

Auswirkung von Tyrosinkinase-Inhibitoren auf die Entwicklung und Funktion von *in vitro* generierten dendritischen Zellen

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Michael Gutknecht

aus Heidenheim an der Brenz

Tübingen

2015

Tag der mündlichen Qualifikation:

16.04.2015

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee

2. Berichterstatter:

PD Dr. Frank Grünebach

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungen.....	6
2	Liste der Publikationen.....	8
3	Ziele der Doktorarbeit.....	9
4	Zusammenfassung.....	9
5	Einleitung	12
5.1	Chronische myeloische Leukämie (CML).....	12
5.2	BCR-ABL Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI).....	15
5.3	Dendritische Zellen	18
5.3.1	DZ-Entwicklung und Subtypen	18
5.3.2	DZ-Ausreifung und T-Zell-Stimulation / Toleranz.....	20
5.4	Immuntherapie	22
5.5	Osteoactivin (GNMB / DC-HIL / HGFIN)	24
5.6	Microphthalmia-associated Transcription Factor (MITF)	26
6	Material und Methoden	28
6.1	Material	28
6.1.1	Geräte.....	28
6.1.2	Software	29
6.1.3	Kits	29
6.1.4	Verbrauchsmaterialien.....	29
6.1.5	Chemikalien, Medien, Puffer.....	30
6.1.6	Primer	32
6.1.7	Antikörper	32
6.1.8	Zytokine, TKI, spez. Inhibitoren, TLR-Liganden und rekombinante Proteine.....	34
6.1.9	Zusammensetzung von Puffer, Lösungen und Medien	35
6.2	Methoden	37

6.2.1	Aufreinigung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) (peripheral blood mononuclear cells)	37
6.2.2	Bestimmung der Zellzahl	38
6.2.3	Generierung dendritischer Zellen aus plastikadhärenten Monozyten.....	38
6.2.4	Gewinnung nicht adhärenter mononukleärer Zellen des peripheren Blutes („Peripheral Blood Mononuclear Cells“, PBMC)	39
6.2.5	Zellseparation mittels MACS („Magnetic Associated Cell Sorting“) 39	
6.2.6	Lagerung von Zellen	42
6.2.7	Gemischte Lymphozyten Reaktion (MLR, Mixed-Lymphocyte-Reaction)	42
6.2.8	Zellaufschluss zur Gewinnung von Proteinlösungen.....	43
6.2.9	Proteinkonzentrationsbestimmung.....	44
6.2.10	SDS-Gelelektrophorese.....	45
6.2.11	Western Blot	47
6.2.12	Nachweis transferierter Proteine / Protein-Phosphorylierung mittels AK (Antikörper-Färbung)	47
6.2.13	qRT-PCR	48
6.2.14	ELISA	49
6.2.15	Durchflusszytometrische Analyse dendritischer Zellen.....	50
6.2.16	Gemischte Lymphozyten Reaktion („Mixed Lymphocyte Reaction“, MLR)	52
7	Ergebnisse	53
7.1	“The immune inhibitory receptor osteoactivin is upregulated in monocyte-derived dendritic cells by BCR–ABL tyrosine kinase inhibitors” – Der immuninhibitorische Rezeptor Osteoactivin wird in moDZ durch BCR-ABL Tyrosinkinase-Inhibitoren hochreguliert.....	53

7.1.1	IL-10 verstärkt die Expression von Osteoactivin in humanen moDZ	
	54	
7.1.2	Auswirkung von Reifungsstimuli auf die basale OA-Expression in humanen moDZ	55
7.1.3	Die BCR-ABL TKI Imatinib, Nilotinib und Dasatinib inhibieren die Ausdifferenzierung von moDZ.....	56
7.1.4	TKI steigern die OA-Expression in unreifen moDZ	57
7.1.5	Die Erkennung von Pathogen-assoziierten molekularen Mustern (PAMP) kann die Steigerung der OA-Expression durch TKI oder IL-10 unterdrücken	60
7.1.6	Die TKI induzierte Verringerung der T-Zell-Stimulationsfähigkeit von moDZ kann durch einen OA blockierenden AK wiederhergestellt werden	62
7.1.7	Effekt von TKI auf weitere immunsuppressive Oberflächenrezeptoren und die moDZ Zytokinproduktion	64
7.1.8	Zusammenfassung Ergebnisse Teil 1	66
7.2	„BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors exert immunosuppressive effects in human dendritic cells by interfering with pathways involved in IL-10 receptor signaling and activation of the microphthalmia-associated transcription factor” – BCR-ABL Tyrosinkinase-Inhibitoren wirken immunsuppressiv auf humane moDZ in dem sie in die IL-10 Signalweiterleitung und die MITF Aktivierung eingreifen.	67
7.2.1	Die Inhibition des PI3K/Akt-Signalwegs führt zur Steigerung der OA-Expression	68
7.2.2	Die Inhibition des PI3K/Akt-Signalwegs durch TKI oder Akt-Inhibitor beeinflusst die Ausdifferenzierung der moDZ.....	70
7.2.3	Die Inhibition des PI3K/Akt-Signalwegs verringert die Fähigkeit von moDZ zur Induktion einer T-Zell-Antwort durch Steigerung der OA-Expression	72
7.2.4	Expression von MITF und OA in verschiedenen hämatopoetischen Zelltypen	73

7.2.5	Expression von MITF in <i>in vitro</i> generierten moDZ	75
7.2.6	MITF steigert die OA-Expression nach Inhibition des PI3K/Akt-Signalwegs durch IL-10 oder TKI	75
7.2.7	Zusammenfassung Ergebnisse Teil 2.....	86
7.3	HDM2 wird in TKI oder IL-10 behandelten moDZ dephosphoryliert ..	87
8	Diskussion	88
9	Literatur	99
10	Danksagung.....	115

1 ABKÜRZUNGEN

ABL - Abelson Protoonkogen

AK – Antikörper

AML – Akute myeloide Leukämie

APZ - antigenpräsentierende Zellen

aSZT – allogene Stammzelltransplantation

BCR – “Breakpoint Cluster Region”

bHLH-Zip – “basic helix-loop-helix-leucine-zipper”

CCR7 – “C-C chemokine receptor type 7”

CD40L – CD40 Ligand

cpm – “counts per minute” (Anzahl pro Minute)

DC-Hil – “dendritic cell associated heperan sulfate proteoglycan integrin ligand”

DMFI – Differenz der medianen Fluoreszenzintensität (= mediane Fluoreszenzintensität der OA Färbung - mediane Fluoreszenzintensität der Isotyp-Kontrolle)

ELISA – „Enzyme Linked Immunosorbent Assay“ (AK-basiertes Zytokin Nachweisverfahren)

Erk – “extracellular stimulus-regulated kinase”

FACS – “Fluorescence-Activated Cell Sorting” (Durchflusszytometrische-Analyse)

FcR – “fragment crystallisable”-Rezeptor (Membranrezeptor)

G6PDH – Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase

GM-CSF – “Granulocyten Macrophagen Colony-Stimulating Factor”

GPNMB – “glycoprotein nonmetastatic melanoma protein B”

GSK3-β – “Glycogen synthase kinase 3 beta”

GvHD – „Graft versus Host Disease“

h – „Hour“ (Stunde)

HGFIN – “Hematopoietic growth factor inducible neurokinin-1”

IFN – Interferon

IL-4 – Interleukin 4

IRAK – “interleukin-1 receptor-associated kinase”

ITAM – “Immunoreceptor tyrosine based activation motif”

kDa – kilo Dalton

LPS – Lipopolysaccharid

MAPK – “Mitogen activated protein Kinases”

M-CSF – “Macrophagen Colony Stimulating Factor”

MITF – “Microphthalmia-associated Transcription Factor”

MLR – „Mixed Lymphocyte Reaction“ (Gemischte Lymphozyten Reaktion)

moDC – „monocyte derived Dendritic cells“ (aus Monozyten generierte dendritische Zellen)

MyD88 – “Myeloid differentiation primary response gene 88”

NF-κB – “nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells”

P – Phosphorylierung

p.a. – “pro Analysis” (bezogen auf die Qualität von Chemikalien, zumeist Alkoholen)

PAMP – „Pathogen-associated molecular pattern” (Pathogen-assoziierte molekulare Muster)

PBMC – „Peripheral Blood Mononuclear Cells“ (nicht adhärente mononukleäre Zellen des peripheren Blutes)

PBS – Phosphatgepufferte Salzlösung (“phosphate buffered saline”)

PD-(L) – “Programmed Death (Ligand)”

PenStrep – Penicillin Streptomycin

PI3K – Phosphoinositid-3-Kinase

PKD – “Polycystic Kidney Disease Domain”

Poly(I:C) – “Polyinosinic:polycytidylic acid“

RANKL – “Receptor Activator of NF-κB Ligand“

RCC – Renal cell carcinoma

RT – Raumtemperatur

SD – Syndecan

siRNA – “small interfering RNA”

STAT3 – “Signal transducer and activator of transcription 3”

TF – Transkriptionsfaktor

TGF- β – „Transforming growth factor beta“

TK – Tyrosinkinasen

TKI – Tyrosinkinase-Inhibitoren

TLR – Toll-like Rezeptor

TRAF – “TNF receptor associated factor”

TZR – T-Zell-Rezeptor

U/min – Umdrehungen pro Minute

ÜN – über Nacht

WB – Western Blot

2 LISTE DER PUBLIKATIONEN

1. Schwarzbich, M.-A. *et al.* The immune inhibitory receptor osteoactivin is upregulated in monocyte-derived dendritic cells by BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Immunol. Immunother.* **61**, 193–202 (2012).
2. Gutknecht, M. *et al.* BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors exert immunosuppressive effects in human dendritic cells by interfering with pathways involved in IL-10 receptor signaling and activation of the microphthalmia-associated transcription factor (eingereicht)

3 ZIELE DER DOKTORARBEIT

Ziel dieser Doktorarbeit war es im Hinblick auf eine mögliche Kombinationstherapie für Philadelphia Chromosom positive (Ph+) Chronische Myeloische Leukämie (CML), die Auswirkungen von BCR-Abl Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI) auf aus Monozyten generierten dendritischen Zellen (moDZ) zu untersuchen.

Nach allgemeinen phänotypischen Analysen der TKI-behandelten moDZ wurde besonderer Wert auf Untersuchungen zur Auswirkung von TKI auf die Expression des immuninhibitorischen Transmembranprotein Osteoactivin (OA) gelegt.

Es sollte unter Anderem geklärt werden, ob und wenn ja, in welchem Ausmaß die derzeitigen Erst- und Zweitlinien TKI Imatinib (Gleevec), Nilotinib (Tasigna) und Dasatinib (Sprycel), Einfluss auf die Expression von OA in moDZ nehmen und in welchem Umfang die gesteigerte OA-Expression für die verringerte immunstimulatorische Fähigkeit von TKI-behandelten moDZ verantwortlich ist.

Darüber hinaus sollte aufgeklärt werden, welcher Signalweg für die Regulation der OA-Expression in moDZ verantwortlich ist und wie dieser von TKI beeinflusst wird.

Hierdurch sollte die Grundlage für eine Optimierung zukünftiger Kombinationstherapien gelegt werden.

4 ZUSAMMENFASSUNG

Zusammenfassend konnten die in dieser Arbeit durchgeführten *in vitro* Studien einen grundlegenden Mechanismus zur Ausbalancierung aktivierender und inhibierender Signale in humanen moDZ aufdecken. Je nach Aktivierung oder Inhibierung des PI3K/Akt/GSK3- β -Signalwegs, entwickeln sich moDZ zu immunstimulierenden oder tolerogenen DZ. Hierbei wird ein Großteil der immuninhibierenden Eigenschaften der tolerogenen moDZ durch die Expressionssteigerung des immuninhibitorischen Transmembranprotein Osteoactivin (OA) hervorgerufen. Es konnte gezeigt werden, dass die Inhibition des PI3K/Akt-Signalwegs durch Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI) oder Interleukin (IL)-10 zur Aktivierung der „Glycogen synthase kinase 3 beta“ (GSK3- β) und der darauf folgenden Aktivierung des „Microphthalmia-associated Transcription

Factor“ (MITF) führt. Nachdem MITF aktiviert wurde, transloziert der Transkriptionsfaktor (TF) in den Zellkern und sorgt hier für eine Steigerung der OA Transkription. Dies führt schließlich zu einer stark reduzierten T-Zell-Stimulationsfähigkeit der moDZ, die jedoch durch OA-blockierende Antikörper (AK) oder rekombinantes Syndecan (SD)-4 wieder hergestellt werden konnte. Umgekehrt führt die Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges durch „Toll-like Receptor“ (TLR)-Liganden wie Lipopolysaccharid (LPS) und „Polyinosinic:polycytidylic acid“ (Poly(I:C)) oder inflammatorische Zytokine wie „Tumor Necrose Factor“ (TNF) und „Interferon gamma“ (IFN- γ) zur Inhibition von GSK3- β durch Akt. Dadurch wird MITF nicht mehr aktiviert wodurch auch keine Transkription von OA mehr erfolgen kann. Gleichzeitig kommt es zur Ausreifung der moDZ, was wiederum zu einer sehr guten T-Zell-Stimulationsfähigkeit der moDZ führt. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit der physiologischen Funktion dendritischer Zellen, welche je nach Bedarf eine T-Zell-Antwort auslösen oder inhibieren sollen.

Die hier Erzielten Ergebnisse könnten gleich in mehreren Bereichen klinisch signifikant sein. Zum einen könnte die Aufdeckung eines grundlegenden Mechanismus zur Induzierung tolerogener moDZ in der Behandlung von Transplant-Wirt-Reaktionen oder Autoimmunerkrankungen wie Rheumatoider Arthritis eingesetzt werden. Zum Anderen sollte auf Grund unserer Ergebnisse bei zukünftigen Kombinationstherapien aus TKI Behandlung und DZ-basierter Immuntherapie, eine Inhibition der OA-Expression oder -Funktion zur Wirksamkeitssteigerung der Behandlung in Betracht gezogen werden. Darüber hinaus ist mit Hilfe unserer Studien nun eine relativ gezielte Kontrolle der OA-Expression möglich wodurch der „Immunescape“ OA-exprimierender Tumoren verhindert werden kann oder die Wirksamkeit von auf OA ausgerichteter Immuntherapien verbessert werden könnte.

In englischer Sprache:

In summary, this studie exposed a fundamental mechanism that balances activating and inhibitory signals in human moDC. The development of moDC to either immunostimulatory or tolerogenic DC depends on the activation or inhibition of the PI3K/Akt/GSK3- β signaling pathway. Here, the majority of the immunoinhibitory characteristics of those tolerogenic moDC are due to the severe up-regulation of the immunoinhibitory trans-membrane glycoprotein Osteoactivin (GPNMB, DC-HIL). It could be shown that inhibition of PI3K/Akt-signaling by tyrosine kinase inhibitors (TKI) or the immunoinhibitory cytokine interleukin (IL)-10 activates „Glycogen synthase

kinase 3 beta“ (GSK3- β) and subsequently the „Microphthalmia-associated Transcription Factor“ (MITF). The activated transcription factor (TF), translocates into the nucleus and induces OA transcription. Eventually, the profound up-regulation of OA results in a severely reduced T cell-stimulation capacity of the TKI- or IL-10-treated moDC, that could be restored by OA-blocking antibody or recombinant Syndecan (SD)-4 ligand. Vice versa, activation of PI3K/Akt-signaling via "Toll-like receptor" (TLR) ligands such as lipopolysaccharide (LPS) and "Polyinosinic:polycytidylic acid" (Poly (I:C)) or inflammatory cytokines such as "tumor necrosis factor "(TNF) and" -gamma interferon "(IFN- γ) inhibits GSK3- β , thereby preventing activation of MITF and subsequent transcription of OA. At the same time, activation of PI3K/Akt-signaling permits formation of functional members of the NF- κ B transcription factor family that induce the transcription of proinflammatory genes and subsequently result in maturation and enhanced T cell-stimulatory capacity of the examined moDC. These findings are consistent with the physiological function of DC as antigen presenting cells (APC) that are responsible for the induction of a proper immune response, either stimulating or inhibiting T cell response. Our studies could be clinically significant in several areas. These findings are of great importance for future combinatory approaches using TKI and DC-based immunotherapy and indicate that inhibition of OA expression or function may serve as a novel strategy to enhance the efficacy of immunotherapeutic interventions in cancer patients. Additionally, the discovery of a fundamental mechanism for the induction of tolerogenic DC could be used for the treatment of graft-versus-host reactions and autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis. OA is a prominent tumor associated antigen (TAA) in various cancers and is probably also responsible for tumor immune escape. Based on this study, a relatively direct control of OA transcription is possible, which could enhance OA-directed immunotherapy strategies or prevent OA-based immune escape.

5 EINLEITUNG

5.1 Chronische myeloische Leukämie (CML)

Die Chronische myeloische Leukämie (CML) ist eine langsam voranschreitende klonale Stammzellerkrankung der Hämatopoese, bei der die Hyperplasie der granulopoetischen Zellen im Vordergrund steht ¹. In Deutschland treten jährlich ca. 1200 neu Fälle auf. Mehr als 90% aller CML-Patienten sind Philadelphia-Chromosom positiv (Ph+) ²⁻⁴. Das Philadelphia-Chromosom (Ph) ist ein verkürztes Chromosom 22, welches durch eine reziproke Translokation zwischen den Chromosomen 9 und 22 entsteht ^{5,6}. Durch die Translokation werden Teile von beiden Chromosomen ausgetauscht und somit das Breakpoint Cluster Region (BCR) -Gen auf Chromosom 22 mit dem Abelson Protoonkogen (ABL) von Chromosom 9 fusioniert (Abb. 1) ^{7,8}.

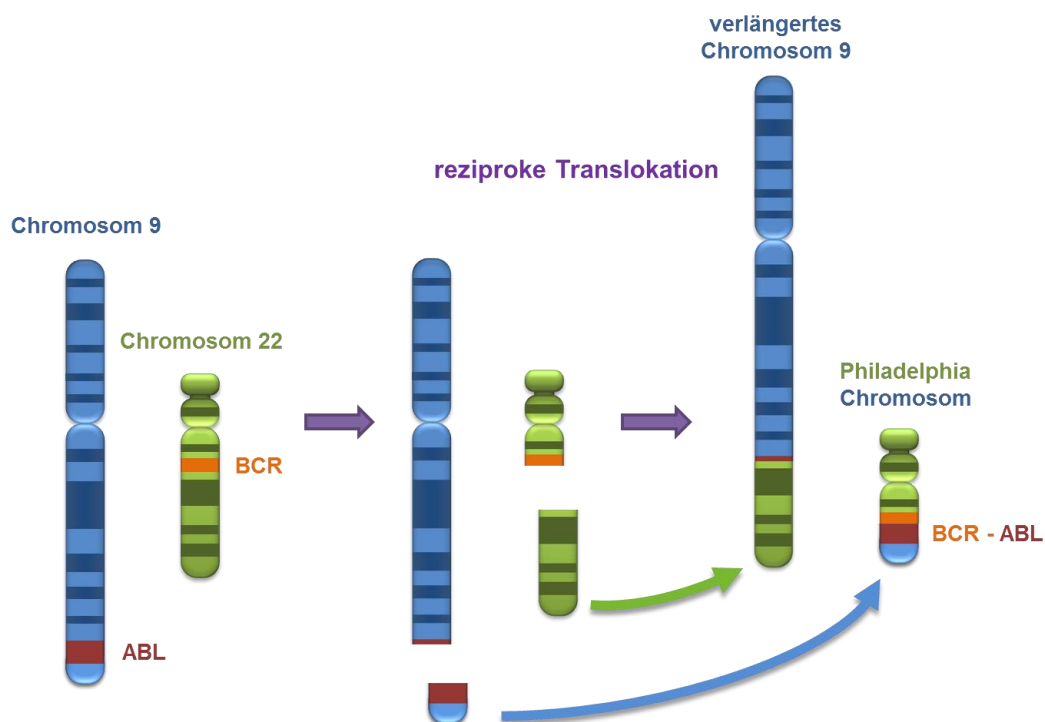


Abb. 1: Das Philadelphia-Chromosom (Ph) entsteht durch eine reziproke Translokation zwischen den Chromosomen 9 und 22. Hierbei werden Teile der Chromosomen 9 und 22 ausgetauscht. Das ABL- Gen (rot) von Chromosom 9 wird durch die Translokation mit dem BCR- Gen (orange) auf Chromosom 22 fusioniert. Durch diesen Austausch wird Chromosom 9 verlängert und Chromosom 22 verkürzt, wodurch das charakteristische Philadelphia Chromosom entsteht.

Während bekannt ist das Abl zur Regulation von Zellzyklus und Apoptose beiträgt, ist die Funktion von BCR noch nicht vollständig aufgeklärt⁹⁻¹¹. Es wird jedoch vermutet, dass BCR an der Signaltransduktion beteiligt ist⁵. Durch die Fusion von BCR mit ABL entsteht eine konstitutiv aktive Tyrosinkinase, welche ständig eine Vielzahl von Signalwegen aktiviert (Abb. 2). Dem zu Grunde liegt die Dimerisierung und anschließende Autophosphorylierung von BCR-ABL^{12,13}. Durch die Autophosphorylierung wird die Entstehung von signaltransduzierenden Komplexen, wie z.B. GRB2/GAB2/SOS begünstigt¹⁴. Dies führt wiederum zur Aktivierung des RAS/Erk-, sowie des PI3K/AKT-Signalwegs¹⁵. Die Beeinflussung des Ras/Erk-Signalwegs bewirkt eine wachstumsfaktorunabhängige Steigerung der Proliferation. Die Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs hat unterschiedliche Auswirkungen. Zum Einen kommt es durch die Ansteuerung von BAD/BCL zu einer Stabilisierung der Mitochondrien wodurch Apoptose unterdrückt wird⁵. Zum Anderen führt die Aktivierung von mTOR zu einer gesteigerten Proteinbiosynthese und damit auch zu einer erhöhten Proliferation¹⁶. Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB („nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells“) durch Akt führt ebenfalls zu einer gesteigerten Proliferation. Darüber hinaus kommt es zu einer Aktivierung des JAK/Stat-Signalwegs durch BCR-ABL¹⁷. Da das Ph nur in Leukämiezellen vorkommt, wird es zur CML-Diagnose herangezogen²⁻⁴. Die mittlerweile am weitesten verbreitete Methode zur Diagnose von Ph+ CML ist die qRT-PCR. Meistens wird die Erkrankung in der chronischen Phase diagnostiziert. Hier liegt der Anteil der Blasten noch bei weniger als 10%. Ohne Behandlung geht die CML von der chronischen in die akzelerierte Phase über, wo die Anzahl der Blasten auf bis zu 19% ansteigen kann. Durch die stetige Verdrängung der normalen Hämatopoese kommt es vermehrt zu Infektionen, Anämie, schmerzenden Knochen und gestörter Blutgerinnung. Die mehrmonatige akzelerierte Phase geht schließlich in die Blasten Phase über, in welcher die Blasten mehr als 20% aller Blutzellen ausmachen. Unbehandelt kann diese akute Form der Leukämie innerhalb weniger Wochen zum Tode führen^{18,19}.

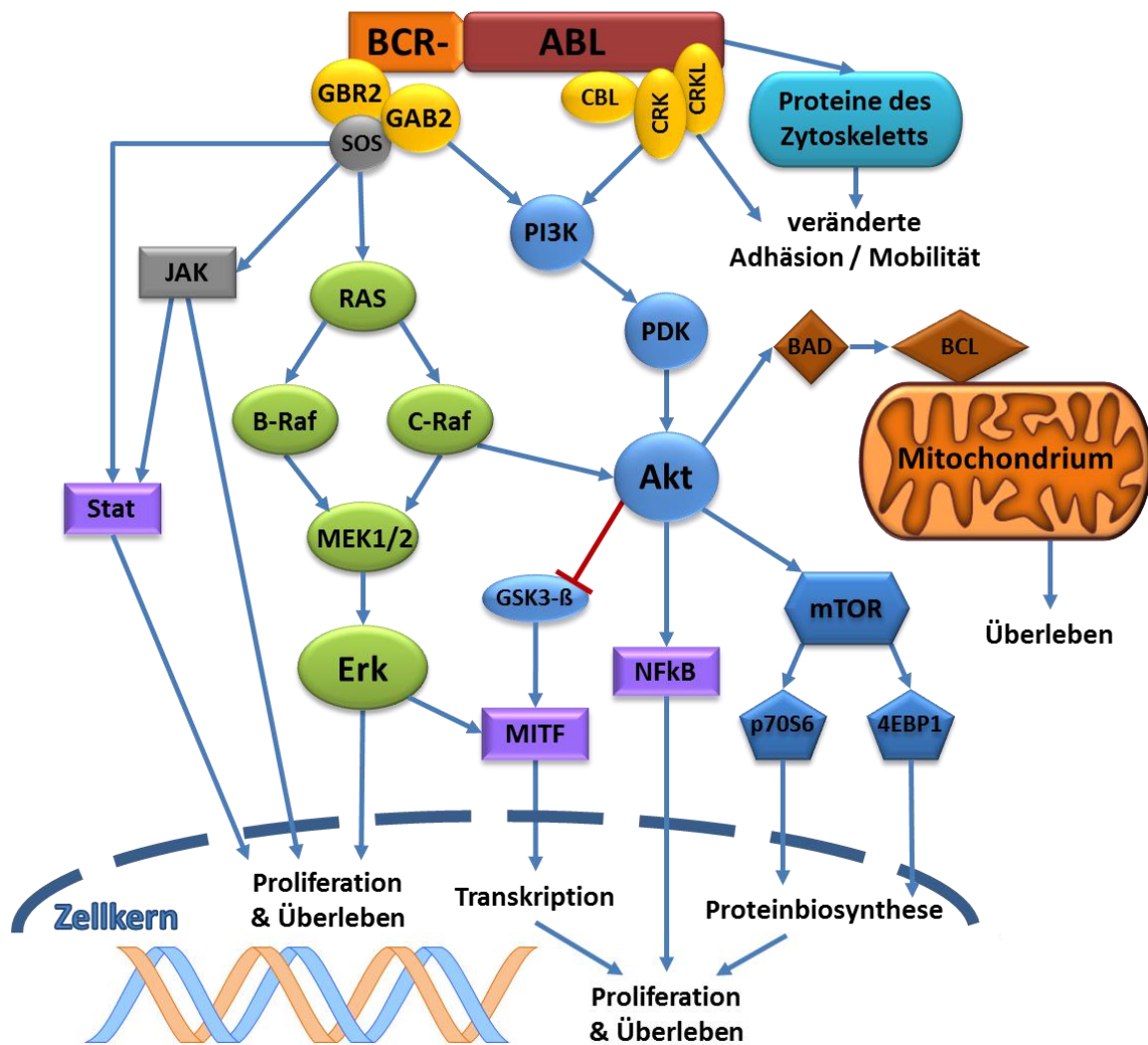


Abb. 2: Von BCR-ABL aktivierte Signalwege in PH+ Zellen. Durch die BCR-ABL Autophosphorylierung wird die Bildung von Signalweiterleitungskomplexen, wie hier in Gelb dargestellt, begünstigt. Durch die ständige Signalweiterleitung wird der hier in blau dargestellte PI3K/Akt-Signalweg sowie der in grün dargestellte RAS/Erk-Signalweg und auch der in grau dargestellte JAK/Stat-Signalweg aktiviert. Dies führt wiederum zur Aktivierung mehrerer Transkriptionsfaktoren (lila), welche die Expression von Genen begünstigen, die Proliferation und Überleben der PH+-Zellen unterstützen. Darüber hinaus führt die Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs zu einer Stabilisierung der Mitochondrien durch BAD/BCL (braun) und somit zu einer Inhibition der Apoptose und einem verbesserten Überleben der PH+-Zellen. Auch die Steigerung der Proteinbiosynthese nach Aktivierung von mTOR durch Akt begünstigt das Überleben und die Proliferation der PH+-Zellen. Desweiteren beeinflusst BCR-ABL Proteine des Zytoskeletts und verändert somit das Adhäsionsverhalten und die Zellmobilität der PH+-Zellen.

5.2 BCR-ABL Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI)

Noch bis zum Ende des 20. Jahrhunderts wurde vor allem Interferon alpha (IFN) und Cytarabin sowie Hydroxyharnstoff und letzten Endes die allogene Stammzelltransplantation zur Therapie von Ph+ CML eingesetzt. Erst durch die Entwicklung von spezifischen BCR-ABL Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI) konnte Anfang des 21. Jahrhunderts die Therapie von Ph+ CML drastisch verbessert werden^{18,20}. Als erster BCR-ABL Tyrosinkinase-Inhibitor (TKI) wurde 2001 Imatinib (CGP57148B bzw. STI-571) von der „U.S. Food and Drug Administration“ (FDA) als Medikament zugelassen^{21,22}. Imatinib wurde in den 90-iger Jahren des letzten Jahrhunderts von Novartis entwickelt. Auf der Suche nach einem Wirkstoff der spezifisch Tyrosinkinasen inhibiert, wendeten Buchdunger *et al.* eine Hochdurchsatz-Untersuchung der firmeneigenen Wirkstoff-Datenbanken an. Die gefundene Leitstruktur 2-phenylaminopyrimidine (pyrimidine A) wurde durch die Einführung von Methyl- und Benzamide-Gruppen weiter modifiziert, bis schließlich eine Struktur mit erheblich verbesserter Spezifität und Potenz synthetisiert werden konnte (Abb. 3)¹.

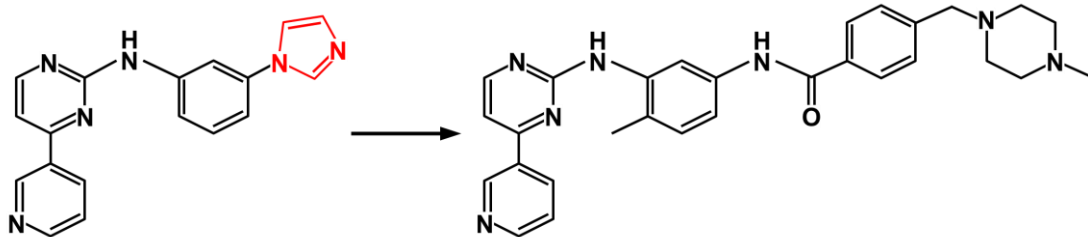


Abb. 3: Entwicklung von Pyrimidine A zu Imatinib. Zur Steigerung der Spezifität wurde die Imidazol-Gruppe durch eine Benzamid-Gruppe ersetzt. Durch Einführung eines Methyl-Substituenten konnte die Potenz des Wirkstoffs noch zusätzlich gesteigert werden

Imatinib wirkt als kompetitiver Tyrosinkinase-Inhibitor und hemmt vor allem die Tyrosinkinasen c-Kit, PDGF-Rezeptor, ABL und BCR-ABL^{1,23}. Die Hemmung der Kinasen wird hierbei durch die Blockade der ATP Bindung erzielt. Durch die Anlagerung von Imatinib an die ATP Bindungsstelle, wird das Enzym in seiner geschlossenen (inaktiven) Form blockiert und ist dadurch nicht mehr in der Lage ATP zu binden (kompetitive Verdrängung)^{23–26}. Dies führt wiederum dazu, dass die Signalübertragung mittels Phosphat-Transfer von ATP auf den Tyrosinrest des Substrats (Substratphosphorylierung) zum Erliegen kommt (Abb. 4)²⁷.

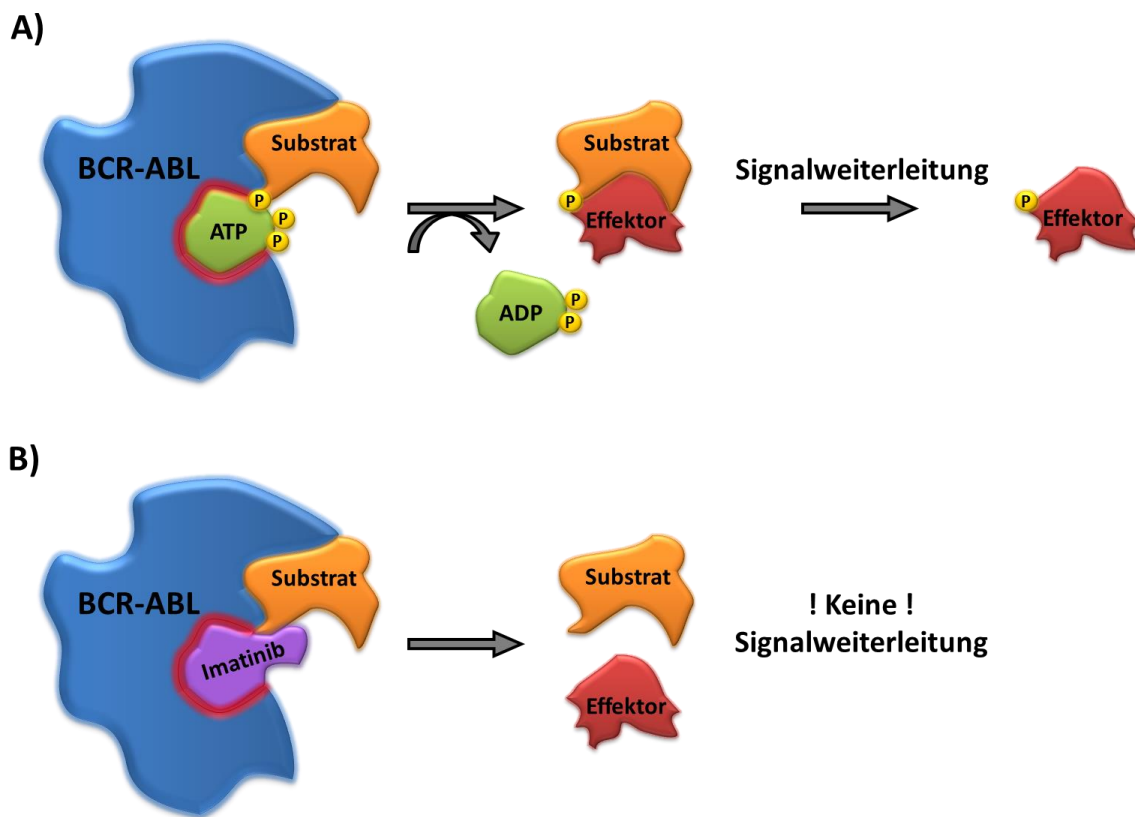


Abb. 4: Molekularer Wirkmechanismus von Imatinib. A) Das aktive Zentrum der Tyrosinkinase (rot hervorgehoben) bindet ATP (grün) und katalysiert den Transfer des gamma Phosphats (gelb) von ATP zu einem oder mehreren Tyrosinresten des Proteinsubstrats (orange). Durch die Phosphorylierung des Substrats kann dessen Enzym-Aktivität, die subzelluläre Lokalisation oder auch die Interaktion mit anderen Proteinen beeinflusst werden. Beispielsweise kann durch die Weitergabe der Phosphatgruppe an ein Effektorprotein (rot) eine Signalkaskade (z.B. RAS/ERK-, bzw. PI3K/Akt-Signalweg) ausgelöst werden. B) Bindet nun Imatinib (lila) im aktiven Zentrum der Kinase, wird diese in der inaktiven (geschlossenen) Form blockiert. Hierdurch kann kein ATP mehr gebunden werden (kompetitive Verdrängung) und somit auch kein Phosphat mehr weitergegeben werden. Eine Signalweiterleitung ist dadurch effektiv unterbunden.

Hierin liegt aber auch die Grundlage von vielen Imatinibresistenzen. Schon eine geringfügige Mutation der Imatinibbindestelle kann dazu führen, dass Imatinib nicht mehr in der Lage ist das Enzym in der inaktiven Konformation zu blockieren ²⁸. Mittlerweile stehen bei Imatinib-Resistenz oder Unverträglichkeit BCR-ABL

Tyrosinkinase-Inhibitoren der zweiten Generation (Nilotinib (Tasigna) und Dasatinib (Sprycel)) zur Verfügung ²⁸⁻³⁰.

Obwohl alle BCR-ABL TKIs mit dem Ziel einer hohen Spezifität entwickelt wurden, kommt es vor allem beim Einsatz von hohen Dosen, auch zur Inhibition von anderen Kinasen („Off-Target-Effekte“). Es ist bekannt, dass Imatinib und Nilotinib, außer BCR-ABL noch mindestens 7 weitere Proteinkinasen (PK) inhibieren. Dies wird von Dasatinib mit insgesamt über 40 blockierten PKs jedoch weit übertroffen ²⁸. So inhibiert Imatinib beispielsweise nicht nur BCR-ABL, c-Kit, PDGF-Rezeptor und ABL ³¹ sondern auch den Discoidin Domain Rezeptor 1 (DDR1) sowie die TK Syk ³². Die Inhibition von c-Kit hat schwerwiegende Auswirkungen auf die Entwicklung und Funktion verschiedener Zelltypen. Es ist bekannt, dass c-Kit nicht nur bei der Karzinoese sondern auch bei Hämatopoese, Melanogonese, Erythropoese und auch Spermatogonese eine wichtige Rolle spielt. So ist zum Beispiel die Entwicklung und das Überleben von hämatopoetischen Stammzellen von einem ungestörten c-Kit Signalweg abhängig ^{33,34}. Es kann auch davon ausgegangen werden, dass sich diese „Off-Target-Effekte“ auf Immunzellen auswirken und hier zur Unterbrechung wichtiger Signalwege führen können. Die Auswirkungen dieser „Off-Target-Effekte“ wurden bisher noch nicht besonders gut untersucht, was zum Teil sicherlich darauf zurück zu führen ist, dass es relativ schwierig ist den Effekt der TKI auf das bereits stark angegriffene Immunsystem der Patienten zu bestimmen. Klar ist aber, dass durch den systemischen Einsatz der TKIs nicht nur Signalwege von Ph+ Zellen unterbrochen werden. Dementsprechend wurde gezeigt, dass in dendritischen Zellen (DZ) die Inhibition von c-Kit durch Imatinib zu einer schlechteren NK-Zell-Aktivierung führt und auch die Art der T-Zell-Induktion beeinflussen kann. Die Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs durch c-Kit fördert beispielsweise nicht nur die Viabilität mittels Aktivierung von Bad und Inhibition des Forkhead Transkription Faktors (FOXO3) sondern beeinflusst auch die Induzierung einer Typ 2 und Typ 17 T-Helferzellen (TH2 und TH17) Antwort in DZ ^{34,35}. Darüber hinaus fungiert c-Kit in DZ als eine Art Schalter, welcher die Produktion von Interleukin 12 (IL-12) auf Interleukin 6 (IL-6) umstellen kann. Wodurch wiederum die Art der von den DZ induzierten Immunantwort gesteuert wird ³⁴. In einer anderen Studie wurde gezeigt, dass Imatinib einen c-Kit unabhängigen Einfluss auf Differenzierung, Ausreifung und Funktionalität von, aus Monozyten und auch aus CD34+ Vorgängerzellen generierten DZ hat ^{36,37}. Diese „Off-Target-Effekte“ der TKI-Behandlung könnten sich als problematisch für eine gleichzeitige Immuntherapie herausstellen ³⁸.

5.3 Dendritische Zellen

Da eine Heilung von Ph+ CML mittels BCR-ABL Tyrosinkinase-Inhibitoren bei mehr als 60% der Patienten nicht möglich ist und die Risiken einer Stammzelltransplantation verhältnismäßig hoch sind, wird nach weiteren Behandlungsmöglichkeiten für die CML gesucht³⁹. Die DZ-basierte Immuntherapie, oftmals auch als DZ Vakzinierung bezeichnet, wird als eine Erfolg versprechende Behandlungsalternative angesehen.

DZ sind hoch spezialisierte antigenpräsentierende Zellen (APZ), die als Bindeglied zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem fungieren⁴⁰. Sie wurden zum ersten Mal im Jahre 1973 von Ralph Steinman und Zanvil Cohn beschrieben⁴¹. Bis dahin waren nur die dendritischen Zellen der Haut, die Langerhans Zellen bekannt⁴².

