



**Untersuchungen über den Einfluss des Tyrosinkinaseinhibitors
Dasatinib auf die Funktion von T-Zellen und aus Monozyten
generierten Dendritischen Zellen**

Studies on the effect of the tyrosine-kinase inhibitor dasatinib on
function of T cells and monocyte-derived dendritic cells

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Klasse Infection and Immunity

vorgelegt von
Thomas Nerreter
aus
Schweinfurt

Würzburg, 2014



Eingereicht am:

Bürostempel

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzender: Prof. Dr. Thomas Müller

1. Betreuer: PD Dr. Ruth Seggewiß-Bernhardt

2. Betreuer: Prof. Dr. Thomas Hünig

3. Betreuer: Prof. Dr. Thomas Herrmann

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunden ausgehändigt am:

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| Zusammenfassung | 6 |
| Summary | 8 |
| 1. Einleitung | 10 |
| 1.1. Tyrosinkinase | 10 |
| 1.1.1. Kinasen der SRC-Familie (SFKs) | 10 |
| 1.2. Geschichte der Tyrosinkinaseinhibitoren | 12 |
| 1.3. Dasatinib | 13 |
| 1.3.1. Struktur und Entwicklung | 13 |
| 1.3.2. Klinische Einsatzgebiete | 13 |
| 1.3.3. Wirkung auf Immunzellen | 14 |
| 1.4. Das Glucocorticoid Dexamethason | 15 |
| 1.5. T-Zellen | 16 |
| 1.5.1. Definition | 16 |
| 1.5.2. Subsets und Funktionen | 17 |
| 1.5.3. Src-Kinasen in T-Zellen | 18 |
| 1.6. Dendritische Zellen | 19 |
| 1.6.1. Definition | 19 |
| 1.6.2. Arten von Dendritischen Zellen..... | 20 |
| 1.6.3. Src-Kinasen in Dendritischen Zellen | 22 |
| 1.6.4. CCR7-abhängige Migration von Dendritischen Zellen..... | 23 |
| 1.7. Zielsetzung der Arbeit | 24 |
| 2. Material und Methoden | 26 |
| 2.1. Material | 26 |
| 2.1.1. Geräte und Zubehör | 26 |
| 2.1.2. Verbrauchsmaterial | 27 |
| 2.1.3. Computerprogramme | 29 |
| 2.1.4. Allgemeine Chemikalien | 29 |
| 2.1.5. Medikamente | 30 |
| 2.1.6. Zellkulturmedien und Zusätze | 30 |
| 2.1.7. Reaktionssets (Kits) | 31 |
| 2.1.8. Antikörper und Isotypen für Durchflusszytometrie | 31 |

| | |
|--|-----------|
| 2.1.9. Antikörper für Western Blot..... | 33 |
| 2.1.10. Sonstige Antikörper und Isotypen..... | 33 |
| 2.1.11. Reagenzien und Puffer für Durchflusszytometrie | 33 |
| 2.1.12. Reagenzien und Puffer für Westernblot | 35 |
| 2.2. Methoden..... | 37 |
| 2.2.1. Zellkultur..... | 37 |
| 2.2.1.1. Kryo-Konservierung von Zellen | 37 |
| 2.2.1.2. Zellzahlbestimmung | 37 |
| 2.2.1.3. Isolierung mononukleärer Zellen durch Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation..... | 37 |
| 2.2.1.4. Gewinnung und Kultivierung primärer T-Zellen..... | 38 |
| 2.2.1.5. Gewinnung und Kultivierung primärer Monozyten und Generierung von reifen moDCs . | 39 |
| 2.2.1.6. Co-Kultivierung von moDCs und T-Zellen..... | 39 |
| 2.2.1.7. Applikation von pharmakologischen Inhibitoren und anderen Substanzen | 40 |
| 2.2.2. Durchflusszytometrie | 41 |
| 2.2.2.1. Färbung von Oberflächenmarkern | 41 |
| 2.2.2.2. Färbung intrazellulärer Zytokine und Oberflächenmarker in virusspezifischen T-Zellen .. | 42 |
| 2.2.2.3. Färbung intrazellulärer Zytokine und Oberflächenmarker in der Co-Kultur | 42 |
| 2.2.2.4. Apoptosemessung mittels Annexin V\7-AAD-Färbung | 43 |
| 2.2.2.5. Messung der Proliferation mittels CFSE-Färbung | 43 |
| 2.2.2.6. Messung der Phagozytose-Aktivität durch Aufnahme von FITC-Dextran-Beads..... | 43 |
| 2.2.2.7. Analyse des Migrationsverhaltens im Transwell-Assay | 44 |
| 2.2.3. Western Blot-Analyse..... | 44 |
| 2.2.3.1. Proteinextraktion und Konzentrationsbestimmung | 44 |
| 2.2.3.2. Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen durch SDS-PAGE..... | 45 |
| 2.2.3.3. Proteintransfer auf Nitrozellulosemembran | 45 |
| 2.2.3.4. Antigen-Detektion mittels HRP-gekoppelter Antikörper | 46 |
| 2.2.4. Phospho-Immunoceptor Array | 46 |
| 2.2.5. Messung der Zytokinsekretion durch ELISA | 47 |
| 2.2.6. Statistische Auswertung..... | 48 |
| 3. Ergebnisse..... | 49 |
| 3.A. Untersuchung synergistischer Effekte von Dasatinib und Dexamethason auf T-Zellen | 49 |
| 3.A.1. Effekte der Medikamentenkombination auf die T-Zell-Aktivierung..... | 49 |
| 3.A.2. Auswirkungen auf die frühe Signaltransduktion..... | 52 |
| 3.A.3. Dexamethason und Dasatinib stören additiv die T-Zell-Proliferation | 53 |

| | |
|--|------------|
| 3.A.4. Weder Dexamethason noch Dasatinib führen zu erhöhten Apoptoseraten | 55 |
| 3.A.5. Naive T-Zellen reagieren sensitiver als Gedächtnis-T-Zellen auf die Medikamentenkombination | 56 |
| 3.A.6. Eine Kombination aus Dexamethason und Dasatinib verringert die Proliferation von Virus- spezifischen CD8 ⁺ T-Zellen..... | 58 |
| 3.A.7. Keine kombinatorische Wirkung auf Zytokin-Produktion und Degranulation von Virus- spezifischen CD8 ⁺ T-Zellen..... | 60 |
| 3.B. Über den Einfluss von Dasatinib auf Dendritische Zellen | 63 |
| 3.B.1. Einfluss von Dasatinib auf die Reifung von moDCs | 63 |
| 3.B.2. Dasatinib hat keinen Einfluss auf die Apoptose- oder Nekroseraten von moDCs | 65 |
| 3.B.3. Dasatinib hat keinen Einfluss auf die Aufnahme von FITC-Dextran-Beads..... | 66 |
| 3.B.4. Der Einfluss von Dasatinib auf die Zytokinsekretion..... | 68 |
| 3.B.5. Eine Vorbehandlung mit Dasatinib hat keinen Einfluss auf die Fähigkeit, CMV-spezifische Antworten in CD8 ⁺ T-Zellen zu induzieren | 69 |
| 3.B.6. Dasatinib verstärkt die Migration von moDCs <i>in vitro</i> | 70 |
| 3.B.7. Dasatinib hat keinen Einfluss auf die Expression von CCR7 | 71 |
| 3.B.8. Die Migrationssteigerung durch Dasatinib erfolgt durch Hemmung von SFKs..... | 72 |
| 3.B.9. Dasatinib behindert die Phosphorylierung der inhibitorischen Immunrezeptoren Siglec-3 und Siglec-9 | 73 |
| 3.B.10. Blockierung von Siglec-9 oder Siglec-3 führt zu einer Steigerung der Migration von moDCs | 74 |
| 3.B.11. Blockierung von Siglec-9 mit einem spezifischen blockierenden Antikörper führt zu einer Dephosphorylierung von Siglec-9, Siglec-3 und SHP-2 | 76 |
| 4. Diskussion..... | 78 |
| 4.A. Synergistische Effekte von Dasatinib und Dexamethason in T-Zellen | 78 |
| 4.B. Der Einfluss von Dasatinib auf Dendritische Zellen..... | 83 |
| 5. Literaturverzeichnis | 92 |
| 6. Anhang | 114 |
| 6.1. Abkürzungsverzeichnis | 114 |
| 6.2. Eidesstattliche Erklärung/Affidavit..... | 119 |
| 6.3. Danksagung | 120 |
| 6.4. Publikationsliste | 121 |
| 6.5. Curriculum Vitae..... | 122 |

Zusammenfassung

Kinasen der SRC-Familie (SFKs) sind sowohl in Wachstum und Metastasierung von Tumor- und Leukämiezellen als auch an prominenter Stelle in vielgestaltige Signalwege aller Immunzellen involviert. Eine Hemmung von SFKs ist damit ein vielversprechendes Mittel zur Therapie maligner Erkrankungen, kann aber darüber hinaus auch sehr effektiv zur Immunmodulation genutzt werden. Für den zur Therapie von CML und AML zugelassenen Tyrosinkinaseinhibitor (TKI) Dasatinib (Handelsname Sprycel®), für den unter anderem SFKs die Hauptziele darstellen, wurden, neben der antitumoralen Wirkung, sowohl immunsuppressive als auch immunstimulierende Effekte beschrieben. Aus diesem Grund könnte Dasatinib ein für die Modulation von Immunantworten sehr interessantes Hilfsmittel darstellen. In der vorliegenden Arbeit werden die hemmenden und fördernden Einflüsse von Dasatinib auf zwei Typen von Immunzellen genauer untersucht, um so die Auswirkungen einer Dasatinib-Behandlung auf Zellen des Immunsystems besser zu verstehen und sich das immunmodulatorische Potenzial von Dasatinib besser nutzbar machen zu können.

Der erste Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Untersuchung möglicher kombinatorischer Effekte zwischen Dasatinib und dem Glucocorticoid Dexamethason auf verschiedene Subsets von T-Zellen vor dem Hintergrund eines potentiellen Einsatzes der Kombination bei der allogenen Hämatopoetischen Stammzelltransplantation (HSCT) zur Separation von Graft-versus-Leukemia (GvL)-Effekten und der Graft-versus-host Disease (GvHD). Während keine kombinatorischen Effekte bei der Aktivierung von T-Zellen auftraten, ergaben sich bei der Untersuchung des Einflusses auf die Proliferation besonders in CD8⁺ T-Zellen additive Effekte durch die Kombination. Die Proliferation naiver T-Zell-Subsets wurde bereits durch die beiden Einzelsubstanzen alleine stark gehemmt. Dagegen waren Memory T-Zell-Subsets deutlich unempfindlicher, allerdings konnte durch eine Kombination von Dexamethason und Dasatinib auch die Proliferation dieser Memory Subsets effektiv gehemmt werden. Hierbei zeigten sich bei CD8⁺ Memory Subsets die deutlichsten synergistischen Effekte. Da eine Kombination in stärkerem Maße auch CD8⁺ gegenüber CD4⁺ Memory Subsets hemmt und diese Subsets unterschiedliche Rollen in der Induktion von GvL-Effekten und der Auslösung einer GvHD zu spielen scheinen, ist eine Steigerung der GvL-Effektivität durch die Medikamenten-Kombination bei gleichzeitiger Minimierung eines GvHD-Risikos in Zusammenhang mit anderen publizierten Ergebnissen durchaus denkbar. Weil eine starke Hemmung von virus-spezifischen T-Zellen nur bei sehr hohen Konzentrationen auftrat, ist zudem das Risiko einer Virus-Reaktivierung, die ein großes Problem bei einer HSCT darstellt, eher als gering einzuschätzen.

Der zweite Teil der Arbeit befasst sich mit dem Einfluss von Dasatinib auf aus Monozyten generierte Dendritische Zellen (moDCs) mit einem Fokus auf der Beeinflussung ihrer Migration. Während eine Behandlung mit Dasatinib nur sehr geringe Auswirkungen auf die Ausreifung der moDCs und die

Expression von kostimulatorischen Molekülen hatte, führte eine Dasatinib-Behandlung zu einer Zeit- und Dosis-abhängigen Verringerung der Zytokinsekretion (IL-10 und IL-12). Im Gegensatz dazu hatte Dasatinib keinen Einfluss auf die phagozytotische Aktivität der moDCs und auf ihre Fähigkeit, Virus-spezifische T-Zell-Antworten auszulösen. Dasatinib zeigte dagegen einen deutlich steigernden Einfluss auf die Migration von moDCs gegen einen CCL19-Gradienten im Transwell-Assay, ohne die Expression des CCL19-Rezeptors CCR7 zu beeinflussen. Da ähnliche Migrations-steigernde Effekte auch bei einer Behandlung mit dem spezifischen SFK-Inhibitor SKI-1 auftraten, eine Behandlung mit Nilotinib, einem TKI der nicht auf SFKs wirkt, im Gegensatz dazu aber zu einer Hemmung der Migration führte, liegt es nahe dass die Migrations-steigernde Wirkung von Dasatinib über SFKs vermittelt wird. Dasatinib führte zu einer deutlichen Inhibierung der Phosphorylierung der inhibitorischen Immunrezeptoren Siglec-9 und Siglec-3 (CD33) ohne ihre Expressionslevel zu beeinflussen. Eine mit spezifischen Antikörpern durchgeführte Blockierung dieser Immunrezeptoren, deren ITIM-Domänen mutmaßlich von SFKs phosphoryliert werden, hatte eine deutliche Steigerung der Migration und eine verringerte Phosphorylierung von Siglec-9, Siglec-3 und SHP-2 zur Folge. Letztere ist eine Phosphatase, die nach Bindung an phosphorylierte ITIM-Domänen von Rezeptoren wie den Siglecs verschiedene Zielmoleküle dephosphoryliert. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass die Migrations-steigernde Wirkung von Dasatinib über eine Hemmung von SFKs und daraus resultierend auf dem Wegfall eines inhibitorischen Signalwegs erfolgt. Diese Steigerung der Migration könnte in der Tumor-Therapie von großem Nutzen sein, da bei einer Vakzinierung mit autologen DCs, die mit Tumor-assoziierten Antigenen stimuliert wurden, die schlechte Einwanderung in die Lymphknoten eines der Hauptprobleme darstellt. Zur Überwindung dieses Problems könnte Dasatinib ein sehr effektives Hilfsmittel darstellen und die Therapie-Effizienz deutlich verbessern. Da Dasatinib aber auch eine ganze Reihe weiterer, sehr vielfältiger Einflüsse auf alle Arten von Immunzellen ausübt, scheint eine Verwendung spezifischer blockierender α -Siglec-Antikörper auf Grund geringerer Nebenwirkungen im Vergleich zu Dasatinib möglicherweise sogar noch deutlich besser geeignet zu sein, das Migrationsverhalten Dendritischer Zellen positiv zu beeinflussen. Die Verwendung gegen Siglec-Rezeptoren gerichteter Antikörper als Adjuvantien könnte somit zu einem erfolgreicherem Einsatz der Vakzination mit Dendritischen Zellen in der Tumor-Therapie führen.

Summary

SRC-family kinases (SFKs) are involved in growth and metastasis of tumor and leukemic cells as well as in manifold signaling pathways at prominent position in all types of immune cells. Inhibition of SFKs thereby represents a promising tool for the therapy of malignant diseases but can also be used quite effectively for immunomodulation. Besides its antitumoral activity, immune-suppressive as well as immune-stimulatory effects have been described for the tyrosine kinase inhibitor (TKI) dasatinib (trademark Sprycel®) which is approved for the treatment of CML and AML. Therefore the use of dasatinib could be a very interesting method for the modulation of immune responses. The present paper aims to scrutinize the inhibitory and promoting effects of dasatinib on two types of immune cells to gain a better insight into the consequences of a dasatinib treatment in immune cells and to take advantage of the immunomodulatory potential of dasatinib.

The first part of the paper deals with the investigation of potential combinatory effects between dasatinib and the glucocorticoid dexamethasone on various T cell subsets in the context of a potential use of the combination in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) to dissect Graft-versus-leukemia (GvL) effects and Graft-versus-host Disease. While no combinatory effects regarding T cell activation occurred, the investigation of the influence on T cell proliferation revealed significant additive effects of the combination especially in CD8⁺ T cells. The proliferation of naïve T cell subsets was inhibited already by use of the single agents. In contrast, memory T cell subsets proved to be much more insensitive, but their proliferation was effectively hampered by a combination of dasatinib and dexamethasone whereas the most pronounced synergistic effects occurred in CD8⁺ memory subsets. Since the combination more potently inhibits also CD8⁺ in comparison to CD4⁺ Memory subsets and since these subsets seem to fulfill diverging roles in mediation of GvL effects and induction of GvHD, an increase in GvL efficacy by the drug combination while concurrently reducing the risk of a GvHD is conceivable, especially when including other published results. Moreover, as a potent inhibition of virus-specific T cells only occurred at very high concentrations, the risk of viral reactivations, which represent a major problem with HSCT, could be considered as rather marginal.

The second part of the paper addresses the influence of dasatinib on monocyte-derived dendritic cells (moDCs) with a special focus on its influence on their migration. While dasatinib treatment exhibited only negligible effects on moDCs' maturation and expression of costimulatory molecules, dasatinib led to a time- and dose-dependent reduction in cytokine secretion (IL-10 and IL-12). In contrast, dasatinib had no influence on phagocytotic activity of moDCs and on their ability to induce virus-specific T cell responses. Notably Dasatinib had a pronounced beneficial effect on migration of moDCs towards a CCL-19 gradient in a transwell assay without altering the expression of the CCL19 receptor CCR7. Since comparable migration-enhancing effects also occurred in presence of the specific SFK-inhibitor SKI-1 while the use of nilotinib, a TKI not inhibiting SFKs, in contrast led to an inhibition of migration, it can be

assumed that dasatinib mediates its migration-enhancing effects via an inhibition of SFKs. Dasatinib treatment led to a dramatic decrease in phosphorylation of the inhibitory immunoreceptors Siglec-9 and Siglec-3 (CD33) without altering their expression levels. The use of specific antibodies for blocking of these immunoreceptors, whose ITIM domains are thought to be phosphorylated by SFKs, led to a powerful increase in migration and diminished phosphorylation of Siglec-9, Siglec-3 and SHP-2. The latter is a phosphatase which dephosphorylates target molecules after binding phosphorylated ITIM domains of receptors like the Siglecs. This paper's results suggest that dasatinib mediates its migration-enhancing effects via inhibition of SFKs resulting in omission of an inhibitory signaling pathway. This enhancement of migratory capacity could be very useful in anti-tumor therapy as limited migration to the lymph nodes is one of the major problems when vaccinating with autologous dendritic cells that were stimulated with tumor-associated antigens. Dasatinib could be a potent mediator to overcome this problem and could lead to an improvement in the efficacy of therapy. Since dasatinib in addition also affects a broad range of processes in all immune cells, the use of specific α -Siglec blocking antibodies seems to be the more appropriate attempt to positively influence the migratory behavior of dendritic cells due to fewer side effects in comparison to dasatinib. Utilization of antibodies that target siglec receptors as adjuvants could lead to a more successful use of a vaccination with dendritic cells in tumor therapy.

1. Einleitung

1.1. Tyrosinkinasen

Proteinkinasen sind *per definitionem* Enzyme, die die Übertragung einer Phosphatgruppe von einem Nucleosidtriphosphat, normalerweise ATP, auf die Hydroxy-Seitenkette einer Aminosäure katalysieren [1]. Neben Kinasen, die die Hydroxy-Gruppen von Serin und Threonin (Serin/Threonin-Kinasen) oder Histidin (Histidin-Kinasen) [1, 2] phosphorylieren und den sogenannten Bispezifischen Kinasen wie MEK1 und MEK2, die neben Serin und Threonin auch Tyrosinreste phosphorylieren können [3], existiert im humanen Genom die Klasse der Tyrosinkinasen mit mehr als 90 Mitgliedern [4]. Tyrosinkinasen werden für gewöhnlich nach ihrer Lokalisation in der Zelle in membranständige Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTKs), wie EGFR und c-KIT, und in zytoplasmatische Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen (nRTKs) ohne Transmembrandomäne unterteilt [4]. Zu den bislang 32 identifizierten nRTKs gehören unter anderem ABL1, ACK1, CSK, FAK, FES, FRK, JAK2, SYK, ZAP70, TEC und BTK und die Kinasen der SRC-Familie [4-6].

1.1.1. Kinasen der SRC-Familie (SFKs)

Die Familie der SRC-Kinasen („*src family kinases*“, SFKs) besteht neben dem namensgebenden SRC im humanen System aus den neun weiteren Mitgliedern BLK, FYN, HCK, LCK, LYN, YES, FGR, FRK und SRMS, die alle ein Molekulargewicht von etwa 60 kDa aufweisen [4, 7]. SRC (c-SRC, zelluläres SRC) wurde 1976 von einer Gruppe um J. Michael Bishop und Harald E. Varmus als Ursprung des (retro)viralen v-SRC („SRC“ ist ein Kurzwort von „*sarcoma*“ im Namen des v-SRC kodierenden Rous-Sarkom-Virus/*Rous sarcoma virus*) erkannt [8]; für diese erste Entdeckung eines zellulären Proto-Onkogens wurden beide 1989 mit dem „Nobelpreis für Physiologie oder Medizin“ ausgezeichnet [9]. Die Expressionsmuster der unterschiedlichen SFKs unterscheiden sich in den verschiedenen Blutzellen teilweise sehr deutlich; so überwiegen in NK-Zellen FYN, LCK und LYN, in B-Zellen FYN, LYN und BLK und in T-Zellen LCK und FYN, wohingegen in Monozyten, Makrophagen und Dendritischen Zellen eine Expression von HCK, FGR und LYN vorherrscht. Allen Mitgliedern der SFKs ist eine ähnliche Struktur gemeinsam, die auch in *Abbildung 1* dargestellt ist. N-terminal befindet sich eine für die jeweilige SFK charakteristische Domäne (U, *unique*) gefolgt von den weit verbreiteten SRC-Homologie-Domänen SH3 und SH2. In der darauf folgenden katalytisch aktiven Kinase-Domäne befindet sich ein phosphorylierbarer Tyrosinrest, dessen zumeist autokatalytische Phosphorylierung für eine vollständige Aktivierung der SRC-Kinase erforderlich ist. Nach dieser Kinase-Domäne befindet sich C-terminal eine kurze regulatorische Region, die einen weiteren phosphorylierbaren Tyrosinrest enthält [10]. Bei den kürzeren SRC-Kinasen FGR, FRK und SRMS fehlt dieser regulatorische Tyrosinrest [6, 11, 12]. Wird dieser zweite Tyrosinrest phosphoryliert (vornehmlich durch die Tyrosinkinase CSK), so kommt es zu einer Konformationsänderung, die zu einer Maskierung des

sich in der Kinasedomäne befindlichen aktivierenden Tyrosinrests führt, so dass die SFK in einen inaktiven Zustand übergeht [10].

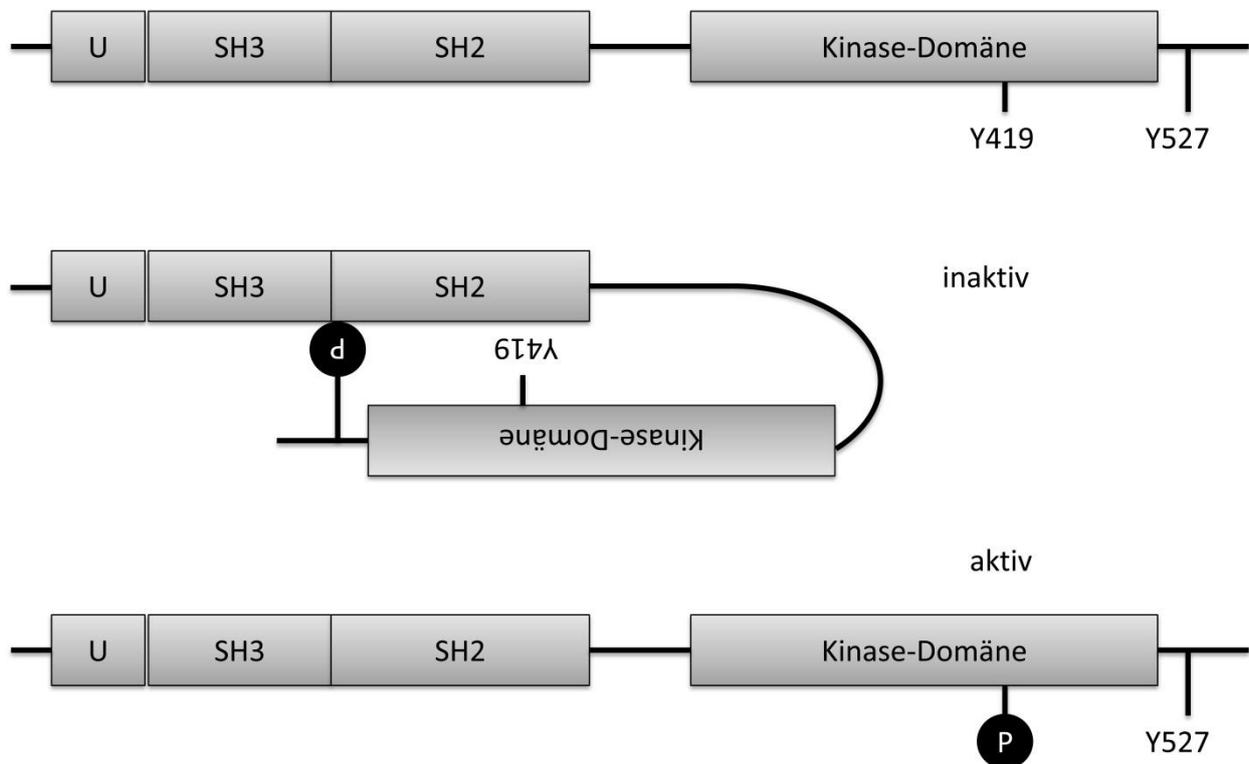


Abbildung 1: Schematische Darstellung einer prototypischen SFK am Beispiel SRC. SRC weist wie alle SFKs N-terminal eine einzigartige (U, *unique*) Domäne auf, gefolgt von den SRC-Homologie-Domänen SH3 und SH2 und der funktionellen Kinase-Domäne. SRC besitzt zwei phosphorylierbare Tyrosinreste. Wird der inhibitorische Tyrosinrest Y527 phosphoryliert, kommt es zu einer Konformationsänderung die den aktivierenden Tyrosinrest Y419 maskiert. Wird dagegen Y419 phosphoryliert, kommt es zu einer vollständigen Aktivierung von SRC. Abbildung nach Lowell [10] (verändert).

SFKs sind in den verschiedenen Immunzellen an nahezu allen zellulären Vorgängen entscheidend beteiligt, so sind SFKs unter anderem, aber nicht ausschließlich, in das Signaling von Zellen des angeborenen Immunsystems (z.B. über Toll-like-Rezeptoren), das B- und T-Zell-Signaling, die Zytokinantwort und die Reaktion auf Wachstumsfaktoren, die Regulation von Apoptose und Phagozytose, das Integrin-Signaling, die Kontrolle über K^+ / Ca^{2+} -Ionenkanäle, Adhäsion und Antigenstimulation involviert [10]. Auf die Rollen von SFKs in den in dieser Arbeit behandelten T-Zellen und Dendritischen Zellen wird unter 1.5.3 respektive 1.6.3 eingegangen.

1.2. Geschichte der Tyrosinkinaseinhibitoren

Schon früh wurde erkannt, dass eine übermäßige Tyrosinkinase-Aktivität zur Entwicklung von Tumoren beitragen kann [13-15]. Daher bestand stets ein großes Interesse an Substanzen, die in der Lage waren, Tyrosinkinasen zu hemmen. Zunächst handelte es sich bei den eingesetzten Stoffen um natürlich vorkommende Substanzen wie die aus Pflanzen oder Pilzen isolierten Quercetin [16], Erbstatin [17, 18], Genistein [19], Herbimycin [20] oder Lavendustin A [21], die alle ein breites Wirkungsspektrum aufweisen [22]. Basierend auf dem natürlichen Erbstatin wurden 1988 die ersten künstlich synthetisierten Tyrosinkinaseinhibitoren (TKIs) zur Hemmung von EGFR präsentiert [23]. Schon kurze Zeit später konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, relativ spezifische Inhibitoren herzustellen, die etwa selektiv EGFR, nicht aber das nahe verwandte ErbB-2 inhibieren und *vice versa* [24, 25]. Die Entdeckung des BCR-ABL-Fusionsproteins und dessen Rolle bei der Chronischen myeloischen Leukämie (CML) durch eine erhöhte Tyrosinkinase-Aktivität [26-29] führte zu einer ausgedehnten Suche nach geeigneten pharmakologischen Inhibitoren [22, 30, 31], die schließlich 1996 in der Entdeckung von Imatinib mündete [32, 33], einem 2-phenylaminopyrimidin-Derivat. Diese Substanzklasse wurde ursprünglich zur Inhibierung der Proteinkinase C (PKC) entwickelt [34, 35]. Nachdem Imatinib 1998 zum ersten Mal an Menschen getestet worden war, erfolgte schon 2001 die erstmalige Zulassung des unter den Handelsnamen Gleevec® (in den USA) bzw. Glivec® (in Europa) von Novartis vertriebenen Medikaments zur CML-Therapie [36, 37]. Im Kielwasser dieses Erfolgs wurden weitere Tyrosinkinase-Inhibitoren beschrieben und schließlich zugelassen, so unter anderem die TKIs Erlotinib [38], Gefitinib [39], Lapatinib [40], Sorafenib [41], Sunitinib [42] und Pazopanib [43], die BCR-ABL-Inhibitoren der zweiten Generation Dasatinib [44-46], Nilotinib [47] und Bosutinib [48], der Inhibitor der dritten Generation Ponatinib [49], und zuletzt Vandetanib [50], Tofacitinib [51], Ruxolitinib [52], Crizotinib [53], Ibrutinib [54] und Regorafenib [55]. Die Wirkungsweisen der meisten Tyrosinkinaseinhibitoren einschließlich Imatinib, Dasatinib, Nilotinib und Ponatinib beruhen auf einer kompetitiven Blockierung der ATP-Bindestelle der Tyrosinkinase [56], es existieren aber auch andere Formen wie eine sterische Hemmung durch Konformationsänderungen, oder eine Konkurrenz mit den Substraten der Kinasen [56-59].

1.3. Dasatinib

1.3.1. Struktur und Entwicklung

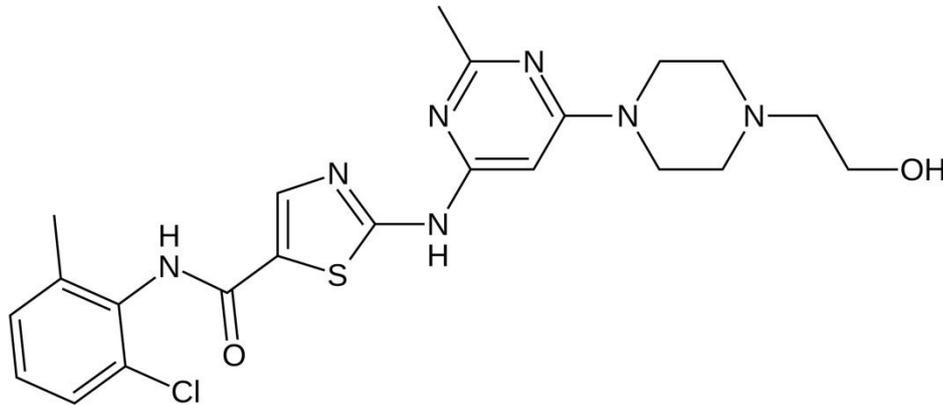


Abbildung 2: Strukturformel von Dasatinib. Dasatinib mit der Summenformel $C_{22}H_{26}ClN_7O_2S$ und dem IUPAC-Namen *N*-(2-chloro-6-methylphenyl)-2-[[6-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-2-methyl-4-pyrimidinyl]amino]-5-thiazol carboxamid monohydrat ist ein Aminothiazol und besitzt ein Molekulargewicht von 488,01 g/mol [60].
Abbildungsquelle: <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Dasatinib.svg> (Aufgerufen am 10.04.2014).

Dasatinib wurde unter der Projektbezeichnung BMS-354825 von Bristol-Myers Squibb entwickelt und 2004 erstmals vorgestellt [44]. Der Freiname des Medikaments, das unter dem Handelsnamen Sprycel® vertrieben wird, leitet sich nicht, wie bisweilen angenommen, vom Sanskrit-Wort Dasa (für Feind), sondern vom Namen des an der Synthese beteiligten Chemikers Jagabandhu Das ab [44, 61].

Dasatinib, dessen Strukturformel in *Abbildung 2* dargestellt ist, wurde von Bristol-Myers Squibb zusammen mit einer Reihe anderer substituierter 2-(aminopyridyl)- und 2-(aminopyrimidinyl)-thiazol-5-Carboxamide als dualer BCR-ABL/SRC-Inhibitor entwickelt und zeigte eine starke Proliferationshemmung in verschiedenen Tumorzelllinien [44].

1.3.2. Klinische Einsatzgebiete

In einer Phase I-Wirksamkeits-Studie konnte gezeigt werden, dass Dasatinib in Patienten mit chronischer CML, bei denen eine Unverträglichkeit oder Resistenz gegen Imatinib vorlag, in 37 von 40 Fällen zu einer kompletten hämatologischen Remission führte [62]. Dasatinib wurde 2005 (Europa) bzw. 2006 (USA) als Second-Line-Therapie für CML- und Philadelphia-Chromosom-positive ALL-Patienten zugelassen, die unter einer Imatinib-Resistenz oder –unverträglichkeit leiden [63]. Nach weiteren vielversprechenden Phase-II- [64-68] und Phase-III-Studien [69, 70] erfolgte 2010 die Zulassung auch zur First-Line-Therapie bei Neudiagnosen von CML und AML. Darüber hinaus wurden eine ganze Reihe weiterer klinischer Studien zum Einsatz von Dasatinib unter anderem gegen solide Tumore [71, 72], Prostatakarzinome [73,

74], das kleinzellige Bronchialkarzinom (SCLC) [75, 76], Chronische lymphatische Leukämie (CLL) [77], Plattenepithelkarzinome [78], Brustkrebs [79, 80], Mesotheliome [81], Ovarial- und Bauchfellkarzinome [82], Pankreaskarzinome [83] oder das Hochrisiko-Myelodysplastische Syndrom [84] durchgeführt.

1.3.3. Wirkung auf Immunzellen

Neben den erwünschten hemmenden Effekten auf entartete Tumorzellen und leukämische Zellen übt Dasatinib durch seine Eigenschaft als Tyrosinkinase-Inhibitor auch Effekte auf jede Art von Immunzellen aus. Da neben BCR-ABL, ABL und allen SFKs auch BTK, CSK, MAP3K4, GAK, TEC, EPHB6 und eine Vielzahl weiterer Kinasen zu den Targets von Dasatinib zählen [85], rückten Untersuchungen zur Wirkung von Dasatinib auf Immunzellen sehr schnell in den Fokus der Forschung. Neben einer ganzen Reihe von Publikationen, die den Einfluss von Dasatinib auf verschiedene Zelllinien untersuchten, zeigten Hantschel *et al.* 2007, dass Dasatinib hemmend auf die IL-6-Sekretion in murinen Mastzellen und die Histamin-Freisetzung durch humane basophile Granulozyten wirkt [86]. Im Hinblick auf die Histamin-Freisetzung durch basophile Granulozyten wurde allerdings inzwischen auch gezeigt, dass Dasatinib in geringen Konzentrationen im humanen System eine Freisetzung fördern kann [87, 88]. Im Laufe der Zeit wurden eine ganze Reihe von Arbeiten veröffentlicht, die aufzeigten, dass Dasatinib einen hemmenden Einfluss auf humane und murine T-Zellen ausübt [89-95]. Auf den Inhalt dieser Arbeiten wird in der Diskussion (4.A.) eingegangen. Beim klinischen Einsatz von Dasatinib zur CML-Therapie wurden dagegen bei einem beträchtlichen Teil der Patienten eine klonale Expansion von T-Zellen und NK-Zellen [96-102] sowie deren verstärkte Mobilisierung [103] und fördernde Einflüsse auf $\gamma\delta$ -T-Zellen [104] beobachtet. In mit Dasatinib behandelten Mäusen kam es zu einer Verringerung des Serumlevels von TNF- α in der Lunge, wohingegen die Sekretion von IL-6 und die Akkumulation von Neutrophilen in der Lunge nicht beeinflusst waren. Darüber hinaus hemmte Dasatinib die Sekretion von TNF- α und IL-6 nach TLR-Stimulation von aus murinem Knochenmark generierten Makrophagen (BMDM) [105]. Mehrfach wurde eine hemmende Wirkung von Dasatinib auf Osteoklasten [106-109] und Tumor-assoziierte Makrophagen [108], sowie auf Neutrophile [110]. Für den Einfluss auf Dendritische Zellen gibt es Berichte sowohl über hemmende (unter anderem auf die Zytokinproduktion) als auch fördernde Effekte wie etwa eine verstärkte Induktion von T-Zell-Antworten [111-113]. Auf diese Arbeiten wird wiederum in der Diskussion (4.B.) eingegangen. Bendall *et al.* berichteten von sehr unterschiedlichen Effekten von Dasatinib je nach Art der Stimulation und des untersuchten Zelltyps. So führte Dasatinib zum Beispiel zu einer kompletten Dephosphorylierung der Natriumorthovanadat-induzierten Phosphorylierung von STAT5 in T-Zellen und B-Zellen, nicht aber in Plasmazytoiden Dendritischen Zellen [114]. Neben dieser Gruppe berichteten auch weitere Publikationen von einer Hemmung des B-Zell-Signalings [115, 116] und daraus resultierend einer verringerten Proliferation [117] und einer verminderten humoralen Immunantwort [118]. Während die ersten Publikationen zum Einfluss von Dasatinib auf NK-Zellen eine verringerte Zytotoxizität [91, 119,

120] und Zytokin-Produktion [120] feststellten, wurde in neueren Veröffentlichungen von einer gesteigerten Expansion [121, 122], Zytotoxizität [122, 123], Zytokokinproduktion und Expression von Degranulationsmarkern [123] berichtet. In Mäusen führte Dasatinib zu einer verringerten Zahl an Thrombozyten durch eine gestörte Migration und Differenzierung von Megakaryozyten [124]. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass Dasatinib durch die hemmende Wirkung auf die CD4⁺-T-Zell-Proliferation einen deutlich blockierenden Einfluss auf die Virus-Produktion in HIV-1-infizierten Patienten zeigt [125].

1.4. Das Glucocorticoid Dexamethason

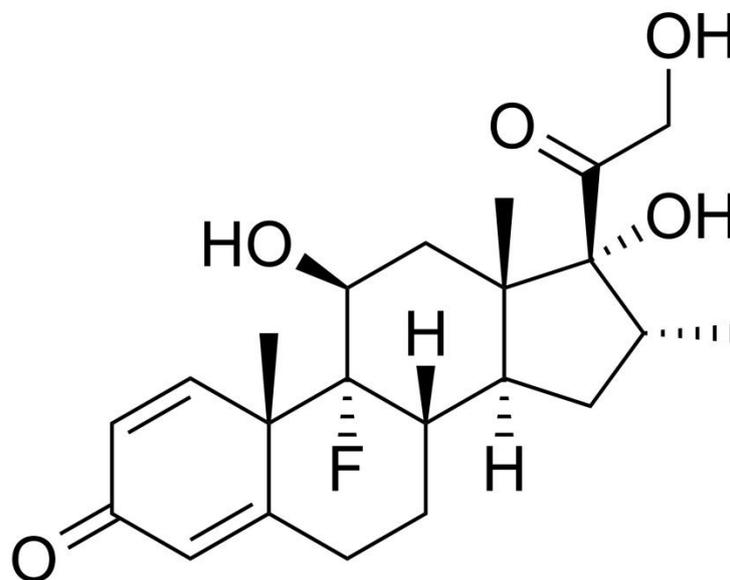


Abbildung 3: Strukturformel von Dexamethason. Dexamethason mit der Summenformel $C_{22}H_{29}FO_5$ und dem IUPAC-Namen (8S,9R,10S,11S,13S,14S,16R,17R)-9-fluoro-11,17-dihydroxy-17-(2-hydroxyacetyl)-10,13,16-trimethyl-6,7,8,11,12,14,15,16-octahydrocyclopenta[a]phenanthren-3-on ist ein synthetisches Glucocorticoid und besitzt ein Molekulargewicht von 392,46 g/mol [126].

Abbildungsquelle: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Dexamethasone_structure.svg (Aufgerufen am 10.04.2014).

Natürliche Glucocorticoide sind Corticosteroide aus der Nebennierenrinde wie Cortisol und Corticosteron, die neben sehr vielfältigen anderen physiologischen Auswirkungen auch eine entzündungshemmende und immunsuppressive Wirkung vermitteln [127, 128]. Aus diesem Grunde werden Glucocorticoide seit den 1930er Jahren und bis heute zur Immunsuppression und Entzündungshemmung eingesetzt. Dexamethason, ein synthetisches Glucocorticoid, wurde schon in den 1950er Jahren erstmals synthetisiert und zur Therapie von Psoriasis verwendet [129-131]. Die Strukturformel von Dexamethason, das eine etwa 25-mal höhere anti-inflammatorische Wirkung als das natürlich vorkommende Cortisol besitzt [132], ist in *Abbildung 3* dargestellt.

Lange Zeit wurde angenommen, dass Glucocorticoide ihre immunsuppressiven Effekte ausschließlich genomisch über den Glucocorticoidrezeptor vermitteln [133]. Dieser Rezeptor liegt im inaktiven Zustand assoziiert mit Chaperonen wie dem Hitzeschockprotein HSP90 vor. Nach Ligandenbindung dissoziieren diese Chaperone und es kommt zu einer Translokation des aktivierten Glucocorticoidrezeptors in den Zellkern [134-136]. Hier bindet der Glucocorticoidrezeptor an spezifische Motive der DNA, sogenannte *Glucocorticoid-responsive elements* (GRE) oder an Transkriptionsfaktoren wie AP-1 oder NFκB und reguliert auf diese Weise die Expression einer Vielzahl von Genen [136-138]. Erst in jüngerer Zeit wurde ein weiterer, weitaus schneller ablaufender Mechanismus vorgestellt [133, 139-143], bei dem angenommen wird, dass der inaktive Glucocorticoidrezeptor in Multiproteinkomplexen gebunden vorliegt. Diese Multiproteinkomplexe beinhalten neben Rezeptoren wie zum Beispiel dem T-Zell-Rezeptor-Komplex unter anderem auch Hitzeschockproteine und Tyrosinkinasen. Nach Bindung des Glucocorticoids an seinen Rezeptor kommt es zur Dissoziation der Multiproteinkomplexe und damit zu keiner Signalweiterleitung über die Tyrosinkinasen [133]. Somit wird angenommen dass Glucocorticoide, wenn auch indirekt, die Aktivität von SFKs hemmen können [133, 144]. Glucocorticoide wie Dexamethason wurden und werden alleine oder unterstützend zur Behandlung einer Vielzahl von unterschiedlichen Erkrankungen wie unter anderem verschiedenen Autoimmunerkrankungen [145-148], Graft-versus-Host-Disease (GvHD) [149, 150] oder in der Tumor- [151, 152] und Leukämie-therapie [153], aber auch zur Vorbeugung der Höhenkrankheit [154] und bei zahnärztlichen Eingriffen [155] eingesetzt.

1.5. T-Zellen

1.5.1. Definition

T-Zellen oder T-Lymphozyten bilden gemeinsam mit den B-Zellen und den Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) die Gruppe der Lymphozyten, die sich (zusammen mit einem Teil der Dendritischen Zellen) aus gemeinsamen lymphatischen Vorläuferzellen entwickeln. Während die NK-Zellen Teil der angeborenen Immunantwort darstellen, bilden T-Zellen und B-Zellen gemeinsam den entscheidenden Teil der adaptiven Immunantwort. Beide Typen von Lymphozyten weisen als charakteristisches Merkmal hochspezifische Antigenrezeptoren auf, die sich im Laufe der T-Zell- und B-Zell-Entwicklung mittels V(D)J-Rekombination aus einem schier unerschöpflichen Repertoire bilden. Die Bezeichnung „T-Zellen“ leitet sich vom Thymus, dem Ort der T-Zell-Reifung ab, einem zweilappigen Organ des lymphatischen Systems, das sich im oberen Brustbereich über dem Herzen befindet [156, 157].

1.5.2. Subsets und Funktionen

Allen T-Zellen ist ein Rezeptorkomplex, der sogenannte T-Zell-Rezeptor-Komplex (TCR-Komplex) gemein. Dieser besteht aus dem heterodimeren T-Zell-Rezeptor, dem für T-Zellen charakteristischen CD3-Co-Rezeptor (einem Heteromer aus 4 Untereinheiten) und zwei CD247- (CD3 ζ -Kette)-Monomeren [158].

Prinzipiell lassen sich T-Zellen zunächst an Hand der beiden Ketten des auf ihnen vorliegenden T-Zell-Rezeptors in die $\alpha\beta$ - und die wesentlich seltener vorkommenden $\gamma\delta$ -T-Zellen unterteilen, die nur etwa zwei Prozent der Gesamtzahl an T-Zellen ausmachen. Letztere unterscheiden sich sehr deutlich von ersteren und sind auf Grund ihrer distinkten Funktionsweise und der im Vergleich stark limitierten Spezifität ihres Antigenrezeptors dem angeborenen Immunsystem zuzurechnen, wo sie sowohl zytotoxische als auch unterstützende Funktionen erfüllen [156, 159].

Innerhalb der $\alpha\beta$ -T-Lymphozyten gibt es eine Reihe von stark unterschiedlichen Sub-Gruppen mit sehr divergenten Funktionen. Anhand des assoziiert mit dem TCR-Komplex vorliegenden Co-Rezeptors lassen sich die $\alpha\beta$ -T-Zellen in $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen unterteilen, wobei die $CD4^+$ T-Zellen klassischerweise als T-Helferzellen bezeichnet werden und eine MHC-Klasse-II-Restriktion aufweisen. Die Aktivierung der $CD8^+$ T-Zellen, die als Zytotoxische T-Lymphozyten oder (veraltet) T-Killerzellen bezeichnet werden, ist dagegen MHC-Klasse-I-restringiert. Diese Definition ist durch die Entdeckung von weiteren, spezialisierten T-Zell-Subsets inzwischen als zumindest zu stark verallgemeinernd anzusehen [156, 159].

Zunächst ist hier die Gruppe der NKT-Zellen zu nennen, ein T-Zell-Subset, das neben dem TCR-Komplex auch Merkmale natürlicher Killerzellen wie etwa eine Expression von CD16 oder CD56 aufweist. Im Hinblick auf die Expression der Co-Rezeptoren können NKT-Zellen sowohl $CD4^+$ als auch $CD8^+$ sein. NKT-Zellen sind im Gegensatz zu den übrigen $\alpha\beta$ -T-Zellen nicht MHC-restringiert und erkennen keine durch Antigen-präsentierende Zellen (APCs) präsentierte Peptide. Stattdessen exprimieren sie einen T-Zell-Rezeptor der eine CD1-Restriktion aufweist und somit mittels CD1d präsentierte Lipide erkennen kann [159, 160].

Neben diesem „Sonderfall“ existiert eine heterogene Klasse von $CD4^+$ T-Zellen, die im Gegensatz zu allen übrigen T-Zellen keine immunfördernde Funktion aufweisen, sondern zu einer Hemmung oder Abmilderung von Immunantworten beitragen. Der Hauptteil dieser regulatorischen T-Zellen (T_{Regs}), die früher auch als T-Suppressorzellen bezeichnet wurden, weist neben der Expression von CD4 auch eine Expression von CD25 und eine hohe Dichte an CD62L sowie eine Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3 auf. Dieser ist neben der Induktion FoxP3-abhängiger Gene auch für eine verringerte Produktion von IL-2 verantwortlich, da er die Interaktion von AP-1 und NFAT am IL-2-Promotor stört. Regulatorische T-Zellen üben ihre hemmende Funktion sowohl durch Zell-Zell-Kontakt, als auch über eine Sekretion von IL-10 und TGF- β aus [161, 162]. Da regulatorische T-Zellen in dieser Arbeit nicht behandelt werden, wird auf ungewöhnlichere und seltenere Formen dieser T-Zell-Klasse hier nicht weiter eingegangen.

Naive, also nicht-aktivierte CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen, zirkulieren ständig über Blut- und Lymphsystem durch den Körper und passieren dabei auch die Lymphknoten. Kommt es hierbei zu einer Interaktion mit einem von einer APC präsentierten Peptid das passend zum T-Zell-Rezeptor der naiven T-Zelle ist, erfolgt deren Aktivierung. Hierdurch kommt es, hauptsächlich über die Sekretion von IL-2 (vor allem durch CD4⁺ T-Zellen) zu einer klonalen Expansion und einer Differenzierung in Effektor- und Gedächtniszellen [163]. T-Effektorzellen sind in der Lage, Antigene sowohl in lymphatischen Organen als auch in der Peripherie zu erkennen, sodass eine Aktivierung nicht auf die lymphatischen Organe beschränkt ist, sondern in jedem infizierten Gewebe erfolgen kann. Unter anderem anhand des Profils ihrer Zytokinsekretion lassen sich verschiedene Subsets von CD4⁺ Effektorzellen wie T_h1, T_h2 und T_h17 charakterisieren, auf die aber hier nicht weiter eingegangen werden soll. Während CD4⁺ Effektorzellen durch die Sekretion von Zytokinen ihrem Namen (Helfer-T-Zellen) entsprechend unter anderem Makrophagen und B-Zellen aktivieren und „zu Hilfe holen“, vermitteln CD8⁺ Effektorzellen, die typischen CTLs (Zytotoxische T-Lymphozyten), neben der Aktivierung von Makrophagen die direkte Zerstörung infizierter Target-Zellen [162, 163].

1.5.3. Src-Kinasen in T-Zellen

Während die Expression der ubiquitär exprimierten SFKs SRC und YES in T-Zellen sehr gering ist, stellen LYN und vor allem auch LCK die vorherrschenden Mitglieder der SRC-Kinasen in T-Lymphozyten dar [164, 165]. LCK und FYN weisen ein Molekulargewicht von 56 respektive 59 KDa auf, besitzen den typischen Aufbau einer SRC-Kinase (vgl. 1.1.1.) und liegen an zelluläre Membranen assoziiert vor. Während LCK häufiger an der Plasmamembran zu finden ist, liegt FYN vermehrt in zentrosomalen und mitochondrialen Strukturen vor [164, 165]. Die *Unique*-Domäne von LCK vermittelt dessen Interaktionen mit den CD4- und CD8-Korezeptoren, was entscheidend zur Teilnahme von LCK am proximalen T-Zell-Signaling beiträgt [164]. LCK liegt normalerweise in einem „*primed state*“ vor, was bedeutet, dass weder der aktivierende noch der inhibitorische Tyrosinrest phosphoryliert sind. Eine komplette Inaktivierung von LCK erfolgt durch eine Phosphorylierung des inhibitorischen Tyrosinrests Y505 durch CSK, welche vor allem durch CD45 aufgehoben werden kann [164-166]. Kommt es zu einer Interaktion des T-Zell-Rezeptors mit MHC-Molekülen, wird LCK über seine Interaktion mit CD4 oder CD8 zum T-Zellrezeptor-Komplex rekrutiert, wo es, vermutlich autokatalytisch, zu einer Phosphorylierung des aktivierenden Tyrosinrests Y394 kommt [164]. Nachdem es sowohl am T-Zell-Rezeptor, als auch bei einem der Korezeptoren zu einer Ligandenbindung gekommen ist, befindet sich LCK in enger räumlicher Nähe zu ITAM-Domänen der CD3- und CD247- (ζ-) Ketten und ist in der Lage, diese zu phosphorylieren [158, 164]. Durch die Phosphorylierung kann eine Kinase der SYK-Familie, ZAP70 (*ζ-associated protein of 70 kD*), an diese ITAM-Domänen andocken. Nach der Bindung erfolgt die Phosphorylierung von ZAP70 durch LCK. Die hierdurch erfolgende Aktivierung von ZAP70 führt wiederum zur Rekrutierung und Phosphorylierung von

weiteren Adaptor-Proteinen wie LAT und SLP76 und schließlich über die Aktivierung der Phospholipase C (PLC γ 1) zur Aktivierung des Calcium- und PKC- (Proteinkinase C)-Signalings und über die Rekrutierung von Grb2 und SOS an LAT zur Aktivierung des Ras-MAP-Kinase-Signalwegs [158]. Es wird angenommen, dass auf ähnliche Weise auch FYN am proximalen T-Zell-Signaling beteiligt ist, allerdings in einem deutlich geringeren Ausmaß als LCK [165]. Neben dieser ganz entscheidenden und sehr weit upstream gelegenen Position im T-Zell-Signaling und in der Aktivierung von T-Zellen und somit der Beeinflussung von vielen entscheidenden Prozessen wie zum Beispiel Proliferation, Zytokinproduktion oder Degranulation, sind LCK und FYN auch in großem Ausmaß an der T-Zell-Entwicklung beteiligt [164, 165]. Hierzu zählen eine entscheidende Involvierung in das Pre-TCR-Signaling und in die Differenzierung von T-Zellen, sowohl beim Übergang vom doppelt-negativen (CD4 $^-$ CD8 $^-$) zum doppelt-positiven (CD4 $^+$ CD8 $^+$), als auch vom doppelt-positiven zum einfach-positiven (CD4 $^+$ CD8 $^-$ oder CD4 $^-$ CD8 $^+$) Zustand [164, 165]. So konnte gezeigt werden, dass eine starke Aktivität von LCK zu einer bevorzugten Ausbildung von CD4 $^+$ T-Zellen gegenüber CD8 $^+$ führt [167-171].

