

Aus der Klinik für Hämatologie/Onkologie  
(Direktor: Prof. Dr. T. Fischer)  
der Medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

**„Hemmbarkeit von humanen T-Zellen durch den FLT3-Kinase-Inhibitor  
Midostaurin im Vergleich zum SRC-Kinase-Inhibitor Dasatinib.“**

## **Dissertation**

**zur Erlangung des Doktorgrades**

**Dr. med.**

**(doctor medicinae)**

an der medizinischen Fakultät

der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von Christine Höding, geb.: Seidler

geb. 23.04.1986 in Magdeburg

Magdeburg 2015

## Dokumentationsblatt

### Bibliographische Beschreibung

Höding, Christine:

Das Expressionsmuster von Oberflächenmarkern und die intrazelluläre Signaltransduktion von T-Lymphozyten unter Einfluss von Midostaurin und Dasatinib im Vergleich -2015-  
100 Bl.: 15 Abb., 12 Tab.

### Kurzreferat

T-Zellen sind ein essentieller Bestandteil der körpereigenen Immunabwehr. Sie eliminieren nicht nur körperfremde, krankheitsfördernde Organismen, sondern auch körpereigene, abnorme Zellen. Bei Dysfunktionen der T-Zellpopulation können unter anderem schwere Infektionen, Autoimmunerkrankungen oder auch Transplantatabstoßungen auftreten. Tyrosinkinase-Inhibitoren sind seit über 10 Jahren ein essentieller Bestandteil in der Behandlung hämatologischer Neoplasien. Für die chronische myeloische Leukämie stellen sie die Standard-Behandlung dar. In anderen hämatologischen Neoplasien, wie der akuten myeloischen Leukämie (**AML**), werden sie aktuell im Rahmen fortgeschrittener klinischer Studien geprüft. Sie unterbrechen die aberrante und maligne transformierte Signaltransduktion, was wiederum zur Apoptoseinduktion der malignen Zellen führt. Experimentelle Daten weisen darauf hin, dass Tyrosinkinase-Inhibitoren auch eine immunsupprimierende Wirkung haben könnten, in dem sie die Signaltransduktion von normalen T-Zellen beeinflussen und diese in ihrer Funktion hemmen.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Wirkung des aktuell in fortgeschrittener klinischer Entwicklung befindlichen FLT3-Tyrosinkinase-Inhibitors Midostaurin mit der Wirkung des SRC-Tyrosinkinase-Inhibitors Dasatinib auf die Expression von charakteristischen Oberflächenmarkern und auf essentielle Proteine der intrazellulären Signaltransduktion der T-Zellen von gesunden Probanden zu untersuchen und anschließend zu vergleichen. Die Zellen wurden dazu mit dem entsprechenden TKI inkubiert und es erfolgte die Analyse von T-Zell-Aktivierungsmarkern mittels Durchfluss-Zytometrie. Die intrazelluläre Signaltransduktion wurde mit Hilfe von Western Blots untersucht. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass Midostaurin, im Gegensatz zu Dasatinib, keine nennenswerten inhibitorischen Effekte auf normale humane T-Zellen ausübt.

Schlüsselwörter: T-Lymphozyten, Oberflächenmarker, intrazelluläre T-Zell-Signaltransduktion, Midostaurin, Dasatinib

Nicht Kunst und Wissenschaft allein,  
Geduld will bei dem Werke sein.  
*Johann Wolfgang von Goethe*

Meiner Familie.

# Inhaltsverzeichnis

- 0.1 Abkürzungsverzeichnis
- 0.2 Abbildungsverzeichnis
- 0.3 Tabellenverzeichnis

## 1. Einleitung

- 1.1 Übersicht über das humane Immunsystem
- 1.2 T-Lymphozyten
- 1.3 Oberflächenantigene der T-Lymphozyten
- 1.4 Intrazelluläre Signaltransduktion von T-Lymphozyten
- 1.5 Der Tyrosinkinase-Inhibitor Dasatinib
- 1.6 Der FLT3-Kinase-Inhibitor Midostaurin
- 1.7 T-Zell-Stimulation mittels Phytohämagglutinin und Dynabeads CD3/CD28 *T-Cell Expander*

## 2. Aufgabenstellung

## 3. Material und Methoden

- 3.1 Material
- 3.2 Studienpopulation
- 3.3 Zellbiologische Methoden
  - 3.3.1 Bestimmung des Differentialblutbildes
  - 3.3.2 Isolation der T-Zellen
  - 3.3.3 Zellkultur
  - 3.3.4 Inhibition und Stimulation der T-Zellen in Vorbereitung für den Western Blot
  - 3.3.5 Stimulation und Inhibition von T-Zellen für die Durchfluss-Zytometrie
  - 3.3.6 Mikroskopie
  - 3.3.7 Immunphänotypisierung (Durchfluss-Zytometrie)
- 3.4 Proteinbiochemische Methoden
  - 3.4.1 Herstellung von Zelllysaten
  - 3.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford
  - 3.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
  - 3.4.4 Analyse der intrazellulären Signaltransduktion durch Western Blots
    - 3.4.4.1 Protein-Transfer
    - 3.4.4.2 Immundetektion
  - 3.4.5 Dehybridisierung von Nitrocellulose-Membranen

### 3.5 Statistik

## 4. Ergebnisse

- 4.1 Studienpopulation
- 4.2 Etablierung der Stimulationsbedingungen von T-Zellen mit PHA
- 4.3 Etablierung der Inhibitionsbedingungen mittels TKI
- 4.4 Einfluss von Dasatinib auf T-Zell-spezifische Oberflächenmarker
- 4.5 Einfluss von Midostaurin auf T-Zell-Aktivierungsmarker
  - 4.5.1 T-Zell-Stimulation mittels 0,5% igem PHA
  - 4.5.2 Stimulation durch Dynabeads CD3/CD28 *T-Cell Expander*
- 4.6 Die intrazelluläre Signaltransduktion des TCRs unter Einfluss der Tyrosinkinase-Inhibitoren Dasatinib und Midostaurin
- 4.7 Vergleich der 0,5% igen PHA-Stimulation mit der Dynabeads CD3/CD28 *T-Cell Expander* Stimulation

## 5. Diskussion

## 6. Zusammenfassung

## 7. Ausblick

- 7.1 Paper “Clinically relevant doses of FLT3-kinase inhibitors Quizartinib and Midostaurin do not impair T-cell reactivity and function.” (Wolleschak et al. 2014).

## 8. Literaturverzeichnis

**Danksagung**

**Erklärung**

**Lebenslauf**

## 0.1 Abkürzungsverzeichnis

Ag	Antigen
AIDS	Erworbenes Immundefizienzsyndrom ( <i>Acquired immunodeficiency syndrome</i> )
AK	Antikörper
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
AP-1	Activator protein 1; Transkriptionsfaktor
APC	Antigen präsentierende Zelle ( <i>Antigen presenting cell</i> )
CD	Differenzierungsantigen ( <i>Cluster of Differentiation</i> )
CML	Chronische myeloische Leukämie
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure ( <i>Ethylene diamine tetraacetic acid</i> )
Egr-1	<i>Early growth response protein 1</i> ; Zif 268 ( <i>zinc finger protein 268</i> ), NGFI-A ( <i>nerve growth factor-induced protein A</i> )
Erk	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
FACS	Durchfluss-Zytometer ( <i>fluorescence activated cell sorting</i> )
FCS	Fetales Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
FITC	Flourescein Isothiocyanate (FACS-Floureszenz)
Gads	<i>Grb2-related adaptor downstream of Shc</i>
Grb2	<i>Growth-factor receptor-bound protein</i>
GvL	<i>Graft versus leukemia</i>
GvT	<i>Graft versus tumor</i>
GvH	<i>Graft versus host</i>
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IL-2	Interleukin-2
Itk	<i>IL-2-induced tyrosine kinase</i>
LAT	<i>Linker for activation of T cell</i>
LP	Lysepuffer
MACS	<i>Magnetic Cell Sorting</i>
MAPK	<i>Mitogen-associated protein kinase</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MNC	Mononukleäre Zellen ( <i>Mononuclear cells</i> )
NFκ-B	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
NK	Natürliche Killerzellen
NO	Stickstoffmonoxid ( <i>nitrogen monoxide</i> )
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )

PE	Phycoerythrin (FACS-Floureszenz)
PHA	Phytohämagglutinin
PKC	Protein Kinase C
PKD1	Protein Kinase D1
PLA2	Phospholipase A2
PLC $\gamma$ 2	Phospholipase C $\gamma$ 2
PMA	Phorbol 12-myristat 13-acetat
PMNZ	Periphere mononukleäre Zellen
PTK2	<i>Protein tyrosine kinase 2</i>
RPMI 1640	Kulturmedium ( <i>Roswell Park Memorial Institute</i> )
SB	Sample-Puffer
SLP76	<i>Src homology 2 (SH2) domain-containing leukocyte phospho-protein of 76 kDa</i>
Src	“Sarcoma”, Protoonkogen
TZR, TCR	T-Zell-Rezeptor ( <i>T-cell-receptor</i> )
TfR	Transferrinrezeptor
TGF $\beta$	<i>Transforming growth factor beta</i>
TKI	Tyrosinkinase-Inhibitor
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$ ( <i>Tumor necrosis factor <math>\alpha</math></i> )
VLA-4	<i>Very late antigen-4; CD29</i>
ZAP70	<i>Zeta-chain-associated protein kinase 70</i>



## 0.2 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Die Domänenstruktur des T-Zell-Rezeptors
- Abbildung 2: CD69 Dimer in zwei Ansichten
- Abbildung 3: Intrazelluläre T-Zell-Signalwege
- Abbildung 4: Darstellung der zweidimensionalen Struktur von Dasatinib
- Abbildung 5: Isolation der MNCs durch Dichtegradientenzentrifugation
- Abbildung 6: Darstellung des zeitlichen Ablaufes der Inhibitor-Inkubation und Stimulation von T-Zellen
- Abbildung 7: Darstellung des Ablaufes der Zell-Stimulation
- Abbildung 8: Bestimmung der zeitlichen Dosis-Wirkungsbeziehung von PHA zur optimalen Expression der Oberflächenantigene CD29, CD69 und CD71 auf MNCs
- Abbildung 9: Vergleichende Analyse zur Wirkung von Midostaurin auf die Expression der Oberflächenantigene CD3, CD29, CD69, CD71 von MNCs mit vorangegangener PHA-Stimulation bzw. mit der nachfolgenden PHA-Stimulation
- Abbildung 10: Analyse zur Wirkung verschiedener Dasatinib-Konzentrationen auf die Expression der Oberflächenantigene CD3, CD29, CD69 und CD71 von T-Zellen mit zeitlich abgestufter PHA-Restimulation
- Abbildung 11: Analyse zur Wirkung verschiedener Midostaurin-Konzentrationen auf die Expression der Oberflächenantigene CD3, CD29, CD69 und CD71 von T-Zellen mit zeitlich abgestufter PHA-Restimulation
- Abbildung 12: Analyse zur Wirkung verschiedener Midostaurin-Konzentrationen auf die Expression der Oberflächenantigene CD3, CD29, CD69 und CD71 von T-Zellen mit zeitlich abgestufter Dynabeads CD3/CD28 *T-Cell Expander*-Restimulation
- Abbildung 13: Analyse der Phosphorylierung ausgewählter T-cell-signaling-Proteine unter Einfluss von Dasatinib und Midostaurin
- Abbildung 14: Mikroskopie der T-Zellen unter Dasatinib-, Midostaurin-Inkubation und PHA-, Dynabeads CD3/CD28 *T-Cell Expander*-Stimulation.
- Abbildung 15: Vergleichende Analyse zur Wirkung einer 0,5%igen PHA-Stimulation mit einer CD3/CD28 *T-Cell Expander*-Stimulation von T-Zellen in zeitlicher Abstufung

### **0.3 Tabellenverzeichnis**

- Tabelle 1: Darstellung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten T-Zell-Oberflächenantigene (aus "Pädiatrische Allergologie und Immunologie", Wahn et al.)
- Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Chemikalien, Hilfsmittel und deren Herkunft
- Tabelle 3: Verwendete Geräte und deren Herkunft
- Tabelle 4: Erythrozyten-Lysepuffer
- Tabelle 5: Darstellung des Versuchsaufbaues in Vorbereitung der Western Blots.
- Tabelle 6: Übersicht der verwendeten Flouochrome zur Oberflächenantigen-Markierung.
- Tabelle 7: Lysepuffer
- Tabelle 8: Sample-Puffer
- Tabelle 9: 2 Sammelgele 5%
- Tabelle 10: 2 Trenngele
- Tabelle 11: Ausgewählte Proteine des T-Cell-Signalings.
- Tabelle 12: NaN<sub>3</sub>-TBS-Lösung

# 1. Einleitung

## 1.1 Übersicht über das humane Immunsystem

Der Mensch ist in seinem Leben einer Vielzahl von Krankheitserregern ausgesetzt. Im Laufe der Evolution hat er ein hoch spezialisiertes Immunsystem entwickelt, welches unter anderem der Abwehr von Mikroorganismen dient. Dieses besitzt in den meisten Fällen die Fähigkeit die schädigenden Erreger zu erkennen und zu eliminieren. Voneinander abzugrenzen sind die unspezifische und die spezifische Immunantwort.

Die unspezifische, angeborene Immunabwehr besteht aus anatomischen und physiologischen Barrieren. Zur mechanischen und chemischen Kategorie gehören die Haut, Schleimhäute oder epitheliale Grenzschichten, aber auch Speichel, Magensaft und Urinfluss (Pezzutto et al. 2007). Sind diese Abwehrinstanzen überwunden, treffen die Keime auf Phagozyten, natürliche Killerzellen, sowie auf Enzyme und Mediatoren wie zum Beispiel Interferone, Interleukine, Lysozym, Transferrine und auf die Komplementabwehr. Die Komplementabwehr ist eine Familie von Plasmaproteinen, zum Teil Zymokine, im Blutplasma gelöst oder zellgebunden, die über eine Aktivierungskaskade die Entzündung fördern, Krankheitserreger für Phagozyten kennzeichnen (*Opsonierung*), durch Membranangriffskomplexe Poren in deren Zellmembran erzeugen und die lytische Zerstörung einleiten (Pezzutto et al. 2007).

Die spezifische, erworbene (adaptive) Immunantwort richtet sich gezielt gegen ein bestimmtes Antigen und erkennt dieses auch zu einem späteren Zeitpunkt wieder. Dringt ein Krankheitserreger in den Körper ein, wird er in den meisten Fällen von Mitgliedern der unspezifischen Abwehr erkannt: Makrophagen (*Antigen presenting cells, APCs*) phagozytieren die Keime, lysieren sie in kleinere Bestandteile und präsentieren diese als sogenannte Antigene auf der Zelloberfläche in Form eines Peptid-MHC (*Major Histocompatibility Complex*)-Komplexes. Ein Antigen (**Ag**) ist eine Substanz, zumeist bestehend aus Proteinen oder komplexen Kohlenhydrat-, Lipidstrukturen oder anderen Molekülen, die an Antikörpern (**Ab**) oder spezifischen Lymphozyten-Rezeptoren bindet. Bei den folgenden Abwehrreaktionen unterscheidet man zwischen der humoralen und der zellvermittelten Immunantwort. Die zellvermittelte Abwehr wird hauptsächlich von den T-Lymphozyten getragen. Naive T-Zellen erkennen ihr spezifisches Antigen, welches sich an der Oberfläche einer antigenpräsentierenden Zelle in Form eines Peptid-MHC-Komplexes befindet (Murphy et al. 2009). In der Folge kommt es zur Proliferation und Differenzierung der naiven T-Zelle zur T-Effektorzelle, welches als primäre zellvermittelte Immunantwort bezeichnet wird. Bei der humoralen Abwehr reifen APC präsentierende B-

Lymphozyten nach der Erkennung durch T-Helferzellen zu Plasmazellen. Daraufhin sezernieren die Plasmazellen Antikörper, welche spezifisch für das Antigen sind und dieses erkennen. Der so gebildete Immunkomplex aus Antikörper und Antigen wird phagozytiert oder komplementvermittelt inaktiviert (Kuby et al. 2003).

## 1.2 T-Lymphozyten

Die T-Lymphozyten bilden eine Untergruppe der Leukozyten und sind für die adaptive (erworbene) Immunantwort zuständig. Sie werden im Knochenmark gebildet, wandern in den Thymus und werden dort selektioniert. Nach der Ausreifung sind die Zirkulation im Blut und die Migration im Körper möglich. Dabei migrieren sie über die Blutgefäße vor allem in die lymphatischen Organe, gelangen aber auf ihren Weg dorthin in den gesamten Körper. Erkennen die T-Zellen über ihren T-Zell-Rezeptor (**TCR**) MHC-präsentierte Antigene auf den APCs, werden die T-Zellen aktiviert, gefolgt von der Proliferation der Zellen und dem Ausüben der Effektorwirkung (Pezzutto et al. 2007).

Fehlfunktionen der T-Lymphozyten, meist verursacht durch eine unzureichende Selektion autoimmunreaktiver T-Zellen im Thymus, können im menschlichen Körper zu schweren allergischen Reaktionen, zu angeborenen Immundefekten wie dem Di-George-Syndrom (Gennery et al. 2002) oder der **SCID** (*Severe Combined Immunodeficiency*) (Gaspar et al. 2001) führen. Auch bei erworbenen Immundefizienzen wie AIDS (Pezzutto et al. 2007) liegt eine Einschränkung der T-Zell-Funktion vor. Entartungen der Lymphozyten und ihrer Vorläuferzellen bedingen Leukämien.

T-Lymphozyten lassen sich immunphänotypisch über ihre Oberflächenantigene unterteilen: CD4<sup>+</sup>-Zellen wechselwirken mit MHCII-Peptid-Komplexen, produzieren Zytokine wie IFN $\gamma$ , GM-CSF, TNF $\alpha$ , IL-4 und IL-5, sorgen für die Aktivierung von CD8<sup>+</sup>-Zellen, fördern die humorale Immunantwort durch Induktion der Antikörper-Produktion von B-Zellen, und deren Isotypenwechsel, sowie die Mobilisierung neutrophiler Granulozyten und regulatorischer T-Zellen (Murphy et al. 2009). CD8<sup>+</sup> T-Killerzellen sind für die zellvermittelte Zytotoxizität zuständig, erkennen MHCI-präsentierte Antigene auf APC's, sezernieren Perforin und Granzym, was in der Zielzelle zu einer Membranschädigung führt und in der Induktion von Apoptose resultiert. Regulatorische T-Zellen (**T<sub>reg</sub>**) sind verantwortlich für die Selbsttoleranz und können allergische Reaktionen, Autoimmunerkrankungen und Transplantatabstoßungen (Viglietta et al. 2004; Sakaguchi et al. 2001) supprimieren. T-Gedächtniszellen ermöglichen bei erneuter Infek-

tion mit einem bekannten Antigen eine schnellere Immunantwort, da aus ihnen Effektorzellen hervorgehen können. Weiterhin sind noch  $\gamma\delta$ -Antigenrezeptor-positive T-Lymphozyten bekannt, wobei die Funktion dieser Zellen noch relativ unklar ist. Sie zeigen eine starke Alloreaktivität (Ciccone 1988), wirken gegen intrazelluläre Pathogene (Kabelitz et al. 1991) und gegen maligne Bluterkrankungen. Sie dienen der ersten Infektionsabwehr und der Bekämpfung maligner Erkrankungen (Autran et al. 1989).

Reife T-Lymphozyten exprimieren das Oberflächenprotein CD3. CD3 ist ein T-Zell-spezifisches Oberflächenantigen, das die Identifizierung von T-Zellen ermöglicht.

### 1.3 Oberflächenantigene der T-Lymphozyten

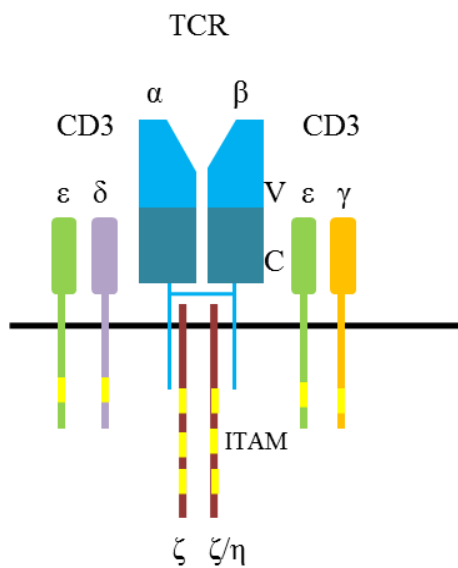
Außer dem T-Zell-spezifischen Oberflächenantigen CD3, werden auf den T-Lymphozyten auch CD5, sowie Aktivierungs-abhängig Oberflächenantigene wie CD29, CD69 und CD71 exprimiert. Eine Übersicht über die Charakteristika dieser Oberflächenantigene ist in der Tabelle 1 zusammengestellt.

Tabelle 1: Darstellung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten T-Zell-Oberflächenantigene (aus "Pädiatrische Allergologie und Immunologie", Wahn et al.)

CD-Nummerierung	Molekül/Antigen	Molekulares Gewicht [kDa]	Zelluläre Reaktivität	Funktion
CD3	CD3-Komplex	Drei Peptide: 20-28	Thymozyten, T-Zelle	Assoziiert mit TCR; Signaltransduktion
CD29	Integrin $\beta$ 1-Kette	130	Leukozyten	Adhäsion, bindet mit $\alpha$ 1 bis $\alpha$ 6 Integrinen (CD49)
CD69	Aktivierungsinduziertes Molekül	28, 32 Homodimer	früh aktivierte T- und B-Zellen, Makrophagen, NK-Zellen	früher Marker, unbekannt
CD71	Transferrin-Rezeptor	95 Homodimer	Aktivierte T- und B-Zellen; proliferierende Zellen	später Marker, Transferrin-Rezeptor

Etwa 60-85% aller peripheren Lymphozyten und der Thymozyten tragen CD3 an ihrer Oberfläche. CD3 ist, wie auch in der Abbildung 1 deutlich wird, mit dem TCR verbunden (Meuer et al. 1983; L. Samelson 1985). Der TCR besteht aus jeweils zwei Eiweißketten, die sich aus der  $\alpha$ - und  $\beta$ - (Allison et al. 1982; Meuer et al. 1983), oder  $\gamma$ - und  $\delta$ -Kette zusammensetzen können. Dabei kommt vor allem das  $\alpha\beta$ -Heterodimer vor. Nur etwa 1-3% der T-Zellen tragen ein  $\gamma\delta$ -Heterodimer (Brenner et al. 1986; Davis 1990; Nakanishi et al. 1987). Die Dimere sind durch

Disulfidbrücken untereinander verbunden. Die Hauptaufgaben des TCR sind die Antigen-Erkennung und -Bindung. Die Signalweiterleitung ins Zellinnere übernimmt das CD3-Molekül. Es setzt sich aus drei invarianten Ketten ( $\gamma$ -,  $\delta$ -,  $\epsilon$ ) und zwei zusätzlichen homodimeren ( $\zeta$ - $\zeta$ ) bzw. heterodimeren Untereinheiten ( $\zeta$ - $\eta$ ) zusammen. Die Ketten sind Transmembranproteine und gehören auch zur Immunglobulin-Gen-Superfamilie. Der negativ geladene transmembranäre Anteil ist mit dem TCR assoziiert. Die intrazellulären Domänen besitzen hochkonservierte Peptide, sogenannte „immunoreceptor tyrosine-based activation motif“ (**ITAM**) (Reth 1989). Nach Phosphorylierung dieser Abschnitte durch Lck bindet ZAP70 an den TCR und die Signaltransduktion wird weitergeleitet.



**Abbildung 1: Die Domänenstruktur des T-Zell-Rezeptors.**

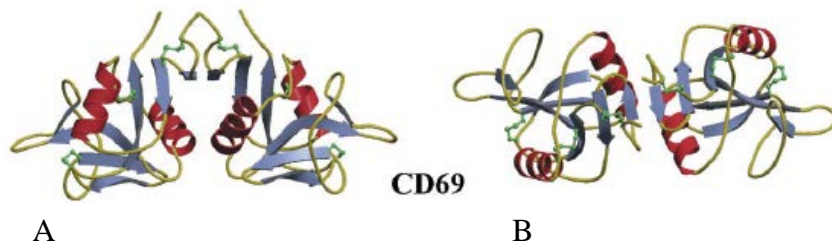
Bestehend aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit, die sich aus einer variablen (V) und einer konstanten (C) Region zusammensetzen. Die variable Region bindet Antigene. Mit dem TCR ist CD3 assoziiert. Es wird gebildet aus  $\epsilon$ -,  $\delta$ -,  $\gamma$ -Ketten, sowie aus zwei homodimeren ( $\zeta$ - $\zeta$ ) bzw. heterodimeren Untereinheiten ( $\zeta$ - $\eta$ ). Intrazelluläre Domänen tragen ITAMS.

Ein weiteres T-Zell-Oberflächenantigen ist CD29, welches auf Leukozyten zu finden ist. CD29 gehört zur Familie der Adhäsionsrezeptoren und bildet die  $\beta$ -Untereinheit eines Integrins (Humphries et al. 2006). Als Integrin ist CD29 beteiligt an der Proliferation, Apoptose, Aufrechterhaltung der Zellform, Zellmotilität, Zellpolarität und der Differenzierung. Es ist Bestandteil der Wechselwirkung zwischen den Zellen und der extrazellulären Matrix sowie bei der Zell-Zell-Interaktion. Außerdem leitet es extrazelluläre Signale an das Zytoskelett weiter (Abram and Lowell 2009). Wie alle Integrine besteht auch CD29 aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit, die nicht-kovalent aneinander gebunden sind (Arnaout et al. 2005). Weiterhin ist aus Studien bekannt, dass diese Untereinheiten in eine Ekto-, Transmembran- und Zytoplasma-

domäne gegliedert sind. In den  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ektodomänen befindet sich eine dreidimensionale globuläre Ligandenbindungsstelle (Shimaoka et al. 2003).

Integrine sind in der Lage simultan Inside-out signaling und Outside-in signaling durchzuführen. Beim Inside-out signaling werden durch Adapter- und Ankerproteine intrazelluläre Signale in Konformationsänderungen der Extrazellulardomäne umgewandelt (Hughes et al. 1996). Das Outside-in signaling beschreibt das Andocken von Liganden an die extrazellulären Integrinbindungsstellen und die Translokation der Signale ins Zellinnere. Das Integrin CD29 bildet zusammen mit dem  $\alpha 4$ -Monomer (CD49d) das **VLA-4** (*Very late antigen-4*). Es wird verstärkt in der späten Phase der T-Zell-Aktivierung exprimiert. Die beiden Hauptbindungspartner sind **VCAM-1** (*Vascular cell adhesion molecule*), lokalisiert auf aktiviertem Endothel, und Fibronektin (Hynes et al. 1992; Lobb and Hemler 1994). Über Paxillin und Talin findet die essentielle Interaktion mit dem Aktinzytoskelett der Zelle statt (Horwitz et al. 1986). Durch *in vivo* Experimente konnte gezeigt werden, dass  $\beta 1$ -Integrin *knock out* Mäuse nicht überlebensfähig waren (Fassler and M. Meyer 1995). CD29 ist somit als Teil des VLA-4 Heterodimers für die Extravasation, Migration, das Homing und die T-Zell-Aktivierung zuständig.

CD69 ist ein weiterer Aktivierungsmarker. Die CD69 Expression auf T-Zellen ist im humanen Embryo in der 7. bis 9,5. Lebenswoche nachzuweisen. Fast alle CD69<sup>+</sup> Zellen befinden sich zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung in der Medulla des Thymus. Postnatal sind sie zum größten Teil subkapsular nachzuweisen. Etwa 30%-65% der Thymozyten sind CD69<sup>+</sup> (Jung et al. 1990). Nicht nur auf Thymozyten, sondern auch auf Thrombozyten, lymphoiden Vorläuferzellen, B- und T-Zellen peripherer lymphatischer Gewebe und auf aktivierten Monozyten, T-, B- und NK-Zellen, welche vor allem in entzündlichen Infiltraten wieder zu finden sind, ist CD69 vorhanden. Auf allen inaktiven Zellen ist keine CD69 Expression zu finden (SantAngelo et al. 1998; Testi et al. 1994). CD69 ist ein Transmembranrezeptor. Dabei handelt es sich um ein homodimeres, phosphoryliertes Typ-II integrales Membranprotein, dessen zwei Untereinheiten (27kDa und 33kDa) über Disulfidbrücken verbunden sind. Sie bestehen aus einer extrazellulären, einer transmembranären und einer zytosolischen Einheit. Der extrazelluläre Teil gehört zur Familie der „C-Type lectin like domains“ (**CTLDs**) und besitzt eine Untereinheit, die die Ligandenbindung wahrscheinlich ermöglicht (Llera et al. 2001). Ein spezieller Ligand für CD69 ist noch nicht bekannt. CD69 hat die Fähigkeit der Dimerisation, die sich aus hydrophoben und polaren Wechselwirkungen ergibt (Abbildung 2).



**Abbildung 2: CD69 Dimer in zwei Ansichten.**

**A)** zeigt die beiden  $\beta$ -Faltblattstrukturen (blau) vertikal verlaufend. **B)** ist eine um  $90^\circ$  um die horizontale Achse gedrehte Darstellung. Die  $\alpha$ -Helices sind in Rot, Disulfidbrücken in Grün abgebildet. (Darstellung entnommen aus Llera et al. 2001)

Wie der Name „Very early antigen“ nahelegt, ist CD69 ein Marker, der sehr frühzeitig bei Zellaktivierung auf der Oberfläche exprimiert wird. Multiple Wirkstoffe wie zum Beispiel anti-CD3/TCR Antikörper, anti-CD2 Antikörper, PKC-Aktivatoren und PHA können *in vitro* die Expression vermitteln (Cebrián et al. 1988; Hara et al. 1986). Bereits 30 bis 60 Minuten nach der T-Zell-Aktivierung ist die mRNA von CD69 nachweisbar (Ziegler et al. 1994). Nach 30 Minuten (Hara et al. 1988-2005) bis 3 Stunden ist mittels Durchfluss-Zytometrie eine deutliche Zunahme der CD69-Oberflächenexpression zu messen, wobei die maximale Expression nach ca. 24 Stunden erreicht wird. Nach Entfernung des Stimulanz ist die Oberflächenexpression ungefähr 48 Stunden nachweisbar (Cebrián et al. 1988). In verschiedenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung der T-Lymphozyten mittels CD69-Antikörpern in einem Anstieg der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration, der Synthese verschiedener Zytokine und ihrer Rezeptoren, sowie in der Expressionssteigerung von c-myc und c-fos Protoonkogenen und eine verstärkte Zellproliferation resultiert (Cebrián et al. 1988; Testi et al. 1989; Tugores et al. 1992). Dabei initiiert CD69 die Tyrosinphosphorylierung von Syc über PTK, einem Src-Familienmitglied, nicht aber von ZAP70. Syc und Src wiederum kontrollieren die CD69 vermittelte Tyrosinphosphorylierung und Aktivierung der PLC $\gamma$ 2 und dem Rho-Familienmitglied Vav1, die für die CD69 getriggerte Zytotoxizität zuständig sind (Pisegna et al. 2002).

Ein weiterer entscheidender Oberflächenrezeptor auf T-Lymphozyten ist CD71. Die lebenswichtige Eisenaufnahme erfolgt über diesen CD71-Oberflächenmarker, der auch als Transferrinrezeptor (**TfR**) bezeichnet wird. An Transferrin gebundenes Eisen wird mit Hilfe dieses membranständigen 180kDa Rezeptors internalisiert (M. L. Hammarström et al. 1982; Ned, Swat, and Andrews 2003). CD71 ist ein über Disulfidbrücken verbundenes homodimeres Glykoprotein. Es ist nur auf aktivierten, proliferierenden Lymphozyten anzutreffen, da diese einen erhöhten Eisenbedarf für die Proliferation besitzen. Außerdem ist dieses Typ II-



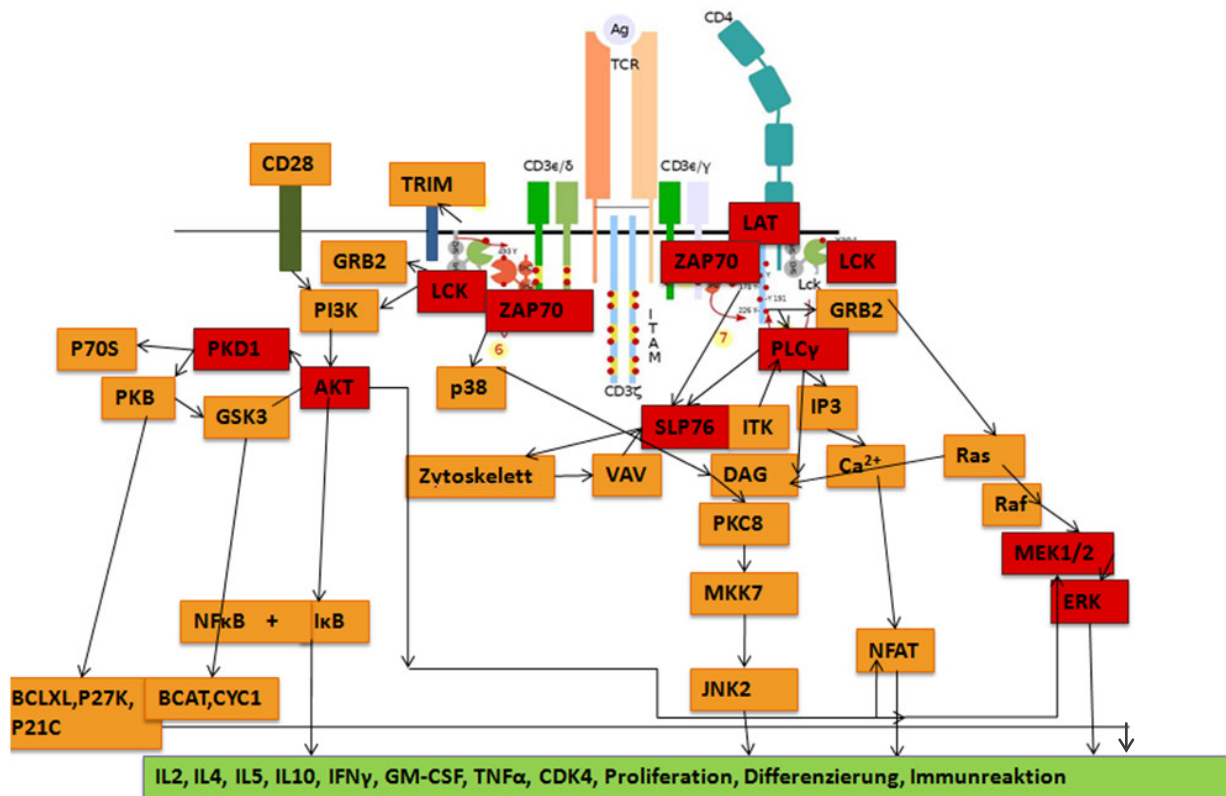
Membranprotein wichtig für die adulte Erythropoese, für die T-Zelldifferenzierung *in vivo*, um über das „frühe Prä-T“-Stadium (CD4-/8-/3-/44-/25+) hinauszukommen (Brekelmans et al. 1994; Macedo et al. 2004; Ned, Swat, and Andrews 2003). Seine spezifische Blockade kann die Abstoßungsreaktion nach Transplantationen unterdrücken, ohne die Eisenaufnahme zu beeinträchtigen (Bayer et al. 1998). Weiterhin wurde ein monoklonaler anti-TfR-Antikörper erfolgreich zur Immuntherapie bei Tumorbehandlung, zum Beispiel bei der Adulten T-Zell-Leukämie (Callens et al. 2008) und dem Nierenzellkarzinom (Kudoh et al. 1994), eingesetzt. CD71 befindet sich jedoch nicht nur in der Membran, sondern auch in Transport- und Recycling-Endosomen im Zellinneren. Bei Antigen verursachter Aktivierung der Zelle werden diese CD71 Pools zur Kontaktseite umverteilt und mittels sogenannter „rafts“ mit CD3ε an der Zelloberfläche exprimiert (Batista et al. 2004). Dabei ist CD71 ein essentieller Bestandteil im peripheren Ring der immunologischen Synapse (pSMAC) und maßgeblich an deren Formation beteiligt (Batista et al. 2004). Bis zu  $1-5 \times 10^5$  CD71-Moleküle/Zelle sind nach der Stimulation auf T-Lymphozyten zu finden (Hammarström et al. 1982). Sie gehen dabei einen relevanten Kontakt mit CD3ζ und der Proteinkinase ZAP70 ein. (Salmeron et al. 1995; Macedo et al. 2004). CD71 wird zeitlich nach dem Interleukin-2(IL-2) Rezeptor, durch IL-2 initiiert, exprimiert. Der IL-2 Rezeptor ist wichtig für die IL-2 Bindung und Bestandteil der T-Zell-Aktivierung. Die Inhibition des IL-2 Rezeptors verhindert die Expression von CD71, was in einer direkten Abhängigkeit der beiden Rezeptoren resultiert. Dies stellt den engen Zusammenhang zwischen dem TfR und dem für die T-Zell-Aktivierung und der Einleitung der DNA-Synthese nötigen IL-2 Rezeptor dar. CD71 ist prinzipiell in allen Zellzyklusphasen vorhanden, auch in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>. Nach einer 48-stündigen Stimulation mit PHA ist er nur noch bei 25% der T-Zellen in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>Phase detektierbar, aber bei fast allen Zellen in S, G<sub>2</sub> und M. Dieses Erkenntnis, die Verbindung mit dem TCR und das Wissen, dass IL2 und Transferrin essentiell für die Zellentwicklung sind, zeigen, dass CD71 eine entscheidende Rolle beim „preTCRsignaling“ hat und nicht nur ein Eisentransporter ist (Neckers et al. 1983; Lum et al. 1986; Macedo et al. 2004; Batista et al. 2004).