5.3.1 DZ-Entwicklung und Subtypen

DZ sind die einzigen Zellen des Immunsystems die lymphoide wie auch myeloide Vorläufer besitzen^{43,44}. Konventionelle DZ (kDZ), welche des öfteren auch als klassische oder myeloide DZ bezeichnet werden, sowie aus Monozyten (Monos) differenzierte DZ (moDZ) entstehen nur aus myeloiden Vorläufern, wohingegen plasmazytoide DZ (pDZ) sowohl aus lymphoiden, als auch aus myeloiden Vorläufern differenzieren können^{42,45-47}. Im Knochenmark können sich pluripotente hämatopoetische Zellen zu „Makrophagen und DZ Vorläufern“ (MDV) oder lymphoiden DZ Vorläufern entwickeln, welche sich über teils mehrere Zwischenformen schließlich zu pDZ, kDZ oder moDZ entwickeln können (Abb. 5). DZ spezifische Vorläuferzellen zirkulieren mit Hilfe des Blutstroms durch den ganzen Körper und differenzieren zu konventionellen DZ, welche gewebespezifisch Subpopulationen bilden können, die wiederum unterschiedliche Immunantworten auslösen. CD11b+ kDZ und CD1c+ kDZs induzieren eher eine CD4+ T-Zell-Antwort, wohingegen CD141+ kDZ vor allem CD8 T-Zellen mittels Kreuzpräsentation und IL-12 Produktion aktivieren⁴⁸. kDZ exprimieren hauptsächlich TLR1, 2, 4, 5 und 8 wodurch sie hauptsächlich von extrazellulären Antigenen aktiviert werden. Wohingegen die aus den lymphoiden DZ Vorläufern hervorgegangenen pDZ vor allem TLR7 und 9 exprimieren und durch intrazelluläre Signale aktiviert werden⁴⁹. Dadurch können pDZ sehr gut virale Infektionen erkennen und mit der Sekretion von INF- α reagieren⁴⁷. moDZ entwickeln sich vor allem in entzündetem Gewebe, weshalb sie auch als inflammatorische DZ bezeichnet werden^{45,47,50,51}. Neben aus CD34+

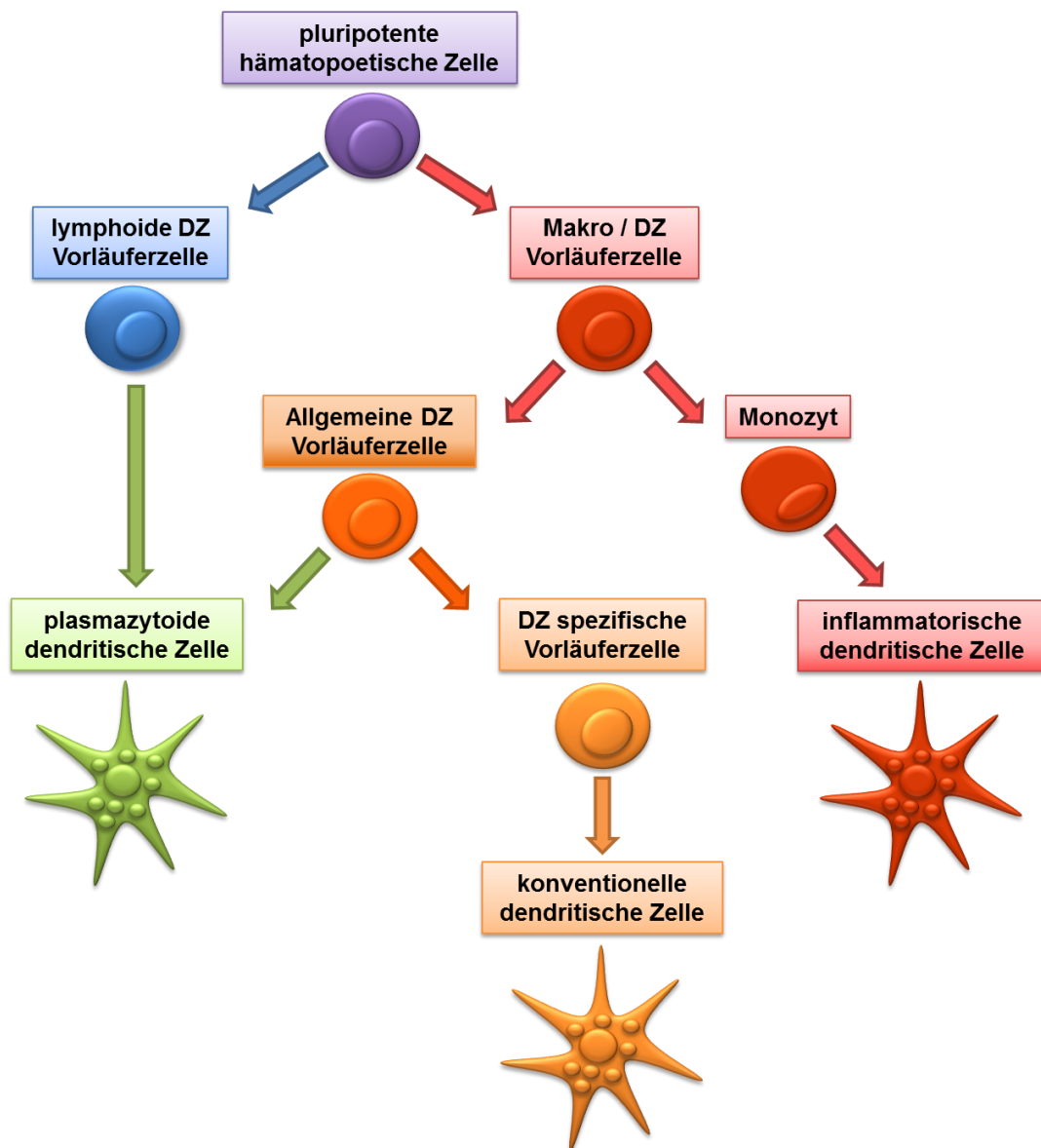


Abb. 5: DZ-Entwicklung. Makrophagen und DZ Vorläufer (rot) wie auch lymphoide DZ Vorläuferzellen (blau) entwickeln sich aus pluripotenten hämatopoetischen Zellen des Knochenmarks (lila). Makrophagen und DZ Vorläufer differenzieren im nächsten Schritt zu Monozyten (rot) und allgemeinen DZ Vorläuferzellen (orange). Inflammatorische DZ (rot) können sich aus Monozyten (rot) entwickeln und werden daher auch moDZ genannt. Allgemeine DZ Vorläuferzellen (orange) differenzieren je nach Stimulus zu DZ spezifischen Vorläuferzellen (gelb) oder auch zu plasmazytoiden DZ (grün). Lymphoide DZ Vorläufer (blau) können sich ebenfalls zu plasmazytoiden DZ (grün) entwickeln. Aus DZ spezifischen Vorläuferzellen (gelb) differenzieren schließlich konventionelle DZ (gelb).

generierten DZ werden moDZ am häufigsten für *in vitro* Arbeiten, wie z.B. Vakzinierungsstudien verwendet. Hierfür werden CD14+ Monozyten mit Hilfe von Plastikadhärenz oder über AK-basierte Aufreinigungsmethoden wie etwa dem MACS System von Miltenyi isoliert und meist durch Zugabe von IL-4 und GM-CSF zu moDZ ausdifferenziert. Nach ca. fünf bis sieben Tagen erhält man über diese Methode unreife moDZ, welche den kDZ des peripheren Blutes in Antigenaufnahme und Prozessierung sehr ähnlich sind und auch annähernd so gute immunstimulatorische Eigenschaften aufweisen ^{40,52-59}.

5.3.2 DZ-Ausreifung und T-Zell-Stimulation / Toleranz

DZ die noch nicht in Kontakt mit Antigenen gekommen sind, werden als unreife DZ bezeichnet. Sie sind hervorragend zur Antigenaufnahme und -prozessierung geeignet, besitzen in diesem Zustand aber kaum immunstimulatorische Fähigkeiten, wohingegen sich ausgereifte DZ durch eine sehr gute Immunstimulationsfähigkeit und eine hohe Zytokinproduktion auszeichnen ^{40,45,47,60}. *In vivo* wie auch *in vitro* kann die Ausreifung von DZ durch Stimulation mit TLR-Liganden wie LPS (TLR4), Poly(I:C) (TLR3), Pam₃Cys (TLR2) und R848 (TLR7/8) oder inflammatorische Zytokinen wie TNF, IFN- γ und Il-1 induziert werden ^{61,62}. Die Aktivierung der TLR setzt eine Signalkaskade in Gang, welche schließlich zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors (TF) NF- κ B und der MAP- („mitogen activated protein“) Kinasen führt. Hierbei kann die Signalweiterleitung über den Toll/IL-1 Rezeptor und den MyD88/IRAK/TRAF6-, bzw. den TRIF/TRADD/TRADD-Signalweg oder den PI3k/Akt-Signalweg erfolgen ⁶³⁻⁶⁷. Die Aktivierung von NF- κ B führt zur Transkription vieler pro-inflammatorischer Gene und ist essentiell für die DZ-Ausreifung und der erfolgreichen T-Zell Stimulation durch DZ. Neben der verstärkten Expression von DZ Reifungsmarkern wie CD83 und CCR7 („C-C chemokine receptor type 7“), kommt es nach Aktivierung von NF- κ B auch zur verstärkten Expression von MHC-Molekülen, co-stimulatorischen Molekülen wie CD40, CD80 und CD86 sowie zur gesteigerten Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen, wie etwa IL-6, IL-12 und TNF ⁶⁸⁻⁷⁰.

Pathogene sowie körpereigene apoptotische bzw. nekrotische Zellen werden ebenfalls durch Oberflächenrezeptoren wie etwa Integrin $\alpha\beta 5$ und Integrin $\alpha\beta 3$, CD36 sowie C-Typ-Lektin-, Fc γ -, „scavenger“-, Phosphatidyl-Serin- und Komplement-Rezeptoren erkannt und von den DZ mittels Phagozytose, Makropinozytose oder Endozytose aufgenommen ^{60,71-80}. Die von den DZ aufgenommenen Antigene werden

prozessiert und je nach Herkunft entweder über MHC-Klasse-I- (intrazelluläre Antigene), MHC-Klasse-II- (extrazelluläre Antigene) oder CD1-Moleküle (Lipide) präsentiert^{53,77,80–83}. Für eine erfolgreiche T-Zell-Stimulation müssen DZ und T-Zellen eine sogenannte „immunologische Synapse“ bilden. Hierbei wird der Zell-Kontakt durch einen Ring von Adhensionsmolekülen (z.B. DC-Sign) hergestellt⁸⁴. Daraufhin kommt es zum Kontakt zwischen den antigenpräsentierenden MHC-Molekülen und dem spezifischen T-Zell-Rezeptor (TZR) sowie zur Interaktion von CD28 mit den co-stimulatorischen Moleküle CD80 und CD86^{85–88}. Somit können zytotoxische T-Zellen oder T-Helfer-Zellen aktiviert werden⁸⁹.

DZ können aber nicht nur spezifische Immunantworten induzieren sondern auch für die Erhaltung der Selbst-Toleranz sorgen oder im ungünstigsten Fall auch wichtige Immunantworten unterdrücken. Vor allem unreife oder nicht zur Gänze ausgereifte dendritische Zellen scheinen bei der Erhaltung der Selbst-Toleranz eine wichtige Rolle zu spielen^{90–92}. Immunsuppressive Zytokine und Medikamente können ebenfalls zur Entstehung von Toleranz induzierenden DZ, sogenannten „tolerogenen DZ“ führen⁹³. Es ist bekannt, dass TGF- β („Transforming growth factor beta“) und IL-10 die Ausreifung von DZ verhindern und einen tolerogenen Phänotyp induzieren können^{91,93–99}. Dies kann von Tumoren als Möglichkeit zur Immunevasion ausgenutzt werden. In viele Tumoren kommt es zu einer Onkogen-induzierten Überexpression des TF STAT3 („Signal transducer and activator of transcription 3“), welche wiederum zur gesteigerten Expression von IL-10 und TGF- β führt¹⁰⁰. Nach dem Kontakt mit IL-10 und TGF- β kann in DZ eine reduzierte Expression von Chemokinrezeptoren sowie von MHC- und co-stimulatorischen- Molekülen festgestellt werden. Ebenso kommt es zu einer verringerten Sekretion der immunstimulatorischen Zytokine TNF, INF- γ , IL-1, IL-6 und IL-12. Darüber hinaus zeigt sich eine gesteigerte Expression von immunsuppressiven Oberflächenmolekülen wie PD-L1/2 („Programmed Death Ligand 1/2“) und Osteoactivin sowie eine erhöhte Produktion des immunsuppressiven Zytokins IL-10. Was wiederum zu T-Zell Anergie und auch zur Induktion von regulatorischen T-Zellen (Treg) führt^{98,101,102}. Diese gravierenden tolerogenen Effekte können zum Teil mit der Inhibition des, für die Ausreifung der DZ wichtigen, PI3k-Akt-Signalwegs und des TF NF- κ B durch IL-10 erklärt werden^{99,103,104}. Auch beim Einsatz von immunsuppressiven Medikamenten wie Glucocorticosteroiden, Vitamin D3 und Rapamycin oder zur CML-Therapie eingesetzten BCR-ABL-TKI (5.2) können diese Effekte beobachtet werden^{37,105–107}.

5.4 Immuntherapie

Schon in den 70iger Jahren des letzten Jahrhunderts wurde versucht eine auf CML gerichtete Antikörperantwort mittels einer Kombination aus bestrahlten Myeloblasten und einem BCG (Bacille Calmette Guerin) Impfstoff zu erreichen ¹⁰⁸. Erste Arbeiten zum Einsatz von DZ in der Immuntherapie wurden bereits 1996 veröffentlicht. Bis zur Zulassung einer DZ-basierten Krebstherapie sollten aber noch über 10 Jahre vergehen. Am 29. April 2010 wurde schließlich Dendreon's Provenge von der FDA zur Behandlung von Prostata Krebs zugelassen. Hierdurch konnte erstmals gezeigt werden, dass Krebs Vakzinierung eine therapeutisch sinnvolle Ergänzung zu bisherigen Behandlungsmethoden darstellt ¹⁰⁹. Ziel der DZ-basierten CML-Therapie ist die Eliminierung der durch die TKI-Behandlung nicht erfassten Krebszellen. Die Analyse des Einflusses von TKI auf das Immunsystem ist daher bei der Entwicklung einer solchen Behandlung unerlässlich ³⁸.

Die Hauptschritte bei der therapeutischen Induktion einer Immunantwort gegenüber Tumorzellen sind (1.) das Beladen der APZ mit Tumorantigen(en) *in vitro* oder *in vivo*, (2.) die Präsentation von Antigen(en) in der entsprechenden immunstimulatorischen Umgebung, (3.) die Induktion und Aktivierung von zytotoxischen und Helfer-T-Lymphozyten sowie (4.) die Umgehung autoregulatorischer Kontrollmechanismen, bzw. die Blockierung der Tumorummunevasion.

Am gebräuchlichsten ist der Einsatz von *ex vivo* angereicherten oder *in vitro* generierten DZ. Die *in vitro* Generierung von moDZ wird wegen ihrer hohen Reproduzierbarkeit oft bevorzugt. Spezielle „Zytokin-Cocktails“ sowie der Einsatz von viralen Vektoren und RNA Transfektion bietet die Möglichkeit zur Generierung von maßgeschneiderten moDZ ^{109,110}. Die *in vivo* Antigenbeladung der DZ ist zwar schwieriger zu realisieren, wird aber oft als Strategie der Zukunft angesehen ¹¹¹. Das Hauptproblem ist hierbei die gezielte Bereitstellung der Antigene. Eine elegante Lösung dieses Problems besteht in der Verwendung von Antigen-Antikörper Konjugaten, welche spezifisch an DZ Rezeptoren binden können ¹¹². Antigene können den DZ in unterschiedlicher Form bereitgestellt werden. Anfänglich wurden hauptsächlich Tumorlysat oder auch bestrahlte Tumorzellen verwendet. Mittlerweile werden vor allem mRNA, DNA, sowie Peptide und Proteine verwendet.

Die Verwendung von mRNA und Plasmid DNA (pDNA) besitzt den Vorteil, dass mRNA und pDNA selbst einen guten Ausreifungsstimulus darstellen und von den DZ über TLR 7 und 8 (mRNA) bzw. TLR9 (pDNA) erkannt werden ^{38,111,113}. DNA Vakzine zur Therapie von CML wurden bereits *in vitro* und auch in Mäusen getestet

unterliegen aber auf Grund der Gefahr einer Integration ins Wirtsgenom strengen Regularien.

Zur CML Immuntherapie wurden auch Peptid TAA, von spezifischen Fusionsproteinen wie z.B. BCR-ABL und PML-RAR α oder überexprimierten Selbstantigenen, wie WT1, Proteinase-3, PRAME und RHAMM in Betracht gezogen ³⁸. Peptide können unter kontrollierten GMP Bedingungen hergestellt werden und sind darüber hinaus sicher und einfach zu applizieren. Ihr einziger Nachteil besteht in Ihrer Einschränkung auf bestimmte HLA-Allele. Diese Einschränkung kann aber durch den sogenannten „Tübingen Ansatz“ (auch bekannt als XPRESIDENT) umgangen werden. Hierbei wird durch die patientenspezifische Analyse von Expressionsprofilen, HLA-Peptid-Präsentation und T-Zell-Untersuchungen eine für jeden Patienten individuelle Vakzinkomposition erstellt ¹¹⁴.

Die Bereitstellung der Antigene allein ist für die Induzierung einer starken Immunantwort aber nicht ausreichend. Es muss auch für einen ausreichenden Ausreifungsstimulus gesorgt werden. Wegen seiner guten Verträglichkeit wird hierzu meist GM-CSF eingesetzt. Erfolgreich wurden auch schon IL-2, IL-7, IL-12, nichtmethyliertes CpG oder Lipopolysaccharide (LPS) verwendet ³⁸. Wie wichtig dies ist, konnte in einer Mage-A3 Studie gezeigt werden. Hier stellte sich heraus, dass eine Antigenbereitstellung ohne adäquate Ausreifung der DZ zur Induzierung von Toleranz führte ¹¹⁵.

Für eine erfolgreiche Immuntherapie muss die Induzierung von Toleranz unter allen Umständen verhindert werden. Dies erfordert die Blockierung autoregulatorischer Kontrollmechanismen und die Umgehung der Tumor Immunevasion. Ein Beispiel für die erfolgreiche Blockierung von Tumor Immunevasionsmechnismen ist der Einsatz des STAT3-Inhibitors Cucurbitacin I. In viele Tumoren kommt es zu einer Onkogen-induzierten Überexpression des TF STAT3 („Signal transducer and activator of transcription 3“), welche wiederum zur gesteigerten Expression von IL-10 und TGF- β führt ¹⁰⁰. Wie schon in 5.3.2 bemerkt, kommt es dadurch zur Induktion von tolerogenen DZ und Treg sowie zu T-Zell-Anergie. Dies kann durch den Einsatz des STAT3-Inhibitors Cucurbitacin I verhindert werden ^{116,117}. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit zur Blockade von „Immune Checkpoint“-Molekülen wie PD-(L)1 („Programmed death (ligand)-1“) oder CTLA-4 („cytotoxic T-lymphocyte antigen-4“). Normalerweise verhindern „Immune Checkpoint“-Moleküle eine Überreaktion des Immunsystems und vermeiden somit Auto-Immunreaktionen und die Schädigung von umliegendem Gewebe ¹¹⁸. CTLA-4 wirkt als Gegenspieler zu CD28 und verhindert

durch seine höhere Affinität zu CD80 und CD86 eine Bindung der co-stimulatorischen Moleküle an CD28¹¹⁹. Außerdem inhibiert CTLA-4 die T-Zell-Rezeptor-Signalweiterleitung durch die Rekrutierung der Phosphatase SHP2 („Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11“)¹²⁰. Dies verhindert hauptsächlich die Aktivierung von T-Helfer-Zellen¹²¹. Darüber hinaus kann CTLA-4 die immunsuppressiven Eigenschaften von Treg steigern¹²². PD-1 wird von T-Zellen, NK-Zellen und B-Zellen exprimiert und kann durch Bindung seiner Liganden PD-L1/2 aktiviert werden. Wie CTLA-4 scheint auch PD-1 Einfluss auf Tregs zu haben und deren Proliferation zu unterstützen¹²³. Desweiteren blockieren CTLA-4 und PD-1 die T-Zell-Aktivierung durch Inhibition des PI3K/Akt-Signalwegs¹²⁴. Diese immunsuppressiven Eigenschaften könne von einigen Tumoren dazu ausgenutzt werden dem Immunsystem zu entgehen. So können Melanome, Mamma- und Lungenkarzinome sowie Lymphome PD-L1 oder CTLA-4 exprimieren wodurch eine effektive Immuntherapie verhindert werden kann^{118,125,126}. Aus diesem Grund besitzt der Einsatz von „Immune Checkpoint“-Inhibitoren wie dem PD-1 Inhibitor Nivolumab oder dem CTLA-4 Inhibitor Ipilimumab, enormes Potential zur Verbesserung von vielen immuntherapeutischen Ansätzen. Was zur Entwicklung immer neuer „Immune Checkpoint“-Inhibitoren führt. So werden bereits mehrere Inhibitoren gegen PD-1, PD-L1, CTLA-4, KIR („killer cell immunoglobulin-like receptor“), IDO1 („indoleamine 2,3-dioxygenase 1“), LAG3 („lymphocyte activation gene 3 protein“) und 4-1BB in klinischen Studien getestet¹²⁷.

Eine weitere Möglichkeit zur Unterdrückung von Toleranz, ist die Auslöschung von Treg durch den Einsatz von AK oder Cyclophosphamid¹²⁸⁻¹³⁰. Vor allem bei der Treg-Depletion mittels AK wurde deutlich, dass die Dosierung und zeitliche Abstimmung von AK und Vakzinierung mit DZ von großer Bedeutung ist¹²⁸.

5.5 Osteoactivin (GNMB / DC-HIL / HGFIN)

Osteoactivin (OA) auch als GPNMB, DC-HIL oder HGFIN bekannt, ist ein hochglykosiliertes Transmembranprotein, in dessen extrazellulärer Region ein Heparin binde-Motiv, eine Signal Sequenz sowie eine RGD (Arg-Gly-Asp) Integrinbinde Domäne und eine Immunglobulin-ähnliche „Polycystic Kidney Disease Domain“ (PKD) zu finden sind. Seiner relativ kurze Zytoplasma-Seite weist zwei lysosomale Ziel-Motive sowie ein ITAM auf¹³¹⁻¹³⁴. Bisher wurden 2 Isoformen von OA mit einer Länge von 572 Aminosäuren (AS) (Isoform A), bzw. 560 AS nachgewiesen (Isoform

B) ¹³⁵. Für Isoform A wurde ein Molekulargewicht von ca. 64 kDa vorhergesagt, welches im Western Blot (WB) durch 13 mögliche Glykosylierungsstellen auf über 120 kDa ansteigen kann ¹³².

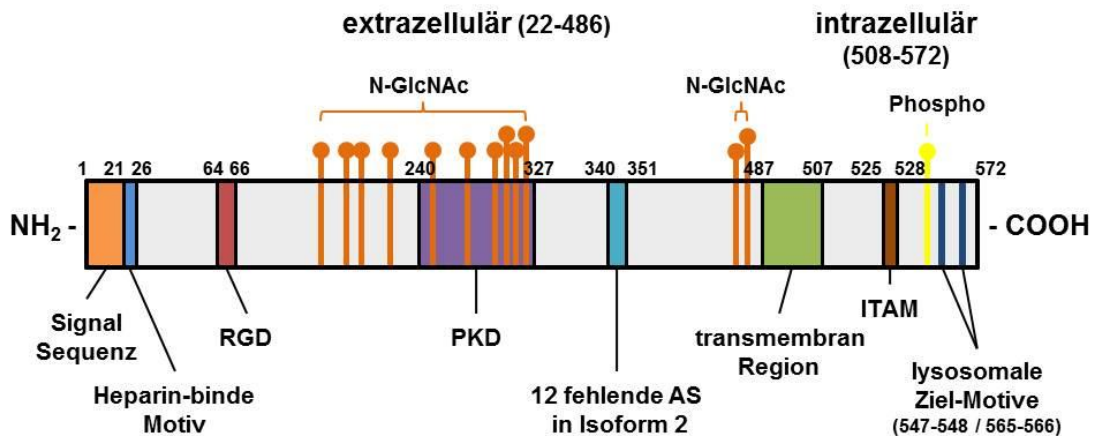


Abb. 6: Schematische Darstellung von Osteoactivin. Die 13 bekannten Glykosylierungen (N-GlcNAc) sind als orange Kugeln dargestellt. Die Phosphorylierung als gelbe Kugel. RGD = Integrin-binde Domäne mit der AS Sequenz Arg-Gly-Asp. PKD = „Polycystic Kidney Disease Domain“. ITAM = „Immunotyrosine based activation motif“.

OA kann auf der Zelloberfläche, wie auch in Zytoplasmafraktionen gefunden werden ¹³¹. Darüber hinaus kann es in den unterschiedlichsten Geweben und Zelltypen nachgewiesen werden. Unter Anderem wird es in Skelettmuskeln, Leber, Knochen, Thymus und Gehirn, wie auch in Osteoblasten und Osteoklasten exprimiert ^{132,136,137}. Interessanterweise wird es in einigen Tumoren wie z.B. Melanomen, Prostata- und Mammakarzinomen sowie Glioblastomen überexprimiert ¹³⁸⁻¹⁴¹. Dies macht es zu einem interessanten Therapieziel, wogegen bereits Antikörper-Medikament-Konjugate entwickelt wurden ¹⁴²⁻¹⁴⁶. Desweiteren kann es auch auf APZ, wie Makrophagen und DZ nachgewiesen werden ^{131,141,147,148}. Es ist bekannt, dass OA zur Knochenmineralisierung sowie Differenzierung von Osteoblasten und Osteoklasten beiträgt und auch eine Rolle bei Zelladhäsion und Proliferation spielt ^{131,132,137,149}. Darüber hinaus haben *Chung et al.* 2007 gezeigt, dass OA eine immunsuppressive Wirkung aufweist, ähnlich derer von „Immune Checkpoint“-Molekülen wie z.B. PD-L1 oder CTLA-4 ^{118,121,124,125,134,150,151}. OA bindet mittels seiner Immunglobulin-ähnlichen PKD an Syndecan (SD)-4 auf aktivierten T-Zellen und hemmt somit deren Zytokinproduktion, Eintritt in die S-Phase und anti-CD3 Antwort ^{134,151}.

Dementsprechend konnte durch einen SD-4 „Knock-down“ und SD-4 blockierende Antikörper eine gesteigerte T-Zellantwort erzielt werden ¹³⁴. Desweiteren wurde gezeigt, dass die OA-Expression von den immunsuppressiven Zytokine TGF- β und IL-10 gesteigert werden kann ^{99,151}. Interessant ist hierbei, dass diese beiden Zytokine dafür bekannt sind den DZ-Phänotyp von immunstimulierend zu immuninhibierend (tolerogen) ändern zu können. In Osteoklasten und Melanoblasten wird die OA-Expression durch den „Microphthalmia-associated transcription factor“ (MITF) kontrolliert ^{138,152}. Darüber hinaus gibt es auch Hinweise auf eine Expressionskontrolle von OA durch p53 ^{140,153}. Bisher wurde die Regulation von Osteoactivin in DZ nicht untersucht.

5.6 Microphthalmia-associated Transcription Factor (MITF)

MITF gehört zur Familie der „basic helix-loop-helix-leucine-zipper“ (bHLH-Zip), bzw. „E-Box-binding“ Transkriptionsfaktoren (TF) und spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung von Melanozyten sowie Osteoklasten ^{152,154–156}. Mutationen in MITF führen zu einer verringerten Anzahl von Mast- und NK-Zellen, sowie zu Osteoporose, Taubheit und Pigmentierungsstörungen von Augen, Haut und Haaren ¹⁵⁴. Im Menschen können MITF-Mutationen zum Waardenburg Syndrom Typ 2 und zum Tietz Syndrom führen ^{154,157,158}. Bisher wurden 12 MITF-Isoformen identifiziert, welche durch alternative Transkription sowie alternatives Splicen entstehen und teilweise sehr gewebespezifisch exprimiert werden ^{159–161}. Am ausgiebigsten wurde MITF bisher in Melanozyten und Melanom Zellen untersucht. Zu den wichtigsten MITF-aktivierenden Signalwegen gehören hier, der „extracellular stimulus-regulated kinase“ (Erk)-Signalweg und der Akt-Signalweg (Abb.7) ^{162–165}. Die Aktivierung von MITF über den Erk-Signalweg führt nur zu einer transienten Aktivierung des TF, da die Phosphorylierung (P) von Serin 73 durch Erk und Serin 409 durch die „Ribosomal protein S6 kinase alpha-1“ (RSK-1) auch zu einer Ubiquitinierung und der darauffolgenden proteasomalen Degradation des TF führt ^{165,166}. Dahingegen kommt es zu einer effektiven Transkription von MITF kontrollierten Genen nach Aktivierung des TF durch die Glykogen-Synthase-Kinase-3- β (GSK3- β). GSK3- β ist Teil des Akt-Signalwegs und phosphoryliert MITF an Serin 298 ^{164,165}. GSK3- β liegt im Akt-Signalweg direkt „unter“ Akt und kann von diesem durch die Phosphorylierung von Serin 9 inhibiert werden ¹⁶⁷. In der Melanogenese führt cAMP zu einer gesteigerten MITF Aktivität nach Inhibition des Akt-Signalwegs auf Höhe von PI3K ¹⁶⁵. Interessanterweise führt die Phosphorylierung von MITF im Western Blot zu einem

„Shift“, wodurch der phosphorylierte und somit aktivierte TF im Gel langsamer läuft¹⁶⁸. Bisher konnten über 80 verschiedene MITF-Zielgene mit den unterschiedlichsten Funktionen identifiziert werden, zu welchen auch OA gehört^{138,152,169}.

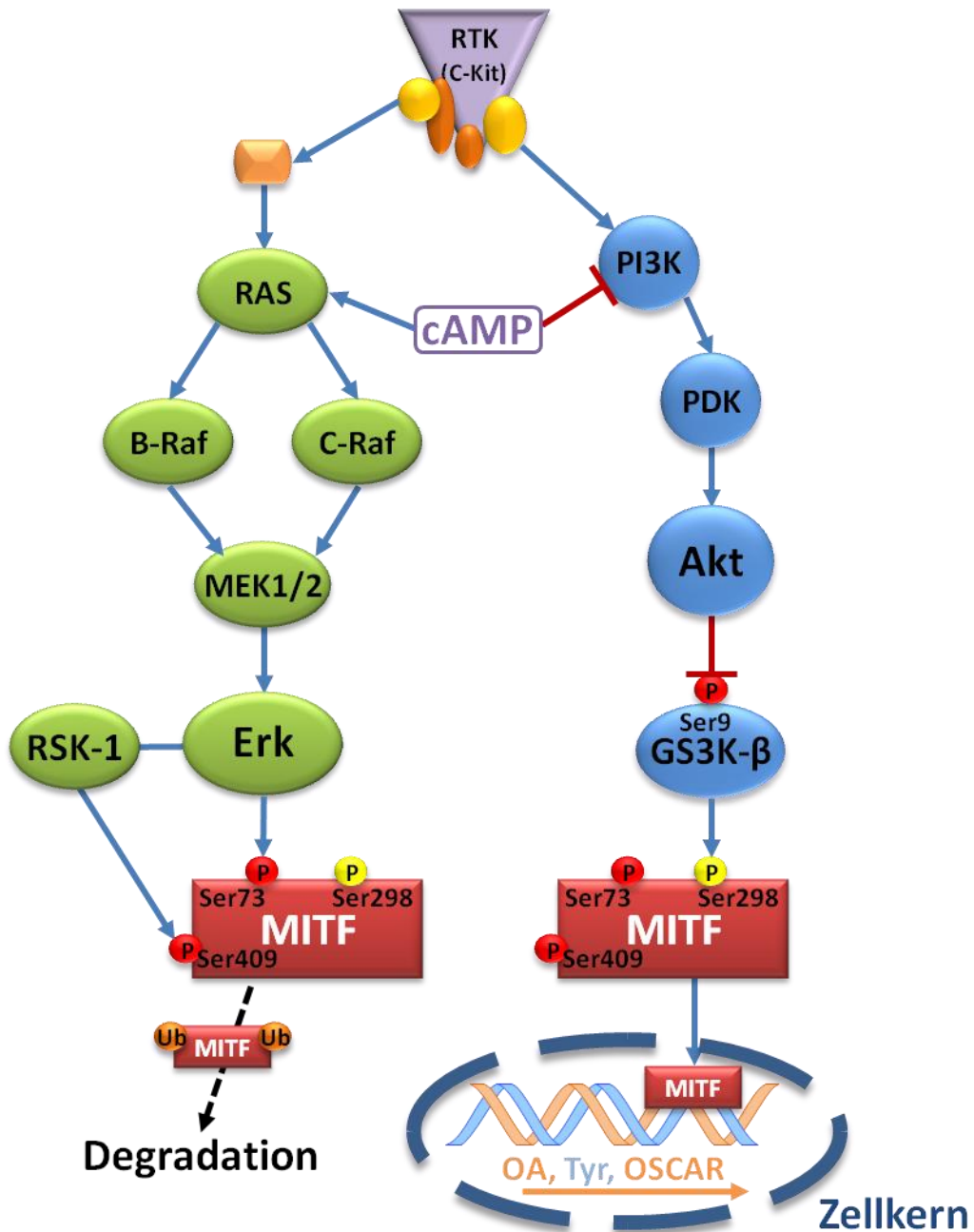


Abb. 7: Schematische Darstellung MITF aktivierender Signalwege. Der RAS/Erk-Signalweg ist in grün dargestellt und der PI3K/Akt-Signalweg in blau. Aktivierende Phosphorylierungen sind als gelbe P dargestellt, inaktivierende oder transient aktivierende als rote P. Ubiquitinierungen als orange Ub. Tyr = „Tyrosinase“, OSCAR = „Osteoclast-associated immunoglobulin-like receptor“, RSK-1 = „Ribosomal protein S6 kinase alpha-1“, PDK = „phosphoinositide dependent protein kinase-1“

6 MATERIAL UND METHODEN

6.1 Material

6.1.1 Geräte

Geräte	Hersteller
Brutschrank Function line	Heraeus instruments, Hanau, D
Durchflusszytometer FACS Calibur	BD Biosciences, Heidelberg, D
Dynatech MR7000 ELISA Reader	Dynatech Laboratories, Chantilly, USA
Elektronikrührer Variomag	H+P Labortechnik, Thermo Fischer Scientific, Schwerte, D
Gefrierschrank -20°C	Liebherr, Biberach an der Riss, D
Gefrierschrank -80°C	Thermo Fischer Scientific, Schwerte, D
Kühlschrank 4°C	Liebherr, Biberach an der Riss, D
LightCycler® Carousel-Based System	Roche, Mannheim, D
LKB Wallac 1205 Betaplate® Liquid Scintillation Counter	Perkin Elmer Wallac GmbH, Freiburg, D
Mikroskop Hund Wilovert S H500	Helmut Hund GmbH, Wetzlar, D
Minishaker MS2	IKA®-Werke GmbH & Co. KG
Mr. Frosty Einfrierhilfe	Thermo Fischer Scientific, Schwerte, D
Multistepper Handy Step	Brand GmbH+CO KG, Wertheim, D
Multistepper Multipette® Plus	Eppendorf, Hamburg, D
Nanodrop 2000	Thermo Fischer Scientific, Schwerte, D
Neubauer Zählkammer Improved Bright-Line	Brand, Wehrheim, D
Odyssey Scanner	LI-COR, Bad Homburg, D
Pipetten Satz	Eppendorf, Hamburg, D
Pipettierhilfe Pipet boy acu	Integra biosciences AG, Fernwald, D
QuadroMACS™ Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
Skatron Combi Cell Harvester	Nunc GmbH, Wiesbaden, D
Sterilbank Lamin Air	Heraeus instruments, Hanau, D
Wasserbad Haake W13	Thermo Fischer Scientific, Schwerte, D
Zentrifuge Fresco 17	Heraeus instruments, Hanau, D
Zentrifuge Megafuge 1.0 R	Heraeus instruments, Hanau, D

Geräte	Hersteller
Gammacell 1000	Atomic Energy of Canada Limited, Ottawa, C

6.1.2 Software

Software	Hersteller
CellQuest Pro	BD Biosciences, Heidelberg, D
FlowJo 7.6.4 für Windows	Tree Star, Inc., Ashland, OR, USA
Graph Pad Prism 5.0	Graph Pad Software
Biolynx™ 2.0 ELISA Reader	Dynatech Laboratories, Chantilly, USA
Odyssey Infrared imaging System 3.0.16	LI-COR, Bad Homburg, D

6.1.3 Kits

Kits	Hersteller
Human IL-6 ELISA Kit	BD Biosciences, Heidelberg, D
Human IL-10 ELISA Kit	BD Biosciences, Heidelberg, D
Human TGF- β ELISA Kit	R&D, Wiesbaden, D
Pierce® BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Schwerte, D
Dead Cell Removal Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
CD209 MicroBead Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
CD14 MicroBead Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
Nuclear/Cytosol Fractionation Kit	BioVison, Milpitas, CA, USA
OA Labelling Kit	Innova Biosciences, Cambridge, UK

6.1.4 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Combitips plus 5 ml, 2,5 ml, 0,5 ml	Eppendorf, Hamburg, D
Conical Tubes, 15 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Conical Tubes, 50 ml, BD Falcon™	BD Biosciences, Heidelberg, D
Cryo Tube Vials, 2 ml	Nunc GmbH, Wiesbaden

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
FACS Röhrchen 5 ml Polystyrene Round bottom Tube	BD Biosciences, Heidelberg, D
Filter Tips	Biozym, Hessisch Oldendorf, D
Gewebekulturflaschen 25cm ² , 75 cm ²	BD Biosciences, Heidelberg, D; Corning Cambridge, MA, USA
LS Columns	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
Multiwell Platten 6 Well	BD Biosciences, Heidelberg, D
Multiwell Platten 96 well, unsteril	Nunc GmbH, Wiesbaden
Multiwell Platten, 24 und 96 Well	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Nitrozellulosemembran	Whatman GmbH, Dassel, D
Pasteurpipetten, steril	Roth, Karlsruhe, D
Pipetten Stripette Costar 5, 10, 25 ml	Sigma Aldrich, St. Louis
Pipettenspitzen 2, 200, 1000 µl	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, D
Reaktionsgefäß 1,5 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Reaktionsgefäß Safe Lock 2 ml	Eppendorf, Hamburg, D

6.1.5 Chemikalien, Medien, Puffer

Chemikalien	Hersteller
APS	Bio-Rad, München, D
Aqua ad iniectabilia	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Assay Diluent für ELISA	BD Biosciences, Heidelberg, D
Badstabil	Neolab, Heidelberg, Deutschland
Biocoll Separating Solution	Biochrom AG, Berlin, D
Bromphenolblau	Sigma, Steinheim, D
Carbonat Bicarbonat Puffer	Sigma, Steinheim, D
Dimethylsulfoxid Cryo-sure	WAK-Chemie Medical GmbH, Steinbach, D
Dimethylsulfoxid für die Zellkultur	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Dulbecco's PBS (1x)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, A
EDTA	Sigma, Steinheim, D
Ethanol 99%, vollständig vergällt	SAV-Liquid Production GmbH, Flintsbach, D

Chemikalien	Hersteller
FACS Fixierlösung Formalin Solution 10%	Sigma, Steinheim, D
FACS Flow, Clean, Rinse	BD Biosciences, Heidelberg, D
FCS	PAA Laboratories, Cölbe, D
Fix Perm + Diluent	eBioscience, Frankfurt am Main, D
Glycerol	Roth, Karlsruhe, D
Glycin	Roth, Karlsruhe, D
HCl	Merck, Darmstadt, D
HEPES	Sigma, Steinheim, D
MACS BSA Stock Solution	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
NaOH	Merck, Darmstadt, D
Perm Puffer	eBiosciences, Frankfurt am Main, D
Polyacrylamid	Applichem GmbH, Darmstadt, D
Protease-, Protease/Phosphatase-Inhibitor Cocktail	Thermo Fischer Scientific, Schwerte, D
Reagent Diluent für ELISA	R&D, Wiesbaden, D
RIPA Puffer	Thermo Fischer Scientific, Schwerte, D
RPMI, GlutaMAX, HEPES	Invitrogen, Karlsruhe, D
Schwefelsäure	Merck, Darmstadt, D
Scintillationsflüssigkeit Ultima Gold	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
SDS	Roth, Karlsruhe, D
Substrat ELISA	Medac, Wedel, D
TEMED	SERVA GmbH, Heidelberg, D
Trizma® base	Sigma, Steinheim, D
Trypanblau 0,4 %	Sigma, Steinheim, D
X-vivo 20	Lonza, Köln, D
β-Mercaptoethanol	Sigma, Steinheim, D
BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder	Thermo Fischer Scientific, Schwerte, D

6.1.6 Primer

Ziel	Vorwärts-Primer	Rückwärts-Primer	Sonde
GPNMB	5'-tgcgtccgtgagaattcag-3'	5'-ccagcacatcatgaaatcgt-3'	Univ. ProbeLibrary probe #68 (Roche)
MITF	5'-ggagcttccaaaacaagcag-3'	5'-acaagtgtgctccgtctcttc-3'	Univ. ProbeLibrary probe #68 (Roche)
G6PDH	5'-gcaaacagagtgagcccttc-3'	5'-ggccagccacataggagtt-3'	Univ. ProbeLibrary probe #65 (Roche)

