

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene  
der Universität Ulm

Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Steffen Stenger

---

**Einfluss von Interferon- $\alpha$   
auf die Immunantwort bei der Tuberkulose**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von  
Andreas Zimmermann  
aus Memmingen

2018

**Amtierender Dekan: Prof. Dr. T. Wirth**

**1. Berichterstatter: Prof. Dr. S. Stenger**

**2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Barth**

**Tag der Promotion: 28.06.2019**

Für meine Eltern

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1. Epidemiologie der Tuberkulose .....	1
1.2. Therapie der Tuberkulose .....	2
1.3. Immunabwehr gegen <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	3
1.4. Interferon- $\alpha/\beta$ .....	5
1.5. Nilotinib .....	7
1.6. Fragestellung der Arbeit.....	9
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>10</b>
2.1. Material und Reagenzien .....	10
2.1.1. Arbeitsgeräte und Arbeitsmaterialien.....	10
2.1.2. Chemikalien und Reagenzien.....	11
2.1.3. Medien und Puffer .....	13
2.1.4. Zytokine, Bakterien, Antikörper und Primer .....	13
2.2. Methoden .....	16
2.2.1. Isolierung von peripheren mononukleären Zellen.....	16
2.2.2. Generierung von Makrophagen .....	17
2.2.3. Infektion von Monozyten mit <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	18
2.2.4. Herstellung von löslichem Extrakt aus <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	19
2.2.5. Stimulation von Zellen und Einteilung der Spender in Kohorten .....	20
2.2.6. Durchflusszytometrie .....	21
2.2.7. Enzyme-linked Immunosorbent Assay .....	25
2.2.8. Messung der Ansäuerung von Lysosomen .....	26
2.2.9. Molekularbiologische Methoden .....	27
2.2.10. Statistische Auswertung und Computerprogramme .....	29

<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>30</b>
3.1. Toxizität von Interferon- $\alpha$ und Nilotinib .....	30
3.2. Einfluss von Interferon- $\alpha$ und Nilotinib auf .....	
die Ansäuerung von Lysosomen.....	32
3.3. Einfluss von Interferon- $\alpha$ und Nilotinib auf die Zytokinfreisetzung .....	35
3.3.1. Einfluss von Interferon- $\alpha$ auf die Freisetzung von .....	
Interferon- $\gamma$ und Tumornekrosefaktor- $\alpha$ .....	35
3.3.2. Einfluss von Interferon- $\alpha$ auf.....	
die nilotinibinduzierte Hemmung der Interferon- $\gamma$ -Freisetzung .....	43
3.3.3. Mechanismus der Interferon- $\alpha$ -induzierten .....	
Interferon- $\gamma$ -Freisetzung.....	45
3.4. Einfluss von Interferon- $\alpha$ und Nilotinib auf .....	
die Degranulation von zytotoxischen Lymphozyten .....	49
3.5. Einfluss von Interferon- $\alpha$ und Nilotinib auf .....	
das intrazelluläre Wachstum von <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	52
<b>4. Diskussion</b> .....	<b>54</b>
4.1. Einfluss von Interferon- $\alpha/\beta$ auf .....	
die Immunabwehr bei der Tuberkulose.....	54
4.2. Mechanismus der Interferon- $\alpha$ -induzierten Interferon- $\gamma$ -Freisetzung .....	57
4.3. Interferon- $\alpha$ und Tyrosinkinaseinhibitoren als .....	
immunmodulatorische Therapie gegen Tuberkulose .....	60
<b>5. Zusammenfassung</b> .....	<b>63</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>65</b>
<b>7. Danksagung</b> .....	<b>89</b>
<b>8. Lebenslauf</b> .....	<b>90</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

Abb.	Abbildung
Abl	Abelson murine leukemia viral oncogene homolog
AIDS	erworbenes Immundefektsyndrom
APC	Allophycocyanin
APC-Cy7	Allophycocyanin-Cyanin 7
APZ	antigenpräsentierende Zellen
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
BCR	Breakpoint Cluster Region
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CM	Zellmedium
CML	Chronisch Myeloische Leukämie
ConA	Concanavalin A
CT	cycle threshold
CTL	zytotoxische T-Zelle
DC	dendritische Zelle
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleotide

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EPEC	Enteropathogene <i>Escherichia coli</i>
FACS	Fluorescence-activated Cell Sorting
FCS	fötale Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	forward scatter
GAS	Interferon- $\gamma$ activated sequence
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony stimulating factor
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Schwefelsäure
Hepes	Hydroxyethylpiperazinylethansulfonsäure
IFN	Interferon
IFN $\alpha$ R1	Interferon- $\alpha$ -Rezeptor 1
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IRF9	Interferon regulatory factor 9
ISGF3	Interferon-stimulated gene factor 3
ISRE	Interferon-stimulated response element
JAK	Janus-Tyrosinkinase
KBE	koloniebildende Einheiten
LPS	Lipopolysaccharid
M $\Phi$	Makrophage

MDR	multi-drug-resistant
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MOI	Multiplizität der Infektion
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
<i>M.tb</i> -Extrakt	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> -Extrakt
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
PB	Pacific Blue
PBMC	periphere mononukleäre Zellen
PBS	Phosphatpuffer
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PE-Cy7	Phycoerythrin-Cyanin 7
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
PI	Propidiumiodid
PKR	Proteinkinase R
pSTAT	(Phosphorylierte) Signal Transducers and Activators of Transcription
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	reverse Transkription
RTase	reverse Transkriptase

SSC	sideward scatter
SDR	single-drug-resistant
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
TKI	Abl-Tyrosinkinaseinhibitor
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TYK2	Tyrosinkinase 2
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
rpm	Umdrehungen pro Minute
vATPase	vesikuläre Adenosintriphosphatase
WHO	Weltgesundheitsorganisation
XDR	extensively-drug-resistant

## 1. Einleitung

### 1.1. Epidemiologie der Tuberkulose

Die Tuberkulose ist neben AIDS und Malaria die Infektionskrankheit mit der höchsten Inzidenz und Mortalität weltweit. Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) zufolge ist ein Drittel der Weltbevölkerung mit *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) infiziert [174]. Latent infizierte Individuen entwickeln im Laufe ihres Lebens mit etwa zehnpromzentiger Wahrscheinlichkeit eine aktive Tuberkulose. Im Jahr 2014 erkrankten 9,6 Millionen Menschen an der aktiven Form, von denen 1,5 Millionen verstarben [174]. Die BCG (Bacillus Calmette-Guérin)-Impfung reduziert zwar die Inzidenz schwerer Verläufe bei Kindern, konnte aber trotz weltweitem Einsatz die Tuberkulose-Epidemie nicht eindämmen [62, 63]. Risikofaktoren für eine aktive Infektion mit *M. tuberculosis* sind Immunschwäche, Unterernährung, Drogen- und Alkoholabusus und Lungenerkrankungen (z. B. Silikose) [121]. Besonders häufig erkrankten HIV-Infizierte [50]. Die Verbreitung der Tuberkulose zeigt regionale Unterschiede. Hochprävalenzländer sind Indien, China, Südostasien, Südafrika und die ehemaligen Mitgliedstaaten der Sowjetunion [182]. In Deutschland war die Zahl der Tuberkulose-Infektionen jahrelang rückläufig. Seit 2013 nimmt die Zahl der gemeldeten Erkrankungen wieder zu. 2015 wurden 5.865 Fälle gemeldet, was einem Zuwachs von 29 % im Vergleich zum Vorjahr entspricht [137]. Der Anstieg resultiert primär aus der frühen und effektiven Fallfindung im Rahmen der gesetzlich vorgeschriebenen Untersuchung von Flüchtlingen und Asylsuchenden [136]. Ein massives Problem ist die weltweite Zunahme multiresistenter Stämme. 2015 wurden mehr als 550.000 Tuberkulose-Infektionen mit multiresistenten Erregern gemeldet [174]. Wichtige Ursachen für das Auftreten von Resistenzen sind inadäquate antibiotische Behandlungen und mangelnde Compliance aufgrund der langwierigen, nebenwirkungsreichen Therapie. Ohne Behandlung beträgt die Letalität der Tuberkulose ca. 50 %.

## **1.2. Therapie der Tuberkulose**

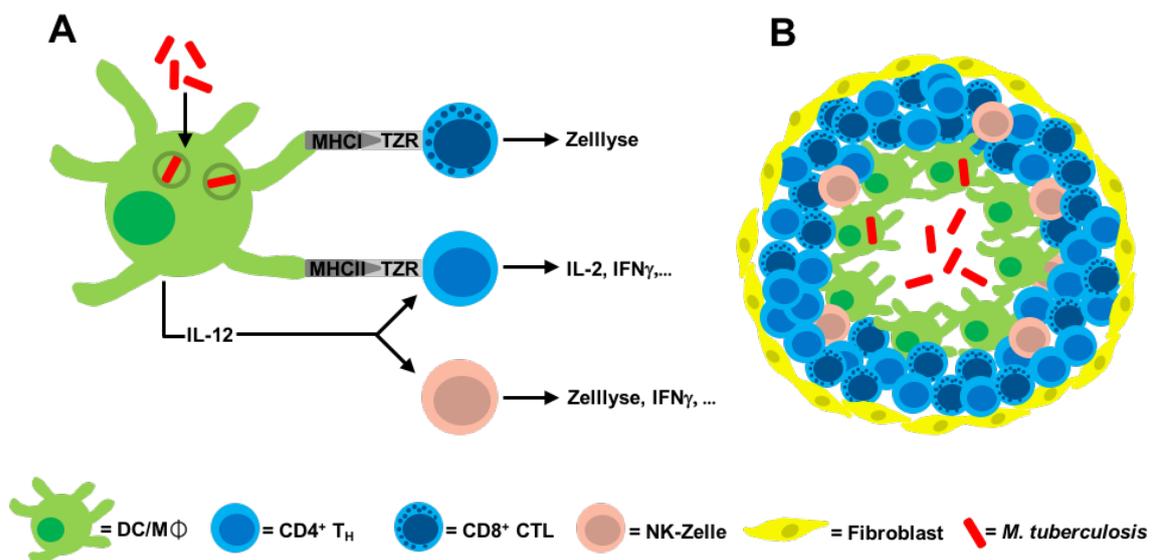
Die Therapie der Tuberkulose ist langwierig und kompliziert. Verantwortlich dafür ist unter anderem die besondere Zusammensetzung der mykobakteriellen Zellwand aus Wachs und Lipiden [69]. Dadurch gelangen Antibiotika nur schwer in das bakterielle Zytoplasma. Für eine erfolgreiche Therapie und das Verhindern von Resistenzen ist daher eine mindestens sechsmonatige Kombinationstherapie erforderlich [110]. Die leitliniengerechte Therapie besteht in den ersten zwei Monaten aus der Kombination von Rifampicin, Isoniazid, Ethambutol und Pyrazinamid. Danach schließt sich eine Erhaltungstherapie mit Rifampicin und Isoniazid für mindestens vier weitere Monate an [175]. Typische Nebenwirkungen sind Hepatotoxizität [15], Neurotoxizität [90], Optikusneuritis [23], Hyperurikämie [152], Arthralgien und Myopathien. Beim Vorliegen von Resistenzen verlängert sich die Therapiedauer auf bis zu 24 Monate. Zudem müssen Zweitlinien-Therapeutika mit erheblichen zusätzlichen Nebenwirkungen eingesetzt werden [48]. Die Heilungschance reduziert sich auf etwa 50 % und Rezidive sind häufig [174]. Bei den resistenten Stämmen unterscheidet man zwischen „single-drug-resistant“ (SDR), „multi-drug-resistant“ (MDR) und „extensively-drug-resistant“ (XDR) [185]. Während SDR-Stämme eine Resistenz gegenüber Rifampicin oder Isoniazid aufweisen, sind MDR-Stämme gegen beide Antibiotika resistent. XDR-Stämme zeigen zudem Resistenzen gegen Fluorchinolone und mindestens ein weiteres Zweitrang-Antibiotikum. Die hohe Inzidenz der Tuberkulose und die Zunahme resistenter Stämme verdeutlicht die Notwendigkeit neuer Therapieoptionen. Neben der Entwicklung neuer Antibiotikaklassen gibt es innovative Strategien, bei denen nicht mehr das Bakterium die Zielstruktur darstellt, sondern Hauptziel die Unterstützung der körpereigenen Immunabwehr ist. Für die gezielte Weiterentwicklung dieses Ansatzes ist das Verständnis der Mechanismen der Immunabwehr bei der Tuberkulose essentiell.

### 1.3. Immunabwehr gegen *Mycobacterium tuberculosis*

*M. tuberculosis*, der Erreger der Tuberkulose, wird aerogen übertragen. Die Erreger werden in der Lunge von ortsständigen Alveolarmakrophagen rezeptorabhängig phagozytiert [132]. Alveolarmakrophagen bilden die erste Verteidigungslinie des angeborenen Immunsystems im Kampf gegen Tuberkulose [83]. Für die Induktion der antimykobakteriellen Aktivität ist der Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) entscheidend [156]. Durch Fusion von Lysosomen und bakterienhaltigen Phagosomen wird die Verdauung der Erreger initiiert [167]. Die Lysosomen enthalten Vorstufen hydrolytischer Enzyme, deren aktive Formen bakteriostatische und bakterizide Wirkung entfalten. Mittels der membranständigen vesikulären Adenosintriphosphatase (vATPase) werden Protonen in die Lysosomen gepumpt [157]. Dadurch sinkt der pH-Wert (pH 4,5-5,0) und die hydrolytischen Enzyme werden aktiviert. Weitere Abwehrmechanismen der Alveolarmakrophagen sind Apoptose, Autophagie [83], Eisendepletion und die Produktion von Sauerstoffradikalen und antimikrobiellen Substanzen wie Cathelicidin und  $\beta$ -Defensin [19]. Virulente Mykobakterien besitzen zahlreiche Virulenzfaktoren, die das intrazelluläre Überleben ermöglichen [45, 70, 169]. Durch Aktivierung der Abl-Tyrosinkinase wird beispielsweise die Transkription der vATPase vermindert [18]. Die verringerte Ansäuerung der Lysosomen resultiert in einer geringeren Aktivierung der hydrolytischen Enzyme und einer Abnahme der antimikrobiellen Aktivität. Durch aktive Hemmung der phagolysosomal Reifung persistieren Mykobakterien intrazellulär in Makrophagen und entziehen sich so dem Zugriff von Antikörpern.

Die Mechanismen des angeborenen Immunsystems sind nicht immer ausreichend, um die Infektion mit *M. tuberculosis* erfolgreich zu bekämpfen. Um das zelluläre Immunsystem zu aktivieren, migrieren infizierte dendritische Zellen in die drainierenden hilären Lymphknoten, wo sie T-Lymphozyten mykobakterielle Antigene präsentieren [98]. Zusätzlich sezernieren Makrophagen, dendritische Zellen und aktivierte T-Zellen Chemokine, die weitere antigenpräsentierende Zellen (APZ), T-Lymphozyten und Granulozyten an den Ort der Infektion rekrutieren [145]. Die kumulierten Zellen bilden ein Granulom, wodurch die Vermehrung und Ausbreitung der Mykobakterien begrenzt wird [58]. Aufgrund der intrazellulären

Lokalisation von Mykobakterien sind Antikörper bei der Immunabwehr von *M. tuberculosis* nach derzeitigem Kenntnisstand nur von untergeordneter Bedeutung. Elementarer Bestandteil des erworbenen Immunsystems sind Zytokinproduzierende  $CD4^+$ - und zytotoxische  $CD8^+$ -T-Lymphozyten. Mykobakterielle Antigene werden von Makrophagen und dendritischen Zellen auf MHC-II-Molekülen  $CD4^+$ -T-Zellen präsentiert, welche Interleukin-2 (IL-2) und Interferon- $\gamma$  ( $IFN_\gamma$ ) sezernieren [7, 120]. Diese proinflammatorischen Zytokine aktivieren Makrophagen, natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und zytotoxische T-Zellen.  $CD8^+$ -T-Zellen werden durch Präsentation von Antigenen auf MHC-I-Molekülen aktiviert und injizieren zytotoxische Granula in infizierte Zielzellen [25]. Die darin enthaltenen Effektormoleküle Perforin und Granzym führen zur Apoptose infizierter Alveolarmakrophagen, während Granulysin die Erreger direkt abtötet [155]. Für eine erfolgreiche Immunantwort gegen *M. tuberculosis* ist ein Zusammenwirken der angeborenen und erworbenen Immunabwehr notwendig (Abb. 1).



**Abbildung 1: Immunabwehr gegen *Mycobacterium tuberculosis***

A) Mykobakterien gelangen aerogen in die Lunge, wo sie von Makrophagen und dendritischen Zellen im Rahmen der angeborenen Immunabwehr phagozytiert werden. NK-Zellen erkennen infizierte Zellen direkt und werden zusätzlich durch IL-12 von antigenpräsentierenden Zellen (APZ) aktiviert [31]. Sie sezernieren daraufhin  $IFN_\gamma$  und führen zur Lyse infizierter Zellen. Aktivierte APZ initiieren das erworbene spezifische Immunsystem, indem sie in hiläre Lymphknoten migrieren und dort T-Zellen mykobakterielle Antigene präsentieren [98]. Über MHC-I-Moleküle werden zytotoxische T-Zellen stimuliert, die daraufhin infizierte Zellen lysieren. Über MHC-II-Moleküle aktivieren APZ T-Helferzellen, die proinflammatorische Zytokine wie IL-2 und  $IFN_\gamma$  freisetzen [154]. B) Aktivierte APZ, T-Zellen und NK-Zellen umschließen Mykobakterien und infizierte Zellen. Durch Bildung eines Granuloms wird die Ausbreitung der Erreger lokal begrenzt [149].

**Abkürzungen:** APZ=antigenpräsentierende Zelle; CD=Cluster of Differentiation; CTL=zytotoxische T-Zellen; DC=dendritische Zelle;  $IFN_\gamma$ =Interferon- $\gamma$ ; IL=Interleukin; MΦ=Makrophage; MHC=Haupthistokompatibilitätskomplex; *M. tuberculosis*=*Mycobacterium tuberculosis*; NK-Zelle=natürliche Killerzelle; TZR=T-Zell-Rezeptor.

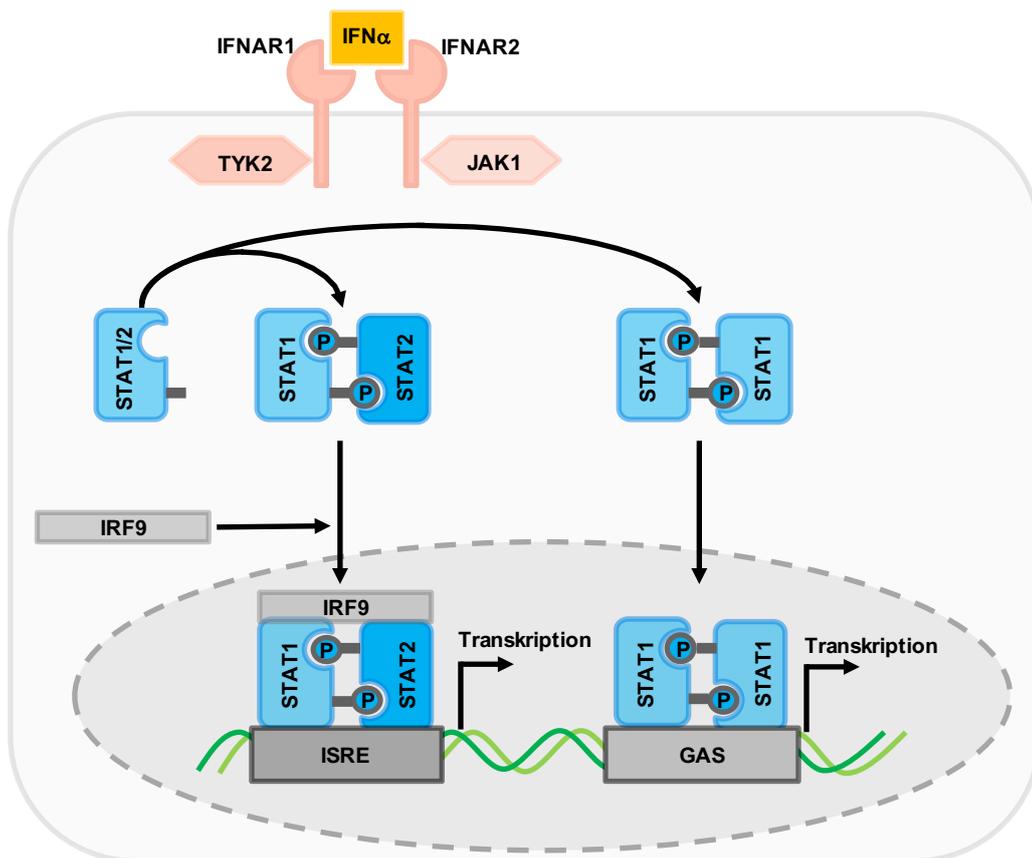
Eine Verbindung zwischen angeborener und erworbener Immunabwehr bilden NK-Zellen. Nach Stimulation mit  $\text{IFN}\alpha/\beta$  sezernieren NK-Zellen bereits in der Frühphase der Infektion  $\text{IFN}\gamma$  und  $\text{TNF}\alpha$  und lysieren infizierte Zellen [71, 89]. Während die protektiven Effekte von  $\text{IFN}\gamma$  und  $\text{TNF}\alpha$  vielfach rezipiert sind, ist der Einfluss von  $\text{IFN}\alpha/\beta$  bei der Immunabwehr gegen Tuberkulose noch ungenügend verstanden.

#### 1.4. Interferon- $\alpha/\beta$

$\text{IFN}\alpha$  und  $\text{IFN}\beta$  sind Typ-I-Interferone, die von nahezu allen Zellen gebildet werden [103]. Ihr Name leitet sich von der Fähigkeit ab, mit der Übertragung von Viren auf Zellen zu „interferieren“ [65]. Zentrale Bedeutung haben  $\text{IFN}\alpha/\beta$  bei der Abwehr von Virusinfektionen. Über den JAK-STAT Signalweg (Abb. 2) regulieren  $\text{IFN}\alpha/\beta$  Schlüsselenzyme des Immunsystems. So führt die Induktion von 2'-5'-Adenosin-Oligomeren und der Proteinkinase R (PKR) zu einer Hemmung der viralen Replikation [166]. Die Steigerung der MHC-I-Expression verbessert die Antigenpräsentation, wodurch dendritische Zellen, Makrophagen und NK-Zellen aktiviert werden.  $\text{CD8}^+$  zytotoxische Zellen lysieren schließlich die infizierten Zellen [109]. Aufgrund der antiviralen Wirkung ist rekombinant hergestelltes  $\text{IFN}\alpha$  u. a. für die Therapie der Hepatitis B und C zugelassen [79, 172].

Neben ihrer Rolle bei der Abwehr von Viren hemmen  $\text{IFN}\alpha/\beta$  durch die Induktion von Mitose-Inhibitoren und proapoptischen Proteinen auch die Proliferation von Zellen und besitzen antitumorale Aktivität [9]. Daher wird  $\text{IFN}\alpha$  erfolgreich zur Therapie von Haarzell-Leukämien [14], Multiplen Myelomen [76], Malignen Melanomen [38], Follikulären Lymphomen [131] und der Chronisch Myeloischen Leukämie (CML) eingesetzt [150].  $\beta$ -Interferone sind für die Behandlung der Multiplen Sklerose zugelassen [59]. Mittlerweile werden überwiegend pegylierte Interferone verwendet. Durch die Bindung von Polyethylenglycol an den Wirkstoff vermindert sich die renale Clearance, wodurch sich die Plasmahalbwertszeit verlängert. Zudem werden durch die Pegylierung gleichmäßigere Wirkspiegel erreicht [36]. Häufige Nebenwirkungen einer Interferon-Therapie sind psychiatrische Nebenwirkungen und grippale Symptome.

Über die Aktivierung der Janus-Tyrosinkinase (JAK) und die Phosphorylierung von STAT-Molekülen regulieren  $\text{IFN}\alpha/\beta$  zentrale Signalwege, die neben der Kontrolle von Viren und Tumorzellen auch für die Abwehr von bakteriellen Erregern, insbesondere der Tuberkulose [40], essentiell sind. Ziel dieser Doktorarbeit war es zu prüfen, welchen Einfluss  $\text{IFN}\alpha$  auf die Immunabwehr bei der Tuberkulose hat und ob die Modulation von  $\text{IFN}\alpha$ -Signalwegen eine immunmodulatorische Therapie gegen *M. tuberculosis* ermöglicht. Ein vielversprechender Kandidat einer solchen immunmodulatorischen Therapie ist der Tyrosinkinaseinhibitor (TKI) Nilotinib.



**Abbildung 2: JAK-STAT Signalweg**

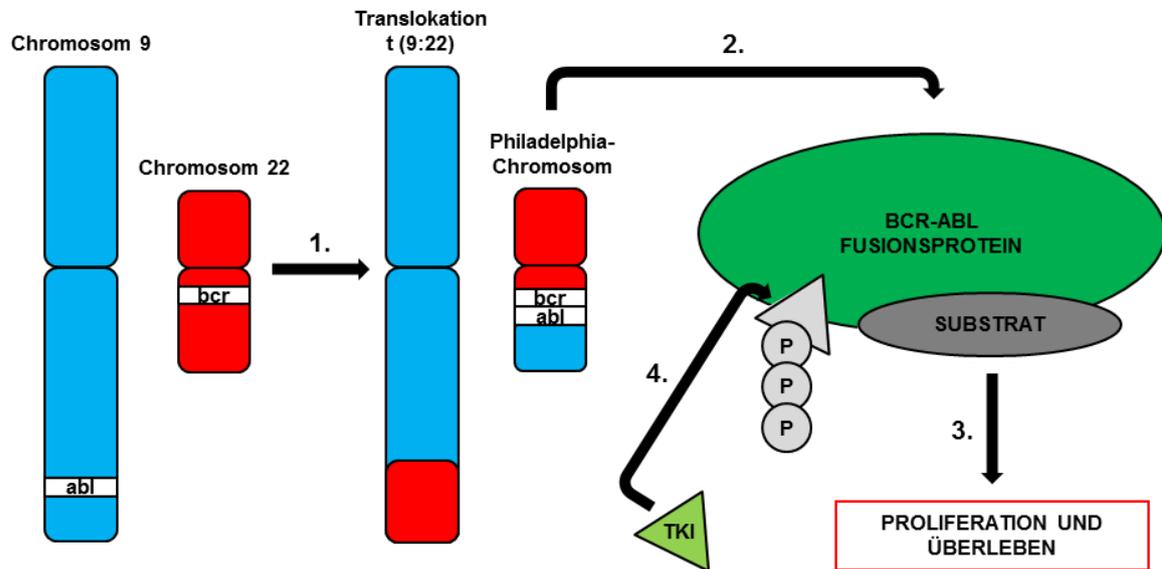
Von infizierten Wirtszellen freigesetztes  $\text{IFN}\alpha$  bindet autokrin und parakrin an den heterodimeren Interferon- $\alpha$ -Rezeptor, bestehend aus IFNAR1 und IFNAR2. An diesen Rezeptor gekoppelt sind die Janus-Tyrosinkinase und die Tyrosinkinase 2, die STAT phosphorylieren und damit aktivieren [29]. Phosphorylierte STAT1-STAT2-Heterodimere binden an IRF9 und formen den ISGF3 [67]. Der so entstandene Komplex transloziert in den Zellkern, bindet an IFN-stimulated Response Elements (ISRE) und induziert die Transkription von zahlreichen antiviralen Proteinen. STAT1-STAT1 Homodimere binden an GAS [35]. Abhängig vom Ligand, vom Rezeptor und von Cofaktoren werden zahlreiche weitere STAT-Moleküle (z. B. STAT4) phosphoryliert, wodurch andere Signalwege beeinflusst werden. **Abkürzungen:** GAS=Interferon-Gamma Activated Sequence;  $\text{IFN}\alpha$ =Interferon- $\alpha$ ;  $\text{IFN}\alpha\text{R}$ =Interferon- $\alpha$ -Rezeptor; IRF9=Interferon Regulatory Factor 9; ISGF3=IFN-stimulated Gene Factor 3; ISRE=IFN-stimulated Response Elements; JAK=Janus-Tyrosinkinase; STAT=Signal Transducers and Activators of Transcription; TYK2=Tyrosinkinase 2.

### 1.5. Nilotinib

Die Bcr-Abl-Tyrosinkinase reguliert zentrale Signalwege im gesunden Organismus wie z. B. Apoptose [171], Autophagie [46], Immunreaktionen [184] und Zellproliferation [168]. Mutation der Bcr-Abl-Tyrosinkinase führt zur Entstehung der CML. Die CML zählt zu den myeloproliferativen Neoplasien und ist durch eine Translokation zwischen den Chromosomen 9 und 22 charakterisiert (Abb. 3). Das Phenylamino-Pyrimidin-Derivat Nilotinib (AMN107) ist ein TKI, der die strukturell ähnlichen Proteinkinasen c-Abl1, c-Abl2, Arg, PDGFR und cKIT hemmt [173]. Durch selektive Bindung der TKI an die ATP-Bindungsstelle wird ATP verdrängt und die katalytische Aktivität der Abl-Tyrosinkinase inhibiert [96]. Dadurch wird das Wachstum maligner Zellen gehemmt. Imatinib war der erste zugelassene TKI [41, 119]. Basierend auf den Ergebnissen klinischer Vergleichsstudien wurden 2010 auch Nilotinib und Dasatinib zur Erstlinientherapie zugelassen [73, 146]. Durch eine selektivere Bindung an Bcr-Abl ist Nilotinib besser wirksam als Imatinib und bei den meisten Imatinib-resistenten Bcr-Abl-Mutanten wirksam. Häufige Nebenwirkungen einer Therapie mit Nilotinib sind Kopfschmerzen, Übelkeit, Exantheme, Muskelschmerzen, Müdigkeit, Hypophosphatämie und vaskuläre Erkrankungen [128, 140]. TKI gelten als erste Vertreter einer zielgerichteten Therapie („targeted therapy“). Während vor Einführung der TKI die CML eine sehr schlechte Prognose hatte, liegt die 5-Jahres-Überlebensrate heute dank der TKI bei über 90 % [68].