#### **1.4 Intrazelluläre Signaltransduktion von T-Lymphozyten**

Die „primäre Signaltransduktion“ beschreibt die Weiterleitung von extrazellulären sowie intrazellulären Signalen in den Zellkern. Dort wird die Transkription der Zielgene initiiert, die neben Proliferation, Apoptose und dem Überleben der Zellen auch die Bildung von Zytokinen steuert. Die neu synthetisierten Zytokine werden meist infolge von Stimuli freigesetzt und

interagieren mit weiteren spezifischen Rezeptoren, über welche eine „sekundäre Signaltransduktion“ aktiviert werden kann.

Die T-Zell-Aktivierung, die Signaltransduktion (Abbildung 3) und die anschließenden Effektormechanismen sind hochkomplexe Vorgänge mit noch vielen unbekannten Dynamiken und Reaktionspartnern.



**Abbildung 3: Intrazelluläre T-Zell-Signalwege.**

In vereinfachter Form ist die T-Zell-Signaltransduktion dargestellt. Angefertigt nach den Vorlagen von Prof. Dr. Weißmantel (Universität Magdeburg 2009), Prof. Dr. Schraven (Universität Magdeburg) und Kanehisa et al. 2009. Rot hervorgehoben sind die Proteine, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit als Markerproteine für die T-Zell-Aktivierung untersucht wurden. Orange hinterlegt wurden die mit ihnen im engen Zusammenhang stehenden Signalproteine.

Proteinkinasen, wie zum Beispiel Src-, Syk-, Csk- und Tec-Familienmitglieder, Phosphatasen, diverse Enzyme und Adapterproteine sind dabei in positive und negative Regulationsprozesse involviert. Entscheidend sind auch der Phosphorylierungsstatus und die Lokalisation der beteiligten Komponenten (Wang et al. 2008). Während die meisten Rezeptoren nach der Ligandenbindung die volle Aktivität erreichen, wird für eine effektive T-Zell-Aktivierung von einem „Zwei-Signal-Modell“ ausgegangen. Das bedeutet, dass zum Antigen-TCR-Erstkontakt ein weiteres kostimulatorisches Signal nötig ist, wie zum Beispiel die Involvierung von CD28 (Bretscher et al. 1970; Riha et al. 2010; Linsley et al. 1993). Bei Kontakt des TCRs mit einem

Antigen-MHC-Komplex, binden CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Zellen an nicht polymorphe Regionen von MHCII/I, welches zum Kontakt und zur Aktivierung der zytosolischen Seite der membranständigen Tyrosinkinase Lck, einem Mitglied der Src-Familie, führt (Veillette et al. 1988). Diese phosphoryliert gemeinsam mit Fyn die ITAMs (Reth-Motiv) an CD3 und ζ-Ketten (Carl H June et al. 1990; L E Samelson et al. 1986, 1990). Die phosphorylierten **SH2**-Domänen (src-Homologie 2) der ITAMs bieten in der Folge Bindungsmöglichkeiten für SH2-Domänen anderer Proteine, wodurch es zur Assoziation des zytosolischen ZAP70 mit den ITAMs kommt (Chan et al. 1992; Palacios et al. 2004). Die Tyrosinkinase ZAP70 wird durch Lck phosphoryliert (Chan et al. 1995; Wange et al. 1995; Mustelin et al. 2003) und phosphoryliert selbst SLP76, sowie das Gerüstprotein LAT (Horejsí, Weiguo Zhang, and Schraven 2004). LAT rekrutiert weiterhin zytosolische Adaptermoleküle wie ADAP, sorgt mit SLP76 für die LFA-1 Aktivierung und ist wesentlicher Initiator der SMAC-Formierung. Das phosphorylierte LAT bietet Bindungsstellen für Grb2, PLC $\gamma$ , p58PI<sub>3</sub>K und indirekt auch für SLP76 über Gads, sowie Nick, Vav1 und ITK (Koretzky et al. 2006; Liu et al. 1999; Sommers et al. 2004). Die Bindung von SLP76 und ITK (Perez-Villar and Kanner 1999) resultiert in der Aktivierung und Bindung von PLC $\gamma$  und RAS (J. C. Stone 2006). Weiterhin aktiviert SLP76 die GTPase RAC, die wiederum an der Aktivierung von Wave2 beteiligt ist. Wave2 ist zusammen mit Wasp und Vav1 für Veränderungen des Zytoskelettes verantwortlich (Nolz et al. 2006; W Zhang et al. 1999). Ein Verlust an SLP76 in der Zelle behindert somit die Bildung der immunologischen Synapse, für die eine Umstrukturierung des Zytoskelettes erforderlich ist. Hinzukommend wird in Abwesenheit von SLP76 kein Talin zur Stabilisierung der Synapse rekrutiert (Horn et al. 2009). Durch die über SLP76 aktivierte PLC $\gamma$  wird Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphonat (**PIP<sub>2</sub>**) in Inositol-1,4,5-Trisphosphat (**IP<sub>3</sub>**) und Diacylglycerol (**DAG**) gespalten. Das Vorhandensein von IP<sub>3</sub> führt zu einer Erhöhung der zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration und diese wiederum über die Aktivierung von Calcineurin zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFAT. Das bei der Spaltung von PIP entstehende DAG vermittelt zum einen mit Hilfe von Ca<sup>2+</sup> die Aktivität von PKC, die den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B aktiviert (Melowic et al. 2007), und zum anderen die Aktivierung des MAPK-Weges (Cobb 1999). Die Aktivierung des MAPK-Signalweges initiiert die IL-2-Produktion und verhindert Anergie und Zelltod. Der Transkriptionsfaktor AP-1 wird durch die Ras/Raf induzierte MAPK-Kaskade reguliert. Ras ist beteiligt an der Aktivierung von AP-1, c-Jun/c-Fos und an der CD69-Expression (D'Ambrosio et al. 1994). Die Transkriptionsfaktoren sorgen für die Induktion spezifischer Gene, die für die Proliferation, Differenzierung und Zytokinliberation verantwortlich sind.

Die Aktivierung des CD28-Oberflächenrezeptors resultiert in dessen Tyrosinphosphorylierung. Die phosphorylierten Tyrosine dienen als Bindungsstelle für SH-2-Domänen. Die PI3-Kinase bindet somit über die SH-2-Domänen am Rezeptor, was direkt über PIP<sub>3</sub> bzw. indirekt über PDK1 zur AKT-Phosphorylierung führt. AKT ist der Vermittler der CD28-Stimulation und trägt zur NF-κB-Aktivierung bei. AKT inhibiert zusätzlich Transkriptionsfaktoren, die den Zellzyklusarrest bewirken (Acuto et al. 2003). Zusätzlich vermittelt AKT über eine Gsk3-Aktivierung eine NFAT Aktivierung (Beals et al. 1997). Die Tyrosinphosphorylierung von CD28 führt auch zur Bindung von Grb2, was einen PI3K-unabhängigen Signalweg aktiviert (Okkenhaug et al. 1998).

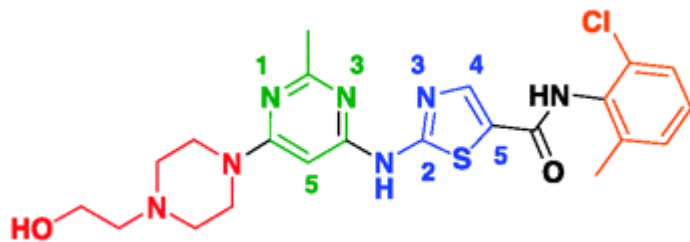
CD29 bzw. VLA-4 ist an der Phosphorylierung von LCK, Fyn, FAK, PLCγ, p45MAPK (Sato et al. 1995) und Erk1/2 (T. K. Kim et al. 2010) beteiligt. Die Aktivierung dieses Oberflächenrezeptors führt zu einer erhöhten Produktion von IL-2, TNFα, INFγ, GM-SCF, einer gesteigerten IL-2-R Expression und einer erhöhten Aktivierung von NFAT, NF-κB und AP-1 (Udagawa et al. 1996).

Die Termination der Signaltransduktion unterliegt einer strengen Kontrolle und wird durch Feedback-Mechanismen vermittelt. Nicht alle Phosphorylierungen sind aktivierend, sondern auch inhibierend. Ein Beispiel für eine negative Regulation der T-Zell-Signaltransduktion ist die durch Fyn vermittelte Aktivierung von PAG. Als Folge kommt es zur Aktivierung von Csk und Cbl, die eine inhibitorische Wirkung auf die Signaltransduktion besitzen (Filby et al. 2010).

Bislang ist nur teilweise bekannt, inwieweit die T-Zell-Signaltransduktion durch die TKIs Dasatinib und Midostaurin beeinflusst wird und wie sich dies in den Oberflächenmarkern CD29, CD69 und CD71 widerspiegelt.

## 1.5 Der Tyrosinkinase-Inhibitor Dasatinib

Dasatinib (*Sprycel*<sup>®</sup>, *N*-(2-Chlor-6-methylphenyl)-2-[[6-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-2-methyl-4-pyrimidinyl]amino]-5-thiazolcarboxamid-Monohydrat) gehört zur Stoffgruppe der Tyrosinkinase-Inhibitoren. Die chemische Struktur ist in Abbildung 4 dargestellt.



**Abbildung 4: Darstellung der zweidimensionalen Struktur von Dasatinib.**

Hier erfolgt die Darstellung der zweidimensionalen Struktur von Dasatinib nach Vorlage von Tokarski et al. 2006. Rot eingefärbt ist die Hydroxyethyl-piperazin-Gruppe, grün der Pyrimidin-Ring, blau der Aminothiazol-Ring, schwarz der Amid-Ring und orange der 2-chloro-6-methyl-phenyl-Ring.

Dasatinib wurde ursprünglich als SRC-Kinase-Inhibitor entwickelt, hemmt jedoch auch die BCR-ABL-Kinase, KIT und PDGFR in nanomolaren Konzentrationen (Lombardo et al. 2004; O'Hare et al. 2005). Eine Inhibition von LCK wird sogar in picomolaren Konzentrationen erreicht (Das et al. 2006). Seit 2006 ist Dasatinib in der Europäischen Union als Medikament zur Behandlung der chronischen myeloischen Leukämie (**CML**) und der Philadelphia-Chromosom-positiven akuten lymphatischen Leukämie (**ALL**) zugelassen. Es wird auch zur Behandlung von Erwachsenen bei Imatinib-Resistenz und Unverträglichkeit verwendet (Talpa et al. 2006; Guilhot et al. 2007; Cortes et al. 2007; Hochhaus et al. 2007). In Bezug auf die BCR-ABL-Inhibition ist es *in vitro* 325fach potenter als Imatinib. Es hemmt 32 von den 33 bekannten BCR-ABL-Resistenz-Mutationen (O'Hare et al. 2005). Außerdem kann Dasatinib die aktive und die inaktive Form von BCR-ABL binden (O'Hare et al. 2005; J. S. Tokarski et al. 2006). Häufig auftretende Nebenwirkungen unter Dasatinib-Therapie sind Durchfall, Übelkeit, Müdigkeit, Ekzeme, Ödeme, Pleuraergüsse, Pilzkrankungen und Gelenkschmerzen. Selten hingegen sind Herzinsuffizienz, Herzrhythmusstörungen, Bluthochdruck und Lungenödeme (Bergeron et al. 2007). Unter der Dasatinib-Therapie manifestierten sich aber auch Panzytopenien, massiver Herpes simplex Virus-Befall bis hin zur Sepsis (Weichsel et al. 2008). Dies ließ auf einen immunrelevanten Einfluss des TKIs auf T-Zellen schließen (Fei et al. 2008/2009; Weichsel et al. 2008). Weiterhin konnte festgestellt werden, dass T-Zellen durch Dasatinib-Inkubation in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>Phase des Zellzyklus arretieren, wobei eine Induktion der Apoptose nicht nachgewiesen werden konnte (Fei et al. 2008, 2009). In T<sub>reg</sub>-Zellen konnte durch den Einsatz des Inhibitors die Expression von FoxP3, GITR und CTLA-4 unterdrückt werden, sowie die Sekretion der Zytokine IFN- $\gamma$ , IL-4 und IL-10. Die Proliferation wurde signifikant supprimiert und die Phosphorylierung von Lck, ZAP70, Erk1/2, Akt und NF- $\kappa$ B inhibiert (Fei et al. 2009). In PHA-stimulierten CD8<sup>+</sup> Zellen erreichte man unter Dasatinib-Inkubation eine Suppression der Expression von CD25, CD69, HLA-DR und der Sekretion von IFN- $\gamma$  und Gran-

zym B. Eine signifikante Hemmung der TCR-vermittelten Signalkaskade wurde bei der Inkubation von T-Lymphozyten mit 10nM Dasatinib erzielt, für eine vollständige Inhibition der TCR induzierten Tyrosinphosphorylierung waren 100nM Dasatinib notwendig. Diese durch Dasatinib generierte Inhibition der T-Zell-Funktionen ist reversibel (Schade et al. 2008).

## 1.6 Der FLT3-Kinase-Inhibitor Midostaurin

PKC 412 (CGP41251) ist unter dem Freinamen Midostaurin bekannt. Hierbei handelt es sich um ein Staurosporin Derivat (entwickelt von Ciba Geigy/Novartis, Schweiz), welches wie ein Serin/Threonin- und Tyrosinkinase-Inhibitor wirkt. Nebenwirkungen, die unter Midostaurin Einsatz auftreten können, sind Übelkeit, Kopfschmerzen, Hautausschlag und Erbrechen (Propper et al. 2001). Zurzeit befindet sich das Medikament in Phase III der pharmakologischen Studien, zur Behandlung von Patienten mit AML. Es wird oral appliziert und gilt als effektiv und verträglich.

Midostaurin spielt eine Schlüsselrolle in Allo- und Autoimmunantworten (Si et al. 2005) und bietet dort diverse, bisher ungeprüfte Einsatzmöglichkeiten. Er hemmt in nanomolaren Konzentrationen die PKC-Isoformen  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen PKC Isoformen  $\delta$ ,  $\epsilon$  und  $\mu$  (Caravatti et al. 1994; Fabbro et al. 1999; Meyer et al. 1989). Es inhibiert FLT3 mit einer  $\text{IC}_{50}$  von 5nM bis 10nM (Heidel et al. 2006). In mikromolaren Konzentrationen inhibiert Midostaurin den MAPKinase-Signalweg, VEGF-R-Kinase, c-Src, PKA und C-Syk, c-fos sowie die Autophosphorylierung von PDGFR (Andrejaskas-Buchdunger and Regenass 1992; Fabbro et al. 1999). Außerdem inhibiert Midostaurin die  $\text{TNF}\alpha$ - und IL-6 Sekretion in T-Zellen (Si et al. 2005; Thavasu et al. 1999). Midostaurin ist in der Lage die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort zu inhibieren, was darauf schließen lässt, dass ein Einfluss auf die TCR-nahe Signaltransduktion besteht (Si et al. 2005). Weiterhin wird durch Midostaurin *in vivo* dem Tumorwachstum durch Hemmung der Tumorangiogenese über VEGF-R-Tyrosinkinase und der Zellproliferation über PKC entgegengewirkt (Fabbro et al. 1999). PKC ist auch für die T-Zell-Signaltransduktion und Aktivierung von Wichtigkeit, sodass sich eine Wirkung des TKI auf T-Lymphozyten annehmen lässt. Der Einsatz von Midostaurin bei Patienten, die an der akuten myeloischen Leukämie erkrankt sind und eine FLT3-Längen-Mutation (ITD) aufweisen, zeigte eine Reduktion der Blasten auf (Weisberg et al. 2002; Fischer et al. 2010). Eine Kombination dieses TKIs mit antileukämischen Chemotherapeutika wie Anthrazyklinen oder Cytarabin wird daher gegenwärtig geprüft. Unter protrahierter Midostaurin-Therapie entwickelten sich Resistenz-vermittelte Mu-

tationen die FLT3 als valide Zielstruktur in der AML bestätigten (Ahmad et al. 2010; Heidel et al. 2006; Weisberg et al. 2010).

## **1.7 T-Zell-Stimulation mittels Phytohämagglutinin und Dynabeads**

### ***CD3/CD28 T-Cell Expander***

Phytohämagglutinin (**PHA**) ist der Lektinextrakt aus der roten Feuerbohne und wird durch Standardchromatographietechniken gewonnen. Es besteht aus zwei eng verbundenen Proteinen: Leukoagglutinin (**PHA-L**) und Erythroagglutinin (**PHA-E**) und besitzt die Fähigkeit, Kohlenhydrate zu binden (Hamelryck et al. 1996). PHA weist zellagglutinierende und mitogene (Nowell 1960) Fähigkeiten auf und wird zur Stimulation von Lymphozyten verwendet. Lymphozyten der Blutbahn haben ihr Stimulationsoptimum nach drei Tagen bei einer PHA-Konzentration von 1-2 µg/ml (Potter and Moore 1975). Bei einer PHA-Stimulation von Vollblut kommt es nach ein bis zwei Tagen zu einer Reduktion der absoluten Zellzahlen. Monozyten und Neutrophile werden apoptotisch, sodass ihr Anteil an der Gesamtzahl mit jedem Stimulationstag abnimmt und somit die Menge der Zelltrümmer zunimmt. Ebenfalls konnte bei T-Lymphozyten, die 48 Stunden mit PHA kultiviert wurden, Apoptose nachgewiesen werden (Li and Traganos 1994). Nach drei Tagen steigt die absolute Zellzahl wieder an, was durch eine gesteigerte Proliferation der T-Zellen erklärt wurde. Über 90% der T-Zellen waren aktivierte T-Lymphozyten, wobei es anscheinend im Gegensatz zu einer spezifischen CD3/CD28 Antikörper-Stimulation keine Bevorzugung von CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> Zellen gab. Die anderen Lymphozytenpopulationen wie B-Zellen oder NKs wurden weniger durch PHA beeinflusst (O'Donovan et al. 1995). PHA bindet glykosylierte Oberflächenproteine, wie den TCR-Komplex und regt die T-Zellproliferation durch direkten Kontakt mit diesem und Kreuzvernetzung mit anderen Oberflächenmolekülen an (Schmitt-Verhulst et al. 1987; Vine et al. 1988). Eine Stimulation der T-Lymphozyten mit PHA ist mit einer Zunahme der Zellgröße und einer Steigerung des Zellmetabolismus verbunden. Anzahl und Größe der Dictyosomen des Golgi-Apparates und die Menge der Mikrotubulie nehmen direkt proportional zur Zellgröße zu (Biberfeld 1971; Thyberg et al. 1977). Ceuppens et al. postulierten 1988, dass für die Proliferation isolierter T-Zellen neben PHA noch weitere Impulse erforderlich sind wie zum Beispiel extrazelluläres IL-2 (Gery et al. 1972; de Vries et al. 1979; Wakasugi et al. 1985). PHA wird experimentell eingesetzt, um T-Lymphozyten zu stimulieren. Morphologische Veränderungen unter PHA sind bekannt und die Effektivität dieser Stimulationsart ist erwiesen, sodass auch in der vorliegenden Arbeit darauf zurückgegriffen wurde.

Eine weitere Möglichkeit um T-Zellen zu stimulieren, ist der Einsatz von CD3/CD28 Dynabeads: Die Aktivierung der T-Zellen wird zum einen durch ein Signal des TCRs und zum anderen durch ein kostimulatorisches Signal erreicht. Letzteres kann durch CD28 vermittelt werden. *In vivo* wird der T-Zelle ein Antigen über APCs präsentiert. Der TCR wird über die Bindung mit dem MHC-Komplex aktiviert. Das Pendant von CD28 auf dem TCR sind CD80/CD86 des APCs (Riha and Rudd 2010). Für unterschiedliche experimentelle Fragestellungen ist es wichtig, diesen natürlichen Ablauf so detailnah wie nur möglich nachzuahmen. Ein Weg dafür ist die Verwendung von CD3/CD28 Dynabeads. Dies sind superparamagnetische, polymere Kugeln, deren magnetisches Material von einer polymeren Hülle umschlossen wird. Auf diesen Kugeln sind die CD3 und CD28 Antikörper kovalent fixiert, welche durch die Interaktion mit spezifischen Rezeptoren, auch in Abwesenheit von APCs, weitestgehend physiologisch die T-Zell-Signalkaskade aktivieren. Dynabeads *Human CD3/CD28 T-Cell Expander* ist spezifisch für die Isolation, Aktivierung und Expansion von menschlichen T-Zellen: CD3<sup>+</sup> T-Zellen, naive T-Zellen, aktivierte CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen, Gedächtnis-T-Zellen und regulatorische Lymphozyten (Kalamasz et al. 2004; Levine et al. 2002). Der Expander ermöglicht eine starke quantitative Expansion der T-Zellen, wobei CD4<sup>+</sup> Zellen besser auf diese Art der Stimulation ansprechen als CD8<sup>+</sup> Zellen (Laux et al. 2000). Entscheidend für die T-Zell-Aktivierung ist das Verhältnis von Beads zu Zellen. Ein hohes Beads zu Zellen Verhältnis führt zu einer Expansion von naiven Zellen, weniger Beads zu einer Bevorzugung antigenspezifischer T-Zellen (Bere et al. 2010; Kalamasz et al. 2004). Beeinflusst wird auch die Zytokinsekretion, die nach erfolgter Stimulation überwiegend ein Th1-Muster aufzeigt (Garlie et al. 1999; B L Levine et al. 1997).

Die klinische Relevanz wird im Einsatz von CD3/CD28 *T-Cell Expander*-stimulierten T-Zellen bei immunsupprimierten HIV- oder Tumorkranken und nach Stammzelltransplantationen unter Ausnutzung des GvT-Effektes deutlich (Garlie et al. 1999; Onlamoon et al. 2006; Porter et al. 2006). *In vitro* stimulierte, gesunde T-Lymphozyten werden den Patienten zur Therapie gegeben.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden der CD3/CD28 *T-Cell Expander* zur *in vitro* T-Zell-Stimulation verwendet.



## 2. Aufgabenstellung

Dasatinib, ein SRC-Kinase-Inhibitor, zeigte schon in früheren Publikationen die Fähigkeit, Aktivierungsmarker, ausgewählte proximale Signalwegproteine und die Zytokinproduktion von T-Lymphozyten zu inhibieren. Hingegen ist über den Einfluss von FLT3-Tyrosinkinase-Inhibitoren, wie Midostaurin, auf die Oberflächenantigen-Expression und die proximale Signalwegtransduktion in T-Zellen weniger bekannt. Si et al. vermuteten 2005 aufgrund der Wirkung von Midostaurin auf die intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Antwort einen Einfluss auf den proximalen T-Zell-Signalweg. Durch vorliegende Forschungsergebnisse ist hypothetisch anzunehmen, dass Midostaurin ebenso wie Dasatinib auf die Expression von charakteristischen Oberflächenmarkern und auf essentielle Proteine der intrazellulären Signaltransduktion der T-Zellen hemmenden Einfluss ausübt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die vergleichende Analyse der Tyrosinkinase-Inhibitoren Midostaurin und Dasatinib in Bezug auf ihr inhibitorisches Potential auf humane T-Zellen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die folgenden Teilaspekte untersucht werden:

1. Untersuchung von Aktivierungsmarkern humaner T-Zellen (CD29, CD69, CD71) und deren Beeinflussbarkeit durch Midostaurin und Dasatinib
2. Analyse der zytomorphologischen Konsequenzen der Tyrosinkinase-Inhibitoren-Einwirkung
3. Vergleich einer CD3/CD28 *T-Cell Expander*-spezifischen Stimulation der T-Zellen mit einer PHA-Stimulation
4. Analyse der Effekte von Midostaurin und Dasatinib auf die intrazelluläre Signaltransduktion von humanen T-Zellen

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Material

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Chemikalien, Hilfsmittel und deren Herkunft

Firma	Produkt
Fermentas (Sankt-Leon Roth)	Prestained Protein Ladder
Greiner Bio One (Frickenhausen)	Cellstar Centrifuge Tubes, Pasteurpipette
Invitrogen (Karlsruhe)	DPBS, L-Glutamine
Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)	Pan T Cell Isolation Kit II
Novartis (Basel, Schweiz)	Midostaurin
PAA (Karlsruhe)	RPMI 1640, FCS, Ficoll
Roth (Karlsruhe)	Acrylamid, Bromphenolblau, BSA, DMSO, EDTA, Glycin, $\beta$ -Mercaptoethanol, Milchpulver, NaCl, NaF, Roti-Nanoquant, SDS, TEMED, Tris, Neubauer Zählkammer
SelleckChem (Houston, USA)	Dasatinib

Tabelle 3: Verwendete Geräte und deren Herkunft

Firma	Gerät
Becton&Dickinson (Heidelberg)	Durchfluss-Zytometer „Calibur“
Binder (Tuttlingen)	CO <sub>2</sub> -Inkubator CB210
Eppendorf (Hamburg)	Mikrozentrifuge 5415R
Heraeus (Hanau)	Varifuge 3.ORS
Hettich (Bäch, Schweiz)	Zentrifuge „Hettich universal 320“
Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)	VarioMACS Separator
Nuaire (USA)	Autoflow 4750 water jacketed CO <sub>2</sub> -incubator
Siemens (Erlangen)	Advia 120 Automated Hematology Analyzer
Thermo Scientific (Braunschweig)	Zentrifuge „Multifuge 3SR+“
VWR (Darmstadt)	Zellkulturbank
Zeiss (Jena)	Mikroskop, Rathenow Technik, Axiophot

#### 3.2 Studienpopulation

Vollblutproben von gesunden Probanden wurden, nach Aufklärung über die Studie und Einverständnis der Spender zur Aufnahme in dieser Studie („Untersuchung onkogener Signaltransduktionswege bei der akuten myeloischen Leukämie (AML) und bei myeloproliferativen Syn-

dromen (MPS)“) entnommen. Ein Votum der Ethikkommission lag vor (Protokollnummer: UKMD115/08). Es wurde darauf geachtet, dass die Blutspender infektfrei und ohne chronische Erkrankungen waren, um eine erhöhte Vorstimulation der T-Zellen zu verhindern. Das Durchschnittsalter der Probanden lag bei 34,7 Jahren. Der Anteil der männlichen zu den weiblichen Probanden war ausgewogen. Von einigen Probanden wurden mehrmals Blutproben entnommen, die für unterschiedliche Fragestellungen dienten. Die Blutabnahme erfolgte morgens zwischen 5.30 Uhr und 6.30 Uhr, um tageszeitliche Schwankungen im Hormonhaushalt zu vermeiden. Insgesamt wurden 29 Blutproben von 16 Spendern analysiert.

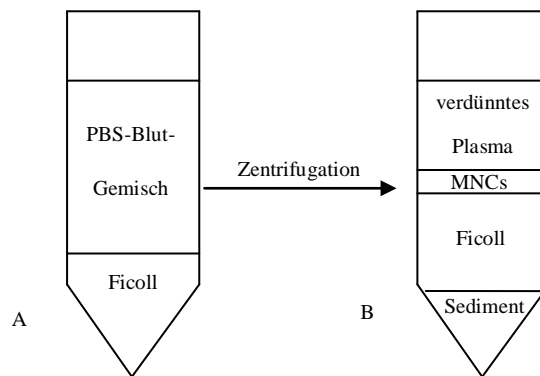
### **3.3 Zellbiologische Methoden**

#### **3.3.1 Bestimmung des Differentialblutbildes**

Peripher wurden je Proband 70ml Blut in EDTA-gepufferte Vacutainerröhrchen abgenommen. 300µl Blut wurden zur Blutbildbestimmung aus dem EDTA-Röhrchen entnommen und mittels eines Differentialblutbild-Automaten analysiert, um die Lymphozytenverteilung der Probe zu erhalten. Das restliche Blutvolumen wurde in sterile 50ml Schraubdeckelröhrchen überführt.

#### **3.3.2 Isolation der T-Zellen**

Zunächst wurde eine Dichtegradientenzentrifugation (Bøyum 1968) durchgeführt, um die MNCs aus dem Blut zu gewinnen (Abbildung 5). Dafür wurden die EDTA-antikoagulierten Vollblutproben im Verhältnis 1:1 mit PBS gemischt. Anschließend wurden 30ml PBS-EDTA-Blut-Gemisch auf 15ml Ficoll geschichtet. Diese Ansätze wurden für 20min bei 1570U/min, 18°C und ohne Abbremsen zentrifugiert. Das Prinzip der Auftrennung der Blutbestandteile mittels Ficoll beruht auf der Tatsache, dass MNCs und Thrombozyten eine geringere Dichte (<1077g/ml) haben als das Ficoll (ungeladenes Saccharose-Polymer, ~1077g/ml), und sich deswegen in einer darüber liegenden Schicht ablagern. Erythrozyten und Granulozyten werden durch das Ficoll aggregiert und sedimentieren aufgrund ihrer höheren Dichte. Nach dem Zentrifugieren wurde der Ring aus mononukleären Zellen, welcher sich zwischen verdünntem Plasma und Ficoll als Phasengrenze befindet, mit einer Pasteurpipette abgenommen, zweimal mit PBS gewaschen und für fünf Minuten bei 20°C und 1500U/min zentrifugiert. Die so aufgereinigten MNCs wurden entweder direkt weiterverarbeitet oder bis zur Verwendung kultiviert.



**Abbildung 5: Isolation der MNCs durch Dichtegradientenzentrifugation**

Bei der Dichtegradientenzentrifugation wird aufgrund von Dichteunterschieden der Blutbestandteile und des Ficolls, welche zu Anfang zusammen in ein Röhrglas gegeben werden (**A**), eine Auftrennung in verdünntes Plasma, MNCs, Ficoll und Sediment (**B**) erreicht. Nach erfolgter Zentrifugation können die MNCs aus den aufgetrennten Schichten abpipettiert und weiterverwendet werden.

Um bei der weiteren Verwendung der Zellen störende Erythrozyten zu entfernen, wurde eine Erythrozyten-Lyse durchgeführt. Dabei wurde das Zellpellet in Erythrozyten-Lysepuffer (siehe Tabelle 4) resuspendiert, für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, wodurch die Erythrozyten anschwellen und platzen, ohne Toxizität für andere Zellpopulationen. Anschließend wurde das Lysat bei 1200rpm für fünf Minuten bei 4°C zentrifugiert und zweimalige mit PBS gewaschen.

Tabelle 4: Erythrozyten-Lysepuffer

Na <sub>4</sub> Cl	155 mM
KHCO <sub>3</sub>	10 mM
EDTA	0,1 mM

Die Isolation der T-Zellen erfolgte mit Hilfe des *Pan T Cell Isolation Kit II* über einen MACS (*Magnetic Cell Sorting*)-Separator. Bei diesem Verfahren handelt es sich um ein magnetisches Zelltrennungssystem. Es findet eine negative Selektion der T-Zellen durch Depletion der „Nicht-T-Zellen“, wie zum Beispiel B-Zellen, Natürliche Killer-Zellen, Monozyten, Granulozyten und dendritische Zellen, statt. Durch die Inkubation der MNCs mit einem Mix aus Biotin-konjugierten monoklonalen Antikörpern gegen CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123 und Glykophorin A werden die Nicht-T-Zellen markiert. Die anschließende Inkubation mit anti-Biotin monoklonalen Antikörpern, konjugiert mit MicroBeads, resultiert in der magnetischen Markierung der unerwünschten Zellpopulationen. Diese Art der Aufreinigung wird als Depletion bezeichnet und hat den Vorteil, dass die T-Zellen nicht markiert werden, was zu einer potentiellen Aktivierung führen könnte.

Die markierten Zellen wurden zur Aufreinigung auf eine LS-Säule gegeben, um dort magnetisch gebunden zu werden. Anschließend wurde die Säule dreimal mit PBS gewaschen. Der Durchfluss enthielt die unmarkierte Zielpopulation.

Die magnetische Markierung wurde folgendermaßen durchgeführt: die Zellsuspension aus MNCs wurde bei 1000rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde in 40µl PBS /10<sup>7</sup> Zellen resuspendiert, 10µl Biotin-Antibody Cocktail je 10<sup>7</sup> Zellen hinzugegeben und für 10 Minuten bei 4-8°C inkubiert. Anschließend wurden 30µl PBS /10<sup>7</sup> Zellen sowie 20µl Anti-Biotin-MicroBeats je 10<sup>7</sup> Zellen zugegeben. Nach 15-minütiger Inkubation bei 4-8°C wurden die Zellen mit dem 10-20fachen des bisherigen Volumens an PBS gewaschen und bei 300g, 10 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde in 500µl PBS resuspendiert. Die Zellzahl wurde durch mikroskopisches Auszählen in der Neubauer-Zählkammer ermittelt.

### 3.3.3 Zellkultur

Im Anschluss an die T-Zell-Isolation wurden je nach Fragestellung die MNCs oder die aufgereinigten T-Zellen in Kultur genommen. Die Kultivierung erfolgte in *Rosewell Park Memorial Institute Medium (RPMI) 1640*, welches mit 10% igem fötalem Kälberserum (FCS) angereichert wurde. Alle Ansätze wurden in einer Konzentration von  $0,5 \times 10^6$  /4ml in 6-Loch Zellkultur-Platten (*wells*) bei 37°C für 48 Stunden und bei 5% CO<sub>2</sub> in einem Brutschrank angelegt.

### 3.3.4 Inhibition und Stimulation der T-Zellen in Vorbereitung für den Western Blot

Aufgrund der gewonnenen Erkenntnisse der Durchfluss-Zytometrie (siehe 4.4.2) wurde zur Analyse der Signaltransduktion in T-Zellen die Stimulation über CD3/CD28 verwendet. Vor Experimentbeginn wurden  $2 \times 10^6$  Zellen/ml in 10ml RPMI1640 mit 10% igem FCS aufgenommen und über Nacht im Brutschrank bei 37°C kultiviert. Am Tag des Experiments wurden  $40 \times 10^6$  Zellen für insgesamt neun Proben benötigt. Es waren neun Ansätze nötig, um drei unterschiedliche Stimulationszeiten mit CD3/CD28 *T-Cell Expander* unter Inhibitoreinwirkung durchführen zu können. Der Versuchsaufbau ist in der nachfolgenden Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 5: Darstellung des Versuchsaufbaues in Vorbereitung der Western Blots.

Ansatz	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Inhibitor [50nM]	Ø	Ø	Ø	Dasa- tinib	Dasa- tinib	Dasa- tinib	Mido- staurin	Mido- staurin	Mido- staurin
Stimmulationszeit [min]	0'	3'	10'	0'	3'	10'	0'	3'	10'

Zu Versuchsbeginn wurden die Ansätze „4-9“ für 10 Minuten bei 37°C mit dem entsprechenden Inhibitor preinkubiert. Die Inkubation wurde durch fünf-minütige Zentrifugation bei 4°C, 6000rpm und dem Absaugen des Überstandes beendet. Die Zellen wurden durch das Resuspendieren in 5ml RPMI 1640 und erneuter Zentrifugation gewaschen. Es erfolgte die Stimulation der Zellen. Dazu wurden sie mit 150µl RPMI 1640 und je Röhrchen 150µl Antikörper (AK)-Mix gemischt. Das Auffüllen der Nullwerte wurde mit 150µl kaltem RPMI 1640 vorgenommen.

