M. L., WITYAK, J. & BORZILLERI, R. M. 2004. Discovery of N-(2-chloro-6-methylphenyl)-2-(6-(4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl)-2-methylpyrimidin-4-ylamino)thiazole-5-carboxamide (BMS-354825), a dual Src/Abl kinase inhibitor with potent antitumor activity in preclinical assays. *J Med Chem*, 47, 6658-61.
- LORE, K., SONNERBORG, A., SPETZ, A. L., ANDERSSON, U. & ANDERSSON, J. 1998. Immunocytochemical detection of cytokines and chemokines in Langerhans cells and in vitro derived dendritic cells. *J Immunol Methods*, 214, 97-111.
- LOWE, D. B., BOSE, A., TAYLOR, J. L., TAWBI, H., LIN, Y., KIRKWOOD, J. M. & STORKUS, W. J. 2014. Dasatinib promotes the expansion of a therapeutically superior T-cell

- repertoire in response to dendritic cell vaccination against melanoma. *Oncoimmunology*, 3, e27589.
- LOWELL, C. A. 2004. Src-family kinases: rheostats of immune cell signaling. *Mol Immunol*, 41, 631-43.
- LYAKH, L., TRINCHIERI, G., PROVEZZA, L., CARRA, G. & GEROSA, F. 2008. Regulation of interleukin-12/interleukin-23 production and the T-helper 17 response in humans. *Immunol Rev*, 226, 112-31.
- MA, X., YAN, W., ZHENG, H., DU, Q., ZHANG, L., BAN, Y., LI, N. & WEI, F. 2015. Regulation of IL-10 and IL-12 production and function in macrophages and dendritic cells. *F1000Res*, 4.
- MOSMANN, T. R., CHERWINSKI, H., BOND, M. W., GIEDLIN, M. A. & COFFMAN, R. L. 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*, 136, 2348-57.
- MUSTJOKI, S., EKBLUM, M., ARSTILA, T. P., DYBEDAL, I., EPLING-BURNETTE, P. K., GUILHOT, F., HJORTH-HANSEN, H., HOGLUND, M., KOVANEN, P., LAURINOLLI, T., LIESVELD, J., PAQUETTE, R., PINILLA-IBARZ, J., RAUHALA, A., SHAH, N., SIMONSSON, B., SINISALO, M., STEEGMANN, J. L., STENKE, L. & PORKKA, K. 2009. Clonal expansion of T/NK-cells during tyrosine kinase inhibitor dasatinib therapy. *Leukemia*, 23, 1398-405.
- NAJIMA, Y., YOSHIDA, C., IRIYAMA, N., FUJISAWA, S., WAKITA, H., CHIBA, S., OKAMOTO, S., KAWAKAMI, K., TAKEZAKO, N., KUMAGAI, T., OHYASHIKI, K., TAGUCHI, J., YANO, S., IGARASHI, T., KOUZAI, Y., MORITA, S., SAKAMOTO, J., SAKAMAKI, H. & INOKUCHI, K. 2018. Regulatory T cell inhibition by dasatinib is associated with natural killer cell differentiation and a favorable molecular response-The final results of the D-first study. *Leuk Res*, 66, 66-72.
- NAKAHARA, T., UCHI, H., URABE, K., CHEN, Q., FURUE, M. & MOROI, Y. 2004. Role of c-Jun N-terminal kinase on lipopolysaccharide induced maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *Int Immunol*, 16, 1701-9.
- NERRETER, T., KOCHER, C., JESPER, D., EICHELBRONNER, I., PUTZ, E., EINSELE, H. & SEGGEWISS-BERNHARDT, R. 2014. Dasatinib enhances migration of monocyte-derived dendritic cells by reducing phosphorylation of inhibitory immune receptors Siglec-9 and Siglec-3. *Exp Hematol*, 42, 773-82 e1-3.
- NEVES, B. M., CRUZ, M. T., FRANCISCO, V., GARCIA-RODRIGUEZ, C., SILVESTRE, R., CORDEIRO-DA-SILVA, A., DINIS, A. M., BATISTA, M. T., DUARTE, C. B. & LOPES, M. C. 2009. Differential roles of PI3-Kinase, MAPKs and NF-kappaB on the manipulation of dendritic cell T(h)1/T(h)2 cytokine/chemokine polarizing profile. *Mol Immunol*, 46, 2481-92.
- NICAISE, C., WANG, X., ROY, A., PFISTER, M., CHEN, T. T., BLEICKARDT, E., HOCHHAUS, A., SHAH, N. P., NICOLINI, F. E., CLARK, R. E., SAGLIO, G. & KANTARJIAN, H. 2008. Dasatinib Pharmacokinetics and Exposure-Response (E-R): Relationships to Efficacy and Safety in Patients with Chronic Myelogenous Leukemia in Chronic Phase (Cml-Cp). *Haematologica-the Hematology Journal*, 93, 227-227.
- PAGE, T. H., SMOLINSKA, M., GILLESPIE, J., URBANIAK, A. M. & FOXWELL, B. M. 2009. Tyrosine kinases and inflammatory signalling. *Curr Mol Med*, 9, 69-85.
- PASARE, C. & MEDZHITOV, R. 2004. Toll-like receptors and acquired immunity. *Semin Immunol*, 16, 23-6.
- PATODI, N., SAGAR, N., RUDZKI, Z., LANGMAN, G. & SHARMA, N. 2012. Haemorrhagic colitis caused by dasatinib. *Case Rep Hematol*, 2012, 417106.



