

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene des
Universitätsklinikums Ulm
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. Steffen Stenger

**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

vorgelegt von
Heiko Bruns aus Borkum

Ulm, Januar 2010

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Axel Groß

1. Gutachter:

Prof. Dr. Bernhard Eikmanns

2. Gutachter:

Prof. Dr. Dr. Walther Knöchel

3. Gutachter:

Prof. Dr. Steffen Stenger

Tag der Promotion:

27.04.2010

„Ich versichere, dass ich die Arbeit ohne fremde Hilfe und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Quellen angefertigt habe und dass die Arbeit in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt hat und von dieser als Teil einer Prüfungsanleitung angenommen wurde. Alle Ausführungen, die wörtlich oder sinngemäß übernommen wurden, sind als solche gekennzeichnet.“

„Alles hat ein Ende nur die Wurst hat Zwei“

(Stephan Remmler)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	3
2.1. Die Abl-Tyrosinkinase	3
2.2. Chronische myeloische Leukämie	4
2.2.1. Ätiologie	4
2.2.2. Therapie	4
2.2.3. Imatinib	5
2.3. Die Abl-Tyrosinkinase bei Infektionen und ihre Funktion im Immunsystem	6
2.4. Die Tuberkulose	7
2.4.1. Epidemiologie	7
2.4.2. Angeborene Immunantwort	7
2.4.3. Interaktionen von <i>M. tb</i> mit dem Phagosom	8
2.5. Ziel der Arbeit	10
3. Material und Methoden	11
3.1. Material und Reagenzien	11
3.1.1. Arbeitsgeräte	11
3.1.2. Arbeitsmaterial	11
3.1.3. Chemikalien und Reagenzien	12
3.1.4. Zytokine, Antikörper und siRNA	14
3.1.5. Bakterien und Zelllinien	15

3.1.6. Medien und Puffer	15
3.1.6.1. Zellkultur und BAL-Medium	15
3.1.6.2. Medium für Mykobakterien	16
3.1.6.3. Fluoreszenzmikroskopie	16
3.1.6.4. Durchflusszytometrie	16
3.1.6.5. Westernblot	16
3.1.6.6. Färbepuffer für Mykobakterien	16
3.2. Methoden	17
3.2.1. Isolierung von PBMC aus menschlichem Vollblut	17
3.2.2. Anreicherung von Monozyten	17
3.2.3. Durchflusszytometrie	17
3.2.4. Generierung von Makrophagen und DZ	18
3.2.5. Isolierung von AM	18
3.2.6. Wachstum von <i>M.tb</i>	19
3.2.7. Färbung von <i>M.tb</i> mit einem Succinimidyl Ester konjugierten Fluorochrom	19
3.2.8. Infektion von Makrophagen mit <i>M.tb</i>	19
3.2.9. Quantifizierung des intrazellulären mykobakteriellen Wachstums	20
3.2.10. Quantifizierung des extrazellulären Wachstums von <i>M.tb</i>	20
3.2.11. Behandlung mit Tyrosinkinase-Inhibitoren	20
3.2.12. Phagozytose-Assay	21
3.2.13. Apoptose-Messung	21
3.2.14. LysoSensor-Färbung	22
3.2.15. Doppelfärbung mit LysoTracker und Antikörpern	22
3.2.16. Aktivierung von Cathepsin D	23
3.2.17. Behandlung mit siRNA	24
3.2.18. Immunpräzipitation von CRKII	24
3.2.19. Westernblot	25
3.2.20. CML Patienten und gesunde Spender	26
3.2.21. Statistische Analysen	26
3.2.22. Verwendete Computerprogramme	27

4. Ergebnisse	28
4.1. Bedeutung der Abl-Tyrosinkinase bei der Phagozytose von <i>M.tb</i>	28
4.2. Bedeutung der Abl-Tyrosinkinase beim intrazellulären Wachstum von <i>M.tb</i>	30
4.2.1. Die Wirkung von Imatinib auf das extrazelluläre Wachstum von <i>M.tb</i>	32
4.2.2. Die Wirkung von Imatinib auf die Apoptose	33
4.2.3. Einfluss des M-CSF Rezeptors auf das intrazelluläre Wachstum von <i>M.tb</i>	34
4.2.4. Einfluss von Imatinib auf den pH-Wert in Makrophagen	36
4.3. Charakterisierung der durch Imatinib angesäuerten Kompartimente	37
4.4. Aktivierung von Cathepsin D durch die Imatinib-induzierte Ansäuerung	40
4.5. Die Bedeutung der Abl-Tyrosinkinase bei der Azidifizierung der Lysosomen	42
4.5.1. Untersuchung der Imatinib-induzierten in Wirtszellen von <i>M.tb</i>	42
4.5.2. Vergleich verschiedener Kinase-Inhibitoren auf die Regulation des pH-Wertes in Makrophagen	44
4.5.3. Einfluss von c-Abl siRNA auf den pH-Wert in Makrophagen	46
4.6. Intrazelluläre Lokalisation von Imatinib induzierten Lysosomen und <i>M.tb</i>	48
4.7. Hemmung der Imatinib induzierten Ansäuerung durch Concanamycin A	49

4.8. Wirkung von Serum Imatinib-behandelter CML-Patienten	
auf den pH-Wert der Lysosomen	50
4.8.1. Wirkung von Patientenserum auf den pH-Wert von Lysosomen	50
4.8.2. Wirkung von Patientenserum auf das Wachstum von <i>M.tb</i>	52
4.9 . Untersuchung des pH-Wertes in Monozyten Imatinib behandelte	
CML-Patienten	52
5. Diskussion	54
5.1. Die Abl-Tyrosinkinase reguliert die Ansäuerung der Lysosomen	54
5.2. Die Manipulation der Abl-Tyrosinkinase durch Infektionserreger	56
5.3. Die Funktion der Abl-Tyrosinkinase bei der Tuberkulose	57
6. Literaturverzeichnis	61
Danksagung	
Curriculum vitae	

Abkürzungsverzeichnis

Abl-Tyrosinkinase	Abelson-Tyrosinkinase
AM	Alveolarmakrophagen
APC	Allophycocyanin
APZ	Antigenpräsentierende Zellen
ATP	Adenosintriphosphat
BAL	bronchoalveoläre Lavage
BCR	Breakpoint Cluster Region
BPF	Pepstatin A-Bodipy-FL
CD	cluster of differentiation
CFU	Kolonie bildende Einheiten
CML	Chronisch myeloische Leukämie
Con A	Concanamycin A
CRKII	chicken tumor virus no. 10 regulator of kinase II
cpm	counts per minute
DC-Sign	Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin
DZ	dendritische Zelle
EEA1	Early Endosomal Antigen 1
EGF	Epidermal-Growth-Factor
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FLT-3	Fetal liver tyrosine kinase
GM-CSF	Granulocyte Monocyte-Colony Stimulating Factor
HRP	horse-radish-peroxidase
IFN- γ	Interferon- γ
IL	Interleukin
JAK2	Janus Kinase 2
MCSF	Monocyte-Colony Stimulating Factor
MFI	Mittlere Fluoreszenz Intensität
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
<i>M.tb</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>

OADC	Oleic acid, albumin, dextrose, catalase
PBMC	periphere Blut mononukleäre Zellen
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PDGF	Platelet-derived growth factor
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
PFA	Paraformaldehyd
PknG	Proteinkinase G
PI	Propidiumjodid
PI3P	Phosphoinositol-3-Phosphat
PS	Phosphatidylserin
Rab	ras-related in brain
Ras	Rat sarcoma
rhu	rekombinat human
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
SDS	Sodium Dodecylsulfat
SH3	src-homology domain 3
si	small interfering
Src	Sarcoma
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TNF	Tumor Nekrose Faktor
THP-1	Human acute monocytic leukemia cell line

1. Zusammenfassung

Die Abl-Tyrosinkinase ist eine Proteintyrosinkinase, deren Aufgabe die Regulation der Proliferation und Differenzierung von Zellen des Immunsystems ist. Bei der Pathogenese der Chronischen Myeloische Leukämie (CML) spielt die dysregulierte Abl-Tyrosinkinase, das BCR-Abl-Protein, eine zentrale Rolle. Um eine molekular gerichtete Therapie der CML zu etablieren, wurde ein kompetitiver Inhibitor der Abl-Tyrosinkinase, Imatinib, entwickelt. Durch den klinischen Einsatz von Imatinib wird einerseits die CML erfolgreich behandelt, andererseits bietet sich durch die Verwendung des Inhibitors eine Möglichkeit die Funktion der Abl-Tyrosinkinase im Immunsystem näher zu untersuchen.

Mycobacterium tuberculosis (M.tb) persistiert in Makrophagen durch Manipulation von antibakteriellen Effektormechanismen. Hierdurch gelingt es *M.tb*, dem Immunsystem so lange zu entgehen, bis dieses durch andere Einflüsse geschwächt wird, um dann reaktiviert zu werden. Da die Abl-Tyrosinkinase grundlegende Prozesse der Zelle und des Immunsystems moduliert, untersuchten wir in dieser Arbeit deren Einfluss auf das Überleben intrazellulärer Mykobakterien.

In der vorliegenden Dissertation wurde zunächst gezeigt, dass bei der Behandlung von infizierten Makrophagen mit Imatinib die Anzahl intrazellulärer Mykobakterien reduziert wird. Bei der Suche nach den antimykobakteriellen Mechanismen wurde gezeigt, dass die Hemmung der Abl-Tyrosinkinase den pH-Wert in den Lysosomen erniedrigt. Die Inhibition der Imatinib induzierten Ansäuerung normalisierte das Wachstum der Mykobakterien.

Um die klinische Bedeutung dieser Befunde zu prüfen, untersuchten wir den Effekt einer Imatinib Therapie auf den pH-Wert in Monozyten und das Überleben von *M.tb*. Serum Imatinib behandelte Patienten reduzierte den pH-Wert der Lysosomen in Makrophagen und hemmte das Wachstum von intrazellulären Mykobakterien. Zusätzlich ergaben unsere *ex-vivo* Experimente, dass die Lysosomen in den Monozyten dieser Patienten stärker angesäuert waren als in unbehandelten Spendern.

Diese Ergebnisse zeigen erstmals, dass die Abl-Tyrosinkinase die Ansäuerung von Lysosomen in primären humanen Makrophagen reguliert und dadurch an der Immunantwort gegen intrazelluläre Bakterien mitwirkt (Abb.1).

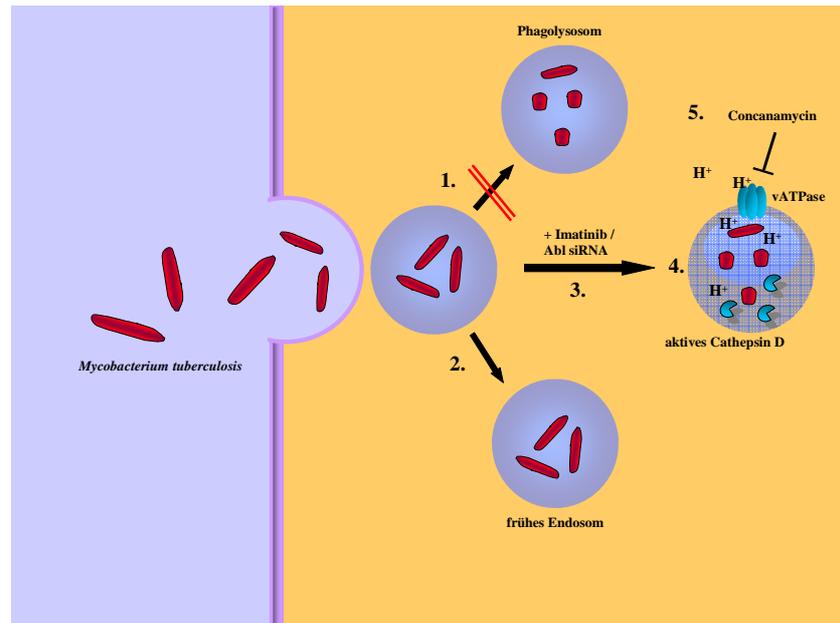


Abb. 1: Die Abl-Tyrosinkinase übernimmt eine wichtige Funktion bei der Immunabwehr gegen *M.tb.* 1) *M.tb.* verhindert nach Aufnahme durch den Makrophagen die Verschmelzung mit dem Lysosom, und 2) persistiert im frühen Endosom. 3) Durch Inhibition (Imatinib, Tasigna) oder durch Elimination (siRNA) der Abl-Tyrosinkinase, 4) sinkt der pH-Wert (gemessen am Protonengehalt durch LysoSensor und indirekt durch die Aktivität von Cathepsin D) und *M.tb.* wird im Wachstum gehindert. 5) Concanamycin, ein spezifischer Inhibitor der vATPase, ist in der Lage diesen Effekt zu antagonisieren.

2. Einleitung

2.1. Die Abl-Tyrosinkinase

Die Abl-Tyrosinkinase gehört zur Familie der „non-receptor“ Tyrosinkinasen und wird in allen humanen Zellen exprimiert. Die Kinase ist sowohl im Zytoplasma als auch im Kern lokalisiert [1]. Neben ihrer Kinasedomäne besitzt die Abl-Tyrosinkinase Strukturen um mit anderen Proteinen zu interagieren (SH2-Domäne, SH3-Domäne und eine Aktin-Bindestelle). Zusätzlich verfügt sie über eine „Kern-Lokalisations-Sequenz“ und eine DNA-Bindestelle [2, 3, 4]. Die Signalwege, die durch die Abl-Tyrosinkinasen dirigiert werden, beeinflussen viele grundlegende Prozesse der Zelle, wie:

1. Zellteilung [5]
2. Apoptose [6]
3. Migration [7, 8]
4. Immunreaktion [9]

Neuere Befunde zeigen, dass auch die Autophagozytose, ein Degradations-Prozess von zelleigenen Proteinen, durch die Abl-Tyrosinkinase reguliert wird [10, 11]. In diesen pleiotropen Signalwegen ist die Kinase in der Lage, mit einer Vielzahl von Proteinen zu interagieren, wie z.B. Aktin [12, 13], p53 (ein Tumorsuppressor) [14], CRKII (ein Adapterprotein) [15] und der RNA Polymerase II [16]. Die konstitutive Kinase-Aktivität ist gering, kann aber durch Stimuli wie Epidermal Growth Factor (EGF) [17], platelet derived growth factor (PDGF) [17], Integrin vermittelte Adhäsion [18] und Bestrahlung [19] aktiviert werden. Die Mechanismen der Regulation sind unbekannt. Vermutet wird, dass die Abl-Tyrosinkinase durch intermolekulare Interaktionen im inaktiven Zustand arretiert und erst durch ein Signal ihre Kinasedomäne und Interaktions-Domänen offen legt [20].

Mäuse bei denen das Abl Gen gezielt zerstört wurde, wiesen eine hohe neonatale Sterblichkeit (75%) und eine erhöhte Infektanfälligkeit auf [21]. Beim Menschen wird die Bedeutung der Abl-Tyrosinkinase und dem von ihr kontrollierten Netzwerk, für die Zelle bei Krankheiten deutlich, bei denen eine Dysregulation der Tyrosinkinase entsteht.

2.2. Chronische myeloische Leukämie

2.2.1. Ätiologie

Bei der Entstehung maligner Erkrankungen spielen Tyrosinkinasen eine bedeutende Rolle. Durch Mutation, durch Fusion mit anderen Proteinen, durch Überexpression oder durch übermäßige Produktion des jeweiligen Liganden können Tyrosinkinasen so verändert werden, dass sie fortwährend ihre aktivierte Konformation beibehalten. Bei über 90 Tyrosinkinasen, welche im menschlichen Genom codiert sind, ist ein großer Teil bei der Entstehung von Tumoren beteiligt. Beschrieben ist dies u. a. für FLT3, PDGF-Rezeptor, oder c-Kit [22, 23, 24]. Bei dem Gen der Abl-Tyrosinkinase handelt es sich ebenfalls um ein Protoonkogen. Durch eine Translokation zwischen dem Chromosom 9 (Abl-Gen) und dem Chromosom 22 (bcr-Gen) kommt es zu einem neuen Genprodukt, dem bcr-abl Gen (Philadelphia-Chromosom). Dieses Gen codiert das Fusionsprotein, die BCR-Abl-Tyrosinkinase. Durch den Einfluss der BCR-Region ist die Kinasedomäne der Abl-Tyrosinkinase dauerhaft aktiviert, so dass die betroffenen Zellen unkontrolliert proliferieren. Von den jährlich 9200 Neuerkrankungen an CML in Deutschland findet man in über 93% das BCR-Abl Fusionsprotein.

2.2.2. Therapie

Die CML ist eine Modellkrankheit für die Entwicklung neuer, richtungweisender Therapie-Strategien. Während in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts die mediane Überlebenszeit bei unbehandelter CML noch bei 31 Monaten lag und nur palliative Therapieansätze unternommen wurden, hat sich die Behandlung in den letzten 10 Jahren durch die Entwicklung von „small-molecule-drugs“ revolutioniert. Verfügbare Therapieoptionen sind die Transplantation und eine medikamentöse Behandlung. Bei der Stammzell- oder Knochenmarkstransplantation werden dem CML-Patient nach Chemotherapie allogene Stammzellen oder Knochenmark transplantiert. Hierdurch wird zum einen die Tumorzelle durch Chemotherapie reduziert, zum anderen eliminieren die neu transplantierten allogenen Zellen durch „Graft-versus-host“ bzw. durch den „Graft-versus-leukemia“ Effekt die restlichen Tumorzellen. Obwohl die Stammzell- oder Knochenmarkstransplantation die einzige heilende Therapieoption darstellt, ist sie aufgrund der hohen Frühmortalität von 30% (transplantationsbedingt) nicht Therapie erster Wahl. Die medikamentöse Therapie bestand bis 2001 aus der Verabreichung von Zytostatika und IFN α . Das Zytostatikum Hydroxycarbamid hemmt die Umwandlung von Ribonucleotiden in Desoxyribonucleotide und normalisiert dadurch die Leukozytenanzahl im Blut. Der Krankheitsverlauf wird durch

diese Normalisierung nicht beeinflusst. Dagegen wird durch die Gabe von $\text{IFN}\alpha$ bei 70-80% der Patienten eine stabile hämatologische Remission und bei 15% sogar eine dauerhaft komplette zytogenetische Remission erreicht. Trotz der Nachteile dieser Therapie (starke Nebenwirkungen und auftretende Resistenzen) kam in den 80er- Jahren des 20. Jahrhunderts erstmals der Gedanke auf die CML heilen zu können.

2.2.3. Imatinib

Ein Meilenstein in der Therapie von CML war die Etablierung von Tyrosinkinase-Inhibitoren. Novartis entwickelte 2000 das Medikament Imatinib mit dem Handelsnamen Glivec[®], welches das Fusionsprotein BCR-Abl-Tyrosinkinase mit hoher Spezifität inhibiert. Zusätzlich blockiert es die natürlich vorkommende Abl-Tyrosinkinase und mit geringerer Effizienz c-Kit, PDGF-Rezeptor [25, 26] und den M-CSF-Rezeptor [27]. Imatinib wirkt, indem es selektiv und kompetetiv die ATP-Bindestelle der Abl-Tyrosinkinase blockiert. Durch diese Blockade wird die Übertragung eines Phosphatrestes vom ATP auf das Substrat verhindert, was zur Inaktivierung der Abl-Tyrosinkinase und ihrer Signalwege führt (Abb.2).

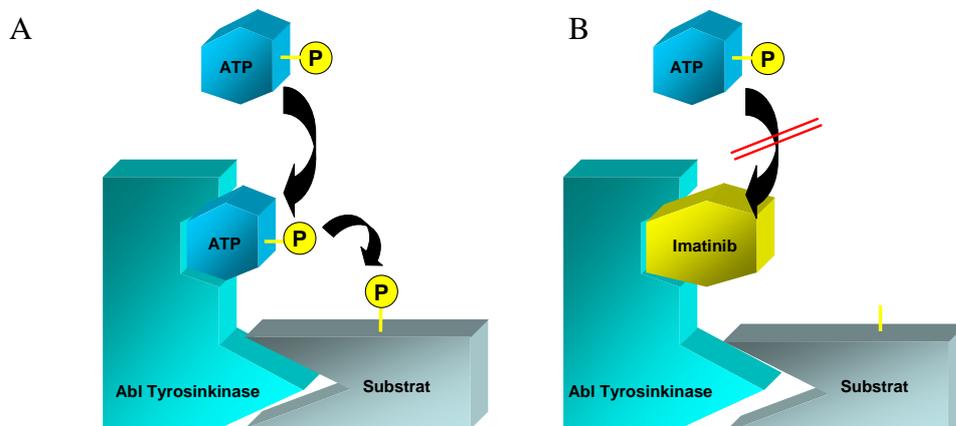


Abb.2: Wirkmechanismus von Imatinib. A) Die aktivierte Abl-Tyrosinkinase bindet ATP und überträgt den Phosphatrest auf das gebundene Substrat. Der Signalweg ist aktiviert. B) Imatinib blockiert kompetetiv die ATP-Bindestasche wodurch es zu keiner phosphorylierung des Substrates kommt. Nachgeschaltete Signalwege sind inhibiert.

Um die Wirksamkeit von Imatinib mit der bisherigen Therapie zu vergleichen wurde von 2000 bis 2001 in einer internationalen Phase-III-Studie (IRIS: International Randomized Study of Interferon and STI571) durchgeführt. In dieser Studie wurden 553 CML-Patienten mit 400mg Imatinib und weitere 553 Probanden mit $\text{IFN}\alpha$ und einem Zytostatikum behandelt.

Imatinib erzielte nach 18 Monaten bei 96% der Probanden eine komplette hämatologische Remission (vs. 67% bei der Interferon-Therapie) und bei 76% eine zytogenetische Remission (vs. 14%)[28]. Durch den Erfolg dieser Studie wurde Imatinib 2001 zur Therapie der CML durch die Federal Drug Administration zugelassen. Heute gilt Imatinib als „Goldstandard“ bei der Behandlung der CML, an dem sich jedes neue Therapeutikum messen muss. Inzwischen wurden weitere Tyrosinkinase-Inhibitoren entwickelt und zugelassen. Die Wirkstoffe Dasatinib (Sprycel[®]) von der Firma Bristol Myer Squibb und Nilotinib (Tasigna[®]) von Novartis wirken über den gleichen Mechanismus wie Imatinib. Dasatinib ist in seiner Wirkung 300fach, Nilotinib 20fach potenter als Imatinib. Dasatinib blockiert zusätzlich die Familie der Src-Kinasen, wobei Nilotinib die Abl-Tyrosinkinase noch selektiver inhibiert als Imatinib [29].

2.3. Die Abl-Tyrosinkinase bei Infektionen und ihre Funktion im Immunsystem

Durch die Adaptation an den menschlichen Wirt haben intrazelluläre Infektionserreger verschiedene Invasions- und Evasionsmechanismen entwickelt. Da Tyrosinkinasen grundlegende Prozesse der Zelle steuern, besteht eine Strategie des Erregers darin, diese zu manipulieren. Welche Funktion die Abl-Tyrosinkinase bei Infektionen übernimmt ist bis dato noch nicht geklärt. Durch die Verfügbarkeit des selektiven Inhibitors Imatinib lässt sich dies untersuchen. Es konnte gezeigt werden, dass Shigellen während der Infektion die Abl-Tyrosinkinase aktivieren, und dass eine Inhibition mit Imatinib zur Reduktion der Infektionsrate führt [30]. *Helicobacter pylori* aktiviert die Abl-Tyrosinkinase um die Zell-Migration des Wirtes zu beeinflussen [31]. Ähnliche Beobachtungen wurden für weitere Bakterien (enteropathogene *E. coli*, Chlamydien) und auch Viren (Vaccinia-Virus, Coxsackie-Virus und murine AIDS-Virus) gemacht [32]. Folgerichtig tritt unter Imatinib Therapie keine erhöhte Infektanfälligkeit auf, obwohl in einer Studie Einzelfälle an Herpes Zoster beschrieben wurden [33]. Zusätzlich gibt es Fallberichte über die Reaktivierung einer Hepatitis B Infektion [34] und für Tuberkulose [35]. Diese klinischen Befunde harmonieren mit den experimentellen Beobachtungen, dass die Abl-Tyrosinkinase die T-Zell und B-Zell-Antwort reguliert. In T-Zellen ist die Abl-Tyrosinkinase im T-Zell Rezeptorkomplex involviert und eine Inhibition führt zu reduzierter IL-2 und IFN γ Produktion, sowie zu verminderter Proliferation [36]. Bei B-Zellen interagiert die Kinase mit CD19, einem Korezeptor des B-Zell Rezeptors, und reguliert hier ebenfalls die Proliferation [37]. Über die Wirkung von Imatinib und die Funktion der Abl-Tyrosinkinase in Antigenpräsentierenden Zellen ist wenig bekannt. Dendritische Zellen (DZ) entwickeln bei ihrer Reifung in der

Gegenwart von Imatinib einen anderen Phänotyp [38]. Außerdem wird durch Inhibierung der Abl-Tyrosinkinase die Antigenpräsentation verstärkt [39]. Bei Monozyten und Makrophagen wird durch Inhibition mit Imatinib die TNF Produktion blockiert [40]. In einer aktuellen Arbeit wird die Rolle der Abl-Tyrosinkinase bei der *M.tb* induzierten Apoptose in Makrophagen beschrieben. Es konnte gezeigt werden dass TNF die Abl-Tyrosinkinase aktiviert [41].

2.4. Die Tuberkulose

2.4.1. Epidemiologie

Die Tuberkulose ist neben Malaria und AIDS die weltweit häufigste Infektionskrankheit. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) schätzt, dass etwa jeder dritte der Weltbevölkerung latent mit dem Tuberkelbazillus infiziert ist. Obwohl es sich dabei um eine therapierbare Erkrankung handelt, sterben jedes Jahr fast 2 Millionen Menschen daran [42]. Ein Großteil der Infizierten (circa 80%) lebt in Hochprävalenz-Ländern, allen voran in Afrika südlich der Sahara, in Südostasien und den Nachfolgestaaten der Sowjetunion. Hier besteht die Problematik vor allem in der Koinfektion mit dem humanen Immundefizienz Virus (HIV) und der Verbreitung von multiresistenten Stämmen. In Deutschland ist die Zahl der Tuberkulosen rückläufig, laut dem Robert Koch Institut belief sich im Jahr 2007 die Inzidenz auf 6,1 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner (gegenüber 6,5 im Vorjahr) [43]. Bei jedem vierten Patienten in Deutschland wird die Erkrankung durch eine immunsupprimierende Erkrankung (etwa Diabetes oder Krebs) oder eine immunsupprimierende Therapie ausgelöst. So ist das Risiko an Tuberkulose zu erkranken z. B. unter anti-TNF Therapie (Infliximab) 5-10fach erhöht [44].