Arbeiten im MyTbLab haben gezeigt, dass Nilotinib durch Hemmung der Abl-Tyrosinkinase die Ansäuerung von Lysosomen verstärkt und dadurch das intrazelluläre Wachstum von *M. tuberculosis* hemmt [82]. Diese Eigenschaft macht Nilotinib zu einem Kandidaten für eine immunmodulatorische Therapie gegen Tuberkulose. Nilotinib inhibiert jedoch zentrale Effektorfunktionen des erworbenen Immunsystems durch Hemmung der Zytokinfreisetzung humaner T-Lymphozyten [82]. Studien mit CML-Patienten haben gezeigt, dass sich die biologische Wirkung von TKI durch Kombination mit IFN $\alpha$  steigern lässt [116, 130]. Es ist denkbar, dass IFN $\alpha$  den negativen Einfluss von Nilotinib auf das erworbene Immunsystem reduziert bzw. dessen antimykobakterielle Wirkung moduliert. Da die Bedeutung von IFN $\alpha$  im Rahmen bakterieller Infektion kontrovers diskutiert wird, ist das

Verständnis des Einflusses von  $\text{IFN}\alpha$  in Kombination mit Nilotinib auf die Immunabwehr gegen Tuberkulose wichtig.



**Abbildung 3: Pathophysiologie der Chronisch Myeloischen Leukämie und Wirkweise der Abl-Tyrosinkinaseinhibitoren** 1) Durch eine Translokation zwischen Chromosom 9 und Chromosom 22 gelangt das *abl*-Gen unter Kontrolle der Breakpoint Cluster Region. 2) Als Fusionsprodukt des *bcr-abl*-Gens entsteht die konstitutiv aktive BCR-ABL-Tyrosinkinase, die ATP (hellgrau dargestellt) bindet und mittels Phosphorylierung zahlreiche Signalwege reguliert. 3) Durch unkontrollierte Proliferation und verminderte Apoptose führt dies zur Entwicklung der Chronisch Myeloischen Leukämie. 4) TKI blockieren kompetitiv und hochselektiv die ATP-Bindungsstelle und führen durch die Inhibition der Phosphorylierung zu einer Inaktivierung der BCR-ABL-Tyrosinkinase und ihrer Signalwege. **Abkürzungen:** ABL=Abelson murine leukemia viral oncogene homolog; ATP=Adenosintriphosphat; BCR=Breakpoint Cluster Region; P=Phosphat; TKI=Tyrosinkinaseinhibitor.

### 1.6. Fragestellung der Arbeit

Die Tuberkulose ist weltweit die am häufigsten zum Tode führende bakterielle Infektionskrankheit. Es gibt keinen zuverlässigen Impfstoff und die Anzahl der Infektionen mit multiresistenten Stämmen nimmt weiter zu. Die Entwicklung neuer Strategien zur Therapie der Tuberkulose hat daher höchste Priorität. Neben der Entwicklung neuer Antibiotikaklassen wird intensiv nach Möglichkeiten gesucht, das Immunsystem bei der körpereigenen Immunabwehr gegen *M. tuberculosis* zu stärken [170]. Vorarbeiten in unserem Labor haben gezeigt, dass die Hemmung der Abl-Tyrosinkinase den pH-Wert in Lysosomen senkt und dadurch das intrazelluläre Wachstum von *M. tuberculosis* gehemmt wird [17, 82]. Im Gegensatz zu der Aktivierung von Makrophagen inhibieren Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI) die Zytokinfreisetzung humaner Leukozyten [72], was ihren Einsatz als immunmodulatorische Therapie möglicherweise limitiert. Studien bei Patienten mit Chronisch Myeloischer Leukämie haben gezeigt, dass die biologische Wirksamkeit von TKI durch den Immunmodulator IFN $\alpha$  verstärkt wird [130, 151]. Ziel dieser Doktorarbeit war zu untersuchen, welchen Einfluss IFN $\alpha$  auf die Immunabwehr bei der Tuberkulose hat. Insbesondere sollte geklärt werden, ob IFN $\alpha$  die negativen Effekte der TKI auf die Lymphozytenfunktion kompensiert und als Kombinationspartner eine immunmodulatorische Therapie der Tuberkulose ermöglicht.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Material und Reagenzien**

#### **2.1.1. Arbeitsgeräte und Arbeitsmaterialien**

a) Arbeitsgeräte:

- ELISA-Reader, ASYS
- FACSCalibur, BD Biosciences
- FACSCanto II, BD Biosciences
- Fluoreszenzmikroskop Axioskop-2, Zeiss
- Geldokumentationsanlage, Biometra
- Gelelektrophoresekammer Horizon 11.14, Biometra
- Herasafe HSP 12-Werkbank, Heraeus
- Inkubator 6000, Heraeus
- Lichtmikroskop 40CFL, Zeiss
- Lichtmikroskop CH-2, Olympus
- LightCycler Nano, Roche
- Thermocycler Professional, Biometra
- Neubauer-Zählkammer, Marienfeld
- Wasserbad, Köttermann
- Zentrifuge 5417R, Eppendorf
- Zentrifuge 5810R, Eppendorf

b) Arbeitsmaterialien:

- 7H11-Agarplatten, Middlebrook
- Einfrierröhrchen, Greiner Bio One
- ELISA-Platten 96 Well, Nunc
- FACS-Röhrchen, Corning
- Filter zum Sterilfiltrieren, PALL
- Impfösen, Sarstedt
- Latexeinmalhandschuhe, Sempercare
- LightCycler Kapillaren 20 µl, Roche
- Mikroskopiekulturplatten 8-chamber-slide, Thermo Fisher

- Pipettenspitzen 0,5 - 10 µl, Brand
- Pipettenspitzen 10 - 100 µl, Roth
- Pipettenspitzen 100 - 1000 µl, Sarstedt
- Röhrchen (0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml), Eppendorf
- Serologische Kunststoffpipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml), Corning
- Zellkulturflaschen 50 ml, Falcon Corning
- Zellkulturplatten 24 Well, Falcon Corning
- Zellkulturplatten 96 Well, ThermoScientific
- Zentrifugenröhrchen (15 ml; 50 ml), Corning
- Zytospin-Objektträger, VWR

### **2.1.2. Chemikalien und Reagenzien**

- Amphotericin B, Sigma
- Ampuwa (destilliertes Wasser), Fresenius Kabi
- Annexin-V-FITC Apoptosis Detection Kit, responsif
- Aquatex, Merck
- Biotinylierte Peroxidase, Thermo Fisher
- Brefeldin A, Sigma
- Bromphenolblau, Sigma
- BSA, Sigma
- Buffy Coats, DRK Blutspendedienst BW-Hessen
- Concanavalin A (ConA), Sigma
- Dimethylsulfoxid (DMSO), Sigma
- dNTPs, Roche
- Ethanol, VWR
- Ethylendiamintetraacetat, Sigma
- Ficoll-Paque-Plus, GE Healthcare
- Fötale Kälberserum, Biochrom
- Glycerol, Sigma
- Schwefelsäure (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), Roth
- HEPES, Biochrom
- Humanserum AB, Sigma
- Imatinib, Novartis

- Isopropanol, Apotheke Uniklinik Ulm
- L-Glutamin, PAA
- LightCycler FastStart DNA Master Sybr Green I, Roche
- Lipopolysaccharid (LPS), Sigma
- LysoSensor Green DND-189, Thermo Fisher
- 2-Mercaptoethanol, Sigma
- Methanol, Roth
- Natriumazid, Roth
- Natriumhydrogencarbonat, Roth
- Nilotinib, Novartis
- Oligo(dT)18 mRNA Primer, New England Biolabs
- Paraformaldehyd, Sigma
- PBS, Gibco
- Penicillin, Biochrom
- Perm/Wash Puffer, BD Biosciences
- 5x Reaktionpuffer, Thermo Fisher
- RevertAid H-Minus Reverse Transcriptase, Thermo Fisher
- RNAase-freies Wasser, Roche
- RNeasy Mini Kit, Qiagen
- RPMI 1640, Gibco
- Saponin, Sigma
- Staurosporin, Sigma
- Streptavidin, Thermo Fisher
- Streptomycin, Sigma
- TMB Substrate Solution, ThermoScientific
- Trizma, Sigma
- Trypanblau, Biochrom AG
- Tween 20, Sigma

### 2.1.3. Medien und Puffer

#### a) Durchflusszytometrie:

- FACS-Puffer: Phosphatpuffer (PBS), 0,1 % Natriumazid, 1 % fötales Kälberserum (FCS)
- Permeabilisierungspuffer: 1 x Perm/Wash in PBS
- Fixierung: 4 % Paraformaldehyd in PBS

#### b) ELISA:

- Assay-Puffer: 2 % BSA (bovines Serumalbumin) in PBS
- Coating-Puffer: PBS
- Stopplösung: 0,18 M Schwefelsäure (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) in Aqua dest.
- Waschpuffer: PBS, 0,1 % BSA, 0,2 % Tween 20, 50 mM Trizma

#### c) Zellkultur:

- Zellkulturmedium: RPMI, 10 mM HEPES, 2 mM L-Glutamin, 5 % hitzeinaktiviertes Humanserum (30 min bei 56°C), 60 µg/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin
- BAL-Medium (Medium für die Experimente mit *M. tuberculosis*): RPMI, 10 mM HEPES, 2 mM L-Glutamin, 5 % nicht hitzeinaktiviertes Humanserum, 13 mM Natriumhydrogencarbonat, 60 µg/ml Penicillin G, 5,6 µg/ml Amphotericin B
- Waschmedium: PBS, 20 % Vollmedium, 2 % FCS

### 2.1.4. Zytokine, Bakterien, Antikörper und Primer

#### a) Zytokine und Bakterien:

- rhu GM-CSF, Miltenyi Biotec
- rhu IFN<sub>γ</sub>, R&D Systems
- *M. tuberculosis* (H37Rv), Institut für Med. Mikrobiologie und Hygiene Ulm
- (peg-)IFN<sub>α</sub>-2a (Pegasys), Roche

b) Antikörper – Durchflusszytometrie:

- anti-CD3-FITC, Biolegend
- anti-CD3-APC, Miltenyi Biotec
- anti-CD4-PB, Biolegend
- anti-CD8-PerCP, BD Bioscience
- anti-CD56-PECy7, BD Bioscience
- anti-CD107a-FITC, BD Bioscience
- anti-human-IFN $\alpha$ -FITC, PBL assay science
- anti-human-IFN $\gamma$ R1-PE, Miltenyi Biotec
- Maus IgG1-FITC, Caltag (Invitrogen)
- Maus IgG1-PE, Miltenyi Biotec
- Maus IgG1-PECy7, BD Bioscience
- Maus IgG1-PerCP, BD Bioscience
- Maus IgG2a-APC, Caltag (Invitrogen)
- Maus IgG2a-FITC, Biolegend
- Maus IgG2a-PerCP, BD Bioscience
- Maus IgG2b-PB, Biozol
- Annexin-V-FITC, BD Bioscience
- Propidiumiodid-PE, BD Bioscience

b) Antikörper – ELISA:

- anti-human-IFN $\gamma$ , ThermoScientific
- anti-human-IFN $\gamma$  biotinyliert, ThermoScientific
- anti-human-IFN $\gamma$  Coating-Antikörper, ThermoScientific
- anti-human-TNF $\alpha$ , ThermoScientific
- anti-human-TNF $\alpha$  biotinyliert, ThermoScientific
- anti-human-TNF $\alpha$  Coating-Antikörper, ThermoScientific

c) Primer:

Alle verwendeten Primer wurden von der Firma biomers.net in Ulm hergestellt.

- **$\beta$ -Aktin-Primer:**

forward: 5'-GGCCACGGCTGCTTC-3'

reverse: 5'-GTTGGCGTACAGGTCTTTGC-3'

- **IFN $\alpha$ R1-Primer:**

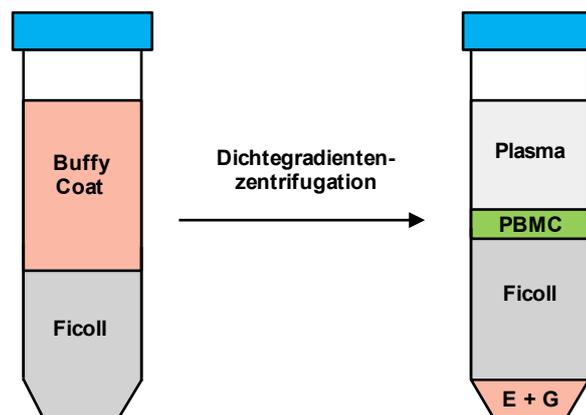
forward: 5'-AGTGTTATGTGGGCTTTGGATGGTTTAAGC-3'

reverse: 5'-TCTGGCTTTCACACAATATACAGTCAGTTG-3'

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Isolierung von peripheren mononukleären Zellen

Humane Lymphozyten wurden aus anonymisierten Buffy Coats von der Blutbank am Universitätsklinikum Ulm isoliert. Die Aufreinigung der peripheren mononukleären Zellen (PBMC) aus den Buffy Coats erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation (Abb. 4). Auf Ficoll wurde mit Antikoagulantien versetztes Blut pipettiert und bei 1600 Umdrehungen pro Minute (rpm) für 30 min bei ausgeschalteter Bremse zentrifugiert. Interphase und Plasma wurden zusammen abgenommen und in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt. Weitere Zentrifugationsschritte mit Waschmedium bei 1800 rpm, 1300 rpm, 1000 rpm für je 10 min und 800 rpm für 8 min dienten der Entfernung von Thrombozyten und restlichem Ficoll. Die noch im Zellpellet enthaltenen Erythrozyten wurden durch Resuspendieren in 1 ml destilliertem Wasser vollständig lysiert. Abschließend wurde erneut bei 800 rpm für 10 min gewaschen, die isolierten PBMC in einer Neubauer-Zählkammer gezählt, in Kompletmedium resuspendiert und auf eine Konzentration von  $100 \times 10^6$  PBMC/ml eingestellt.

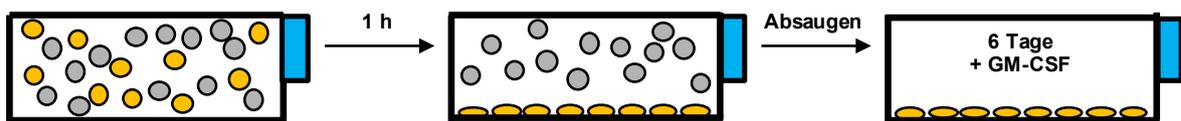


**Abbildung 4: Vergleich zweier Zentrifugenröhrchen vor und nach dem ersten Zentrifugationsschritt**

Durch Zentrifugation bei 1600 rpm für 30 min werden die unterschiedlichen Blutbestandteile entsprechend ihrer Dichte aufgetrennt. Ficoll hat eine definierte Dichte von 1,077 g/ml und bewirkt u. a. eine Aggregation der Erythrozyten. Granulozyten (G) und die aggregierten Erythrozyten (E) besitzen eine höhere Dichte als Ficoll und setzen sich am Boden des Zentrifugenröhrchens ab. Die weniger dichten PBMC und Thrombozyten befinden sich nach der Zentrifugation zwischen Plasma und Ficoll in der sogenannten Interphase (grün dargestellt). PBMC können so von den übrigen Bestandteilen isoliert und weiter aufgereinigt werden. **Abkürzungen:** E=Erythrozyten; G=Granulozyten; PBMC=periphere mononukleäre Zellen; rpm=Umdrehungen pro Minute.

### 2.2.2. Generierung von Makrophagen

Im Gegensatz zu Lymphozyten, Granulozyten und NK-Zellen adhären Monozyten an Plastikoberflächen. Diese Eigenschaft macht man sich bei der Generierung von Makrophagen zu Nutze (Abb. 5).  $80 \times 10^6$  frisch isolierte PBMC wurden in 6 ml Zellkulturmedium in einer Kulturflasche ausgesät und für 60 min bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Durch leichtes Klopfen und einmaliges Spülen mit PBS wurden nichtadhärente Zellen entfernt. Die adhärenen Monozyten wurden anschließend bei  $37^\circ\text{C}$  für 6 Tage mit 10 ng/ml Granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) stimuliert, um eine Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen zu erreichen. Das Ernten der Zellen erfolgte durch Inkubation mit PBS + 1 mM Ethylendiamintetraacetat (EDTA) für 20 min bei Raumtemperatur. EDTA komplexiert  $\text{Ca}^{2+}$ , wodurch Makrophagen ihre Adhärenz verlieren und durch kräftiges Klopfen von der Plastikoberfläche gelöst werden können. Abschließend wurden die Makrophagen in einer Neubauer-Zählkammer gezählt, in Zellmedium (CM) resuspendiert und auf eine Konzentration von  $10 \times 10^6$  /ml eingestellt.



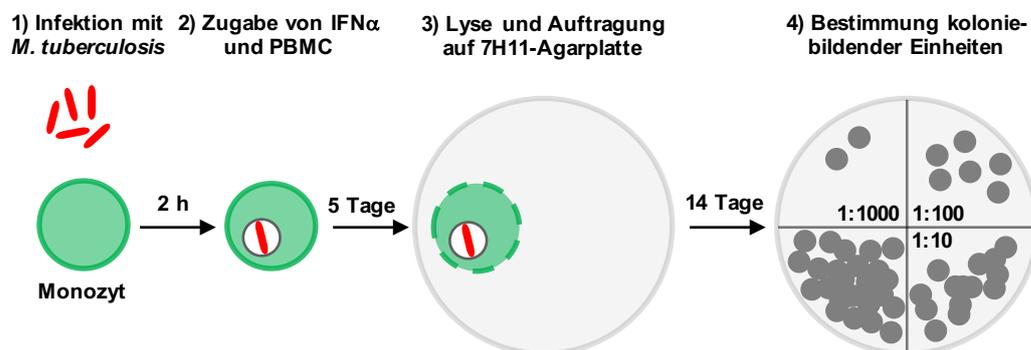
**Abbildung 5: Generierung von Makrophagen**

Durch ihre Adhärenz an Plastikoberflächen lassen sich Monozyten (gelb) unkompliziert von den nichtadhärenen PBMC (grau) isolieren. **Abkürzungen:** GM-CSF=Granulocyte macrophage colony stimulating factor; PBMC=periphere mononukleäre Zellen.

### 2.2.3. Infektion von Monozyten mit *Mycobacterium tuberculosis*

*M. tuberculosis* (virulenter Stamm H37Rv) wurde in einer Suspension aus Middlebrook 7H9-Medium kultiviert. Alle Experimente mit *M. tuberculosis* wurden in einem Labor der biologischen Sicherheitsstufe 3 durchgeführt.

$2 \times 10^6$  PBMC pro Well wurden in einer 24-Well-Platte für 60 min in BAL-Medium inkubiert. Nichtadhärente Zellen im Überstand wurden abgenommen und asserviert. Die Zahl der adhärennten Monozyten wurde basierend auf ihrem prozentualen Anteil an den PBMC von 10 % auf  $2 \times 10^5$  geschätzt. Das Prinzip der Infektion von Monozyten mit *M. tuberculosis* veranschaulicht Abbildung 6. Vor Infektion wurden die Bakterien im Ultraschall-Wasserbad bei 37°C für 10 min beschallt, was eine Verklumpung der Mykobakterien verhinderte.  $2 \times 10^5$  Monozyten wurden für 2 h mit  $1 \times 10^6$  *M. tuberculosis* pro Well infiziert. Dies entspricht einer MOI (Multiplizität der Infektion) von 5. Nach Abwaschen extrazellulärer Mykobakterien mittels PBS wurden  $2 \times 10^6$  der autologen, nichtadhärennten PBMC dazugegeben (Verhältnis 1:10) und mit 100 ng/ml IFN $\alpha$  inkubiert. Nach fünf Tagen wurden die Zellen mit 0,3 % Saponin lysiert und auf 7H11-Agarplatten aufgetragen. Nach 14 Tagen wurde das intrazelluläre Wachstum von *M. tuberculosis* durch Zählen der koloniebildenden Einheiten (KBE) quantifiziert.



**Abbildung 6: Infektion von Monozyten mit *Mycobacterium tuberculosis***

1) Monozyten (grün dargestellt) wurden für 2 h mit *Mycobacterium tuberculosis* (rot dargestellt) infiziert. 2) Nach Zugabe der nichtadhärennten PBMC wurde für 5 Tage mit 100 ng/ml IFN $\alpha$  inkubiert. 3) Anschließend wurden die Zellen lysiert und auf 7H11-Agarplatten (grau dargestellt) ausplattiert. 4) Um einzeln stehende Kolonien zu erhalten wurden die Lysate zusätzlich 1:10, 1:100 und 1:1000 verdünnt aufgetragen. Nach 14 Tagen wurden die koloniebildenden Einheiten gezählt.

**Abkürzungen:** IFN $\alpha$ =Interferon- $\alpha$ ; *M.tb*=*Mycobacterium tuberculosis*; PBMC=periphere mononukleäre Zellen.

#### **2.2.4. Herstellung von löslichem Extrakt aus *Mycobacterium tuberculosis***

Zur antigenspezifischen Stimulation von PBMC wurde *Mycobacterium tuberculosis*-Extrakt (*M.tb*-Extrakt) verwendet. *M.tb*-Extrakt besteht aus den löslichen Bestandteilen von *M. tuberculosis* und ist reich an Lipiden und Proteinen. *M.tb*-Extrakt wurde mittels Ultraschall-Lyse und Zentrifugation aus Mykobakterien „extrahiert“. 1 g radioaktiv abgetöteter Mykobakterien (H37Rv) wurden in einem 15-ml-Zentrifugenröhrchen zweimal mit 10 ml PBS bei 3500 rpm für 10 min zentrifugiert. Die Pellets wurden in 6 ml PBS resuspendiert und auf zwei 15-ml-Zentrifugenröhrchen aufgeteilt. Um die Mykobakterien zu lysieren, wurden beide Röhrchen mittels einer Ultraschallsonde für 3 min beschallt, wobei lösliche mykobakterielle Bestandteile freigesetzt wurden. Anschließend wurde bei 3500 rpm für 10 min zentrifugiert und die Überstände aus den beiden Röhrchen gepoolt. Die Pellets wurden in 3 ml PBS resuspendiert und erneut beschallt. Das zweite Sonikat wurde ohne Zentrifugation zu dem zuvor asservierten Überstand gegeben. Nach abschließender Zentrifugation bei 40.000 rpm für 60 min wurde das Pellet mit allen partikulären Zellbestandteilen verworfen. Der Überstand wurde sterilfiltriert und die Menge der extrahierten löslichen Bestandteile von *M. tuberculosis* mittels Protein-Assay quantifiziert.

### 2.2.5. Stimulation von Zellen und Einteilung der Spender in Kohorten

In einer 24-Well-Platte wurden  $1 \times 10^6$  PBMC pro Well in 300  $\mu$ l CM ausgesät und über Nacht inkubiert (Tabelle 1). Wenn nicht explizit erwähnt, wurde mit der therapeutischen Dosis (\*) von Nilotinib inkubiert. Für IFN $\alpha$  und *M.tb*-Extrakt wurden Standardkonzentrationen von 100 ng/ml bzw. 5  $\mu$ g/ml verwendet. Durch Stimulation der PBMC mit *M.tb*-Extrakt und Messung der IFN $\gamma$ -Freisetzung mittels ELISA wurden die Spender in eine negative Kohorte und in eine *M.tb*-Extrakt-positive Kohorte eingeteilt. Der Grenzwert für *M.tb*-Extrakt-positive Spender entsprach dem Dreifachen der IFN $\gamma$ -Konzentration in der Mediumkontrolle. Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich *M.tb*-Extrakt-positive Spender eingesetzt, da nur sie Aussagen über antigenspezifische T-Zellfunktionen ermöglichen.

Tabelle 1: Reagenzien zur Stimulation von peripheren mononukleären Zellen (PBMC)

Reagenz	Konzentration
ConcanavalinA	5 $\mu$ g/ml
GM-CSF	10 ng/ml
Interferon- $\alpha$ (Pegasys®)	10 ng/ml; 100 ng/ml; 1000 ng/ml
Interferon- $\gamma$	0,5 $\mu$ g/ml
Lipopolysaccharid	10 ng/ml
<i>M.tb</i> -Extrakt	5 $\mu$ g/ml
Nilotinib (Tasigna®)	0,25 $\mu$ g/ml; 2,5 $\mu$ g/ml*; 25 $\mu$ g/ml

**Abkürzungen:** GM-CSF=Granulocyte macrophage colony stimulating factor; *M.tb*=*Mycobacterium tuberculosis*.

### 2.2.6. Durchflusszytometrie

Im Durchflusszytometer werden Zellen einzeln in einen Mikrokanal gesaugt, wo sie von einem Laser bestrahlt werden. Jede Zelle bricht aufgrund ihrer Größe und Granularität das Licht auf charakteristische Weise. Anhand des vorwärts (FSC = forward scatter) und seitwärts (SSC = sideward scatter) gebrochenen Anteils des Lichts lassen sich die unterschiedlichen Zellpopulationen identifizieren. Fluorescence-activated Cell Sorting (FACS) stellt eine Form der Durchflusszytometrie dar, bei der, basierend auf der Fluoreszenz bestimmter Farbstoffe, Zellen noch genauer charakterisiert werden können. Spezifische Zellbestandteile werden mittels fluorochromgebundener Antikörpern markiert. Das FACS-Gerät besitzt unterschiedliche Laser mit definierter Wellenlänge. Trifft Licht auf das Fluorochrom, dessen Wellenlänge innerhalb des spezifischen Anregungsspektrums liegt, emittiert der Farbstoff seinerseits Licht charakteristischer Wellenlänge. Durch geeignete Filter gelangt das Licht auf einen für das Fluorochrom spezifischen Detektor und wird schließlich mittels Photomultiplier in ein elektrisches Signal umgewandelt. Bei geeigneter Zusammenstellung der Fluorochrome ermöglicht das gemessene Signal im jeweiligen Detektor eine Charakterisierung der Zellen gemäß der Expression der farbstoffmarkierten Zellbestandteile. Als Kontrolle für unspezifische Bindungen wurden Antikörper desselben Isotyps und derselben Farbstoffkonjugation verwendet.

Die Durchflusszytometrie wurde zur Beantwortung folgender Fragestellungen verwendet:

- a) Phänotypische Charakterisierung humaner PBMC mittels Färbung von Proteinen auf der Zelloberfläche
- b) Identifikation IFN $\gamma$ -produzierender Zellen mittels intrazellulärer IFN $\gamma$ -Färbung
- c) Detektion apoptotischer Zellen mittels Annexin-V-Färbung
- d) Detektion zytotoxischer Zellen mittels CD107a-Färbung

**a) Oberflächenfärbung**

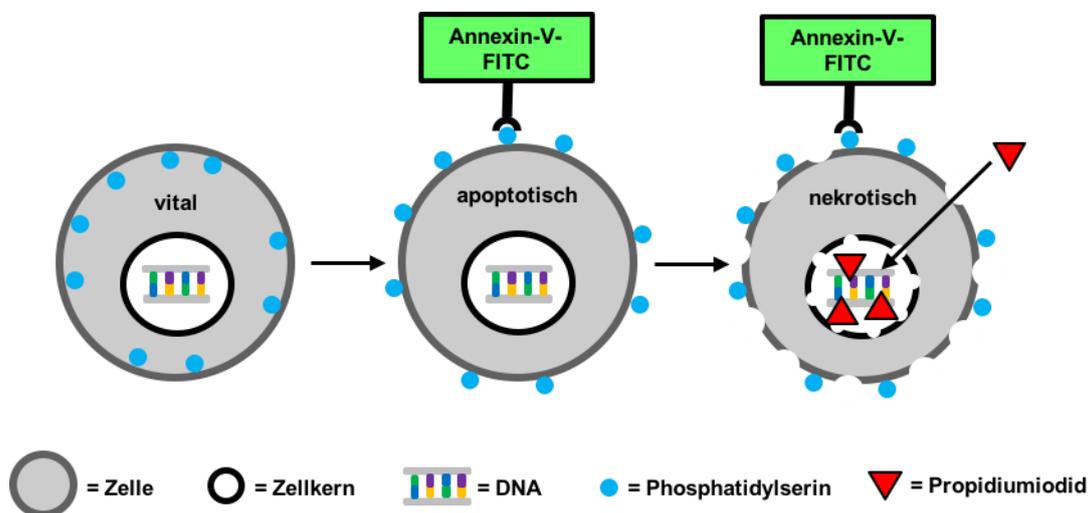
Frisch isolierte PBMC wurden mit FACS-Puffer bei 1300 rpm für 10 min gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit fluorochrommarkierten Antikörpern für 30 min bei 4°C. Abschließend wurden die Zellen erneut mit FACS-Puffer gewaschen und sofort am Durchflusszytometer aufgenommen.

**b) Intrazelluläre IFN $\gamma$ -Färbung**

Zur Charakterisierung der IFN $\gamma$ -produzierenden Zellen wurde eine intrazelluläre IFN $\gamma$ -Färbung durchgeführt.  $1 \times 10^6$  PBMC wurden über Nacht in einer 24-Well-Platte bei 37°C stimuliert. Am nächsten Tag wurden die Zellen für 4 h mit 10  $\mu$ g/ml Brefeldin A inkubiert. Brefeldin A ist ein Lakton-Antibiotikum, das den Transport zwischen endoplasmatischem Retikulum und Golgi-Apparat hemmt [105]. Dadurch wird sowohl die Reinternalisierung von Membranproteinen als auch die Sekretion von Proteinen verhindert. In der Folge akkumulieren Zytokine in der Zelle und können im Durchflusszytometer nachgewiesen werden. Die Zellen wurden anschließend geerntet und mit FACS-Puffer bei 1300 rpm für 10 min zentrifugiert. Damit der anti-IFN $\gamma$ -Antikörper die Zellmembran passiert, wurden die Zellen mit 2 ml Permash bei 1300 rpm für 10 min gewaschen. Danach wurde der anti-IFN $\gamma$ -Antikörper für 30 min bei 4°C hinzugegeben. Nach erneutem Waschen mit 2 ml Permash und 2 ml FACS-Puffer bei je 1300 rpm für 10 min wurden die Zellen sofort am Durchflusszytometer aufgenommen. Wurde zusätzlich eine Oberflächenfärbung durchgeführt, erfolgte nach dem ersten Zentrifugationsschritt mit FACS-Puffer die Zugabe von Oberflächenantikörpern für 30 min bei 4°C. Zur Fixierung der Zellen wurde nach erneutem Waschen mit 2 ml FACS-Puffer (1300 rpm; 10 min) 250  $\mu$ l 4 % Paraformaldehyd für 20 min im Dunkeln bei 4°C zugegeben. Nach nochmaligem Waschen mit FACS-Puffer wurde die intrazelluläre Färbung wie oben beschrieben durchgeführt.

