

Aus dem Forschungszentrum Borstel  
Leibniz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften  
Programmbereich Infektionen  
Direktor: Prof. Dr. Ulrich Schaible

**Der Verlauf einer experimentellen zerebralen  
Malaria und der experimentellen Tuberkulose  
während einer Tuberkulose-Malaria-  
Koinfektion**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades  
der Universität zu Lübeck

Aus der Sektion Naturwissenschaften

vorgelegt von

Jannike Blank

aus Lübeck

Lübeck 2016

1. Berichterstatter/Berichterstatterin: PD Dr. Norbert Reiling

2. Berichterstatter/Berichterstatterin: Prof. Dr. Rudolph Manz

Tag der mündlichen Prüfung: 28.07.2016

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 31.08.2016

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	IV
Zusammenfassung.....	VII
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Tuberkulose .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Epidemiologie.....	1
1.1.2 Infektionsverlauf .....	2
1.1.3 Immunologie .....	3
1.1.4 Mausmodell der Tb .....	5
1.1.5 Risikofaktoren für die Tb .....	7
<b>1.2 Malaria.....</b>	<b>8</b>
1.2.1 Epidemiologie.....	8
1.2.2 Infektionsverlauf .....	9
1.2.3 Immunologie .....	10
1.2.4 Die Aufgaben der Milz in der Malariainfektion.....	12
1.2.5 Zerebrale Malaria .....	14
1.2.6 Mausmodelle der Malariainfektion .....	15
<b>1.3 Koinfektionen .....</b>	<b>16</b>
1.3.1 Tb-Malaria Koinfektion.....	17
<b>1.4 Fragestellung .....</b>	<b>20</b>
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>21</b>
<b>2.1 Material .....</b>	<b>21</b>
2.1.1 Chemikalien.....	21
2.1.2 Kulturmedien, Lösungen und Puffer .....	22
2.1.3 Anti-Maus Antikörper für die Durchflusszytometrie .....	23
2.1.4 Proteine .....	24
2.1.5.....	24
2.1.6 Primer.....	25
2.1.7 Kits.....	25
2.1.8 Verbrauchsmaterial.....	25
2.1.9 Geräte.....	26

2.1.10	Software .....	27
2.1.11	Parasiten- und Bakterienstämme.....	27
2.1.12	Mausstämme.....	27
2.2	Methoden .....	28
2.2.1	Tierexperimentelles Arbeiten .....	28
2.2.2	Mikrobiologisches Arbeiten .....	32
2.2.3	Zellbiologische Arbeiten.....	33
2.2.4	Immunologische Analysen .....	37
2.2.5	Histopathologische Analysen .....	39
2.2.6	Molekularbiologische Analysen .....	40
2.2.7	Statistische Analysen.....	41
3	Ergebnisse .....	42
3.1	Die <i>Mtb</i> -Koinfektion hat keinen Einfluss auf die von <i>PbANKA</i> -induzierte EZM in C57BL/6 Mäusen.....	42
3.1.1	Koinfizierte Mäuse entwickeln EZM.....	42
3.1.2	Die <i>Mtb</i> -Koinfektion hat keinen Einfluss auf die <i>PbANKA</i> -induzierte Zytokinantwort.....	45
3.1.3	Die <i>Mtb</i> -Koinfektion hat keinen Einfluss auf den Aktivierungsstatus der CD11c <sup>hi</sup> DZ-Population in der Milz.....	47
3.1.4	Die T-Zell-Antworten in der Milz von <i>PbANKA</i> -infizierten Tieren werden durch die zeitgleiche <i>Mtb</i> -Infektion nicht beeinflusst .....	48
3.1.5	Die Sequestrierung von Parasiten und antigenspezifischen CD8 <sup>+</sup> T-Zellen im Gehirn von <i>PbANKA</i> -infizierten Mäusen erfolgt ungeachtet der zeitgleichen <i>Mtb</i> -Infektion .....	51
3.2	Eine Episode der nicht letalen <i>Py</i> -Infektion verschlechtert vorübergehend den Verlauf einer experimentellen Tb-Infektion .....	54
3.2.1	Unveränderter Verlauf einer <i>Py</i> -Infektion in naiven und <i>Mtb</i> -infizierten Mäusen .....	54
3.2.2	Eine <i>Py</i> -Infektion verstärkt die Lungenpathologie in <i>Mtb</i> -infizierten Mäusen .	55
3.2.3	Die <i>Py</i> -Koinfektion verstärkt die Zytokinantworten in der Lunge <i>Mtb</i> -infizierter Mäuse .....	57
3.2.4	Die zelluläre Immunantwort in koinfizierten Mäusen ist nicht beeinträchtigt .	59
3.2.5	Die Induktion von CD11c <sup>+</sup> Zellen durch die <i>Py</i> -Koinfektion.....	63
3.2.6	CD11c <sup>+</sup> Zellen – eine Nische für <i>Mtb</i> ?.....	65