2.4.2. Angeborene Immunantwort

M.tb, der Erreger der Tuberkulose, wird über Aerosole aufgenommen. In den Bronchien oder Alveolen trifft der Erreger auf die erste immunologische Verteidigungslinie, welche zugleich die Wirtszellen des Erregers sind. Diese besteht hauptsächlich aus den dortigen Alveolarmakrophagen (AM). Ihre Aufgabe ist es den Erreger zu phagozytieren, über verschiedene Effektormechanismen zu eliminieren und prozessierte Antigene spezifischen T-Zellen zu präsentieren. Die Phagozytose der Mykobakterien wird über eine Vielzahl an Rezeptoren initiiert. Beteiligt an der Aufnahme sind der Komplementrezeptor 3, Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin (DC-SIGN), Mannoserezeptor, CD14, und der Scavenger-Rezeptor A [45]. Durch die Interaktion des

Rezeptors mit dem Erreger kommt es zur Reorganisation des Aktinzytoskelettes und zur Aufnahme des Pathogens. Bei diesem neu gebildeten endozytischen Vesikel handelt es sich um ein frühes Phagosom. Dieses frühe Phagosom ist durch den pH Wert (6,0-6,5) und die Moleküle EEA1, Rab5, und den Transferrin-Rezeptor definiert [46]. Das frühe Phagosom durchläuft verschiedene Reifungsstadien, bis es schließlich, durch die Fusion des Phagosoms mit Lysosomen zum Phagolysosom wird. Lysosomen enthalten hydrolytische Enzyme (Nukleasen, Lipasen und Proteasen) und die vATPase welche Protonen in die Vesikel pumpen wodurch der pH Wert sinkt (pH 4,5-5,0). Dieses saure Milieu ist bakteriostatisch und wichtig für die Aktivierung der hydrolytischen Enzyme, die für den Abbau des phagozytierten Mykobakteriums verantwortlich sind.

Die Reifung vom frühen Phagosom zum Phagolysosom führt zum Abtöten des aufgenommenen Mykobakteriums. Dazu steht dem Makrophagen ein beachtliches Waffenarsenal zur Verfügung: Durch die Produktion von antimikrobiellen Substanzen wie β -Defensin, Cathelicidin und Stickstoffradikalen tötet der infizierte Makrophage Mykobakterien direkt ab [47, 48, 49]. Zusätzlich werden durch weitere Mechanismen wie der Apoptose [50], Eisendepletion [51] und der Autophagozytose [52] das Überleben des intrazellulären Erregers erschwert.

2.4.3. Interaktionen von *M. tb* mit dem Phagolysosomen

Das mykobakterielle Phagosom ist durch einen erhöhten pH-Wert (6,2 - 6,3) als Folge der fehlenden Rekrutierung der H⁺-Protonenpumpe vATPase charakterisiert [53]. Dies spiegelt sich auch im Fehlen einer Reihe lysosomaler und endosomaler Marker wie z.B. Rab7 oder LAMP-1 wieder. Pathogene Mykobakterien verhindern die Ansäuerung indem sie nach Phagozytose die Biogenese zum Phagolysosom inhibieren [46]. Hierfür haben Mykobakterien verschiedene Strategien entwickelt. Da Phosphoinositol-3-Phosphat (PI3P) ein wichtiges Molekül für die Vesikelfusion ist, greift *M.tb* dieses Molekül auf gleich zwei Wege an. Die Phosphatidyl-Analoga Lipoarabinomannan (LAM) und Phosphatidylinositolmannosid (PIM) blockieren die Bildung von PI3P indem sie die Kinase hVP34 (PI3P-Kinase) inhibieren. Zusätzlich wird die Phosphatase SapM sekretiert, welche die Konzentration von PI3P auf den Vesikeln erniedrigt.

Ein weiterer Angriffspunkt von *M. tb* ist die Calcium-Regulation. Mykobakterien rekrutieren das Wirtspotein Coronin1 zum Phagosom, wodurch es zum Calciumionen-Influx, und zur Aktivierung der Calcium abhängige Phosphatase Calcineurin kommt. Das aktive Calcineurin verhindert die Entstehung des Phagolysosoms. Eine Inhibierung wiederum von Calcineurin

mit den Medikamenten Cyclosporin und FK506 führt zu einem verminderten Wachstum von Mykobakterien in Makrophagen [54].

Ein weiterer Pathogenitätsfaktor der die Phagosomen-Reifung blockiert ist PknG. Diese von *M. tb* sekretierte Kinase, deren Target in der Wirtszelle noch unbekannt ist, ist für die Mykobakterien nur von Bedeutung, wenn sie von Makrophagen phagozytiert werden. Eine PknG defiziente Mutante überlebt zwar extrazellulär in *in vitro* Kulturen, wird aber in Makrophagen durch verstärkte Phagolysosom-Bildung abgebaut [55].

Die Modulation der Phagosomen-Reifung durch Mykobakterien ist der entscheidende Faktor für ihr intrazelluläres Überleben. Durch den Arrest der Phagosomen-Reifung werden bakterizide Mechanismen gehemmt, es findet keine Degradation statt und die Antigenpräsentation wird supprimiert (Abb.3).

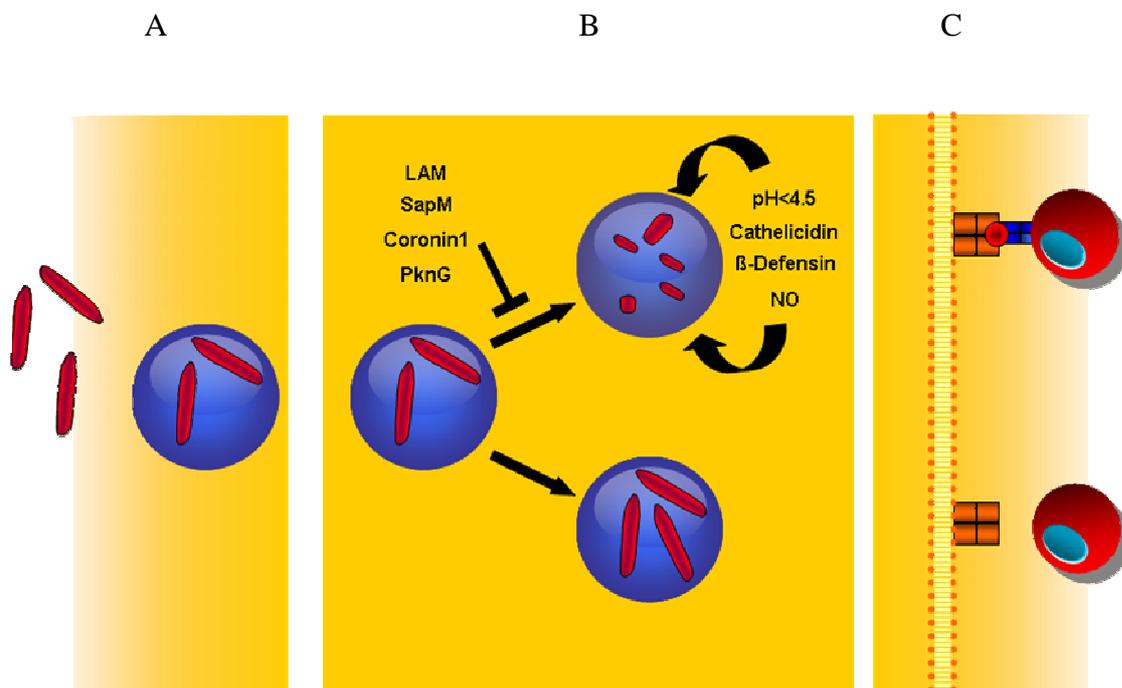


Abb.3: Mykobakterien inhibieren die Reifung des Phagosoms. A) Mykobakterien werden phagozytiert und gelangen ins frühe Endosom. B) Durch verschiedene Evasionsmechanismen wird die Phagosomreifung inhibiert und es kommt weder zur Ansäuerung noch zu anderen bakteriziden Mechanismen. Die Mykobakterien überleben und replizieren sich C) Durch fehlende Degradation der Antigene kommt es zu keiner oder zu einer schlechteren Antigenpräsentation.

Daher ist die Aufrechterhaltung einer effizienten Barrikade durch den Makrophagen für eine protektive Immunantwort bedeutend. Jede Immunmodulation kann den Makrophagen in seiner Funktion als erste Verteidigungslinie gegenüber Mykobakterien stören.

2.5. Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, die Bedeutung der Abl-Tyrosinkinase bei der Immunantwort gegen *M.tb* zu untersuchen. Unsere Hypothese war, dass durch Inhibierung der Abl-Tyrosinkinase die Effektorfunktionen von infizierten Makrophagen beeinflusst werden.

3. Material und Methoden

3.1. Material und Reagenzien

3.1.1. Arbeitsgeräte

- Beta-Counter Berthold, München
- Blotting-Apparatur B33 Biometra, Göttingen
- Elektroporationsgerät Amaxa Biosystems, Köln
- Entwickler Curix60 AGFA
- FACScalibur Durchflusszytometer BD Biosciences, Heidelberg
- Fluoreszenzmikroskop Axioskop-2 Zeiss, Oberkochen
- Gelkammer Minigel-Twin Biometra
- Heizblock 5320 Eppendorf, Hamburg
- Inkubator 6000 Heraeus
- Konfokales-Laser-Mikroskop 510 Zeiss
- Lichtmikroskop 40CFL Zeiss
- Lichtmikroskop CH-2 Zeiss
- Rollerinkubator Incudrive Schütt
- Rollenmischer SRT1 Stuart Scientific
- Power Pac P25 Biometra
- Ultraschallwasserbad Elma, Singen
- Wasserbad Köttermann
- Zentrifuge 5417R Eppendorf
- Zentrifuge 5810R Eppendorf
- Zytospin Zentrifuge Shandon, Pittsburgh, USA

3.1.2. Arbeitsmaterial

- 7H11 Kulturplatten Nährbodenküche
- 8-Chamberslides Nunc
- Amaxa-Küvetten Amaxa
- Einmalfilter, 0,22µm Millipore
- Einmalspritzen BD Biosciences
- Deckgläser 24x50mm Marienfeld
- Kulturflaschen für Mykobakterienkultur Corning

- FACS-Röhrchen Sarstedt, Nürnberg
- Nitrocellulose-Membran Hybond ECL Amersham Bioscience
- Roller-Bottles Greiner
- Schraubröhrchen, 1,5ml Roth
- Schraubröhrchen, 15ml Sarstedt, Nürnberg
- Schraubröhrchen, 50ml Sarstedt
- Teesieb WMF AG, Geislingen
- Zellkulturflaschen, 50ml BD Bioscience
- Zellkulturflaschen, 250ml BD Bioscience
- Zellkulturplatten, 6 well Corning
- Zellkulturplatten, 12 well Corning
- Zellkulturplatten, 24 well Greiner, Nürtingen
- Zellkulturplatten, 96 well Nunc

3.1.3. Chemikalien und Reagenzien

- PP2 Calbiochem
- SB203580 Calbiochem
- ³H-Uracil Amersham Biosciences
- aqua dest B. Braun, Petzold GmbH
- Ammoniumchlorid Sigma
- Ammoniumperoxidisulfat Merck
- Amphotericin B Sigma
- Auramin-Rhodamin Merck, Darmstadt
- BacLight Molecular Probes
- Bromphenolblau Sigma
- Concanamycin A Sigma
- Dasatinib Bristol-Myers Squibb
- Dimethylsulfoxid Sigma
- Eindeckmedium AF1 Citifluor
- Entwicklerlösung ECL-plus Amersham
- Ethylendiamintetraessigsäure Sigma
- Ficoll-Paque-Plus Amersham
- Fluorescein-Succinimidyl-Ester Alexa-568 Molecular Probes

• Fluorescein-Succinimidyl-Ester Alexa-647	Molecular Probes
• Fötale Kälberserum	Sigma
• Glycerol	Roth
• Glycin	Merck
• Harnstoff	Roth
• HCl	Roth
• Hepes	Roth
• Hoechst 33258	Molecular Probes
• Humanserum AB	BioWhittaker
• Imatinib	Novartis
• Isopropanol	Roth
• L-Glutamin	Seromed, Berlin
• LysoSensor Green DND 189	Molecular Probes
• LysoTracker Red DND 99	Molecular Probes
• Methanol	Roth
• Mercapto-Ethanol	Sigma
• Middlebrook 7H9 Medium	BD Bioscience
• Middlebrook OADC	BD Bioscience
• Milchpulver	Roth
• Natriumazid	Roth
• Natriumchlorid	Roth
• Natrium-Dodecylsulfat	Roth
• Natriumhydrogencarbonat	Merck
• Natriumdeoxycholat	Fluka
• Nilotinib	LC Laboratories
• NP-40	Fluka
• Paraformaldehyd	Sigma
• PBS	PAA
• Penicillin	Biochrom
• Pepstatin A	Sigma
• Pepstatin A bodipy-FL	Molecular Probes
• Polyacrylamid	Roth
• Propidiumiodid	Roth

• Protease-Inhibitor-Cocktail Tabletten	Roche
• Proteinmarker	Fermentas
• Rifampicin	Sigma
• Ringer Lösung	B.Braun,
• RPMI 1640	Biochrom
• Streptomycin	Sigma
• Saponin	Sigma
• Sepharose-4B	Zytomed
• Sodium Dodecylsulfat	Roth
• Tetramethylethyldiamin	Roth
• Tris	Roth
• Triton-X-100	Sigma
• Trypanblau	Biochrom
• Tween-20	Sigma
• Tween-80	Sigma
• Wortmannin	Sigma

3.1.4. Zytokine, Antikörper und siRNA

• rhu TNF- α	Strathmann
• rhu IL-1 β	R&D Systems
• rhu IL-4	Strathmann
• rhu IL-6	R&D Systems
• rhu GM-CSF	Berlex
• rhu M-CSF	Berlex
• rhu Prostaglandin E2	Sigma
• Annexin-V-FITC	Responsif, Erlangen
• anti-hu-M-CSF Rezeptor	R&D Systems
• anti-hu-IgG1	R&D Systems
• anti-hu-c-Abl	Cell Signalling Technologie
• anti-hu-CRKII	Cell Signalling Technologie
• anti-hu-phospho-CRKII	Cell Signalling Technologie
• anti-rabbit-HRP	Cell Signalling Technologie

- anti-hu-CCR7-FITC R&D Systems
- anti-hu-CD14-APC Caltag, Hamburg
- anti-hu-CD63 Immunotech
- anti-hu-CD83-PE Coulter
- anti-hu-CD163-PE BD Bioscience
- anti-hu-MHCII-FITC Invitrogen
- anti-hu-EEA1-FITC BD Bioscience
- anti-hu-LC3 Cell Signalling Technologie
- maus IgG1-PE BD Bioscience
- maus IgG2a-FITC R&D Systems
- maus IgG2b-FITC Caltag
- maus IgG2b-PE Caltag
- anti-rabbit-IgG-Alexa-488 Cell Signalling Technologie

3.1.5. Bakterien und Zelllinien

- *Mycobacterium tuberculosis*, H37Rv Institut für Medizinische
Mikrobiologie und Hygiene,
Ulm
- THP-1 Zellen ATCC

3.1.6. Medien und Puffer

3.1.6.1. Zellkultur und Medium für die bronchoalveoläre Lavage (BAL-Medium)

- Zellkulturmedium: RPMI 1640, 10 mM HEPES, 13 mM Natriumhydrogencarbonat, 2 mM L-Glutamin, 60 µg/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 5% hitzeinaktiviertes Humanserum.
- BAL-Medium: RPMI 1640, 10 mM HEPES, 13 mM Natriumhydrogencarbonat, 2 mM L-Glutamin, 60 µg/ml Penicillin, 5,6 µg/ml Amphotericin B und 10% nicht hitzeinaktiviertes Humanserum. Dies Medium wurde für alle Experimente mit AM und infizierten Zellen verwendet.

3.1.6.2. Medium für die Anzucht von Mykobakterien

- 7H9-Medium (500ml): 2,35g 7H9 Medium, 5ml Glycerol, 50ml OADC, 1,25ml einer 20% Tween 80 Lösung, aqua bidest (pH 6,8), steril filtrieren.

3.1.6.3. Fluoreszenzmikroskopie

- Block-und Permeabilisierungspuffer: PBS, 0,3% Triton-X-100, 2%FCS

3.1.6.4. Durchflusszytometrie

- FACS-Puffer: PBS, 2 % FCS, 0,1 % NaN_3
- Ringer Lösung: aqua bidest, 0,9 % NaCl, 0,02 % KCl, 0,02 % CaCl_2 , 0,01 % NaHCO_3

3.1.6.5. Westernblot

- Lysepuffer: RIPA-Puffer: 1 M PBS, 1 % Nonidet P40, 0,5 % Na-Deoxycholat, 0,1 % SDS, Complete-Proteaseinhibitor-Tabletten
- Elektrophorese-Puffer : 0,5 M Tris, 3,8 M Glycin, 70 mM SDS, pH 8,9
- Trenngelpuffer: 1,5M Tris/HCl, pH 8,8
- Trenngel (12 %): Polyacrylamid 30% (12,5ml), aqua bidest (6ml), Trenngelpuffer (6,25ml), SDS 10% (250 μ l), Ammoniumpersulfat 10% (125 μ l), TEMED (25 μ l)
- Sammelgelpuffer: 0,5M Tris/HCl, pH 6,8
- Sammelgel (6%): Polyacrylamid 30% (1,5ml), aqua bidest (5,9ml), Sammelgelpuffer (2,5ml), SDS 10% (100 μ l), Ammoniumpersulfat 10% (100 μ l), TEMED (10 μ l)
- SDS-Puffer: 125mM Tris/HCl, pH 7,8, 20% Glycerol, 4% SDS, Mercapthoethanol 100% (1ml), 100mM DTT, Bromphenolblau 0,2mg/ml
- 5X Elektrophoresepuffer: 125mM Tris, 960mM Glycin, 0,5% SDS, pH 8,3, in 500ml aqua dest
- Transfer-Puffer: 25mM Tris, 192mM Glycin, 20% Methanol
- 10xTBS: 200mM Tris, 1,4M NaCl, pH 7,6
- T-TBS: 1% Tween in TBS
- Blockierungspuffer: 5% Magermilch in T-TBS
- Strippuffer: 200mM Glycin, pH 2,5

3.1.6.6. Färbepuffer für Mykobakterien

- PBS, 0,5% Tween 80, 0,2% Natriumhydrogencarbonat (pH 8,8)

3.2. Methoden

3.2.1. Isolierung von PBMC aus menschlichem Vollblut

Frisches, mit Antikoagulantien (Natriumcitrat oder Heparin) behandeltes Blut, wurde über eine Dichte-Gradienten Zentrifugation in drei Schichten aufgetrennt. Der Dichtegradient wurde mit 15ml Ficoll-Paque Plus (1,077 g/l) in ein 50 ml Röhrchen pipettiert und das Blut vorsichtig dazugegeben. Die Röhrchen wurden für 20 min bei 1600 UpM ohne Bremse zentrifugiert, um den Aufbau des Gradienten durch die Scherkräfte beim Abbremsen nicht aufzuheben. Erythrozyten wurden durch Na-Ditrizoat im Ficoll aggregiert und sedimentierten vollständig durch den Gradienten. Granulozyten bekamen durch den osmotischen Druck der Ficoll Lösung eine höhere Dichte. Aufgrund der geringeren Dichte von Thrombozyten, Lymphozyten und Monozyten sammeln sich diese in der Interphase zwischen dem Plasma und dem Ficoll. Die Zellen aus der Interphase wurden in ein neues 50 ml Röhrchen überführt und bei 1800 UpM für 10 min pelletiert. Um die Thrombozyten zu entfernen folgten weitere Waschschrte bei 1300, 1000, und 2 bis 5 x bei 800 UpM für je 10 min folgten. Die verbliebenen Zellen wurden in einer Neubauer Zählkammer gezählt und auf 100×10^6 /ml in Zellkulturmedium eingestellt.

3.2.2. Anreicherung von Monozyten

Monozyten besitzen als einzige Untergruppe innerhalb der PBMC die Eigenschaft an der Plastikoberfläche von Zellkulturschalen zu adhären. Dieses Prinzip wird als kostengünstige, schnelle, und ausreichend reine Methode zur Isolation von Monozyten aus dem peripheren Blut eingesetzt. Dazu wurden 80×10^6 PBMC sofort nach der Dichtegradienten-Zentrifugation in 6 ml kompletten Medium mit 5 % Humanserum in einer 75cm^2 Kulturflasche ausgesät und für 60 min bei 37°C inkubiert. Danach wurden die nicht adhärenen Lymphozyten durch leichtes Klopfen der Zellkulturflasche abgelöst und 3-mal mit jeweils 5ml PBS kräftig gespült.

3.2.3. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorting; FACS) ermöglicht das Zählen und die Analyse von physikalischen und molekularen Eigenschaften von Zellen in einem Flüssigkeitsstrom. Sie liefert die Möglichkeit bestimmte Eigenschaften von Zellen oder Zellpopulationen auf Einzelzellebene zu analysieren. Die Analyse ermöglicht die Quantifizierung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen. Das Prinzip ist die Antigen-Antikörper-Reaktion, die mit Fluoreszenz markierten Antikörpern durchgeführt wird.

Bei der Analyse werden die Zellen durch eine dünne Kapillare direkt an einem Laser vorbei geführt. Durch einen oder mehrerer Laser verschiedener Wellenlängen werden die Elektronen eines Fluorochrom angeregt und emittieren bei dem Abfall ihres Energieniveaus Photonen, welche durch elektronische Detektoren erkannt werden. Darüber hinaus werden durch die Lichtbeugung und resultierende Streuung Informationen über die Zellgröße und Granularität der Zellen gewonnen. Ein großer Vorteil besteht in der Möglichkeit verschiedene Parameter gleichzeitig zu analysieren, da sich die eingesetzten Fluorochrome zwar häufig bei einer gemeinsamen Wellenlänge anregen lassen aber über ein bestimmtes Fluorochrom charakteristisches Emmissionsspektrum verfügen.

3.2.4. Generierung von Makrophagen und DZ

Die Monozyten wurden in 6ml Zellkulturmedium aufgenommen und entweder zu Makrophagen (GM-SCF, 1000 U/ml, 5-6 d) oder unreifen DZ (GM-SCF, 1000 U/ml, IL-4, 10ng/ml, 6 d) differenziert. Um reife DZ zu erhalten, wurde am Tag 4 der Inkubation ein Zytokincocktail aus TNF (10ng/ml), IL-6 (10ng/ml), IL-1 β (2ng/ml) und Prostaglandin E2 (1 μ g/ml) hinzugefügt [56]. Für die Generierung von Typ II Makrophagen wurde anstatt GM-CSF, M-CSF (1000 U/ml, 6d) verwendet [57]. Zum Ablösen der Makrophagen und DZ wurden die Zellen durch kräftiges resuspendieren von der Oberfläche gelöst. Falls erforderlich, wurde die Adhärenz durch 15 bis 20 minütige Inkubation mit dem Calciumchelator EDTA (1mM) aufgehoben. Die Reinheit und Reife der Zellen wurde durch Bestimmung der Expression von MHC Klasse II, CCR7, CD83 und CD163 im Durchflusszytometer überprüft.

3.2.5. Isolierung von AM

AM wurden aus der BAL von Patienten isoliert, bei denen aus diagnostischen Gründen eine Bronchoskopie durchgeführt wurde. Die AM von Patienten mit einer infektiösen Lungenerkrankung oder einer Erkrankung, die den Alveolarraum betraf, wurden nicht experimentell verwertet. Die Lavageflüssigkeit wurde durch ein Teesieb filtriert und anschließend bei 1300 rpm für 10 Min. und 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in BAL-Medium resuspendiert und in einer 6-well Platte mit einer Dichte von 1×10^6 AM/ml ausgesät. Die AM wurden über Nacht bei 37°C zur Adhärenz gebracht. Nicht-adhärenente Zellen wurden durch gründliches Waschen mit PBS entfernt. Frisches BAL-Medium wurde zu den Zellen gegeben. Die AM wurden durch spülen mit kaltem PBS, gegebenenfalls mit

EDTA (1mM) für 20 min, geerntet. Die Reinheit der Zellen wurde in ausgewählten Experimenten mittels Durchflusszytometrie bestätigt (CD3 < 10%).

3.2.6. Wachstum von *M.tb*

M. tb (virulenter Stamm H37Rv) wuchs in einer Suspension aus Middlebrook 7H9 Medium, unter ständiger Rotation in Kulturflaschen in einem Rollerinkubator. Aliquots von logarithmisch wachsenden Kulturen wurden in PBS mit 10% Glycerol eingefroren. Ein repräsentatives Aliquot wurde ausplattiert auf Middlebrook 7H11 Platten und die Anzahl an Kolonie bildende Einheiten (KBE) bestimmt. Eine Färbung der Bakterien mit BacLight zeigte eine Lebendigkeit der Mykobakterien von über 90%. Da das Verklumpen der Mykobakterien ein allgemeines Problem darstellt und die Validität und Reproduzierbarkeit der Experimente beeinflusst, wurden verschiedene Vorsichtsmaßnahmen getroffen: 1) die Wahl der Kulturbedingungen (Rotation, Tween), 2) vor der *in vitro* Infektion mit *M. tb* wurden diese 10 Min. im Wasserbad (37°C) beschallt, um kleine Bakterienaggregate zu zerstören und 3) für die *in vitro* Infektion wurde die Anzahl an Mykobakterien pro AM so gewählt, dass maximal ein bis zwei Bakterien je Zelle vorhanden waren.

3.2.7. Färbung von *M.tb* mit einem Succinimidyl Ester konjugierten Fluorochrom

Um intrazelluläre Mykobakterien zu detektieren ohne deren Vitalität oder die der Wirtszelle zu beeinflussen wurde Succinimidyl Ester verwendet. Dieses Reagenz bindet kovalent an primäre Aminogruppen, wie sie an der Oberfläche von Bakterien vorkommen. Durch die Fluorochrom-Konjugation des Esters sind die gefärbten Bakterien im Durchflusszytometer und im Fluoreszenz-Mikroskop sichtbar. Die gefärbten Mykobakterien wurden für Kolokalisations-Experimente verwendet. *M.tb* wurde zweimal im Färbepuffer (1ml) bei 10000rpm für 10 min gewaschen und anschließend in 50µl Färbepuffer und 5µl Succinimidyl Ester für 1h bei 37°C inkubiert. Nach drei weiteren Waschschrritten (1ml, 10000rpm, 10min) wurden die gefärbten Mykobakterien in 100µl BAL-Medium resuspendiert [58].

3.2.8. Infektion von Makrophagen mit *M.tb*

AM und Makrophagen wurden mit einer Einzelzellsuspension von *M.tb* in einer 6-well Platte oder in einer 8-chamberslide mit 1×10^6 Zellen/ml in einem Volumen von 3 ml oder von 250µl BAL-Medium mit einer MOI von 5 infiziert. 24h nach der Infektion wurden extrazelluläre Mykobakterien durch 3maliges Spülen mit PBS entfernt. Die adhärenenten Makrophagen und AM wurden anschließend mit EDTA (1mM) für 15 min geerntet und (800

rpm, 10 min) pelletiert und in BAL-Medium resuspendiert. Um die Anzahl der infizierten Zellen zu ermitteln, wurden in repräsentativen Experimenten eine Auramin-Rhodamin-Färbung und eine Plattierung durchgeführt. Die Infektionsrate (24h) lag im Mittel bei 45%.