6.1.7 Antikörper

6.1.7.1 AK verwendet in der Durchflusszytometrie

Antigen	Fluoreszenz	Klon	Isotyp	Spezies	Hersteller	Verdünnung
CD1a	FITC	HI149	IgG1	Maus	BDBiosciences	1:20
CD1a	APC	703217	IgG1	Maus	R&D	1:20
CD1c	APC	HI149	IgG1	Maus	Biologend	1:25
CD4	FITC	RPA-T4	IgG1	Maus	eBioscience	1:100
CD14	FITC	M5E2	IgG2a	Maus	BDPharmingen	1:20
CD14	PerCP	MφP9	IgG2a	Maus	BDBiosciences	1:25
CD14	PerCP-Cy5.5	61D3	IgG1	Maus	eBioscience	1:40
CD80	FITC	2D10.4	IgG1	Maus	eBioscience	1:20
CD80	PE	2D10.4	IgG1	Maus	eBioscience	1:40
CD83	FITC	HB15e	IgG1	Maus	Biologend	1:25
CD83	PE	HB15e	IgG1	Maus	BDPharmingen	1:25
CD83	PE	HB15e	IgG1	Maus	eBioscience	1:100
CD86	FITC	2331	IgG1	Maus	BDPharmingen	1:25
CD86	APC	2331	IgG1	Maus	BDPharmingen	1:50
CD127	APC	eBioRD R5	IgG1	Maus	eBioscience	1:40
CD209 (DC-Sign)	PE	120507	IgG2b	Maus	R&D	1:100
CD209 (DC-Sign)	PerCP	120507	IgG2b	Maus	R&D	1:20

Antigen	Fluoreszenz	Klon	Isotyp	Spezies	Hersteller	Verdünnung
CD209 (DC-Sign)	PerCP-Cy5.5	eB-h209	IgG2a	Ratte	eBioscience	1:40
CD209 (DC-Sign)	APC	DCN46	IgG2b	Maus	BDPharmingen	1:50
FoxP3	PE	PCH101	IgG2a	Ratte	eBioscience	1:40
HLA-DR	APC	LN3	IgG2b	Maus	eBioscience	1:40
HLA-DR	FITC	L243	IgG2a	Maus	eBioscience	1:40
IgG1	FITC	X40	IgG1	Maus	BDBiosciences	1:200
IgG1	PE	P3.6.2.8.1	IgG1	Maus	eBioscience	1:200
IgG1	PE	X40	IgG1	Maus	BDBiosciences	1:200
IgG1	APC	11711	IgG1	Maus	R&D	1:100
IgG1	PerCP-Cy5.5	MOPC-21	IgG1	Maus	biolegend	1:40
IgG1	PerCP-Cy5.5	P3.6.2.8.1	IgG1	Maus	eBioscience	1:800
IgG2b	PerCP	133303	IgG2b	Maus	R&D	1:100
IgG2b	PE	MAB004	IgG2b	Maus	R&D	1:100
IgG2b	PE	eBMG2b	IgG2b	Ratte	eBioscience	1:200
OA	PE	303822	IgG2b	Maus	R&D	1 µg / 100 µl

6.1.7.2 AK verwendet im Western Blot

Antigen	Fluoreszenz	Klonalität	Spezies	Hersteller	Verdünnung
OA	-	polyklonal	Ziege	R&D	0,1 µg / ml
Akt Pan specific	-	monoklonal	Maus	R&D	0,2 µg / ml
Phospho Akt (S473)	-	monoklonal	Hase	CellSignaling	1:2000

Antigen	Fluoreszenz	Klonalität	Spezies	Hersteller	Verdünnung
GSK-3-alpha/beta	-	monoklonal	Hase	CellSignaling	1:2000
Phospho-GSK-3-alpha/beta (S21/9)	-	polyklonal	Hase	CellSignaling	1:1000
MITF	-	polyklonal	Hase	Abcam	1 µg / ml
HDM2	-	polyklonal	Hase	CellSignaling	1:1000
Aktin	-	monoklonal	Hase	LI-COR	1:1000
GAPDH	-	polyklonal	Hase	Millipore	1:10.000
GAPDH	-	monoklonal	Maus	RnD	1:10.000
Histone	-	polyklonal	Hase	CellSignaling	1:1000
α-Hase	IRDye 680	monoklonal	Esel	LI-COR	1:20.000
α-Maus	IRDye 680 RD	monoklonal	Esel	LI-COR	1:20.000
α-Hase	IRDye 800 CW	monoklonal	Esel	LI-COR	1:20.000
α-Ziege	IRDye 800 CW	monoklonal	Esel	LI-COR	1:20.000
α-Maus	IRDye 800 CW	monoklonal	Esel	LI-COR	1:20.000

6.1.8 Zytokine, TKI, spez. Inhibitoren, TLR-Liganden und rekombinante Proteine

Substanz	Stockkonz.	Arbeitsvol.	Endkonz.	Hersteller
IL-4	10 µg/ml in X-vivo 20	2 µl/ml	20 ng/ml	R&D Systems, Wiesbaden, D
IL-10	5 µg/ml in PBS	2 µl/ml	10 ng/ml	R&D Systems, Wiesbaden, D
GM-CSF	50 µg/ml in Aqua ad iniectabilia	2 µl/ml	100 ng/ml	Bayer HealthCare Pharmaceuticals, Richmond, USA
TNF	10 µg/ml in X-vivo 20	1 µl/ml	10 ng/ml	R&D Systems, Wiesbaden, D
INF-γ	100 µg/ml in Aqua ad iniectabilia	1 µl/ml	10 µg/ml	R&D Systems, Wiesbaden, D
CD40L	100 µg/ml in PBS	100 ng/ml	100 ng/ml	tebu-Bio, Le-Perray-en-Yvelines, F
Imatinib	10 mM in DMSO	0,3 µl/ml	3 µM	Cayman Chemical Company, Biomol, Hamburg, D

Substanz	Stockkonz.	Arbeitsvol.	Endkonz.	Hersteller
Nilotinib	10 mM in DMSO	0,3 µl/ml	3 µM	Cayman Chemical Company, Biomol, Hamburg, D
Dasatinib	10 µM in DMSO	0,1 µl/ml	10 nM	Selleckchem, München, D
Akt-Inh., MK2206;	1 mM in DMSO	0,3 µl/ml	300 nM	Selleckchem, München, D
Erk-Inh., FR180204	1 mM in DMSO	0,3 µl/ml	300 nM	Calbiochem, Merck Millipore, Darmstadt, D
MITF-Inh., ML329	1 mM in DMSO	0,2 - 2 µl/ml	200 nM - 2000 nM	Glix Laboratories, Southborough, MA, USA
KLF5-Inh., CID	1 mM in DMSO	0,2 - 2 µl/ml	200 nM - 2000 nM	Calbiochem, Merck Millipore, Darmstadt, D
PI3K-Inh., LY294002	500 µM in DMSO	0,2 µl/ml	100 nM	Cayla - InvivoGen, Toulouse, F
c-Raf-Inh., 553003	100 µM in DMSO	0,2 µl/ml	20 nM	Calbiochem, Merck Millipore, Darmstadt, D
Pam ₃ Cys, TLR2L	1 mg/ml in Aqua ad iniectabilia	5 µl/ml	5 µg/ml	EMCMicrocollection, Tübingen, Germany
Poly I:C, TLR3L	10mg/ml in Aqua ad iniectabilia	5 µl/ml	50 µg/ml	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany
LPS, TLR4L	1 mg/ml in PBS	0,1 µl/ml	100 ng/ml	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany
R848, TLR7/8L	1 mg/ml in PBS	2 µl/ml	2 µg/ml	InvivoGen, San Diego, USA
Syndecan 4, SD-4	5 µg/ml	2 - 8 µl/ml	5 - 20 µg/ml	R&D Systems, Wiesbaden, D
Klotho β	5 µg/ml	2 - 8 µl/ml	5 - 20 µg/ml	R&D Systems, Wiesbaden, D

6.1.9 Zusammensetzung von Puffer, Lösungen und Medien

6.1.9.1 Zellkultur Medien

RPMI Medium:

500 ml RPMI

50 ml FCS

10 ml Pen/Strep

6.1.9.2 Puffer und Lösungen für die DNA-Gelelektrophorese

Ladepuffer für Agarosegele:

0,04% (w/v) Bromphenolblau

50% (w/v) Glycerin

Agarose-Gel (1%):

5,0 g Agarose

500 ml TAE-Puffer

6.1.9.3 Puffer und Lösungen für Zellyse und SDS-Gelelektrophorese

Zellyse-Puffer:

100 µl RIPA Puffer

1 µl Protease Inhibitor oder

1 µl Protease/Phosphatase Inhibitor

Blot-Puffer:

3,03 g Trizma® base

14,4 g Glyzin

200 ml Methanol p.a.

800 ml H₂O_{bidest.}

10 x SDS-Gel Lauf-Puffer (Laemmli):

30,3 g Trizma® base

144 g Glyzin

10 g SDS

1 l H₂O_{bidest.}

Block-Puffer (3x wiederverwendbar):

20 ml Odyssey Blocking Buffer

20 ml PBS

0,1 – 0,2% (w/v) Tween 20 (nur bei stark exprimierten Proteinen, bzw. bei starkem Hintergrund)

2x SDS-Gel Lade-Puffer (10 ml):

3,55 ml H₂O

1,25 ml 0,5 M Tris-HCl, pH 6.8

2,5 ml Glycerol

2,0 ml 10% (w/v) SDS

0,2 ml 0.5% (w/v) Bromophenolblau

0,5 ml β-Mercaptoethanol

1. AK-Lösung:

20 ml Block-Puffer

0,1 – 0,2% (w/v) Tween 20

0,001% (w/v) NaN₃

protein-/phosphorylierungsspezifischer AK

Wasch-Puffer:

500 ml PBS

0,1 – 0,2% (w/v) Tween 20

2. AK-Lösung:

20 ml Block-Puffer

0,1 – 0,2% (w/v) Tween 20

0,01 – 0,02% (w/v) SDS

speziesspezifischer 2. AK

6.1.9.4 Puffer und Lösungen für die Durchflusszytometrie

MACS-Puffer:

497,1 ml PBS
2,5 ml BSA (0,5 %)
2 ml EDTA 500 mM (2 mM)

FACS-Puffer:

475 ml PBS
12,5 ml BSA (2,5%)

Lebend-/Tot-Farbstoff-Lösung:

0,25 µl Lebend-/Tot-Farbstoff
100 µl PBS

Block-Puffer / FACS-Röhrchen:

5 µl MACS Block-Lösung
45 µl FACS-Puffer

6.2 Methoden

6.2.1 Aufreinigung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) („peripheral blood mononuclear cells“)

Zur Isolation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes wurden Buffy Coats und Thrombozytenkegel verwendet, welche von der Blutspendezentrale Tübingen zur Verfügung gestellt wurden. Buffy-Coats sind Reste aus einer Erythrozytenspende und sogenannte Kegel sind die Überreste einer Thrombozytenspende. Die Isolierung der Monozyten erfolgt über eine Dichtegradientenzentrifugation mittels Ficoll. Ficoll ist eine Mischung aus Sucrose und Epichlorhydrin mit einer Dichte von 1,077 g/ml. Erythrozyten und Granulozyten weisen eine höhere Dichte als PBMCs auf und passieren im Zentrifugationsschritt die Polymerschicht. PBMCs hingegen verbleiben wegen ihrer geringeren Dichte als Zellschicht auf dem Ficoll, wo sie leicht abgenommen werden können.

Das Blut wird mit „phosphat buffered saline“ (PBS) verdünnt und auf ein Volumen von 120 ml je Buffy Coat, bzw. Thrombozytenkegel aufgefüllt. Das Blut-PBS-Gemisch wird danach auf vier 50-ml-Röhrchen aufgeteilt. Hierbei wird eine vorgelegte 12 ml Ficoll-Lösung mit je 30ml Blut-PBS-Gemisch überschichtet und danach in der Megafuge bei 677 g (1800 U/min) 15 Minuten ohne Bremsfunktion zentrifugiert. In der Interphase zwischen Ficoll-Lösung und Plasma ist nun eine Zellschicht (PBMCs) sichtbar, die mit einer Pasteurpipette abgenommen wird. Um Ficollreste zu entfernen wird die Zellesuspension zweimal mit PBS gewaschen und dazu in der Megafuge für

5 Minuten bei 470 g (1500 U/min) zentrifugiert. Zur Entfernung von Thrombozyten werden zwei 12-minütige Waschschrte bei 133 g (800 U/min) angeschlossen. Anschließend werden die Zellen in PBS aufgenommen und die Zellzahl wird bestimmt.

6.2.2 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl werden 10 µl Zellsuspension entnommen und 1:20 mit PBS sowie Trypanblau verdünnt. Mittels Trypanblau kann eine Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen vorgenommen werden. Bei lebenden Zellen wird nur die Membran (Membranproteine) angefärbt, wohingegen sich bei toten Zellen, die ihre Membranintegrität verloren haben, die gesamte Zelle anfärbt. In der Neubauer-Zählkammer (Hämozytometer) werden die lebenden Zellen in zwei Großquadraten (je 4*4 Felder) ausgezählt. Durch die Zählkammer ist es möglich Zellen in einem definierten Volumen auszuzählen. Die Zählkammer besitzt ein Volumen von 0,1 µl, daher kann die ermittelte Zellzahl mit dem Faktor 10⁴ multipliziert werden um die Zellzahl pro ml zu erhalten. Für die Berechnung der Zellzahl in Suspension ergibt sich somit folgende Formel:

$$\frac{\text{gezählte Zellen}}{\text{Anzahl der gezählten Quadrate}} * \text{Verdünnungsfaktor} * 10^4 = \text{Zellzahl/ml}$$

6.2.3 Generierung dendritischer Zellen aus plastikadhärenten Monozyten

Zur Generierung dendritischer Zellen werden 0,8-1,2*10⁸ PBMCs pro 75cm² Gewebekulturflasche in 9 ml X-VIVO™ 20 Medium für 1,5 - 2 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. In dieser Zeit adhären die Monozyten an den Plastikboden der Zellkulturflasche. Nicht adhären Zellen können anschließend durch mehrfaches Spülen mit dem vorliegenden Medium abgewaschen werden. Die adhären Monozyten werden darauf hin noch einmal mit PBS gewaschen. Zur weiteren Kultivierung werden 10 ml RPMI-Kulturmedium (RPMI 1640+FCS+PenStrep) zugegeben und die Zellen bei 37°C, 5% CO₂ im Brutschrank für 7 Tage inkubiert. An Tag 0, 2, 4 und 6 werden die, für die Generierung der dendritischen Zellen notwendigen Zytokine IL-4 (20ng/ ml) und GM-CSF (100ng/ ml)

zugegeben. Gegebenenfalls werden zur gleichen Zeit auch IL-10 (10ng /ml), Imatinib (3µM), Nilotinib (3µM), Dasatinib (50nM) oder spezifische Inhibitoren (Inh.) wie PI3K-Inh. (LY294002 100 nM), Erk-Inh. (FR180204 300 nM), Akt-Inh. (MK2206 300 nM), c-Raf-Inh. (553003 20 nM) oder MITF-Inh. (ML329 200 nM - 2000 nM) zugegeben. Falls erforderlich werden die DZ an Tag 6 unter zu Hilfenahme von Ausreifungsstimuli wie etwa TLR-Liganden (LPS (TLR4L, 100 ng/ml), Poly I:C (TLR3L, 50 µg/ml), Pam3Cys (TLR2L, 5 µg/ml)) und Zytokinen (TNF (10 ng/ml), INF-γ (10 µg/ml)) oder CD40 Ligand (CD40L) ausgereift. Die Ernte der Zellen erfolgt an Tag 7.

Für die Ernte der Zellen wird die Zellkulturflasche wiederholt (30-50 Mal) mit dem enthaltenen Kulturmedium gespült und anschließend nochmals mit PBS. Die entstehende Zellsuspension wird in ein 50-ml-Röhrchen überführt. Zur Entnahme von Kulturüberständen wird dieses nun bei 470 g (1500 U/min) für 5 min zentrifugiert und anschließend der Überstand entnommen. Die Zellkulturflasche wird nun mit 7 ml PBS so lange weiter gespült bis die Zellen weitestgehend abgelöst sind. Das PBS wird ebenfalls in das 50 ml Röhrchen überführt und die Zellsuspension wird erneut bei 470 g (1500 U/min) für 5 min zentrifugiert. Die Zellen werden in 1-3 ml RPMI Medium aufgenommen und die Zellzahl wird bestimmt.

6.2.4 Gewinnung nicht adhärenter mononukleärer Zellen des peripheren Blutes („Peripheral Blood Mononuclear Cells“, PBMC)

Nach der Adhärenz zur Gewinnung der Monozyten werden die nicht adhärenenten Zellen abgespült. Diese werden aus allen Flaschen eines Spenders vereint und zur Entfernung des X-VIVO™ 20 Mediums bei 470 g (1500 U/min) für 5 min zentrifugiert und anschließend in RPMI-Medium aufgenommen. Nach der Bestimmung der Zellzahl werden die Zellen eingefroren.

6.2.5 Zellseparation mittels MACS („Magnetic Associated Cell Sorting“)

Bei der Zellseparation mit Hilfe von MicroBead Kits (CD14, CD209, Dead Cell Removal Kit) der Miltenyi Biotec GmbH werden die zu separierenden Zellen durch spezifische AK markiert. Diese AK sind an magnetische MicroBeads gekoppelt. Bei den Microbeads handelt es sich um magnetische Partikel die so klein sind, dass es zu keiner Aktivierung der Zellen kommt und die Zelloberfläche nicht abgedeckt wird. Eine Aktivierung durch die verwendeten AK ist dennoch möglich. Weswegen auf adäquate

Kontrollen geachtet werden muss (Untersuchung der DZ-Ausreifungsmarker mittels Durchflusszytometrie). Nach der Inkubation der Zellen mit den MicroBeads wird die Zellsuspension auf eine MACS® Säule gegeben, welche zuvor in das magnetische Feld eines MACS Separators gespannt werden muss. Die Zellsuspension durchläuft die Säule, wobei alle Zellen in der Säule zurückgehalten werden, an die MicroBeads gebunden haben. Durch mehrere Waschschriffe können nicht gebundene Zellen entfernt werden. Sobald die Säule aus dem magnetischen Feld des MACS Separators entfernt wird, können die per MicroBead selektierten Zellen eluiert werden.

6.2.5.1 Zellseparation von CD4+ CD14+ und CD209+ Zellen

Mittels der in 6.2.1 beschriebenen Methode zur Generierung von DZ unter zu Hilfenahme der Plastik-Adhärenz-Isolation von Monozyten (CD14+) kann keine reine DZ-Kultur erzielt werden. Normalerweise kann nur eine Reinheit von 70 – 80 % erreicht werden. Um zu gewährleisten, dass im WB oder der RT-qPCR nur DZ analysiert werden wird nach der üblichen Generierung der DZ (wie in 6.2.1 beschrieben) eine Isolierung der DZ mit Hilfe des „CD209 MicroBead Kit“ von Miltenyi durchgeführt.

Hierbei werden die Zellen bei 300 g (1200 U/min), 10 min abzentrifugiert und anschließend das Pellet in MACS-Puffer resuspendiert. Hierbei wird die Zellzahl auf $3 \cdot 10^7$ DZ pro 100 μ l MACS-Puffer eingestellt. Daraufhin werden je 35 μ l FcR Blocking Reagenz und CD209 (DC-SIGN) MicroBeads gegeben. Zellsuspension und MACS-Puffer müssen ab diesem Zeitpunkt kalt gehalten werden. Die Inkubation erfolgt für 15 min bei 4°C. Anschließend werden die Zellen mit 1 – 2 ml MACS-Puffer pro $1 \cdot 10^7$ Zellen gewaschen und bei 300 g (1200 U/min), 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wird vollständig abgenommen. Die Resuspension des Zellpellets erfolgt in 500 μ l MACS-Puffer pro 10^8 DZ.

Im weiteren Verlauf der Aufreinigung werden die Zellen mit den „MicroBeads“ markiert. Dafür werden die Zellen für 10 min bei 300 g (1200 U/min) abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet in 300 μ l MACS-Puffer pro $1 \cdot 10^8$ Zellen resuspendiert. Es folgt die Zugabe von je 75 μ l FcR Blocking Reagenz und CD209 „MicroBeads“ pro $1 \cdot 10^8$ Zellen. Ab diesem Zeitpunkt müssen Zellen und MACS-Puffer kalt gehalten werden. Die Inkubation erfolgt für 30 min im Kühlschrank bei 4°C. Nach der Inkubationszeit werden die Zellen mit 5 bis 10 ml MACS-Puffer pro $1 \cdot 10^8$ Zellen gewaschen und in der auf 4°C vorgekühlten Zentrifuge für 10 min bei

300 g (1200 U/min) abzentrifugiert. Nach Abnahme des Überstands werden die DZ in 500 µl MACS-Puffer pro 1×10^8 Zellen resuspendiert.

Für die Trennung der Zellpopulationen wird nun die LS Säule in das magnetische Feld des MACS Separators gespannt. Zur Äquilibration wird die Säule mit 3 ml MACS-Puffer gespült und anschließend die Zellsuspension auf die Säule gegeben. Dabei ist zu beachten, dass maximal 2×10^9 Zellen auf die Säule gegeben werden sollten. Die Säule wird drei Mal mit je 3 ml MACS-Puffer gewaschen, wobei der Durchfluss verworfen wird. Nach Entnahme der Säule aus dem Separator können die CD209+ Zellen mit Hilfe eines Stempels und 5 ml MACS-Puffer eluiert werden. Nach Bestimmung der Zellzahl in einer 1:2 Verdünnung wird die Reinheit der Elution mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Dabei werden $1 - 2 \times 10^5$ Zellen eingesetzt, die direkt mit einem CD209PerCP-Cy5 AK angefärbt werden.

Eine weitere Möglichkeit eine weitgehend reine DZ-Zellsuspension zu erhalten, besteht darin auf die Plastik-Adhärenz-Isolation von Monozyten zu verzichten und stattdessen auf eine Isolierung von Monozyten mittels CD14-„MicroBeads“ zurückzugreifen. Hierbei wird wie bei der Isolierung mittels Plastik-Adhärenz eine Dichtegradientenzentrifugation der aus dem Buffy-Coat entnommenen Zellen durchgeführt. Im Weiteren erfolgt die Aufreinigung der CD14+ Monozyten wie die oben beschriebene Aufreinigung der CD209+ DZ. Für die Aufreinigung von CD209+ DZ werden durch die geringere Gesamtzellzahl weniger „MicroBeads“ gebraucht wodurch diese Aufreinigung zumeist bevorzugt wird. Ein weiterer Vorteil der Aufreinigung von DZ mittels des „CD209 MicroBead Kit“ besteht darin, dass die Zellen direkt nach der Aufreinigung analysiert werden und somit etwaige Nebeneffekte der Aufreinigung vernachlässigt werden können.

6.2.5.2 Ausschluss toter Zellen mittels „Dead Cell Removal Kit“

Nach der Zellernte können mit Hilfe des „Dead Cell Removal Kit“ tote Zellen aus der zu analysierenden Zellsuspension entfernt werden. Somit können durch tote Zellen oder Zellfragmente verursachte Artefakte bei der Analyse vermieden werden. Wie bei den CD209 und CD14 Selektionskits kommen auch beim „Dead Cell Removal Kit“ mit AK besetzte „Microbeads“ zum Einsatz. Hier binden die AK ein Antigen in der Plasmamembran der toten Zellen.

Nach Ernte und Zellzahlbestimmung werden die Zellen erneut bei 300xg (1200 U/min) für 10 min abzentrifugiert. Nach der Zentrifugation wird der Überstand vollständig abgenommen und das Pellet in mindestens 100 µl „Dead Cell Removal

MicroBeads“ (100 μ l / 10^7 Zellen) aufgenommen und für 15 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert.

Die Selektion der toten Zellen erfolgt mittels einer LS Säule und einem QuadroMACS Separator. Bevor die „MicroBead“-markierten Zellen auf die Säule aufgetragen werden können muss diese mit 3 ml 1x Bindepuffer gespült werden. Hiernach können die markierten Zellen aufgetragen werden. Die Säule wird vier Mal mit je 3 ml Bindepuffer gewaschen, wobei der Durchfluss gesammelt wird. Im Durchfluss sollten nur noch lebenden Zellen vorhanden sein.

6.2.6 Lagerung von Zellen

Sowohl beim Einfrieren als auch beim Auftauen sollte auf Grund des verwendeten DMSO zügig gearbeitet werden.

Das Einfrieren der Zellen erfolgt in 2 ml Nunc Cryo -Röhrchen. Pro Röhrchen werden $2 \cdot 10^7$ Zellen in 1 ml RPMI + 10% DMSO eingefroren. Hierfür wird die Zelldichte auf $1 - 2 \cdot 10^7$ Zellen pro 900 μ l RPMI eingestellt. Pro Röhrchen werden 900 μ l Zellsuspension vorgelegt und 100 μ l DMSO zugegeben. Daraufhin werden die Zellen zügig in die Einfrierhilfe „Mr.Freeze“ überführt und bei -80°C eingefroren.

Zum Auftauen der Zellen wird ein 50 ml Röhrchen mit 10 ml RPMI vorbereitet und bei 37°C im Wasserbad erwärmt. Die Röhrchen werden aus dem Gefrierschrank entnommen und durch die wiederholte Zugabe von warmen RPMI aufgetaut. Die Zellen werden bei 470 g (1500 U/min) für 5 min zentrifugiert und anschließend mit warmem RPMI Medium durch erneute Zentrifugation gewaschen. Danach wird die Anzahl der dendritischen Zellen mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt.

6.2.7 Gemischte Lymphozyten Reaktion (MLR, Mixed-Lymphocyte-Reaction)

Für den MLR werden DZ und nicht adhärenenten PBMC im Verhältnis 1:10 gemischt und in einer 96-well Platte über 5 Tage bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Die DZ werden wie in 6.2.3 generiert. Wenn möglich werden frische PBMC verwendet. Falls dies nicht möglich ist werden bei -80°C eingefrorene PBMC wie in 6.2.6 beschrieben aufgetaut. Pro Well werden $1 \cdot 10^4$ DZ in 100 μ l RPMI vorgelegt. Falls eine Blockierung von OA erwünscht ist wird daraufhin AK oder Syndecan-4 zugegeben und die DZ für

20-30 min im Brutschrank inkubiert. Danach werden die DZ bei 30 Gy, 100% bestrahlt. Nach der Bestrahlung werden $1 \cdot 10^5$ nicht-adhärenenten PBMC in 100 μ l RPMI zugegeben. Der Ansatz kann daraufhin 5 Tage bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert werden.

An Tag 5 wird 14,8 kBq ³H-Thymidin zugegeben und für weitere 16-18 h inkubiert. Am nächsten Morgen werden die Zellen mittels Skatron Combi Cell Harvester geerntet. Hierbei werden die Zellen auf ein Fließ überführt. Sobald das Fließ trocken ist, wird der ³H-Thymidin Einbau mit einem Szintillationszähler (LKB Wallac 1205 Betaplate[®] Liquid Scintillation Counter) gemessen.

6.2.8 Zellaufschluss zur Gewinnung von Proteinlösungen

6.2.8.1 Gewinnung von Membran- oder Zytoplasma-Proteinen

Für die Untersuchung von Membran- oder Zytoplasma-Proteinen kann neben der FACS-Analyse auch ein Western Blot eingesetzt werden. Hierfür wird eine Proteinlösung verwendet, welche durch die Lyse der zu untersuchenden Zellen gewonnen werden kann. Für den Zellaufschluss sollten mindestens $5 \cdot 10^5$ Zellen eingesetzt werden. Die Zellen werden in einem 1,5-ml-Reaktionsgefäß in der auf 4°C gekühlten Tischzentrifuge bei 0,3 g (1800 rpm) 10 min abzentrifugiert. Nach der Zentrifugation wird der Überstand verworfen und das Zellpellet in 50 μ l eiskaltem RIPA Lyse-Puffer pro $1 \cdot 10^6$ Zellen + 1 μ l Protease/Phosphatase-Inhibitor pro 100 μ l RIPA-Puffer resuspendiert. Die Zellen werden unter mehrmaligem vortexen für 30 min auf Eis lysiert.

Nach der Inkubation wird der entstandene Zelldebris, inklusive der genomischen DNS, durch Zentrifugation bei 12.000 g (13800 rpm) für 12 min bei 4°C abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das Lysat kann nun bei -80°C eingefroren werden.

Soll zur Kontrolle die vorhandene Proteinphosphorylierung entfernt werden, wird beim Zellaufschluss anstelle des Protease/Phosphatase-Inhibitors nur 1 μ l Protease-Inhibitor pro 100 μ l RIPA Lyse-Puffer zugegeben. Im Anschluss an Zell-Lyse und Abzentrifugation des Zelldebris wird der Proteinlösung 1 μ l Phosphatase pro 100 μ l RIPA Lyse-Puffer beigefügt.

6.2.8.2 Auftrennung von Zytoplasma- und Kernfraktion

Zum Nachweis der Translokation des TF MITF vom Zytoplasma in den Zellkern wird das Zelllysat in eine Zytoplasma- und eine Kernfraktion aufgeteilt. Hierfür wird das Nuclear/Cytosol Fractionation Kit von BioVison (Milpitas, CA, USA) verwendet. Für den Zellaufschluss sollten mindestens $5 \cdot 10^5$ Zellen eingesetzt werden. Im Folgenden beziehen sich alle Volumina auf $1 \cdot 10^6$ Ausgangszellen. Die Zellen werden in einem 1,5-ml-Reaktionsgefäß in der auf 4°C gekühlten Tischzentrifuge bei 0,3 g (1800 rpm) 10 min abzentrifugiert. Nach der Zentrifugation wird der Überstand verworfen und das Zellpellet in 0,1 ml eiskaltem „Cytosol Extraction Buffer“ (CEB)-A Puffer (+ 2 µl Protease- / Phosphatase-Inhibitor + 1 µl DTT) resuspendiert (15 sec vortexen) und anschließend für 10 min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wird 5,5 µl eiskalter CEB-B Puffer zugegeben, 5 sec gevortext und nochmals für 1 min auf Eis inkubiert. Anschließend wird kurz (5 sec) gevortext und die Suspension 5 min in der gekühlten (4°C) Tischzentrifuge bei höchster Geschwindigkeit abzentrifugiert. Daraufhin wird der Überstand (die Zytoplasmafraktion) in ein vorgekühltes Reaktionsgefäß überführt und bei -80°C eingefroren.

Das Zellpellet wird in 50 µl eiskaltem „Nuclear Extraction Buffer“ (NEB)-Puffer (+ 2 µl Protease- / Phosphatase-Inhibitor + 1 µl DTT) resuspendiert (15 sec vortexen) und anschließend für 40 min auf Eis inkubiert. Alle 10 min muss für 15 sec gevortext werden. Nach der Inkubation wird für 10 min bei maximaler Geschwindigkeit in der auf 4°C gekühlten Tischzentrifuge zentrifugiert. Danach wird der Überstand (Kernfraktion) in ein vorgekühltes Reaktionsgefäß überführt und bei -80°C eingefroren.

6.2.9 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentrationsbestimmung wird mit dem „Pierce® BCA Protein Assay Kit“ durchgeführt. Das Prinzip basiert hierbei auf der Biuret-Reaktion, bei der es in alkalischer Lösung zu einer Chelatbildung zwischen den Proteinen und den zweiwertigen Kupferionen kommt. Wodurch es eine Reduktion zu einwertigen Kupferionen erfolgt, welche anschließend durch Bicinchoninsäure (BCA) gebunden werden können. Hierbei entsteht ein violetter Farbkomplex. Die Farbintensität des Lysats und somit die Proteinkonzentration kann mit Hilfe des Dynatech MR7000 Plate Reader gemessen werden.

Die Proben werden zunächst auf Eis aufgetaut. Anschließend werden 7 µl Probe 1:5 mit RIPA Lyse-Puffer verdünnt. Es wird ein Dreifachansatz durchgeführt. Je Vertiefung werden 10 µl Verdünnung vorgelegt. Der Standard wird mit Hilfe einer BSA-Stocklösung (2 mg/ml, im Kit enthalten) angesetzt und ebenfalls in Triplets von je 10 µl pro Vertiefung vorgelegt. Außerdem werden 2 Kontrollen (nur RIPA-Puffer und eine leere Vertiefung) verwendet.

Pro Vertiefung werden 200 µl Reagenzlösung zugegeben. Hierfür wird die im Kit enthaltene „Reagenz B“ 1:50 mit „Reagenz A“ verdünnt. Die Platte wird 30 min bei 37°C inkubiert und die Reaktion anschließend 10 min bei Raumtemperatur abgestoppt. Die Messung erfolgt im Dynatech MR7000 Reader bei 550 nm mit der Software Biolynx™.

6.2.10 SDS-Gelelektrophorese

Proteine können in einem elektrischen Feld, ähnlich DNA-Molekülen, nach ihren Molekulargewichten aufgetrennt werden. Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ist es notwendig, die Proteine durch Hitzeeinwirkung und anionischem Natriumdodecylsulfat (SDS) zu denaturieren. Das negativ geladene SDS bindet an die denaturierten Proteine und verleiht diesen damit eine gleichmäßige negative Ladung. Die Anzahl der gebundenen SDS-Moleküle ist proportional zum Molekulargewicht der Polypeptide, so dass es im elektrischen Feld zu einer Auftrennung nach Molekulargewicht kommt. Es wird ein eindimensionaler, diskontinuierlicher Gellauf nach dem Prinzip der Isotachophorese durchgeführt. Dabei bilden sich im Sammelgel durch einen Feldstärkegradienten zwischen Folgeionen (Glycin) und Leitonen (Chlorid) Proteinstapel. Durch die pH-Änderung im Trenngel befindet sich das Folgeion nicht mehr am isoelektrischen Punkt und überholt die Proteine wodurch diese sich nun ihrer Größe entsprechend auftrennen können.

Der Gellauf wurde im Mini-PROTEAN Tetra Electrophoresis System der Firma Bio-Rad durchgeführt. Das Molekulargewicht der Proteine kann durch definierte Proteinmarker (BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder) bestimmt werden.

Rezept für Trenn- und Sammelgel:

	Trenngel (9%)	Sammelgel (5%)
H ₂ O	8,6 ml	6,8 ml
30% Polyacrylamid	6,0 ml	1,7 ml
Tris	5,0 ml 1,5 M (pH 8,8)	1,25 ml 1 M (pH 6,8)
10% SDS	200 µl	100 µl
10% APS (zuletzt)	200 µl	100 µl
TEMED	20 µl	10 µl
Gesamt	20,0 ml	10,0 ml

APS wird zuletzt hinzugegeben, da hierdurch die Polymerisierung des Gels ausgelöst wird. Aus diesem Grund wird das Trenngel gleich nach Zugabe des APS in die vorbereitete Gießvorrichtung (1mm Gele) gegossen. Um zu gewährleisten, dass eine scharfe Kante entsteht und um Luftblasen zu vermeiden wird mit Isopropanol überschichtet. Sobald das Trenngel auspolymerisiert ist (ca. 10 - 20 min), kann das Isopropanol entfernt werden. Daraufhin kann das Sammelgel das Trenngel gegossen werden. Die Kämme sollten möglichst direkt eingesetzt werden. Ist das Gel komplett auspolymerisiert, wird es in die Laufkammer gespannt und diese mit 1 x Lauf-Puffer gefüllt.

Je nach zur Verfügung stehendem Volumen der Proben werden 10 – 30 µg Protein eingesetzt. In eine Geltasche können maximal 40 µl Gesamtvolumen pipettiert werden. Die Proben werden 2 : 1 mit dem 2 x Lade-Puffer versetzt. Die in Lade-Puffer vorliegenden Proben werden für 10 min bei 95°C aufgeköcht. Die Hitze und das β-Mercaptoethanol lösen die Disulfid- und Wasserstoffbrücken der Proteine wodurch ihre Tertiär- und Sekundär- Struktur verloren geht. Nach dem Aufkochen können die Proben auf das Gel aufgetragen werden. Als Marker wird 3 µl des BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder aufgetragen.

Der Gellauf wird mit 100 V (10 mA / Gel) begonnen, damit sich alle Proteine langsam an der Grenze zwischen Sammel- und Trenngel ansammeln können. Dies verhindert das sogenannte „Schmieren“ der Proben und sorgt für „scharfe“ Banden. Nach ca. 10 min wird die Spannung auf 150 – 200 V erhöht (maximal 35 mA pro Gel) und das Gel für weitere 45 – 60 min (je nach Größe des zu untersuchenden Proteins) laufen gelassen.

6.2.11 Western Blot

Beim Western-Blot werden die Proteine aus dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Der Transfer erfolgt mittels elektrischer Spannung. Es wird ein Nass-Blot durchgeführt. Hierbei befinden sich Nitrozellulosemembran und Gel in einer mit 1x-Transferpuffer gefüllten Blotkammer. Zunächst werden Schwämme, Nitrozellulosemembran und Filterpapier (8,5 x 5,5 cm) in gekühltem 1x Transfer-Puffer eingelegt. Das Gel wird vorsichtig aus der Laufapparatur entfernt und ebenfalls für 10 min in gekühltem Transfer-Puffer äquilibriert. Anschließend wird ein Blot-Sandwich aufgebaut. Dazu werden auf die schwarze Seite der Kassette ein Schwamm und ein Filterpapier gelegt und das Gel darauf platziert. Es folgen die Nitrozellulosemembran, ein weiteres Filterpapier und ein weiterer Schwamm. Nach Aufbau des Sandwichs werden eventuelle Luftblasen zwischen Gel und Membran mit Hilfe einer Rolle vorsichtig entfernt. Danach werden die Kassetten sowie ein Kühlakku in die Blotkammer gesetzt und der Blot bei ca. 350 mA (100 V) für ca. 70 min im Kühlraum durchgeführt. Es muss darauf geachtet werden, dass das Trenngel der Kathode zugewandt ist, während die Nitrozellulosemembran zur Anode hin gerichtet ist.

6.2.12 Nachweis transferierter Proteine / Protein-Phosphorylierung mittels AK (Antikörper-Färbung)

Die auf die Nitrozellulosemembran übertragenen Proteine können mit Hilfe von Antikörpern nachgewiesen werden. Hierbei wird eine indirekte Antikörperfärbung durchgeführt, bei welcher das Zielprotein, bzw. die zu untersuchende Phosphorylierungsstelle durch einen spezifischen Erstantikörper gebunden wird, welcher wiederum von einem speziesspezifischen Sekundärantikörper gebunden werden kann. An den Sekundärantikörper ist ein Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt, welcher mittels dem LI-COR Odyssey® Infrared Imaging Systems nachgewiesen werden kann.

Vor der „Färbung“ muss die Membran durch einen PBS-Waschschritt von restlichem Blot-Puffer befreit werden. Danach wird die Membran mittels Block-Puffer für eine Stunde bei RT oder ÜN bei 4°C „geblockt“, wodurch unspezifische Antikörperbindungen verhindert werden sollen. Nach dem Blocken wird die Membran ÜN bei 4°C in Erstantikörperlösung (Protein-/Phosphorylierungsstellen-spezifischer AK in Block-Puffer + 0,001% NaN₃) inkubiert (siehe. Am nächsten Morgen wird die Erstantikörperlösung abgenommen und bei 4°C bis zur nächsten Verwendung

gelagert. Die Membran wird 4 mal für 10 min mit Wasch-Puffer (PBS + 0,2% Tween 20) von jeglichen Rückständen der Erstantikörperlösung befreit. Erst nach gründlichem Waschen wird die Sekundärantikörperlösung (speziesspezifischer AK + GAPDH-Kontrollantikörper + Blocking-Puffer + 0,015 % SDS) auf die Membran gegeben. Das enthaltene SDS ist in der Lage weniger starke Antikörperbindungen zu lösen und somit unspezifischen Bindungen zu verringern. Die Sekundärantikörper sind speziesspezifisch und müssen passend zum Erstantikörper ausgewählt werden. Ist der Erstantikörper also aus Maus muss ein entsprechender anti-Maus Sekundärantikörper verwendet werden. Eine Inkubationszeit von 20 – 30 min bei RT im Dunkeln sollte nicht überschritten werden, da danach die Anzahl an unspezifischen Bindungen drastisch ansteigt. Ab der Sekundärantikörper-Färbung sollte die Membran im Dunkeln gehalten werden, da die an die Sekundärantikörper gekoppelten Fluorophore lichtsensitiv sind. Nach der Sekundärantikörper-Färbung ist ein weiterer Waschschrift nötig, bei welchem überschüssige Sekundärantikörper entfernt werden. Hierbei sollte mindestens 4 mal für 10 min im Dunkeln mit Waschpuffer gewaschen werden. Um die Membran von Tween 20 zu befreien, kann ein letzter Waschschrift mit PBS durchgeführt werden. Danach kann die Membran bei 60°C im Dunkeln getrocknet werden (trockene Membranen erzielen ein besseres Signal zu Hintergrund Verhältnis).

Die trockene Membran kann schließlich mit dem Odyssey® Infrared Imaging Systems der Firma LI-COR eingescannt werden. Hierbei können zwei verschiedene Wellenlängen (800 nm (grün), 700 nm (rot) gleichzeitig detektiert werden.