Der Antikörper-Mix bestand aus CD28 und MEM 92 (*Ascites*) und wurde im Verhältnis 500:1 zum Inhibitor/DMSO gegeben, damit die Stimulation in Anwesenheit des jeweiligen Inhibitors ablaufen konnte, da bereits gezeigt wurde, dass sowohl die Dasatinib-Inhibition (Weichsel et al. 2008), als auch die Midostaurin induzierte Hemmung (Andrejaskas et al. 1992; Alkan et al. 1993) reversibel sind. Die Inkubation des T-Zell-AK-Mixes erfolgte bei 37°C. Die Inkubation wurde durch Zugabe von 1ml kaltem PBS gestoppt, die Ansätze bei zwei Minuten, 7000rpm und 4°C zentrifugiert und daraufhin bei 4°C auf Eis gelagert.

### 3.3.5 Stimulation und Inhibition von T-Zellen für die Durchfluss-Zytometrie

Zur PHA-Stimulation von T-Zellen wurde eine Konzentration von 0,5% igem PHA etabliert (siehe Punkt 4.2). Nach Vorlage der Ergebnisse wurden eine PHA-Konzentration von 0,5% und eine maximale Stimulationsdauer von 48 Stunden verwendet.

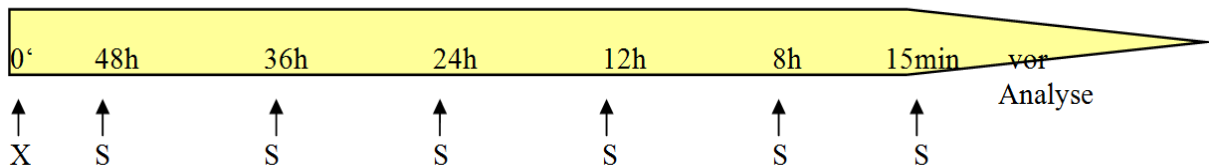
Als zweite Stimulationsmethode für die T-Zellen wurde der Invitrogen Dynabeads CD3/CD28 *T-Cell Expander* gewählt, der bereits zur Aktivierung und Expansion von menschlichen T-Zellen (Kalamasz et al. 2004; Levine et al. 2002; Laux et al. 2000) verwendet wird. Entsprechend der Herstellerangaben wurden zu  $1 \times 10^6$  T-Zellen je 25µl Beads gegeben und für 24 bzw. 48 Stunden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> in einem Brutschrank inkubiert. Der Erfolg der Stimulanz-

Reagenzien wurde durch die Expression von Oberflächenmarkern auf T-Zellen mittels Durchfluss-Zytometrie (siehe 4.2) überprüft und die weitere Verarbeitung der Kulturen erfolgte wie zuvor beschrieben.

Direkt nach der Aussaat im Kulturmedium wurden die T-Zellen mit dem der Aufgabenstellung entsprechenden TKI preinkubiert (Zeitpunkt „Null“, siehe Abbildung 6). Dabei wurde Dasatinib in klinisch relevanten Konzentrationen von 10nM und 50nM (Weichsel et al. 2008) verwendet. Bei Midostaurin wurden klinisch relevante Konzentrationen von 5nM, 20nM und 50nM eingesetzt. Diese wurden in frühen klinischen Studien als Talspiegel für die Substanz beschrieben.

Die Stimulation erfolgte zu Zeitpunkten 48 Stunden bis 15 Minuten vor der Zell-Analyse, je nach Ansatz mittels PHA oder CD3/CD28 *T-Cell Expander*. Die Stimulation erfolgte jeweils frühestens 10 Minuten nach Zugabe des jeweiligen TKIs. Nach Ablauf der Inkubationsdauer wurden die Proben mittels Durchfluss-Zytometer analysiert (siehe 3.6).

Zeitpunkt:



**Abbildung 6: Darstellung des zeitlichen Ablaufes der Inhibitor-Inkubation und Stimulation von T-Zellen.**

In dem Zeitstrahl sind die Stimulationszeitspannen bis zur durchfluss-zytometrischen Analyse abgetragen. 0° markiert den Zeitpunkt der Aussaat der Zellen in RPMI 1640 und die sofortige Zugabe des jeweiligen Inhibitors (X). Im Anschluss daran erfolgte frühestens nach 10 Minuten die erste Zugabe des Stimulanz (S) in den Zeitspannen 48-, 36-, 24-, 12-, 8 Stunden und 15 Minuten vor der Analyse.

### 3.3.6 Mikroskopie

Um Aussagen über morphologische Veränderungen der T-Zellen unter der TKI-Inkubation treffen zu können, wurde die Zell-Morphologie im Lichtmikroskop analysiert. Dazu wurden Cytospins angefertigt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für fünf Minuten bei 1000U/min auf einem Objektträger fixiert, gefolgt vom zwei-minütigen Trocknen des Objektträgers bei 2000U/min. Im nächsten Schritt konnten die Zellen am Mikroskop mit der Software DHS-Bilddatenbank im Durchlicht bei zehnfacher, zwanzigfacher bzw. vierzigfacher Vergrößerung mikroskopiert und zur Dokumentation auf Fotopapier kopiert werden.

### 3.3.7 Immunphänotypisierung (Durchfluss-Zytometrie)

In der Durchfluss-Zytometrie werden die intra- oder extrazellulären Antigene der zu untersuchenden Zellen mit Fluoreszenz gekoppelten Antikörpern markiert. Die Analyse mehrerer Parameter wird durch die Kopplung mit unterschiedlichen Fluorochromen möglich. Die Fluorochrome werden von dem Laserstrahl angeregt und emittieren Licht charakteristischer Wellenlängen, welches detektiert und analysiert wird.

Die in der vorliegenden Arbeit analysierten Oberflächenantigene (**CD**; *cluster of differentiation*) der T-Zellen sowie die Fluorochrom-Kopplung der Antikörper sind in der Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Übersicht der verwendeten Fluorochrome zur Oberflächenantigen-Markierung.

Antigen	Isotyp	Konjugat	Firma	Verdünnung
<b>CD71</b> (Transferrin Rezeptor)	IgG1, Kappa, mouse	FITC	DakoCytomation	1:10
<b>CD69</b>	IgG2b, mouse	PE	Beckman Coulter	1:10
<b>CD3</b> (TCR)	Schwere IgG1-Ketten und leichte Kappa-Ketten, mouse	PerCP	Becton&Dickinson	1:10
<b>CD29</b> (Integrin beta1)	IgG2a, Kappa, mouse	PE	Becton&Dickinson	1:10

Zur Markierung der Oberflächenantigene wurden mindestens 10.000 T-Zellen im „life gate“ in 100µl PBS aufgenommen und mit 10µl des primären Antikörpers für 20 Minuten in der Dunkelheit bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Entfernen überschüssiger ungebundener Antikörper wurde der Ansatz zweimal mit 1ml PBS gewaschen und zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 400µl PBS resuspendiert. Die Analyse der Proben erfolgte im Durchfluss-Zytometer (FACS-Calibur, BD Biosciences). Je Analyse wurden 100.000 Events gesammelt. Die Auswertung fand mit dem Software-Programm *CellQuest Research* statt. Zur graphischen Darstellung wurden zweidimensionale „Punkt-Bilder“ (dot-blots) verwendet. Durch gezieltes Setzen von Auswahlfenstern („gates“) war es möglich, unterschiedliche Zellpopulationen quantitativ näher zu analysieren. Es wurde auf CD3<sup>+</sup>/CD29<sup>+</sup>; CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> und CD3<sup>+</sup>/CD71<sup>+</sup> Zellen gated. Anschließend wurde der Prozentsatz an positiven CD3<sup>+</sup>/CD29<sup>+</sup>; CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> und CD3<sup>+</sup>/CD71<sup>+</sup> Zellen zur Auswertung der Ansätze verwendet.

### 3.4 Proteinbiochemische Methoden

Dieser Arbeitsteil der vorliegenden Dissertation wurde im Institut für Molekulare und Klinische Immunologie der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magde-



burg unter Anleitung von Frau Dr. rer. nat. Kliche vorgenommen. Verfahren, Abläufe, diesbezügliches Material und Geräte stammen von ihrer Arbeitsgruppe und durften freundlicherweise verwendet werden.

Die Gewinnung, das Anlegen der Zellkultur, Inhibition und Stimulation der T-Zellen erfolgte wie unter 3.3 beschrieben.

### 3.4.1 Herstellung von Zellysaten

Ein erster Grundschrift zur Vorbereitung des Western Blots war die Herstellung von Zellysaten. Dabei wurde mit Hilfe von Detergenzien die Zellmembran aufgelöst, um die zu untersuchenden Proteine zu gewinnen. Die, wie unter 3.3.4 beschrieben, gewonnenen Pellets wurden in je 50µl Lysepuffer (LP) (siehe Tabelle 7) resuspendiert und 20 Minuten auf Eis gestellt. Zusätzlich wurde der Lysepuffer in drei Teile geteilt und zu einem Drittel mit Dasatinib, zum zweiten Drittel mit Midostaurin und im letzten Drittel mit DMSO versetzt, um auch hier die Anwesenheit des jeweiligen Inhibitors zu gewährleisten.

Unlösliche Zellbestandteile wurden vom Lysat durch 10-minütiges Zentrifugieren (13200rpm, 4°C) getrennt. Das Zellysat wurde als Überstand vorsichtig abgenommen, direkt weiterverwendet oder bei -80°C bis zur Bearbeitung gelagert.

Tabelle 7: Lysepuffer

Chemikalie [Konz final]	Stammlösungen	1ml	in [µl]
NP40 1%	10%		100
Lauryl Maltoside	10%		100
Vanadat [1mM]	100nM		10
Tris [50mM]	1M pH7,4		50
EDTA [10mM]	0,5M		20
NaF [10mM]	0,5M		20
NaCL [150mM]	5M		33
PEFA-Block	2mg/ml		5
PMSF [1mM]	100mM in EtoH		10
H <sub>2</sub> O			652

### 3.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Zur Konzentrationsbestimmung der gewonnenen Proteine wurde eine Bestimmung nach Bradford verwendet. Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass die Anlagerung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250 in saurer Lösung an kationische, unpolare Seitenketten von Proteinen zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes von 465nm (rot) zu 595nm (blau) führt, welche photometrisch messbar ist. Dabei ist die Absorptionszunahme

bei 595nm proportional zur Proteinkonzentration. Zur Erstellung der Kalibrierungsgeraden wurde eine BSA-Standardreihe verwendet.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde in Doppelbestimmung in einer 96-Well-Platte durchgeführt. Die Roti-Nanoquant-Lösung wurde nach Anleitung 1:5 mit H<sub>2</sub>O verdünnt, davon 50µl je Well hinzugegeben, bei fünf Minuten inkubiert und mittels „Plate reader“ bei 595nm gemessen.

### **3.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Zur Vorbereitung der Gelelektrophorese wurden Proben mit Proben-Puffer (siehe Tabelle 8) versetzt und aufgekocht, was zur Denaturierung der Proteine führte. SDS ist anionisch geladen und denaturiert nicht nur die Proteine, sondern bindet auch deren hydrophobe Bereiche. Das Mercaptoethanol spaltet die Disulfidbrücken der Proteine, wodurch sich die hydrophoben Amino-Reste außen befinden. Die denaturierten Proteine werden zur gelelektrophoretischen Auftrennung auf das SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen.

Das Prinzip der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese beruht darauf, dass durch eine elektrische Spannung, die zuvor mittels SDS negativ geladenen und zusätzlich durch Mercaptoethanol denaturierten und gestreckten Proteine durch das Gel wandern und die kleinen Proteine besser durch die Poren des Gels migrieren als große, sodass es zu einer Auftrennung der Proteine der Größe nach kommt.

Bei der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese müssen die Proteine zuerst durch ein Sammelgel (siehe Tabelle 9) mit neutralem pH wandern und werden dort aufkonzentriert. Anschließend erfolgt die eigentliche Auftrennung der Größe nach im basischen Trenngel (siehe Tabelle 10).

Durch das gebundene, stark negativ geladene SDS wandern die denaturierten Proteine durch das Gel im elektrischen Feld zur Anode. Die Wandergeschwindigkeit wird nur noch von der Größe der Proteine bestimmt.

Durch die Siebfunktion des Gels wandern kleine Proteine schneller zur Anode als größere. Zur späteren eindeutigen Bestimmung der Proteingröße wird als Referenz ein Proteinstandard „*Prestained Protein Ladder*“ mitgeführt.

Es wurden 50µg des Proteinlysats mit Aqua dest auf 20µl aufgefüllt, 5µl 5x Sample-Puffer red (siehe Tabelle 8) zugegeben und der Mix für fünf Minuten bei 95°C gekocht. Anschließend wurde die Probe auf das SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Das Gel wurde für 1,5 Stunden bei 120V laufen gelassen.

Tabelle 8: Sample-Puffer

	5x	1x
0,5M Tris (pH 6,8)	10 ml	10 ml
Glycerol	20 ml	5 ml
Bromphenolblau	Spatelspitze	Spatelspitze
20% SDS	12,5ml	12,5ml
add H <sub>2</sub> O bis 50ml		
Kurz vor Benutzung Zugabe von $\beta$ -Mercaptoethanol: auf 1ml SB+100 $\mu$ l $\beta$ -Mercaptoethanol.		

Tabelle 9: 2 Sammelgele 5%

Aqua dest	5,15ml
0,5M Tris pH 6,8 mit SDS	2,1 ml
30% Acrylamid (29:1)	1,13ml
10% APS	60 $\mu$ l
TEMED	17,5 $\mu$ l

Tabelle 10: 2 Trenngele

	10%	12,5%
Aqua dest	7,5 ml	6 ml
1,5M Tris pH 8,8	4,5 ml	4,5 ml
30% Acrylamid (29:1)	6 ml	7,5 ml
10% APS	120 ml	120 ml
TEMED	25 $\mu$ l	25 $\mu$ l

### 3.4.4 Western Blot

Um die mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine immunologisch nachweisen zu können und somit Aussagen über die Modifikation und Mengen der Proteine treffen zu können, ist es zunächst notwendig, die Proteine auf eine Membran zu überführen. Infolgedessen können die Proteine mittels spezifischer Antikörper detektiert werden.

#### 3.4.4.1 Protein-Transfer

Zum Transfer der Proteine aus dem Trenngel auf eine Trägermembran wurde ein Sandwich aus Gel, Trägermembran und Filterpapier aufgebaut und ein elektrisches Feld angelegt. Der Transfer erfolgte im Tank-Blot-System. Die Proteine wandern bei 140mA aus dem Gel auf die Nitrocellulose-Membran in Richtung der positiven Elektrode. Das ursprüngliche im Gel erhaltene Trennmuster der Proteine blieb bei dem Transfer erhalten. Der erfolgreiche Transfer der Proteine auf die Nitrocellulose Membran erfolgt durch Färbung der Membran mit Ponceau Rot (2% Ponceau S, 30% Trichloroacetacetat, 30% Sulfosalicylsäure, Verdünnung 1:10 mit Aqua dest vor Gebrauch). Die Färbung ist durch Waschen mit H<sub>2</sub>O reversibel.

### 3.4.4.2 Immundetektion

Vor der Immundetektion wurden die freien, unspezifischen Bindungsstellen der Proteine für eine Stunde mit 5% iger Milch geblockt (Blotto 5% (4°C): Entfettete Trockenmilch 5g, PBST 100ml). Danach wurde die Membran zweimal für fünf Minuten mit PBST (Phosphate Buffered Saline-Tween (**PBST**): PBS mit 0,1% Tween 20) gewaschen und in 10ml PBS-Tween zusammen mit 100µl Azid10% bei 4°C gelagert. Vor der Antikörperinkubation wurden die Blots zweimal für vier Minuten mit PBS-Tween gewaschen, um das Azid zu entfernen. Anschließend wurde der erste spezifische Antikörper in entsprechender Verdünnung (siehe Tabelle 11) auf die Membran aufgebracht und für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Der Antikörper ist gegen ein spezifisches Antigen des Proteins gerichtet und bildet einen Antikörper-Antigen-Komplex aus. Zum Entfernen der überschüssigen und unspezifisch schwächer gebundenen Antikörper nach der primären Antikörper-Inkubation wurde die Membran fünfmal für vier Minuten mit PBS gewaschen. Danach wurde der verdünnte sekundäre Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Der sekundäre Antikörper ist spezifisch für das Epitop des primären Antikörpers. Eine Übersicht, über die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Proteine, enthält die unten stehende Tabelle 11. Zu Beachten war, dass bei den nachfolgenden Proteinen der primäre Antikörper über Nacht auf der Membran inkubiert wurde: PLC $\gamma$ 1, ZAP70, LAT, LCK, SLP76, AKT, PKD1, MAPK.

An dem sekundären Antikörper ist eine Meerrettich-Peroxidase gekoppelt, die nach Zugabe der Chemolumineszenz-Substrat-Lösung „Roti-Lumin“ das Luminol in seine oxidierte Form umsetzt. Die entstehende Lumineszenz wurde mittels Hyperfilm detektiert.

Tabelle 14: Ausgewählte Proteine des T-Cell-Signalings.

<u>Antikörper</u>	<u>Modifikation</u>	<u>Molekulargewicht</u> <u>in kDa</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Herkunft</u>	<u>Firma</u>	<u>Gel</u>
<b>4G10</b>	alle Tyr		1:200	mouse	Cell Signaling	10%
<b>B-Actin</b>		45	1:200	mouse	Sigma	10%, 12%
<b>pAKT</b>	Ser 473	60	1:1000	rabbit	Cell Signaling	12%
<b>pLAT</b>	Tyr 171	36,38	1:1000	rabbit	Cell Signaling	12%
<b>pLCK</b>	Tyr 418	56	1:1000	rabbit	Bio Zol	10%
<b>pMAPK</b>	Tyr 202/204	42,44	1:5000	rabbit	Cell Signaling	10%
<b>pPKD1</b>	Ser 916	115	1:1000	rabbit	Cell Signaling	12%
<b>pPLC<math>\gamma</math>1</b>	Tyr 783	155	1:1000	rabbit	Santa Cruz	10%
<b>pSLP76</b>	Tyr 145	76	1:1000	rabbit	BD	12%
<b>pZAP70</b>	Tyr 319	70	1:1000	rabbit	Cell Signaling	10%

### 3.4.5 Dehybridisierung von Nitrocellulose-Membranen

Um weitere Proteine auf derselben Membran nachweisen zu können, wurde diese dehybridisiert. Dafür musste sie zweimal vier Minuten mit PBS-Tween gewaschen werden, kam für 45 Minuten in 20ml 1% iger  $\text{NaN}_3$ -TBS-Lösung (für 20ml: 2ml 10%  $\text{NaN}_3$ , 2ml 10xTBS, 16ml dd  $\text{H}_2\text{O}$ ) auf den Rüttler und wurde anschließend zweimal für vier Minuten mit PBS-Tween gewaschen. Eine Weiterbehandlung der Membran konnte entsprechend des Protokolls vorgenommen werden.

### 3.5 Statistik

Die Erstellung der Diagramme und die statistische Auswertung der Ergebnisse wurden mit dem Programm Graph Pad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., San Diego) durchgeführt. Alle Daten wurden als unabhängige Mehrfachbestimmungen erhoben ( $n$  = Anzahl der Versuche).

In den Diagrammen sind jeweils der Mittelwert und die dazugehörige Standardabweichung in Balkenform dargestellt.

Für den Vergleich von Konditionen wurde bei Nicht-Vorliegen einer Gaußschen Normalverteilung ein Mann-Whitney-U-Test gewählt. In den Abbildungen bedeutet \* =  $p < 0,05$ .

## 4. Ergebnisse

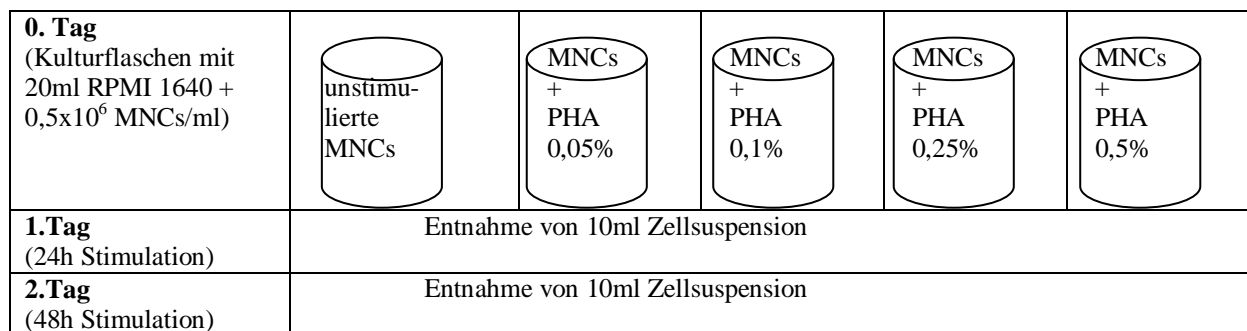
### 4.1 Studienpopulation

Um die Versuche durchführen zu können, war es wiederholt erforderlich die genaue Leukozyten-/Lymphozyten-Anzahl zu bestimmen, um zum Beispiel das Einstellen der Lymphozytenanzahl abhängigen Detergenzien des *Pan T Cell Isolations Kits* oder das Anlegen der Zellkulturen vornehmen zu können. Anhand der Blutbildanalyse des EDTA-Blutes im Differentialblutbild-Automaten war dabei deutlich zu erkennen, dass die Anzahl der Leukozyten/Lymphozyten bei den Probanden individuell sehr verschieden war. Der Mittelwert der Leukozyten/Lymphozyten im Differentialblutbild betrug  $7,57 \times 10^9/l$  bzw.  $0,43 \times 10^9/l$  (Standardabweichung: 4,54/0,15). Der kleinste gemessene Wert an Leukozyten/Lymphozyten war  $4,25 \times 10^9/l$  bzw.  $0,2 \times 10^9/l$ . Der größte ermittelte Wert war  $23,84 \times 10^9/l$  bzw.  $0,85 \times 10^9/l$ .

## 4.2 Etablierung der Stimulationsbedingungen zur PHA-Stimulation von T-Zellen

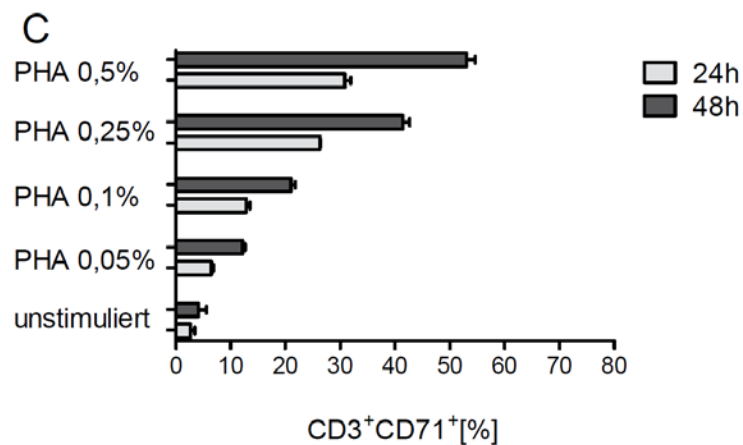
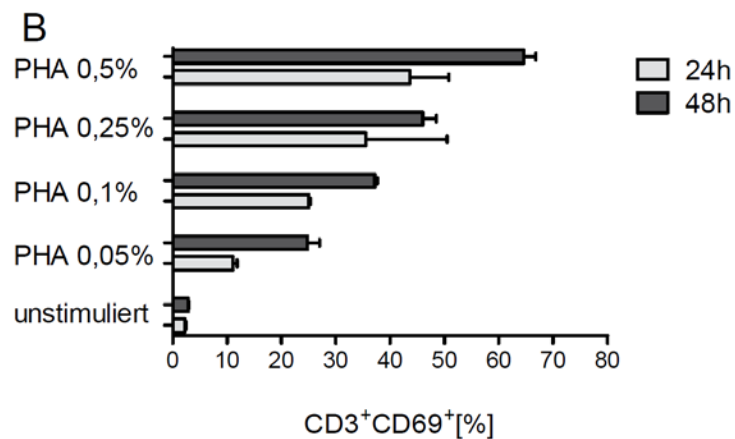
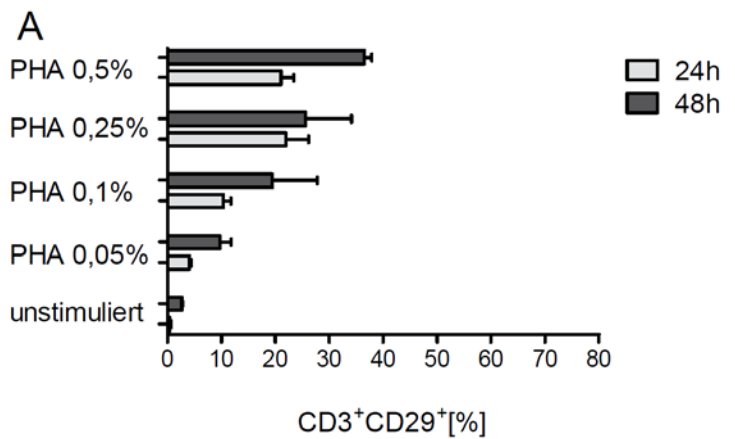
Eine Stimulation mit PHA wurde in dieser Arbeit angewendet, um eine Aktivierung von immunkompetenten Zellen zu erreichen und somit den Einfluss von Dasatinib und Midostaurin auf die T-Zell-Aktivierung und Proliferation analysieren zu können. Zur Aktivierung der T-Zellen wird in der Literatur am häufigsten 0,5%iges PHA eingesetzt. Die in der Literatur publizierten Stimulationszeiträume variieren stark, je nach experimenteller Fragestellung (Schade et al. 2008; Fei et al. 2008). Zunächst wurde der Frage nachgegangen, in welcher zeitlichen Dosis-Wirkungsbeziehung PHA zur Expression der zu untersuchenden Aktivierungsmarker CD29, CD69 und CD71 steht.

Daher war es ein erstes Ziel, zunächst eine Dosis an PHA zu definieren, die für die Analyse der T-Zell-Aktivierung in unserem Modell am besten geeignet erschien. Folgende PHA-Konzentrationen wurden analysiert: 0,05%; 0,1%; 0,25%; 0,5%. Getestete Zeiträume waren 24- und 48 Stunden. Dieser Versuch wurde mit MNCs durchgeführt. Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 7 dargestellt.



**Abbildung 7: Darstellung des Ablaufes der Zell-Stimulation**

Zu den Zeitpunkten 24- und 48 Stunden nach Fertigstellung des Zellansatzes wurde ein Teil als Zellsuspension entnommen und für die Durchfluss-Zytometrie, wie unter 3.3.5; 3.3.7 beschrieben, vorbereitet.



**Abbildung 8: Bestimmung der zeitlichen Dosis-Wirkungsbeziehung von PHA zur optimalen Expression der Oberflächenantigene CD29, CD69 und CD71 auf MNCs**

0,5x10<sup>6</sup> Zellen pro ml Kulturansatz wurden mit vier unterschiedlichen Konzentrationen an PHA behandelt: 0,05%; 0,1%; 0,25%; 0,5%. Die Analyse der Expression der Oberflächenantigene erfolgte 24- und 48 Stunden nach Beginn der PHA-Stimulation mittels Durchfluss-Zytometrie. **A** zeigt den prozentualen Anteil der CD3<sup>+</sup>/CD29<sup>+</sup> MNCs in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Zugabe von PHA in unterschiedlicher Dosis im Vergleich zu den unstimulierten Zellen. In **B** ist der prozentuale Anteil der CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> MNCs in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Zugabe von PHA in unterschiedlicher Dosis im Vergleich zu den unstimulierten Zellen zu sehen. Diagramm **C** bildet das Ergebnis des Versuches für CD3<sup>+</sup>/CD71<sup>+</sup> MNCs ab. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchsreihen mit der Standardabweichung.

Die Expression der untersuchten Aktivierungsmarker bei unstimulierten CD3<sup>+</sup> Zellen zu den Zeitpunkten von 24- und 48 Stunden war sehr gering (Abbildung 8, A-C). Der relative Anteil der CD3<sup>+</sup> Zellen betrug zu jedem Zeitpunkt bei allen Oberflächenantigenen weniger als 4,2%. CD29 zeigte insgesamt eine geringe Expression (Mittelwert 24 Stunden: 0,4% und 48 Stunden: 2,7%). CD69 war stärker exprimiert (Mittelwert 24 Stunden: 2,2% und 48 Stunden: 2,8%) als CD29, aber geringer als CD71 (Mittelwert 24 Stunden: 2,7% und 48 Stunden: 4,1%). Insgesamt wird deutlich, dass für alle ausgewählten Oberflächenmarker die 48 Stunden-Stimulation effektiver als die 24 Stunden-Stimulation war.

Mit 0,5%igem PHA konnte durchgehend die stärkste Expression aller Aktivierungsmarker erzielt werden.

Im Vergleich der Oberflächenantigen-Expression untereinander konnte gezeigt werden, dass CD69, in den gewählten Zeiträumen und Konzentrationen, am besten durch 0,5%iges PHA aktiviert wurde (Mittelwert 24 Stunden: 43,6% und 48 Stunden: 64,6%). Ähnliche Ergebnisse konnten auch von der Arbeitsgruppe Schade et al. 2008 gezeigt werden. Im Unterschied dazu war die CD29-Expression nach einer Inkubation mit PHA am schwächsten ausgeprägt (Mittelwert 24 Stunden: 21,1% und 48 Stunden: 36,5%). CD71 wurde nach einer PHA-Stimulation stärker exprimiert als CD29, aber schwächer als CD69 (Mittelwert 24 Stunden: 30,8% und 48 Stunden: 53%). Auch war bei CD69 eine frühere Zunahme der Expression bei allen PHA-Konzentrationen nachweisbar. In Abhängigkeit von den PHA-Konzentrationen lässt sich die Aussage treffen, dass auch bei geringeren PHA Konzentrationen CD69 besser als CD29 und CD71 exprimiert wurde (PHA 0,1% nach 48 Stunden: CD69: 37,2%; CD71: 21%; CD29: 19,4%). Die Standardabweichungen in den Diagrammen nahmen eine Spanne zwischen 0,07 und 8,53 ein. Innerhalb der Versuche zeigte sich eine große Standardabweichung der einzelnen Ergebnisse voneinander, die vermutlich in dem individuellen Verhalten der MNCs und T-Zellen der einzelnen Probanden begründet sein könnte.

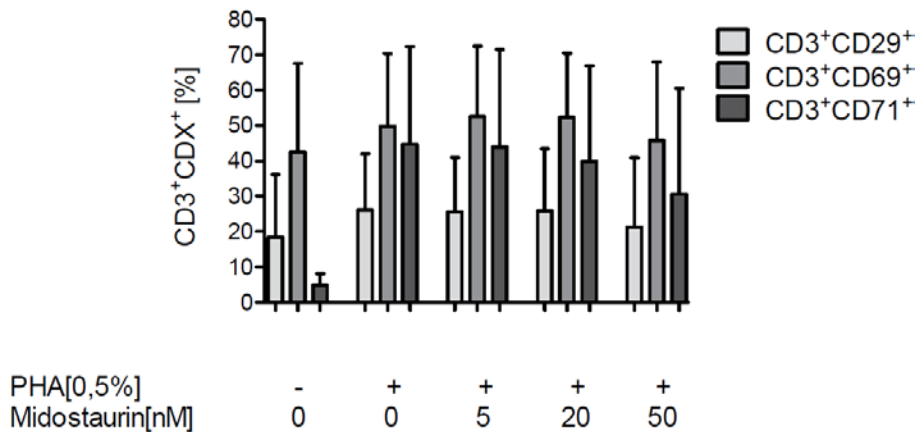
Aufgrund dieser Ergebnisse werden für alle weiteren Experimente eine PHA-Konzentration von 0,5% und eine maximale Inkubationszeit von 48 Stunden verwendet.

### **4.3 Etablierung der Inhibitionsbedingungen mittels TKIs**

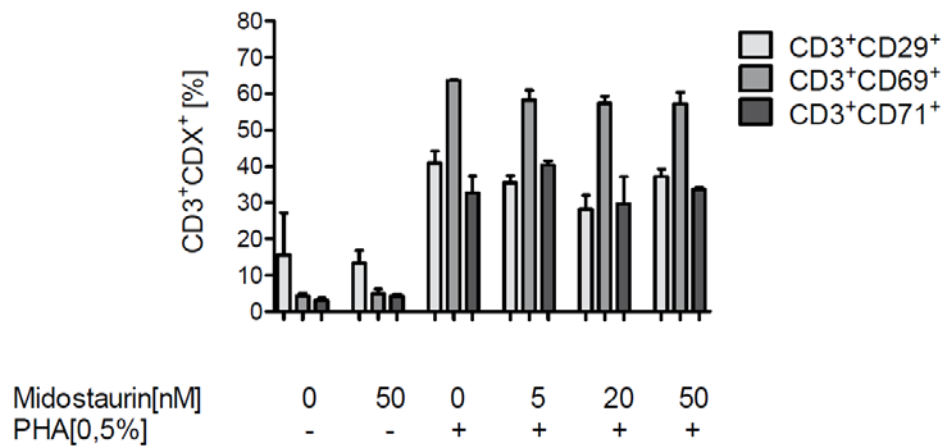
Nach der Etablierung der Stimulationsbedingungen sollten nun die Bedingungen für die Inhibition der T-Zellen mittels TKI bestimmt werden. Dabei wurde eine Probe vor der Stimulation mit Midostaurin für 10 Minuten inhibiert, während eine andere erst nach der Stimulation mit Midostaurin inkubiert wurde. Als Inhibitor wählten wir Midostaurin, als Stimulanz 0,5%iges PHA und die Inkubationszeit betrug 48 Stunden.



A



B



**Abbildung 9: Vergleichende Analyse zur Wirkung von Midostaurin auf die Expression der Oberflächenantigene CD3, CD29, CD69, CD71 von MNCs mit vorangegangener PHA-Stimulation bzw. mit nachfolgender PHA-Stimulation.**

Prozentualer Anteil der CD3<sup>+</sup>CDX<sup>+</sup> (X= CD29 hellgrau; CD69 grau; CD71 schwarz) MNCs in Abhängigkeit der verwendeten Midostaurin-Konzentration im Vergleich zu der unstimulierten und zu der mit 0,5%igem PHA stimulierten Zellfraktionen. **A** Zellen wurden erst mit 0,5%igem PHA stimuliert und anschließend 48 Stunden mit Midostaurin in unterschiedlichen Konzentrationen inhibiert. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert aus fünf unabhängigen Versuchsreihen mit der Standardabweichung.

Diagramm **B** zeigt die Ergebnisse des Versuches, in dem die MNC's erst mit Midostaurin inhibiert und anschließend 48 Stunden mit 0,5%igem PHA stimuliert wurden. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert aus zwei unabhängigen Versuchsreihen mit der Standardabweichung.

Die Stimulation mit PHA (Abb. 9, A) führte zu einer deutlichen Expressionssteigerung der ausgewählten Oberflächenantigene (unstimuliert: CD29: 19,69%; CD69: 42,54%; CD71: 22,48% versus reine Stimulation mit 0,5%igem PHA: CD29: 26,12%; CD69: 49,74%; CD71: 44,69%). Eine Post-Inkubation der MNCs mit 50nM Midostaurin konnte keine Inhibition der zuvor hochregulierten Expression der Aktivierungsmarker erzielen (Stimulation mit 0,5%igem

PHA: CD29: 26,12%; CD69: 49,74%; CD71: 44,69% versus Inhibition mit Midostaurin CD29: 21,23%; CD69: 45,76%; CD71: 30,62%). Bei genauerer Betrachtung der Standardabweichungen konnte auch bei CD71 keine Inhibition der Oberflächenantigen-Expression festgestellt werden.

Im zweiten Versuch erfolgte die PHA-Stimulation nach einer Pre-Inkubation mit Midostaurin [50nM]. Dabei ist ersichtlich (Abb. 9, B), dass eine verstärkte Oberflächenantigen-Expression durch eine 0,5%ige PHA-Stimulation, trotz vorangegangener Inhibition mit Midostaurin, möglich war. Für CD29 konnte eine Expressionssteigerung um 18,24%, für CD69 um 55,14% und für CD71 um 32,78% erreicht werden. Wobei gerade bei CD69 deutlich wurde, dass die Restimulation prozentual geringer ausfiel, als die alleinige PHA-Aktivierung (Restimulation mit 0,5%igem PHA bei Inhibition mit 50nM Midostaurin: CD69: 58,79% versus reine Stimulation mit 0,5%igem PHA: CD69: 64,16%).