3.2.9. Quantifizierung des intrazellulären mykobakteriellen Wachstums

Die infizierten, geernteten Makrophagen wurden in eine 24-well Platte, mit einer Dichte von $0,5 \times 10^6$ /ml verteilt. Nachdem die Makrophagen wieder adhärent waren, wurden die infizierten Makrophagen mit Imatinib (1 μ M, 5 μ M, 10 μ M) 1d, 3d, 5d bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurden zu jedem Ansatz 50 μ l Saponin (3% Endkonzentration) für 10min gegeben, die Lysate geerntet und für 10min bei 37°C beschallt. Aus dem Lysat jedes Ansatzes wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt (pur, 1:10, 1:100, 1:1000) und jede Verdünnung wurde auf eine 7H11 Platte ausgestrichen. Nach 14 Tagen Inkubation der Kulturplatten bei 37°C und 5% CO₂ wurden die Kolonien gezählt und ausgewertet. Die Vitalität der Zellen wurde zu jedem Zeitpunkt während der Inkubation mit dem Lichtmikroskop überprüft.

3.2.10. Quantifizierung des extrazellulären Wachstums von *M.tb*

Die Pyrimidin-Base Uracil wird selektiv in die RNA metabolisierender Mykobakterien inkorporiert. Eukaryontische Zellen sind nicht in der Lage Uracil einzubauen, sondern akquirieren diesen RNA Baustein über die Aufnahme von dUTP. In einem β -Counter wird inkorporiertes ³H-Uracil gemessen und ist ein Maß für die Proliferation der Bakterien. Nach dem Beschallen der Mykobakterien für 10min bei 37°C werden 2×10^6 Mykobakterien in einem Volumen von 75 μ l 7H9 Medium in eine 96-well Platte pipettiert. Als Kontrolle wurde Medium und das Tuberkulostatikum Rifampicin verwendet. Imatinib wurde in verschiedenen Konzentrationen getestet (1 μ M, 5 μ M, 10 μ M). Alle Ansätze wurden als Triplikate angesetzt. Nach drei Tagen wurden die Mykobakterien mit 1 μ Ci ³H-Uracil inkubiert. Nach 24 Std. wurden die Mykobakterien mit 4% Paraformaldehyd (Endkonzentration) für 30min abgetötet. Die ³H-Uracil Aufnahme wurde in einem Beta-Counter gemessen [59].

3.2.11. Behandlung mit Tyrosinkinase-Inhibitoren

Alle verwendeten Tyrosinkinase-Inhibitoren wurden in DMSO gelöst. Bei allen Experimenten wurde daher DMSO ohne gelöste Substanz als Kontrolle verwendet. Makrophagen wurden in eine 24-well Platte, $0,5 \times 10^6$ /ml Makrophagen je well, verteilt. Anschließend wurden sie mit Imatinib (5 μ M), Dasatinib (100nM), Nilotinib (2 μ M), PP2 (10 μ M), SB203580 (10 μ M) oder

Wortmannin (100nM) für 24h inkubiert. Die Apoptose-Rate (siehe unten) war in allen Experimenten <1%.

3.2.12. Phagozytose-Assay

Makrophagen (1×10^6 /ml) wurden in BAL-Medium auf ein 8-chamberslide pipettiert. Nach Adhärenz wurde ein Teil der Makrophagen mit Imatinib ($5 \mu\text{M}$) für 60min inkubiert. Die Zellen wurden für 24h mit *M.tb* (MOI 5) infiziert. Nach 30min Fixierung mit 4% PFA wurden die Kulturen mit Auramin-Rhodamin gefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop bei 1000-facher Vergrößerung mit Durchlicht-Filter analysiert.

3.2.13. Apoptose-Messung

Geht eine Zelle durch Apoptose zugrunde, treten definierte Änderungen in ihrer Morphologie auf. Ein frühes Ereignis in der Apoptose ist das Vorkommen von Phosphatidylserin (PS) auf der Oberfläche der Zellmembran. Dieses ist ein Bestandteil der Membran und kommt in der vitalen Zelle nur auf der inneren Seite der Membran vor. Annexin V (AxV) bindet in der Gegenwart von Calcium, PS. Dadurch kann es, bei Konjugation an ein Fluochrom, im Durchflusszytometer nachgewiesen werden. Da auch nekrotische Zellen Phosphatidylserin auf ihrer Oberfläche präsentieren, muss man diese von den apoptotischen Zellen differenzieren. Dies geschieht mittels einer zusätzlichen Propidiumiodid Färbung (PI). PI gelangt nur in nekrotische Zellen und färbt dort den Zellkern an.

Die Zellen wurden in Ringer-Lösung gewaschen und resuspendiert. Annexin V-FITC wurde in einer 1: 2000 Verdünnung zu den Lymphozyten gegeben und für 15 min im Kühlschrank bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde ungebundenes Annexin V heruntergewaschen und $0,5 \mu\text{l}$ PI je Ansatz dazugegeben. Die Auswertung erfolgte umgehend am Durchflusszytometer (Abb.4).

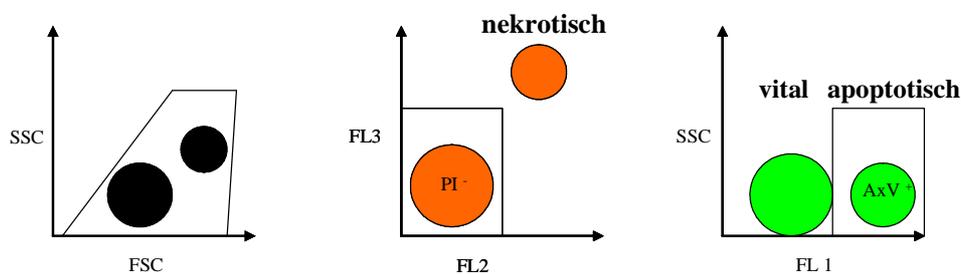


Abb. 4: Auswerteschema am Durchflusszytometer: Die Lymphozyten, welche sich im Lebendgate befinden, werden auf PI Fluoreszenz untersucht (FL 2 vs. FL 3). Die vitalen und apoptotischen Zellen sind PI negativ. Diese Population wird zusätzlich auf Annexin V (FL 1) positive Zellen untersucht. Vitale Zellen sind FL 1 negativ, während apoptotische Zellen positiv sind.

3.2.14. LysoSensor-Färbung

Um den pH-Wert in den Lysosomen zu untersuchen wurden Makrophagen oder AM für 24h in einer 6-well Platte (1×10^6 /ml) mit *M.tb* infiziert (MOI 5) und anschließend in eine 24-well Platte, $0,5 \times 10^6$ /ml Makrophagen je well, verteilt. Die Makrophagen wurden für weitere 24h mit Imatinib ($5 \mu\text{M}$) inkubiert. In ausgewählten Experimenten wurden die Makrophagen vorher (2h) mit Concanamycin A (50nM) behandelt um die Ansäuerung zu inhibieren [60]. Die virulenten Mykobakterien wurden mit 4% PFA abgetötet. Die fixierten Makrophagen wurden mit $4 \mu\text{M}$ LysoSensor Green DND 189 für 2h bei 37°C angefärbt. Ungebundener Farbstoff wurde durch zweifaches Waschen mit PBS (1300rpm, 10min) entfernt. Die Proben wurden sofort am Durchflusszytometer aufgenommen. Für Aufnahmen am Fluoreszenz-Mikroskop wurden die Proben zusätzlich für 10min mit einem Kernfarbstoff, Hoechst 33258 ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$), inkubiert und mittels Zytospin auf Objektträger geschleudert. Die Präparate wurden mit Eindeckmedium und Deckglas versehen und am Fluoreszenz-Mikroskop ausgewertet. Für die Untersuchung der Patientenproben wurden Makrophagen in eine 24-well Platte ($0,5 \times 10^6$ /ml Makrophagen je well) verteilt und mit 50% Serum von CML Patienten oder von gesunden Spendern für 24h inkubiert. Die Makrophagen wurden mit $4 \mu\text{M}$ LysoSensor für 2h bei 37°C gefärbt. Ungebundener Farbstoff wurde durch zweifaches Waschen mit PBS (1300rpm, 10min) entfernt. Die Proben wurden anschließend am Durchflusszytometer oder am Fluoreszenz-Mikroskop ausgewertet. Das Vollblut der CML- oder gesunden Patienten (je $250 \mu\text{l}$) wurden mit $4 \mu\text{M}$ LysoSensor für 2h bei 37°C behandelt, zweimal mit PBS gewaschen (1300rpm, 10min) und anschließen mit $2 \mu\text{l}$ anti-hu-CD14-APC inkubiert (60min, auf Eis). Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Proben sofort am Durchflusszytometer aufgenommen.

3.2.15. Doppelfärbung mit LysoTracker und Antikörpern

Bei einer intrazellulären Färbung muss die Zellmembran für einen Antikörper permeabel gemacht werden, und der pH-sensitive Farbstoff stabil bleiben. Da LysoTracker, im Gegensatz zu LysoSensor, unabhängig von einer Permeabilisierung stabil den pH anzeigt verwendeten wir für Doppelfärbungen diesen Farbstoff. Makrophagen wurden in 8-chamberslides zu je 1×10^6 /ml verteilt und mit verschiedenen Tyrosinkinase-Inhibitoren, Imatinib ($5 \mu\text{M}$), Dasatinib (100nM), Nilotinib ($2 \mu\text{M}$), PP2 ($10 \mu\text{M}$), SB203580 ($10 \mu\text{M}$) oder Wortmannin (100nM), für 24h behandelt. Anschließend wurden die Makrophagen mit LysoTracker Red DND 99 (100nM) für 1h bei 37°C gefärbt. Die Makrophagen wurden 3mal mit PBS gewaschen und anschließend mit 4% PFA für 20min auf Eis fixiert. Die fixierten

3.2.17. Behandlung mit siRNA

Mithilfe von spezifischer silencing RNA (siRNA) ist es möglich die Synthese definierter Proteine zu verhindern. Hierzu benötigt man die Sequenz der mRNA des Proteins und entwickelt daraus die komplementäre siRNA. Werden diese doppelsträngigen-Oligonukleotide z.B. über Elektroporation in die Zelle eingeschleust, werden sie dort vom RISC-Komplex (Proteinkomplex aus Endonukleasen und dsRNA-bindenden Protein) Einzelsträngen zerlegt. Diese 21 Nukleotide langen RNA-Stücke binden an die komplementäre mRNA. Die Doppelstränge aus mRNA und siRNA werden wieder von Endonukleasen degradiert und die Translation des codierten Proteins verhindert.

Makrophagen ($0,75 \times 10^6$) wurden zentrifugiert (1300rpm, 10min) und in 100µl „human-macrophage-nucleofector-solution“ resuspendiert und mit Kontroll-siRNA oder spezifischer c-Abl siRNA (300nM) versetzt (Santa Cruz Biotechnologie). Die Sequenz der c-Abl siRNA besteht aus drei Sequenzen:

UCAACAGUCUGGAGAAACA

CUUCAUCCCUCUCAUAUCA

UGUGAAUCCUGGCAAGAAA

Die siRNA wurde mittels Elektroporation (Amaxa I) mit einem von der Firma vorgegebenen Programm (Y-10) in die Zellen transfiziert. Anschließend wurden die 100µl Makrophagen-Suspension mit 500µl vorgewärmten (37°C, 5%CO₂) BAL-Medium versetzt und in eine 12-well Platte (Endvolumen 1,5ml) transferiert. Die Transfektionseffizienz wurde mittels Westernblot nach 24h analysiert.

3.2.18. Immunpräzipitation von CRKII

Ist ein Antigen aufgrund seiner geringen Konzentration nur schwer im Westernblot zu detektieren, besteht die Möglichkeit es im Lysat spezifisch anzureichern. Hierfür wird das Antigen mit dem spezifischen Antikörper gebunden und anschließend dieser Antigen-Antikörper Komplex mit Sepharose-Beads präzipitiert. Dies ist möglich da die Beads mit Protein-G konjugiert sind, welche spezifisch das Fc-Fragment des Antikörpers binden (Abb.6).

Makrophagen (1×10^6) wurden in Zellkulturmedium ohne Serum für 24h in einer 24-well Platte inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit *M.tb* (MOI10) für unterschiedliche Zeitpunkte infiziert. Zum Abstoppen der Infektion wurden die Makrophagen in der Platte 1x mit kaltem PBS gewaschen und anschließend mit 250µl Lyse-Puffer für 30min auf Eis in der Kulturplatte lysiert. 100µl der Lysate wurden mit 10µl Sepharose-Beads für 2h bei 4°C inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (14000rpm, 10min) wurden die Beads

verworfen. Mit diesem Schritt wurden unspezifisch bindende Proteine entfernt. Das Lysat wurde mit 2 µg/ml Antikörper (anti-hu-CRKII) über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Antikörper wurden erneut mit 10 µl Sepharose-Beads für 2h bei 4°C inkubiert und durch anschließende Zentrifugation (14000rpm, 10min) immunopräzipitiert. Diesmal wurde der Überstand verworfen und das Präzipitat in 30 µl SDS-Puffer gekocht (95°C, 10min). Die Proben konnten anschließend auf ein SDS-Gel aufgetragen werden.

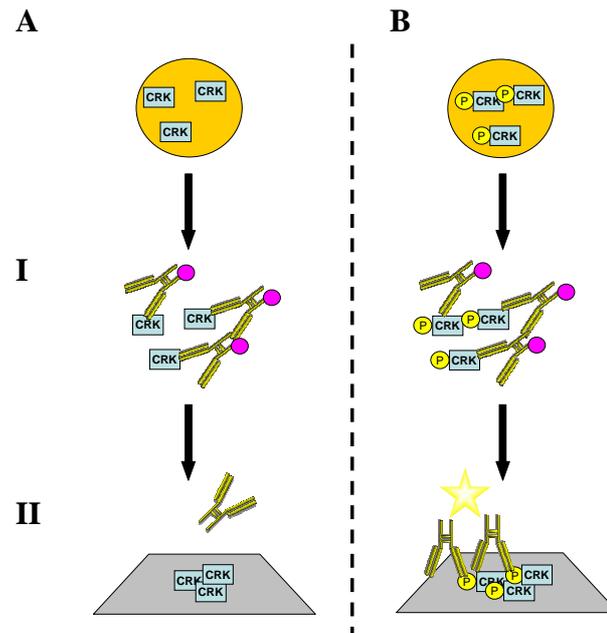


Abb. 6: A) Zelle im unaktivierten Zustand. B) Zelle im aktivierten Zustand (phospho-CRK). I Das Protein, CRKII, wird mit anti-CRK und gekoppelten Sepharose-Beads präzipitiert. II Nach der Denaturierung, werden die Beads und die Antikörper aus dem Komplex gelöst und das Protein auf einen Blot transferiert. Das phosphorylierte CRK wird nun mit einem anti-phospho-CRK Antikörper detektiert.

3.2.19. Westernblot

Beim Westernblot wird ein Protein, welches vorher auf einem SDS-Gel nach Größe getrennt wurde, auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Die Übertragung erfolgt über ein senkrecht zum Polyacrylamid-Gel gerichtetes elektrisches Feld. Hierdurch wandern die (durch das SDS) negativ geladenen Proteine zum Pluspol der Blotting-Apparatur und bleiben auf dem Weg dorthin durch hydrophobe Wechselwirkungen auf der Membran. Hier sind sie nun zugänglich für Antikörper um das gesuchte Protein zu detektieren.

Die Lysate wurden im SDS-Puffer (1:1) aufgenommen und aufgekocht (95°C, 10min). Nach einem Zentrifugationsschritt (14000rpm, 10min) wurden die Proben auf ein SDS-Gel (12%) aufgetragen (30 µg/ml). Die Proteinproben wurden nach ihrer Größe in der Laufkammer

aufgetrennt (60mA, 60min). Der Lauf der Proben wurde mit einem Proteinmarker kontrolliert. Das Gel wurde auf eine Nitrocellulose-Membran gelegt und mit Filterpapier (alles mit Transfer-Puffer getränkt) vor den Elektroden geschützt. Nach dem Blotten (300mA, 2h) wurden unspezifische Bindungen mit Blockierungspuffer abgesättigt (4°C, über Nacht). Der gebundene 1. Antikörper (anti-hu-phospho-CRKII oder anti-hu-c-Abl 1:1000; 4°C, über Nacht) wurde anschließend mit einem 2. Antikörper (anti-rabbit-HRP; 1:2000; 4°C, 2h) detektiert. Zwischen den Inkubationsschritten wurden die Blots 3-mal mit T-TBS gewaschen (5min, 4°C). Der Antigen-Antikörper-Komplex wurde durch Zugabe von Entwicklerlösung und einem photo-sensitivem Film sichtbar gemacht.

Die Intensität der Banden auf den belichteten Filmen wurde im Densitometer mit der Software Gel-Scan 5.1 analysiert und ausgewertet.

3.2.20. CML Patienten und gesunde Spender

Für *ex-vivo*-Experimente wurden in Zusammenarbeit mit der Medizinischen Klinik III, Universitätsklinikum Ulm (Prof. Dr. Konstanze Döhner und Dr.med. Frank Stegelmann) zwischen Februar 2009 und September 2009, 19 CML Patienten für die ImMyTub-Studie (Imatinib- *Mycobacterium tuberculosis*) rekrutiert. Die Patienten wurden über die Studie informiert und haben der Probenentnahme zugestimmt. Die Studie (No. 192/07) wurde von der Ethik-Kommission der Universität Ulm genehmigt. Aufnahmekriterien für die Studie waren:

1. chronische Phase der Erkrankung
2. Tagesdosis: 400mg Imatinib
3. komplette hämatologische und zytogenetische Remission

Von jedem Patienten erhielten wir 30ml Blut (EDTA-Monovette) und 5ml Serum (Serum-Monovette). Das Serum wurde vor Lagerung bei -70°C durch abzentrifugieren (1300rpm, 10min) gewonnen. Serum von gesunden Spendern bestand aus nicht hitzeinaktiviertem AB-Serum (Cambrex). Blut von gesunden Spendern stammte aus Buffy-Coats des DRK Ulm.

3.2.21. Statistische Analysen

Die Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt. Ausgenommen sind Rohdaten einzelner Experimente, die repräsentativen Charakter besitzen. Bei der statistischen Signifikanz p zwischen zwei unterschiedlich behandelten Ansätzen oder unterschiedlichen Zeitpunkten der Analyse wurde der Student's t Test verwendet. Unterschiede von p kleiner

0,05 wurden als signifikant bezeichnet. Bei der Signifikanzermittlung mittels Student`s t Test wurde das Computerprogramm Excel verwendet.

3.2.22. Verwendete Computerprogramme

Für die Erstellung bzw. Durchführung der Doktorarbeit wurden die nachfolgend aufgelisteten Computerprogramme genutzt.

Tabelle 1: Genutzte Computerprogramme

Programm	Hersteller	Anwendung
PowerPoint	Microsoft Inc.	Graphische Darstellung von Daten
Word	Microsoft Inc.	Text und Datenverarbeitung
Excel	Microsoft Inc.	Statistik
WinMDI 2.8		Datenverarbeitung und graphische Darstellung von Zytometriedaten
GelScan 5.1	BioSciTec	Gel-Dokumentation
Cell Quest	BD Biosciences	Datenverarbeitung und graphische Darstellung von Zytometriedaten

4. Ergebnisse

4.1. Bedeutung der Abl-Tyrosinkinase bei der Phagozytose von *M.tb*

Die Abl-Tyrosinkinase hat als einzig bekannte Kinase eine Aktin-Binde-Domäne und die Fähigkeit das Adapterprotein CRKII zu aktivieren, welches über CDC42 und Rac1 die Phagozytose steuern kann [63]. CRKII ist ein Substrat der Abl-Tyrosinkinase und wird von ihr an einem definierten Tyrosinrest (Tyr221) phosphoryliert [64]. Wir überprüften daher, ob *M.tb* durch die Manipulation der Abl-Tyrosinkinase seine eigene Aufnahme steuert. Daher untersuchten wir zunächst, ob die Abl-Tyrosinkinase durch eine Infektion mit *M.tb* aktiviert wird. Als Maß für eine Aktivierung der Kinase überprüften wir die Phosphorylierung von CRKII nach Immunpräzitation im Westernblot. Die Abl-Tyrosinkinase wurde in infizierten Makrophagen im Vergleich zu nicht-infizierten, aktiviert (Abb.7).

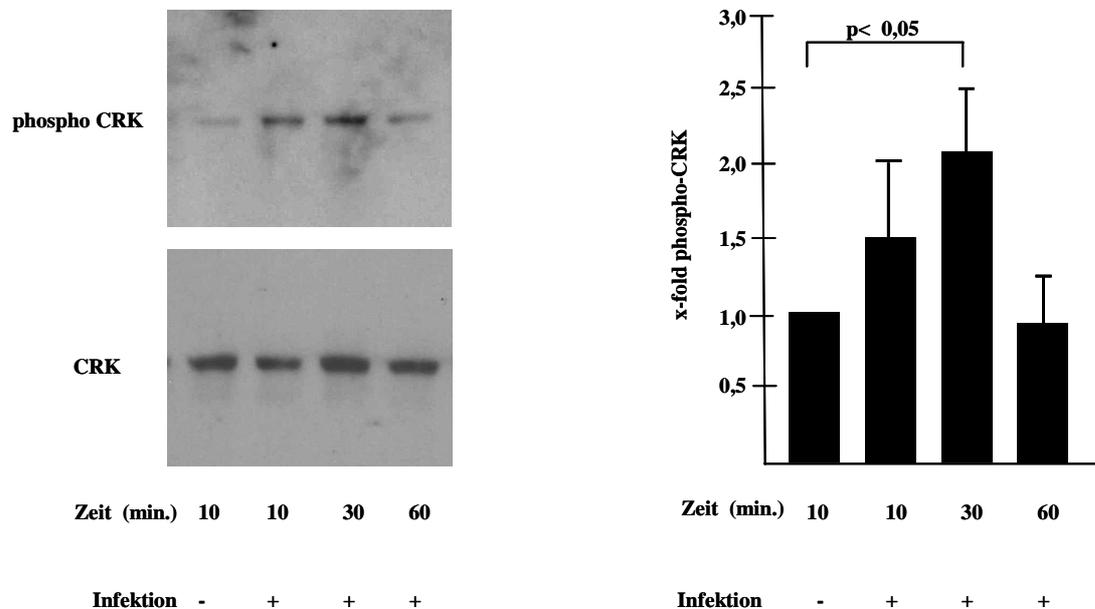


Abb. 7: Eine Infektion mit *M. tuberculosis* aktiviert die Abl-Tyrosinkinase. Makrophagen wurden infiziert (MOI10) und nach unterschiedlichen Zeitpunkten lysiert. (A) Die Lysate wurden mit anti-CRKII immunpräzitiert und im Westernblot auf den phosphorylierungsgrad mit anti-phospho-CRKII untersucht (oberer Blot). Zur Ladungskontrolle wurde die Membran gestrippt und auf CRKII analysiert (unterer Blot). Die Blots zeigen ein typisches Ergebnis von 3 Experimenten. (B) Zusammenfassung von 3 unabhängigen Experimenten. Die Banden wurden mittels Densitometer gemessen und mit Gel-Scan 5.1 ausgewertet. Die Aktivierung der uninfizierten Makrophagen wurde als 1-fach gleichgesetzt.

Die Aktivierung der Kinase hatte nach 30min Infektion ihr Maximum erreicht und wurde nach 60min wieder inaktiv. Die mittlere Steigung der Aktivierung nach 30min war signifikant höher (2,1-fach) als die Aktivierung in uninfizierten Makrophagen ($p=0,046$, SD 0,62). Diese Daten zeigen, dass die Abl-Tyrosinkinase die Interaktion von *M.tb* und Makrophagen beeinflusst.

Die Aktivierung der Abl-Tyrosinkinase ist ein möglicher Invasionsmechanismus mit dem *M.tb* gezielt in seine natürliche Wirtszelle eindringt. Da eine Infektion mit *M.tb* die Abl-Tyrosinkinase und das nachgeschaltete Adapterprotein CRKII aktiviert untersuchten wir, ob die Kinase die Aufnahme von *M.tb* in Makrophagen beeinflusst. Hierzu infizierten wir Imatinib- behandelte und Kontroll-Makrophagen und bestimmten mittels Auramin-Rhodamin Färbung die Infektionsrate. Es zeigte sich, dass Imatinib die Phagozytose von *M.tb* nicht signifikant beeinflusst ($p=0,75$) (Abb.8).

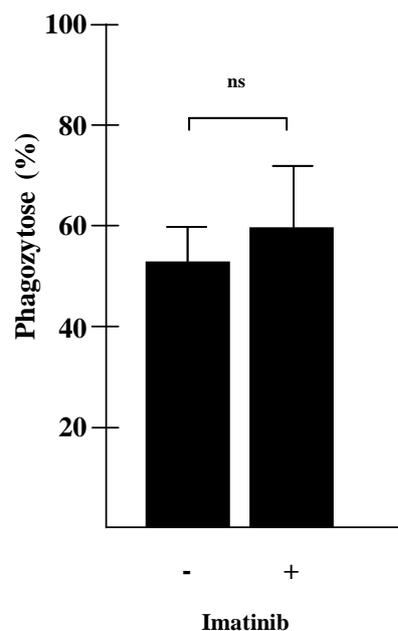


Abb.8: Makrophagen wurden für 60min mit 5 μ M Imatinib inkubiert und anschließend infiziert (MOI5). Die Infektionsrate wurde mittels Auramin-Rhodamin Färbung im Fluoreszenz-Mikroskop bestimmt. Es wurden in jedem Experiment 100 Makrophagen ausgezählt. Die Abbildung gibt die Durchschnittswerte aus vier Experimenten und die SD wieder.

4.2. Bedeutung der Abl-Tyrosinkinase beim intrazellulären Wachstum von *M.tb*

Da *M.tb* die Abl-Tyrosinkinase aktiviert (Abb.7), untersuchten wir im nächsten Schritt, ob das Überleben intrazellulärer Mykobakterien durch die Abl-Tyrosinkinase moduliert wird. Hierzu infizierten wir AM für 24h und behandelten die infizierten Zellen mit verschiedenen Konzentrationen Imatinib. Die Makrophagen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten lysiert und das Wachstum der intrazellulären Mykobakterien bestimmt. In drei unabhängigen Experimenten, hemmte Imatinib das Wachstum von *M.tb* konzentrationsabhängig. In Kontrollkulturen wuchs *M.tb* in 5 Tagen von $0,8 \times 10^6$ auf $3,8 \times 10^6$ Bakterien. Durch die Inkubation mit $1 \mu\text{M}$ Imatinib wurde das Wachstum nur an Tag 3 nicht aber an Tag 5 beeinflusst. $5 \mu\text{M}$ Imatinib reduzierten die Anzahl intrazellulärer Mykobakterien an Tag 3 auf fast 50%, während $10 \mu\text{M}$ Imatinib bereits an Tag 1 das Wachstum inhibierten und an Tag 5 eine 75% Reduktion der CFU aufwies (Abb.9).