3.2.7	Die durch <i>Py</i> induzierten immunologischen Veränderungen in koinfizierten Mäusen sind nur vorübergehend.....	70
4	Diskussion.....	74
4.1	EZM.....	75
4.1.1	Eine <i>Mtb</i> -Infektion schützt nicht vor einer <i>PbANKA</i> -induzierten EZM.....	76
4.1.2	Die <i>PbANKA</i> -induzierte Immunantwort ist in <i>Mtb</i> -infizierten Tieren unverändert.....	77
4.1.3	Unveränderte Sequestrierung von iRBZ im Gehirn koinfizierter Mäuse.....	79
4.1.4	Kein Unterschied in der kDZ-Population in der Milz und der CD8 <sup>+</sup> T-Zell-Antwort im Gehirn koinfizierter Tiere.....	80
4.2	Der Verlauf der experimentellen Tb ist durch eine <i>Py</i> -Koinfektion übergangsweise verschlechtert.....	82
4.2.1	NO als wichtiger Abwehrmechanismus trotz Erhöhung von IL-10 nicht beeinträchtigt.....	82
4.2.2	Neutrophile Granulozyten und NK-Zellen tragen nicht zur verstärkten Infiltration in koinfizierte Lungen bei.....	83
4.2.3	Die Rekrutierung einer CD11c <sup>int</sup> Population in die Lungen koinfizierter Mäuse – eine Nische für <i>Mtb</i> ?.....	84
4.2.4	DZ könnten zur Ausbreitung von <i>Mtb</i> beitragen.....	89
4.2.5	Fördert Hz die Entzündung und die Einwanderung von Immunzellen?.....	89
4.2.6	Die Langzeitfolgen der Koinfektion mit <i>Py</i> .....	91
4.2.7	Hypothese.....	92
4.3	Ausblick.....	93
	Literaturverzeichnis.....	95
	Abbildungsverzeichnis.....	123
	Tabellenverzeichnis.....	123
	Anhang.....	124
	Lebenslauf.....	134
	Publikationen und Kongressbeiträge.....	136
	Danksagung.....	137
	Erklärung.....	138

## Abkürzungsverzeichnis

-/-	defizient
°C	Grad Celsius
αCD	anti CD
A. dest	<i>Aqua destillata</i> (destilliertes Wasser)
Abb.	Abbildung
AF	Alexa Fluor
APC	Allophycocyanin
APZ	antigenpräsentierende Zellen
BCG	<i>Bacille Calmette Guerin</i>
BNITM	Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin
BSA	Rinderserumalbumin
BSL	Biologisches Sicherheitslabor
BV	Brillant Violett
CBA	<i>cytometric bead array</i>
CCL	CC-Motiv-Chemokin-Ligand
CCR	CC-Motiv-Chemokin-Rezeptor
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	komplementäre DNA
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl ester
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CXCL	CXC-Motiv-Chemokin-Ligand
CXCR	CXC-Motiv-Chemokin-Rezeptor
Cy	Cyanin
DC-SIGN	<i>dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin</i>
d.h.	das heißt
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DZ	dendritische Zellen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
EZM	experimentelle zerebrale Malaria
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FCS	fötale Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FSC	<i>Forward Scatter</i>
Flt	<i>Fms-related tyrosine kinase</i>
FZB	Forschungszentrum Borstel
g	Gramm
<i>g</i>	<i>gravity</i>
G	Gauge
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
h	Stunde ( <i>hour</i> )
H&E	Hämatoxylin und Eosin

---

H <sub>2</sub> O	Wasser
hi	hoch
HO	Hämoxygenase
HIV	Humanes Immundefizienz –Virus
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl Transferase
Hz	Hämozoïn
ICAM	<i>intercellular adhesion molecule</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IGRA	<i>interferon-γ release assay</i>
IL	Interleukin
iNKT-Zellen	invariante Natürliche Killer T-Zellen
iNOS	induzierbare Nitritoxid-Synthase
int	intermediär
i.p.	intraperitoneal
IP-10	<i>IFNγ-inducible protein-10</i>
iRBZ	infizierte rote Blutzellen
IRF	<i>interferon regulatory factor</i>
i.v.	intravenös
IVC	einzelbelüftete Käfige ( <i>Individually Ventilated Cages</i> )
KBE	Kolonien bildende Einheiten
KC	<i>Keratinocyte chemoattractant</i>
kDZ	konventionelle DZ
KMDZ	Knochenmarks-DZ
l	Liter
log <sub>10</sub>	dekadischer Logarithmus
LT	Lymphotoxin
LTBI	latente Tuberkuloseinfektion
μ	mikro-
m	milli-
M	Molar
M.	<i>Mycobacterium</i>
MA-ARDS	Malaria-assoziiertes akutes respiratorisches Distress-Syndrom
MACS	<i>magnetic activated cell sorting</i>
MCP	<i>monocyte chemoattractant protein</i>
MeOH	Methanol
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex ( <i>Major Histocompatibility Complex</i> )
Mig	<i>monokine-induced by IFNγ</i>
min	Minute
MIP	<i>macrophage inflammatory protein</i>
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
mRNA	Boten ( <i>messenger</i> ) RNA
<i>Mtb</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MyD88	<i>myeloid differentiation primary response gene 88</i>
n	nano-
NETs	<i>neutrophil extracellular traps</i>