### c) Detektion apoptotischer Zellen

Zum Nachweis apoptotischer Zellen wurde die Annexin-V-Färbung durchgeführt (Abb. 7).  $1 \times 10^6$  PBMC wurden über Nacht in einer 24-Well-Platte bei  $37^\circ\text{C}$  mit den jeweiligen Reagenzien inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit PBS + 1 mM EDTA gerntet, zweimal mit kaltem PBS bei 1300 rpm für 10 min zentrifugiert und in 1 x Annexin-V binding buffer auf eine Konzentration von  $1 \times 10^6$  PBMC/ml eingestellt. 100  $\mu\text{l}$  davon wurden in ein FACS-Röhrchen überführt und mit 1  $\mu\text{l}$  Annexin-V-FITC und 5  $\mu\text{l}$  Propidiumiodid-Färbelösung 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Abschließend wurden 400  $\mu\text{l}$  1 x binding buffer hinzugefügt und die Zellen sofort am FACS aufgenommen. Als Positivkontrolle für apoptotische Zellen wurde der Proteinkinaseinhibitor Staurosporin eingesetzt [57].



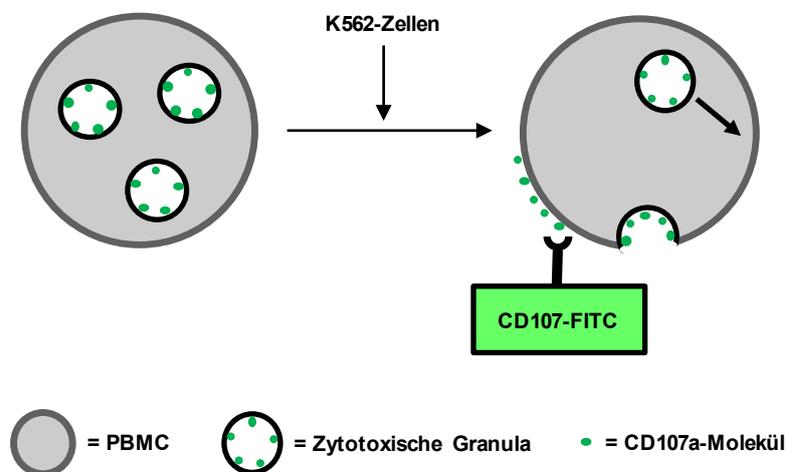
**Abbildung 7: Prinzip der Annexin-V-Färbung**

Wird eine Zelle apoptotisch, durchläuft sie definierte morphologische Veränderungen [75]. So kommt es z. B. zur Externalisierung von Phosphatidylserin, welches in vitalen Zellen nur in der intrazellulären Membran lokalisiert ist. Annexin-V bindet an Phosphatidylserin und durch Konjugation mit dem Farbstoff FITC lassen sich so apoptotische Zellen nachweisen [80]. Um zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen zu unterscheiden, wurden die Zellen zusätzlich mit PI gefärbt. Nur wenn eine Zelle nekrotisch ist, gelangt PI in das Zellinnere, wo es in die DNA interkaliert und so tote Zellen anfärbt [115]. Zellen, die weder Annexin-V-positiv noch PI-positiv waren, wurden als vital definiert.

**Abkürzungen:** DNA=Desoxyribonukleinsäure; FITC=Fluoresceinisothiocyanat; PI=Propidiumiodid.

### d) CD107-Degranulationsassay

Die zytotoxische Aktivität von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen und NK-Zellen korreliert mit der Expression von CD107a [11, 124] (Abb. 8). Für die Analyse der CD107a-Expression wurden  $1 \times 10^5$  PBMC in 200  $\mu$ l Endvolumen in einer 96-Well-Flachbodenplatte ausgesät und über Nacht bei 37°C mit verschiedenen Reagenzien inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Zugabe von  $2 \times 10^5$  K562-Zellen zusammen mit 2  $\mu$ l anti-CD107a-FITC-Antikörper bzw. 2  $\mu$ l anti-IgG1-FITC-Antikörper zur Kontrolle. Nach 1 h wurde Brefeldin A (10  $\mu$ g/ml) hinzugegeben, da es neben der Sekretion auch die Wiederaufnahme von Molekülen hemmt und damit die Internalisierung von CD107a verhindert. Nach einer Inkubationszeit von 4 h wurden die Zellen geerntet, in FACS-Röhrchen überführt, mit 2 ml FACS-Puffer gewaschen (1300 rpm; 10 min) und am Durchflusszytometer analysiert.

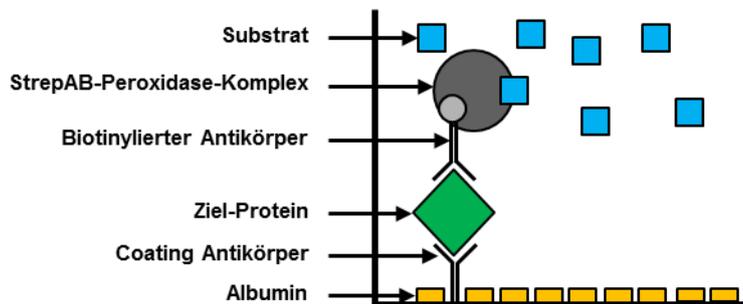


**Abbildung 8: Prinzip des CD107a-Degranulationsassays**

CD107a ist ein Molekül, das in der luminalen Seite von zytotoxischen Granula lokalisiert ist [53]. Bei der Degranulation wird der Inhalt der Granula entleert und CD107a auf der Zelloberfläche exprimiert. Da in unstimulierten Zellen die Expression von CD107a gering ist, wurden die PBMC durch Kontakt mit K562-Zellen aktiviert. K562-Zellen sind MHC-Klasse-I negativ [78]. Durch das Fehlen dieses zentralen inhibitorischen Signals lysieren NK-Zellen die K562-Zellen [81]. In Vorexperimenten wurde das optimale Verhältnis von PBMC zu K562-Zellen von 1:2 bestimmt (Daten nicht gezeigt). Die Messung der Expression von CD107a erfolgte mittels Durchflusszytometrie. **Abkürzungen:** CD=Cluster of Differentiation; FITC=Fluoresceinisothiocyanat; PBMC=periphere mononukleäre Zellen.

### 2.2.7. Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) ist ein Verfahren zum quantitativen Nachweis von Substanzen in einer Probe (Abb. 9). Der ELISA wurde zum Nachweis von  $\text{IFN}\gamma$  und  $\text{TNF}\alpha$  im Überstand stimulierter PBMC eingesetzt. Die Sensitivität war bei allen ELISAs  $\leq 125$  pg/ml.



**Abbildung 9: Prinzip des Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA)**

Eine 96-Well-Mikrotiterplatte wird zuerst mit einem Erstantikörper (Coating Antikörper) beschichtet, der unspezifisch an die Oberfläche bindet. Weitere unspezifische Bindungsstellen werden mittels Albumin blockiert. Nach Zugabe der Probe kommt es zur spezifischen Bindung der Zielproteine an den Erstantikörper, wohingegen die anderen in der Probe enthaltenen Moleküle ungebunden bleiben. Der Zweitantikörper (biotinylierter Antikörper) bindet ebenfalls spezifisch an das Zielprotein. Von dem so entstehenden Komplex aus Erstantikörper, Zielprotein und Zweitantikörper leitet sich der Name Sandwich-ELISA ab. Die gebundene Menge an Zielprotein wird mittels einer enzymatischen Reaktion sichtbar gemacht, bei der die Biotin-Peroxidase das Substrat zu einem blauen Farbstoff umbaut. Diese chemische Reaktion kann durch eine schwefelsäurehaltige Stopplösung beendet werden, wodurch es zu einem Farbumschlag von blau nach gelb kommt.

### 2.2.8. Messung der Ansäuerung von Lysosomen

Zur Messung der Ansäuerung von Lysosomen in Makrophagen wurde der membrangängige Farbstoff LysoSensor Green DND-189 ( $pK_a \sim 5,2$ ) verwendet. LysoSensor eignet sich zur qualitativen und semiquantitativen Bestimmung des pH-Wertes von sauren Kompartimenten, da er in saurem Milieu akkumuliert. Zusätzlich resultiert bei niedrigem pH-Wert aus der Protonierung einer basischen Seitenkette die Aufhebung der Fluoreszenzlöschung, wodurch es zu einer Zunahme der Fluoreszenzintensität kommt.

Für Aufnahmen am Durchflusszytometer wurden  $10^6$  Makrophagen pro Well in einem Endvolumen von 300  $\mu$ l in einer 24-Well-Platte ausgesät und mit TKI bzw.  $IFN\alpha$  über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden mittels PBS + 1 mM EDTA für 20 min bei Raumtemperatur geerntet und in FACS-Röhrchen überführt. Nach Zentrifugation mit 2 ml FACS-Puffer (1300 rpm; 10 min) wurden die Makrophagen mit 0,1  $\mu$ l LysoSensor Green DND-189 bei 37°C für 10 min angefärbt. Anschließend wurde erneut mit 2 ml FACS-Puffer gewaschen (1300 rpm; 10 min) und die Zellen am Durchflusszytometer aufgenommen. Das Gate für LysoSensor-positive Zellen wurde so gewählt, dass der Anteil LysoSensor-positiver Zellen in der Mediumkontrolle durchschnittlich unter 1 % lag. Dieses methodische Vorgehen erklärt die unterschiedlichen prozentualen Anteile LysoSensor-positiver Zellen bei der Durchflusszytometrie verglichen mit der Fluoreszenzmikroskopie. Für die Arbeiten am Fluoreszenzmikroskop wurden  $7 \times 10^4$  Makrophagen pro Well in einem 8-Chamber-Slide über Nacht mit Nilotinib oder  $IFN\alpha$  stimuliert. Nach Fixierung der Zellen mit 4 % Paraformaldehyd für 10 min bei 0°C und einmaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit 1  $\mu$ l LysoSensor Green DND-189 und dem Kernfarbstoff Hoechst 33258 (1  $\mu$ g/ml) für 2 h bei 37°C angefärbt. Abschließend wurde zur Entfernung ungebundenen Farbstoffes zweimal mit PBS gewaschen und die Präparate mit Eindeckelmedium und Deckglas versehen. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop, indem die Anzahl der LysoSensor-positiven und LysoSensor-negativen Zellen gezählt wurde. Für die abgebildeten Fluoreszenzaufnahmen wurden die Makrophagen nach obigem Protokoll in FACS-Röhrchen behandelt und abschließend mittels einer Zytospin-Zentrifuge auf Objektträger geschleudert.

### 2.2.9. Molekularbiologische Methoden

Mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) wurde der Einfluss von IFN $\gamma$  und *M.tb*-Extrakt auf die Expression der IFN $\alpha$ R1-mRNA in humanen PBMC untersucht.

#### RNA-Isolierung

Für die Bestimmung der IFN $\alpha$ R1-mRNA-Expression wurden je  $2 \times 10^6$  PBMC in einer 24-Well-Platte mit 0,5  $\mu$ g/ml IFN $\gamma$  bzw. 5  $\mu$ g/ml *M.tb*-Extrakt für 2, 4 und 8 h stimuliert. Als Kontrolle dienten unstimulierte PBMC. Nach Ende der Inkubation wurden die Zellen mittels 1 ml PBS + 1 mM EDTA für 10 min bei 37°C geerntet und in ein 1,5-ml-Röhrchen überführt. Die RNA-Isolierung erfolgte mittels des RNeasy Kits von Qiagen. Nach Zentrifugation bei 14000 rpm für 10 min wurde das Zellpellet in 350  $\mu$ l RLT Puffer + 1 % Mercaptoethanol resuspendiert und 350  $\mu$ l 70 % Ethanol dazugegeben. Die initial zähflüssige Emulsion wurde durch Pipettieren ausgiebig gemischt, 700  $\mu$ l davon in eine Säule aus dem Kit überführt und bei 14000 rpm für 15 s zentrifugiert. Danach wurde die Säule einmal mit 700  $\mu$ l RWI Puffer (14000 rpm, 15 s) und zweimal mit je 500  $\mu$ l RPE Puffer (14000 rpm, 15 s bzw. 2 min) gewaschen. Der Durchfluss wurde nach den einzelnen Waschschrinen jeweils verworfen. Abschließend wurde in jedes Röhrchen für 5 min 20  $\mu$ l RNAase-freies Wasser gegeben und durch Zentrifugation bei 14000 rpm für 2 min eluiert. Bis zur weiteren Verarbeitung wurde die isolierte Ribonukleinsäure (RNA) bei -80°C gelagert.

#### Reverse Transkription (RT)

Das Umschreiben der mRNA in komplementäre DNA (cDNA) erfolgte mittels Revert Aid H-Minus M-MuLV RTase Kit von Fermentas in einem Thermocycler. Pro Ansatz wurden 5  $\mu$ l der isolierten RNA, 1  $\mu$ l Oligo(dT) Primer und 7  $\mu$ l RNAase-freies Wasser in ein 0,5-ml-PCR-Röhrchen pipettiert. Während der Inkubation bei 70°C für 10 min lagerten sich die Oligo(dT) Primer an die RNA-Templates an. Anschließend wurde bei 37°C für 5 min mit einem Mastermix aus 4  $\mu$ l 5 x RT-Puffer und 2  $\mu$ l Desoxyribonukleotide (dNTPs) inkubiert. Zur Verknüpfung der an die RNA angelagerten dNTPs wurde nach 5 min 1  $\mu$ l H-Minus RTase dazugegeben und für

50 min bei 42°C inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurde für 15 min bei 70°C inkubiert. Die Konservierung der cDNA erfolgte bei -20°C.

### LightCycler PCR

Die PCR dient der Amplifikation von DNA. Die qPCR stellt eine Weiterentwicklung dar, bei der die Menge des amplifizierten PCR-Produkts gemessen werden kann. Hierzu wurde das LightCycler Fast Start DNA Master<sup>Plus</sup> SYBR Green I Kit von Roche verwendet. Der Farbstoff SYBR Green lagert sich in die neu synthetisierte doppelsträngige DNA ein und fluoresziert daraufhin. Durch die Messung der Fluoreszenzzunahme nach jedem Replikationszyklus kann die Menge des synthetisierten PCR-Produkts bestimmt werden. Pro Ansatz wurden 5 µl der zuvor synthetisierten cDNA, 2 µl Primermix aus forward und reverse Primer, 4 µl SYBR Green Mastermix und 9 µl Wasser in 20 µl Kapillaren pipettiert und in den LightCycler gestellt. Der Ablauf der PCR-Reaktion bestand aus einer Vorheizphase auf 95°C für 10 min, 40 Zyklen zu je 60 s bei 94°C, 60°C und 72°C, gefolgt von einer zehnminütigen Elongationsphase bei 72°C. Anschließend wurde auf 95°C erhitzt, um, basierend auf der Schmelzkurve der synthetisierten Produkte, die Spezifität der Reaktion zu überprüfen. Zusätzlich wurde die Spezifität mittels Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert. Parallel zur Amplifizierung der IFN $\alpha$ R1-cDNA wurde eine Reaktion mit  $\beta$ -Aktin durchgeführt. Die Menge des Housekeeping-Gens  $\beta$ -Aktin ist in allen Zellen annähernd gleich und wird nicht durch die verwendeten Substanzen beeinflusst, weshalb es sich bei der Berechnung der Genexpressionsänderung als Referenz-Gen eignet. Die relative Änderung der IFN $\alpha$ R1-Expression im Vergleich zur  $\beta$ -Aktin-Expression wurde mit Hilfe der  $\Delta\Delta$ Ct-Methode berechnet.  $\Delta$ Ct (cycle threshold) entspricht hierbei dem Schwellenwert-Zyklus, bei dem es erstmals zu einem exponentiellen Anstieg der Fluoreszenz über den Hintergrundwert kommt.

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct} (\text{Zielgen}) - \text{Ct} (\text{Referenzgen})$$

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct} (\text{stimuliert}) - \Delta\text{Ct} (\text{unstimuliert})$$

$$\text{n-fache Genexpression} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$

### 2.2.10. Statistische Auswertung und Computerprogramme

Die Überprüfung auf statistische Signifikanz erfolgte mittels des nicht-parametrischen Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests [176], da aufgrund der geringen Fallzahlen nicht von einer Normalverteilung ausgegangen werden konnte. Als signifikant wurden Daten gewertet, wenn  $p \leq 0,05$  (\*);  $p \leq 0,01$  (\*\*);  $p \leq 0,001$  (\*\*\*) und  $p \leq 0,0001$  (\*\*\*\*) war. Die Ergebnisse der dargestellten Balkendiagramme sind stets als Mittelwert + Standardfehler angegeben. Tabelle 2 fasst die verwendeten Computerprogramme zusammen.

Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Software

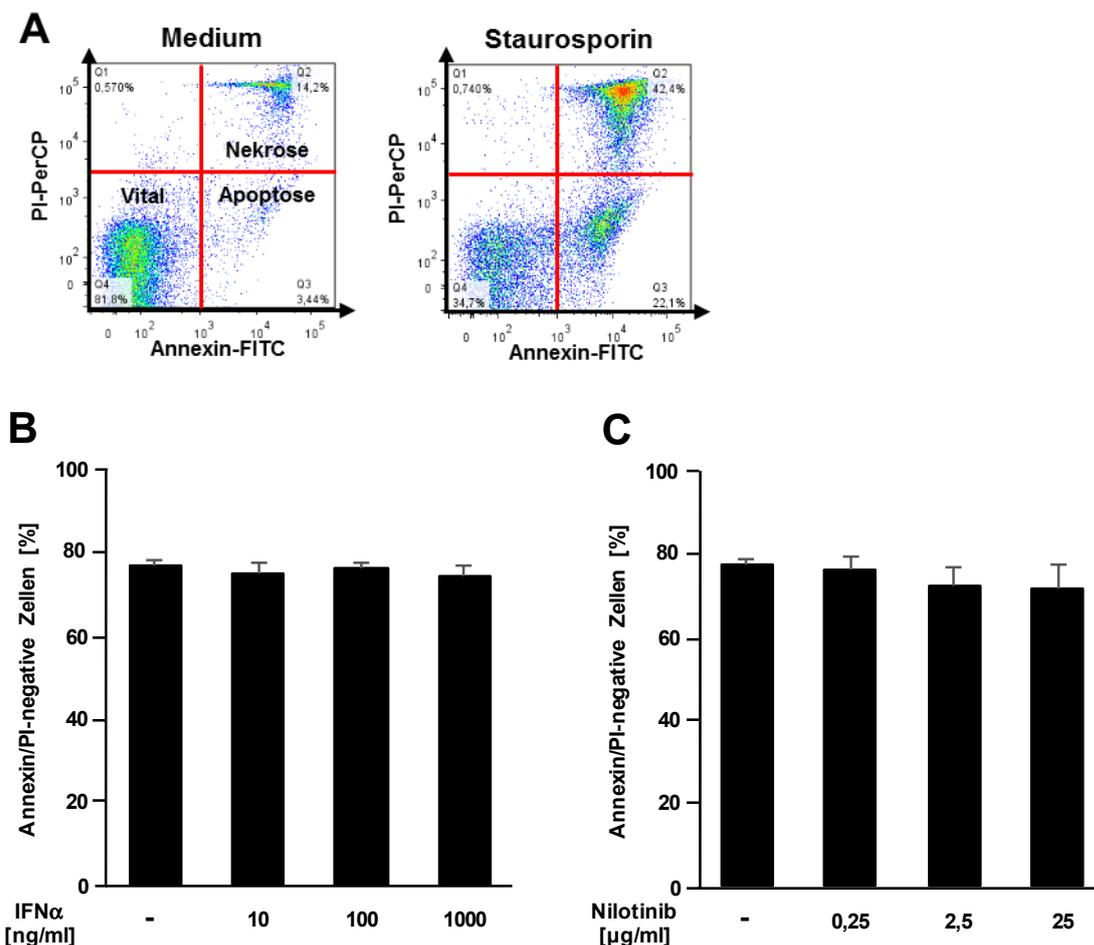
Programm	Hersteller	Anwendung
Cell Quest	BD Bioscience	Verarbeitung von FACS-Daten
Excel	Microsoft Inc.	Datenerfassung und Bearbeitung
FlowJo 10	Tree Star Inc.	Auswertung von FACS-Daten
LightCycler Software	Roche	Auswertung der PCR-Daten
Power Point	Microsoft Inc.	Erstellung von Abbildungen
Word	Microsoft Inc.	Textverarbeitung

**Abkürzungen:** FACS=Fluorescence-activated Cell Sorting; Inc.=Incorporated; PCR=Polymerase-Kettenreaktion.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Toxizität von Interferon- $\alpha$ und Nilotinib

Um eine Beeinträchtigung der Zellviabilität durch IFN $\alpha$  und Nilotinib auszuschließen wurde initial untersucht, ob die beiden Immunmodulatoren einen toxischen Effekt auf primäre humane Zellen haben. Hierzu wurden PBMC über Nacht mit IFN $\alpha$  oder Nilotinib inkubiert. Die Messung der Toxizität erfolgte am nächsten Tag mittels Annexin-V-FITC-Färbung und PI-Färbung (Abb. 10A). Als Positivkontrolle für apoptotische Zellen wurde der Proteinkinaseinhibitor Staurosporin eingesetzt.



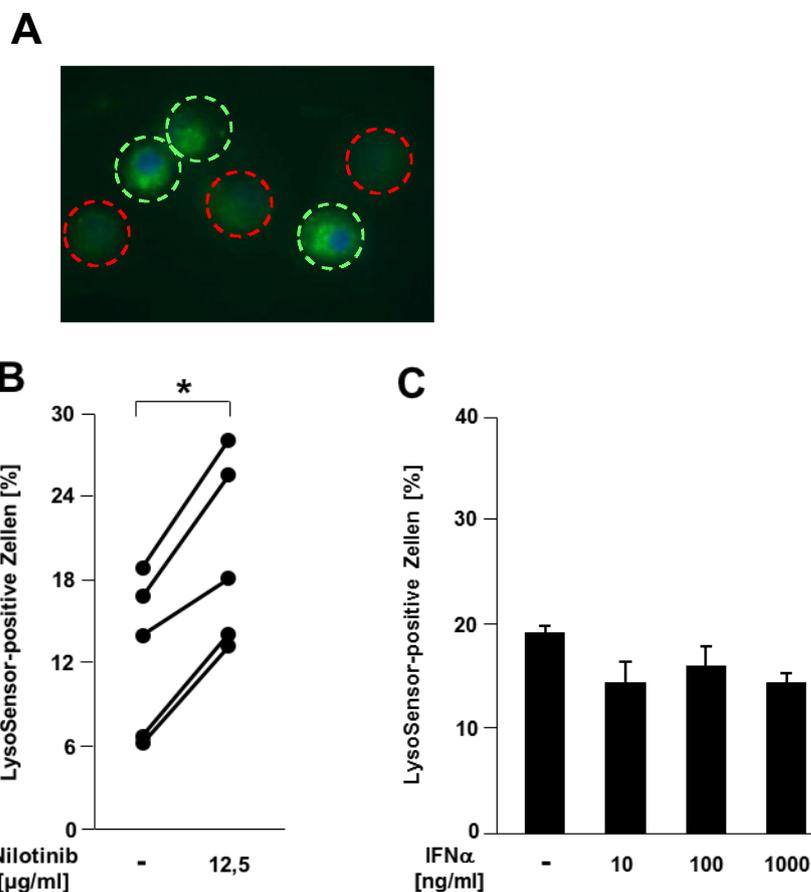
**Abbildung 10: Toxizität von IFN $\alpha$  und Nilotinib**

Je  $2 \times 10^6$  PBMC wurden über Nacht mit IFN $\alpha$  bzw. Nilotinib inkubiert. Im Anschluss wurde eine Annexin-V-FITC- und PI-Färbung durchgeführt. Der Anteil vitaler Zellen (Annexin-negativ/PI-negativ) wurde durchflusszytometrisch erfasst. A) Repräsentatives Beispiel der Medium- und Positivkontrolle. B) Einfluss von IFN $\alpha$  und C) Nilotinib auf den prozentualen Anteil Annexin-negativer/PI-negativer Zellen (je n=3). Die Ergebnisse sind angegeben als Mittelwert + Standardfehler. (Universitätsklinikum Ulm, 2015) **Abkürzungen:** IFN $\alpha$ =Interferon- $\alpha$ ; FITC=Fluoresceinisothiocyanat; PBMC=periphere mononukleäre Zellen; PerCP=Peridinin Chlorophyll Protein; PI=Propidiumiodid.

Alle im weiteren Verlauf verwendeten Konzentrationen von IFN $\alpha$  und Nilotinib wurden untersucht. Insgesamt zeigten sich keine signifikanten toxischen Effekte nach Inkubation mit IFN $\alpha$  oder Nilotinib (Abb. 10B/C). Der Anteil vitaler Zellen war stets größer als 69 % und lag damit maximal 10 Prozentpunkte unter der Mediumkontrolle. Zudem zeigten sich bei der Titration keine dosisabhängigen Effekte. Diese Experimente zeigen, dass IFN $\alpha$  und Nilotinib in den verwendeten Konzentrationen die Viabilität der Zellen im Vergleich zur Mediumkontrolle nicht signifikant beeinträchtigen.

### 3.2. Einfluss von Interferon- $\alpha$ und Nilotinib auf die Ansäuerung von Lysosomen

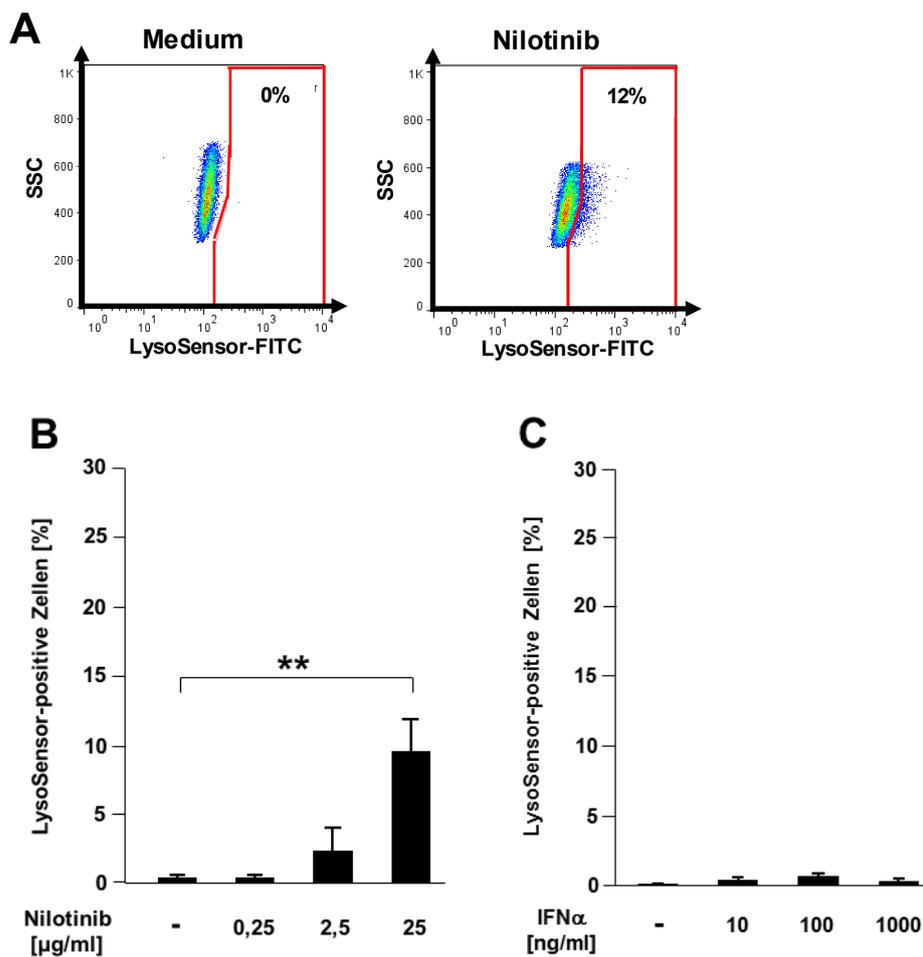
Ein zentraler Abwehrmechanismus von Makrophagen gegen intrazelluläre Bakterien ist die Ansäuerung des Phagosoms durch Fusion mit Lysosomen. Um zu untersuchen, ob IFN $\alpha$  oder Nilotinib die lysosomale Ansäuerung beeinflussen, wurden Makrophagen über Nacht mit IFN $\alpha$  bzw. Nilotinib inkubiert und anschließend mittels pH-sensitiver LysoSensor-Färbung fluoreszenzmikroskopisch untersucht (Abb. 11). Nilotinib führte zu einem signifikanten Anstieg der LysoSensor-positiven Makrophagen von durchschnittlich 12 % auf 20 % (Abb. 11B), während bei IFN $\alpha$  kein Unterschied zum Medium erkennbar war (Abb. 11C).



**Abbildung 11: Einfluss von Nilotinib und IFN $\alpha$  auf die Ansäuerung von Lysosomen (Fluoreszenzmikroskopie)**

Je  $0,7 \times 10^5$  Makrophagen wurden über Nacht mit Nilotinib oder IFN $\alpha$  inkubiert, anschließend für 2 h mit LysoSensor Green gefärbt und am Fluoreszenzmikroskop analysiert. A) Repräsentatives Beispiel für LysoSensor-positiv (grün umrandet) bzw. LysoSensor-negative Zellen (rot umrandet) nach Inkubation mit 12,5  $\mu\text{g/ml}$  Nilotinib (1000-fache Vergrößerung). B) - C) Prozentualer Anteil LysoSensor-positiver Makrophagen nach Inkubation mit Nilotinib (n=5) bzw. IFN $\alpha$  (n=3). Es wurden jeweils 200 Zellen ausgezählt. Jede Linie repräsentiert einen individuellen Spender;  $p \leq 0,05$  (\*). (Universitätsklinikum Ulm, 2015) **Abkürzungen:** IFN $\alpha$ =Interferon- $\alpha$ .