1.6. Dendritische Zellen

1.6.1. Definition

Dendritische Zellen (DCs) sind zumeist dem Knochenmark entstammende Zellen des angeborenen Immunsystems, die in epithelialen und lymphoiden Geweben vorliegen und morphologisch durch dünne, zytoplasmatische Fortsätze, die sogenannten Dendriten, charakterisiert sind. Da es sich um eine sehr heterogene Gruppe mit unterschiedlichen Funktionen handelt, und sich verschiedene Typen von Dendritischen Zellen sowohl aus lymphoiden (CLP) als auch aus myeloischen Vorläuferzellen (CMP) entwickeln können oder sogar mesenchymalen Ursprungs sind, ist es unmöglich auf Grund der Expression von einzelnen Antigenen einen einzigen, charakteristischen „DC-Marker“ zu benennen, und auch die Abgrenzung gegen andere Zelltypen wie Monozyten und Makrophagen ist teilweise schwierig. Gemein ist allen Dendritischen Zellen, mit Ausnahme der folliculären DCs (fDCs), eine Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen und die Aufnahme, Prozessierung und Präsentation von Antigenen (hauptsächlich an T-Zellen) als Hauptaufgaben. Verbunden damit ist die Zuordnung zu den „professionellen“ Antigen-präsentierenden Zellen (APCs), zu denen neben den Dendritischen Zellen noch Makrophagen und B-Zellen gerechnet werden [172-176].

1.6.2. Arten von Dendritischen Zellen

Noch immer ist eine verbindliche Einteilung der verschiedenen Arten von Dendritischen Zellen, die wirklich alle Aspekte abdeckt, nicht verfügbar. Am einfachsten lassen sich Dendritische Zellen im Hinblick auf ihre Lokalisation in den verschiedenen Geweben und ihrer Funktion grob unterteilen wie in der Folge beschrieben. Neben den Dendritischen Zellen im menschlichen Blut, auf die gleich noch detaillierter eingegangen wird, sind hier (ohne Anspruch auf Vollständigkeit) die Langerhans-Zellen (LCs) der Haut, interstitielle, interdigitierende, inflammatorische, und follikuläre Dendritische Zellen zu nennen [177, 178].

Die Entdeckung der Langerhans-Zellen durch Paul Langerhans 1868 stellte die erste Beschreibung und Abbildung eines dendritischen Zelltyps dar. Langerhans-Zellen sind myeloiden Ursprungs und sind hauptsächlich in der Epidermis der Haut und im Schleimhaut-Epithel zu finden, kommen allerdings auch im Gastrointestinaltrakt vor. Als charakteristisches Merkmal weisen die Langerhans-Zellen Tennisschläger-förmige Organellen, die so genannten Birbeck-Granula auf, die unter anderem den charakteristischen LC-Marker Langerin (CD207) enthalten. Die noch unreifen LCs migrieren nach Antigenkontakt zur Antigenpräsentation in die Lymphknoten [177, 179].

Erst gut 100 Jahre später, 1973, erfolgte die Wiederentdeckung von Zellen mit einem dendritischen Phänotyp durch Ralph M. Steinman, der auch den Begriff „Dendritische Zellen“ prägte [176]. Für diese Entdeckung und seine lebenslange Forschungsarbeit zu den Dendritischen Zellen wurde ihm 2011 der „Nobelpreis für Physiologie oder Medizin“ verliehen, als erstem Forscher posthum [180].

Interstitielle DCs (auch als *Dermal DCs* oder *Interstitial/Dermal DCs* bezeichnet) liegen im Gegensatz zu den LCs in der Dermis oder der *Lamina propria* der Schleimhäute vor, weisen keine Birbeck-Granula auf und sind vor allem durch die Expression von DC-SIGN (CD209) charakterisiert. Ebenso wie die Langerhans-Zellen wandern die unreifen interstitiellen DCs, die myeloiden Ursprungs sind und viele ihrer Eigenschaften mit den Makrophagen teilen, nach Antigenaufnahme in die Lymphknoten ein [177, 181-183].

Interdigitierende Dendritische Zellen, die ebenso wie die interstitiellen DCs bisweilen als „iDCs“ bezeichnet werden, liegen vor allem in den T-Zell-Zonen der Lymphknoten vor, weisen eine Expression von DC-LAMP, CD54 und CD83 und den kostimulatorischen Molekülen CD40, CD80 und CD86 auf und interagieren daher dort sehr eng mit T-Zellen und sind starke T-Zell-Aktivatoren [184-187].

Inflammatorische Dendritische Zellen (infDCs) stellen, wie der Name nahelegt ein DC-Subset dar, das während Entzündungsreaktionen auftritt. infDCs exprimieren HLA-DR, CD11c, BDCA1, CD1a, FcεRI, CD206, CD172a, CD14, CD11b, M-CSFR und ZBTB46 und entwickeln sich aus Monozyten, die an den Ort der Entzündung rekrutiert wurden [178, 188, 189].

Follikuläre Dendritische Zellen (fDCs) stammen im Gegensatz zu allen anderen DCs nicht von Stammzellen des Knochenmarks ab, sondern sind mesenchymalen Ursprungs. Wie bereits erwähnt

weisen sie keine Expression von Klasse-II-MHC-Molekülen auf und sind nicht in der Lage, Antigene aufzunehmen. Diese in den Follikeln sekundärer lymphatischer Organe vorkommenden Dendritischen Zellen spielen eine wichtige unterstützende Rolle in der B-Zell-Antigenerkennung [175, 177, 190].

Wie für alle Dendritischen Zellen ist es auch bei den im Blut vorkommenden Formen schwierig, eine allgemeingültige Abgrenzung und Einteilung zu schaffen. Der oft dafür herangezogenen Marker CD11c ist dafür nicht (alleine) geeignet, da auch annähernd alle menschlichen Monozyten CD11c exprimieren. Ziegler-Heitbrock *et al.* nahmen 2010 unter der Schirmherrschaft von IUIS (*International Union of Immunological Societies*) und WHO (*World Health Organisation*) auf Basis von Transkriptomanalysen folgende Definition vor: Dendritische Zellen im menschlichen Blut sind MHC-Klasse-II-positiv und Lineage-Marker-negativ, also ohne Expression des T-Zellmarkers CD3, des Monozytenmarkers CD14, des Granulozytenmarkers CD15, der B-Zell-Marker CD19 und CD20 und des NK-Zellmarkers CD56. Darüber hinaus unterteilen die Autoren die humanen Dendritischen Zellen des Blutes in drei Subgruppen. Dies sind die plasmazytoiden, CD303⁺ DCs, die myeloiden CD1c⁺ DCs und die myeloiden CD141⁺ DCs [173, 191].

Plasmazytoide Dendritische Zellen (pDCs), die sich sowohl aus lymphoiden, als auch aus myeloiden Vorläuferzellen entwickeln können, spielen eine entscheidende Rolle in der Immunantwort gegen virale Erreger, sind in der Lage, große Mengen an IFN- α zu produzieren und exprimieren die Toll-like-Rezeptoren TLR7 und TLR9 [173, 192, 193].

Die beiden Formen von myeloiden DCs, die auch als *conventional DCs* (cDCs) oder mDCs (*myeloid DCs*) bezeichnet werden, unterscheiden sich durch das Muster ihrer TLR-Rezeptor-Expression und ihrer Zytokinsekretion als Antwort auf Pathogene. Während die CD1c⁺ myeloiden DCs TLR2 und, in geringerem Ausmaß, TLR4 exprimieren und vornehmlich IL-10 sekretieren, zeigen die CD141⁺ myeloiden DCs keine Expression von TLR2 oder TLR4, sind durch eine Expression von TLR-3 gekennzeichnet und in der Lage, große Mengen an IL-12 und IFN- β zu produzieren [191, 194-196].

Der Großteil der *in vitro*-Arbeiten über Dendritischen Zellen beruht auf Untersuchungen von aus Monozyten generierten Dendritischen Zellen (*monocyte-derived dendritic cells*, moDCs). Diese werden, wie der Name schon sagt, durch Zugabe von GM-CSF und IL-4 aus aus humanem Blut isolierten CD14⁺ Monozyten generiert wobei es unter anderem zu einer Herunterregulation von CD14 und einer Hochregulation von CD1a kommt. Mittels bakterieller Antigene ausgereifte moDCs weisen neben CD1a eine Expression von CD40, CD80, CD83, CD86, CCR7 und Klasse-II-MHC-Molekülen auf. Hinsichtlich der Vergleichbarkeit mit *in vivo* vorkommenden DC-Subsets gab und gibt es stets divergierende Meinungen. So unterscheiden sich moDCs teilweise sehr deutlich hinsichtlich der Expression von TLR-Molekülen und der Zytokinproduktion von den DC-Subsets des Blutes. Vielmehr ähneln moDCs in vielen Bereichen den interstitiellen Dendritischen Zellen der Haut. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass kein exaktes Homolog der *in vitro* generierten moDCs im menschlichen Körper existiert, sich aber die Funktionen der

in vivo vorkommenden Subsets auf Grund der einfachen Handhabbarkeit und der verhältnismäßig großen verfügbaren Zellmengen sehr gut untersuchen lassen [111, 191, 197, 198].

1.6.3. Src-Kinasen in Dendritischen Zellen

Im Gegensatz zu dem relativ gut erforschten und klar definierten Einfluss der SFKs LCK und LYN auf das T-Zell-Signaling (vgl. 1.5.3.) ist die Situation in Zellen des angeborenen Immunsystems im Allgemeinen und in Dendritischen Zellen im Speziellen weitaus weniger klar. Dies liegt natürlich zum einen in der großen Heterogenität der Dendritischen Zellen (vgl. 1.6.2.) begründet, ist zum anderen aber auch darauf zurückzuführen, dass in Zellen des angeborenen Immunsystems mehrere, oft redundante SFKs vorkommen, die ihre Funktionen gegenseitig übernehmen können [199]. Wie auch in den meisten anderen Zellen des angeborenen Immunsystems werden in Dendritischen Zellen vor allem die SFKs HCK, FGR, LYN und, in geringerem Umfang, SRC exprimiert [10]. Die Hypothese, dass SRC-Kinasen in Zellen des angeborenen Immunsystems vor allem über die Toll-like-Rezeptoren aktiviert werden, konnte durch die Beobachtung widerlegt werden, dass HCK-, FGR- und LYN-defiziente Makrophagen eine unveränderte oder sogar stärkere Antwort auf eine LPS-Behandlung zeigen und sogar die TLR-Aktivierung eher negativ regulieren [200-202].

Der am besten erforschte Signalweg, in dem SFKs eine entscheidende Rolle spielen, ist der klassische Immunrezeptor-aktivierende Pathway über ITAMs, der von einer großen Menge an Immunrezeptoren wie Fc-Rezeptoren, aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren oder Molekülen zur Pathogenerkennung wie den Mitgliedern der TREM-Familie verwendet wird. Hierbei werden die ITAM-Domänen der Rezeptoren durch SFKs phosphoryliert, was die Bindung der Kinase SYK ermöglicht. Diese kann nun wiederum ihrerseits eine ganze Reihe von Substraten phosphorylieren, zu denen unter anderem SLP76 oder LAT gehören. Anschließend sind diese in der Lage, weitere Proteine zu rekrutieren, was letztendlich zur Aktivierung der MAP-Kinase-, NF- κ B- und Ca²⁺-Signalwege und damit zur Steigerung der Proliferation, Zytokinsekretion und Transkription NFAT-abhängiger Gene führt [199]. Neben diesem klassischen ITAM-Weg existiert eine weitere Form, bei der Rezeptoren wie die Familie der Integrine nach erfolgter Aktivierung ITAM-haltige Adaptorproteine rekrutieren. Nach der Phosphorylierung der ITAMs durch SRC-Kinasen kommt es zu einer Rekrutierung von SYK, was unter anderem zur Aktivierung der PI3- und TEC-Kinasen führt. Darüber hinaus tragen SFKs und SYK auch zur Aktivierung der FAK/PYK2-Kinasen und damit des Rho/WASp-Signalwegs bei, was vor allem zu für Adhäsion, Migration und Degranulation notwendigen Veränderungen des Zytoskeletts führt [199].

SFKs spielen aber nicht nur in der Regulation von aktivierenden Signalwegen eine Rolle, sondern sind durch die Phosphorylierung der ITIM-Domänen inhibitorischer Immunrezeptoren wie den ILTs oder Rezeptoren der Siglec-Familie auch an der Hemmung von Immunantworten beteiligt. Nach Phosphorylierung der ITIM-Domänen dieser hemmenden Immunrezeptoren können Phosphatasen wie

SHP-1, SHP-2 oder SHIP1 an die ITIM-Domänen binden (siehe auch 4.B.) und sind durch diese Aktivierung in der Lage eine ganze Reihe von Substraten zu dephosphorylieren. Zu diesen Substraten gehören unter anderem die ITAMs von aktivierenden Immunrezeptoren selbst, aber auch viele Moleküle der eben angesprochenen aktivierenden Signalwege. Auf diese Weise tragen SFKs sowohl zur Steigerung als auch zur Hemmung von Immunantworten bei [199].

Darüber hinaus gibt es eine Reihe von Studien, die eine Involvierung von SFKs in die Regulation der Zytokinantwort über JAK-Kinasen [203, 204], das TRAF-Signaling [205] oder der direkten Interaktion mit dem IL-6-Rezeptor [206] beschreiben. Auch an der Regulation des Chemokinsignalings, das über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren vermittelt wird [207-209] (und damit auch an der Migration, siehe 1.6.4.), und an einer schier endlosen Reihe weiterer zellulärer Funktionen sind SFKs direkt oder auch indirekt beteiligt, was eine erschöpfende Aufzählung nahezu unmöglich macht [199].

Für die in dieser Arbeit behandelten moDCs wurde die Beteiligung von Kinasen der SRC-Familie vor allem auf die Zytokinproduktion beschrieben, wohingegen der Einfluss auf die Ausreifung, vor allem auf die Expression von kostimulatorischen Molekülen, eher begrenzt ist [111, 209, 210],

1.6.4. CCR7-abhängige Migration von Dendritischen Zellen

Eine wichtige Folge der Ausreifung von Dendritischen Zellen durch Antigenaufnahme ist eine Hochregulation des Chemokinrezeptors CCR7. Hierdurch wird es den Zellen ermöglicht, zum Beispiel aus der Haut, in Richtung eines CCL19- oder CCL21-Gradienten über afferente Lymphgefäße in die Lymphknoten einzuwandern, wo in den T-Zell-Zonen oder B-Zell-Follikeln die Präsentation der aufgenommenen und prozessierten Antigene erfolgt und somit eine T- oder B-Zellantwort in Gang gesetzt wird [211-218]. Nach der Bindung des Liganden an CCR7 erfolgen die Aktivierung verschiedener an CCR7 gekoppelter G-Proteine und die Initiierung verschiedener Signalkaskaden. So führt eine Aktivierung von $G_{\alpha_{12}}$ zur Aktivierung von Rho, PYK2 und schließlich des Aktin-bindenden Proteins Cofilin was die Migrationsgeschwindigkeit der Dendritischen Zellen erhöht. Eine Stimulation von G_{α_i} führt zur Aktivierung der MAP-Kinase-Kaskade über p38, Erk1/2 und JNK und der Aktivierung von PI3K-, PKC- und AKT/NF- κ B-Signalwegen, die zusammen mit der Induktion des Ca^{2+} -Signalings über PLC β 2 und IP $_3$ für eine Regulation der Chemotaxis sorgen. SFKs sind durch ihre Phosphorylierungsaktivität in der Lage, auf diese Prozesse fördernd einzuwirken. Darüber hinaus ist eine dritte Form von G-Proteinen, G_{α_q} , an der Induktion des Calcium-Signalings über PLC1,3 und IP $_3$ beteiligt [215, 219-222]. Je nach Zelltyp unterscheidet sich die Bedeutung der einzelnen Signalkaskaden, so wurde etwa in moDCs gezeigt, dass die Migration gegen CCL19 und CCL21 zwar von der Aktivierung von Rho, einer Involvierung der PLC und einem Calcium-Flux abhängig ist, die PI3K allerdings nicht benötigt wird [223]. Neben diesen grundsätzlichen, CCR7-abhängigen zellulären Vorgängen tragen eine ganze Reihe verschiedenster Moleküle zur Migration von Dendritischen Zellen bei, darunter Transmembran-Transportproteine wie

MDR1 oder MRP1 [224], Integrine (vor allem LFA-1, VLA-4 und Mac-1) [225, 226], Selectine wie L-Selectin [226] oder Sialomucine wie PSGL-1 [226, 227], von denen viele mit SFKs assoziiert vorliegen oder von SFKs beeinflusst werden [227].

1.7. Zielsetzung der Arbeit

Immunmodulation, also die Beeinflussung von Zellen des Immunsystems durch physikalische Reize oder pharmakologische Wirkstoffe, spielt eine ganz entscheidende Rolle in der Behandlung einer Vielzahl von Krankheiten, wobei Immunmodulatoren einerseits immunstimulatorisch, andererseits immunsuppressiv wirken können. Während für die Therapie von malignen Tumorerkrankungen eher eine stimulierende Wirkung auf Immunzellen benötigt wird, ist in anderen Fällen, etwa als Voraussetzung für eine erfolgreiche Transplantation, eine Hemmung von Immunantworten unabdingbar.

Kinasen der SRC-Familie (SFKs) spielen sowohl beim malignen Wachstum [228], als auch in vielfältigen Signalwegen in Immunzellen sehr entscheidende Rollen (vgl. 1.5.3. und 1.6.3.). Daher ist die Inhibierung von SFKs ein wirksames Mittel zur Behandlung von entarteten Zellen, bietet daneben aber auch eine effektive Möglichkeit zur Immunmodulation. Da für den Tyrosinkinaseinhibitor Dasatinib neben den anvisierten direkten antitumoralen Effekten sowohl immunsuppressive als auch immunstimulierende Wirkungen beschrieben wurden (siehe 1.3.3.), stellt dieses Medikament ein sehr interessantes Mittel zur Beeinflussung von Immunantworten dar. Die vorliegende Arbeit hat zum Ziel, die hemmenden und fördernden Einflüsse von Dasatinib auf zwei Typen von Immunzellen genauer zu untersuchen um die Auswirkungen von Dasatinib auf Zellen des Immunsystems besser zu verstehen und so das immunmodulatorische Potenzial von Dasatinib besser nutzbar zu machen.

Graft-versus-host Disease (GvHD) und infektiöse Komplikationen durch die Immunsuppression von T-Zellen sind auch weiterhin die Hauptursachen für Morbidität und Mortalität nach erfolgter allogener Hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSCT) [229-232]. Glucocorticoide stellen noch immer die verwendete Standardbehandlung dar, unterdrücken aber neben der bezweckten Hemmung der GvHD-Effekte leider auch die wünschenswerten *Graft-versus-leukemia* (GvL)-Effekte und begünstigen durch ihre stark immunsuppressive Wirkung Folgeinfektionen. Durch die Unterschiede zwischen GvL- und GvHD-vermittelnden T-Zellen hinsichtlich ihrer Expansionsraten und den Bedingungen für ihre Aktivierung [233-235], ist es denkbar, dass die immunmodulatorische Wirkung von Tyrosinkinaseinhibitoren wie Dasatinib GvHD-Effekte minimieren kann, ohne GvL-Effekte zu beeinträchtigen. Diese Hypothese wird unterstützt durch klinische Beobachtungen einer GvHD-Hemmung durch die Tyrosinkinaseinhibitoren Imatinib und Dasatinib [236-238] und einer Nicht-Beeinflussung von GvL-Reaktionen durch Dasatinib [239]. Eines der Ziele der vorliegenden Arbeit ist daher die Untersuchung möglicher synergistischer Effekte einer Kombination aus dem Tyrosinkinase-Inhibitor Dasatinib und dem Glucocorticoid Dexamethason auf T-Zellen und T-Zell-Subsets vor dem

Hintergrund der möglichen Verringerung von Nebenwirkungen in der Klinik durch die Verwendung geringerer Dosen der Einzelsubstanzen in der Kombination.

Als professionelle Antigen-präsentierende Zellen sind Dendritische Zellen (DCs) unabdingbare Regulatoren spezifischer T-Zell-Reaktionen gegen Pathogene und Krankheiten. Die Erzeugung von schützenden Anti-Tumor-Antworten beruht auf der Präsentation tumoraler Antigene durch die DCs. Daher ist die Vakzinierung mit autologen Dendritischen Zellen, die mit Tumor-assoziierten Antigenen stimuliert werden, zu einer der Standardbehandlungen in der klinischen Krebstherapie geworden [240]. Allerdings wird der Erfolg einer solchen Therapie durch eine verminderte Ausreifung und schlechte Migration der *ex vivo* expandierten DCs vom Ort der Injektion zu den Lymphknoten vermindert [241, 242]. Da die Migration somit eine entscheidende Grundvoraussetzung für die Induktion von T-Zellantworten darstellt, wäre es wünschenswert ein besseres Verständnis der Migration Dendritischer Zellen zu gewinnen und ihre Migration pharmakologisch zu steigern. Da für Dasatinib hemmende, aber auch fördernde Effekte auf Immunzellen beschrieben wurden [90, 91, 111-113, 119-123], beschäftigt sich der zweite Teil dieser Arbeit mit dem Einfluss von Dasatinib auf die Reifung und Funktionalität von *in vitro* aus Monozyten generierten Dendritischen Zellen (moDCs), wobei der Haupt-Fokus auf dem Einfluss von Dasatinib auf die Migration liegt und die molekularen Ursachen für die Beeinflussung der Migrationskapazität genauer untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte und Zubehör

| | | |
|---|------------------------|--|
| Analysenwaage, d=0,0001 g | AEJ 120-4M | Kern&Sohn, Balingen |
| Analysenwaage, d=0,1 g | 440-33N | Kern&Sohn, Balingen |
| Autoklav | V75 | Systemec, Wetzlar |
| Durchflusszytometer, 4-Farb-basiert | FACS-Calibur™ | BD Biosciences, Heidelberg |
| Einfrierhilfe „Mr Frosty™“ | 5100-0001 | Fisher Scientific, Schwerte |
| Eismaschine, Scotsman® | AF80 | Hubbard Ice Systems, Otley, Suffolk, UK |
| Filmentwicklermaschine | CP1000 | Agfa, Düsseldorf |
| Gefrier-/Kühlschrank (-20 °C/4 °C) | CP4023 | Liebherr, Ochsenhausen |
| Gefrierschrank (-20 °C) | GP1466 | Liebherr, Ochsenhausen |
| Gefrierschrank (-80 °C) | MDF-U73 | Panasonic Healthcare, Wood Dale, IL, USA |
| Gelelektrophoresekammer und Blot-Modul, „XCell SureLock® Mini-Cell and XCell II™ Blot Module“ | EI0002 | Life Technologies, Darmstadt |
| Großraum-Gefrierbehälter für flüssigen Stickstoff | 10K | Taylor-Wharton (tec-lab, Taunusstein) |
| Heizblock, „neoBlock 1“ | 2-2503 | neoLab, Heidelberg |
| Inkubator (37 °C, 5% CO ₂) | Hera Cell 150 | Fisher Scientific, Schwerte |
| Kühlschrank (4 °C) | KTP 1740 | Liebherr, Ochsenhausen |
| MACS-Zellseparator | QuadroMACS™ | Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach |
| Magnetrührer/Wärmplatte “Yellowline” | MSH basic | IKA-Werke, Staufen |
| <i>Microplate Reader</i> | Model 680 | BioRad, München |
| <i>Microplate Reader</i> | Genios basic | Tecan, Crailsheim |
| Mikroskop | Axio Imager Z1 | Carl Zeiss Microscopy, Jena |
| Mikroskop, „eclipse“ | TS 100 | Nikon, Düsseldorf |
| pH-Meter | Ph211 | Hanna, Kehl am Rhein |
| Pipettierhilfe | SWIFT-PET ⁺ | Hirschmann, Eberstadt |
| Pipetten 1-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl | Reference | Eppendorf, Hamburg |
| Pipetten 2-20 µl, 20-200 µl, 200-1000 µl | Pipet Man | Gilson International, Limburg |

| | | |
|--|----------------------|---|
| Pipette, 12-Kanal, 20-200 µl | Discovery Comfort | Hirschmann, Eberstadt |
| Pipetten 0,1-2 µl, 0,5-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl | Discovery Comfort | Hirschmann, Eberstadt |
| Pipetten 0,5-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl | peqPETTE | PEQLAB, Erlangen |
| Röntgenfilmkassetten 13x18 cm | 13x18 | Dr. Goos-Suprema, Heidelberg |
| Röntgenfilmverstärkerfolien | Special Rapid 200 | Dr. Goos-Suprema, Heidelberg |
| Rotator | RS-24 | Biosan, Riga, Lettland |
| Spannungsquelle, Power ease 500 | PS0091 | Life Technologies, Darmstadt |
| Sterilwerkbank, Herasafe™ | HS12 | Fisher Scientific, Schwerte |
| Stickstofftank | XL240 | Taylor-Wharton (tec-lab, Taunusstein) |
| Trockenschrank, Heratherm™ | IMH60 | Fisher Scientific, Schwerte |
| Vortexmischer „UZUSIO“ | VTX3000L | LMS Group, Tokyo, Japan |
| Vortexmischer „VortexGenie2™“ | G560E | Scientific Industries, Bohemia, NY, USA |
| Wasserbad | WB/OB 7-45 | Memmert, Schwabach |
| Wippschüttler, Minirocker | MR-1 | Lab4you, Berlin |
| Zählkammer, Neubauer <i>improved</i> | 0640030 | Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen |
| Zentrifuge | ZR66 | Hermle Labortechnik, Wehingen |
| Zentrifuge, Microzentrifuge | Sigma 1-14 | Sigma Laborzentrifugen, Osterode |
| Zentrifuge, ROTIXA/P | 4201 | Andreas Hettich, Tuttlingen |

2.1.2. Verbrauchsmaterial

| | | |
|--|--------------|------------------------------|
| Alufolie | AF30 | Hartenstein, Würzburg |
| Autoklavier-Klebeband | STKD | Hartenstein, Würzburg |
| Bechergläser | verschiedene | VITLAB, Großostheim |
| <i>Blotting paper, thickness: ca. 1,3 mm, 550 g/m², extra high absorbency</i> | GB40 | Hartenstein, Würzburg |
| Deckgläser | DK26 | Hartenstein, Würzburg |
| Einfrierröhrchen, Nunc® CryoTube Vials | 368632 | Fisher Scientific, Schwerte |
| Gelkämme, mini, 1 mm, 15 Taschen | NC3015 | Life Technologies, Darmstadt |
| Gelkassetten mini, 1,5 mm, Novex | NC2015 | Life Technologies, Darmstadt |
| Gewebekulturschalen 35x10 mm, Nunclon™ | 12-565-91 | Fisher Scientific, Schwerte |

Delta Surface

| | | |
|---|------------------------|---|
| Laborflaschen Duran® | verschiedene | Duran, Wertheim am Main |
| Nitrozellulosemembran, Protran® BA85, 0,45 µm | 10401196 | GE Healthcare, München |
| Parafilm® | H951.1 | Carl Roth, Karlsruhe |
| Pasteur-Pipette aus Glas | SAP10104985 | Zentrallager Universitätsklinik Würzburg, Würzburg |
| Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl, 1000 µl | PSK, PSM2, PSG, PSB | Hartenstein, Würzburg |
| Pipettenspitzen, Gel-Loading | GS21 | Hartenstein, Würzburg |
| Reagenzröhrchen, Polysterol (FACS-Röhrchen) | RE01 | Hartenstein, Würzburg |
| Reaktionsgefäße mit Deckel (Eppendorf), 0,5 ml | 72699 | Sarstedt, Nürnbrecht |
| Reaktionsgefäße mit Deckel (Eppendorf), 1,5 ml | 72690.011 | Sarstedt, Nürnbrecht |
| Röntgenfilme, Super RX | 47410 19230 | Fujifilm, Düsseldorf |
| Säulen für MACS-Separation, LS | 130-042-401 | Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach |
| Serologische Pipetten Cellstar® (10 ml) | 607180 | Greiner bio-One, Frickenhausen |
| Serologische Pipetten Cellstar® (25 ml) | 760180 | Greiner bio-One, Frickenhausen |
| Serologische Pipetten Cellstar® (5 ml) | 606180, | Greiner bio-One, Frickenhausen |
| Serologische Pipetten Cellstar® (50 ml) | 768180 | Greiner bio-One, Frickenhausen |
| Transwell®-24-Well-Platten und Inserts (5 µm), costar® | 3241 | Corning, Corning, NY, USA |
| Zellkulturflaschen Cellstar 175 cm ² | 660175 | Greiner bio-One, Frickenhausen |
| Zellkulturflaschen Cellstar 25 cm ² | 690175 | Greiner bio-One, Frickenhausen |
| Zellkulturflaschen Cellstar 75 cm ² | 658175 | Greiner bio-One, Frickenhausen |
| Zellkulturplatte 6-Well, Flachboden | 353046 | Corning, Corning, NY, USA |
| Zellkulturplatte 24-Well, Flachboden | 353047 | Corning, Corning, NY, USA |
| Zellkulturplatte 48-Well, Flachboden | 353078 | Corning, Corning, NY, USA |
| Zellkulturplatte 48-Well, Nunclon™ Delta Surface | 150687 | Fisher Scientific, Schwerte |
| Zellkulturplatte 96-Well, Flachboden | 353072 | Corning, Corning, NY, USA |
| Zellkulturplatte 96-Well, Flachboden, Falcon™ | 353279 | BD Biosciences, Heidelberg |
| <i>Microtest for ELISA</i> | | |
| Zellkulturplatte 96-Well, U-Boden | 650180 | Greiner bio-One, Frickenhausen |
| Zentrifugenröhrchen, konisch ("Falcon"), Cellstar® 15 ml | 188261 | Greiner bio-One, Frickenhausen |

| | | |
|---|--------|--------------------------------|
| Zentrifugenröhrchen, konisch ("Falcon"), Cellstar® 50 ml | 227261 | Greiner bio-One, Frickenhausen |
|---|--------|--------------------------------|

2.1.3. Computerprogramme

| | |
|---------------------|---------------------------------------|
| Canvas® | ACD Systems, Victoria, BC, Kanada |
| CellQuest™ | BD Biosciences, Heidelberg |
| FlowJo® | TreeStar, Ashland, OR, USA |
| GraphPad Prism® | GraphPad Software, La Jolla, CA, USA |
| ImageJ | Wayne Rasband, NIH, Bethesda, MD, USA |
| Magellan™ | Tecan, Crailsheim |
| Microplate Manager™ | BioRad, München |
| Microsoft Office™ | Microsoft, Hamburg |
| Zeiss AxioVision® | Carl Zeiss, Jena |

2.1.4. Allgemeine Chemikalien

| | | |
|---|-----------|--|
| Albumin Fraktion V, biotinfrei (Bovines Serumalbumin, BSA) | 0163.2 | Carl Roth, Karlsruhe |
| <i>Aqua ad iniectabilia (Aqua dest.)</i> | 2138613 | Braun, Melsungen |
| BD Pharm Lyse™ Lysepuffer | 555899 | BD Biosciences, Heidelberg |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | SAP707891 | Klinikapothek der Universitäts- klinik Würzburg, Würzburg |
| Entwicklerkonzentrat Vision GV 60, Part 1 | 23036 | röntgen bender, Baden-Baden |
| Entwicklerkonzentrat Vision GV 60, Part 2 | 000222 | röntgen bender, Baden-Baden |
| Ethanol 70%, vergällt | SAP708078 | Klinikapothek der Universitäts- klinik Würzburg, Würzburg |
| Ficoll-Hypaque, Pancoll | P04-60500 | PAN Biotech, Aidenbach |
| Fixiererkonzentrat Vision GV 60 | 23037 | röntgen bender, Baden-Baden |
| Formaldehydlösung 36 % | 47608 | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Incidin® perfekt | 3011290 | Ecolab, Düsseldorf |
| Isopropanol, 2-propanol | 9866.5 | Carl Roth, Karlsruhe |
| Methanol | 8388.4 | Carl Roth, Karlsruhe |
| Natriumazid | K305.1 | Carl Roth, Karlsruhe |

| | | |
|--|-----------|----------------------------|
| Natriumchlorid (NaCl) | 3957.1 | Carl Roth, Karlsruhe |
| Natriumfluorid (NaF) | P756.1 | Carl Roth, Karlsruhe |
| Natriumorthovanadat (Na ₃ VO ₄) | A2196 | Applichem, Darmstadt |
| Paraformaldehyd (PFA) | 0335.2 | Carl Roth, Karlsruhe |
| Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) | P04-36500 | PAN Biotech, Aidenbach |
| Salzsäure 1 M (HCl) | K025.1 | Carl Roth, Karlsruhe |
| Schwefelsäure 1 M (H ₂ SO ₄) | A2699 | Applichem, Darmstadt |
| Trypanblaulösung (0,4 %) | 93595 | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Tween 20 (Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat) | A1389 | Applichem, Darmstadt |
| Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) | P95302 | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |

2.1.5. Medikamente

| | | |
|----------------------------|------------------------------------|----------------------------------|
| Dasatinib (Dasa) | D-3307 | LC Laboratories, Woburn, MA, USA |
| Dexamethason (DEXA) | D1756 | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Nilotinib (Nilo), Tasigna® | <i>Material Transfer Agreement</i> | Novartis Pharma, Nürnberg |
| Src-Inhibitor 1 (SKI-1) | S2075 | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |

Alle Medikamente wurden in DMSO gelöst und als Stocklösungen (SKI-1: 5 mM, Dasatinib 10 mM, Nilotinib: 10 mM, Dexamethason: 10 mM) bei -20 °C gelagert.

2.1.6. Zellkulturmedien und Zusätze

| | | |
|--|-----------------|------------------------------------|
| RPMI 1640 | P04-17500 | PAN Biotech, Aidenbach |
| Fetales Kälberserum (<i>fetal calve serum</i> , FCS), Südamerika, Chargen-Nr. P11040 | 3302-P110403 | PAN Biotech, Aidenbach |
| L-Glutamin 200 mM | P04-80100 | PAN Biotech, Aidenbach |
| Penicillin 10.000 U/ml / Streptomycin 10 mg/ml | P06-07100 | PAN Biotech, Aidenbach |
| GM-CSF, Leukine® | NDL58468-0181-2 | Bayer Healthcare, Leverkusen |
| IL-4, human | 130-094-117 | Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach |
| OKT3®, Orthoclone (α-CD3) | PZN-0704706 | Janssen-Cilag, Neuss |
| α-CD28 (L293) | 340975 | BD Biosciences, Heidelberg |
| α-CD49d (L25) | 340976 | BD Biosciences, Heidelberg |

| | | |
|---|--------|----------------------------|
| LPS (Lipopolysaccharide aus <i>Escherichia coli</i> 055:B5) | L2880 | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| CMV-Peptid pp65 ₄₉₅₋₅₀₃ (NLVPMVATV) | custom | JPT Peptide Technologies |
| EBV-Peptid BMLFI ₂₅₉₋₂₆₇ (GLCTLVAML) | custom | JPT Peptide Technologies |

FCS wurde für 30 Minuten bei 56 °C hitzeinaktiviert.

R10-Medium

RPMI-1640 wurde mit 10% FCS, 1% L-Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin versetzt.

2.1.7. Reaktionssets (Kits)

| | | |
|--|-----------|----------------------------|
| BioRad DC Protein Assay II | 500-0112 | BioRad, München |
| IL-2 ELISA, OptEIA™ Human IL-2 Set | 555190 | BD Biosciences, Heidelberg |
| IL-10ELISA, OptEIA™ Human IL-10 Set | 555157 | BD Biosciences, Heidelberg |
| IL-12 ELISA, OptEIA™ Human IL-12 (IL-12p70) Set | 555183 | BD Biosciences, Heidelberg |
| dazu: OptEIA™ Assay Diluent | 555213 | BD Biosciences, Heidelberg |
| dazu: OptEIA™ Substrate Reagent A | 51-2606KC | BD Biosciences, Heidelberg |
| dazu: OptEIA™ Substrate Reagent B | 51-2607KC | BD Biosciences, Heidelberg |
| Phospho-Immuneceptor Array Kit, Proteome Profiler™ | ARY004 | R&D Systems, Wiesbaden |

2.1.8. Antikörper und Isotypen für Durchflusszytometrie

| | | |
|--------------------------------|-------------|------------------------------------|
| α-CCR7-APC (CD197) (FR11-11E8) | 130-093-624 | Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach |
| α-CD1a-FITC (NA1/34) | F7141 | Dako (Biozol, Eching) |
| α-CD3-APC (UCHT1) | 555335 | BD Biosciences, Heidelberg |
| α-CD3-FITC (UCHT1) | 21620033 | Immunotools, Friesoythe |
| α-CD3-PerCP (UCHT1) | 300428 | BioLegend, Fell |
| α-CD4-FITC (RPA-T4) | 555346 | BD Biosciences, Heidelberg |
| α-CD4-PE (M-T271) | 555451 | BD Biosciences, Heidelberg |
| α-CD4-PerCP (SK3) | 345770 | BD Biosciences, Heidelberg |
| α-CD8-FITC (RPA-T8) | 555366 | BD Biosciences, Heidelberg |
| α-CD8-PE (RPA-T8) | 555367 | BD Biosciences, Heidelberg |
| α-CD8-PerCP (SK1) | 345774 | BD Biosciences, Heidelberg |

| | | |
|---|--------------------|------------------------------------|
| α -CD14-PerCP (Tük4) | MHCD1431 | Life Technologies, Darmstadt |
| α -CD27-PE (M-T271) | 555441 | BD Biosciences, Heidelberg |
| α -CD33-APC (Siglec-3) (WM53) | 303407 | BioLegend, Fell |
| α -CD40-APC (5C3) | 555591 | BD Biosciences, Heidelberg |
| α -CD45RO-APC (UCHL1) | 559865 | BD Biosciences, Heidelberg |
| α -CD69-PE (FN50) | 555531 | BD Biosciences, Heidelberg |
| α -CD69-PerCP (L78) | 340548 | BD Biosciences, Heidelberg |
| α -CD80-PE (L307.4) | 557227 | BD Biosciences, Heidelberg |
| α -CD83-APC (HB15E) | 551073 | BD Biosciences, Heidelberg |
| α -CD85a-PE (MKT5.1) | 337704 | BioLegend, Fell |
| α -CD86-FITC (2231 (FUN-1)) | 555657 | BD Biosciences, Heidelberg |
| α -CD107a-FITC (H4A3) | 555800 | BD Biosciences, Heidelberg |
| α -CD107b-FITC (H4B4) | 555804 | BD Biosciences, Heidelberg |
| α -HLA-A,B,C-APC (W6/32) | 311410 | BioLegend, Fell |
| α -HLA-DR-PE (G46-6) | 555812 | BD Biosciences, Heidelberg |
| α -IFN- γ -PE (B27) | 554701 | BD Biosciences, Heidelberg |
| α -IL-2-PE (MQ1-17H12) | 500307 | BioLegend, Fell |
| α -Siglec-3-APC (CD33) (WM53) | 303407 | BioLegend, Fell |
| α -Siglec-9-PE (K8) | 351503 | BioLegend, Fell |
| α -TNF- α -PE (MAb11) | 554513 | BD Biosciences, Heidelberg |
| Isotyp mouse IgG1-APC (IS5-21F5) | 130-092-214 | Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach |
| Isotyp mouse IgG1-APC (MOPC-21) | 400122 | BioLegend, Fell |
| Isotyp mouse IgG1-FITC (MOPC-21) | 400110 | BioLegend, Fell |
| Isotyp mouse IgG1-PE (MOPC-21) | 400112 | BioLegend, Fell |
| Isotyp mouse IgG1-PerCP (MOPC-21) | 400148 | BioLegend, Fell |
| Isotyp mouse IgG2a-APC (MOPC-173) | 400222 | BioLegend, Fell |
| Isotyp mouse IgG2a-FITC (MOPC-173) | 400210 | BioLegend, Fell |
| Isotyp mouse IgG2a-PE (MOPC-173) | 400214 | BioLegend, Fell |
| Isotyp mouse IgG2a-PerCP (MOPC-173) | 400250 | BioLegend, Fell |
| Isotyp rat IgG2a-PE (RTK2758) | 400508 | BioLegend, Fell |
| CMV-Tetramer-APC (HLA A*0201; refolded mit CMV-Peptid pp65 ₄₉₅₋₅₀₃ (NLVPMVATV)) | selbst hergestellt | <i>siehe 2.1.11</i> |
| EBV-Tetramer-APC (HLA A*0201; refolded mit EBV-Peptid BMLF1 ₂₅₉₋₂₆₇ (GLCTLVAML)) | selbst hergestellt | <i>siehe 2.1.11</i> |

2.1.9. Antikörper für Western Blot

| | | |
|--|---------|---|
| α - β -Actin (AC-74) | A2228 | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| α -CD85a (222821) | MAB1806 | R&D Systems, Wiesbaden |
| α -ERK1/2 (polyklonal) | 9102 | Cell Signaling (New England Biolabs, Frankfurt am Main) |
| α -LCK (polyklonal) | 2752 | Cell Signaling (New England Biolabs, Frankfurt am Main) |
| α -Phospho-ERK1/2 (T202/Y204/T185/Y187, polyklonal) | AF1018 | R&D Systems, Wiesbaden |
| α -Phospho-LCK (Tyr 505, polyklonal) | 2571 | Cell Signaling (New England Biolabs, Frankfurt am Main) |
| α -Phospho-SRC (Tyr416, polyklonal) | 2110 | Cell Signaling (New England Biolabs, Frankfurt am Main) |
| α -Phospho-ZAP70 (Tyr319, 65E4) | 2717 | Cell Signaling (New England Biolabs, Frankfurt am Main) |
| α -ZAP70 (C1C10E) | 3165 | Cell Signaling (New England Biolabs, Frankfurt am Main) |
| Anti-mouse-HRP | NXA931 | GE Healthcare, München |
| Anti-rabbit-HRP | NA9340V | GE Healthcare, München |

2.1.10. Sonstige Antikörper und Isotypen

| | | |
|--|---------|----------------------------|
| α -CD28 (L293) | 340975 | BD Biosciences, Heidelberg |
| α -CD49d (L25) | 340976 | BD Biosciences, Heidelberg |
| α -HLA-A,B,C (W6/32) | 311411 | BioLegend, Fell |
| α -Siglec-3 (CD33) (6C5/2) | MAB1137 | R&D Systems, Wiesbaden |
| α -Siglec-9 (191240) | MAB1139 | R&D Systems, Wiesbaden |
| Isotyp mouse IgG1 (MG1-45) | 401403 | BioLegend, Fell |
| Isotyp mouse IgG2a (MG2a-53) | 401503 | BioLegend, Fell |
| OKT3 [®] (α -CD3), Orthoclone | 23333A | Janssen-Cilag, Neuss |

2.1.11. Reagenzien und Puffer für Durchflusszytometrie

| | | |
|------------------------------|--------|----------------------------|
| 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) | 559925 | BD Biosciences, Heidelberg |
| Annexin V binding buffer | 556454 | BD Biosciences, Heidelberg |

| | | |
|---|---------------|---|
| Annexin V-PE | 556422 | BD Biosciences, Heidelberg |
| Biotin-gekoppelte HLA*0201 Monomere, refolded mit CMV-Peptid pp65 ₄₉₅₋₅₀₃ (NLVPMVATV) oder EBV-Peptid BMLFI ₂₅₉₋₂₆₇ (GLCTLVAML) in PBS, 1 mg/ml | <i>custom</i> | Prof. Dr. D. A. Price, Cardiff University School of Medicine, Cardiff, UK |
| Brefeldin A | B6542 | Sigma Aldrich, Taufkirchen |
| Carboxyfluorescein Diacetat Succinimidylester (CFSE) CellTrace™ Kit | C34554 | Life Technologies, Darmstadt |
| CCL19 (Recombinant human MIP-3β) | 300-29B | Peprotech, Hamburg |
| Cytofix/Cytoperm™ | 51-2090KZ | BD Biosciences, Heidelberg |
| Cytofix™ | 554655 | BD Biosciences, Heidelberg |
| FACS Clean | 340345 | BD Biosciences, Heidelberg |
| FACSFlow™ Sheath fluid | 342003 | BD Biosciences, Heidelberg |
| FACSRinse Solution | 340346 | BD Biosciences, Heidelberg |
| FITC-Dextran-Beads (Dextran, Fluorescein, 40,000 MW) | D1845 | Life Technologies, Darmstadt |
| GolgiStop™ | 554724 | BD Biosciences, Heidelberg |
| Perm/Wash™ | 51-2091KZ | BD Biosciences, Heidelberg |
| Protease Inhibitor Cocktail Set I | 539131 | Merck, Darmstadt |
| Saponin | 9622.1 | Carl Roth, Karlsruhe |
| Streptavidin-APC | PJ27S | Prozyme, Hayward, CA, USA |

FACS-Puffer

500 ml PBS wurden mit 0,2% BSA und 0,05% Natriumazid versetzt und bei 4 °C gelagert.

MACS-Puffer

500 ml PBS wurden mit 0,5% BSA (steril) und 2 mM EDTA (steril) versetzt und bei 4 °C gelagert.

Herstellung der CMV- und EBV-Tetramere

Für die Herstellung der CMV- bzw. EBV-Tetramere wurden 100 µg der Biotin-gekoppelten HLA*0201 Monomere (refolded mit CMV-Peptid pp65₄₉₅₋₅₀₃ (NLVPMVATV) bzw. EBV-Peptid BMLFI₂₅₉₋₂₆₇ (GLCTLVAML)) (50 µl) mit 1 µl Protease Inhibitor Cocktail Set I und 3,5 µl Streptavidin-APC gemischt und bei 4 °C auf dem Rotator inkubiert. Vier Mal wurden nach jeweils 18 Minuten erneut 3,5 µl Streptavidin-APC zugegeben. Nach den letzten 18 Minuten Inkubation wurde die Tetramer-Lösung mit PBS auf 500 µl aufgefüllt und bei 4 °C gelagert.

2.1.12. Reagenzien und Puffer für Westernblot

| | | |
|---|----------|------------------------------|
| Ammoniumperoxodisulfat (APS) | 9592.3 | Carl Roth, Karlsruhe |
| Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) | 8040.1 | Carl Roth, Karlsruhe |
| p-Kumarinsäure | C9908 | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Luminol | 4203.1 | Carl Roth, Karlsruhe |
| Magermilchpulver | Sucofin® | TSI, Zeven |
| Natriumdeoxycolat | 3484.1 | Carl Roth, Karlsruhe |
| Natriumdodecylsulfat (SDS) | A2572 | Applichem, Darmstadt |
| Nonidet 40 (NP-40) | A1694 | Applichem, Darmstadt |
| NuPage® Antioxidant | NP0005 | Life Technologies, Darmstadt |
| NuPage® LDS Sample Buffer, 4x | NP0007 | Life Technologies, Darmstadt |
| NuPage® Sample Reducing Agent, 10x | NP0009 | Life Technologies, Darmstadt |
| Phosphatase Inhibitor Cocktail 2 | P5726 | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Ponceau S | 5938.1 | Carl Roth, Karlsruhe |
| 3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure (MOPS), Pufferan | 6979.3 | Carl Roth, Karlsruhe |
| Protease Inhibitor Cocktail | P8340 | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Proteinmarker, PageRuler Plus Prestained Protein Ladder | 26620 | Fisher Scientific, Schwerte |
| Rotiphorese Gel 30 (37, 5:1) | 3029.1 | Carl Roth, Karlsruhe |
| Tetramethylethylendiamin (TEMED) | 2367.1 | Carl Roth, Karlsruhe |
| Tris (hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) Ultra | 5429.3 | Carl Roth, Karlsruhe |
| TRIS-HCl | 9090.2 | Carl Roth, Karlsruhe |
| Tween 20 (Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat) | A1389 | Applichem, Darmstadt |

RIPA-Puffer (für 100 ml):

50 mM TRIS-HCl (790 mg) und 150 mM NaCl (900 mg) wurden in 75 ml *Aqua dest.* gelöst. Anschließend erfolgte die Zugabe von 10 ml 10% NP-40-Lösung, 2,5 ml 10% Na-deoxycholatlösung und 1 ml 100 mM EDTA-Lösung. Wenn die Lösung nach dem Rühren klar war, erfolgte ein Auffüllen auf 100 ml mit *Aqua dest.* und die Lagerung bei 4 °C.

Herstellung von Trenn- und Sammelgel

Zuerst wurde das Trenngel gegossen (ca. 2/3 der Gelkassette) und für eine glatte Kante mit Isopropanol überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren wurde das Isopropanol entfernt, das Sammelgel gegossen (bis zur Oberkante der Kassette) und der Gelkamm eingesetzt.

Tabelle 1: Herstellung von Trenn- und Sammelgel

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

MOPS-Laufpuffer (5x)

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

Transfer-Puffer (10x)

250 mM TRIS (15,14 g), 2 M Glycin (72 g) und 3,4 mM SDS (0,5 g) wurden in 500 ml *Aqua dest.* gelöst und bei Raumtemperatur gelagert. Für den 1x Transferpuffer wurden 50 ml 10x Transferpuffer und 100 ml Methanol mit 350 ml *Aqua dest.* verdünnt. Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur.

TBS-T

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

Stripping-Puffer

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

ECL-Lösung

Die ECL-Lösung ist eine Dreikomponentenlösung die stets frisch aus den Einzelbestandteilen hergestellt wurde. Hierzu wurden 1 ml ECL-A-Lösung (200 ml 0,1 M TRIS pH 8,8 + 50 mg Luminol, 4 °C) mit 200 µl ECL-B-Lösung (10 ml DMSO + 11 mg p-Kumarinsäure, Raumtemperatur, dunkel) und 0,3 µl 30% Wasserstoffperoxid (H₂O₂, 4 °C, dunkel) gemischt.

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkultur

Alle Zellen wurden unter sterilen Bedingungen in R10-Medium kultiviert und behandelt und befanden sich während der Kultur bzw. bei Inkubationsschritten, wenn nicht anders angegeben, bei 37 °C und 5% CO₂ im Inkubator. Waschschriffe erfolgten, sofern nicht anders angegeben, durch Zentrifugation großvolumig in PBS für 5 Minuten bei 1200 rpm.

2.2.1.1. Kryo-Konservierung von Zellen

Die Zellen wurden gewaschen, in FCS + 10% DMSO resuspendiert und in Einfrierröhrchen überführt. Diese wurden anschließend zügig in eine vorgekühlte Mr. Frosty™-Einfrierhilfe gestellt und in dieser für 24 Stunden bei -80 °C gelagert. Eine langfristige Lagerung der Einfrierröhrchen erfolgte mittels Kryokonservierung in flüssigem Stickstoff in einem Großraum-Gefrierbehälter.

Beim Auftauen wurden die Einfrierröhrchen kurz angetaut und die Zellen, noch gefroren, in vorgewärmtes R10-Medium überführt. Nach komplettem Auftauen wurden die Zellen gewaschen, in frischem R10-Medium aufgenommen und über Nacht ruhen gelassen.

2.2.1.2. Zellzahlbestimmung

Zellzahlen wurden mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Nach Verdünnung mit Trypanblau wurden die Zellen in 16 Kleinquadraten gezählt und hierbei gleichzeitig auf ihre Vitalität untersucht; abgestorbene Zellen färben sich, da ihre Zellmembran permeabel ist, dunkelblau. Die Zelldichte einer Suspension wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Zelldichte (Zellen/ml)} = (\text{Zellzahl/Zahl der Großquadrate}) * 10^4 * \text{Verdünnungsfaktor} * \text{ml}^{-1}$$

Gezählt wurde die Anzahl der vitalen Zellen in 4 Großquadraten (entspricht 16 Kleinquadraten) der Neubauer Zählkammer. 10⁴ ist deren spezifischer Kammerfaktor, der Verdünnungsfaktor ergibt sich aus der Verdünnung der Zellsuspension mit Trypanblau und etwaiger Vorverdünnungen.

2.2.1.3. Isolierung mononukleärer Zellen durch Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation

Die Gewinnung peripherer Lymphozyten gesunder Spender erfolgte nach schriftlichem Einverständnis (Stellungnahme der Würzburger Ethikkommission 170/10, Genehmigung vom 24.02.2002). Verwendet wurden Leukozytendepletate, die im Institut für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums

Würzburg als Nebenprodukt bei der Blutspende anfallen. Der Inhalt der Depletionskammern wurde zunächst mit PBS auf 20 ml aufgefüllt und anschließend vorsichtig auf 20 ml Ficoll in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen aufgeschichtet. Dann erfolgte eine Zentrifugation bei 1600 rpm ohne Beschleunigung und Bremse für 30 min. Hierbei schichten sich die Blutbestandteile entsprechend ihrer Dichte auf: In der obersten Schicht befinden sich Thrombozyten und Blutplasma, darunter folgt eine Schicht aus Lymphozyten, am Boden des Röhrchens setzen sich schwere Erythrozyten und Granulozyten ab [243]. Die Leukozytenschicht wurde abgenommen und zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Lyse der noch vorhandenen Erythrozyten mit Hilfe von BD Pharm Lyse™ Lysepuffer für 7 Minuten bei Raumtemperatur. Nach zwei weiteren Waschschrritten mit PBS wurden die mononukleären peripheren Blutzellen („*peripheral blood mononuclear cells*“, PBMC) nach Bestimmung der Zelldichte in R10-Medium aufgenommen und bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert.