---

NF-κB	<i>Nuclear factor kappa-light chain-enhancer of activated B-cells</i>
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NO	Stickoxid
OVA	Ovalbumin
<i>P.</i>	<i>Plasmodium</i>
PAMP	<i>pathogen associated molecular pattern</i>
<i>Pb</i>	<i>Plasmodium berghei</i>
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll
PFA	Paraformaldehyd
PM	Peritonealmakrophagen
Poly-IC	<i>Polyinosinic polycytidylic acid</i>
PRR	<i>pathogen recognition receptor</i>
<i>Py</i>	<i>Plasmodium yoelii</i>
qRT-PCR	quantitative <i>Real-Time</i> -Polymerasekettenreaktion
RBZ	rote Blutzellen
RNA	Ribonukleinsäure
RNI	reaktive Stickstoffintermediate
ROI	reaktive Sauerstoffintermediate
rpm	<i>rounds per minute</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
SSC	<i>Sideward Scatter</i>
SD	Standardabweichung
sek	Sekunde
SPF	spezifisch pathogenfrei
Tb	Tuberkulose
TDM	Trehalosedimycolat
Tg	transgen
TGF	<i>transforming growth factor</i>
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
Th	T-Helfer
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TZR	T-Zell-Rezeptor
U	<i>Unit</i>
v/v	Volumen/Volumen ( <i>volume per volume</i> )
w/o	ohne ( <i>without</i> )
w/v	Gewicht/Volumen ( <i>weight per volume</i> )
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
ZM	zerebrale Malaria
ZTL	zytotoxische T-Lymphozyten

## Zusammenfassung

Das menschliche Immunsystem ist nur selten einem einzigen Krankheitserreger ausgesetzt. Jedoch wird die Interaktion von Wirt und Pathogenen überwiegend isoliert, d.h. in einer ein Wirt – ein Pathogen-Beziehung studiert. Dabei wird die Immunmodulation, wie sie im Rahmen einer Infektion mit mehreren Erregern auftreten kann, und deren Folgen auf die jeweilige Wirt-Pathogen-Beziehung nicht erfasst.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Koinfektion von *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) und *Plasmodium*-Parasiten in experimentellen Mausmodellen studiert. Diese Arbeit konzentrierte sich auf zwei übergeordnete Fragestellungen, wobei zum einen studiert wurde, wie sich eine zu Grunde liegende chronische Tuberkulose (Tb) auf eine *Plasmodium berghei* ANKA (*PbANKA*)-induzierte experimentelle zerebrale Malaria (EZM) auswirkt. Dabei wurde festgestellt, dass sich der Verlauf einer *PbANKA*-Infektion in naiven oder *Mtb*-infizierten Tieren nicht unterschied, unabhängig von der Anzahl applizierter infizierter roter Blutzellen (iRBZ) oder dem Zeitpunkt der Koinfektion. Die untersuchten *PbANKA*-induzierten Immunantworten blieben trotz unterschiedlicher immunologischer Vorprägung in *Mtb*-infizierten und naiven Tieren unverändert. Somit wurde die *PbANKA*-induzierte EZM durch eine *Mtb*-Infektion nicht beeinflusst.