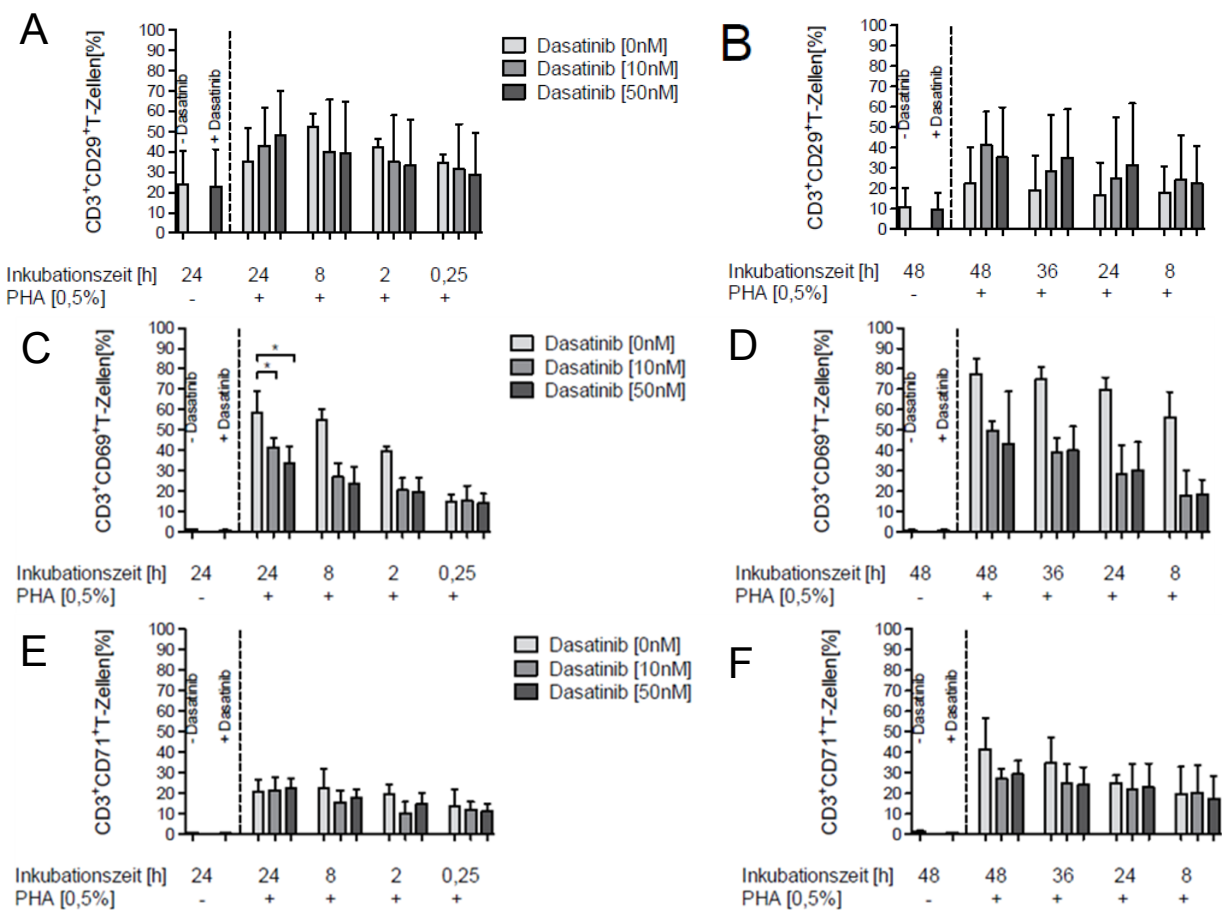
Nach der Etablierung der Inkubationsbedingungen wurden diese anschließend an T-Zellen unter dem Einfluss von Dasatinib untersucht.

#### **4.4 Einfluss von Dasatinib auf T-Zell-spezifische Oberflächenmarker**

T-Zellen gehören zur körpereigenen Immunabwehr, zum Beispiel gegen virale, bakterielle oder tumorgene Schädlinge. Es ist wichtig zu wissen, wie diese Gruppe der Immunzellen auf den Einsatz von Medikamenten reagiert, um herauszufinden, ob diese die T-Zell-Funktion hemmen. Die Expression von Antigenen wie CD29, CD69 und CD71 auf der Zelloberfläche ist ein Zeichen der T-Zell-Aktivierung. Es konnte bereits von der Arbeitsgruppe Schade et al. 2008 gezeigt werden, dass eine Dasatinib-Inkubation von T-Zellen zu einer verminderten Expression von CD69 führt. Ein Teilziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Wirkung von Dasatinib auf CD69 zu reproduzieren und dessen Wirkung an CD71, als später Aktivierungsmarker, und an CD29, als drittes spezifisches T-Zell-Aktivierungsantigen, zu untersuchen.

Es wurden zwei unterschiedliche Versuchsreihen durchgeführt. In der ersten Versuchsanordnung (n=4) wurde Dasatinib für 24 Stunden mit den Zellen inkubiert und in definierten Abständen vor der durchfluss-zytometrischen Messung wurde (24-; 12-; 8-; 2-; 0,25 Stunden) 0,5%iges PHA hinzugefügt.

In der zweiten Experimentalreihe (n=3) erfolgte eine 48-stündige Inhibition mit Dasatinib. Die Restimulation mittels 0,5%igem PHA war 48-, 36-, 24-, 12-, 8 Stunden vor der Analyse.



**Abbildung 10: Analyse zur Wirkung verschiedener Dasatinib-Konzentrationen auf die Expression der Oberflächenantigene CD3, CD29, CD69 und CD71 von T-Zellen mit zeitlich abgestufter PHA-Restimulation.**

Dargestellt ist der prozentuale Anteil CD3<sup>+</sup>/CD29<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>/CD71<sup>+</sup> Zellen in Abhängigkeit der verwendeten Dasatinib-Konzentration und vom Zeitpunkt der Restimulation mit 0,5%igem PHA im Vergleich zu der unstimulierten und zu der mit 0,5%igem PHA stimulierten Zellfraktionen. **A** Die T-Zellen wurden erst mit Dasatinib [10nM; 50nM] für 24 Stunden inkubiert und anschließend 24-; 8-; 2-; 0,25 Stunden vor der durchfluss-zytometrischen Messung mittels PHA restimuliert. Gegated wurden CD3<sup>+</sup>/CD29<sup>+</sup> Zellen. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert aus vier unabhängigen Versuchsreihen mit der Standardabweichung. Diagramm **B** zeigt die Ergebnisse des Versuches, in dem die T-Zellen mit Dasatinib [10nM; 50nM] für 48 Stunden inkubiert und anschließend 48-; 36-; 24-; 8 Stunden vor der durchfluss-zytometrischen Messung mittels PHA restimuliert wurden. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchsreihen mit der Standardabweichung. **C** CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> T-Zellen wurden mit Dasatinib [10nM; 50nM] 24 Stunden inkubiert und anschließend 24-; 8-; 2-; 0,25 Stunden vor der durchfluss-zytometrischen Messung mit PHA restimuliert. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert aus vier unabhängigen Versuchsreihen mit der Standardabweichung. Nach dem Mann Whitney Test besteht eine Signifikanz (\*) für die Mittelwerte von 0,0286. **D** zeigt den prozentualen Anteil CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> Zellen, die mit Dasatinib [10nM; 50nM] 48 Stunden inkubiert und anschließend 48-; 36-; 24-; 8 Stunden vor der durchfluss-zytometrischen Messung mittels PHA restimuliert wurden. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchsreihen mit der Standardabweichung.

**E** zeigt CD3<sup>+</sup>/CD71<sup>+</sup> T-Zellen, die mit Dasatinib [10nM; 50nM] 24 Stunden pre-inkubiert und 24-; 8-; 2-; 0,25 Stunden vor der durchfluss-zytometrischen Messung mittels PHA stimuliert wurden. Dargestellt ist jeweils der

Mittelwert aus vier unabhängigen Versuchsreihen mit der Standardabweichung. In **F** ist der prozentuale Anteil  $CD3^+/CD71^+$  Zellen zu sehen. Sie wurden mit Dasatinib [10nM; 50nM] 48 Stunden pre-inkubiert und 48-; 36-; 24-; 8 Stunden vor der durchfluss-zytometrischen Messung mittels PHA restimuliert. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchsreihen mit der Standardabweichung.

Beginnend mit dem CD29-Aktivierungsmarker, werden die Ergebnisse aus dem Versuch nach 24- und 48-stündiger Inkubation mit Dasatinib analysiert (Abb 10 A, B). Auffällig ist, dass bei 24-stündiger Inkubation im Mittel 24% der  $CD3^+$  T-Zellen vor der Behandlung im unstimulierten Zustand  $CD29^+$  waren. Weiterhin ist ersichtlich, dass der Anteil an T-Zellen, die 24 Stunden mit Dasatinib [50nM] behandelt wurden, ca. 23% betrug. Bei der 48-stündigen Inkubation ist erkennbar, dass im unbehandelten Zustand die T-Zellen zu ca. 11% das Oberflächenantigen exprimierten. Unter einer 48-stündigen Dasatinib [50nM]-Inkubation war auch hier keine deutliche Veränderung der CD29-Expression (10%  $CD29^+$ ) im Vergleich zu den unbehandelten T-Zellen nachzuweisen. Insgesamt lässt sich feststellen, dass Dasatinib im beschriebenen experimentellen Ansatz keinen hemmenden Einfluss auf die Expression von CD29 von inaktiven T-Zellen hat.

Ein Vergleich der zeitlich verschiedenen PHA-Stimulationen ergibt, dass die 0,5%ige PHA-Stimulation der T-Zellen bezüglich der CD29-Expression effektiv war. Unstimuliert waren ca. 24% der T-Zellen  $CD3^+$  und  $CD29^+$  (Abb. 10 A). Nach einer 15-minütigen PHA-Stimulation waren 35%, nach zwei-stündiger PHA-Einwirkung 42%, nach acht Stunden PHA-Stimulation 52% und nach 24 Stunden 39% der T-Zellen doppelt positiv. Ein ähnliches Ergebnis wurde auch in der 48-Stunden-Versuchsreihe erzielt (Abb. 10 B). Die längere Inkubationszeit mit 0,5%igem PHA resultiert somit in der Erhöhung der doppelt positiven Zellen.

Werden die prozentualen Anteile der mittels PHA stimulierten  $CD3^+/CD29^+$  Zellen mit den Dasatinib inkubierten und mittels PHA restimulierten verglichen (Abb. 10 A), wird deutlich, dass bei einer acht- und zwei-stündigen Restimulation eine Inhibition der Expression von CD29 erreicht werden konnte. Für den Zeitpunkt von 24- und 0,25 Stunden kann diese Aussage nicht getroffen werden. Außerdem kann formuliert werden, dass die Inhibition der CD29-Expression bei einer Dasatinib-Konzentration von 50nM bei 24-; 8-; 2-; 0,25 Stunden effektiver als bei einer Konzentration von 10nM ausfiel. Auffällig ist, dass die CD29-Expression der mit 0,5%igen PHA-stimulierten T-Zellen geringer ausfiel, als bei den zuvor mit Dasatinib inhibierten und im Anschluss restimulierten T-Zellen. So betrug der prozentuale Anteil  $CD29^+$ -exprimierender T-Zellen, die mit 0,5%igen PHA 48 Stunden stimuliert wurden 22%. Im Gegensatz dazu, waren die prozentualen Anteile, der zuvor mit Dasatinib 50nM und 10nM inhibierten T-Zellen 35% und 41%. Einen bestimmten Unterschied in der CD29-Expression hin-

sichtlich der Dasatinib-Konzentration war in der zweiten Versuchsreihe, im Gegensatz zur ersten, nicht zu erkennen.

Unter gleichen experimentellen Bedingungen wurde im Folgenden der Oberflächenmarker CD69 nach 24- und 48-stündiger Inkubation von Dasatinib analysiert.

Der prozentuale Anteil der CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> T-Zellen der 24- und 48 Stunden-Versuchsreihen im unstimulierten Zustand war gering; er betrug ca. 1% (Abb. 10 C, D). Durch die Inkubation der T-Zellen mit Dasatinib (ohne eine PHA-Stimulation) in einer Konzentration von 50nM über 48- und 24 Stunden traten keine Veränderungen der CD69-Expression auf. Dasatinib wies in dieser Konzentration somit keine erhebliche Hemmung des CD69-Aktivierungsmarkers auf. Durch die Zugabe von 0,5% igem PHA zu verschiedenen Zeitpunkten vor der Durchflusszytometrischen-Messung konnte eine deutliche Aktivierung der Expression des CD69-Oberflächenantigens auf den T-Zellen erreicht werden. Die 48-stündige Stimulation mit 0,5% igem PHA resultierte in einer deutlich stärkeren CD69-Expression, als zu früheren Zeitpunkten des PHA-Einsatzes (Abb. 10 C). Der prozentuale Anteil der CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> Zellen unter 48-stündiger PHA-Inkubation betrug 77% im Vergleich zu 58% doppelt positiver T-Zellen im 24-Stunden-Versuch bei 24-stündiger PHA-Stimulation.

Wurden die T-Zellen zuvor mit Dasatinib inkubiert, wiesen sie bei der Restimulation mit 0,5% igem PHA eine verminderte CD69-Expression, im Vergleich zur reinen PHA-Aktivierung, auf. Erkennbar ist bei der 24-Stunden-Versuchsreihe, dass eine Konzentration von 50nM Dasatinib, gerade bei längerer Einwirkzeit, eine effektivere Inhibition der Expression erreicht als 10nM Dasatinib. Bei einer 24-stündigen PHA-Inkubation lag der prozentuale Anteil der T-Zellen bei 58%. Wurden die Zellen 24 Stunden mit Dasatinib [50nM] inkubiert und anschließend restimuliert, war der Anteil CD69<sup>+</sup> 34%. Bei einer Dasatinib-Konzentration von 10nM war der Anteil CD69<sup>+</sup> T-Zellen 42%. Im Gegensatz dazu, konnte in der 48-Stunden-Versuchsreihe keine konzentrationsabhängige Wirkung von Dasatinib auf die CD69-Expression, verglichen mit der 24-Stunden-Restimations-Reihe, nachgewiesen werden. Lange Restimationszeiten durchbrechen gut die Inhibition der T-Zell-Aktivität durch Dasatinib. Dasatinib wirkt reversibel.

In beiden Experimenten wird deutlich, dass eine Konzentration von 10nM ausreicht, um die CD69 Expression zu supprimieren. Dies bestätigt die von Schade et al. 2008 und Weichsel et al. 2008 publizierten Daten.

Im nächsten Abschnitt werden die Ergebnisse zur Expression des CD71- Oberflächenmarkers nach 24- und 48-stündiger Inkubation von Dasatinib vorgestellt.

Die Untersuchungen bezüglich des späten Aktivierungsmarkers CD71 (Abb. 10 E, F) wiesen sowohl im unstimulierten Zustand als auch bei den 48- und 24-stündigen Dasatinib [50nM]-Inkubationen ähnliche Ergebnisse wie zuvor die CD69-Versuche auf. Der Anteil der unstimulierten CD71<sup>+</sup> T-Zellen lag auch hier unter 1%.

In zeitlicher Abhängigkeit von der PHA-Zugabe war eine eindeutig gesteigerte CD71-Expression im Vergleich zu den unstimulierten Zellen erkennbar. Wie zuvor bei den CD69-Versuchsreihen wurde auch bei CD71 deutlich, dass, je länger die Inkubationszeit von PHA war, desto stärker fiel die Expression des CD71-Aktivierungsmarkers der T-Zellen aus. Bei 48-stündiger, 0,5%iger PHA-Stimulation waren im Mittel 41% CD3<sup>+</sup>/CD71<sup>+</sup> Zellen, bei 36 Stunden 35%, bei 24 Stunden 25% und bei einer 8-stündigen PHA-Inkubation ca. 20% CD71<sup>+</sup> Zellen. Die prozentualen Anteile der doppelt positiven T-Zellen im 24-Stunden-Versuch waren ähnlich (24 Stunden: 21%-; 8 Stunden: 23%-; 2 Stunden: 19%-; 0,25 Stunden: 14% CD3<sup>+</sup>/CD71<sup>+</sup> T-Zellen). Deutlich wird auch, unter Einbezug der 24-Stunden-Versuchsreihe, dass CD71 vermehrt auf der Zelloberfläche vorhanden ist, wenn die Aktivierungszeit mittels 0,5%igem PHA über 24 Stunden liegt. Das deutet darauf hin, dass CD71 ein später Oberflächenaktivierungsmarker ist. Nach vorangegangener Dasatinib-Inkubation und anschließender 24-; 12-; 8-; 2- und 0,25-stündiger Restimulation wurde eine minimal verminderte CD71-Expression verglichen mit den reinen 0,5%igen PHA-Stimulationen festgestellt. Bei den längeren Dasatinib-Inkubationszeiten, 48- und 36 Stunden, mit PHA-Poststimulation konnte eine verminderte CD71-Expression verglichen mit der alleinigen PHA-Inkubation gemessen werden. Bei den CD71-Experimenten konnten keine eindeutigen Expressionsunterschiede des Aktivierungsmarkers nach Inkubation mit den unterschiedlichen zwei Dasatinib-Konzentrationen nachgewiesen werden.

Wie schon zuvor erwähnt, ist die Spanne der Standardabweichungen relativ groß. Ursächlich dafür ist wahrscheinlich die Individualität der T-Zellen der einzelnen Probanden. Es konnte damit bestätigt werden, dass die T-Zellen der Probanden im gewissen Maße unterschiedlich sensibel auf Dasatinib reagieren (Schade et al. 2009).

Im Anschluss an diese Versuchsreihen wurden Experimente zur Wirkung von Midostaurin auf die Expression der Oberflächenmarker durchgeführt. Die Ergebnisse werden im nächsten Kapitel vorgestellt.

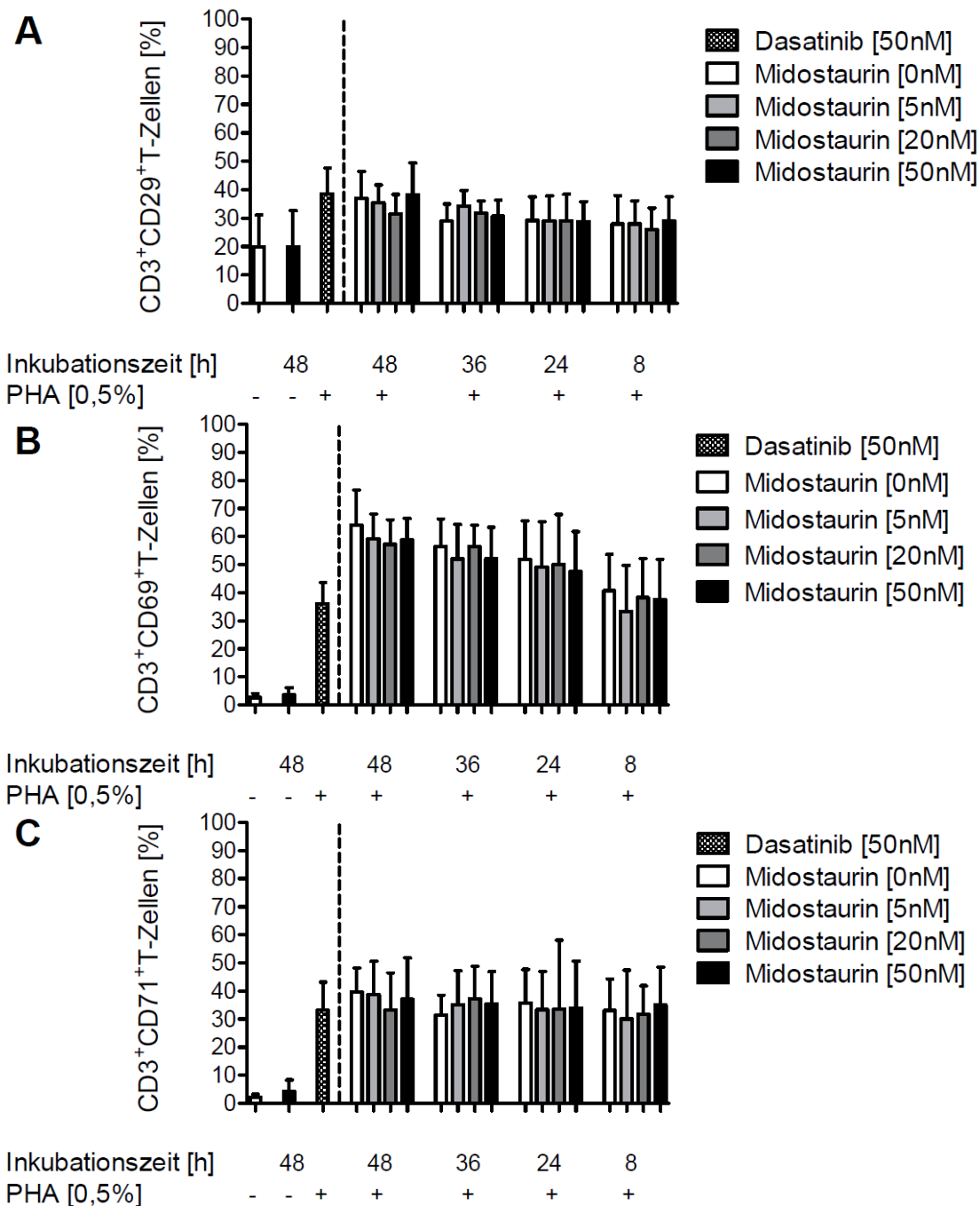
## **4.5 Einfluss von Midostaurin auf T-Zell-Aktivierungsmarker**

Über Midostaurin existieren in der Fachliteratur keine Erkenntnisse über dessen Wirkung auf die T-Zell-Aktivität im Hinblick auf einen eventuellen Einsatz nach einer allogenen Stammzelltransplantation (Wolleschak et al. 2014). Um einen ersten Hinweis auf den Einfluss von Midostaurin auf die T-Zell-Aktivität zu erhalten, ist es ein weiteres Teilziel der vorliegenden Arbeit, die Wirkung von Midostaurin auf die T-Zell-Oberflächenantigene CD29, CD69 und CD71 zu untersuchen. Dazu wurden insgesamt zwei Versuchsreihen durchgeführt, in denen Midostaurin 48 Stunden auf den Zellen inkubiert wurde. In der ersten Versuchsanordnung wurden die T-Zellen mit 0,5%igem PHA und in der zweiten mittels Dynabeads CD3/CD28 *T-Cell Expander* in definierten Abständen (48-; 36-; 24-; 8 Stunden) vor der Analyse restimuliert.

### **4.4.1 T-Zell-Stimulation mittels 0,5%igem PHA**

In der ersten Versuchsanordnung (n=5) wurden die T-Zellen wie unter 3.3.5 und 4.2 beschrieben mit 0,5%igem PHA stimuliert. Anschließend wurde die Expression der Aktivierungsmarker CD29, CD69 und CD71 nach Midostaurin-Inkubation der T-Zellen untersucht.

Im Folgenden werden die Ergebnisse zusammengefasst.



**Abbildung 11: Analyse zur Wirkung verschiedener Midostaurin-Konzentrationen auf die Expression der Oberflächenantigene CD3, CD29, CD69 und CD71 von T-Zellen mit zeitlich abgestufter PHA-Restimulation.**

Dargestellt ist der prozentuale Anteil CD3<sup>+</sup>/CD29<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>/CD71<sup>+</sup> Zellen in Abhängigkeit der verwendeten Midostaurin-Konzentration [5nM; 20nM; 50nM] und vom Zeitpunkt der Restimulation mit 0,5%igem PHA im Vergleich zu der unstimulierten, zu der mit 0,5%igem PHA stimulierten, der mit Dasatinib inkubierten und anschließend restimulierten Zellfraktionen. Die T-Zellen wurden mit Midostaurin 48 Stunden inkubiert und anschließend 48-; 36-; 24-; 8 Stunden vor der Analyse mittels PHA restimuliert. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert aus fünf unabhängigen Versuchsreihen mit der Standardabweichung. **A** zeigt den prozentualen Anteil CD3<sup>+</sup>/CD29<sup>+</sup> T-Zellen. In **B** sind die gemittelten Versuchsergebnisse der CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> T-Zellen graphisch zusammengefasst. In **C** sind die Mittelwerte der CD3<sup>+</sup>/CD71<sup>+</sup> Zellen abgebildet.



Die Analyse ergibt einen Anteil von ca. 20% CD29<sup>+</sup> T-Zellen im unstimulierten Zustand (Abb. 11 A). Wurden die unstimulierten T-Zellen 48 Stunden vor der durchfluss-zytometrischen Messung mit Midostaurin pre-inkubiert, beträgt der prozentuale Anteil ebenfalls 20%. Daraus ist abzuleiten, dass Midostaurin keinen Einfluss auf die Expression des Oberflächenantigens CD29 der unstimulierten T-Zellen hat.

Zum Zeitpunkt der 48-stündigen PHA-Stimulation beträgt der Anteil an CD29<sup>+</sup> Zellen ca. 37%. Wurden die Zellen zuvor mit Midostaurin inkubiert, waren bei 5nM 35%, bei 20nM 31% und bei 50nM 38% CD29<sup>+</sup>. Bei einer 48-stündigen Midostaurin- Pre-Inkubation mit anschließender 24-stündiger PHA-Stimulation lag der Anteil an doppelt positiven T-Zellen bei alleiniger PHA-Zugabe und den unterschiedlichen Midostaurin-Konzentrationen bei 29%. Ein Vergleich der Midostaurin-unbehandelten Zellfraktionen mit den behandelten Zellen zeigt, dass eine Midostaurin-Pre-Inkubation die PHA-vermittelte Expression von CD29 nicht beeinflusst. Ebenso zeichneten sich bei den drei unterschiedlichen Midostaurin-Konzentrationen keine eindeutigen Wirkungsunterschiede bezüglich des Einflusses auf die CD29-Expression ab.

Weiterhin kann festgestellt werden, dass längere Stimulationszeiten mit PHA die CD29 Expression erhöhen. Dies ergab sich aus den gemessenen Werten: Bei einer 48-stündigen 0,5%igen PHA-Inkubation wurde ein prozentualer Anteil an CD29<sup>+</sup> Zellen von 37% gemessen, bei 36- und 24 Stunden 29% und bei 8 Stunden 28%.

Die mit Dasatinib inhibierte Zellprobe war in dieser Versuchsanordnung eine Positivkontrolle, um zu sehen, ob ähnliche Ergebnisse, wie unter 4.3 beschrieben, erzeugt werden konnten, und um das Verhalten der Oberflächenmarker unter Midostaurin-Inkubation im Vergleich beurteilen zu können. Die T-Zellen wurden 48 Stunden vor der durchfluss-zytometrischen Messung mit Dasatinib inkubiert und anschließend mit 0,5%igem PHA restimuliert. Der prozentuale Anteil an CD29<sup>+</sup>, mit Dasatinib pre-inkubierten T-Zellen betrug 39% und war im Vergleich zu 37% der 48-stündigen PHA-stimulierten Zellen kaum verringert.

Der nachfolgende Abschnitt geht auf die Ergebnisse der Expression des CD69- Oberflächenmarkers nach 48-stündiger Inkubation von Midostaurin ein.

Im unbehandelten Zustand war nur eine geringe CD69-Expression auf den T-Zellen vorhanden (Abb. 11 B). Der prozentuale Anteil betrug ca. 3%. Zwischen dieser Zellfraktion und den mit Midostaurin inkubierten CD3<sup>+</sup> Zellen (ca. 4%) waren keine relevanten prozentualen Unterschiede zu erkennen.

Gegenüber der alleinigen 0,5%igen PHA-Stimulation konnte in der durchfluss-zytometrischen Messung nur eine leichte Verringerung der Expression des CD69-Oberflächenantigens bei den

zuvor mit Midostaurin inkubierten T-Zellen festgestellt werden. Im Vergleich zu den 48 Stunden PHA-stimulierten Zellen (64%) betrug der prozentuale Anteil der mit 50nM Midostaurin inkubierten T-Lymphozyten ca. 59%. Bei der Preinkubation mit 20nM Midostaurin waren 57% der Zellen CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>, bei dem Einsatz von 5nM Midostaurin 59%. Zum Zeitpunkt der 36-stündigen PHA-Stimulation waren ca. 36% der Zellen doppelt positiv. Erfolgte zuvor die Inkubation mit 50nM Midostaurin lag der prozentuale Anteil der CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> Zellen bei 52%. Bei einer Pre-Inkubation mit 20nM des TKIs waren 56% doppelt positiv, bei einer 5nM Inhibitor-konzentration 52%. Auch bei den 24- und 8 Stunden-Werten ist keine eindeutige Inhibition der CD69-Expression festzustellen.

Weiterhin war erkennbar, dass 50nM Midostaurin keine stärkere inhibitorische Wirkung besitzt als 20nM und 5nM des TKIs. Midostaurin konnte nicht im gleichen Maße wie zuvor Dasatinib die CD69-Expression verringern.

Wie schon bei den vorangegangenen Experimenten ersichtlich ist, konnte die CD69-Expression der T-Zellen durch 0,5% ige PHA-Stimulation verstärkt werden. Dabei gilt auch wieder, je länger die Einwirkdauer von PHA ist, desto mehr doppelt positive T-Zellen können durchflusszytometrisch gemessen werden.

Die Kontrollzellfraktion zeigte, dass wie unter 4.3 beschrieben, Dasatinib die Expression von CD69 auf T-Zellen inhibiert.

Anschließend wurde auch die Wirkung von Midostaurin auf die CD71-Expression der T-Zellen analysiert. Dabei wurde die gleiche Versuchsanordnung wie bei der Analyse der CD29- und CD69-Expression beibehalten (siehe Versuchsaufbau unter 3.1 bis 3.8).

Im Mittel waren ca. 2% der T-Zellen im unstimulierten Zustand CD71<sup>+</sup> (Abb.11 C). Der prozentuale Anteil der mit Midostaurin inkubierten Zellen betrug ungefähr 4%. Es kann somit kein Einfluss von Midostaurin auf die CD71-Expression festgestellt werden.

Bei einer Pre-Inkubation mit Midostaurin exprimierten die T-Zellen nach 0,5% iger PHA-Stimulation fast so viel CD71 wie die rein stimulierten Zellen (ca. 38%). Bei den Zeitpunkten 36- und 8 Stunden war sogar eine um ca. 2-6% vermehrte CD71-Expression durchflusszytometrisch zu messen, obwohl anfangs die Zugabe des TKIs erfolgte: Bei einer 36-stündigen PHA-Stimulation waren ca. 31% der T-Zellen CD71<sup>+</sup>. Wurden die Zellen zuvor mit 5; 20 und 50nM Midostaurin inkubiert und 36 Stunden nach der Stimulation durchflusszytometrisch gemessen, stieg der Anteil doppelt positiver Zellen auf ca. 35-36%. Bei den 8-Stunden-Messwerten betrug der Anteil PHA-stimulierter Zellen 33%. Erfolgte eine Inhibition mit 50nM Midostaurin waren ca. 35% der T-Lymphozyten CD3<sup>+</sup>/CD71<sup>+</sup>. Die Analyse zu den 48- und 24

Stunden-Zeitpunkten zeigte eine Verringerung der Expression des CD71-Aktivierungsmarkers um ca. 1-6%. So waren nach einer 48-stündigen PHA-Stimulation ca. 40% der T-Zellen doppelt positiv. Bei einer Pre-Inkubation mit 50nM Midostaurin waren es 37%, bei 20nM des TKIs 33% und bei einer Konzentration von 5nM 39%. Fand eine 24-stündige PHA-Stimulation statt, waren ca. 36% CD71<sup>+</sup>. Bei zuvor mit 5nM, 20nM und 50nM Midostaurin inkubierten Zellen, war ein prozentualer Anteil von ca. 33% CD3<sup>+</sup>/CD71<sup>+</sup> Lymphozyten zu messen. An diesen Werten ist auch zu erkennen, dass keine Konzentrationsabhängigkeit des Effektes besteht.

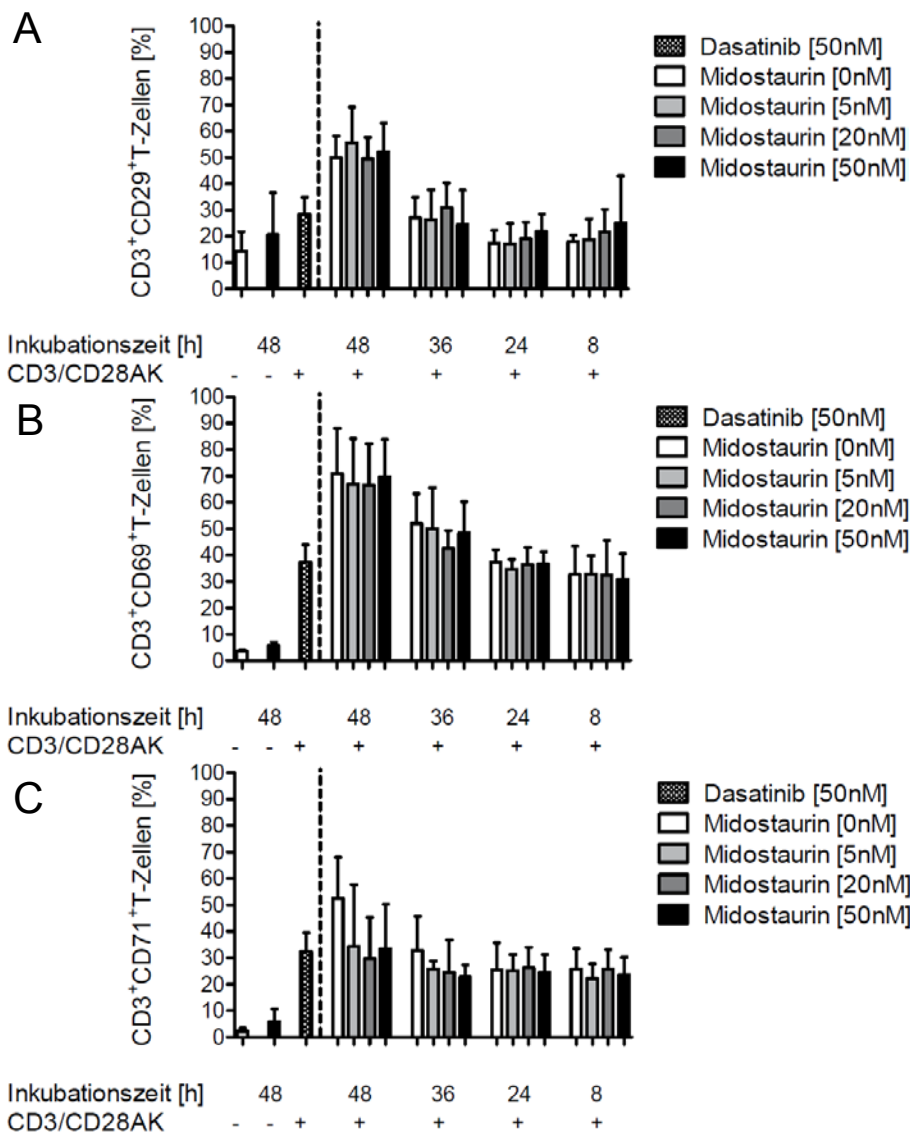
Die Pre-Inkubation der T-Zellen mit 50nM Dasatinib und anschließender PHA-Restimulation resultiert in einer um 7% geringeren CD71<sup>+</sup>-Expression gegenüber den 48 Stunden mit PHA stimulierten Zellen (33% versus 40% CD3<sup>+</sup>/CD71<sup>+</sup>T-Zellen).

Die hier vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass Midostaurin keinen wesentlichen Einfluss auf die Expression der Aktivierungsmarker CD29, CD69 und CD71 hat, weder bei unstimulierten noch bei PHA-stimulierten T-Zellen.

#### **4.4.2 Stimulation durch Dynabeads CD3/CD28 *T-Cell Expander***

Im weiteren Verlauf wurde neben der PHA-Stimulation eine Stimulation mit Dynabeads CD3/CD28 *T-Cell Expander* durchgeführt. Letztere Stimulationsmethode zeichnet sich im Gegensatz zu PHA durch eine physiologischerere Wirkung auf die T-Zellen aus. Auf den Dynabeads sind die CD3 und CD28 Antikörper kovalent gebunden. Durch ihre Interaktion mit spezifischen Rezeptoren wird die T-Zell-Signalkaskade weitestgehend physiologisch aktiviert. Die Aktivierung wird zum einen durch ein Signal des TCRs und zum anderen durch ein kostimulatorisches Signal erzielt, welches durch CD28 vermittelt werden kann. Im Gegensatz dazu bindet PHA glykosylierte Oberflächenproteine, wie den TCR-Komplex und fördert die T-Zellproliferation durch direkten Kontakt mit diesem und Kreuzvernetzung mit anderen Oberflächenmolekülen. Diese Art der Stimulation geht mit einer Zunahme der Zellgröße und einer Steigerung des Zellmetabolismus einher. Um möglichst genaue Aussagen zur Expression der T-Zell-Aktivierungsmarker unter Midostaurin-Einwirkung treffen zu können, wurde diese zweite Versuchsreihe durchgeführt. Die Zellveränderungen die durch PHA verursacht werden, sollten mit der physiologischeren Stimulationsmethode mittels CD3/CD28 *T-Cell Expander* vermieden werden.