6.2.13 qRT-PCR

Die Gesamt-RNA, welche in der quantitativen „Real Time Reverse Transkriptase PCR (qRT-PCR)“ verwendet wird, wird mit Hilfe von QIAGEN RNeasy Mini Anionen-Austauscher Säulen aus DZ-Lysaten isoliert. Dazu werden die Zellpellets in 350 µl RTL Puffer lysiert und durch vortexen homogenisiert. Die Suspension wird mit 350 µl 70%-igem Ethanol versetzt und vorsichtig durch mehrmaliges auf und ab pipettieren gemischt. Die Probe wird auf die RNeasy Säule aufgebracht und 15 Sekunden bei > 8000 g zentrifugiert. Der Durchlauf wird verworfen. Die Säule wird 1 x mit 700 µl RW1-Puffer und 2 x mit 500 µl PRE-Puffer gewaschen, hierbei wird 15 s bei 8000 g zentrifugiert. Nach dem letzten Waschschrift wird der restliche Waschpuffer mittels einer 2 minütigen Zentrifugation bei 8000 g entfernt und die Säule in ein frisches

Reaktionsgefäß überführt. Die RNA wird durch eine 1 minütige Zentrifugation mit 30-50 µl Rnase-freiem Wasser eluiert. Die Konzentration und Reinheit der RNA wird mit einem UV-Spektrometer (Nanodrop 2000) bestimmt. 5 µg der Gesamt-RNA werden zur cDNA Synthese eingesetzt. Diese wird mit Hilfe des „Transkriptor First Strand cDNA Synthese Kits“ durchgeführt. Die Quantifizierung erfolgt mit Hilfe eines Real-time-PCR-Systems (LightCycler® Carousel-Based System, Roche) und des „LightCycler TaqMan Master“ Reaktions-Kits. Osteoactivin und MITF sowie das „Housekeeping“-Gen Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH) wurden in getrennten Reaktionen amplifiziert. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind unter 6.1.8 aufgelistet. Die Menge an Osteoactivin, bzw. MITF mRNA wird dann ins Verhältnis zur G6PDH-Menge gesetzt und auf die Kontrolle mit unbehandelten DCs normiert.

6.2.14 ELISA

6.2.14.1 IL-6 und IL-10 ELISA

Eine 96-Well-Flachboden-Platte wird mit 100 µl Erstantikörper (1:250 in Carbonat-Bicarbonat Puffer verdünnt) und ÜN bei 4°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag werden die Platten 3 x mit Waschpuffer (300 µl PBS + 0,05% Tween-20) gewaschen. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren wird anschließend jedem Well 200 µl „Assay Diluent“ zugegeben und 1h bei RT inkubiert. Die Platten werden wiederum 3 x mit Waschpuffer gewaschen und nach jedem Waschschrift ausgeklopft um die Flüssigkeit zu entfernen. Die 8 Standardkonzentrationen werden mittels 1:2 Verdünnungen in „Assay Diluent“ vorbereitet (Ausgangskonzentration ist 300 pg/ ml). Die Proben werden ebenfalls 1:2 in „Assay Diluent“ verdünnt. Pro Well werden je 100 µl Standard, bzw. Proben pipettiert, wobei die acht Standards doppelt und die Proben vierfach aufgetragen werden. Die Inkubation erfolgt für 2 h bei RT. Anschließend werden die Platten 5 x gewaschen. Der Detektionsantikörper und das Enzym werden 1:250 in „Assay Diluent“ verdünnt. Es werden 100 µl pro Well zugegeben und 1 h bei RT inkubiert. Um unspezifische Signale zu minimieren wird daraufhin 7 x für 30-60 s mit Waschpuffer gewaschen. Danach werden 100 µl Substrat pro Well zugegeben und bei RT für 30 min inkubiert. Die Reaktion wird anschließend mit 1M Schwefelsäure abgestoppt. Die Messung muss innerhalb der nächsten 30 min erfolgen und wird mit dem „Dynatech ELISA Reader“ bei 450 nm

durchgeführt. Aus den Standardwerten kann eine Eichkurve erstellt werden, die zur Berechnung der Zytokinkonzentrationen verwendet wird.

6.2.14.2 TGF- β ELISA

Eine 96-Well-Flachbodenplatte wird mit 100 μ l Erstantikörper (2 μ g/ml in PBS) ÜN bei RT inkubiert. Am nächsten Tag werden die Platten 3 x mit Waschpuffer (300 μ l PBS + 0,05% Tween-20) gespült. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren werden die Platten anschließend mit 200 μ l Blockpuffer pro Well (PBS + 5% Tween-20) 1h bei RT inkubiert. Die Platten werden erneut 3 x gewaschen und nach jedem Waschschrift ausgeklopft um die Flüssigkeit zu entfernen. Zur TGF- β Aktivierung werden 350 μ l Probe mit 70 μ l 1M HCl gemischt und 10 min bei RT inkubiert. Die Mischung wird mit 70 μ l 1,2 M NaOH/0,5 M HEPES neutralisiert und wieder 10 min inkubiert. Die Proben werden nun 1:5 in „Reagent Diluent“ verdünnt. Die 8 Standardkonzentrationen werden mittels 1:2 Verdünnungen in „Assay Diluent“ vorbereitet (Ausgangskonzentration ist 2000 pg/ml). Pro Well werden je 100 μ l Standard, bzw. Proben pipettiert, wobei die acht Standards doppelt und die Proben vierfach aufgetragen werden. Die Inkubation erfolgt für 2 h bei RT. Anschließend werden die Platten 3 x gewaschen. Danach werden 100 μ l Detektionsantikörper pro Well (300 ng/ml in „Reagent Diluent“) 2 h bei RT inkubiert. Es wird erneut 3 x mit Waschpuffer gespült. Daraufhin werden 100 μ l Enzymlösung (1:200 in Reagent Diluent) zugegeben und 20 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Nach drei weiteren Waschschriften werden 100 μ l Substrat pro Well zugegeben und 20 min bei RT inkubiert. Die Reaktion wird anschließend mit 1 M Schwefelsäure abgestoppt. Die Messung muss innerhalb der nächsten 30 min erfolgen und wird mit dem „Dynatech ELISA Reader“ bei 450 nm durchgeführt. Aus den Standardwerten kann eine Eichkurve erstellt werden, die zur Berechnung der Zytokinkonzentrationen verwendet wird.

6.2.15 Durchflusszytometrische Analyse dendritischer Zellen

Die Phänotypisierung der dendritischen Zellen wird mittels Durchflusszytometrie („Fluorescence assisted cell sorting“ (FACS))-Analyse durchgeführt. Hierbei werden fluoreszenzfarbstoffgekoppelte AK verwendet, die spezifisch an bestimmte Rezeptoren auf der Zelloberfläche binden. Mit Hilfe einer Trägerflüssigkeit wird die Zellsuspension durch die Messküvette des Durchflusszytometers gepresst wobei der

Probenstrom beschleunigt wird, was dazu führt, dass die Zellen vereinzelt werden (hydrodynamische Fokussierung). Die an die Antikörper gekoppelten Fluorophore können nun durch Laser mit einer bestimmten Wellenlänge angeregt. Ein System von Filtern und Spiegeln erlaubt die Auftrennung der emittierten Fluoreszenzsignale auf verschiedene Detektoren. Dabei handelt es sich um Photodioden und Photomultiplier, welche die optischen Signale in Spannungsimpulse umwandeln und diese dem Computer zur Analyse übermitteln. Die FCS-Diode („Forward Scatter“) misst das Vorwärtsstreulicht, welches sich proportional zur Zelloberfläche verhält und somit die Größe der gemessenen Zelle anzeigt. Die zur Seite abgelenkten Lichtstrahlen (Seitwärtsstreulicht) werden durch die SSC-Diode („Side Scatter“) detektiert und sind ein Maß für die Granularität der analysierten Zelle. Weitere Detektoren messen die von den Fluoreszenzfarbstoffen emittierenden Lichtstrahlen. Die Intensität der Emission ist dabei proportional zur Menge der gebundenen AK, bzw. des gebundenen Fluoreszenzfarbstoffes.

Für die Durchflusszytometrische-Analyse (FACS-Analyse) der moDZ werden die Zellen wie unter 6.2.3 beschrieben geerntet. Zur Verbesserung der Reproduzierbarkeit wurden immer $2 \cdot 10^5$ Zellen eingesetzt. Die zur Färbung verwendeten AK und „Viability Dyes“ (Lebend-/Tot-Farbstoffe) sind unter 6.1.7.1 aufgeführt.

Zur Färbung werden $2 \cdot 10^5$ DZ pro FACS-Röhrchen verwendet und mit 1 ml PBS gewaschen. Anschließend werden die für die Viabilitätsanalyse vorgesehenen Zellen von den restlichen DZ getrennt und mit 100 μ l Lebend-/Tot-Farbstoff-Lösung für 30min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation wird 2 x mit 1 ml PBS gewaschen. Um unspezifische Bindungen zu blockieren werden die bereits mit Lebend-/Tot-Farbstoff gefärbten Zellen, ebenso wie die restlichen DZ mit 100 μ l Block-Puffer für 20 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Für jedes FACS-Röhrchen wird ein AK-Mastermix mit den in 6.1.7.1 angegebenen AK-Konzentrationen angesetzt. Der AK-Mastermix wird direkt den in Block-Puffer vorliegenden Zellen zugegeben und anschließend für 15 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Danach wird 2 x mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen und die Zellen in 100 μ l FACS-Puffer und FACS-Fixierlösung (Sigma, Steinheim, D) aufgenommen.

Die Analyse der Zellen wurde mit einem FACS-Calibur Durchflusszytometer (BD Biosciences, Heidelberg, D) und der zugehörigen Software „CellQuest Pro“ (BD Biosciences, Heidelberg, D), bzw. mit der Software „FlowJo“ (Tree Star, Inc., Ashland, OR, USA) durchgeführt.

6.2.16 Gemischte Lymphozyten Reaktion („Mixed Lymphocyte Reaction“, MLR)

Zur Untersuchung des Einflusses von OA auf die T-Zell-Stimulationsfähigkeit der DZ wurde eine Gemischte Lymphozyten Reaktion („Mixed Lymphocyte Reaction, MLR) durchgeführt. Der MLR ist ein funktioneller Assay, mit dem die Proliferationsantwort von Lymphozyten eines „Responders“ (Spender 1) nach Stimulation mit Lymphozyten eines Stimulators (Spender 2) gemessen wird. In diesem sogenannten Ein-Wege MLR werden die Lymphozyten des Stimulators vor dem Versuch bestrahlt um ihre Proliferationsfähigkeit zu unterdrücken. Somit wird im MLR nur die Proliferationsantwort des „Responders“ gemessen.

DZ wurden wie unter 6.2.3 beschrieben generiert und werden hier als Stimulator verwendet. Nach der DZ Ernte wird die Zellzahl auf $1 \cdot 10^4$ DZ pro 100 μ l Kultivierungsmedium eingestellt. Für jeden Ansatz sollten zumindest 4 Wells oder besser 6 Wells verwendet werden. Die Generierung der DZ mittels Plastikadhärenz führt nicht zu einer 100 % reinen DZ Kultur, weswegen die geernteten Zellen vor der weiteren Verwendung im MLR mit 30 Gy, 100% bestrahlt werden müssen. Danach werden in einer 96-Well-Platte $1 \cdot 10^4$ DZ also 100 μ l DZ-Lösung pro Well vorgelegt. Falls OA mittels spezifischem AK oder rekombinantem SD-4 blockiert werden soll, müssen die DZ mindestens 20 min mit den entsprechenden Konzentrationen an AK und SD-4 inkubiert werden bevor die PBMC des „Responders“ zugegeben werden können. Autologe, bzw. allogene „Responder“ PBMC werden wie unter 6.2.4 beschrieben gewonnen und auf $1 \cdot 10^5$ Zellen pro 100 μ l Kulturmedium eingestellt. Pro Well werden $1 \cdot 10^5$ Zellen also 100 μ l PBMC-Lösung den bereits vorgelegten DZ zugegeben. Daraufhin wird die Platte für 5 Tage bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Am Tag 5 werden 14,8 kBq ³H-Thymidine zugegeben. Danach wird die Platte für weitere 18 h inkubiert und am nächsten Morgen mit Hilfe eines Skatron Combi Cell Harvester (Nunc GmbH, Wiesbaden, D) geerntet. Hierbei werden die Zellen auf ein Fließ überführt welches mittels eines Szintillationszähler auf Thymidineinbau untersucht werden kann.

7 ERGEBNISSE

7.1 “The immune inhibitory receptor osteoactivin is upregulated in monocyte-derived dendritic cells by BCR–ABL tyrosine kinase inhibitors” – Der immuninhibitorische Rezeptor Osteoactivin wird in moDZ durch BCR-ABL Tyrosinkinase-Inhibitoren hochreguliert

Die Entwicklung und Funktion von DZ wird von einer Vielzahl an TK kontrolliert, welche auch von BCR-Abl TKI inhibiert werden können. Aus diesem Grund ist es wahrscheinlich, dass der Einsatz von TKI immuninhibitorische Nebeneffekte hat. Es wurde bereits gezeigt, dass Imatinib nicht nur die Expression von DZ-Oberflächenproteinen beeinflussen kann, sondern auch die Fähigkeit der DZ zur T-Zell Stimulation inhibiert ^{4,36,37}.

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass BCR-Abl TKI (Imatinib, Nilotinib, Dasatinib) die Expression des immunsuppressiven Oberflächenproteins Osteoactivin, in humanen moDZ, signifikant hochregulieren können. Was wiederum zur Inhibition der allogene T-Zell Antwort durch OA führt.

7.1.1 IL-10 verstärkt die Expression von Osteoactivin in humanen moDZ

Es konnte gezeigt werden, dass ausschließlich mit IL-4 und GM-CSF generierte moDZ nur eine sehr schwache OA-Expression aufweisen, diese jedoch durchgehend durch das immunsuppressive Zytokin IL-10 hochreguliert werden kann (Abb. 8). Die basale OA-Expression variiert sehr stark von Spender zu Spender.

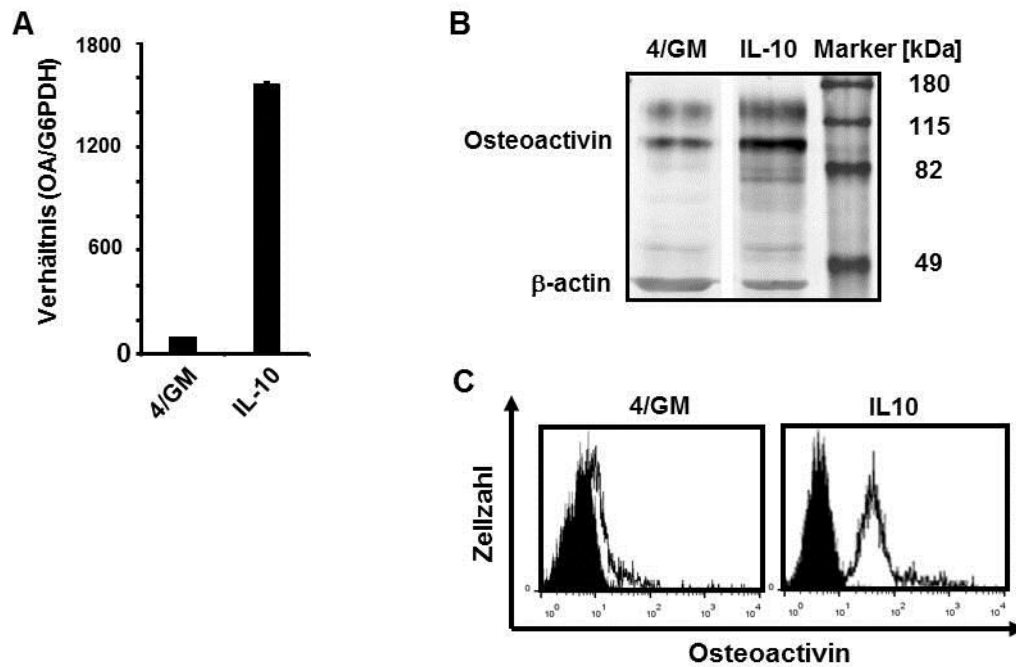


Abb. 8: IL-10 verstärkt die Expression von Osteoactivin in humanen moDZ. Unreife moDZ wurden *in vitro* unter Zugabe von IL-4 und GM-CSF generiert und als Kontrolle (4/GM) verwendet oder mit IL-4, GM-CSF und zusätzlich IL-10 (IL-10) generiert. (A) qRT-PCR der OA-Expression in moDZ generiert mit und ohne IL-10. Es wurde die relative OA-Expression ermittelt (Verhältnis der Expression von OA zu G6PDH). Gezeigt ist der Mittelwert von zwei technischen Duplikaten sowie deren Standardabweichung (\pm SD). Die OA-Expression wurde auf Proteinebene mittels (B) WB oder (C) FACS nachgewiesen. Dunkle Histogramme stellen die Isotyp-Kontrolle dar, Helle die OA-Färbung. Es werden repräsentative Ergebnisse von mindestens drei unabhängigen Experimenten mit unterschiedlichen Spendern gezeigt.

7.1.2 Auswirkung von Reifungsstimuli auf die basale OA-Expression in humanen moDZ

Desweiteren wurden die Auswirkungen von verschiedenen Reifungsstimuli auf die basale Expression von OA in humanen moDZ untersucht. Durch die Ausreifung von moDZ mittels TLR Liganden wie LPS, Poly (I:C), Pam₃Cys sowie R848 konnte die basale OA-Expression fast vollständig unterdrückt werden (Abb. 9).

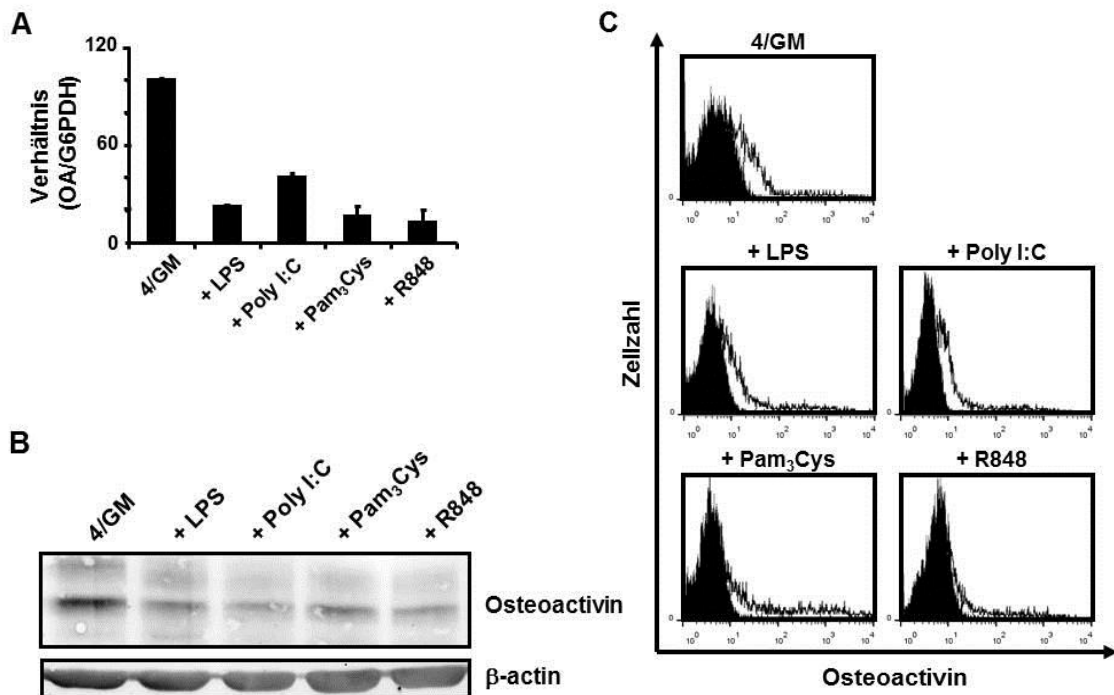


Abb. 9: TLR Liganden regulieren die basale OA-Expression herunter. *In vitro* generierte moDZ wurden 24 Stunden vor Ernte mit den angegebenen TLR Liganden stimuliert, wie üblich an Tag 7 geerntet und ihre OA-Expression mittels (A) qRT-PCR, (B) WB und (C) FACS analysiert. In der qRT-PCR (A) wurde die relative OA-Expression ermittelt (Verhältnis der Expression von OA zu G6PDH). Gezeigt ist der Mittelwert von zwei technischen Duplikaten sowie deren Standardabweichung (\pm SD). In der FACS Analyse (C) stellen dunkle Histogramme die Isotyp-Kontrolle dar, Helle die OA-Färbung. Es werden repräsentative Ergebnisse von mindestens fünf unabhängigen Experimenten mit unterschiedlichen Spendern gezeigt.

Die Zugabe von CD40L oder der inflammatorischen Zytokine IFN- γ (parakriner Stimulus) und TNF (autokriner Stimulus) konnte die basale OA-mRNA-Expression hingegen nur schwach oder gar nicht herab regulieren (Abb. 10). CD40L verstärkte die OA-Expression sogar in allen fünf untersuchten Spendern.

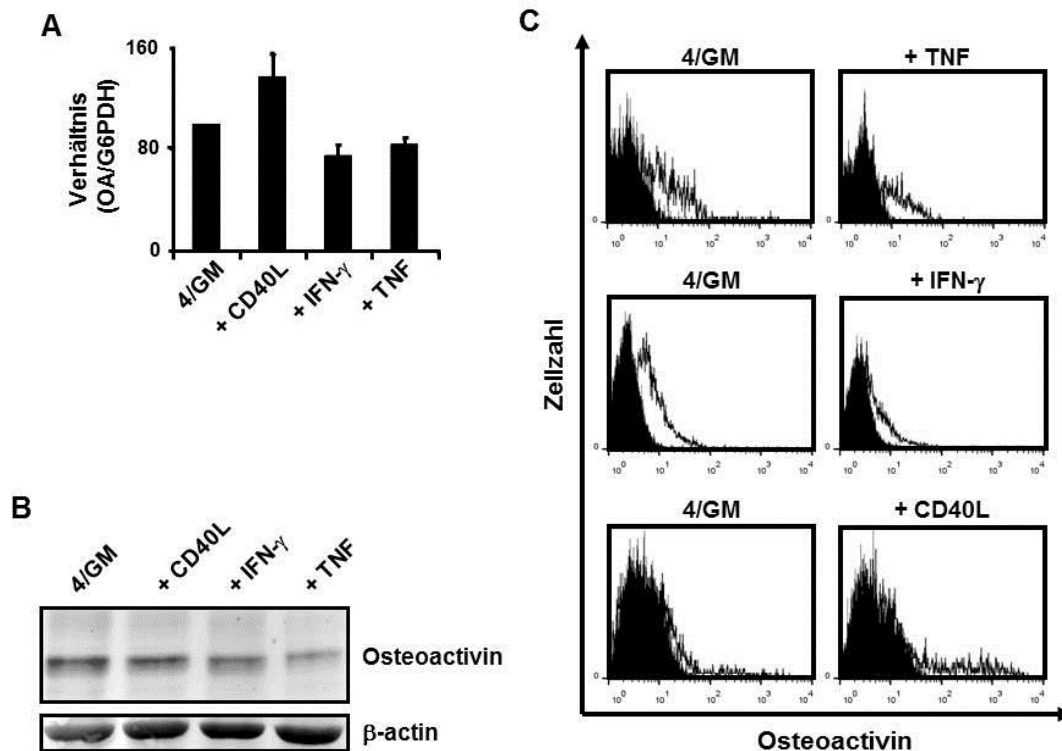


Abb. 10: Inflammatorische Zytokine haben wenig Einfluss auf die basale OA-Expression. *In vitro* generierte moDZ wurden 24 Stunden vor Ernte mit den angegebenen inflammatorischen Zytokinen stimuliert, wie üblich an Tag 7 geerntet und ihre OA-Expression mittels (A) qRT-PCR, (B) WB und (C) FACS analysiert. In der qRT-PCR (A) wurde die relative OA-Expression ermittelt (Verhältnis der Expression von OA zu G6PDH). Gezeigt ist der Mittelwert von zwei technischen Duplikaten sowie deren Standardabweichung (\pm SD). In der FACS Analyse (C) stellen dunkle Histogramme die Isotyp-Kontrolle dar, Helle die OA-Färbung. Es werden repräsentative Ergebnisse von mindestens fünf unabhängigen Experimenten mit unterschiedlichen Spendern gezeigt.

7.1.3 Die BCR-ABL TKI Imatinib, Nilotinib und Dasatinib inhibieren die Ausdifferenzierung von moDZ

Um die Auswirkungen der BCR-Abl TKI Imatinib, Nilotinib und Dasatinib auf die Differenzierung von moDZ zu analysieren, wurden moDZ unter Zugabe klinischer Konzentrationen von Imatinib (3 μ M), Nilotinib (3 μ M) und Dasatinib (10 nM) generiert. Die Zugabe erfolgte alle 2 Tage, beginnend an Tag 0. Nach Ernte der moDZ an Tag 7 wurde die Expression moDZ typischer Oberflächenmarker mittels FACS untersucht. Hierbei stellte sich heraus, dass die unter TKI generierten moDZ einen Großteil ihrer

CD14 Expression beibehielten und eine signifikant verringerte Expression von CD1a zeigten (Abb. 11). Es konnte aber keine signifikante Änderung in der Expression anderer wichtiger Oberflächenmarker, wie z.B. CD86, CCR7 oder DC-Sign festgestellt werden (nicht gezeigt).

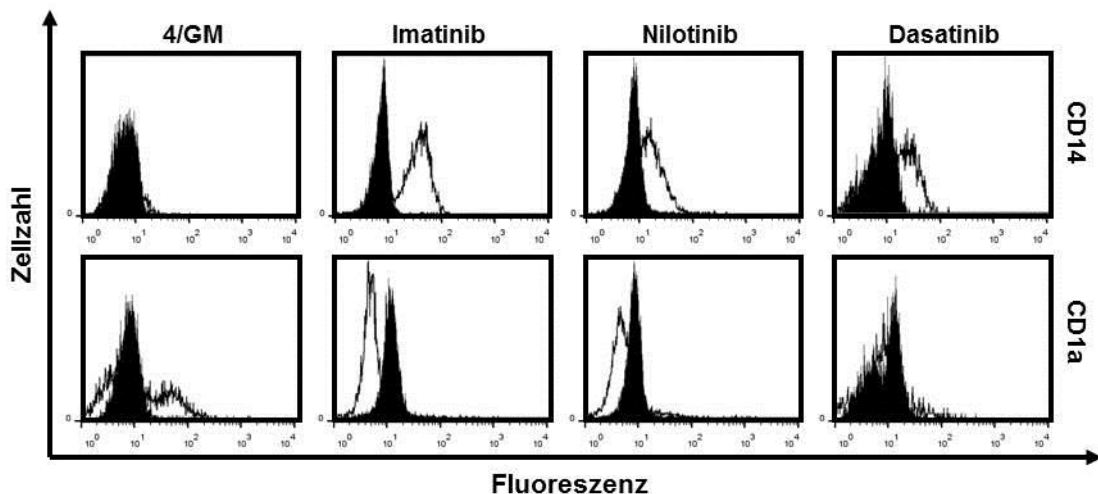


Abb. 11: Die Zugabe von TKI während der moDZ Generierung verändert den moDZ Phänotyp. Unreife moDZ wurden *in vitro* unter Zugabe von 4/GM generiert oder zusätzlich alle 2 Tage beginnend an Tag 0 mit TKI behandelt (Imatinib, Nilotinib, Dasatinib). moDZ wurden an Tag 7 geerntet und mittels FACS analysiert. Dunkle Histogramme stellen die Isotyp-Kontrolle dar, helle die CD14, bzw. CD1a Färbung. Es werden repräsentative Ergebnisse von mindestens 20 unabhängigen Experimenten mit unterschiedlichen Spendern gezeigt.

7.1.4 TKI steigern die OA-Expression in unreifen moDZ

Nachdem gezeigt werden konnte, dass TKI schwerwiegende Auswirkungen auf die Ausdifferenzierung der moDZ haben, wurde untersucht ob TKI ebenso wie IL-10 die Expression des immuninhibitorischen Oberflächenmoleküls OA hochregulieren können. Es konnte gezeigt werden, dass TKI ähnlich wie IL-10 die OA-Expression steigern. Diese Hochregulation konnte nicht nur auf mRNA-Ebene, sondern auch auf Protein-Ebene mittels FACS-, WB- und Immunhistochemie (IHC)-Analyse nachgewiesen werden (Abb. 12 / Abb. 13).

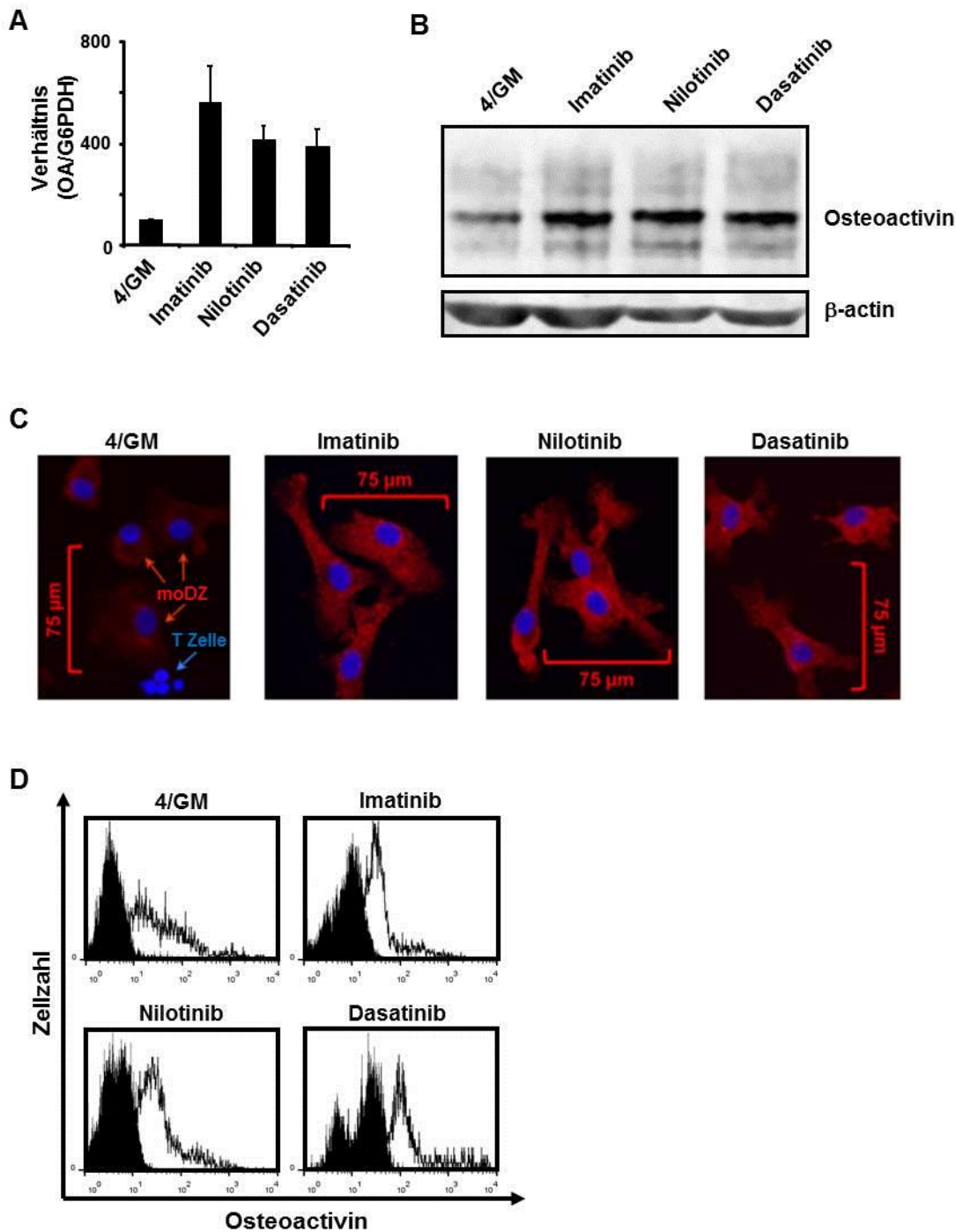


Abb. 12: TKI steigern die OA-Expression in unreifen moDZ. Unreife moDZ wurden *in vitro* unter Zugabe von 4/GM generiert oder zusätzlich alle 2 Tage beginnend an Tag 0 mit TKI behandelt (Imatinib, Nilotinib, Dasatinib). moDZ wurden an Tag 7 geerntet und mittels (A) qRT-PCR, (B) WB, (C) IHC und (D) FACS analysiert. Dunkle Histogramme stellen die Isotyp-Kontrolle dar, helle die CD14, bzw. CD1a Färbung. Es werden repräsentative Ergebnisse von mindestens 3 unabhängigen Experimenten mit unterschiedlichen Spendern gezeigt.

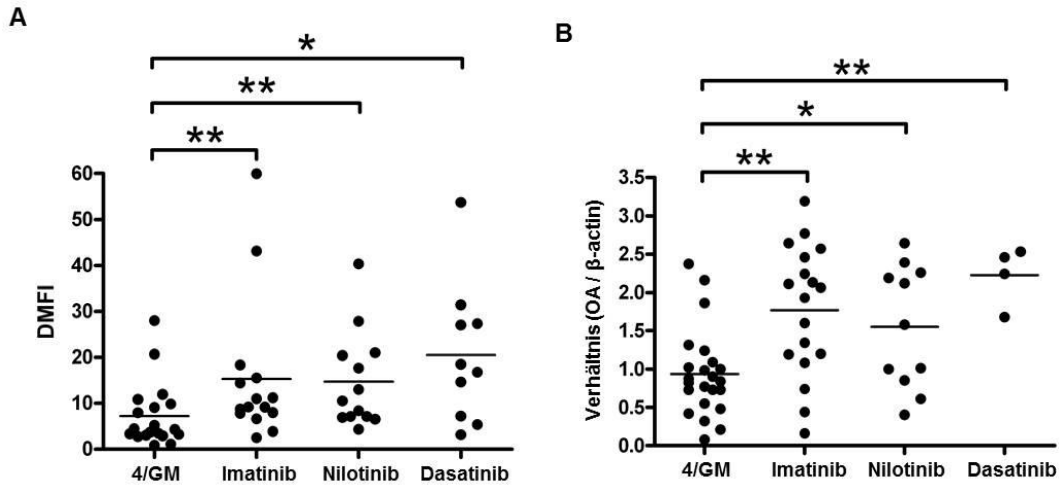


Abb. 13: Statistische Auswertung der OA-Expression auf Protein-Ebene in TKI-behandelten moDZ und Kontroll-moDZ. Unreife moDZ wurden *in vitro* unter Zugabe von 4/GM generiert oder zusätzlich alle 2 Tage beginnend an Tag 0 mit TKI behandelt (Imatinib, Nilotinib, Dasatinib). moDZ wurden an Tag 7 geerntet und mittels FACS analysiert. Es wurde die Differenz der Medianen Fluoreszenzintensität (DMFI) bestimmt. Die Statistische Auswertung wurde mit Graphpad Prism 5 durchgeführt. Hierbei wurde ein „zweiseitiger, gepaarter T-Test“ angewendet (n.s.= nicht signifikant).

7.1.5 Die Erkennung von Pathogen-assoziierten molekularen Mustern (PAMP) kann die Steigerung der OA-Expression durch TKI oder IL-10 unterdrücken

Die Ausreifung von moDZ ist Grundvoraussetzung für eine effektive T-Zell-Stimulation durch DZ. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob die TKI- oder IL-10-bedingte Hochregulation des immunsuppressiven Oberflächenproteins OA von Ausreifungsstimuli beeinflusst werden kann. Es stellte sich heraus, dass sowohl die IL-10- als auch die TKI-bedingte Hochregulation von OA durch den TLR 4 Liganden LPS wieder herab reguliert werden konnte (Abb. 14).

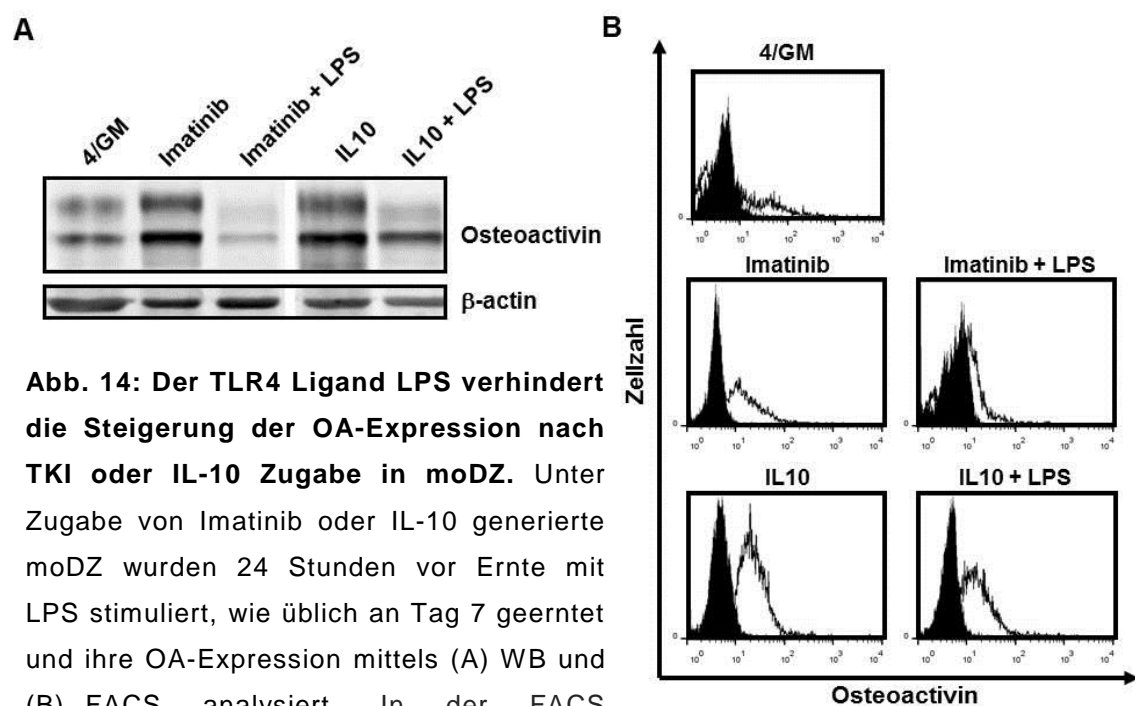


Abb. 14: Der TLR4 Ligand LPS verhindert die Steigerung der OA-Expression nach TKI oder IL-10 Zugabe in moDZ. Unter Zugabe von Imatinib oder IL-10 generierte moDZ wurden 24 Stunden vor Ernte mit LPS stimuliert, wie üblich an Tag 7 geerntet und ihre OA-Expression mittels (A) WB und (B) FACS analysiert. In der FACS stellen dunkle Histogramme die Isotyp-Kontrolle dar, Helle die OA Färbung. Es werden repräsentative Ergebnisse von mindestens drei unabhängigen Experimenten mit unterschiedlichen Spendern gezeigt.

Auch die inflammatorischen Zytokine TNF und IFN- γ waren dazu in der Lage die, durch IL-10 und Imatinib hervorgerufene, OA-Expressionssteigerung abzuschwächen (Abb. 15). Vor allem auf mRNA-Ebene (Abb. 15 (A)) konnte die von Imatinib hervorgerufene OA-Expressionssteigerung stark reduziert werden. Auf Protein-Ebene war dieser Effekt hingegen weniger stark bemerkbar (Abb. 15 (B, C)). TNF und IFN- γ zeigten eine vergleichsweise geringfügige Auswirkung auf die Steigerung der OA-Expression durch IL-10 (Abb. 15 (A-C)).