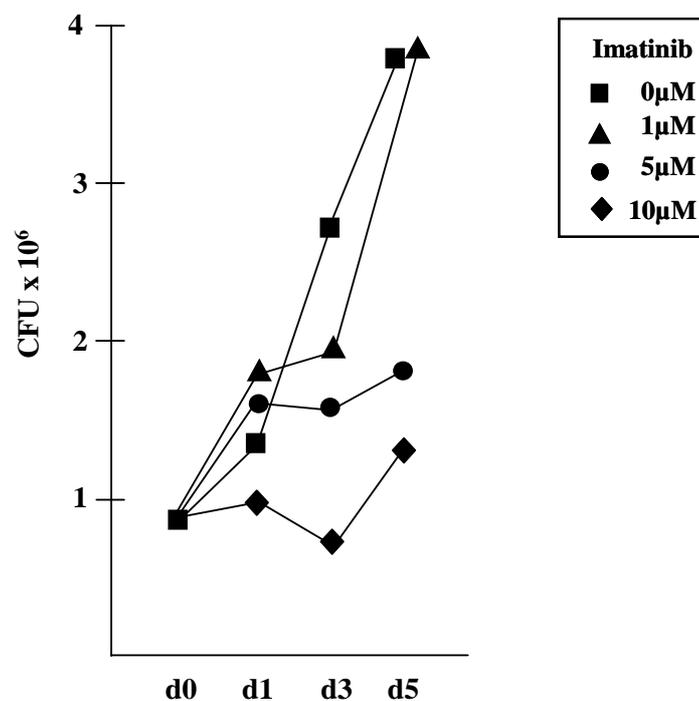


Abb.9: Makrophagen wurden mit *M.tb* (24h, MOI5) infiziert und mit unterschiedlichen Konzentrationen Imatinib behandelt. Die Anzahl an CFU wurde durch Plattierung der Lysate bestimmt. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis von drei Experimenten.

Um diesen Befund zu erweitern, infizierten wir Makrophagen und AM und inkubierten diese mit und ohne Imatinib für drei Tage (Abb.10). Die Anzahl intrazellulärer *M.tb* wurde durch Plattierung der Zelllysate analysiert. Sowohl in Makrophagen (Abb.10A, n=9) als auch in Alveolarmakrophagen (Abb.10B, n=14) wurde durch Imatinib die Anzahl der Mykobakterien

signifikant reduziert ($p < 0,002$). Der Mittelwert der CFU-Reduktion bei Makrophagen betrug 76% und bei Alveolarmakrophagen 51%

Diese Daten zeigen, dass *M.tb* eine intakte Abl-Tyrosinkinase für das Überleben und Wachstum in humanen Makrophagen benötigt.

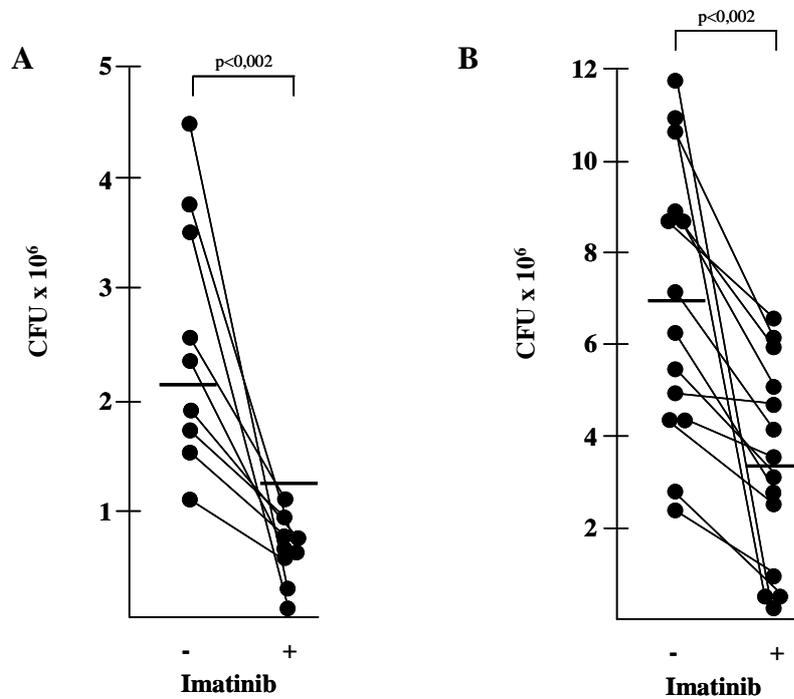


Abb.10: Makrophagen (A) und Alveolarmakrophagen (B) wurden mit *M.tb* (24h, MOI5) infiziert und mit Imatinib (5 μ M) für 3 Tage inkubiert. Die Lysate wurden plattiert und die CFU nach 14 Tagen ausgewertet. Die Signifikanz-Werte sind als p über den Balken zu entnehmen. Die horizontale Linie zeigt den Mittelwert an.

4.2.1. Die Wirkung von Imatinib auf das extrazelluläre Wachstum von *M.tb*

Der spezifische Inhibitor Imatinib ist membrangängig und könnte direkt zu den intrazellulären Mykobakterien gelangen. Denkbar wäre, dass Imatinib eine unbekannte mykobakterielle Kinase inhibiert oder eine andere mykobakterielle Funktion beeinträchtigt. Dies könnte die Teilung und das Überleben der Mykobakterien, unabhängig vom Makrophagen, beeinflussen. Um dies zu überprüfen, wurden Mykobakterien in 7H9-Medium inkubiert und mit verschiedenen Imatinib Konzentration (1µM, 5µM, 10µM) für 3 Tage behandelt. Rifampicin, ein bakterizides Antibiotikum, wurde als Positiv-Kontrolle verwendet. Die metabolische Aktivität der Mykobakterien wurde mittels radioaktiv markierten Uracil-Einbaus gemessen (Abb.11). Durch Rifampicin wurde die metabolische Aktivität der Mykobakterien im Mittel um 64% (von 11213 ± 1145 auf 4054 ± 1200 cpm) signifikant reduziert ($p < 0,0005$). Es zeigte sich, dass Imatinib die Aufnahme von ^3H -Uracil nicht signifikant veränderte (1µM: 13471 ± 1464 cpm, $p < 0,06$; 5µM: 12502 ± 1317 cpm, $p < 0,3$; 10µM: 10916 ± 1683 cpm, $p < 0,3$). Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass Imatinib keinen direkten Einfluss auf die metabolische Aktivität von extrazellulären *M.tb* hat.

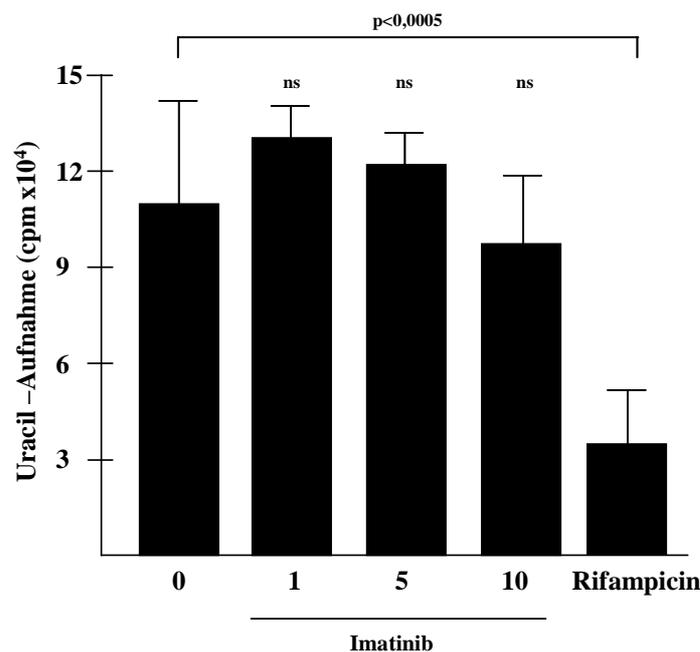


Abb.11: Messung der metabolischen Aktivität von extrazellulären *M.tb* nach Imatinib Inkubation. 2×10^6 Mykobakterien wurden für drei Tage mit unterschiedlichen Konzentrationen Imatinib inkubiert. Als Positiv-Kontrolle wurde Rifampicin (10µg/ml) verwendet. Die metabolische Aktivität wurde durch den Einbau von radioaktivem Uracil gemessen. Alle Ansätze wurden in Triplikate angesetzt. Die Balken geben den Mittelwert und die SD wieder.

4.2.2. Die Wirkung von Imatinib auf die Apoptose

Da die Abl-Tyrosinkinase die Apoptose reguliert [6], und *M.tb* durch Apoptose abgetötet wird [50], wurde jetzt überprüft, ob durch Imatinib die Apoptose in infizierten Makrophagen beeinflusst wird. Dazu wurden Makrophagen für 24h infiziert und anschließend mit Imatinib für 24h und für 72h inkubiert. Die Anzahl apoptotischer und nekrotischer Zellen wurden mittels AnnexinV und PI Färbung am Durchflusszytometer gemessen. In unseren Experimenten fanden wir sowohl in uninfizierten Makrophagen (24h: 94% \pm 0,02% vs.93% \pm 0,001%; 72h: 90% \pm 3% vs. 85% \pm 5%) als auch in infizierten Makrophagen (24h: 91% \pm 0,3% vs. 89% \pm 0,03%; 72h: 60% \pm 0,05 vs.59% \pm 0,04%) keinen signifikanten Unterschied zwischen unbehandelten und mit Imatinib behandelten Makrophagen in der Apoptose Induktion (Abb.12). Daher ist dieser Mechanismus keine Erklärung für das reduzierte Wachstum von *M.tb* in Imatinib behandelten Makrophagen.

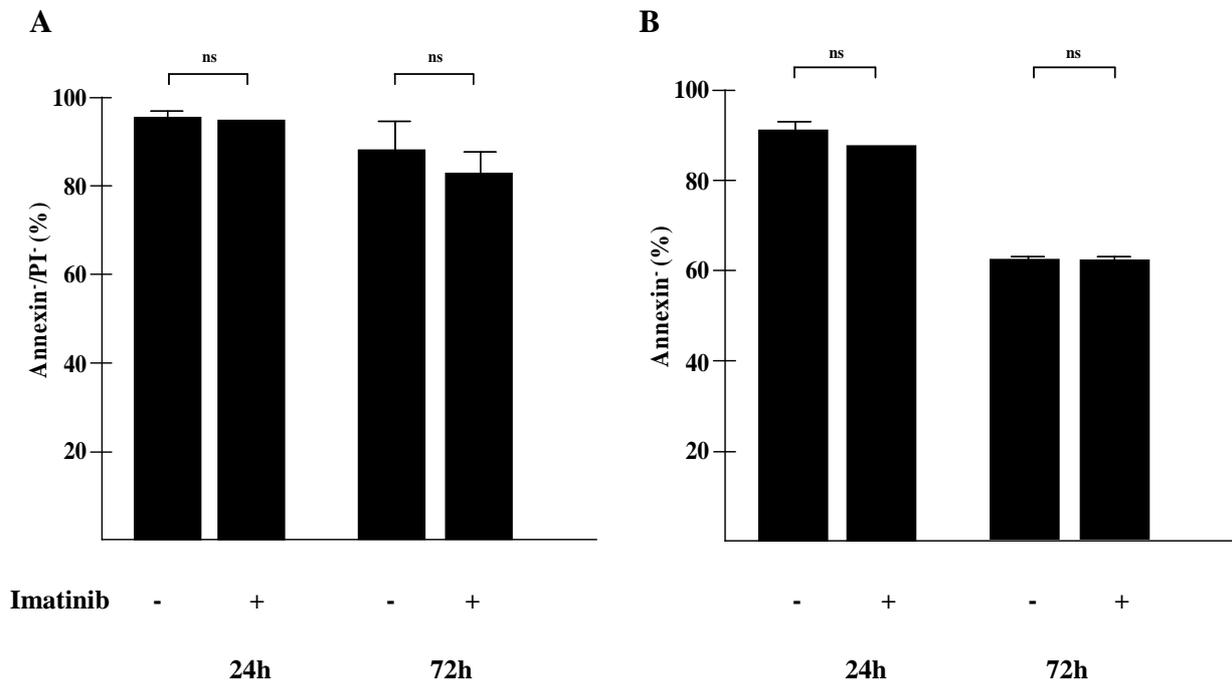


Abb.12: Apoptose Messung in Makrophagen nach Inhibition der Abl-Tyrosinkinase. Makrophagen wurden für 24h mit *M.tb* infiziert (MOI5) und mit Imatinib (5 μ M) inkubiert. Die Messung der Apoptose erfolgte im Durchflusszytometer. Es wurde pro Probe 5 \times 10⁴ Makrophagen aufgenommen. Infizierte Zellen konnten aufgrund der PFA-Fixierung nur mit Annexin-V gefärbt werden. Die Grafik stellt die Zusammenfassung von 4 unabhängigen Experimenten dar. Die Balken geben den Mittelwert und die SD an.

4.2.3. Einfluss des M-CSF Rezeptors auf das intrazelluläre Wachstum von *M.tb*

Imatinib inhibiert nicht nur die Abl-Tyrosinkinase, sondern mit geringerer Affinität auch den M-CSF-Rezeptor [27]. Dieser Rezeptor befindet sich auf Monozyten und Makrophagen und fördert das Wachstum und die Differenzierung der Zellen. Zusätzlich beeinflusst M-CSF das Überleben intrazellulärer Erreger, wie z.B. *Listeria monocytogenes* [65]. Um zu überprüfen ob die Wirkung von Imatinib auf Makrophagen über den M-CSF Rezeptor ausgelöst wird, inhibierten wir den Rezeptor mit einem neutralisierenden Antikörper.

Für die Validierung des blockierenden Antikörpers generierten wir Typ II Makrophagen in Gegenwart des M-CSF-Antikörpers. Um die Reifung zu beurteilen, wurde die Expression der Oberflächenmoleküle MHCII und CD163 im Durchflusszytometer überprüft. M-CSF generierte Makrophagen haben im Vergleich zu GM-CSF generierten Makrophagen eine hohe MHCII Expression und sind CD163 positiv (Abb.13).

Um den Effekt des M-CSF-Rezeptors auf das Wachstum von *M.tb* in Makrophagen zu untersuchen, wurden Makrophagen infiziert und anschließend mit anti-M-CSF-Rezeptor Antikörper oder dem Isotyp des Antikörpers für drei Tage behandelt. Zur Kontrolle wurde ein Ansatz nur mit Imatinib inkubiert.

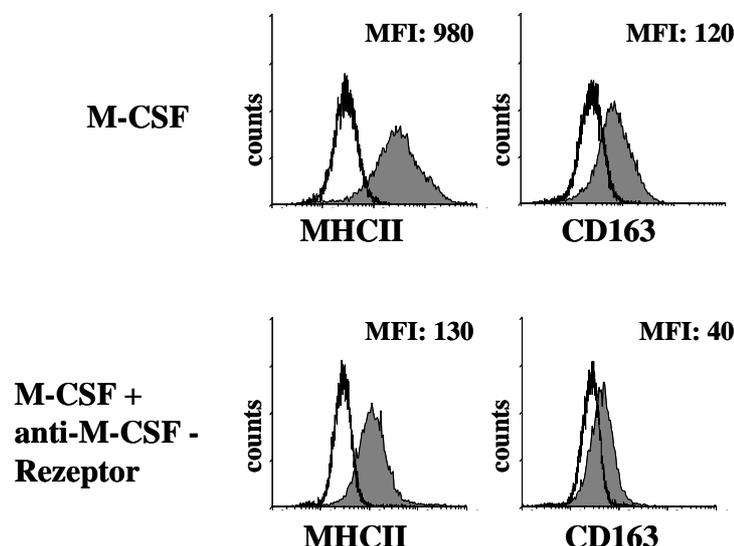


Abb.13: Validierung des M-CSF Rezeptor-Antikörpers. Monozyten wurden für 5 Tage mit M-CSF (10ng/ml) zu Makrophagen vom Typ II (MHCII positiv, CD163 positiv) in Abwesenheit (oberes Panel) oder in Anwesenheit (unteres Panel) von einem anti-M-CSF Rezeptor-Antikörper (10µg/ml) gereift. Der Phänotyp wurde im Durchflusszytometer ($2,5 \times 10^4$ Zellen) untersucht.

Die CFU wurde durch Plattierung der Lysate bestimmt. In vier Experimenten wurde durch Imatinib die Anzahl der intrazellulären Mykobakterien signifikant ($p=0,002$) reduziert (73%

Inhibierung des Wachstums, SD 8,6%). Dagegen fanden sich keine signifikanten Veränderungen des Wachstums in den Ansätzen mit dem anti-M-CSF-Rezeptor Antikörper (Abb. 14; $p=0,5$, SD 9%) (Abb.14). Diese Ergebnisse zeigen, dass der M-CSF Rezeptor das Überleben der intrazellulären Mykobakterien nicht beeinflusst.

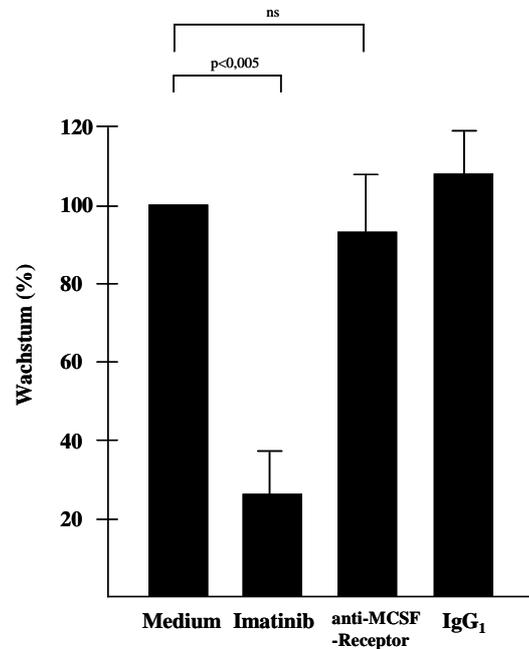


Abb.14: Die Inhibierung des Wachstums durch Imatinib wird nicht durch den M-CSF-Rezeptor hervorgehoben. Infizierte Makrophagen (MOI5) wurden für 3 Tage mit anti-M-CSF Rezeptor oder IgG1 (beides 10 μ g/ml) inkubiert. Als Kontrolle wurden die infizierten Makrophagen mit Imatinib (5 μ M) behandelt. Die Makrophagen wurden lysiert und die Lysate auf 7H11 Platten ausplattiert. Die Grafik gibt die Zusammenfassung von vier Experimenten wieder. Die Medium-Kontrolle wurde als 100% Wachstum gewertet und die anderen Ansätze danach berechnet. Die Horizontalen Linien geben die SD wieder.

4.2.4. Einfluss von Imatinib auf den pH-Wert in Makrophagen

Als weiteren potentiellen Mechanismus untersuchten wir den pH-Wert in den Lysosomen. Ein wichtiger Evasionsmechanismus von *M.tb* besteht in der Hemmung der Phagosomen-Reifung, wodurch die Azidifizierung des mykobakteriellen Kompartiments verhindert wird. Ziel der folgenden Experimente war es zu untersuchen, ob durch die Inhibition der Abl-Tyrosinkinase die Azidifizierung in den Makrophagen moduliert wird. Es wurden uninfizierte und infizierte Makrophagen mit einem pH-sensitiven Fluoreszenz-Farbstoff (LysoSensor) markiert, der bei einem niedrigen pH-Wert (6,0 bis 4,0), fluoresziert. Am Fluoreszenz-Mikroskop zeigte sich, dass durch Imatinib sowohl in uninfizierten als auch in infizierten Makrophagen LysoSensor positive Vesikel gebildet wurden, wohingegen die unbehandelten Zellen kaum Kompartimente mit saurem pH aufwiesen (Abb.15A). Dieses Ergebnis wurde im Durchflusszytometer quantifiziert (Abb.15B).

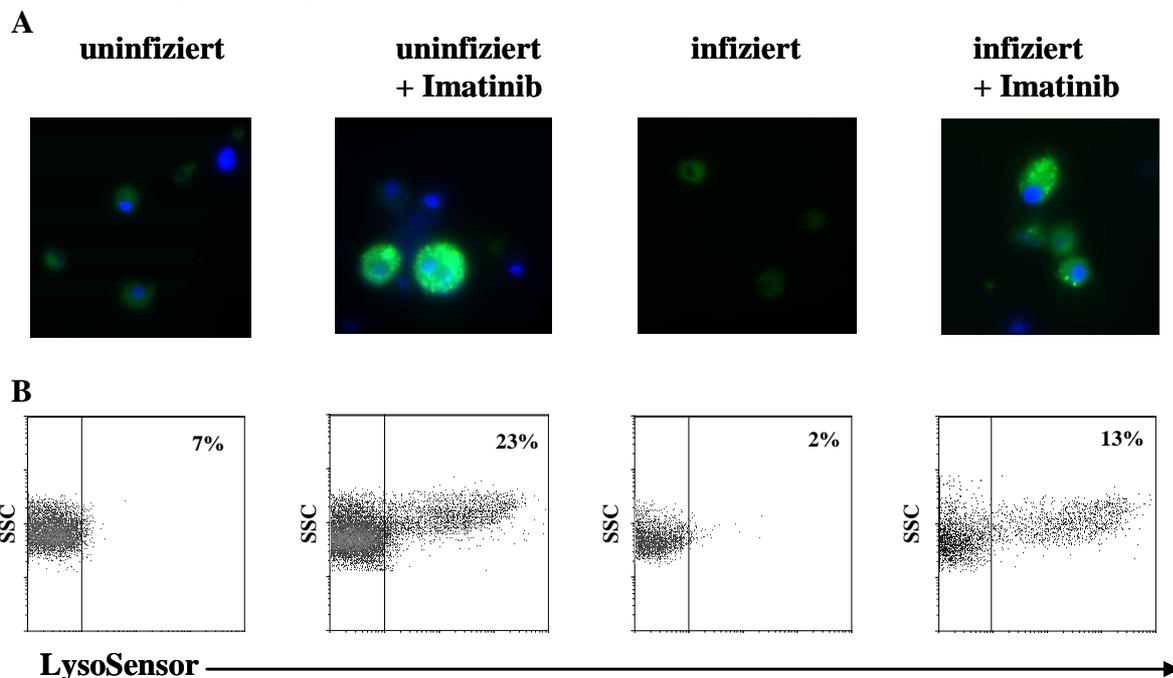


Abb.15: Imatinib induziert saure Kompartimente in Makrophagen. Makrophagen wurden teilweise infiziert (24h, MOI5) und mit Imatinib (24h, 5 μ M) inkubiert. Die Azidifizierung wurde mittel LysoSensor gemessen. A) Repräsentatives Ergebnis einer Aufnahme am Fluoreszenz-Mikroskop. LysoSensor (4 μ M, grün) färbt acidifizierte Kompartimente, Hoechst 33258 (1 μ M, blau) die Zellkerne (Vergrößerung 630-fach). B) Repräsentatives Ergebnis des gleichen Experimentes am Durchflusszytometer. Am FACS wurden 2,5x10⁵ Makrophagen aufgenommen.

Es zeigte sich, dass durch Imatinib die Ansäuerung in Makrophagen signifikant gesteigert wurde (uninfiziert: $p < 0,0002$; infiziert: $p < 0,05$). Im Mittel wurde mit Imatinib in uninfizierten (Medium: 6% vs. Imatinib: 17,5%) und in infizierten Makrophagen (Medium: 7% vs. Imatinib: 21%) die Azidifizierung um das 3-fache gesteigert (Abb.16).

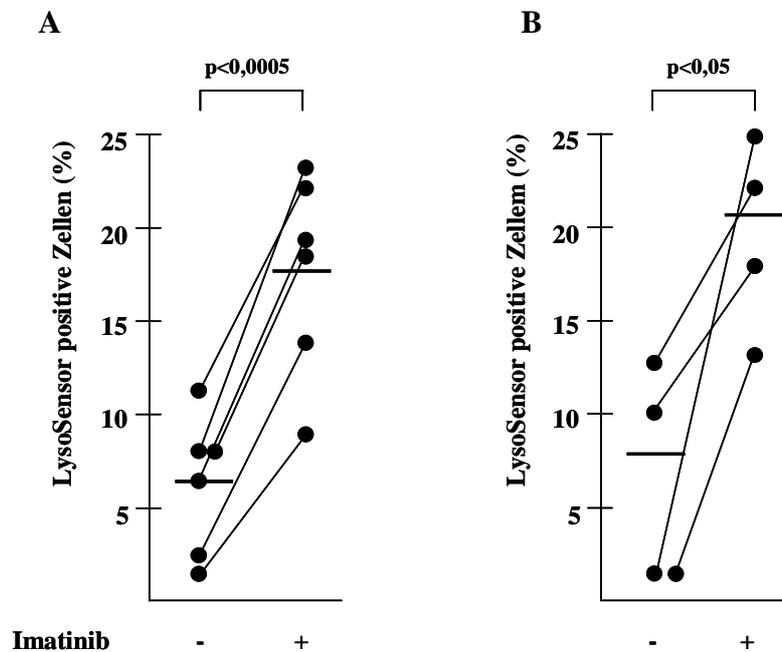


Abb.16: A) Uninfizierte Makrophagen (n=6) unbehandelt (-) und mit Imatinib behandelt (+) (24h, 5 μ M). B) Infizierte Makrophagen (n=4) unbehandelt (-) und mit Imatinib (+)behandelt (24h, 5 μ M). Die Makrophagen wurden mit LysoSensor (2h, 4 μ M) gefärbt und am Durchflusszytometer aufgenommen. Am Durchflusszytometer wurden $2,5 \times 10^5$ Makrophagen aufgenommen und der prozentuale Anteil an LysoSensor positiven Zellen bestimmt. Die horizontalen Linien geben den Mittelwert wieder.

Diese Daten legen nahe, dass die Imatinib induzierte Ansäuerung der Mechanismus für die Abnahme des intrazellulären Wachstums von *M.tb* ist.

4.3. Charakterisierung der durch Imatinib angesäuerten Kompartimente

Imatinib induziert in Makrophagen die Bildung von Kompartimenten mit einem niedrigen pH-Wert (Abb.15). Um diese präzise zu definieren, wurden als Marker für frühe Endosomen, EEA1, und als Marker für Lysosomen, CD63 verwendet. EEA1 ist ein Protein, welches Phosphoinositol-3-phosphat auf anderen Vesikel bindet und so zur Weiterleitung und Fusion der Vesikel beiträgt. Es befindet sich auf frühen Endosomen und kolokalisiert mit dem Transferrin-Rezeptor und Rab5. CD63, ist ein glykolisiertes Protein, welches sich in Lysosomen befindet. Für die gleichzeitige Bestimmung des pH-Wertes und intrazellulärer Antigene wurde ein pH sensitiver Farbstoff, welcher unempfindlich gegenüber permeabilisierenden Detergenzien ist, benötigt. Diese Voraussetzungen erfüllt LysoTracker, nicht aber der bisher verwendete Farbstoff LysoSensor. Makrophagen wurden mit Imatinib

inkubiert und mit LysoTracker gefärbt. EEA1 und CD63 wurden durch eine intrazelluläre Färbung mit spezifischen Antikörpern markiert. Die Doppelfärbungen wurden am Fluoreszenz-Mikroskop untersucht und die Kollokalisation des endosomalen oder des lysosomalen Markers mit LysoTracker quantifiziert (Abb.17).