Der Aufbau und die Durchführung entsprachen dem der ersten Versuchsreihe. An Stelle von PHA wurden CD3/CD28-Antikörper, ein sogenannter CD3/CD28 *T-Cell Expander*, zur T-Zell-Stimulation ausgewählt. Abgebildet werden die Mittelwerte und die Standardabweichungen über drei Versuchswiederholungen.



**Abbildung 12: Analyse zur Wirkung verschiedener Midostaurin-Konzentrationen auf die Expression der Oberflächenantigene CD3, CD29, CD69 und CD71 von T-Zellen mit zeitlich abgestufter Dynabeads CD3/CD28 T-Cell Expander-Restimulation.**

Dargestellt ist der prozentuale Anteil CD3<sup>+</sup>/CD29<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>/CD71<sup>+</sup> Zellen in Abhängigkeit der verwendeten Midostaurin-Konzentration und vom Zeitpunkt der Restimulation mit Dynabeads CD3/CD28 T-Cell Expander im Vergleich zu der unstimulierten, zu der mit Dynabeads CD3/CD28 T-Cell Expander stimulierten, der mit Dasatinib inkubierten und anschließend restimulierten Zellfraktionen. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchsreihen mit der Standardabweichung. **A** zeigt die Ergebnisse der 48-stündigen Midostaurin [5nM; 20nM; 50nM]-Inkubation auf T-Zellen, gefolgt von der Restimulation der Zellen mittels PHA, 48-; 36-; 24-; 8 Stunden vor der durchfluss-zytometrischen Messung mit Dynabeads CD3/CD28 T-Cell Expander. **B** stellt den prozentualen Anteil CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> Zellen in Abhängigkeit zur Midostaurin-Konzentration [5nM; 20nM; 50nM] und dem Zeitpunkt der Restimulation (48-; 36-; 24-; 8 Stunden vor der durchfluss-zytometrischen Messung) mit Dynabeads CD3/CD28 T-Cell Expander dar. Im Diagramm **C** ist der prozentuale Anteil CD3<sup>+</sup>/CD71<sup>+</sup> Zellen im Zusammenhang zur 48-stündigen Midostaurin [5nM; 20nM; 50nM]-Inkubation zu sehen, gefolgt von der Restimulation der Zellen mittels PHA, 48-; 36-; 24-; 8 Stunden vor der durchfluss-zytometrischen Messung mit Dynabeads CD3/CD28 T-Cell Expander.

Im unstimulierten Zustand exprimierten ca. 14% der T-Zellen das CD29-Oberflächenantigen (Abb.12 A). Eine 48-stündige Midostaurin [50nM]-Inkubation resultierte in einem prozentualen Anteil CD29<sup>+</sup> Zellen von ca. 20%. Bei einer 48 Stunden andauernden Dasatinib [50nM]-Pre-Inkubation und anschließender Stimulation mit CD3/CD28 Dynabeads, konnte ein relativer Anteil von ca. 29% durchfluss-zytometrisch gemessen werden. Im Vergleich dazu waren bei der 48-stündigen CD3/CD28 *T-Cell Expander* -Stimulation 50% der T-Zellen CD29<sup>+</sup>, sodass eine eindeutige supprimierende Wirkung von Dasatinib auf die CD29-Expression erkennbar war (Abb.12 A).

Betrachtet man die prozentualen Anteile CD29<sup>+</sup> T-Zellen im Bezug auf die zeitlich abgestufte CD3/CD28 *T-Cell Expander*-Stimulation, wird deutlich, dass die CD29-Expression mit dem *T-Cell Expander* gesteigert werden konnte, und dass längere Einwirkzeiten eine stärkere Expression fördern (Abb. 12 A). Betrug die Stimulationszeit 36 Stunden, waren ca. 27% der T-Zellen doppelt positiv, bei 24 und acht Stunden waren ca. 17% CD29<sup>+</sup>. Nach einer 48-stündigen Stimulation mit dem CD3/CD28 *T-Cell Expander* wurden 50% CD3<sup>+</sup>/CD29<sup>+</sup> T-Zellen gemessen. Wiederum konnte bei dem Aktivierungsmarker CD29 nicht eindeutig gezeigt werden, dass die Pre-Inkubation der T-Zellen mit Midostaurin eine hemmende Wirkung auf die CD29-Expression hatte. Dies wurde zum Beispiel an den 48 Stunden-Werten deutlich: Eine reine Stimulation über diesen Zeitraum mit dem CD3/CD28 *T-Cell Expander* generierte 50% CD3<sup>+</sup>/CD29<sup>+</sup> Zellen. Wurden die T-Zellen zuvor mit 5nM Midostaurin inkubiert waren ca. 56% der Zellen doppelt positiv, bei einer 20nM Midostaurin-Inkubation 50% und mit 50nM des TKIs 52% CD3<sup>+</sup>/CD29<sup>+</sup> (Abb. 12 A).

Desweiteren wurde der Einfluss von Midostaurin auf die CD69-Expression der T-Zellen untersucht. Nach einer 48-stündigen Inkubation der T-Zellen ohne Stimulanz und TKI (Abb. 12 B) waren ca. 4% CD69<sup>+</sup>. Mit Midostaurin [50nM] inkubierte Zellen exprimierten zu ca. 6% diesen Aktivierungsmarker. Dies deutet wie in 4.4.1 darauf hin, dass Midostaurin keinen Einfluss auf die CD69-Expression unstimulierter Zellen hat.

Nach einer 48-stündigen Inkubation mit 50nM Dasatinib war eine deutliche Veränderung der CD69-Expression (37%) im Vergleich zu den rein mit CD3/CD28 *T-Cell Expander* stimulierten T-Zellen (71%) nachzuweisen (Abb. 12 B). Dieser Vergleich zeigt, dass Dasatinib die CD69-Expression deutlich vermindert. Im Gegensatz dazu stehen die Messwerte mit Midostaurin: Keine der in der vorliegenden Arbeit verwendete Konzentration an Midostaurin konnte eindeutig die CD69-Expression durch die CD3/CD28 *T-Cell Expander*-Restimulation vermindern. Bei einer Stimulationszeit von 48 Stunden exprimierten ca. 71% der T-Zellen CD69.

Wurden die Zellansätze zuvor mit 50nM Midostaurin preinkubiert, waren ca. 70% CD69<sup>+</sup>. Bei einer Pre-Inkubation der Lymphozyten mit 5 und 20nM des TKIs waren jeweils 67% CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>. Erfolgte die CD3/CD28 *T-Cell Expander*-Stimulation 24 Stunden vor der durchfluss-zytometrischen Messung, wurden 37% doppelt positive Zellen generiert. Hatte zuvor eine Pre-Inkubation mit 50nM Midostaurin stattgefunden, waren ebenfalls ca. 37% messbar (Abb. 12 B).

Wiederum ist in dieser Versuchsreihe gut zu erkennen, dass mittels CD3/CD28 *T-Cell Expander*-Stimulation eine verstärkte Expression des Aktivierungsmarkers CD69 in zeitlicher Abhängigkeit erreicht werden konnte: Bei einer 48-stündigen CD3/CD28 *T-Cell Expander*-Inkubation war ein prozentualer Anteil CD69<sup>+</sup> T-Zellen von ca. 71% durchfluss-zytometrisch zu messen, während die 8-stündige Stimulation in ca. 33% doppelt positive T-Zellen resultierte (Abb. 12 B).

Bei gleichbleibender Versuchsanordnung wurde im Anschluss an den CD69-Aktivierungsmarker experimentell auf den CD71-Oberflächenmarker eingegangen. Die Untersuchungen bezüglich des späten Aktivierungsmarkers CD71 (Abb. 12 C) zeigen sowohl im unstimulierten Zustand als auch bei der 48-stündigen Midostaurin-Inkubation ähnliche Ergebnisse wie bei den vorherigen Versuchsreihen: Nur ca. 2% der unbehandelten T-Zellen exprimierten CD71. Die Fraktion der mit Midostaurin inkubierten Zellen blieb unter 6%.

Bei einer Stimulation der T-Zellen mit dem CD3/CD28 *T-Cell Expander* wurde besonders bei den längeren Inkubationszeiten eine starke CD71-Expression gemessen (48 Stunden: 53%; 36 Stunden: 33%; 24 Stunden: 25%; acht Stunden: 26%), sodass die Stimulation mit dem CD3/CD28 *T-Cell Expander* erfolgreich war. Hingegen war die CD71-Expression der T-Zellen bei einer Pre-Inkubation mit Dasatinib vermindert. Der prozentuale Anteil doppelt positiver Zellen war 32%. Im Vergleich dazu betrug der prozentuale Anteil der 48 Stunden mit Dynabeads CD3/CD28 *T-Cell Expander* stimulierten Zellen ca. 53% (Abb. 12 C).

Die Analyse der 48- und 36-stündigen Inkubationszeiten mit Midostaurin und der anschließenden Restimulation zeigte, dass eine verringerte CD71-Expression im Vergleich zu den CD3/CD28 *T-Cell Expander* inkubierten Zellen vorhanden war. Beispielsweise konnte bei der 48-stündigen CD3/CD28 *T-Cell Expander*-Stimulation ein relativer Anteil von 53% an CD3<sup>+</sup>/CD71<sup>+</sup> Zellen durchfluss-zytometrisch gemessen werden. Bei einer Inkubation mit 5nM Midostaurin waren 34% der T-Zellen doppelt positiv, bei der Gabe von 20nM Midostaurin 30% und bei 50nM des Inhibitors 33%. Bei der 36-Stunden-Stimulation waren 33% der Zellen doppelt positiv. Ging eine Preinkubation mit 50nM Midostaurin voraus, konnten 23% CD3<sup>+</sup>/CD71<sup>+</sup>

Zellen durchfluss-zytometrisch detektiert werden. Bei einer Inkubation mit 20nM waren 25% und bei 5nM des TKIs 26% CD71<sup>+</sup>. Bei den 24- und 8-stündigen Inkubationszeiten mit Midostaurin war keine eindeutige Wirkung des TKIs auf die CD71-Expression erkennbar. Beispielsweise konnten sowohl bei der 24-stündigen CD3/CD28 *T-Cell Expander*-Stimulation als auch bei der Prä-inkubation mit 50nM Midostaurin ein prozentualer Anteil von 53% an CD3<sup>+</sup>/CD71<sup>+</sup> Zellen durchfluss-zytometrisch gemessen werden.

Es konnte nicht nachgewiesen werden, dass eine höhere Midostaurin-Konzentration eine stärkere inhibitorische Wirkung auf die CD71-Oberflächenantigen-Expression hat.

Anhand der unter 4.3 und 4.4 ermittelten Ergebnisse lässt sich feststellen, dass Dasatinib und Midostaurin eine unterschiedlich starke Wirkung auf die Expression der analysierten Aktivierungsmarker haben. Im Folgenden soll daher der Einfluss beider TKIs auf die intrazelluläre Signaltransduktion der T-Zellen untersucht werden.

#### **4.5 Die intrazelluläre Signaltransduktion des TCRs unter Einfluss der Tyrosinkinase-Inhibitoren Dasatinib und Midostaurin**

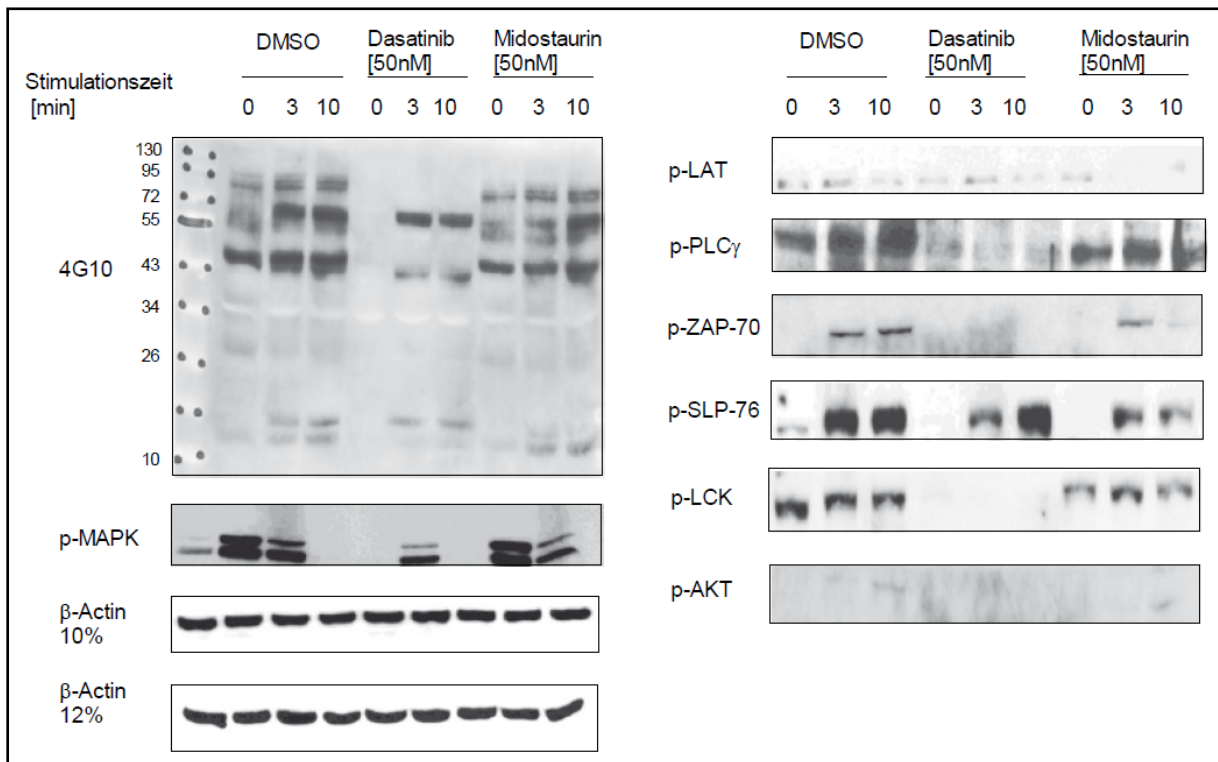
In diesem Abschnitt der vorliegenden Arbeit werden die Ergebnisse zur intrazellulären Signaltransduktion des TCRs unter Einfluss von Dasatinib und Midostaurin vorgestellt (Abb. 19).

Dasatinib ist ein Multi-Kinase-Inhibitor und besitzt die Fähigkeit die Phosphorylierung verschiedener Signalmoleküle in unterschiedlichen Abschnitten der Signaltransduktion zu beeinflussen. Über die Wirkung von Midostaurin auf das TCR-vermittelte Signaling ist in der Fachliteratur weniger beschrieben. Midostaurin inhibiert in mikromolaren Konzentrationen die MAP-Kinasen. Über den Einfluss auf das Signalwegprotein LCK, welches die erste über den TCR phosphorylierte Tyrosinkinase ist, existieren keine Veröffentlichungen. Auswirkungen einer Midostaurin-Inkubation auf die Phosphorylierungen von AKT, SLP76, LAT, PLC $\gamma$ , ZAP70 von T-Zellen wurden nicht eingehender untersucht. Die ausgewählten Signalmoleküle LCK, AKT, SLP76, LAT, PLC $\gamma$ , ZAP70 und MAPK sind aber entscheidend in der Signaltransduktion von T-Zellen und damit essentiell für eine intakte Immunantwort.

Um die intrazelluläre Signaltransduktion des TCRs an diesen ausgewählten Signalwegproteinen zu untersuchen, wurden, wie unter 3.9 beschrieben, zunächst die T-Zellen von drei gesunden Probanden isoliert, stimuliert, lysiert und für den Western Blot vorbereitet. Im Western



Blot wurden neben den phosphorylierten Proteinen auch die unphosphorylierten Proteine detektiert,  $\beta$ -Actin diente zur Kontrolle der Beladung der Gele.



**Abbildung 13: Analyse der Phosphorylierung ausgewählter T-cell-signaling-Proteine unter Einfluss von Dasatinib und Midostaurin.**

Die T-Zellen wurden 10 Minuten unter Inhibitorzugabe, entweder mit Dasatinib [50nM] oder Midostaurin [50nM], inkubiert und anschließend für drei bzw. 10 Minuten mittels MEM92/CD28 Antikörper-Mix stimuliert, lysiert und anschließend auf phosphorylierte Tyrosin- und Serinreste analysiert. Als Bezug dient die Phosphorylierung unstimulierter und nicht-inhibierter Zellen (0', DMSO). Die Molekülgrößen sind in [kDa] links des Blots angegeben. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis eines Probanden von insgesamt drei unabhängigen Versuchsreihen.

Um einen ersten Hinweis auf die Wirkung von Midostaurin und Dasatinib auf die Phosphorylierung von Proteinen zu bekommen, wurde anfänglich der Einfluss der beiden TKIs auf die allgemeine Tyrosinphosphorylierung mittels eines Phosphotyrosin-Antikörpers analysiert (Abb. 13).

Bei den drei im Versuchsaufbau gleichen, unabhängig voneinander durchgeführten 4G10-Western Blots war gut zu erkennen, dass die unbehandelten T-Zellen (0', DMSO) ein schwächeres Phosphorylierungssignal aufwiesen, als die drei und 10 Minuten lang stimulierten T-Zellen. Dieses Ergebnis zeigt, dass die T-Zellen vital waren, dass diese T-Zellen im unstimulierten Zustand ein geringeres Phosphorylierungsniveau der intrazellulären Proteine aufweisen und durch MEM92/CD28 Antikörper-Mix deutlich stimulierbar sind. Betrachtet man die Phosphorylierungssignale der mit 50nM Dasatinib inkubierten, unstimulierten T-Zellen, wird deut-

lich, dass bei diesen eine maximale Inhibition der Phosphorylierung der Tyrosinreste erreicht wurde. Wurden die Zellen nach Dasatinib-Inkubation anschließend für drei bzw. 10 Minuten mittels MEM92/CD28Antikörper-Mix stimuliert, war bei einigen Proteinen wieder ein Phosphorylierungssignal detektierbar, das jedoch nicht schwächer war, als das der Phosphorylierung der TKI unbehandelten Proben. Die Midostaurin-Inkubation erzielte hingegen keine Wirkung auf die Phosphorylierung: die Signale der unstimulierten Zellen waren vergleichbar mit denen der Midostaurin-inkubierten Zellen. Die gleiche Aussage lässt sich über die zuerst mit Midostaurin inkubierten und nachfolgend mit dem MEM92/CD28Antikörper-Mix stimulierten Zellen treffen. Das Phosphorylierungsniveau war nur bei wenigen Banden geringer als bei den rein stimulierten Zellen. Midostaurin schien somit einen geringeren Einfluss auf die Phosphorylierung von Tyrosinresten der T-Zell-Proteine zu haben als Dasatinib (Abb. 13).

Die Analyse spezifischer Proteine des TCR-Signalings zeigt, dass LAT, LCK, SLP76, PLC $\gamma$  und MAP Kinasen im phosphorylierten Zustand der unbehandelten T-Zellen vorhanden waren (Abb. 13, Lane 1). SLP76, PLC $\gamma$  und die MAP Kinasen wiesen gegenüber den anderen untersuchten Proteinen schwächere Phosphorylierungssignale auf (Abb. 13, Lane 1). Nach Aktivierung der Zellen durch den MEM92/CD28Antikörper-Mix, konnte eine starke Phosphorylierung von LCK, SLP76, PLC $\gamma$  und bei den MAP Kinasen gesehen werden, während AKT nur schwach phosphoryliert wurde (Abb. 13, Lane 2). Die längere Inkubationszeit, 10 Minuten, resultierte in einer deutlichen Verstärkung des Phosphorylierungssignals bei PLC $\gamma$ , ZAP70 und AKT, wohingegen bei der MAP Kinase bei drei Minuten ein stärkeres Signal vorzufinden war (Abb. 13, Lane 3). Bei der alleinigen Dasatinib-Inkubation wiesen LCK und SLP76 kein Phosphorylierungssignal, im Vergleich zu den Proben ohne TKI-Zugabe, auf (Abb. 13, Lane 4).

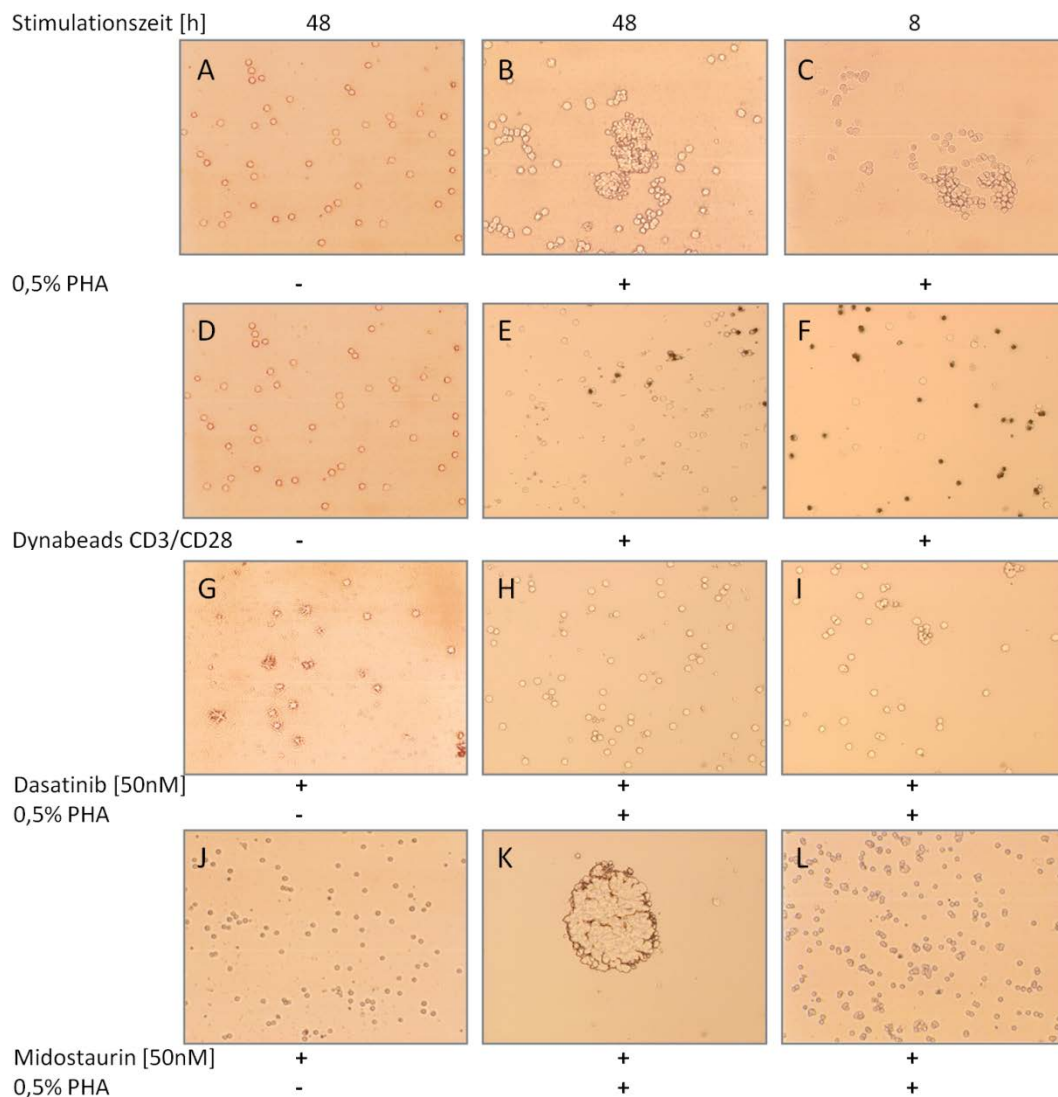
Wie auch schon aus den funktionellen Versuchen mit den Aktivierungsmarkern zu erwarten war, war bei Dasatinib auch nach der MEM92/CD28Antikörper-Mix-Stimulation das Phosphorylierungsniveau der einzelnen Proteine, verglichen mit dem der unbehandelten T-Zellen, abgeschwächt: Die Phosphorylierung von ZAP70, LCK, AKT und der MAP Kinasen bei einer Restimulationszeit von drei Minuten konnte durch 50nM Dasatinib gehemmt werden (Abb. 13, Lane 5). Bei 10-minütiger Restimulation von PLC $\gamma$ , SLP76 und den MAP Kinasen war das Phosphorylierungssignal stark abgeschwächt (Abb. 13, Lane 6). Nur auf die Phosphorylierung des Signalproteins LAT schien Dasatinib keinen Einfluss zu nehmen (Abb. 13, Lane 5, 6).

Midostaurin inhibierte die Phosphorylierung der unstimulierten Zellen bei SLP76 und den MAP Kinasen. Das Phosphorylierungssignal von LCK und PLC $\gamma$  wurde durch diesen TKI abgeschwächt (Abb. 13, Lane 7). Die Midostaurin-Inkubation der T-Zellen konnte bei keinem der untersuchten Signalwegproteine die Phosphorylierung im Vergleich zur Dasatinib-Inkubation

vollständig inhibieren. Eine Abschwächung der Signale konnte nach 10-minütiger Restimulation bei PLC $\gamma$ , ZAP70, SLP76, LCK und den MAP Kinasen gesehen werden. LAT und AKT wurden in ihrem Phosphorylierungsgrad in diesem Versuch durch Midostaurin nicht beeinflusst (Abb. 13, Lane 7, 8, 9).

Ergänzend zu den Analysen der T-Zell-Aktivierungsmarker und den intrazellulären Signalwegproteinen unter Dasatinib- bzw. Midostaurin- Inkubation wurde die Morphologie vitaler T-Zellen unter dem Einfluss von 0,5%igem PHA, CD3/CD28 *T-Cell Expander*, Dasatinib und Midostaurin mittels Mikroskopie dokumentiert, um zu analysieren, ob die bis dahin vorliegenden Ergebnisse morphologisch korrelieren.

Nach der Entnahme der T-Zellen aus der Zellkultur und vor der anschließenden Aufbereitung für die durchfluss-zytometrischen Messungen, wurden die unbehandelten und die stimulierten T-Zellen im Mikroskop wie in 3.3.6 beschrieben, mittels Durchlicht-Mikroskopie analysiert.



**Abbildung 14: Mikroskopie der T-Zellen unter Dasatinib-, Midostaurin-Inkubation und PHA-, Dynabeads CD3/CD28 T-Cell Expander-Stimulation.**

Die T-Zellen wurden nach der Aufreinigung für 48 Stunden in Kultur genommen. Vor der durchflusszytometrischen Messung wurden die unbehandelten und die stimulierten, sowie die TKI-inkubierten T-Zellen im Mikroskop wie in 3.3.6 beschrieben, analysiert. Mit dem Softwareprogramm DHS-Bilddatenbank wurden die Bilder gespeichert und anschließend ausgedruckt. Die Fotografien **A** und **D** zeigen unbehandelte T-Lymphozyten, die sich 48 Stunden in Kultur befanden. In der Abbildung **B** sind T-Zellen zu sehen, die 48 Stunden mit 0,5%igem PHA stimuliert wurden. Die Zellen der Abbildung **C** wurden 8 Stunden mit 0,5%igem PHA inkubiert. In **E** sind T-Zellen zu erkennen, die 48 Stunden mit CD3/CD28 T-Cell Expander inkubiert wurden. **F** zeigt die Zellen, die acht Stunden mit dem CD3/CD28 T-Cell Expander stimuliert wurden. In der Abbildung **G** wurden die Zellen 48 Stunden mit 50nM Dasatinib inkubiert, in der Abbildung **J** mit 50nM Midostaurin. In **H** und **I** sieht man T-Zellen, die zuvor 48 Stunden mit 50nM Dasatinib inkubiert und anschließend mit 0,5% PHA 48 Stunden bzw. acht Stunden vor der Analyse restimuliert wurden. Die Abbildung **K** zeigt T-Zellen, die mit 5nM Midostaurin 48 Stunden inkubiert und nachfolgend 48 Stunden mit 0,5%igem PHA restimuliert wurden. **L** stellt T-Lymphozyten dar, die 48 Stunden mit 50nM Midostaurin inkubiert und anschließend 8 Stunden mit 0,5%igem PHA restimuliert wurden. Die Abbildungen wurden mit 20facher Vergrößerung aufgenommen. Es sind jeweils repräsentative Bildausschnitte des Präparates dargestellt.

Zuerst werden die unbehandelten T-Zellen, welche 48 Stunden in Kultur genommen wurden, betrachtet (Abb. 14 A, D). Sie lagen vereinzelt vor, waren rund, hatten eine glatte Zellbegrenzung und eine normale Größe (ca. 7,5µm). Anschließend wurden die T-Zellen mit 0,5%igem PHA inkubiert. Nach acht-stündiger PHA-Stimulation (Abb. 14 C) lagen einige Zellen vereinzelt vor, andere schlossen sich zu kleinen Zellansammlungen von zwei bis acht Zellen zusammen. Zellteilungen waren hier deutlich zu erkennen. Bei einigen Zellen war die Begrenzung unregelmäßig. Weiterhin divergierte die Größe der Zellen. Bei einer Stimulationsdauer von 48 Stunden (Abb. 14 B) bildeten sich Zellkolonien aus bis zu 100 Zellen, aber auch vereinzelt T-Lymphozyten waren zu sehen. Die runde Zellform mit einer glatten Begrenzung war beim überwiegenden Teil der Lymphozyten zu erkennen. Zellteilungen fanden statt. Wurden die T-Lymphozyten mit CD3/CD28 *T-Cell Expander* (Abb. 14 E, F) stimuliert, fand zu keinem Zeitpunkt eine Koloniebildung statt. Morphologisch gab es im Vergleich zu den unbehandelten Zellen keine Unterschiede. Zellteilungen und Größenveränderungen waren nicht sichtbar. Die Dynabeads sind in den Aufnahmen als schwarze Kugeln erkennbar. Aus diesen Ergebnissen ist zu entnehmen, dass eine PHA-Stimulation die Morphologie und das Koloniebildungsverhalten von T-Zellen beeinflusste, wohingegen CD3/CD28 *T-Cell Expander* auf diese Faktoren keinen Einfluss zu haben schien.

Im nächsten Schritt wurden TKI-behandelte T-Zellen fotografiert. Nachdem die T-Zellen 48 Stunden mit 50nM Dasatinib inkubiert wurden, erschienen einige Zellen nicht mehr intakt (Abb. 14 G). Die Kontinuität der Zellmembran war nicht mehr gegeben. Die übrigen Lymphozyten lagen vereinzelt vor, waren rund und hatten eine normale Größe. Bei T-Zellen, die mit 50nM Midostaurin inkubiert wurden (Abb. 14 J), waren im Vergleich zu den unbehandelten Zellen keine Unterschiede feststellbar. Bei den T-Zellen, die 48 Stunden mit 50nM Dasatinib inkubiert wurden, fand fast keine Koloniebildung statt (Abb. 14 H, I). Es gab keine Form- und keine Größenänderungen unter der PHA-Stimulation bei vorangegangener TKI-Inkubation. Bei T-Zellen, die 48 Stunden mit 5 bzw. 50nM Midostaurin inkubiert und anschließend mit 0,5%igem PHA 48- bzw. acht Stunden restimuliert wurden, ist zu erkennen, dass die zuvor beobachteten Veränderungen der PHA-Stimulation erneut auftraten (Abb. 14 K, L). Bei der 48- (Abb. 14 K), 24- (nicht abgebildet) oder acht- (Abb. 14 L) stündigen PHA-Stimulation, bei zuvor erfolgter Midostaurin-Inkubation, nahm die Koloniebildung mit der Dauer der Stimulationszeit zu.

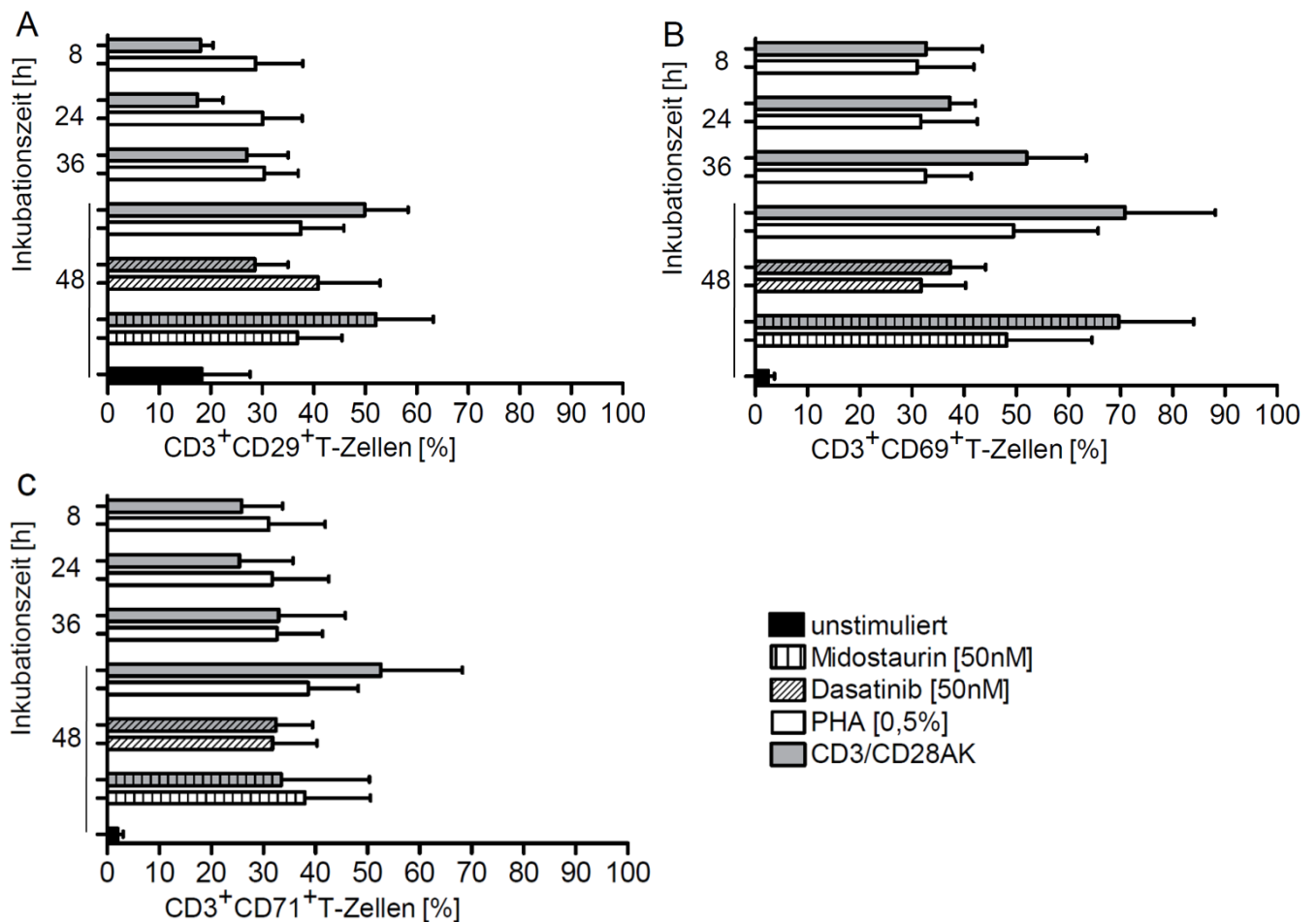
Zusammenfassend lässt sich beschreiben, dass Midostaurin im Gegensatz zu Dasatinib die durch PHA-induzierten morphologischen Veränderungen der T-Zellen nicht inhibiert.

## **4.6 Vergleich der 0,5%igen PHA-Stimulation mit der Dynabeads**

### **CD3/CD28 *T-Cell Expander* Stimulation**

Als letzter Aspekt zur Wirkung der ausgewählten Stimulanzen auf T-Zellen wurde untersucht, ob eine CD3/CD28 *T-Cell Expander*-spezifische Stimulation der T-Zellen effektiver als eine Stimulation mit PHA ist. Im Hinblick auf nachfolgende T-Zell-Versuche sollte in dieser Arbeit eruiert werden, welche Stimulation am optimalsten für T-Lymphozyten ist.