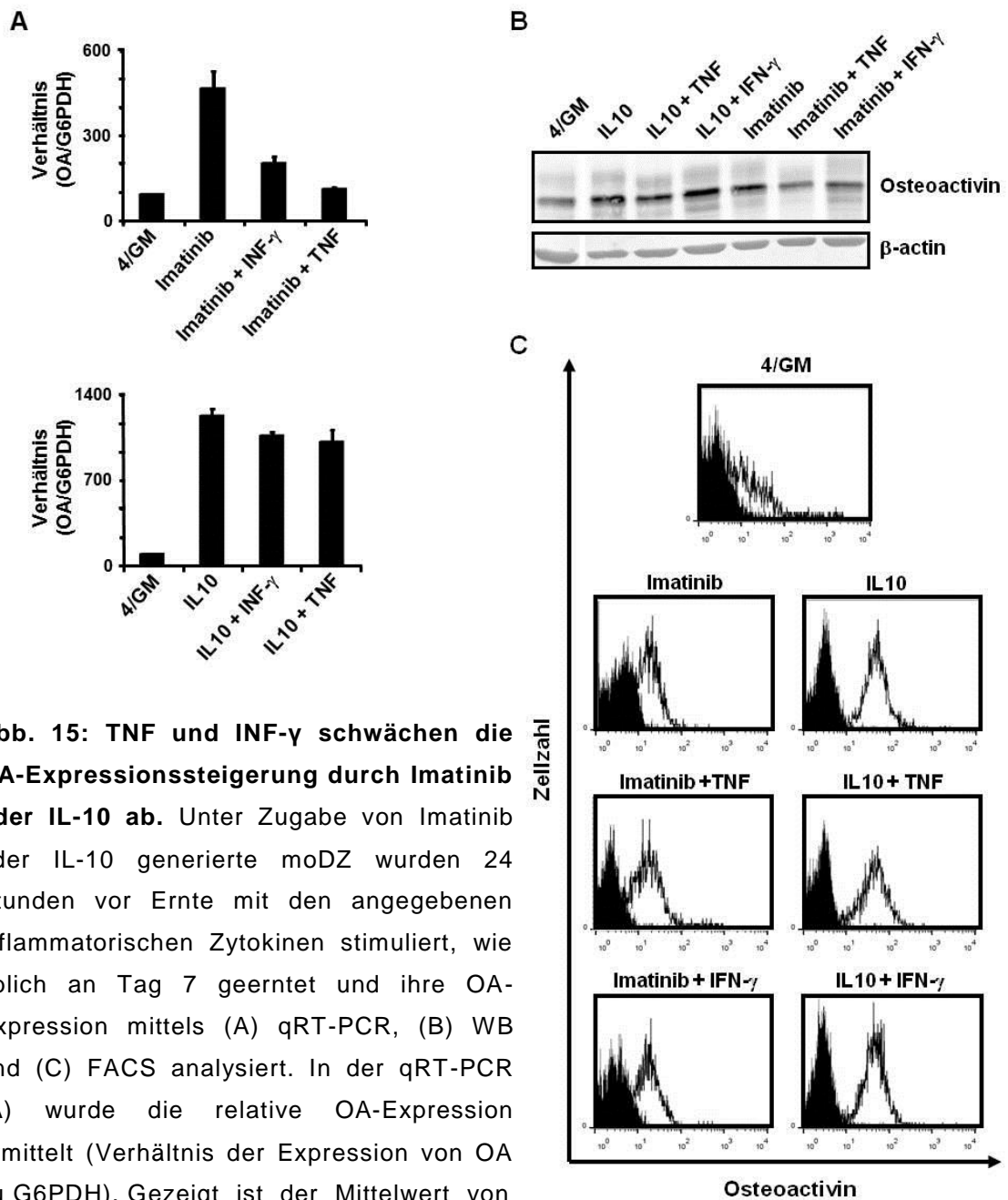
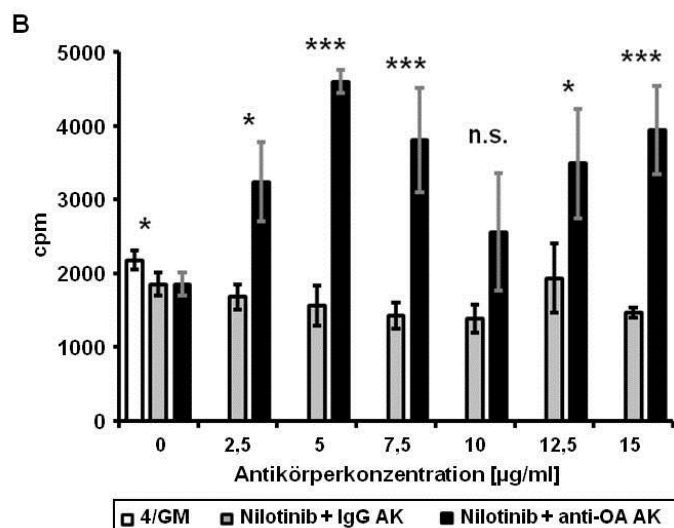
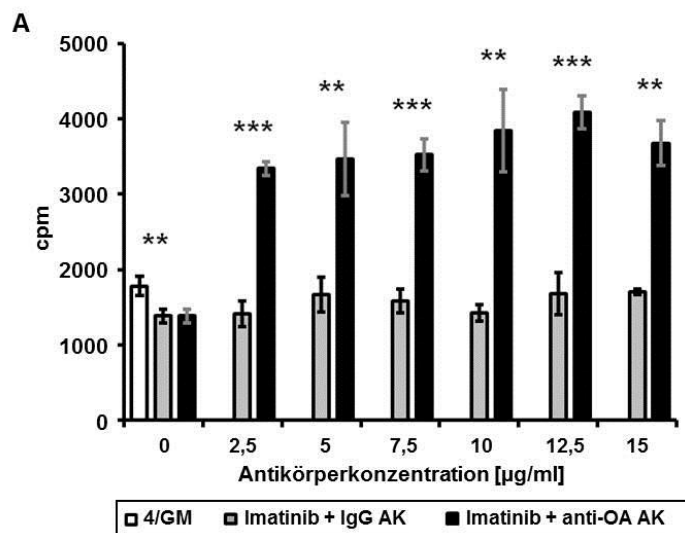


Abb. 15: TNF und $\text{INF-}\gamma$ schwächen die OA-Expressionssteigerung durch Imatinib oder IL-10 ab. Unter Zugabe von Imatinib oder IL-10 generierte moDZ wurden 24 Stunden vor Ernte mit den angegebenen inflammatorischen Zytokinen stimuliert, wie üblich an Tag 7 geerntet und ihre OA-Expression mittels (A) qRT-PCR, (B) WB und (C) FACS analysiert. In der qRT-PCR (A) wurde die relative OA-Expression ermittelt (Verhältnis der Expression von OA zu G6PDH). Gezeigt ist der Mittelwert von zwei technischen Duplikaten sowie deren Standardabweichung (\pm SD). In der FACS Analyse (C) stellen dunkle Histogramme die Isotyp-Kontrolle dar, Helle die OA Färbung. Es werden repräsentative Ergebnisse von mindestens drei unabhängigen Experimenten mit unterschiedlichen Spendern gezeigt.

7.1.6 Die TKI induzierte Verringerung der T-Zell-Stimulationsfähigkeit von moDZ kann durch einen OA-blockierenden AK wiederhergestellt werden

Um bestimmen zu können, in wie weit OA für die abgeschwächte T-Zell-Stimulationsfähigkeit von TKI behandelten moDZ verantwortlich ist, wurde OA in gemischten Lymphozyten Reaktionen (MLR), mit Hilfe eines OA-blockierenden Antikörpers, abgeschirmt. Hierbei stellte sich heraus, dass die TKI-behandelten moDZ durch Zugabe von OA-blockierendem Antikörper nicht nur ihre volle T-Zell-Stimulationsfähigkeit zurückgewinnen konnten sondern diese sogar verbessert wurde (Abb. 16 (A-C)). Dies ist wahrscheinlich darauf zurück zu führen, dass nicht nur das hochregulierte OA von den Antikörpern blockiert wurde, sondern auch das basal exprimierte OA abgeschirmt werden konnte. Diese Vermutung konnte durch eine verbesserte T-Zell-Stimulationsfähigkeit von nicht TKI-behandelten Kontroll-moDZ nach OA-Blockierung untermauert werden (Abb. 16 (D)).



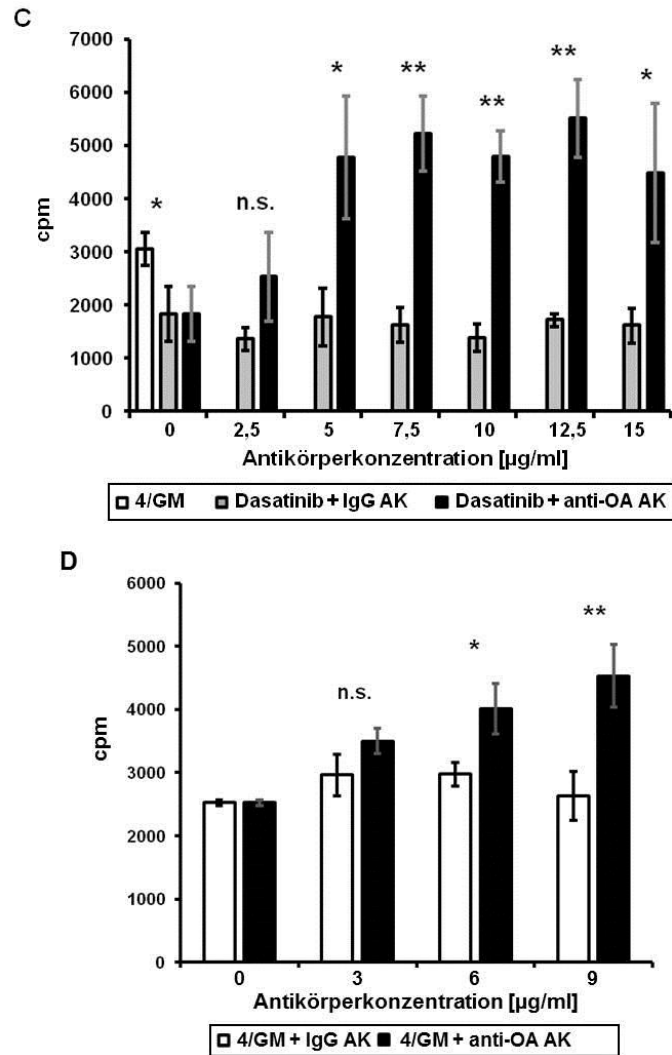


Abb. 16: TKI verringern die Fähigkeit von moDZ zur Induktion einer T-Zell Antwort durch Steigerung der OA-Expression. Unter Zugabe von (A) Imatinib-, (B) Nilotinib- und (C) Dasatinib- generierte moDZ oder nur mit (D) 4/GM generierte moDZ wurden zusammen mit allogenen PBMC für die MLR verwendet. OA wurde durch Zugabe eines anti-OA AK (+ anti-OA AK, schwarze Balken) blockiert. Als Kontrolle-AK wurde Ziegen IgG (+ IgG AK, graue Balken) verwendet. Nur mit 4/GM generierte moDZ mit und ohne Zugabe von Kontroll-AK dienten als Normalzustand-Kontrolle (4/GM / 4/GM +IgG, weiße Balken). Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichungen der „counts per min“ (cpm) von 4 technischen Replikaten. Die Statistische Auswertung wurde mit Graphpad Prism 5 durchgeführt. Es wurde ein „zweiseitiger, gepaarter T-Test“ angewendet (* = $P \leq 0,05$, ** = $P \leq 0,01$, *** = $P \leq 0,003$, n.s. = nicht signifikant). Es werden repräsentative Ergebnisse von mindestens drei unabhängigen Experimenten mit unterschiedlichen Spendern gezeigt.

7.1.7 Effekt von TKI auf weitere immunsuppressive Oberflächenrezeptoren und die moDZ Zytokinproduktion

Als weitere Kontrolle und um sicher zu stellen, dass die im MLR beobachteten tolerogenen Eigenschaften der unter TKI generierten moDZ hauptsächlich auf die Expressionssteigerung von OA zurückzuführen ist, wurde der Expressionsstatus anderer immunsuppressiver Oberflächenmoleküle sowie die Ausschüttung immunsuppressiver Zytokine überprüft.

Eine signifikante Änderung der Expression weiterer immunsuppressiver Oberflächenproteine außer OA, wie etwa „Programmed Death Ligand“ (PD)-L1 und PD-L2 konnte in TKI-behandelten moDZ nicht nachgewiesen werden (Abb. 17)

105,123,170

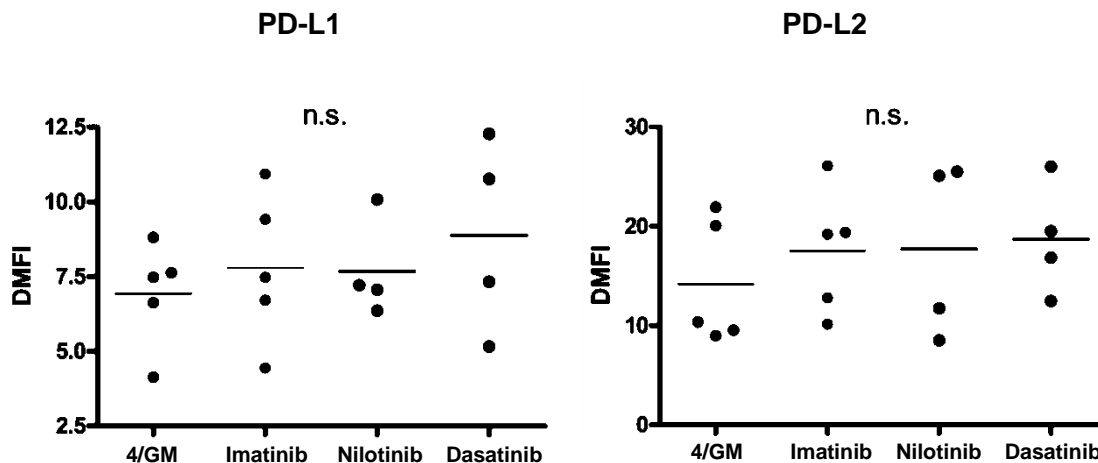


Abb. 17: Statistische Auswertung der PD-L1/2 Expression in TKI-behandelten moDZ und Kontroll-moDZ. Unreife moDZ wurden *in vitro* unter Zugabe von 4/GM generiert oder zusätzlich alle 2 Tage beginnend an Tag 0 mit TKI behandelt (Imatinib, Nilotinib, Dasatinib). moDZ wurden an Tag 7 geerntet und mittels FACS analysiert. Es wurde die Differenz der Medianen Fluoreszenzintensität (DMFI) bestimmt. Die Statistische Auswertung wurde mit Graphpad Prism 5 durchgeführt. Hierbei wurde ein „zweiseitiger, gepaarter T-Test“ angewendet (n.s. = nicht signifikant).

Es konnte ebenfalls keine Änderung in der Produktion und Ausschüttung der immunsuppressiven Zytokine TGF- β und IL-10 durch die TKI-behandelten moDZ festgestellt werden (Abb. 18 (A, B)). Nur die IL-6-Ausschüttung TKI-behandelter moDZ erhöhte sich leicht (Abb. 18 (C)). Es wurde bereits gezeigt, dass IL-6 die Ausreifung von moDZ unterdrücken kann ¹⁷¹.

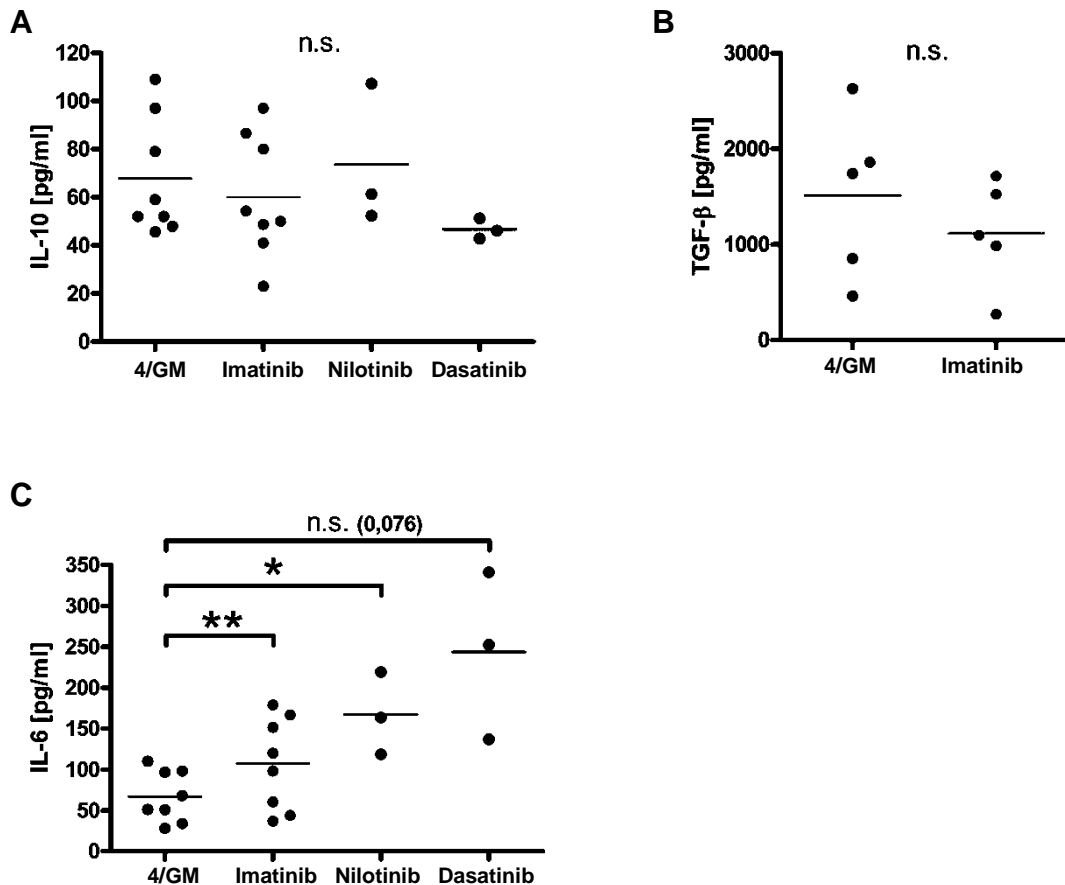


Abb. 18: Statistische Auswertung der Zytokin-Ausschüttung in TKI-behandelten moDZ und Kontroll-moDZ. Unreife moDZ wurden *in vitro* unter Zugabe von 4/GM generiert (4/GM) oder zusätzlich alle 2 Tage beginnend an Tag 0 mit TKI behandelt (Imatinib, Nilotinib, Dasatinib). Der Kulturüberstand wurden an Tag 7 geerntet und die Zytokin-Ausschüttung der moDZ mittels ELISA bestimmt. Die Statistische Auswertung wurde mit Graphpad Prism 5 durchgeführt. Es wurde ein „zweiseitiger, gepaarter T-Test“ angewendet (* = $P \leq 0,05$, ** = $P \leq 0,01$, *** = $P \leq 0,003$, n.s. = nicht signifikant).

7.1.8 Zusammenfassung Ergebnisse Teil 1

Die hier vorgestellten Daten zeigen, dass nicht nur IL-10 sondern auch die BCR-ABL TKI Imatinib, Nilotinib und Dasatinib, während der *in vitro* Generierung von unreifen moDZ, das immuninhibitorische Oberflächenprotein Osteoactivin hochregulieren können. Dieser Effekt kann jedoch durch Ausreifungsstimuli („Gefahrensignale“) wie TLR-Liganden oder den inflammatorischen Zytokinen TNF und IFN- γ wieder umgekehrt werden.

Darüber hinaus konnte mit der Wiederherstellung der T-Zell-Stimulationsfähigkeit von TKI-behandelten moDZ nach Einsatz eines OA-blockierenden AK gezeigt werden, dass die im MLR beobachteten immunsuppressiven Effekte zu einem großen Teil auf die TKI-induzierte Hochregulation von OA zurückzuführen sind.

Dies konnte bestätigt werden, nachdem TKI-behandelte moDZ keine signifikante Expressionssteigerung weiterer immunsuppressiver Oberflächenmoleküle zeigten und auch keine Änderung in der Sekretion von immunsuppressiven Zytokinen beobachtet werden konnte.

7.2 „BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors exert immunosuppressive effects in human dendritic cells by interfering with pathways involved in IL-10 receptor signaling and activation of the microphthalmia-associated transcription factor” – BCR-ABL Tyrosinkinase-Inhibitoren wirken immunsuppressiv auf humane moDZ in dem sie in die IL-10-Signalweiterleitung und die MITF-Aktivierung eingreifen.

Die Kontrolle von APZ zur Auslösung spezifischer Immunreaktionen ist nicht nur eine attraktive Möglichkeit zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen oder Transplant-Wirt-Reaktionen sondern bietet auch die Gelegenheit gegen Krebs gerichtete Immuntherapien zu optimieren ^{170,172}. Wie bereits in 7.1 gezeigt werden konnte, wird die Expression des immunsuppressiven Transmembranprotein Osteoactivin (GPNMB, DC-HIL) in moDZ von IL-10 oder TKI hochreguliert ¹⁷³. Die folgenden Experimente wurden eingesetzt um den molekularen Mechanismus aufzuklären, der für die Aktivierung der GPNMB Transkription in moDZ nach TKI- oder IL-10- Behandlung verantwortlich ist. Die durchgeführten *in vitro* Studien zeigten, dass die von BCR-ABL TKI in humanen moDZ ausgelösten immunsuppressiven Effekte durch Inhibition des PI3K/Akt-Signalwegs und anschließender Aktivierung von MITF ausgelöst werden. Um die Auswirkungen der, während der moDZ-Generierung, verwendeten Zytokine, TKI oder spezifischen Inhibitoren auf Signalwegsaktivierung oder -Inhibition untersuchen zu können, wurden die moDZ in allen Experimenten zur Signalwegsaufklärung an Tag 7 geerntet und mittels CD209 „MicroBeads“ (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D) von den restlichen Zellen der Plastikadhärenzkultur separiert. Tote Zellen wurden mit Hilfe des „Dead Cell Removal Kits“ (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D) entfernt. Danach wurden die Zellen in frischem Medium aufgenommen und nur mit GM-CSF und IL-4 (4/GM) oder zusätzlich mit TKI oder IL-10, bzw. spezifischen Inhibitoren für weitere 20 bis 60 Minuten inkubiert und anschließend mittels qRT-PCR, FACS oder WB analysiert (6.2.5.1, 6.2.5.2).

7.2.1 Die Inhibition des PI3K/Akt-Signalwegs führt zur Steigerung der OA-Expression

Es ist bekannt, dass Imatinib, Nilotinib und Dasatinib nicht nur BCR-ABL sondern auch eine Vielzahl anderer Kinasen in unterschiedlichen Signalwegen inhibieren können²⁸. Aus diesem Grund wurde die Relevanz verschiedener Signalwege für die Steuerung der OA-Expression untersucht.

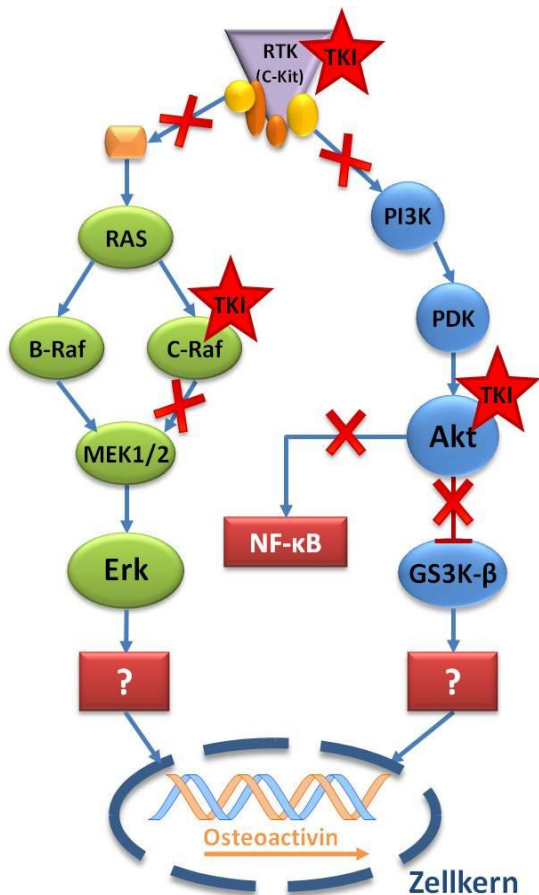


Abb. 19: Schematische Darstellung der Inhibition des Erk- und Akt-Signalwegs durch TKI. Rezeptor Tyrosin Kinasen wie C-Kit sind als lila Dreieck dargestellt. Stellen an denen die TKI in den Erk-Signalweg (in grün dargestellt) oder den Akt-Signalweg (in blau dargestellt) eingreifen sind mit einem roten Stern markiert, blockierte Signalwege sind mit einem roten X gekennzeichnet. Die Fragezeichen stellen unbekannte TF dar.

Um den Effekt der TKI zu simulieren wurden bestimmte Kinasen im PI3K/Akt- sowie im RAS/Erk-Signalweg durch spezifische Inhibitoren blockiert und die darauffolgende Auswirkung auf die OA-Expression an Hand von FACS und qRT-PCR analysiert (Abb. 20). Die Inhibition des RAS/Erk-Signalwegs mittels spezifischer Inhibitoren von Erk und c-Raf (300 nM Erk-Inhibitor FR180204, 20 nM c-Raf-Inhibitor 553003) zeigte keinerlei Auswirkung auf die Expression von OA, wohingegen die Inhibition des PI3K/Akt-Signalwegs durch einen PI3K- (100 nM LY294002) oder Akt-Inhibitor (300 nM MK2206) zu einer drastischen Steigerung der OA-Expression führte.

Dementsprechend konnte die Expression von OA nach Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs mittels LPS und TLR4, stark herunter reguliert werden (Abb. 20 (C)).

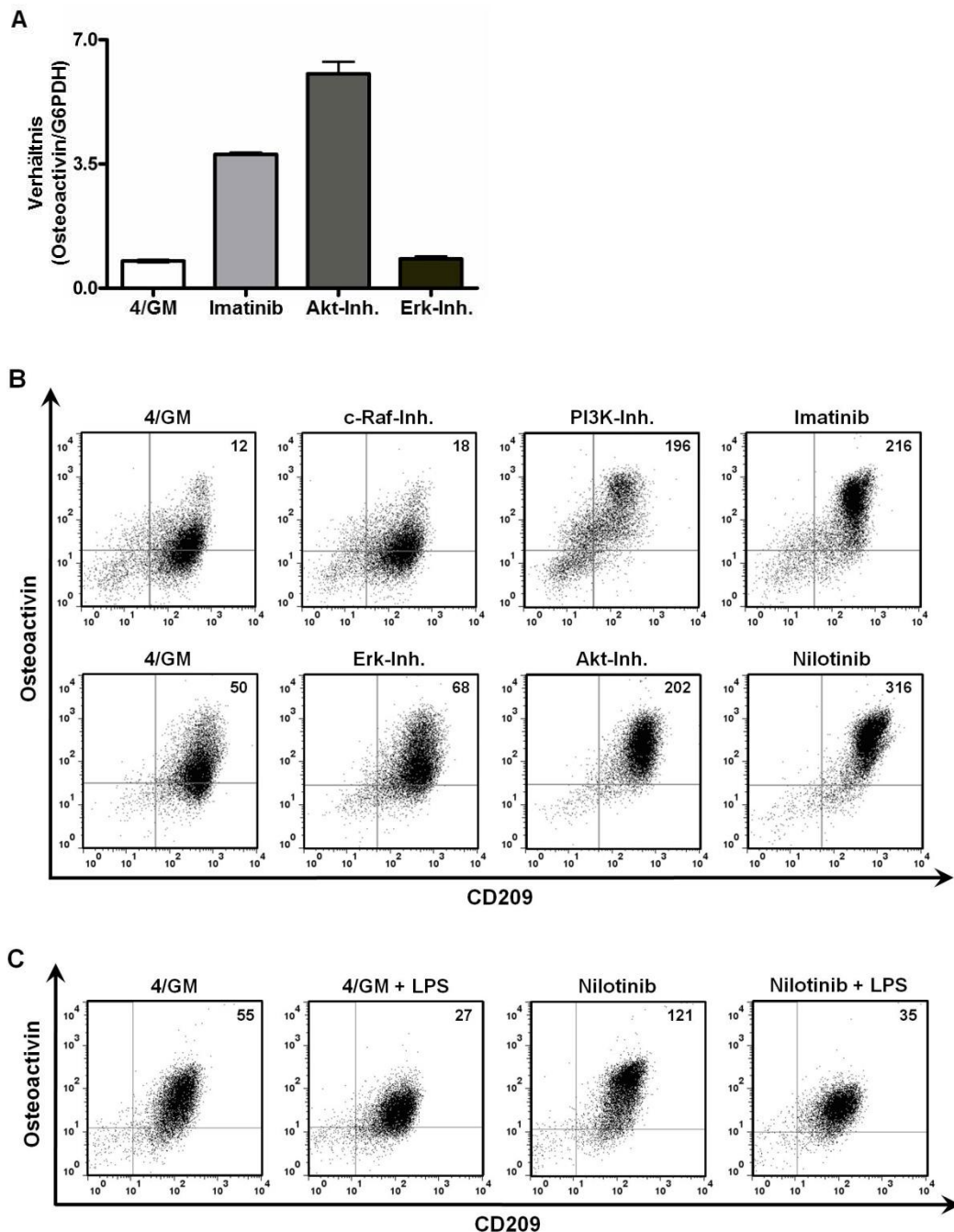
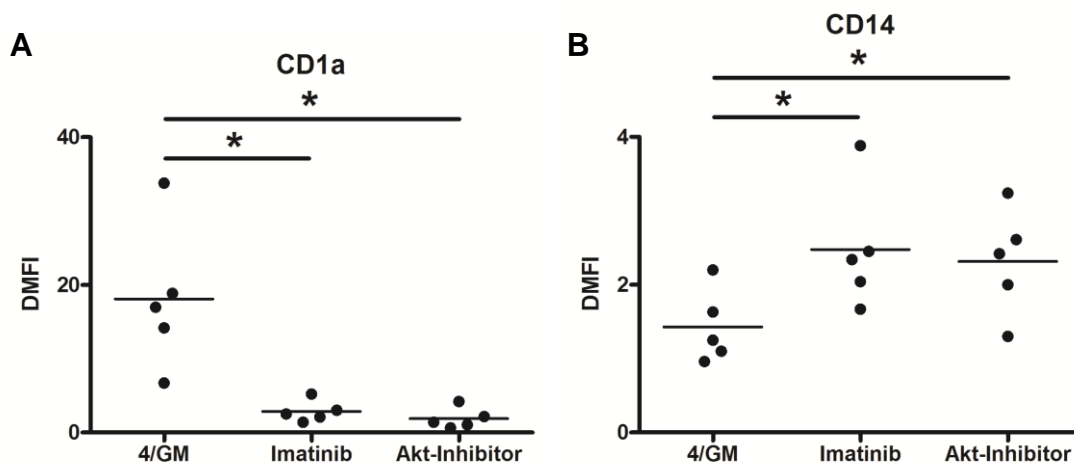


Abb. 20: Die Inhibition des PI3K/Akt-Signalwegs führt zur Steigerung der OA-Expression. Unreife moDZ wurden *in vitro* unter Zugabe von 4/GM generiert oder zusätzlich alle 2 Tage beginnend an Tag 0 mit TKI (3 μ M Imatinib oder 3 μ M Nilotinib), 300 nM Akt Inhibitor MK2206 (Akt-Inh.), 100 nM PI3K Inhibitor LY294002 (PI3K-Inh.) und 300 nM Erk Inhibitor FR180204 (Erk-Inh.) generiert. Falls erforderlich wurden die moDZ 24 Stunden vor Ernte mit LPS ausgereift (+LPS). Die OA-Expression wurde mittels (A) qRT-PCR sowie (B, C) FACS analysiert. In der qRT-PCR (A) wurde die relative OA-Expression ermittelt (Verhältnis der Expression

von OA zu G6PDH). Es ist der Mittelwert von zwei technischen Duplikaten sowie deren Standardabweichung (\pm SD) gezeigt. In der FACS Analyse (B, C) wurde der OA Proteinlevel von CD209 (DC-Sign) positiven Zellen gemessen. Die Differenz der medianen Fluoreszenzintensität (DMFI) wird im rechten, oberen Quadranten gezeigt. Es werden repräsentative Ergebnisse von mindestens drei unabhängigen Experimenten mit unterschiedlichen Spendern gezeigt.

7.2.2 Die Inhibition des PI3K/Akt-Signalwegs durch TKI oder Akt-Inhibitor beeinflusst die Ausdifferenzierung der moDZ

Desweiteren stellte sich heraus, dass die unter Akt-Inhibitor generierten moDZ, wie schon die TKI-behandelten moDZ (7.1.3), einen Großteil ihrer CD14 Expression beibehielten und eine signifikant verringerte Expression von CD1a zeigten (Abb. 21 (A, B)). Andere für Ausreifung und T-Zell Aktivierung wichtige Oberflächenmarker, wie CD83, CD86 und HLA-DR wurden hingegen nicht signifikant beeinflusst (Abb. 21 (C, D, E)). Der einzige signifikant beeinflusste Oberflächenmarker war der co-stimulatorische Rezeptor CD80, welcher von Imatinib und dem Akt-Inhibitor (MK2206) gleichermaßen leicht herunter reguliert wurde (Abb. 21 (F)).



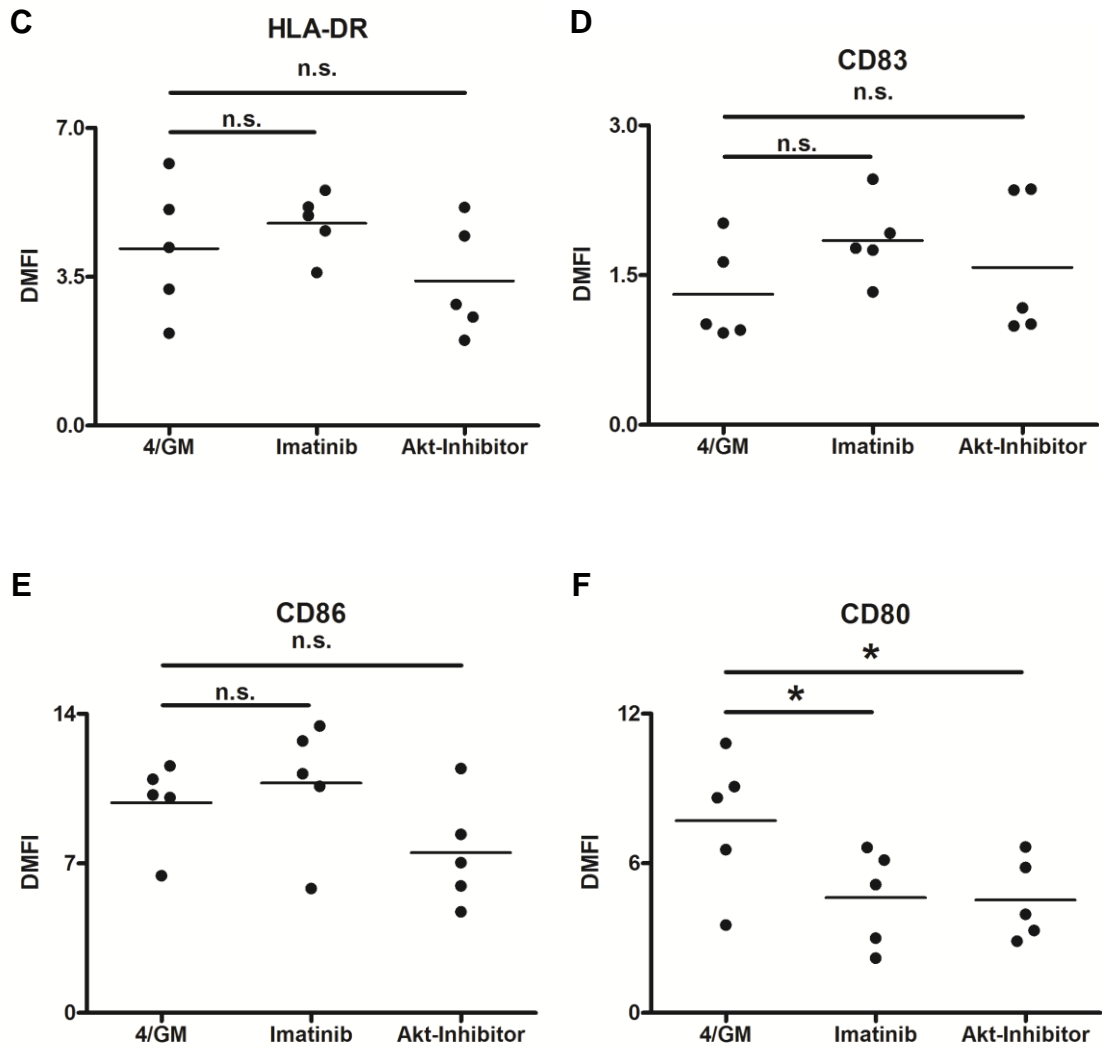
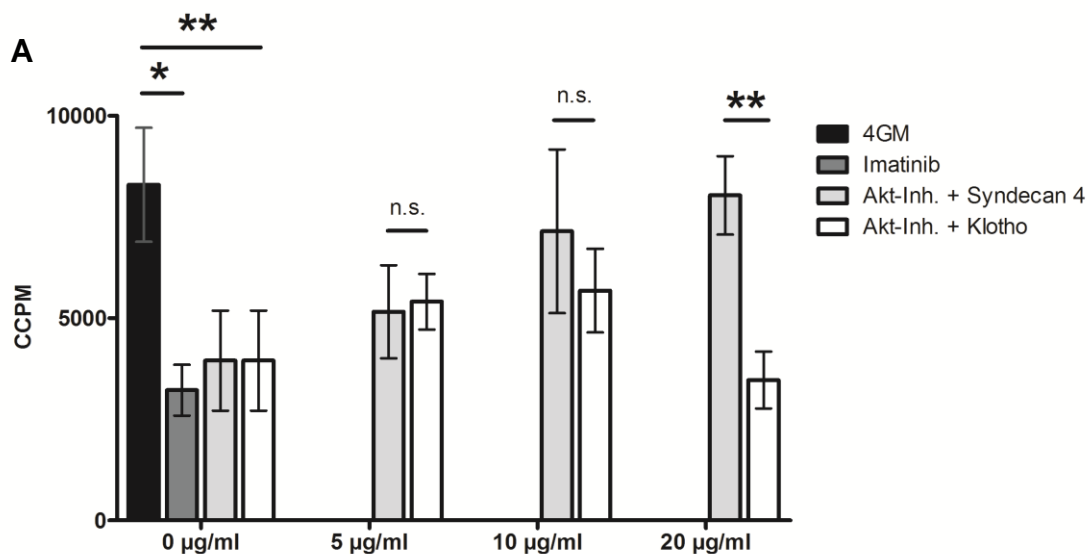


Abb. 21: TKI und Akt-Inhibitor beeinflussen die Ausdifferenzierung der moDZ. Unreife moDZ wurden *in vitro* unter Zugabe von 4/GM generiert oder zusätzlich alle 2 Tage beginnend an Tag 0 mit Imatinib oder Akt-Inhibitor behandelt. moDZ wurden an Tag 7 geerntet und mittels FACS analysiert. Es wurde die Differenz der Medianen Fluoreszenzintensität (DMFI) bestimmt. Die Statistische Auswertung wurde mit Graphpad Prism 5 durchgeführt. Gezeigt ist Streudiagramm von mindestens 5 verschiedenen Spendern. Die Rohdaten wurden verwendet um einen „ratio paired t-test“ durchzuführen. $p^* \leq .05$, $p^{**} \leq .01$, $p^{***} \leq .003 = ***$, n.s. = nicht signifikant.

7.2.3 Die Inhibition des PI3K/Akt-Signalwegs verringert die Fähigkeit von moDZ zur Induktion einer T-Zell-Antwort durch Steigerung der OA-Expression

Wie bereits für TKI behandelte moDZ gezeigt wurde (7.1.6), kommt es auch bei Akt-Inhibitor behandelten moDZ zu einer verstärkten Expression von OA, welche zu einer signifikant reduzierten T-Zell-Stimulationsfähigkeit der moDZ führt. Was mittels MLR-Analysen (6.2.7) nachgewiesen werden konnte (Abb. 22 (A, B)). Desweiteren konnte gezeigt werden, dass die Blockierung von OA mittels rekombinantem SD-4 zu einer Wiederherstellung der moDZ T-Zell-Stimulationsfähigkeit führte (Abb. 22 (A, C)). Wohingegen das als Kontrolle eingesetzte rekombinante Transmembranprotein Klotho keine signifikante Auswirkung zeigte. Dies bestätigte die funktionelle Relevanz der Akt-Inhibition und zeigte, dass die Steigerung der OA-Expression auch bei Akt-Inhibitor behandelten moDZ der Hauptgrund für die verringerte T-Zell-Stimulationsfähigkeit war.



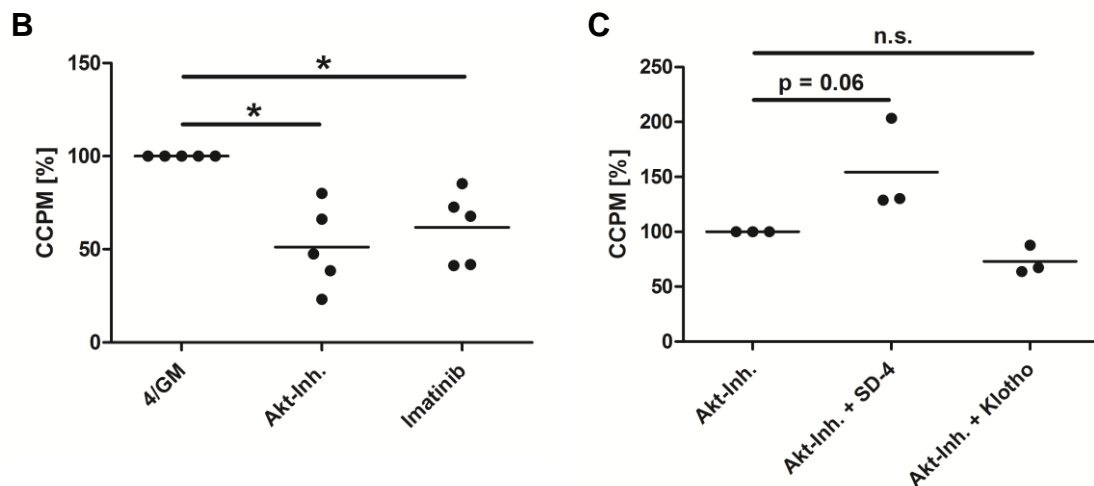


Abb. 22: Die Inhibition des PI3K/Akt-Signalwegs verringert die Fähigkeit von moDZ zur Induktion einer T-Zell-Antwort durch Steigerung der OA-Expression, was durch die Blockierung von OA wiederhergestellt werden kann. Unreife moDZ wurden nur unter Zugabe von 4/GM oder zusätzlich mit Imatinib oder Akt-Inhibitor generiert und zusammen mit allogenen PBMC für die MLR verwendet. OA wurde durch Zugabe von Syndecan 4 (+SD-4) blockiert. Als Kontrolle wurde Klotho (+ Klotho) verwendet. Nur mit 4/GM generierte moDZ dienten als Normalzustand-Kontrolle. (A) Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichungen der „corrected counts per min“ (CCPM) von 4 technischen Replikaten. (B, C) Dargestellt ist ein Streudiagramm von mindestens 3 verschiedenen Spendern. Alle Werte wurden auf die 4/GM (B) oder Akt-Inh. (C) normalisiert (4/GM, Akt-Inh. = 100 %). Die Statistische Auswertung wurde mit Graphpad Prism 5 durchgeführt. Es wurde ein „ratio paired t-test“ angewendet (* = $P \leq 0,05$, ** = $P \leq 0,01$, *** = $P \leq 0,003$, n.s. = nicht signifikant). Es werden repräsentative Ergebnisse von mindestens drei unabhängigen Experimenten mit unterschiedlichen Spendern gezeigt.