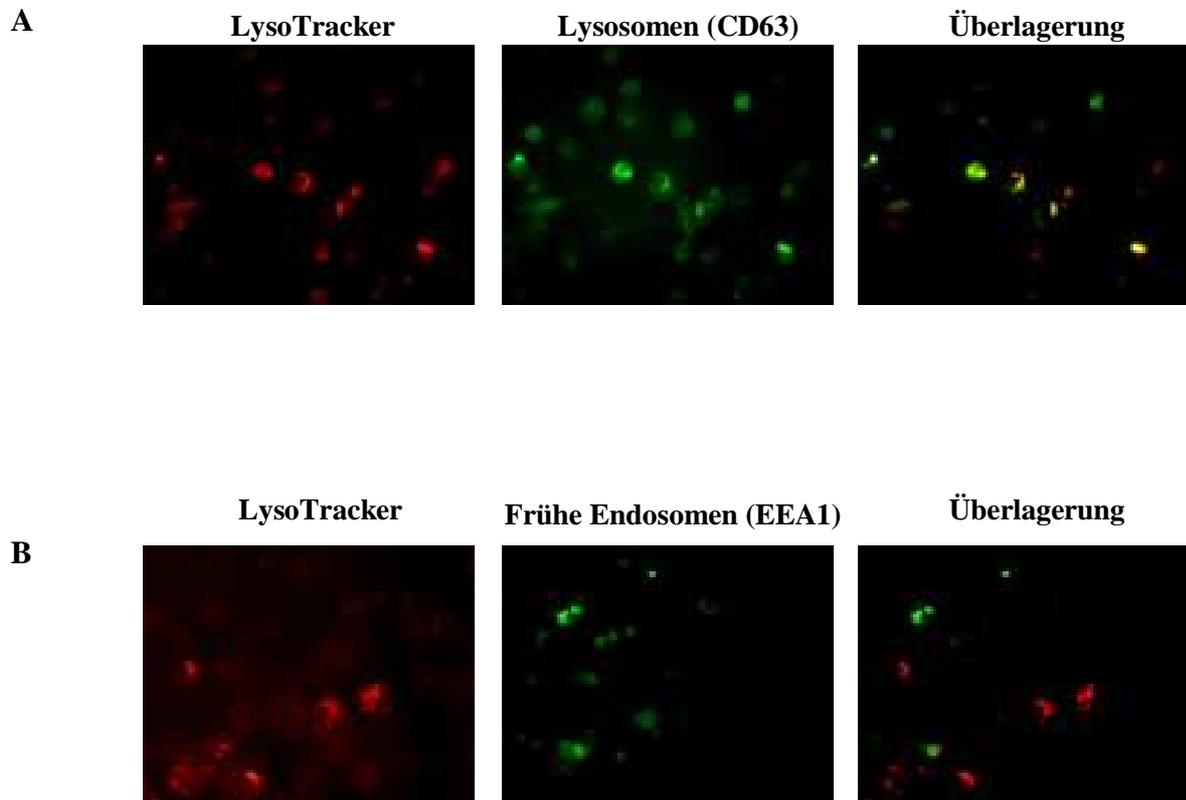


Abb.17: Imatinib induziert eine Ansäuerung der Lysosomen. Makrophagen wurden mit Imatinib (24h, 5 μ M) behandelt und anschließend mit LysoTracker (100nM, rot) und mit Antikörper gegen A) CD63 (obere Reihe, grün) oder gegen B) EEA1 (unterer Reihe, grün) gefärbt. Es wurden in drei unabhängigen Experimenten jeweils 100 Makrophagen ausgezählt. Die Überlagerung zeigt die Kollokalisation des jeweiligen Bild-Ausschnittes (gelb) (Vergrößerung 630-fach).

Es zeigte sich, dass die LysoTracker positiven Vesikel signifikant häufiger mit CD63 kolokalisieren als mit EEA1 ($p < 0,005$) (Abb.18). Im Mittel waren 75% der sauren Vesikel CD63 positiv (SD: 19%) und 8% EEA1 positiv (SD: 11%). Daher sind die sauren Kompartimente, welche durch Imatinib induziert werden, sehr wahrscheinlich Lysosomen.

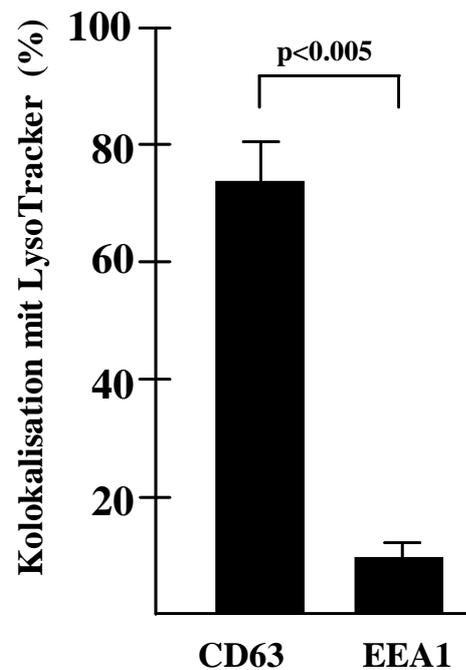


Abb.18: Imatinib induziert eine Ansäuerung der Lysosomen. In jedem Experiment wurden 100 Makrophagen ausgezählt und die Kokalisation von EEA1 (frühes Endosom) oder CD63 (Lysosom) mit dem pH sensitiven Farbstoff LysoTracker untersucht. Die Balken geben den Mittelwert und die SD aus vier Experimenten wieder.

4.4. Aktivierung von Cathepsin D durch die Imatinib-induzierte Ansäuerung

Um die funktionelle Relevanz der Imatinib induzierten Ansäuerung zu untersuchen, überprüften wir, ob die saure Protease Cathepsin D aktiviert wird. Cathepsin D, ist als inaktive Proform in den Lysosomen lokalisiert. Nimmt der pH-Wert ab, wird das Enzym aktiviert. Um diese pH-Wert-abhängige Aktivierung zu messen, inkubierten wir Makrophagen in einem 8-chamber-slide mit Imatinib und färbten die Zellen mit BPF. Die Auswertung der Färbung erfolgte am konfokalen-Laser-Mikroskop. Nur in den Ansätzen mit Imatinib wurden punktförmige Kompartimente, welche BPF gebunden hatten, detektiert. Durchschnittlich induzierte Imatinib in 43% \pm 5% der Makrophagen die aktive Konformation von Cathepsin D. Bei den unbehandelten Zellen fanden sich nur 8% \pm 4% BPF positive Makrophagen (Abb.19; $p < 0,005$).

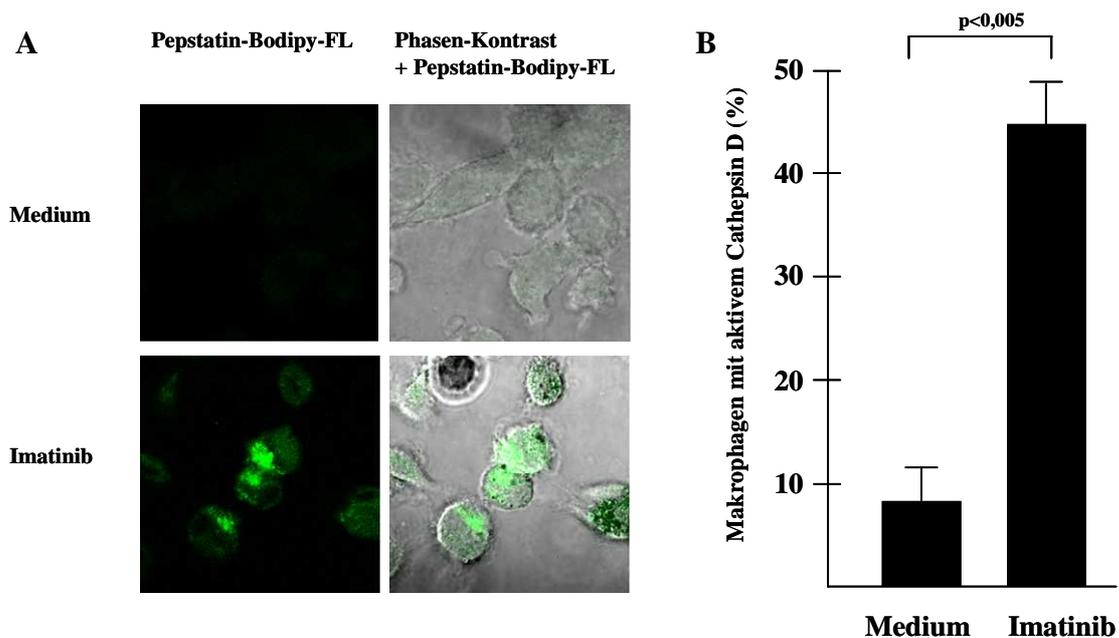
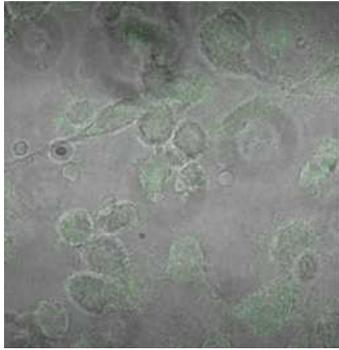


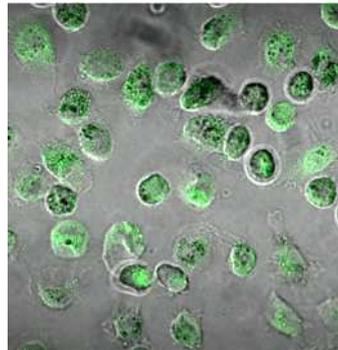
Abb.19: Imatinib-induzierte Ansäuerung aktiviert Cathepsin D. A) Repräsentativer Ausschnitt einer Aufnahme am konfokalen-Laser-Mikroskop. Die linke Seite zeigt die Fluoreszenz von BPF, die rechte Seite die Überlagerung mit dem Phasen-Kontrast. Imatinib-behandelte (unteres Panel, 5 μ M, 24h) oder unbehandelte Makrophagen wurden mit BPF (1 μ g/ml, grün) für 30min bei 37°C gefärbt (Vergrößerung 630-fach). B) Zur Quantifizierung wurden jeweils 100 Makrophagen ausgezählt. Die Balken geben den Mittelwert und die SD aus vier unabhängigen Experimenten an.

Um sicherzustellen, dass die Aktivierung von Cathepsin D pH-abhängig ist, wurden Makrophagen mit Concanamycin A inkubiert. Concanamycin A ist ein Inhibitor der vATPase, welche Protonen in das Lumen der Lysosomen pumpt und dadurch den pH-Wert erniedrigt. Concanamycin A antagonisiert fast vollständig die pH-abhängige

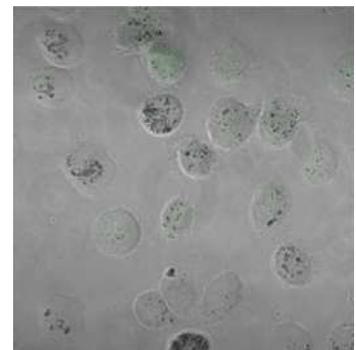
Konformationsänderung von Cathepsin D (Abb.20). Dies zeigt, dass die Erniedrigung des pH-Wertes der Lysosomen durch Inhibierung der Abl-Tyrosinkinase Cathepsin D aktiviert.



Medium



Imatinib



**Imatinib
+ Concanamycin A**

Abb.20: Die Imatinib induzierte Aktivierung von Cathepsin D ist pH abhängig. Makrophagen wurden mit Imatinib (5 μ M, 24h) oder mit ConcanamycinA (50nm, 26h) + Imatinib (5 μ M, 24h) inkubiert. Die aktive Form von Cathepsin D wurde mit BPF (1 μ g/ml, grün) markiert. Die Bilder zeigen ein typisches Ergebnis von zwei Experimenten am konfokalen-Laser-Mikroskop (Vergrößerung 630-fach).

4.5. Die Bedeutung der Abl-Tyrosinkinase bei der Azidifizierung der Lysosomen

Die vorigen Experimente hatten gezeigt, dass die Abl-Tyrosinkinase die Ansäuerung der Lysosomen reguliert. Um diesen neuen Befund zu vertiefen, untersuchten wir in den folgenden Experimenten die Imatinib induzierte Ansäuerung in verschiedenen Wirtszellen von *M.tb*, und die Wirkung von weiteren Kinase-Inhibitoren auf die Ansäuerung in Makrophagen.

4.5.1. Untersuchung der Imatinib-induzierten Azidifizierung in Wirtszellen von *M.tb*

Weitere Wirtszellen von *M.tb* sind, neben Typ I Makrophagen, Typ II Makrophagen und unreife DZ bzw. reife DZ. Um die Wirkung von Imatinib auf den pH-Wert in diesen Populationen zu untersuchen, wurden unreife DZ, reife DZ und Typ II Makrophagen mit Imatinib inkubiert und anschließend mit LysoSensor gefärbt. Die Reinheit und der Phänotyp der unterschiedlichen Zellpopulationen wurden im Durchflusszytometer bestimmt (Abb. 21).

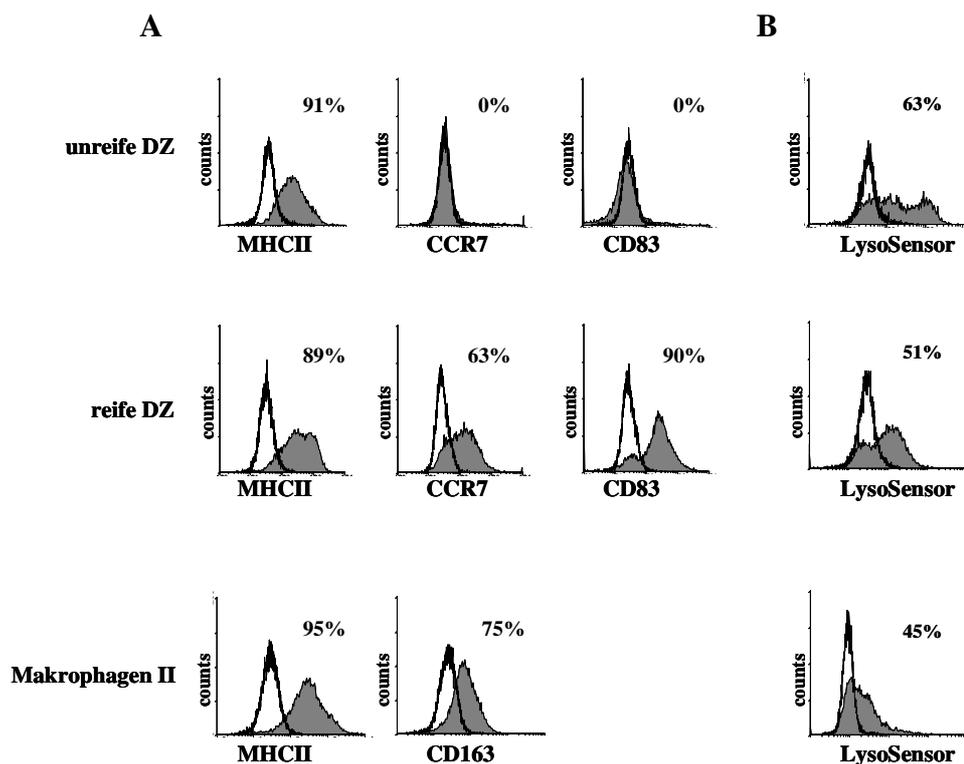


Abb. 21: Imatinib induziert in antigenpräsentierenden Zellen eine Ansäuerung der Lysosomen. Monozyten wurden mit GM-CSF und IL-4 (unreife DZ) für 5 Tage, oder zusätzlich mit TNF, IL-1 β , IL-6 und Prostaglandin E2 (reife DZ) für zwei weitere Tage inkubiert. Makrophagen vom Typ II wurden mit M-SCF (10ng/ml). A) Nach Imatinib-Behandlung (5 μ M, 24h) wurde der Phänotyp dieser Zellen mit den angegebenen Antikörpern im Durchflusszytometer ausgewertet. Unreife DZ (91% MHCII, 0% CCR7, 0% CD83). Reife DZ (89% MHCII, 63% CCR7, 90% CD83). Typ II Makrophagen (95% MHCII, 75% CD163). B) Die unterschiedlichen Populationen wurden mit LysoSensor (4 μ M, 2h) gefärbt und am Durchflusszytometer ausgewertet. Die Linie ohne Füllung gibt den Isotyp wieder. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis von drei Experimenten.

Auf unreifen und reifen DZ wurden MHCII (beide Zelltypen positiv), CCR7 (ein „homing-Rezeptor“ für die Lymphknoten; unreife DZ: negativ, reife DZ positiv) und CD83 (unreife DZ: negativ, reife DZ positiv) untersucht. Typ II Makrophagen wurden mit MHCII (positiv) und CD163 (positiv) charakterisiert.

Imatinib induzierte in allen drei Zellpopulationen eine Abnahme des pH-Wertes. Diese Befunde bestätigten die Hypothese, dass die Regulation des pH-Wertes in allen untersuchten Wirtszellen von *M.tb* durch die Abl-Tyrosinkinase gesteuert wird.

4.5.2. Vergleich verschiedener Kinase-Inhibitoren auf die Regulation des pH-Wertes in Makrophagen

In der Zelle gibt es eine Vielzahl von multifunktionellen Kinasen, die PI3P-Kinase [66], die MAP-Kinase p38 [67] und die Src-Kinase Hck [68] beeinflussen die Physiologie des Phagolysosoms. Ebenso sind diese Kinasen bei der Blockierung der Phagosomen-Reifung durch *M.tb* von Bedeutung [66]. Daher sollte in den folgenden Experimenten überprüft werden, ob diese Kinasen die Ansäuerung, ähnlich wie die Abl-Tyrosinkinase, modulieren. Dazu wurden die Kinase-Inhibitoren Wortmannin (PI3P-Kinase), SB203580 (MAP-Kinase p38) und PP2 (Src-Kinasen) eingesetzt. Zusätzlich wurden mit Nilotinib und Dasatinib zwei Weiterentwicklungen von Imatinib getestet. Makrophagen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen dieser Inhibitoren für 24h inkubiert, mit LysoSensor gefärbt und am Durchflusszytometer analysiert. Nur Inhibitoren, welche eine hohe Spezifität für die Abl-Tyrosinkinase haben (Imatinib, Nilotinib), induzierten in Makrophagen eine Azidifizierung der Lysosomen (Abb.22).

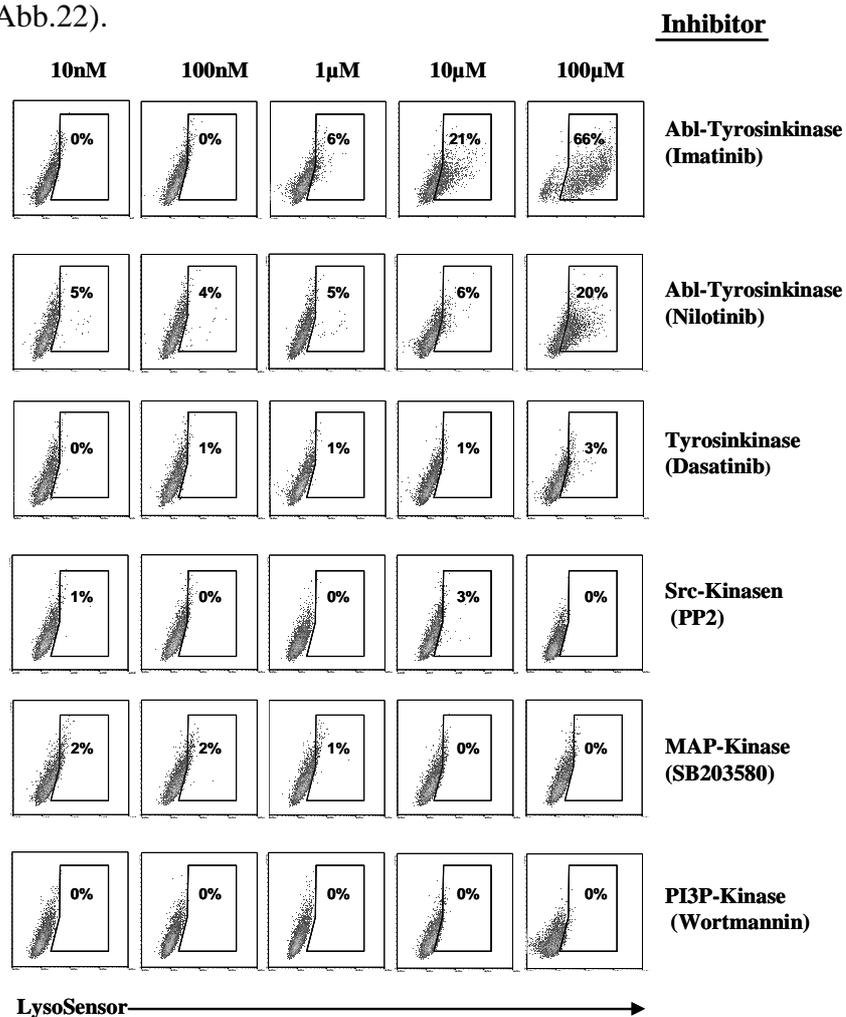


Abb.22: Imatinib und Nilotinib induzieren eine Ansäuerung der Lysosomen. Makrophagen wurden mit verschiedenen Kinase-Inhibitoren für 24h inkubiert und die Ansäuerung mittels LysoSensor (4µM) gemessen. Zur Messung wurden 50×10^6 Zellen am Durchflusszytometer aufgenommen. Die Abbildung zeigt ein charakteristisches Ergebnis von drei Experimenten.

Im Gegensatz dazu hatte der Tyrosinkinase Inhibitor Dasatinib, der die Abl-Tyrosinkinase weniger spezifisch bindet, nur einen schwachen Effekt auf den pH-Wert. Die anderen Inhibitoren zeigten keine Wirkung auf den pH-Wert der Lysosomen.

Diese Ergebnisse wurden im Folgenden am Fluoreszenz-Mikroskop mittels LysoTracker Färbung validiert. Auch hier zeigten nur Imatinib (33% \pm 6%, $p=0,002$) und Nilotinib (6% \pm 2%, $p=0,002$) eine signifikante Wirkung auf die Bildung von sauren Lysosomen (Abb.23). Diese Befunde sind ein Indiz dafür, dass die Ansäuerung der Lysosomen spezifisch von der Abl-Tyrosinkinase reguliert wird, und dass diese Funktion im Vergleich zu anderen Kinasen ein Alleinstellungsmerkmal darstellt.

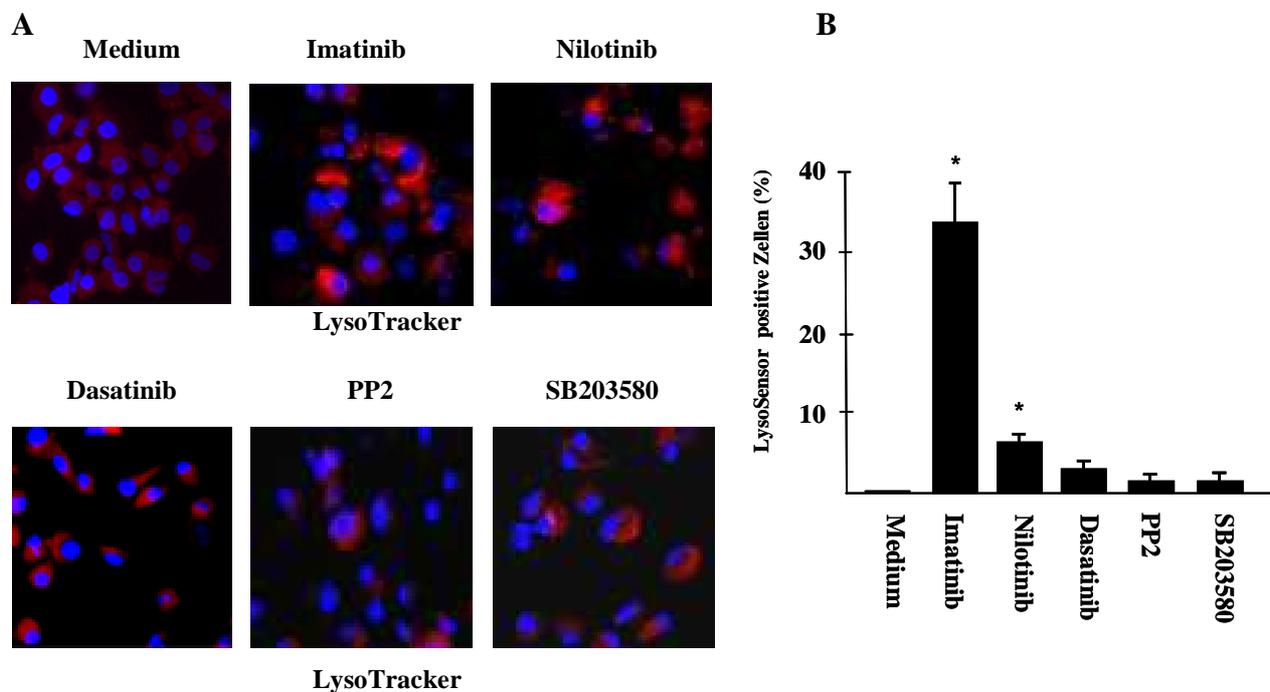


Abb. 23: Imatinib und Nilotinib induzieren eine Ansäuerung der Lysosomen. Makrophagen wurden mit Inhibitoren (Imatinib: 5 μ M, Nilotinib: 2 μ M, Dasatinib: 100nM, PP2: 10 μ M, SB203580: 10 μ M) für 24h inkubiert. Der pH in den Lysosomen wurde mit LysoTracker (100nM, rot) markiert und die Zellkerne mit Hoechst 33258 (1 μ g/ml, blau) gefärbt. Zur Auswertung wurden jeweils 100 Makrophagen analysiert. A) Zeigt eine repräsentative Aufnahme von drei Experimenten (Vergrößerung 630-fach). B) Makrophagen wurden mit den Inhibitoren inkubiert und mit LysoSensor (4 μ M) gefärbt. Die Quantifizierung wurde am Durchflusszytometer durchgeführt. Die Balken geben den Mittelwert und die SD an. Die Sterne stehen für $p < 0,05$.

4.5.3. Einfluss von c-Abl siRNA auf den pH-Wert in Makrophagen

Trotz der Spezifität von Imatinib und Nilotinib für die Abl-Tyrosinkinase, neutralisieren sie zusätzlich mit geringerer Effektivität die Kinasen PDGF-Rezeptor und c-Kit. Um zu beweisen, dass die Abl-Tyrosinkinase allein für die Regulation des pH-Wertes der Lysosomen verantwortlich ist, verwendeten wir siRNA, welche komplementär zur Abl-Tyrosinkinasen mRNA ist. Ziel war es die Translation der Abl-Tyrosinkinase in Makrophagen zu verhindern und dann den pH-Wert der Lysosomen zu untersuchen. Für diese Experimente wurden Makrophagen mittels Elektroporation mit siRNA transfiziert. Um unspezifische Effekte der Abl-Tyrosinkinasen-siRNA auszuschließen, wurden Makrophagen parallel mit unspezifischer siRNA transfiziert. Nach der Transfektion wurden die Makrophagen ($0,75 \times 10^6$) für 24h in einer 12-well Platte inkubiert. Ein Ansatz wurde lysiert um mittels Westernblot die Transfektionseffizienz zu bestimmen (Abb.24). Hierzu wurde die Bandenintensität, der Abl-Tyrosinkinase, der einzelnen Ansätze mit einem Densitometer gemessen und mit GelScan 5.1 ausgewertet (Daten nicht gezeigt). Parallel wurde, der pH-Wert der Makrophagen mit LysoSensor am Fluoreszenz-Mikroskop bestimmt. Die Ergebnisse aus dem Westernblot zeigen in allen Experimenten ($n=3$), dass durch die spezifische siRNA die Proteinmenge an Abl-Tyrosinkinase nach 24h in Makrophagen reduziert wurde.