Es wurden T-Zellen, wie in 3.3.1-3.3.3 und 3.3.5 beschrieben, in Kultur genommen und entweder mit CD3/CD28 *T-Cell Expander* oder PHA für 48-, 36-, 24- und 8 Stunden inkubiert. Anschließend erfolgte die, wie in 3.3.7 dargelegt, durchfluss-zytometrische Analyse der Expression der Oberflächenantigene CD3, CD29, CD69 und CD71. Die nachfolgenden Diagramme der Abbildung 15 zeigen die Mittelwerte und Standardabweichungen aus für PHA elf und für den CD3/CD28 *T-Cell Expander* drei unabhängigen Versuchswiederholungen.



**Abbildung 15: Vergleichende Analyse zur Wirkung einer 0,5%igen PHA-Stimulation mit einer CD3/CD28 T-Cell Expander-Stimulation von T-Zellen in zeitlicher Abstufung.**

Dargestellt ist der prozentuale Anteil CD3<sup>+</sup>/CDX<sup>+</sup> Zellen in Abhängigkeit des verwendeten Stimulanz und vom Zeitpunkt der Stimulation mit 0,5%igem PHA im Vergleich zu der mittels CD3/CD28 T-Cell Expander stimulierten Zellfraktionen. A) Die T-Zellen wurden 48-; 36-; 24- und 8 Stunden vor der durchfluss-zytometrischen Messung zum einen mittels PHA zum anderen mit CD3/CD28 T-Cell Expander stimuliert. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert mit der Standardabweichung der prozentualen Anteile CD3<sup>+</sup>/CD29<sup>+</sup> Zellen von unabhängigen Versuchsreihen aus elf PHA-Experimenten und drei CD3/CD28 T-Cell Expander-Experimenten. Abbildung B zeigt die Ergebnisse des Versuches, in dem die T-Zellen 48-; 36-; 24- und 8 Stunden vor der durchfluss-zytometrischen Messung zum einen mittels PHA zum anderen mit CD3/CD38 T-Cell Expander inkubiert wurden. Bei der Analyse wurde auf CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> Zellen getastet. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert mit der Standardabweichung von unabhängigen Versuchsreihen aus elf PHA-Experimenten und drei CD3/CD28 T-Cell Expander-Experimenten. Abbildung C zeigt die prozentualen Anteile an CD3<sup>+</sup>/CD71<sup>+</sup> Zellen. Die T-Zellen wurden zuvor 48-; 36-; 24- und 8 Stunden mit PHA und mit CD3/CD28 T-Cell Expander inkubiert und nachfolgend durchfluss-zytometrisch analysiert. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert mit der Standardabweichung von unabhängigen Versuchsreihen aus elf PHA-Experimenten und drei CD3/CD28 T-Cell Expander-Experimenten.

Im Vergleich zu dem prozentualen Anteil unbehandelter T-Zellen ist der prozentuale Anteil stimulierter, doppelt positiver T-Zellen unter der Zugabe von 0,5%igem PHA bzw. CD3/CD28 *T-Cell Expander* deutlich erhöht. Das heißt, dass unter Inkubation mit 0,5%igem PHA bzw. CD3/CD28 *T-Cell Expander* eine Steigerung der Aktivierungsmarker-Expression stattgefunden hat. Bei beiden Stimulanzen bewirkte eine längere Inkubationszeit eine effektivere T-Zell-Oberflächenantigen-Expression (Abb. 15).

Unbehandelte T-Zellen hatten, wie schon zuvor gezeigt, eine sehr geringe CD69- und CD71-Expression, verglichen mit CD29.

Im Gegensatz zu CD29 wurde CD69 vermehrt auf den durch 0,5%igem PHA und CD3/CD28 *T-Cell Expander* aktivierten T-Lymphozyten durchfluss-zytometrisch gemessen.

Interessant war, dass bei der Inkubation mit CD3/CD28 *T-Cell Expander* im Vergleich zu PHA bei einer Inkubationszeit von 48 Stunden eine um ca. 13% erhöhte Expressionsrate an CD29 vorhanden war. Bei den kürzeren Stimulationszeiten war die Inkubation der T-Zellen mit 0,5%igem PHA effektiver als die Inkubation mit CD3/CD28 *T-Cell Expander*. Die effektivere Expression der Aktivierungsmarker bei einer 48-stündigen Inkubationszeit mit CD3/CD28 *T-Cell Expander*, verglichen mit PHA, ließ sich auch bei CD69 und CD71 beobachten.

Bei CD29 konnte die Inkubation der T-Lymphozyten mit 50nM Midostaurin und anschließender Restimulation die Expression nicht beeinflussen. Die Vorbehandlung der T-Zellen mit Dasatinib [50nM] verhinderte eine starke CD29 Aktivierung nach CD3/CD28 *T-Cell Expander*-Zugabe. Auf die Stimulation der Zellen mittels 0,5%igem PHA hatte der TKI keinen Einfluss. Bei CD69 und CD71 konnte eine vorangegangene Dasatinib-Inkubation der T-Zellen bei beiden Stimulanzen die vermehrte Expression inhibieren. Midostaurin hingegen hatte keine eindeutig hemmende Wirkung auf die CD69-Expression von PHA- und CD3/CD28 *T-Cell Expander*-inkubierten T-Lymphozyten. Dafür aber inhibierte Midostaurin die CD71-Expression CD3/CD28 *T-Cell Expander*-stimulierter Zellen. Der prozentuale Anteil an CD71<sup>+</sup> Zellen betrug bei der PHA-Inkubation ca. 39% und bei einer Inkubation der Zellen mit CD3/CD28 *T-Cell Expander* ca. 53%. Bei einer vorangegangenen Dasatinib-Inkubation waren ca. 32% CD71<sup>+</sup>. Bei einer zuvor erfolgten Inkubation der T-Zellen mit Midostaurin waren unter PHA-Restimulation 38% und bei einer CD3/CD28 *T-Cell Expander*-Restimulation 33% CD3<sup>+</sup>/CD71<sup>+</sup>.



## 5. Diskussion

Nicht bei jedem Menschen ist das Immunsystem intakt. Immunzellen, wie zum Beispiel die T-Lymphozyten, können defekt sein und somit die Gesundheit gefährden. Medikamente können Funktionen von Lymphozyten hemmen, oder die Funktion von T-Zellen unterstützen, um Autoimmunerkrankungen zu supprimieren oder Tumorthérapien zu entwickeln. Die Hemmung von Lymphozyten kann auch als ungewollter Nebeneffekt einer zielgerichteten Therapie, z.B. von Kinase-Inhibitoren, auftreten.

Midostaurin, ein Tyrosin-, Serin-, Threoninkinase-Inhibitor, befindet sich zurzeit in Phase III-Studien zur Behandlung der AML. Seine Fähigkeit die intrazellulären Proteine PKC, MAPK, PKA, VEGFRK, c-Src, Syk, c-fos, PDGFR, die Sekretion von TNF $\alpha$  und IL-6 und die Phosphorylierung des intrazellulären Signalwegproteins Erk1/2 zu hemmen, wurde in Publikationen belegt (Meyer et al. 1989; Caravatti et al. 1994; Fabbro et al. 1999; Thavasu et al. 1999; Si et al. 2005).

In der vorliegenden Arbeit wurden die klinisch relevanten Konzentrationen (5nM, 20nM, 50nM) von Midostaurin verwendet, die auch als Talspiegel in der AML-Therapie erreicht werden, wie frühere klinische Studien belegen (Heidel et al. 2006).

Bereits in früheren Publikationen wurde neben Midostaurin auch die Wirkung von Dasatinib analysiert (Lombardo et al. 2004; O'Hare et al. 2005; Das et al. 2006; Fei et al. 2008/2009; Weichsel et al. 2008). Dasatinib ist ein SRC-Kinase-Inhibitor, dessen Einfluss auf die T-Zellen vielfach untersucht wurde und somit in der vorliegenden Arbeit als Kontrolle fungiert. Dasatinib ist nach Schade et al. 2008 spezifisch für den TCR und hemmt nachgewiesen die BCR-ABL-Kinase, c-Kit, PDGFR und die SRC-Kinase-Familie (Lombardo et al. 2004; O'Hare et al. 2005). Nach Weichsel et al. und Fei et al. ist dieses Medikament zu Unterdrückung der T-Zell-Entwicklung und -Funktion fähig. Dies zeigte sich in Experimenten, in denen Transkriptionsfaktoren wie FoxP3, die Oberflächenantigene GITR, CTLA-4, die Zytokine IFN $\gamma$ , IL-10, IL-4, sowie die Phosphorylierung von LCK und NF $\kappa$ B von regulatorischen T-Zellen inhibiert werden konnten (Fei et al. 2009). In CD8<sup>+</sup> Lymphozyten bewies Dasatinib die Fähigkeit, die Oberflächenantigene CD25, CD69, HLA-DR, das Zytokin IFN $\gamma$  und die Serinprotease Granzym B sowie die Phosphorylierungen der Signalwegproteine LCK, ZAP70, Erk1/2, AKT und NF $\kappa$ B zu hemmen (Fei et al. 2008; Schade et al. 2008). Um die Phosphorylierung von Erk1/2, AKT und NF $\kappa$ B zu supprimieren, waren nur 10nM Dasatinib erforderlich. Eine vollständige Inhibition wurde mit 100nM erreicht (Schade et al. 2008). Im Vergleich dazu, wurde im menschlichen Körper ein Serumspiegel von ca. 90nM (Weisberg et al. 2007) bei der AML-Therapie

festgestellt. In den Versuchen der vorliegenden Arbeit wurden klinisch relevante und *in vivo* erreichbare Konzentrationen von 10nM und 50nM Dasatinib verwendet.

Sowohl Midostaurin als auch Dasatinib inhibieren spezifisch die Signaltransduktion, was in der Zellkultur zur Verringerung der onkogen mutierten Zellen und im Patienten zu einer Reduktion des onkogenen Klons führt. Diese Effizienz wurde für Midostaurin zum Beispiel bei der Behandlung des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms (Hemström et al. 2005; Ikegami et al. 1996a; Monnerat 2004), der AML und des Myelodysplastischen Syndroms (Fischer et al. 2010) nachgewiesen oder für Dasatinib bei der Imatinib-resistenten Chronisch myeloischen Leukämie (Cortes et al. 2007; Guilhot et al. 2007). Auch bei anderen Erkrankungen konnten diese Substanzen zum Teil in Kombination mit anderen Medikamenten Erfolge verzeichnen (Begemann et al. 1996; Buettner et al. 2008; Johnson et al. 2005; Stone et al. 2005).

Ziel dieser vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, inwiefern beide klinisch relevanten TKIs immunmodulatorische Eigenschaften in Hinblick auf T-Zellen aufweisen und in wieweit sich diese Wirkungen bei ausgewählten T-Zell-Signalweg-Proteinen, den Oberflächenmarkern CD29, CD69 und CD71 und der Zellmorphologie widerspiegeln.

Dasatinib, ein Tyrosinkinase-Inhibitor, zeigte schon bei anderen Arbeitsgruppen, dass er Aktivierungsmarker, proximale Signalwegproteine und die Zytokinproduktion von T-Lymphozyten inhibieren kann. Über Midostaurin hingegen ist auf dem Gebiet der Oberflächenantigen-Expression und proximalen Signalwegtransduktion in T-Zellen weniger bekannt. Midostaurin soll den oberen Abschnitt des T-Zell-Signalweges beeinflussen (Si et al. 2005). Es ist bewiesen, dass dieser Serin-/Threonin-, Tyrosinkinase-Inhibitor Einfluss auf PKC, den MAPKinase-Signalweg, VEGF-R-Kinase, c-Src, PKA und C-Syk, c-fos sowie die Autophosphorylierung von PDGFR (Fabbro et al. 1999; Andrejaskas et al. 1992) nimmt und eine Inhibition der phosphorylierten und unphosphorylierten ERK1/2 und der TNF $\alpha$ - und IL-6 Sekretion bewirkt (Thavasu et al. 1999; Si et al. 2005).

In der vorliegenden Arbeit wurden mittels Western Blot ausgewählte spezifische Proteine des oberen Abschnittes des T-Zell-Signalweges auf die Wirkung von Midostaurin und Dasatinib untersucht. Die aufgereinigten T-Zellen wurden dafür, wie unter 3.3.4 beschrieben, entweder mit DMSO versetzt, oder jeweils mit 50nM Dasatinib oder 50nM Midostaurin inkubiert und mit dem MEM92/CD28Antikörper-Mix drei und 10 Minuten stimuliert. Die Auftrennung der Proteine der Größe nach erfolgte durch die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Anschließend wurde ein Protein-Transfer durchgeführt, um die aufgetrenn-

ten Proteine immunologisch mit spezifischen Antikörpern, wie in 3.4.4.2 dargestellt, nachweisen zu können.

Zum einen zeigte die Analyse der intrazellulären Signaltransduktion mit Hilfe von Western Blots deutliche Unterschiede in der Inhibition der Phosphorylierung der ausgewählten Proteine durch die TKIs im Vergleich zu den unbehandelten, mit DMSO inkubierten Zellen. Zum anderen wurde in der Detektion der allgemeinen Phosphorylierung an Tyrosinresten durch den Pan-Phosphotyrosinantikörper 4G10 sichtbar, dass die Tyrosinreste durch Dasatinib im Vergleich zu Midostaurin stärker inhibiert wurden. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 13 zu sehen. Zunächst einmal konnte festgestellt werden, dass die unbehandelten T-Zellen schwächere oder keine Phosphorylierungssignale, im Vergleich zu den mit MEM92/CD28Antikörper-Mix stimulierten Lymphozyten, aufwiesen. Letztere zeigten starke Phosphorylierungssignale, sodass davon ausgegangen werden konnte, dass die Immunzellen nach der Inkubation vital waren und gut durch den MEM92/CD28Antikörper-Mix aktiviert wurden. Erfolgte die Inkubation der T-Zellen mit Dasatinib, konnte eine vollständige Inhibition der Phosphorylierung der Tyrosinreste der Proteine der unstimulierten Zellen nachgewiesen werden. Weiterhin konnte eine vollständige bzw. verminderte Inhibition der Phosphorylierungen bei Proteinen gesehen werden, deren Zellen nach Dasatinib-Inkubation restimuliert wurden. Midostaurin zeigte einen geringeren Einfluss, da weder bei den unstimulierten noch bei den restimulierten T-Zellen eine vollständige Hemmung der Phosphorylierung zu erkennen war. Daraufhin wurde die Phosphorylierung einzelner Proteine untersucht. Bei den unbehandelten, unstimulierten Zellen konnte ein deutliches Phosphorylierungssignal für LAT und LCK gemessen werden. SLP76, PLC $\gamma$  und MAPK wiesen ein schwächeres Signal auf. Bei ZAP70 und AKT waren keine Banden sichtbar, was darauf hindeutet, dass in den unstimulierten T-Lymphozyten die Proteine LAT, LCK, SLP76, PLC $\gamma$  und MAPK aktiviert sind. ZAP70 und AKT werden hingegen erst nach einer Stimulation phosphoryliert. Vorweggreifend kann geschlussfolgert werden, dass eine unspezifische Stimulation der Zellen durch im Medium vorhandene Zusätze nicht angenommen wird, da die Aktivierungsmarker in den unbehandelten Zellen herabreguliert waren. Die vorhandene Aktivierung von LCK und MAPK und die fehlende Aktivierung von AKT und ZAP70 im unstimulierten Zustand, stimmt mit bereits veröffentlichten Daten von Fei et al. 2008/2009, Schade et al. 2009 und Weichsel et al. 2008 überein. In der vorliegenden Arbeit resultiert eine drei-minütige Stimulation der T-Zellen mit dem MEM92/CD28Antikörper-Mix in der Phosphorylierung von LCK, SLP76, PLC $\gamma$  und MAPK. Eine LAT- und ZAP70-Phosphorylierung waren vergleichsweise schwach, AKT war nur minimal phosphoryliert. Bei einer 10-minütigen Stimulation war im Vergleich zu einer drei-Minuten-Stimulation die Phosphorylierung von PLC $\gamma$ , ZAP70 und

AKT verstärkt. Eine mögliche Erklärung wäre, dass ZAP70 und AKT durch die CD3/CD28 Rezeptor-spezifische Stimulation erst phosphoryliert und aktiviert werden, wohingegen die anderen Signalwegproteine schon ein ständiges Grundphosphorylierungsniveau besitzen. Eine andere mögliche Erklärung wäre eine unterschiedliche Phosphorylierungskinetik der Proteine, oder es handelt sich um rezeptornahe und rezeptorferne Proteine. Gegen letztere Annahme spricht zum Teil, dass PLC $\gamma$  anfangs stark phosphoryliert ist, wohingegen ZAP70, welches PLC $\gamma$  aktiviert, erst schwach phosphoryliert ist. Da PLC $\gamma$  auch in unbehandelten Zellen eine Grundphosphorylierung besitzt, kann die sehr starke Phosphorylierung nach einer 10-minütigen Stimulation durch die verstärkte Aktivität von ZAP70 erklärt werden. Dann bleibt aber die Frage offen, warum SLP76, welches erst durch ZAP70 phosphoryliert wird, schon nach einer drei-Minuten-Stimulation stärker phosphoryliert ist, als ZAP70. Auffällig war auch, dass in jedem Versuch der Phosphorylierungsgrad der MAPK zum Zeitpunkt der drei-Minuten-Stimulation größer war als bei einer 10-minütigen Inkubation der T-Zellen mit dem MEM92/CD28Antikörper-Mix, sodass davon ausgegangen werden kann, dass im T-Zell-Signalweg eine frühzeitige, transiente Aktivierung dieser Kinase vorliegt. Eine Inkubation mit Dasatinib konnte die Phosphorylierung von LCK, PLC $\gamma$ , MAPK und SLP76 bei inaktiven Lymphozyten vollständig inhibieren. Nach der Dasatinib-Inkubation mit anschließender dreiminütiger Restimulation konnte durch Dasatinib die Phosphorylierung von ZAP70, LCK, AKT und MAPK unterdrückt werden. Nach einer 10 Minuten-MEM92/CD28Antikörper-Mix-Inkubation war die Phosphorylierung von PLC $\gamma$ , SLP76 und MAPK abgeschwächt. Auf den Phosphorylierungsstatus von LAT nahm Dasatinib unter diesen Versuchsbedingungen keinen Einfluss. LAT und SLP76 konnten in den vorliegenden Versuchen unabhängig von einer Dasatinib-Pre-Inkubation stimuliert werden. Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass Dasatinib die Phosphorylierungen von LCK, AKT, ZAP70, MAPK und PLC $\gamma$  vollständig inhibiert. Dasatinib wurde als src-Kinasen Inhibitor entwickelt (Lombardo et al. 2004; O'Hare et al. 2005), was die Inhibition der src-Kinase LCK und der Syk-Kinase ZAP70 erklärt. AKT hingegen ist eine Serin-/Threoninproteinkinase; die Inhibition der Phosphorylierung zeigt, dass Dasatinib ein ihr vorgeschaltetes Protein des Signalweges beeinflussen könnte. Dabei könnte es sich um PI3K handeln, da bei einer Hemmung von PDK1 AKT über PI3K weiterhin phosphoryliert werden müsste. Um die Zielkinasen von Dasatinib zu vervollständigen, wären Western Blots mit PI3K und Dasatinib sinnvoll. Ähnlich ist es bei LAT: Wenn ZAP70, das in seiner aktivierten Form LAT phosphoryliert, in allen Phasen vollständig durch Dasatinib inhibiert wird, besteht die Frage, welches andere Protein LAT phosphoryliert, da bei LAT trotz Dasatinib-Inkubation der Zellen auch weiterhin im Western Blot eine Bande sichtbar war. Wahrscheinlich ist noch ein

weiteres Protein an der Phosphorylierung von LAT beteiligt, welches ZAP70- bzw. LCK-unabhängig agiert. Interessant ist auch die Tatsache, dass die Phosphorylierung von SLP76 in den unstimulierten T-Zellen durch Dasatinib völlig inhibiert war. Nach Clements et al. 2003, Kanehisa Laboratories 2009 und Weißmantel 2009 wird SLP76 durch ZAP70 phosphoryliert. Da diese Kinase aber durch Dasatinib inhibiert wurde, ist die erfolgreiche, wenn auch im Signal schwächere, Rephosphorylierung von SLP76 nur durch ein weiteres Protein erklärbar. In der Literatur lässt sich bislang kein Hinweis auf diese Kinase finden. Die Versuche mit Dasatinib haben demzufolge nicht nur Aufschluss über dessen eigene Wirkung gegeben, sondern weisen auch darauf hin, dass weitere Untersuchungen, den T-Zell-Signalweg betreffend, durchgeführt werden sollten.

Die Analyse der Auswirkungen von Midostaurin auf die Signaltransduktion hingegen zeigt, dass dessen inhibitorische Wirkung geringer ausfiel. Eine mögliche Erklärung wäre, dass zu geringe Konzentrationen eingesetzt wurden und eine effektive Inhibition der ausgewählten Signalwegproteine erst ab 100nM erreicht worden wären. Die von Si et al. 2005 bestimmte  $IC_{50}$  für T-Zellen betrug jedoch 0,1µM. Außerdem handelt es sich hier um eine *in vivo* erreichbare klinisch relevante Konzentration (Heidel et al. 2006). Zum anderen ist es möglich und auch wahrscheinlicher, dass Midostaurin geringere immunmodulatorische Eigenschaften im Vergleich zu Dasatinib auf den proximalen T-Zell-Signalweg besitzt. Si et al. vermuteten 2005 aufgrund der Wirkung von Midostaurin auf die intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Antwort einen Einfluss dieser Substanz auf den proximalen Abschnitt des T-Zell-Signalweges. Diese Annahme konnte durch die vorliegende Arbeit nicht bestätigt werden. Midostaurin inhibierte deutlich die Phosphorylierung von SLP76 und MAPK. Weiterhin war unter Midostaurin-Inkubation das Phosphorylierungssignal von LCK und  $PLC\gamma$  in den unstimulierten T-Zellen verringert. Nach dreiminütiger Restimulation mit dem MEM92/CD28Antikörper-Mix bei vorangegangener Midostaurin-Inkubation war bei keinem analysierten Signalwegprotein das Phosphorylierungsniveau, im Vergleich zu Dasatinib, vollständig herabgesetzt. Jedoch konnte für ZAP70, SLP76 und  $PLC\gamma$  eine verminderte Phosphorylierung festgestellt werden. Ein schwächeres Phosphorylierungssignal nach 10-minütiger Restimulation war bei ZAP70, SLP76,  $PLC\gamma$ , Lck und MAPK zu sehen. Midostaurin nahm keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von aktiviertem LAT und AKT. Wie die Fachliteratur zeigt, gab es keine andere Arbeitsgruppe, die die Wirkung von Midostaurin auf den intrazellulären Signalweg der T-Lymphozyten näher betrachtet hat. Es wurde lediglich analysiert, dass PKC-Isoformen  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , die  $Ca^{2+}$ abhängigen PKC Isoformen  $\delta$ ,  $\epsilon$  und  $\mu$  (Caravatti et al. 1994; Fabbro et al. 1999; Meyer et al. 1989), der MAPKinase-Signalweg, PKA, die Autophosphorylierung von PDGFR (Andrejaskas-Buchdunger and

Regenass 1992; Fabbro et al. 1999), die phosphorylierte und unphosphorylierte ERK1/2 (Thavasu et al. 1999) von Midostaurin inhibiert werden. Da die hier gezeigten Western Blot-Ergebnisse für Dasatinib mit denen bereits publizierter Daten von Schade et al. 2009, Fei et al. 2008 und 2009, sowie Weichsel et al. 2008 übereinstimmen, kann davon ausgegangen werden, dass auch die Erkenntnisse für Midostaurin bei gleicher Versuchsanordnung aussagekräftig sind.

Die Phosphorylierung von LAT wurde weder von Dasatinib noch von Midostaurin gehemmt. Die Phosphorylierung von AKT wird von Midostaurin nicht inhibiert. LCK, PLC $\gamma$ , ZAP70, SLP76 und MAPK-Phosphorylierungen werden von Midostaurin in einem geringeren Ausmaß beeinflusst als bei einer Dasatinib-Inkubation der Zellen.

Ein weiterer Schritt zur Klärung der Wirkung von Dasatinib und Midostaurin auf T-Zellen ist die Untersuchung der gerichteten T-Zell-Funktion auf präsentierte Antigene auf APCs (z. B. virale Antigene oder Tumor-Antigene) unter TKI-Behandlung mittels ELI-Spot. Diese Untersuchung wurde bereits durchgeführt und zeigte, dass Midostaurin (50nM) die lytische Aktivität von humanen T-Zellen nicht beeinflusst. Im Gegensatz dazu inhibierte Dasatinib (10nM) signifikant die virusspezifische T-Zell-Antwort (Wolleschak et al. 2014).

Um nähere Aussagen über immunmodulatorische Eigenschaften von Midostaurin im Vergleich zu Dasatinib treffen zu können, war es sinnvoll, ihre Wirkung auf T-Zell-Aktivierungsmarker zu analysieren. Wie zuvor bei den ausgewählten T-Zell-Signalweg-Proteinen spiegelte sich auch bei den Oberflächenantigenen ein unterschiedlich starker inhibitorischer Einfluss beider TKIs wider.

Für diese Versuche wurden CD29, ein  $\beta$ 1-Integrin, CD69, ein früher Aktivierungsmarker, und CD71, ein Transferrinrezeptor und später Aktivierungsmarker, ausgewählt. CD69 und CD71 wurden in diesen Experimenten, im Gegensatz zu CD29, nicht auf den inaktiven T-Zellen exprimiert. Dies wird durch Versuchsergebnisse anderer Arbeitsgruppen belegt (Testi et al. 1994; Sant'Ángelo et al. 1998; Macedo et al. 2004; Ned et al. 2003; Brekelmans et al. 1994). Auf weniger als 4% der untersuchten, unbehandelten Lymphozyten *in vitro* waren CD69 und CD71 durchfluss-zytometrisch zu messen. Hingegen waren ca. 10-20% der T-Zellen im unstimulierten Zustand CD29<sup>+</sup>. Bei allen Oberflächenantigenen war bei Stimulation mit 0,5%igem PHA oder CD3/CD28 *T-Cell Expander* eine verstärkte Expression zu erkennen. Die längste Stimulationszeit (48 Stunden) erzielte die höchsten Expressionsraten der Oberflächenantigene. Aufgrund von Literaturdaten (Potter et al. 1975) ist jedoch anzunehmen, dass längere Stimulationszeiten zu einer stärkeren Expression von CD29, CD69 und CD71 führen könnten, da zum

Beispiel PHA erst nach 48 Stunden sein Wirkoptimum bei T-Zellen entfaltet. Es erscheint daher sinnvoll in künftigen Experimenten auch spätere Analysezeitpunkte zu wählen. Gerade bei den zeitlich später exprimierten Oberflächenantigenen CD29 und CD71 könnte man somit weitere Aussagen zur Expression bei längeren Stimulationszeiten unter PHA-Inkubation treffen.

CD69 ist nach den Forschungsergebnissen von Hara T. et al. 1988-2005 und Cebrián et al. 1988 nach 30 Minuten bis drei Stunden nach T-Zellaktivierung im Durchfluss-Zytometer zu messen und erreicht nach 24 Stunden sein Expressionsmaximum, sodass zu diesem frühen Aktivierungsmarker gute Aussagen getroffen werden konnten. Zu beachten ist bei der Expression der Oberflächenantigene, dass sie immer ein Resultat eines in den T-Zellen aktivierten Signalweges ist und sie nicht losgelöst von der intrazellulären Signaltransduktion oder von Funktionsassays betrachtet werden sollte.

Eine weitere Erkenntnis dieser Arbeit ist, dass von den verwendeten Stimulanzen am stärksten die CD69-Expression herauf reguliert werden konnte. Danach folgte die Expression von CD71. Die geringste stimulationsabhängige Expression zeigte CD29. Ein weiterer Punkt ist, dass die Standardabweichungen für die Oberflächenantigen-Expression relativ groß sind. Ursächlich dafür können eine gewisse Schwankungsbreite der Lymphozytenzahlen und Reaktionseigenschaften auf die verwendeten Substanzen sein, die von der Individualität der Probanden abhängig sein könnte.

Die CD69-Expression der unbehandelten, inaktiven Zellen wird weder von Dasatinib noch von Midostaurin beeinflusst. Anders verhält es sich bei den Restimulationsversuchen: Während Dasatinib in allen Konzentrationen und zu jedem gemessenen Zeitpunkt eine deutliche Abschwächung der CD69-Expression unter Restimulation bewirkt (Abbildung 10), bleibt bei vorangegangener Midostaurin-Inkubation die CD69-Expression nahezu unverändert (Abbildung 11; 12). Bei einzelnen Versuchen ist der prozentuale Anteil an CD69<sup>+</sup> Zellen unter Midostaurin-Inkubation minimal geringer als bei der reinen Stimulation mit 0,5% igem PHA (Abbildung 11) oder mit dem CD3/CD28 *T-Cell Expander* (Abbildung 12). Doch kann damit keine inhibitorische Wirkung von Midostaurin auf die CD69-Expression nachgewiesen werden. Bei Dasatinib hingegen, ist eine Konzentration von 10nM ausreichend, um die Restimulation zu beeinflussen. Literaturdaten der Forschungsgruppen Weichsel et al. 2008; Schade et al. 2008 bestätigten, dass 10nM Dasatinib eine ausreichende inhibitorische Wirkung auf T-Zellen hat. In den vorliegenden Versuchen wurden 50nM Dasatinib verwendet, sodass der inhibitorische Erfolg noch deutlicher war.

Das CD69 Gen befindet sich auf dem menschlichen Chromosom 12. Die Transkription wird durch die Transkriptionsfaktoren NFκ-B, Egr-1 und AP-1 reguliert (Castellanos et al. 2002;

López-Cabrera et al. 1995). Die Aktivierungen der T-Zelle über den TCR, CD28, PKC und p21ras Stimulation werden als potente Vermittler der CD69-Expression angesehen (De Maria et al. 1999). Ras ist an der Aktivierung der CD69-Expression beteiligt (D'Ambrosio et al. 1994). In den hier präsentierten Versuchen wird deutlich, dass Dasatinib die Phosphorylierungen von LCK, ZAP70, SLP76, PLC $\gamma$  und AKT inhibieren konnte und somit diese Signalproteine durch Stimulation nicht in den aktiven Zustand versetzt werden konnten. Doch gerade diese Proteine werden durch CD28-Rezeptor- und TCR-Stimulation aktiv und führen über die Signalkaskade zur Aktivierung von Ras und somit zur Transkription von NF $\kappa$ -B und AP-1 und sind damit auch für die CD69-Expression ursächlich.

Im Gegensatz zu CD69 ist CD71 ein später Aktivierungsmarker und steht im engen Zusammenhang mit CD3 $\zeta$  und ZAP70. Der TCR und CD71 bedingen sich gegenseitig in der Phosphorylierung (Salmeron et al. 1995; Macedo et al. 2004). Wird der TCR und der sich anschließende Signalweg in ihren Funktionen inhibiert, liegt die Schlussfolgerung nah, dass auch die CD71-Expression herab reguliert wird. Dieser Zustand konnte teilweise mit einer Dasatinib- und mit einer Midostaurin-Inkubation der Zellen nachgewiesen werden (Abbildungen 10; 11; 12). Eine Inhibition der CD71-Expression nach Restimulation wurde bei den längeren Inkubationszeiten (36-, 48 Stunden) mit allen gewählten Konzentrationen der beiden Substanzen erreicht. Bei kürzeren Inkubationszeiten konnte keine Expressionshemmung festgestellt werden. Zu Bedenken ist aber, dass die Aktivierung von CD71 auch vom IL-2 Rezeptor abhängig ist (Lum et al. 1986). Somit existiert ein weiterer Aktivierungsweg für CD71. Dies ist eine mögliche Erklärung dafür, dass aufgrund des zweiten, ungehemmten Signalweges keine ebenso deutliche Expressionshemmung wie bei CD69 zu sehen war.

Die CD29-Expression blieb unbeeinflusst von einer TKI-Inkubation, was in den Abbildungen 10; 11 und 12 zu sehen ist. Wie zuvor beschrieben, war CD29 auf 10% bis 20% der unbehandelten T-Zellen vorhanden. Auch bei einer Pre-Inkubation der T-Zellen mit dem jeweiligen TKI gab es kaum eine Änderung des durchfluss-zytometrisch gemessenen prozentualen Anteils an CD29. Weiterhin konnten weder Midostaurin noch Dasatinib die Wirkung der PHA- bzw. der CD3/CD28 *T-Cell Expander*-Restimulation auf das  $\beta$ 1-Integrin beeinflussen. Zusammenfassend waren weder Zeit- noch Konzentrationseinflüsse zu erkennen. Da Dasatinib eine inhibitorische Wirkung auf die Expression von CD69 und CD71 bewiesen hat und dieser TKI nach Schade et al. 2008 sehr TCR spezifisch ist, ist ein TCR/CD28 unabhängiger Weg für die verstärkte CD29-Expression unter Stimulanz-Inkubation denkbar.

Dasatinib hat einen stärkeren inhibitorischen Effekt auf T-Zellen gesunder Probanden als Midostaurin. Dies wird auch durch deren unterschiedlichen Einfluss auf die Zellmorphologie ver-



anschaulicht. Die unbehandelten Zellen lagen einzeln, rund und in Normalgröße (ca. 7,5µm) vor. Durch eine CD3/CD28 *T-Cell Expander*-Stimulation wird die Aktivität und Proliferation der T-Lymphozyten angeregt. Die Zellform bleibt unverändert. Bei einer PHA-Inkubation der T-Zellen tritt hingegen eine verstärkte Koloniebildung sowie eine Größenzunahme auf. Diese Zunahme der Zellgröße ist auch bei Biberfeld 1971 und Thyberg et al. 1977 beschrieben. Somit kann durch diese gut zu beobachtende Veränderung des T-Lymphozyten die Wirkung eines Inhibitors auf die Morphologie bei der PHA-Stimulation am besten beurteilt werden. Wurde eine Konzentration von 10nM Dasatinib eingesetzt, lagen die Zellen bei einer 48-stündigen PHA-Restimulation in kleinen Zellhaufen vor, zum einen normal geformt, zum anderen sternförmig zusammengezogen und vereinzelt. Bei einer Konzentration von 50nM Dasatinib und einer 48-stündigen PHA-Restimulation waren nur vereinzelt Zellen zu sehen, die zum größten Teil geplatzt bzw. zusammengeschrumpft erschienen. Auch in anderen Arbeitsgruppen konnte gezeigt werden, dass durch Dasatinib die Koloniebildung von Zellen verringert wird (Johnson et al. 2005; Schade et al. 2008). Dies kann durch die inhibitorische Wirkung von Dasatinib auf die T-Zell-Signalwegproteine erklärt werden, wie zum Beispiel SLP76 und PLC $\gamma$ , die mit dem Arrangement des Zytoskelettes in Verbindung stehen (Nolz et al. 2006; W Zhang et al. 1999) und somit die Form der Zelle beeinflussen.

Midostaurin hatte nach Auswertung der vorliegenden Ergebnisse weder Einfluss auf die Morphologie der unstimulierten, noch auf PHA oder CD3/CD28 *T-Cell Expander* stimulierte T-Zellen. Das Fazit ist, dass Midostaurin im Gegensatz zu Dasatinib keine Wirkung auf die T-Zell-Morphologie hat. Dasatinib hingegen inhibiert konzentrationsabhängig die PHA abhängigen morphologischen Veränderungen.