7.2.4 Expression von MITF und OA in verschiedenen hämatopoetischen Zelltypen

Als Nächstes wurde versucht einen TF ausfindig zu machen, welcher durch die Inhibition des PI3K/Akt-Signalweg aktiviert wird und somit für die gesteigerte OA-Expression verantwortlich sein könnte. In Melanom Zellen konnte gezeigt werden, dass die OA-Expression durch den TF MITF kontrolliert wird, welcher wiederum durch GSK3- β kontrolliert wird¹⁷⁴. GSK3- β wird unter anderem durch den PI3K/Akt-Signalweg gesteuert und fungiert bei der Signalweiterleitung zu MITF als „molekularer

Schalter“, welcher üblicherweise von Akt auf „aus“ gestellt wird. Akt phosphoryliert GSK3- β an Serin 9 wodurch es inhibiert wird. Sollte Akt jedoch selbst inhibiert werden, wird der „Schalter“ umgelegt und GSK3- β aktiviert. Aktiviertes GSK3- β kann MITF an Serin 298 phosphorylieren und somit aktivieren (5.6). Welche Rolle MITF in der Hämopoese spielt, wurde bisher jedoch nicht weiter analysiert. Aus diesem Grund wurde das Expressionsmuster von MITF in verschiedenen hämopoetischen Zelltypen mittels qRT-PCR untersucht (Abb. 23). Hierbei konnte festgestellt werden, dass eine signifikante Expression von MITF nur in Monozyten und CD34+ Vorgängerzellen nachweisbar war. CD4+, CD8+ und CD19+ Zellen zeigten nur eine sehr geringe Expression und CD4+CD25+ regulatorische T-Zellen gar keine MITF Expression. Dies entspricht fast vollständig dem Expressionsmuster von OA. Nur in CD34+ Zellen konnte keine OA-Expression festgestellt werden.

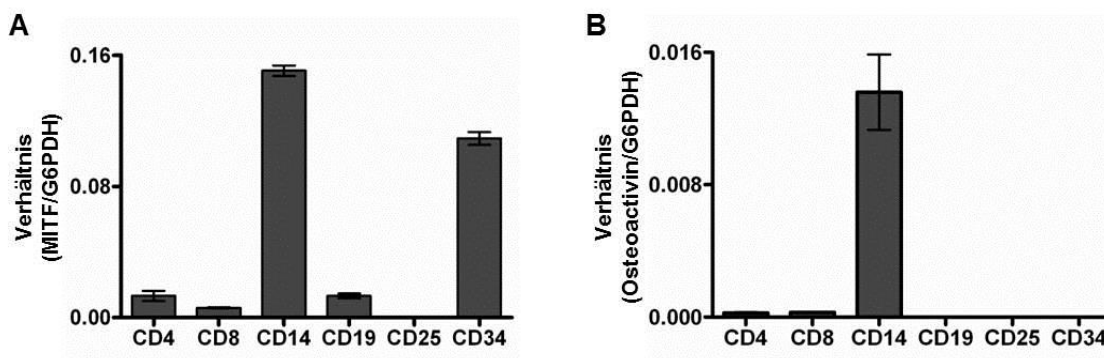


Abb. 23: Expressionsmuster von MITF und OA in verschiedenen hämopoetischen Zelltypen. Die Expressionsmuster von MITF (A) und OA (B) wurden mittels qRT-PCR untersucht. Hierfür wurde Zelltyp spezifische Gesamt-RNA verwendet und die relative MITF, bzw. OA-Expression ermittelt (Verhältnis der Expression von MITF oder OA zu G6PDH). Es ist der Mittelwert von zwei technischen Duplikaten sowie deren Standardabweichung (\pm SD) gezeigt. Es werden repräsentative Ergebnisse von mindestens drei unabhängigen Experimenten mit unterschiedlichen Spendern gezeigt.

7.2.5 Expression von MITF in *in vitro* generierten moDZ

Desweiteren wurde untersucht, ob es auch in *in vitro* generierten unreifen moDZ zu einer MITF-Expression kommt und wenn ja, ob diese Expression durch TKI oder IL-10 beeinflusst werden kann. Es konnte nicht nur gezeigt werden, dass MITF in *in vitro* generierten moDZ exprimiert wird sondern auch, dass die MITF-Expression (wenn auch nur leicht im Vergleich zur OA-Expression) durch IL-10 und TKI gesteigert werden konnte (Abb. 24).

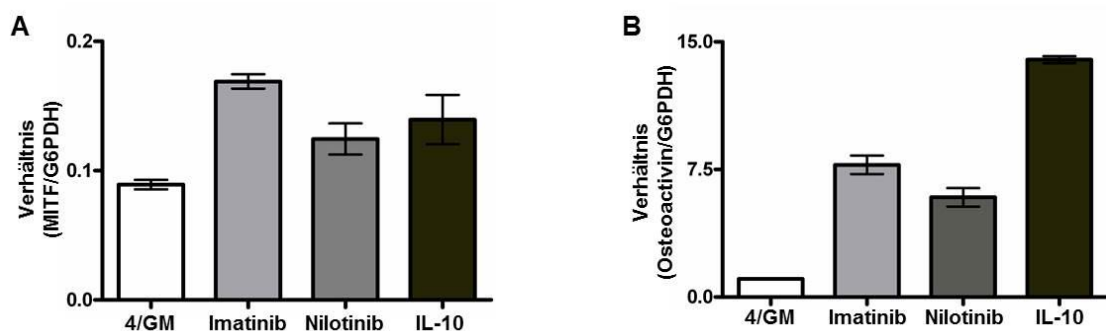


Abb. 24: Expression von MITF und OA in TKI oder IL-10 behandelten moDZ.

Unreife moDZ wurden nur unter Zugabe von 4/GM oder zusätzlich mit TKI (Imatinib oder Nilotinib), bzw. IL-10 generiert. Die Expression von MITF (A) und OA (B) wurden mittels qRT-PCR untersucht. Es wurde die relative MITF-, bzw. OA-Expression ermittelt (Verhältnis der Expression von MITF oder OA zu G6PDH). Es ist der Mittelwert von zwei technischen Duplikaten sowie deren Standardabweichung (\pm SD) gezeigt. Es werden repräsentative Ergebnisse von mindestens drei unabhängigen Experimenten mit unterschiedlichen Spendern gezeigt.

7.2.6 MITF steigert die OA-Expression nach Inhibition des PI3K/Akt-Signalwegs durch IL-10 oder TKI

Auf Grund der bis dahin gewonnen Daten wurde eine Hypothese zur Regulation der OA-Expression in *in vitro* generierten moDZ entwickelt. Laut Hypothese wird die Expression von OA über den PI3K/Akt/GSK3- β /MITF-Signalweg kontrolliert. GSK3- β fungiert hierbei als „molekularer Schalter“, welcher normalerweise durch Akt inhibiert wird, bei einer Inhibition von Akt durch TKI oder IL-10 aber dazu in der Lage ist MITF zu aktivieren (5.6, Abb. 34). Zur Bestätigung dieser Hypothese wurde die Inhibition des PI3K/Akt-Signalwegs durch IL-10 und TKI mittels eines spezifischen Akt-Inhibitors (300 nM MK2206) nachgestellt. Desweiteren wurden der Proteinlevel,

Phosphorylierungsstatus und die zelluläre Lokalisation von Akt, GSK3- β und MITF, nach IL-10- oder TKI-Behandlung, im WB untersucht. Um die Kulturbedingungen während der DZ-Generierung bestmöglich nachstellen zu können und um die Auswirkungen von Zytokinen, TKI und spezifischen Inhibitoren auf die Signalwegsweiterleitung in moDZ untersuchen zu können, wurden die an Tag 7 geernteten moDZ vor der Analyse für 20, bzw. 40 min in frischem Kulturmedium, inklusive den während der Generierung verwendeten Zytokinen, TKI oder spezifischen Inhibitoren, inkubiert.

7.2.6.1 TKI und IL-10 inhibieren die Phosphorylierung von Akt

Es konnte gezeigt werden, dass in IL-10, TKI oder Akt-Inhibitor behandelten moDZ nicht nur die OA-Expression gesteigert werden konnte (Abb. 25) sondern auch Akt dephosphoryliert wurde (Abb. 26). Auf Grund der begrenzten Anzahl der zur Verfügung stehenden moDZ, konnten nicht alle Behandlungen an Zellen des gleichen Spenders getestet werden. Jede Behandlung mit Imatinib, Nilotinib, IL-10 oder Akt-Inhibitor (MK2206) wurde an Zellen von mindestens drei verschiedenen Spendern untersucht.

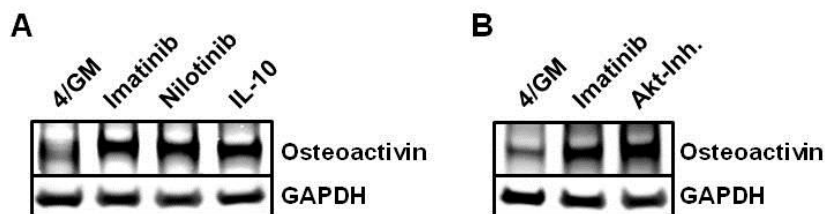


Abb. 25: Der Akt-Inhibitor MK2206 steigert die Expression von OA in moDZ ebenso wie TKI und IL-10: moDZ wurden nur unter Zugabe von 4/GM oder zusätzlich mit TKI (Imatinib, Nilotinib), IL-10 oder Akt-Inhibitor (MK2206) generiert. Die OA-Expression wurde mittels WB analysiert. Es werden repräsentative Ergebnisse von mindestens drei unabhängigen Experimenten mit unterschiedlichen Spendern gezeigt.

Es konnte gezeigt werden, dass die Inkubation der moDZ mit 4/GM und Imatinib (Abb. 26 (A)) oder Nilotinib (Abb. 26 (B)), bei gleichbleibendem Akt-Proteinlevel, innerhalb von 20 bis 40 Minuten zu einer verringerten Phosphorylierung von Akt führte. Das immunsuppressive Zytokin IL-10 zeigte eine, mit den TKI vergleichbare, Dephosphorylierung von Akt (Abb. 26 (C)). Dieser Effekt wurde durch eine 40-

minütige Inkubation mit Akt-Inhibitor noch übertroffen, wobei hier auch der Akt Proteinlevel sank (Abb. 26 (D)).

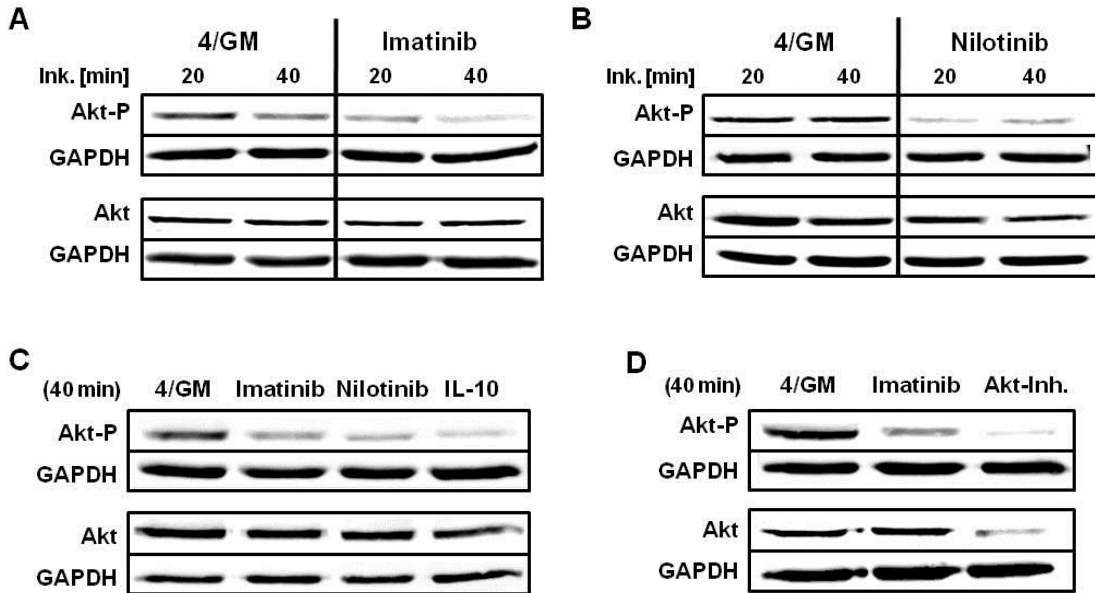


Abb. 26: TKI und IL-10 inhibieren die Phosphorylierung von Akt: moDZ wurden nur unter Zugabe von 4/GM oder zusätzlich mit TKI (Imatinib, Nilotinib), IL-10 oder Akt-Inhibitor (MK2206) generiert, an Tag 7 geerntet und mittels CD209 „Microbeads“ aufgereinigt. Daraufhin erfolgte eine 20 bis 40 min Inkubation mit den während der Generierung verwendeten Zytokinen und Inhibitoren. Der Akt Proteinlevel (Akt) und Phosphorylierungsstatus (Akt-P) wurde mittels WB analysiert. Es werden repräsentative Ergebnisse von mindestens drei unabhängigen Experimenten mit unterschiedlichen Spendern gezeigt.

Die enorme Spendervariabilität erschwerte die WB-Analyse. Jedoch konnte bei steigender Spenderzahl eine hohe Signifikanz erreicht werden (Abb. 27).

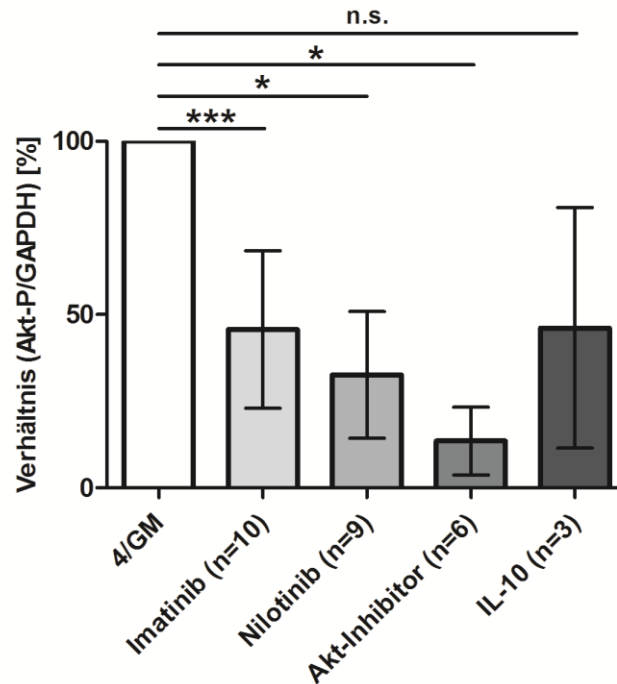


Abb. 27: Statistische Auswertung der Inhibition von Akt-P durch TKI und IL-10.

moDZ wurden nur unter Zugabe von 4/GM oder zusätzlich mit TKI (Imatinib, Nilotinib), IL-10 oder Akt-Inhibitor (MK2206) generiert, an Tag 7 geerntet und mittels CD209 „Microbeads“ aufgereinigt. Daraufhin erfolgte eine 40 minütige Inkubation mit den während der Generierung verwendeten Zytokinen und Inhibitoren. Mittels der LICOR Odyssey Application Software 3.0 wurde eine relative Quantifizierung der Akt-P durchgeführt. Alle Werte wurden auf die 4/GM Kontrolle normalisiert (4/GM = 100 %) und als Verhältnis von Akt-P zu GAPDH angegeben. Die Statistische Auswertung wurde mit Graphpad Prism 5 durchgeführt. Gezeigt ist der Mittelwert von mindestens 3 verschiedenen Spendern sowie deren Standardabweichung (\pm SD). Die Rohdaten wurden verwendet um einen „ratio paired t-test“ durchzuführen. $p^* \leq 0.05$, $p^{**} \leq 0.01$, $p^{***} \leq 0.003 = ***$, n.s. = nicht signifikant.

7.2.6.2 TKI und IL-10 inhibieren die Phosphorylierung von GSK3- β

Die Inhibition von Akt mittels TKI und IL-10 führt in moDZ zu einer Dephosphorylierung von GSK3- β nicht aber von GSK3- α . Es wurde ein monoklonaler AK eingesetzt, der beide GSK3 Isoformen (α , β) detektieren konnte. Eine 20 bis 40 minütige Inkubation der moDZ mit 4/GM und Imatinib (Abb. 28 (A)) oder Nilotinib (Abb. 28 (B)) führt bei gleichbleibendem GSK3- α/β Proteinlevel zu einer verringerten Phosphorylierung von GSK3- β , wohingegen GSK3- α nicht beeinflusst wurde. Das immunsuppressive Zytokin IL-10 zeigte nach 40 min eine mit den TKI vergleichbare

Dephosphorylierung von GSK3- β (Abb. 28 (C)). Der Akt-Inhibitor zeigte auch hier, wie erwartet, einen deutlich stärkeren Effekt (Abb. 28 (D)). Wie klar an den WB-Bildern zu sehen ist, schwankte die GSK3- β -P stark von Spender zu Spender.

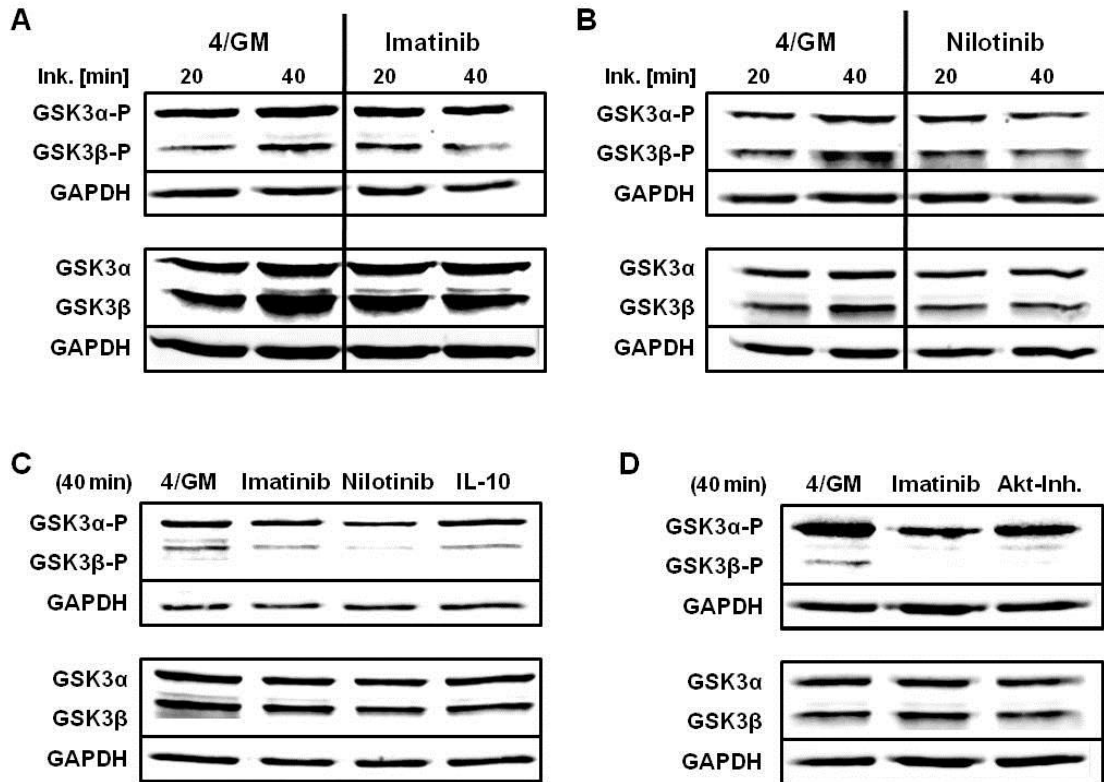


Abb. 28: TKI und IL-10 inhibieren die Phosphorylierung von GSK3- β : moDZ wurden nur unter Zugabe von 4/GM oder zusätzlich mit TKI (Imatinib, Nilotinib), IL-10 oder Akt-Inhibitor (MK2206) generiert, an Tag 7 geerntet und mittels CD209 „Microbeads“ aufgereinigt. Daraufhin erfolgte eine 20 bis 40 min Inkubation mit den während der Generierung verwendeten Zytokinen und Inhibitoren. Der GSK3- α/β Proteinlevel (GSK3- α/β) und Phosphorylierungsstatus (GSK3- α/β -P) wurde mittels WB analysiert. Es werden repräsentative Ergebnisse von mindestens drei unabhängigen Experimenten mit unterschiedlichen Spendern gezeigt.

Trotz starker Spendervariabilität und einer geringen Detektionssensitivität des verwendeten AK, konnte bei steigender Spenderzahl auch in diesem Ansatz eine hohe Signifikanz erreicht werden (Abb. 29).

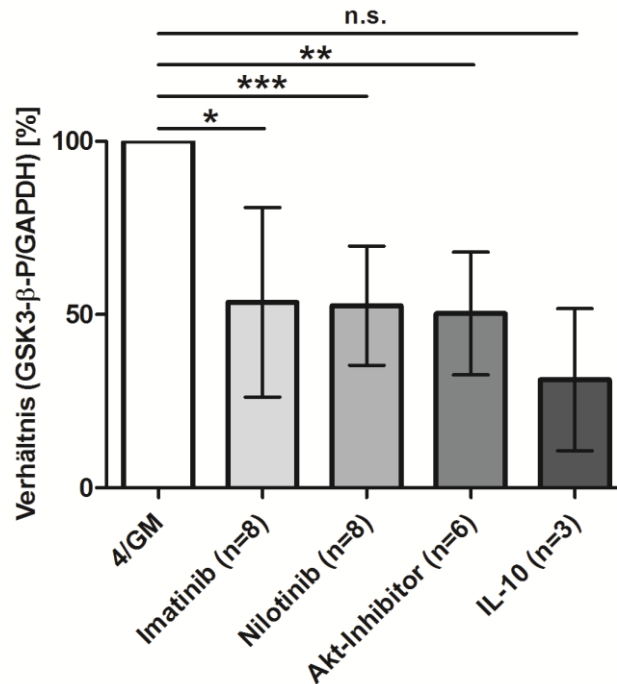


Abb. 29: Statistische Auswertung der Inhibition von GSK3-β durch TKI und IL-10. moDZ wurden nur unter Zugabe von 4/GM oder zusätzlich mit TKI (Imatinib, Nilotinib), IL-10 oder Akt-Inhibitor (MK2206) generiert, an Tag 7 geerntet und mittels CD209 „Microbeads“ aufgereinigt. Daraufhin erfolgte eine 40 min Inkubation mit den während der Generierung verwendeten Zytokinen und Inhibitoren. Mittels der LI-COR Odyssey Application Software 3.0 wurde eine relative Quantifizierung der GSK3-β-P durchgeführt. Alle Werte wurden auf die 4/GM Kontrolle normalisiert (4/GM = 100 %) und als Verhältnis von Akt-P zu GAPDH angegeben. Die Statistische Auswertung wurde mit Graphpad Prism 5 durchgeführt. Gezeigt ist der Mittelwert von mindestens 3 verschiedenen Spendern sowie deren Standardabweichung (\pm SD). Die Rohdaten wurden verwendet um einen „ratio paired t-test“ durchzuführen. $p^* \leq .05$, $p^{**} \leq .01$, $p^{***} \leq .003 = ***$, n.s. = nicht signifikant.

7.2.6.3 MITF wird in TKI oder IL-10 behandelten moDZ phosphoryliert

Die Dephosphorylierung von GSK3-β führt zu dessen Aktivierung und der darauffolgenden Phosphorylierung von MITF an Serin 298 (siehe 5.6). Mittels WB-Analyse konnte gezeigt werden, dass die Generierung von moDZ unter Zugabe von TKI oder IL-10 zu einer Phosphorylierung von MITF führte (Abb. 30). Da es keine kommerziell erhältlichen phosphorylierungsspezifischen AK gibt, welche die Phosphorylierung von MITF an Serin 298 nachweisen, musste dies auf andere Weise überprüft werden ^{164,165}. Interessanterweise führt die Phosphorylierung von MITF im

WB zu einem „Shift“, wodurch der TF im Gel langsamer läuft und als separate Bande über der nicht-phosphorylierten MITF-Variante zu sehen ist ¹⁶⁸. Dadurch konnte phosphoryliertes und somit aktiviertes MITF (ca. 70 kDa) von nicht-phosphoryliertem und konsequenter Weise inaktivem MITF (ca. 55) unterschieden werden. Um zu kontrollieren ob die vermeintliche Phosphorylierungs-Bande auch wirklich phosphoryliertes MITF darstellte wurden die Zelllysate mit Phosphatase behandelt, wodurch sich die Bande fast vollständig auflöste (Abb. 30, Spur 3,4). Das MITF-Bandenmuster unterscheidet sich zwischen moDZ und der verwendeten Hela-Kontrolle, was zum Auftreten zelltypspezifischer Isoformen passt.

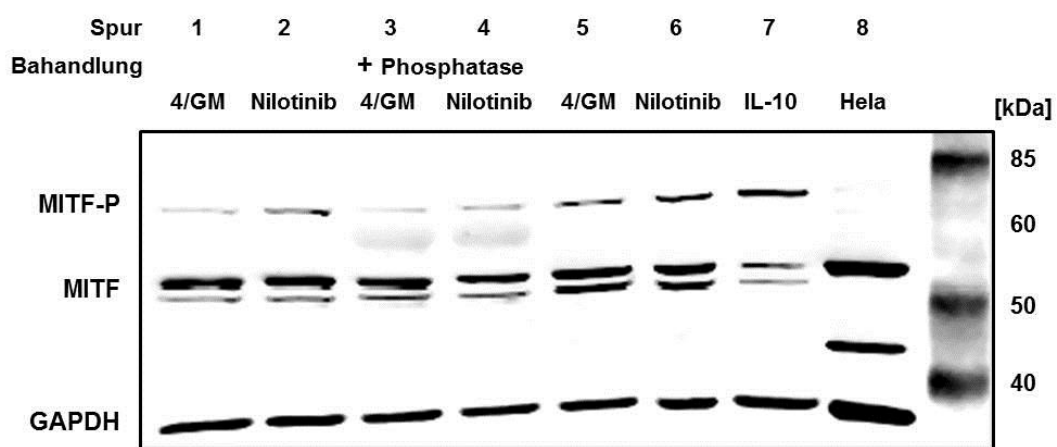
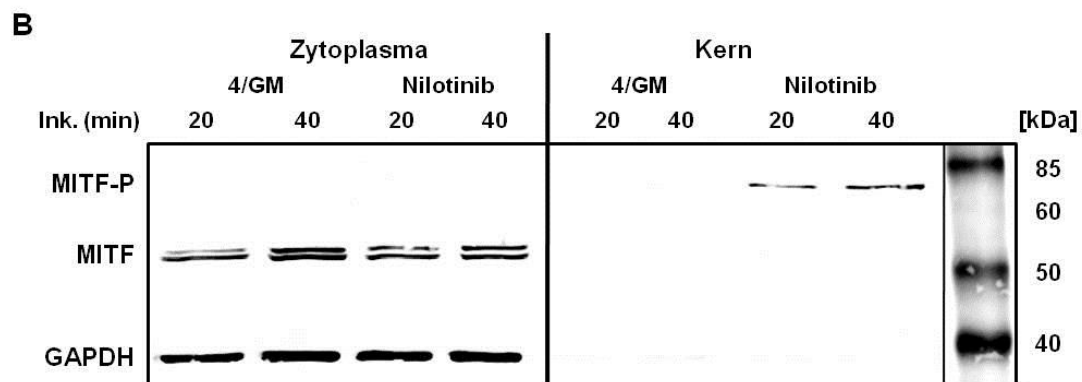
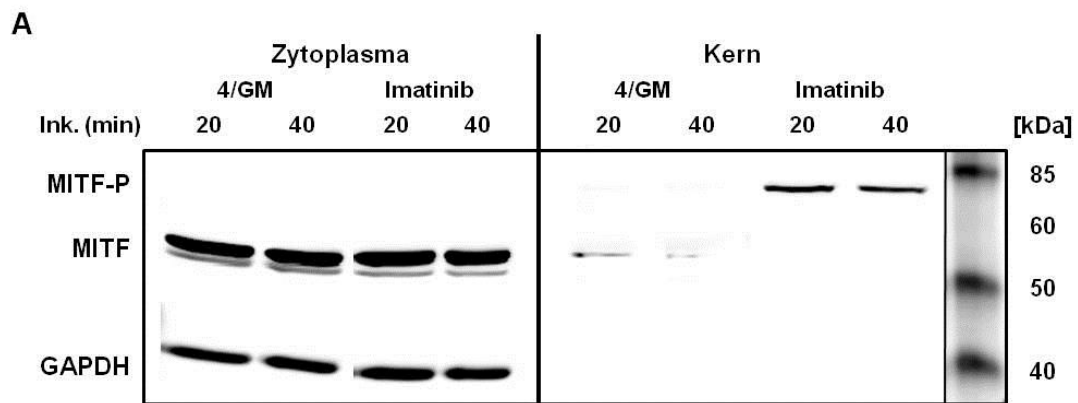


Abb. 30: MITF wird in moDZ durch TKI oder IL-10 phosphoryliert. moDZ wurden nur unter Zugabe von 4/GM oder zusätzlich mit TKI (Nilotinib), bzw. IL-10 generiert, an Tag 7 geerntet und mittels CD209 „Microbeads“ aufgereinigt. Daraufhin erfolgte eine 40 min Inkubation mit den während der Generierung verwendeten Zytokinen und Inhibitoren. Der MITF Proteinlevel und Phosphorylierungsstatus wurde mittels WB analysiert. Es wurden Zelllysate von 2 Spendern (Spender 1 = Spur 1 – 4, Spender 2 = Spur 5 - 7) und einer Tumorzelllinie (Hela, CCL-2, ATCC, Wesel, D, Spur 8) aufgetragen. „+ Phosphatase“ bezeichnet Zelllysate die zusätzlich mit Phosphatase behandelt wurden (Spur 3, 4). GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet. Es werden repräsentative Ergebnisse von mindestens drei unabhängigen Experimenten mit unterschiedlichen Spendern gezeigt.

7.2.6.4 Phosphoryliertes MITF transloziert in den Zellkern

Die Phosphorylierung von MITF an Serin 298 führt nicht nur zur Aktivierung des TF sondern auch zu dessen Translokation in den Zellkern (siehe 5.6). Dies konnte als zweiter Nachweis der MITF-Aktivierung ausgenutzt werden. Hierfür wurden von den

IL-10, TKI oder Akt-Inhibitor behandelten moDZ mit Hilfe des „Nuclear/Cytosol Fractionation Kit“ von BioVison (Milpitas, CA, USA) Zytoplasma- sowie Zellkernfraktionen isoliert und mittels WB analysiert. Es zeigte sich, dass nach einer 20- bis 40-minütigen Inkubation (Ink.) der moDZ mit Imatinib (Abb. 31 (A)) oder Nilotinib (Abb. 31 (B)), die phosphorylierte Form von MITF im Zellkern (gezeigt auf der rechten Seite des WB) nachweisbar war. Dies konnte auch bei einer Inkubation der moDZ mit IL-10 (Abb. 31 (C)) oder dem spezifischen Akt-Inhibitor MK 2206 (Abb. 31 (D)) nachgewiesen werden. Die Akt-Inhibitor Kontrolle zeigte, dass die Inhibition des PI3K/Akt-Signalwegs allein ausreichend ist und weitere durch die TKI oder IL-10 verursachte Inhibitionen keinen oder nur geringen Einfluss auf die OA-Expression haben. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die aktive Signalweiterleitung in den Zellkern nach 40 bis 60 min durch Dephosphorylierung des TF beendet wird (Abb. 31 (E)).



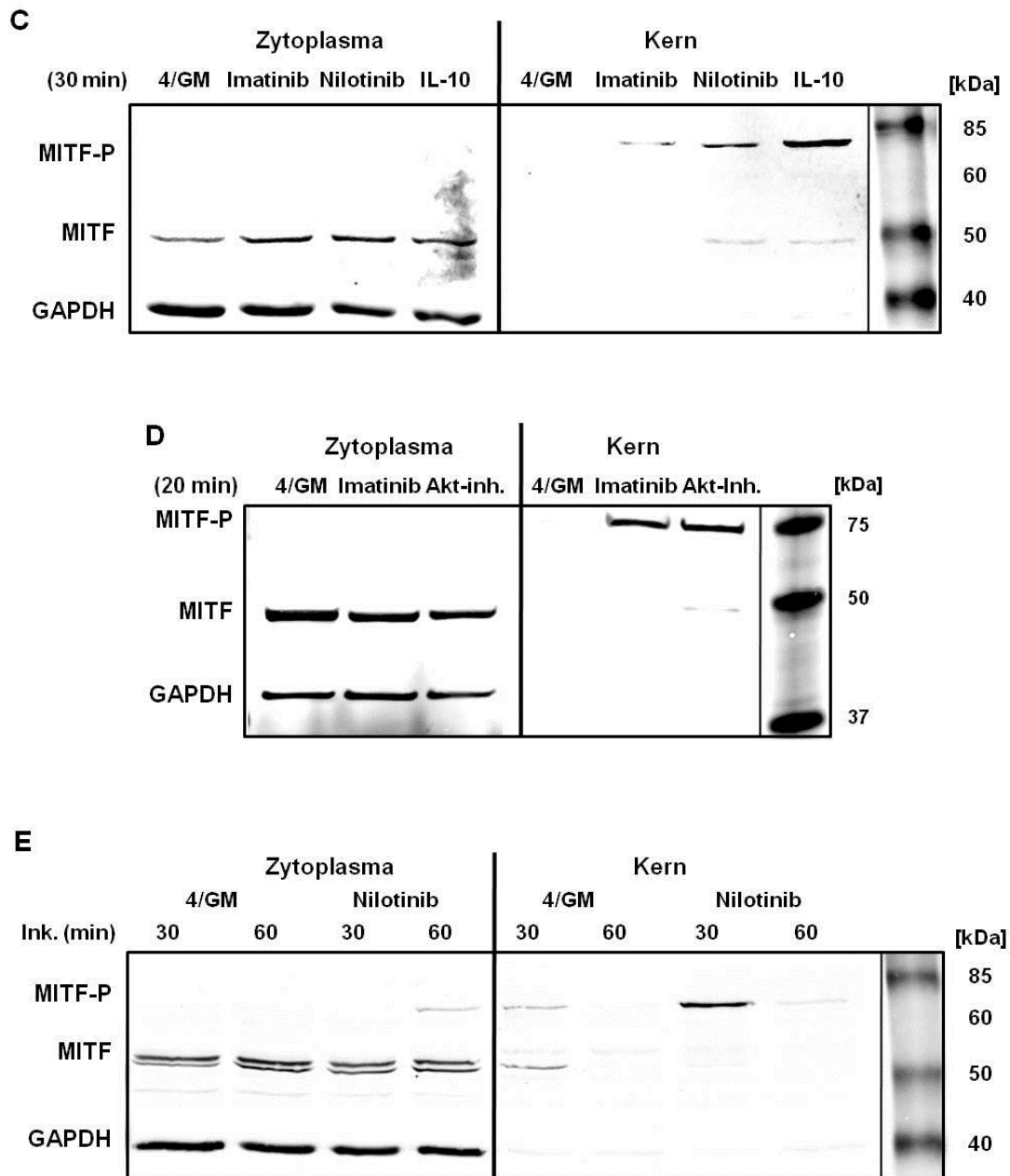


Abb. 31: Nach Behandlung der moDZ mit IL-10, TKI oder Akt-Inhibitor transloziert MITF in den Zellkern. moDZ wurden nur unter Zugabe von 4/GM oder zusätzlich mit TKI (Imatinib, Nilotinib), IL-10 oder Akt-Inhibitor (MK2206) generiert, an Tag 7 geerntet und mittels CD209 „Microbeads“ aufgereinigt. Daraufhin erfolgte eine 20 bis 40 min Inkubation mit den während der Generierung verwendeten Zytokinen und Inhibitoren. Nach Lyse der moDZ wurden Zytoplasma und Zellfraktionen isoliert. Der MITF-Phosphorylierungsstatus (MITF-P) und dessen Translokation aus dem Zytoplasma (linke Seite) in den Zellkern (rechte Seite) wurden mittels WB analysiert. GAPDH wurde als Ladekontrolle der Zytoplasmafraktion und als Reinheitskontrolle der Kernfraktion verwendet. Es werden repräsentative Ergebnisse von mindestens drei unabhängigen Experimenten mit unterschiedlichen Spendern gezeigt.

7.2.6.5 Die Inhibition von MITF führt zu einer verringerten OA-Expression

An Hand der durchgeführten Phosphorylierungs-WB konnte nachgewiesen werden, dass die Inhibition des PI3K/Akt-Signalwegs zur Aktivierung von MITF führt und dessen Translokation in den Zellkern auslöst. Dies konnte aber noch nicht als direkter Nachweis dafür angesehen werden, dass MITF auch in humanen moDZ als TF für OA fungiert. Einen eindeutigen Beweis sollte daher die Ausschaltung von MITF mittels „small interfering“ (si)RNA erbringen. Leider führte der Einsatz von siRNA zu einer unspezifischen Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs und somit auch zur Absenkung der OA-Expression (8). Somit musste dieser Ansatz durch den Einsatz eines spezifischen MITF-Inhibitors (ML329) ersetzt werden ¹⁷⁵. Wie im Weiteren zu sehen ist, führte die Inhibition von MITF durch ML329 (200 nM - 2000 nM) zu einer starken Reduktion der OA-Expression (Abb. 32). Als Kontrolle wurde der „Krüppel-like Factor“ (KLF)5 Inhibitor CID 5951923 verwendet. Durch den Einsatz des MITF-Inhibitors konnte der basale OA mRNA-Level von nur mit 4/GM generierten moDZ stark abgesenkt werden (Abb. 32 (A)). Selbst in den mit IL-10 generierten moDZ, welche üblicherweise die stärkste OA-Expression zeigten, konnte der MITF-Inhibitor die OA-Expression um fast das 8-fache senken (Abb. 32 (B)). Die Auswirkungen der MITF-Inhibition auf die OA-Expression wurden nicht nur auf mRNA-Ebene untersucht sondern auch auf Protein-Ebene mittels WB (Abb. 32 (C)). Durch diese Experimente konnte letztendlich gezeigt werden konnte, dass MITF auch in humanen moDZ als TF für OA fungiert.