- POLTORAK, A., HE, X., SMIRNOVA, I., LIU, M. Y., VAN HUFFEL, C., DU, X., BIRDWELL, D., ALEJOS, E., SILVA, M., GALANOS, C., FREUDENBERG, M., RICCIARDI-CASTAGNOLI, P., LAYTON, B. & BEUTLER, B. 1998. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science*, 282, 2085-8.
- PULENDRAN, B., TANG, H. & MANICASSAMY, S. 2010. Programming dendritic cells to induce T(H)2 and tolerogenic responses. *Nat Immunol*, 11, 647-55.
- RANDOLPH, G. J., ANGELI, V. & SWARTZ, M. A. 2005. Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. *Nat Rev Immunol*, 5, 617-28.
- RAPHAEL, I., NALAWADE, S., EAGAR, T. N. & FORSTHUBER, T. G. 2014. T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine*.
- RIX, U., HANTSCHHEL, O., DURNBURGER, G., REMSING RIX, L. L., PLANAYAVSKY, M., FERNBACH, N. V., KAUPE, I., BENNETT, K. L., VALENT, P., COLINGE, J., KOCHER, T. & SUPERTI-FURGA, G. 2007. Chemical proteomic profiles of the BCR-ABL inhibitors imatinib, nilotinib, and dasatinib reveal novel kinase and nonkinase targets. *Blood*, 110, 4055-63.
- ROGERS, N. C., SLACK, E. C., EDWARDS, A. D., NOLTE, M. A., SCHULZ, O., SCHWEIGHOFFER, E., WILLIAMS, D. L., GORDON, S., TYBULEWICZ, V. L., BROWN, G. D. & REIS E SOUSA, C. 2005. Syk-dependent cytokine induction by Dectin-1 reveals a novel pattern recognition pathway for C type lectins. *Immunity*, 22, 507-17.
- ROMANI, L. 2004. Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol*, 4, 1-23.
- ROMANI, N., GRUNER, S., BRANG, D., KAMPGEN, E., LENZ, A., TROCKENBACHER, B., KONWALINKA, G., FRITSCH, P. O., STEINMAN, R. M. & SCHULER, G. 1994. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med*, 180, 83-93.
- ROMANI, N., REIDER, D., HEUER, M., EBNER, S., KAMPGEN, E., EIBL, B., NIEDERWIESER, D. & SCHULER, G. 1996. Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. *J Immunol Methods*, 196, 137-51.
- SAITO, M., IZUMIYAMA, K., MORI, A., IRIE, T., TANAKA, M., MORIOKA, M., SAGA, A., MUSASHI, M., KATO, T., MEGURO, T. & TANINO, M. 2014. [Intestinal bleeding in patients with chronic myelogenous leukemia treated with tyrosine kinase inhibitors]. *Rinsho Ketsueki*, 55, 130-2.
- SALIH, J., HILPERT, J., PLACKE, T., GRUNEBACH, F., STEINLE, A., SALIH, H. R. & KRUSCH, M. 2010. The BCR/ABL-inhibitors imatinib, nilotinib and dasatinib differentially affect NK cell reactivity. *Int J Cancer*, 127, 2119-28.
- SALLUSTO, F. & LANZAVECCHIA, A. 1994. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med*, 179, 1109-18.
- SCHADE, A. E., SCHIEVEN, G. L., TOWNSEND, R., JANKOWSKA, A. M., SUSULIC, V., ZHANG, R., SZPURKA, H. & MACIEJEWSKI, J. P. 2008. Dasatinib, a small-molecule protein tyrosine kinase inhibitor, inhibits T-cell activation and proliferation. *Blood*, 111, 1366-77.
- SEMENZATO, G., ZAMBELLO, R., STARKEBAUM, G., OSHIMI, K. & LOUGHRAN, T. P., JR. 1997. The lymphoproliferative disease of granular lymphocytes: updated criteria for diagnosis. *Blood*, 89, 256-60.