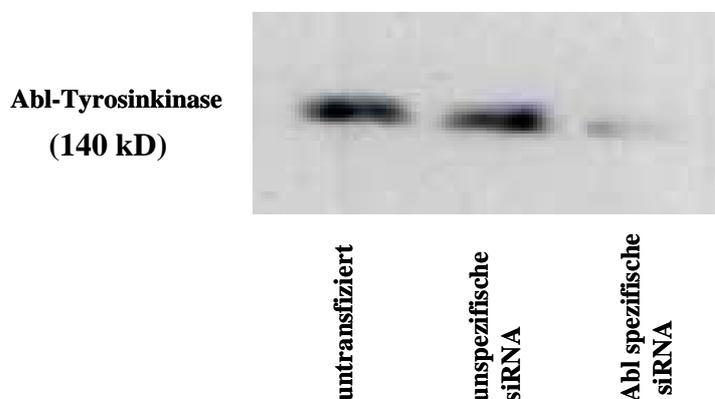


Abb. 24: Durch Behandlung mit spezifischer siRNA wird die Abl-Tyrosinkinase herunterreguliert. Makrophagen wurden mit Abl-Tyrosinkinase spezifischer siRNA oder mit unspezifischer –siRNA transfiziert. Nach 24h wurde die Transfektionseffizienz im Westernblot untersucht und mittels Densitometer ausgewertet (Daten nicht gezeigt). Die Abbildung zeigt ein charakteristisches Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten.

Die gleichen Makrophagen zeigen in der LysoSensor Färbung eine gesteigerte Ansäuerung der Lysosomen. Makrophagen, welche mit unspezifischer siRNA behandelt wurden, bilden keine sauren Kompartimente (Abb.25). Diese Experimente beweisen, dass die Abl-Tyrosinkinase die Azidifizierung der Lysosomen in humanen Makrophagen kontrolliert.

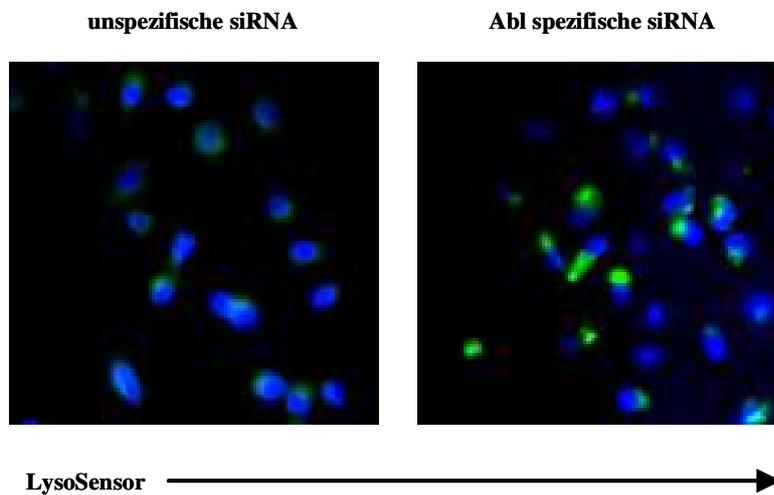


Abb. 25: Durch Behandlung mit spezifischer siRNA steigt die Ansäuerung der Lysosomen in Makrophagen. 24h nach der Transfektion wurden Makrophagen mit LysoSensor (4 μ M) und mit Hoechst 33258 (1 μ g/ml) gefärbt und im Fluoreszenz-Mikroskop untersucht (grün: LysoSensor, blau: Hoechst 33258; Vergrößerung 630-fach). Die Abbildung zeigt ein typisches Ergebnis am Fluoreszenz-Mikroskop von drei unabhängigen Experimenten.

4.6. Intrazelluläre Lokalisation von Imatinib induzierten Lysosomen und *M.tb*

Die bisherigen Experimente legen nahe, dass die Abnahme des mykobakteriellen Wachstums durch Imatinib (Abb.10) durch eine gesteigerte Ansäuerung der Lysosomen verursacht wird. Voraussetzung hierfür ist, dass die Imatinib induzierten Lysosomen mit Mykobakterien kolokalisieren. Daher wurden in den folgenden Experimenten Makrophagen mit Succinimidyl-Ester markierten *M.tb* infiziert, mit Imatinib inkubiert und schließlich mit LysoSensor gefärbt. Die Lokalisation von Mykobakterien und sauren Arealen wurde mit einem konfokalen Laser Mikroskop untersucht. Es wurden 100 gefärbte Mykobakterien ausgezählt und ihre Kolokalisation mit Lysosomen überprüft (Abb.26A). Die Kolokalisation von *M.tb* stieg durch Imatinib im Durchschnitt von $8\% \pm 7\%$ auf $27\% \pm 8\%$ signifikant an ($p < 0,002$) (Abb.26B). Zusammenfassend zeigen diese Experimente, dass Mykobakterien in Imatinib-behandelten Makrophagen in sauren Kompartimenten residieren was ein möglicher Mechanismus für das verminderte Wachstum sein könnte.

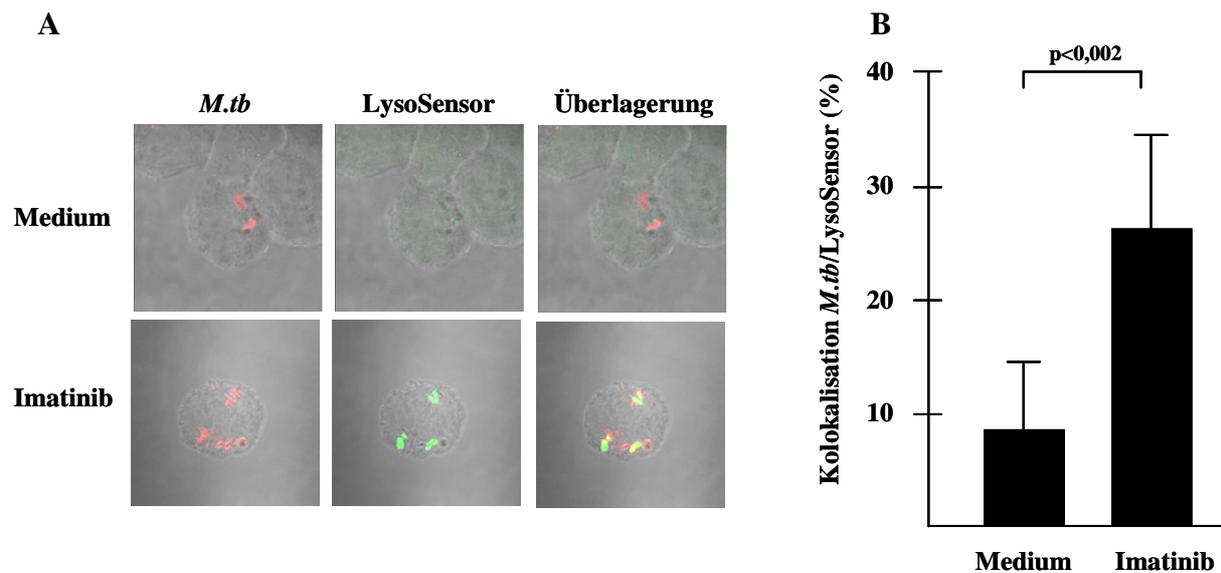


Abb.26: Imatinib induziert eine Kolokalisation von *M.tb* mit Lysosomen. Makrophagen wurden mit Succinimidyl-Ester markierten *M.tb* infiziert (24h, MOI5), mit Imatinib inkubiert (24h, 5 μ M) und am Konfokalen Laser Mikroskop untersucht. A) Das obere Panel zeigt unbehandelte Makrophagen, das untere Panel Makrophagen, welche mit Imatinib inkubiert wurden. *M.tb* (rot) wird mit LysoSensor (grün) überlagert (gelb). B) Zusammenfassung der ermittelten Kolokalisation von *M.tb* mit Lysosomen. Die Balken geben den Mittelwert und die horizontalen Linien die Standardabweichung wieder.

4.7. Hemmung der Imatinib induzierten Ansäuerung durch Concanamycin A

Nachdem wir gezeigt hatten, dass durch Inhibierung der Abl-Tyrosinkinase i) das mykobakterielle Wachstum in Makrophagen abnimmt, ii) die Ansäuerung der Lysosomen induziert wird und iii) *M.tb* sich in sauren Lysosomen befindet, wollten wir untersuchen, ob diese Befunde kausal zusammenhängen. Dazu wurde die Imatinib induzierte Ansäuerung in infizierten Makrophagen durch den vATPase Inhibitor Concanamycin A antagonisiert. Zuerst überprüften wir, ob sich die Ansäuerung mit Concanamycin A aufheben lässt. Ein Teil der Makrophagen wurde mit Imatinib inkubiert, der andere Teil wurde mit Concanamycin A vorbehandelt. Die Erniedrigung des pH-Wertes der Lysosomen wurde mit LysoSensor im Durchflusszytometer und im Fluoreszenz-Mikroskop beobachtet. Die Ergebnisse am Fluoreszenz-Mikroskop zeigten, dass durch Concanamycin A Behandlung die Anzahl LysoSensor positiver Zellen erniedrigt wurde (Abb.27A). Die Imatinib induzierte Ansäuerung der Lysosomen ließ sich durch Blockade der vATPase um 90% reduzieren ($p=0,01$) (Abb. 27B) (Imatinib: $29\% \pm 11\%$ vs. Imatinib + Concanamycin A: $3\% \pm 1\%$).

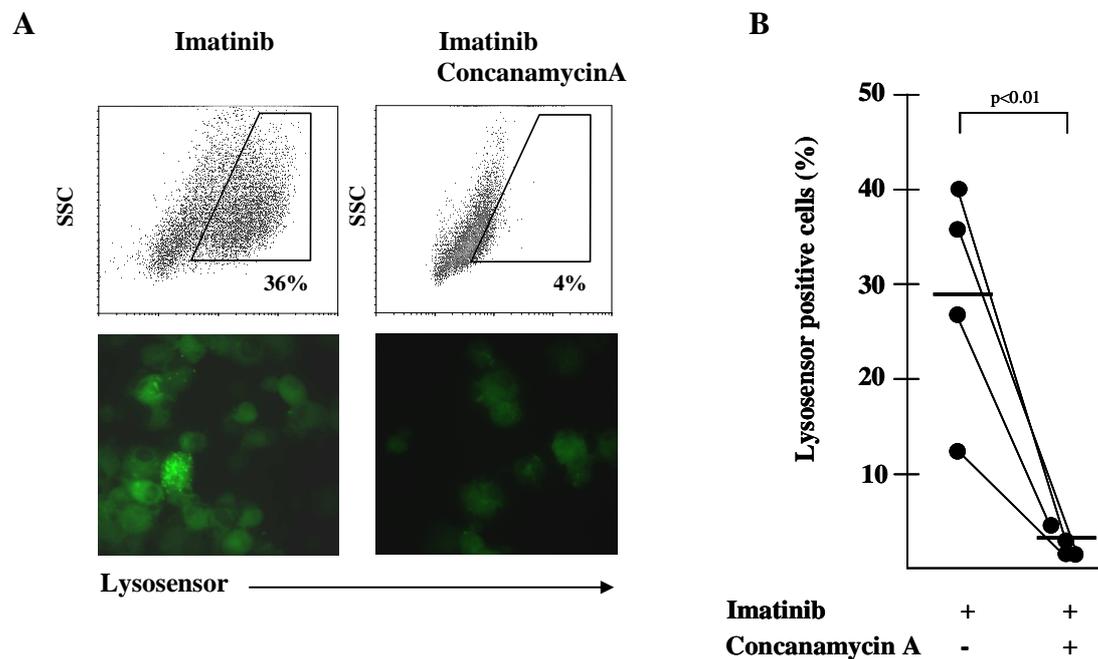


Abb.27: Die Imatinib induzierte Ansäuerung wird durch Concanamycin A antagonisiert. Makrophagen wurden mit Concanamycin A (2h, 50nM) inkubiert und anschließend mit Imatinib behandelt. Der pH-Wert wurde mittels LysoSensor (4 μ M, grün) bestimmt und im Durchflusszytometer oder im Fluoreszenz-Mikroskop ausgewertet. A) Eine charakteristische Aufnahme am Durchflusszytometer (oberes Panel) und am Mikroskop (unteres Panel, Vergrößerung 630-fach). Das Gate wurde im Vergleich zu einer Medium-Kontrolle gelegt. B) Zur Quantifizierung wurden 30×10^6 Makrophagen am Durchflusszytometer aufgenommen. Der Graph gibt die Ergebnisse von vier unabhängigen Spendern wieder. Die horizontalen Linien geben den Mittelwert wieder

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die Hemmung der Ansäuerung auf das Wachstum von *M.tb* auswirkt. Makrophagen wurden infiziert und für drei Tage mit Imatinib und Concanamycin inkubiert. Die Zellviabilität wurde durch die Inhibitoren nicht signifikant beeinflusst (Daten nicht gezeigt).

Durch Imatinib alleine wurde das Wachstum um $53\% \pm 2,6\%$ signifikant inhibiert ($p < 0,0005$). Dieser Effekt wurde durch Concanamycin A fast vollständig aufgehoben ($18\% \pm 8,5\%$; $p < 0,01$) (Abb. 28). Diese Ergebnisse beweisen, dass die antibakterielle Wirkung von Imatinib durch eine Erniedrigung des pH-Wertes in den Lysosomen bewirkt wird.

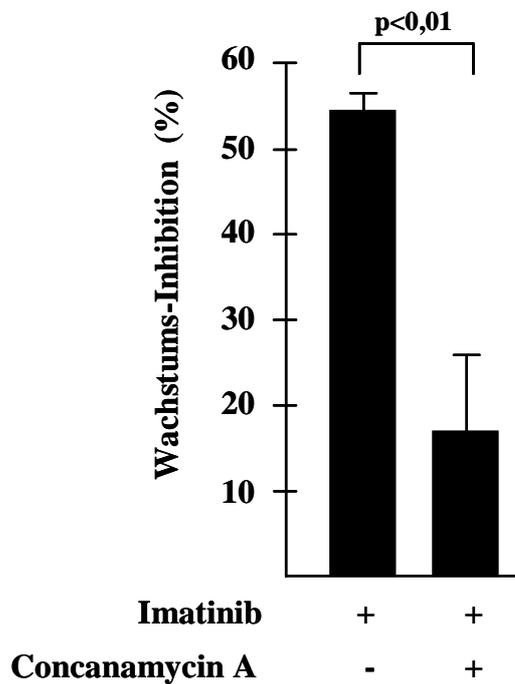


Abb.28: Hemmung der Imatinib induzierten Ansäuerung durch Concanamycin A. Makrophagen wurden mit *M.tb* infiziert (MOI5, 24h), in An- und Abwesenheit von Concanamycin A (50nM) mit Imatinib behandelt. Nach drei Tagen wurde das mykobakterielle Wachstum durch Plattierung der Zelllysate bestimmt. Die Abbildung gibt die Zusammenfassung von fünf unabhängigen Experimenten wieder. Die Balken zeigen den Mittelwert und die Standardabweichung.

4.8. Wirkung von Serum Imatinib-behandelter CML-Patienten auf den pH-Wert der Lysosomen

Durch die Therapie von CML-Patienten mit Imatinib besteht die Möglichkeit mit Patientenproben die Relevanz der *in vitro*- Befunde *ex vivo* zu untersuchen. Hierzu wurden im Zeitraum von Februar 2009 bis September 2009 19 CML Patienten rekrutiert. Ziel war es, zu untersuchen, ob die Abnahme des pH-Wertes und die Zunahme der antimykobakteriellen Aktivität auch bei Patienten unter Imatinib-Therapie nachweisbar sind.

4.8.1. Wirkung von Patientenserum auf den pH-Wert von Lysosomen

Der Hauptbefund der vorausgegangenen Experimente war, dass durch Inhibition der Abl-Tyrosinkinase der pH-Wert in den Lysosomen erniedrigt wird. Die therapeutisch erzielbaren Imatinib-Spiegel entsprechen der Konzentration, welche in unseren Experimenten eingesetzt wurden (1 μ M-5 μ M) [69]. Daher spekulierten wir, dass die Patientenserum den gleichen Effekt auf die Lysosomen haben würden wie exogen zur Zellkultur hinzugegebenes Imatinib. Makrophagen gesunder Spender wurden mit Kontroll-Serum gesunder Spender oder mit Patientenserum für 24h inkubiert (beide 50% im Zellkultur-Medium). Alle untersuchten Patientenserum (n=5) induzierten im Vergleich zu den Kontrollserum eine signifikante Steigerung der LysoSensor positiven Zellen (Abb.29).

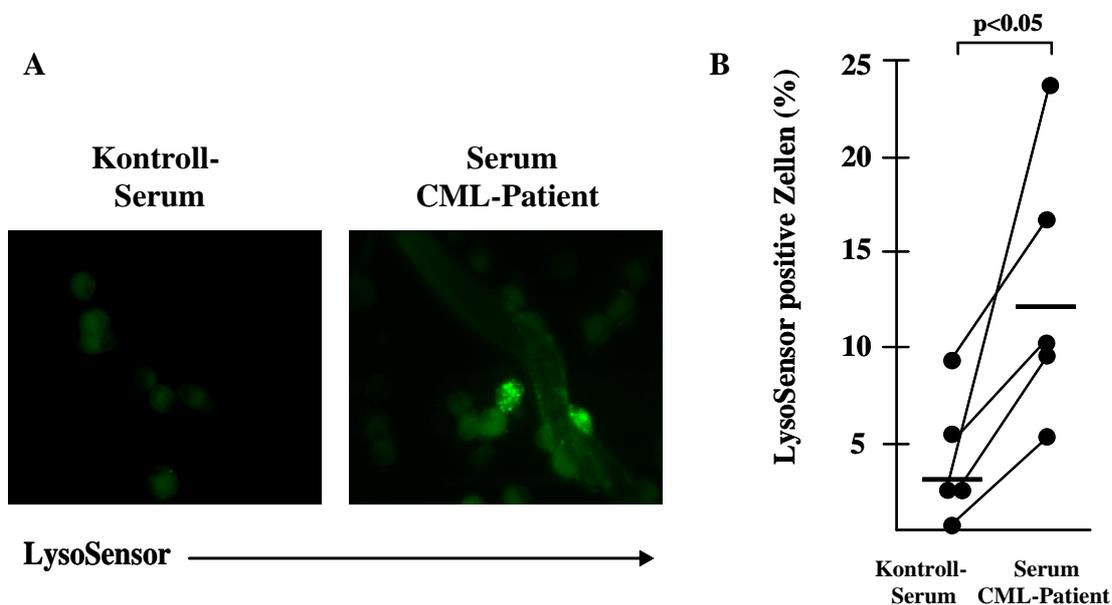


Abb. 29: Serum von Patienten unter Imatinib-Therapie führt zu einer Ansäuerung der Lysosomen. Makrophagen wurden mit Kontroll-Serum oder mit Serum von CML-Patienten unter Imatinib Therapie inkubiert (50%, 24h). Die Azidifizierung der Lysosomen wurden mittels LysoSensor (4 μ M) im Durchflusszytometer (50x10⁶ Makrophagen) sichtbar gemacht. Im Fluoreszenz-Mikroskop wurden LysoSensor positive Makrophagen je Experiment untersucht. A) Eine repräsentative Aufnahme am Fluoreszenz-Mikroskop (LysoSensor: grün; 630-fach). B) Die Zellen wurden am Durchflusszytometer aufgenommen und die LysoSensor positiven Makrophagen quantifiziert. Die Abbildung zeigt die Ergebnisse von 5 unabhängigen Experimenten. Die horizontalen Linien geben den Mittelwert wieder.

4.8.2. Wirkung von Patientenserum auf das Wachstum von *M.tb*

Nachdem wir gezeigt hatten, dass Serum von CML-Patienten unter Imatinib-Therapie die Ansäuerung der Lysosomen in Makrophagen induziert, überprüften wir, ob diese Ansäuerung auch das mykobakterielle Wachstum hemmt. Hierzu inkubierten wir Makrophagen mit Serum von gesunden Spendern oder mit Serum von Imatinib behandelten Patienten. Die Anzahl der lebendigen Mykobakterien wurde nach drei Tagen durch Plattierung der Zelllysate bestimmt (Abb. 30). Das Patientenserum hemmte das Wachstum von *M.tb* deutlich stärker ($1,98 \pm 0,78$) als die Kontrollseren ($5,34 \pm 3,19$) ($p < 0,05$).

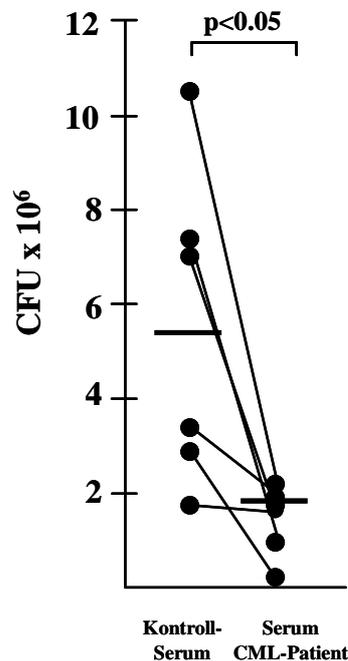


Abb. 30: Serum von Patienten unter Imatinib-Therapie induziert antimykobakterielle Aktivität in Makrophagen. Makrophagen (n=6) wurden mit *M.tb* infiziert (MOI5, 24h) und für drei Tage mit Serum von Kontroll-Spendern oder mit Serum von Patienten unter Imatinib-Therapie behandelt (50%). Die Anzahl lebendiger Bakterien wurde durch Plattierung von Zelllysaten bestimmt. Die Abbildung zeigt die Ergebnisse von 6 unabhängigen Experimenten. Die horizontalen Linien geben den Mittelwert an.

4.9. Untersuchung des pH-Wertes in Monozyten Imatinib behandelter CML-Patienten

Durch die Inhibition der Abl-Tyrosinkinase wird der pH-Wert in den Lysosomen erniedrigt und das Wachstum von Mykobakterien reduziert. Im Folgenden sollte die Frage geklärt werden, ob die Imatinib-Therapie auch in zirkulierenden Monozyten von CML-Patienten zu einer Ansäuerung der Lysosomen führt. Um dies zu beantworten, färbten wir Vollblut direkt nach der Blutentnahme mit LysoSensor. Die Monozyten wurden anschließend mit anti-CD14 Antikörpern markiert, um die Ansäuerung gezielt in CD14⁺ Monozyten untersuchen zu können. Dadurch. Zur Kontrolle wurde Vollblut von gesunden Spendern identisch behandelt und untersucht (Abb.31A). Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) lag bei CD14⁺

Monozyten von gesunden Spendern im Mittel bei einer MFI von 434 ± 220 . In den mit Imatinib behandelten Patienten dagegen stieg die MFI signifikant auf 1462 ± 528 ($p < 0,005$) (Abb. 31B).

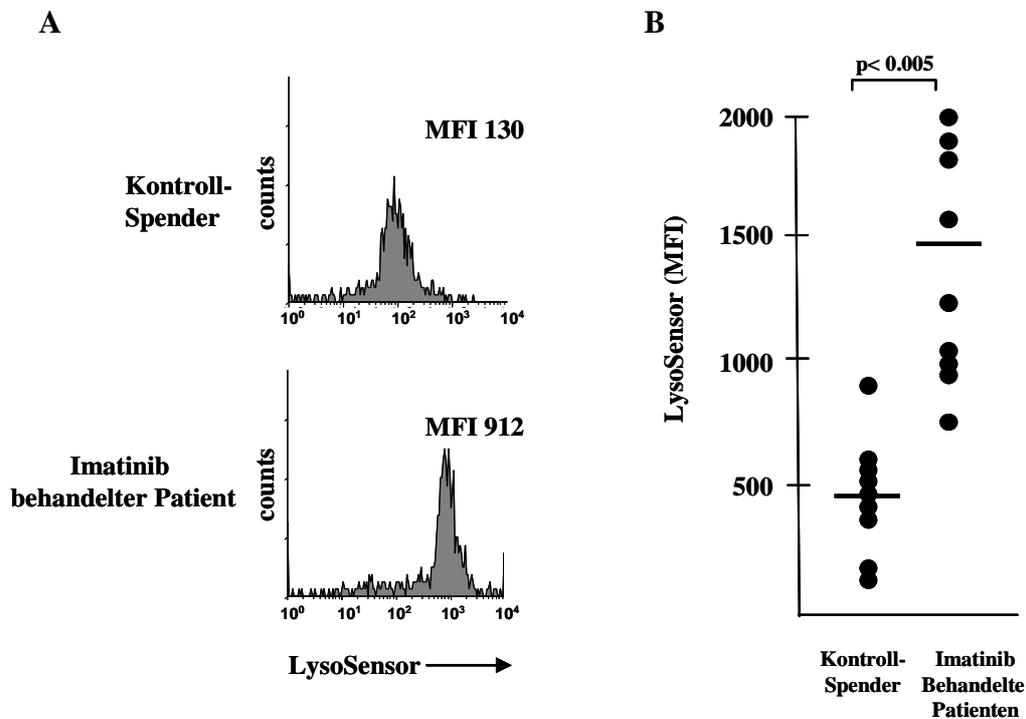


Abb. 31: Unter Imatinib-Therapie sinkt der pH-Wert der Lysosomen in Monozyten. 250 μ l Vollblut von gesunden Spendern ($n=9$) und von CML-Patienten ($n=9$) unter Imatinib-Therapie wurde mit LysoSensor (4 μ M) gefärbt. Die Monozyten wurden anschließend mit einem anti-CD14 Antikörper markiert. A) Zur Auswertung wurden 3000 CD14⁺ Monozyten (abgegrenzt zu einer Isotyp-Kontrolle) am Durchflusszytometer aufgenommen und die MFI der LysoSensor Färbung im Histogramm ausgewertet. Die Abbildung zeigt ein charakteristisches Ergebnis. B) Die Abbildung zeigt das Ergebnis von 18 individuellen Spendern. Die horizontalen Linien geben den Mittelwert der MFI wieder.

Zusammenfassend zeigen diese Experimente, dass durch die Imatinib-Therapie der pH-Wert in Monozyten gesenkt wird. Dieser Effekt könnte die angeborene Immunantwort gegen intrazelluläre Bakterien wie *M.tb* beeinflussen.

5. Diskussion

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Abl-Tyrosinkinase den pH-Wert der Lysosomen reguliert. Die Inhibierung der Abl-Tyrosinkinase führt zu einer Ansäuerung der Lysosomen und einem verminderten Wachstum von intrazellulären Mykobakterien. Serum Imatinib behandelte Patienten erniedrigt den pH-Wert in Makrophagen und reduziert das Wachstum von intrazellulären Mykobakterien. Die Wirkung von Imatinib ist klinisch relevant, da eine orale Therapie den pH-Wert in zirkulierenden Monozyten erniedrigt.