Im Folgenden werden Gemeinsamkeiten und Unterschiede der T-Zell-Stimulation durch PHA und durch Dynabeads CD3/CD28 *T-Cell Expander* herausgearbeitet. Beide haben gemeinsam, dass sie einfach in der Handhabung sind und die Aktivierung und Proliferation von T-Zellen ermöglichen und in der Literatur vielfach zur Stimulation von T-Zellen verwendet werden (Nowell 1960; Kalamasz et al. 2004; Levine et al. 2002). Während eine Inkubation mit CD3/CD28 *T-Cell Expander* CD4<sup>+</sup> Zellen besser stimuliert als CD8<sup>+</sup> Zellen, was sich in einer verstärkten Proliferation und Zytokinfreisetzung durch CD4<sup>+</sup> zeigt, ist eine PHA-Stimulation der beiden T-Zell-Subpopulationen gleich effektiv (Laux et al. 2000; Rochford et al. 2004; eigene Daten nicht aufgeführt). Bei PHA handelt es sich um eine starke, relativ unspezifische Aktivierung über den TCR und andere glykosylierte Oberflächenmoleküle (Schmitt-Verhulst et al. 1987; Vine et al. 1988). Der Dynabeads CD3/CD28 *T-Cell Expander* liefert eine physiologische Aktivierung über den TCR und CD28, sodass das „Zwei-Signal-Modell“, beschrieben in

1.4, der T-Zell-Aktivierung erfüllt wird (Bretscher et al. 1970; Riha et al. 2010; Linsley et al. 1993). Durch die Ergebnisse der Versuche zum Einfluss der TKI auf die Oberflächenantigen-Expression wurde deutlich, dass eine PHA-Inkubation bei kürzeren Stimulationszeiten effektiver war und somit einen größeren relativen Anteil an  $CD3^+/CD29^+/CD69^+/CD71^+$  Zellen erzeugte als eine *CD3/CD28 T-Cell Expander*-Stimulation der T-Zellen. Eine *CD3/CD28 T-Cell Expander*-Stimulation wiederum war bei den längeren Inkubationszeiten (ab 36 Stunden) effizienter in der Heraufregulation der Expression der ausgewählten Oberflächenantigene. Am stärksten förderten die verwendeten Stimulanzen die CD69-Expression. An zweiter Stelle stand die CD71-Expression. Für beide Stimulationsmethoden galt: je länger die Inkubationszeit dauerte, desto effektiver war die Oberflächenantigen-Expression. Zusätzlich konnte in der Durchlicht-Mikroskopie der T-Zellen bestätigt werden, dass PHA nicht nur eine Blasten ähnliche Transformation der Zellen erzeugt (Biberfeld et al. 1971; Thyberg et al. 1977), sondern auch stark die Koloniebildung fördert (bestätigt durch Nowell 1960), wohingegen der *CD3/CD28 T-Cell Expander* keinen Einfluss auf die Morphologie nimmt. Diese unterschiedlichen Auswirkungen der verwendeten Stimulanzen lassen sich durch die physiologische T-Zell-Aktivierung durch den *CD3/CD28 T-Cell Expander* erklären.

Ist eine schnelle, sichere und effektive Stimulation von T-Zellen gewünscht, eignet sich PHA gut für T-Zellversuche. Wird ein physiologischer Weg bevorzugt, oder handelt es sich bei dem Experiment um spezifische T-Zell-Signalweguntersuchungen, ist der *CD3/CD28 T-Cell Expander* besser geeignet.

Bei Tumor-Patienten werden durch Chemotherapeutika neben kranken Zellen auch gesunde Immunzellen beeinflusst. Es stellt sich nun die Frage, ob die gesunden Abwehrzellen die schützende Immunabwehr trotz TKI-Gabe aufrechterhalten können. Hinweise auf den Aktivitätsgrad der T-Lymphozyten waren in der vorliegenden Arbeit der Phosphorylierungsstatus der Signalwegproteine, der zuvor schon in diesem Kapitel diskutiert wurde, und die Expression der T-Zell-Aktivierungsmarker. Weiterhin wurde in diesen Versuchsreihen die Durchführbarkeit der Restimulation nach Pre-Inkubation mit den TKIs Dasatinib und Midostaurin geprüft.

T-Lymphozyten sind ausschlaggebend an der Pathophysiologie von Autoimmunerkrankungen, Transplantatabstoßungen und dem GvH-Effekt beteiligt. Die Fähigkeit von Dasatinib, unabhängig von intakten oder onkogenen T-Lymphozyten, sehr TCR-spezifisch frühe Ereignisse des T-Zell-Signalweges zu inhibieren, eröffnet neue Einsatzmöglichkeiten dieses TKIs für Autoimmunerkrankungen, Transplantatabstoßungen und dem GvH-Effekt (hier vorliegende Ergebnisse, Schade et al. 2008, Weichsel et al. 2008). Durch aktuelle Forschungsergebnisse wird gezeigt, dass gesunde T-Zellen in Proliferation, Zytokinproduktion und der TCR-vermittelten-

Signaltransduktion von Dasatinib reversibel inhibiert werden und somit die Gabe dieses TKIs nach Stammzelltransplantationen eher fragwürdig ist, weil nicht nur im Körper verbliebene transformierte Zellen, sondern auch transplantierte Immunzellen inhibiert werden würden. Der GvL-Effekt wäre gleichermaßen abgeschwächt.

Im Gegensatz dazu, wurde durch die hier dargestellten Ergebnisse und durch die weitergeführten Experimente (Wolleschak et al. 2014) eruiert, dass die TCR-vermittelte Signaltransduktion, Proliferation und Funktion von gesunden T-Zellen unbeeinträchtigt von einer Midostaurin-Inkubation bleiben, sodass die Immunantwort gegenüber viralen oder onkogenen Antigenen ungehindert ablaufen kann. Ein Einsatz von Midostaurin bei der allogenen Stammzelltransplantation wäre somit möglich. Wäre zum Beispiel eine allogene Stammzelltransplantation bei AML-Patienten mit einer begleitenden spezifischen FLT3-Kinase-Inhibition kombinierbar, bliebe der GvL-Effekt unbeeinflusst, wohingegen die transformierten Zellen inhibiert werden würden. Um diese Hypothese verifizieren zu können, wären weiterführende Experimente mit Midostaurin an T-Lymphozyten von AML-Patienten erforderlich. Zusätzlich wären Versuche zum Zusammenspiel von gesunden T-Zellen und malignen Klonen unter Midostaurin-Inkubation aus einem autologen Donor (AML-Patient) aufschlussreich.

Im Hinblick auf das Verhalten von gesunden Spender-T-Zellen bei Lymphozyteninfusionen oder bei dem GvL-Effekt können durch die Verwendung gesunder T-Zellen Rückschlüsse gezogen werden. Diese aktuellen Untersuchungen sind ein Anfang in der Erforschung der Einsatzmöglichkeiten von Midostaurin. Auch *in vivo* konnten wir in Folgearbeiten belegen, dass Midostaurin, im Gegensatz zu Dasatinib, keinen Einfluss auf eine GvH-Reaktion nimmt, die mittels Transplantation unbehandelter T-Zellen in gesunden Mäusen provoziert wurde (Wolleschak et al. 2014).

## **6. Zusammenfassung**

Ein wichtiges Mitglied des komplexen menschlichen Immunsystems sind die T-Zellen. Sie haben unter anderem auch die Aufgabe onkogen mutierte Zellen zu eliminieren und tragen essentiell zur Immunabwehr bei.

In der vorliegenden Doktorarbeit wurde die Wirkung der Tyrosinkinase-Inhibitoren Midostaurin und Dasatinib auf die Aktivierung von T-Zellen (Expression der T-Zell-Oberflächenmarker CD29, CD69 und CD71 mittels Durchfluss-Zytometrie), sowie auf die intrazelluläre Signaltransduktion von primären, humanen T-Lymphozyten, mit Hilfe des Western Blots, untersucht. Weiterhin wurde der Einfluss der beiden Substanzen auf die T-Zellmorphologie mit der Durch-

licht-Mikroskopie analysiert und es wurde die Effizienz zweier Stimulationsmethoden für die T-Zell-Stimulation, PHA und Dynabeads CD3/CD28 *T-Cell Expander*, vergleichend betrachtet.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Dasatinib *in vitro* mit klinisch relevanten Konzentrationen von 10nM und 50nM immunmodulatorisch wirksam ist. Dieser TKI zeigte einen starken inhibitorischen Einfluss auf die Phosphorylierung der Signalwegproteine LCK, PLC $\gamma$ , MAPK, SLP76 und eine mäßige Wirkung auf die Phosphorylierung von ZAP70 und AKT. Unter der Dasatinib-Inkubation fand eine deutliche Inhibition des T-Zell-spezifischen Aktivierungsmarkers CD69 statt. Die Oberflächenexpression von CD71, dem Transferrinrezeptor der T-Zellen, wurde durch Dasatinib in geringem Maß, aber nicht in allen Restimulationszeiten durchgehend konstant, inhibiert. In den hier vorliegenden Experimenten konnte keine Wirkung dieses TKIs auf die intrazelluläre Proteinphosphorylierung von LAT und auf die Expression von CD29, einem  $\beta$ 1-Integrin auf der T-Zelloberfläche, belegt werden. Mittels Mikroskopie wurde sichtbar, dass Dasatinib die durch PHA verursachten morphologischen Veränderungen und die Agglutination der T-Zellen inhibiert.

Midostaurin wies in den gewählten Konzentrationen 5nM, 20nM und 50nM geringere immunmodulatorische Eigenschaften auf. Die Expression der Oberflächenmarker CD29, CD69 und CD71 konnte unter der Restimulation mit 0,5%igem PHA und CD3/CD28 *T-Cell Expander* nicht verhindert werden. Die Phosphorylierung der Signalwegproteine SLP76 und MAPK wurden vollständig inhibiert, die Phosphorylierungen von LCK, PLC $\gamma$ , ZAP70 abgeschwächt. Die Western Blots ließen den Schluss zu, dass Midostaurin auf das Phosphorylierungsniveau von LAT und AKT keinen Einfluss hat. Zudem konnten in der Mikroskopie keine morphologischen Veränderungen der T-Zellen unter der Midostaurin-Inkubation *in vitro* nachgewiesen werden. Desweiteren wurden Auswirkungen der T-Zell-Stimulation mit PHA und dem Dynabeads CD3/CD28 *T-Cell Expander* ermittelt. PHA ist für eine schnelle und quantitative Stimulation von T-Zellen geeignet. Sollen morphologische Veränderungen unter einer Stimulation ausgeschlossen werden und ist für Versuche ein physiologischer Ansatz wichtig, sollte der CD3/CD28 *T-Cell Expander* verwendet werden.

Weiterhin könnten die gewonnen Erkenntnisse in der Therapie der AML dazuführen, den Einsatz von Midostaurin nach einer Knochenmark-Transplantation zu erwägen, da in klinisch relevanten Dosen keine inhibitorische Wirkung auf primäre, humane T-Zellen nachgewiesen werden konnte. Diese Ergebnisse wurden veröffentlicht (Wolleschak et al. 2014).

## 7. Ausblick

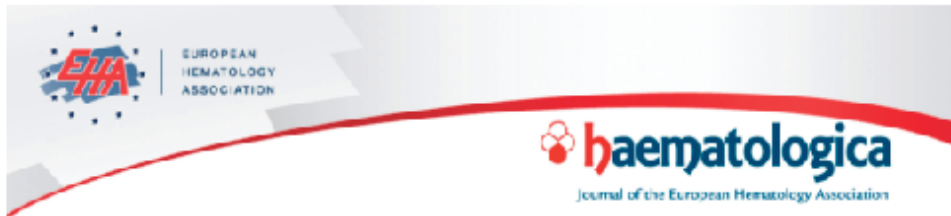
Tyrosinkinase-Inhibitoren wie Dasatinib und Midostaurin werden unter anderem zur Therapie von der Chronisch myeloischen Leukämie, der Akuten lymphatischen Leukämie und der Akuten myeloischen Leukämie eingesetzt. Midostaurin ist ein unspezifischer FLT3-Inhibitor (Caravatti et al. 1994; Fabbro et al. 1999; Meyer et al. 1989; Heidel et al. 2006), wohingegen Dasatinib spezifischer in die Funktionen der T-Zelle über src-Kinasen eingreift (Lombardo et al. 2004; O'Hare et al. 2005). Gerade die T-Lymphozyten sind entscheidend bei der GvL-Reaktion (**GvL-Graft-versus-leukemia**), einer im menschlichen Körper erwünschten T-Zell-spezifischen Immunantwort der Spender-Zellen nach einer allogenen Stammzelltransplantation zur Abwehr von onkogenen hämatologischen Zellen des Empfängers. Hier besteht die Gefahr, dass der Einsatz eines TKIs als überbrückende Behandlung nach allogener Stammzelltransplantation, bis zum Absetzen der immunsuppressiven Medikation, die positive Immunantwort der Spender-T-Zellen inhibiert und somit einen Rückfall verursacht.

Durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurde mittels Western Blots und Durchfluss-Zytometrie gezeigt, dass Midostaurin im Gegensatz zu Dasatinib deutlich die Phosphorylierung spezifischer T-Zell-Signalweg-Proteine sowie die Expression der T-Zell-Aktivierungsmarker CD69 und CD71 nicht inhibiert. Somit liefern die hier vorliegenden Daten erste Hinweise, dass Midostaurin in klinisch relevanten Dosen die T-Zell-Funktion und somit potentiell den GvL-Effekt nicht negativ beeinflusst.

Um gesicherte Aussagen über die Wirkung der analysierten TKIs treffen zu können, war es notwendig, die Funktionalität und Proliferation der T-Zellen zunächst *in vitro* und anschließend *in vivo* zu untersuchen. Die ergänzenden Experimente wurden von Frau Dr. Denise Wolleschak in der AG Heidel durchgeführt und wurden gemeinsam mit den Daten dieser Arbeit zur Veröffentlichung eingereicht. Die Daten zeigen, dass Dasatinib als Kontrollsubstanz in klinisch relevanten Konzentrationen auch in Funktionsassays, CFSE-Proliferationsversuchen und Mausmodellen stark die T-Zell-Aktivierung und –Funktion inhibiert, wohingegen Midostaurin keinen Einfluss darauf zu haben scheint und somit für einen Einsatz nach einer Stammzelltransplantation geeignet erscheint.

## 7.1 Paper “Clinically relevant doses of FLT3-kinase inhibitors Quizartinib and Midostaurin do not impair T-cell reactivity and function.” (Wolleschak et al. 2014).

Published Ahead of Print on March 14, 2014, as doi:10.3324/haematol.2014.104331.  
Copyright 2014 Ferrata Storti Foundation.



### Clinically relevant doses of FLT3-kinase inhibitors Quizartinib and Midostaurin do not impair T-cell reactivity and function

by Denise Wolleschak, Thomas S. Mack, Florian Perner, Stephanie Frey, Tina M. Schnoeder, Marie-Christine Wagner, Christine Höding, Marina C. Pils, Andreas Parkner, Stefanie Kliche, Burkhard Schraven, Katrin Hebel, Monika Brunner-Weinzierl, Satish Ranjan, Berend Isermann, Daniel B. Lipka, Thomas Fischer, and Florian H. Heidel

Haematologica 2014 [Epub ahead of print]

*Citation: Wolleschak D, Mack TS, Perner F, Frey S, Schnoeder TM, Wagner MC, Höding C, Pils MC, Parkner A, Kliche S, Schraven B, Hebel K, Brunner-Weinzierl M, Ranjan S, Isermann B, Lipka DB, Fischer T, and Heidel FH. Clinically relevant doses of FLT3-kinase inhibitors Quizartinib and Midostaurin do not impair T-cell reactivity and function. Haematologica. 2014; 99:xxx  
doi:10.3324/haematol.2014.104331*

#### *Publisher's Disclaimer.*

*E-publishing ahead of print is increasingly important for the rapid dissemination of science. Haematologica is, therefore, E-publishing PDF files of an early version of manuscripts that have completed a regular peer review and have been accepted for publication. E-publishing of this PDF file has been approved by the authors. After having E-published Ahead of Print, manuscripts will then undergo technical and English editing, typesetting, proof correction and be presented for the authors' final approval; the final version of the manuscript will then appear in print on a regular issue of the journal. All legal disclaimers that apply to the journal also pertain to this production process.*

## Clinically relevant doses of FLT3-kinase inhibitors Quizartinib and Midostaurin do not impair T-cell reactivity and function

The vast majority of AML patients harboring an FLT3-ITD mutation experience relapse within a short period of time after discontinuation of chemotherapy (1). Treatment options include experimental trials using FLT3-tyrosine kinase-inhibitors (TKI) or allogeneic stem cell transplantation (allo-SCT). Inhibitors that are currently investigated in advanced clinical trials with promising clinical responses include midostaurin (PKC412) and quizartinib (AC220). Resistance-mediating mutations emerging upon long-term exposure to these inhibitors have confirmed mutated FLT3-kinase as a valid therapeutic target (2, 3). Both compounds have proven the ability to salvage refractory FLT3-ITD-positive AML and thus allowed 'bridging' of patients towards allo-SCT. The role of allo-SCT in first complete remission for FLT3-ITD-mutated AML remains a topic of current debate. Patients undergoing allo-SCT do show a survival benefit in retrospective analyses, however, the majority of patients will eventually experience relapse (4). The combination allo-SCT and concomitant inhibition of mutated FLT3-kinase may facilitate development of leukemia-specific T-cell (GvL-) responses after discontinuation of immunosuppression with the malignant clone being held in check by the kinase-inhibitor. GvL activity has been documented in AML patients in general (5) and even ITD-specific T-cell responses have been described *in vitro* (6). Kinase inhibitors – in general – can impair T-cell function through inhibition of various signaling pathways. Inhibition of this protective GvL-effect after allo-SCT could eventually lead to reactivation of the malignant clone. Although inhibiting T-cell reactivity at higher concentrations (7), TKI like imatinib can be administered safely after allo-SCT (8, 9) without an increased risk of relapse. Other TKI such as nilotinib (10) or dasatinib (11) do interfere with T-cell reactivity even at low nanomolar concentrations. Based on these findings, we aimed to assess for the effects of clinically relevant doses of PKC412 and AC220 on T-cell signaling, proliferation and reactivity.

Most first-generation FLT3-TKIs such as PKC412 target various kinases and therefore act relatively unspecific while AC220 acts in a far more FLT3-specific manner (12). To investigate the effects of both clinically relevant FLT3-TKI on T-cell receptor (TCR) signaling we used primary human T-cells derived from healthy donors (HDTC) and applied a dose range of 5-50nM midostaurin and 10-50nM quizartinib. These concentrations have been described as trough levels during inhibitor therapy in early clinical trials (2, 12-14). Thus, all effects observed resemble the clinical situation in terms of dosing and pharmacokinetics. The SRC-kinase inhibitor dasatinib was included as a positive control (at doses beyond the clinically achievable levels).

In regard to T-cell receptor (TCR)-mediated signaling we investigated bona fide signaling molecules downstream of the TCR. Besides SRC-kinases like LCK also ZAP70, PLCG1 and the MAPK/ERK pathway have been described to play a pivotal role in T-cell activation. Treatment with clinically relevant doses of midostaurin (left panel) and quizartinib (right panel) (50nM) did not inhibit activation of any investigated TCR-signaling pathway. Comparable to DMSO control, overall phosphorylation was induced almost immediately after 0.5% PHA-stimulation (Figure 1a). Dasatinib treatment led to reduction in global tyrosine phosphorylation (top panels) using the 4G10 antibody. Likewise, activation of all downstream signaling pathways appeared to be inhibited, consistent with previously published reports (11).

Activation of primary T-cells is a critical step in immune responses against viral and tumor antigens. Several surface markers such as CD69 have been described as indicators of T-cell activation. HD-TCs were stimulated using either PHA0.5% or CD3/CD28-beads. Applying clinically relevant doses of midostaurin or quizartinib had no impact on CD69 surface expression. CD69-expression on gated CD8+ cytotoxic T-cells or (ungated) CD3+ cells was comparable to DMSO-control - even in the presence of 50nM midostaurin or quizartinib (Figure 1b, c). Dasatinib exposure significantly reduced CD69-expression on CD3 positive T-cells following TCR-stimulation. Reduction of the T-cell pool through decreased cell proliferation or induction of apoptosis could hamper immune responses against viral or tumor antigens.

Therefore, we assessed for T-cell proliferation by CFSE-labeling assays. Concentrations of up to 100nM of either FLT3-inhibitor did not reveal any negative impact on proliferative capacity of previously stimulated T-cells. Incubation with dasatinib almost abrogated proliferative activity (Figure 1d). Exposure of T-cells to either inhibitor did not lead to any significant induction of apoptosis (data not shown). Finally, we aimed to investigate the functional impact of FLT3-TKI on T-cell reactivity and function. To assess for T-cell reactivity directed against HLA-antigens, antigen-presenting cells (APC) derived from healthy donors were co-incubated with T-cells derived from unmatched, unrelated donors in the presence of either FLT3-inhibitor or DMSO. Thymidine incorporation was used as the readout for T-cell reactivity. Both FLT3-TKI did not affect T-cell reactivity when used at concentrations up to 50nM while dasatinib reduced T-cell reactivity to the maximum extent (Figure 2a). To confirm these findings we used an ELISPOT assay to assess for T-cell reactivity directed against viral peptides (CMVpp65) loaded on APC from healthy donors that were co-incubated with HD-TCs from the same individual. T-cell reactivity was preserved and comparable to DMSO control in the presence of 50nM midostaurin or quizartinib (Figure 2b, c). Dasatinib abrogated the T-cell response. Similar effects could be confirmed *in vivo* using an intestinal-GvHD model. Mice were transplanted with unmatched T-cells and treated with PKC412, dasatinib or vehicle control. Macroscopic analysis (soreness, Figure 2d) as well as histology of ileum and colon was performed to assess for GvHD development. Consistent with our previous findings, treatment with PKC412 or vehicle-control did not lead to any reduction of GvHD development (Figure 2e-g). Treatment with dasatinib significantly reduced the extent of GvHD.

Taken together our results provide first evidence that clinically relevant doses of PKC412 and AC220 leave human T-cell signaling, proliferation and function unaffected. Although our study is limited by the use of HD-TC that may act different than T-cells derived from AML-patients, our findings facilitate a pre-clinical assessment for the use of FLT3-TKI in the context of allo-SCT. Without affecting T-cell function, midostaurin and quizartinib could be concomitantly used until discontinuation of immunosuppressive therapy and thereby prevent relapse prior to appearance of a sufficient GvL-response. Of note, differential effects of FLT3-TKI on dendritic cell function that may even stimulate GvHD cannot be excluded by our experiments and need to be considered (15).

*Denise Wolleschak*<sup>1</sup>, *Thomas S. Mack*<sup>1</sup>, *Florian Perner*<sup>1</sup>, *Stephanie Frey*<sup>1</sup>, *Tina M. Schnöder*<sup>1</sup>, *Marie-Christine Wagner*<sup>1</sup>, *Christine Höding*<sup>1</sup>, *Marina C. Pils*<sup>2</sup>, *Andreas Parkner*<sup>3</sup>, *Stefanie Kliche*<sup>4</sup>, *Burkhardt Schraven*<sup>4,5</sup>, *Katrin Hebel*<sup>6</sup>, *Monika Brunner-Weinzierl*<sup>6</sup>, *Satish Ranjan*<sup>7</sup>, *Berend Isermann*<sup>7</sup>, *Daniel B. Lipka*<sup>1,8</sup>, *Thomas Fischer*<sup>1</sup> and *Florian H. Heidel*<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Hematology and Oncology, Center of Internal Medicine, Otto-von-Guericke University Medical Center, Magdeburg, Germany

<sup>2</sup> Mousepathology, Animal Experimental Unit, Helmholtz-Center for Infection Research, Braunschweig, Germany

<sup>3</sup> Department of Transfusion Medicine, Otto-von-Guericke University Medical Center, Magdeburg, Germany

<sup>4</sup> Institute of Molecular and Clinical Immunology, Otto-von-Guericke University Medical Center, Magdeburg, Germany

<sup>5</sup> Department of Immune Control, Helmholtz Center for Infection Research, Braunschweig, Germany

<sup>6</sup> Department of Experimental Pediatrics, Otto-von-Guericke University Medical Center, Magdeburg, Germany



7 Institute of Clinical Chemistry and Pathobiochemistry, Otto-von-Guericke University Medical Center, Magdeburg, Germany

8 German Cancer Research Center (DKFZ), Division of Epigenomics and Cancer Risk Factors, Heidelberg, Germany

Key words: Tyrosine kinase inhibitors, FLT3-ITD, T-cell activation, AC220, PKC412

### Correspondence

Florian H. Heidel, MD, Department of Hematology and Oncology, Center of Internal Medicine Otto-von-Guericke University Medical Center Leipzigerstr. 44 39120 Magdeburg/Germany. E-mail: [florian.heidel@med.ovgu.de](mailto:florian.heidel@med.ovgu.de)

Conflict of Interest: F.H.H. received research funding from Novartis Inc. All other authors have nothing to disclose.

### Funding

This work was supported by a grant from Novartis Inc. to F.H.H and partially by a DFG-grant (FI405/5-1) to T.F. and F.H and the Collaborative Research Cluster (CRC854) to T.M.S., S.K., B.S., M.B.W., B.I., T.F. and F.H.H. All human samples were collected and stored in the Hematology Tissue-Bank Magdeburg (HTM) supported by a grant from the Jose-Carreras Foundation (SP12/04) to F.H.H.

### References

1. Gale RE, Green C, Allen C, Mead AJ, Burnett AK, Hills RK, et al. The impact of FLT3 internal tandem duplication mutant level, number, size, and interaction with NPM1 mutations in a large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2008;111(5):2776-84.
2. Heidel F, Solem FK, Breitenbuecher F, Lipka DB, Kasper S, Thiede MH, et al. Clinical resistance to the kinase inhibitor PKC412 in acute myeloid leukemia by mutation of Asn-676 in the FLT3 tyrosine kinase domain. *Blood*. 2006;107(1):293-300.
3. Smith CC, Wang Q, Chin CS, Salerno S, Damon LE, Levis MJ, et al. Validation of ITD mutations in FLT3 as a therapeutic target in human acute myeloid leukaemia. *Nature*. 2012;485(7397):260-3.
4. Brunet S, Labopin M, Esteve J, Cornelissen J, Socie G, Iori AP, et al. Impact of FLT3 internal tandem duplication on the outcome of related and unrelated hematopoietic transplantation for adult acute myeloid leukemia in first remission: a retrospective analysis. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2012;30(7):735-41.
5. Van Driessche A, Gao L, Stauss HJ, Ponsaerts P, Van Bockstaele DR, Berneman ZN, et al. Antigen-specific cellular immunotherapy of leukemia. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, UK*. 2005;19(11):1863-71.
6. Graf C, Heidel F, Tenzer S, Radsak MP, Solem FK, Britten CM, et al. A neoepitope generated by an FLT3 internal tandem duplication (FLT3-ITD) is recognized by leukemia-reactive autologous CD8+ T cells. *Blood*. 2007;109(7):2985-8.
7. Seggewiss R, Lore K, Greiner E, Magnusson MK, Price DA, Douek DC, et al. Imatinib inhibits T-cell receptor-mediated T-cell proliferation and activation in a dose-dependent manner. *Blood*. 2005;105(6):2473-9.
8. Hess G, Bunjes D, Siegert W, Schwerdtfeger R, Ledderose G, Wassmann B, et al. Sustained complete molecular remissions after treatment with imatinib-mesylate in patients with failure after allogeneic stem cell transplantation for chronic myelogenous leukemia: results of a

prospective phase II open-label multicenter study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2005;23(30):7583-93.

9. Pfeifer H, Wassmann B, Bethge W, Dengler J, Bornhauser M, Stadler M, et al. Randomized comparison of prophylactic and minimal residual disease-triggered imatinib after allogeneic stem cell transplantation for BCRABL1- positive acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, UK*. 2013;27(6):1254-62.

10. Chen J, Schmitt A, Chen B, Rojewski M, Rubeler V, Fei F, et al. Nilotinib hampers the proliferation and function of CD8+ T lymphocytes through inhibition of T cell receptor signalling. *J Cell Mol Med*. 2008;12(5B):2107-18.

11. Fei F, Yu Y, Schmitt A, Rojewski MT, Chen B, Greiner J, et al. Dasatinib exerts an immunosuppressive effect on CD8+ T cells specific for viral and leukemia antigens. *Experimental hematology*. 2008;36(10):1297-308.

12. Zarrinkar PP, Gunawardane RN, Cramer MD, Gardner MF, Brigham D, Belli B, et al. AC220 is a uniquely potent and selective inhibitor of FLT3 for the treatment of acute myeloid leukemia (AML). *Blood*. 2009;114(14):2984-92.

13. Chao Q, Sprankle KG, Grotzfeld RM, Lai AG, Carter TA, Velasco AM, et al. Identification of N-(5-tertbutyl- isoxazol-3-yl)-N'-(4-[7-(2-morpholin-4-yl-ethoxy)imidazo[2,1-b][1,3]benzothiazol-2-yl]phenyl)urea dihydrochloride (AC220), a uniquely potent, selective, and efficacious FMS-like tyrosine kinase-3 (FLT3) inhibitor. *Journal of medicinal chemistry*. 2009;52(23):7808-16.

14. Weisberg E, Manley PW, Cowan-Jacob SW, Hochhaus A, Griffin JD. Second generation inhibitors of BCRABL for the treatment of imatinib-resistant chronic myeloid leukaemia. *Nature reviews Cancer*. 2007;7(5):345-56.

15. Wolf M, Schwinn S, Yoo YE, Rens ML, Braun M, Chopra M, et al. Src-kinase inhibitors sensitize human cells of myeloid origin to Toll-like-receptor-induced interleukin 12 synthesis. *Blood*. 2013;122(7):1203-13.

## Figure Legends

### Figure 1

**(a)** Western blot analysis of T-cell receptor signaling upon inhibitor treatment. Cells were treated with the respective TKI for 48 hours prior to short-term TCR stimulation. In detail, primary T-cells from healthy donors (HD-TC) were treated with indicated concentrations of the respective kinase inhibitors (TKI) for 48 hours and then stimulated with PHA (0.5%). Whole protein lysates were prepared immediately and after 3 and 10 minutes of PHA 0.5% stimulation. Midostaurin (PKC412, left panel) and quizartinib (AC220, right panel) did not reduce global tyrosine phosphorylation or activation of downstream signaling molecules (ZAP70, MAPK, LCK, PLCG1). Dasatinib treatment led to global reduction in global tyrosine phosphorylation and inhibition of downstream signaling pathways. Shown are 2 representative blots out of 6 healthy donors. **(b, c)** CD69 expression was determined by flow cytometry (n>5 per group). HD-TCs were stimulated with PHA 0.5% (b) or CD3/CD28-beads (for 48 hours at a bead-to-cell ratio of 1:1; Dynabeads® Human T-Activator; Life Technologies) (c) and treated with indicated concentrations of the respective TKI. In both analyses all concentrations of midostaurin and quizartinib applied left CD69 expression unaffected. Dasatinib significantly reduced CD69 expression. **(d)** T-Cell proliferation was assessed by CFSE labeling (n=4). HD-TCs stimulated for 24 h with 0.5% PHA / IL2 and co-incubated with kinase inhibitors dasatinib, midostaurin or quizartinib or DMSO. CFSE fluorescence was measured by flow cytometry on day 5 post stimulation. 10nM dasatinib abrogated the proliferation activity (right panel). The

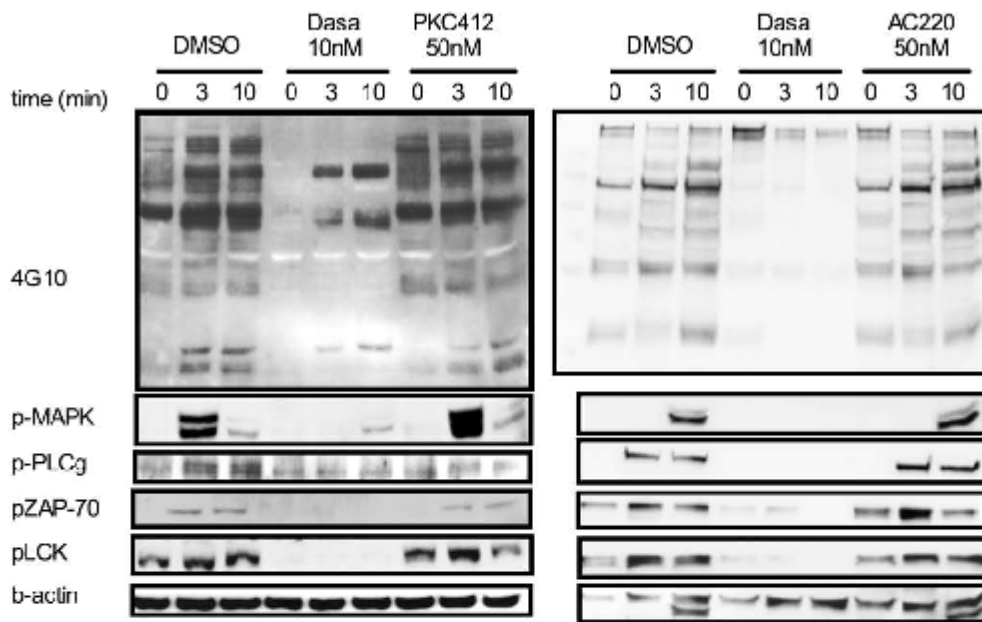
FLT3-inhibitors midostaurin and quizartinib did not impair T-cell proliferation at concentrations applied.

## Figure 2

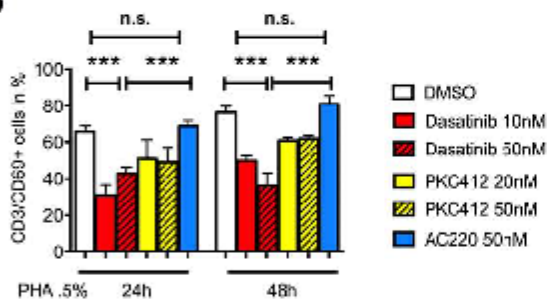
**(a)** Allogeneic (unmatched) T-cell reactivity was measured by <sup>3</sup>H-thymidine incorporation. HD-TCs were cocubated with antigen presenting cells (APC; T-cell depleted PBMC) from an unrelated healthy donor in the absence or presence of the respective TKI. 50nM of midostaurin and quizartinib did not have any negative impact on T-cell reactivity compared to DMSO control. Dasatinib impaired T-cell reactivity to less than 5% of control. **(b, c)** ELISPOT assay to assess for HD-TC-responses directed against viral antigens (n=10). Lytic T-cell activity was determined based on the frequency of IFN- $\gamma$  secreting cells. Autologous APC loaded with a viral peptide pool (CMVpp65; PepMix™ HCMVA(pp65), JPT Inc., Berlin, Germany) were incubated with T-cells (of the same individual) in the absence or presence of the respective TKI (as indicated). Midostaurin (50nM) and quizartinib (50nM) did not impair lytic activity. 10nM dasatinib significantly inhibited the virus-specific T-cell response. APC loaded with control peptides (CEF) or without peptides served as positive and negative control. These results could be recapitulated using human influenza virus derived peptides as an antigen. **(d-g)** Allogeneic (un-matched) GvHD (Graft-versus-Host-Disease) assay *in vivo*:  $0.5 \times 10^6$  CD3+ T-cells derived from BL/6 mice were transplanted along with  $2 \times 10^6$  BALB/c WBMC into lethally irradiated (13Gy) BALB/c recipient mice. Animals developed severe GvHD of the gut within 3-4 weeks after transplantation. Midostaurin treatment was performed after engraftment (days 14-19; 100mg/kg body weight by gavage, every 24h). Ileum and colon fixed in formalin and embedded in paraffin were analyzed for apoptosis of crypt cells on day 25. Midostaurin treatment (n=3) did not affect severity of GvHD in the mouse gut. Both, severity of GvH-reaction and induction of apoptosis in the ileum or colon were comparable to vehicle treated animals (n=2). Dasatinib (2.5mg/kg) treated animals (n=3) revealed decreased induction of apoptosis and reduced severity of GvHD in both, ileum and colon.