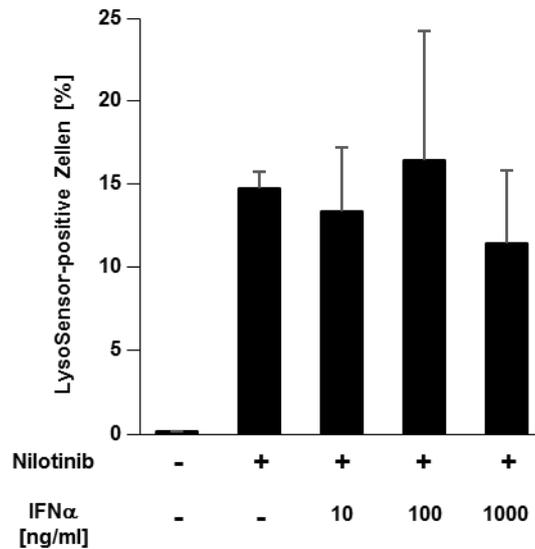
Die am Fluoreszenzmikroskop erhobenen Ergebnisse wurden mittels Durchflusszytometrie erweitert. Inkubation mit Nilotinib führte zu einer titrierbaren Zunahme des Anteils LysoSensor-positiver Makrophagen auf durchschnittlich bis zu 10 % (Abb. 12B). Bei  $\text{IFN}\alpha$  zeigten sich keine Unterschiede im Vergleich zur Mediumkontrolle (Abb. 12C). Da das Gate für LysoSensor-positive Zellen so gewählt wurde, dass in der Mediumkontrolle alle Zellen negativ sind, ergab sich im Vergleich zur Fluoreszenzmikroskopie ein niedrigerer Anteil LysoSensor-positiver Zellen.



**Abbildung 12: Einfluss von Nilotinib und  $\text{IFN}\alpha$  auf die Ansäuerung von Lysosomen (Durchflusszytometrie)**

Je  $1 \times 10^6$  Makrophagen wurden über Nacht mit Nilotinib ( $n=7$ ) oder  $\text{IFN}\alpha$  ( $n=3$ ) inkubiert, anschließend für 10 min mit LysoSensor Green gefärbt und am Durchflusszytometer analysiert. A) Ein repräsentativer von insgesamt sieben vergleichbaren Spendern nach Inkubation mit 25 µg/ml Nilotinib. B) - C) Prozentualer Anteil LysoSensor-positiver Makrophagen nach Inkubation mit Nilotinib bzw.  $\text{IFN}\alpha$ . Die Ergebnisse sind angegeben als Mittelwert + Standardfehler;  $p \leq 0,01$  (\*\*). (Universitätsklinikum Ulm, 2015) **Abkürzungen:**  $\text{IFN}\alpha$ =Interferon- $\alpha$ ; FITC=Fluoresceinisothiocyanat; SSC=sideward scatter.

Die Zugabe von IFN $\alpha$  hatte keinen Effekt auf die nilotinibinduzierte Ansäuerung der Makrophagen (Abb. 13).



**Abbildung 13: Einfluss von IFN $\alpha$  auf die nilotinibinduzierte Ansäuerung von Lysosomen (Durchflusszytometrie)**

Je  $1 \times 10^6$  Makrophagen wurden über Nacht mit 25  $\mu\text{g/ml}$  Nilotinib +/- 10 ng/ml, 100 ng/ml bzw. 1000 ng/ml IFN $\alpha$  inkubiert. Die Zellen wurden anschließend für 10 min mit LysoSensor Green gefärbt und am Durchflusszytometer analysiert. Die Ergebnisse sind angegeben als Mittelwert + Standardfehler (n=4). (Universitätsklinikum Ulm, 2015) **Abkürzungen:** IFN $\alpha$ =Interferon- $\alpha$ .

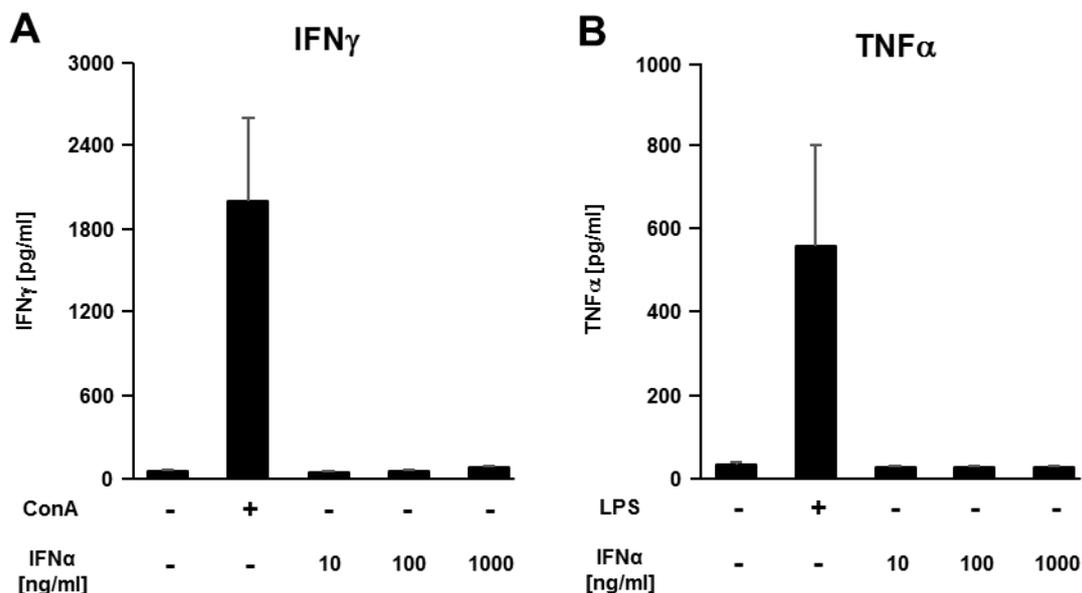
Zusammenfassend wurden mittels Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie folgende Befunde erhoben:

- 1) Nilotinib führt zu einer dosisabhängigen Ansäuerung von Lysosomen in humanen Makrophagen.
- 2) IFN $\alpha$  hat keinen Einfluss auf die Ansäuerung von Lysosomen.
- 3) Die nilotinibinduzierte Ansäuerung wird durch IFN $\alpha$  nicht signifikant beeinflusst.

### 3.3. Einfluss von Interferon- $\alpha$ und Nilotinib auf die Zytokinfreisetzung

#### 3.3.1. Einfluss von Interferon- $\alpha$ auf die Freisetzung von Interferon- $\gamma$ und Tumornekrosefaktor- $\alpha$

Die proinflammatorischen Zytokine IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  spielen eine zentrale Rolle bei der Bekämpfung von *M. tuberculosis*. Um zu untersuchen, welchen Einfluss IFN $\alpha$  auf die Freisetzung von IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  hat, wurden PBMC über Nacht mit IFN $\alpha$  stimuliert. Anschließend wurden die Konzentrationen von IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  im Überstand mittels ELISA quantifiziert. Als Positivkontrollen dienten Concanavalin A (ConA) bzw. Lipopolysaccharid (LPS). ConA ist ein Mitogen, das T-Zellen stimuliert und die Freisetzung von IFN $\gamma$  bewirkt. LPS ist ein Bestandteil der äußeren Membran von gramnegativen Bakterien, der die Sekretion von TNF $\alpha$  durch Makrophagen induziert. Es zeigte sich, dass IFN $\alpha$  allein keine Freisetzung von IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  induziert (Abb. 14).

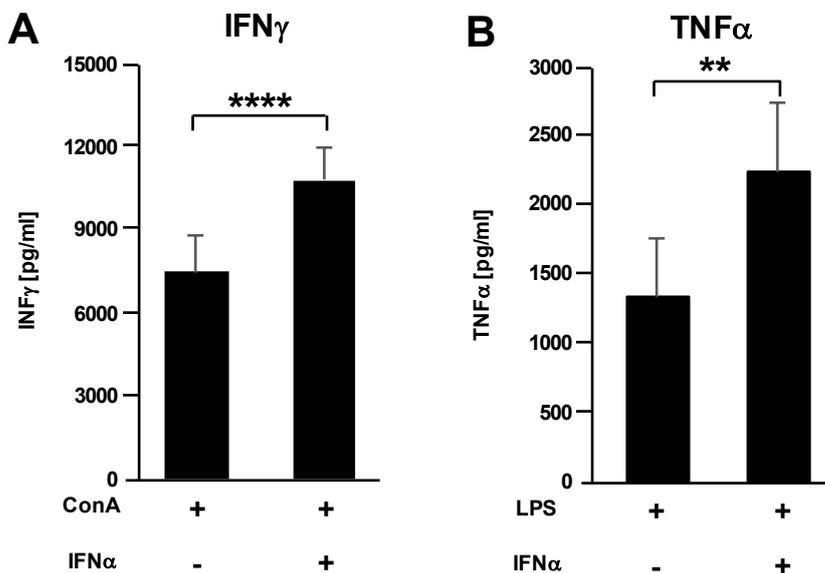


**Abbildung 14: Einfluss von IFN $\alpha$  auf die Freisetzung von IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  von peripheren mononukleären Zellen**

Je  $1 \times 10^6$  PBMC wurden über Nacht mit IFN $\alpha$  stimuliert. Der Überstand wurde gewonnen und mittels IFN $\gamma$ -ELISA (A; n=13) und TNF $\alpha$ -ELISA (B; n=12) analysiert. Als Positivkontrollen dienten 5  $\mu$ g/ml ConA bzw. 10 ng/ml LPS. Die Ergebnisse sind angegeben als Mittelwert + Standardfehler. (Universitätsklinikum Ulm, 2015)

**Abkürzungen:** ConA=Concanavalin A; ELISA=Enzyme-linked Immunosorbent Assay; IFN $\alpha$ =Interferon- $\alpha$ ; IFN $\gamma$ =Interferon- $\gamma$ ; LPS=Lipopolysaccharid; PBMC=periphere mononukleäre Zellen; TNF $\alpha$ =Tumornekrosefaktor- $\alpha$ .

Als nächstes wurde untersucht, ob  $\text{IFN}\alpha$  die Zytokinfreisetzung von stimulierten PBMC moduliert. Dazu wurden PBMC mit ConA bzw. LPS in der Anwesenheit von  $\text{IFN}\alpha$  stimuliert und die Konzentrationen von  $\text{IFN}\gamma$  bzw.  $\text{TNF}\alpha$  im Überstand bestimmt. Die Zugabe von  $\text{IFN}\alpha$  erhöhte die ConA-induzierte  $\text{IFN}\gamma$ -Freisetzung signifikant (Abb. 15A). Gleichzeitige Stimulation mit LPS und  $\text{IFN}\alpha$  führte zu einer signifikanten Zunahme der Freisetzung von  $\text{TNF}\alpha$  (Abb. 15B).

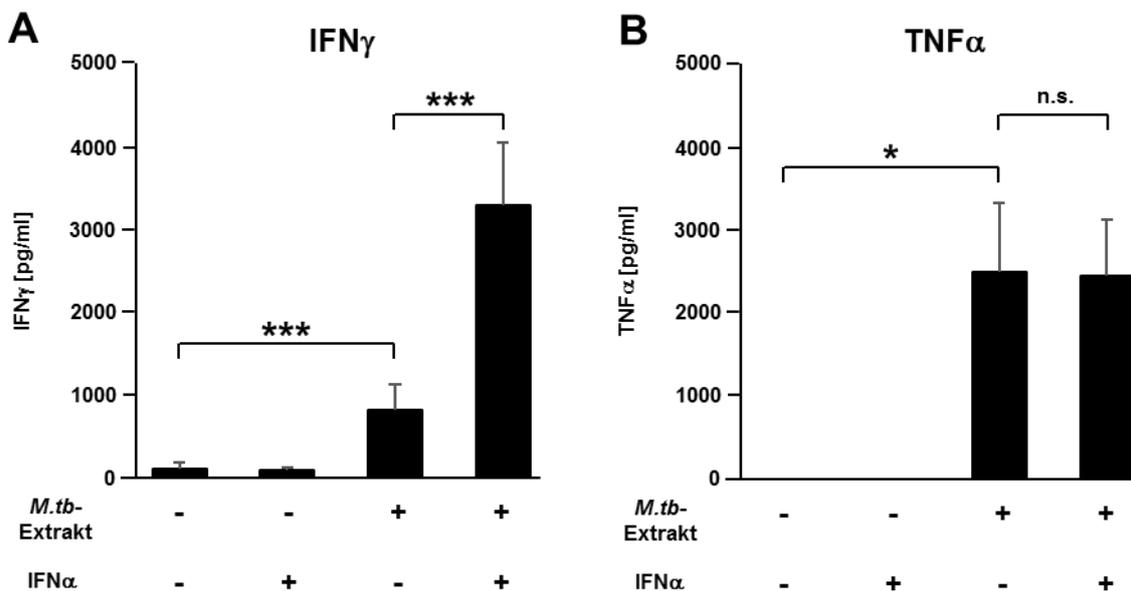


**Abbildung 15: Einfluss von  $\text{IFN}\alpha$  auf die Zytokinfreisetzung von stimulierten peripheren mononukleären Zellen**

Je  $1 \times 10^6$  PBMC wurden über Nacht mit  $5 \mu\text{g/ml}$  ConA (A;  $n=21$ ) bzw.  $10 \text{ ng/ml}$  LPS (B;  $n=11$ ) +/-  $100 \text{ ng/ml}$   $\text{IFN}\alpha$  stimuliert. Der Überstand wurde gewonnen und mittels  $\text{IFN}\gamma$ -ELISA und  $\text{TNF}\alpha$ -ELISA analysiert. Die Ergebnisse sind angegeben als Mittelwert + Standardfehler;  $p \leq 0,01$  (\*\*) bzw.  $p \leq 0,0001$  (\*\*\*\*). (Universitätsklinikum Ulm, 2015)

**Abkürzungen:** ConA=Concanavalin A; ELISA=Enzyme-linked Immunosorbent Assay;  $\text{IFN}\alpha$ =Interferon- $\alpha$ ;  $\text{IFN}\gamma$ =Interferon- $\gamma$ ; LPS=Lipopolysaccharid; PBMC=periphere mononukleäre Zellen;  $\text{TNF}\alpha$ =Tumornekrosefaktor- $\alpha$ .

Diese Daten zeigen, dass  $\text{IFN}\alpha$  die Zytokinfreisetzung von aktivierten PBMC steigert und damit die TKI-vermittelte Hemmung antagonisieren könnte. ConA und LPS induzieren die Freisetzung von  $\text{IFN}\gamma$  bzw.  $\text{TNF}\alpha$  antigenunabhängig durch direkte Aktivierung der intrazellulären Signaltransduktionskaskade. Um den Einfluss von  $\text{IFN}\alpha$  auf die antigenspezifische Zytokinfreisetzung zu ermitteln, wurden PBMC nun in Anwesenheit von  $\text{IFN}\alpha$  mit *M.tb*-Extrakt stimuliert (Abb. 16).



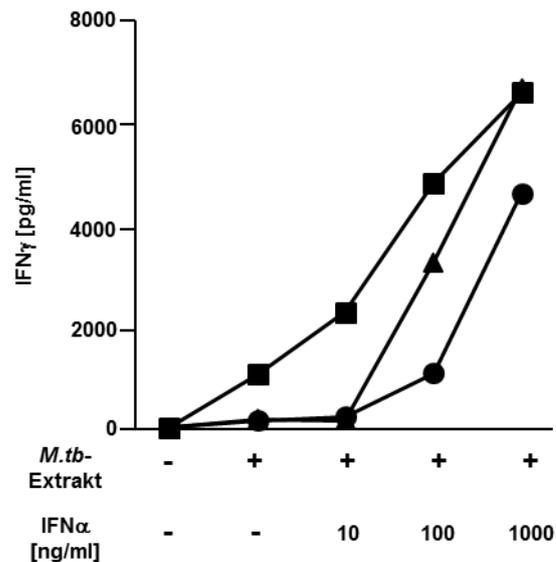
**Abbildung 16: Einfluss von  $\text{IFN}\alpha$  auf die Zytokinfreisetzung von PBMC in *M.tb*-Extrakt-positiven Spendern**

Je  $1 \times 10^6$  PBMC wurden über Nacht mit  $5 \mu\text{g/ml}$  *M.tb*-Extrakt +/-  $100 \text{ ng/ml}$   $\text{IFN}\alpha$  stimuliert. Der Überstand wurde gewonnen und mittels A)  $\text{IFN}\gamma$ -ELISA ( $n=12$ ) und B)  $\text{TNF}\alpha$ -ELISA ( $n=7$ ) analysiert. Die Ergebnisse sind angegeben als Mittelwert + Standardfehler;  $p \leq 0,05$  (\*) bzw.  $p \leq 0,001$  (\*\*\*) (Universitätsklinikum Ulm, 2015)

**Abkürzungen:** ELISA=Enzyme-linked Immunosorbent Assay;  $\text{IFN}\alpha$ =Interferon- $\alpha$ ;  $\text{IFN}\gamma$ =Interferon- $\gamma$ ; *M.tb*=*Mycobacterium tuberculosis*; n.s.=nicht signifikant; PBMC=periphere mononukleäre Zellen;  $\text{TNF}\alpha$ =Tumornekrosefaktor- $\alpha$ .

Bei *M.tb*-Extrakt-positiven Spendern betrug die  $\text{IFN}\gamma$ -Konzentration nach Stimulation mit *M.tb*-Extrakt im Mittel  $798 \pm 305 \text{ pg/ml}$ .  $\text{IFN}\alpha$  führte zu einer Zunahme der  $\text{IFN}\gamma$ -Freisetzung auf  $3525 \pm 740 \text{ pg/ml}$  ( $p = 0,0005$ ) (Abb. 16A). *M.tb*-Extrakt-Stimulation führte zu einer deutlichen Zunahme der  $\text{TNF}\alpha$ -Freisetzung auf durchschnittlich  $2464 \pm 820 \text{ pg/ml}$ . Diese wurde durch  $\text{IFN}\alpha$  jedoch nicht zusätzlich gesteigert (Abb. 16B). Angesichts der Bedeutung von  $\text{IFN}\gamma$  für die Immunabwehr war die  $\text{IFN}\alpha$ -induzierte  $\text{IFN}\gamma$ -Freisetzung ein wichtiger Befund, der im Folgenden genauer analysiert wurde.

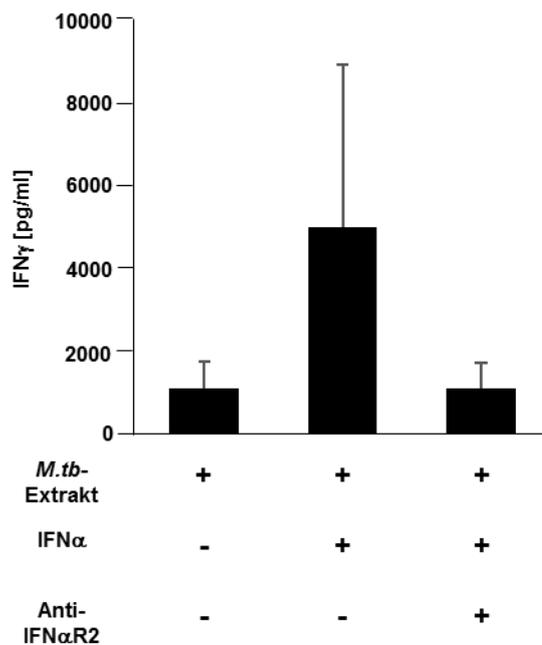
Um zu überprüfen, ob die  $\text{IFN}\alpha$ -induzierte  $\text{IFN}\gamma$ -Freisetzung dosisabhängig ist, wurde die Konzentration von  $\text{IFN}\alpha$  zu *M.tb*-Extrakt-stimulierten PBMC titriert (Abb. 17). Bereits 10 ng/ml  $\text{IFN}\alpha$  steigerten die freigesetzte  $\text{IFN}\gamma$ -Menge im Mittel auf 880 pg/ml im Vergleich zu 453 pg/ml bei alleiniger *M.tb*-Extrakt-Stimulation. 100 ng/ml  $\text{IFN}\alpha$  führten zu einer durchschnittlichen  $\text{IFN}\gamma$ -Freisetzung von 3054 +/- 1085 pg/ml, während 1000 ng/ml die  $\text{IFN}\gamma$ -Konzentration auf durchschnittlich 5976 +/- 674 pg/ml erhöhten.



**Abbildung 17: Dosisabhängige Steigerung der *M.tb*-Extrakt-induzierten  $\text{IFN}\gamma$ -Freisetzung durch  $\text{IFN}\alpha$**

Je  $1 \times 10^6$  PBMC wurden über Nacht mit 5  $\mu\text{g/ml}$  *M.tb*-Extrakt +/- 10 ng/ml, 100 ng/ml bzw. 1000 ng/ml  $\text{IFN}\alpha$  stimuliert. Der Überstand wurde gewonnen und mittels  $\text{IFN}\gamma$ -ELISA analysiert (n=3). Die unterschiedlichen Symbole repräsentieren jeweils separate Spender. (Universitätsklinikum Ulm, 2015) **Abkürzungen:** ELISA=Enzyme-linked Immunosorbent Assay;  $\text{IFN}\alpha$ =Interferon- $\alpha$ ;  $\text{IFN}\gamma$ =Interferon- $\gamma$ ; *M.tb*=*Mycobacterium tuberculosis*; PBMC=periphere mononukleäre Zellen.

Um zu prüfen, ob dieser Effekt über den IFN $\alpha$ R vermittelt wird, wurden Experimente in Anwesenheit eines blockierenden IFN $\alpha$ R2-Antikörpers durchgeführt. PBMC wurden mit anti-IFN $\alpha$ R2-AK vorinkubiert und anschließend über Nacht mit *M.tb*-Extrakt und IFN $\alpha$  stimuliert. Die Zugabe des blockierenden IFN $\alpha$ R2-Antikörpers führte zur Inhibition der IFN $\gamma$ -Freisetzung auf das Ausgangsniveau (Abb. 18). Damit wurde gezeigt, dass die gesteigerte IFN $\gamma$ -Freisetzung in stimulierten PBMC über den IFN $\alpha$ R vermittelt wird.

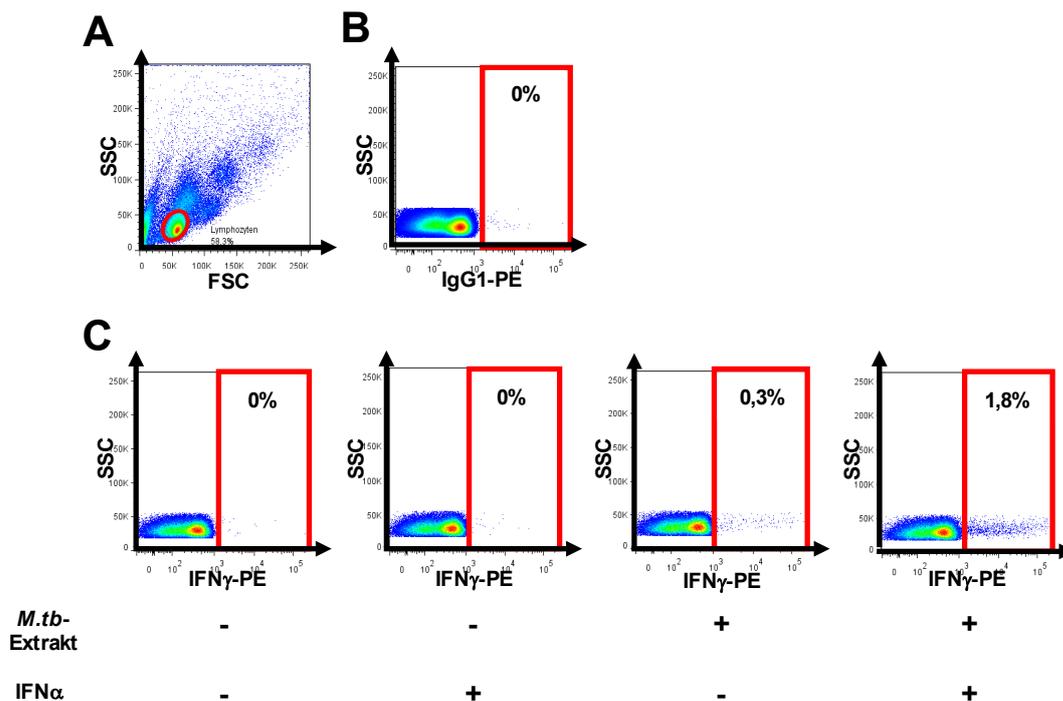


**Abbildung 18: Antagonisierung der IFN $\alpha$ -induzierten IFN $\gamma$ -Freisetzung mittels blockierendem IFN $\alpha$ R2-Antikörper**

0,5 x 10<sup>6</sup> PBMC wurden über Nacht mit 5  $\mu$ g/ml *M.tb*-Extrakt +/- 100 ng/ml IFN $\alpha$  stimuliert. Ein Ansatz wurde zusätzlich für 1 h mit 10  $\mu$ g/ml IFN $\alpha$ R2-Antikörper vorinkubiert. Überstände wurde gewonnen und mittels IFN $\gamma$ -ELISA analysiert. Aufgrund der geringen Anzahl an Spendern (n=3) konnten keine nichtparametrischen Signifikanztests durchgeführt werden. Die Ergebnisse sind angegeben als Mittelwert + Standardfehler. (Universitätsklinikum Ulm, 2015)

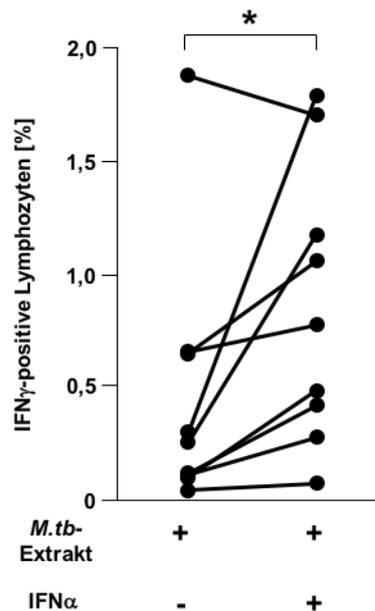
**Abkürzungen:** ELISA=Enzyme-linked Immunosorbent Assay; IFN $\alpha$ =Interferon- $\alpha$ ; IFN $\alpha$ R2=Interferon- $\alpha$ -Rezeptor2; IFN $\gamma$ =Interferon- $\gamma$ ; *M.tb*=*Mycobacterium tuberculosis*; PBMC=periphere mononukleäre Zellen.

Hauptproduzenten von  $\text{IFN}\gamma$  sind  $\text{CD4}^+$ -T-Helferzellen,  $\text{CD8}^+$ -zytotoxische T-Zellen und NK-Zellen. Mit dem Ziel der phänotypischen Charakterisierung der  $\text{IFN}\gamma$ -produzierenden Zellen wurden PBMC über Nacht mit *M.tb*-Extrakt +/-  $\text{IFN}\alpha$  inkubiert und die Expression von  $\text{IFN}\gamma$  mittels intrazellulärer Durchflusszytometrie analysiert. Unstimulierte und  $\text{IFN}\alpha$ -stimulierte Zellen exprimierten kein  $\text{IFN}\gamma$ . In Anwesenheit von *M.tb*-Extrakt waren 0,28 % der Zellen positiv, während die Anzahl  $\text{IFN}\gamma$ -positiver Lymphozyten bei simultaner Inkubation mit  $\text{IFN}\alpha$  auf 1,81 % anstieg (Abb. 19C). In Übereinstimmung mit den vorherigen Ergebnissen erhöhte  $\text{IFN}\alpha$  die Anzahl der  $\text{IFN}\gamma$ -positiven Lymphozyten signifikant (Abb. 20;  $p = 0,0195$ ).



**Abbildung 19: Einfluss von  $\text{IFN}\alpha$  auf den prozentualen Anteil  $\text{IFN}\gamma$ -positiver Lymphozyten – repräsentatives Beispiel**

Je  $1 \times 10^6$  PBMC wurden über Nacht mit  $5 \mu\text{g/ml}$  *M.tb*-Extrakt +/-  $100 \text{ ng/ml}$   $\text{IFN}\alpha$  stimuliert und intrazelluläres  $\text{IFN}\gamma$  angefärbt. A) Gate für die Lymphozytenpopulation. B) Isotypkontrolle. C)  $\text{IFN}\gamma$ -positive Lymphozyten ohne Stimulus, mit  $\text{IFN}\alpha$ , *M.tb*-Extrakt und *M.tb*-Extrakt +  $\text{IFN}\alpha$ . Die Abbildung zeigt einen repräsentativen von insgesamt neun Spendern mit vergleichbarem Ergebnis. (Universitätsklinikum Ulm, 2015) **Abkürzungen:** FSC=forward scatter;  $\text{IFN}\alpha$ =Interferon- $\alpha$ ;  $\text{IFN}\gamma$ =Interferon- $\gamma$ ; IgG1=ImmunglobulinG1; *M.tb*=*Mycobacterium tuberculosis*; PBMC=periphere mononukleäre Zellen; PE=Phycoerythrin; SSC=sideward scatter.