5.1. Die Abl-Tyrosinkinase reguliert die Ansäuerung der Lysosomen

Die Hauptfunktionen der Abl-Tyrosinkinase sind die Regulation der Proliferation, der Apoptose und des Aktinzytoskeletts [5, 6, 12, 13]. Zusätzlich reguliert die Abl-Tyrosinkinase vesikuläre Abbauprozesse. Die Inhibition der Abl-Tyrosinkinase moduliert den lysosomalen Transport, wodurch ein Autophagozytose ähnlicher Prozess induziert wird [10, 11, 70]. In dieser Arbeit wird die Regulation des pH-Wertes der Lysosomen als neue zellbiologische Funktion der Abl-Tyrosinkinase aufgedeckt. Für den Mechanismus der Ansäuerung sind drei Hypothesen denkbar:

1. Die Abl-Tyrosinkinase moduliert die Ansäuerung der Lysosomen durch das Aktinzytoskelett (Abb.32.A) Die Abl-Tyrosinkinase besitzt eine Aktin-Binde-Domäne [3] und Imatinib inhibiert die Polymerisierung des Aktinzytoskeletts [12, 71]. Aktin transportiert Untereinheiten der vATPase und lysosomale Enzyme zum Lysosom [72]. Ebenso wird das Lysosom selbst durch das Aktinzytoskelett zu seinem Bestimmungsort gebracht [73]. Dieser Transport des Lysosoms durch das Zytoplasma, beeinflusst die Ansäuerung des Organells [74]. Daher könnte die Inhibition der Abl-Tyrosinkinase zu Veränderungen des Aktinzytoskeletts führen und dadurch den pH-Wert in den Lysosomen beeinflussen.
2. Die Abl-Tyrosinkinase reguliert die Expression lysosomaler Proteine (Abb.32 B). Der Transkriptionsfaktor FoxO3a reguliert die Expression von lysosomalen Proteinen und wird in Zellen von CML-Patienten durch Imatinib aktiviert [75, 76]. Die lysosomalen Protonentransporter vATPase (Untereinheit a3) und chloride channel 3 (CLC-3) führen zu einem erniedrigten pH-Wert in den Lysosomen und haben Bindemotive für FoxO3a in ihrer Promotorregion [72, 77]. Demzufolge könnte die Inhibition der Abl-Tyrosinkinase den Transkriptionsfaktor FoxO3a aktivieren, wodurch die Transkription von der vATPase a3 und CLC-3 induziert wird. Durch die vermehrte Expression und Aktivität dieser Protonentransporter würde der pH-Wert in den Lysosomen sinken.

3. Die Abl-Tyrosinkinase reguliert die Ansäuerung der Lysosomen durch Phosphorylierung von lysosomalen Membranproteinen (Abb.32 C). Das Protein ceroid-lipofuscinosis 3 (CLN3) [78] befindet sich auf der Membran von Lysosomen und beeinflusst den pH-Wert. CLN3 besitzt Phosphorylierungsstellen für Kinasen auf der zytosolischen Seite [79]. Wird CLN3 dort phosphoryliert, führt dies zum Abbau des Membranproteins durch Ubiquitin [80]. Deshalb wäre es denkbar, dass durch Inhibition der Abl-Tyrosinkinase CLN3 nicht mehr phosphoryliert vorliegt und dadurch stabilisiert wird. Somit käme es zu einer gesteigerten Ansäuerung in den Lysosomen.

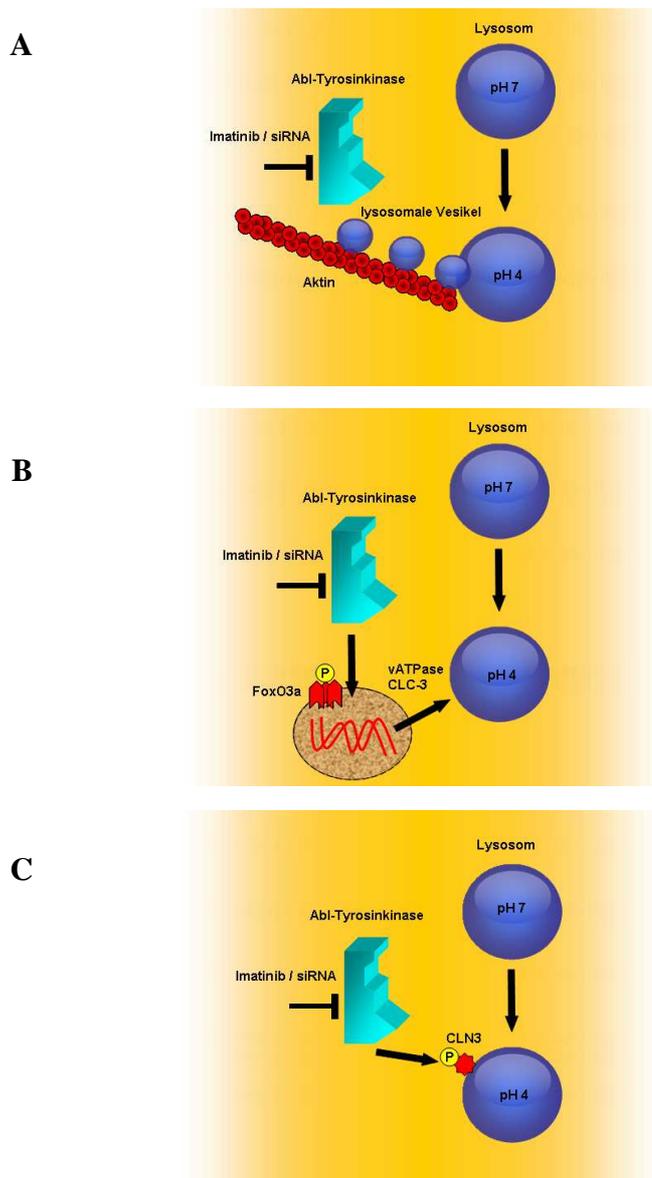


Abb.32: Mechanismen der Ansäuerung durch Imatinib. A) Die Abl-Tyrosinkinase moduliert die Ansäuerung der Lysosomen durch das Aktinzytoskelett. B) Die Abl-Tyrosinkinase reguliert die Expression lysosomaler Proteine. C) Die Abl-Tyrosinkinase reguliert die Ansäuerung der Lysosomen durch Phosphorylierung von lysosomalen Membranproteinen.

5.2. Die Manipulation der Abl-Tyrosinkinase durch Infektionserreger

Durch den Einfluss der Abl-Tyrosinkinase auf grundlegende zellbiologische Prozesse, wie Regulation des Aktinzytoskelettes, Proliferation und Regulation des lysosomalen pH, ist sie ein attraktiver Interaktionspartner für viele Infektionserreger.

Die Pathogene *Shigella flexneri*, *Chlamydia trachomatis*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Salmonella enterica* profitieren von der Eigenschaft der Abl-Tyrosinkinase mit Aktin zu interagieren. Sie aktivieren von extrazellulär die Abl-Tyrosinkinase und manipulieren das Aktinzytoskelett um ihre Aufnahme in die Wirtszelle zu initiieren [32, 81, 82, 83]. Vaccinia Viren nutzen ebenfalls die Abl-Tyrosinkinase um das Aktinzytoskelett zu modulieren. Durch Aktin-Moleküle werden die Viren aus ihren Zellen befördert um die nächste Zelle infizieren zu können. Eine Inhibition der Abl-Tyrosinkinase führt zu einer geringeren Viruslast in der Maus [84].

Neben der Beeinflussung von Aktin, nutzt das murine AIDS Virus eine weitere Eigenschaft der Abl-Tyrosinkinase, nämlich die Regulation der Proliferation. Durch Bindung eines viralen Proteins an die SH3-Domäne der Abl-Tyrosinkinase, transloziert die Abl-Tyrosinkinase in den Kern. Dadurch induziert sie eine Proliferation der Zelle, wodurch die Erreger ungestört replizieren können [85].

Anaplasma phagocytophilum und *Helicobacter pylori* benutzen die Abl-Tyrosinkinase, um die Zytokinproduktion zu manipulieren. Die Erreger transportieren eigene Proteine in die Wirtszelle, welche die gleiche Erkennungssequenz für eine Phosphorylierung besitzen wie zelluläre Proteine. Diese eingeschleusten Proteine werden von der Abl-Tyrosinkinase als Substrat erkannt und phosphoryliert [86, 87]. Dies führt zur Aktivierung von proinflammatorischen Genen (IL-8) und zum Überleben des Erregers [88]. Die Fähigkeit der Abl-Tyrosinkinase den pH-Wert der Lysosomen zu modulieren, wird von *M.tb* ausgenutzt. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass *M.tb* die Abl-Tyrosinkinase in Makrophagen aktiviert (Abb. 7). Anders als bei meisten Erregern, veränderte dies aber nicht der Aufnahme von *M.tb* (Abb. 8). Durch Inhibition der Abl-Tyrosinkinase sinkt der pH-Wert in den Lysosomen. Daher ist es denkbar, dass der Erreger die Abl-Tyrosinkinase aktiviert, um die Ansäuerung des Phagosoms zu verhindern.

Eine Vielzahl an Infektionserregern bemächtigen sich der Abl-Tyrosinkinase um ihre Invasions- und Evasionsmechanismen zu starten. Dies gelingt ihnen, indem sie die Abl-Tyrosinkinase aktivieren und dadurch grundlegende zellbiologische Prozesse für sich verfügbar machen. Daher muss vor Beginn einer Therapie mit Imatinib berücksichtigt

werden, dass durch die Inhibition der Abl-Tyrosinkinase gleichzeitig ein Angriffspunkt für viele Infektionserreger blockiert wird.

5.3. Die Funktion der Abl-Tyrosinkinase bei der Tuberkulose

Da die Abl-Tyrosinkinase eine Vielzahl immunologischer Funktionen von T-Zellen und Makrophagen beeinflusst, ist sie möglicherweise ein Schlüsselenzym bei der Immunantwort gegen intrazelluläre Erreger, wie *M.tb* (Abb.33).

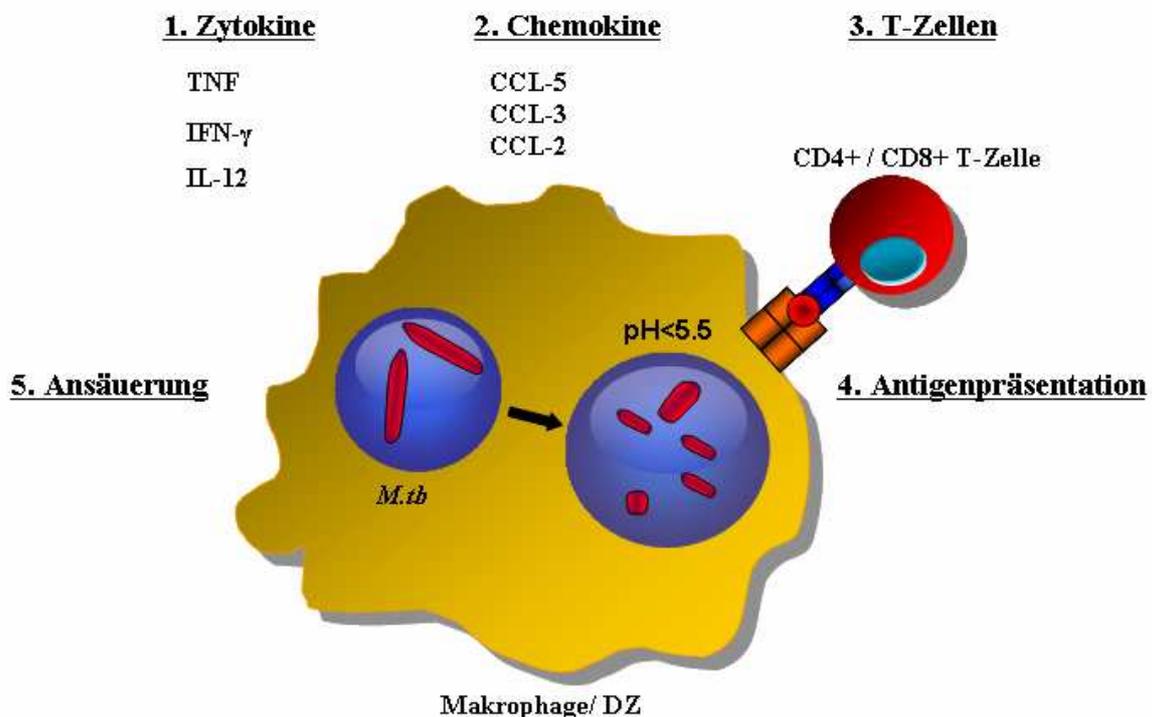


Abb. 33: Funktion der Abl-Tyrosinkinase bei der Immunantwort gegen die Tuberkulose

1. Die Abl-Tyrosinkinase reguliert die Produktion von Zytokinen. TNF und IL-12 wird in Makrophagen durch Inhibition der Abl-Tyrosinkinase gehemmt [89, 38]. Die Freisetzung von TNF ist bei der Immunantwort gegen die Tuberkulose ein Leitzytokin [90]. TNF vermittelt selbst und über andere Zytokine einen ständigen Influx von Granulozyten und Monozyten in den Alveolar-Raum [91, 92]. Darüber hinaus induziert TNF die Freisetzung von Chemokinen und die Expression von Adhäsionsmolekülen welche spezifische T-Zellen zum Granulom rekrutieren. Entsprechend bleibt in TNF-defizienten Mäusen die Formierung von Granulomen aus und es kommt zu einer zunehmenden Ausbreitung der Bakterien [93]. Zusätzlich kann

TNF zur Apoptose der infizierten Zellen sowie möglicherweise zum Freisetzen der Mykobakterien führen. Diese können durch frisch aus dem peripheren Blut rekrutierte Monozyten aufgenommen und abgetötet werden [94]. Durch das Zusammenspiel von TNF und IFN γ werden antibakterielle Moleküle, wie Sauerstoff- und Stickstoffoxid-Radikale, produziert [95]. Auf der anderen Seite kann TNF aber auch dem Immunsystem entgegenarbeiten. Exogen zugesetztes TNF führt *in vitro* zu einem stärkeren Wachstum von *M.tb* [96], während die Inhibition der TNF Synthese das Wachstum vermindern kann [97].

IL-12 aktiviert T-Zellen und induziert die Wanderung von DZ zu den Lymphknoten [98, 99]. Genetisch bedingte Immundefekte, die die IL-12 Kaskade betreffen, führen zu einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber mykobakteriellen Infektionen [100]. Da die Abl-Tyrosinkinase die Sekretion von IL-12 moduliert, ist sie entscheidend für die Steuerung IL-12 vermittelter Effektormechanismen.

Ebenso wird die antigenspezifische Sekretion von IFN- γ in T-Zellen durch Imatinib inhibiert [101]. IFN- γ aktiviert antimikrobielle Effektormechanismen in Makrophagen und erhöht die MHC II Produktion [102]. Die Relevanz von IFN- γ bei der Tuberkulose wird in der knock out Maus deutlich, hier ist das Fehlen von IFN- γ mit einem schwereren Krankheitsverlauf der Tuberkulose assoziiert [103, 104]. Die Abl-Tyrosinkinase reguliert die Produktion von TNF, IL-12 und IFN- γ . Diese Zytokine sind erforderlich für eine protektive Immunantwort bei der Tuberkulose und setzen eine funktionierende Abl-Tyrosinkinase voraus.

2. Die Abl-Tyrosinkinase beeinflusst die Freisetzung von Chemokinen. Die Sekretion von CCL-2, CCL-3 und CCL-5 wird in DZ reduziert, wenn diese mit Imatinib behandelt wurden [38]. Eine Infektion von AM mit Mykobakterien führt zur Freisetzung von CCL5, CCL-3 und CCL2. Bei der Tuberkulose führt CCL-5 und CCL3 zytotoxische Lymphozyten zum Granulom und verstärkt die zytotoxische Wirkung von T-Zellen [105, 106]. CCL-2 induziert die Wanderung von Monozyten und CD4⁺ T-Zellen zum Ort der Infektion. Dagegen führt eine Überproduktion an CCL-2 zu einer erhöhten Suszeptibilität bei der Tuberkulose [107]. Damit steuert die Abl-Tyrosinkinase die Migration von zytotoxischen Lymphozyten und Monozyten zum Granulom und verhindert so die Streuung von *M.tb* bei der Immunantwort der Tuberkulose.

3. Die Abl-Tyrosinkinase reguliert die T-Zell Antwort. Imatinib inhibiert die Proliferation, die Sekretion von Granzym B und die Zytokinfreisetzung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen [108, 109]. CD4⁺ T-Zellen produzieren antigenspezifisch IFN- γ und CD40 Ligand welches Makrophagen zur Abtötung von intrazellulären *M.tb* aktiviert [110]. Zusätzlich sind CD4⁺ T-Zellen in der Lage mit dem Fas-Liganden infizierte Makrophagen oder intrazelluläre

Mykobakterien direkt abzutöten [111]. In der Maus führt die Depletion von CD4⁺ T-Zellen zu einem schwereren Krankheitsverlauf bei mykobakteriellen Infektionen. Hierdurch wird die Relevanz von CD4⁺ T-Zellen bei der Tuberkulose deutlich [112]. Die CD8⁺ T-Zellen haben darüber hinaus eine zytolytische Funktion. Sie lysieren mithilfe von zytotoxischen Substanzen wie Perforin und Granulysin infizierte Makrophagen und töten Mykobakterien direkt ab [113, 114]. Ein Verlust an zytotoxischen Lymphozyten geht einher mit einer erhöhten Tuberkulose Inzidenz [115]. Diese Effektormechanismen der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen werden durch die Abl-Tyrosinkinase reguliert, die somit möglicherweise die T-Zell-Antwort bei der Tuberkulose mit beeinflusst. Zukünftige Experimente müssen zeigen, ob *M.tb* infizierte Mäuse unter Imatinib-Therapie noch eine protektive T-Zell-Antwort gegen den Erreger generieren können.

4. Die Antigenpräsentation wird durch die Abl-Tyrosinkinase moduliert. Durch Inhibition der Abl-Tyrosinkinase wird die Expression von antigenpräsentierenden Molekülen (MHCII, CD1a) und kostimulatorischen Molekülen (CD80, CD86) erhöht [116]. CD1a ist notwendig um Lipid-Antigene den T-Zellen präsentieren zu können. Diese Lipid-reaktive T-Zellen kommen gehäuft bei Tuberkulose Patienten vor und sind in der Lage Mykobakterien gezielt abzutöten [117, 118]. Die Bedeutung von CD1 Molekülen bei der Immunantwort gegen *M.tb* zeigt sich in der CD1 transfizierten Maus [119]. Diese Mäuse generierten CD1-restringierte T-Zellen, welche *M.tb* infizierte Zellen lysierten und IFN- γ produzierten. Um diesem Abwehrmechanismus zu entgehen kann *M.tb* die Präsentation von mykobakteriellen Lipide manipulieren, indem es die Expression von CD1 Moleküle herunterreguliert [120]. Die Expression von antigenpräsentierenden Molekülen ist für die Aktivierung des adaptiven Immunsystems gegen *M.tb* notwendig.

5. Die Abl-Tyrosinkinase reguliert die Ansäuerung der Lysosomen. Wir konnten zeigen, dass durch Inhibition der Abl-Tyrosinkinase der pH-Wert des mykobakteriellen Kompartiments sinkt, und hierdurch *M.tb* in seinem Wachstum gehemmt wird (Abb.26, Abb.28). *M.tb* schützt sich vor einem niedrigen pH (4,5-5,5), indem eine Fusion zwischen dem mykobakteriellen Phagosom und dem Lysosom verhindert wird [121]. Durch einen niedrigen pH-Wert können aus Nitrit (NO₂⁻) die Radikale NO und NO₂ generiert werden, welche einen bakteriziden Effekt auf *M.tb* haben [122]. Zusätzlich wird Eisen durch Lactotransferrin gebunden, wenn das Enzym durch den sauren pH aktiviert wurde, so dass *M.tb* Eisen entzogen wird [123]. Ebenso benötigt TLR9 einen niedrigen pH um CpG-Motive zu erkennen und eine effektive T_H-1 Antwort gegen *M.tb* zu generieren [124, 125]. Da die Abl-Tyrosinkinase den pH-Wert

der Lysosomen und somit des mykobakteriellen Kompartiments reguliert, hat sie möglicherweise eine zentrale Funktion bei der Immunantwort gegen die Tuberkulose.

Durch die Regulation der Zytokine, der Chemokine, der T-Zellen, der Antigenpräsentation und der Ansäuerung von Makrophagen ist eine funktionierende Abl-Tyrosinkinase wahrscheinlich unersetzlich für eine wirksame Immunantwort gegen *M.tb*. Daher stellt sich die Frage, warum es unter Imatinib-Therapie nicht gehäuft zu Reaktivierungen einer Tuberkulose kommt. Diese Arbeit zeigt, dass Imatinib nicht nur eine immunsupprimierende Wirkung auf das Immunsystem hat, sondern dass Imatinib durch die Senkung des pH-Wertes in den Lysosomen eine immunprotektive Wirkung bei der Immunabwehr gegen intrazelluläre Bakterien besitzt.

Weiterführende Experimente müssten zeigen, welche Auswirkung die Inhibition der Abl-Tyrosinkinase *in vivo* auf die Immunabwehr gegen *M.tb* hat. Hierzu könnten Abl knock out Mäuse mit *M.tb* infiziert werden, oder infizierte Mäuse mit Imatinib behandelt werden. Ergebnisse aus diesen Experimenten könnten möglicherweise darauf hindeuten, dass sich spezifische Tyrosinkinase-Inhibitoren zur Therapie von intrazellulären Erregern eignen.

6. Literaturverzeichnis

1. Van Etten RA, Jackson P, Baltimore D. The mouse type IV *c-abl* gene product is a nuclear protein, and activation of transforming ability is associated with cytoplasmic localization. 1989; *Cell* 58:669-678
2. Feller SM, Ren R, Hanafusa H, Baltimore D. SH2 and SH3 domains as molecular adhesives: the interactions of Crk and Abl. *Trends Biochem Sci.* 1994; 1:453-450.
3. Van Etten RA, Jackson PK, Baltimore D, Sanders MC, Matsudaira PT, Janmey PA. The COOH terminus of the c-Abl tyrosine kinase contains distinct F- and G-actin binding domains with bundling activity. *J Cell Biol.* 1994; 124:325-340
4. Kipreos ET, Wang JYJ (1992) Cell cycle-regulated binding of c-Abl tyrosine kinase to DNA. *Science.* 1992; 256:382-385
5. Vigneri, P. and Wang, J.Y. (2001) Induction of apoptosis in chronic myelogenous leukemia cells through nuclear entrapment of BCR-ABL tyrosine kinase. *Nat. Med.* 2001; 7: 228–234
6. Wang JY. Regulation of cell death by the Abl tyrosine kinase. *Oncogene.* 2000; 19(49):5643-50.
7. Plattner, R., Irvin, B.J., Guo, S., Blackburn, K., Kazlauskas, A., Abraham, R.T., York, J.D. and Pendergast, A.M. A new link between the c-Abl tyrosine kinase and phosphoinositide signalling through PLC- γ 1. *Nat. Cell Biol.* 2003; 5, 309–319
8. Suetsugu, S., Yamazaki, D., Kurisu, S. and Takenawa, T. Differential roles of WAVE1 and WAVE2 in dorsal and peripheral ruffle formation for fibroblast cell migration. *Dev. Cell.* 2003; 5, 595–609
9. Patricia A. Zipfel, Weiguo Zhang, Marisol Quiroz, and Ann Marie Pendergast. Requirement for Abl Kinases in T Cell Receptor Signaling. *Current Biology.* 2004; 14, 1222–1231.
10. Ertmer A, Huber V, Gilch S, Yoshimori T, Erfle V, Duyster J, Elsässer HP, Schätzl HM. The anticancer drug imatinib induces cellular autophagy. *Leukemia.* 2007; 21(5):936-42.
11. Yogalingam G, Pendergast AM. Abl kinases regulate autophagy by promoting the trafficking and function of lysosomal components. *J Biol Chem.* 2008; 283(51):35941-53.
12. Woodring, P.J., Litwack, E.D., O'Leary, D.D., Lucero, G.R., Wang, J.Y. and Hunter, T. Modulation of the F-actin cytoskeleton by c-Abl tyrosine kinase in cell spreading and neurite extension. *J. Cell Biol.* 2002; 156, 879–892
13. Woodring, P.J., Hunter, T. and Wang, J.Y. Regulation of F-actin-dependent processes by the Abl family of tyrosine kinases. *J. Cell Sci.* 2003; 116, 2613–2626

14. Wen, S.T., Jackson, P.K. and Van Etten, R.A. The cytostatic function of c-Abl is controlled by multiple nuclear localisation signals and requires the p53 and Rb tumor suppressor gene products. *EMBO J.* 1996; 15, 1583–1595
15. Hashimoto Y, Katayama H, Kiyokawa E, Ota S, Kurata T, Gotoh N, Otsuka N, Shibata M, Matsuda M. Phosphorylation of CrkII adaptor protein at tyrosine 221 by epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem.* 1998; 273(27):17186-91.
16. Baskaran R, Dahmus ME, Wang JY. Tyrosine phosphorylation of mammalian RNA polymerase II carboxyl-terminal domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993; 90(23):11167-71.
17. Plattner, R., Kadlec, L., DeMali, K.A., Kazlauskas, A. and Pendergast, A.M. c-Abl is activated by growth factors and Src family kinases and has a role in the cellular response to PDGF. *Genes Dev.* 1999; 13, 2400–2411
18. Lewis, J.M., Baskaran, R., Taagepera, S., Schwartz, M.A. and Wang, J.Y. Integrin regulation of c-Abl tyrosine kinase activity and cytoplasmic-nuclear transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1996; 93, 15174–15179
19. Kharbanda S, Ren R, Pandey P, Shafman TD, Feller SM, Weichselbaum RR, Kufe DW. Activation of the c-Abl tyrosine kinase in the stress response to DNA-damaging agents. *Nature.* 1995; 376(6543):785-8.
20. Hantschel, O., Nagar, B., Guettler, S., Kretzschmar, J., Dorey, K., Kuriyan, J. and Superti-Furga, G. (2003) A myristoyl/ phosphotyrosine switch regulates c-Abl. *Cell.* 2003; 112, 845–857
21. Schwartzberg PL, Stall AM, Hardin JD, Bowdish KS, Humaran T, Boast S, Harbison ML, Robertson EJ, Goff SP. Mice homozygous for the ablm1 mutation show poor viability and depletion of selected B and T cell populations. *Cell.* 1991; 65(7):1165-75.
22. Maroc N, Rottapel R, Rosnet O, Marchetto S, Lavezzi C, Mannoni P, Birnbaum D, Dubreuil P. Biochemical characterization and analysis of the transforming potential of the FLT3/F LK2 receptor tyrosine kinase. *Oncogene.* 1993;8(4):909-18.
23. Stiles CD. The molecular biology of platelet-derived growth factor. *Cell.* 1983;33(3):653-5.
24. Bühring HJ, Ullrich A, Schaudt K, Müller CA, Busch FW. The product of the proto-oncogene c-kit (P145c-kit) is a human bone marrow surface antigen of hemopoietic precursor cells which is expressed on a subset of acute non-lymphoblastic leukemic cells. *Leukemia.* 1991;5(10):854-60.
25. Buchdunger E, Zimmermann J, Mett H, et al. Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylaminopyrimidine derivative. *Cancer Res.* 1996;56:100-104

26. Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, et al. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med.* 1996;2:561-566
27. 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.* 2005;105(8):3127-32.
28. 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; IRIS Investigators. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2003;348(11):994-1004.
29. O'Hare T, Walters DK, Stoffregen EP, Jia T, Manley PW, Mestan J, Cowan-Jacob SW, Lee FY, Heinrich MC, Deininger MW, Druker BJ. In vitro activity of Bcr-Abl inhibitors AMN107 and BMS-354825 against clinically relevant imatinib-resistant Abl kinase domain mutants. *Cancer Res.* 2005;65(11):4500-5.
30. Burton EA, Plattner R, Pendergast. Abl tyrosine kinases are required for infection by *Shigella flexneri*. *AM. EMBO J.* 2003;22(20):5471-9.
31. Poppe M, Feller SM, Römer G, Wessler S. Phosphorylation of *Helicobacter pylori* CagA by c-Abl leads to cell motility. *Oncogene.* 2007;26(24):3462-72.
32. Backert S, Feller SM, Wessler S. Emerging roles of Abl family tyrosine kinases in microbial pathogenesis. *Trends Biochem Sci.* 2008;33(2):80-90.
33. Mattiuzzi GN, Cortes JE, Talpaz M, Reuben J, Rios MB, Shan J, Kontoyiannis D, Giles FJ, Raad I, Verstovsek S, Ferrajoli A, Kantarjian HM. Development of Varicella-Zoster virus infection in patients with chronic myelogenous leukemia treated with imatinib mesylate. *Clin Cancer Res.* 2003; 9(3):976-80.
34. Ikeda K, Shiga Y, Takahashi A, Kai T, Kimura H, Takeyama K, Noji H, Ogawa K, Nakamura A, Ohira H, Sato Y, Maruyama Y. Fatal hepatitis B virus reactivation in a chronic myeloid leukemia patient during imatinib mesylate treatment. *Leuk Lymphoma.* 2006 ;47(1):155-7.
35. Daniels JM, Vonk-Noordegraaf A, Janssen JJ, Postmus PE, van Altena R. Tuberculosis complicating imatinib treatment for chronic myeloid leukaemia. *Eur Respir J.* 2009;33(3):670-2.
36. Gu JJ, Zhang N, He YW, Koleske AJ, Pendergast AM. Defective T cell development and function in the absence of Abelson kinases. *J Immunol.* 2007;179(11):7334-43.