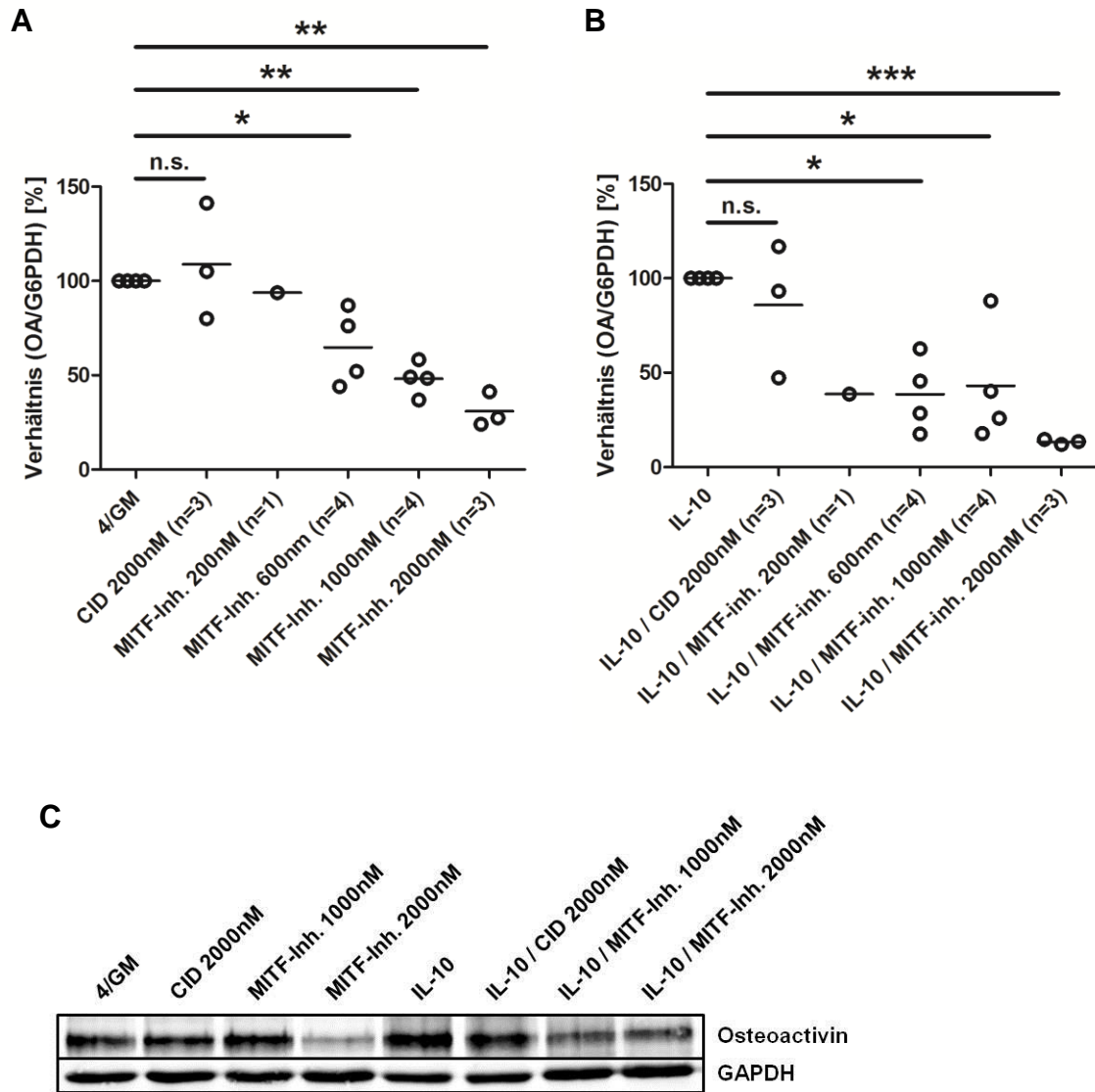


Abb. 32: Die Inhibition von MITF senkt die OA-Expression in modZ. modZ wurden (A, C) nur unter Zugabe von 4/GM oder 4/GM + MITF-Inhibitor (ML329), bzw. KLF5-Inhibitor (CID 5951923) generiert oder (B, C) unter Zugabe von 4/GM + IL-10 + MITF-Inhibitor (ML329), bzw. KLF5-Inhibitor (CID 5951923) generiert. Die modZ wurden an Tag 7 geerntet und mittels CD209 „Microbeads“ aufgereinigt. Die OA-Expression wurde mittels qRT-PCR (A, B) und WB (C) analysiert. Der WB zeigt repräsentative Ergebnisse von mindestens drei unabhängigen Experimenten mit unterschiedlichen Spendern. Alle Werte der qRT-PCR wurden auf die 4/GM Kontrolle normalisiert (4/GM = 100 %) und als Verhältnis von OA zu G6PDH angegeben. Die Statistische Auswertung der qPCR Analyse wurde mit Graphpad Prism 5 durchgeführt. Die Rohdaten der qRT-PCR wurden verwendet um einen „ratio paired t-test“ durchzuführen. $p \leq .05$, $p^{**} \leq .01$, $p^{***} \leq .003 = ***$, n.s. = nicht signifikant.

7.2.7 Zusammenfassung Ergebnisse Teil 2

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Expression von OA in humanen moDZ über den Transkriptionsfaktor MITF gesteuert wird, welcher durch Inhibition des PI3K/Akt-Signalwegs aktiviert werden kann. Die Akt-Inhibition kann hierbei als Nebeneffekt einer Behandlung mit den untersuchten BCR-ABL TKI auftreten oder gezielt durch einen spezifischen Akt-Inhibitor verursacht werden. Nach Inhibition von Akt kann GSK3- β nicht länger von Akt inhibiert werden, woraufhin es zur Aktivierung von MITF durch GSK3- β kommt. MITF transloziert daraufhin in den Zellkern, was letztlich zur Steigerung der OA-Expression und damit zur Ausbildung eines tolerogenen moDZ Phänotyp führt. Durch die Wiederherstellung der T-Zell-Stimulationsfähigkeit nach Blockierung von OA konnte gezeigt werden, dass der tolerogene moDZ Phänotyp hauptsächlich durch die gesteigerte OA-Expression verursacht wird. Diese Inhibition und der mit ihr einhergehende tolerogene moDZ Phänotyp kann also sowohl durch den gezielten Einsatz eines spezifischen Akt-Inhibitors wie MK2206 verursacht werden, wie auch als Nebeneffekt einer TKI-Therapie.

7.3 HDM2 wird in TKI- oder IL-10- behandelten moDZ dephosphoryliert

Es konnte bereits von anderen Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass die Expression von OA in Prostata- und Brustkrebs durch p53 beeinflusst wird^{139,153,176}. p53 selbst wird wiederum durch den PI3K/Akt-Signalweg reguliert¹⁷⁷⁻¹⁸⁰. Wie bei MITF kommt es zu einer Aktivierung des TF nach Inhibition von Akt. Die Akt-Inhibition führt dazu, dass HDM2 („Human double minute 2 homolog“) nicht mehr aktiviert wird. HDM2 ist eine Ubiquitin-Ligase die durch Akt aktiviert werden kann und danach p53 inhibiert und ubiquitiniert. Dies führt schließlich zum proteasomalen Abbau von p53 und somit letztendlich zu einer verringerten OA-Expression. An Hand von WB-Analysen konnte gezeigt werden, dass HDM2 nach Nilotinib-Behandlung der moDZ dephosphoryliert wird (Abb. 33).

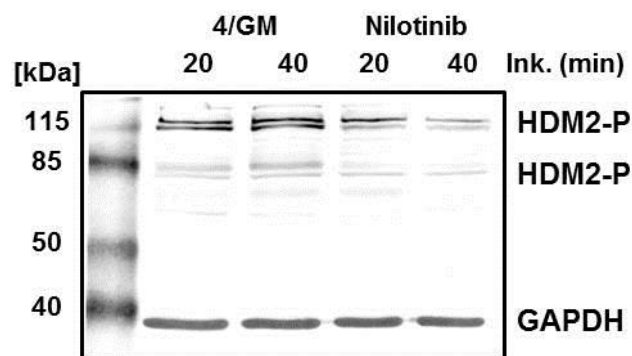


Abb. 33: HDM2 wird in moDZ durch Nilotinib dephosphoryliert. moDZ wurden nur unter Zugabe von 4/GM oder zusätzlich mit Nilotinib generiert, an Tag 7 geerntet und mittels CD209 „Microbeads“ aufgereinigt. Daraufhin erfolgte eine 40 min Inkubation mit den während der Generierung verwendeten Zytokinen und Nilotinib. Der HDM2 Phosphorylierungsstatus wurde mittels WB analysiert. GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet. Es werden repräsentative Ergebnisse von mindestens drei unabhängigen Experimenten mit unterschiedlichen Spendern gezeigt.

8 DISKUSSION

TKI haben die Behandlung von Krebs bedeutend verbessert ^{18,20}. Die Wirksamkeit von Imatinib konnte durch die internationale Phase III Studie IRIS (International Randomized Study of Interferon and STI571) gezeigt werden ²¹. Jedoch kommt es nach dem Absetzen der TKI-Therapie bei mehr als 60% der CML-Patienten zu einem Rezidiv ³⁹. Aus diesem Grund wird eine Kombinationstherapie aus TKI-Behandlung und DZ-basierter Immuntherapie als Behandlungsalternative für CML-Patienten angestrebt. Bevor dies in die Tat umgesetzt werden kann, müssen aber noch ausgiebige Studien zum Zusammenspiel der beiden unterschiedlichen Therapien durchgeführt werden. In dieser Arbeit wurde nun der Effekt der drei am häufigsten zur CML-Therapie eingesetzten TKI, auf die Differenzierung und Funktionsfähigkeit von *in vitro* generierten humanen moDZ untersucht. Hierbei wurde schnell klar, dass die untersuchten TKI bereits bei klinischen Konzentrationen (3 μ M Imatinib, 3 μ M Nilotinib, 10 nM Dasatinib) in wichtige Signalwege eingreifen und somit Einfluss auf Differenzierung und Funktionsfähigkeit der moDZ nehmen. Im Vergleich zu nicht mit TKI behandelten moDZ konnte vor allem eine massive Expressionssteigerung des immunsuppressiven Transmembranprotein Osteoactivin festgestellt werden (7.1.4). Ähnliche Ergebnisse zeigte bereits eine Untersuchung der Auswirkung des immunsuppressiven Zytokin IL-10 auf moDZ. Auch hier konnte eine massive Steigerung der OA-Expression nachgewiesen werden ⁹⁹.

Osteoactivin ist ein Transmembranprotein, welches von APZ exprimiert werden kann und auch als co-inhibitorisches Molekül fungiert ^{131,134,141,147,148,150,151}. Interessanterweise kann seine Expression durch die immunsuppressiven Zytokine TGF- β und IL-10 drastisch gesteigert werden ^{99,151}. Darüber hinaus ist bekannt, dass IL-10 in der MLR die T-Zell-Stimulierungsfähigkeit von DZ stark inhibieren kann ¹⁸¹. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass mit IL-4 und GM-CSF generierte moDZ nur eine sehr schwache basale OA-Expression aufweisen. Diese basale OA-Expression variiert sehr stark von Spender zu Spender, kann aber massiv durch IL-10 hochreguliert werden (7.1.1) ¹⁷³. Dies lässt vermuten, dass zumindest ein Teil der immunsuppressiven und anti-inflammatorischen Auswirkungen von IL-10 auf moDZ, durch die Steigerung der OA-Expression verursacht werden. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass auch die BCR-ABL TKI Imatinib, Nilotinib und Dasatinib die OA-Expression steigern (7.1.4). Diese Expressionssteigerung konnte nicht nur auf mRNA-Ebene, sondern auch auf Protein-Ebene mittels FACS- und WB-Analyse

nachgewiesen werden ¹⁷³. Dies deutet auf eine OA-Regulation, auf Ebene der mRNA Transkription, Prozession und/oder Stabilität hin.

Interessanterweise konnte bei IL-10- wie auch TKI-behandelten moDZ eine verringerte Expression des moDZ Marker CD1a und eine gleichzeitige Aufrechterhaltung der Expression des Monozyten Marker CD14 beobachtet werden ^{99,173}. TKI und IL-10 scheinen während der Differenzierung von moDZ auf differenzierungsrelevante Signalwege einzuwirken und dadurch die Ausdifferenzierung der moDZ zu unterdrücken, wodurch ein eher „Monozyten-ähnlichen“-Phänotyp entsteht. Zusammen mit der gesteigerten OA-Expression, ließ dies die Vermutung aufkommen, dass die unter Zugabe von TKI und IL-10 kultivierten Monozyten nicht zu moDZ ausdifferenzieren sondern zu Osteoklasten. Obwohl Osteoactivin eine Schlüsselrolle in der Entwicklung von Osteoklasten spielt, unterscheidet sich die *in vitro* Generierung von Osteoklasten und DZ doch in einigen entscheidenden Punkten. So wird bei der Osteoklasten-Generierung an Stelle von IL-4 und GM-CSF, zumeist M-CSF und RANKL verwendet. Desweiteren werden für die Generierung von Osteoklasten ca. 21 Tage benötigt im Vergleich zu den 7 Tagen bei moDZ ¹⁸². Als zusätzliche Kontrolle wurde eine PCR-Analyse der Expression Osteoklasten-typischer Gene durchgeführt, wodurch endgültig eine unbeabsichtigte Generierung von Osteoklasten ausgeschlossen werden konnte.

Normalerweise verhindern „Immune Checkpoint“-Moleküle eine Überreaktion des Immunsystems und vermeiden somit Auto-Immunreaktionen ¹¹⁸. DZ exprimieren beispielsweise die „Immune Checkpoint“-Moleküle PD-L1 und PD-L2, welche PD-1 auf T-Zellen binden und somit nicht nur die T-Zell-Proliferation inhibieren können sondern auch Tregs aktivieren ^{123,183}. Um auszuschließen, dass die in den TKI-behandelten moDZ beobachteten immunsuppressiven Effekte auf weitere immunsuppressive Oberflächenproteine neben OA zurück geführt werden konnten, wurde die Expression der „Immune Checkpoint“-Moleküle PD-L1 und PD-L2 untersucht (7.1.7) ^{105,123,170}. Hierbei konnte keine signifikante Änderung ihrer Protein-Level festgestellt werden. Kritisch betrachtet muss zugegeben werden, dass noch weitere „Immune Checkpoint“-Moleküle hätten untersucht werden sollen. So könnte vor allem eine Untersuchung von B7-H4 interessant sein, da die Expression dieses „Immune Checkpoint“-Moleküls, wie die Expression von OA, durch IL-10 gesteigert und durch TNF gesenkt werden kann ¹⁸⁴.

Auch die Expression weiterer, für moDZ Ausreifung und T-Zell-Aktivierung wichtiger Oberflächenmarker, wie CD83, CD86 und HLA-DR wurden nicht signifikant beeinflusst (Abb. 21 (C, D, E)). Der einzige signifikant beeinflusste

Oberflächenmarker, war der co-stimulatorische Rezeptor CD80, welcher von Imatinib und dem Akt-Inhibitor (MK2206) gleichermaßen leicht herunter reguliert wurde (Abb. 21 (F)). Dies könnte zum tolerogenen Phänotyp der TKI-behandelten moDZ beitragen. Alle anderen untersuchten Marker scheinen jedoch nicht von den TKI beeinflusst zu werden. Dies verdeutlicht die dominante Beteiligung von OA am tolerogenen Phänotyp in TKI- oder IL-10-generierten moDZ.

Durch die Wiederherstellung der T-Zell-Stimulationsfähigkeit von TKI-behandelten moDZ nach Blockierung von OA mittels anti-OA Antikörpern oder Syndecan 4 konnte dies noch weiter untermauert werden. Überraschenderweise konnten die TKI-behandelten moDZ nach OA-Blockierung nicht nur die T-Zell-Stimulationsfähigkeit der unbehandelten Kontroll-DZ erreichen sondern diese sogar noch übertreffen¹⁷³. Dies ist wahrscheinlich darauf zurück zu führen, dass auch die basale OA-Expression der moDZ von den Antikörpern blockiert wurde. Um ausschließen zu können, dass der beobachtete Effekt durch Endotoxinverunreinigungen verursacht wurde, wurden alle mit anti-OA AK oder Syndecan 4 behandelten moDZ 24 h nach Zugabe des AK oder Proteins, mittels FACS-Analyse, auf Ausreifungsmarker (CD80, CD83, CD86, HLA-DR) untersucht (nicht gezeigt). Hierbei konnte keinerlei Unterschied zwischen nicht-behandelten und behandelten moDZ in der Expression der angegebenen Reifungsmarker festgestellt werden.

Da der tolerogene Phänotyp TKI-behandelter moDZ auch auf eine Änderung in der Ausschüttung immunsuppressiver Zytokine zurück geführt werden könnte, wurde die Produktion von TGF- β , IL-10 und IL-6 untersucht (7.1.7, Abb. 18). Hiermit sollte auch die Möglichkeit einer Steigerung der OA-Expression auf Grund von autokrinem TGF- β und IL-10 untersucht werden. Es zeigte sich, dass kein Unterschied in der Ausschüttung von TGF- β und IL-10 festgestellt werden konnte (7.1.7, Abb. 18 (A, B)). Somit konnte es weder zu einem immunsuppressiven Effekt durch die erhöhte Ausschüttung von TGF- β und IL-10 kommen, noch wurde die gesteigerte OA-Expression durch einen erhöhten Level dieser Zytokine ausgelöst. Die untersuchten TKI mussten also selbst für die Steigerung der OA-Expression in moDZ verantwortlich sein. Allerdings konnte eine leicht erhöhte Ausschüttung von IL-6 in TKI-behandelten moDZ festgestellt werden (7.1.7, Abb. 18 (C)). Es wurde bereits gezeigt, dass IL-6 die Ausreifung von moDZ unterdrücken kann¹⁷¹. Die Untersuchung weiterer immunmodulatorischer Zytokine, wie etwa der IL-12-Zytokin-Familie (IL-12, IL-23, IL-27, IL-35), welche sowohl immunstimulatorische wie auch immuninhibitorische Effekte zeigt, wäre durchaus interessant gewesen, konnte aber aus zeitlichen Gründen nicht mehr durchgeführt werden^{185–187}.

Nur ausgereifte DZ sind in der Lage eine starke T-Zell-Antwort auszulösen. Um zu überprüfen ob die TKI- oder IL-10 induzierte OA-Expressionssteigerung Ausreifungssignale unterdrücken kann, wurde der Effekt verschiedener TLR-Liganden untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass nicht nur die basale OA-Expression der Kontroll-DZ (4/GM) durch verschiedene TLR-Liganden stark herunter reguliert werden konnte (7.1.2), sondern auch die TKI- und IL-10-induzierte Überexpression von OA durch TLR-Liganden stark abgeschwächt wurde (7.1.5). Inflammatorische Zytokine wie TNF und INF- γ konnten die OA-Expression hingegen nur bedingt abschwächen. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit der physiologischen Funktion ausgereifter DZ, welche eine Immunreaktion stimulieren sollen, wofür aber zuerst OA durch TLR-Signalweiterleitung herunter reguliert werden muss. Somit scheint die Expression von OA durch Signalwege reguliert zu werden, welche einerseits für die TLR-Signalweiterleitung wichtig sind und andererseits auch durch IL-10 und TKI beeinflusst werden können.

In weiteren Experimenten wurde versucht, den für die Regulation der OA-Expression in DZ verantwortlichen Signalweg, sowie den molekularen Mechanismus hinter der IL-10- und TKI-induzierten Expressionssteigerung von OA zu finden.

Die Beeinflussung der OA-Expression durch stimulatorische oder inhibitorische Signale spiegelt die physiologische Funktion der moDZ als APC wieder. Je nachdem ob eine Immunantwort induziert oder unterdrückt werden soll, wird die OA-Expression verringert oder gesteigert¹⁷³. Die durchgeführten Experimente zeigten, dass therapeutische Konzentrationen von TKI die Entwicklung von humanen Monozyten zu moDZ auf ähnliche Weise beeinflussen wie das immunsuppressive Zytokin IL-10. IL-10 inhibiert die TLR-induzierte Ausreifung und T-Zell-Stimulationsfähigkeit von DZ durch Unterdrückung des PI3K/Akt-Signalwegs und der daraus resultierenden Inhibition von NF- κ B^{63,99,103}. Dies führt gleichzeitig zu einer Expressionssteigerung von OA. Dem entgegengesetzt, aktivieren Ausreifungsstimuli wie inflammatorische Zytokine oder TLR-Liganden, sowie Wachstumsfaktoren wie GM-CSF und IL-4 den PI3K/Akt-Signalweg und nachfolgende Transkriptionsfaktoren wie NF κ -B¹⁸⁸⁻¹⁹⁰. Was wiederum zur Ausreifung der DZ führt und gleichzeitig die OA-Expression herunter reguliert. Dadurch lässt sich schlussfolgern, dass die Expression von OA durch Signalwege reguliert wird, welche für die TLR- und IL-10 Signalweiterleitung wichtig sind. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass Imatinib, Nilotinib und Dasatinib nicht nur BCR-ABL sondern auch eine Vielzahl anderer Kinasen, einschließlich Akt, in unterschiedlichen Signalwegen inhibieren können^{23,28,191}. An Hand dieser Hinweise wurde folgende Hypothese entwickelt. Aktivierende und inhibitorische Signale werden

in humanen moDZ durch Stimulation oder Inhibition des PI3K/Akt-Signalwegs ausbalanciert. Wobei der, durch inhibitorische Signale induzierte, tolerogene moDZ Phänotyp nicht zuletzt auf die Steigerung der OA-Expression nach Inhibition des PI3K/Akt-Signalwegs zurück zu führen ist.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde versucht die TKI- oder IL-10-induzierte Steigerung der OA-Expression mittels spezifischer Signalweg-Inhibitoren nachzustellen. Hierzu wurde C-Raf, MEK1/2 und Erk1/2 im RAS/Erk-Signalweg, sowie PI3K und Akt1/2/3 im PI3K/Akt-Signalweg blockiert (7.2.1). Die Inhibition des Erk-Signalwegs zeigte keinerlei Auswirkung auf die Expression von OA. Wie erwartet führte dahingegen die Inhibition des Akt-Signalwegs mittels MK-2206 zu einer starken Expressionssteigerung von OA, welche vergleichbar mit oder sogar stärker als die TKI-induzierte OA-Expressionssteigerung ausfiel. Hierdurch konnten die Relevanz des PI3K/Akt-Signalwegs für die Steuerung der OA-Expression nachgewiesen werden.

In Osteoklasten und Melanoblasten wird die OA-Expression durch den „Microphthalmia-associated transcription factor“ (MITF) kontrolliert, welcher selbst durch den PI3K/Akt-Signalweg kontrolliert wird ^{138,152}. Passend zur aufgestellten Hypothese, kann MITF erst durch GSK3- β aktiviert werden, wenn Akt inhibiert wird, da Akt GSK3- β inhibiert ^{164,165,167}. GSK3- β fungiert hierbei als „Umschalter“, welcher die Aktivierung von MITF durch Akt-Inhibitoren wie den TKI erlaubt. Zur weiteren Überprüfung dieser Hypothese wurden Expressionsprofile von MITF und OA in hämopoetischen Zellen erstellt. Hiermit konnte gezeigt werden, dass das OA-Expressionsprofil mit dem MITF-Expressionsprofil übereinstimmt und OA nur in Zellen exprimiert wird in denen auch MITF vorhanden ist (7.2.4). Dies konnte auch in MUTZ-3 DZ gezeigt werden. MUTZ-3 DZ sind ein Modell für die Differenzierung von DZ aus CD34⁺-Vorläuferzellen. Wie bei direkt aus CD34⁺-Vorläuferzellen generierten DZ, konnte auch bei den MUTZ-3 DZ nur eine sehr schwache basale OA-Expression festgestellt werden, welche weder durch TKI noch durch IL-10 gesteigert werden konnte (Diplomarbeit Simone Joas, 2013). Diese Ergebnisse entsprechen denen von Lundberg *et al.*, welche zeigen, dass MITF in moDZ zweimal so stark exprimiert wird wie in anderen gebräuchlichen *in vitro* DZ Modellen, einschließlich MUTZ-3 DZ und aus CD34⁺-Vorläuferzellen generierten Langerhans Zellen oder DZ ¹⁹². Somit konnte die aufgestellte Hypothese zur Regulierung der OA-Expression über den PI3K/Akt-Signalweg durch einen passenden TF ergänzt werden (Abb. 34). Um dies zu bestätigen, wurden WB-Analysen durchgeführt, in denen der Phosphorylierungs-Status von Akt und GSK3- β , sowie die Phosphorylierung (P) und Translokation von

MITF überprüft wurde. Die größte Herausforderung hierbei, bestand darin spezifische P-AK für humane moDZ zu finden. Erst nach Erprobung mehrerer P-spezifische AK unterschiedlicher Hersteller konnte gezeigt werden, dass die P von Akt durch Imatinib und Nilotinib im gleichen Maß blockiert werden konnte wie von IL-10 und dem verwendeten Akt-Inhibitor (7.2.6.1). Wodurch der erste Teil der aufgestellten Hypothese bewiesen werden konnte. TKI inhibieren wie IL-10 den PI3K/Akt-Signalweg. Es konnte ebenso gezeigt werden, dass nach Inhibition von Akt die inhibierende P von GSK3- β verschwindet (7.2.6.2) worauf hin MITF phosphoryliert wird (7.2.6.3) und in den Zellkern transloziert (7.2.6.4). Somit konnte bestätigt werden, dass der TF MITF, wie postuliert nach Inhibition des PI3K/Akt-Signalweg durch TKI oder IL-10 aktiviert wird. Jedoch konnte auf Grund fehlender P-AK die P von MITF im Western Blot nur an Hand eines „Shifts“ und der Translokation in den Zellkern nachgewiesen werden. Durch die P ändert sich die Ladung von MITF, wodurch der TF im Gel langsamer läuft¹⁶⁸. Um zu beweisen, dass dieser „Shift“ durch die P ausgelöst wurde, wurde WB-Proben mittels einer Phosphatase dephosphoryliert, was zum Verschwinden des „Shifts“ führte (7.2.6.3). Somit konnten alle Schritte unserer Hypothese bis zum TF nachvollzogen und bestätigt werden. Zur vollständigen Bestätigung der aufgestellten Hypothese musste nur noch ein direkter Nachweis dafür erbracht werden, dass MITF auch in humanen moDZ als TF für OA fungiert.

In einem ersten Ansatz wurde hierfür versucht MITF mittels „small interfering“ (si)RNA auszuschalten. Dies war jedoch nicht von Erfolg gekrönt, da auch bei der verwendeten unspezifischen Kontroll-siRNA eine Herunterregulierung von OA beobachtet werden konnte (persönliche Mitteilung: Frank Grünebach). Wie andere Gruppen nachweisen konnten, kommt es in DZ zur Erkennung der siRNA durch TLR3^{193,194}. Eine Erkennung der siRNA durch TLR7 und TLR8 muss ebenfalls in Betracht gezogen werden^{195,196}. Dies führt unweigerlich zur Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs und somit auch zur Absenkung der OA-Expression. Darüber hinaus stehen diese Ergebnisse in Einklang mit Versuchen, in denen gezeigt werden konnte, dass doppelsträngige RNA (PolyI:C) die Expression von OA stark herunter reguliert. Aus diesem Grund wurde versucht die Erkennung der siRNA durch TLR mittels einer speziell modifizierten siRNA (Accel siRNA, GE Dharmacon, Lafayette, USA) zu umgehen. Die Accel siRNA wurde für schwer zu transfizierende Zellen entwickelt und benötigt nicht die üblichen Transfektionsreagenzien. Vermutlich führt dies dazu, dass sie nicht wie andere siRNA über Endozytose aufgenommen wird und somit die im Endosom lokalisierten TLR umgehen kann.

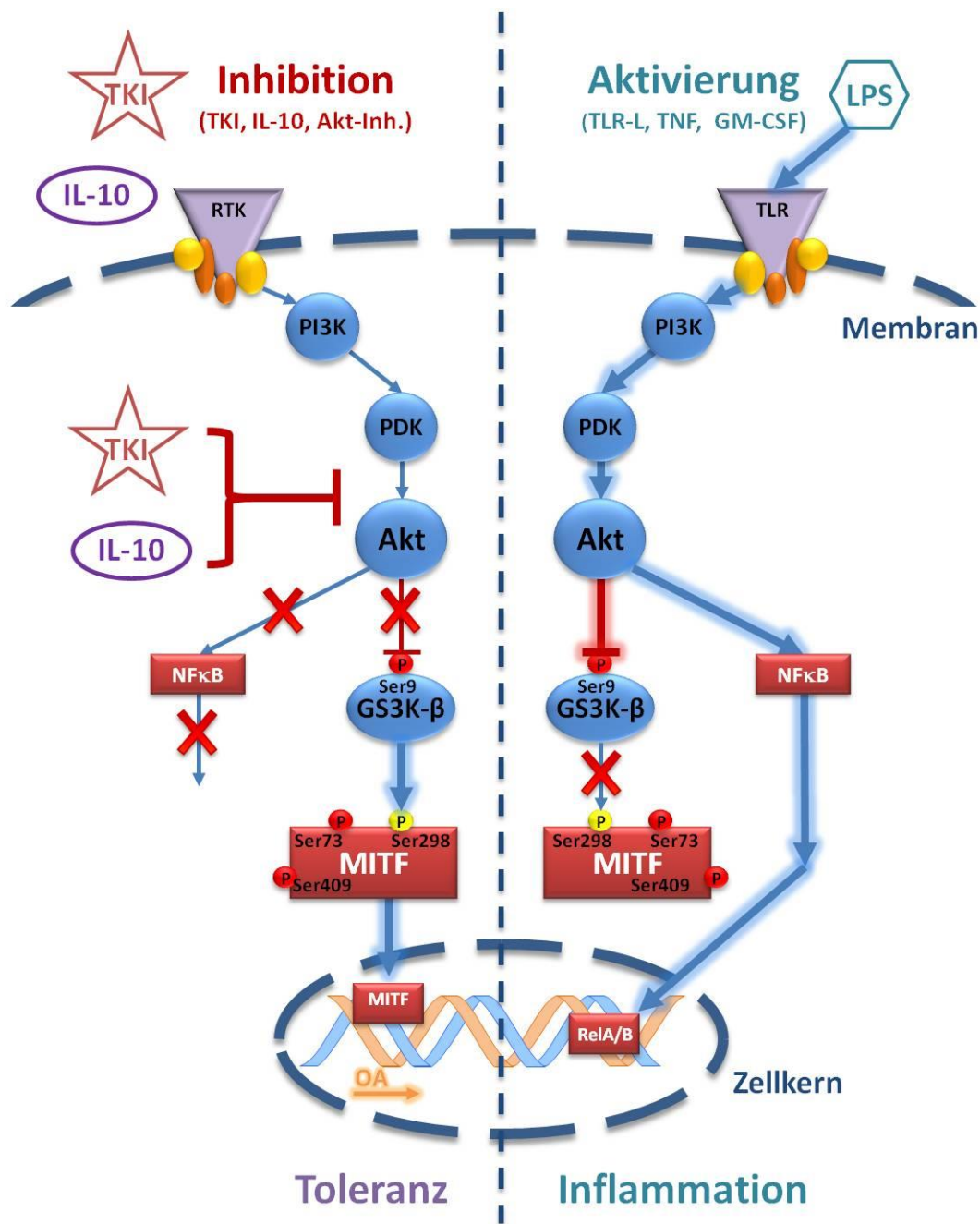


Abb. 34: Schematische Darstellung der Hypothese zur OA-Regulation. Blockierte Signalwege sind mit einem roten X markiert, aktive Signalwege sind fett hervorgehoben. Aktivierende Phosphorylierungen sind als gelbe P dargestellt, inaktivierende oder transient aktivierende als rote P.

Erste Versuche mit der Accel siRNA zeigten vielversprechende Ergebnisse. Zum Einen konnte keine Ausreifung der Kontroll-siRNA-behandelten moDZ festgestellt werden. Zum Anderen konnte eine Verringerung der OA-Expression nach Behandlung der moDZ mit anti-OA- und anti-MITF-siRNA erzielt werden. Auf Grund der speziellen Modifikation der siRNA kann jedoch erst nach ca. 3 Tagen mit einem „knockdown“ von MITF und OA gerechnet werden. Dies wirkte sich negativ auf die

moDZ Viabilität aus, da das Transfektionsmedium für moDZ toxisch war (Diplomarbeit, Simone Joas). Dies führte zu äußerst geringen Zellzahlen und der Befürchtung, dass der beobachtete „knockdown“ durch die Toxizität des Transfektionsmediums verursacht wurde. Somit musste dieser Ansatz aufgegeben werden.

Daraufhin wurde versucht MITF mit Hilfe eines spezifischen Inhibitors (ML329) auszuschalten¹⁷⁵. Die Inhibierung von MITF durch ML329 führte zu einer starken Reduktion der OA-Expression (7.2.6.5). Wodurch letztendlich gezeigt werden konnte, dass MITF auch in humanen moDZ als TF für OA fungiert und somit alle Teile der aufgestellten Hypothese bewiesen werden konnten. Weitere Möglichkeiten zur Überprüfung der aufgestellten Hypothese wären der Einsatz von Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) oder eines „Electrophoretic Mobility Shift Assay“ (EMSA), womit in anderen Zelltypen bereits gezeigt werden konnte, dass MITF als OA-TF fungiert^{174,197,198}. Eine interessante neue Methode mit der Bezeichnung NanoTemper (NanoTemper Technologies GmbH, München, Germany), könnte hierfür auch verwendet werden¹⁹⁹.

Die 12 bekannten Splicevarianten von MITF sind sehr zellspezifisch^{159,161,200}. Daher könnte die Bestimmung von MITF-Splicevarianten, welche spezifisch für OA-exprimierende Zellen sind, einen besseren Einblick in die, durch alternatives mRNA-Spleißen vermittelte, Kontrolle von Ausdifferenzierung und Zellfunktion bieten. Desweiteren könnte durch die Analyse der spezifischen Splicevarianten genauere Vorhersagen zur Manipulierbarkeit der OA-Expression in verschiedenen Zelltypen erstellt werden.

Andere Arbeitsgruppen zeigten, dass die Expression von OA in Prostata- und Brustkrebs durch p53 beeinflusst wird^{139,153,176}. p53 selbst wird wiederum durch den PI3K/Akt-Signalweg reguliert¹⁷⁷⁻¹⁸⁰. Wie bei MITF hängt hierbei die Aktivierung des TF von der Akt-Inhibition ab (Abb. 35). Dadurch wurde geschlossen, dass auch die Aktivierung von p53 durch TKI, IL-10 oder Akt-Inhibitoren induziert werden kann und dies einen zweiten Weg zur Regulation von OA darstellen könnte. Durch die Inhibition von Akt wird HDM2 („Human double minute 2 homolog“) nicht mehr aktiviert, und GSK3- β nicht länger inhibiert. GSK3- β ist dadurch in der Lage Tip60 zu aktivieren. Tip60 aktiviert daraufhin p53 mittels Acetylierung an Lys120. Zur gleichen Zeit wird HDM2 von Tip60 inhibiert¹⁷⁸. HDM2 ist eine Ubiquitin-Ligase die durch Akt aktiviert werden kann und danach p53 durch ihre Bindung inhibiert und ubiquitiniert. Was schließlich zum proteasomalen Abbau von p53 führt (Abb. 35).

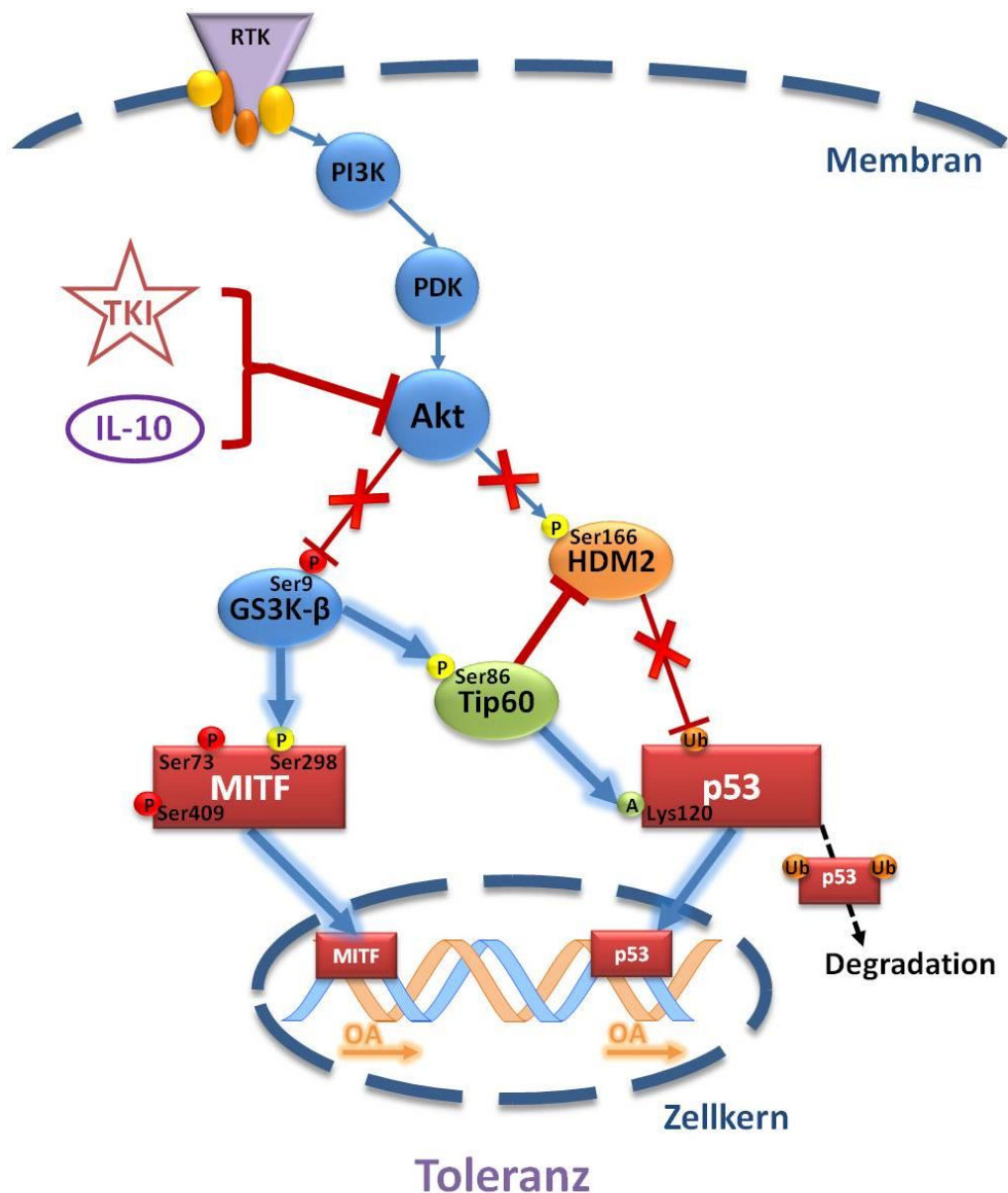


Abb. 35: Schematische Darstellung der Hypothese zur OA-Regulation über MITF und p53. Der PI3K/Akt-Signalweg ist in blau dargestellt. Inhibitionen sind durch rote X markiert. Aktivierungen durch hervorgehobene blaue Pfeile. Aktivierende Phosphorylierungen sind als gelbe P dargestellt, inaktivierende oder transient aktivierende als rote P. Ubiquitinierungen als orange Ub. RTK = Rezeptor Tyrosin Kinase.

Erste Anhaltspunkte darauf, dass sich die Vermutung einer Regulation der OA-Expression mittels p53 bewahrheiten könnte, lieferten WB-Analysen in denen die De-Phosphorylierung von HMD2 nachgewiesen werden konnte (7.3). Die Phosphorylierung von Tip60 durch GSK3-β konnte in dieser Arbeit jedoch nicht abschließend beantwortet werden und sollte in weiteren Experimenten untersucht

werden. Zusammenfassend konnten die in dieser Arbeit durchgeführten *in vitro* Studien einen grundlegenden Mechanismus zur Ausbalancierung aktivierender und inhibierender Signale in humanen moDZ aufdecken.

Je nachdem ob der PI3K/Akt/GSK3- β -Signalweg stimuliert oder inhibiert wird, entwickeln sich moDZ zu immunstimulierenden oder tolerogenen DZ (Abb. 34). Hierbei wird ein Großteil der immuninhibierenden Eigenschaften der tolerogenen moDZ durch die Aktivierung des TF MITF über GSK3- β und der daraus resultierenden Expressionssteigerung des immuninhibitorischen Transmembranproteins OA hervorgerufen. Zusätzlich zu den in dieser Arbeit durchgeführten *in vitro* Studien gibt es Hinweise auf mögliche immunsuppressive Auswirkungen von TKI *in vivo*. Vor allem die klinische Remission von rheumatoider Arthritis, einer T-Zell-bedingten Autoimmunkrankheit, in TKI behandelten Krebs-Patienten ist ein gewichtiger Anhaltspunkt²⁰¹⁻²⁰³. Der genaue Mechanismus der Remissionen wurde bisher aber noch nicht aufgeklärt. Jedoch kann spekuliert werden, dass die gezielte Steigerung der OA-Expression mittels TKI eine neue Möglichkeit zur Behandlung von T-Zell-bedingten Autoimmunkrankheiten durch DZ bieten kann²⁰⁴.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit könnten also in mehreren Bereichen klinisch signifikant sein. Zum einen könnte die Aufdeckung eines grundlegenden Mechanismus zur Induzierung tolerogener moDZ in der Behandlung von GvHD („Graft versus Host Disease“) oder Autoimmunerkrankungen wie Rheumatoider Arthritis eingesetzt werden. Zum Anderen sollte auf Grund der gewonnenen Ergebnisse bei zukünftigen Kombinationstherapien aus TKI-Behandlung und DZ-basierter Immuntherapie, eine Inhibition der OA-Expression oder -Funktion zur Wirksamkeitssteigerung der Behandlung in Betracht gezogen werden. Darüber hinaus ist OA in Prostatakarzinomen, Melanomen, Glioblastomen und Mamakarzinomen ein Tumor assoziiertes Antigen und stellt daher ein attraktives Ziel für zukünftige anti-Krebstherapien dar¹³⁸⁻¹⁴¹. Es wurde bereits ein gegen OA gerichtetes Antikörper-Medikament-Konjugat entwickelt und in klinischen Phase 1 und 2 Studien getestet¹⁴²⁻¹⁴⁶. Hierbei wurde auch versucht die OA-Expression mit Hilfe verschiedener Medikamente, z.T. auch therapeutisch genutzter Substanzen wie Imatinib, p38 MAPK Inhibitoren, Ammoniumchlorid (NH₄Cl) und Chloroquin zu steigern. Wobei der zu Grunde liegende molekulare Mechanismus aber nicht aufgeklärt werden konnte. Mit Hilfe der in dieser Arbeit durchgeführten Studien ist nun eine relativ spezifische Steigerung der OA-Expression möglich. Die (Über)expression von OA durch Tumorzellen könnte auch einen Mechanismus des „Immunescape“ darstellen,

welcher durch die gezielte Inhibition der OA-Expression oder Funktion eliminiert werden könnte. Die Analyse der OA-Expression und –Regulation in Tumoren ist daher ein interessanter Aspekt zukünftiger Untersuchungen.