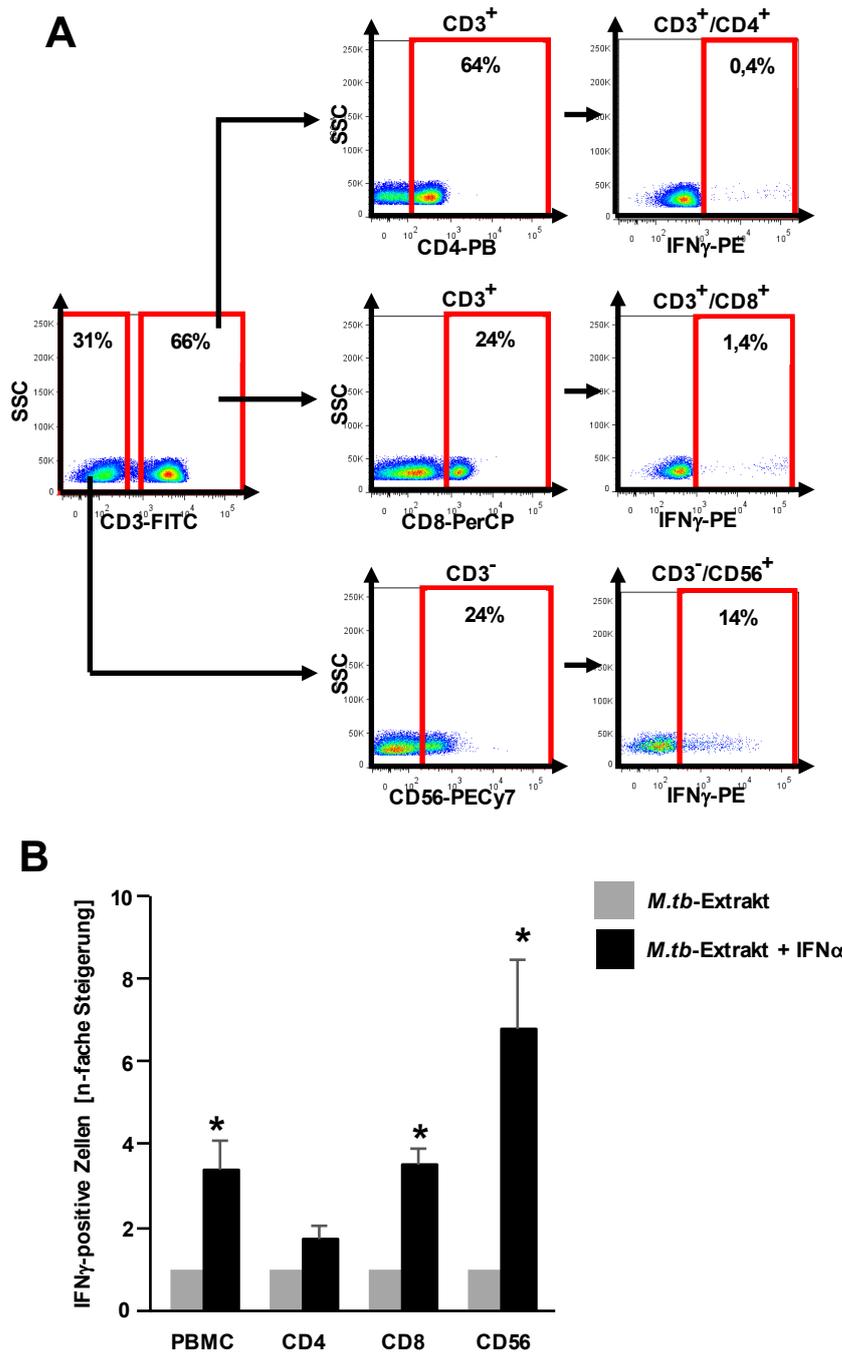


**Abbildung 20: Einfluss von IFN $\alpha$  auf den prozentualen Anteil IFN $\gamma$ -positiver Lymphozyten - Zusammenfassung**

Je  $1 \times 10^6$  PBMC wurden über Nacht mit 5  $\mu\text{g/ml}$  *M.tb*-Extrakt +/- 100 ng/ml IFN $\alpha$  stimuliert. Die IFN $\gamma$ -Expression wurde durchflusszytometrisch quantifiziert. Jede Linie repräsentiert einen individuellen Spender (n=9);  $p \leq 0,05$  (\*). (Universitätsklinikum Ulm, 2015) **Abkürzungen:** IFN $\alpha$ =Interferon- $\alpha$ ; IFN $\gamma$ =Interferon- $\gamma$ ; *M.tb*=*Mycobacterium tuberculosis*; PBMC=periphere mononukleäre Zellen;

Die IFN $\alpha$ -induzierte IFN $\gamma$ -Sekretion zeigte sich nur bei Spendern, die bereits Kontakt mit Antigenen von *M. tuberculosis* hatten, und nicht bei *M.tb*-Extrakt-negativen Spendern. Daher stellten wir die Hypothese auf, dass T-Lymphozyten für die Produktion von IFN $\gamma$  verantwortlich sind. Zur phänotypischen Charakterisierung der IFN $\gamma$ -produzierenden Zellen wurde eine intrazelluläre IFN $\gamma$ -Färbung mit einer zelltypspezifischen Oberflächenmarkerfärbung kombiniert. Hierfür wurden NK-Zellen (CD56) und T-Zellen (CD3, CD4, CD8) markiert. IFN $\alpha$  führte in allen Subpopulationen zu einer Zunahme der Anzahl der IFN $\gamma$ -positiven Zellen (Abb. 21). In der CD3 $^+$ /CD4 $^+$ -T-Zell-Population war der Effekt am geringsten, wobei es annähernd zu einer Verdoppelung der Anzahl der IFN $\gamma$ -positiven Zellen kam. Eine signifikante Zunahme an IFN $\gamma$ -positiven Zellen fand sich in der CD3 $^+$ /CD8 $^+$ -T-Zell-Population (~ 4 x) und in der CD3 $^-$ /CD56 $^+$ -NK-Zell-Population (~ 7 x) (jeweils  $p < 0,05$ ). Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die IFN $\alpha$ -induzierte IFN $\gamma$ -Freisetzung nicht auf eine einzelne Zellpopulation beschränkt ist, sondern dass neben den T-Zellen auch NK-Zellen vermehrt IFN $\gamma$  produzieren. Weiterführende Experimente in unserem Labor zeigten, dass die Aktivierung der NK-Zellen

abhängig von IL-2 und damit ebenfalls antigenspezifisch ist (Ergebnisse nicht gezeigt).



**Abbildung 21: Einfluss von IFN $\alpha$  auf den prozentualen Anteil IFN $\gamma$ -positiver Zellen in den CD4 $^+$ -, CD8 $^+$ - und CD56 $^+$ -Populationen** Je  $1 \times 10^6$  PBMC wurden über Nacht mit  $5 \mu\text{g/ml}$  *M.tb*-Extrakt +/-  $100 \text{ ng/ml}$  IFN $\alpha$  stimuliert. Die Zellen wurden extrazellulär gegen CD3, CD4, CD8 und CD56 angefärbt und anschließend intrazellulär gegen IFN $\gamma$ . A) Stimulation mit *M.tb*-Extrakt + IFN $\alpha$ ; repräsentatives Beispiel zur Veranschaulichung der Gatingstrategie, B) Einfluss von IFN $\alpha$  auf die Anzahl IFN $\gamma$ -positiver Zellen in den verschiedenen Lymphozytensubpopulationen bei *M.tb*-Extrakt-positiven Spendern; die Ergebnisse sind angegeben als Mittelwert + Standardfehler;  $p \leq 0,05$  (\*) ( $n=6$ ). (Universitätsklinikum Ulm, 2015)  
**Abkürzungen:** CD=Cluster of Differentiation; FITC=Fluoresceinisothiocyanat; IFN $\alpha$ =Interferon- $\alpha$ ; IFN $\gamma$ =Interferon- $\gamma$ ; *M.tb*=*Mycobacterium tuberculosis*; PB=Pacific Blue; PBMC=periphere mononukleäre Zellen; PE=Phycoerythrin; PECy7=Phycoerythrin-Cyanin 7; PerCP=Peridinin Chlorophyll Protein; SSC=sideward scatter.

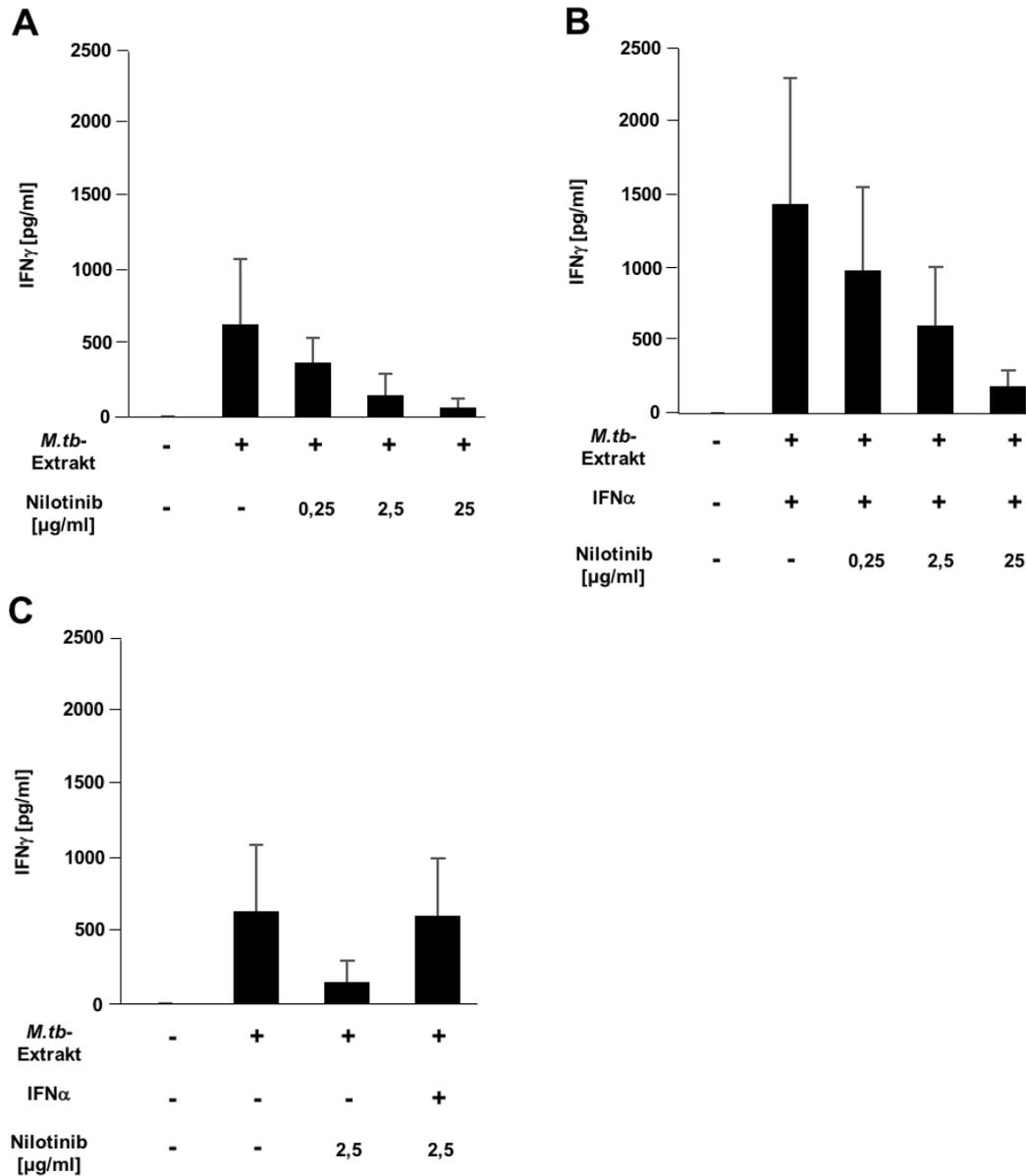
### 3.3.2. Einfluss von Interferon- $\alpha$ auf die nilotinibinduzierte Hemmung der Interferon- $\gamma$ -Freisetzung

TKI reduzieren das intrazelluläre Wachstum von *M. tuberculosis* und werden deshalb als mögliche Kandidaten einer immunmodulatorischen Therapie gegen die Tuberkulose geprüft. Allerdings hemmen die TKI Imatinib, Nilotinib und Dasatinib die Freisetzung von Zytokinen, die mit Schutz gegen eine Infektion mit *M. tuberculosis* assoziiert sind [82]. Angesichts der bisher gezeigten Ergebnisse, die eine Induktion der IFN $\gamma$ -Freisetzung durch IFN $\alpha$  zeigten, war das Ziel der folgenden Experimente zu prüfen, ob IFN $\alpha$  die Hemmung der Zytokinfreisetzung durch Nilotinib antagonisiert.

Hierfür wurden PBMC mit *M.tb*-Extrakt aktiviert und mit IFN $\alpha$  und Nilotinib inkubiert. Nilotinib verringerte dosisabhängig die *M.tb*-Extrakt-induzierte IFN $\gamma$ -Freisetzung in An- und Abwesenheit von IFN $\alpha$  (Abb. 22A/B). Die therapeutische Dosis von Nilotinib führte in Abwesenheit von IFN $\alpha$  zu einer Reduktion der IFN $\gamma$ -Freisetzung von durchschnittlich 637 pg/ml auf 149 pg/ml. Simultane Inkubation mit IFN $\alpha$  steigerte die freigesetzte Menge an IFN $\gamma$  auf 604 pg/ml (Abb. 22C). Diese Daten zeigen, dass IFN $\alpha$  den hemmenden Effekt von Nilotinib auf die IFN $\gamma$ -Freisetzung von humanen Lymphozyten teilweise antagonisiert.

Der Einfluss von IFN $\alpha$  und Nilotinib auf die *M. tuberculosis*-spezifische IFN $\gamma$ -Freisetzung lässt sich folgendermaßen zusammenfassen:

- 1) IFN $\alpha$  allein führt nicht zur Freisetzung von IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  in PBMC.
- 2) IFN $\alpha$  steigert die Freisetzung von IFN $\gamma$  in *M.tb*-Extrakt-aktivierten PBMC.
- 3) Nilotinib allein hemmt die Freisetzung von IFN $\gamma$  in PBMC.
- 4) IFN $\alpha$  antagonisiert die nilotinibinduzierte Hemmung der IFN $\gamma$ -Freisetzung.

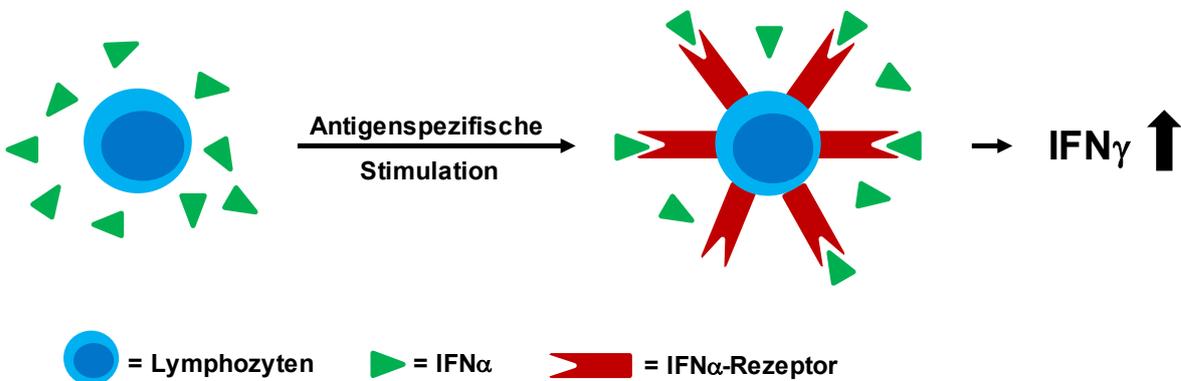


**Abbildung 22: Einfluss von Nilotinib und IFN $\alpha$  auf die Freisetzung von IFN $\gamma$**

Je  $1 \times 10^6$  PBMC wurden über Nacht mit  $5 \mu\text{g/ml}$  *M.tb*-Extrakt +/-  $100 \text{ ng/ml}$  IFN $\alpha$  +/- Nilotinib stimuliert. Der Überstand wurde gewonnen und mittels IFN $\gamma$ -ELISA analysiert ( $n=3$ ; es handelt sich um dieselben Spender, was einen direkten Vergleich der IFN $\gamma$ -Konzentrationen erlaubt). Die Ergebnisse sind angegeben als Mittelwert + Standardfehler. (Universitätsklinikum Ulm, 2015) **Abkürzungen:** ELISA=Enzyme-linked Immunosorbent Assay; IFN $\alpha$ =Interferon- $\alpha$ ; IFN $\gamma$ =Interferon- $\gamma$ ; *M.tb*=*Mycobacterium tuberculosis*; PBMC=periphere mononukleäre Zellen.

### 3.3.3. Mechanismus der Interferon- $\alpha$ -induzierten Interferon- $\gamma$ -Freisetzung

Das zentrale Ergebnis der bisherigen Experimente war die IFN $\alpha$ -induzierte IFN $\gamma$ -Freisetzung in antigenspezifisch aktivierten PBMC. Basierend auf diesem Leitbefund wurde die Hypothese aufgestellt, dass IFN $\gamma$  den IFN $\alpha$ -Rezeptor (IFN $\alpha$ R1) hochreguliert und so die Zellen für IFN $\alpha$  sensibilisiert (Abb. 23).



**Abbildung 23: Hypothese für den Mechanismus der IFN $\alpha$ -induzierten IFN $\gamma$ -Freisetzung**

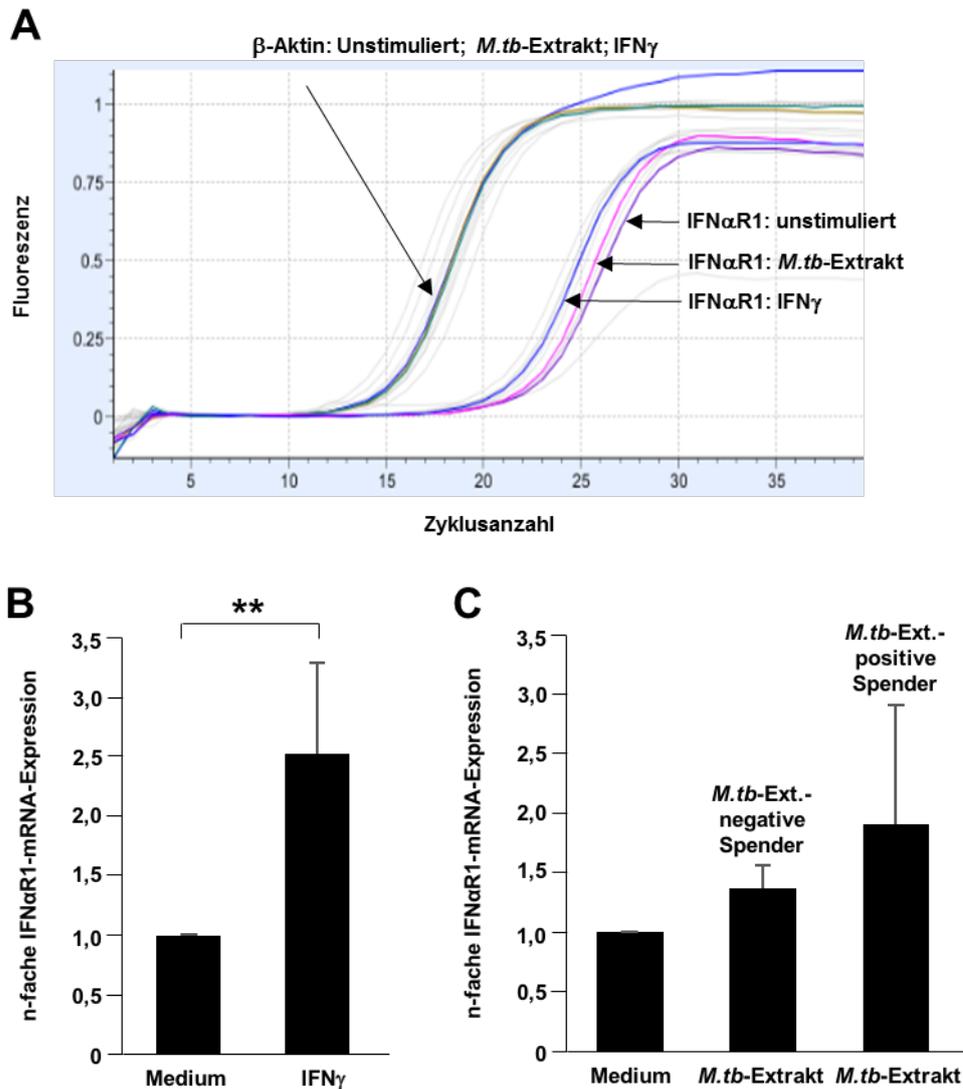
Antigen-spezifische Stimulation induziert die Freisetzung von IFN $\gamma$  und steigert dadurch die Expression des Interferon- $\alpha$ -Rezeptors auf der Oberfläche von PBMC. Dies führt zur Sensibilisierung der Lymphozyten für die Stimulation mit IFN $\alpha$  und zur vermehrten Freisetzung von IFN $\gamma$ . **Abkürzungen:** IFN $\alpha$ =Interferon- $\alpha$ ; IFN $\gamma$ =Interferon- $\gamma$ ; PBMC=periphere mononukleäre Zellen.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden zwei komplementäre Experimentalansätze gewählt:

1. Quantifizierung der IFN $\alpha$ R1-mRNA-Expression mittels qPCR
2. Messung der IFN $\alpha$ R1-Expression mittels Durchflusszytometrie

Zunächst wurden PBMC für 2 h mit IFN $\gamma$  bzw. *M.tb*-Extrakt stimuliert und anschließend die IFN $\alpha$ R1-mRNA mittels LightCycler-PCR quantifiziert. Bei 7 von 8 Spendern führte IFN $\gamma$  zu einer Steigerung der IFN $\alpha$ R1-mRNA von 1,44-fach bis 7,7-fach im Vergleich zu den unstimulierten Zellen (Abb. 24B). Da IFN $\alpha$  nur bei *M.tb*-Extrakt-positiven Spendern IFN $\gamma$  induzierte (Abb. 16A), diente die *M.tb*-negative Kohorte als Kontrollgruppe. Sowohl bei *M.tb*-Extrakt-positiven Spendern (1,91-fach) als auch bei *M.tb*-Extrakt-negativen Spendern (1,37-fach) kam es nach Stimulation mit *M.tb*-Extrakt zu einer diskreten Erhöhung der IFN $\alpha$ R1-mRNA Expression (Abb.

24C). Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen war jedoch nicht signifikant, sodass die Hochregulation des IFN $\alpha$ -Rezeptors als alleinige Ursache für die IFN $\alpha$ -induzierte IFN $\gamma$ -Freisetzung unwahrscheinlich ist.

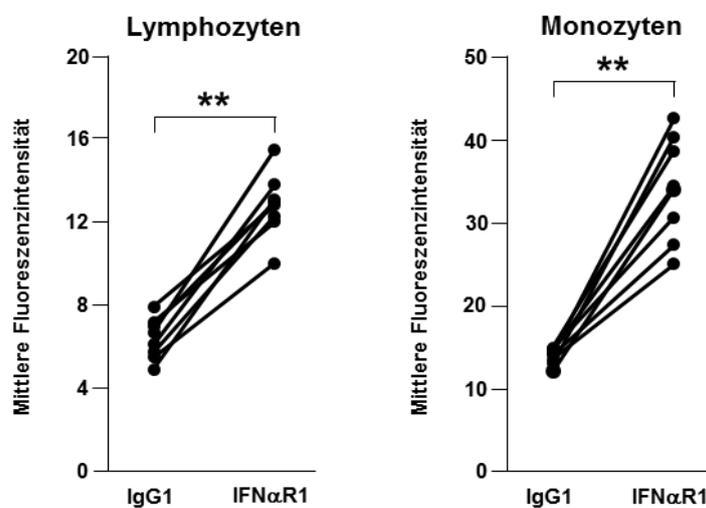


**Abbildung 24: Einfluss von IFN $\gamma$  und *M.tb*-Extrakt auf die IFN $\alpha$ -Rezeptor1-mRNA-Expression**

PBMC wurden für 2 h mit 0,5  $\mu$ g/ml IFN $\gamma$  bzw. 5  $\mu$ g/ml *M.tb*-Extrakt stimuliert. Danach wurde die RNA isoliert, eine reverse Transkription durchgeführt und die cDNA mittels LightCycler-PCR amplifiziert und quantifiziert. A) Repräsentatives Ergebnis einer LightCycler-PCR 2 h nach Stimulation. B) n-fache mRNA-Expression von IFN $\alpha$ R1 2 h nach Stimulation mit IFN $\gamma$ , bezogen auf die konstante Expression von  $\beta$ -Aktin (n=8). C) n-fache mRNA-Expression von IFN $\alpha$ R1 2 h nach Stimulation mit *M.tb*-Extrakt für *M.tb*-Extrakt-positive und *M.tb*-Extrakt-negative Spender, bezogen auf die konstante Expression von  $\beta$ -Aktin (jeweils n=4). Die Ergebnisse sind angegeben als Mittelwert + Standardfehler;  $p \leq 0,01$  (\*\*). (Universitätsklinikum Ulm, 2015)

**Abkürzungen:** cDNA=komplementäre Desoxyribonukleinsäure; IFN $\alpha$ =Interferon- $\alpha$ ; IFN $\alpha$ R1=Interferon- $\alpha$ -Rezeptor1; IFN $\gamma$ =Interferon- $\gamma$ ; mRNA=Boten-Ribonukleinsäure *M.tb*=*Mycobacterium tuberculosis*; PBMC=periphere mononukleäre Zellen; PCR=Polymerase-Kettenreaktion.

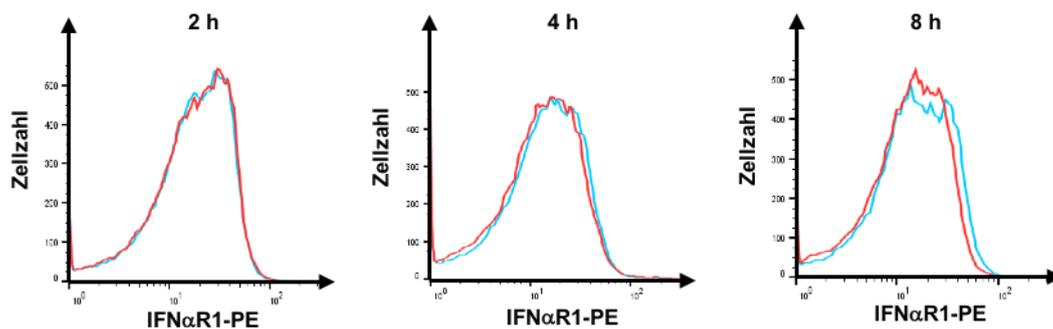
Um zu untersuchen, ob  $\text{IFN}\gamma$  und *M.tb*-Extrakt die Expression des  $\text{IFN}\alpha$ -Rezeptors auf Proteinebene modulieren, wurde die  $\text{IFN}\alpha\text{R1}$ -Expression auf PBMC im Durchflusszytometer analysiert. In den Lymphozyten- und Monozytenpopulationen zeigte sich eine signifikant erhöhte mittlere Fluoreszenzintensität im Vergleich zum IgG1-Isotyp (Abb. 25). Der  $\text{IFN}\alpha\text{R}$  wird demzufolge auf Lymphozyten und Monozyten exprimiert. Auf dieser Grundlage wurde überprüft, ob die antigenspezifische Stimulation mit *M.tb*-Extrakt bzw.  $\text{IFN}\gamma$  zu einer Hochregulation des  $\text{IFN}\alpha\text{R}$  führt.



**Abbildung 25: Nachweis des  $\text{IFN}\alpha$ -Rezeptor1 auf der Oberfläche von Lymphozyten und Monozyten**

Zusammenfassende Darstellung der  $\text{IFN}\alpha$ -Rezeptor1-Expression auf Lymphozyten und Monozyten basierend auf der mittleren Fluoreszenzintensität (jeweils n=8). Jede Linie repräsentiert einen individuellen Spender,  $p \leq 0,05$  (\*) bzw.  $p \leq 0,01$  (\*\*). (Universitätsklinikum Ulm, 2015) **Abkürzungen:**  $\text{IFN}\alpha\text{R1}$ =Interferon- $\alpha$ -Rezeptor1; IgG1=ImmunglobulinG1.

Nach Inkubation mit  $\text{IFN}\gamma$  zeigte sich eine diskrete Hochregulation des  $\text{IFN}\alpha\text{R}$  gegenüber unstimulierten Zellen (Abb. 26). Entsprechend war die mittlere Fluoreszenzintensität im Vergleich zu den unstimulierten Zellen zu allen untersuchten Zeitpunkten erhöht (Daten nicht gezeigt). Die Inkubation mit *M.tb*-Extrakt führte zu keiner erhöhten Expression des  $\text{IFN}\alpha\text{R}$  (Daten nicht gezeigt). Dies legt nahe, dass die Freisetzung von  $\text{IFN}\gamma$  durch  $\text{IFN}\alpha$  nicht durch eine Hochregulation des  $\text{IFN}\alpha\text{R}$  verursacht wird.



**Abbildung 26: Einfluss von  $\text{IFN}\gamma$  auf die  $\text{IFN}\alpha\text{R1}$ -Expression**

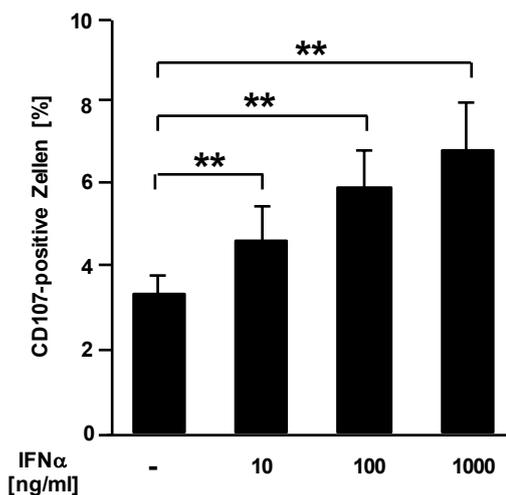
PBMC wurden für 2, 4 und 8 h mit 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$   $\text{IFN}\gamma$  stimuliert (blaue Linie), anschließend wurde für 30 min mit anti- $\text{IFN}\alpha\text{R1}$  Antikörper gefärbt und die Zellen am Durchflusszytometer aufgenommen. Als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen (rote Linie). Ein repräsentativer von insgesamt fünf unabhängigen Spendern. (Universitätsklinikum Ulm, 2015)

**Abkürzungen:**  $\text{IFN}\alpha\text{R1}$ =Interferon- $\alpha$  Rezeptor1;  $\text{IFN}\gamma$ =Interferon- $\gamma$ ; PBMC=periphere mononukleäre Zellen; PE=Phycoerythrin.

### 3.4. Einfluss von Interferon- $\alpha$ und Nilotinib auf die Degranulation von zytotoxischen Lymphozyten

Vorangegangene Experimente hatten gezeigt, dass IFN $\alpha$  vor allem in den zytotoxischen Lymphozytenpopulationen (CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen und NK-Zellen) die IFN $\gamma$ -Freisetzung steigert (Abb. 21). Im Folgenden wurde daher untersucht, ob IFN $\alpha$  und Nilotinib die Degranulation von zytotoxischen Lymphozyten modulieren. Hierfür wurde die Expression von CD107a durchflusszytometrisch gemessen, da diese mit der Degranulation und Freisetzung von zytotoxischen Substanzen korreliert (Abb. 8).