37. 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.* 2000;165(12):6872-9.
38. Appel S, Rupf A, Weck MM, Schoor O, Brümmendorf TH, Weinschenk T, Grünebach 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.* 2005;11(5):1928-40.
39. 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.* 2003;21(2):67-75.
40. Wolf AM, Wolf D, Rumpold H, Ludwiczek S, Enrich B, Gastl G, Weiss G, Tilg H. The kinase inhibitor imatinib mesylate inhibits TNF- α production in vitro and prevents TNF-dependent acute hepatic inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(38):13622-7.
41. Kundu M, Pathak SK, Kumawat K, Basu S, Chatterjee G, Pathak S, Noguchi T, Takeda K, Ichijo H, Thien CB, Langdon WY, Basu J. A TNF- and c-Cbl-dependent FLIP(S)-degradation pathway and its function in Mycobacterium tuberculosis-induced macrophage apoptosis. *Nat Immunol.* 2009;10(8):918-26.
42. WHO: WHO Report 2004a: Global Tuberculosis Control: 2004a
43. Bericht zur Epidemiologie der Tuberkulose in Deutschland für 2007, Robert-Koch-Institut, Stand: 16.03.09
44. Wallis RS, Broder MS, Wong JY, Hanson ME, Beenhouwer DO. Granulomatous infectious diseases associated with tumor necrosis factor antagonists. *Clin Infect Dis.* 2004;38(9):1261-5.
45. Ernst JD. Macrophage receptors for Mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun.* 1998;66(4):1277-81.
46. Chua J, Singh SB, Deretic V. Cell biology of mycobacterium tuberculosis phagosome. *Vergne Annu Rev Cell Dev Biol.* 2004;20:367-94.
47. Miyakawa Y, Ratnakar P, Rao AG, Costello ML, Mathieu-Costello O, Lehrer RI, Catanzaro A. In vitro activity of the antimicrobial peptides human and rabbit defensins and porcine leukocyte protegrin against Mycobacterium tuberculosis.
48. Liu PT, Stenger S, Li H, Wenzel L, Tan BH, Krutzik SR, Ochoa MT, Schaubert J, Wu K, Meinken C, Kamen DL, Wagner M, Bals R, Steinmeyer A, Zügel U, Gallo RL, Eisenberg D, Hewison M, Hollis BW, Adams JS, Bloom BR, Modlin RL. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science.* 2006;311(5768):1770-3.

49. Chan J, Xing Y, Magliozzo RS, Bloom BR. Killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. *J Exp Med.* 1992;175(4):1111-22.
50. Molloy A, Laochumroonvorapong P, Kaplan G. Apoptosis, but not necrosis, of infected monocytes is coupled with killing of intracellular bacillus Calmette-Guérin. *J Exp Med.* 1994;180(4):1499-509.
51. Douvas GS, May MH, Crowle AJ. Transferrin, iron, and serum lipids enhance or inhibit *Mycobacterium avium* replication in human macrophages. *J Infect Dis.* 1993;167(4):857-64.
52. Gutierrez MG, Master SS, Singh SB, Taylor GA, Colombo MI, Deretic V. Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* survival in infected macrophages. *Cell.* 2004;119(6):753-66.
53. Sturgill-Koszycki S, Schlesinger PH, Chakraborty P, Haddix PL, Collins HL, Fok AK, Allen RD, Gluck SL, Heuser J, Russell DG. Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science.* 1994;263(5147):678-81.
54. 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.* 2007;130(1):37-50.
55. 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.* 2004;304(5678):1800-4.
56. Peters JH, Xu H, Ruppert J, Ostermeier D, Friedrichs D, Gieseler RK. Signals required for differentiating dendritic cells from human monocytes in vitro. *Adv Exp Med Biol.* 1993;329:275-80.
57. Verreck FA, de Boer T, Langenberg DM, Hoeve MA, Kramer M, Vaisberg E, Kastelein R, Kolk A, de Waal-Malefyt R, Ottenhoff TH. Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(13):4560-5.
58. Beatty WL, Russell DG. Identification of mycobacterial surface proteins released into subcellular compartments of infected macrophages. *Infect Immun.* 2000;68(12):6997-7002.
59. Förtsch D, Röllinghoff M, Stenger S. IL-10 converts human dendritic cells into macrophage-like cells with increased antibacterial activity against virulent *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol.* 2000;165(2):978-87.

60. Dröse S, Bindseil KU, Bowman EJ, Siebers A, Zeeck A, Altendorf K. Inhibitory effect of modified bafilomycins and concanamycins on P- and V-type adenosinetriphosphatases. *Biochemistry*. 1993;32(15):3902-6.
61. Via LE, Fratti RA, McFalone M, Pagan-Ramos E, Deretic D, Deretic V. Effects of cytokines on mycobacterial phagosome maturation. *J Cell Sci*. 1998;111 (Pt 7):897-905.
62. Chen CS, Chen WN, Zhou M, Arttamangkul S, Haugland RP. Probing the cathepsin D using a BODIPY FL-pepstatin A: applications in fluorescence polarization and microscopy. *J Biochem Biophys Methods*. 2000;42(3):137-51.
63. Cho SY, Klemke RL. Purification of pseudopodia from polarized cells reveals redistribution and activation of Rac through assembly of a CAS/Crk scaffold. *J Cell Biol*. 2002;156(4):725-36.
64. Amoui M, Miller WT. The substrate specificity of the catalytic domain of Abl plays an important role in directing phosphorylation of the adaptor protein Crk. *Cell Signal*. 2000;12(9-10):637-43.
65. Weisbart RH, Gasson JC, Golde DW. Colony-stimulating factors and host defense. *Ann Intern Med*. 1989;110(4):297-303
66. Vergne I, Chua J, Deretic V. Tuberculosis toxin blocking phagosome maturation inhibits a novel Ca²⁺/calmodulin-PI3K hVPS34 cascade. *J Exp Med*. 2003;198(4):653-9.
67. Anes E, Peyron P, Staali L, Jordao L, Gutierrez MG, Kress H, Hagedorn M, Maridonneau-Parini I, Skinner MA, Wildeman AG, Kalamidas SA, Kuehnel M, Griffiths G. Dynamic life and death interactions between *Mycobacterium smegmatis* and J774 macrophages. *Cell Microbiol*. 2006;8(6):939-60.
68. Peyron P, Maridonneau-Parini I, Stegmann T. Fusion of human neutrophil phagosomes with lysosomes in vitro: involvement of tyrosine kinases of the Src family and inhibition by mycobacteria *J Biol Chem*. 2001;276(38):35512-7.
69. 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*. 2001;344(14):1031-7.
70. Ertmer A, Gilch S, Yun SW, Flechsig E, Klebl B, Stein-Gerlach M, Klein MA, Schätzl HM. The tyrosine kinase inhibitor STI571 induces cellular clearance of PrP^{Sc} in prion-infected cells. *J Biol Chem*. 2004;279(40):41918-27.
71. Chen C, Ba X, Xu T, Cui L, Hao S, Zeng X. c-Abl is involved in the F-actin assembly triggered by L-selectin crosslinking. *J Biochem*. 2006;140(2):229-35.

72. Sun-Wada GH, Tabata H, Kawamura N, Aoyama M, Wada Y. Direct recruitment of H⁺-ATPase from lysosomes for phagosomal acidification. *J Cell Sci.* 2009; 122(Pt 14):2504-13.
73. Styers ML, Salazar G, Love R, Peden AA, Kowalczyk AP, Faundez V. The endo-lysosomal sorting machinery interacts with the intermediate filament cytoskeleton. *Mol Biol Cell.* 2004;15(12):5369-82.
74. Marie-Neige Cordonnier, Daniel Dauzonne, Daniel Louvard, Evelyne Coudrier. Actin Filaments and Myosin I Alpha Cooperate with Microtubules for the Movement of Lysosomes. *Molecular Biology of the Cell*, 2001; Vol. 12, 4013–4029
75. Essafi A, Fernández de Mattos S, Hassen YA, Soeiro I, Mufti GJ, Thomas NS, Medema RH, Lam EW. Direct transcriptional regulation of Bim by FoxO3a mediates STI571-induced apoptosis in Bcr-Abl-expressing cells. *Oncogene.* 2005; 24(14):2317-29
76. Zhao J, Brault JJ, Schild A, Cao P, Sandri M, Schiaffino S, Lecker SH, Goldberg AL FoxO3 coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells. *Cell Metab.* 2007;6(6):472-83.
77. Li X, Wang T, Zhao Z, Weinman SA. The ClC-3 chloride channel promotes acidification of lysosomes in CHO-K1 and Huh-7 cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002; 282(6):C1483-91
78. Golabek AA, Kida E, Walus M, Kaczmarek W, Michalewski M, Wisniewski KE. CLN3 protein regulates lysosomal pH and alters intracellular processing of Alzheimer's amyloid-beta protein precursor and cathepsin D in human cells. *Mol Genet Metab.* 2000;70(3):203-13.
79. Michalewski MP, Kaczmarek W, Golabek AA, Kida E, Kaczmarek A, Wisniewski KE. Evidence for phosphorylation of CLN3 protein associated with Batten disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;253(2):458-62.
80. J Yaglom, MH Linskens, S Sadis, DM Rubin, B Futcher and D Finley. p34Cdc28-mediated control of Cln3 cyclin degradation. *Mol. Cell. Biol.*, 1995, 731-741, Vol 15.
81. 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.* 2008;4(3):e1000021
82. 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.* 2008;4(3):e1000031.
83. Ly KT, Casanova JE. Abelson tyrosine kinase facilitates *Salmonella enterica* serovar Typhimurium entry into epithelial cells. *Infect Immun.* 2009;77(1):60-9.

84. Reeves PM, Bommarius B, Lebeis S, McNulty S, Christensen J, Swimm A, Chahroudi A, Chavan R, Feinberg MB, Veach D, Bornmann W, Sherman M, Kalman D. Disabling poxvirus pathogenesis by inhibition of Abl-family tyrosine kinases. *Nat Med*;11(7):731-9.
85. Dupraz P, Rebai N, Klein SJ, Beaulieu N, Jolicoeur P. The murine AIDS virus Gag precursor protein binds to the SH3 domain of c-Abl. *J Virol*.;71(4):2615-20.
86. Lin M, den Dulk-Ras A, Hooykaas PJ, Rikihisa Y. *Anaplasma phagocytophilum* AnkA secreted by type IV secretion system is tyrosine phosphorylated by Abl-1 to facilitate infection. *Cell Microbiol*. 2007;9(11):2644-57.
87. Poppe M, Feller SM, Römer G, Wessler S. Phosphorylation of *Helicobacter pylori* CagA by c-Abl leads to cell motility. *Oncogene*. 2007;26(24):3462-72.
88. Brandt S, Kwok T, Hartig R, König W, Backert S. NF-kappaB activation and potentiation of proinflammatory responses by the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*.;102(26):9300-5
89. Wolf AM, Wolf D, Rumpold H, Ludwiczek S, Enrich B, Gastl G, Weiss G, Tilg H. The kinase inhibitor imatinib mesylate inhibits TNF- α production in vitro and prevents TNF-dependent acute hepatic inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(38):13622-7.
90. Stenger S. Immunological control of tuberculosis: role of tumour necrosis factor and more. *Ann Rheum Dis*.;64 Suppl 4:iv24-8. 2005
91. Roach DR, Bean AG, Demangel C, France MP, Briscoe H, Britton WJ. TNF regulates chemokine induction essential for cell recruitment, granuloma formation, and clearance of mycobacterial infection. *J Immunol*;168:4620-7. 2002
92. Tessier PA, Naccache PH, Clark-Lewis I, Gladue RP, Neote KS, McColl SR. Chemokine networks in vivo: involvement of C-X-C and C-C chemokines in neutrophil extravasation in vivo in response to TNF- α . *J Immunol*;159:3595-602; 1997
93. Flynn JL, Goldstein MM, Chan J, Triebold KJ, Pfeffer K, Lowenstein CJ, Schreiber R, Mak TW, Bloom BR: Tumor necrosis factor- α is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Immunity* 2(6):561, 1995.
94. Flesch IE, Kaufmann SH: Activation of tuberculostatic macrophage functions by gamma interferon, interleukin-4, and tumor necrosis factor. *Infect Immun*. 58(8):2675, 1990.
95. Ding AH, Nathan CF, Stuehr DJ: Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol* 141(7):2407, 1988.

96. Engele M, Stössel E, Castiglione K, Schwerdtner N, Wagner M, Bölskei P, Röllinghoff M, Stenger S. Induction of TNF in human alveolar macrophages as a potential evasion mechanism of virulent *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol*;168(3):1328-37. 2002
97. Haraguchi S, Day NK, Kamchaisatian W, Beigier-Pompadre M, Stenger S, Tangsinmankong N, Sleasman JW, Pizzo SV, Cianciolo GJ. LMP-420, a small-molecule inhibitor of TNF-alpha, reduces replication of HIV-1 and *Mycobacterium tuberculosis* in human cells. *AIDS Res Ther.*;3:8. 2006
98. Giacomini E, Iona E, Ferroni L, Miettinen M, Fattorini L, Orefici G, Julkunen I, Coccia EM. Infection of human macrophages and dendritic cells with *Mycobacterium tuberculosis* induces a differential cytokine gene expression that modulates T cell response. *J Immunol.* 2001;166(12):7033-41.
99. Khader SA, Partida-Sanchez S, Bell G, Jelley-Gibbs DM, Swain S, Pearl JE, Ghilardi N, Desauvage FJ, Lund FE, Cooper AM. Interleukin 12p40 is required for dendritic cell migration and T cell priming after *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Exp Med.* 2006;203(7):1805-15.
100. Filipe-Santos O, Bustamante J, Chappier A, Vogt G, de Beaucoudrey L, Feinberg J, Jouanguy E, Boisson-Dupuis S, Fieschi C, Picard C, et al. Inborn errors of IL-12/23- and IFN-gamma-mediated immunity: molecular, cellular, and clinical features. *Semin Immunol.* 2006;18:347–361.
101. Chen J, Schmitt A, Giannopoulos K, Chen B, Rojewski M, Döhner 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.* 2007;31(5):1133-9
102. J. L. Flynn, J. Chan, *Annu. Rev. Immunol.* 19, 93 (2001)
103. Caruso AM, Serbina N, Klein E, Triebold K, Bloom BR, Flynn JL. Mice deficient in CD4 T cells have only transiently diminished levels of IFN-gamma, yet succumb to tuberculosis. *J Immunol.* 1999;162(9):5407-16.
104. Flynn JL, Chan J, Triebold KJ, Dalton DK, Stewart TA, Bloom BR. An essential role for interferon gamma in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Exp Med.*;178(6):2249-54. 1993
105. Schall, T. J., K. Bacon, R. D. R. Camp, J. W. Kaspari, and D. V. Goeddel. 1993. Human macrophage inflammatory protein 1 alpha (MIP-1 α) and MIP-1 β chemokines attract distinct populations of lymphocytes. *J. Exp. Med.* 177: 1821-1825

106. Stegelmann F, Bastian M, Swoboda K, Bhat R, Kiessler V, Krensky AM, Roellinghoff M, Modlin RL, Stenger S. Coordinate expression of CC chemokine ligand 5, granulysin, and perforin in CD8+ T cells provides a host defense mechanism against *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol.*;175(11):7474-83.
107. Flores-Villanueva PO, Ruiz-Morales JA, Song CH, Flores LM, Jo EK. A functional promoter polymorphism in monocyte chemoattractant protein-1 is associated with increased susceptibility to pulmonary tuberculosis. *J. Exp. Med.* 2005; 202:1649–58
108. Cwynarski K, Laylor R, Macchiarulo E, Goldman J, Lombardi G, Melo JV, Dazzi F. Imatinib inhibits the activation and proliferation of normal T lymphocytes in vitro. *Leukemia*. 2004;18(8):1332-9.
109. Gu JJ, Zhang N, He YW, Koleske AJ, Pendergast AM. Defective T cell development and function in the absence of Abelson kinases. *J Immunol.* 2007;179(11):7334-43.
110. Chan J, Xing Y, Magliozzo RS, Bloom BR: Killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. *J Exp Med* 1992, 175:1111-1122.
111. Oddo M, Renno T, Attinger A, Bakker T, Macdonald HR, Meylan PR: Fas ligand-induced apoptosis of infected human macrophages reduces the viability of intracellular *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 1998, 160:5448-5454.
112. Pedrazzini T, Hug K, Louis JA: Importance of L3T4+ and Lyt-2+ cells in the immunologic control of infection with *Mycobacterium bovis* strain Bacillus Calmette-Guerin in mice. *J Immunol* 1987, 139:2032-2037.
113. Stenger S, Hanson DA, Teitelbaum R, Dewan P, *et al.*: An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science* 282:121-5, 1998
114. Mazzaccaro RJ, Stenger S, Rock KL, Porcelli SA, Brenner MB, Modlin RL, Bloom BR. Cytotoxic T lymphocytes in resistance to tuberculosis. *Adv Exp Med Biol.*;452:85-101. 1998
115. Bruns H, Meinken C, Schauenberg P, Härter G, Kern P, Modlin RL, Antoni C, Stenger S. Anti-TNF immunotherapy reduces CD8+ T cell-mediated antimicrobial activity against *Mycobacterium tuberculosis* in humans. *J Clin Invest.*;119(5):1167-77. 2009
116. 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.* 2003;21(2):67-75.
117. Ulrichs, T., D. B. Moody, E. Grant, S. H. Kaufmann, S. A. Porcelli. 2003. T-cell responses to CD1-presented lipid antigens in humans with *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Infect. Immun.* 71: 3076-3087.

118. Bastian M, Braun T, Bruns H, Röllinghoff M, Stenger S. Mycobacterial lipopeptides elicit CD4⁺ CTLs in Mycobacterium tuberculosis-infected humans. *J. Immunol.* 2008;180(5):3436-46.
119. Felio K, Nguyen H, Dascher CC, Choi HJ, Li S, Zimmer MI, Colmone A, Moody DB, Brenner MB, Wang CR. CD1-restricted adaptive immune responses to Mycobacteria in human group 1 CD1 transgenic mice. *J Exp Med.*;206(11):2497-509. 2009
120. Stenger S, Niazi KR, Modlin RL. Down-regulation of CD1 on antigen-presenting cells by Infection with Mycobacterium tuberculosis. *J Immunol.* 1998 Oct 1;161(7):3582-8.
121. Armstrong JA, Hart PD. Response of cultured macrophages to Mycobacterium tuberculosis with observations on fusion of lysosomes with phagosomes. *J Exp Med.* 1971;134(3 Pt 1):713-40
122. Chan J, Xing Y, Magliozzo RS, Bloom BR. Killing of virulent Mycobacterium tuberculosis by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. *J Exp Med.* 1992;175(4):1111-22
123. Sipe DM, Murphy RF. Binding to cellular receptors results in increased iron release from transferrin at mildly acidic pH. *J Biol Chem.* 1991;266(13):8002-7.
124. Bafica A, Scanga CA, Feng CG, Leifer C, Cheever A, Sher A. TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to Mycobacterium tuberculosis. *J Exp Med.* 2005;202(12):1715-24.
125. Häcker H, Mischak H, Miethke T, Liptay S, Schmid R, Sparwasser T, Heeg K, Lipford GB, Wagner H. CpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation. *EMBO J.* 1998;17(21):6230-40

Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Steffen Stenger bedanken. Dafür dass er mich stets bei der Weiterentwicklung meiner Dissertation unterstützt und gefördert hat. Darüber hinaus gilt ihm mein Dank, weil er immer ein offenes Ohr für dienstliche oder persönliche Probleme hatte.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Bernhard Eikmanns, der mich bei der Konzeption und Durchführung der Arbeit sowie bei der Erstellung der Dissertationsschrift betreute und mir in allen fachlichen Fragen stets zur Seite stand.

Prof. Dr. Knöchel danke ich äußerst für die unkomplizierte und freundliche Zusage, meine Dissertation zu Begutachten.

Prof. Dr. Konstanze Döhner und Dr. Frank Stegelmann (Medizinischen Klinik III, Universitätsklinikum Ulm) danke ich für ihre Unterstützung und Kooperationsbereitschaft. Ohne ihre Hilfe hätte die ImMyTub-Studie nicht stattgefunden.

Diese Gelegenheit möchte ich nutzen, den Bronchoskopeuren für Ihre großen Bemühungen zu danken, mich stets mit erstklassigen Alveolarmakrophagen zu versorgen. Zum einen gilt mein Danke Dr. Christian Schumann und seinen Mitarbeitern (Medizinische Klinik II, Universitätsklinikum Ulm) und zum anderen bedanke ich mich bei Dr. Manfred Wagner und Kollegen (Klinikum Nord, Medizinische Klinik III, Nürnberg) für die hervorragende Zusammenarbeit.

Dr. Ger van Zandbergen danke ich sehr für die Hilfe am Fluoreszenz-Mikroskop. Ohne sein Wissen und sein technisches Geschick hätte ich viele Fragestellungen in meiner Doktorarbeit nicht beantworten können.

Meinen Labormitarbeiter und Freunden Max, Kiki, Nina, Daniel, Bettina, Martin, Valezka, Benny und Michaela möchte ich nicht nur für ihre Hilfsbereitschaft und für den wissenschaftlichen Gedankenaustausch danken, sondern besonders für die schöne freundschaftliche Atmosphäre die stets im Labor herrschte.

Ohne die ausdauernde und vielseitige Unterstützung meiner Eltern wäre die Umsetzung meiner Promotion kaum möglich gewesen. Besonders bei ihnen möchte ich mich von ganzem Herzen bedanken.

Meiner Frau Susann und ihren Eltern möchte ich für ihre Ausdauer und ihre Unterstützung bei meiner Promotion danken. Mein Danke gilt auch meinem Sohn Maurice, vor allem aber hoffe ich, dass er mir meine regelmäßige Abwesenheit nicht nachtragen wird.

Zur Person: Heiko Bruns

geb. am 18.09.1979 auf Borkum

Verheiratet, 1 Kind (Maurice, 2 Jahre)

CURRICULUM VITAE

Hochschulausbildung

Seit 01/2007

Doktorarbeit

Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene

Universitätsklinikum Ulm

Schwerpunkt: Immunologie

Thema: „Die Funktion der Abl-Tyrosinkinase bei der angeborenen Immunabwehr gegen *Mycobacterium tuberculosis*“

02/2006 – 10/2006

Diplomarbeit

Institut für Klinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene

Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

Schwerpunkt: Immunologie

Thema: „Mechanismen der erhöhten Tuberkulose-Inzidenz unter Therapie mit Tumor-Nekrose-Faktor Antikörpern“

Note: sehr gut

10/2001 – 08/2006

Studium der Biologie (Diplom)

Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

Wehrdienst

07/2000 – 07/2001

Sanitätsdienst der Marine

BWK Bad Zwischenahn

Schulbildung

08/1997 – 07 /2000

Abitur

Allgemeine Hochschulreife

Gymnasium Lohne

Besondere Qualifikationen

08/2002 – 03/2006

Studentische Hilfskraft im HLA-Labor

Spendertypisierung

Medizinische Klinik 3, Universitätsklinikum Erlangen

Fremdsprachen

Gute Englischkenntnisse in Wort und Schrift

EDV-Kenntnisse

Exzellente Kenntnisse in MS-Word, MS-Excel,
MS-PowerPoint

Publikationsverzeichnis

1. **Bruns H**, Meinken C, Schauenberg P, Härter G, Kern P, Modlin RL, Antoni C, Stenger S. Anti-TNF immunotherapy reduces CD8+ T cell mediated antimicrobial activity against Mycobacterium tuberculosis in humans.
J. Clin. Invest.; 119 (5): 1167-77, 2009
2. Wollin M, Abele S, **Bruns H**, Weyand M, Kalden JR, Ensminger SM, Spriewald BM. Inhibition of TNF-alpha reduces transplant arteriosclerosis in a murine aortic transplant model.
Transpl. Int.; 22(3): 342-9, 2009
3. Bastian M, Braun T, **Bruns H**, Röllinghoff M, Stenger S.
Mycobacterial lipopeptides elicit CD4+ CTLs in Mycobacterium tuberculosis-infected humans
J Immunol.; 180(5). 3436-46, 2008
4. Tan BH, Meinken C, Bastian M, **Bruns H**, Legasapi A, Ochoa MT, Krutzik SR, Bloom BR, Ganz T, Modlin RL, Stenger S.
Macrophages acquire neutrophil granules for antimicrobial activity against intracellular pathogens
J Immunol.; 177(3): 1864-71, 2006

Auszeichnung

Science Preis

der Deutschen Gesellschaft für Pulmologie

Referenzen:

Prof. Dr. Steffen Stenger
Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
Albert-Einstein-Allee 23
89073 Ulm
0731/50065300
steffen.stenger@uniklinik-ulm.de

PD. Dr. Bernd Spriewald
Medizinische Klinik 3, Universitätsklinikum Erlangen
Krankenhausstraße 12
91054 Erlangen
09131/8533092
bernd.spriewald@uk-erlangen.de

Fürth, 16.01.2010