2.2.1.4. Gewinnung und Kultivierung primärer T-Zellen

Die Gewinnung von primären T-Zellen erfolgte mit Hilfe des Pan T Cell Kit II™. Bei dieser negativen magnetischen Separation werden alle Nicht-T-Zellen mit einem Cocktail aus magnetischen MicroBeads (gegen CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123 und CD235a) gelabelt und so in der sich in einem Magnetfeld befindenden Säule des MACS-Separators zurückgehalten. Nur die (nichtmagnetischen) T-Zellen können die Säule passieren und liegen anschließend in sehr hoher Reinheit vor. Aufgereinigte PBMCs wurden gezählt, gewaschen und in 40 µl MACS-Puffer je 10⁷ Zellen resuspendiert. Anschließend wurden 10 µl des Biotin-gekoppelten Antikörper-Cocktails je 10⁷ Zellen zugegeben, und die Zellen für 10 Minuten bei 4 °C inkubiert. Nach Zugabe von je 30 µl MACS-Puffer und 20 µl Anti-Biotin-MicroBeads je 10⁷ Zellen erfolgte eine weitere Inkubation bei 4 °C für 15 Minuten. Nach dem Waschen wurden je 10⁸ Zellen in 500 µl MACS-Puffer resuspendiert. Für die magnetische Separation wurde eine LS-Säule in den Magneten des QuadroMACS™ eingespannt und mit 3 ml MACS-Puffer vorgespült; der Durchfluss wurde in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen gesammelt. Anschließend wurde die gelabelte Zellsuspension auf die Säule aufgetragen; nachdem sie diese durchlaufen hatte, erfolgte eine Nachspülung der Säule mit 3x 3 ml MACS-Puffer. Der Durchfluss mit den aufgereinigten T-Zellen (91%-98% CD3⁺ T-Zellreinheit, Bestimmung nach Antikörperfärbung im Durchflusszytometer) wurde gewaschen und die Zellen wurden in R10 über Nacht zur Erholung bzw. zum Aufheben einer Voraktivierung bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Am nächsten bzw. übernächsten Tag erfolgte nach dem Zählen und Einstellen der Zelldichte auf 1x10⁶/ml und etwaiger Vorbehandlung (siehe 2.2.1.7) die Stimulation der T-Zellen. Für diese wurden am Vortag der Stimulation Nunclon-Zellkulturplatten mit 5 µg/ml OKT3 beschichtet und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Vor der Stimulation wurden die Platten mit PBS gewaschen und die T-Zellen auf die Platten überführt. Eine (optionale) Co-Stimulation der T-Zellen erfolgte durch Zugabe von je 1 µg/ml α-CD28 und

α -CD49d. Die Zellen wurden nun bis zu 4 Tagen bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert. Für die Untersuchung von CMV- bzw. EBV-spezifischen T-Zellen (HLA-A2⁺ CMV- bzw. EBV-IgG seropositive Spender) wurden die Zellen statt mit OKT3 durch Zugabe von 2 μ M HLA A*201-CMV pp65₄₉₅₋₅₀₃ bzw. HLA-A*021-EBV BMLF1₂₅₉₋₂₆₇ und je 1 μ g/ml α -CD28 und α -CD49d stimuliert und für 6 Tage kultiviert.

2.2.1.5. Gewinnung und Kultivierung primärer Monozyten und Generierung von reifen moDCs

Die Aufreinigung von primären Monozyten erfolgte für die meisten Versuche mittels Plastikadhärenz. Hierzu wurden 2,5 ml PBMCs in R10 mit einer Dichte von $3,3 \times 10^6$ /ml in 6-Well Zellkulturplatten ausplattiert und für 75 Minuten bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert, um die Monozyten adhären zu lassen. Anschließend wurden die Kulturplatten mit PBS gewaschen, 2 ml R10 pro Well wurden zugegeben und die Platten wurden erneut für 45 Minuten bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift erfolgte die Zugabe von 3 ml DC-Medium (R10 + 100 ng/ml GM-CSF und 20 ng/ml IL-4) um die Differenzierung der Monozyten in moDCs anzuregen. Nach drei Tagen der Kultivierung bei 37 °C und 5% CO₂ wurde die Hälfte des Mediums abgenommen und durch 1,5 ml R10 ersetzt und es erfolgte die Zugabe von 100 ng/ml GM-CSF und 20 ng/ml IL-4. Nach weiteren 3 Tagen wurde die Ausreifung der moDCs durch Zugabe von 1 μ g/ml LPS für 24 h induziert, anschließend erfolgten die funktionellen Untersuchungen. Die Reinheit der reifen moDCs variierte zwischen 70% und 85% (Median: 74% CD14⁺ CD1a⁺ nach Antikörperfärbung, Bestimmung im Durchflusszytometer).

2.2.1.6. Co-Kultivierung von moDCs und T-Zellen

Bei der durchgeführten Co-Kultur sollen moDCs, die zuvor ein Peptid aufgenommen haben, gezielt T-Zellen stimulieren, die eine Spezifität für dieses Peptid aufweisen. Für die Co-Kultur wurden die Monozyten nicht mittels Plastikadhärenz gewonnen, sondern durch einen positiven CD14-MACS-Sort separiert um eine höhere Reinheit zu erzielen. Hierzu wurden PBMCs HLA-A2⁺ CMV-IgG seropositiver Spender wie unter 2.2.1.3 aufgereinigt, gezählt und nach einem Waschschrift in 80 μ l FACS-Puffer je 10^7 Zellen resuspendiert. Nach der Zugabe von 20 μ l CD14-MicroBeads wurden die Zellen für 15 Minuten bei 4 °C inkubiert. Nach einem Waschschrift erfolgte die Resuspendierung in 500 μ l Puffer je 10^8 Zellen. Für die magnetische Separation wurde eine LS-Säule in den Magneten eingespannt und mit 3 ml MACS-Puffer vorgespült, der Durchfluss wurde in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen gesammelt. Anschließend wurde die gelabelte Zellsuspension auf die Säule aufgetragen; nachdem sie diese durchlaufen hatte, erfolgte eine Nachspülung der Säule mit 3x 3 ml MACS-Puffer. Da sich die gewünschten Zellen bei diesem Positiv-Sort im Gegensatz zum negativen T-Zell-Sort (siehe 2.2.1.4) in der Säule befinden, wurde die Säule aus dem Magnetfeld entfernt. Nun wurden 5 ml MACS-Puffer auf die Säule gegeben und mittels

des Kolbens in ein weiteres Zentrifugenröhrchen gepresst. Die jetzt in diesem Röhrchen enthaltenen CD14⁺ Monozyten (Median der Reinheit: 92%, Bestimmung nach Antikörperfärbung am Durchflusszytometer) wurden nach einem Waschschrift in einer Konzentration von 1×10^6 /ml mit DC-Medium (R10 + 100 ng/ml GM-CSF und 20 ng/ml IL-4) resuspendiert und à 3 ml in 6-Well-Platten bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert. Die CD14⁻ Zellen („*peripheral blood lymphocytes*“, PBLs) aus dem Durchfluss des MACS-Sorts wurden gewaschen und bei einer Zelldichte von 1×10^7 /ml eingefroren. Nach drei Tagen wurde bei den Monozyten die Hälfte des Mediums abgenommen und durch 1,5 ml R10 ersetzt und es erfolgte die Zugabe von 100 ng/ml GM-CSF und 20 ng/ml IL-4. Nach weiteren 3 Tagen erfolgte nach einem Waschschrift die Ausreifung der moDCs bei einer Zelldichte von 2×10^6 /ml durch Zugabe von 2,5 µg/ml CMV pp65₄₉₅₋₅₀₃-Peptid für zwei Stunden in 96-Well-Platten. Schon am Vortag wurden die PBLs aufgetaut und auf 1×10^7 /ml eingestellt. Diese wurden eine Stunde vor Ablauf der Stimulationszeit der moDCs in 96-Well-Platten ausplattiert (50 µl), für eine Stunde inkubiert und nach einem Waschschrift in 50 µl R10 resuspendiert. Nach Ablauf der zweistündigen Stimulationszeit wurden die moDCs gewaschen, auf eine Zelldichte von 2×10^6 /ml eingestellt, und im Verhältnis 1:10 zu PBLs gegeben (100 µl). Für das weitere Protokoll der Co-Kultivierung siehe 2.2.2.3.

2.2.1.7. Applikation von pharmakologischen Inhibitoren und anderen Substanzen

In Versuchen mit T-Zellen wurden die Zellen eine oder 24 Stunden mit Dasatinib, Dexamethason oder einer Kombination aus beiden vor der Stimulation vorbehandelt. Für einige Versuche wurde eine viertägige Vorbehandlung gewählt, bei einigen anderen erfolgte die Zugabe der beiden Medikamente erst 6 Stunden nach der Stimulation. Die genauen Behandlungszeiten sind stets bei den jeweiligen Versuchen angegeben.

In Versuchen mit moDCs erfolgte entweder eine Behandlung mit Dasatinib ab Beginn der Generierung (Langzeit-Behandlung) oder mit Dasatinib, Nilotinib bzw. SKI-1 24 Stunden vor der Stimulation mit LPS (Kurzzeit-Behandlung). In allen Fällen wurden die Medikamente vor den funktionellen Untersuchungen ausgewaschen. Darüber hinaus erfolgte die Zugabe von Dasatinib während funktioneller Untersuchungen (Behandlung im Assay), auch nach vorhergehender Kurzzeit-Behandlung. Blockierende Antikörper (und entsprechende Isotypen) wurden zeitgleich mit der Stimulation durch LPS zugegeben.

Bei den Versuchen zur Co-Kultivierung wurden entweder die moDCs 48 Stunden, oder die T-Zellen eine Stunde vor Beginn der Co-Kultivierung mit Dasatinib vorbehandelt (beides mit anschließendem Auswaschen), oder Dasatinib war während des Assays im Medium enthalten.

Für die Untersuchung der Signaltransduktion im Western Blot (s. 2.2.3) wurden unreife moDCs eine Stunde lang mit Dasatinib oder SKI-1 vorbehandelt, und anschließend 10 Minuten mit 1 µg/ml LPS

stimuliert. T-Zellen (5×10^6 /ml) wurden für 24 Stunden bzw. 10 Minuten mit Dexamethason und/oder eine Stunde mit Dasatinib vorbehandelt, und anschließend für 5 Minuten mit OKT3 und $1 \mu\text{g/ml}$ α -CD28 stimuliert.

2.2.2. Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie ist es möglich, Einzelzellen auf Grund von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften zu analysieren. Durch hydrodynamische Fokussierung werden Zellen aus einer Zellsuspension vereinzelt, passieren einen Laserstrahl und erzeugen, je nach Eigenschaft der Zellen, eine bestimmte Streuung des Lichts. Das in flachem Winkel abgelenkte Licht wird als Vorwärtsstreulicht (*forward light scatter*, FSC) bezeichnet und dient als Maß für das Zellvolumen, da Zellen mit zunehmender Größe das Licht stärker streuen. Das rechtwinklig abgelenkte Licht, das als Seitwärtsstreulicht (*sideward light scatter*, SSC) bezeichnet wird, dient als Maß für die Granularität und Struktur einer Zelle. Neben der Messung des gestreuten Lichts können weitere Eigenschaften einer Zelle mit Hilfe von spezifischen Antikörpern erfasst werden, an die fluoreszierende Farbstoffe (Fluorochrome) gekoppelt sind. Diese Fluorochrome werden durch einen Laserstrahl bei einer spezifischen Wellenlänge angeregt und es erfolgt die Messung des emittierten Fluoreszenzspektrums. Das in dieser Arbeit verwendete FACS Calibur™ (BD Biosciences) ist mit einem blauen Argon-Ionen-Laser (488 nm) und einem roten Diodenlaser (~635 nm) ausgestattet, mit denen bis zu 4 verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe gleichzeitig angeregt werden können. Antikörper, die für die durchgeführten durchflusszytometrischen Analysen verwendet wurden, waren mit den Fluorochromen FITC (Fluoresceinisothiocyanat, Exzitations-/Emissionsmaximum 495/519 nm, Kanal FL1), PE (Phycoerythrin, Exzitations-/Emissionsmaximum 566/575 nm, Kanal FL2), PerCP (Peridinin-Chlorophyll, Exzitations-/Emissionsmaximum 482/678 nm, Kanal FL3), oder APC (Allophycocyanin, Exzitations-/Emissionsmaximum 650/660 nm, Kanal FL4) gekoppelt. Als fluoreszierende Zellfarbstoffe wurden zusätzlich 7-AAD (7-Aminoactinomycin D, Exzitations-/Emissionsmaximum 548/648, Kanal FL3) und CFSE (6-Carboxyfluorescein-Succinimidylester, Exzitations-/Emissionsmaximum 491/517, Kanal FL1) verwendet. Die Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte mit Hilfe der Softwarepakete Cell Quest™ (BD Biosciences) und FlowJo™ (TreeStar).

2.2.2.1. Färbung von Oberflächenmarkern

Für die Färbung von Molekülen an der Zelloberfläche wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen und für 15 Minuten bei 4 °C mit den jeweiligen Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift erfolgten die Fixierung der Zellen mit 4% PFA und die Messung am Durchflusszytometer. Im Normalfall wurde die Stärke der Expression eines Oberflächenmoleküls durch

die mittlere Fluoreszenzintensität (*mean fluorescence intensity*, MFI) bestimmt. Für die Berechnung der spezifischen Fluoreszenzintensität (*specific fluorescence intensity*, SFI) wurde für jede Probe der erhaltene MFI-Wert für den spezifischen Antikörper durch den MFI-Wert der korrespondierenden Isotypenkontrolle dividiert. Alle eingesetzten Antikörper wurden vor der Verwendung stets austitriert.

2.2.2.2. Färbung intrazellulärer Zytokine und Oberflächenmarker in virusspezifischen T-Zellen

Aufgereinigte T-Zellen (siehe 2.2.1.4) CMV- bzw. EBV-positiver Spender (HLA-A2⁺ CMV- bzw. EBV-IgG seropositiv) wurden über Nacht ruhen gelassen und nach der Zugabe von α -CD107a und α -CD107b mit 2 μ M HLA A*201-CMV pp65₄₉₅₋₅₀₃ bzw. HLA A*201-EBV BMLFI₂₅₉₋₂₆₇ und je 1 μ g/ml α -CD28 und α -CD49d stimuliert und anschließend für eine Stunde bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Dann erfolgten die Zugabe von 0,7 μ l Golgi Stop™ und 10 μ g/ml Brefeldin A um den Austransport intrazellulärer Zytokine aus der Zelle zu unterbinden und eine weitere vierstündige Inkubation. Im Anschluss wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen und für 15 Minuten mit CMV-/EBV-Tetramer bei 37 °C und anschließend mit α -CD8 für 15 Minuten bei 4 °C gefärbt. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Zellen mit 250 μ l BD Cytotfix/Cytoperm™ für 20 Minuten bei 4 °C fixiert und permeabilisiert. Im Anschluss an zwei Waschschrift mit BD Cytotfix Wash™ erfolgte die intrazelluläre Färbung mit α -TNF- α und/oder α -IFN- γ für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Zuletzt wurden die Zellen mit BD Cytotfix Wash™ gewaschen und am Durchflusszytometer untersucht.

2.2.2.3. Färbung intrazellulärer Zytokine und Oberflächenmarker in der Co-Kultur

Nach den grundlegenden Vorbereitungen (siehe 2.2.1.6) wurden PBLs und moDCs im Verhältnis 10:1 in 96-Well-Platten gegeben und mit HLA A*201-CMV pp65₄₉₅₋₅₀₃-Tetramer gefärbt. Anschließend wurden die Zellen für 12 Stunden bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Danach folgten die Zugabe von 0,7 μ l Golgi Stop™, und eine weitere vierstündige Inkubation. Im Anschluss wurden die Zellen gewaschen und für 15 Minuten bei 4 °C mit α -CD3 und α -CD8 gefärbt. Nach einem darauffolgenden Waschschrift mit FACS-Puffer wurden die Zellen für 20 Minuten mit 4% PFA fixiert und anschließend erneut gewaschen. Als nächstes erfolgte die Inkubation der Zellen für 12 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln mit FACS-Puffer + 0,5% w/v Saponin als Detergens. Dann wurden die Zellen im Kühlschrank 30 Minuten lang mit α -TNF- α , α -IFN- γ oder α -IL-2 gefärbt, nach einem abschließenden Waschschrift mit 4% PFA nachfixiert und im Durchflusszytometer gemessen.

Für die Detektion der Oberflächenmarker CD107a und CD107b wurden die Zellen vor der zwölfstündigen Inkubation neben der Färbung mit dem HLA A*201-CMV pp65₄₉₅₋₅₀₃-Tetramer auch mit α -CD107a und α -CD107b gefärbt. Nach Ablauf der 12 Stunden wurde erneut mit α -CD107a und α -CD107b nachgefärbt

und für eine weitere Stunde bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend folgten die Zugabe von 10 µg/ml Brefeldin A zur Zerstörung des Golgi-Apparats und eine weitere Inkubation von vier Stunden. Danach wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen und für 15 Minuten bei 4 °C mit α-CD3 und α-CD8 gefärbt. Nach einem abschließenden Waschschrift erfolgten die Fixierung mit 4% PFA und die Messung im Durchflusszytometer.

2.2.2.4. Apoptosemessung mittels Annexin V\7-AAD-Färbung

Die Färbung der Zellen erfolgte nach normaler Kultivierungsdauer (T-Zellen: 4 Tage nach Stimulation; moDCs: 24h nach Stimulation). Nach dem Ernten und Waschen (mit FACS-Puffer) wurden die Zellen mit zellspezifischen Markern und α-Annexin-V und 7-AAD unter Zugabe von 100 µl Annexin V binding buffer für 15 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur gefärbt. Im Anschluss erfolgte die Messung der lebenden Zellen ohne Fixierung am Durchflusszytometer innerhalb einer Stunde, wobei AnnV⁺/7-AAD⁻ als (früh-)apoptotische und AnnV⁺/7-AAD⁺ als spät-apoptotische bzw. nekrotische Zellen erachtet wurden.

2.2.2.5. Messung der Proliferation mittels CFSE-Färbung

Unstimulierte aufgereinigte T-Zellen (siehe 2.2.1.4) wurden mit 0,25 µM CFSE für 7 Minuten im Wasserbad bei 37 °C gelabelt [244], dann erfolgte die Zugabe von 1 ml FCS. Nach drei Waschschriften mit PBS + 5% FCS wurden die Zellen in R10-Medium aufgenommen und über Nacht ruhen gelassen. Am nächsten Tag erfolgte die Stimulation mit OKT3 bzw. HLA A*201-CMV pp65₄₉₅₋₅₀₃ oder HLA A*201-EBV BMLF1₂₅₉₋₂₆₇ und je α-CD28 und α-CD49d. Nach 4 Tagen (bzw. 6 Tagen bei der Untersuchung virusspezifischer T-Zellen) wurden die Zellen geerntet und mit α-CD3 und α-CD8 bzw. α-CD8 und CMV-/EBV-Tetramer gefärbt. Die Auswertung der Zahl der Zellteilungen und die Berechnung der Proliferationsindices [93] erfolgten mit Hilfe der Software FlowJo™.

2.2.2.6. Messung der Phagozytose-Aktivität durch Aufnahme von FITC-Dextran-Beads

Unreife und mit LPS ausgereifte moDCs wurden für 90 Minuten bei 37 °C und 5% CO₂ bzw. bei 4 °C (als Kontrolle) inkubiert. Anschließend erfolgten die Zugabe von 1 mg/ml FITC-Dextran-Beads und eine weitere einstündige Inkubation bei den genannten Bedingungen [245]. Nach einem Waschschrift (mit FACS-Puffer) wurden die Zellen am Durchflusszytometer gemessen.

2.2.2.7. Analyse des Migrationsverhaltens im Transwell-Assay

Die Migrationsassays wurden exakt nach der Beschreibung von Scandella [223, 246] durchgeführt. Das verwendete Assay-System besteht aus zwei Kompartimenten, die durch eine zellpermeable Membran (Porengröße 5 µm) getrennt sind. Wird ein Chemokin in das untere Kompartiment zugegeben, so bildet sich ein Gradient aus, entlang dem ins obere Kompartiment applizierte Zellen chemotaktisch durch die Membran ins untere Kompartiment migrieren können. Die unteren Kompartimente von 24-Transwell-Platten wurden mit 500 µl R10 + 250 µg/ml CCL19 befüllt. In die oberen Kompartimente wurden 100 µl mit LPS ausgereifter moDCs bei einer Zelldichte von 1×10^6 /ml zugegeben. Anschließend folgte eine Inkubation für eine bzw. drei Stunden bei 37 °C und 5% CO₂. Danach wurden 500 µl aus dem unteren Kompartiment entnommen und es erfolgte die Zählung der migrierten Zellen für 120 Sekunden am Durchflusszytometer bei niedrigster Durchflussgeschwindigkeit. Um eine ungerichtete Migration auszuschließen, wurden die Versuche für alle Bedingungen stets auch ohne Zugabe von CCL19 zum unteren Kompartiment durchgeführt. Auf Grund sehr großer Schwankungen zwischen den einzelnen Versuchen im Hinblick auf die absoluten Zellzahlen wurden alle Werte als Fold-Change gegen die nur mit LPS behandelte Kontrolle (unter Zusatz von CCL19), deren Wert als „1“ gesetzt wurde, dargestellt.

2.2.3. Western Blot-Analyse

Für Untersuchungen zum Einfluss der Medikamente auf Proteinexpression und –phosphorylierung wurden Western Blots mit vorangegangener SDS-PAGE Gelelektrophorese durchgeführt.

2.2.3.1. Proteinextraktion und Konzentrationsbestimmung

Die Zellen wurden nach Ende der Behandlung bzw. Stimulation (siehe 2.2.1.7) für 10 Minuten auf Eis gehalten. Anschließend erfolgten das Ernten der Zellen, das Überführen in Eppendorf-Reaktionsgefäße und zwei Waschschrte mit eiskaltem PBS. Als nächstes wurden die Zellen in 100 µl RIPA-Lyse-Puffer resuspendiert, der frisch mit je 1% Phosphatase-Inhibitor Cocktail 2 und Protease-Inhibitor Cocktail versetzt worden war. Es folgten eine fünfminütige Inkubation auf Eis und die Überführung der Reaktionsgefäße in flüssigen Stickstoff um die Probe schockzufrosten und die Zellen damit auch mechanisch aufzubrechen. Nach dem Auftauen erfolgten eine zehnmünütige Zentrifugation bei 8000xg und der Transfer des Überstandes, der die Proteine enthält, in ein neues Reaktionsgefäß. Die Lagerung der Proben bis zur Auftrennung mittels SDS-PAGE erfolgte bei -20 °C.

Die Ermittlung der Proteinkonzentration der einzelnen Proben erfolgte mittels des BioRad DC Protein™ Assays nach Angaben des Herstellers in 96-Loch-Platten. Zunächst wurden 1 ml Reagent A mit 20 µl Reagent S versetzt um Reagent A' zu erhalten. Anschließend erfolgte die Herstellung einer BSA-

Verdünnungsreihe von 2,9 µg/ml bis 0,09 µg/ml in 1:2 Schritten mit RIPA-Puffer. 5 µl jeder Konzentration wurden in ein Well pipettiert, zusätzlich 5 µl RIPA alleine (als 0 µg/ml) um mit dieser Reihe später eine Standardkurve erstellen zu können. Von jeder zu testenden Probe wurden ebenfalls 5 µl in ein Well gegeben. Anschließend erfolgten die Zugabe von je 25 µl Reagent A' und 200 µl Reagent B zu allen Wells und ein vorsichtiges Durchmischen. In ein leeres Well wurden 230 µl RIPA-Puffer als Blank-Wert pipettiert. Nach einer 15-minütigen Inkubation erfolgte die Messung mittels eines Tecan GENios™ Microplate Readers bei 620 nm gegen 0 nm. Die Erstellung einer Standardkurve und Berechnung der Messwerte wurde mit der Software Magellan durchgeführt.

2.2.3.2. Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen durch SDS-PAGE

Zur Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht wurde eine diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli [247] eingesetzt. Hierbei erfolgt zunächst die Aufkonzentrierung der Proteine in einem pH-neutralen Sammelgel und eine anschließende Auftrennung nach deren Molekulargewicht in einem basischen Trenngel. Für alle untersuchten Proteine eigneten sich 10%ige Bis-Tris-Gele. Vor der Beladung wurden die Gele in die Gelelektrophoresekammer eingespannt und mit 1x MOPS-Laufpuffer geflutet, und es erfolgte die Zugabe von 500 µl NuPage® Antioxidant. Alle zu untersuchenden Proben wurden mit RIPA-Puffer auf die gleiche (niedrigste) Konzentration gebracht, die im Gellauf eingesetzten Proteinmengen schwankten von 10 bis 25 µg. 16,25 µl der eingestellten Proben wurden mit 6,25 µl NuPage® LDS Sample Buffer und 2,5 µl NuPage® Sample Reducing Agent für 10 Minuten im Heizblock auf 70 °C erhitzt. Nach kurzem Abzentrifugieren wurden mit Gel-Loading-Pipettenspitzen 20 µl Probe pro Geltasche appliziert. Bei jedem Gellauf wurde ein Proteinmarker in einer Tasche mitgeführt. Der Gellauf erfolgte für 50 Minuten bei 200 V (die Stromstärke verhielt sich variabel).

2.2.3.3. Proteintransfer auf Nitrozellulosemembran

Die Gele wurden vorsichtig aus den Kassetten entfernt und in das Blotting-Modul transferiert (Aufbau: 3 Schwammstücke, 3 Lagen Blotting-Paper, Gel, Nitrozellulose-Membran, 3 Lagen Blotting-Paper, 3 Schwammstücke), wobei mit einem Reagenzröhrchen die Luftblasen ausgestrichen wurden. Das Modul wurde nun in die Gelelektrophoresekammer eingespannt und mit 1x Transfer-Puffer geflutet. Der Transfer der Proteine vom Gel auf die Nitrozellulosemembran erfolgte für 90 Minuten bei 25 V und 200 mA. Im Anschluss wurde der Transfer durch Färbung mit Ponceau S, welches reversibel an positiv geladene Aminogruppen der Proteine bindet, überprüft.

2.2.3.4. Antigen-Detektion mittels HRP-gekoppelter Antikörper

Die im Folgenden angegebenen Inkubationszeiten variierten, ebenso wie die eingesetzten Antikörpermengen, je nach Epitop und Antikörper. Alle Inkubationsschritte erfolgten in Plastikschälchen auf einem Wippschüttler. Zunächst wurde die Nitrozellulose-Membran eine Stunde bei Raumtemperatur in Blocking-Puffer geblockt. Anschließend erfolgten drei Waschschriffe mit TBS-T und die Inkubation mit nichtgekoppeltem Erstantikörper in Blocking-Puffer bei 4 °C über Nacht. Nach drei Waschschriffen mit TBS-T wurde die Membran mit HRP-gekoppeltem Sekundärantikörper in Blocking-Puffer für eine (bei Raumtemperatur) bis 24 (bei 4 °C) Stunden inkubiert. Nach drei weiteren Waschschriffen wurde die Membran mit *Aqua dest.* gespült und es wurde möglichst alle Flüssigkeit abgeklopft. Anschließend erfolgten die Benetzung der Membran mit ECL-Lösung und eine einminütige Inkubation. Die Membran wurde anschließend abgeklopft, luftblasenfrei in Klarsichtfolie verpackt und in eine Röntgenfilmkassette eingelegt. In der Dunkelkammer wurden nun Röntgenfilme aufgelegt und für 2 Sekunden bis 90 Minuten belichtet. Die Entwicklung erfolgte mittels einer Entwicklermaschine. Für weitere Antikörperdetektionen wurde die Membran anschließend, nach einem Waschschriff mit TBS-T, für 30 Minuten mit Stripping-Puffer gestrippt. Danach erfolgten ein erneutes Blocken und weiteres Vorgehen wie beschrieben. Bei mehrfachem Strippen der Membran wurde immer zuerst der Phospho-Antikörper detektiert, anschließend der Nicht-Phospho-Antikörper und zuletzt die Ladungskontrolle (β -Actin). Die Quantifizierung der Proteinexpression und -phosphorylierung erfolgte densitometrisch mit Hilfe der Software Image J. Die erhaltenen Werte wurden stets als Fold-Change im Vergleich zur unbehandelten (bzw. stimulierten) Kontrolle, deren Wert mit „1“ gesetzt wurde, dargestellt.

2.2.4. Phospho-Immunoceptor Array

Die Phosphorylierungsstati einer Vielzahl ITAM- und ITIM-haltiger Immunrezeptoren wurden mittels des Proteome Profiler™ Human Phospho-Immunoceptor Array Kits (R&D Systems) untersucht, bei dem Antikörper gegen 59 verschiedene Immunrezeptoren jeweils in Duplikaten auf eine Membran gedruckt sind. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Mit LPS für 24 Stunden ausgereifte moDCs wurden für 2 Minuten bei 37 °C im Wasserbad mit 250 ng/ml CCL19 gepulst [223] und anschließend mit PBS gespült. Die Proteinextraktion erfolgte mit Hilfe des im Kit enthaltenen Lysis Buffer 17 (versetzt mit 1% Phosphatase-Inhibitor Cocktail 2 und Protease-Inhibitor Cocktail) für 30 Minuten bei 4 °C auf einem Wippschüttler. Nach einem Zentrifugationsschriff wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C gelagert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte wie unter 2.2.3.1 angegeben. Die Membranen wurden für eine Stunde mit Assay Buffer 1 auf einem Wippschüttler geblockt. Währenddessen wurden die zu vergleichenden Proben mit Array Buffer 1 auf die gleiche (niedrigste) Konzentration eingestellt und, ebenfalls mit Array Buffer 1, auf 1,5 ml verdünnt. Die

im Array eingesetzten Proteinmengen variierten von 95 bis 300 µg. Nach Ablauf der Blockierung wurde der Array Buffer 1 entfernt und es erfolgte die Zugabe des Zelllysates und die Inkubation auf einem Wippschüttler bei 4 °C über Nacht. Anschließend wurden die Membranen dreimal für 10 Minuten mit Wash Buffer gewaschen. Danach erfolgte eine zweistündige Inkubation mit HRP-gekoppeltem Anti-Phospho-Tyrosin-Antikörper in Array Buffer 2 auf einem Wippschüttler bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurden die Membranen dreimal für 10 Minuten mit Wash Buffer gewaschen. Nach dem Abtropfen folgte eine einminütige Inkubation mit Chemi Reagent Mix. Die Detektion erfolgte durch Belichtung von Röntgenfilmen für 1 bis 10 Minuten und anschließender Entwicklung.

2.2.5. Messung der Zytokinsekretion durch ELISA

Die Messung der Zytokinsekretion im ELISA erfolgte mit Hilfe der BD OptEIA™ ELISA-Kits nach Angaben des Herstellers. Proben wurden im Fall der moDCs durch Abnehmen des Kulturüberstandes 24 Stunden nach der Stimulation mit LPS gewonnen. Die Überstände wurden unverdünnt im Assay eingesetzt. Überstände aus T-Zell-Kulturen wurden 18 Stunden nach Stimulation mit OKT3, α-CD28 und α-CD49d abgenommen und vor dem Assay 1:5 verdünnt. Bereits am Tag vor dem Ansetzen des ELISAs wurde eine 96-Well-ELISA-Platte mit 100 µl einer 1:250-Verdünnung des jeweiligen Capture-Antikörpers in Coating Buffer pro Well beschichtet und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Platte fünfmal mit je 200 µl PBS + 0,05% Tween 20 gewaschen. Anschließend erfolgten die Blockierung der Platte mit 200 µl Assay Diluent pro Well für eine Stunde bei Raumtemperatur und 5 weitere Waschschrte. Anschließend wurde eine 1:2-Verdünnungsreihe der rekombinanten IL-2/IL-10/IL-12-Standards (Start IL-2: 300 pg/ml, Start IL-10: 1000 pg/ml, Start IL-12: 1000 pg/ml) in Assay Diluent hergestellt und ebenso wie die Proben à 100 µl ausplattiert. Nach zwei Stunden Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Platte fünfmal gewaschen und pro Well wurden 100 µl des Working Detectors (Detektionsantikörper + Streptavidin-HRP-Konjugat) zugegeben. Nach einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Wells sieben Mal gewaschen, wobei das PBS + 0,05% Tween 20 jeweils eine Minute einwirken gelassen wurde. Anschließend folgten die Zugabe von 100 µl Substrate Solution (1:1 Substrate Solution A und B) pro Well und eine dreißigminütige Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln. Nach der Zugabe von 50 µl Stop Solution (2N H₂SO₄) erfolgte innerhalb von 30 Minuten die Messung an einem BioRad Model 680 *Microplate Reader* bei 450 nm gegen 0 nm. Die Erstellung einer Standardkurve und Berechnung der Messwerte wurde mit der Software *Microplate Manager*™ durchgeführt.

2.2.6. Statistische Auswertung

Die Ermittlung von Mean, Median, SEM und p-Werten erfolgten mit Hilfe der Software GraphPad Prism®. Statistische Signifikanzen wurden mit der Software unter Verwendung eines zweiseitigen gepaarten Studentischen T-Tests berichtet, wobei p-Werte < 0.05 als statistisch signifikant angesehen wurden.

3. Ergebnisse

3.A. Untersuchung synergistischer Effekte von Dasatinib und Dexamethason auf T-Zellen

Basierend auf vorangegangenen Titrations-Experimenten, bei denen klinisch relevante Dosen von Dexamethason (1-1000 nM) [248-250] und Dasatinib (0,1-100 nM) [251-253] für die Untersuchung von T-Zell-Aktivierung und -Proliferation eingesetzt worden waren, wurden 10 und 100 nM Dexamethason und 1-50 nM Dasatinib verwendet, um potentielle synergistische Effekte zu untersuchen. Da sowohl langsame, über den Glucocorticoid-Rezeptor vermittelte genomische, als auch schnell ablaufende nichtgenomische, durch eine Modulation der Aktivität von SFKs vermittelte Effekte für Glucocorticoide beschrieben wurden [133, 144], wurde zudem auch der Einfluss der Behandlungsdauer mit Dexamethason und Dasatinib untersucht. Hierfür wurden T-Zellen für 1 versus 24 Stunden mit Dexamethason kombiniert mit 1 versus 24 Stunden mit Dasatinib behandelt. Nachdem die Dauer der Vorbehandlung keine Auswirkungen erkennen ließ (*Daten nicht gezeigt*), wurden für weitere Experimente eine 24-stündige Vorbehandlung mit Dexamethason und eine einstündige Vorbehandlung mit Dasatinib ausgewählt.

3.A.1. Effekte der Medikamentenkombination auf die T-Zell-Aktivierung

Um zu überprüfen, ob sich eine Kombination aus Dexamethason und Dasatinib kombinatorisch auf die Aktivierung von T-Zellen auswirkt, wurde der Einfluss auf die Expression des Aktivierungsmarkers CD69 und auf die Sekretion von IL-2 untersucht. Während 10 oder 100 nM Dexamethason wie beschrieben [254] keinen Einfluss auf die Expression von CD69 in CD3⁺ (*Abbildung 4 A*), CD3⁺CD4⁺ (*Abbildung 4 B*) oder CD3⁺CD8⁺ (*Abbildung 4 C*) T-Zellen hatten, konnte bestätigt werden [90], dass eine Vorbehandlung mit Dasatinib bereits bei einer Konzentration von 10 nM die Hochregulation von CD69 nach Stimulation mit OKT3 komplett unterbindet. 1 nM Dasatinib zeigte, zumindest in CD3⁺CD4⁺ T-Zellen, ebenfalls einen hemmenden Einfluss, diese Hemmung war allerdings statistisch nicht signifikant. Kombinatorische Effekte von Dasatinib und Dexamethason konnten nicht beobachtet werden.

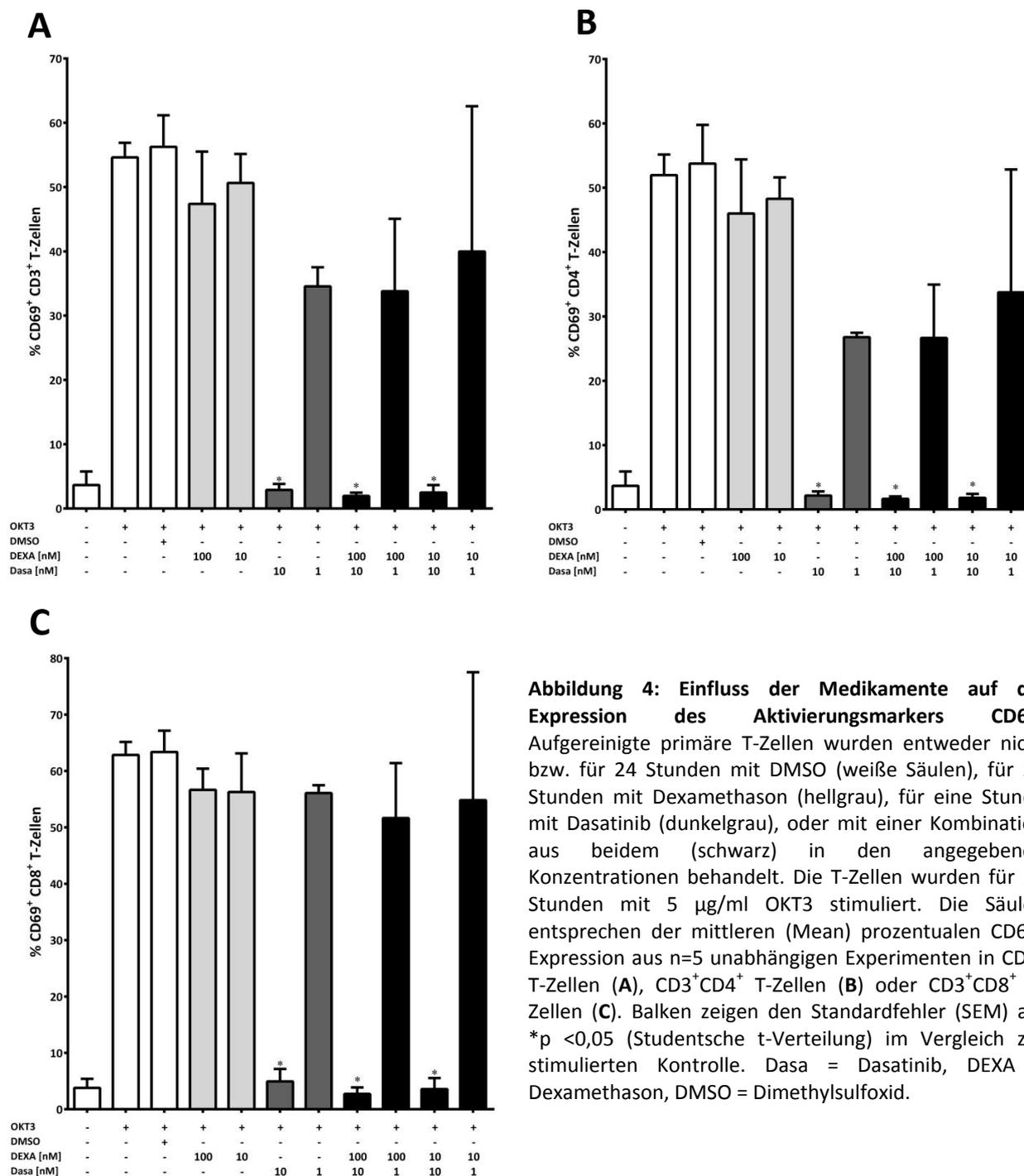


Abbildung 4: Einfluss der Medikamente auf die Expression des Aktivierungsmarkers CD69.

Aufgereinigte primäre T-Zellen wurden entweder nicht bzw. für 24 Stunden mit DMSO (weiße Säulen), für 24 Stunden mit Dexamethason (hellgrau), für eine Stunde mit Dasatinib (dunkelgrau), oder mit einer Kombination aus beidem (schwarz) in den angegebenen Konzentrationen behandelt. Die T-Zellen wurden für 24 Stunden mit 5 µg/ml OKT3 stimuliert. Die Säulen entsprechen der mittleren (Mean) prozentualen CD69-Expression aus n=5 unabhängigen Experimenten in CD3⁺ T-Zellen (A), CD3⁺CD4⁺ T-Zellen (B) oder CD3⁺CD8⁺ T-Zellen (C). Balken zeigen den Standardfehler (SEM) an. *p < 0,05 (Studentsche t-Verteilung) im Vergleich zur stimulierten Kontrolle. Dasa = Dasatinib, DEXA = Dexamethason, DMSO = Dimethylsulfoxid.

Um zu untersuchen, ob auch eine bereits erfolgte Aktivierung der T-Zellen durch Dasatinib oder Dexamethason unterbunden werden kann, wurden CD3⁺ T-Zellen 6 Stunden nach Stimulation mit OKT3 mit Dasatinib und/oder Dexamethason behandelt. Weder Dasatinib noch Dexamethason noch eine Kombination aus beiden hatte in diesem Setting einen Einfluss auf die Expression von CD69 (Abbildung 5).

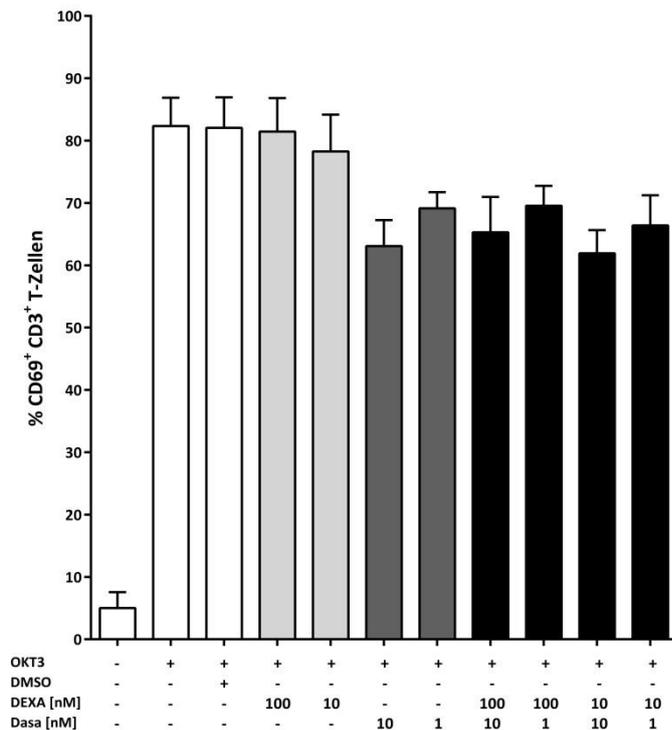


Abbildung 5: Hemmbarkeit einer bereits erfolgten Aktivierung. Aufgereinigte primäre T-Zellen wurden nach 6 Stunden Stimulation mit OKT3 für 18 Stunden mit DMSO (weiß) bzw. Dexamethason (hellgrau), Dasatinib (dunkelgrau) oder einer Kombination (schwarz) in den angegebenen Konzentrationen behandelt. Die Säulen entsprechen der mittleren (Mean) prozentualen CD69-Expression aus n=5 unabhängigen Experimenten in CD3⁺ T-Zellen. Balken zeigen den Standardfehler (SEM) an. Es traten keine statistisch signifikanten Unterschiede (p < 0,05, Studentische t-Verteilung) auf. Dasa = Dasatinib, DEXA = Dexamethason, DMSO = Dimethylsulfoxid.

Im Hinblick auf die Sekretion von IL-2 führte eine Vorbehandlung mit Dexamethason in CD3⁺ T-Zellen zu einer starken Hemmung selbst bei einer Konzentration von 1 nM. Eine Kombination mit Dasatinib, das alleine ebenfalls stark hemmend wirkt [90], führte zu keiner weiteren Verstärkung der Hemmung (Abbildung 6).

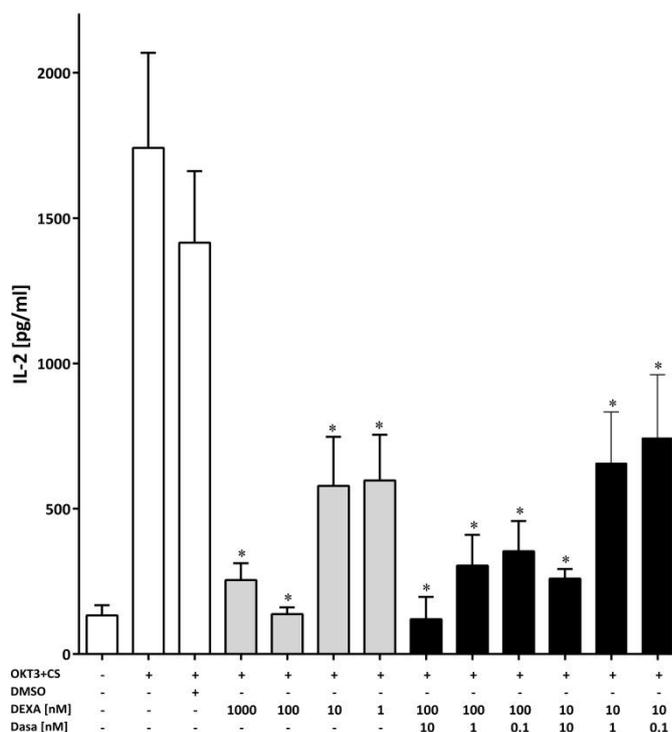


Abbildung 6: Einfluss der Medikamente auf die Sekretion von IL-2. Aufgereinigte primäre T-Zellen wurden für 24 Stunden mit Dexamethason mit (hellgrau) oder ohne Dasatinib (für eine Stunde, schwarz) oder DMSO als Lösungsmittelkontrolle (weiß) in den angegebenen Konzentrationen vorbehandelt. Die Sekretion von IL-2 wurde im ELISA 18 Stunden nach der Stimulation mit OKT3, α-CD28 und α-CD49d gemessen. Die gezeigten Daten entstammen n=4 unabhängigen Experimenten. Säulen zeigen die mittlere (Mean) sekretierte IL-2-Menge, Balken den Standardfehler (SEM) an. *p < 0,05 (Studentische t-Verteilung) im Vergleich zur stimulierten Kontrolle. CS = costimulatorische Moleküle, Dasa = Dasatinib, DEXA = Dexamethason, DMSO = Dimethylsulfoxid.

3.A.2. Auswirkungen auf die frühe Signaltransduktion

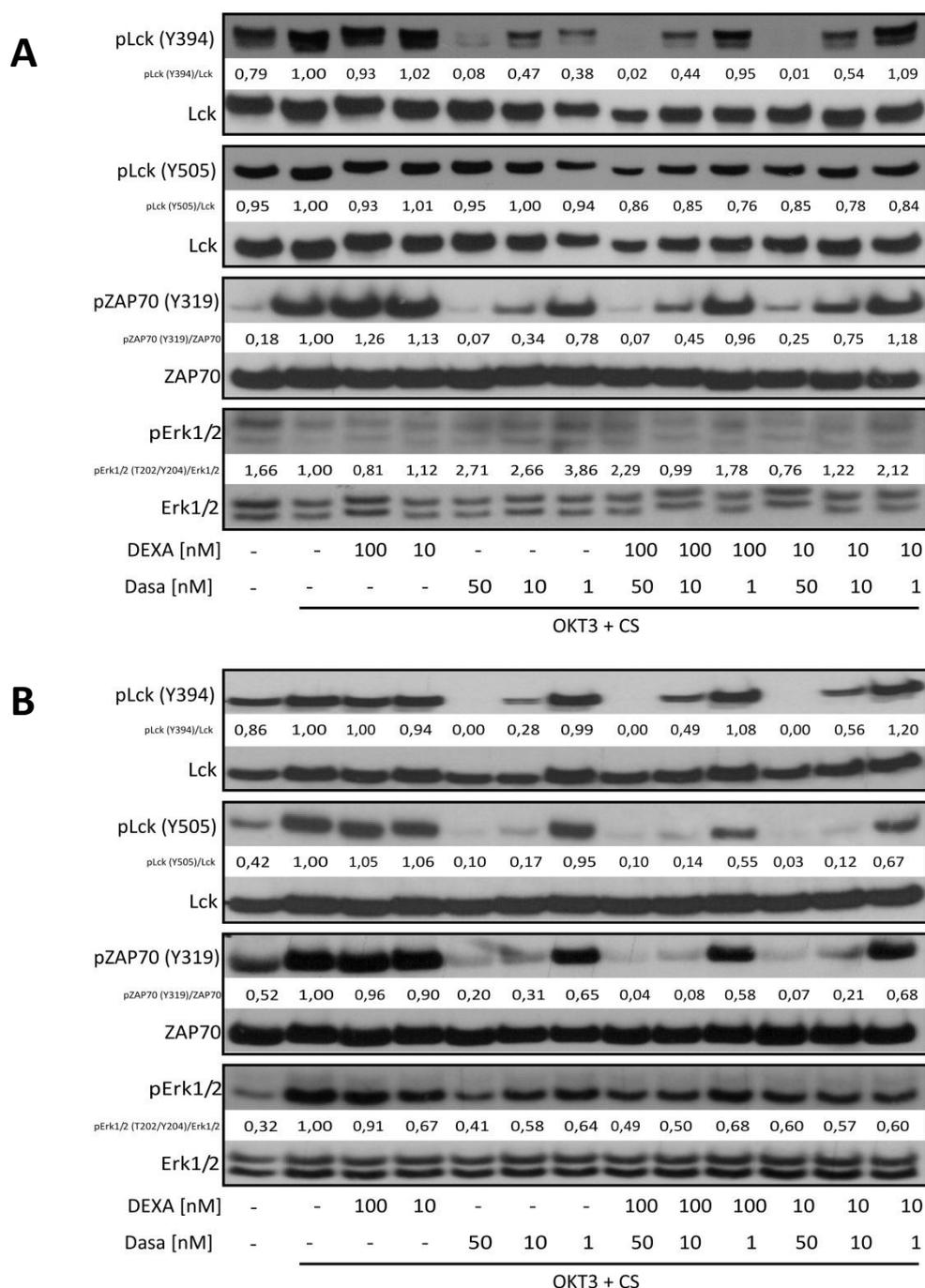


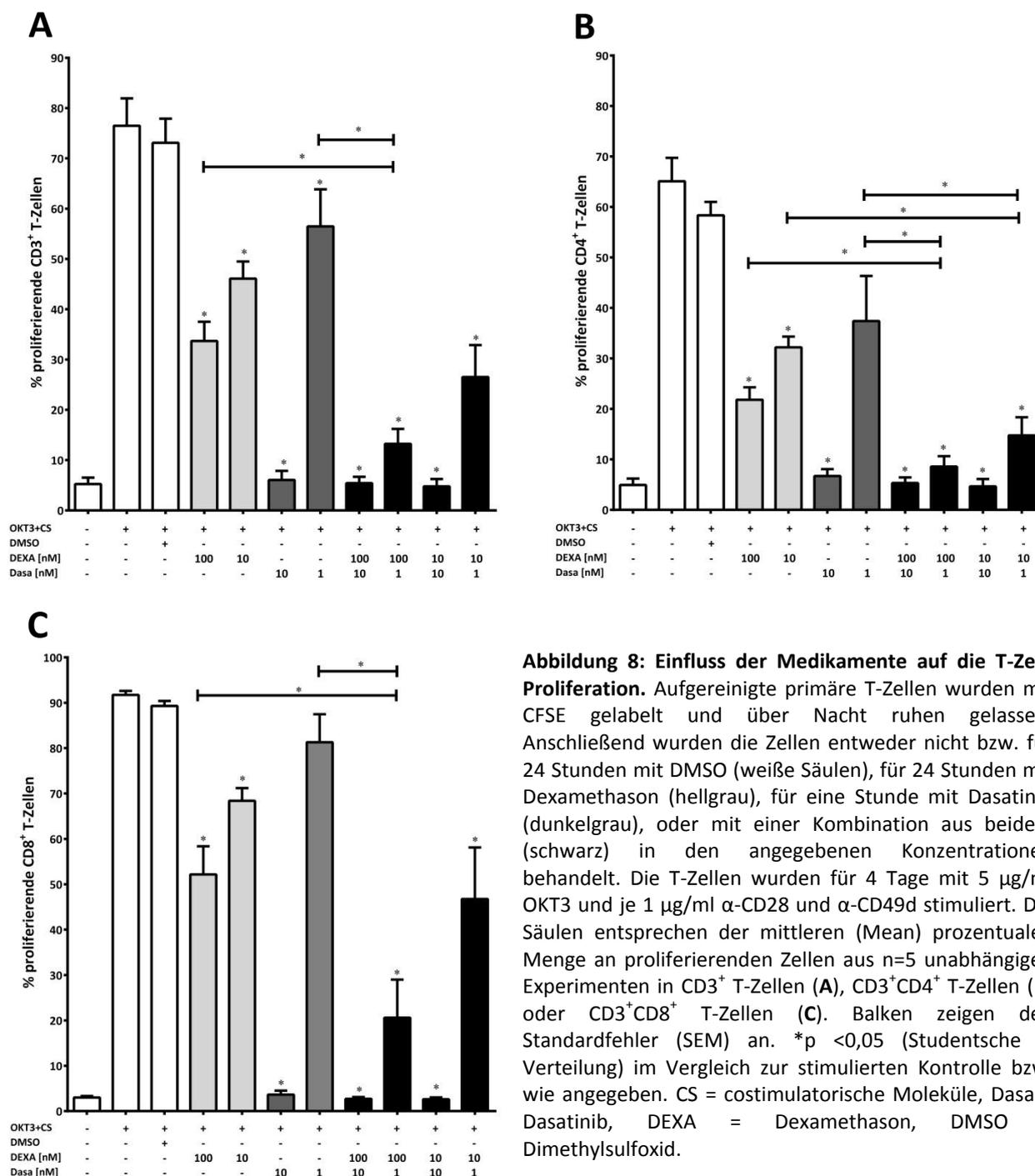
Abbildung 7: Einfluss von Dexamethason und Dasatinib auf das TCR-Signaling. Aufgereinigte primäre T-Zellen wurden für 24 Stunden (A) oder 10 Minuten (B) mit Dexamethason und/oder mit Dasatinib (für eine Stunde) in den angegebenen Konzentrationen vorbehandelt. Die Aktivierung erfolgte mit 5 µg/ml OKT3 und je 1 µg/ml α-CD28 und α-CD49d für 5 Minuten. Die Zellen wurden auf Eis überführt, lysiert, und die Expression von LCK, ZAP70 und ERK1/2 und deren Phosphorylierungsstati (pLCK Y394 [pSRC Y416] und Y505, pZAP70 Y319, pERK1/2 T202/Y204/T185/Y187) wurden mittels Western Blot untersucht. Gezeigt ist je ein repräsentatives Ergebnis von je n=2 unabhängigen Experimenten. Eine gleichmäßige Beladung wurde mit Hilfe von β-Actin kontrolliert (nicht gezeigt). CS = costimulatorische Moleküle, Dasa = Dasatinib, DEXA = Dexamethason.