IFN $\alpha$  führte zu einer signifikanten, dosisabhängigen Steigerung der CD107-Expression auf PBMC (Abb. 27). Verglichen mit der Kontrolle (3,4 %) führte die Stimulation mit 10, 100 bzw. 1000 ng/ml IFN $\alpha$  zu einer Zunahme auf 4,8 %, 6,0 % bzw. 7,0 % an CD107-positiven Zellen. Diese Befunde zeigen, dass IFN $\alpha$  neben der IFN $\gamma$ -Freisetzung auch die Degranulation von PBMC steigert.

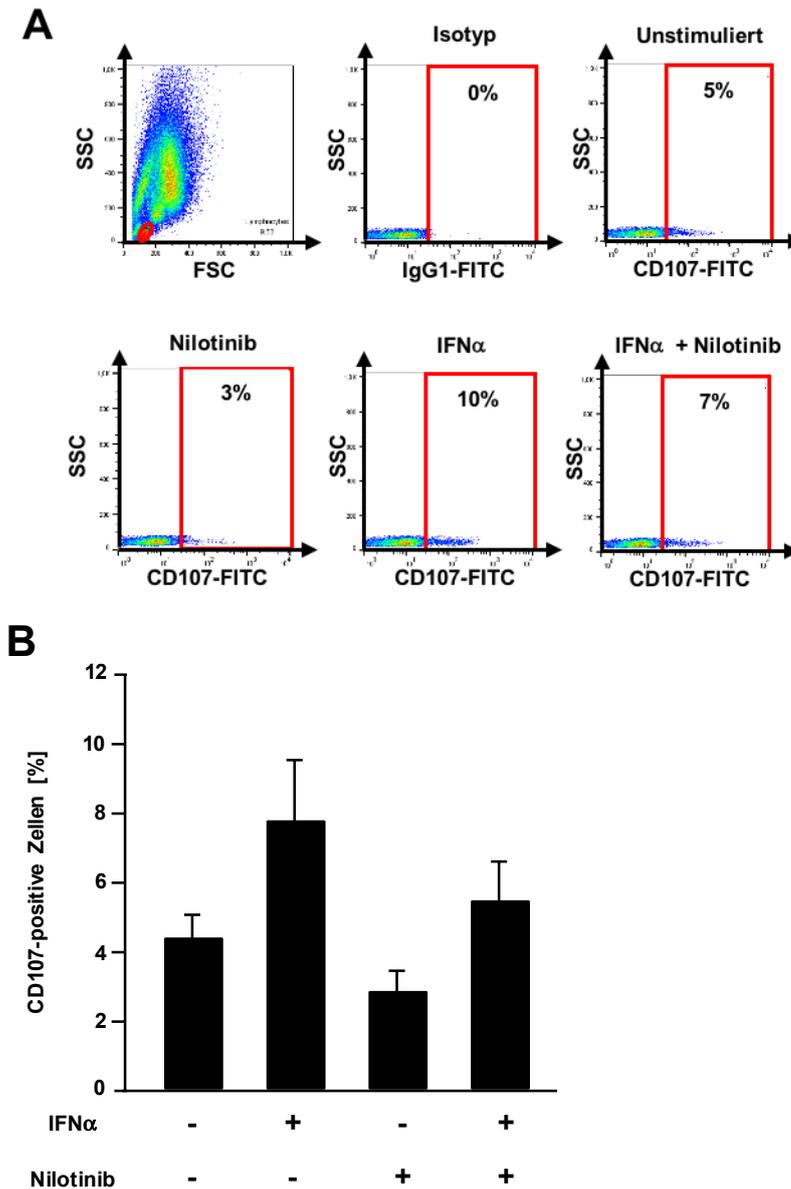


**Abbildung 27: Einfluss von IFN $\alpha$  auf die CD107-Expression von peripheren mononukleären Zellen**

Je  $1 \times 10^6$  PBMC wurden über Nacht mit  $2 \times 10^6$  K562-Zellen und 10 ng/ml, 100 ng/ml bzw. 1000 ng/ml IFN $\alpha$  stimuliert. Die CD107a-Expression wurde durchflusszytometrisch quantifiziert (n=7). Die Ergebnisse sind angegeben als Mittelwert + Standardfehler;  $p \leq 0,01$  (\*\*). (Universitätsklinikum Ulm, 2015)

**Abkürzungen:** CD=Cluster of Differentiation; IFN $\alpha$ =Interferon- $\alpha$ ; PBMC=periphere mononukleäre Zellen.

Abschließend wurde untersucht, welchen Einfluss Nilotinib und die Kombination von Nilotinib mit  $\text{IFN}\alpha$  auf die Degranulation von zytotoxischen Lymphozyten hat. PBMC wurden hierfür mit  $\text{IFN}\alpha$  und Nilotinib inkubiert und der Anteil CD107-positiver Zellen durchflusszytometrisch gemessen (Abb. 28).



**Abbildung 28: Einfluss von  $\text{IFN}\alpha$  und Nilotinib auf die CD107-Expression von peripheren mononukleären Zellen**

PBMC wurden mit 100 ng/ml  $\text{IFN}\alpha$  und 2.5  $\mu\text{g/ml}$  Nilotinib über Nacht inkubiert. Nach Zugabe der K562-Zellen wurde die CD107-Expression durchflusszytometrisch ermittelt. A) Ein repräsentativer von insgesamt drei unabhängigen Spendern. B) Einfluss von  $\text{IFN}\alpha$  und Nilotinib auf den prozentualen Anteil CD107-positiver Zellen ( $n=3$ ). Die Ergebnisse sind angegeben als Mittelwert + Standardfehler. (Universitätsklinikum Ulm, 2015) **Abkürzungen:** CD=Cluster of Differentiation; FITC=Fluoresceinisothiocyanat; FSC=forward scatter;  $\text{IFN}\alpha$ =Interferon- $\alpha$ ; IgG1=ImmunglobulinG1; PBMC=periphere mononukleäre Zellen; SSC=sideward scatter.

Nilotinib reduzierte den Anteil CD107-positiver Zellen von 4,4 % in der Mediumkontrolle auf 2,9 % (Abb. 28B). Demzufolge hemmt Nilotinib neben der Zytokin-freisetzung auch die Degranulation aktivierter humaner PBMC. Bei allen drei Spendern führte die zeitgleiche Stimulation mit IFN $\alpha$  annähernd zu einer Verdoppelung des Anteils CD107-positiver Zellen und lag durchschnittlich bei 5,6 % (Abb. 28B). Damit lag der Anteil CD107-positiver Zellen trotz des inhibitorischen Einflusses von Nilotinib über dem der Mediumkontrolle.

Zusammenfassend wurden folgende Leitbefunde erhoben:

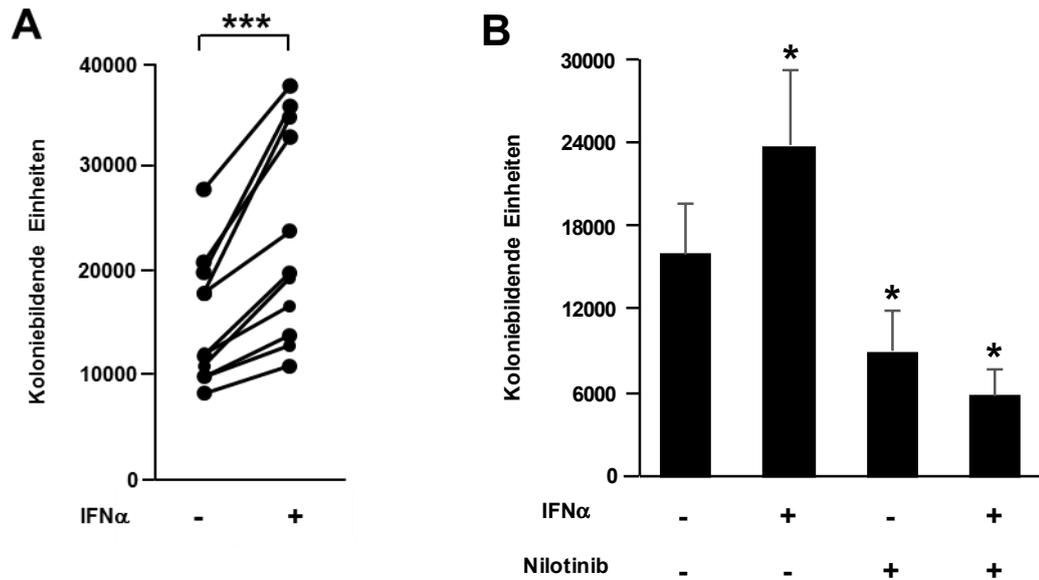
1. IFN $\alpha$  steigert die Degranulation von zytotoxischen Lymphozyten.
2. Nilotinib hemmt die Degranulation von zytotoxischen Lymphozyten.
3. IFN $\alpha$  antagonisiert die nilotinibinduzierte Hemmung der Degranulation.

### **3.5. Einfluss von Interferon- $\alpha$ und Nilotinib auf das intrazelluläre Wachstum von *Mycobacterium tuberculosis***

Die bisherigen Experimente haben gezeigt, dass IFN $\alpha$  allein die Freisetzung von IFN $\gamma$  und die Aktivität zytotoxischer Lymphozyten aktiviert. Damit steigert IFN $\alpha$  zwei zentrale Effektorfunktionen des erworbenen Immunsystems, die für die Kontrolle der Tuberkulose entscheidend sind. In Kombination mit Nilotinib antagonisiert IFN $\alpha$  den hemmenden Effekt von Nilotinib auf diese Effektorfunktionen, ohne die nilotinib-induzierte Ansäuerung von Makrophagen zu beeinträchtigen. Als entscheidende Funktion wurde jetzt geprüft, ob aus der Steigerung der Zytokinfreisetzung und Degranulation eine Reduktion des intrazellulären Wachstums von virulenten Mykobakterien resultiert. Dazu wurden Monozyten mit *M. tuberculosis* infiziert und mit IFN $\alpha$  und Nilotinib inkubiert. Zu den Monozyten wurden autologe PBMC im Verhältnis 1:10 gegeben, was dem physiologischen Anteil der Monozyten entspricht. Nach fünf Tagen wurde die Anzahl lebendiger Mykobakterien durch Ausplattierung bestimmt (Abb. 29).

Trotz Aktivierung der Zytokinfreisetzung und Degranulation von Lymphozyten führte die alleinige Inkubation mit IFN $\alpha$  zu einer signifikanten Zunahme der KBE in allen 11 untersuchten Spendern von 20354 +/- 3740 im Kontrollansatz auf durchschnittlich 31562 +/- 5926 (Abb. 29A). Nilotinib reduzierte die Anzahl der KBE signifikant von 16040 +/- 3510 in der Mediumkontrolle auf 8990 +/- 2972. In Kombination mit Nilotinib führte IFN $\alpha$  zur stärksten Reduktion des mykobakteriellen Wachstums auf durchschnittlich 5840 +/- 1883 KBE (Abb. 29B).

IFN $\alpha$  hat folglich einen ambivalenten Effekt auf das Wachstum von *M. tuberculosis*. Während IFN $\alpha$  allein das mykobakterielle Wachstum steigert, führt IFN $\alpha$  in Kombination mit Nilotinib zu einer vermehrten Hemmung des Wachstums von *M. tuberculosis* (Abb. 30).



**Abbildung 29: Einfluss von IFN $\alpha$  und Nilotinib auf das intrazelluläre Wachstum von *M. tuberculosis* in Monozyten**  
 Je  $2 \times 10^5$  Monozyten wurden mit *M. tuberculosis* infiziert (MOI5). Anschließend wurden  $1 \times 10^6$  nichtadhärente, autologe PBMC im Verhältnis 1:10 dazugegeben und mit A) 100 ng/ml IFN $\alpha$  bzw. B) 100 ng/ml IFN $\alpha$  +/- 2.5  $\mu$ g/ml Nilotinib inkubiert. Nach fünf Tagen wurden die Zellen lysiert und zur Quantifizierung der koloniebildenden Einheiten für 14 Tage auf einer 7H11-Agarplatte ausplattiert. A) Jede Linie repräsentiert einen individuellen Spender (n=11),  $p \leq 0,001$  (\*\*\*). B) Die Ergebnisse sind angegeben als Mittelwert + Standardfehler (n=5),  $p \leq 0,05$  (\*) bezogen auf Mediumkontrolle. (Universitätsklinikum Ulm, 2015)  
**Abkürzungen:** IFN $\alpha$ =Interferon- $\alpha$ ; MOI=Multiplizität der Infektion; *M. tuberculosis*=*Mycobacterium tuberculosis*; PBMC=periphere mononukleäre Zellen.

	Nilotinib	Interferon- $\alpha$	Nilotinib + Interferon- $\alpha$
<b>Ansäuerung von Lysosomen</b>	↑	=	↑
<b>Interferon-<math>\gamma</math>-Freisetzung</b>	↓↓	↑	↓
<b>Zytotoxische Aktivität</b>	↓	↑↑	↑
<b>Mykobakterielles Wachstum</b>	↓	↑	↓↓

**Abbildung 30: Zusammenfassung der Auswirkungen von Interferon- $\alpha$  und Nilotinib**  
 Grüne Pfeile repräsentieren einen protektiven Einfluss auf die jeweilige Effektorfunktion, rote Pfeile repräsentieren einen negativen Einfluss. In Kombination ergänzen sich die positiven Effekte Interferon- $\alpha$  und Nilotinib. Ohne die Ansäuerung der Lysosomen zu beeinträchtigen, kompensiert Interferon- $\alpha$  die hemmenden Effekte von Nilotinib auf die Lymphozytenfunktion. Die Folge ist ein signifikant vermindertes intrazelluläres Wachstum von Mykobakterien. (Universitätsklinikum Ulm, 2015)

## 4. Diskussion

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass IFN $\alpha$  die Zytokinfreisetzung und Degranulation von zytotoxischen Lymphozyten steigert (Abb. 16A/27). Damit aktiviert IFN $\alpha$  zwei antigenspezifische Effektorfunktionen, die entscheidend für die Immunantwort bei der Tuberkulose sind. Ohne die nilotinibinduzierte Ansäuerung von Makrophagen zu beeinträchtigen, antagonisiert IFN $\alpha$  den hemmenden Einfluss von Nilotinib auf das Immunsystem (Abb. 22C/28). IFN $\alpha$  steigert dadurch die antimykobakterielle Aktivität von Nilotinib und reduziert das intrazelluläre Wachstum von *M. tuberculosis* (Abb. 29B). Die Kombination von IFN $\alpha$  mit Nilotinib ist demzufolge ein vielversprechender immunmodulatorischer Ansatz im Kampf gegen die Tuberkulose.

### 4.1. Einfluss von Interferon- $\alpha/\beta$ auf die Immunabwehr bei der Tuberkulose

IFN $\alpha/\beta$  haben eine zentrale Bedeutung bei der Abwehr und Pathogenese von viralen Infektionen [103]. Aktuell häufen sich Hinweise, dass IFN $\alpha/\beta$  auch den Verlauf von bakteriellen Infektionen beeinflussen. So zeigten IFN $\alpha$ R-defiziente Mäuse, bei denen IFN $\alpha$  nicht aktiv ist, eine verminderte Anfälligkeit gegenüber Infektionen mit *Staphylococcus aureus* [100], *Yersenia pestis* [123], *Francisella tularensis* [61], *Brucella abortus* [30] und *Listeria monocytogenes* [5].

Im Mausmodell wurde gezeigt, dass IFN $\alpha/\beta$  auch den klinischen Verlauf der Infektion mit *M. tuberculosis* verschlechtern:

- Verminderte Letalität IFN $\alpha$ -Rezeptor-defizienter Mäuse [95]
- Erhöhte Letalität durch intranasale Behandlung mit IFN $\alpha/\beta$  [94]
- Erhöhte Letalität durch indirekte Erhöhung der IFN $\alpha$ -Konzentration durch
  - Toll-like Rezeptor Agonisten Poly-ICLC [3]
  - Koinfektion mit *Influenza A-Viren* [135]
- Verminderte Letalität durch Gabe von IFN $\alpha/\beta$ -neutralisierenden Antikörpern [95]

Auch beim Menschen verdichten sich die Hinweise auf einen nachteiligen Effekt von IFN $\alpha/\beta$  bei der Tuberkulose. Besonders wichtig sind die Ergebnisse einer Studie,

bei der die Genexpression im Blut von Patienten mit aktiver Tuberkulose und latenter Tuberkulose verglichen wurde. Es wurden insgesamt 393 Gen-Transkripte identifiziert, deren Expression sich signifikant zwischen den beiden Kohorten unterschied. Bei Patienten mit aktiver Tuberkulose zeigte sich eine gesteigerte Expression von IFN $\gamma$ - und IFN $\alpha$ -induzierten Genen wie STAT1 und STAT2 [10]. Durch erfolgreiche tuberkulostatische Therapie war das IFN-dominante Expressionsmuster bereits nach zwei Wochen nicht mehr nachzuweisen [12]. Die gesteigerte Expression von IFN $\alpha$ -induzierten Transkripten korrelierte zudem mit der Schwere des Krankheitsverlaufes und lieferte damit die ersten genetischen Hinweise auf die Bedeutung von IFN $\alpha/\beta$  bei der Pathogenese der Tuberkulose beim Menschen. Fallberichte und Studien belegen zudem ein gehäuftes Auftreten von Tuberkulose unter Therapie mit IFN $\alpha$  bei Hepatitis-C- und CML-Patienten [1, 33, 49, 88, 143, 164]. Angesichts dieser Fallberichte und unseres Leitbefundes, dass IFN $\alpha$  das Wachstum von *M. tuberculosis in vitro* steigert, sollte vor Beginn einer Therapie mit IFN $\alpha$  ein Screening nach latenter Tuberkulose durchgeführt werden.

Die inhibitorischen Effekte von IFN $\alpha/\beta$  auf das Immunsystem werden über unterschiedliche Signalwege vermittelt. Durch Modulation der Chemokin-Expression induziert IFN $\alpha$  eine Differenzierung von humanen dendritischen Zellen zu *M. tuberculosis*-empfindlichen Wirtsmakrophagen [99]. Darüber hinaus reduziert die Stimulation von Makrophagen mit IFN $\alpha/\beta$  die Expression des IFN $\gamma$ -Rezeptors und die Bindung von IFN $\gamma$  an die Zielzellen [134]. Dadurch werden die Zellen unempfindlicher gegenüber IFN $\gamma$ , wodurch wichtige IFN $\gamma$ -vermittelte antimikrobielle Effektorfunktionen wie die Steigerung der Expression von MHC-II-Molekülen und die Freisetzung von Sauerstoffradikalen gehemmt werden [87, 180]. Dies führt zu einem verstärkten mykobakteriellen Wachstum [104]. Ursächlich dafür ist zudem die verminderte Produktion der proinflammatorischen Zytokine TNF $\alpha$ , IL-12 und IL-1. Dadurch schwächt IFN $\alpha$  die Th1-Antwort [34, 102, 118], die essentiell für eine erfolgreiche Bekämpfung von intrazellulären Bakterien ist. Auch bei Infektionen mit *Mycobacterium leprae* korreliert die Expression von IFN $\alpha/\beta$  mit einem schweren Krankheitsverlauf. In Läsionen von Patienten mit tuberkuloïder Lepra, der leichteren Verlaufsform der Erkrankung, zeigte sich eine hohe Expression von IFN $\gamma$  und antimikrobiellen Genen. Bei Patienten mit der disseminierten Verlaufsform der

Lepra (lepromatöse Lepra) zeigte sich in den nässenden und zum Teil verstümmelnden Läsionen eine hohe Expression von IFN $\beta$  und des antiinflammatorischen Zytokins IL-10. *In vitro* hemmen dabei IFN $\alpha/\beta$  über IL-10 die IFN $\gamma$ -induzierte Vitamin-D-abhängige Freisetzung antimikrobieller Peptide [163].

IFN $\alpha/\beta$  hemmen folglich durch mindestens vier Mechanismen das Immunsystem:

1. Differenzierung von dendritischen Zellen in *M. tuberculosis*-empfindliche Wirtsmakrophagen [99]
2. Induktion von Apoptose in Makrophagen [158]
3. Verminderte Produktion proinflammatorischer Zytokine (TNF $\alpha$ , IL-12, IL-1)
4. Inhibition IFN $\gamma$ -vermittelter Abwehrmechanismen durch
  - verminderte Expression des IFN $\gamma$ -Rezeptors auf Makrophagen [133, 134]
  - Induktion von antiinflammatorischem IL-10 [92, 165]

Diese negativen Effekte sind mögliche Erklärungen für unseren Leitbefund, dass IFN $\alpha$  das intrazelluläre Wachstum von *M. tuberculosis* steigert. Aufgrund des hemmenden Einflusses von IFN $\alpha$  auf das angeborene Immunsystem folgt trotz der gesteigerten Degranulation zytotoxischer Lymphozyten und vermehrten IFN $\gamma$ -Freisetzung keine Kontrolle von *M. tuberculosis*. Die IFN $\alpha$ -induzierte IFN $\gamma$ -Freisetzung ist möglicherweise ineffektiv, weil durch die verminderte Expression des IFN $\gamma$ -Rezeptors die Makrophagen nicht durch IFN $\gamma$  aktiviert werden.

Nilotinib hingegen reduziert durch vermehrte Ansäuerung von Lysosomen trotz Inhibition antigenspezifischer T-Zellfunktionen das intrazelluläre Wachstum von *M. tuberculosis*. Diese Daten unterstreichen die Bedeutung des angeborenen Immunsystems für eine erfolgreiche Kontrolle der Tuberkulose. Unsere Befunde liefern eine Erklärung dafür, warum Personen nach engem Kontakt mit Tuberkulose-Patienten häufig ohne messbare T-Zellantwort gesund bleiben [66, 108]. Zusätzlich sind negative Tuberkulin-Hauttests mit einem geringeren Risiko assoziiert, eine aktive Tuberkulose zu entwickeln [139]. Angesichts unserer Befunde, die eine Aktivierung von Lymphozytenfunktionen durch IFN $\alpha$  zeigen, überrascht es wenig, dass der Einfluss von IFN $\alpha$  auch positive Effekte bei der Immunantwort gegen

Bakterien hat. So unterstützt IFN $\alpha$  die Immunabwehr gegen *Chlamydia trachomatis* [32, 74], *Chlamydia pneumoniae* [141, 142], *Legionella pneumophila* [127], *Shigella flexneri* und *Salmonella typhimurium* [117] sowie unter bestimmten Umständen auch gegen *M. tuberculosis*. So zeigte die adjuvante IFN $\alpha$ -Therapie bei Tuberkulose-Patienten mit defektem IFN $\gamma$ -Rezeptor antimykobakterielle Effekte [8]. Zusätzlich sind Patienten mit einem angeborenen Defekt eines IFN $\alpha$ -induzierten Proteins (ISG15-Mangel) aufgrund einer verminderten Sekretion von IFN $\gamma$  empfänglicher für Tuberkulose-Infektionen [13]. Die Steigerung der IFN $\gamma$ -Produktion ist ein wichtiger Mechanismus, durch den IFN $\alpha/\beta$  die Immunabwehr gegen diese Pathogene unterstützen [51]. Angesichts des hemmenden Einflusses von IFN $\alpha/\beta$  auf die Produktion anderer proinflammatorischen Zytokine wie TNF $\alpha$ , IL-12 und IL-1 ist die IFN $\alpha$ -induzierte IFN $\gamma$ -Freisetzung ein relevanter Befund – insbesondere für unser Verständnis über die Immunabwehr bei Infektionen mit intrazellulären Erregern.

#### **4.2. Mechanismus der Interferon- $\alpha$ -induzierten Interferon- $\gamma$ -Freisetzung**

IFN $\alpha/\beta$  können von nahezu allen Körperzellen gebildet werden. Nach Infektion mit *M. tuberculosis* sezernieren vor allem infizierte Makrophagen und dendritische Zellen IFN $\alpha/\beta$  [40, 84]. Als Folge der Immunantwort gegen *M. tuberculosis* wird vermehrt IFN $\gamma$  sezerniert. Die Wechselwirkungen zwischen IFN $\alpha/\beta$  und IFN $\gamma$  sind komplex und nur ungenügend verstanden [166]. Unsere Ergebnisse zeigen, dass IFN $\alpha$  die Freisetzung von IFN $\gamma$  *in vitro* steigert. In Übereinstimmung mit unseren Befunden führt IFN $\alpha$  auch zu einer vermehrten IFN $\gamma$ -Freisetzung durch humane CD4<sup>+</sup>-T-Zellen [16, 97], CD8<sup>+</sup>-T-Zellen [28] und NK-Zellen [101]. Unsere Daten zeigen, dass NK-Zellen die Hauptproduzenten von IFN $\gamma$  sind. Die IFN $\gamma$ -Freisetzung ist IL-2-abhängig und antigenspezifisch. Auch im Rahmen von Infektionen mit Viren und intrazellulären Bakterien zeigte sich, dass IFN $\alpha/\beta$  die Freisetzung von IFN $\gamma$  induzieren. So kam es nach Infektion von IFN $\alpha$ R-defizienten Maus-Makrophagen mit *Chlamydia pneumoniae* zu einer verminderten Freisetzung von IFN $\gamma$  [141]. Überstände von humanen Makrophagen, die mit Influenza-Viren infiziert wurden, stimulierten T-Zellen zur Freisetzung von IFN $\gamma$  [147]. IFN $\alpha/\beta$  können aber auch die

Freisetzung von  $\text{IFN}_\gamma$  hemmen. So wurde in virusinfizierten Mäusen die  $\text{IFN}_\gamma$ -Freisetzung von NK- und T-Zellen durch endogene  $\text{IFN}_{\alpha/\beta}$  inhibiert [113].

Die initialen Befunde dieser Arbeit führten zu der Frage, wie  $\text{IFN}_{\alpha/\beta}$  die Freisetzung von  $\text{IFN}_\gamma$  induzieren. Bereits bekannt ist, dass  $\text{IFN}_\gamma$  zu einer Hochregulation des  $\text{IFN}_{\alpha}R1$  in humanen Epithelzellen führt [107]. Daher postulierten wir, dass  $\text{IFN}_\gamma$  den  $\text{IFN}_{\alpha}R$  hochreguliert und so die Empfindlichkeit für  $\text{IFN}_{\alpha}$  steigert. Nach Stimulation mit *M.tb*-Extrakt zeigten sich jedoch keine Unterschiede in der Expression des  $\text{IFN}_{\alpha}R$  zwischen *M.tb*-Extrakt-negativen und *M.tb*-Extrakt-positiven Spendern. Demzufolge ist die Freisetzung von  $\text{IFN}_\gamma$  durch  $\text{IFN}_{\alpha}$  nicht durch eine vermehrte Expression des  $\text{IFN}_{\alpha}$ -Rezeptors bedingt. Ein alternativer Mechanismus ist die Modulation des JAK-STAT-Signalwegs. Bedeutend für die Produktion von  $\text{IFN}_\gamma$  und die Induktion einer Th1-Antwort ist die Phosphorylierung von STAT4 [52, 85]. Einer der wichtigsten Induktoren von  $\text{IFN}_\gamma$  ist IL-12, indem es über die Phosphorylierung von Tyrosin- oder Serinresten STAT4 aktiviert [26]. Auch  $\text{IFN}_{\alpha/\beta}$  stimulieren die  $\text{IFN}_\gamma$ -Freisetzung durch Steigerung der Expression von phosphoryliertem STAT4 (pSTAT4) [22, 138]. An virusinfizierten Mäusen wurde gezeigt, dass  $\text{IFN}_{\alpha/\beta}$  zu Beginn der Infektion STAT4 aktivieren und dadurch die Freisetzung von  $\text{IFN}_\gamma$  induzieren [93]. Durch Aktivierung von STAT1 durch  $\text{IFN}_\gamma$  und  $\text{IFN}_{\alpha/\beta}$  wird im Laufe der Infektion pSTAT4 verdrängt und die Freisetzung von  $\text{IFN}_\gamma$  gehemmt [114]. Als negativer Feedback-Mechanismus hemmt dabei  $\text{IFN}_\gamma$  durch Phosphorylierung von STAT1 seine eigene Freisetzung [106]. Wir konnten zeigen, dass die  $\text{IFN}_{\alpha}$ -induzierte  $\text{IFN}_\gamma$ -Freisetzung mit einer gesteigerten Expression von pSTAT1 und pSTAT4 assoziiert war. Simultane Stimulation mit mykobakteriellen Antigenen und  $\text{IFN}_{\alpha}$  führte zur vermehrten Freisetzung von  $\text{IFN}_\gamma$  (Abb. 16/20) und zu einer synergistischen Zunahme der pSTAT4-Expression.

Mindestens drei verschiedene Wege sind möglich, über die  $\text{IFN}\alpha$  die Freisetzung von  $\text{IFN}\gamma$  via Phosphorylierung von STAT4 induziert:

1.  $\text{IFN}\alpha$  aktiviert STAT4 unabhängig von IL-12 [51].
2.  $\text{IFN}\alpha$  aktiviert STAT4 indirekt durch Induktion von IL-12 [54].
3.  $\text{IFN}\alpha$  und IL-12 steigern synergistisch die Freisetzung von  $\text{IFN}\gamma$  [64].

Unterschiedliche STAT-Expressionsmuster in den Zell-Subtypen könnten darüber hinaus unseren Befund erklären, dass vor allem NK-Zellen vermehrt  $\text{IFN}\gamma$  freisetzen. Stimulation mit  $\text{IFN}\alpha$  aktiviert bevorzugt STAT4 gegenüber STAT1 und induziert dadurch vor allem in diesen Zellen die Sekretion von  $\text{IFN}\gamma$  [101, 106]. Erhöhte Expression von STAT4 ist somit eine mögliche Ursache für die gesteigerte  $\text{IFN}\gamma$ -Produktion von NK-Zellen. Die Expression der STAT-Moleküle ist auch für die Immunabwehr gegen Tuberkulose relevant. So zeigten STAT1- und STAT4-defiziente Mäuse niedrigere  $\text{IFN}\gamma$ -Spiegel und eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber mykobakteriellen Infektionen [159, 160]. Unphosphoryliertes STAT1 hemmt die Apoptose von *M. tuberculosis*-infizierten Maus-Makrophagen und fördert somit die Immunevasion [178]. Beim Menschen sind zwei Mutationen in STAT1-Genen [42, 43] sowie STAT4-Allele [144] beschrieben, die jeweils mit einem erhöhten Risiko an Tuberkulose zu erkranken assoziiert sind. Bei Patienten mit aktiver Tuberkulose zeigte sich im Vergleich zu gesunden Individuen eine verminderte Expression von pSTAT1 [47] und von pSTAT4 [2]. Zusätzlich wurde bei Patienten mit MDR-Tuberkulose eine verminderte Phosphorylierung von STAT1 und STAT4 und eine niedrigere Sekretion von  $\text{IFN}\gamma$ ,  $\text{TNF}\alpha$  und IL-12 nachgewiesen [77]. Basierend auf diesen Befunden bietet die Modulation des  $\text{IFN}\alpha$ -Signalwegs einen Ansatzpunkt für eine immunmodulatorische Therapie der Tuberkulose. Aufgrund des hemmenden Einflusses von  $\text{IFN}\alpha/\beta$  auf das angeborene Immunsystem ist vor allem eine Kombination mit TKI sinnvoll, da sie einen positiven Einfluss auf Effektorfunktionen des angeborenen Immunsystems haben.