9 LITERATUR

1. Druker, B. Imatinib mesylate in the treatment of chronic myeloid leukaemia. *Expert Opin. Pharmacother.* **4**, 963–71 (2003).
2. Hehlmann, R., Hochhaus, A. & Baccarani, M. Chronic myeloid leukaemia. *Lancet* **370**, 342–50 (2007).
3. Nowell, P. Discovery of the Philadelphia chromosome: a personal perspective. *J. Clin. Invest.* **117**, 2033–2035 (2007).
4. Brauer, K. K. M. *et al.* BCR-ABL activity is critical for the immunogenicity of chronic myelogenous leukemia cells. *Cancer Res.* **67**, 5489–97 (2007).
5. Deininger, M., Goldman, J. & Melo, J. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood* **96**, 3343–3356 (2000).
6. ROWLEY, J. D. A New Consistent Chromosomal Abnormality in Chronic Myelogenous Leukaemia identified by Quinacrine Fluorescence and Giemsa Staining. *Nature* **243**, 290–293 (1973).
7. Heisterkamp, N. *et al.* Localization of the c-ab1 oncogene adjacent to a translocation break point in chronic myelocytic leukaemia. *Nature* **306**, 239–42 (1983).
8. Groffen, J. *et al.* Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell* **36**, 93–9 (1984).
9. Sawyers, C., McLaughlin, J., Goga, A., Havlik, M. & Witte, O. The nuclear tyrosine kinase c-Abl negatively regulates cell growth. *Cell* **77**, 121–31 (1994).
10. Kipreos, E. T. & Wang, J. Y. Differential phosphorylation of c-Abl in cell cycle determined by cdc2 kinase and phosphatase activity. *Science (80-)*. **248**, 217–20 (1990).
11. Yuan, Z., Shioya, H., Ishiko, T., Sun, X. & Gu, J. p73 is regulated by tyrosine kinase c-Abl in the apoptotic response to DNA damage. *Nature* **399**, 814–817 (1999).
12. McWhirter, J. R., Galasso, D. L. & Wang, J. Y. A coiled-coil oligomerization domain of Bcr is essential for the transforming function of Bcr-Abl oncoproteins. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 7587–95 (1993).
13. Zhao, X., Ghaffari, S., Lodish, H., Malashkevich, V. N. & Kim, P. S. Structure of the Bcr-Abl oncoprotein oligomerization domain. *Nat. Struct. Biol.* **9**, 117–20 (2002).

14. Sattler, M. *et al.* Critical role for Gab2 in transformation by BCR/ABL. *Cancer Cell* **1**, 479–92 (2002).
15. Chu, S., Li, L., Singh, H. & Bhatia, R. BCR-tyrosine 177 plays an essential role in Ras and Akt activation and in human hematopoietic progenitor transformation in chronic myelogenous leukemia. *Cancer Res.* **67**, 7045–53 (2007).
16. O'Hare, T., Deininger, M. W. N., Eide, C. a, Clackson, T. & Druker, B. J. Targeting the BCR-ABL signaling pathway in therapy-resistant Philadelphia chromosome-positive leukemia. *Clin. Cancer Res.* **17**, 212–21 (2011).
17. Ilaria, R. L. & Van Etten, R. a. P210 and P190BCR/ABL Induce the Tyrosine Phosphorylation and DNA Binding Activity of Multiple Specific STAT Family Members. *J. Biol. Chem.* **271**, 31704–31710 (1996).
18. Kanterjian, H. CME Information : Chronic myeloid leukemia : 2014 update. *Am. J. Hematol.* **89**, 547–556 (2014).
19. Melo, J. V & Barnes, D. J. Chronic myeloid leukaemia as a model of disease evolution in human cancer. *Nat. Rev. Cancer* **7**, 441–53 (2007).
20. Martens, U. *Small Molecules in Oncology.* (2010). at <http://link.springer.com/content/pdf/10.1007/978-3-642-01222-8.pdf>
21. Jabbour, E., Saglio, G., Hughes, T. P. & Kantarjian, H. Suboptimal responses in chronic myeloid leukemia: implications and management strategies. *Cancer* **118**, 1181–91 (2012).
22. Kantarjian, H. & Sawyers, C. Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. *N. Engl. J. Med.* **346**, 645–652 (2002).
23. Lee, S. J. & Wang, J. Y. J. Exploiting the promiscuity of imatinib. *J. Biol.* **8**, 30 (2009).
24. Schindler, T. *et al.* Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase. *Science* **289**, 1938–42 (2000).
25. Breitkopf, S. & Oppermann, F. Proteomics analysis of cellular imatinib targets and their candidate downstream effectors. *J. Proteome Res.* 6033–6043 (2010).
26. Zaharieva, M. *Leukemia. Edited by Margarita ...* (2013). doi:10.5772/45914
27. Goldman, J. Targeting the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* **344**, 1084–1086 (2001).

28. Hantschel, O., Rix, U. & Superti-Furga, G. Target spectrum of the BCR-ABL inhibitors imatinib, nilotinib and dasatinib. *Leuk. Lymphoma* **49**, 615–9 (2008).
29. Weisberg, E. *et al.* Characterization of AMN107, a selective inhibitor of native and mutant Bcr-Abl. *Cancer Cell* **7**, 129–41 (2005).
30. Lombardo, L. J. *et al.* 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. *J. Med. Chem.* **47**, 6658–61 (2004).
31. Buchdunger, E., Cioffi, C. & Law, N. Abl protein-tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **295**, 139–145 (2000).
32. Atwell, S. *et al.* A novel mode of Gleevec binding is revealed by the structure of spleen tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* **279**, 55827–32 (2004).
33. Ray, P., Krishnamoorthy, N. & Ray, A. Emerging functions of c-kit and its ligand stem cell factor in dendritic cells: regulators of T cell differentiation. *Cell Cycle* **7**, 2826–32 (2008).
34. Ray, P., Krishnamoorthy, N., Oriss, T. B. & Ray, A. Signaling of c-kit in dendritic cells influences adaptive immunity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1183**, 104–22 (2010).
35. Rönstrand, L. Signal transduction via the stem cell factor receptor/c-Kit. *Cell. Mol. Life Sci. C.* **61**, 2535–48 (2004).
36. Appel, S. *et al.* Imatinib mesylate affects the development and function of dendritic cells generated from CD34+ peripheral blood progenitor cells. *Blood* **103**, 538–44 (2004).
37. Appel, S. *et al.* Effects of imatinib on monocyte-derived dendritic cells are mediated by inhibition of nuclear factor-kappaB and Akt signaling pathways. *Clin. Cancer Res.* **11**, 1928–40 (2005).
38. Lin, C. & Li, Y. The role of peptide and DNA vaccines in myeloid leukemia immunotherapy. *Cancer Cell Int.* **13**, 13 (2013).
39. Mahon, F., Réa, D., Guilhot, J. & Guilhot, F. Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained complete molecular remission for at least 2 years: the prospective, multicentre Stop Imatinib (STIM) trial. *Lancet Oncol.* **11**, 1029–35 (2010).

40. Banchereau, J. *et al.* Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. ...* **18**, 767–811 (2000).
41. Steinman, R. & Cohn, Z. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. *J Exp Med* **137**, 1142–1162 (1973).
42. Merad, M. & Manz, M. G. Dendritic cell homeostasis. *Blood* **113**, 3418–27 (2009).
43. Liu, Y. J. Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. *Cell* **106**, 259–62 (2001).
44. Liu, Y. J., Kanzler, H., Soumelis, V. & Gilliet, M. Dendritic cell lineage, plasticity and cross-regulation. *Nat. Immunol.* **2**, 585–9 (2001).
45. Cella, M., Sallusto, F. & Lanzavecchia, A. Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr. Opin. Immunol.* 10–16 (1997).
46. Karsunky, H., Merad, M., Cozzio, A., Weissman, I. L. & Manz, M. G. Flt3 ligand regulates dendritic cell development from Flt3+ lymphoid and myeloid-committed progenitors to Flt3+ dendritic cells in vivo. *J. Exp. Med.* **198**, 305–13 (2003).
47. Geissmann, F. *et al.* Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* **327**, 656–61 (2010).
48. Plantinga, M. *et al.* Conventional and monocyte-derived CD11b(+) dendritic cells initiate and maintain T helper 2 cell-mediated immunity to house dust mite allergen. *Immunity* **38**, 322–35 (2013).
49. Penna, G., Vulcano, M., Sozzani, S. & Adorini, L. Differential migration behavior and chemokine production by myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Hum. Immunol.* **63**, 1164–71 (2002).
50. Hiasa, M. *et al.* GM-CSF and IL-4 induce dendritic cell differentiation and disrupt osteoclastogenesis through M-CSF receptor shedding by up-regulation of TNF-alpha converting enzyme (TACE). *Blood* **114**, 4517–26 (2009).
51. Rossi, M. & Young, J. Human dendritic cells: potent antigen-presenting cells at the crossroads of innate and adaptive immunity. *J. Immunol.* (2005).
52. Palucka, K., Banchereau, J. & Mellman, I. Designing vaccines based on biology of human dendritic cell subsets. *Immunity* **33**, 464–78 (2010).
53. Brossart, P., Wirths, S., Brugger, W. & Kanz, L. Dendritic cells in cancer vaccines. *Exp. Hematol.* **29**, 1247–55 (2001).

54. Chapuis, F. *et al.* Differentiation of human dendritic cells from monocytes in vitro. *Eur. J. Immunol.* **27**, 431–441 (1997).
55. Scheding, S., Kratz-Albers, K., Meister, B., Brugger, W. & Kanz, L. Ex vivo expansion of hematopoietic progenitor cells for clinical use. *Semin. Hematol.* **35**, 232–240 (1998).
56. Sallusto, F. & Lanzavecchia, A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J. Exp. Med.* **179**, 1109–18 (1994).
57. Nencioni, A. & Brossart, P. Cellular immunotherapy with dendritic cells in cancer: current status. *Stem Cells* 501–513 (2004).
58. Brossart, P. *et al.* Tumor necrosis factor α and CD40 ligand antagonize the inhibitory effects of interleukin 10 on T-cell stimulatory capacity of dendritic cells. *Cancer Res.* **60**, 4485–4492 (2000).
59. Brossart, P. *et al.* Generation of functional human dendritic cells from adherent peripheral blood monocytes by CD40 ligation in the absence of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* **92**, 4238–47 (1998).
60. Lanzavecchia, a & Sallusto, F. Regulation of T cell immunity by dendritic cells. *Cell* **106**, 263–6 (2001).
61. O'Neill, D., Adams, S. & Bhardwaj, N. Manipulating dendritic cell biology for the active immunotherapy of cancer. *Blood* **104**, 2235–46 (2004).
62. Gilboa, E. DC-based cancer vaccines. *J. Clin. Invest.* **117**, 1195–1203 (2007).
63. Troutman, T. D., Bazan, J. F. & Pasare, C. Toll-like receptors, signaling adapters and regulation of the pro-inflammatory response by PI3K. *Cell Cycle* **11**, 3559–67 (2012).
64. Kumar, H., Kawai, T. & Akira, S. Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **388**, 621–5 (2009).
65. Takeda, K. & Akira, S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int. Immunol.* **17**, 1–14 (2005).
66. Medzhitov, R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **1**, 135–45 (2001).
67. Perkins, N. D. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 49–62 (2007).

68. Hayden, M. S., West, P. & Ghosh, S. NF- κ B and the immune response. *Oncogene* **25**, 6758–6780 (2006).
69. Yoshimura, S., Bondeson, J., Foxwell, B. M., Brennan, F. M. & Feldmann, M. Effective antigen presentation by dendritic cells is NF- κ B dependent: coordinate regulation of MHC, co-stimulatory molecules and cytokines. *Int. Immunol.* **13**, 675–683 (2001).
70. Tas, S. W. *et al.* Selective inhibition of NF- κ B in dendritic cells by the NEMO-binding domain peptide blocks maturation and prevents T cell proliferation and polarization. *Eur. J. Immunol.* **35**, 1164–1174 (2005).
71. Albert, M. L. *et al.* Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via α 5 β 1 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* **188**, 1359–1368 (1998).
72. Jenne, L., Arrighi, J. F., Jonuleit, H., Saurat, J. H. & Hauser, C. Dendritic cells containing apoptotic melanoma cells prime human CD8⁺ T cells for efficient tumor cell lysis. *Cancer Res.* **60**, 4446–4452 (2000).
73. Fadok, V. A. *et al.* A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature* **405**, 85–90 (2000).
74. Canton, J., Neculai, D. & Grinstein, S. Scavenger receptors in homeostasis and immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 621–34 (2013).
75. Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C. & Lanzavecchia, A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J. Exp. Med.* **182**, 389–400 (1995).
76. Swanson, J. A. & Watts, C. Macropinocytosis. *Trends Cell Biol.* **5**, 424–428 (1995).
77. Norbury, C. C., Chambers, B. J., Prescott, A. R., Ljunggren, H. G. & Watts, C. Constitutive macropinocytosis allows TAP-dependent major histocompatibility complex class I presentation of exogenous soluble antigen by bone marrow-derived dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* **27**, 280–288 (1997).
78. Brossart, P. & Bevan, M. J. Presentation of exogenous protein antigens on major histocompatibility complex class I molecules by dendritic cells: pathway of presentation and regulation by cytokines. *Blood* **90**, 1594–1599 (1997).
79. Savina, A. & Amigorena, S. Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells. *Immunol. Rev.* **219**, 143–56 (2007).

80. Regnault, A. *et al.* Fcγ receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization. *J. Exp. Med.* **189**, 371–380 (1999).
81. Théry, C. & Amigorena, S. The cell biology of antigen presentation in dendritic cells. *Curr. Opin. Immunol.* **13**, 45–51 (2001).
82. Inaba, K. *et al.* Efficient presentation of phagocytosed cellular fragments on the major histocompatibility complex class II products of dendritic cells. *J. Exp. Med.* **188**, 2163–2173 (1998).
83. Barral, D. & Brenner, M. CD1 antigen presentation: how it works. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 929–41 (2007).
84. Geijtenbeek, T. DC-SIGN, a C-type lectin on dendritic cells that unveils many aspects of dendritic cell biology. ... *Leukoc. Biol.* **71**, 921–31 (2002).
85. Davis, D. & Dustin, M. What is the importance of the immunological synapse? *Trends Immunol.* **25**, 323–7 (2004).
86. Dilioglou, S., Cruse, J. M. & Lewis, R. E. Function of CD80 and CD86 on monocyte- and stem cell-derived dendritic cells. *Exp. Mol. Pathol.* **75**, 217–227 (2003).
87. Dustin, M. L. & Cooper, J. A. The immunological synapse and the actin cytoskeleton: molecular hardware for T cell signaling. *Nat. Immunol.* **1**, 23–29 (2000).
88. Grakoui, A. *et al.* The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* **285**, 221–227 (1999).
89. Banchereau, J. & Steinman, R. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**, 245–252 (1998).
90. Mahnke, K., Johnson, T. S., Ring, S. & Enk, A. H. Tolerogenic dendritic cells and regulatory T cells: A two-way relationship. *Journal of Dermatological Science* **46**, 159–167 (2007).
91. Frick, J. J.-S., Grünebach, F. & Autenrieth, I. B. I. Immunomodulation by semi-mature dendritic cells: a novel role of Toll-like receptors and interleukin-6. *Int. J. Med. Microbiol.* **300**, 19–24 (2010).
92. Van den Broek, M. Dendritic cells break bonds to tolerize. *Immunity* **27**, 544–6 (2007).
93. Woltman, A. M. & Kooten, C. Van. Functional modulation of dendritic cells to suppress adaptive immune responses. *J. Leukoc. Biol.* (2002). doi:10.1189/jlb.0902431.http

94. Steinbrink, K., Wölfel, M. & Jonuleit, H. Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J. Immunol.* (1997).
95. Wallet, M., Sen, P. & Tisch, R. Immunoregulation of dendritic cells. *Clin. Med. Res.* **3**, 166–75 (2005).
96. Flavell, R. A. & Sanjabi, S. The polarization of immune cells in the tumour environment by TGF β . *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 554–567 (2010).
97. Buelens, C. *et al.* Interleukin-10 prevents the generation of dendritic cells from human peripheral blood mononuclear cells cultured with interleukin-4 and granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor. *Eur. J. Immunol.* **27**, 756–762 (1997).
98. Steinbrink, K. *et al.* Interleukin-10-treated human dendritic cells induce a melanoma-antigen-specific anergy in CD8(+) T cells resulting in a failure to lyse tumor cells. *Blood* **93**, 1634–42 (1999).
99. Knödler, a *et al.* Post-transcriptional regulation of adapter molecules by IL-10 inhibits TLR-mediated activation of antigen-presenting cells. *Leukemia* **23**, 535–44 (2009).
100. Melief, C. J. M. Cancer immunotherapy by dendritic cells. *Immunity* **29**, 372–83 (2008).
101. Torres-Aguilar, H. *et al.* Tolerogenic dendritic cells generated with different immunosuppressive cytokines induce antigen-specific anergy and regulatory properties in memory CD4+ T cells. *J. Immunol.* **184**, 1765–1775 (2010).
102. Boks, M. A. *et al.* IL-10-generated tolerogenic dendritic cells are optimal for functional regulatory T cell induction - A comparative study of human clinical-applicable DC. *Clin. Immunol.* **142**, 332–342 (2012).
103. Bhattacharyya, S. *et al.* Immunoregulation of dendritic cells by IL-10 is mediated through suppression of the PI3K/Akt pathway and of I B kinase activity. *Blood* **104**, 1100–1109 (2004).
104. Wang, P., Wu, P., Siegel, M., Egan, R. W. & Billah, M. M. Interleukin (IL)-10 inhibits nuclear factor kB(NF kB) activation in human monocytes. *J. Biol. Chem.* **270**, 9558–9563 (1995).
105. Maldonado, R. A. & von Andrian, U. H. How tolerogenic dendritic cells induce regulatory T cells. *Adv. Immunol.* **108**, 111–65 (2010).
106. Hackstein, H. & Thomson, A. W. Dendritic cells: emerging pharmacological targets of immunosuppressive drugs. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 24–34 (2004).

107. Pugliese, O., D'Ambrosio, A., Campanile, D. & Quintieri, F. Diltiazem induces regulatory T cells in vitro by modulating human dendritic cell maturation. *Transpl. Int.* **24**, 409–417 (2011).
108. Ramachandar, K., Baker, M. & Taub, R. Antibody responses to leukemia-associated antigens during immunotherapy of chronic myelocytic leukemia. *Blood* **46**, (1975).
109. Schuler, G. Dendritic cells in cancer immunotherapy. *Eur. J. Immunol.* **40**, 2123–30 (2010).
110. Nencioni, A. *et al.* The use of dendritic cells in cancer immunotherapy. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* **65**, 191–199 (2008).
111. Weide, B., Garbe, C., Rammensee, H.-G. & Pascolo, S. Plasmid DNA- and messenger RNA-based anti-cancer vaccination. *Immunol. Lett.* **115**, 33–42 (2008).
112. Palucka, K. & Banchereau, J. Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 265–77 (2012).
113. Grünebach, F., Müller, M. R. & Brossart, P. New developments in dendritic cell-based vaccinations: RNA translated into clinics. *Cancer Immunology, Immunotherapy* **54**, 517–525 (2005).
114. Singh-Jasuja, H., Emmerich, N. P. N. & Rammensee, H.-G. The Tübingen approach: identification, selection, and validation of tumor-associated HLA peptides for cancer therapy. *Cancer Immunol. Immunother.* **53**, 187–95 (2004).
115. Atanackovic, D. *et al.* Booster vaccination of cancer patients with MAGE-A3 protein reveals long-term immunological memory or tolerance depending on priming. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 1650–5 (2008).
116. Blaskovich, M. a, Sun, J. & Cantor, A. Discovery of JSI-124 (Cucurbitacin I), a Selective Janus Kinase / Signal Transducer and Activator of Discovery of JSI-124 (Cucurbitacin I), a Selective Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription 3 Signaling Pathway Inhibitor with Pote. *CANCER Res.* **124**, 1270–1279 (2003).
117. Van Kester, M. S. *et al.* Cucurbitacin I inhibits Stat3 and induces apoptosis in Sézary cells. *J. Invest. Dermatol.* **128**, 1691–1695 (2008).
118. Pardoll, D. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 252–64 (2012).
119. Leach, D. R., Krummel, M. F. & Allison, J. P. Enhancement of Antitumor Immunity by CTLA-4 Blockade. *Science (80-)*. **271**, 1734–1736 (1996).

120. Lee, K. M. *et al.* Molecular basis of T cell inactivation by CTLA-4. *Science* **282**, 2263–2266 (1998).
121. Walunas, T. L. *et al.* CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity* **1**, 405–413 (1994).
122. Wing, K. *et al.* CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science* **322**, 271–5 (2008).
123. Francisco, L. M. *et al.* PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *J. Exp. Med.* **206**, 3015–29 (2009).
124. Parry, R. V *et al.* CTLA-4 and PD-1 Receptors Inhibit T-Cell Activation by Distinct Mechanisms. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 9543–9553 (2005).
125. Contardi, E. *et al.* CTLA-4 is constitutively expressed on tumor cells and can trigger apoptosis upon ligand interaction. *Int. J. Cancer* **117**, 538–50 (2005).
126. Victor, C. T.-S. *et al.* Radiation and dual checkpoint blockade activate non-redundant immune mechanisms in cancer. *Nature* (2015). doi:10.1038/nature14292
127. Webster, R. M. The immune checkpoint inhibitors: where are we now? *Nat. Rev. Drug Discov.* **13**, 883–884 (2014).
128. Jacobs, J. F. M. *et al.* Dendritic cell vaccination in combination with anti-CD25 monoclonal antibody treatment: A phase I/II study in metastatic melanoma patients. *Clin. Cancer Res.* **16**, 5067–5078 (2010).
129. Walter, S. *et al.* Multi-peptide immune response to cancer vaccine IMA901 after single-dose cyclophosphamide associates with longer patient survival. *Nature Medicine* **18**, 1254–1261 (2012).
130. Suttmuller, R. P. M. *et al.* Synergism of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and depletion of CD25(+) regulatory T cells in antitumor therapy reveals alternative pathways for suppression of autoreactive cytotoxic T lymphocyte responses. *J. Exp. Med.* **194**, 823–32 (2001).
131. Shikano, S., Bonkobara, M., Zukas, P. K. & Ariizumi, K. Molecular cloning of a dendritic cell-associated transmembrane protein, DC-HIL, that promotes RGD-dependent adhesion of endothelial cells through recognition of heparan sulfate proteoglycans. *J. Biol. Chem.* **276**, 8125–34 (2001).
132. Safadi, F. F. *et al.* Cloning and Characterization of Osteoactivin , A Novel cDNA Expressed in Osteoblasts. *J. Cell. Biochem.* **26**, (2002).

133. Bandari, P. S. *et al.* Hematopoietic growth factor inducible neurokinin-1 type: a transmembrane protein that is similar to neurokinin 1 interacts with substance P. *Regul. Pept.* **111**, 169–178 (2003).
134. Chung, J., Dougherty, I., Cruz, P. D. & Ariizumi, K. Syndecan-4 mediates the coinhibitory function of DC-HIL on T cell activation. *J. Immunol.* **179**, 5778–84 (2007).
135. Patel, S., Lim, P. & Rameshwar, P. GPNMB (glycoprotein (transmembrane) nmb). *Atlas Genet. Cytogenet. Oncol. Haematol.* **14**, 765–767 (2011).
136. Haralanova-Ilieva, B., Ramadori, G. & Armbrust, T. Expression of osteoactivin in rat and human liver and isolated rat liver cells. *J. Hepatol.* **42**, 565–72 (2005).
137. Sheng, M. H.-C., Wergedal, J. E., Mohan, S. & Lau, K.-H. W. Osteoactivin is a novel osteoclastic protein and plays a key role in osteoclast differentiation and activity. *FEBS Lett.* **582**, 1451–8 (2008).
138. Loftus, S. S. K. *et al.* Gpnmb is a melanoblast-expressed, MITF-dependent gene. *Pigment Cell Melanoma Res.* **22**, 99–110 (2009).
139. Rose, A. a N. *et al.* Osteoactivin promotes breast cancer metastasis to bone. *Mol. Cancer Res.* **5**, 1001–14 (2007).
140. Kuan, C.-T. *et al.* Glycoprotein nonmetastatic melanoma protein B, a potential molecular therapeutic target in patients with glioblastoma multiforme. *Clin. Cancer Res.* **12**, 1970–82 (2006).
141. Chung, J.-S., Tamura, K., Cruz, P. D. & Ariizumi, K. DC-HIL-Expressing Myelomonocytic Cells Are Critical Promoters of Melanoma Growth. *J. Invest. Dermatol.* **134**, 2784–2794 (2014).
142. Tse, K. F. *et al.* CR011, a fully human monoclonal antibody-auristatin E conjugate, for the treatment of melanoma. *Clin. Cancer Res.* **12**, 1373–82 (2006).
143. Qian, X., Mills, E., Torgov, M., LaRochelle, W. J. & Jeffers, M. Pharmacologically enhanced expression of GPNMB increases the sensitivity of melanoma cells to the CR011-vcMMAE antibody-drug conjugate. *Mol. Oncol.* **2**, 81–93 (2008).
144. Pollack, V. a *et al.* Treatment parameters modulating regression of human melanoma xenografts by an antibody-drug conjugate (CR011-vcMMAE) targeting GPNMB. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **60**, 423–35 (2007).
145. Zhou, L. T. *et al.* Gpnmb/osteoactivin, an attractive target in cancer immunotherapy. *Neoplasma* **59**, 1–5 (2012).

146. Vaklavas, C. & Forero, A. Management of Metastatic Breast Cancer with Second-Generation Antibody–Drug Conjugates: Focus on Glembatumumab Vedotin (CDX-011, CR011-vcMMAE). *BioDrugs* **28**, 253–263 (2014).
147. Chung, J.-S. *et al.* Binding of DC-HIL to dermatophytic fungi induces tyrosine phosphorylation and potentiates antigen presenting cell function. *J. Immunol.* **183**, 5190–8 (2009).
148. Ahn, J. H. *et al.* Identification of the genes differentially expressed in human dendritic cell subsets by cDNA subtraction and microarray analysis. *Blood* **100**, 1742–1754 (2002).
149. Abdelmagid, S. M. *et al.* Osteoactivin, an anabolic factor that regulates osteoblast differentiation and function. *Exp. Cell Res.* **314**, 2334–51 (2008).
150. Chung, J. *et al.* DC-HIL is a negative regulator of T lymphocyte activation. *Blood* **109**, 4320–7 (2007).
151. Chung, J.-S., Bonkobara, M., Tomihari, M., Cruz, P. D. & Ariizumi, K. The DC-HIL/syndecan-4 pathway inhibits human allogeneic T-cell responses. *Eur. J. Immunol.* **39**, 965–74 (2009).
152. Ripoll, V. M. *et al.* Microphthalmia transcription factor regulates the expression of the novel osteoclast factor GPNMB. *Gene* **413**, 32–41 (2008).
153. Metz, R. L., Patel, P. S., Hameed, M., Bryan, M. & Rameshwar, P. Role of human HGFIN/nmb in breast cancer. *Breast Cancer Res.* **9**, R58 (2007).
154. Moore, K. J. Insight into the microphthalmia gene. *Trends Genet.* **11**, 442–448 (1995).
155. Bentley, N. J., Eisen, T. & Goding, C. R. Melanocyte-specific expression of the human tyrosinase promoter: activation by the microphthalmia gene product and role of the initiator. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 7996–8006 (1994).
156. Yasumoto, K. -i. *et al.* Transcriptional Activation of the Melanocyte-Specific Genes by the Human Homolog of the Mouse Microphthalmia Protein. *J. Biochem.* **118**, 874–881 (1995).
157. Ni, C. *et al.* Hearing dysfunction in heterozygous *Mitf*(Mi-wh) /+ mice, a model for Waardenburg syndrome type 2 and Tietz syndrome. *Pigment Cell Melanoma Res.* **26**, 78–87 (2013).

158. Tassabehji, M., Newton, V. & Read, A. Waardenburg syndrome type 2 caused by mutations in the human microphthalmia (MITF) gene. *Nat. Genet.* **8**, (1994).
159. Shibahara, S. *et al.* Microphthalmia-associated transcription factor (MITF): multiplicity in structure, function, and regulation. *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.* **6**, 99–104 (2001).
160. Vachtenheim, J. & Borovanský, J. 'Transcription physiology' of pigment formation in melanocytes: central role of MITF. *Exp. Dermatol.* **19**, 617–27 (2010).
161. Hou, L. & Pavan, W. J. Transcriptional and signaling regulation in neural crest stem cell-derived melanocyte development: do all roads lead to Mitf? *Cell Res.* **18**, 1163–76 (2008).
162. Hemesath, T. J. J., Price, E. R. R., Takemoto, C., Badalian, T. & Fisher, D. E. E. MAP kinase links the transcription factor Microphthalmia to c-Kit signalling in melanocytes. *Nature* **391**, 298–301 (1998).
163. Saito, H. *et al.* Microphthalmia-associated transcription factor in the Wnt signaling pathway. *Pigment Cell Res.* **16**, 261–5 (2003).
164. Takeda, K. *et al.* Ser298 of MITF, a mutation site in Waardenburg syndrome type 2, is a phosphorylation site with functional significance. *Hum. Mol. Genet.* **9**, 125–32 (2000).
165. Khaled, M. *et al.* Glycogen synthase kinase 3beta is activated by cAMP and plays an active role in the regulation of melanogenesis. *J. Biol. Chem.* **277**, 33690–7 (2002).
166. Wu, M. *et al.* c-Kit triggers dual phosphorylations, which couple activation and degradation of the essential melanocyte factor Mi. *Genes Dev.* **14**, 301–12 (2000).
167. Cross, D. A., Alessi, D. R., Cohen, P., Andjelkovich, M. & Hemmings, B. A. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* **378**, 785–9 (1995).
168. Debbache, J. *et al.* In vivo role of alternative splicing and serine phosphorylation of the microphthalmia-associated transcription factor. *Genetics* **191**, 133–44 (2012).
169. Hoek, K. S. *et al.* Novel MITF targets identified using a two-step DNA microarray strategy. *Pigment Cell Melanoma Res.* **21**, 665–76 (2008).
170. Driessens, G., Kline, J. & Gajewski, T. Costimulatory and coinhibitory receptors in anti-tumor immunity. *Immunol. Rev.* **24**, 1639–41 (2009).

171. Park, S.-J. *et al.* IL-6 Regulates In Vivo Dendritic Cell Differentiation through STAT3 Activation. *J. Immunol.* **173**, 3844–3854 (2004).
172. Nurieva, R. I., Liu, X. & Dong, C. Molecular mechanisms of T-cell tolerance. *Immunol. Rev.* **241**, 133–44 (2011).
173. Schwarzbich, M.-A. *et al.* The immune inhibitory receptor osteoactivin is upregulated in monocyte-derived dendritic cells by BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Immunol. Immunother.* **61**, 193–202 (2012).
174. Khaled, M. *et al.* Microphthalmia associated transcription factor is a target of the phosphatidylinositol-3-kinase pathway. *J. Invest. Dermatol.* **121**, 831–6 (2003).
175. Faloon, P. W. *et al.* A Small Molecule Inhibitor of the MITF Molecular Pathway. *Probe Reports from the NIH Molecular Libraries Program [Internet]*. (2013). at <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK154496/>>
176. Tsui, K.-H., Chang, Y.-L., Feng, T.-H., Chang, P.-L. & Juang, H.-H. Glycoprotein transmembrane nmb: an androgen-downregulated gene attenuates cell invasion and tumorigenesis in prostate carcinoma cells. *Prostate* **72**, 1431–42 (2012).
177. Nayak, G. & Cooper, G. M. p53 is a major component of the transcriptional and apoptotic program regulated by PI 3-kinase/Akt/GSK3 signaling. *Cell Death Dis.* **3**, e400 (2012).
178. Linares, L. K. L. L. K. *et al.* Role of the histone acetyl transferase Tip60 in the p53 pathway. *J. Biol. Chem.* **279**, 44825–33 (2004).
179. Mayo, L. D. & Donner, D. B. A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 11598–11603 (2001).
180. Zhou, B. *et al.* HER-2/neu induces p53 ubiquitination via Akt-mediated MDM2 phosphorylation. *Nat. Cell Biol.* **3**, (2001).
181. Steinbrink, K., Wolf, M., Jonuleit, H., Knop, J. & Enk, A. H. Induction of Tolerance by IL-10-Treated Dendritic Cells. *J. Immunol.* (1997).
182. Nicholson, G., Malakellis, M. & Collier, F. Induction of osteoclasts from CD14-positive human peripheral blood mononuclear cells by receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL). *Clin. Sci.* **140**, 133–140 (2000).
183. Latchman, Y. *et al.* PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat. Immunol.* **2**, 261–8 (2001).
184. Cheng, C. *et al.* Overexpression of B7-H4 in tumor infiltrated dendritic cells. *J. Immunoassay Immunochem.* **32**, 353–364 (2011).

185. Murugaiyan, G., Mittal, A. & Weiner, H. L. Identification of an IL-27/osteopontin axis in dendritic cells and its modulation by IFN-gamma limits IL-17-mediated autoimmune inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 11495–11500 (2010).
186. Yoshimoto, T. *et al.* Regulation of antitumor immune responses by the IL-12 family cytokines, IL-12, IL-23, and IL-27. *Clinical and Developmental Immunology* **2010**, (2010).
187. Vignali, D. A. A. & Kuchroo, V. K. IL-12 family cytokines: immunological playmakers. *Nature Immunology* **13**, 722–728 (2012).
188. Xie, J. *et al.* Critical roles of Raf/MEK/ERK and PI3K/AKT signaling and inactivation of p38 MAP kinase in the differentiation and survival of monocyte-derived immature dendritic cells. *Exp. Hematol.* **33**, 564–572 (2005).
189. Ozes, O., Mayo, L., Gustin, J. & Pfeffer, S. NF- κ B activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine–threonine kinase. *Nature* **401**, 1–4 (1999).
190. Kawai, T. & Akira, S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity* **34**, 637–50 (2011).
191. Sims, J. T. *et al.* Imatinib reverses doxorubicin resistance by affecting activation of STAT3-dependent NF- κ B and HSP27/p38/AKT pathways and by inhibiting ABCB1. *PLoS One* **8**, e55509 (2013).
192. Lundberg, K. *et al.* Transcriptional profiling of human dendritic cell populations and models--unique profiles of in vitro dendritic cells and implications on functionality and applicability. *PLoS One* **8**, e52875 (2013).
193. Kariko, K., Bhuyan, P., Capodici, J. & Weissman, D. Small Interfering RNAs Mediate Sequence-Independent Gene Suppression and Induce Immune Activation by Signaling through Toll-Like Receptor 3. *J. Immunol.* **172**, 6545–6549 (2004).
194. Karikó, K. *et al.* Exogenous siRNA mediates sequence-independent gene suppression by signaling through toll-like receptor 3. *Cells. Tissues. Organs* **177**, 132–8 (2004).
195. Sioud, M. *RNA Interference.* **1218**, 301–319 (Springer New York, 2015).
196. Robbins, M., Judge, A. & MacLachlan, I. siRNA and innate immunity. *Oligonucleotides* **19**, 89–102 (2009).
197. Wooden, J. & Ciborowski, P. Chromatin immunoprecipitation for human monocyte derived macrophages. *Methods* **70**, 89–96 (2014).

198. Sen, R. & Baltimore, D. Multiple Nuclear Factors Interact with the Immunoglobulin Enhancer Sequences. **46**, (1988).
199. Khavrutskii, L. *et al.* Protein purification-free method of binding affinity determination by microscale thermophoresis. *J. Vis. Exp.* 2013 (2013).
200. Vachtenheim, J. & Borovanský, J. 'Transcription physiology' of pigment formation in melanocytes: central role of MITF. *Exp. Dermatol.* **19**, 617–27 (2010).
201. D'Aura Swanson, C., Paniagua, R. T., Lindstrom, T. M. & Robinson, W. H. Tyrosine kinases as targets for the treatment of rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* **5**, 317–324 (2009).
202. Tristano, A. G. Tyrosine kinases as targets in rheumatoid arthritis. *Int. Immunopharmacol.* **9**, 1–9 (2009).
203. Eklund, K. K. *et al.* Maintained efficacy of the tyrosine kinase inhibitor imatinib mesylate in a patient with rheumatoid arthritis. *J. Clin. Rheumatol.* **14**, 294–6 (2008).
204. Khan, S., Greenberg, J. D. & Bhardwaj, N. Dendritic cells as targets for therapy in rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* **5**, 566–71 (2009).

10 DANKSAGUNG

Ich möchte mich recht herzlich bei Frau Dr. med. Susi Rittig und Herr PD Dr. rer. nat. Frank Grünebach dafür bedanken, dass sie mich in der Arbeitsgruppe für Experimentelle Immuntherapie des Universitätsklinikum Tübingen so freundlich aufgenommen haben. Sie hatten jederzeit ein offenes Ohr für meine Fragen und konnten mir immer mit Rat und Tat zur Seite stehen. Vor allem möchte ich mich für Ihre Hilfe bei den MITF-Inhibitor Experimenten bedanken. Susi, vielen Dank für die Mono-Isolierung und Frank vielen Dank für die PCRs.

Desweiteren möchte ich Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee dafür danken, dass ich meine Doktorarbeit unter seiner Leitung anfertigen durfte. Die Besprechungen mit ihm waren mir stets eine große Hilfe. Seine konstruktiven Vorschläge waren nicht unwesentlich am guten Gelingen meiner Arbeit beteiligt. Vielen Dank auch für die tolle Kommunikation über den „großen Teich“ hinweg! Und auch für die extra schnelle Korrektur!

Außerdem möchte ich mich bei Herr Prof. Dr. med. Helmut Salih und Herr PD Dr. med. Dr. rer. nat. Martin Müller für ihre hilfreichen Tipps und aufschlussreichen Diskussionen während des „Work in Progress“ –Seminars sowie ihrer konstruktiven Kritik bei der Verfassung unserer Fachartikel und natürlich auch für ihre besondere Hilfe am Ende meiner Doktorarbeit bedanken.

Ein besonderes Dankeschön gebührt Frau Sylvia Klein, der guten Seele der AG Experimentelle Immuntherapie. Sie war in all den Jahren nicht nur eine immer freundliche sondern auch sehr tatkräftige Kollegin, auf deren Unterstützung ich mich jederzeit verlassen konnte. Danke für Alles!

Darüber hinaus möchte ich mich auch bei allen anderen Mitarbeitern der Forschungslabore der Inneren Medizin II und der Sportmedizin für die tolle Arbeitsatmosphäre und tatkräftige Unterstützung bedanken. Vor allem möchte ich hierbei Melanie Märklin, Frauke Prenzler, Sandra Weisser, Elke Malenke, David Worbs, Nunzi Fragasso, Stefanie Bugl und Jonas Heitmann für die tolle Zeit danken! Sie waren nicht nur tolle Arbeitskollegen sondern sind auch Freunde fürs Leben geworden! Ohne Euch wär die Zeit, wenn überhaupt, nur halb so schön gewesen!

Außerdem möchte ich mich bei meinen wissenschaftlichen Hilfskräften Lisa Spring, Eva-Maria Ewen, Celina Wortmann sowie Julian Geiger für ihre tolle Arbeit bedanken. Danke Leute, durch Euch konnten wir so viel mehr machen!

Mit einem besonderen Dankeschön möchte ich auch meine beiden Diplomandinnen Simone Joas und Lisa Spring bedenken. Vielen Dank für Euer Vertrauen und Euer Engagement! Simone absolvierte bereits ihr Großpraktikum in der Experimentellen Immuntherapie und Lisa arbeitete schon als HiWi für mich. Beide wussten also auf was sie sich einlassen und scheuten trotzdem nicht vor der vielen Arbeit und den schwierigen Diplomarbeitsthemen zurück. Besonders gefreut habe ich mich, als Lisa mir einen kleinen Teil ihrer Hochzeitsorganisation anvertraute. Vielen Dank Ihr Beiden, Ihr seid spitze!

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken.

Meine Freunde Toby, Bianca, HJ, Benny, Christina, Melly, Manu, Frauke, David, Mareike, Jennifer, Seb, Cora, Happy, Silke, Alex, Chris, Domi, Dan und Luke haben für einen gesunden Ausgleich zur Arbeit gesorgt. Vielen Dank für den ganzen Spaß!

Meinen Eltern, meiner Schwester Annette, meiner Tante Moni und natürlich meiner Freundin Marion gebührt mein besonderer Dank! Sie waren immer für mich da, haben mir den Rücken gestärkt und über so manche Krise hinweggeholfen. Ich weiß nicht was ich ohne Euch gemacht hätte! Tausend Dank!