Es ist seit langem bekannt dass die SRC-Kinase LCK das Hauptangriffsziel für Dasatinib in T-Zellen darstellt [255]. Darüber hinaus wird angenommen, dass Dexamethason neben den schon lange bekannten

genomischen Effekten auch schnell ablaufende Effekte über eine Dephosphorylierung von LCK und FYN [140, 256] und den MAPK/ERK Pathway vermitteln kann [257]. Natürlicherweise ist eine große Menge an LCK in T-Zellen konstitutiv aktiv, und es wurde gezeigt, dass durch Aktivierung von ERK eine Dexamethason-Resistenz gefördert werden kann [258]. Um eine mechanistische Basis für die beobachteten verschiedenartigen Einflüsse auf die Effektor-Funktionen von T-Zellen zu gewinnen, wurden Menge und Phosphorylierungsstatus von LCK und dessen wichtigen downstream gelegenen Targets ZAP70 und ERK1/2 in unterschiedlich vorbehandelten T-Zellen untersucht. Hierzu wurden die Zellen für 24 Stunden oder 10 Minuten mit Dexamethason, kombiniert mit einer Stunde Dasatinib vorbehandelt, und für 5 Minuten mit OKT3 und Kostimulatoren stimuliert. Während das Expressionslevel von LCK bei allen Bedingungen unverändert blieb, verursachte Dasatinib eine deutliche und Dosis-abhängige Dephosphorylierung des aktivatorischen Tyrosinrests Y394 [259]. Der inhibitorische Tyrosinrest Y505 [259] wurde dagegen nicht durchgehend beeinflusst. 50 nM Dasatinib führten stets zu einer annähernd vollständigen Dephosphorylierung von Y394. Eine Behandlung mit Dexamethason führte weder nicht zu einer Änderung der Phosphorylierungsstati und es traten keine kombinatorischen Effekte mit Dasatinib auf. Im Einklang dazu führte nur eine Behandlung mit Dasatinib zu einer verringerten Phosphorylierung des aktivierenden Tyrosinrests Y319 [260] bei ZAP70, welche durch die Zugabe von Dexamethason nicht verändert wurde. Ebenso wurde der Phosphorylierungsstatus von ERK1/2 durch Dasatinib leicht verändert, nicht aber durch Dexamethason (*Abbildung 7 A-B*).

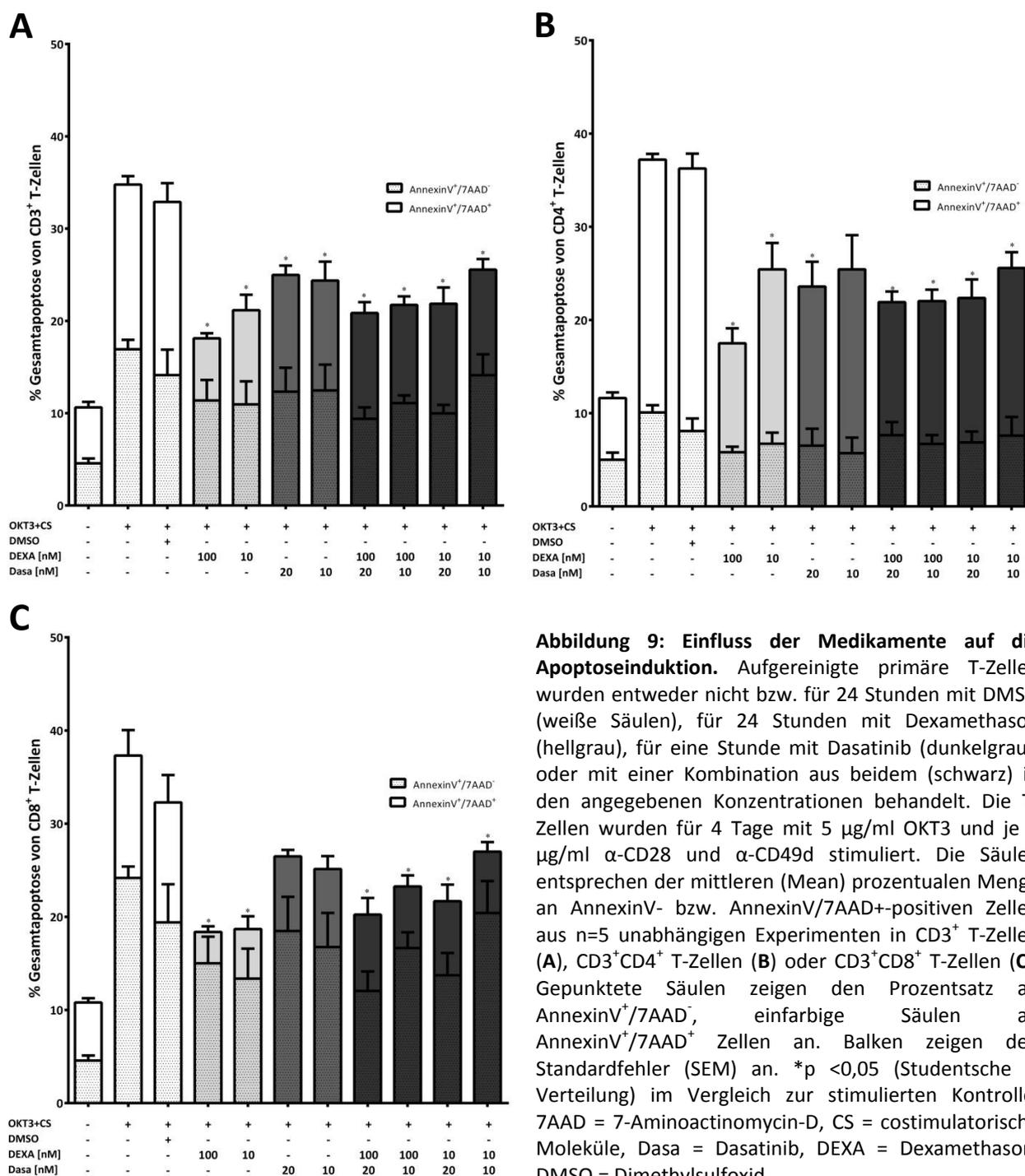
3.A.3. Dexamethason und Dasatinib stören additiv die T-Zell-Proliferation

Die Proliferation von CD3⁺ T-Zellen wurde durch Dexamethason Dosis-abhängig behindert. 100 nM Dexamethason reduzierten die Zahl der proliferierenden Zellen von 76% auf 33%, bei 10 nM proliferierten 46% der T-Zellen, was im Einklang mit bereits publizierten Ergebnissen steht [257, 261]. Wie bereits beschrieben [90], reduzierten 10 nM Dasatinib die Zahl der proliferierenden Zellen auf 6% und 1 nM immer noch auf 56%, wobei alle Unterschiede statistisch signifikant waren. Signifikante additive Effekte waren bei einer Kombination von 100 nM Dexamethason und 1 nM Dasatinib zu beobachten, die zu einer Reduktion auf 13% führte (*Abbildung 8 A*). Es zeigte sich, dass CD4⁺ T-Helferzellen zwar insgesamt sensitiver als zytotoxische CD8⁺ T-Zellen auf eine Kombination beider Stoffe reagierten (4,4-fache Reduktion bei 10 nM Dexamethason und 1 nM Dasatinib in CD4⁺ T-Zellen, 2-fache Reduktion in CD8⁺ T-Zellen; 7,6-fache Reduktion bei 100 nM Dexamethason und 1nM Dasatinib in CD4⁺ T-Zellen, 4,5-fache Reduktion in CD8⁺ T-Zellen), dass aber auch die jeweiligen Einzelsubstanzen in CD8⁺ T-Zellen bereits deutlich weniger wirkungsvoll agieren konnten.



So führten selbst 100 nM Dexamethason alleine nur zu einer Reduktion von 92% auf 52%, 1 nM Dasatinib reduzierte (nicht signifikant) auf 81%. Eine Kombination beider Stoffe führte zu einer Reduktion auf 21%. In CD4⁺ T-Zellen dagegen reduzierten bereits 100 nM Dexamethason die Zahl der proliferierten Zellen alleine schon von 65% auf 22% und 1 nM Dasatinib (nicht signifikant) auf 37%, die Kombination führte zu einer Reduktion auf 9% (Abbildungen 8 B-C).

3.A.4. Weder Dexamethason noch Dasatinib führen zu erhöhten Apoptoseraten



Um auszuschließen, dass der hemmende Einfluss von Dasatinib und Dexamethason auf die Proliferation durch eine Erhöhung der Apoptoseraten bedingt ist, wurden (frühe) Apoptose und späte Apoptose/Nekrose mittels Annexin V/7-AAD-Färbung vier Tage nach Stimulation gemessen. In allen Fällen war der Aktivierungs-induzierte Zelltod bei mit Dexamethason oder Dasatinib behandelten CD3⁺, CD3⁺CD4⁺ und CD3⁺CD8⁺ T-Zellen signifikant niedriger als in der Kontrolle. Kombinatorische Effekte zwischen den beiden Substanzen traten nicht auf (Abbildung 9 A-C).

3.A.5. Naive T-Zellen reagieren sensitiver als Gedächtnis-T-Zellen auf die Medikamentenkombination

Um zu untersuchen, ob sich die Kombination von Dasatinib und Dexamethason verschiedenartig auf unterschiedliche CD4⁺- und CD8⁺-Subsets auswirkt, wurden die CD3⁺CD4⁺ und CD3⁺CD8⁺ T-Zell-Subsets durch das Hinzuziehen der Marker CD45RO und CD27 weiter in naive T-Zellen (CD45RO⁻CD27⁺) und zwei Formen von Gedächtnis T-Zellen (CD45RO⁺CD27⁺ als eher central memory, CD45RO⁺CD27⁻ als eher effector memory [262, 263]) unterteilt. Wie schon für CD3⁺ bzw. CD3⁺CD4⁺ und CD3⁺CD8⁺ (Abbildung 4) dargestellt, hatte Dexamethason auf die Expression des Aktivierungsmarkers CD69 keinerlei Einfluss. Dagegen erfolgte durch Dasatinib in allen Fällen eine Dosis-abhängige Verringerung der Expression, die in den naiven Subsets am stärksten ausgeprägt war. Kombinatorische Effekte zwischen Dasatinib und Dexamethason waren nicht zu beobachten (*nicht gezeigt*).

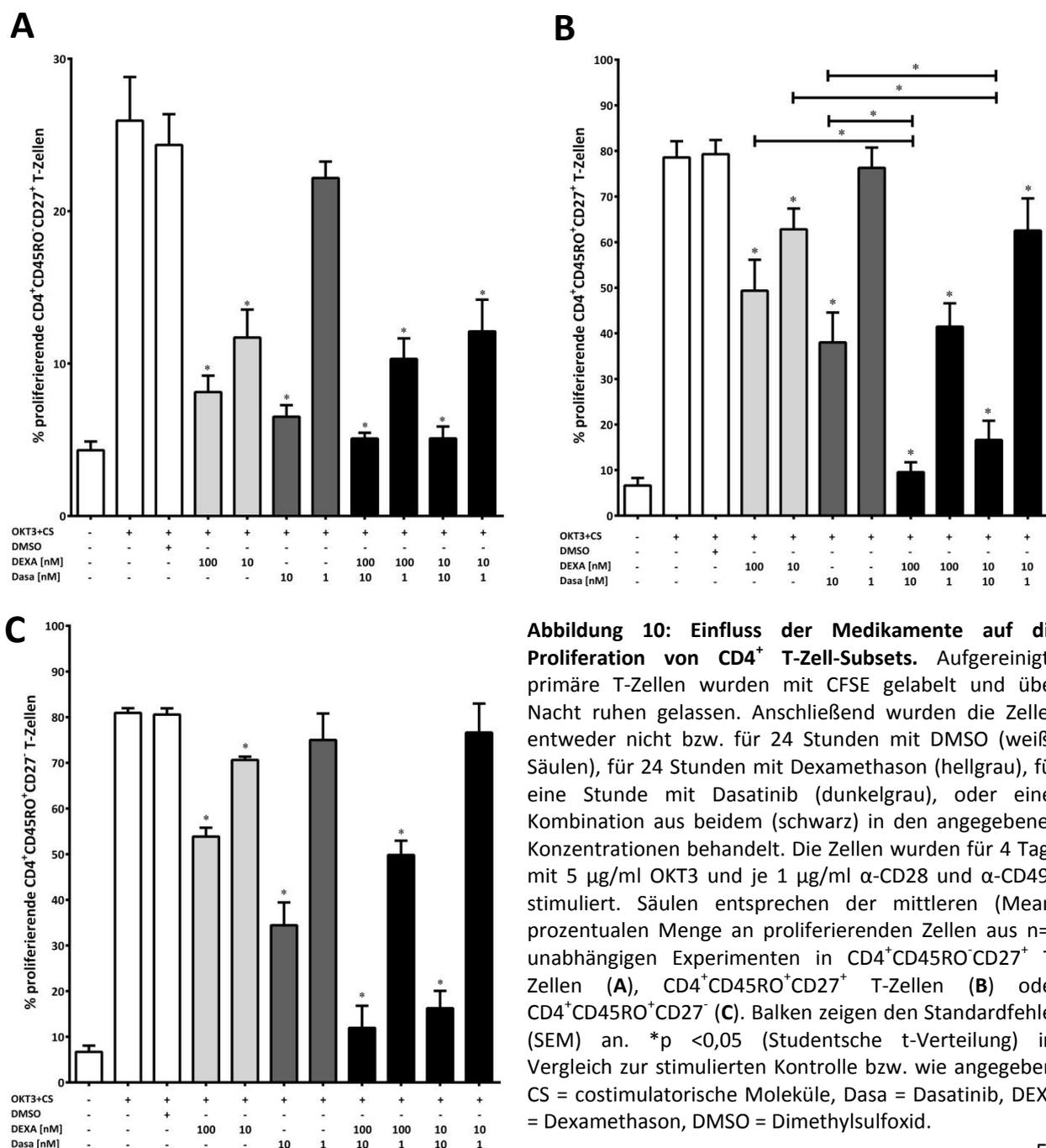
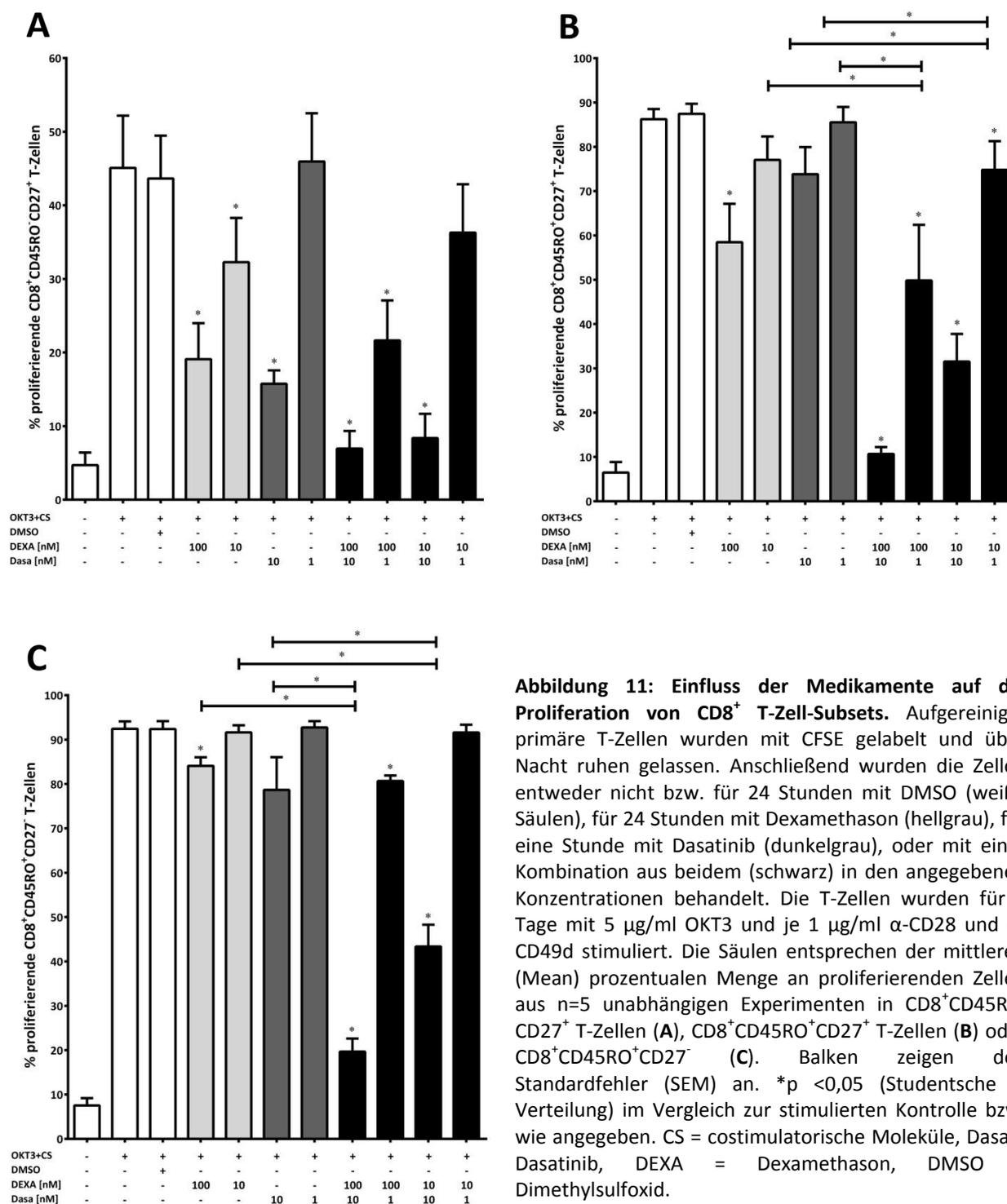


Abbildung 10: Einfluss der Medikamente auf die Proliferation von CD4⁺ T-Zell-Subsets. Aufgereinigte primäre T-Zellen wurden mit CFSE gelabelt und über Nacht ruhen gelassen. Anschließend wurden die Zellen entweder nicht bzw. für 24 Stunden mit DMSO (weiße Säulen), für 24 Stunden mit Dexamethason (hellgrau), für eine Stunde mit Dasatinib (dunkelgrau), oder einer Kombination aus beidem (schwarz) in den angegebenen Konzentrationen behandelt. Die Zellen wurden für 4 Tage mit 5 µg/ml OKT3 und je 1 µg/ml α-CD28 und α-CD49d stimuliert. Säulen entsprechen der mittleren (Mean) prozentualen Menge an proliferierenden Zellen aus n=5 unabhängigen Experimenten in CD4⁺CD45RO⁻CD27⁺ T-Zellen (A), CD4⁺CD45RO⁺CD27⁺ T-Zellen (B) oder CD4⁺CD45RO⁺CD27⁻ (C). Balken zeigen den Standardfehler (SEM) an. *p <0,05 (Studentsche t-Verteilung) im Vergleich zur stimulierten Kontrolle bzw. wie angegeben. CS = costimulatorische Moleküle, Dasa = Dasatinib, DEXA = Dexamethason, DMSO = Dimethylsulfoxid.

Die Zahl der proliferierenden Zellen in naiven T-Zell-Subsets wurde durch eine Kombination von Dexamethason und Dasatinib dosis-abhängig insgesamt stärker verringert als in Gedächtnis-Subsets, was in Einklang mit den bereits berichteten Effekten der Einzelsubstanzen steht [90, 258]. Dasatinib verstärkte dosis-abhängig die Dexamethason-induzierte Reduzierung der Zahl an proliferierenden Zellen, starke synergistische Effekte waren insbesondere in $CD8^+$ Memory-Subsets zu beobachten (Abbildung 10 A-C und Abbildung 11 A-C).



So führten 10 nM Dasatinib alleine nur zu einer 1,2-fachen, 100 nM Dexamethason alleine nur zu einer 1,1-fachen Reduktion der proliferierenden CD8⁺CD45RO⁺CD27⁻ T-Zellen, eine Kombination aus beiden führte dagegen zu einer 4,7-fachen Reduktion (*Abbildung 11 C*). Im Gegensatz dazu erreichte die Kombination einen nicht einmal additiven Effekt in CD4⁺CD45RO⁺CD27⁻ T-Zellen (Kombination: 5,1-fache, 10 nM Dasatinib: 2,3-fache, 100 nM Dexamethason: 3,9-fache Hemmung; *Abbildung 10 C*).

3.A.6. Eine Kombination aus Dexamethason und Dasatinib verringert die Proliferation von Virus-spezifischen CD8⁺ T-Zellen

Da CD8⁺ T-Zell-vermittelte Immunreaktionen essentiell für die Langzeit-Kontrolle von Herpesviren nach erfolgter allogener hämatopoetischer Stammzelltransplantation sind, wurden die Einflüsse beider Substanzen auf Antigen-spezifische T-Zellantworten gegen CMV und EBV alleine und in Kombination untersucht.

Eine Vorinkubation mit Dasatinib führte Dosis-abhängig zu einer verringerten Zahl an proliferierenden EBV- und CMV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen. Dexamethason alleine zeigte nur in CMV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen einen leicht hemmenden Einfluss. Signifikante und synergistisch wirkende kombinatorische Effekte traten bei 10 nM Dasatinib und 100 nM Dexamethason in CMV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen, und bei 10 nM Dasatinib mit 10 oder 100 nM Dexamethason in EBV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen auf. (*Abbildung 12 A-C*). Obwohl eine Vorbehandlung mit 10 nM Dasatinib zu einem leicht verringerten Proliferationsindex führte ($3,7 \pm 0,5$ gegenüber $4,6 \pm 0,4$ bei CMV-Peptid-stimulierten Zellen), wurde die Zahl der proliferierenden Zellen dadurch nicht beeinflusst. Im Gegensatz dazu führte eine Vorinkubation mit Dexamethason zu signifikant geringeren Teilungsraten (in CMV-Peptid-stimulierten Zellen $2,3 \pm 0,1$ bei 100 nM, $2,4 \pm 0,1$ bei 10 nM). Wurden die Zellen mit 50 nM Dasatinib vorbehandelt, so verhielten sie sich wie die unstimulierte Kontrolle. Eine Kombination aus Dexamethason und Dasatinib hatte keinen weitergehenden Einfluss auf die Proliferationsindices. Während 50 nM Dasatinib also die Proliferation in nahezu allen Zellen unterband und im Vergleich mit 10 nM nach dem Prinzip „ganz oder gar nicht“ agierte, führte Dexamethason zu einer stark verlangsamt ablaufenden Proliferation. Eine Kombination aus Dexamethason und Dasatinib kombinierte die Effekte der beiden Einzelsubstanzen und führte somit folgerichtig zu einer synergistischen Hemmung der Proliferation.

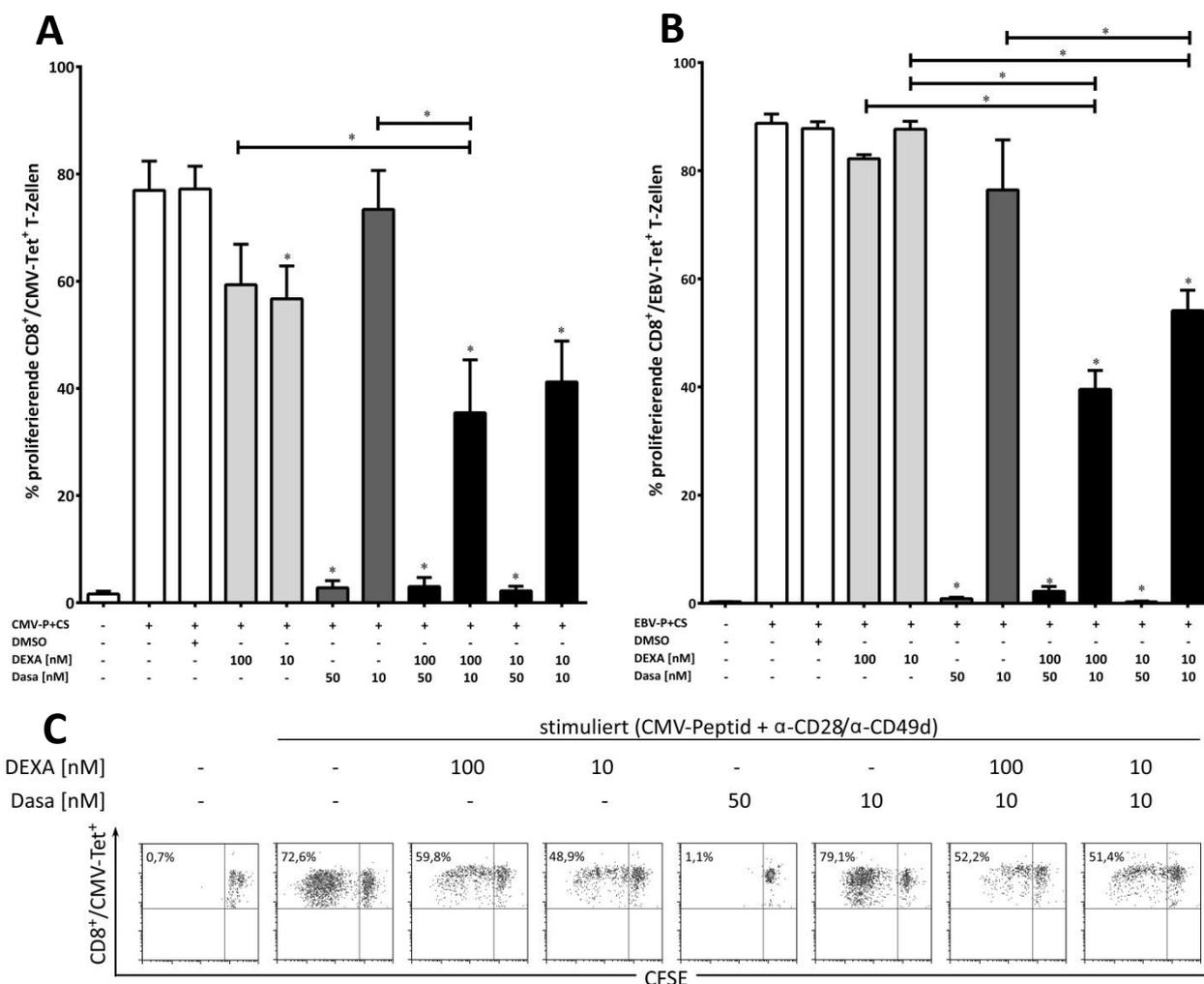


Abbildung 12: Einfluss von Dasatinib und Dexamethason auf die Proliferation von Virus-spezifischen CD8⁺ T-Zellen. Aufgereinigte primäre T-Zellen CMV- bzw. EBV- positiver Spender wurden mit CFSE gelabelt und über Nacht ruhen gelassen. Anschließend wurden die Zellen entweder nicht bzw. für 24 Stunden mit DMSO (weiße Säulen), für 24 Stunden mit Dexamethason (hellgrau), für eine Stunde mit Dasatinib (dunkelgrau), oder mit einer Kombination aus beidem (schwarz) in den angegebenen Konzentrationen behandelt. Die T-Zellen wurden für 6 Tage mit 2 μ M HLA A*201-CMV pp65₄₉₅₋₅₀₃ bzw. HLA-A*201-EBV BMLF1₂₅₉₋₂₆₇ und je 1 μ g/ml α -CD28 und α -CD49d stimuliert. Die Säulen entsprechen der mittleren (Mean) prozentualen Menge proliferierender Zellen aus n=4 unabhängigen Experimenten in CD8⁺CMV-Tet⁺ T-Zellen (A), bzw. aus n=3 unabhängigen Experimenten in CD8⁺EBV-Tet⁺ T-Zellen (B). Balken zeigen den Standardfehler (SEM) an. *p < 0,05 (Studentsche t-Verteilung) im Vergleich zur stimulierten Kontrolle bzw. wie angegeben. CS = costimulatorische Moleküle. (C) Repräsentatives Beispiel für den Einfluss auf die Proliferation CMV-spezifischer T-Zellen. Dasa = Dasatinib, DEXA = Dexamethason, DMSO = Dimethylsulfoxid.

3.A.7. Keine kombinatorische Wirkung auf Zytokin-Produktion und Degranulation von Virus-spezifischen CD8⁺ T-Zellen

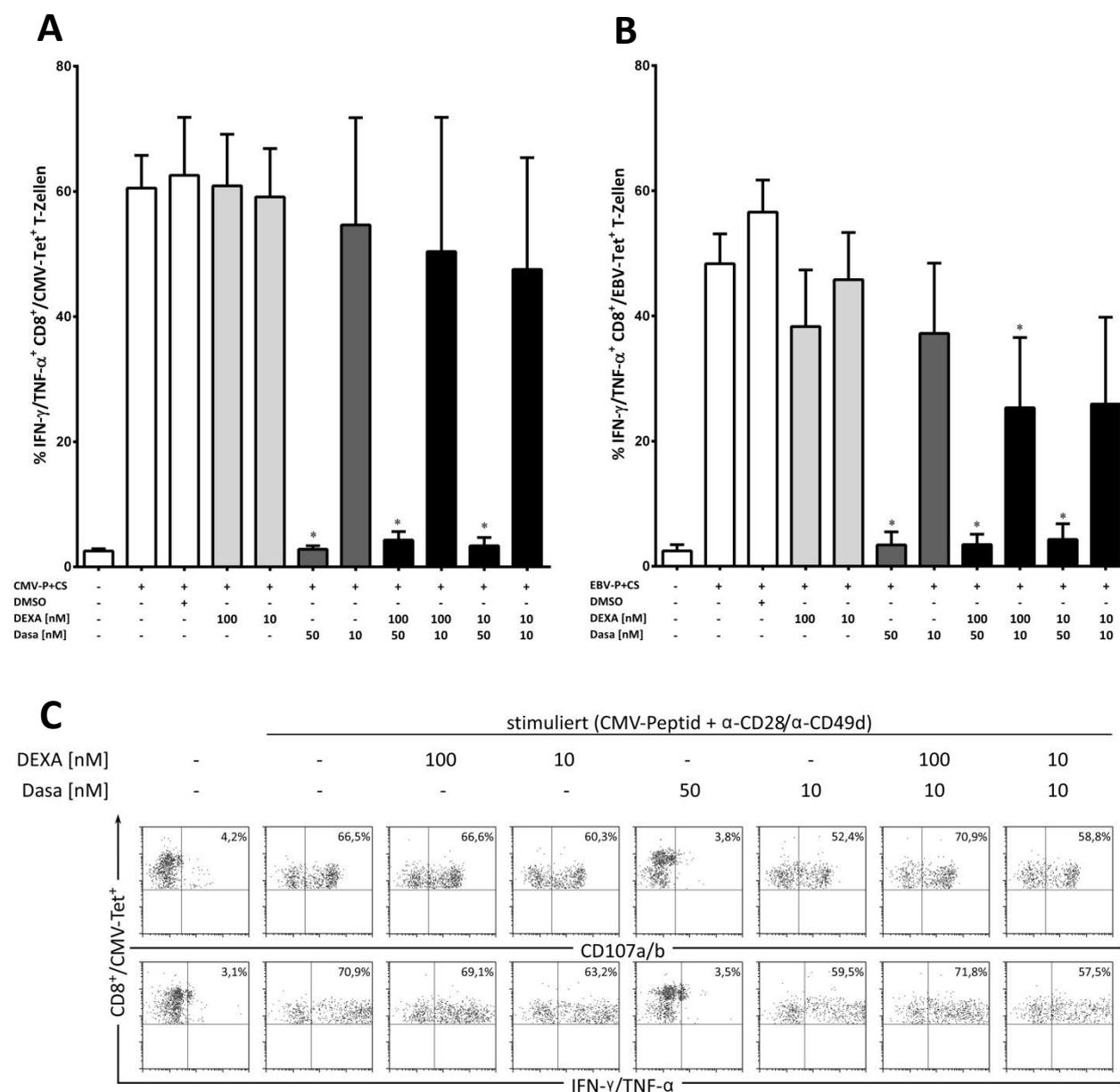


Abbildung 13: Einfluss von Dasatinib und Dexamethason auf die Zytokinproduktion von Virus-spezifischen CD8⁺ T-Zellen. Aufgereinigte primäre T-Zellen CMV- bzw. EBV- positiver Spender wurden entweder nicht bzw. für 24 Stunden mit DMSO (weiße Säulen), für 24 Stunden mit Dexamethason (hellgrau), für eine Stunde mit Dasatinib (dunkelgrau), oder mit einer Kombination aus beidem (schwarz) in den angegebenen Konzentrationen behandelt und anschließend für 5 Stunden mit 2 μ M HLA A*201-CMV pp65₄₉₅₋₅₀₃ bzw. HLA-A*201-EBV BMLF1₂₅₉₋₂₆₇ und je 1 μ g/ml α -CD28 und α -CD49d stimuliert. Die Säulen entsprechen der mittleren prozentualen Menge an Zytokinproduzierenden Zellen (Mean) aus n=3 unabhängigen Experimenten in CD8⁺CMV-Tet⁺ T-Zellen (A) bzw. in CD8⁺EBV-Tet⁺ T-Zellen (B). Balken zeigen den Standardfehler (SEM) an. *p < 0,05 (Studentische t-Verteilung) im Vergleich zur stimulierten Kontrolle. (C) Repräsentatives Beispiel für den Einfluss auf die Degranulation (siehe auch *Abbildung 14* A) und Zytokinproduktion CMV-spezifischer T-Zellen. CMV-P = CMV-Peptid, CS = costimulatorische Moleküle, Dasa = Dasatinib, DEXA = Dexamethason, DMSO = Dimethylsulfoxid, EBV = EBV-Peptid.

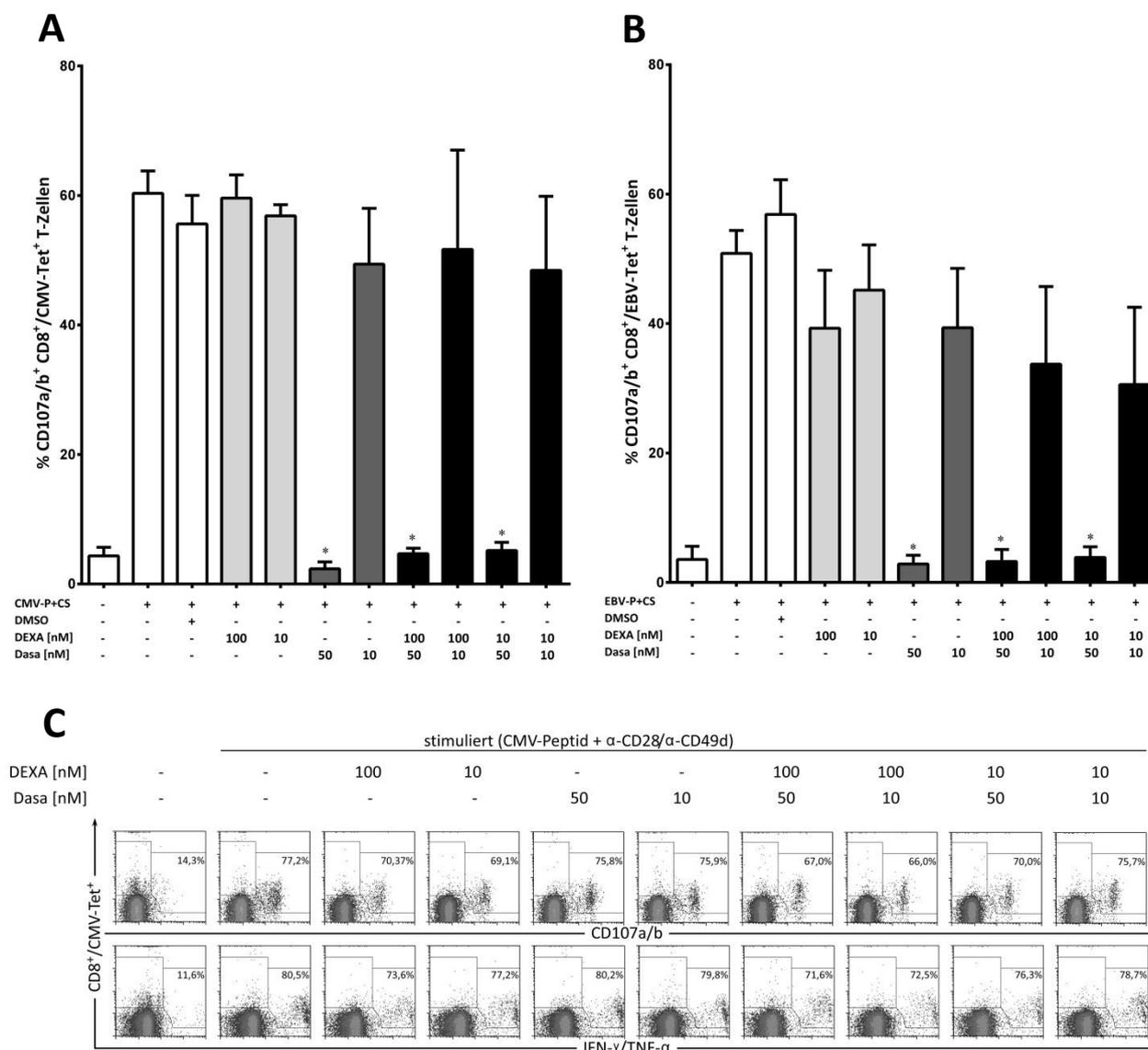


Abbildung 14: Einfluss von Dasatinib und Dexamethason auf die Degranulation von Virus-spezifischen CD8⁺ T-Zellen. Aufgereinigte primäre T-Zellen CMV- bzw. EBV- positiver Spender wurden entweder nicht bzw. für 24 Stunden mit DMSO (weiße Säulen), für 24 Stunden mit Dexamethason (hellgrau), für eine Stunde mit Dasatinib (dunkelgrau), oder mit einer Kombination aus beidem (schwarz) in den angegebenen Konzentrationen behandelt und anschließend für 5 Stunden mit 2 μ M HLA A*201-CMV pp65₄₉₅₋₅₀₃ bzw. HLA-A*201-EBV BMLFI₂₅₉₋₂₆₇ und je 1 μ g/ml α -CD28 und α -CD49d stimuliert. Die Säulen entsprechen der mittleren prozentualen Menge an CD107a/b exprimierenden Zellen (Mean) aus n=3 unabhängigen Experimenten in CD8⁺CMV-Tet⁺ T-Zellen (**A**) bzw. in CD8⁺EBV-Tet⁺ T-Zellen (**B**). Balken zeigen den Standardfehler (SEM) an. *p < 0,05 (Studentsche t-Verteilung) im Vergleich zur stimulierten Kontrolle. (**C**) Repräsentatives Beispiel (von n=2 unabhängigen Experimenten) für den Einfluss auf die Degranulation und Zytokinproduktion (vgl. auch *Abbildung 13*) CMV-spezifischer T-Zellen bei einer auf 4 Tage ausgedehnten Vorbehandlung mit Dexamethason und/oder Dasatinib vor Stimulation. Die Prozentzahlen geben den Anteil des rechten Gates an der Gesamtzahl der im linken und rechten Gate enthaltenen Zellen an. CMV-P = CMV-Peptid, CS = costimulatorische Moleküle, Dasa = Dasatinib, DEXA = Dexamethason, DMSO = Dimethylsulfoxid, EBV = EBV-Peptid.

Eine Behandlung mit Dasatinib führte zu einer Dosis-abhängigen Inhibierung sowohl der Zytokinproduktion als auch der Mobilisierung von CD107a/b als Voraussetzung für die Perforin- und

Granzym-vermittelte Zellyse. Im Gegensatz dazu ergaben sich keine messbaren Auswirkungen durch eine Dexamethason-Behandlung, ebenso waren keine kombinatorischen Effekte feststellbar (*Abbildung 13 A-C und Abbildung 14 A-B*). Interessanterweise konnte keine der beiden Substanzen, weder alleine noch in Kombination, Degranulation und Zytokinproduktion behindern, wenn die Vorbehandlungszeit auf 4 Tage ausgedehnt wurde (*Abbildung 14 C*).

3.B. Über den Einfluss von Dasatinib auf Dendritische Zellen

3.B.1. Einfluss von Dasatinib auf die Reifung von moDCs

Zunächst wurde der Einfluss von Dasatinib auf die Reifung von moDCs untersucht. Klinisch relevante Konzentrationen von 10 und 50 nM [251] Dasatinib wurden hierzu entweder von Beginn der DC-Generierung an eingesetzt (Langzeit-Behandlung, insgesamt 7 Tage, Auswaschen vor Untersuchungen bzw. funktionellen Assays), oder 24 Stunden vor Induktion der Ausreifung mittels LPS zugefügt (Kurzzeit-Behandlung, insgesamt 48 Stunden, Auswaschen vor Untersuchungen bzw. funktionellen Assays).

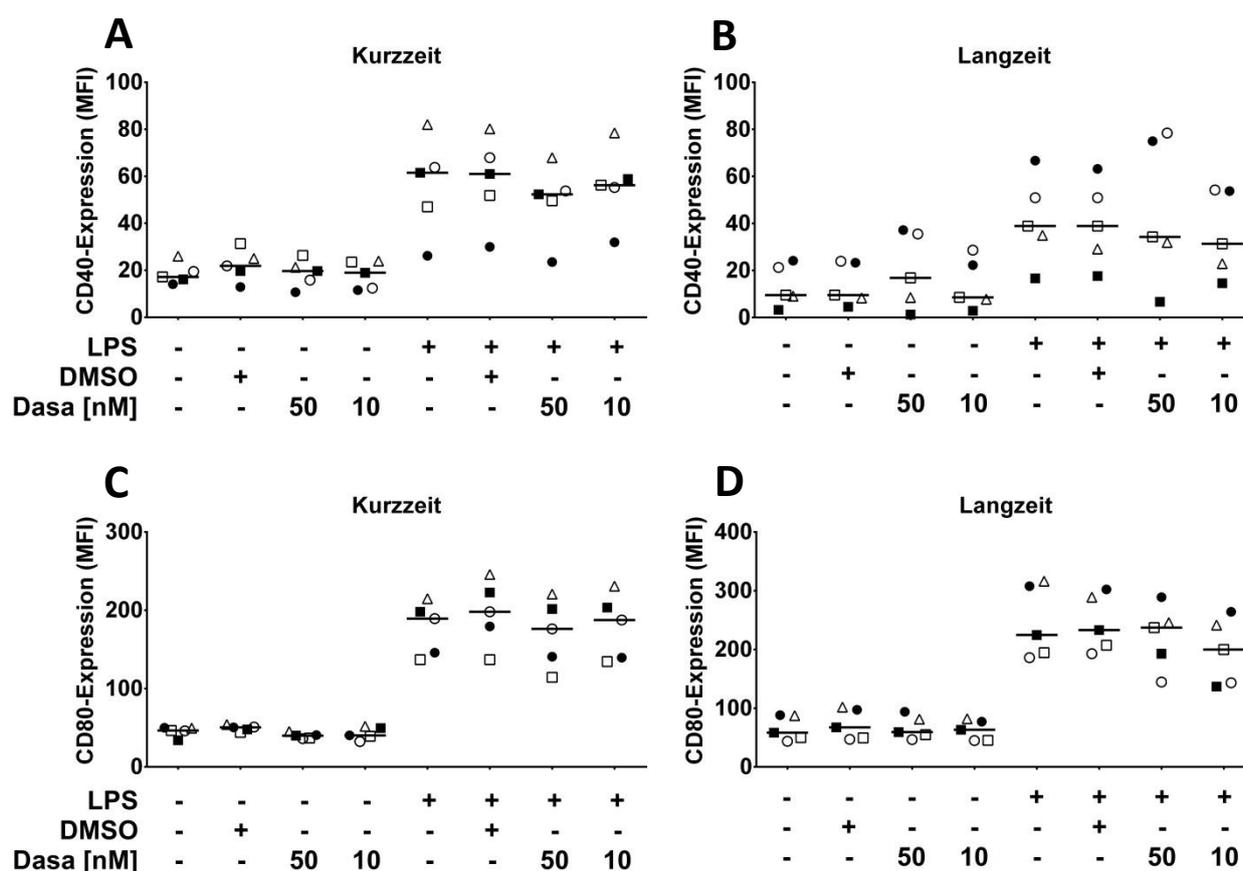


Abbildung 15: Einfluss von Dasatinib auf die Expression von kostimulatorischen Molekülen (I). Aus mittels Plastikadhärenz aufgereinigten Monozyten wurden durch Zugabe von IL-4 und GM-CSF moDCs generiert. Die Zellen wurden entweder von Beginn der Generierung an (Langzeit, gesamt 7 Tage) oder 24 Stunden vor LPS-Stimulation (Kurzzeit, gesamt 48 Stunden) mit Dasatinib in den angegebenen Konzentrationen vorbehandelt. Nach 6 Tagen erfolgte die Ausreifung durch Addition von 1 µg/ml LPS für 24 Stunden. Dargestellt sind die Expressionslevel von CD40 (A, B) und CD80 (C, D) nach Kurzzeit- (A, C) und Langzeitbehandlung (B, D) aus je n=5 unabhängigen Versuchen. Balken: Median. Unterschiedliche Symbole kennzeichnen jeweils einen Versuch. Es traten keine signifikanten ($p < 0,05$ (Studentsche t-Verteilung)) Unterschiede zwischen den Bedingungen auf. Dasa = Dasatinib, DMSO = Dimethylsulfoxid, LPS = Lipopolysaccharid.

Der Einfluss von Dasatinib auf prominente kostimulatorische Moleküle bzw. Aktivierungsmarker fiel insgesamt eher gering aus. So hatte Dasatinib weder in der Kurzzeit-, noch in der Langzeitbehandlung einen messbaren Einfluss auf die Expressionslevel von CD40 (Abbildung 15 A,B), CD80 (Abbildung 15 C,D) oder CD83 (Abbildung 16 A,B). Im Gegensatz dazu führten beide Behandlungsmethoden zu einer Dosis-

abhängigen und statistisch signifikanten leichten Verringerung der Expression von CD86 (Abbildung 16 C,D).

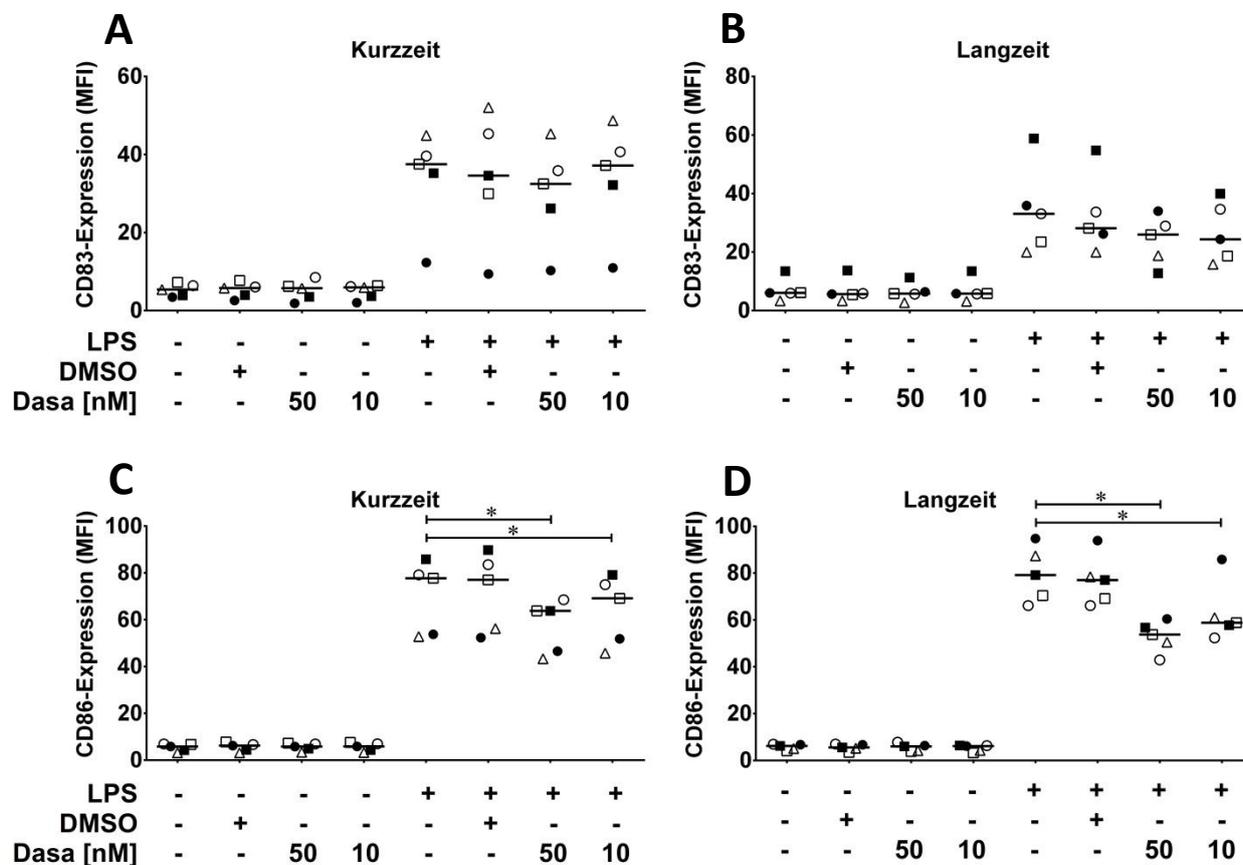


Abbildung 16: Einfluss von Dasatinib auf die Expression von kostimulatorischen Molekülen (II). Aus mittels Plastikadhärenz aufgereinigten Monozyten wurden durch Zugabe von IL-4 und GM-CSF moDCs generiert. Die Zellen wurden entweder von Beginn der Generierung an (Langzeit, gesamt 7 Tage) oder 24 Stunden vor LPS-Stimulation (Kurzzeit, gesamt 48 Stunden) mit Dasatinib in den angegebenen Konzentrationen vorbehandelt. Nach 6 Tagen erfolgte die Ausreifung durch Addition von 1 µg/ml LPS für 24 Stunden. Dargestellt sind die Expressionslevel von CD83 (A, B) und CD86 (C, D) nach Kurzzeit- (A, C) und Langzeitbehandlung (B, D) aus je n=5 unabhängigen Versuchen. Balken: Median. Unterschiedliche Symbole kennzeichnen jeweils einen Versuch. *p < 0,05 (Studentsche t-Verteilung). Dasa = Dasatinib, DMSO = Dimethylsulfoxid, LPS = Lipopolysaccharid.

Während weder eine Kurzzeit- noch eine Langzeitbehandlung einen messbaren Einfluss auf die Expression von MHC Klasse I-Molekülen (HLA-A,B,C) hatte (Abbildung 17 A,B), führte eine Langzeitbehandlung mit 50 nM Dasatinib im Gegensatz zur Kurzzeitbehandlung zu einer signifikant erhöhten Expression des MHC Klasse II-Moleküls HLA-DR (Abbildung 17 C,D). 10 nM Dasatinib führten bei keiner der beiden Zeitspannen zu einer Veränderung der Expression von MHC Klasse-I- oder Klasse-II-Molekülen (Abbildung 17 A-D).