### **4.3. Interferon- $\alpha$ und Tyrosinkinaseinhibitoren als immunmodulatorische Therapie gegen Tuberkulose**

Die Abl-Tyrosinkinase reguliert zahlreiche zelluläre Prozesse wie Apoptose [171], Autophagie [46, 179], Migration [126], Mitose [168] und Immunabwehr [183, 184]. Aufgrund ihrer zentralen „Regulator-Funktion“ ist die Abl-Tyrosinkinase häufig Ziel von Pathogenen [6], die dadurch verschiedene Signalwege zu ihrem Vorteil manipulieren. Wechselwirkungen mit der Abl-Tyrosinkinase sind neben *M. tuberculosis* [18] für zahlreiche weitere Bakterien und Viren beschrieben z.B. für *Chlamydia trachomatis* [44], *Escherichia coli* (EPEC) [161], *Helicobacter pylori* [129, 162], *Shigella flexneri* [20], *Pseudomonas aeruginosa* [125], *Salmonella typhimurium* [91], *Coxsackieviren Gruppe B* [27] und für das *Humane Immundefizienz-Virus* [60]. Der Einsatz von TKI als „host-directed therapy“ beruht auf der Neutralisation dieser Manipulation durch die Pathogene. Das Konzept besteht somit nicht in der direkten Attacke des Pathogens, sondern darin, das Immunsystem des Wirts bei der Elimination der Erreger zu unterstützen. Das Auftreten von Resistenzen durch genetische Veränderungen unter Selektionsdruck ist dabei deutlich unwahrscheinlicher als bei der Therapie mit Antibiotika. Aufgrund der rapide steigenden Inzidenz von MDR- und XDR-Tuberkulose sind solche Alternativen dringend notwendig.

Arbeiten im MyTbLab haben gezeigt, dass TKI über die Induktion der vATPase die Ansäuerung von Lysosomen steigern und dadurch das Wachstum von *M. tuberculosis* hemmen [17, 82]. Neben der Hemmung des intrazellulären Wachstums von Mykobakterien fördern TKI die Antigenpräsentation z. B. durch Hochregulation von CD1-Molekülen [148], die entscheidend für die Präsentation von lipidhaltigen Antigenen an T-Zellen sind. Sie antagonisieren somit die *M. tuberculosis*-vermittelte Herunterregulation von CD1-Molekülen [21, 153]. Zudem induzieren TKI die Myelopoese und stärken durch die Zunahme von myeloischen Zellen in Blut und Milz die antimikrobielle Abwehr [112]. Aufgrund ihrer Wirksamkeit in Mäuseversuchen [111] und der guten Verträglichkeit sind klinische Studien in Vorbereitung, die die antimykobakterielle Wirksamkeit von TKI an Tuberkulose-Patienten überprüfen.

Ein Problem bei der Verwendung von TKI als „host-directed therapy“ ist ihr hemmender Einfluss auf grundlegende Prozesse der antigenspezifischen Immunantwort, wie:

1. Produktion der proinflammatorischen Zytokine (Abb. 22) [72, 82, 86, 177]
2. Aktivität zytotoxischer Lymphozyten (Abb. 28)
3. Produktion von Chemokinen [4]
4. Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen [37]
5. Proliferation von T-Zellen [24, 39]

Falls sich dieser negative Einfluss auf das Immunsystem im Rahmen von klinischen Studien als bedeutend herausstellt, könnte die Kombination mit IFN $\alpha$  sinnvoll sein. So wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass IFN $\alpha$  die nilotinibinduzierte Hemmung der IFN $\gamma$ -Freisetzung und Degranulation zytotoxischer Lymphozyten (Abb. 22C/28) antagonisiert. Der negative Einfluss von IFN $\alpha$  auf die Funktion von Monozyten und Makrophagen hingegen wurde durch die nilotinibinduzierte Ansäuerung von Lysosomen kompensiert. Unsere Befunde legen nahe, dass sich die positiven Effekte beider Substanzen auf das Immunsystem ergänzen, da das intrazelluläre Wachstum von *M. tuberculosis* gehemmt wird (Abb. 29B). Die Relevanz unserer Befunde wird durch Fallberichte und Studien unterstützt, die einen protektiven Effekt

von IFN $\alpha$  als adjuvante Therapie bei multiresistenter Tuberkulose belegen [40, 55, 122]. Bei einem 48-jährigen Patienten mit MDR-Tuberkulose kam es nach Gabe von IFN $\alpha$  in Kombination mit Isoniazid, Ethambutol, Rifampicin und Pyrazinamid bereits nach zwei Monaten zu einer Sputumkonversion und zu einer deutlichen klinischen Verbesserung. Zuvor war der Patient acht Monate lang erfolglos leitliniengerecht antibiotisch behandelt worden [181]. In einer anderen Studie waren sieben Patienten sechs Monate lang erfolglos mit einer Zweitlinientherapie tuberkulostatisch behandelt worden. Nach zusätzlicher wöchentlicher Gabe von aerolisiertem IFN $\alpha$  über zwei Monate waren bei fünf Patienten als Ausdruck eines Rückgangs der Infektion keine Mykobakterien mehr im Sputum nachweisbar [56]. Diese Befunde unterstreichen das Potential von IFN $\alpha$ , den Verlauf einer Tuberkulose günstig zu beeinflussen. Unsere Daten zeigen allerdings auch, dass IFN $\alpha$  das intrazelluläre Wachstum von *M. tuberculosis* fördert. Möglicherweise führt IFN $\alpha$  durch Steigerung des Wachstums von Mykobakterien zu einem verbesserten Ansprechen gegenüber Tuberkulostatika [40].

In Kombination mit Nilotinib zeigte sich, dass IFN $\alpha$  das intrazelluläre Wachstum von *M. tuberculosis* verstärkt inhibiert. Falls sich die positiven Effekte beider Substanzen auf das Immunsystem auch *in vivo* ergänzen, wäre dies ein Schritt in Richtung einer immunmodulatorischen Therapie gegen Tuberkulose. Solche Alternativen sind insbesondere für Patienten mit MDR- oder XDR-Tuberkulose entscheidend, bei denen klassische Antibiotika kaum mehr Wirkung zeigen.

## 5. Zusammenfassung

Die Tuberkulose ist eine der Infektionskrankheiten mit der höchsten Morbidität und Mortalität weltweit. Aufgrund der Zunahme von Infektionen mit resistenten Mykobakterien und dem Fehlen einer effektiven Impfung ist die Entwicklung neuer Therapieoptionen dringend erforderlich. Ein innovativer Ansatz besteht darin, das Immunsystem bei der Bekämpfung der Infektionserreger direkt zu unterstützen („host-directed therapy“). Ein in unserem Labor entwickeltes Konzept propagiert den Einsatz von Tyrosinkinaseinhibitoren wie Nilotinib, da sie antimykobakterielle Effektormechanismen in humanen Makrophagen aktivieren. Ein Nachteil von Nilotinib ist allerdings, dass T-Zellfunktionen, die zur Abwehr der Tuberkulose beitragen, gehemmt werden. Ziel dieser Arbeit war es zu prüfen, ob Interferon- $\alpha$ , ein zentrales Zytokin bei der Abwehr von zahlreichen Viren und Bakterien, die nachteiligen Wirkungen von Nilotinib antagonisieren kann. In der vorliegenden Arbeit wurde daher der Einfluss von Interferon- $\alpha$  auf zentrale Effektorfunktionen humaner Lymphozyten untersucht, die essentiell für die Abwehr gegen *Mycobacterium tuberculosis* sind.

Folgende Schlüsselergebnisse wurden erzielt:

1. Interferon- $\alpha$  steigert das intrazelluläre Wachstum von *Mycobacterium tuberculosis* trotz antigenspezifischer Aktivierung von Lymphozyten.
2. Interferon- $\alpha$  antagonisiert den hemmenden Einfluss von Nilotinib auf die Zytokinfreisetzung und Degranulation von zytotoxischen Lymphozyten.
3. Interferon- $\alpha$  führt in Kombination mit Nilotinib zu einer verstärkten Hemmung des intrazellulären Wachstums von *Mycobacterium tuberculosis*.

Der etablierte Immunmodulator Interferon- $\alpha$  besitzt folglich das Potential, die negativen Auswirkungen der Tyrosinkinaseinhibitoren auf die Funktion von Lymphozyten zu antagonisieren. Die positiven Eigenschaften beider Substanzen auf das Immunsystem ergänzen sich, woraus eine gesteigerte Kontrolle des

mykobakteriellen Wachstums resultiert. Zukünftig könnten derartige kombinierte Strategien zur Modulation des Immunsystems eine wichtige Ergänzung zum Arsenal im Kampf gegen die Tuberkulose werden.

**6. Literaturverzeichnis**

- [1] Abutidze A, Bolokadze N, Chkhartishvili N, Sharvadze L, Tsertsvadze T: Incidence of tuberculosis among HIV/HCV co-infected patients receiving Hepatitis C treatment with pegylated Interferon and Ribavirin in Georgia. *Georgian Med News* 10-5. (2016)
- [2] Allan NC: Therapeutic options in chronic myeloid leukaemia. *Blood Rev* 3: 45-52. (1989)
- [3] Antonelli LR, Gigliotti Rothfuchs A, Goncalves R, Roffe E, Cheever AW, Bafica A, Salazar AM, Feng CG, Sher A: Intranasal Poly-IC treatment exacerbates tuberculosis in mice through the pulmonary recruitment of a pathogen-permissive monocyte/macrophage population. *J Clin Invest* 120: 1674-82. (2010)
- [4] Appel S, Rupf A, Weck MM, Schoor O, Brummendorf TH, Weinschenk T, Grunebach F, Brossart P: Effects of imatinib on monocyte-derived dendritic cells are mediated by inhibition of nuclear factor-kappaB and Akt signaling pathways. *Clin Cancer Res* 11: 1928-40. (2005)
- [5] Auerbuch V, Brockstedt DG, Meyer-Morse N, O'Riordan M, Portnoy DA: Mice lacking the type I interferon receptor are resistant to *Listeria monocytogenes*. *J Exp Med* 200: 527-33. (2004)
- [6] Backert S, Feller SM, Wessler S: Emerging roles of Abl family tyrosine kinases in microbial pathogenesis. *Trends Biochem Sci* 33: 80-90. (2008)
- [7] Banchereau J, Steinman RM: Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392: 245-52. (1998)
- [8] Bax HI, Freeman AF, Ding L, Hsu AP, Marciano B, Kristosturyan E, Jancel T, Spalding C, Pechacek J, Olivier KN, Barnhart LA, Boris L, Frein C, Claypool RJ, Anderson V, Zerbe CS, Holland SM, Sampaio EP: Interferon alpha treatment of

patients with impaired interferon gamma signaling. *J Clin Immunol* 33: 991-1001. (2013)

[9] Bekisz J, Baron S, Balinsky C, Morrow A, Zoon KC: Antiproliferative Properties of Type I and Type II Interferon. *Pharmaceuticals (Basel)* 3: 994-1015. (2010)

[10] Berry MP, Graham CM, McNab FW, Xu Z, Bloch SA, Oni T, Wilkinson KA, Banchereau R, Skinner J, Wilkinson RJ, Quinn C, Blankenship D, Dhawan R, Cush JJ, Mejias A, Ramilo O, Kon OM, Pascual V, Banchereau J, Chaussabel D, O'Garra A: An interferon-inducible neutrophil-driven blood transcriptional signature in human tuberculosis. *Nature* 466: 973-7. (2010)

[11] Betts MR, Brenchley JM, Price DA, De Rosa SC, Douek DC, Roederer M, Koup RA: Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells by a flow cytometric assay for degranulation. *J Immunol Methods* 281: 65-78. (2003)

[12] Bloom CI, Graham CM, Berry MP, Wilkinson KA, Oni T, Rozakeas F, Xu Z, Rossello-Urgell J, Chaussabel D, Banchereau J, Pascual V, Lipman M, Wilkinson RJ, O'Garra A: Detectable changes in the blood transcriptome are present after two weeks of antituberculosis therapy. *PLoS One* 7: e46191. (2012)

[13] Bogunovic D, Byun M, Durfee LA, Abhyankar A, Sanal O, Mansouri D, Salem S, Radovanovic I, Grant AV, Adimi P, Mansouri N, Okada S, Bryant VL, Kong XF, Kreins A, Velez MM, Boisson B, Khalilzadeh S, Ozcelik U, Darazam IA, Schoggins JW, Rice CM, Al-Muhsen S, Behr M, Vogt G, Puel A, Bustamante J, Gros P, Huibregtse JM, Abel L, Boisson-Dupuis S, Casanova JL: Mycobacterial disease and impaired IFN-gamma immunity in humans with inherited ISG15 deficiency. *Science* 337: 1684-8. (2012)

[14] Bohn JP, Gastl G, Steurer M: Long-term treatment of hairy cell leukemia with interferon-alpha: still a viable therapeutic option. *Memo* 9: 63-65. (2016)

- [15] Bouazzi OE, Hammi S, Bourkadi JE, Tebaa A, Tanani DS, Soulaymani-Bencheikh R, Badrane N, Bengueddour R: First line anti-tuberculosis induced hepatotoxicity: incidence and risk factors. *Pan Afr Med J* 25: 167. (2016)
- [16] Brinkmann V, Geiger T, Alkan S, Heusser CH: Interferon alpha increases the frequency of interferon gamma-producing human CD4+ T cells. *J Exp Med* 178: 1655-63. (1993)
- [17] Bruns H: Die Funktion der Abl-Tyrosinkinase bei der angeborenen Immunabwehr gegen *Mycobacterium tuberculosis*. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades Dr. rer. nat. der Fakultät für Naturwissenschaften der Universität Ulm. (2010)
- [18] Bruns H, Stegelmann F, Fabri M, Dohner K, van Zandbergen G, Wagner M, Skinner M, Modlin RL, Stenger S: Abelson tyrosine kinase controls phagosomal acidification required for killing of *Mycobacterium tuberculosis* in human macrophages. *J Immunol* 189: 4069-78. (2012)
- [19] Bruns H, Stenger S: New insights into the interaction of *Mycobacterium tuberculosis* and human macrophages. *Future Microbiol* 9: 327-41. (2014)
- [20] Burton EA, Plattner R, Pendergast AM: Abl tyrosine kinases are required for infection by *Shigella flexneri*. *Embo j* 22: 5471-9. (2003)
- [21] Busch M, Herzmann C, Kallert S, Zimmermann A, Hofer C, Mayer D, Zenk SF, Muche R, Lange C, Bloom BR, Modlin RL, Stenger S: Lipoarabinomannan-Responsive Polycytotoxic T Cells Are Associated with Protection in Human Tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 194: 345-55. (2016)
- [22] Byrnes AA, Li DY, Park K, Thompson D, Mocilnikar C, Mohan P, Molleston JP, Narkewicz M, Zhou H, Wolf SF, Schwarz KB, Karp CL: Modulation of the IL-12/IFN-gamma axis by IFN-alpha therapy for hepatitis C. *J Leukoc Biol* 81: 825-34. (2007)

- [23] Carr RE, Henkind P: Ocular manifestations of ethambutol, Toxic amblyopia after administration of an experimental antituberculous drug. *Arch Ophthalmol* 67: 566-71. (1962)
- [24] Chen J, Schmitt A, Giannopoulos K, Chen B, Rojewski M, Dohner H, Bunjes D, Schmitt M: Imatinib impairs the proliferation and function of CD4+CD25+ regulatory T cells in a dose-dependent manner. *Int J Oncol* 31: 1133-9. (2007)
- [25] Cho S, Mehra V, Thoma-Uszynski S, Stenger S, Serbina N, Mazzaccaro RJ, Flynn JL, Barnes PF, Southwood S, Celis E, Bloom BR, Modlin RL, Sette A: Antimicrobial activity of MHC class I-restricted CD8+ T cells in human tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 12210-5. (2000)
- [26] Cho SS, Bacon CM, Sudarshan C, Rees RC, Finbloom D, Pine R, O'Shea JJ: Activation of STAT4 by IL-12 and IFN-alpha: evidence for the involvement of ligand-induced tyrosine and serine phosphorylation. *J Immunol* 157: 4781-9. (1996)
- [27] Coyne CB, Bergelson JM: Virus-induced Abl and Fyn kinase signals permit coxsackievirus entry through epithelial tight junctions. *Cell* 124: 119-31. (2006)
- [28] Curtsinger JM, Valenzuela JO, Agarwal P, Lins D, Mescher MF: Type I IFNs provide a third signal to CD8 T cells to stimulate clonal expansion and differentiation. *J Immunol* 174: 4465-9. (2005)
- [29] Darnell JE, Jr., Kerr IM, Stark GR: Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 264: 1415-21. (1994)
- [30] de Almeida LA, Carvalho NB, Oliveira FS, Lacerda TL, Vasconcelos AC, Nogueira L, Bafica A, Silva AM, Oliveira SC: MyD88 and STING signaling pathways are required for IRF3-mediated IFN-beta induction in response to *Brucella abortus* infection. *PLoS One* 6: e23135. (2011)

- [31] de Groen RA, Boltjes A, Hou J, Liu BS, McPhee F, Friberg J, Janssen HL, Boonstra A: IFN-lambda-mediated IL-12 production in macrophages induces IFN-gamma production in human NK cells. *Eur J Immunol* 45: 250-9. (2015)
- [32] de la Maza LM, Peterson EM, Goebel JM, Fennie CW, Czarniecki CW: Interferon-induced inhibition of *Chlamydia trachomatis*: dissociation from antiviral and antiproliferative effects. *Infect Immun* 47: 719-22. (1985)
- [33] de Oliveira Uehara SN, Emori CT, Perez RM, Mendes-Correa MC, de Souza Paiva Ferreira A, de Castro Amaral Feldner AC, Silva AE, Filho RJ, de Souza ESIS, Ferraz ML: High incidence of tuberculosis in patients treated for hepatitis C chronic infection. *Braz J Infect Dis* 20: 205-9. (2016)
- [34] de Paus RA, van Wengen A, Schmidt I, Visser M, Verdegaal EM, van Dissel JT, van de Vosse E: Inhibition of the type I immune responses of human monocytes by IFN-alpha and IFN-beta. *Cytokine* 61: 645-55. (2013)
- [35] de Weerd NA, Samarajiwa SA, Hertzog PJ: Type I interferon receptors: biochemistry and biological functions. *J Biol Chem* 282: 20053-7. (2007)
- [36] Delgado C, Francis GE, Fisher D: The uses and properties of PEG-linked proteins. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 9: 249-304. (1992)
- [37] Dewar AL, Cambareri AC, Zannettino AC, Miller BL, Doherty KV, Hughes TP, Lyons AB: Macrophage colony-stimulating factor receptor c-fms is a novel target of imatinib. *Blood* 105: 3127-32. (2005)
- [38] Di Trollo R, Simeone E, Di Lorenzo G, Buonerba C, Ascianto PA: The use of interferon in melanoma patients: a systematic review. *Cytokine Growth Factor Rev* 26: 203-12. (2015)
- [39] Dietz AB, Souan L, Knutson GJ, Bulur PA, Litzow MR, Vuk-Pavlovic S: Imatinib mesylate inhibits T-cell proliferation in vitro and delayed-type hypersensitivity in vivo. *Blood* 104: 1094-9. (2004)

- [40] Donovan ML, Schultz TE, Duke TJ, Blumenthal A: Type I Interferons in the Pathogenesis of Tuberculosis: Molecular Drivers and Immunological Consequences. *Front Immunol* 8: (2017)
- [41] Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, Peng B, Buchdunger E, Ford JM, Lydon NB, Kantarjian H, Capdeville R, Ohno-Jones S, Sawyers CL: Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 344: 1031-7. (2001)
- [42] Dupuis S, Dargemont C, Fieschi C, Thomassin N, Rosenzweig S, Harris J, Holland SM, Schreiber RD, Casanova JL: Impairment of mycobacterial but not viral immunity by a germline human STAT1 mutation. *Science* 293: 300-3. (2001)
- [43] Dupuis S, Jouanguy E, Al-Hajjar S, Fieschi C, Al-Mohsen IZ, Al-Jumaah S, Yang K, Chapgier A, Eidenschenk C, Eid P, Al Ghonaium A, Tufenkeji H, Frayha H, Al-Gazlan S, Al-Rayes H, Schreiber RD, Gresser I, Casanova JL: Impaired response to interferon-alpha/beta and lethal viral disease in human STAT1 deficiency. *Nat Genet* 33: 388-91. (2003)
- [44] Elwell CA, Ceesay A, Kim JH, Kalman D, Engel JN: RNA interference screen identifies Abl kinase and PDGFR signaling in *Chlamydia trachomatis* entry. *PLoS Pathog* 4: e1000021. (2008)
- [45] Engele M, Stossel E, Castiglione K, Schwerdtner N, Wagner M, Bolcskei P, Rollinghoff M, Stenger S: Induction of TNF in Human Alveolar Macrophages As a Potential Evasion Mechanism of Virulent *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of Immunology* 168: 1328-37. (2002)
- [46] Ertmer A, Huber V, Gilch S, Yoshimori T, Erfle V, Duyster J, Elsassner HP, Schatzl HM: The anticancer drug imatinib induces cellular autophagy. *Leukemia* 21: 936-42. (2007)

- [47] Esquivel-Solis H, Quinones-Falconi F, Zarain-Herzberg A, Amieva-Fernandez RI, Lopez-Vidal Y: Impaired activation of Stat1 and c-Jun as a possible defect in macrophages of patients with active tuberculosis. *Clin Exp Immunol* 158: 45-54. (2009)
- [48] Falzon D, Jaramillo E, Schunemann HJ, Arentz M, Bauer M, Bayona J, Blanc L, Caminero JA, Daley CL, Duncombe C, Fitzpatrick C, Gebhard A, Getahun H, Hensens M, Holtz TH, Keravec J, Keshavjee S, Khan AJ, Kulier R, Leimane V, Lienhardt C, Lu C, Mariandyshev A, Migliori GB, Mirzayev F, Mitnick CD, Nunn P, Nwagboniwe G, Oxlade O, Palmero D, Pavlinac P, Quelapio MI, Raviglione MC, Rich ML, Royce S, Rusch-Gerdes S, Salakaia A, Sarin R, Sculier D, Varaine F, Vitoria M, Walson JL, Wares F, Weyer K, White RA, Zignol M: WHO guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis: 2011 update. *Eur Respir J* 38: 516-28. (2011)
- [49] Farah R, Awad J: The association of interferon with the development of pulmonary tuberculosis. *Int J Clin Pharmacol Ther* 45: 598-600. (2007)
- [50] Ford N, Shubber Z, Meintjes G, Grinsztejn B, Eholie S, Mills EJ, Davies MA, Vitoria M, Penazzato M, Nsanzimana S, Frigati L, O'Brien D, Ellman T, Ajose O, Calmy A, Doherty M: Causes of hospital admission among people living with HIV worldwide: a systematic review and meta-analysis. *Lancet HIV* 2: e438-44. (2015)
- [51] Freudenberg MA, Merlin T, Kalis C, Chvatchko Y, Stubig H, Galanos C: Cutting Edge: A Murine, IL-12-Independent Pathway of IFN- $\gamma$  Induction by Gram-Negative Bacteria Based on STAT4 Activation by Type I IFN and IL-18 Signaling. *The Journal of Immunology* 169: 1665-68. (2002)
- [52] Frucht DM, Aringer M, Galon J, Danning C, Brown M, Fan S, Centola M, Wu CY, Yamada N, El Gabalawy H, O'Shea JJ: Stat4 is expressed in activated peripheral blood monocytes, dendritic cells, and macrophages at sites of Th1-mediated inflammation. *J Immunol* 164: 4659-64. (2000)

- [53] Fukuda M: Lysosomal membrane glycoproteins. Structure, biosynthesis, and intracellular trafficking. *J Biol Chem* 266: 21327-30. (1991)
- [54] Gautier G, Humbert M, Deauvieu F, Scuiller M, Hiscott J, Bates EE, Trinchieri G, Caux C, Garrone P: A type I interferon autocrine-paracrine loop is involved in Toll-like receptor-induced interleukin-12p70 secretion by dendritic cells. *J Exp Med* 201: 1435-46. (2005)
- [55] Giosue S, Casarini M, Alemanno L, Galluccio G, Mattia P, Pedicelli G, Rebek L, Bisetti A, Ameglio F: Effects of aerosolized interferon-alpha in patients with pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 158: 1156-62. (1998)
- [56] Giosue S, Casarini M, Ameglio F, Zangrilli P, Palla M, Altieri AM, Bisetti A: Aerosolized interferon-alpha treatment in patients with multi-drug-resistant pulmonary tuberculosis. *Eur Cytokine Netw* 11: 99-104. (2000)
- [57] Grant S, Turner AJ, Bartimole TM, Nelms PA, Joe VC, Jarvis WD: Modulation of 1-[beta-D-arabinofuranosyl] cytosine-induced apoptosis in human myeloid leukemia cells by staurosporine and other pharmacological inhibitors of protein kinase C. *Oncol Res* 6: 87-99. (1994)
- [58] Guirado E, Schlesinger LS, Kaplan G: Macrophages in tuberculosis: friend or foe. *Semin Immunopathol* 35: 563-83. (2013)
- [59] Haji Abdolvahab M, Mofrad MR, Schellekens H: Interferon Beta: From Molecular Level to Therapeutic Effects. *Int Rev Cell Mol Biol* 326: 343-72. (2016)
- [60] Harmon B, Campbell N, Ratner L: Role of Abl kinase and the Wave2 signaling complex in HIV-1 entry at a post-hemifusion step. *PLoS Pathog* 6: e1000956. (2010)
- [61] Henry T, Kirimanjeshwara GS, Ruby T, Jones JW, Peng K, Perret M, Ho L, Sauer JD, Iwakura Y, Metzger DW, Monack DM: Type I IFN signaling constrains IL-17A/F secretion by gammadelta T cells during bacterial infections. *J Immunol* 184: 3755-67. (2010)

- [62] Herzmann C, Sotgiu G, Schaberg T, Ernst M, Stenger S, Lange C: Early BCG vaccination is unrelated to pulmonary immunity against *Mycobacterium tuberculosis* in adults. *Eur Respir J* 44: 1087-90. (2014)
- [63] Herzmann C, Sotgiu G, Schaberg T, Ernst M, Stenger S, Lange C: Childhood BCG vaccination does not influence control of *Mycobacterium tuberculosis* growth by human bronchoalveolar lavage cells. *Tuberculosis (Edinb)* 95: 321-7. (2015)
- [64] Hunter CA, Gabriel KE, Radzanowski T, Neyer LE, Remington JS: Type I interferons enhance production of IFN-gamma by NK cells. *Immunol Lett* 59: 1-5. (1997)
- [65] Isaacs A, Lindenmann J: Virus Interference. I. The Interferon. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B - Biological Sciences* 147: 258-67. (1957)
- [66] Israel HL, Hetherington HW, Ord JG: A study of tuberculosis among students of nursing. *Journal of the American Medical Association* 117: 839-44. (1941)
- [67] Ivashkiv LB, Donlin LT: Regulation of type I interferon responses. *Nat Rev Immunol* 14: 36-49. (2014)
- [68] Jabbour E: Chronic myeloid leukemia: First-line drug of choice. *Am J Hematol* 91: 59-66. (2016)
- [69] Jankute M, Cox JA, Harrison J, Besra GS: Assembly of the *Mycobacterium tuberculosis* Cell Wall. *Annu Rev Microbiol* 69: 405-23. (2015)
- [70] Jayachandran R, Sundaramurthy V, Combaluzier B, Mueller P, Korf H, Huygen K, Miyazaki T, Albrecht I, Massner J, Pieters J: Survival of mycobacteria in macrophages is mediated by coronin 1-dependent activation of calcineurin. *Cell* 130: 37-50. (2007)

[71] Junqueira-Kipnis AP, Kipnis A, Jamieson A, Juarrero MG, Diefenbach A, Raulet DH, Turner J, Orme IM: NK cells respond to pulmonary infection with *Mycobacterium tuberculosis*, but play a minimal role in protection. *J Immunol* 171: 6039-45. (2003)

[72] Kallert S: Einfluss der Abl-Tyrosinkinase auf die Aktivierung humaner T-Zellen. Diplomarbeit, Eberhard-Karls-Universität Tübingen. (2012)

[73] Kantarjian H, Shah NP, Hochhaus A, Cortes J, Shah S, Ayala M, Moiraghi B, Shen Z, Mayer J, Pasquini R, Nakamae H, Huguet F, Boque C, Chuah C, Bleickardt E, Bradley-Garelik MB, Zhu C, Szatrowski T, Shapiro D, Baccarani M: Dasatinib versus imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 362: 2260-70. (2010)

[74] Kazar J, Gillmore JD, Gordon FB: Effect of Interferon and Interferon Inducers on Infections with a Nonviral Intracellular Microorganism, *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun* 3: 825-32. (1971)

[75] Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-57. (1972)

[76] Khoo TL, Vangsted AJ, Joshua D, Gibson J: Interferon-alpha in the treatment of multiple myeloma. *Curr Drug Targets* 12: 437-46. (2011)

[77] Kim HJ, Chung DH, Kim MJ, Jang JH, Kim YW, Han SK, Shim YS, Yim JJ: Decreased phosphorylation of STAT-1, STAT-4 and cytokine release in MDR-TB patients with primary resistance. *Int J Tuberc Lung Dis* 12: 1071-6. (2008)

[78] Klein E, Ben-Bassat H, Neumann H, Ralph P, Zeuthen J, Polliack A, Vanky F: Properties of the K562 cell line, derived from a patient with chronic myeloid leukemia. *Int J Cancer* 18: 421-31. (1976)