- SILLABER, C., HERRMANN, H., BENNETT, K., RIX, U., BAUMGARTNER, C., BOHM, A., HERNDLHOFER, S., TSCHACHLER, E., SUPERTI-FURGA, G., JAGER, U. & VALENT, P. 2009. Immunosuppression and atypical infections in CML patients treated with dasatinib at 140 mg daily. *Eur J Clin Invest*, 39, 1098-109.
- STEINMAN, R. M. & BANCHEREAU, J. 2007. Taking dendritic cells into medicine. *Nature*, 449, 419-26.
- STEINMAN, R. M. & COHN, Z. A. 1973. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med*, 137, 1142-62.
- STEINWAY, S. N., LEBLANC, F. & LOUGHRAN, T. P., JR. 2014. The pathogenesis and treatment of large granular lymphocyte leukemia. *Blood Rev*, 28, 87-94.
- TOKARSKI, J. S., NEWITT, J. A., CHANG, C. Y., CHENG, J. D., WITTEKIND, M., KIEFER, S. E., KISH, K., LEE, F. Y., BORZILLERRI, R., LOMBARDO, L. J., XIE, D., ZHANG, Y. & KLEI, H. E. 2006. The structure of Dasatinib (BMS-354825) bound to activated ABL kinase domain elucidates its inhibitory activity against imatinib-resistant ABL mutants. *Cancer Res*, 66, 5790-7.
- TROMBETTA, E. S. & MELLMAN, I. 2005. Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu Rev Immunol*, 23, 975-1028.
- USLUOGLU, N., PAVLOVIC, J., MOELLING, K. & RADZIWIŁL, G. 2007. RIP2 mediates LPS-induced p38 and I $\kappa$ B $\alpha$  signaling including IL-12 p40 expression in human monocyte-derived dendritic cells. *Eur J Immunol*, 37, 2317-25.
- WEI, W. C., SU, Y. H., CHEN, S. S., SHEU, J. H. & YANG, N. S. 2011. GM-CSF plays a key role in zymosan-stimulated human dendritic cells for activation of Th1 and Th17 cells. *Cytokine*, 55, 79-89.
- WEICHSEL, R., DIX, C., WOOLDRIDGE, L., CLEMENT, M., FENTON-MAY, A., SEWELL, A. K., ZEZULA, J., GREINER, E., GOSTICK, E., PRICE, D. A., EINSELE, H. & SEGGEWISS, R. 2008. Profound inhibition of antigen-specific T-cell effector functions by dasatinib. *Clin Cancer Res*, 14, 2484-91.
- WEISBERG, E., MANLEY, P. W., COWAN-JACOB, S. W., HOCHHAUS, A. & GRIFFIN, J. D. 2007. Second generation inhibitors of BCR-ABL for the treatment of imatinib-resistant chronic myeloid leukaemia. *Nat Rev Cancer*, 7, 345-56.
- WOLFL, M., LANGHAMMER, F., WIEGERING, V., EYRICH, M. & SCHLEGEL, P. G. 2013. Dasatinib medication causing profound immunosuppression in a patient after haploidentical SCT: functional assays from whole blood as diagnostic clues. *Bone Marrow Transplant*, 48, 875-7.
- ZHOU, L. J. & TEDDER, T. F. 1996. CD14<sup>+</sup> blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83<sup>+</sup> dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 2588-92.
- ZHU, J. & PAUL, W. E. 2008. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood*, 112, 1557-69.

## 6 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. med. Ruth Seggewiß-Bernhardt, Leiterin der Arbeitsgruppe, für die Überlassung des Themas, die konstruktive Kritik und intensive Betreuung.

Außerdem danke ich sehr herzlich Carolin Köchel, die mir insbesondere bei der Durchführung der Versuche eine große Hilfe war und meinen Mitdoktoranden Nicole Hassold und Christoph Köchel für die gute Zusammenarbeit.

Besonderer Dank gilt zudem meinen Eltern für ihre Unterstützung.

## **7 Curriculum vitae**