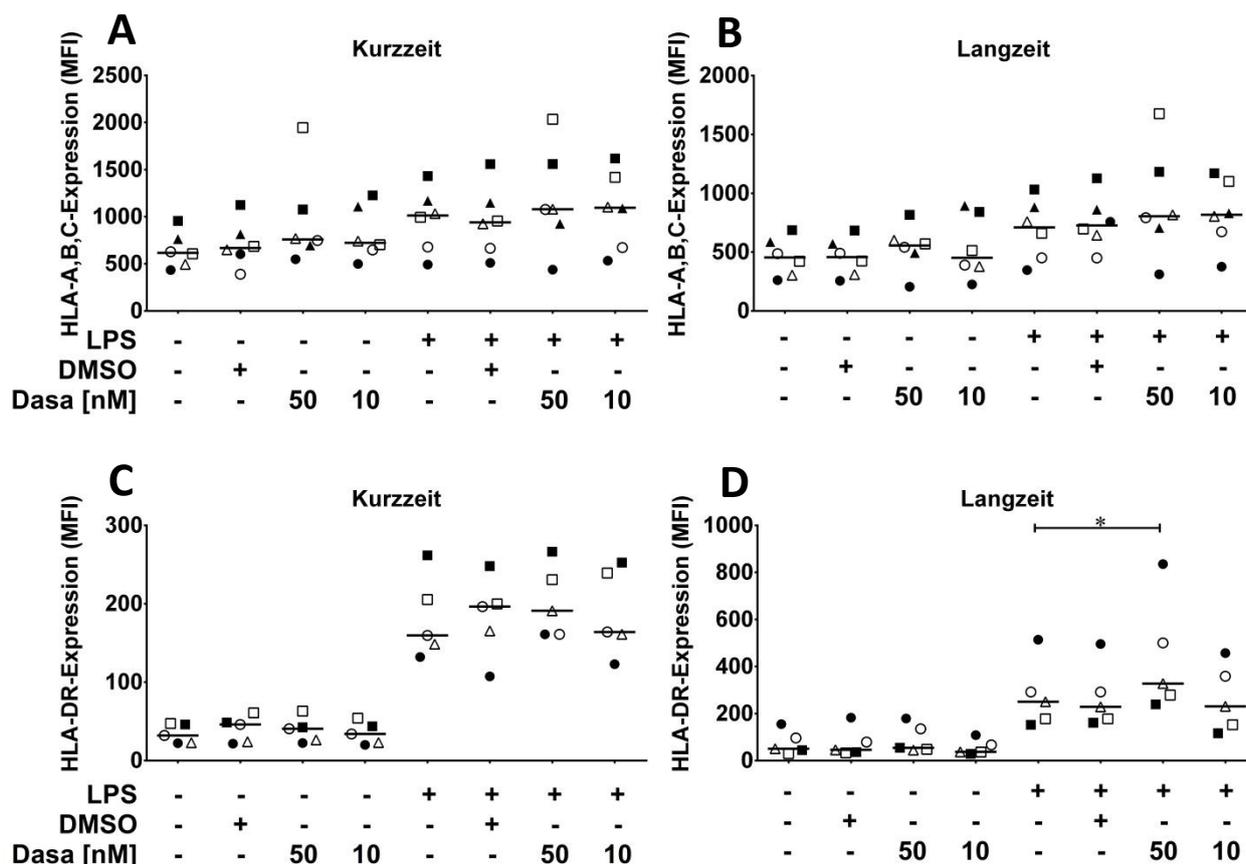


Abbildung 17: Einfluss von Dasatinib auf die Expression von HLA Klasse I- und II-Molekülen. Aus mittels Plastikadhärenz aufgereinigten Monozyten wurden durch Zugabe von IL-4 und GM-CSF moDCs generiert. Die Zellen wurden entweder von Beginn der Generierung an (Langzeit, gesamt 7 Tage) oder 24 Stunden vor LPS-Stimulation (Kurzzzeit, gesamt 48 Stunden) mit Dasatinib in den angegebenen Konzentrationen vorbehandelt. Nach 6 Tagen erfolgte die Ausreifung durch Addition von 1 µg/ml LPS für 24 Stunden. Dargestellt sind die Expressionslevel von HLA-A,B,C (A, B) und HLA-DR (C, D) nach Kurzzzeit- (A, C) und Langzeitbehandlung (B, D) aus je n=5 unabhängigen Versuchen. Balken: Median. Unterschiedliche Symbole kennzeichnen jeweils einen Versuch. *p < 0,05 (Studentsche t-Verteilung). Dasa = Dasatinib, DMSO = Dimethylsulfoxid, LPS = Lipopolysaccharid.

3.B.2. Dasatinib hat keinen Einfluss auf die Apoptose- oder Nekroseraten von moDCs

Bei der Untersuchung des programmierten Zelltods mittels Annexin V/7-AAD-Färbung zeigte sich keinerlei Einfluss von Dasatinib auf die Zahl der (früh) apoptotischen oder spätapoptotischen/nekrotischen moDCs. Auch 50 nM Dasatinib führten weder bei der 48-stündigen Kurzzzeitbehandlung, noch wenn die moDCs ab Beginn der Generierung mit Dasatinib behandelt worden waren zu gesteigerten Apoptoseraten (Abbildung 18 A,B).

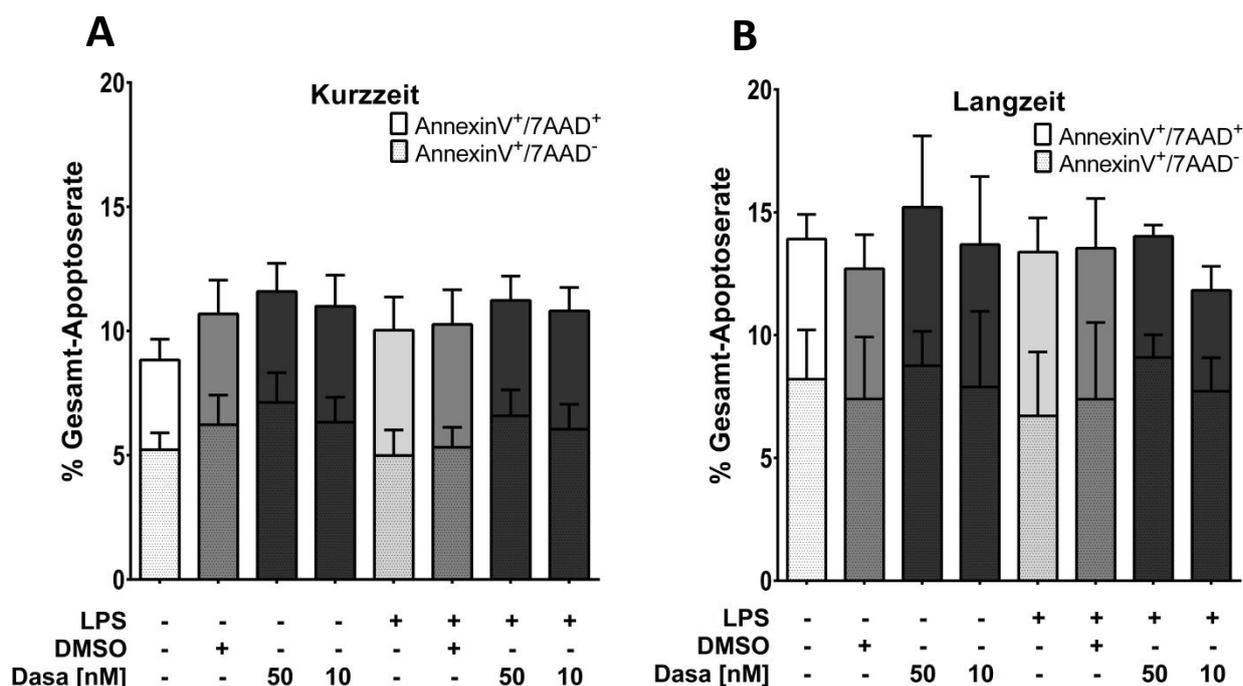


Abbildung 18: Einfluss von Dasatinib auf die Apoptoserate. Aus mittels Plastikadhärenz aufgereinigten Monozyten wurden durch Zugabe von IL-4 und GM-CSF moDCs generiert. Die Zellen wurden entweder von Beginn der Generierung an (Langzeit, gesamt 7 Tage) oder 24 Stunden vor LPS-Stimulation (Kurzzeit, gesamt 48 Stunden) mit Dasatinib in den angegebenen Konzentrationen vorbehandelt. Nach 6 Tagen erfolgte die Ausreifung durch Addition von 1 µg/ml LPS für 24 Stunden. Die Säulen entsprechen den mittleren prozentualen Mengen (Mean) (früh-) apoptotischer (AnnexinV⁺/7AAD⁻) und spät-apoptotischer/nekrotischer Zellen (AnnexinV⁺/7AAD⁺) nach Kurzzeit- (A) und Langzeitbehandlung (B). Gepunktete Säulen zeigen den Prozentsatz an AnnexinV⁺/7AAD⁻, einfarbige Säulen an AnnexinV⁺/7AAD⁺ Zellen an. Balken zeigen den Standardfehler (SEM) an. Es traten keine signifikanten ($p < 0,05$ (Studentsche t-Verteilung)) Unterschiede zwischen den Bedingungen auf. 7-Aminoactinomycin-D, Dasa = Dasatinib, DMSO = Dimethylsulfoxid, LPS = Lipopolysaccharid.

3.B.3. Dasatinib hat keinen Einfluss auf die Aufnahme von FITC-Dextran-Beads

Um zu untersuchen, inwieweit Dasatinib die Aufnahme von Fremdkörpern durch moDCs mittels Phagozytose beeinflusst, wurden FITC-gekoppelte Dextran-Beads (40 kDa) verwendet. Weder eine Kurzzeit- noch eine Langzeit-Vorbehandlung mit Dasatinib veränderte die Fähigkeit zur Aufnahme der Beads (Abbildung 19 A-D).

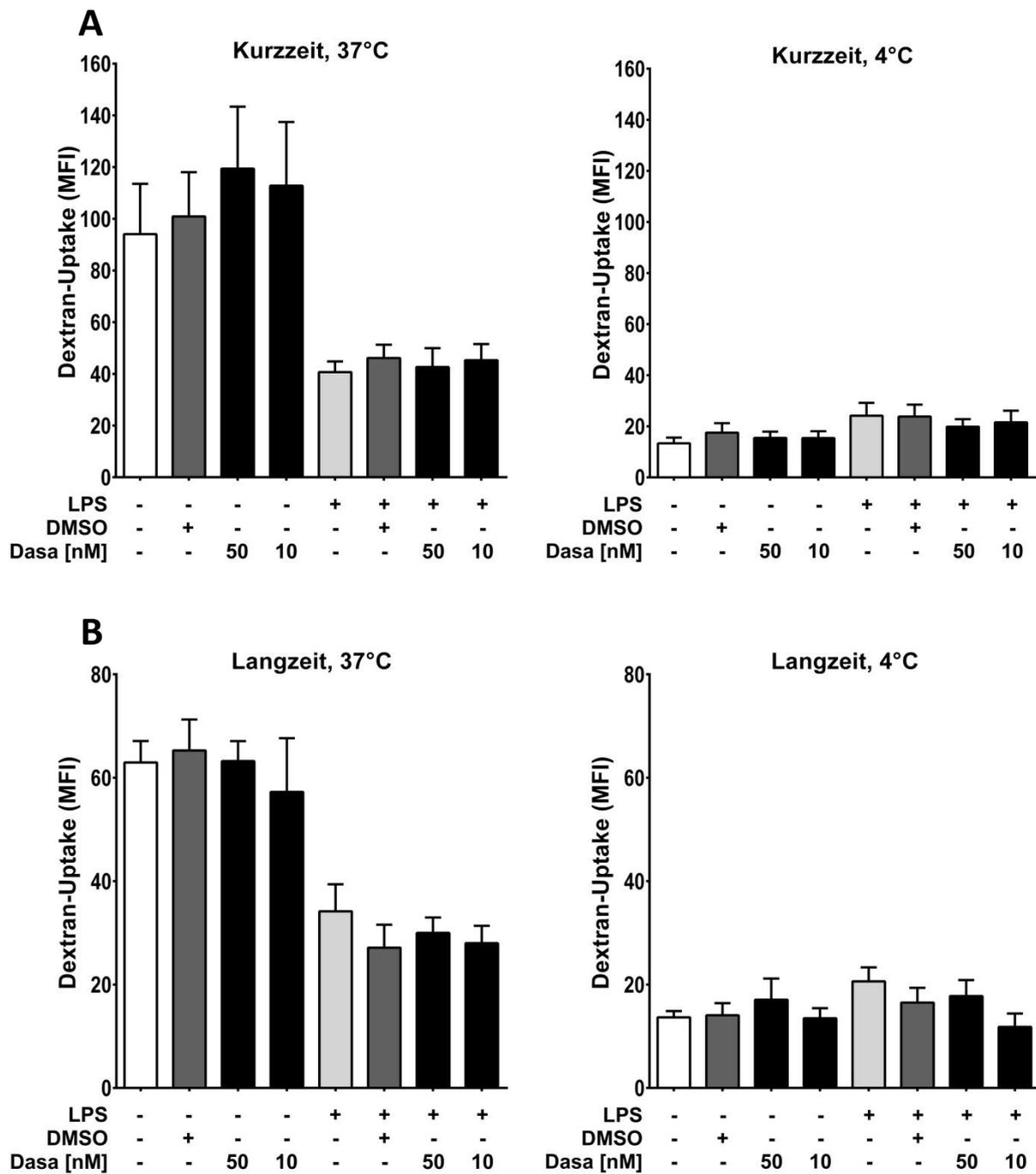


Abbildung 19: Einfluss von Dasatinib auf die Phagozytoserate. Aus mittels Plastikadhärenz aufgereinigten Monozyten wurden durch Zugabe von IL-4 und GM-CSF moDCs generiert. Die Zellen wurden entweder von Beginn der Generierung an (Langzeit, gesamt 7 Tage) oder 24 Stunden vor LPS-Stimulation (Kurzzeit, gesamt 48 Stunden) mit Dasatinib in den angegebenen Konzentrationen vorbehandelt. Nach 6 Tagen erfolgte die Ausreifung durch Addition von 1 µg/ml LPS. 24 Stunden nach LPS-Zugabe wurden die Zellen für eine Stunde mit FITC-Dextran-Beads bei 37 °C inkubiert. Die Säulen entsprechen den mittleren prozentualen Mengen an Zellen, die nach Kurzzeit- (A) und Langzeitbehandlung (B) FITC-Dextran-Beads aufgenommen haben (Mean). Gezeigt sind Ergebnisse von n=5 unabhängigen Versuchen. Balken zeigen den Standardfehler (SEM) an. Als (Negativ-) Kontrolle wurden gleichsam behandelte Zellen während der FITC-Dextran-Assays statt bei 37 °C bei 4 °C inkubiert. Es traten keine signifikanten ($p < 0,05$ (Studentsche t-Verteilung)) Unterschiede zwischen den Bedingungen auf. Dasa = Dasatinib, DMSO = Dimethylsulfoxid, LPS = Lipopolysaccharid.

3.B.4. Der Einfluss von Dasatinib auf die Zytokinsekretion

Da bereits für pDCs beschrieben wurde dass Dasatinib einen hemmenden Einfluss auf die Zytokinsekretion hat [112], wurde die Sekretion von IL-10 und IL-12 untersucht.

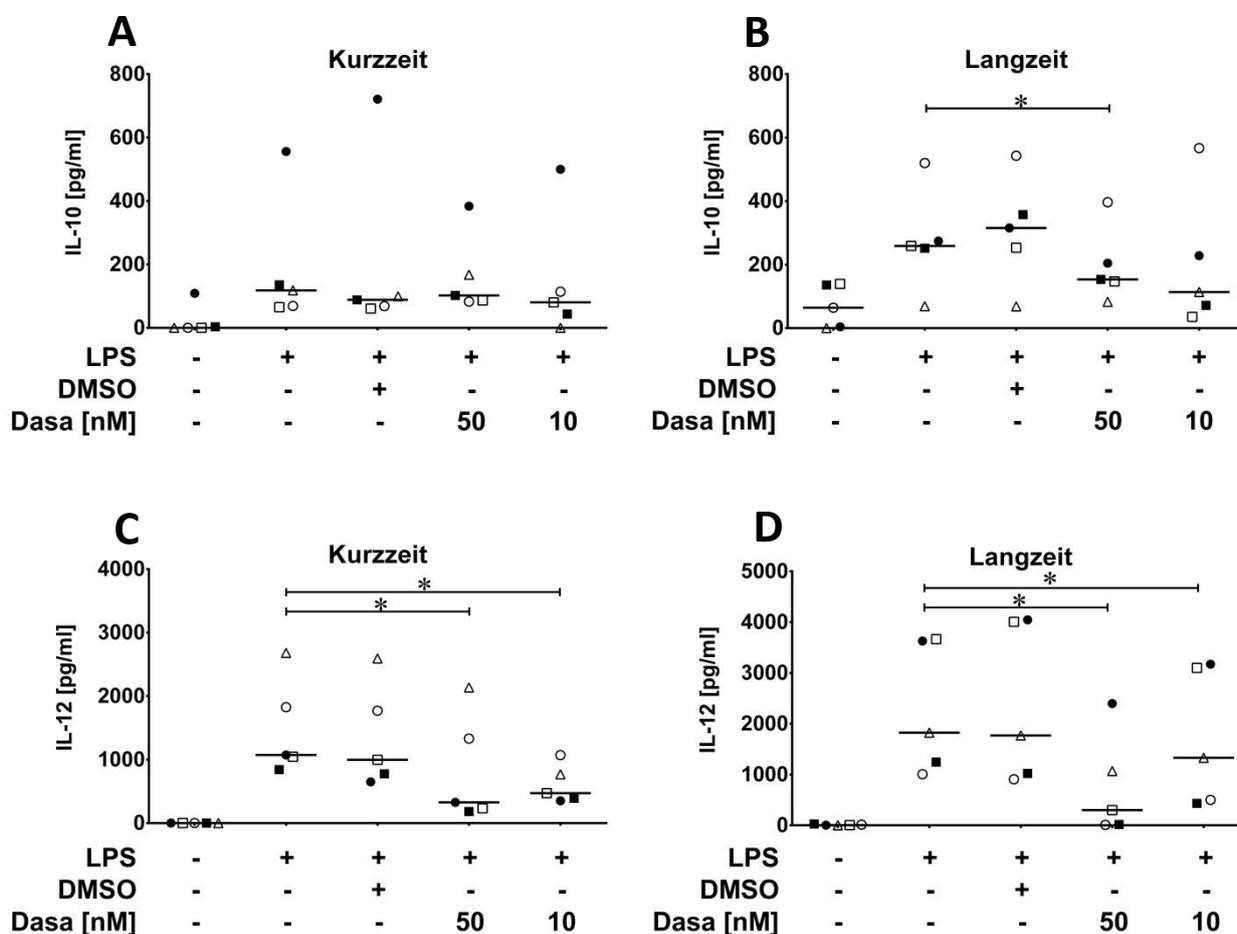


Abbildung 20: Einfluss von Dasatinib auf die Zytokinsekretion. Aus mittels Plastikadhärenz aufgereinigten Monozyten wurden durch Zugabe von IL-4 und GM-CSF moDCs generiert. Die Zellen wurden entweder von Beginn der Generierung an (Langzeit, gesamt 7 Tage) oder 24 Stunden vor LPS-Stimulation (Kurzzeit, gesamt 48 Stunden) mit Dasatinib in den angegebenen Konzentrationen vorbehandelt. Nach 6 Tagen erfolgte die Ausreifung durch Addition von 1 µg/ml LPS für 24 Stunden. Die Messung der Zytokinsekretion erfolgte mit Kulturüberständen im ELISA. Dargestellt sind die sekretierten Mengen von IL-10 (A, B) und IL-12 (C, D) nach Kurzzeit- (A, C) und Langzeitbehandlung (B, D) aus je n=5 unabhängigen Versuchen. Balken: Median. Unterschiedliche Symbole kennzeichnen jeweils einen Versuch. *p <0,05 (Studentsche t-Verteilung). Dasa = Dasatinib, DMSO = Dimethylsulfoxid, LPS = Lipopolysaccharid.

Während eine Kurzzeit-Behandlung mit Dasatinib keinerlei Einfluss auf die Sekretion von IL-10 hatte, führte eine Langzeit-Behandlung mit 50 nM Dasatinib zu einer signifikant verringerten Menge an sekretiertem IL-10 (Abbildung 20 A,B). Im Gegensatz dazu hatten sowohl Langzeit- als auch Kurzzeit-Vorbehandlung mit Dasatinib eine statistisch signifikante und Dosis-abhängig verringerte Reduktion der Sekretion von IL-12 (IL-12p70) zur Folge (Abbildung 20 C,D). Die Reduktion war erwartungsgemäß in der Langzeitbehandlung stärker ausgeprägt als in der Kurzzeitbehandlung. So führten 50 nM Dasatinib in der

Langzeitbehandlung zu einer Verringerung der IL-12-Sekretion um 67%, in der Kurzzeit-Behandlung dagegen nur um 44%.

3.B.5. Eine Vorbehandlung mit Dasatinib hat keinen Einfluss auf die Fähigkeit, CMV-spezifische Antworten in CD8⁺ T-Zellen zu induzieren

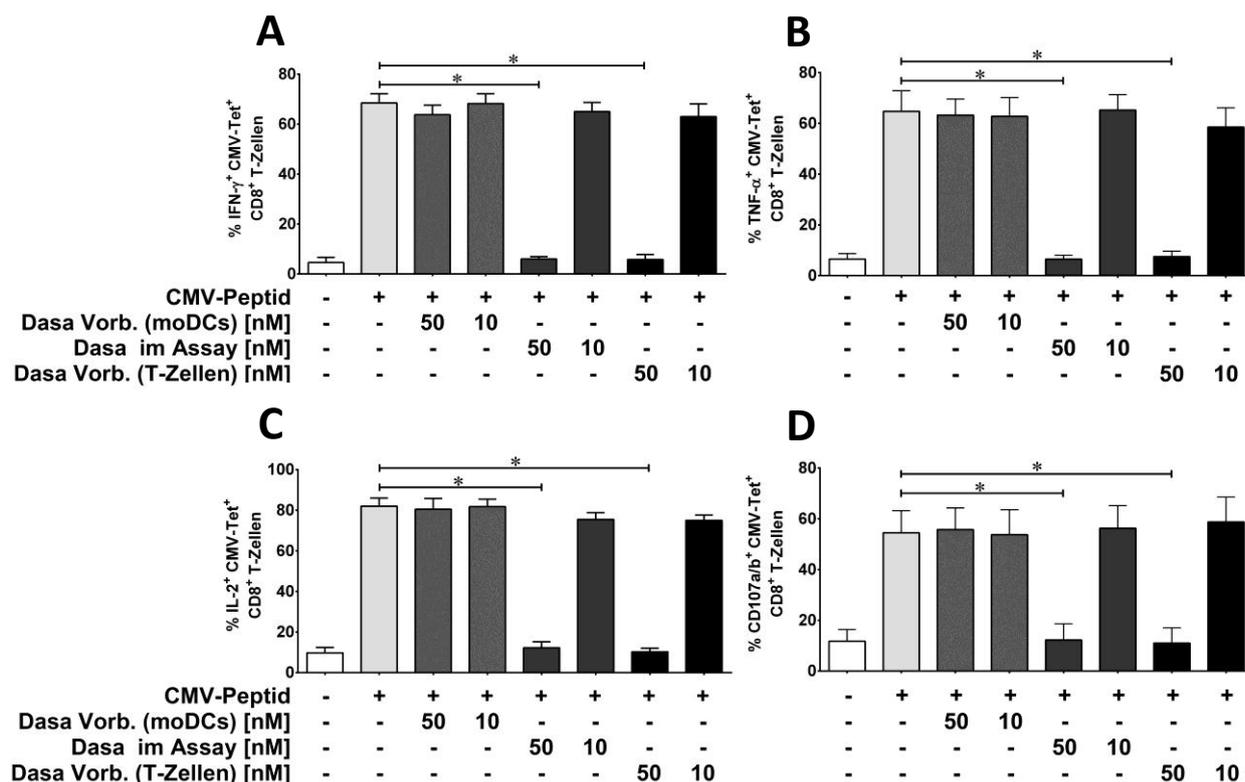


Abbildung 21: Einfluss von Dasatinib auf die Induktion von Virus-spezifischen T-Zell-Antworten. PBMCs CMV-positiver Spender wurden mittels MACS-Sort in CD14⁺ und CD14⁻ Zellen aufgetrennt. Aus den CD14⁺ Monozyten wurden durch Zugabe von IL-4 und GM-CSF moDCs generiert. Nach 6 Tagen erfolgte die Ausreifung durch Addition von 2,5 µg/ml HLA A*201-CMV pp65₄₉₅₋₅₀₃ für 2 Stunden. Im Anschluss wurden T-Zellen und moDCs im Verhältnis 10:1 für 12 Stunden gemeinsam inkubiert, danach erfolgte ein 5-stündiger Zytokinassay. Dasatinib wurde zur Vorbehandlung der moDCs 48 Stunden vor der Co-Kultur oder für eine Vorbehandlung der T-Zellen 1 Stunde vor der Co-Kultur appliziert und jeweils anschließend ausgewaschen, oder dem Assay-Medium während der Co-Kultur zugegeben. Die Säulen entsprechen der mittleren prozentualen Menge (Mean) an IFN-γ (A), TNF-α (B) oder IL-2-produzierenden (C), bzw. CD107a/b exprimierenden CMV-Tet⁺ CD8⁺ T-Zellen (D) aus je n=4 unabhängigen Experimenten. Balken zeigen den Standardfehler (SEM) an. *p < 0,05 (Studentsche t-Verteilung). Dasa = Dasatinib, DMSO = Dimethylsulfoxid, Vorb.=Vorbehandlung.

Da die Induktion von Antigen-spezifischen T-Zell-Antworten wohl die wichtigste Funktion Dendritischer Zellen darstellt, wurde untersucht ob Dasatinib die Fähigkeit Peptid-beladener moDCs die Zytokinproduktion und Degranulation von CMV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen zu induzieren beeinflusst. Eine Vorbehandlung der Dendritischen Zellen für 48 Stunden mit 50 nM Dasatinib führte nicht zu einer signifikanten Änderung der Produktion von IFN-γ, TNF-α und IL-2 oder der Expression der Degranulationsmarker CD107a/b in CMV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen. Im Gegensatz dazu führte das

Vorhandensein von 50 nM Dasatinib im Assaymedium oder eine Vorbehandlung der T-Zellen für eine Stunde zu einer völligen Aufhebung der moDC-induzierten Zytokinproduktion und CD107a/b-Expression in CMV⁺ CD8⁺ T-Zellen. 10 nM Dasatinib zeigten bei keiner Behandlungsart einen messbaren Einfluss auf Zytokinproduktion oder Degranulation (Abbildung 21 A-D). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den unter 3.A.7 dargestellten Resultaten, bei denen gezeigt wurde, dass eine Behandlung mit 50 nM Dasatinib bei Virus-spezifischen CD8⁺ T-Zellen zu einer Aufhebung der Viruspeptid-induzierten Zytokinproduktion und Degranulation führt.

3.B.6. Dasatinib verstärkt die Migration von moDCs *in vitro*

Die Regulation der Migration Dendritischer Zellen aus der Peripherie in die Lymphknoten wird über die Chemokine CCL19 und CCL21 vermittelt und erfordert die Expression des CCL19/CCL21-Rezeptors CCR7 [211-218]. Da diese Migration eine entscheidende Grundvoraussetzung für Präsentation aufgenommener Antigene an T-Zellen darstellt, wurde der Einfluss einer Behandlung mit Dasatinib für verschiedene Zeitspannen auf mit LPS ausgereifte moDCs *in vitro* untersucht.

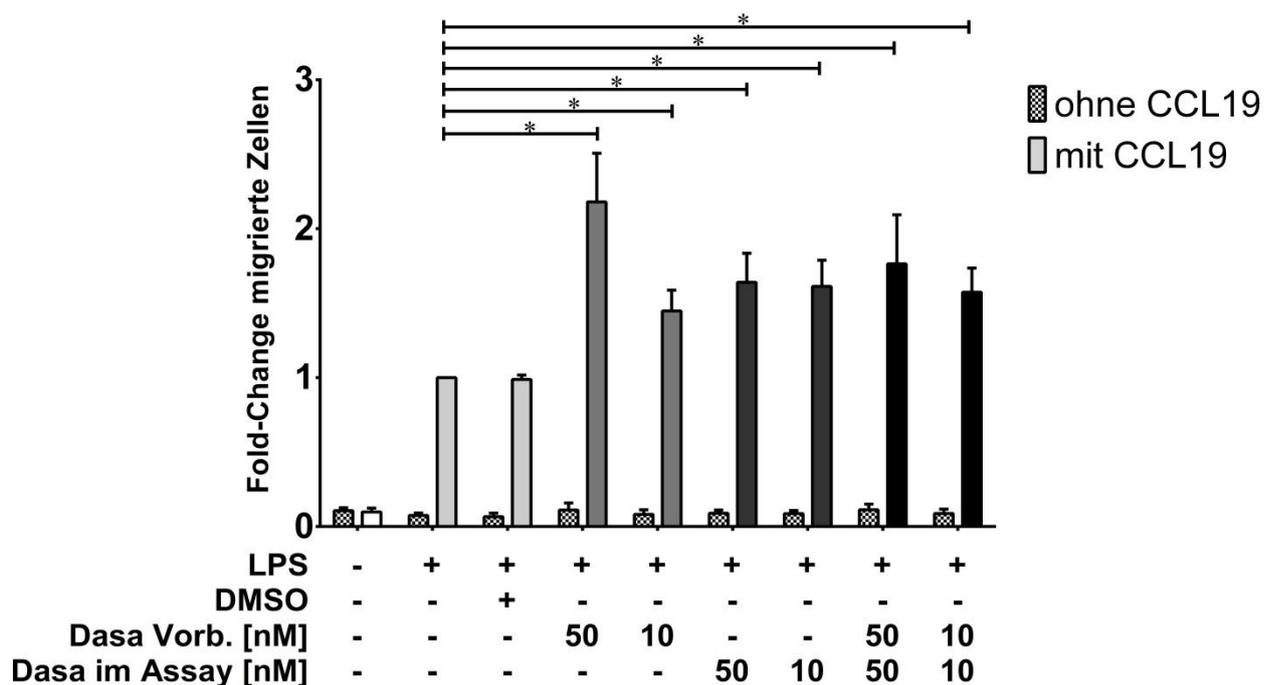


Abbildung 22: Einfluss von Dasatinib auf die Migration von moDCs. Aus mittels Plastikadhärenz aufgereinigten Monozyten wurden durch Zugabe von IL-4 und GM-CSF moDCs generiert. Nach 6 Tagen erfolgte die Ausreifung durch Addition von 1 µg/ml LPS für 24 Stunden. Die Zellen wurden 24 Stunden vor LPS-Stimulation mit Dasatinib vorbehandelt (mit anschließendem Auswaschen nach insgesamt 48 Stunden) oder Dasatinib wurde dem Medium während des dreistündigen Migrationsassays in den angegebenen Konzentrationen zugegeben. Die Säulen zeigen den mittleren Fold-Change (Mean; Fold-Change bezogen auf die Werte der nur mit LPS + CCL19 behandelten Zellen=1) aus fünf unabhängigen Versuchen. Karierte Säulen repräsentieren die Werte ohne Zugabe von CCL19 (Kontrolle). Balken zeigen den Standardfehler (SEM) an. *p <0,05 (Studentsche t-Verteilung). Dasa = Dasatinib, DMSO = Dimethylsulfoxid, LPS = Lipopolysaccharid, Vorb. = Vorbehandlung.

Dasatinib führte in Konzentrationen von 10 und 50 nM sowohl bei einer 48-stündigen Vorbehandlung mit anschließendem Auswaschen, als auch beim Vorhandensein im Assay-Medium während des Migrationsassays und einer Kombination aus beidem zu einer signifikanten Steigerung der Zahl der in Richtung eines CCL19-Gradienten migrierten Zellen. Hierbei kam es durch Dasatinib nicht zu einer generellen Erhöhung der Motilität, da ohne das Vorhandensein eines CCL19-Gradienten keinerlei erhöhte Wanderbewegungen ins untere Transwell-Kompartiment festzustellen waren. Der steigernde Effekt auf die gerichtete Migration war am stärksten ausgeprägt bei einer 48-stündigen Vorbehandlung mit 50 nM Dasatinib, wo die Zahl der migrierten Zellen mehr als verdoppelt wurde (2,18-fache Steigerung). Es ist allerdings festzustellen, dass zwischen den Einflüssen der verschiedenen Dasatinib-Behandlungen keinerlei signifikante Unterschiede auftraten (*Abbildung 22*).

3.B.7. Dasatinib hat keinen Einfluss auf die Expression von CCR7

Die naheliegendste Erklärung für die beobachtete Migrationssteigerung durch Dasatinib in Richtung eines CCL19-Gradienten wäre eine erhöhte Expression des CCL19-Rezeptors CCR7. Dies konnte allerdings, in Einklang mit früheren Beschreibungen [111], ausgeschlossen werden, da Dasatinib die Expression von CCR7 in moDCs unter den oben genannten Bedingungen nicht beeinflusste (*Abbildung 23*).

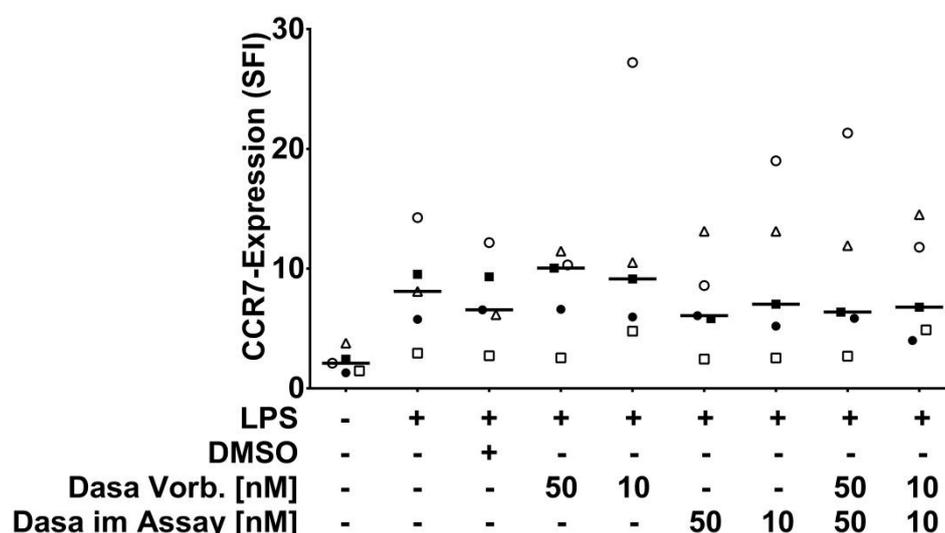


Abbildung 23: Einfluss von Dasatinib auf die Expression von CCR7. Aus mittels Plastikadhärenz aufgereinigten Monozyten wurden durch Zugabe von IL-4 und GM-CSF moDCs generiert. Nach 6 Tagen erfolgte die Ausreifung durch Addition von 1 µg/ml LPS für 24 Stunden. Die Zellen wurden 24 Stunden vor LPS-Stimulation mit Dasatinib vorbehandelt (mit anschließendem Auswaschen nach insgesamt 48 Stunden) oder Dasatinib wurde dem Medium für drei Stunden in den angegebenen Konzentrationen zugegeben. Gezeigt ist die spezifische Fluoreszenzintensität (SFI: MFI von CCR7 geteilt durch MFI der korrespondierenden Isotypenkontrolle) von CCR7 aus je fünf unabhängigen Versuchen. Balken: Median. Unterschiedliche Symbole kennzeichnen jeweils einen Versuch. Es traten keine signifikanten ($p < 0,05$ (Studentsche t-Verteilung)) Unterschiede zwischen den Bedingungen auf. Dasa = Dasatinib, DMSO = Dimethylsulfoxid, LPS = Lipopolysaccharid, Vorb. = Vorbehandlung.

3.B.8. Die Migrationssteigerung durch Dasatinib erfolgt durch Hemmung von SFKs

Auf Grund der Tatsache, dass Kinasen der SRC-Familie zu den Hauptangriffszielen von Dasatinib gehören, liegt es nahe, dass eine Hemmung dieser SFKs durch Dasatinib für den migrationssteigernden Effekt verantwortlich sein könnte. Um diese These zu untermauern wurde der Einfluss zweier weiterer Kinaseinhibitoren auf die Migration von moDCs untersucht. Dies waren zum einen Nilotinib, ein BCR-ABL-Inhibitor der keine Wirkung auf SRC-Kinasen ausübt [264], zum anderen ein spezifischer SFK-Inhibitor, SKI-1 (SRC kinase inhibitor 1) [265, 266].

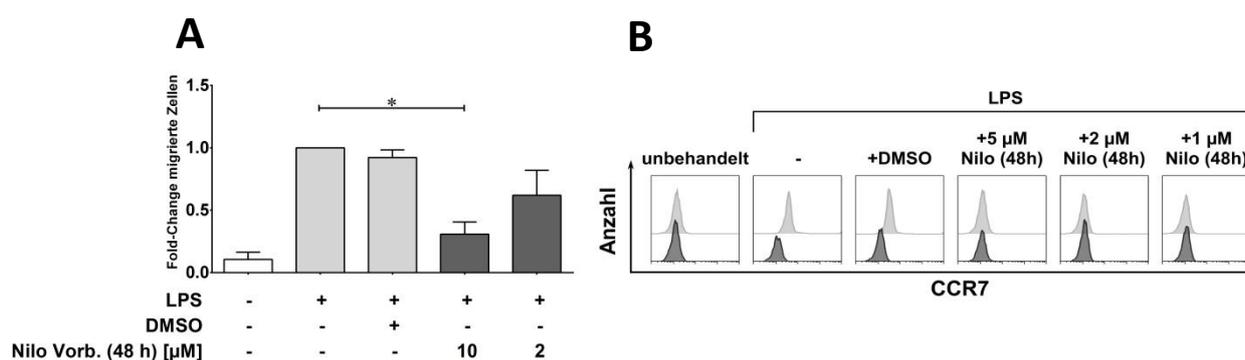


Abbildung 24: Einfluss von Nilotinib auf Migration und CCR7-Expression. Aus mittels Plastikadhärenz aufgereinigten Monozyten wurden durch Zugabe von IL-4 und GM-CSF moDCs generiert. Nach 6 Tagen erfolgte die Ausreifung durch Addition von 1 µg/ml LPS für 24 Stunden. Die Zellen wurden 24 Stunden vor LPS-Stimulation mit Nilotinib in den angegebenen Konzentrationen vorbehandelt und vor den funktionellen Untersuchungen ausgewaschen. **(A)** Einfluss auf die Migration. Die Säulen zeigen den mittleren Fold-Change (Mean; Fold-Change bezogen auf die Werte der nur mit LPS + CCL19 behandelten Zellen=1) aus fünf unabhängigen Versuchen. Gezeigt sind nur Ergebnisse von Versuchen unter Zusatz von CCL19. Balken zeigen den Standardfehler (SEM) an. *p < 0,05 (Studentsche t-Verteilung). **(B)** Repräsentatives Beispiel für den Einfluss von Nilotinib auf die CCR7-Expression. Hellgraue Peaks (oben): spezifischer CCR7-Antikörper, dunkelgraue Peaks (unten): korrespondierender Isotyp. DMSO = Dimethylsulfoxid, LPS = Lipopolysaccharid, Nilo = Nilotinib, Vorb. = Vorbehandlung.

Im Gegensatz zu Dasatinib führte eine 48-stündige Vorbehandlung mit Nilotinib Dosis-abhängig zu einer signifikant verringerten Zahl an migrierten Zellen (*Abbildung 24 A*) und verhinderte darüber hinaus sehr potent eine LPS-induzierte Hochregulation von CCR7 (*Abbildung 24 B*).

Dagegen führte eine 48-stündige Vorbehandlung mit dem spezifischen SFK-Inhibitor SKI-1 zu einer Migrationssteigerung, die mit der durch Dasatinib verursachten vergleichbar war (*Abbildung 25 A*). Ebenso waren Dasatinib und SKI-1 gleichartig effizient in der Hemmung der Phosphorylierung von SFKs am aktiven Tyrosinrests Y416 nach einstündiger Vorbehandlung (*Abbildung 25 B*).

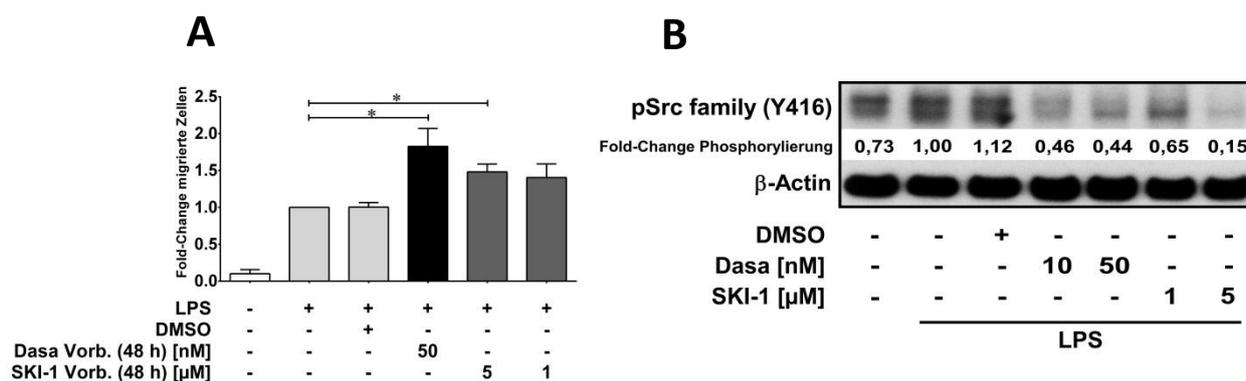


Abbildung 25: Einfluss des spezifischen SRC-Inhibitors SKI-1 auf Migration und Phosphorylierung von SFKs. (A) Einfluss auf die Migration. Aus mittels Plastikadhärenz aufgereinigten Monozyten wurden durch Zugabe von IL-4 und GM-CSF moDCs generiert. Nach 6 Tagen erfolgte die Ausreifung durch Addition von 1 µg/ml LPS für 24 Stunden. Die Zellen wurden 24 Stunden vor LPS-Stimulation mit Dasatinib oder SKI-1 in den angegebenen Konzentrationen vorbehandelt und nach 48 Stunden vor den funktionellen Untersuchungen ausgewaschen. Säulen zeigen den mittleren Fold-Change (Mean; Fold-Change bezogen auf die Werte der nur mit LPS + CCL19 behandelten Zellen=1) aus n=3 unabhängigen Versuchen. Gezeigt sind nur Ergebnisse von Versuchen unter Zusatz von CCL19. Balken zeigen den Standardfehler (SEM) an. *p <0,05 (Studentsche t-Verteilung). (B) Repräsentatives Beispiel (von n=3) für den Einfluss von SKI-1 und Dasatinib auf die Phosphorylierung der aktivierenden Tyrosinreste von SFKs. Unreife moDCs wurden für eine Stunde mit SKI-1 oder Dasatinib vorbehandelt und anschließend für 10 Minuten mit 1 µg/ml LPS stimuliert. Anschließend erfolgten die Zell-Lyse und Auswertung im Western Blot. Die angegebenen Werte (Fold-Change) zeigen den Grad der Phosphorylierung bezogen auf die LPS-behandelten Zellen (gleich 1 gesetzt). Dasa = Dasatinib, DMSO = Dimethylsulfoxid, LPS = Lipopolysaccharid, SKI-1 = SRC kinase inhibitor 1, Vorb. = Vorbehandlung.

3.B.9. Dasatinib behindert die Phosphorylierung der inhibitorischen Immunrezeptoren Siglec-3 und

Siglec-9

Um zu verstehen, welche Mechanismen der SFK-induzierten Steigerung des Migrationsverhaltens durch Dasatinib zu Grunde liegen, wurden die Phosphorylierungsstadi von 59 ITAM- und ITIM-haltigen Immunrezeptoren mittels eines Array-Kits analysiert. In Mäusen ist bereits gezeigt worden, dass der inhibitorische Rezeptor PIRB, dessen humanes Homolog CD85a darstellt, die Migration negativ beeinflusst. Knockouts der SFKs Hck und Fgr führten im murinen System zu einer verminderten Phosphorylierung von PIRB und einer erhöhten Migration muriner moDCs sowohl *in vitro* als auch *in vivo* [267]. Auf Grund dieses Berichts lag nahe, dass eine Behandlung mit Dasatinib zu einer verringerten Phosphorylierung des PIRB-Homologes CD85a führen würde. Wider Erwarten führte eine 48-stündige Vorbehandlung mit 50 nM Dasatinib vor einem zweiminütigen Pulsen mit CCL19 [268] in mit LPS ausgereiften moDCs zu keiner konsistenten Beeinflussung des Phosphorylierungsstatus von CD85a (Abbildung 26 A). Während auch die Phosphorylierungsstadi der restlichen 56 im Kit enthaltenen Immunrezeptoren durch eine Dasatinib-Behandlung nicht konsistent beeinflusst wurden, führte Dasatinib zu einer kompletten Dephosphorylierung von Siglec-3 (CD33) und Siglec-9 (Abbildung 26 A). Im

Gegensatz zum Einfluss auf die Phosphorylierung zeigte Dasatinib keinerlei Effekt auf die Expressionslevel von Siglec-3 (Abbildung 26 B) und Siglec-9 (Abbildung 26 C).

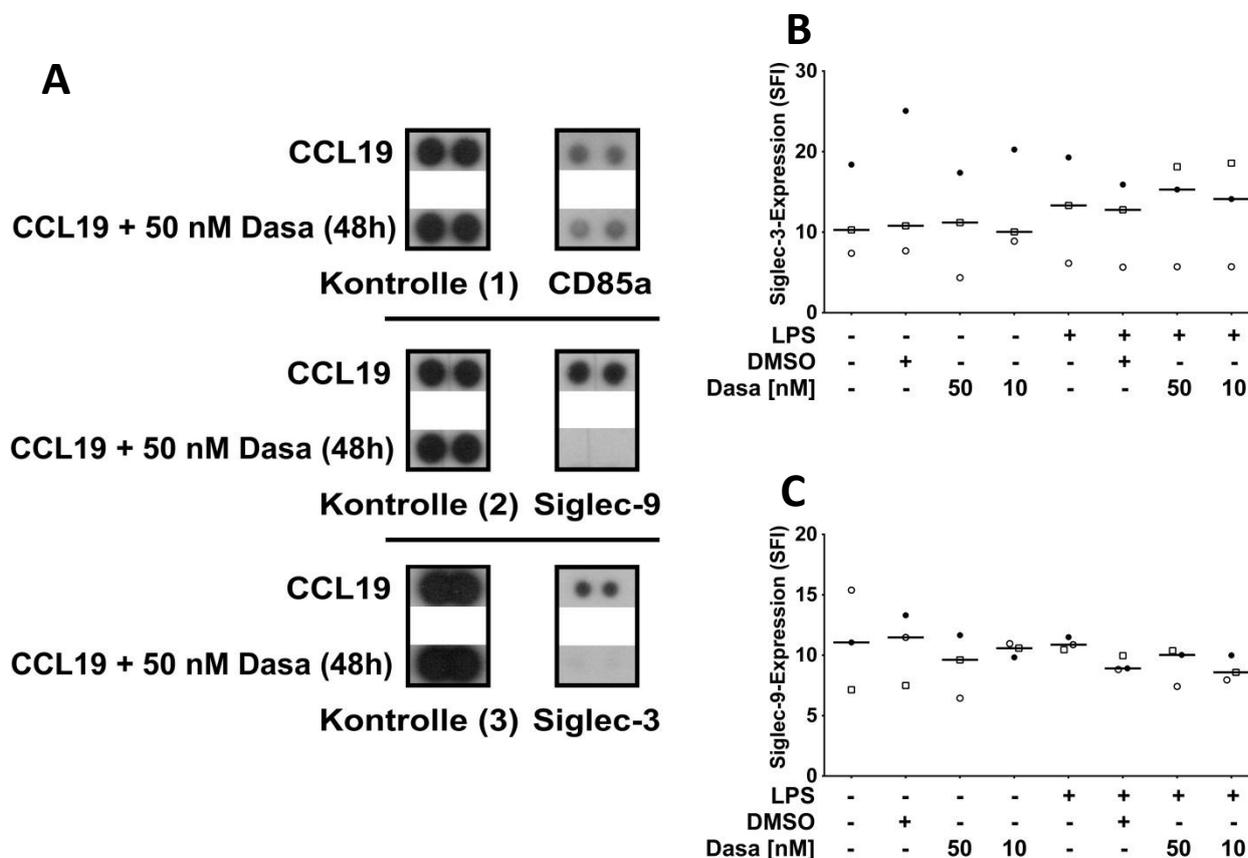


Abbildung 26: Einfluss von Dasatinib auf die Phosphorylierung und Expression von Siglec-9 und Siglec-3. Aus mittels Plastikadhärenz aufgereinigten Monozyten wurden durch Zugabe von IL-4 und GM-CSF moDCs generiert. Nach 6 Tagen erfolgte die Ausreifung durch Addition von 1 µg/ml LPS für 24 Stunden. Den Zellen wurde 24 Stunden vor LPS-Stimulation Dasatinib in den angegebenen Konzentrationen zugegeben. **(A)** Einfluss auf die Phosphorylierung verschiedener Immunrezeptoren. 24 Stunden nach LPS-Zugabe wurden die Zellen für 2 Minuten mit 250 ng/ml CCL19 gepulst und anschließend lysiert. Die Analyse der Phosphorylierungsstati von 59 Immunrezeptoren erfolgte mittels des Proteome Profiler™ Human Phospho-Immuneceptor Array Kits (R&D Systems). Exemplarisch dargestellt (von n=2) ist die durch Dasatinib verursachte Veränderung der Phosphorylierungsstati von CD85a, Siglec-3 (CD33) und Siglec-9. **(B-C)** Einfluss auf die Expressionslevel von Siglec-3 (CD33) und Siglec-9. 24 Stunden nach LPS-Stimulation wurden die Zellen auf die Expression von Siglec-3 **(B)** und Siglec-9 **(C)** gefärbt. Gezeigt ist die spezifische Fluoreszenzintensität (SFI: MFI des spezifischen Antikörpers geteilt durch MFI der korrespondierenden Isotypenkontrolle) aus je drei unabhängigen Versuchen. Balken: Median. Unterschiedliche Symbole kennzeichnen jeweils einen Versuch. Dasa = Dasatinib, DMSO = Dimethylsulfoxid, LPS = Lipopolysaccharid, Vorb. = Vorbehandlung.

3.B.10. Blockierung von Siglec-9 oder Siglec-3 führt zu einer Steigerung der Migration von moDCs

Beide dieser inhibitorischen Immunrezeptoren weisen ITIM-Domänen auf und könnten für die beobachteten Migrations-fördernden Effekte verantwortlich sein, da ihre Phosphorylierung, die höchstwahrscheinlich durch SFKs erfolgt [269], durch Dasatinib behindert wird. Diese Hypothese wird unterstützt durch die Beobachtung, dass eine Blockierung von Siglec-2 mit spezifischen monoklonalen

Antikörpern die Migration von CD27⁺ B-Zellen gegen CXCL12 *in vitro* verstärkt [270]. Da die Expression von Siglec-2 größtenteils auf B-Zellen beschränkt ist und Siglec-2 nur in geringen Mengen von Monozyten exprimiert wird [271], ist es wahrscheinlich, dass andere inhibitorische Mitglieder der Siglec-Familie in einer ähnlichen Weise in moDCs wirken.