**Figure 1**

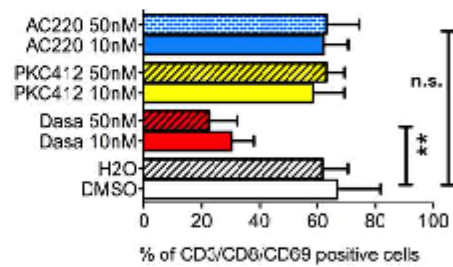
**a**



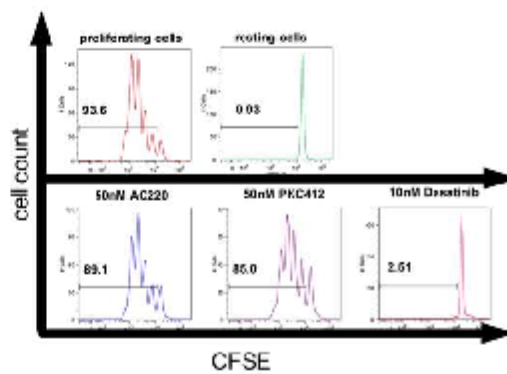
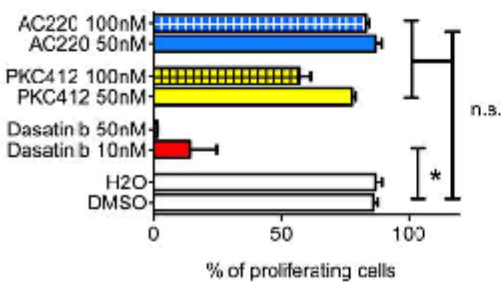
**b**



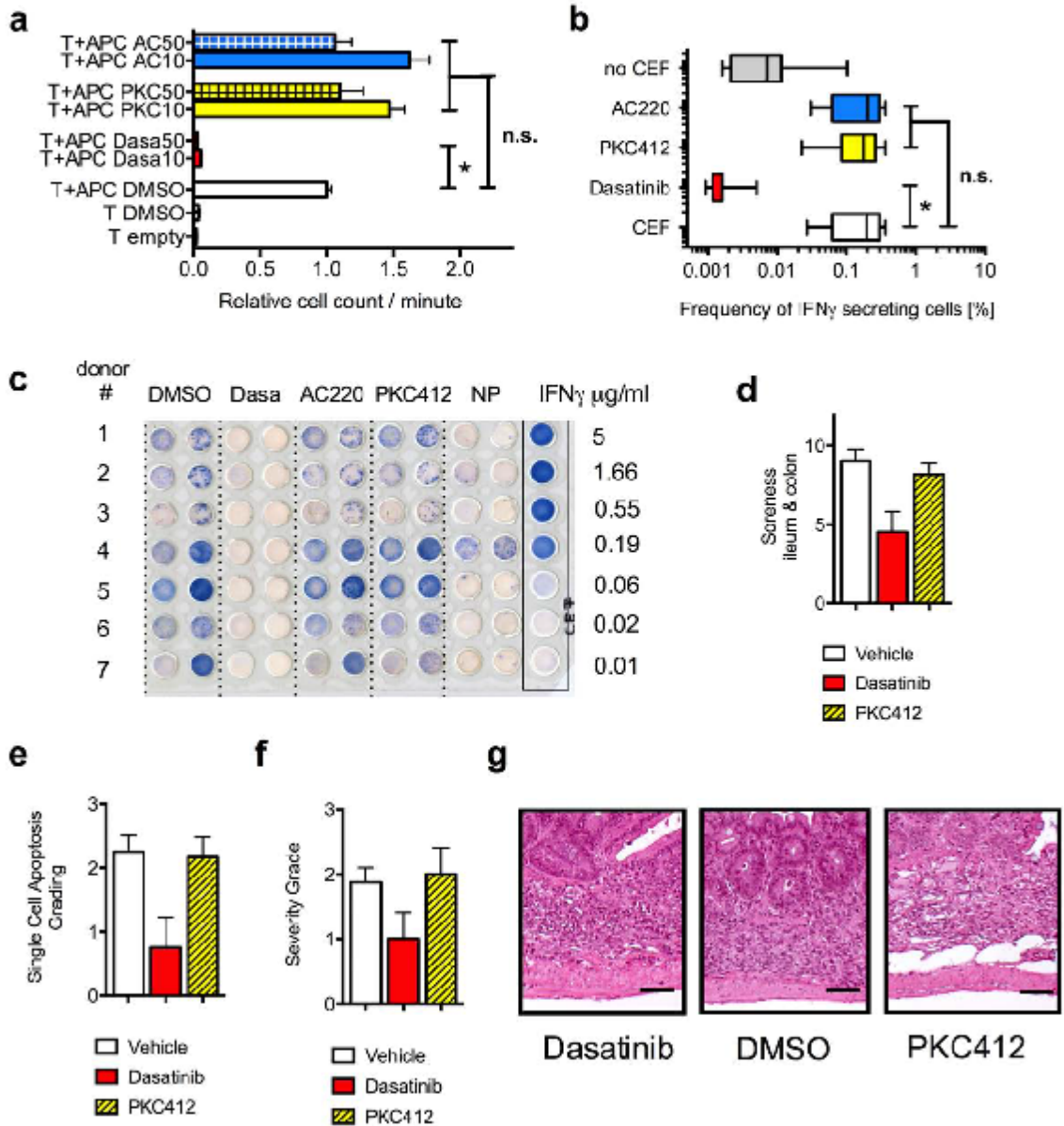
**c**



**d**



**Figure 2**



## 8. Literaturverzeichnis

1. Abram, Clare L, and Clifford A Lowell. 2009. "The ins and outs of leukocyte integrin signaling." *Annual review of immunology* 27: 339-62.
2. Acuto, Oreste, and Frédérique Michel. 2003. "CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling." *Nature reviews. Immunology* 3(12): 939-51.
3. Ahmad, Rehan et al. 2010. "Combining the FLT3 inhibitor PKC412 and the triterpenoid CDDO-Me synergistically induces apoptosis in acute myeloid leukemia with the internal tandem duplication mutation." *Molecular cancer research : MCR* 8(7): 986-93.
4. Allison, JP, BW McIntyre, and D Bloch. 1982. "Tumor-specific antigen of murine T-lymphoma defined with monoclonal antibody." *J. Immunol.* 129(5): 2293-2300.
5. Andrejaskas-Buchdunger, Elisabeth, and Urs Regenass. 1992. "Differential Inhibition of the Epidermal Growth Factor-, Platelet-derived Growth Factor-, and Protein Kinase C-mediated Signal Transduction Pathways by the Staurosporine Derivative CGP 41251." *Cancer Res.* 52(19): 5353-5358.
6. Arnaout, M A, B Mahalingam, and J-P Xiong. 2005. "Integrin structure, allostery, and bidirectional signaling." *Annual review of cell and developmental biology* 21: 381-410.
7. B Autran, F Triebel. 1989. "T cell receptor gamma/delta+ lymphocyte subsets during HIV infection." *Clinical and Experimental Immunology* 75(2): 206.
8. Batista, Alicia et al. 2004. "Recruitment of Transferrin Receptor to Immunological Synapse in Response to TCR Engagement." *J. Immunol.* 172(11): 6709-6714.
9. Beals, C R et al. 1997. "Nuclear export of NF-ATc enhanced by glycogen synthase kinase-3." *Science (New York, N.Y.)* 275(5308): 1930-4.
10. Begemann, M et al. 1996. "Inhibition of the growth of glioblastomas by CGP 41251, an inhibitor of protein kinase C, and by a phorbol ester tumor promoter." *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2(6): 1017-30.
11. Bere, Alfred et al. 2010. "Comparison of polyclonal expansion methods to improve the recovery of cervical cytobrush-derived T cells from the female genital tract of HIV-infected women." *Journal of immunological methods* 354(1-2): 68-79.
12. Bergeron, Anne et al. 2007. "Lung abnormalities after dasatinib treatment for chronic myeloid leukemia: a case series." *American journal of respiratory and critical care medicine* 176(8): 814-8.

13. Bernstein, Wendy B et al. 2004. "Immune reconstitution following autologous transfers of CD3/CD28 stimulated CD4(+) T cells to HIV-infected persons." *Clinical immunology (Orlando, Fla.)* 111(3): 262-74.
14. Biberfeld, P. 1971. "Morphogenesis in blood lymphocytes stimulated with phytohaemagglutinin (PHA). A light and electron microscopic study." *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica. Supplement 223: Suppl 223:1-70.*
15. Brekelmans, P et al. 1994. "Inhibition of proliferation and differentiation during early T cell development by anti-transferrin receptor antibody." *European journal of immunology* 24(11): 2896-902.
16. Brenner, Michael B. et al. 1986. "Identification of a putative second T-cell receptor." *Nature* 322(6075): 145-149.
17. Bretscher, P, and M Cohn. 1970. "A theory of self-nonsel discrimination." *Science (New York, N.Y.)* 169(3950): 1042-9.
18. Budworth, J et al. 1996. "Comparison of staurosporine and four analogues: their effects on growth, rhodamine 123 retention and binding to P-glycoprotein in multidrug-resistant MCF-7/Adr cells." *British journal of cancer* 73(9): 1063-8.
19. Buettner, Ralf et al. 2008. "Inhibition of Src family kinases with dasatinib blocks migration and invasion of human melanoma cells." *Molecular cancer research : MCR* 6(11): 1766-74.
20. Callens, C et al. 2008. "Recent advances in adult T-cell leukemia therapy: focus on a new anti-transferrin receptor monoclonal antibody." *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* 22(1): 42-8.
21. Caravatti, Giorgio et al. 1994. "Inhibitory activity and selectivity of staurosporine derivatives towards protein kinase C." *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 4(3): 399-404.
22. Castellanos Mdel C, López-Giral S, López-Cabrera M, de Landázuri MO. 2002. "Multiple cis-acting elements regulate the expr... [Eur J Immunol. 2002] - PubMed - NCBI." *Eur J Immunol.:* 3108-17.
23. Cebrián M, Yagüe E, Rincón M, López-Botet M, de Landázuri MO, Sánchez-Madrid F. 1988. "Triggering of T cell proliferation through AIM, an activation inducer molecule expressed on activated human lymphocytes." *The Journal of Experimental Medicine* 168(5): 1621.

24. Ceuppens, J L et al. 1988. "Human T cell activation with phytohemagglutinin. The function of IL-6 as an accessory signal." *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 141(11): 3868-74.
25. Chan, A C et al. 1992. "ZAP-70: a 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR zeta chain." *Cell* 71(4): 649-62.
26. Chan, a C et al. 1995. "Activation of ZAP-70 kinase activity by phosphorylation of tyrosine 493 is required for lymphocyte antigen receptor function." *The EMBO journal* 14(11): 2499-508.
27. Ciccone, E. 1988. "Antigen recognition by human T cell receptor gamma-positive lymphocytes. Specific lysis of allogeneic cells after activation in mixed lymphocyte culture." *Journal of Experimental Medicine* 167(4): 1517-1522.
28. Cobb, M H. 1999. "MAP kinase pathways." *Progress in biophysics and molecular biology* 71(3-4): 479-500.
29. Cortes, Jorge et al. 2007. "Dasatinib induces complete hematologic and cytogenetic responses in patients with imatinib-resistant or -intolerant chronic myeloid leukemia in blast crisis." *Blood* 109(8): 3207-13.
30. Das, Jagabandhu et al. 2006. "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 (dasatin." *Journal of medicinal chemistry* 49(23): 6819-32.
31. Davis, M M. 1990. "T cell receptor gene diversity and selection." *Annual review of biochemistry* 59: 475-96.
32. D'Ambrosio, D et al. 1994. "Involvement of p21ras activation in T cell CD69 expression." *European journal of immunology* 24(3): 616-20.
33. Fabbro, D et al. 2000. "PKC412--a protein kinase inhibitor with a broad therapeutic potential." *Anti-cancer drug design* 15(1): 17-28.
34. Fabbro, Dorian et al. 1999. "Inhibitors of Protein KinasesCGP 41251, a Protein Kinase Inhibitor with Potential as an Anticancer Agent." *Pharmacology & Therapeutics* 82(2-3): 293-301.
35. Fassler, R, and M Meyer. 1995. "Consequences of lack of beta 1 integrin gene expression in mice." *Genes & Development* 9(15): 1896-1908.
36. Fei, Fei et al. 2008. "Dasatinib exerts an immunosuppressive effect on CD8+ T cells specific for viral and leukemia antigens." *Experimental hematology* 36(10): 1297-308.



37. Fei, Fei et al.. 2009. "Dasatinib inhibits the proliferation and function of CD4+CD25+ regulatory T cells." *British journal of haematology* 144(2): 195-205.
38. Filby, Andrew et al. 2010. "Commitment to Effector Function 1." *The Journal of Immunology*.
39. Fischer, T. et al. 2010. "Phase IIB trial of oral Midostaurin (PKC412), the FMS-like tyrosine kinase 3 receptor (FLT3) and multitargeted kinase inhibitor, in patients with acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome with either wild-type or mutated FLT3." *Journal of clinical oncology*. 28(2010): 4339-45
40. Gallo, R. 2005. "The discovery of the first human retrovirus: HTLV-1 and HTLV-2." *Retrovirology*.
41. Ganeshaguru, K, and RG Wickremasinghe. 2002. "Actions of the selective protein kinase C inhibitor PKC412 on B-chronic lymphocytic leukemia cells in vitro." *Haematologica* 87(february): 167-176.
42. Garlie, N K et al. 1999. "T cells coactivated with immobilized anti-CD3 and anti-CD28 as potential immunotherapy for cancer." *Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md. : 1997)* 22(4): 336-45.
43. Gaspar, H. B. et al. 2001. " Severe combined immunodeficiency--molecular pathogenesis and diagnosis." *Archives of disease in childhood*. 84: 169-73.
44. Gennery, A. 2002. "Antibody deficiency and autoimmunity in 22q11.2 deletion syndrome." *Archives of Disease in Childhood*. 86(6): 422-425.
45. Gescher, A. 2000. "Staurosporine analogues - pharmacological toys or useful antitumour agents?" *Critical reviews in oncology/hematology* 34(2): 127-35.
46. Guilhot, Francois et al. 2007. "Dasatinib induces significant hematologic and cytogenetic responses in patients with imatinib-resistant or -intolerant chronic myeloid leukemia in accelerated phase." *Blood* 109(10): 4143-50.
47. H., Gery I. Waksman. 1972. "POTENTIATION OF THE T-LYMPHOCYTE RESPONSE TO MITOGENS." *Public Health* 136: 143-155.
48. Hamelryck, T W et al. 1996. "The crystallographic structure of phytohemagglutinin-L." *The Journal of biological chemistry* 271(34): 20479-85.
49. Hammarström, M L et al. 1982. "Transferrin receptors on mitogen-stimulated human thymus-derived lymphocytes." *Scandinavian journal of immunology* 16(4): 355-60.
50. Hara, T et al. 1986. "Human T cell activation. III. Rapid induction of a phosphorylated 28 kD/32 kD disulfide-linked early activation antigen (EA 1) by 12-o-tetradecanoyl

- phorbol-13-acetate, mitogens, and antigens." *The Journal of experimental medicine* 164(6): 1988-2005.
51. Hara, T, LK Jung, and SM Fu. 1988. "Expression of a 33-kDa antigen Tm 1 on lymphocyte surface after modulation of cell surface antigens by IgM monoclonal antibody." *J. Immunol.* 140(4): 1028-1033.
  52. Heidel, Florian et al. 2006. "Clinical resistance to the kinase inhibitor PKC412 in acute myeloid leukemia by mutation of Asn-676 in the FLT3 tyrosine kinase domain." *Blood* 107(1): 293-300.
  53. Hemström, Therese H et al. 2005. "PKC 412 sensitizes U1810 non-small cell lung cancer cells to DNA damage." *Experimental cell research* 305(1): 200-13.
  54. Hess, Georg et al. 2005. "Sustained Complete Molecular Remissions After Treatment With Imatinib-Mesylate in Patients With Failure After Allogeneic Stem Cell Transplantation for Chronic Myelogenous Leukemia: Results of a Prospective Phase II Open-Label Multicenter Study" *Journal of Clinical Oncology* 7583-93.
  55. Hochhaus, Andreas et al. 2007. "Dasatinib induces notable hematologic and cytogenetic responses in chronic-phase chronic myeloid leukemia after failure of imatinib therapy." *Blood* 109(6): 2303-9.
  56. Horejsí, Václav, Weiguo Zhang, and Burkhardt Schraven. 2004. "Transmembrane adaptor proteins: organizers of immunoreceptor signalling." *Nature reviews. Immunology* 4(8): 603-16. h
  57. Horn, Jessica et al. 2009. "Src homology 2-domain containing leukocyte-specific phosphoprotein of 76 kDa is mandatory for TCR-mediated inside-out signaling, but dispensable for CXCR4-mediated LFA-1 activation, adhesion, and migration of T cells." *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 183(9): 5756-67.
  58. Horwitz, A et al. 1986. "Interaction of plasma membrane fibronectin receptor with talin--a transmembrane linkage." *Nature* 320(6062): 531-3.
  59. Hughes PE, Diaz-Gonzalez F, Leong L, Wu C, McDonald JA, Shattil SJ, Ginsberg MH. 1996. "Breaking the Integrin Hinge." *Journal of Biological Chemistry* 271(12): 6571-6574.
  60. Humphries, Jonathan D, Adam Byron, and Martin J Humphries. 2006. "Integrin ligands at a glance." *Journal of cell science* 119(Pt 19): 3901-3.
  61. Hynes, Richard O. 1992. "Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion." *Cell* 69(1): 11-25.

62. Ikegami, Y, S Yano, and K Nakao. 1996a. "Antitumor effect of CGP41251, a new selective protein kinase C inhibitor, on human non-small cell lung cancer cells." *Japanese journal of pharmacology* 70(1): 65-72.
63. Ikegami, Y, S Yano, and K Nakao. 1996b. "Effects of the new selective protein kinase C inhibitor 4'-N-benzoyl staurosporine on cell cycle distribution and growth inhibition in human small cell lung cancer cells." *Arzneimittel-Forschung* 46(2): 201-4.
64. Johnson, Faye M et al. 2005. "Dasatinib (BMS-354825) tyrosine kinase inhibitor suppresses invasion and induces cell cycle arrest and apoptosis of head and neck squamous cell carcinoma and non-small cell lung cancer cells." *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 11(19 Pt 1): 6924-32.
65. June, Carl H et al. 1990. "of receptor-mediated." *Immunology* 87(October): 7722-7726.
66. Kabelitz D, Bender A, Prospero T, Wesselborg S, Janssen O, Pechhold K. 1991. "The primary response of human gamma/delta + T cells to Mycobacterium tuberculosis is restricted to V gamma 9-bearing cells." *The Journal of Experimental Medicine* 173(6): 1331.
67. Kalamasz, Dale et al. 2004. "Optimization of human T-cell expansion ex vivo using magnetic beads conjugated with anti-CD3 and Anti-CD28 antibodies." *Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md. : 1997)* 27(5): 405-18.
68. Kim, Tae Kon et al. 2010. "Co-engagement of alpha(4)beta(1) integrin (VLA-4) and CD4 or CD8 is necessary to induce maximal Erk1/2 phosphorylation and cytokine production in human T cells." *Human immunology* 71(1): 23-8.
69. Kinashi, Tatsuo. 2005. "Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes." *Nature reviews. Immunology* 5(7): 546-59.
70. Koretzky, Gary A, Farhad Abtahian, and Michael A Silverman. 2006. "SLP76 and SLP65: complex regulation of signalling in lymphocytes and beyond." *Nature reviews. Immunology* 6(1): 67-78.
71. Kuby, Janis et al. "Immunology", 5. Auflage. W. H. Freeman and Company, New York 2003
72. Kudoh, S et al. 1994. "T lymphocytes infiltrating renal cell carcinoma have a reduced expression of transferrin receptor." *International journal of cancer. Journal international du cancer* 58(3): 369-75.
73. L K Jung, B F Haynes. 1990. "Expression of early activation antigen (CD69) during human thymic development." *Clinical and Experimental Immunology* 81(3): 466.

74. Laux, I et al. 2000. "Response differences between human CD4(+) and CD8(+) T-cells during CD28 costimulation: implications for immune cell-based therapies and studies related to the expansion of double-positive T-cells during aging." *Clinical immunology (Orlando, Fla.)* 96(3): 187-97.
75. Levine, B L et al. 1997. "Effects of CD28 costimulation on long-term proliferation of CD4+ T cells in the absence of exogenous feeder cells." *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 159(12): 5921-30.
76. Li, Xun, and Frank Traganos. 1994. "Simultaneous analysis of DNA replication and apoptosis during treatment of HL-60 cells with camptothecin and hyperthermia and mitogen stimulation of human." *Cancer research*: 4289-4293.
77. Li, Yixin, and Roger J Kurlander. 2010. "Comparison of anti-CD3 and anti-CD28-coated beads with soluble anti-CD3 for expanding human T cells: differing impact on CD8 T cell phenotype and responsiveness to restimulation." *Journal of translational medicine* 8(1): 104.
78. Linsley, P S, and J A Ledbetter. 1993. "The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen." *Annual review of immunology* 11: 191-212.
79. Liu, S K et al. 1999. "The hematopoietic-specific adaptor protein gads functions in T-cell signaling via interactions with the SLP-76 and LAT adaptors." *Current biology : CB* 9(2): 67-75.
80. Llera, A S et al. 2001. "Crystal structure of the C-type lectin-like domain from the human hematopoietic cell receptor CD69." *The Journal of biological chemistry* 276(10): 7312-9.
81. Lobb, R R, and M E Hemler. 1994. "The pathophysiologic role of alpha 4 integrins in vivo." *Journal of Clinical Investigation* 94(5): 1722-1728.
82. Lombardo, Louis J et al. 2004. "Discovery of N-(2-chloro-6-methyl-phenyl)-2-(6-(4-(2-hydroxyethyl)-piperazin-1-yl)-2-methylpyrimidin-4-ylamino)thiazole-5-carboxamide (BMS-354825), a dual Src/Abl kinase inhibitor with potent antitumor activity in preclinical assays." *Journal of medicinal chemistry* 47(27): 6658-61.
83. Lum, J B et al. 1986. "Transferrin synthesis by inducer T lymphocytes." *The Journal of clinical investigation* 77(3): 841-9.
84. López-Cabrera M, Muñoz E, Blázquez MV, Ursa MA, Santis AG, Sánchez-Madrid F. 1995. "Transcriptional Regulation of the Gene Encoding the Human C-type Lectin Leukocyte Receptor AIM/CD69 and Functional Characterization of Its Tumor Necrosis

- Factor-alpha-responsive Elements.” *Journal of Biological Chemistry* 270(37): 21545-21551.
85. Macedo, M Fatima et al. 2004. “Transferrin is required for early T-cell differentiation.” *Immunology* 112(4): 543-9.
  86. Melowic, Heather R et al. 2007. “Mechanism of diacylglycerol-induced membrane targeting and activation of protein kinase Ctheta.” *The Journal of biological chemistry* 282(29): 21467-76.
  87. Meuer SC, Fitzgerald KA, Hussey RE, Hodgdon JC, Schlossman SF, Reinherz EL. 1983. “Clonotypic structures involved in antigen-specific human T cell function. Relationship to the T3 molecular complex.” *The Journal of Experimental Medicine* 157(2): 705.
  88. Meyer, T et al. 1989. “A derivative of staurosporine (CGP 41 251) shows selectivity for protein kinase C inhibition and in vitro anti-proliferative as well as in vivo anti-tumor activity.” *International journal of cancer. Journal international du cancer* 43(5): 851-6.
  89. Monnerat, C. 2004. “Phase I study of PKC412 (N-benzoyl-staurosporine), a novel oral protein kinase C inhibitor, combined with gemcitabine and cisplatin in patients with non-small-cell lung cancer.” *Annals of Oncology* 15(2): 316-323.
  90. Montero, Juan Carlos et al. 2011. “Inhibition of SRC family kinases and receptor tyrosine kinases by dasatinib: possible combinations in solid tumors.” *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 17(17): 5546-52.
  91. Motomu Shimaoka, and Junichi Takagi, and Timothy A. Springer. 2003. “CONFORMATIONAL REGULATION OF INTEGRIN STRUCTURE AND FUNCTION.” *Annu Rev .*
  92. Murphy, Kenneth M et al. "Janeway Immunologie", 7. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, 2009
  93. Mustelin, Tomas, and Kjetil Taskén. 2003. “Positive and negative regulation of T-cell activation through kinases and phosphatases.” *The Biochemical journal* 371(Pt 1): 15-27.
  94. Nakanishi, Nobuki et al. 1987. “ $\gamma$  protein is expressed on murine fetal thymocytes as a disulphide-linked heterodimer.” *Nature* 325(6106): 720-723.
  95. Neckers, L M, and J Cossman. 1983. “Transferrin receptor induction in mitogen-stimulated human T lymphocytes is required for DNA synthesis and cell division and is

- regulated by interleukin 2.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80(11): 3494-8.
96. Ned, Renee M, Wojciech Swat, and Nancy C Andrews. 2003. “Transferrin receptor 1 is differentially required in lymphocyte development.” *Blood* 102(10): 3711-8.
  97. Nolz, JC et al. 2006. “The WAVE2 complex regulates actin cytoskeletal reorganization and CRAC-mediated calcium entry during T cell activation.” *Current biology* 16(1): 24-34.
  98. Nowell, Peter C. 1960. “Phytohemagglutinin : An Initiator of Mitosis in Cultures of Normal Human Leukocytes Phytohemagglutinin : An Initiator of Mitosis in Cultures of Normal Human Leukocytes \*.” *Cancer Research*: 462-466.
  99. Okkenhaug, K, and R Rottapel. 1998. “Grb2 forms an inducible protein complex with CD28 through a Src homology 3 domain-proline interaction.” *The Journal of biological chemistry* 273(33): 21194-202.
  100. Onlamoon, Nattawat et al. 2006. “Optimization of in vitro expansion of macaque CD4 T cells using anti-CD3 and co-stimulation for autotransfusion therapy.” *Journal of medical primatology* 35(4-5): 178-93.
  101. O’Donovan, M R, S Johns, and P Wilcox. 1995. “The effect of PHA stimulation on lymphocyte sub-populations in whole-blood cultures.” *Mutagenesis* 10(4): 371-4.
  102. O’Hare, Thomas et al. 2005. “In vitro activity of Bcr-Abl inhibitors AMN107 and BMS-354825 against clinically relevant imatinib-resistant Abl kinase domain mutants.” *Cancer research* 65(11): 4500-5.
  103. Palacios, Emil H, and Arthur Weiss. 2004. “Function of the Src-family kinases, Lck and Fyn, in T-cell development and activation.” *Oncogene* 23(48): 7990-8000.
  104. Perez-Villar, J J, and S B Kanner. 1999. “Regulated association between the tyrosine kinase Emt/Itk/Tsk and phospholipase-C gamma 1 in human T lymphocytes.” *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 163(12): 6435-41.
  105. Pezzutto, Antonio et al. "Taschenatlas der Immunologie" 2. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2007.
  106. Pisegna, Simona et al. 2002. “Src-Dependent Syk Activation Controls CD69-Mediated Signaling and Function on Human NK Cells.” *J. Immunol.* 169(1): 68-74.
  107. Porter, David L et al. 2006. “A phase 1 trial of donor lymphocyte infusions expanded and activated ex vivo via CD3/CD28 costimulation.” *Blood* 107(4): 1325-31.

108. Potter, M R, and M Moore. 1975. "PHA STIMULATION OF SEPARATED HUMAN LYMPHOCYTE POPULATIONS PHA stimulation of separated lymphocytes." *Blood*: 456-467.
109. Propper, D J et al. 2001. "Phase I and pharmacokinetic study of PKC412, an inhibitor of protein kinase C." *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 19(5): 1485-92.
110. Reth, M. 1989. "Antigen receptor tail clue." *Nature* 338(6214): 383-4.
111. Riha, Pavel, and Christopher E Rudd. 2010. "CD28 co-signaling in the adaptive immune response." *Self/nonself* 1(3): 231-240.
112. SANTAANGELO, D. 1998. "A Molecular Map of T Cell Development." *Immunity* 9(2): 179-186.
113. Sakaguchi, Shimon et al. 2001. "Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance." *Immunological Reviews* 182(1): 18-32.
114. Salmeron, A et al. 1995. "Transferrin receptor induces tyrosine phosphorylation in T cells and is physically associated with the TCR zeta-chain." *J. Immunol.* 154(4): 1675-1683.
115. Samelson, L. 1985. "Identification of the components of the murine T cell antigen receptor complex." *Cell* 43(1): 223-231. [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(85\)90027-3](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(85)90027-3) (Accessed May 6, 2012).
116. Samelson, L E et al. 1986. "Antigen activation of murine T cells induces tyrosine phosphorylation of a polypeptide associated with the T cell antigen receptor." *Cell* 46(7): 1083-90.
117. Samelson, L E et al.. 1990. "Association of the fyn protein-tyrosine kinase with the T-cell antigen receptor." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87(11): 4358-62.
118. Sancho, David et al. 2003. "CD69 downregulates autoimmune reactivity through active transforming growth factor-beta production in collagen-induced arthritis." *Journal of Clinical Investigation* 112(6): 872-882.
119. Sato, T et al. 1995. "Role of the VLA-4 molecule in T cell costimulation. Identification of the tyrosine phosphorylation pattern induced by the ligation of VLA-4." *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 155(6): 2938-47.
120. Schade, Andrew E et al. 2008. "Dasatinib, a small-molecule protein tyrosine kinase inhibitor, inhibits T-cell activation and proliferation." *Blood* 111(3): 1366-77.

121. Schmitt-Verhulst, A M et al. 1987. "Pleiotropic loss of activation pathways in a T-cell receptor alpha-chain deletion variant of a cytolytic T-cell clone." *Nature* 325(6105): 628-31.
122. Si, Ming-Sing, Bruce A Reitz, and Dominic C Borie. 2005. "Effects of the kinase inhibitor CGP41251 (PKC 412) on lymphocyte activation and TNF-alpha production." *International immunopharmacology* 5(7-8): 1141-9.
123. Sommers, Connie L, Lawrence E Samelson, and Paul E Love. 2004. "LAT: a T lymphocyte adapter protein that couples the antigen receptor to downstream signaling pathways." *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 26(1): 61-7.
124. Stone, J C. 2006. "Regulation of Ras in lymphocytes: get a GRP." *Biochemical Society transactions* 34(Pt 5): 858-61.
125. Stone, Richard M et al. 2005. "Patients with acute myeloid leukemia and an activating mutation in FLT3 respond to a small-molecule FLT3 tyrosine kinase inhibitor, PKC412." *Blood* 105(1): 54-60.
126. Talpaz, M, NP Shah, and H Kantarjian. 2006. "Dasatinib in Imatinib-Resistant Philadelphia Chromosome-Positive Leukemias." *England Journal of*: 2531-2541. h
127. Testi R, D'Ambrosio D, De Maria R, Santoni A. 1994. "The CD69 receptor: a multi-purpose cell-surface... [Immunol Today. 1994] - PubMed - NCBI." *Immunol Today*: 479-83.
128. Testi, R, JH Phillips, and LL Lanier. 1988. "Constitutive expression of a phosphorylated activation antigen (Leu 23) by CD3bright human thymocytes." *J. Immunol.* 141(8): 2557-2563.
129. Testi, R, JH Phillips, and LL Lanier. 1989. "Leu 23 induction as an early marker of functional CD3/T cell antigen receptor triggering. Requirement for receptor cross-linking, prolonged elevation of intracellular [Ca<sup>++</sup>] and stimulation of protein kinase C." *J. Immunol.* 142(6): 1854-1860.
130. Thavasu, Parames et al. 1999. "The Protein Kinase C Inhibitor CGP41251 Suppresses Cytokine Release and Extracellular Signal-regulated Kinase 2 Expression in Cancer Patients The Protein Kinase C Inhibitor CGP41251 Suppresses Cytokine Release and Extracellular Signal-regulated Kinase 2 E." *Cancer*: 3980-3984.
131. Thyberg, J, S Moskalewski, and U Friberg. 1977. "Effects of colchicine and vinblastine on the phytohaemagglutinin-induced transformation of lymphocytes." *Journal of cell science* 27: 183-98.



132. Tokarski, John S et al. 2006. "The structure of Dasatinib (BMS-354825) bound to activated ABL kinase domain elucidates its inhibitory activity against imatinib-resistant ABL mutants." *Cancer research* 66(11): 5790-7.
133. Tugores, A et al. 1992. "Human T cell activation through the activation-inducer molecule/CD69 enhances the activity of transcription factor AP-1." *J. Immunol.* 148(7): 2300-2306.
134. Udagawa, T, D G Woodside, and B W McIntyre. 1996. "Alpha 4 beta 1 (CD49d/CD29) integrin costimulation of human T cells enhances transcription factor and cytokine induction in the absence of altered sensitivity to anti-CD3 stimulation." *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 157(5): 1965-72.
135. Utz, Irene et al. 1994. "The protein kinase C inhibitor CGP 41251, a staurosporine derivative with antitumor activity, reverses multidrug resistance." *International Journal of Cancer* 57(1): 104-110.
136. Veillette, A et al. 1988. "The CD4 and CD8 T cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine-protein kinase p56lck." *Cell* 55(2): 301-8.
137. Viglietta, Vissia et al. 2004. "Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis." *The Journal of experimental medicine* 199(7): 971-9.
138. Vine, J B, T D Geppert, and P E Lipsky. 1988. "T4 cell activation by immobilized phytohemagglutinin: differential capacity to induce IL-2 responsiveness and IL-2 production." *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 141(8): 2593-600.
139. de Vries, J E et al. 1979. "The role of monocytes in human lymphocyte activation by mitogens." *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 122(3): 1099-107.
140. Wakasugi, H et al. 1985. "IL 2 receptor induction on human T lymphocytes: role for IL 2 and monocytes." *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 135(1): 321-7.
141. Wang, Xiaoqian et al. 2008. "Dynamics of proximal signaling events after TCR/CD8-mediated induction of proliferation or apoptosis in mature CD8+ T cells." *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 180(10): 6703-12.
142. Wange, RL, N Isakov, and JD Watts. 1995. "Activating and inhibitory mutations in adjacent tyrosines in the kinase domain of ZAP-70." *Journal of Biological.*
143. Weichsel, Ralf et al. 2008. "Profound inhibition of antigen-specific T-cell effector functions by dasatinib." *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 14(8): 2484-91.

144. Weisberg, Ellen et al. 2002. "Inhibition of mutant FLT3 receptors in leukemia cells by the small molecule tyrosine kinase inhibitor PKC412." *Cancer cell* 1(5): 433-43.
145. Weisberg, Ellen et al. 2007. "Second generation inhibitors of BCR-ABL for the treatment of imatinib-resistant chronic myeloid leukaemia." *Nature reviews. Cancer* 7(5): 345-56.
146. Weisberg, Ellen et al. 2010. "Antileukemic Effects of Novel First- and Second-Generation FLT3 Inhibitors: Structure-Affinity Comparison." *Genes & cancer* 1(10): 1021-32.
147. Wolleschak, D et al. 2014. *Haemologica*
148. Zhang, W et al. 1999. "Functional analysis of LAT in TCR-mediated signaling pathways using a LAT-deficient Jurkat cell line." *International immunology* 11(6): 943-50.
149. Ziegler, SF et al. 1994. "The mouse CD69 gene. Structure, expression, and mapping to the NK gene complex." *J. Immunol.* 152(3): 1228-1236.

## **Danksagung**

Herrn PD Dr. med. F. Heidel danke ich für die Überlassung des Themas und die Betreuung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. med Th. Fischer danke ich für die Möglichkeit, in den von ihm geleiteten Einrichtungen die notwendigen Untersuchungen und Experimente durchführen zu können.

Ganz besonders möchte ich mich an dieser Stelle für die Betreuung der Arbeit bei Dr. med. D. Lipka und bei Frau Dr. rer. nat. Marie-Christine Wagner bedanken.

Mein Dank gilt auch den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Hämatologischen Speziallabors und der Experimentellen Hämatologie für die Unterstützung bei den Versuchsdurchführungen und Frau Dr. Kliche (Institut für Molekulare und Klinische Immunologie), dass sie und ihr Team mir mit ihrem Wissen und Materialien sehr geholfen haben.

Natürlich wäre diese Arbeit nicht ohne die Mithilfe einer Vielzahl von Personen zustande gekommen. Ihnen möchte ich sehr danken, auch wenn ich sie hier an dieser Stelle nicht alle erwähnen kann.

Nicht zuletzt möchte ich meinem Ehemann Stefan Höding und meinen Eltern besonderen Dank für ihre Geduld und ihr Verständnis während der ganzen Zeit aussprechen.

## **Erklärung**

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

**„Hemmbarkeit von humanen T-Zellen durch den FLT3-Kinase-Inhibitor Midostaurin im Vergleich zum SRC-Kinase-Inhibitor Dasatinib.“**

in der Klinik für Hämatologie/Onkologie der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg mit der Unterstützung durch PD Dr. med. Florian Heidel ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den

Christine Höding, geb. Seidler

## Lebenslauf

**Name :** Christine Höding, geb.: Seidler

**Geburtsdatum:** 23. April 1986

**Geburtsort:** Magdeburg

### Schulbildung:

1992-1996 Grundschule „Schmeilstraße“ Magdeburg

1996-2005 Gymnasium „Otto von Guericke“ in Magdeburg

Juli 2005 Abitur

### Studium:

2005 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Otto-von-Guericke-Universität  
Magdeburg

2007 Physikum

2010-2011 Praktisches Jahr:

- Pädiatrie; Kreiskrankenhaus Burg (CÄ Dr. med. Holleck)
- Chirurgie; Klinikum Schönebeck (CA Dr. med. Thews)
- Innere Medizin; Kreiskrankenhaus Burg (CA Prof. Dr. med. habil. Janowitz)

2011 **Staatsexamen** in Humanmedizin (Otto-von-Guericke Universität Magdeburg)

### Beruflicher Werdegang:

2012-2013 Assistenzärztin in der Klinik für Pädiatrie im Kreiskrankenhaus Burg

2013-2014 Elternzeit (Geburt meines Sohnes Falk Höding)

seit 2014 Assistenzärztin in der Klinik für Kindergastroenterologie und Kinderdiabetologie im Krankenhaus St. Marienstift Magdeburg