[79] Konerman MA, Lok AS: Interferon Treatment for Hepatitis B. *Clin Liver Dis* 20: 645-65. (2016)

[80] Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH: Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 84: 1415-20. (1994)

[81] Kornbluth J, Spear B, Raab SS, Wilson DB: Evidence for the role of class I and class II HLA antigens in the lytic function of a cloned line of human natural killer cells. *J Immunol* 134: 728-35. (1985)

[82] Kubis J: Auswirkungen von Abl-Tyrosinkinaseinhibitoren auf die Immunantwort bei der Tuberkulose. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades Dr. med der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm. (2016)

[83] Lam A, Prabhu R, Gross CM, Riesenberger LA, Singh V, Aggarwal S: Role of apoptosis and autophagy in Tuberculosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* ajplung.00162.2017. (2017)

[84] Lande R, Giacomini E, Grassi T, Remoli ME, Iona E, Miettinen M, Julkunen I, Coccia EM: IFN-alpha beta released by Mycobacterium tuberculosis-infected human dendritic cells induces the expression of CXCL10: selective recruitment of NK and activated T cells. *J Immunol* 170: 1174-82. (2003)

[85] Lawless VA, Zhang S, Ozes ON, Bruns HA, Oldham I, Hoey T, Grusby MJ, Kaplan MH: Stat4 regulates multiple components of IFN-gamma-inducing signaling pathways. *J Immunol* 165: 6803-8. (2000)

[86] Leder C, Ortler S, Seggewiss R, Einsele H, Wiendl H: Modulation of T-effector function by imatinib at the level of cytokine secretion. *Exp Hematol* 35: 1266-71. (2007)

[87] Ling PD, Warren MK, Vogel SN: Antagonistic effect of interferon-beta on the interferon-gamma-induced expression of Ia antigen in murine macrophages. *J Immunol* 135: 1857-63. (1985)

- [88] Liu CJ, Hong YC, Teng CJ, Hung MH, Hu YW, Ku FC, Chen YT, Chien SH, Yeh CM, Chen TJ, Chiou TJ, Gau JP, Tzeng CH: Risk and impact of tuberculosis in patients with chronic myeloid leukemia: a nationwide population-based study in Taiwan. *Int J Cancer* 136: 1881-7. (2015)
- [89] Lu CC, Wu TS, Hsu YJ, Chang CJ, Lin CS, Chia JH, Wu TL, Huang TT, Martel J, Ojcius DM, Young JD, Lai HC: NK cells kill mycobacteria directly by releasing perforin and granulysin. *J Leukoc Biol* 96: 1119-29. (2014)
- [90] Lubing HN: Peripheral neuropathy in tuberculosis patients treated with isoniazid. *Am Rev Tuberc* 68: 458-61. (1953)
- [91] Ly KT, Casanova JE: Abelson tyrosine kinase facilitates *Salmonella enterica* serovar Typhimurium entry into epithelial cells. *Infect Immun* 77: 60-9. (2009)
- [92] Ma J, Yang B, Yu S, Zhang Y, Zhang X, Lao S, Chen X, Li B, Wu C: Tuberculosis antigen-induced expression of IFN-alpha in tuberculosis patients inhibits production of IL-1beta. *Faseb j* 28: 3238-48. (2014)
- [93] Mack EA, Kallal LE, Demers DA, Biron CA: Type 1 interferon induction of natural killer cell gamma interferon production for defense during lymphocytic choriomeningitis virus infection. *MBio* 2: (2011)
- [94] Manca C, Tsenova L, Bergtold A, Freeman S, Tovey M, Musser JM, Barry CE, 3rd, Freedman VH, Kaplan G: Virulence of a *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolate in mice is determined by failure to induce Th1 type immunity and is associated with induction of IFN-alpha /beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 5752-7. (2001)
- [95] Manca C, Tsenova L, Freeman S, Barczak AK, Tovey M, Murray PJ, Barry C, Kaplan G: Hypervirulent *M. tuberculosis* W/Beijing strains upregulate type I IFNs and increase expression of negative regulators of the Jak-Stat pathway. *J Interferon Cytokine Res* 25: 694-701. (2005)

[96] Manley PW, Cowan-Jacob SW, Mestan J: Advances in the structural biology, design and clinical development of Bcr-Abl kinase inhibitors for the treatment of chronic myeloid leukaemia. *Biochim Biophys Acta* 1754: 3-13. (2005)

[97] Marchant A, Amedei A, Azzurri A, Vekemans J, Benaglio M, Tamburini C, Lienhardt C, Corrah T, McAdam KP, Romagnani S, D'Elia MM, Del Prete G: Polarization of PPD-specific T-cell response of patients with tuberculosis from Th0 to Th1 profile after successful antimycobacterial therapy or in vitro conditioning with interferon-alpha or interleukin-12. *Am J Respir Cell Mol Biol* 24: 187-94. (2001)

[98] Marino S, Pawar S, Fuller CL, Reinhart TA, Flynn JL, Kirschner DE: Dendritic Cell Trafficking and Antigen Presentation in the Human Immune Response to *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of Immunology* 173: 494-506. (2004)

[99] Mariotti S, Teloni R, Iona E, Fattorini L, Romagnoli G, Gagliardi MC, Orefici G, Nisini R: *Mycobacterium tuberculosis* diverts alpha interferon-induced monocyte differentiation from dendritic cells into immunoprivileged macrophage-like host cells. *Infect Immun* 72: 4385-92. (2004)

[100] Martin FJ, Gomez MI, Wetzel DM, Memmi G, O'Seaghdha M, Soong G, Schindler C, Prince A: *Staphylococcus aureus* activates type I IFN signaling in mice and humans through the Xr repeated sequences of protein A. *J Clin Invest* 119: 1931-9. (2009)

[101] Matikainen S, Paananen A, Miettinen M, Kurimoto M, Timonen T, Julkunen I, Sareneva T: IFN-alpha and IL-18 synergistically enhance IFN-gamma production in human NK cells: differential regulation of Stat4 activation and IFN-gamma gene expression by IFN-alpha and IL-12. *Eur J Immunol* 31: 2236-45. (2001)

[102] Mayer-Barber KD, Andrade BB, Barber DL, Hieny S, Feng CG, Caspar P, Oland S, Gordon S, Sher A: Innate and adaptive interferons suppress IL-1alpha and IL-1beta production by distinct pulmonary myeloid subsets during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Immunity* 35: 1023-34. (2011)

[103] McNab F, Mayer-Barber K, Sher A, Wack A, O'Garra A: Type I interferons in infectious disease. *Nat Rev Immunol* 15: 87-103. (2015)

[104] McNab FW, Ewbank J, Howes A, Moreira-Teixeira L, Martirosyan A, Ghilardi N, Saraiva M, O'Garra A: Type I IFN induces IL-10 production in an IL-27-independent manner and blocks responsiveness to IFN-gamma for production of IL-12 and bacterial killing in *Mycobacterium tuberculosis*-infected macrophages. *J Immunol* 193: 3600-12. (2014)

[105] Misumi Y, Misumi Y, Miki K, Takatsuki A, Tamura G, Ikehara Y: Novel blockade by brefeldin A of intracellular transport of secretory proteins in cultured rat hepatocytes. *J Biol Chem* 261: 11398-403. (1986)

[106] Miyagi T, Gil MP, Wang X, Louten J, Chu WM, Biron CA: High basal STAT4 balanced by STAT1 induction to control type 1 interferon effects in natural killer cells. *J Exp Med* 204: 2383-96. (2007)

[107] Mizukoshi E, Kaneko S, Yanagi M, Ohno H, Matsushita E, Kobayashi K: Upregulation of type I interferon receptor by IFN-gamma. *J Interferon Cytokine Res* 19: 1019-23. (1999)

[108] Morrison J, Pai M, Hopewell PC: Tuberculosis and latent tuberculosis infection in close contacts of people with pulmonary tuberculosis in low-income and middle-income countries: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 8: 359-68. (2008)

[109] Murphy KP: Janeway's immunobiology. 8th edition: 112-13. (2012)

[110] Nahid P, Dorman SE, Alipanah N, Barry PM, Brozek JL, Cattamanchi A, Chaisson LH, Chaisson RE, Daley CL, Grzemska M, Higashi JM, Ho CS, Hopewell PC, Keshavjee SA, Lienhardt C, Menzies R, Merrifield C, Narita M, O'Brien R, Peloquin CA, Raftery A, Saukkonen J, Schaaf HS, Sotgiu G, Starke JR, Migliori GB, Vernon A: Official American Thoracic Society/Centers for Disease Control and

Prevention/Infectious Diseases Society of America Clinical Practice Guidelines: Treatment of Drug-Susceptible Tuberculosis. *Clin Infect Dis* 63: e147-e95. (2016)

[111] Napier RJ, Rafi W, Cheruvu M, Powell KR, Zaunbrecher MA, Bornmann W, Salgame P, Shinnick TM, Kalman D: Imatinib-sensitive tyrosine kinases regulate mycobacterial pathogenesis and represent therapeutic targets against tuberculosis. *Cell Host Microbe* 10: 475-85. (2011)

[112] Napier RJ, Norris BA, Swimm A, Giver CR, Harris WA, Laval J, Napier BA, Patel G, Crump R, Peng Z, Bornmann W, Pulendran B, Buller RM, Weiss DS, Tirouvanziam R, Waller EK, Kalman D: Low doses of imatinib induce myelopoiesis and enhance host anti-microbial immunity. *PLoS Pathog* 11: e1004770. (2015)

[113] Nguyen KB, Cousens LP, Doughty LA, Pien GC, Durbin JE, Biron CA: Interferon alpha/beta-mediated inhibition and promotion of interferon gamma: STAT1 resolves a paradox. *Nat Immunol* 1: 70-6. (2000)

[114] Nguyen KB, Watford WT, Salomon R, Hofmann SR, Pien GC, Morinobu A, Gadina M, O'Shea JJ, Biron CA: Critical role for STAT4 activation by type 1 interferons in the interferon-gamma response to viral infection. *Science* 297: 2063-6. (2002)

[115] Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C: A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods* 139: 271-9. (1991)

[116] Nicolini FE, Hayette S, Legros L, Rousselot P, Maloisel F, Tulliez M, Guerci A, Charbonnier A, Prebet T, Rigal-Huguet F, Chabane K, Magaud JP, Paillet C, Pivot C, Michallet M: Pegylated IFN-alpha2a combined to imatinib mesylate 600mg daily can induce complete cytogenetic and molecular responses in a subset of chronic phase CML patients refractory to IFN alone or to imatinib 600mg daily alone. *Leuk Res* 35: 80-6. (2011)

[117] Niesel DW, Hess CB, Cho YJ, Klimpel KD, Klimpel GR: Natural and recombinant interferons inhibit epithelial cell invasion by *Shigella* spp. *Infect Immun* 52: 828-33. (1986)

[118] Novikov A, Cardone M, Thompson R, Shenderov K, Kirschman KD, Mayer-Barber KD, Myers TG, Rabin RL, Trinchieri G, Sher A, Feng CG: *Mycobacterium tuberculosis* triggers host type I IFN signaling to regulate IL-1beta production in human macrophages. *J Immunol* 187: 2540-7. (2011)

[119] O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA, Gathmann I, Baccarani M, Cervantes F, Cornelissen JJ, Fischer T, Hochhaus A, Hughes T, Lechner K, Nielsen JL, Rousselot P, Reiffers J, Saglio G, Shepherd J, Simonsson B, Gratwohl A, Goldman JM, Kantarjian H, Taylor K, Verhoef G, Bolton AE, Capdeville R, Druker BJ: Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 348: 994-1004. (2003)

[120] Orme IM, Cooper AM: Cytokine/chemokine cascades in immunity to tuberculosis. *Immunol Today* 20: 307-12. (1999)

[121] Pai M, Behr MA, Dowdy D, Dheda K, Divangahi M, Boehme CC, Ginsberg A, Swaminathan S, Spigelman M, Getahun H, Menzies D, Raviglione M: Tuberculosis. *Nature Reviews Disease Primers* 2: 16076. (2016)

[122] Palmero D, Eiguchi K, Rendo P, Castro Zorrilla L, Abbate E, Gonzalez Montaner LJ: Phase II trial of recombinant interferon-alpha2b in patients with advanced intractable multidrug-resistant pulmonary tuberculosis: long-term follow-up. *Int J Tuberc Lung Dis* 3: 214-8. (1999)

[123] Patel AA, Lee-Lewis H, Hughes-Hanks J, Lewis CA, Anderson DM: Opposing roles for interferon regulatory factor-3 (IRF-3) and type I interferon signaling during plague. *PLoS Pathog* 8: e1002817. (2012)

- [124] Penack O, Gentilini C, Fischer L, Asemissen AM, Scheibenbogen C, Thiel E, Uharek L: CD56dimCD16neg cells are responsible for natural cytotoxicity against tumor targets. *Leukemia* 19: 835-40. (2005)
- [125] Pielage JF, Powell KR, Kalman D, Engel JN: RNAi screen reveals an Abl kinase-dependent host cell pathway involved in *Pseudomonas aeruginosa* internalization. *PLoS Pathog* 4: e1000031. (2008)
- [126] Plattner R, Irvin BJ, Guo S, Blackburn K, Kazlauskas A, Abraham RT, York JD, Pendergast AM: A new link between the c-Abl tyrosine kinase and phosphoinositide signalling through PLC-gamma1. *Nat Cell Biol* 5: 309-19. (2003)
- [127] Plumlee CR, Lee C, Beg AA, Decker T, Shuman HA, Schindler C: Interferons direct an effective innate response to *Legionella pneumophila* infection. *J Biol Chem* 284: 30058-66. (2009)
- [128] Pophali PA, Patnaik MM: The Role of New Tyrosine Kinase Inhibitors in Chronic Myeloid Leukemia. *Cancer J* 22: 40-50. (2016)
- [129] Poppe M, Feller SM, Romer G, Wessler S: Phosphorylation of *Helicobacter pylori* CagA by c-Abl leads to cell motility. *Oncogene* 26: 3462-72. (2007)
- [130] Preudhomme C, Guilhot J, Nicolini FE, Guerci-Bresler A, Rigal-Huguet F, Maloisel F, Coiteux V, Gardembas M, Berthou C, Vekhoff A, Rea D, Jourdan E, Allard C, Delmer A, Rousselot P, Legros L, Berger M, Corm S, Etienne G, Roche-Lestienne C, Eclache V, Mahon FX, Guilhot F: Imatinib plus peginterferon alfa-2a in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 363: 2511-21. (2010)
- [131] Radesi-Sarghi S, Arbion F, Dartigeas C, Delain M, Benboubker L, Herault O, Colombat P, Gyan E: Interferon alpha with or without rituximab achieves a high response rate and durable responses in relapsed FL: 17 years' experience in a single centre. *Ann Hematol* (2013)

[132] Rajaram MV, Ni B, Dodd CE, Schlesinger LS: Macrophage immunoregulatory pathways in tuberculosis. *Semin Immunol* 26: 471-85. (2014)

[133] Rayamajhi M, Humann J, Penheiter K, Andreasen K, Lenz LL: Induction of IFN- $\alpha$  enables *Listeria monocytogenes* to suppress macrophage activation by IFN- $\gamma$ . *J Exp Med* 207: 327-37. (2010)

[134] Rayamajhi M, Humann J, Kearney S, Hill KK, Lenz LL: Antagonistic crosstalk between type I and II interferons and increased host susceptibility to bacterial infections. *Virulence* 1: 418-22. (2010)

[135] Redford PS, Mayer-Barber KD, McNab FW, Stavropoulos E, Wack A, Sher A, O'Garra A: Influenza A virus impairs control of *Mycobacterium tuberculosis* coinfection through a type I interferon receptor-dependent pathway. *J Infect Dis* 209: 270-4. (2014)

[136] RKI: Thorax-Röntgenuntersuchungen bei Asylsuchenden gemäß § 36 Absatz 4 IfSG Im Internet:  
[https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/T/Tuberkulose/Tuberkulose\\_Roentgen-Untersuchungen\\_Asylsuchende.html](https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/T/Tuberkulose/Tuberkulose_Roentgen-Untersuchungen_Asylsuchende.html). (abgerufen am 01.08.2018)

[137] RKI: Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2015. Im Internet:  
<http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahrbuecher/2015.html>.  
(abgerufen am 31.07.2018)

[138] Rogge L, D'Ambrosio D, Biffi M, Penna G, Minetti LJ, Presky DH, Adorini L, Sinigaglia F: The role of Stat4 in species-specific regulation of Th cell development by type I IFNs. *J Immunol* 161: 6567-74. (1998)

[139] Rose DN, Schechter CB, Adler JJ: Interpretation of the tuberculin skin test. *J Gen Intern Med* 10: 635-42. (1995)

[140] Rosti G, Castagnetti F, Gugliotta G, Palandri F, Baccarani M: Physician's guide to the clinical management of adverse events on nilotinib therapy for the treatment of CML. *Cancer Treat Rev* 38: 241-8. (2012)

[141] Rothfuchs AG, Gigliotti D, Palmblad K, Andersson U, Wigzell H, Rottenberg ME: IFN-alpha beta-dependent, IFN-gamma secretion by bone marrow-derived macrophages controls an intracellular bacterial infection. *J Immunol* 167: 6453-61. (2001)

[142] Rothfuchs AG, Trumstedt C, Mattei F, Schiavoni G, Hidmark A, Wigzell H, Rottenberg ME: STAT1 regulates IFN-alpha beta- and IFN-gamma-dependent control of infection with *Chlamydia pneumoniae* by nonhemopoietic cells. *J Immunol* 176: 6982-90. (2006)

[143] Sabbatani S, Manfredi R, Marinacci G, Pavoni M, Cristoni L, Chiodo F: Reactivation of severe, acute pulmonary tuberculosis during treatment with pegylated interferon-alpha and ribavirin for chronic HCV hepatitis. *Scand J Infect Dis* 38: 205-8. (2006)

[144] Sabri A, Grant AV, Cosker K, El Azbaoui S, Abid A, Abderrahmani Rhorfi I, Souhi H, Janah H, Alaoui-Tahiri K, Gharbaoui Y, Benkirane M, Orlova M, Boland A, Deswarte C, Migaud M, Bustamante J, Schurr E, Boisson-Dupuis S, Casanova JL, Abel L, El Baghdadi J: Association study of genes controlling IL-12-dependent IFN-gamma immunity: STAT4 alleles increase risk of pulmonary tuberculosis in Morocco. *J Infect Dis* 210: 611-8. (2014)

[145] Sadek MI, Sada E, Toossi Z, Schwander SK, Rich EA: Chemokines induced by infection of mononuclear phagocytes with mycobacteria and present in lung alveoli during active pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 19: 513-21. (1998)

[146] Saglio G, Kim DW, Issaragrisil S, le Coutre P, Etienne G, Lobo C, Pasquini R, Clark RE, Hochhaus A, Hughes TP, Gallagher N, Hoenekopp A, Dong M, Haque A,

Larson RA, Kantarjian HM: Nilotinib versus imatinib for newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 362: 2251-9. (2010)

[147] Sareneva T, Matikainen S, Kurimoto M, Julkunen I: Influenza A virus-induced IFN-alpha/beta and IL-18 synergistically enhance IFN-gamma gene expression in human T cells. *J Immunol* 160: 6032-8. (1998)

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

[149] Saunders BM, Cooper AM: Restraining mycobacteria: role of granulomas in mycobacterial infections. *Immunol Cell Biol* 78: 334-41. (2000)

[150] Simonsson B, Hjorth-Hansen H, Bjerrum OW, Porkka K: Interferon alpha for treatment of chronic myeloid leukemia. *Curr Drug Targets* 12: 420-8. (2011)

[151] Simonsson B, Gedde-Dahl T, Markevarn B, Remes K, Stentoft J, Almqvist A, Bjoreman M, Flogegard M, Koskenvesa P, Lindblom A, Malm C, Mustjoki S, Myhr-Eriksson K, Ohm L, Rasanen A, Sinisalo M, Sjalander A, Stromberg U, Bjerrum OW, Ehrencrona H, Gruber F, Kairisto V, Olsson K, Sandin F, Nagler A, Nielsen JL, Hjorth-Hansen H, Porkka K: Combination of pegylated IFN-alpha2b with imatinib increases molecular response rates in patients with low- or intermediate-risk chronic myeloid leukemia. *Blood* 118: 3228-35. (2011)

[152] Solangi GA, Zuberi BF, Shaikh S, Shaikh WM: Pyrazinamide induced hyperuricemia in patients taking anti-tuberculous therapy. *J Coll Physicians Surg Pak* 14: 136-8. (2004)

[153] Stenger S, Niazi KR, Modlin RL: Down-regulation of CD1 on antigen-presenting cells by infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 161: 3582-8. (1998)

- [154] Stenger S, Modlin RL: T cell mediated immunity to Mycobacterium tuberculosis. *Curr Opin Microbiol* 2: 89-93. (1999)
- [155] Stenger S: Cytolytic T cells in the immune response to mycobacterium tuberculosis. *Scand J Infect Dis* 33: 483-7. (2001)
- [156] Stenger S: Immunological control of tuberculosis: role of tumour necrosis factor and more. *Ann Rheum Dis* 64 Suppl 4: iv24-8. (2005)
- [157] Stevens TH, Forgac M: Structure, function and regulation of the vacuolar (H<sup>+</sup>)-ATPase. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13: 779-808. (1997)
- [158] Stockinger S, Materna T, Stoiber D, Bayr L, Steinborn R, Kolbe T, Unger H, Chakraborty T, Levy DE, Muller M, Decker T: Production of type I IFN sensitizes macrophages to cell death induced by *Listeria monocytogenes*. *J Immunol* 169: 6522-9. (2002)
- [159] Sugawara I, Yamada H, Mizuno S: Relative importance of STAT4 in murine tuberculosis. *J Med Microbiol* 52: 29-34. (2003)
- [160] Sugawara I, Yamada H, Mizuno S: STAT1 knockout mice are highly susceptible to pulmonary mycobacterial infection. *Tohoku J Exp Med* 202: 41-50. (2004)
- [161] Swimm A, Bommarius B, Li Y, Cheng D, Reeves P, Sherman M, Veach D, Bornmann W, Kalman D: Enteropathogenic *Escherichia coli* use redundant tyrosine kinases to form actin pedestals. *Mol Biol Cell* 15: 3520-9. (2004)
- [162] Tammer I, Brandt S, Hartig R, Konig W, Backert S: Activation of Abl by *Helicobacter pylori*: a novel kinase for CagA and crucial mediator of host cell scattering. *Gastroenterology* 132: 1309-19. (2007)
- [163] Teles RM, Graeber TG, Krutzik SR, Montoya D, Schenk M, Lee DJ, Komisopoulou E, Kelly-Scumpia K, Chun R, Iyer SS, Sarno EN, Rea TH, Hewison

M, Adams JS, Popper SJ, Relman DA, Stenger S, Bloom BR, Cheng G, Modlin RL: Type I interferon suppresses type II interferon-triggered human anti-mycobacterial responses. *Science* 339: 1448-53. (2013)

[164] Telesca C, Angelico M, Piccolo P, Nosotti L, Morrone A, Longhi C, Carbone M, Baiocchi L: Interferon-alpha treatment of hepatitis D induces tuberculosis exacerbation in an immigrant. *J Infect* 54: e223-6. (2007)

[165] Travar M, Petkovic M, Verhaz A: Type I, II, and III Interferons: Regulating Immunity to Mycobacterium tuberculosis Infection. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 64: 19-31. (2016)

[166] Trinchieri G: Type I interferon: friend or foe? *J Exp Med* 207: 2053-63. (2010)

[167] Vergne I, Chua J, Singh SB, Deretic V: Cell biology of mycobacterium tuberculosis phagosome. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20: 367-94. (2004)

[168] Vigneri P, Wang JY: Induction of apoptosis in chronic myelogenous leukemia cells through nuclear entrapment of BCR-ABL tyrosine kinase. *Nat Med* 7: 228-34. (2001)

[169] Walburger A, Koul A, Ferrari G, Nguyen L, Prescianotto-Baschong C, Huygen K, Klebl B, Thompson C, Bacher G, Pieters J: Protein kinase G from pathogenic mycobacteria promotes survival within macrophages. *Science* 304: 1800-4. (2004)

[170] Wallis RS, Hafner R: Advancing host-directed therapy for tuberculosis. *Nat Rev Immunol* 15: 255-63. (2015)

[171] Wang JY: Regulation of cell death by the Abl tyrosine kinase. *Oncogene* 19: 5643-50. (2000)

[172] Wang LS, D'Souza LS, Jacobson IM: Hepatitis C-A clinical review. *J Med Virol* 88: 1844-55. (2016)

[173] Weisberg E, Manley PW, Breitenstein W, Bruggen J, Cowan-Jacob SW, Ray A, Huntly B, Fabbro D, Fendrich G, Hall-Meyers E, Kung AL, Mestan J, Daley GQ, Callahan L, Catley L, Cavazza C, Azam M, Neuberg D, Wright RD, Gilliland DG, Griffin JD: Characterization of AMN107, a selective inhibitor of native and mutant Bcr-Abl. *Cancer Cell* 7: 129-41. (2005)

[174] WHO: Global tuberculosis report 2016. Im Internet:  
<http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/250441/9789241565394-eng.pdf;jsessionid=0021B4FF66852C43D96549AF0C483515?sequence=1>.  
(abgerufen am 31.07.2018)

[175] WHO: Guidelines for treatment of drug-susceptible tuberculosis and patient care (2017 update); Im Internet:  
[http://www.who.int/tb/publications/2017/dstb\\_guidance\\_2017/en/](http://www.who.int/tb/publications/2017/dstb_guidance_2017/en/).  
(abgerufen am 31.07.2018)

[176] Wilcoxon F: Individual Comparisons by Ranking Methods. *Biometrics Bulletin* 1: 80-83. (1945)

[177] Wolf AM, Wolf D, Rumpold H, Ludwiczek S, Enrich B, Gastl G, Weiss G, Tilg H: The kinase inhibitor imatinib mesylate inhibits TNF- $\alpha$  production in vitro and prevents TNF-dependent acute hepatic inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 13622-7. (2005)

[178] Yao K, Chen Q, Wu Y, Liu F, Chen X, Zhang Y: Unphosphorylated STAT1 represses apoptosis in macrophages during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Cell Sci* 130: 1740-51. (2017)

[179] Yogalingam G, Pendergast AM: Abl kinases regulate autophagy by promoting the trafficking and function of lysosomal components. *J Biol Chem* 283: 35941-53. (2008)

[180] Yoshida R, Murray HW, Nathan CF: Agonist and antagonist effects of interferon alpha and beta on activation of human macrophages. Two classes of

interferon gamma receptors and blockade of the high-affinity sites by interferon alpha or beta. *J Exp Med* 167: 1171-85. (1988)

[181] Zarogoulidis P, Kioumis I, Papanas N, Manika K, Kontakiotis T, Papagianis A, Zarogoulidis K: The effect of combination IFN-alpha-2a with usual antituberculosis chemotherapy in non-responding tuberculosis and diabetes mellitus: a case report and review of the literature. *J Chemother* 24: 173-7. (2012)

[182] Zignol M, Dean AS, Falzon D, van Gemert W, Wright A, van Deun A, Portaels F, Laszlo A, Espinal MA, Pablos-Mendez A, Bloom A, Aziz MA, Weyer K, Jaramillo E, Nunn P, Floyd K, Raviglione MC: Twenty Years of Global Surveillance of Antituberculosis-Drug Resistance. *N Engl J Med* 375: 1081-9. (2016)

[183] Zipfel PA, Grove M, Blackburn K, Fujimoto M, Tedder TF, Pendergast AM: The c-Abl tyrosine kinase is regulated downstream of the B cell antigen receptor and interacts with CD19. *J Immunol* 165: 6872-9. (2000)

[184] Zipfel PA, Zhang W, Quiroz M, Pendergast AM: Requirement for Abl kinases in T cell receptor signaling. *Curr Biol* 14: 1222-31. (2004)

[185] Zumla A, Chakaya J, Centis R, D'Ambrosio L, Mwaba P, Bates M, Kapata N, Nyirenda T, Chanda D, Mfinanga S, Hoelscher M, Maeurer M, Migliori GB: Tuberculosis treatment and management--an update on treatment regimens, trials, new drugs, and adjunct therapies. *Lancet Respir Med* 3: 220-34. (2015)

## 7. Danksagung

Zuallererst möchte ich mich von ganzem Herzen bei meinem Doktorvater und Betreuer Prof. Dr. med. Steffen Stenger für die Möglichkeit bedanken, an einem so spannenden und aktuellen Thema forschen zu dürfen. Sein Engagement und die Betreuung in den vergangenen drei Jahren waren herausragend. Während dieser Zeit konnte ich sehr viel von ihm lernen und hatte dabei große Freude.

Besonders möchte ich mich auch bei meinen lieben Laborkollegen und Freunden im MyTbLab bedanken, allen voran Steffi, Daniel und Mark. Danke nicht nur für ihre Hilfsbereitschaft und Engagement während meiner Doktorarbeit sowie für die geplante Publikation, sondern auch für die schöne gemeinsame Zeit. Mein weiterer Dank geht an Kathrin, Steffi H., Alex, Sebastian H., Jessi, Esra, Michi, Jan L., Jan K., Sebastian Z., Flo, Felix, Benny und alle Mitarbeiter der AG Streptokokken und Chlamydien. Sie alle haben mit ihrer offenen und freundlichen Art zur super Atmosphäre im MyTbLab beigetragen. Vielen Dank euch allen!

Zudem geht mein Dank an Prof. Dr. med. Andreas Essig und alle Mitarbeiter der mikrobiologischen Diagnostik der Uniklinik Ulm für ihre Unterstützung und die Möglichkeit, in ihren Räumlichkeiten zu forschen und zu famulieren.

Die drei Jahre im MyTbLab waren eine lehrreiche und tolle Zeit, die ich immer in guter Erinnerung behalten werde.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie, insbesondere bei meinen Eltern und Großeltern und meiner Freundin bedanken, ohne deren seelische, moralische und finanzielle Unterstützung das Studium und diese Doktorarbeit nicht möglich gewesen wären. Sie haben mich bei all meinen Entscheidungen unterstützt und waren immer für mich da. Dafür bin ich ihnen unendlich dankbar.

**8. Lebenslauf**

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.