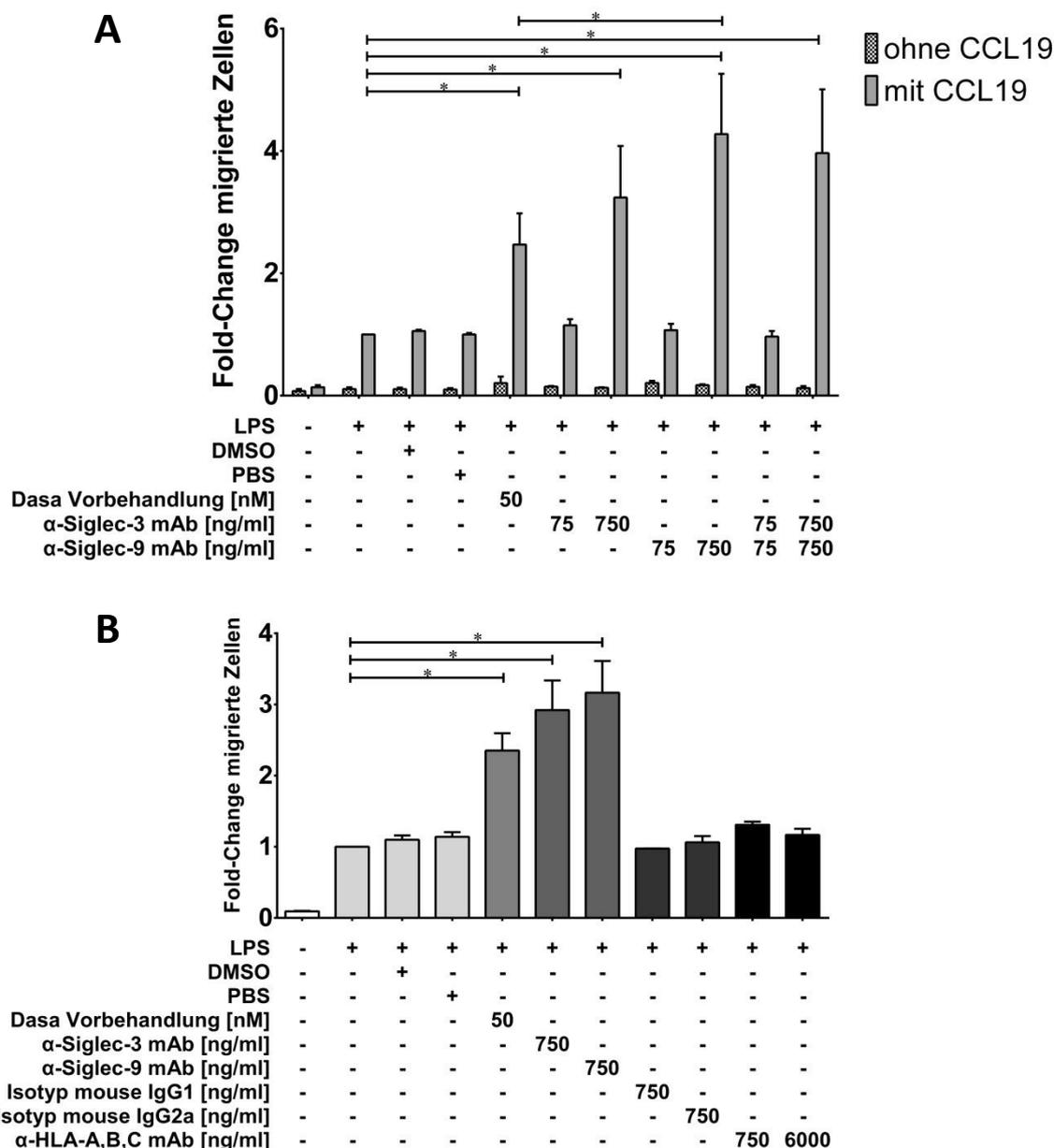


Abbildung 27: Einfluss blockierender α -Siglec-3 und α -Siglec-9-Antikörper auf die Migration von moDCs. Aus mittels Plastikadhärenz aufgereinigten Monozyten wurden durch Zugabe von IL-4 und GM-CSF moDCs generiert. Nach 6 Tagen erfolgte die Ausreifung durch Addition von 1 μ g/ml LPS für 24 Stunden. Die Zellen wurden entweder 24 Stunden vor LPS-Stimulation mit Dasatinib vorbehandelt oder spezifische blockierende Antikörper gegen Siglec-3 und Siglec-9 wurden zeitgleich mit LPS in den angegebenen Konzentrationen zugegeben. Vor den Migrationsassays wurden die Zellen gewaschen. **(A)** Die Säulen zeigen den mittleren Fold-Change (Mean; Fold-Change bezogen auf die Werte der nur mit LPS + CCL19 behandelten Zellen=1) aus n=6 unabhängigen Versuchen. Die karierten Säulen repräsentieren die Werte ohne Zugabe von CCL19 (Kontrolle). Balken zeigen den Standardfehler (SEM) an. **(B)** wie **(A)**, zeitgleich mit LPS wurden die mit den Siglec-Antikörpern korrespondierenden Isotypenkontrollen bzw. ein Klasse I-MHC-Antikörper in den angegebenen Konzentrationen zugegeben. Gezeigt sind nur Ergebnisse von Versuchen unter Zusatz von CCL19. *p < 0,05 (Studentsche t-Verteilung). Dasa = Dasatinib, DMSO = Dimethylsulfoxid, LPS = Lipopolysaccharid, PBS = Phosphate Buffered Saline.

Tatsächlich führte eine spezifische Blockierung von Siglec-9 und/oder Siglec-3 zu einer signifikanten Steigerung der Zahl in Richtung eines CCL19-Gradienten migrierten moDCs. Nach einer Titration beider blockierender Antikörper von 15 bis 3.000 ng/ml wurden 750 ng/ml in beiden Fällen als sättigende Konzentration ermittelt um die Rezeptoren spezifisch zu blockieren ($n=2$, *Daten nicht gezeigt*).

Die bei der gewählten Konzentration von 750 ng/ml α -Siglec-9 auftretende Verstärkung der Migration war sogar signifikant größer als die durch 50 nM Dasatinib verursachte (Dasatinib: 2,47-fache Steigerung, 750 ng/ml α -Siglec-9: 4,27-fache Steigerung). 750 ng/ml α -Siglec-3 führten zwar ebenfalls zu einer Steigerung der Migration die stärker war als die durch Dasatinib vermittelte (α -Siglec-3: 3,24-fache Steigerung), allerdings unterschieden sich beide Werte nicht signifikant.

Eine Kombination von je 750 ng/ml α -Siglec-3 und α -Siglec-9 führte zu keiner weiteren Steigerung der Zahl der migrierten Zellen, was nahelegt, dass die Signaltransduktion beider Rezeptoren über denselben Signalweg erfolgt. Die steigernden Effekte der beiden blockierenden Antikörper war abermals nicht auf eine gesteigerte ungerichtete Motilität, sondern auf eine Steigerung der gerichteten Migration zurückzuführen, da ohne das Vorhandensein von CCL19 keine verstärkte Zellwanderung auftrat (*Abbildung 27 A*).

Um auszuschließen, dass nichtspezifische Effekte durch eine Antikörperbindung *per se* für die Effekte auf die Migration verantwortlich sind, wurden α -Siglec-9- und α -Siglec-3-Antikörper mit ihren korrespondierenden Isotypen und einem MHC Klasse I-Antikörper hinsichtlich des Einflusses auf die Migration verglichen. Im Gegensatz zu Dasatinib und den blockierenden α -Siglec-Antikörpern zeigten weder einer der beiden Isotypen noch ein α -HLA-A,B,C-Antikörper einen messbaren Einfluss auf die Migration von moDCs im Transwell-System (*Abbildung 27 B*).

3.B.11. Blockierung von Siglec-9 mit einem spezifischen blockierenden Antikörper führt zu einer Dephosphorylierung von Siglec-9, Siglec-3 und SHP-2

Um zu beweisen, dass eine Bindung der blockierenden Antikörper an die Siglec-Moleküle tatsächlich zu deren Dephosphorylierung führt, wurde der Einfluss des α -Siglec-9-Antikörpers auf die Immunrezeptor-Phosphorylierung im Phospho-Immunrezeptor Array Kit untersucht. Hier kam es zu einer starken Dephosphorylierung von Siglec-9 und auch Siglec-3, was eine Interaktion der beiden Rezeptoren nahelegt. Neben der Beeinflussung der Siglec-Phosphorylierung führte die α -Siglec-9-Antikörperbindung darüber hinaus zu einer Dephosphorylierung von SHP-2. Die Phosphorylierungsstadien der weiteren 56 im Array Kit enthaltenen Rezeptoren wurden nicht beeinflusst (*Abbildung 28*).

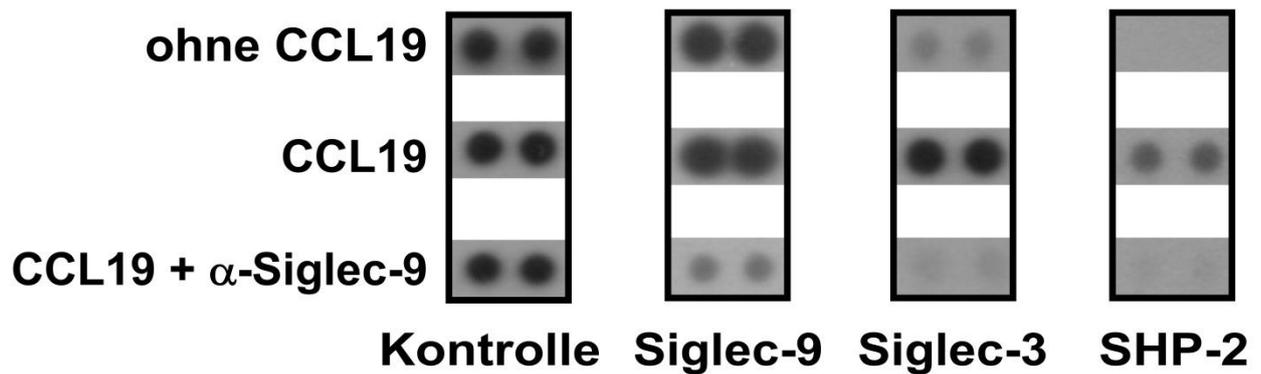


Abbildung 28: Einfluss des blockierenden α -Siglec-9-Antikörpers auf die Phosphorylierung von Siglec-9, Siglec-3 und SHP-2. Aus mittels Plastikadhärenz aufgereinigten Monozyten wurden durch Zugabe von IL-4 und GM-CSF moDCs generiert. Nach 6 Tagen erfolgte die Ausreifung durch Addition von 1 μ g/ml LPS für 24 Stunden. Die Zellen wurden zeitgleich mit der LPS-Stimulation mit 750 ng/ml blockierendem α -Siglec-9-Antikörper behandelt. 24 Stunden nach LPS-Zugabe wurden die Zellen für 2 Minuten mit 250 ng/ml CCL19 gepulst und anschließend lysiert. Die Analyse der Phosphorylierungsstadi von 59 Immunrezeptoren erfolgte mittels des Proteome Profiler™ Human Phospho-Immuneceptor Array Kits (R&D Systems). Exemplarisch dargestellt (von n=2) ist die durch α -Siglec-9 verursachte Veränderung der Phosphorylierungsstadi von Siglec-3 (CD33), Siglec-9 und SHP-2.

Es wird angenommen, dass die Phosphatase SHP-2 an phosphorylierte ITIM-Domänen der Siglec-Rezeptoren rekrutiert wird und nach Bindung weiter downstream gelegene Targets dephosphoryliert [272-274]. Daher könnte SHP-2 eine wichtige Schaltstelle in der Modulation der Migration durch Siglec-9 und Siglec-3 darstellen. Ein Modell der potentiellen Interaktion ist im Diskussionsteil zu finden (siehe 4.B., *Abbildung 29*).

4. Diskussion

4.A. Synergistische Effekte von Dasatinib und Dexamethason in T-Zellen

Noch immer sind schwerwiegende Immunreaktionen gegen Haut, Gastrointestinaltrakt und Leber durch *Graft-versus-host Disease* (GvHD) und aus der Depletion von T-Zellen resultierende infektiöse Komplikationen die Hauptgründe für schwere Erkrankungen und eine erhöhte Sterblichkeit nach allogener Hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSCT) zur Leukämitherapie [229-232]. Zur Standardbehandlung werden auch weiterhin Glucocorticoide eingesetzt, die aber neben der bezweckten Hemmung der GvHD-Effekte leider auch zu einer Unterdrückung von erstrebenswerten Antitumor- oder *Graft-versus-leukemia* (GvL)-Effekten führen. Darüber hinaus begünstigen sie durch ihre stark immunsuppressive Wirkung schwerwiegende Folgeinfektionen wie durch *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis* oder das Varizella-Zoster-Virus [275-277]. Da GvHD- und GvL-vermittelnde T-Zellen sich im Hinblick auf ihre Expansionsraten und ihre Aktivierungsbedingungen unterscheiden [233-235], ist es denkbar, dass Tyrosinkinaseinhibitoren wie Dasatinib, ohne die wünschenswerten GvL-Effekte zu beeinträchtigen, durch ihre immunmodulatorische Wirkung GvHD-Effekte minimieren könnten. Diese Hypothese wird durch klinische Beobachtungen untermauert, die zeigen dass die Tyrosinkinaseinhibitoren Imatinib und Dasatinib in der Lage sind eine GvHD zu hemmen [236-238], und dass Dasatinib GvL-Reaktionen nicht beeinträchtigt [239].

Vor dem Hintergrund, dass durch den Einsatz der Kombination niedrigere Dosen der Einzelsubstanzen verwendet werden könnten, wurden im ersten Teil dieser Arbeit mögliche kombinatorische Effekte des Glucocorticoids Dexamethason und des Tyrosinkinaseinhibitors Dasatinib auf Effektorfunktionen von T-Zellen untersucht. Hierbei zeigten sich synergistische Effekte auf die T-Zell-Proliferation, nicht aber auf Merkmale der T-Zell-Aktivierung wie die Expression von CD69 oder die Sekretion von IL-2.

Die Diskrepanz zwischen den Effekten von Dexamethason auf zwei verschiedene Kennzeichen der T-Zell-Aktivierung, nämlich der inhibitorischen Wirkung auf die IL-2-Sekretion (3.A.1., *Abbildung 6*) zum einen und der bereits gezeigten [254] Nicht-Beeinflussung der Expression von CD69 (3.A.1., *Abbildung 4*) zum anderen, beruht höchstwahrscheinlich auf einer Interaktion von Dexamethason mit AP-1, einem Transkriptionsfaktor der essentiell für die Transkription von IL-2, nicht aber für eine Hochregulation von CD69 ist [278-281]. Dasatinib führte wie zu erwarten war [90] in beiden Fällen zu einer deutlichen Hemmung und wie bereits erwähnt traten keine kombinatorischen Effekte auf. Wurde Dasatinib nicht zur Vorbehandlung eingesetzt, sondern in bereits stimulierten Zellen eingesetzt, so hatte es wie auch Dexamethason keinen Einfluss auf die Expression von CD69 (3.A.1., *Abbildung 5*). Dies lässt darauf schließen, dass der hemmende Einfluss von Dasatinib auf die Expression von CD69 hauptsächlich über eine Inhibierung des im T-Zell-Signaling weit upstream gelegenen LCK vermittelt wird.

Bei der Untersuchung des Einflusses auf die Phosphorylierungsstadien der SFK LCK und der downstream gelegenen Substrate ZAP70 und ERK1/2 traten ebenfalls keine kombinatorischen Effekte zwischen Dasatinib und Dexamethason auf (3.A.2., *Abbildung 7*). Die Aussagen, die in der Literatur über einen Einfluss von Glucocorticoiden auf die Phosphorylierung von Kinasen der SRC-Familie gemacht werden, sind kontrovers und oft widersprüchlich [140, 256, 282, 283], wenngleich in dieser Arbeit Dexamethason alleine, im Gegensatz zu der zu erwartenden Hemmung der Phosphorylierung durch Dasatinib [89, 92, 95], durchgehend keinerlei Beeinflussung der SFK-Phosphorylierung zeigte.

Sowohl Dexamethason als auch Dasatinib führten alleine zu einer Hemmung der T-Zell-Proliferation, wodurch frühere Berichte bestätigt wurden [89-91, 93-95, 257, 261]. Hierbei verhielten sich CD8⁺ T-Zellen gegen die beiden Einzelsubstanzen weit weniger sensitiv als CD4⁺ T-Zellen. In der Kombination hemmten Dexamethason und Dasatinib die T-Zell-Proliferation additiv und auch in CD8⁺-T-Zell sehr effizient (3.A.3., *Abbildung 8*). Diese Hemmung der Proliferation resultierte nicht aus einer durch die Medikamente verringerten Zellviabilität, da sowohl Dasatinib als auch Dexamethason zu signifikant niedrigeren Apoptoseraten führten (3.A.4., *Abbildung 9*).

Neben dieser unterschiedlich starken Beeinflussung der Proliferation von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen unterschieden sich auch die Effekte der Medikamente auf naive T-Zellen und Gedächtnis-T-Zell-Subsets. Während beide Einzelsubstanzen eine deutliche und Dosis-abhängige Hemmung der Proliferation sowohl in naiven CD4⁺ T-Zellen als auch in naiven CD8⁺ T-Zellen verursachten, wurden CD4⁺ und CD8⁺ Memory-Subsets unterschiedlich stark beeinflusst. Obgleich die Wirkung auf CD4⁺ Memory Subsets deutlich schwächer ausgeprägt war als auf naive T-Zellen, erfolgte durch beide Medikamente alleine bereits eine signifikante Hemmung der Proliferation. Dagegen wurde die Proliferation von CD8⁺ Memory-Subsets weder durch Dasatinib noch durch Dexamethason alleine nennenswert gehemmt. Erst eine Kombination aus beiden Substanzen führte in diesen Subsets zu einer deutlichen Hemmung der Proliferation, wobei ein synergistisches Zusammenwirken von Dexamethason und Dasatinib zu beobachten war. In den CD4⁺ Memory-Subsets, in denen schon beide Einzelsubstanzen alleine wirksam waren, zeigten sich dagegen höchstens additive Effekte (3.A.5., *Abbildung 10, Abbildung 11*).

Die beobachtete höhere Empfindlichkeit von naiven T-Zellen gegen die beiden Einzelsubstanzen deckt sich mit den bereits publizierten Beobachtungen, dass Dexamethason die Proliferation von naiven murinen CD4⁺ T-Zellen stark hemmt [258], und dass Dasatinib im humanen System stärker proliferationshemmend auf naive als auf Memory-T-Zellen wirkt [90]. Auch die größere Empfindlichkeit von CD4⁺ Memory- gegenüber CD8⁺ T-Zell-Memory-Subsets deckt sich mit früheren Beobachtungen [90]. Die Unterschiede zwischen naiven T-Zellen und den Memory Subsets kann durch die Beobachtung erklärt werden, dass murine CD8⁺ Memory-T-Zellen selbst dann in der Lage sind ihre Effektorfunktionen auszuüben, wenn die Expression von LCK durch ein Tet-On-System unterbunden wird [284]. Des Weiteren ist die Tatsache, dass Dexamethason und Dasatinib in CD8⁺ T-Zell-Memory-Subsets

synergistisch zusammenwirken, ein Hinweis darauf dass die Hauptwirkung von Dexamethason nicht durch schnell ablaufende, über SFKs vermittelte Effekte erfolgt, sondern über den klassischen Glucocorticoid-Rezeptorweg (vgl. 1.4.). Würde Dexamethason über SFK-vermittelte Effekte auf die Proliferation einwirken, so wäre auf Grund der Tatsache, dass in diesem Fall beide Medikamente ihre Wirkung über die Inhibierung von SRC-Kinasen vermitteln, eher mit additiven Effekten zu rechnen.

Für einen möglichen klinischen Einsatz der Kombination aus Dexamethason und Dasatinib spricht zunächst einmal der stark proliferationshemmende Einfluss der Kombination auf CD8⁺ Memory-Subsets während die Behandlung mit nur einem der beiden Medikamente wenig effizient war. Daher dürften so, deutlich stärker als mit den Einzelsubstanzen, auch CD8⁺ Central Memory T-Zellen gehemmt werden, von denen berichtet wurde dass sie neben GvL-Effekten vor allem auch GvHD-Effekte vermitteln [285]. Von Interesse ist des Weiteren auch der Befund, dass vor allem im CD4⁺CD45RO⁺CD27⁻-Subset die Proliferation durch eine Kombination nur unwesentlich stärker beeinflusst wurde als durch die Einzelsubstanzen. Dieses Subset ist eher den Effektor-Memory T-Zellen zuzurechnen [263], die im murinen System als GvL-vermittelnd beschrieben wurden ohne eine GvHD auszulösen [235]. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass murine CD4⁺ Memory-T-Zellen sogar bei einem gleichzeitigen Ausschalten von LCK und FYN in der Lage bleiben, zu persistieren [286]. In der Summe könnte eine Kombination aus Dexamethason und Dasatinib daher das Gleichgewicht im Vergleich zu einer Monotherapie eher Richtung GvL-Reaktionen verschieben und das Risiko einer GvHD verringern.

Die verminderte Sensitivität der CD8⁺ Memory Subsets trat in fast noch stärkerem Ausmaß bei der Betrachtung virusspezifischer CD8⁺ T-Zellen zutage. So wurden bei der Untersuchung von CMV- und EBV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen höhere (aber noch immer klinisch relevante [251-253]) Dosen von Dasatinib eingesetzt um messbare Effekte zu erzielen. Diese höhere Dasatinib-Konzentration von 50 nM führte sehr effektiv zu einer Hemmung sowohl der Produktion der Zytokine IFN- γ und TNF- α , als auch der Expression von CD107a/b als Voraussetzung für die Perforin- und Granzym-vermittelte Zelllyse. Im Gegensatz dazu hatte eine Vorbehandlung mit Dexamethason auf beide Funktionen keinen Einfluss und es traten auch keine kombinatorischen Effekte zwischen Dasatinib und Dexamethason auf. Wurde die Zeit der Vorbehandlung mit den beiden Medikamenten auf vier Tage verlängert, so hatten nun auch 50 nM Dasatinib keinerlei messbaren Einfluss auf Zytokinproduktion oder CD107a/b-Expression (3.A.7., *Abbildung 13, Abbildung 14*). Dies spricht dafür, dass die hemmende Wirkung von Dasatinib auf diese beiden Effektorfunktionen ebenso wie auch andere durch Dasatinib vermittelte Effekte [287-289] verhältnismäßig schnell ausgeübt wird und durch die kurze Halbwertszeit von Dasatinib von eher transienter Natur ist.

Vergleichbar mit dem Einfluss auf die Proliferation der CD8⁺ Memory-Subsets (3.A.5., *Abbildung 11*) führten sowohl Dasatinib als auch Dexamethason zu einer Proliferationshemmung in CMV- und EBV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen. Allerdings waren, wie auch bei den CD8⁺ Memory Subsets, die Effekte der

Einzelsubstanzen auf die Zahl der proliferierenden Zellen eher mäßig ausgeprägt, eine Ausnahme bildeten 50 nM Dasatinib. Dagegen führte eine Kombination aus Dexamethason und Dasatinib zu einer deutlichen Proliferationshemmung bei der sich die Substanzen, besonders in den EBV-spezifischen Zellen synergistisch ergänzten (3.A.6., *Abbildung 12*).

Dexamethason führte, im Gegensatz zu 10 nM Dasatinib, zu einer deutlich langsamer ablaufenden Proliferation, was sich in geringeren Teilungsraten äußerte. Die Effekte der beiden Medikamente auf die Proliferation waren also unterschiedlicher Natur: Während Dasatinib mehr nach dem Prinzip „alles oder nichts“ zu wirken scheint, führte eine Dexamethason-Behandlung zu einer eher qualitativen Verringerung der Proliferation. Folgerichtig kam es zwar zu starken synergistischen Effekten auf die Zahl der proliferierenden Zellen, die Qualität der Proliferation, also die durchschnittliche Zahl der Zellteilungen, wurde durch eine Kombination mit Dasatinib im Vergleich zum durch Dexamethason alleine vermittelten Effekt nicht weiter verringert. Diese beiden Befunde legen nahe, dass die hemmenden Wirkungen von Dasatinib und Dexamethason auf die Proliferation über zwei verschiedene Signalwege ablaufen, was wiederum, wie bereits im Hinblick auf die Wirkung in den CD8⁺ Memory Subsets angedeutet, eher dafür spricht, dass Dexamethason seine Effekte auf die Proliferation nicht über eine direkte oder auch indirekte Hemmung von SRC-Kinasen, sondern über den klassischen Glucocorticoid-Rezeptor-Weg ausübt (vgl. 1.4).

Auch wenn die Untersuchung der Effekte einer Kombination aus Dexamethason und Dasatinib in Patienten mit Hämatopoetischer Stammzelltransplantation natürlich außerhalb des Fokus dieser Arbeit lag, so sind doch diese Ergebnisse durchaus ein Hinweis auf ein verhältnismäßig geringes Risiko der CMV- oder EBV-Reaktivierung in Folge der Stammzelltransplantation bei einer Kombination beider Medikamente in niedrigeren Dosen. Eine weitere Untersuchung der Effekte im klinischen Setting wäre durchaus vielversprechend.

Ogleich sie nicht direkt Teil dieser Arbeit waren, sollen die Ergebnisse, die im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Wolfgang Herr (ehemals Universität Mainz, jetzt Universität Regensburg) gewonnen wurden, nicht gänzlich unerwähnt bleiben. Bei den zusammen mit dem ersten Teil dieser Arbeit veröffentlichten Daten [290] wurde untersucht, inwieweit sich die Reaktionen AML-spezifischer und alloreaktiver CTLs unterscheiden. Untersucht wurden zum einen die Effekte auf die Lyse (⁵¹Cr-Release-Assay) von AML-Blasten beziehungsweise von K562-Zellen die mit einem HLA-Mismatch (HLA-*A02:01) transfiziert wurden, zum anderen die Auswirkungen auf die Sekretion von IFN-γ (ELISpot-Assay) in Reaktion auf die jeweiligen Target-Zellen. Hierbei zeigten sich, wenn die Zellen für vier Tage mit den beiden Medikamenten vorbehandelt wurden, unterschiedliche Effekte in den AML- und alloreaktiven Zellen. Bei zwei von drei Klonen führten 50 nM Dasatinib in den AML-reaktiven CTLs zu einer Steigerung der Lyseaktivität, bei zwei verschiedenen alloreaktiven CTLs

wurde die Lyseaktivität einmal gesenkt und einmal nicht beeinflusst; Dexamethason zeigte keine nennenswerten Effekte. Darüber hinaus führte eine Vorbehandlung mit 50 nM Dasatinib in zwei von vier Fällen zu einer deutlichen Steigerung der IFN- γ -Sekretion in den AML-reaktiven Klonen, während keine konsistenten Effekte bei den alloreaktiven CTLs auszumachen waren. Dexamethason zeigte wiederum keinen oder einen leicht hemmenden Einfluss. Der exemplarische Einsatz einer Kombination von 100 nM Dexamethason und 10 nM Dasatinib führte zu keiner eindeutigen Veränderung der IFN- γ -Sekretion weder in AML-reaktiven Klonen noch in alloreaktiven CTLs. Auch wenn die Anzahl der durchgeführten Experimente natürlich sehr klein ist ist es auffällig, dass die Reaktionen einzelner AML-Klone durch eine Dasatinib-Vorbehandlung gesteigert, die Reaktionen von alloreaktiven CTLs aber nicht oder eher hemmend beeinflusst wurden. Diese Befunde legen nahe, dass Leukämie- und alloreaktive T-Zellen unterschiedlich sensitiv auf Dasatinib-induzierte Effekte reagieren [290]. Diese Ergebnisse decken sich mit klinischen Befunden, die eine Verstärkung von GvL-Reaktionen ohne Entwicklung von GvHD unter Dasatinib gezeigt haben [238, 239]. Da alle verwendeten CTLs den gleichen Phänotyp aufwiesen (ausdifferenzierte Effektor-Memory T-Zellen) ist es unwahrscheinlich, dass Unterschiede im Phänotyp für die beobachteten unterschiedlichen Effekte verantwortlich sind, auch wenn Unterschiede in der Generierung (AML-reaktive Klone, alloreaktive „bulk CTLs“) die Ergebnisse beeinflusst haben könnten [290].

Zusammen mit den zuletzt diskutierten anti-Leukämie-fördernden Effekten durch Dasatinib zeigen die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse, dass eine Kombination von Dexamethason und Dasatinib in der Behandlung einer HSCT durchaus synergistische Vorteile bringen könnte. Neben einer denkbaren Verringerung der Dosen der Einzelmedikamente durch die Kombination könnte es auch zu einer GvHD-Hemmung bei gleichzeitiger Beibehaltung oder sogar Förderung der GvL-Effekte kommen, wie bei den Auswirkungen der Medikamente auf die Proliferation von CD4⁺-und CD8⁺-Subsets bereits diskutiert wurde. Darüber hinaus ist das Risiko einer Infektion oder CMV- bzw. EBV-Reaktivierung nach Stammzelltransplantation als eher gering einzuschätzen, da spezifische antivirale Antworten bei verringerten Dosen der Medikamente nicht gestört wurden.

4.B. Der Einfluss von Dasatinib auf Dendritische Zellen

Als professionelle Antigen-präsentierende Zellen sind DCs unverzichtbare Mediatoren der Induktion spezifischer T-Zell-Antworten gegen Pathogene und Krankheiten. Über die Präsentation tumoraler Antigene durch Dendritische Zellen kommt es zur Erzeugung schützender Anti-Tumor-Antworten. Daher ist eine Vakzinierung mit autologen Dendritischen Zellen, die mit Tumor-assoziierten Antigenen stimuliert werden, zu einer der Standardbehandlungen in der klinischen Krebstherapie geworden [240]. Der Erfolg solcher Therapien wird allerdings durch eine gestörte Ausreifung und eine mäßige Migration der *ex vivo* expandierten DCs vom Ort der Injektion zu den Lymphknoten, den Orten der Antigen-Präsentation, verringert [241, 242]. Da die Migration eine der entscheidenden Grundvoraussetzungen für die Induktion von T-Zellantworten darstellt, wäre es vorteilhaft die Migration Dendritischer Zellen besser zu verstehen und pharmakologisch zu verstärken. Da für Dasatinib sowohl hemmende als auch fördernde Effekte auf verschiedene Immunzellen beschrieben wurden [90, 91, 111-113, 119-123], beschäftigte sich der zweite Teil dieser Arbeit mit der Wirkung von Dasatinib auf die Reifung und Funktionalität von *in vitro* aus Monozyten generierten Dendritischen Zellen (moDCs), wobei der Schwerpunkt auf die Untersuchung des Einflusses von Dasatinib auf die Migration und dessen molekularen Ursachen gerichtet war.

Während die Ausreifung der moDCs und wichtige Effektor-Funktionen wie die Antigen-Aufnahme, die Fähigkeit zur Induktion spezifischer T-Zell-Antworten oder die Zytokinsekretion durch Dasatinib nicht oder nur wenig beeinflusst wurden, zeigte Dasatinib einen deutlichen Migrations-steigernden Effekt der durch eine Dephosphorylierung der inhibitorischen Immunrezeptoren Siglec-9 und Siglec-3 (CD33) verursacht wurde.

Bei der Untersuchung des Einflusses von Dasatinib auf die LPS-induzierte Ausreifung von moDCs wurden die Zellen entweder ab Beginn der Generierung, also für eine Gesamtzeit von sieben Tagen (Langzeit), oder 24 Stunden vor Induktion der Ausreifung mit LPS, also für eine Gesamtzeit von 48 Stunden (Kurzzeit) mit Dasatinib behandelt. Durch LPS-Behandlung kommt es zu einer Hochregulation typischer Maturierungsmarker, zu denen neben den kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86 auch CD83 und Klasse-II-MHC-Moleküle wie HLA-DR gehören [291]. Weder eine Langzeit- noch eine Kurzzeitbehandlung mit Dasatinib führte zu messbaren Veränderungen der Expressionslevel von CD40, CD80 und CD83, ebenso wenig wie von MHC-Klasse-I-Molekülen. Dagegen wurde die LPS-induzierte Hochregulation des kostimulatorischen Moleküls CD86 sowohl in der Langzeit- also auch in der Kurzzeitbehandlung mit Dasatinib signifikant verringert, wenngleich die Effekte nicht sonderlich stark ausgeprägt waren. Im Gegensatz dazu führte eine Langzeitbehandlung, nicht aber eine Kurzzeitbehandlung mit 50 nM Dasatinib zu einer signifikanten Steigerung der Expression des MHC-Klasse-II-Moleküls HLA-DR (3.B.1., *Abbildung 15*, *Abbildung 16*, *Abbildung 17*). Die Nicht-Beeinflussung der Expression von CD40, CD80 und CD83 durch Dasatinib ist im Einklang mit publizierten Ergebnissen

[111, 113], bei denen moDCs aber etwas anders kultiviert oder behandelt worden waren als in der vorliegenden Arbeit.

Der hier beobachtete hemmende Einfluss von Dasatinib auf die Expression von CD86 ist auf den ersten Blick im Widerspruch zu zwei anderen Veröffentlichungen, die von einer Nicht-Beeinflussung berichten [111, 113]. In diesen Arbeiten wurden die moDCs allerdings, wie bereits erwähnt, andersartig behandelt. Wölfl *et al.* setzten 50 nM Dasatinib zur Behandlung zeitgleich mit der Induktion der Ausreifung für 16 Stunden ein, wobei diese im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit nicht durch LPS alleine, sondern unter Zusatz von 100 U/ml IFN- γ induziert wurde. Zudem zeigte sich auch dort in vier der fünf untersuchten Spender eine, wenn auch sehr leichte, Herunterregulierung von CD86, die allerdings nicht statistisch signifikant war [113]. Schwarzbich *et al.* setzten Dasatinib analog zu der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Langzeitbehandlung ab Beginn der Generierung ein, verwendeten aber nur 10 nM Dasatinib und untersuchten den Einfluss auf die Expression in nicht ausgereiften Zellen [111]. Unter diesen Bedingungen kam es auch in der vorliegenden Arbeit nicht zu signifikanten Effekten. In einer weiteren Arbeit wurde von einem hemmenden Effekt von Dasatinib (30 nM und höher) auf die CD86-Expression berichtet, allerdings in pDCs nach Stimulation mit CpG-A, einem TLR-9-Liganden [112].

Im Gegensatz zu dem in der vorliegenden Arbeit festgestellten, leicht fördernden Einfluss von Dasatinib auf die Expression von HLA-DR in der Langzeitbehandlung, berichteten Wölfl *et al.* auch in diesem Fall von einer Nicht-Beeinflussung. Neben der bereits erwähnten Ausreifung unter Zusatz von IFN- γ besteht vor allem aber auch ein deutlicher Unterschied in der Behandlungsdauer (vorliegende Arbeit: 7 Tage, Wölfl *et al.*: 16 Stunden). In der vorliegenden Arbeit wurde im Einklange damit in der Kurzzeitbehandlung (48 Stunden) ebenfalls keine Steigerung der HLA-DR-Expression durch Dasatinib beobachtet. Erwähnenswert ist, dass drei der fünf bei Wölfl *et al.* gezeigten Versuche eine höhere Expression von HLA-DR unter Dasatinib-Behandlung zeigten, auch wenn diese Unterschiede wiederum nicht statistisch signifikant waren [113].

Insgesamt ist zum Einfluss von Dasatinib auf die Expression von Reifemarkern und kostimulatorischen bzw. MHC-Molekülen zu sagen, dass die Effekte von Dasatinib relativ gering ausgeprägt sind und eine biologische Relevanz damit fraglich ist. Die Unterschiede im Vergleich zu bereits publizierten Ergebnissen [111, 113] lassen sich durch unterschiedliche Behandlungs-, Kultur- und Stimulationsbedingungen erklären.

Dasatinib führte auch in moDCs nicht zu einer Steigerung der Apoptoseraten, hatte aber im Gegensatz zur Wirkung in T-Zellen (siehe 3.A.4) keinen reduzierenden Einfluss auf die Apoptose (3.B.2., *Abbildung 18*).

Da die Aufnahme von Antigenen mittels Phagozytose der erste Schritt zur Induktion einer Immunantwort ist, wurde untersucht, ob eine Dasatinib-Behandlung Auswirkungen auf die phagozytotische Aufnahme

von FITC- gekoppelten Dextran-Beads hat. Weder in der Kurzzeit- noch in der Langzeitbehandlung war ein Einfluss von Dasatinib auf die Phagozytose zu beobachten (3.B.3., *Abbildung 19*).

Neben der direkten Interaktion mit Zellen des adaptiven Immunsystems stellt die Sekretion von Zytokinen ein wirkungsvolles Mittel im Arsenal Dendritischer Zellen dar.

In der Kurzzeitbehandlung zeigte sich keine Beeinflussung der Sekretion von IL-10, während eine Langzeitbehandlung mit 50 nM Dasatinib die IL-10-Sekretion signifikant senkte. Sowohl in der Kurzzeitbehandlung als auch in der Langzeitbehandlung kam es zu einer signifikanten und deutlichen Hemmung der Sekretion von IL-12, die in der Langzeitbehandlung stärker ausgeprägt war (3.B.4., *Abbildung 20*). Diese Hemmung der Sekretion von Zytokinen durch Dasatinib steht im Einklang mit den Berichten einer generellen Hemmung der Zytokin-Produktion in pDCs [112].

Auch Wöfl *et al.* haben den Einfluss von Dasatinib auf die Sekretion von IL-10 und IL-12 in moDCs untersucht und kamen wiederum zu zumindest teilweise gegensätzlichen Ergebnissen. Sie berichten von einer Nicht-Beeinflussung der IL-10-Sekretion und sogar von einer Steigerung der Sekretion von IL-12, wobei sowohl die Sekretion der IL12-Untereinheit IL-12p40 als auch des IL-12-Heterodimers (IL-12p70) unter Dasatinib gesteigert waren [113]. Die Unterschiede zur in der vorliegenden Arbeit beobachteten Verringerung der IL-12-Sekretion (IL-12p70) durch Dasatinib dürften wiederum auf die Verwendung von IFN- γ für die Ausreifung zurückzuführen sein, vor allem wenn man bedenkt, dass IFN- γ als förderlich für die IL-12-Produktion durch Priming des IL-12p40-Promotors beschrieben wurde [292-294]. Dafür spricht, dass, wenn eine Ausreifung nur mit LPS ohne Zusatz von IFN- γ erfolgte, durch Wöfl *et al.* keinerlei (positive) Beeinflussung der IL-12-Sekretion (IL-12p70) mehr festgestellt wurde [113]. Bezieht man die im Vergleich deutlich kürzere Zeit der Behandlung mit Dasatinib (Wöfl *et al.*: 16 Stunden, die vorliegende Arbeit: 48 Stunden bzw. 7 Tage) und die Tatsache dass die Hemmung der IL-12-Sekretion in der vorliegenden Arbeit mit steigender Behandlungsdauer zunahm mit ein, so sind die auftretenden Unterschiede durchaus verständlich. Im Hinblick auf die Sekretion von IL-10 kommt die vorliegende Arbeit (in der Kurzzeitbehandlung) zum gleichen Ergebnis wie Wöfl *et al.* [113].

Betrachtet man die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse hinsichtlich des Einflusses von Dasatinib auf die Zytokinproduktion, so steht zu vermuten, dass mit Dasatinib behandelte und nur mit LPS ausgereifte moDCs durch die starke Verminderung der IL-12-Sekretion bei gleichzeitiger, aber schwächer ausgeprägter Hemmung der IL-10-Sekretion eher die Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen zu einem T_h2-Phänotyp gegenüber einem T_h1-Phänotyp induzieren würden [163, 295].

Wie bereits erwähnt, spielt die direkte Interaktion von Dendritischen Zellen mit Zellen des adaptiven Immunsystems, also B-Zellen und T-Zellen, eine ganz entscheidende Rolle in der Induktion einer Immunreaktion gegen Pathogene. Daher wurde untersucht, inwieweit Dasatinib die Interaktion von moDCs mit Virus-spezifischen CD8⁺ T-Zellen stört. Hierzu wurden entweder die moDCs für 48 Stunden oder die T-Zellen für eine Stunde vor Beginn einer Co-Kultivierung mit Dasatinib vorbehandelt, oder

Dasatinib wurde dem Assaymedium während der Co-Kultur zugegeben. Die mit CMV-Peptid (CMV pp65₄₉₅₋₅₀₃) ausgereiften moDCs wurden mit den T-Zellen für 12 Stunden co-kultiviert, daran schloss sich ein fünfstündiger Zytokinassay an. Gemessen wurden schließlich die Produktion der Zytokine IFN- γ , TNF- α und IL-2 und die Expression des Degranulationsmarkers CD107a/b durch CMV-spezifische CD8⁺ T-Zellen. Bei diesen Versuchen zeigte sich, dass Dasatinib in der höheren Konzentration von 50 nM die Zytokinproduktion und Expression von CD107a/b annähernd komplett unterband, wenn es im Assay-Medium vorlag oder zur Vorbehandlung der T-Zellen eingesetzt wurde. Der Einsatz von 10 nM Dasatinib hatte dagegen keinen messbaren Einfluss. Dies steht im Einklang mit den bereits für virus-spezifische CD8⁺ T-Zellen alleine beschriebenen Effekten (3.A.7. und [90]). Wurden dagegen die moDCs vorbehandelt und das Medikament, wie auch bei nach Vorbehandlung der T-Zellen, vor Beginn der Co-Kultivierung ausgewaschen, so hatten selbst 50 nM Dasatinib keinerlei negativen Einfluss auf die Fähigkeit der moDCs Virus-spezifische CD8⁺ T-Zell-Antworten auszulösen (3.B.5., *Abbildung 21*).

Während die Behandlung mit Dasatinib in der vorliegenden Arbeit die Fähigkeit der Induktion von virusspezifischen CD8⁺ T-Zell-Antworten durch moDCs also weder positiv noch negativ beeinflusste, so berichtet die bereits mehrfach angesprochene Arbeit von Wöfl *et al.* sogar von einer deutlichen Steigerung der stimulatorischen Kapazität von moDCs und verschiedenen primären myeloiden Zellen durch Dasatinib [113]. Die Autoren beobachteten, in Analogie zu den in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnissen, eine starke Hemmung der Proliferation von Melan-A-spezifischen (Melan-A_{(26-35(27L))}) CD8⁺ T-Zellen, wenn die T-Zellen mit Dasatinib behandelt wurden oder wenn Dasatinib dem Assay-Medium in einer Co-Kultur mit moDCs zugegeben wurde. Dagegen zeigte sich eine starke Steigerung der Proliferation der Melan-A-spezifischen T-Zellen, wenn die zur Co-Kultivierung (für 11 Tage) eingesetzten moDCs ab Beginn ihrer Generierung aus Monozyten, also vergleichbar mit der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Langzeit-Behandlung, mit 50 nM Dasatinib behandelt worden waren. Trotz dieser starken durch die moDCs induzierten Proliferation bewahrten sich die proliferierten Zellen einen Central-Memory-Phänotyp. Neben dieser fördernden Wirkung auf die T-Zell-Proliferation erfolgten auch deutlich steigende Effekte im Hinblick auf die Zytokin-Produktion der Melan-A-spezifischen CD8⁺ T-Zellen in Reaktion auf eine Melan-A-exprimierende Melanomzelllinie (FM55). Hier zeigte sich eine deutlich stärkere Produktion von IFN- γ und TNF- α in Reaktion auf die Tumorzellen, wenn die zum Priming eingesetzten moDCs (für 11 Tage vor Beginn der Co-Kultivierung mit den Melanomzellen) seit Beginn ihrer Generierung mit Dasatinib vorbehandelt worden waren. Da die Autoren ja eine verstärkte Sekretion von IL-12 in mit Dasatinib behandelten moDCs festgestellt haben, nehmen sie an, dass eine gesteigerte Induktion von T-Zell-Antworten zumindest teilweise durch diese Erhöhung der IL-12-Sekretion bedingt sein könnte. Wurden neutralisierende α -IL-12-Antikörper während der Co-Kultivierung der geprimten T-Zellen mit den Melanomzellen zum Medium zugegeben, so kam es tatsächlich zu einer deutlichen Verringerung der intrazellulären IFN- γ /TNF- α -Produktion durch die Melan-A-spezifischen

CD8⁺ T-Zellen, wenn auch die Zytokinproduktion nicht komplett unterdrückt werden konnte. Dies lässt darauf schließen, dass eine erhöhte IL-12-Produktion, auch wenn sie wohl die Hauptursache darstellt, nicht der alleinige Grund für die gesteigerte stimulatorische Kapazität der mit Dasatinib behandelten moDCs ist. Neben diesen fördernden Effekten auf *in vitro* aus Monozyten generierte moDCs konnten die Autoren auch eine gesteigerte Zytokin-Produktion (TNF- α und IL-12) in primären CD14⁺ Monozyten, Slan CD14^{low} DCs (6-sulfo LacNAc DCs, einem inflammatorischen Typ von dermalen DCs) und in CD1c⁺ myeloiden DCs feststellen [113].

Die Unterschiede zwischen der eben diskutierten Veröffentlichung [113] und der vorliegenden Arbeit im Hinblick auf den Einfluss einer Dasatinib-Vorbehandlung auf die Fähigkeit von moDCs, spezifische CD8⁺ T-Zell-Antworten zu generieren, dürften wiederum zu einem großen Teil auf die Ausreifung mit LPS unter Zusatz von IFN- γ zurückzuführen sein. Da IFN- γ ja wie bereits erwähnt einen starken IL-12-Trigger darstellt, führt die durch IFN- γ gesteigerte IL-12-Produktion der moDCs zu einer stärkeren Induktion der Zytokinproduktion in CD8⁺ T-Zellen in der Co-Kultur. Darüber hinaus ist nicht auszuschließen, dass auch bei der in dieser Arbeit verwendeten Form der Co-Kultivierung von T-Zellen mit ohne IFN- γ ausgereiften moDCs durch eine längere Vorbehandlung der moDCs mit Dasatinib (Langzeitbehandlung statt Kurzzeit-Behandlung) fördernde Effekte auf die T-Zellaktivierung auftreten könnten.

Eine Migration vom Ort der Antigenaufnahme in die Lymphknoten ist eine Grundvoraussetzung für die Induktion von T-Zell-Antworten. Die Migration von Dendritischen Zellen in die Lymphknoten wird über die Chemokine CCL19 und CCL21 reguliert und erfordert die Expression des CCL19/CCL21-Rezeptors CCR7 [211-218]. Eine Behandlung mit Dasatinib führte zu einer deutlichen Steigerung der Zahl an migrierten Zellen in Richtung eines CCL19-Gradienten im Transwell-Migrationsassay. Dasatinib wirkte hierbei sowohl wenn es zur Vorbehandlung (48 Stunden vor dem Migrationsassay) eingesetzt wurde, als auch als Zusatz zum Assaymedium fördernd auf die Migration von moDCs. Eine Behandlung mit Dasatinib sorgte hierbei nicht für eine generelle Steigerung der (ungerichteten) Motilität sondern für eine Steigerung der (gerichteten) Chemotaxis, da ohne das Vorhandensein eines CCL19-Gradienten keine vermehrte Wanderung der Zellen festzustellen war (3.B.6., *Abbildung 22*).

Der plausibelste Grund für diese Steigerung der Zahl an migrierten Zellen wäre eine durch Dasatinib erhöhte Expression des CCL19-Rezeptors CCR7. Dasatinib zeigte aber, wie eine frühere Veröffentlichung bereits nahelegte [111], keinerlei messbare Effekte auf die CCR7-Expression in moDCs (3.B.7., *Abbildung 23*).

Da Dasatinib neben der Hemmung von SFKs auch die Aktivität einer ganzen Reihe von anderen Kinasen beeinflusst [264], wurde versucht die möglichen für die Migrationssteigerung verantwortlichen Targets einzugrenzen. Hierzu wurden die Effekte zweier weiterer Kinase-Inhibitoren auf die Migration

untersucht. Neben der Verwendung des BCR-ABL-Inhibitors Nilotinib, für den SFKs keine Zielmoleküle darstellen [264], erfolgte der Einsatz des spezifischen SFK-Inhibitors SKI-1 [265, 266].

Eine Vorbehandlung mit Nilotinib (für 48 Stunden) führte, ganz im Gegensatz zu der durch Dasatinib ausgelösten Migrationssteigerung, zu einer signifikanten Hemmung des Migrationsverhaltens von moDCs. Darüber hinaus hemmte Nilotinib auch die LPS-induzierte Hochregulation von CCR7 (3.B.8, *Abbildung 24*). Dagegen führte eine 48-stündige Vorbehandlung mit SKI-1 zu einer signifikanten Steigerung der Zahl der migrierten Zellen im Transwell-Assay (3.B.8., *Abbildung 25*). Die unterschiedlichen Wirkungen dieser beiden Kinase-Inhibitoren legen nahe, dass für die durch Dasatinib verursachte Migrationssteigerung nicht eines der Dasatinib und Nilotinib gemeinsamen Zielmoleküle wie etwa c-KIT [264] verantwortlich ist, sondern die Wirkung über die Hemmung von Kinasen der SRC-Familie vermittelt wird.

Die große Masse der Publikationen, die sich mit dem Einfluss von SFKs auf die Migration von Immun- und Tumorzellen beschäftigen, berichtet von einem fördernden Einfluss von SFKs auf die Migration oder Migrations-assoziierte Funktionen [221, 222, 296-300]. Dies steht zunächst offenbar im Widerspruch zu der in dieser Arbeit beobachteten Steigerung der Migration von moDCs durch eine Inhibierung von Kinasen der SRC-Familie. Eine Publikation, die von einem hemmenden Einfluss von SFKs auf die Migration von murinen Neutrophilen und moDCs berichtet, zeigte dass in diesem System SFKs den inhibitorischen Rezeptor PIR-B, dessen humanes Homolog CD85a darstellt, aktivieren. Durch Knockout der SFKs HCK und FGR kam es im murinen System zu einer verringerten Phosphorylierung von PIR-B und einer gesteigerten Migration von Neutrophilen und moDCs sowohl *in vitro* als auch *in vivo* [267].

Um zu überprüfen, ob das PIR-B-Homolog CD85a oder andere Immunrezeptoren durch eine Dasatinib-Behandlung beeinflusst werden, wurden die Phosphorylierungsstati von 59 ITAM- und ITIM-haltigen Immunrezeptoren mit Hilfe eines Array-Kits untersucht. Während sich eine Dasatinib-Behandlung nicht auf die Phosphorylierung von CD85a auswirkte und die restlichen 56 im Array-Kit enthaltenen anderen Immunrezeptoren durch Dasatinib ebenfalls nicht beeinflusst wurden, zeigte sich eine komplette Dephosphorylierung der Sialylsäure-Rezeptoren Siglec-9 und Siglec-3 (CD33), wenn die moDCs für 48 Stunden mit Dasatinib vorbehandelt wurden. Dagegen hatte eine Dasatinib-Vorbehandlung, im Gegensatz zum Einfluss auf die Phosphorylierung, keine Veränderungen in der Siglec-3- oder Siglec-9-Expression zu Folge (3.B.9., *Abbildung 26*).

Diese beiden inhibitorischen Immunrezeptoren weisen ITIM- (*Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*)-Domänen auf, die höchstwahrscheinlich durch Kinasen der SRC-Familie phosphoryliert werden [269]. Weder Siglec-3 noch Siglec-9 wurden bislang in einem Zusammenhang mit der Regulation der Migration von Immunzellen genannt, aber ein weiteres Mitglied der Siglec-Familie, Siglec-2 ist in die Regulation der B-Zell-Migration involviert. Eine Blockierung von Siglec-2 mit spezifischen monoklonalen Antikörpern führte zu einer gesteigerten Migration von CD27⁺ B-Zellen gegen einen CXCL12-Gradienten

in vitro [270]. Da die Expression von Siglec-2 hauptsächlich auf B-Zellen beschränkt ist, und dieser Immunrezeptor nur auf niedrigem Niveau von Monozyten exprimiert wird [271], ist es wahrscheinlich, dass in moDCs andere Mitglieder der Siglec-Familie in einer ähnlichen Weise wirken. Daher wurde der Einfluss einer Blockierung von Siglec-9 und Siglec-3 auf die Migration untersucht. Beide verwendeten Antikörper wurden bereits als blockierend beschrieben [268], und für den verwendeten Siglec-9-Antikörper wurde gezeigt, dass eine Bindung dieses Antikörpers die Sialylsäure-Bindestelle maskiert, ohne den Rezeptor zu aktivieren [301]. In der Tat führte die Verwendung von monoklonalen blockierenden Antikörpern gegen Siglec-9 und Siglec-3 zu einer deutlichen Steigerung der Zahl der migrierten moDCs, wobei dieser Effekt sogar den Einfluss von Dasatinib übertraf. Wie auch schon Dasatinib führten die α -Siglec-9- und α -Siglec-3-Antikörper dabei nicht zu einer generellen Erhöhung der ungerichteten Motilität, sondern zu einer Steigerung der Chemotaxis. Die Tatsache, dass eine Kombination aus beiden Antikörpern zu keiner weiteren Steigerung der Migration führte, deutet darauf hin, dass beide Rezeptoren die Migration über dieselben Signalwege regulieren. Die beobachtete migrationssteigernde Wirkung der Antikörper beruhte dabei nicht auf generellen, unspezifischen Effekten durch die Antikörperbindung *per se*, da der Einsatz der korrespondierenden Isotypenkontrolle oder eines pan-Klasse-I-MHC-Antikörpers keinerlei Wirkung zeigte (3.B10., *Abbildung 27*).

Um zu beweisen, dass die Bindung der blockierenden Antikörper tatsächlich ebenso wie Dasatinib zu einer Dephosphorylierung von Siglec-9 und Siglec-3 führt, wurde der Einfluss des α -Siglec-9-Antikörpers auf die Phosphorylierung der 59 im Array-Kit enthaltenen Rezeptoren untersucht. Während wiederum die Mehrheit (56) der Immunrezeptoren nicht beeinflusst wurde, kam es durch Behandlung mit dem α -Siglec-9-Antikörper zu einer Dephosphorylierung von Siglec-9 und Siglec-3, was eine Art von „Cross-Talk“ zwischen den beiden Rezeptoren nahelegt. Daneben kam es zu einer Dephosphorylierung der Phosphatase SHP-2 (3.B.11., *Abbildung 28*), von der angenommen wird, dass sie an die phosphorylierten ITIM-Domänen der Siglec-Rezeptoren rekrutiert wird [272-274].

Auf Grund der gewonnenen Ergebnisse wird der folgende Mechanismus propagiert, der in *Abbildung 29* dargestellt wird. Nach Bindung eines Sialylsäure-Liganden rekrutieren die aktivierten Siglec-Rezeptoren Kinasen der SRC-Familie, die Tyrosinreste an den ITIM-Domänen der Siglecs phosphorylieren [269]. Die phosphorylierten ITIMs können nunmehr wiederum Phosphatasen wie SHP-1, SHP-2 oder SHIP-1 über deren SH2-Domäne rekrutieren, wodurch es zu einer Aktivierung der Phosphatasen kommt. Die aktivierten Phosphatasen dephosphorylieren nun eine Reihe von downstream gelegenen Targets und wirken auf diese Weise hemmend auf die Migration.

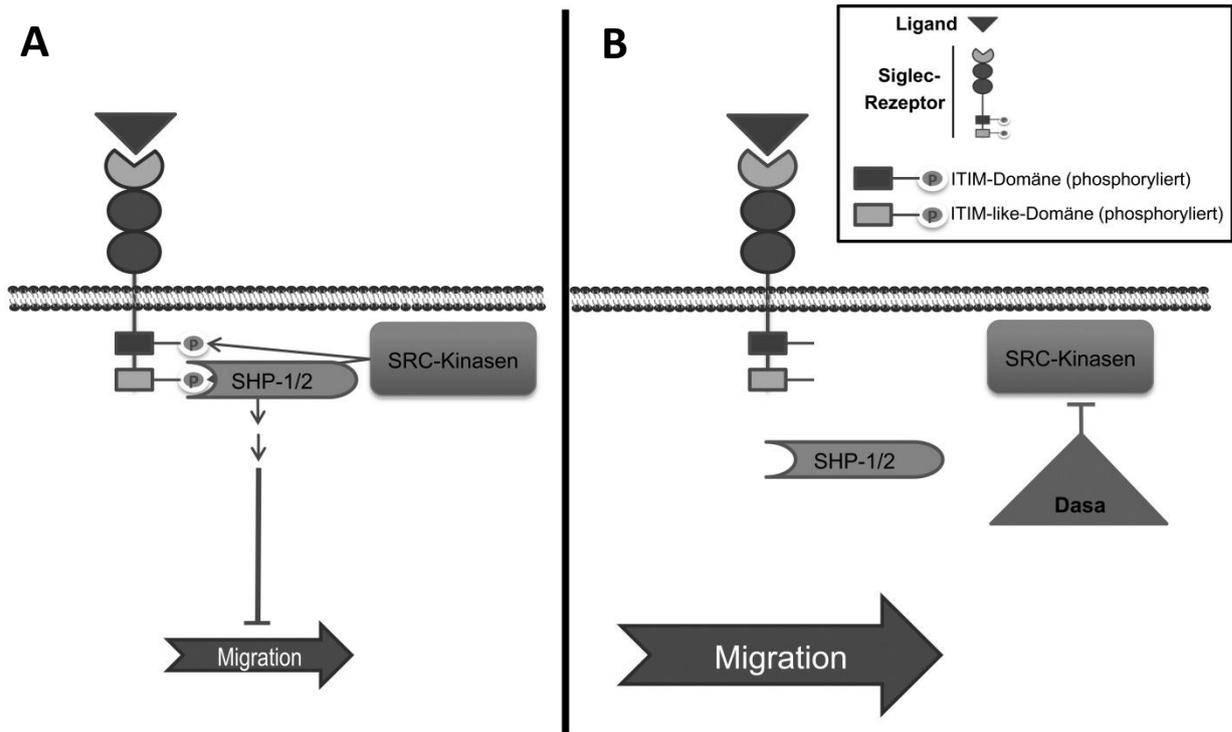


Abbildung 29: Propagierter Mechanismus für die Involvement von Dasatinib und Siglec-Rezeptoren in die Migration von moDCs. (A) Nach Bindung eines Sialylsäure-Liganden durch die Siglec-Rezeptoren werden SFKs an die ITIM-Domänen der Siglec-Rezeptoren rekrutiert, wo sie Tyrosinreste der ITIMs phosphorylieren können. Die phosphorylierten ITIMs wiederum rekrutieren Phosphatasen wie SHP-1 oder SHP-2, die downstream gelegene Zielmoleküle dephosphorylieren und auf diese Weise hemmend auf die Migration von moDCs wirken. (B) In der Gegenwart von Dasatinib erfolgt nach Ligandenbindung keine Rekrutierung von SFKs nach Ligandenbindung, da die SFKs durch eine Dasatinib-induzierte Dephosphorylierung inaktiv sind. Somit erfolgt keine Aktivierung von SHP-1/SHP-2 und die Migration wird nicht gehemmt. Dasa: Dasatinib. Modell der Siglec-Rezeptor-Struktur verändert nach Crocker *et al.*, *Nat Rev Immunol*, 2007 [272].

Sind die SFKs durch Dasatinib dephosphoryliert und somit inaktiv, so kommt es nach Bindung eines Sialylsäure-Liganden an die Siglec-Rezeptoren nun zu keiner Rekrutierung der SFKs an die ITIM-Domänen und in der Folge, auf Grund der nun fehlenden Phosphorylierung der ITIM-Domänen, zu keiner Rekrutierung der Phosphatasen, wodurch die hemmende Wirkung auf die Migration entfällt.

Die in dieser Arbeit beschriebenen, deutlichen Migrations-steigernden Effekte von Dasatinib auf moDCs erfolgten größtenteils ohne dass weitere Effektorfunktionen der Dendritischen Zellen beeinflusst oder gestört wurden. Es zeigten sich keine toxischen Effekte durch die Behandlung mit Dasatinib, da keine erhöhten Apoptose- oder Nekroseraten festzustellen waren. Daneben kam es zu nur unwesentlichen Beeinflussungen der mit LPS induzierten Ausreifung und der Expression von kostimulatorischen Molekülen. Darüber hinaus führte Dasatinib nicht zu einer Beeinträchtigung der Phagozytose-Aktivität und damit der Antigenaufnahme, und die Fähigkeit, Virus-spezifische CD8⁺ T-Zellantworten auszulösen wurde ebenfalls nicht beeinträchtigt.

Schon für sich alleine sprechen diese Ergebnisse dafür, dass der unterstützende Einsatz von Dasatinib bei der Vakzinierung mit autologen Dendritischen Zellen in der Krebstherapie substantielle Vorteile bringen könnte, da eine verbesserte Einwanderung der injizierten DCs in die Lymphknoten möglich wäre.

Nimmt man allerdings die bereits ausführlich diskutierten Ergebnisse von Wöfl *et al.* mit hinzu, die zeigen dass mit Dasatinib behandelte und mit LPS und IFN- γ ausgereifte moDCs zu einer stärkeren Induktion von spezifischen T-Zell-Antworten befähigt sind [113], könnte ein derartiger Ansatz noch deutlich vielversprechender sein, auch wenn es natürlich denkbar wäre, dass bei einer anderen Art der Ausreifung der in dieser Arbeit beschriebene Migrations-steigernde Effekt von Dasatinib eingeschränkt sein könnte und insgesamt die Einflüsse unterschiedlicher Stimulationsbedingungen natürlich noch genauer untersucht werden müssen.

Vielversprechend ist in diesem Zusammenhang auch eine kürzlich erschienene Studie, die von einem deutlichen positiven Effekt von Dasatinib bei der Vakzinierung mit DCs in Mäusen mit Melanomen berichtet. Hierbei kam es bei der Verabreichung einer täglichen Dosis Dasatinib in mit DCs vakzinierten Tieren zu einer kombinatorischen Reduktion der Tumorgroße, verursacht durch eine bessere Einwanderung von tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TILs), einem breiteren therapeutischen CD8⁺ T-Zell-Repertoire und einer Verringerung von immunsuppressiven Zelltypen (MSDCs und T_{Regs}) [302].

Außer dem möglichen Einsatz von Dasatinib, das neben dem Einfluss auf die Phosphorylierung der Siglec-Rezeptoren natürlich noch eine ganze Reihe anderer, teilweise nachteiliger Effekte vermittelt, könnte aber auch die Verwendung von blockierenden α -Siglec-Antikörpern als Adjuvantien einen möglicherweise eleganteren Weg darstellen, die Migration von Dendritischen Zellen nach Vakzinierung positiv zu beeinflussen. Durch die deutlich höhere Spezifität im Vergleich zu einem „dirty drug“ wie Dasatinib sind eine geringere Menge unerwünschter Nebeneffekte sehr wahrscheinlich. Daher sollte dieser Ansatz unbedingt in präklinischen Studien, unter anderem im Mausmodell, weiterverfolgt werden.

5. Literaturverzeichnis

- [1] Besant PG, Tan E & Attwood PV. Mammalian protein histidine kinases. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003;35:297-309.
- [2] Attwood PV. Histidine kinases from bacteria to humans. *Biochem Soc Trans.* 2013;41:1023-1028.
- [3] Dhanasekaran N & Premkumar Reddy E. Signaling by dual specificity kinases. *Oncogene.* 1998;17:1447-1455.
- [4] Cowan-Jacob SW. Structural biology of protein tyrosine kinases. *Cell Mol Life Sci.* 2006;63:2608-2625.
- [5] Neet K & Hunter T. Vertebrate non-receptor protein-tyrosine kinase families. *Genes Cells.* 1996;1:147-169.
- [6] The UniProt Consortium. Tyrosine-protein kinase Srms. UniProt KB Database. <http://www.uniprot.org/uniprot/Q9H3Y6>. Aufgerufen am 18.03.2014.
- [7] Goel RK, Miah S, Black K, Kalra N, Dai C & Lukong KE. The unique N-terminal region of SRMS regulates enzymatic activity and phosphorylation of its novel substrate docking protein 1. *FEBS J.* 2013;280:4539-4559.
- [8] Stehelin D, Varmus HE, Bishop JM & Vogt PK. DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature.* 1976;260:170-173.
- [9] Marx JL. Cancer gene research wins medicine Nobel. *Science.* 1989;246:326-327.
- [10] Lowell CA. Src-family kinases: rheostats of immune cell signaling. *Mol Immunol.* 2004;41:631-643.
- [11] The UniProt Consortium. Tyrosine-protein kinase Blk. UniProt KB Database. <http://www.uniprot.org/uniprot/P51451>. Aufgerufen am 18.03.2014.
- [12] The UniProt Consortium. Tyrosine-protein kinase FRK. UniProt KB Database. <http://www.uniprot.org/uniprot/P42685>. Aufgerufen am 18.03.2014.
- [13] Levinson AD, Oppermann H, Levintow L, Varmus HE & Bishop JM. Evidence that the transforming gene of avian sarcoma virus encodes a protein kinase associated with a phosphoprotein. *Cell.* 1978;15:561-572.
- [14] Collett MS, Purchio AF & Erikson RL. Avian sarcoma virus-transforming protein, pp60src shows protein kinase activity specific for tyrosine. *Nature.* 1980;285:167-169.
- [15] Lau AF, Krzyzek RA & Faras AJ. Loss of tumorigenicity correlates with a reduction in pp60src kinase activity in a revertant subclone of avian sarcoma virus-infected field vole cells. *Cell.* 1981;23:815-823.
- [16] Graziani Y, Chayoth R, Karny N, Feldman B & Levy J. Regulation of protein kinases activity by quercetin in Ehrlich ascites tumor cells. *Biochim Biophys Acta.* 1982;714:415-421.
- [17] Umezawa H, Imoto M, Sawa T, Isshiki K, Matsuda N, Uchida T, Iinuma H, Hamada M & Takeuchi T. Studies on a new epidermal growth factor-receptor kinase inhibitor, erbstatin, produced by MH435-hF3. *J Antibiot (Tokyo).* 1986;39:170-173.

- [18] Imoto M, Umezawa K, Sawa T, Takeuchi T & Umezawa H. In situ inhibition of tyrosine protein kinase by erbstatin. *Biochem Int.* 1987;15:989-995.
- [19] Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, Ogawara H, Watanabe S, Itoh N, Shibuya M & Fukami Y. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol Chem.* 1987;262:5592-5595.
- [20] Uehara Y, Murakami Y, Suzukake-Tsuchiya K, Moriya Y, Sano H, Shibata K & Omura S. Effects of herbimycin derivatives on src oncogene function in relation to antitumor activity. *J Antibiot (Tokyo).* 1988;41:831-834.
- [21] Onoda T, Iinuma H, Sasaki Y, Hamada M, Isshiki K, Naganawa H, Takeuchi T, Tatsuta K & Umezawa K. Isolation of a novel tyrosine kinase inhibitor, lavendustin A, from *Streptomyces griseolavendus*. *J Nat Prod.* 1989;52:1252-1257.
- [22] Levitzki A & Gazit A. Tyrosine kinase inhibition: an approach to drug development. *Science.* 1995;267:1782-1788.
- [23] Yaish P, Gazit A, Gilon C & Levitzki A. Blocking of EGF-dependent cell proliferation by EGF receptor kinase inhibitors. *Science.* 1988;242:933-935.
- [24] Gazit A, Osherov N, Posner I, Yaish P, Poradosu E, Gilon C & Levitzki A. Tyrphostins. 2. Heterocyclic and alpha-substituted benzylidenemalononitrile tyrphostins as potent inhibitors of EGF receptor and ErbB2/neu tyrosine kinases. *J Med Chem.* 1991;34:1896-1907.
- [25] Osherov N, Gazit A, Gilon C & Levitzki A. Selective inhibition of the epidermal growth factor and HER2/neu receptors by tyrphostins. *J Biol Chem.* 1993;268:11134-11142.
- [26] Konopka JB, Watanabe SM & Witte ON. An alteration of the human c-abl protein in K562 leukemia cells unmasks associated tyrosine kinase activity. *Cell.* 1984;37:1035-1042.
- [27] Kurzrock R, Gutterman JU & Talpaz M. The molecular genetics of Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N Engl J Med.* 1988;319:990-998.
- [28] Lugo TG, Pendergast AM, Muller AJ & Witte ON. Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. *Science.* 1990;247:1079-1082.
- [29] Morgan GJ & Wiedemann LM. Molecular biology of the Philadelphia positive leukaemias. *Recent Prog Med.* 1989;80:508-519.
- [30] Anafi M, Gazit A, Zehavi A, Ben-Neriah Y & Levitzki A. Tyrphostin-induced inhibition of p210bcr-abl tyrosine kinase activity induces K562 to differentiate. *Blood.* 1993;82:3524-3529.
- [31] Kaur G, Gazit A, Levitzki A, Stowe E, Cooney DA & Sausville EA. Tyrphostin induced growth inhibition: correlation with effect on p210bcr-abl autokinase activity in K562 chronic myelogenous leukemia. *Anticancer Drugs.* 1994;5:213-222.
- [32] Buchdunger E, Zimmermann J, Mett H, Meyer T, Muller M, Druker BJ & Lydon NB. Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylaminopyrimidine derivative. *Cancer Res.* 1996;56:100-104.

- [33] Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal GM, Fanning S, Zimmermann J & Lydon NB. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med*. 1996;2:561-566.
- [34] Zimmermann J, Caravatti G, Mett H, Meyer T, Muller M, Lydon NB & Fabbro D. Phenylamino-pyrimidine (PAP) derivatives: a new class of potent and selective inhibitors of protein kinase C (PKC). *Arch Pharm (Weinheim)*. 1996;329:371-376.
- [35] Buchdunger E, Zimmermann J, Mett H, Meyer T, Muller M, Regenass U & Lydon NB. Selective inhibition of the platelet-derived growth factor signal transduction pathway by a protein-tyrosine kinase inhibitor of the 2-phenylaminopyrimidine class. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:2558-2562.
- [36] Arnold K. After 30 Years of Laboratory Work, a Quick Approval for STI571. *Journal of the National Cancer Institute*. 2001;93:972.
- [37] FDA approves Gleevec for leukemia treatment. *FDA Consum*. 2001;35:6.
- [38] Pollack VA, Savage DM, Baker DA, Tsaparikos KE, Sloan DE, Moyer JD, Barbacci EG, Pustilnik LR, Smolarek TA, Davis JA, Vaidya MP, Arnold LD, Doty JL, Iwata KK & Morin MJ. Inhibition of epidermal growth factor receptor-associated tyrosine phosphorylation in human carcinomas with CP-358,774: dynamics of receptor inhibition in situ and antitumor effects in athymic mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 1999;291:739-748.
- [39] Ciardiello F. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors as anticancer agents. *Drugs*. 2000;60 Suppl 1:25-32; discussion 41-22.
- [40] Xia W, Mullin RJ, Keith BR, Liu LH, Ma H, Rusnak DW, Owens G, Alligood KJ & Spector NL. Anti-tumor activity of GW572016: a dual tyrosine kinase inhibitor blocks EGF activation of EGFR/erbB2 and downstream Erk1/2 and AKT pathways. *Oncogene*. 2002;21:6255-6263.
- [41] Hotte SJ & Hirte HW. BAY 43-9006: early clinical data in patients with advanced solid malignancies. *Curr Pharm Des*. 2002;8:2249-2253.
- [42] O'farrell AM, Abrams TJ, Yuen HA, Ngai TJ, Louie SG, Yee KW, Wong LM, Hong W, Lee LB, Town A, Smolich BD, Manning WC, Murray LJ, Heinrich MC & Cherrington JM. SU11248 is a novel FLT3 tyrosine kinase inhibitor with potent activity in vitro and in vivo. *Blood*. 2003;101:3597-3605.
- [43] Podar K, Tonon G, Sattler M, Tai YT, Legouill S, Yasui H, Ishitsuka K, Kumar S, Kumar R, Pandite LN, Hideshima T, Chauhan D & Anderson KC. The small-molecule VEGF receptor inhibitor pazopanib (GW786034B) targets both tumor and endothelial cells in multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:19478-19483.
- [44] Lombardo LJ, Lee FY, Chen P, Norris D, Barrish JC, Behnia K, Castaneda S, Cornelius LA, Das J, Doweiko AM, Fairchild C, Hunt JT, Inigo I, Johnston K, Kamath A, Kan D, Klei H, Marathe P, Pang S, Peterson R, Pitt S, Schieven GL, Schmidt RJ, Tokarski J, Wen ML, Wityak J & Borzilleri RM. Discovery of N-(2-chloro-6-methyl-phenyl)-2-(6-(4-(2-hydroxyethyl)-piperazin-1-yl)-2-methylpyrimidin-4-ylamino)thiazole-5-carboxamide (BMS-354825), a dual Src/Abl kinase inhibitor with potent antitumor activity in preclinical assays. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2004;47:6658-6661.
- [45] Travis J. Cancer. Gleevec, chapter two: new leukemia drug aims to overcome resistance. *Science*. 2004;305:319-321.

- [46] Shah NP, Tran C, Lee FY, Chen P, Norris D & Sawyers CL. Overriding imatinib resistance with a novel ABL kinase inhibitor. *Science*. 2004;305:399-401.
- [47] O'hare T, Walters DK, Deininger MW & Druker BJ. AMN107: tightening the grip of imatinib. *Cancer Cell*. 2005;7:117-119.
- [48] Golas JM, Arndt K, Etienne C, Lucas J, Nardin D, Gibbons J, Frost P, Ye F, Boschelli DH & Boschelli F. SKI-606, a 4-anilino-3-quinolinecarbonitrile dual inhibitor of Src and Abl kinases, is a potent antiproliferative agent against chronic myelogenous leukemia cells in culture and causes regression of K562 xenografts in nude mice. *Cancer Res*. 2003;63:375-381.
- [49] O'hare T, Shakespeare WC, Zhu X, Eide CA, Rivera VM, Wang F, Adrian LT, Zhou T, Huang WS, Xu Q, Metcalf CA, 3rd, Tyner JW, Loriaux MM, Corbin AS, Wardwell S, Ning Y, Keats JA, Wang Y, Sundaramoorthi R, Thomas M, Zhou D, Snodgrass J, Commodore L, Sawyer TK, Dalgarno DC, Deininger MW, Druker BJ & Clackson T. AP24534, a pan-BCR-ABL inhibitor for chronic myeloid leukemia, potently inhibits the T315I mutant and overcomes mutation-based resistance. *Cancer Cell*. 2009;16:401-412.
- [50] Hennequin LF, Stokes ES, Thomas AP, Johnstone C, Ple PA, Ogilvie DJ, Dukes M, Wedge SR, Kendrew J & Curwen JO. Novel 4-anilinoquinazolines with C-7 basic side chains: design and structure activity relationship of a series of potent, orally active, VEGF receptor tyrosine kinase inhibitors. *J Med Chem*. 2002;45:1300-1312.
- [51] Changelian PS, Flanagan ME, Ball DJ, Kent CR, Magnuson KS, Martin WH, Rizzuti BJ, Sawyer PS, Perry BD, Brissette WH, Mccurdy SP, Kudlacz EM, Conklyn MJ, Elliott EA, Koslov ER, Fisher MB, Strelevitz TJ, Yoon K, Whipple DA, Sun J, Munchhof MJ, Doty JL, Casavant JM, Blumenkopf TA, Hines M, Brown MF, Lillie BM, Subramanyam C, Shang-Poa C, Milici AJ, Beckius GE, Moyer JD, Su C, Woodworth TG, Gaweco AS, Beals CR, Littman BH, Fisher DA, Smith JF, Zagouras P, Magna HA, Saltarelli MJ, Johnson KS, Nelms LF, Des Etages SG, Hayes LS, Kawabata TT, Finco-Kent D, Baker DL, Larson M, Si MS, Paniagua R, Higgins J, Holm B, Reitz B, Zhou YJ, Morris RE, O'shea JJ & Borie DC. Prevention of organ allograft rejection by a specific Janus kinase 3 inhibitor. *Science*. 2003;302:875-878.
- [52] Lin Q, Meloni D, Pan Y, Xia M, Rodgers J, Shepard S, Li M, Galya L, Metcalf B, Yue TY, Liu P & Zhou J. Enantioselective synthesis of Janus kinase inhibitor INCB018424 via an organocatalytic aza-Michael reaction. *Org Lett*. 2009;11:1999-2002.
- [53] Timofeevski SL, Mctigue MA, Ryan K, Cui J, Zou HY, Zhu JX, Chau F, Alton G, Karlicek S, Christensen JG & Murray BW. Enzymatic characterization of c-Met receptor tyrosine kinase oncogenic mutants and kinetic studies with aminopyridine and triazolopyrazine inhibitors. *Biochemistry*. 2009;48:5339-5349.
- [54] Honigberg LA, Smith AM, Sirisawad M, Verner E, Loury D, Chang B, Li S, Pan Z, Thamm DH, Miller RA & Buggy JJ. The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 blocks B-cell activation and is efficacious in models of autoimmune disease and B-cell malignancy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107:13075-13080.
- [55] Wilhelm SM, Dumas J, Adnane L, Lynch M, Carter CA, Schutz G, Thierauch KH & Zopf D. Regorafenib (BAY 73-4506): a new oral multikinase inhibitor of angiogenic, stromal and oncogenic receptor tyrosine kinases with potent preclinical antitumor activity. *Int J Cancer*. 2011;129:245-255.
- [56] Hantschel O, Grebien F & Superti-Furga G. The growing arsenal of ATP-competitive and allosteric inhibitors of BCR-ABL. *Cancer Res*. 2012;72:4890-4895.

- [57] Posner I, Engel M, Gazit A & Levitzki A. Kinetics of inhibition by tyrphostins of the tyrosine kinase activity of the epidermal growth factor receptor and analysis by a new computer program. *Mol Pharmacol.* 1994;45:673-683.
- [58] Hantschel O. Allosteric BCR-ABL inhibitors in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: novel opportunities for drug combinations to overcome resistance. *Haematologica.* 2012;97:157-159.
- [59] Bose P, Park H, Al-Khafaji J & Grant S. Strategies to circumvent the T315I gatekeeper mutation in the Bcr-Abl tyrosine kinase. *Leuk Res Rep.* 2013;2:18-20.
- [60] Li J, Rix U, Fang B, Bai Y, Edwards A, Colinge J, Bennett KL, Gao J, Song L, Eschrich S, Superti-Furga G, Koomen J & Haura EB. A chemical and phosphoproteomic characterization of dasatinib action in lung cancer. *Nat Chem Biol.* 2010;6:291-299.
- [61] Das J, Chen P, Norris D, Padmanabha R, Lin J, Moquin RV, Shen Z, Cook LS, Doweyko AM, Pitt S, Pang S, Shen DR, Fang Q, De Fex HF, Mcintyre KW, Shuster DJ, Gillooly KM, Behnia K, Schieven GL, Wityak J & Barrish JC. 2-aminothiazole as a novel kinase inhibitor template. Structure-activity relationship studies toward the discovery of N-(2-chloro-6-methylphenyl)-2-[[6-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-2-methyl-4-pyrimidinyl]amino]-1,3-thiazole-5-carboxamide (dasatinib, BMS-354825) as a potent pan-Src kinase inhibitor. *J Med Chem.* 2006;49:6819-6832.
- [62] Talpaz M, Shah NP, Kantarjian H, Donato N, Nicoll J, Paquette R, Cortes J, O'Brien S, Nicaise C, Bleickardt E, Blackwood-Chirchir MA, Iyer V, Chen TT, Huang F, Decillis AP & Sawyers CL. Dasatinib in imatinib-resistant Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N Engl J Med.* 2006;354:2531-2541.
- [63] Kantarjian H, Jabbour E, Grimley J & Kirkpatrick P. Dasatinib. *Nat Rev Drug Discov.* 2006;5:717-718.
- [64] Cortes J, Rouselot P, Kim DW, Ritchie E, Hamerschlak N, Coutre S, Hochhaus A, Guilhot F, Saglio G, Apperley J, Ottmann O, Shah N, Erben P, Branford S, Agarwal P, Gollerkeri A & Baccarani M. Dasatinib induces complete hematologic and cytogenetic responses in patients with imatinib-resistant or -intolerant chronic myeloid leukemia in blast crisis. *Blood.* 2007;109:3207-3213.
- [65] Guilhot F, Apperley J, Kim DW, Bullorsky EO, Baccarani M, Roboz GJ, Amadori S, De Souza CA, Lipton JH, Hochhaus A, Heim D, Larson RA, Branford S, Muller MC, Agarwal P, Gollerkeri A & Talpaz M. Dasatinib induces significant hematologic and cytogenetic responses in patients with imatinib-resistant or -intolerant chronic myeloid leukemia in accelerated phase. *Blood.* 2007;109:4143-4150.
- [66] Hochhaus A, Kantarjian HM, Baccarani M, Lipton JH, Apperley JF, Druker BJ, Facon T, Goldberg SL, Cervantes F, Niederwieser D, Silver RT, Stone RM, Hughes TP, Muller MC, Ezzeddine R, Countouriotis AM & Shah NP. Dasatinib induces notable hematologic and cytogenetic responses in chronic-phase chronic myeloid leukemia after failure of imatinib therapy. *Blood.* 2007;109:2303-2309.
- [67] Quintas-Cardama A, Kantarjian H, Jones D, Nicaise C, O'Brien S, Giles F, Talpaz M & Cortes J. Dasatinib (BMS-354825) is active in Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia after imatinib and nilotinib (AMN107) therapy failure. *Blood.* 2007;109:497-499.
- [68] Kantarjian H, Pasquini R, Hamerschlak N, Rouselot P, Holowiecki J, Jootar S, Robak T, Khoroshko N, Masszi T, Skotnicki A, Hellmann A, Zaritsky A, Golenkov A, Radich J, Hughes T, Countouriotis A & Shah N. Dasatinib or high-dose imatinib for chronic-phase chronic myeloid leukemia after failure of first-line imatinib: a randomized phase 2 trial. *Blood.* 2007;109:5143-5150.

- [69] Kantarjian H, Cortes J, Kim DW, Dorlhiac-Llacer P, Pasquini R, Dipersio J, Muller MC, Radich JP, Khoury HJ, Khoroshko N, Bradley-Garelik MB, Zhu C & Tallman MS. Phase 3 study of dasatinib 140 mg once daily versus 70 mg twice daily in patients with chronic myeloid leukemia in accelerated phase resistant or intolerant to imatinib: 15-month median follow-up. *Blood*. 2009;113:6322-6329.
- [70] Kantarjian H, Shah NP, 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 MB, Zhu C, Sztatowski T, Shapiro D & Baccarani M. Dasatinib versus imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2010;362:2260-2270.
- [71] Demetri GD, Lo Russo P, Macpherson IR, Wang D, Morgan JA, Brunton VG, Paliwal P, Agrawal S, Voi M & Evans TR. Phase I dose-escalation and pharmacokinetic study of dasatinib in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res*. 2009;15:6232-6240.
- [72] Takahashi S, Miyazaki M, Okamoto I, Ito Y, Ueda K, Seriu T, Nakagawa K & Hatake K. Phase I study of dasatinib (BMS-354825) in Japanese patients with solid tumors. *Cancer Sci*. 2011;102:2058-2064.
- [73] Yu EY, Wilding G, Posadas E, Gross M, Culine S, Massard C, Morris MJ, Hudes G, Calabro F, Cheng S, Trudel GC, Paliwal P & Sternberg CN. Phase II study of dasatinib in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2009;15:7421-7428.
- [74] Yu EY, Massard C, Gross ME, Carducci MA, Culine S, Hudes G, Posadas EM, Sternberg CN, Wilding G, Trudel GC, Paliwal P & Fizazi K. Once-daily dasatinib: expansion of phase II study evaluating safety and efficacy of dasatinib in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer. *Urology*. 2011;77:1166-1171.
- [75] Miller AA, Pang H, Hodgson L, Ramnath N, Otterson GA, Kelley MJ, Kratzke RA, Vokes EE, Cancer & Leukemia Group B. A phase II study of dasatinib in patients with chemosensitive relapsed small cell lung cancer (Cancer and Leukemia Group B 30602). *J Thorac Oncol*. 2010;5:380-384.
- [76] Johnson FM, Bekele BN, Feng L, Wistuba I, Tang XM, Tran HT, Erasmus JJ, Hwang LL, Takebe N, Blumenschein GR, Lippman SM & Stewart DJ. Phase II study of dasatinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2010;28:4609-4615.
- [77] Amrein PC, Attar EC, Takvorian T, Hochberg EP, Ballen KK, Leahy KM, Fisher DC, Lacasce AS, Jacobsen ED, Armand P, Hasserjian RP, Werner L, Neuberg D & Brown JR. Phase II study of dasatinib in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res*. 2011;17:2977-2986.
- [78] Brooks HD, Glisson BS, Bekele BN, Johnson FM, Ginsberg LE, El-Naggar A, Culotta KS, Takebe N, Wright J, Tran HT & Papadimitrakopoulou VA. Phase 2 study of dasatinib in the treatment of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer*. 2011;117:2112-2119.
- [79] Finn RS, Bengala C, Ibrahim N, Roche H, Sparano J, Strauss LC, Fairchild J, Sy O & Goldstein LJ. Dasatinib as a single agent in triple-negative breast cancer: results of an open-label phase 2 study. *Clin Cancer Res*. 2011;17:6905-6913.
- [80] Fornier MN, Morris PG, Abbruzzi A, D'andrea G, Gilewski T, Bromberg J, Dang C, Dickler M, Modi S, Seidman AD, Sklarin N, Chang J, Norton L & Hudis CA. A phase I study of dasatinib and weekly paclitaxel for metastatic breast cancer. *Ann Oncol*. 2011;22:2575-2581.

- [81] Dudek AZ, Pang H, Kratzke RA, Otterson GA, Hodgson L, Vokes EE, Kindler HL, Cancer & Leukemia Group B. Phase II study of dasatinib in patients with previously treated malignant mesothelioma (cancer and leukemia group B 30601): a brief report. *J Thorac Oncol.* 2012;7:755-759.
- [82] Schilder RJ, Brady WE, Lankes HA, Fiorica JV, Shahin MS, Zhou XC, Mannel RS, Pathak HB, Hu W, Alpaugh RK, Sood AK & Godwin AK. Phase II evaluation of dasatinib in the treatment of recurrent or persistent epithelial ovarian or primary peritoneal carcinoma: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol.* 2012;127:70-74.
- [83] Chee CE, Krishnamurthi S, Nock CJ, Meropol NJ, Gibbons J, Fu P, Bokar J, Teston L, O'brien T, Gudena V, Reese A, Bergman M, Saltzman J, Wright JJ, Dowlati A & Brell J. Phase II study of dasatinib (BMS-354825) in patients with metastatic adenocarcinoma of the pancreas. *Oncologist.* 2013;18:1091-1092.
- [84] Duong VH, Jaglal MV, Zhang L, Kale V, Lancet JE, Komrokji RS & List AF. Phase II pilot study of oral dasatinib in patients with higher-risk myelodysplastic syndrome (MDS) who failed conventional therapy. *Leuk Res.* 2013;37:300-304.
- [85] Rix U, Hantschel O, Durnberger G, Remsing Rix LL, Planyavsky M, Fernbach NV, Kaupe I, Bennett KL, Valent P, Colinge J, Kocher T & Superti-Furga G. Chemical proteomic profiles of the BCR-ABL inhibitors imatinib, nilotinib, and dasatinib reveal novel kinase and nonkinase targets. *Blood.* 2007;110:4055-4063.
- [86] Hantschel O, Rix U, Schmidt U, Burckstummer T, Kneidinger M, Schutze G, Colinge J, Bennett KL, Ellmeier W, Valent P & Superti-Furga G. The Btk tyrosine kinase is a major target of the Bcr-Abl inhibitor dasatinib. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104:13283-13288.
- [87] Kneidinger M, Schmidt U, Rix U, Gleixner KV, Vales A, Baumgartner C, Lupinek C, Weghofer M, Bennett KL, Herrmann H, Schebesta A, Thomas WR, Vrtala S, Valenta R, Lee FY, Ellmeier W, Superti-Furga G & Valent P. The effects of dasatinib on IgE receptor-dependent activation and histamine release in human basophils. *Blood.* 2008;111:3097-3107.
- [88] Herrmann H, Blatt K, Ghanim V, Kneidinger M, Marth K, Valenta R & Valent P. Glucocorticosteroids rescue basophils from dasatinib-augmented immunoglobulin E-mediated histamine release. *Int Arch Allergy Immunol.* 2012;159:15-22.
- [89] Blake S, Hughes TP, Mayrhofer G & Lyons AB. The Src/ABL kinase inhibitor dasatinib (BMS-354825) inhibits function of normal human T-lymphocytes in vitro. *Clin Immunol.* 2008;127:330-339.
- [90] Weichsel R, Dix C, Wooldridge L, Clement M, Fenton-May A, Sewell AK, Zezula J, Greiner E, Gostick E, Price DA, Einsele H & Seggewiss R. Profound inhibition of antigen-specific T-cell effector functions by dasatinib. *Clin Cancer Res.* 2008;14:2484-2491.
- [91] Fraser CK, Blake SJ, Diener KR, Lyons AB, Brown MP, Hughes TP & Hayball JD. Dasatinib inhibits recombinant viral antigen-specific murine CD4+ and CD8+ T-cell responses and NK-cell cytolytic activity in vitro and in vivo. *Exp Hematol.* 2009;37:256-265.
- [92] Lee KC, Ouwehand I, Giannini AL, Thomas NS, Dibb NJ & Bijlmakers MJ. Lck is a key target of imatinib and dasatinib in T-cell activation. *Leukemia.* 2010;24:896-900.
- [93] Blake SJ, Hughes TP & Lyons AB. Drug-interaction studies evaluating T-cell proliferation reveal distinct activity of dasatinib and imatinib in combination with cyclosporine A. *Exp Hematol.* 2012;40:612-621 e616.

- [94] Fei F, Yu Y, Schmitt A, Rojewski MT, Chen B, Gotz M, Dohner H, Bunjes D & Schmitt M. Dasatinib inhibits the proliferation and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Br J Haematol*. 2009;144:195-205.
- [95] Fei F, Yu Y, Schmitt A, Rojewski MT, Chen B, Greiner J, Gotz M, Guillaume P, Dohner H, Bunjes D & Schmitt M. Dasatinib exerts an immunosuppressive effect on CD8+ T cells specific for viral and leukemia antigens. *Exp Hematol*. 2008;36:1297-1308.
- [96] Mustjoki S, Ekblom M, Arstila TP, Dybedal I, Epling-Burnette PK, Guilhot F, Hjorth-Hansen H, Hoglund M, Kovanen P, Laurinoli T, Liesveld J, Paquette R, Pinilla-Ibarz J, Rauhala A, Shah N, Simonsson B, Sinisalo M, Steegmann JL, Stenke L & Porkka K. Clonal expansion of T/NK-cells during tyrosine kinase inhibitor dasatinib therapy. *Leukemia*. 2009;23:1398-1405.
- [97] Kreutzman A, Juvonen V, Kairisto V, Ekblom M, Stenke L, Seggewiss R, Porkka K & Mustjoki S. Mono/oligoclonal T and NK cells are common in chronic myeloid leukemia patients at diagnosis and expand during dasatinib therapy. *Blood*. 2010;116:772-782.
- [98] Kim DH, Kamel-Reid S, Chang H, Sutherland R, Jung CW, Kim HJ, Lee JJ & Lipton JH. Natural killer or natural killer/T cell lineage large granular lymphocytosis associated with dasatinib therapy for Philadelphia chromosome positive leukemia. *Haematologica*. 2009;94:135-139.
- [99] Powers JJ, Dubovsky JA, Epling-Burnette PK, Moscinski L, Zhang L, Mustjoki S, Sotomayor EM & Pinilla-Ibarz JA. A molecular and functional analysis of large granular lymphocyte expansions in patients with chronic myelogenous leukemia treated with tyrosine kinase inhibitors. *Leuk Lymphoma*. 2011;52:668-679.
- [100] Kreutzman A, Ladell K, Koechel C, Gostick E, Ekblom M, Stenke L, Melo T, Einsele H, Porkka K, Price DA, Mustjoki S & Seggewiss R. Expansion of highly differentiated CD8+ T-cells or NK-cells in patients treated with dasatinib is associated with cytomegalovirus reactivation. *Leukemia*. 2011;25:1587-1597.
- [101] Tanaka H, Nakashima S & Usuda M. Rapid and sustained increase of large granular lymphocytes and rare cytomegalovirus reactivation during dasatinib treatment in chronic myelogenous leukemia patients. *Int J Hematol*. 2012;10.1007/s12185-012-1132-8.
- [102] Qiu ZY, Xu W & Li JY. Large granular lymphocytosis during dasatinib therapy. *Cancer Biol Ther*. 2014;15:247-255.
- [103] Mustjoki S, Auvinen K, Kreutzman A, Rousselot P, Hernesniemi S, Melo T, Lahesmaa-Korpinen AM, Hautaniemi S, Bouchet S, Molimard M, Smykla R, Lee FY, Vakkila J, Jalkanen S, Salmi M & Porkka K. Rapid mobilization of cytotoxic lymphocytes induced by dasatinib therapy. *Leukemia*. 2013;27:914-924.
- [104] Wu KN, Wang YJ, He Y, Hu YX, Fu HR, Sheng LX, Wang BS, Fu S & Huang H. Dasatinib promotes the potential of proliferation and antitumor responses of human gammadeltaT cells in a long-term induction ex vivo environment. *Leukemia*. 2014;28:206-210.
- [105] Fraser CK, Lousberg EL, Kumar R, Hughes TP, Diener KR & Hayball JD. Dasatinib inhibits the secretion of TNF-alpha following TLR stimulation in vitro and in vivo. *Exp Hematol*. 2009;37:1435-1444.
- [106] Yano A, Tsutsumi S, Soga S, Lee MJ, Trepel J, Osada H & Neckers L. Inhibition of Hsp90 activates osteoclast c-Src signaling and promotes growth of prostate carcinoma cells in bone. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:15541-15546.

- [107] Araujo JC, Poblenz A, Corn P, Parikh NU, Starbuck MW, Thompson JT, Lee F, Logothetis CJ & Darnay BG. Dasatinib inhibits both osteoclast activation and prostate cancer PC-3-cell-induced osteoclast formation. *Cancer Biol Ther.* 2009;8:2153-2159.
- [108] Brownlow N, Mol C, Hayford C, Ghaem-Maghamsi S & Dibb NJ. Dasatinib is a potent inhibitor of tumour-associated macrophages, osteoclasts and the FMS receptor. *Leukemia.* 2009;23:590-594.
- [109] Vandyke K, Dewar AL, Diamond P, Fitter S, Schultz CG, Sims NA & Zannettino AC. The tyrosine kinase inhibitor dasatinib dysregulates bone remodeling through inhibition of osteoclasts in vivo. *J Bone Miner Res.* 2010;25:1759-1770.
- [110] Futosi K, Nemeth T, Pick R, Vantus T, Walzog B & Mocsai A. Dasatinib inhibits proinflammatory functions of mature human neutrophils. *Blood.* 2012;119:4981-4991.
- [111] Schwarzbich MA, Gutknecht M, Salih J, Salih HR, Brossart P, Rittig SM & Grunebach F. The immune inhibitory receptor osteoactivin is upregulated in monocyte-derived dendritic cells by BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Immunol Immunother.* 2012;61:193-202.
- [112] Fujita H, Kitawaki T, Sato T, Maeda T, Kamihira S, Takaori-Kondo A & Kadowaki N. The tyrosine kinase inhibitor dasatinib suppresses cytokine production by plasmacytoid dendritic cells by targeting endosomal transport of CpG DNA. *Eur J Immunol.* 2013;43:93-103.
- [113] Wöflfl M, Schwinn S, Yoo YE, Ress ML, Braun M, Chopra M, Schreiber SC, Ayala VI, Ohlen C, Eyrich M, Beilhack A & Schlegel PG. Src-kinase inhibitors sensitize human cells of myeloid origin to Toll-like-receptor-induced interleukin 12 synthesis. *Blood.* 2013;122:1203-1213.
- [114] Bendall SC, Simonds EF, Qiu P, Amir El AD, Krutzik PO, Finck R, Bruggner RV, Melamed R, Trejo A, Ornatsky OI, Balderas RS, Plevritis SK, Sachs K, Pe'er D, Tanner SD & Nolan GP. Single-cell mass cytometry of differential immune and drug responses across a human hematopoietic continuum. *Science.* 2011;332:687-696.
- [115] Mccaig AM, Cosimo E, Leach MT & Michie AM. Dasatinib inhibits B cell receptor signalling in chronic lymphocytic leukaemia but novel combination approaches are required to overcome additional pro-survival microenvironmental signals. *Br J Haematol.* 2011;153:199-211.
- [116] Bosco R, Rabusin M, Voltan R, Celeghini C, Corallini F, Capitani S & Secchiero P. Anti-leukemic activity of dasatinib in both p53(wild-type) and p53(mutated) B malignant cells. *Invest New Drugs.* 2012;30:417-422.
- [117] Dargart JL, Fish K, Gordon LI, Longnecker R & Cen O. Dasatinib therapy results in decreased B cell proliferation, splenomegaly, and tumor growth in a murine model of lymphoma expressing Myc and Epstein-Barr virus LMP2A. *Antiviral Res.* 2012;95:49-56.
- [118] De Lavallade H, Khoder A, Hart M, Sarvaria A, Sekine T, Alsuliman A, Mielke S, Bazeos A, Stringaris K, Ali S, Milojkovic D, Foroni L, Chaidos A, Cooper N, Gabriel I, Apperley J, Belsey S, Flanagan RJ, Goldman J, Shpall EJ, Kelleher P, Marin D & Rezvani K. Tyrosine kinase inhibitors impair B-cell immune responses in CML through off-target inhibition of kinases important for cell signaling. *Blood.* 2013;122:227-238.
- [119] Blake SJ, Bruce Lyons A, Fraser CK, Hayball JD & Hughes TP. Dasatinib suppresses in vitro natural killer cell cytotoxicity. *Blood.* 2008;111:4415-4416.

- [120] Salih J, Hilpert J, Placke T, Grunebach F, Steinle A, Salih HR & Krusch M. The BCR/ABL-inhibitors imatinib, nilotinib and dasatinib differentially affect NK cell reactivity. *Int J Cancer*. 2010;127:2119-2128.
- [121] Tanaka J, Sugita J, Shiratori S, Shigematsu A & Imamura M. Dasatinib enhances the expansion of CD56+CD3- NK cells from cord blood. *Blood*. 2012;119:6175-6176.
- [122] Uchiyama T, Sato N, Narita M, Yamahira A, Iwabuchi M, Furukawa T, Sone H & Takahashi M. Direct effect of dasatinib on proliferation and cytotoxicity of natural killer cells in in vitro study. *Hematol Oncol*. 2013;31:156-163.
- [123] Hassold N, Seystahl K, Kempf K, Urlaub D, Zekl M, Einsele H, Watzl C, Wischhusen J & Seggewiss-Bernhardt R. Enhancement of natural killer cell effector functions against selected lymphoma and leukemia cell lines by dasatinib. *Int J Cancer*. 2012;131:E916-927.
- [124] Mazharian A, Ghevaert C, Zhang L, Massberg S & Watson SP. Dasatinib enhances megakaryocyte differentiation but inhibits platelet formation. *Blood*. 2011;117:5198-5206.
- [125] Pogliaghi M, Papagno L, Lambert S, Calin R, Calvez V, Katlama C & Autran B. The tyrosine kinase inhibitor Dasatinib blocks in-vitro HIV-1 production by primary CD4+ T cells from HIV-1 infected patients. *AIDS*. 2014;28:278-281.
- [126] Zilberman M, Shifrovitch Y, Aviv M & Hershkovitz M. Structured drug-eluting bioresorbable films: microstructure and release profile. *J Biomater Appl*. 2009;23:385-406.
- [127] Cope CL. The adrenal cortex in internal medicine. I. *Br Med J*. 1966;2:847-853.
- [128] Coutinho AE & Chapman KE. The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights. *Mol Cell Endocrinol*. 2011;335:2-13.
- [129] Bjoernberg A & Hellgren L. Lotio-Behandlung von Psoriasis capillitii, ein Vergleich zwischen Locacorten und Millicorten. *Dermatol Wochenschr*. 1954;150:673-675.
- [130] Arth GE, Fried J, Johnston DBR, Hoff DR, Sarett LH, Silber RH, Stoerk HC & Winter CA. 16-METHYLATED STEROIDS. II. 16 α -METHYL ANALOGS OF CORTISONE, A NEW GROUP OF ANTI-INFLAMMATORY STEROIDS. 9 α -HALO DERIVATIVES. *Journal of the American Chemical Society*. 1958;80:3161-3163.
- [131] Taub D, Hoffsommer RD, Slates HL & Wendler NL. 16 β -METHYL CORTICAL STEROIDS. *Journal of the American Chemical Society*. 1958;80:4435-4435.
- [132] Jain MR & Srivastava S. Ocular penetration of hydrocortisone and dexamethasone into the aqueous humour after subconjunctival injection. *Trans Ophthalmol Soc U K*. 1978;98:63-65.
- [133] Löwenberg M, Verhaar AP, Bilderbeek J, Marle J, Buttgereit F, Peppelenbosch MP, Van Deventer SJ & Hommes DW. Glucocorticoids cause rapid dissociation of a T-cell-receptor-associated protein complex containing LCK and FYN. *EMBO Rep*. 2006;7:1023-1029.
- [134] Buttgereit F, Straub RH, Wehling M & Burmester GR. Glucocorticoids in the treatment of rheumatic diseases: an update on the mechanisms of action. *Arthritis Rheum*. 2004;50:3408-3417.
- [135] Pratt WB, Galigniana MD, Morishima Y & Murphy PJ. Role of molecular chaperones in steroid receptor action. *Essays Biochem*. 2004;40:41-58.

- [136] Franchimont D. Overview of the actions of glucocorticoids on the immune response: a good model to characterize new pathways of immunosuppression for new treatment strategies. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1024:124-137.
- [137] Boumpas DT, Paliogianni F, Anastassiou ED & Balow JE. Glucocorticosteroid action on the immune system: molecular and cellular aspects. *Clin Exp Rheumatol.* 1991;9:413-423.
- [138] Cato AC & Wade E. Molecular mechanisms of anti-inflammatory action of glucocorticoids. *Bioessays.* 1996;18:371-378.
- [139] Doolan CM, O'sullivan GC & Harvey BJ. Rapid effects of corticosteroids on cytosolic protein kinase C and intracellular calcium concentration in human distal colon. *Mol Cell Endocrinol.* 1998;138:71-79.
- [140] Löwenberg M, Tuynman J, Bilderbeek J, Gaber T, Buttgereit F, Van Deventer S, Peppelenbosch M & Hommes D. Rapid immunosuppressive effects of glucocorticoids mediated through Lck and Fyn. *Blood.* 2005;106:1703-1710.
- [141] Löwenberg M, Verhaar AP, Van Den Brink GR & Hommes DW. Glucocorticoid signaling: a nongenomic mechanism for T-cell immunosuppression. *Trends Mol Med.* 2007;13:158-163.
- [142] Boldizar F, Szabo M, Kvell K, Czompoly T, Talaber G, Bjorkan J, Bartis D, Nemeth P & Berki T. ZAP-70 tyrosines 315 and 492 transmit non-genomic glucocorticoid (GC) effects in T cells. *Mol Immunol.* 2013;53:111-117.
- [143] Boldizar F, Talaber G, Szabo M, Bartis D, Palinkas L, Nemeth P & Berki T. Emerging pathways of non-genomic glucocorticoid (GC) signalling in T cells. *Immunobiology.* 2010;215:521-526.
- [144] Harr MW, Rong Y, Bootman MD, Roderick HL & Distelhorst CW. Glucocorticoid-mediated inhibition of Lck modulates the pattern of T cell receptor-induced calcium signals by down-regulating inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *J Biol Chem.* 2009;284:31860-31871.
- [145] De A, Blotta HM, Mamoni RL, Louzada P, Bertolo MB, Foss NT, Moreira AC & Castro M. Effects of dexamethasone on lymphocyte proliferation and cytokine production in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2002;29:46-51.
- [146] Das S, Giri PP & Roy AK. Dexamethasone- cyclophosphamide pulse in collagen vascular diseases: An observation. *Indian Dermatol Online J.* 2011;2:10-12.
- [147] Dhabhai R, Kalla G, Singhi MK, Ghiya BC & Kachhawa D. Dexamethasone-cyclophosphamide pulse therapy in systemic lupus erythematosus. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2005;71:9-13.
- [148] Kaur S & Kanwar AJ. Dexamethasone-cyclophosphamide pulse therapy in pemphigus. *Int J Dermatol.* 1990;29:371-374.
- [149] Deeg HJ. How I treat refractory acute GVHD. *Blood.* 2007;109:4119-4126.
- [150] Bacigalupo A. Management of acute graft-versus-host disease. *Br J Haematol.* 2007;137:87-98.
- [151] Tsuji D, Kim YI, Nakamichi H, Daimon T, Suwa K, Iwabe Y, Hayashi H, Inoue K, Yoshida M & Itoh K. Association of ABCB1 polymorphisms with the antiemetic efficacy of granisetron plus dexamethasone in breast cancer patients. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2013;28:299-304.

- [152] Dalezis P, Geromichalos GD, Trafalis DT, Pissimissis N, Panagiotopoulou D, Galaktidou G, Papageorgiou E, Papageorgiou A, Daifoti Z, Lymperti M & Koutsilieris M. Dexamethasone plus octreotide regimen increases anticancer effects of docetaxel on TRAMP-C1 prostate cancer model. *In Vivo*. 2012;26:75-86.
- [153] Musto P, Simeon V, Martorelli MC, Petrucci MT, Cascavilla N, Di Raimondo F, Caravita T, Morabito F, Offidani M, Olivieri A, Benevolo G, Mina R, Guariglia R, D'arena G, Mansueto G, Filardi N, Nobile F, Levi A, Falcone A, Cavalli M, Pietrantuono G, Villani O, Bringhen S, Omede P, Lerose R, Agnelli L, Todoerti K, Neri A, Boccadoro M & Palumbo A. Lenalidomide and low-dose dexamethasone for newly diagnosed primary plasma cell leukemia. *Leukemia*. 2014;28:222-225.
- [154] Maggiorini M, Brunner-La Rocca HP, Peth S, Fischler M, Bohm T, Bernheim A, Kiencke S, Bloch KE, Dehnert C, Naeije R, Lehmann T, Bartsch P & Mairbaurl H. Both tadalafil and dexamethasone may reduce the incidence of high-altitude pulmonary edema: a randomized trial. *Ann Intern Med*. 2006;145:497-506.
- [155] Schmelzeisen R & Frolich JC. Prevention of postoperative swelling and pain by dexamethasone after operative removal of impacted third molar teeth. *Eur J Clin Pharmacol*. 1993;44:275-277.
- [156] Abbas AK, Lichtman AH & Pillai S. *Cellular and molecular immunology*. 7th edition. Philadelphia: Elsevier/Saunders; 2012. Chapter 1, 2:1-35.
- [157] Murphy K, Travers P & Walport M. *Janeway Immunologie*. 7. Auflage. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2009. Kapitel 1:1-51.
- [158] Abbas AK, Lichtman AH & Pillai S. *Cellular and molecular immunology*. 7th edition. Philadelphia: Elsevier/Saunders; 2012. Chapter 7:139-172.
- [159] Murphy K, Travers P & Walport M. *Janeway Immunologie*. 7. Auflage. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2009. Kapitel 2:52-139.
- [160] Abbas AK, Lichtman AH & Pillai S. *Cellular and molecular immunology*. 7th edition. Philadelphia: Elsevier/Saunders; 2012. Chapter 8:173-202.
- [161] Abbas AK, Lichtman AH & Pillai S. *Cellular and molecular immunology*. 7th edition. Philadelphia: Elsevier/Saunders; 2012. Chapter 14:319-343.
- [162] Murphy K, Travers P & Walport M. *Janeway Immunologie*. 7. Auflage. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2009. Kapitel 8:407-477.
- [163] Abbas AK, Lichtman AH & Pillai S. *Cellular and molecular immunology*. 7th edition. Philadelphia: Elsevier/Saunders; 2012. Chapter 9:203-224.
- [164] Palacios EH & Weiss A. Function of the Src-family kinases, Lck and Fyn, in T-cell development and activation. *Oncogene*. 2004;23:7990-8000.
- [165] Salmond RJ, Filby A, Qureshi I, Caserta S & Zamoyska R. T-cell receptor proximal signaling via the Src-family kinases, Lck and Fyn, influences T-cell activation, differentiation, and tolerance. *Immunol Rev*. 2009;228:9-22.
- [166] Hermiston ML, Xu Z & Weiss A. CD45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:107-137.

- [167] Mcneill L, Salmond RJ, Cooper JC, Carret CK, Cassady-Cain RL, Roche-Molina M, Tandon P, Holmes N & Alexander DR. The differential regulation of Lck kinase phosphorylation sites by CD45 is critical for T cell receptor signaling responses. *Immunity*. 2007;27:425-437.
- [168] Hernandez-Hoyos G, Sohn SJ, Rothenberg EV & Alberola-Ila J. Lck activity controls CD4/CD8 T cell lineage commitment. *Immunity*. 2000;12:313-322.
- [169] Legname G, Seddon B, Lovatt M, Tomlinson P, Sarnier N, Tolaini M, Williams K, Norton T, Kioussis D & Zamoyska R. Inducible expression of a p56Lck transgene reveals a central role for Lck in the differentiation of CD4 SP thymocytes. *Immunity*. 2000;12:537-546.
- [170] Schmedt C, Saijo K, Niidome T, Kuhn R, Aizawa S & Tarakhovsky A. Csk controls antigen receptor-mediated development and selection of T-lineage cells. *Nature*. 1998;394:901-904.
- [171] Molina TJ, Kishihara K, Siderovski DP, Van Ewijk W, Narendran A, Timms E, Wakeham A, Paige CJ, Hartmann KU, Veillette A, Davidson D & Mak TW. Profound block in thymocyte development in mice lacking p56lck. *Nature*. 1992;357:161-164.
- [172] Abbas AK, Lichtman AH & Pillai S. *Cellular and molecular immunology*. 7th edition. Philadelphia: Elsevier/Saunders; 2012. Appendix I:471-499.
- [173] Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, Leenen PJ, Liu YJ, Macpherson G, Randolph GJ, Scherberich J, Schmitz J, Shortman K, Sozzani S, Strobl H, Zembala M, Austyn JM & Lutz MB. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*. 2010;116:e74-80.
- [174] Banchereau J & Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998;392:245-252.
- [175] Van Nierop K & De Groot C. Human follicular dendritic cells: function, origin and development. *Semin Immunol*. 2002;14:251-257.
- [176] Steinman RM & Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med*. 1973;137:1142-1162.
- [177] Bobryshev YV. Dendritic cells and their role in atherogenesis. *Lab Invest*. 2010;90:970-984.
- [178] Segura E & Amigorena S. Inflammatory dendritic cells in mice and humans. *Trends Immunol*. 2013;34:440-445.
- [179] Langerhans P. Ueber die Nerven der menschlichen Haut. *Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medicin*. 1868;44:325-337.
- [180] The Nobel Foundation. Ralph Steinman Remains Nobel Laureate. The Nobel Foundation. http://www.nobelprize.org/nobel_organizations/nobelfoundation/press_releases_archive/2011/steinman.html. Aufgerufen am 10.04.2014.
- [181] Valladeau J & Saeland S. Cutaneous dendritic cells. *Semin Immunol*. 2005;17:273-283.
- [182] Mayer WJ, Irschick UM, Moser P, Wurm M, Huemer HP, Romani N & Irschick EU. Characterization of antigen-presenting cells in fresh and cultured human corneas using novel dendritic cell markers. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007;48:4459-4467.

- [183] Guermonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Thery C & Amigorena S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:621-667.
- [184] Bates EE, Dieu MC, Ravel O, Zurawski SM, Patel S, Bridon JM, Ait-Yahia S, Vega F, Jr., Banchereau J & Lebecque S. CD40L activation of dendritic cells down-regulates DORA, a novel member of the immunoglobulin superfamily. *Mol Immunol*. 1998;35:513-524.
- [185] De Saint-Vis B, Vincent J, Vandenabeele S, Vanbervliet B, Pin JJ, Ait-Yahia S, Patel S, Mattei MG, Banchereau J, Zurawski S, Davoust J, Caux C & Lebecque S. A novel lysosome-associated membrane glycoprotein, DC-LAMP, induced upon DC maturation, is transiently expressed in MHC class II compartment. *Immunity*. 1998;9:325-336.
- [186] Bjorck P, Flores-Romo L & Liu YJ. Human interdigitating dendritic cells directly stimulate CD40-activated naive B cells. *Eur J Immunol*. 1997;27:1266-1274.
- [187] Takahashi K, Kenji A, Norihiro T, Eisaku K, Takashi O, Kazuhiko H, Tadashi Y & Tadaatsu A. Morphological interactions of interdigitating dendritic cells with B and T cells in human mesenteric lymph nodes. *Am J Pathol*. 2001;159:131-138.
- [188] Segura E, Touzot M, Bohineust A, Cappuccio A, Chiochia G, Hosmalin A, Dalod M, Soumelis V & Amigorena S. Human inflammatory dendritic cells induce Th17 cell differentiation. *Immunity*. 2013;38:336-348.
- [189] Guttman-Yassky E, Lowes MA, Fuentes-Duculan J, Whynot J, Novitskaya I, Cardinale I, Haider A, Khatcherian A, Carucci JA, Bergman R & Krueger JG. Major differences in inflammatory dendritic cells and their products distinguish atopic dermatitis from psoriasis. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;119:1210-1217.
- [190] Aguzzi A, Kranich J & Krautler NJ. Follicular dendritic cells: origin, phenotype, and function in health and disease. *Trends Immunol*. 2014;35:105-113.
- [191] Kassianos AJ, Hardy MY, Ju X, Vijayan D, Ding Y, Vulink AJ, McDonald KJ, Jongbloed SL, Wadley RB, Wells C, Hart DN & Radford KJ. Human CD1c (BDCA-1)+ myeloid dendritic cells secrete IL-10 and display an immuno-regulatory phenotype and function in response to *Escherichia coli*. *Eur J Immunol*. 2012;42:1512-1522.
- [192] Sallusto F & Lanzavecchia A. The instructive role of dendritic cells on T-cell responses. *Arthritis Res*. 2002;4 Suppl 3:S127-132.
- [193] Yang GX, Lian ZX, Kikuchi K, Moritoki Y, Ansari AA, Liu YJ, Ikehara S & Gershwin ME. Plasmacytoid dendritic cells of different origins have distinct characteristics and function: studies of lymphoid progenitors versus myeloid progenitors. *J Immunol*. 2005;175:7281-7287.
- [194] Lindstedt M, Lundberg K & Borrebaeck CA. Gene family clustering identifies functionally associated subsets of human in vivo blood and tonsillar dendritic cells. *J Immunol*. 2005;175:4839-4846.
- [195] Jongbloed SL, Kassianos AJ, McDonald KJ, Clark GJ, Ju X, Angel CE, Chen CJ, Dunbar PR, Wadley RB, Jeet V, Vulink AJ, Hart DN & Radford KJ. Human CD141+ (BDCA-3)+ dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens. *J Exp Med*. 2010;207:1247-1260.
- [196] Poulin LF, Salio M, Griessinger E, Anjos-Afonso F, Craciun L, Chen JL, Keller AM, Joffre O, Zelenay S, Nye E, Le Moine A, Faure F, Donckier V, Sancho D, Cerundolo V, Bonnet D & Reis E Sousa C.

Characterization of human DNCR-1+ BDCA3+ leukocytes as putative equivalents of mouse CD8alpha+ dendritic cells. *J Exp Med*. 2010;207:1261-1271.

[197] Bechemtoille N, Andre V, Valladeau J, Perrier E & Dezutter-Dambuyant C. Mixed Langerhans cell and interstitial/dermal dendritic cell subsets emanating from monocytes in Th2-mediated inflammatory conditions respond differently to proinflammatory stimuli. *J Leukoc Biol*. 2006;80:45-58.

[198] Van Der Aar AM, Sylva-Steenland RM, Bos JD, Kapsenberg ML, De Jong EC & Teunissen MB. Loss of TLR2, TLR4, and TLR5 on Langerhans cells abolishes bacterial recognition. *J Immunol*. 2007;178:1986-1990.

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

[200] Meng F & Lowell CA. Lipopolysaccharide (LPS)-induced macrophage activation and signal transduction in the absence of Src-family kinases Hck, Fgr, and Lyn. *J Exp Med*. 1997;185:1661-1670.

[201] Keck S, Freudenberg M & Huber M. Activation of murine macrophages via TLR2 and TLR4 is negatively regulated by a Lyn/PI3K module and promoted by SHIP1. *J Immunol*. 2010;184:5809-5818.

[202] Kagan JC & Medzhitov R. Phosphoinositide-mediated adaptor recruitment controls Toll-like receptor signaling. *Cell*. 2006;125:943-955.

[203] Reddy EP, Korapati A, Chaturvedi P & Rane S. IL-3 signaling and the role of Src kinases, JAKs and STATs: a covert liaison unveiled. *Oncogene*. 2000;19:2532-2547.

[204] Hayakawa F & Naoe T. SFK-STAT pathway: an alternative and important way to malignancies. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1086:213-222.

[205] Leibbrandt A & Penninger JM. RANK/RANKL: regulators of immune responses and bone physiology. *Ann N Y Acad Sci*. 2008;1143:123-150.

[206] Hausherr A, Tavares R, Schaffer M, Obermeier A, Miksch C, Mitina O, Ellwart J, Hallek M & Krause G. Inhibition of IL-6-dependent growth of myeloma cells by an acidic peptide repressing the gp130-mediated activation of Src family kinases. *Oncogene*. 2007;26:4987-4998.

[207] Tomkowicz B, Lee C, Ravyn V, Cheung R, Ptasznik A & Collman RG. The Src kinase Lyn is required for CCR5 signaling in response to MIP-1beta and R5 HIV-1 gp120 in human macrophages. *Blood*. 2006;108:1145-1150.

[208] Cheung R, Malik M, Ravyn V, Tomkowicz B, Ptasznik A & Collman RG. An arrestin-dependent multi-kinase signaling complex mediates MIP-1beta/CCL4 signaling and chemotaxis of primary human macrophages. *J Leukoc Biol*. 2009;86:833-845.

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

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

- [211] Saeki H, Moore AM, Brown MJ & Hwang ST. Cutting edge: secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC) and CC chemokine receptor 7 (CCR7) participate in the emigration pathway of mature dendritic cells from the skin to regional lymph nodes. *J Immunol.* 1999;162:2472-2475.
- [212] Kellermann SA, Hudak S, Oldham ER, Liu YJ & Mcevoy LM. The CC chemokine receptor-7 ligands 6CKine and macrophage inflammatory protein-3 beta are potent chemoattractants for in vitro- and in vivo-derived dendritic cells. *J Immunol.* 1999;162:3859-3864.
- [213] Robbiani DF, Finch RA, Jager D, Muller WA, Sartorelli AC & Randolph GJ. The leukotriene C(4) transporter MRP1 regulates CCL19 (MIP-3beta, ELC)-dependent mobilization of dendritic cells to lymph nodes. *Cell.* 2000;103:757-768.
- [214] Takeuchi H, Fujimoto A, Tanaka M, Yamano T, Hsueh E & Hoon DS. CCL21 chemokine regulates chemokine receptor CCR7 bearing malignant melanoma cells. *Clin Cancer Res.* 2004;10:2351-2358.
- [215] Randolph GJ, Ochando J & Partida-Sanchez S. Migration of dendritic cell subsets and their precursors. *Annu Rev Immunol.* 2008;26:293-316.
- [216] Kissenpfennig A, Henri S, Dubois B, Laplace-Builhe C, Perrin P, Romani N, Tripp CH, Douillard P, Leserman L, Kaiserlian D, Saeland S, Davoust J & Malissen B. Dynamics and function of Langerhans cells in vivo: dermal dendritic cells colonize lymph node areas distinct from slower migrating Langerhans cells. *Immunity.* 2005;22:643-654.
- [217] Johansson-Lindbom B, Svensson M, Pabst O, Palmqvist C, Marquez G, Forster R & Agace WW. Functional specialization of gut CD103+ dendritic cells in the regulation of tissue-selective T cell homing. *J Exp Med.* 2005;202:1063-1073.
- [218] Ohl L, Mohaupt M, Czeloth N, Hintzen G, Kiafard Z, Zwirner J, Blankenstein T, Henning G & Forster R. CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions. *Immunity.* 2004;21:279-288.
- [219] Rozengurt E. Mitogenic signaling pathways induced by G protein-coupled receptors. *J Cell Physiol.* 2007;213:589-602.
- [220] Luttrell LM, Daaka Y & Lefkowitz RJ. Regulation of tyrosine kinase cascades by G-protein-coupled receptors. *Curr Opin Cell Biol.* 1999;11:177-183.
- [221] Luttrell LM, Hawes BE, Van Biesen T, Luttrell DK, Lansing TJ & Lefkowitz RJ. Role of c-Src tyrosine kinase in G protein-coupled receptor- and Gbetagamma subunit-mediated activation of mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem.* 1996;271:19443-19450.
- [222] Ptasznik A, Traynor-Kaplan A & Bokoch GM. G protein-coupled chemoattractant receptors regulate Lyn tyrosine kinase.Shc adapter protein signaling complexes. *J Biol Chem.* 1995;270:19969-19973.
- [223] Scandella E, Men Y, Legler DF, Gillessen S, Prikler L, Ludewig B & Groettrup M. CCL19/CCL21-triggered signal transduction and migration of dendritic cells requires prostaglandin E2. *Blood.* 2004;103:1595-1601.
- [224] Randolph GJ. Dendritic cell migration to lymph nodes: cytokines, chemokines, and lipid mediators. *Semin Immunol.* 2001;13:267-274.

- [225] Huttenlocher A & Horwitz AR. Integrins in cell migration. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011;3:a005074.
- [226] Alvarez D, Vollmann EH & Von Andrian UH. Mechanisms and consequences of dendritic cell migration. *Immunity.* 2008;29:325-342.
- [227] Baruzzi A, Cavegion E & Berton G. Regulation of phagocyte migration and recruitment by Src-family kinases. *Cell Mol Life Sci.* 2008;65:2175-2190.
- [228] Summy JM & Gallick GE. Src family kinases in tumor progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 2003;22:337-358.
- [229] Bjorklund A, Aschan J, Labopin M, Remberger M, Ringden O, Winiarski J & Ljungman P. Risk factors for fatal infectious complications developing late after allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2007;40:1055-1062.
- [230] Van Burik JA, Carter SL, Freifeld AG, High KP, Godder KT, Papanicolaou GA, Mendizabal AM, Wagner JE, Yanovich S & Kernan NA. Higher risk of cytomegalovirus and aspergillus infections in recipients of T cell-depleted unrelated bone marrow: analysis of infectious complications in patients treated with T cell depletion versus immunosuppressive therapy to prevent graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2007;13:1487-1498.
- [231] Marr KA, Carter RA, Boeckh M, Martin P & Corey L. Invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients: changes in epidemiology and risk factors. *Blood.* 2002;100:4358-4366.
- [232] Cordonnier C, Chevret S, Legrand M, Rafi H, Dhedin N, Lehmann B, Bassompierre F & Gluckman E. Should immunoglobulin therapy be used in allogeneic stem-cell transplantation? A randomized, double-blind, dose effect, placebo-controlled, multicenter trial. *Ann Intern Med.* 2003;139:8-18.
- [233] Kim YM, Sachs T, Asavaroengchai W, Bronson R & Sykes M. Graft-versus-host disease can be separated from graft-versus-lymphoma effects by control of lymphocyte trafficking with FTY720. *J Clin Invest.* 2003;111:659-669.
- [234] Zhang C, Lou J, Li N, Todorov I, Lin CL, Cao YA, Contag CH, Kandeel F, Forman S & Zeng D. Donor CD8+ T cells mediate graft-versus-leukemia activity without clinical signs of graft-versus-host disease in recipients conditioned with anti-CD3 monoclonal antibody. *J Immunol.* 2007;178:838-850.
- [235] Zheng H, Matte-Martone C, Li H, Anderson BE, Venketesan S, Sheng Tan H, Jain D, Mcniff J & Shlomchik WD. Effector memory CD4+ T cells mediate graft-versus-leukemia without inducing graft-versus-host disease. *Blood.* 2008;111:2476-2484.
- [236] Shimoni A, Kroger N, Zander AR, Rowe JM, Hardan I, Avigdor A, Yeshurun M, Ben-Bassat I & Nagler A. Imatinib mesylate (STI571) in preparation for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation and donor lymphocyte infusions in patients with Philadelphia-positive acute leukemias. *Leukemia.* 2003;17:290-297.
- [237] Jabbour E, Cortes J, Kantarjian H, Giralt S, Andersson BS, Giles F, Shpall E, Kebriaei P, Champlin R & De Lima M. Novel tyrosine kinase inhibitor therapy before allogeneic stem cell transplantation in patients with chronic myeloid leukemia: no evidence for increased transplant-related toxicity. *Cancer.* 2007;110:340-344.

- [238] Breccia M, Cannella L, Stefanizzi C, Carotti A, Santopietro M & Alimena G. Efficacy of dasatinib in a chronic myeloid leukemia patient with disease molecular relapse and chronic GVHD after haploidentical BMT: an immunomodulatory effect? *Bone Marrow Transplant.* 2009;44:331-332.
- [239] Garland P, Dazzi F & Marin D. Dasatinib may not suppress the GVL effect of donor lymphocyte infusions for CML. *Bone Marrow Transplant.* 2010;45:395-396.
- [240] Steinman RM. Decisions about dendritic cells: past, present, and future. *Annu Rev Immunol.* 2012;30:1-22.
- [241] Galluzzi L, Senovilla L, Vacchelli E, Eggermont A, Fridman WH, Galon J, Sautes-Fridman C, Tartour E, Zitvogel L & Kroemer G. Trial watch: Dendritic cell-based interventions for cancer therapy. *Oncoimmunology.* 2012;1:1111-1134.
- [242] Aarntzen EH, Srinivas M, Schreiber G, Heerschap A, Punt CJ, Figdor CG, Oyen WJ & De Vries IJ. Reducing cell number improves the homing of dendritic cells to lymph nodes upon intradermal vaccination. *Oncoimmunology.* 2013;2:e24661.
- [243] English D & Andersen BR. Single-step separation of red blood cells. Granulocytes and mononuclear leukocytes on discontinuous density gradients of Ficoll-Hypaque. *J Immunol Methods.* 1974;5:249-252.
- [244] Seggewiss R, Lore K, Greiner E, Magnusson MK, Price DA, Douek DC, Dunbar CE & Wiestner A. Imatinib inhibits T-cell receptor-mediated T-cell proliferation and activation in a dose-dependent manner. *Blood.* 2005;105:2473-2479.
- [245] Kim HJ, Yang JS, Woo SS, Kim SK, Yun CH, Kim KK & Han SH. Lipoteichoic acid and muramyl dipeptide synergistically induce maturation of human dendritic cells and concurrent expression of proinflammatory cytokines. *J Leukoc Biol.* 2007;81:983-989.
- [246] Scandella E, Men Y, Gillessen S, Forster R & Groettrup M. Prostaglandin E2 is a key factor for CCR7 surface expression and migration of monocyte-derived dendritic cells. *Blood.* 2002;100:1354-1361.
- [247] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227:680-685.
- [248] Loew D, Schuster O & Graul EH. Dose-dependent pharmacokinetics of dexamethasone. *Eur J Clin Pharmacol.* 1986;30:225-230.
- [249] Kumar S, Allen DA, Kieswich JE, Patel NS, Harwood S, Mazzon E, Cuzzocrea S, Raftery MJ, Thiemermann C & Yaqoob MM. Dexamethasone ameliorates renal ischemia-reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20:2412-2425.
- [250] Ishida Y & Heersche JN. Glucocorticoid-induced osteoporosis: both in vivo and in vitro concentrations of glucocorticoids higher than physiological levels attenuate osteoblast differentiation. *J Bone Miner Res.* 1998;13:1822-1826.
- [251] Weisberg E, Manley PW, Cowan-Jacob SW, Hochhaus A & Griffin JD. Second generation inhibitors of BCR-ABL for the treatment of imatinib-resistant chronic myeloid leukaemia. *Nat Rev Cancer.* 2007;7:345-356.
- [252] Brave M, Goodman V, Kaminskas E, Farrell A, Timmer W, Pope S, Harapanhalli R, Saber H, Morse D, Bullock J, Men A, Noory C, Ramchandani R, Kenna L, Booth B, Gobburu J, Jiang X, Sridhara R, Justice R &

- Pazdur R. Sprycel for chronic myeloid leukemia and Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia resistant to or intolerant of imatinib mesylate. *Clin Cancer Res.* 2008;14:352-359.
- [253] Furlong MT, Agrawal S, Hawthorne D, Lago M, Unger S, Krueger L & Stouffer B. A validated LC-MS/MS assay for the simultaneous determination of the anti-leukemic agent dasatinib and two pharmacologically active metabolites in human plasma: application to a clinical pharmacokinetic study. *J Pharm Biomed Anal.* 2012;58:130-135.
- [254] Brandl C, Haas C, D'argouges S, Fisch T, Kufer P, Brischwein K, Prang N, Bargou R, Suzich J, Baeuerle PA & Hofmeister R. The effect of dexamethasone on polyclonal T cell activation and redirected target cell lysis as induced by a CD19/CD3-bispecific single-chain antibody construct. *Cancer Immunol Immunother.* 2007;56:1551-1563.
- [255] Schade AE, Schieven GL, Townsend R, Jankowska AM, Susulic V, Zhang R, Szpurka H & Maciejewski JP. Dasatinib, a small-molecule protein tyrosine kinase inhibitor, inhibits T-cell activation and proliferation. *Blood.* 2008;111:1366-1377.
- [256] Ghosh MC, Baatar D, Collins G, Carter A, Indig F, Biragyn A & Taub DD. Dexamethasone augments CXCR4-mediated signaling in resting human T cells via the activation of the Src kinase Lck. *Blood.* 2009;113:575-584.
- [257] Spies CM, Gaber T, Hahne M, Naumann L, Tripmacher R, Schellmann S, Stahn C, Burmester GR, Radbruch A & Buttgerit F. Rimexolone inhibits proliferation, cytokine expression and signal transduction of human CD4+ T-cells. *Immunol Lett.* 2010;131:24-32.
- [258] Tsitoura DC & Rothman PB. Enhancement of MEK/ERK signaling promotes glucocorticoid resistance in CD4+ T cells. *J Clin Invest.* 2004;113:619-627.
- [259] Hardwick JS & Sefton BM. The activated form of the Lck tyrosine protein kinase in cells exposed to hydrogen peroxide is phosphorylated at both Tyr-394 and Tyr-505. *J Biol Chem.* 1997;272:25429-25432.
- [260] Di Bartolo V, Mege D, Germain V, Pelosi M, Dufour E, Michel F, Magistrelli G, Isacchi A & Acuto O. Tyrosine 319, a newly identified phosphorylation site of ZAP-70, plays a critical role in T cell antigen receptor signaling. *J Biol Chem.* 1999;274:6285-6294.
- [261] Strauss G, Osen W & Debatin KM. Induction of apoptosis and modulation of activation and effector function in T cells by immunosuppressive drugs. *Clin Exp Immunol.* 2002;128:255-266.
- [262] Hamann D, Baars PA, Rep MH, Hooibrink B, Kerkhof-Garde SR, Klein MR & Van Lier RA. Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8+ T cells. *J Exp Med.* 1997;186:1407-1418.
- [263] Sallusto F, Geginat J & Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:745-763.
- [264] Hantschel O, Rix U & Superti-Furga G. Target spectrum of the BCR-ABL inhibitors imatinib, nilotinib and dasatinib. *Leuk Lymphoma.* 2008;49:615-619.
- [265] Bain J, Plater L, Elliott M, Shpiro N, Hastie CJ, Mclauchlan H, Klevernic I, Arthur JS, Alessi DR & Cohen P. The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochem J.* 2007;408:297-315.

- [266] Leung EL, Tam IY, Tin VP, Chua DT, Sihoe AD, Cheng LC, Ho JC, Chung LP & Wong MP. SRC promotes survival and invasion of lung cancers with epidermal growth factor receptor abnormalities and is a potential candidate for molecular-targeted therapy. *Mol Cancer Res.* 2009;7:923-932.
- [267] Zhang H, Meng F, Chu CL, Takai T & Lowell CA. The Src family kinases Hck and Fgr negatively regulate neutrophil and dendritic cell chemokine signaling via PIR-B. *Immunity.* 2005;22:235-246.
- [268] Ohta M, Ishida A, Toda M, Akita K, Inoue M, Yamashita K, Watanabe M, Murata T, Usui T & Nakada H. Immunomodulation of monocyte-derived dendritic cells through ligation of tumor-produced mucins to Siglec-9. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;402:663-669.
- [269] Walter RB, Hausermann P, Raden BW, Teckchandani AM, Kamikura DM, Bernstein ID & Cooper JA. Phosphorylated ITIMs enable ubiquitylation of an inhibitory cell surface receptor. *Traffic.* 2008;9:267-279.
- [270] Daridon C, Blassfeld D, Reiter K, Mei HE, Giesecke C, Goldenberg DM, Hansen A, Hostmann A, Frolich D & Dorner T. Epratuzumab targeting of CD22 affects adhesion molecule expression and migration of B-cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther.* 2010;12:R204.
- [271] Engel P, Nojima Y, Rothstein D, Zhou LJ, Wilson GL, Kehrl JH & Tedder TF. The same epitope on CD22 of B lymphocytes mediates the adhesion of erythrocytes, T and B lymphocytes, neutrophils, and monocytes. *J Immunol.* 1993;150:4719-4732.
- [272] Crocker PR, Paulson JC & Varki A. Siglecs and their roles in the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2007;7:255-266.
- [273] Avril T, Attrill H, Zhang J, Raper A & Crocker PR. Negative regulation of leucocyte functions by CD33-related siglecs. *Biochem Soc Trans.* 2006;34:1024-1027.
- [274] Orr SJ, Morgan NM, Elliott J, Burrows JF, Scott CJ, Mcvicar DW & Johnston JA. CD33 responses are blocked by SOCS3 through accelerated proteasomal-mediated turnover. *Blood.* 2007;109:1061-1068.
- [275] Martin PJ, Rizzo JD, Wingard JR, Ballen K, Curtin PT, Cutler C, Litzow MR, Nieto Y, Savani BN, Schriber JR, Shaughnessy PJ, Wall DA & Carpenter PA. First- and second-line systemic treatment of acute graft-versus-host disease: recommendations of the American Society of Blood and Marrow Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2012;18:1150-1163.
- [276] Pidala J. Graft-vs-host disease following allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Cancer Control.* 2011;18:268-276.
- [277] Couriel D, Carpenter PA, Cutler C, Bolanos-Meade J, Treister NS, Gea-Banacloche J, Shaughnessy P, Hymes S, Kim S, Wayne AS, Chien JW, Neumann J, Mitchell S, Syrjala K, Moravec CK, Abramovitz L, Liebermann J, Berger A, Gerber L, Schubert M, Filipovich AH, Weisdorf D, Schubert MM, Shulman H, Schultz K, Mittelman B, Pavletic S, Vogelsang GB, Martin PJ, Lee SJ & Flowers ME. Ancillary therapy and supportive care of chronic graft-versus-host disease: national institutes of health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic Graft-versus-host disease: V. Ancillary Therapy and Supportive Care Working Group Report. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2006;12:375-396.
- [278] Paliogianni F, Raptis A, Ahuja SS, Najjar SM & Boumpas DT. Negative transcriptional regulation of human interleukin 2 (IL-2) gene by glucocorticoids through interference with nuclear transcription factors AP-1 and NF-AT. *J Clin Invest.* 1993;91:1481-1489.

- [279] Ashwell JD, Lu FW & Vacchio MS. Glucocorticoids in T cell development and function*. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:309-345.
- [280] Macian F, Garcia-Rodriguez C & Rao A. Gene expression elicited by NFAT in the presence or absence of cooperative recruitment of Fos and Jun. *EMBO J.* 2000;19:4783-4795.
- [281] Macian F, Lopez-Rodriguez C & Rao A. Partners in transcription: NFAT and AP-1. *Oncogene.* 2001;20:2476-2489.
- [282] Bartis D, Boldizar F, Szabo M, Palinkas L, Nemeth P & Berki T. Dexamethasone induces rapid tyrosine-phosphorylation of ZAP-70 in Jurkat cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2006;98:147-154.
- [283] Harr MW, Caimi PF, Mccoll KS, Zhong F, Patel SN, Barr PM & Distelhorst CW. Inhibition of Lck enhances glucocorticoid sensitivity and apoptosis in lymphoid cell lines and in chronic lymphocytic leukemia. *Cell Death Differ.* 2010;17:1381-1391.
- [284] Tewari K, Walent J, Svaren J, Zamoyska R & Suresh M. Differential requirement for Lck during primary and memory CD8+ T cell responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:16388-16393.
- [285] Zheng H, Matte-Martone C, Jain D, Mcniff J & Shlomchik WD. Central memory CD8+ T cells induce graft-versus-host disease and mediate graft-versus-leukemia. *J Immunol.* 2009;182:5938-5948.
- [286] Seddon B, Tomlinson P & Zamoyska R. Interleukin 7 and T cell receptor signals regulate homeostasis of CD4 memory cells. *Nat Immunol.* 2003;4:680-686.
- [287] Imagawa J, Tanaka H, Matsumoto K, Morita K, Harada Y & Harada H. A sharp fluctuation in peripheral blood cells shortly after dasatinib administration. *Int J Hematol.* 2012;96:194-199.
- [288] Gao B, Yeap S, Clements A, Balakrishnar B, Wong M & Gurney H. Evidence for therapeutic drug monitoring of targeted anticancer therapies. *J Clin Oncol.* 2012;30:4017-4025.
- [289] Wang X, Roy A, Hochhaus A, Kantarjian HM, Chen TT & Shah NP. Differential effects of dosing regimen on the safety and efficacy of dasatinib: retrospective exposure-response analysis of a Phase III study. *Clin Pharmacol.* 2013;5:85-97.
- [290] Nerreter T, Distler E, Kochel C, Einsele H, Herr W & Seggewiss-Bernhardt R. Combining dasatinib with dexamethasone long-term leads to maintenance of antiviral and antileukemia specific cytotoxic T cell responses in vitro. *Exp Hematol.* 2013;41:604-614.e604.
- [291] Ardeschna KM, Pizzey AR, Devereux S & Khwaja A. The PI3 kinase, p38 SAP kinase, and NF-kappaB signal transduction pathways are involved in the survival and maturation of lipopolysaccharide-stimulated human monocyte-derived dendritic cells. *Blood.* 2000;96:1039-1046.
- [292] Hayes MP, Wang J & Norcross MA. Regulation of interleukin-12 expression in human monocytes: selective priming by interferon-gamma of lipopolysaccharide-inducible p35 and p40 genes. *Blood.* 1995;86:646-650.
- [293] Ma X, Chow JM, Gri G, Carra G, Gerosa F, Wolf SF, Dzialo R & Trinchieri G. The interleukin 12 p40 gene promoter is primed by interferon gamma in monocytic cells. *J Exp Med.* 1996;183:147-157.

- [294] Saito Y, Yanagawa Y, Kikuchi K, Iijima N, Iwabuchi K & Onoe K. Low-dose lipopolysaccharide modifies the production of IL-12 by dendritic cells in response to various cytokines. *J Clin Exp Hematop.* 2006;46:31-36.
- [295] Pilette C, Jacobson MR, Ratajczak C, Detry B, Banfield G, Vansnick J, Durham SR & Nouri-Aria KT. Aberrant dendritic cell function conditions Th2-cell polarization in allergic rhinitis. *Allergy.* 2013;68:312-321.
- [296] Ma YC, Huang J, Ali S, Lowry W & Huang XY. Src tyrosine kinase is a novel direct effector of G proteins. *Cell.* 2000;102:635-646.
- [297] Wan Y, Bence K, Hata A, Kurosaki T, Veillette A & Huang XY. Genetic evidence for a tyrosine kinase cascade preceding the mitogen-activated protein kinase cascade in vertebrate G protein signaling. *J Biol Chem.* 1997;272:17209-17215.
- [298] Inngjerdingen M, Torgersen KM & Maghazachi AA. Lck is required for stromal cell-derived factor 1 alpha (CXCL12)-induced lymphoid cell chemotaxis. *Blood.* 2002;99:4318-4325.
- [299] Ptasznik A, Urbanowska E, Chinta S, Costa MA, Katz BA, Stanislaus MA, Demir G, Linnekin D, Pan ZK & Gewirtz AM. Crosstalk between BCR/ABL oncoprotein and CXCR4 signaling through a Src family kinase in human leukemia cells. *J Exp Med.* 2002;196:667-678.
- [300] Barlic J, Andrews JD, Kelvin AA, Bosinger SE, Devries ME, Xu L, Dobransky T, Feldman RD, Ferguson SS & Kelvin DJ. Regulation of tyrosine kinase activation and granule release through beta-arrestin by CXCR1. *Nat Immunol.* 2000;1:227-233.
- [301] Carlin AF, Uchiyama S, Chang YC, Lewis AL, Nizet V & Varki A. Molecular mimicry of host sialylated glycans allows a bacterial pathogen to engage neutrophil Siglec-9 and dampen the innate immune response. *Blood.* 2009;113:3333-3336.
- [302] Lowe DB, Bose A, Taylor JL, Tawbi H, Lin Y, Kirkwood JM & Storkus WJ. Dasatinib promotes the expansion of a therapeutically superior T-cell repertoire in response to dendritic cell vaccination against melanoma. *Oncoimmunology.* 2014;3:e27589.

6. Anhang

6.1. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------|---|
| % | Prozent |
| °C | Grad Celsius |
| µ- | mikro-, 10 ⁻⁶ |
| 7-AAD | 7-Aminoactinomycin-D |
| ABL | <i>Abelson murine leukemia viral oncogene homolog</i> |
| ACK | <i>Activated CDC42 Kinase</i> |
| AKT1 | <i>v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1</i> |
| ALL | Akute lymphatische Leukämie |
| AML | Akute myeloische Leukämie |
| AnnV | Annexin V |
| AP-1 | Transkriptionsfaktor, <i>activator protein 1</i> |
| APC | Allophycocyanin |
| APCs | <i>Antigen presenting cells</i> (Antigen-präsentierende Zellen) |
| APS | Ammoniumperoxodisulfat |
| <i>Aqua dest.</i> | <i>aqua destillata</i> , destilliertes Wasser |
| ATP | Adenosin-Triphosphat |
| BCR-ABL | Fusionsprotein aus BCR (<i>breakpoint cluster region</i>) und ABL (<i>Abelson murine leukemia viral oncogene homolog</i>) |
| BDCA1 | CD1c |
| BLK | <i>B lymphoid tyrosine kinase</i> |
| BMDM | <i>Bone marrow-derived macrophages</i> (aus Knochenmark generierte Makrophagen) |
| BSA | Bovines Serumalbumin |
| BTK | <i>Bruton agammaglobulinemia tyrosine kinase</i> |
| B-Zellen | Typ von Immunzellen, das B steht für den Ort der Differenzierung in Vögeln (Bursa Fabricii) |
| bzw. | beziehungsweise |
| c- | zenti- (10 ⁻²) |
| c-SRC | zelluläres SRC |
| ca. | circa |
| CCL | <i>CC chemokine ligand</i> |
| CCR | <i>CC chemokine receptor</i> |
| CD | <i>Cluster of differentiation</i> |
| cDC | <i>conventional dendritic cell</i> |
| CFSE | 6-Carboxyfluorescein-Succinimidylester |
| c-KIT | <i>v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog</i> , CD117 |
| CLL | Chronische lymphatische Leukämie |
| CLP | <i>common lymphoid progenitor</i> |
| CML | Chronische myeloische Leukämie |
| CMP | <i>common myeloid progenitor</i> |
| CMV | Cytomegalievirus |
| CMV-P | CMV-Peptid |
| CO ₂ | Kohlenstoffdioxid |
| CpG-A | CpG Oligonukleotid, Typ A |
| CS | Costimulatorische Moleküle (in dieser Arbeit α-CD28 und α-CD49d als Zusatz zu OKT3) |
| CSK | <i>c-src tyrosine kinase</i> |

| | |
|------------------|---|
| CXCL | <i>Chemokine (C-X-C motif) ligand</i> |
| Da | Dalton |
| Dasa | Dasatinib |
| DC | <i>Dendritic cell</i> (Dendritische Zelle) |
| DC-LAMP | <i>lysosomal-associated membrane protein 3</i> |
| DC-SIGN | CD209 |
| DEXA | Dexamethason |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | <i>Deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure) |
| EBV | Epstein-Barr-Virus |
| EBV-P | EBV-Peptid |
| ECL | <i>enhanced Chemoluminescence</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| EGFR | <i>Epidermal growth factor receptor</i> |
| ELISpot | <i>Enzyme Linked Immuno Spot</i> |
| EPHB | <i>Ephrin type-B receptor</i> |
| ErbB | <i>v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog</i> |
| ERK | <i>Extracellular signal-regulated kinase</i> |
| FACS | <i>Fluorescence-activated cell sorting</i> (Durchflusszytometrie) |
| FAK | <i>Focal Adhesion Kinase, PTK2</i> |
| FcR | Rezeptor, der an Fc (<i>Fragment, crystallizable</i>)-Regionen von Immunglobulinen bindet |
| FCS | <i>fetal calve serum</i> , Fetales Kälberserum |
| fDC | follikuläre Dendritische Zelle |
| FES | <i>Feline sarcoma oncogene</i> |
| FGR | <i>Feline Gardner-Rasheed sarcoma viral oncogene homolog</i> |
| FITC | Fluorescein-Isothiocyanat |
| FoxP3 | Transkriptionsfaktor, <i>Forkhead box protein 3</i> |
| FRK | <i>Fyn-related kinase</i> |
| FSC | <i>Forward light scatter</i> (Vorwärtsstreulicht) |
| FYN | <i>FYN oncogene related to SRC, FGR, YES</i> |
| g | Gramm |
| GAK | <i>Cyclin G-associated kinase</i> |
| GM-CSF | <i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i> |
| Grb2 | <i>Growth factor receptor-bound protein 2</i> |
| GRE | <i>Glucocorticoid-responsive elements</i> |
| GvHD | <i>Graft-versus-Host Disease</i> |
| GvL | <i>Graft-versus-Leukemia</i> |
| h | Stunde(n) |
| H ₂ O | Wasser |
| HCK | <i>Hemopoietic cell kinase</i> |
| HIV | Humanes Immundefizienz-Virus |
| HLA | <i>Human leukocyte antigen</i> |
| HRP | <i>Horseradish peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase) |
| HSCT | <i>Hematopoietic stemcell transplantation</i> (Hämatopoetische Stammzelltransplantation) |
| HSP | Hitzeschockprotein |
| iDC | Interstitielle oder interdigitierende Dendritische Zelle (siehe 1.6.2.) |
| IFN | Interferon |
| Ig | Immunglobulin |
| IL | Interleukin |
| ILT | <i>Ig-like transcript receptor</i> |
| infDC | inflammatorische Dendritische Zellen |
| IP ₃ | Inositoltriphosphat |

| | |
|------------|--|
| ITAM | <i>Immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i> |
| ITIM | <i>Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif</i> |
| IUIS | <i>International Union of Immunological Societies</i> |
| IUPAC | <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> |
| JAK | Januskinase |
| k- | kilo-, 10^3 |
| l | Liter |
| LAT | <i>Linker of activated T cells</i> |
| LC | Langerhans-Zelle |
| LCK | <i>Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase</i> |
| LFA-1 | <i>Lymphocyte function-associated antigen 1 (CD11a)</i> |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| LYN | <i>v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog</i> |
| M | Molar (mol/l) |
| m | Meter |
| m- | milli-, 10^{-3} |
| Mac-1 | <i>Integrin, beta 2 (CD18)</i> |
| MACS | <i>Magnetic Cell Separation</i> |
| MAP | <i>Mitogen-activated protein</i> |
| MAPK | <i>Mitogen-activated protein kinase</i> |
| MAP2K | <i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i> |
| MAP3K | <i>Mitogen-activated protein kinase kinase kinase</i> |
| M-CSFR | <i>Macrophage colony-stimulating factor receptor</i> |
| mDC | <i>myeloid dendritic cell</i> |
| MDR1 | <i>„Multidrug resistance protein 1“, ABCB1</i> |
| MEK1 | <i>MAP2K1, Mitogen-activated protein kinase kinase 1</i> |
| MEK2 | <i>MAP2K2, Mitogen-activated protein kinase kinase 2</i> |
| MFI | <i>Mean fluorescence intensity (mittlere Fluoreszenzintensität)</i> |
| MHC | <i>Major Histocompatibility Complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)</i> |
| min | Minute |
| moDC | <i>Monocyte-derived Dendritic cell (aus Monozyten generierte Dendritische Zelle)</i> |
| mol | Mol |
| MOPS | 3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure |
| MRP1 | <i>Multidrug-resistance-associated protein 1, ABCC1</i> |
| MSDC | Myeloid-derived suppressor cell |
| N | Normalität (Gehaltsangabe) |
| n- | nano-, 10^{-9} |
| NFAT | Transkriptionsfaktor, <i>Nuclear factor of activated T-cells</i> |
| NFκB | Transkriptionsfaktor <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i> |
| Nilo | Nilotinib |
| NK-Zellen | Natürliche Killer-Zellen |
| NKT-Zellen | Natürliche Killer-T-Zellen |
| nRTK | Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase |
| p- | piko-, 10^{-12} |
| p-38 | p38-mitogenaktivierte Proteinkinase |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| PBL | <i>peripheral blood lymphocytes (Lymphozyten des peripheren Blutes)</i> |
| PBMC | <i>peripheral blood mononuclear cells (mononukleäre periphere Blutzellen)</i> |
| PBS | <i>Phosphate-buffered saline, Phosphat-gepufferte Salzlösung</i> |
| pDC | plasmazytoide Dendritische Zellen |
| PE | Phycocerythrin |
| PerCP | Peridinin-Chlorophyll |

| | |
|------------------|---|
| pErk1/2 | Phosphoryliertes ERK1/2 |
| PFA | Paraformaldehyd |
| pH | <i>per Hydronium</i> |
| PI3K | Phosphoinositid-3-Kinase |
| PIR-B | <i>Paired Ig-like receptor B</i> |
| PKC | Proteinkinase C |
| PLC | Phospholipase C |
| pLCK | Phosphoryliertes LCK |
| PSGL-1 | <i>P-selectin glycoprotein ligand-1</i> |
| pSRC family | Phosphorylierte SFKs |
| PYK | <i>Phosphorylase kinase</i> |
| pZAP70 | Phosphoryliertes ZAP70 |
| Ras | <i>“Rat sarcoma”, p21</i> |
| Rho | <i>„Ras homologue“, GTPase</i> |
| RIPA | <i>Radioimmunoprecipitation assay buffer</i> |
| rpm | <i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute) |
| RTK | Rezeptor-Tyrosinkinasen |
| SCLC | <i>Small-cell carcinoma of the lung</i> (kleinzelliges Bronchialkarzinom) |
| SDS | <i>Sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat) |
| sec | Sekunde(n) |
| SEM | <i>Standard error of the mean</i> (Standardfehler) |
| SFI | <i>Specific fluorescence intensity</i> (spezifische Fluoreszenzintensität, s. 2.2.2.1.) |
| SFK | <i>SRC-family kinase</i> (Kinasen der SRC-Familie) |
| SH- | SRC-Homologie-(Domäne) |
| SHIP | <i>Src homology region 2 domain-containing Inositol polyphosphate-5-phosphatase</i> |
| SHP | <i>Src homology region 2 domain-containing phosphatase</i> |
| Siglec | <i>Sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins</i> |
| SKI-1 | <i>SRC kinase inhibitor 1</i> |
| Slan | 6-sulfo LacNAc (N-Acetyl-D-Lactosamin) |
| SLP-76 | <i>SH2 domain containing leukocyte protein of 76kDa</i> |
| SOS | <i>“Son of Sevenless”, Guaninnukleotid-Austauschfaktor</i> |
| SRC | <i>v-src avian sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog</i> |
| SRMS | <i>Src-related kinase lacking C-terminal regulatory tyrosine and N-terminal myristylation sites</i> |
| SSC | <i>Sideward light scatter</i> (Seitwärtsstreulicht) |
| STAT | <i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i> |
| SYK | <i>Spleen tyrosine kinase</i> |
| T | Threonin |
| TBS | <i>TRIS-buffered saline</i> |
| TBS-T | TBS + 0,1% Tween 20 |
| TCR | <i>T cell receptor</i> (T-Zell-Rezeptor) |
| TEC | <i>Tec protein tyrosine kinase</i> |
| TEMED | Tetramethylethyldiamin |
| Tet | Tetracyclin |
| TGF | <i>Transforming growth factor</i> |
| T _h | <i>T helper cell</i> (T-Helferzelle) |
| TIL | tumorinfiltrierende Lymphozyten |
| TKI | Tyrosinkinaseinhibitor |
| TLR | <i>Toll-like</i> Rezeptoren |
| TNF | Tumornekrosefaktor |
| TRAF | <i>TNF receptor associated factor</i> |
| T _{Reg} | Regulatorische T-Zellen |

| | |
|----------|--|
| TREM | <i>Triggering receptor expressed on myeloid cells</i> |
| TRIS | tris (hydroxymethyl)-aminomethan |
| T-Zellen | Typ von Immunzellen, das T steht für den Ort der Differenzierung, den Thymus |
| U | <i>units</i> (Einheiten) |
| U-Domäne | <i>Unique</i> , charakteristische Domäne einer spezifischen SFK |
| V | Volt |
| v-SRC | virales SRC |
| vgl. | vergleiche |
| VLA-4 | “ <i>Very Late Antigen-4</i> ”, Integrin $\alpha_4\beta_1$ |
| Vorb. | Vorbehandlung |
| vs. | versus |
| w/v | <i>weight per volume</i> |
| WASp | <i>Wiskott–Aldrich syndrome protein</i> |
| WHO | <i>World Health Organisation</i> (Weltgesundheits-Organisation) |
| xg | Vielfaches der Erdbeschleunigung |
| Y | Tyrosin |
| YES | <i>v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral oncogene homolog 1</i> |
| z.B. | zum Beispiel |
| ZAP | <i>Zeta-chain-associated protein kinase</i> |
| ZBTB46 | <i>Zinc finger and BTB domain containing 46</i> |

6.2. Eidesstattliche Erklärung/Affidavit

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Untersuchungen über den Einfluss des Tyrosinkinaseinhibitors Dasatinib auf die Funktion von T-Zellen und aus Monozyten generierten Dendritischen Zellen“ eigenständig, d.h. insbesondere selbstständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Würzburg, 25.04.2014
Ort, Datum

Unterschrift

Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled “Studies on the effect of the tyrosine-kinase inhibitor dasatinib on function of T cells and monocyte-derived dendritic cells” is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Würzburg, 25.04.2014
Place, Date

Signature

6.3. Danksagung

Mein erster Dank geht an PD Dr. Ruth Seggewiß-Bernhardt für die Stellung des Themas und die fruchtbare Zusammenarbeit während der Zeit meiner Promotion.

Weitere große „Dankeschöns“ gehen an Prof. Dr. Thomas Hünig und Prof. Dr. Thomas Herrmann für die Übernahme der Co-Betreuung in meinem Promotionskomitee und für die zahlreichen gewinnbringenden Anregungen.

Bedanken möchte ich mich natürlich auch bei Prof. Dr. Thomas Müller, der sich bereit erklärte, den Vorsitz meines Promotionskomitees zu übernehmen.

Als nächstes möchte ich Prof. Dr. Hermann Einsele und Prof. Dr. Ralf Bargou meinen Dank aussprechen, die als meine „obersten Chefs“ diese Arbeit mit ermöglicht haben.

„Danke“ für eine schöne Zeit möchte ich den Mitgliedern der AG Seggewiß sagen, vor allem Stephan Zeiß, Julian Lohmeyer und Sarah Lill. Das gilt natürlich auch für Carolin Köchel und Irina Eichelbröner die mich zudem in vielfältigster Weise unterstützt haben; danke auch fürs Korrekturlesen!

Vielen Dank auch den Mitgliedern der anderen Arbeitsgruppen in C11 (Gruppen von Prof. Dr. Jürgen Löffler, Dr. Götz Ulrich Grigoleit, Prof. Dr. Stephan Mielke und PD Dr. Gernot Stuhler) für Rat und Tat.

Ein großes Dankeschön auch an Dr. Evelyn Putz und das gesamte Team der Transfusionsmedizin, die die Versorgung mit Zapfen gewährleistet haben und bei der Rekrutierung Virus-spezifischer Spender behilflich waren.

Bedanken möchte ich mich auch bei den „Mainzern“ Prof. Dr. Wolfgang Herr, Dr. Eva Distler und Michaela Frey für eine erfolgreiche Kooperation.

Ein weiteres Dankeschön geht an Prof. Dr. Manfred Lutz und Prof. Dr. Matthias Eyrich für hilfreiche Anregungen zu den Versuchen mit Dendritischen Zellen.

Danken möchte ich auch allen Mitgliedern des GK520 „Immunomodulation“ und dessen Koordinatoren Dr. Elisa Monzón Casanova und Dr. Paula Tabares für interessante Seminare und informative aber auch lustige Retreats.

Das größte Dankeschön geht an meine Eltern, meine Schwester und die ganze Familie für immerwährende Unterstützung während allen Phasen meines Lebens.

Der letzte Dank gilt Frau Jutta Staub, meiner alte Biologielehrerin am Gymnasium die mich damals auf den rechten Weg gebracht hat.

6.4. Publikationsliste

Publikationen die aus dieser Arbeit resultieren:

Nerreter T, Köchel Ch, Jesper D, Eichelbrönner I, Putz E, Einsele H, Seggewiss-Bernhardt R. Dasatinib enhances migration of monocyte-derived dendritic cells by reducing phosphorylation of inhibitory immune receptors Siglec-9 and Siglec-3. *Exp Hematol*. Revision eingereicht am 09.04.2014 (MS-Nr. 13-234R1).

Nerreter T, Distler E, Köchel Ca, Einsele H, Herr W, Seggewiss-Bernhardt R. Combining dasatinib with dexamethasone long-term leads to maintenance of antiviral and antileukemia specific cytotoxic T cell responses in vitro. *Exp Hematol*. 2013 Jul;41(7):604-614.e4.

Weitere Publikationen:

Michaelis M, Rothweiler F, **Nerreter T**, van Rikxoort M, Sharifi M, Wiese M, Ghafourian T, Cinatl J. Differential Effects of the Oncogenic BRAF Inhibitor PLX4032 (Vemurafenib) and its Progenitor PLX4720 on ABCB1 Function. *J Pharm Pharm Sci*. 2014;17(1):154-158.

Michaelis M, Rothweiler F, **Nerreter T**, Sharifi M, Ghafourian T, Cinatl J. Karanjin interferes with ABCB1, ABCC1, and ABCG2. *J Pharm Pharm Sci*. 2014;17(1):92-105.

Beiträge auf wissenschaftlichen Konferenzen:

Nerreter T, Eichelbrönner I, Köchel Ch, Putz E, Einsele H, Seggewiss-Bernhardt R. Dasatinib enhances migration of monocyte-derived dendritic cells via inhibition of phosphorylation of Siglec-9 and Siglec-3. Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Hämatologie und Onkologie 2013 in Wien (18-22.10.2013). Vortrag (V928). Abstract veröffentlicht in *Onkologie* 2013;36(suppl 7):283.

Nerreter T, Eichelbrönner I, Köchel Ch, Köchel Ca, Einsele H, Seggewiss-Bernhardt R. Dasatinib enhances migration of monocyte-derived dendritic cells and hampers their cytokine secretion without diminishing their ability to induce virus-specific CD8⁺ T cell responses. Cellular Therapy 2013 in Erlangen (14-15.03.2013). Poster (C7).

Nerreter T, Eichelbrönner I, Köchel Ch, Köchel Ca, Einsele H, Seggewiss-Bernhardt R. Dasatinib enhances migration of monocyte-derived dendritic cells, increases their HLA-DR expression and hampers their IL-12 secretion. Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Hämatologie und Onkologie 2012 in Stuttgart (19-23.10.2012). Vortrag (V654). Abstract veröffentlicht in *Onkologie* 2012;35(suppl 6):196.

6.5. Curriculum Vitae