Zum anderen wurde der Frage nachgegangen, inwiefern eine Malariainfektion die Kontrolle einer experimentellen Tb beeinträchtigen kann. Es stellte sich heraus, dass eine Episode einer *Plasmodium yoelii* (*Py*)-Infektion während einer chronischen experimentellen Tb zu einer signifikant erhöhten mykobakteriellen Keimlast in Lunge, Milz und Leber in koinfizierten Tieren führte, wohingegen der Verlauf der Malaria selbst unverändert blieb. Die *Py*-Koinfektion war mit einer erhöhten Einwanderung von Immunzellen und einem Anstieg der entzündlichen Immunantwort in der Lunge assoziiert. Hierbei führte die *Py*-Koinfektion vor allem zu einer Anreicherung von CD11c<sup>+</sup> Zellen in Milz und Lunge koinfizierter Tiere. Dabei begünstigten CD11c<sup>+</sup> Zellen aus *Py*-infizierten, aber nicht aus naiven Mäusen das Wachstum von *Mtb ex vivo*, was Anlass zu der Vermutung gibt, dass durch eine *Py*-Koinfektion eine für *Mtb* permissive Wirtszelle induziert wird. Die *Py*-bedingte Zunahme einer entzündlichen Immunantwort in der Lunge koinfizierter Tiere war nur von vorübergehender Natur und konnte 150 Tage später nicht mehr beobachtet werden.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass eine Malariainfektion die im Rahmen einer *Mtb*-Infektion induzierten Immunantworten moduliert. Dabei war der Krankheitsverlauf der experimentellen Tb direkt nach dem Abklingen einer akuten *Py*-Infektion verschlechtert. Im Gegensatz dazu wurden weder die *PbANKA*- noch die *Py*-Infektion in *Mtb*-infizierten Tieren verändert. Die vorliegenden Daten legen nahe, dass die Permissivität von Wirtszellen im Rahmen einer Malaria-Koinfektion erhöht wird, die die Suszeptibilität gegenüber einer *Mtb*-Infektion erhöht.

# 1 Einleitung

## 1.1 Tuberkulose

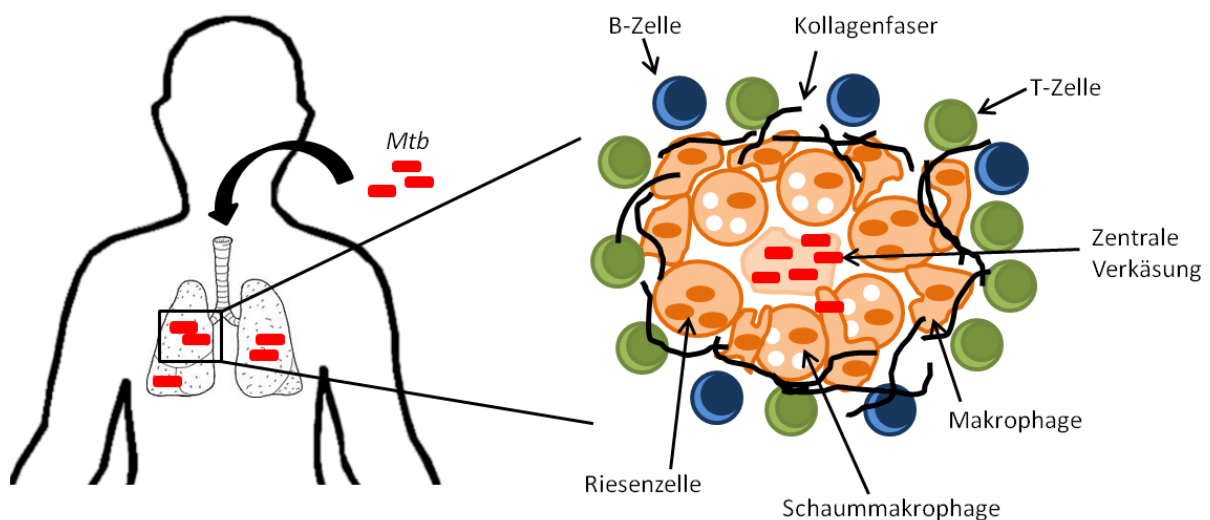
*Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) wurde erstmals 1882 von Robert Koch als Verursacher der Tuberkulose (Tb) beschrieben und zählt heute zur weltweit vorherrschenden bakteriellen Infektionskrankheit im Menschen (Cambau and Drancourt, 2014). Laut Weltgesundheitsorganisation (WHO) wurde 2014 von über 9,6 Millionen neuen Tb-Fällen berichtet, über 1,5 Millionen Menschen starben. Damit ist die Tb die häufigste Todesursache durch eine Infektion mit nur einem Erreger (WHO, 2015a). *Mtb* ist ein pathogenes aerobes, immobiles und nicht sporulierendes Stäbchen, das säureresistent ist und durch die Ziehl-Neelsen-Färbung von anderen Bakterien unterschieden werden kann. Mykobakterien können aufgrund ihrer säurebeständigen Zellwand, deren Eigenschaften vor allem durch die Bestandteile Arabinogalaktan und Mykolsäuren bestimmt wird, weder als gram-positiv noch als gram-negativ klassifiziert werden (Brennan, 2003). Auch die geringe Multiplikationsrate von *Mtb* (20-24 h) kann auf die stabile, lipidreiche Zellwand zurückgeführt werden, da nur wenige Nährstoffe aufgenommen werden können und die Zellwandsynthese sehr aufwendig ist (Hett and Rubin, 2008).

### 1.1.1 Epidemiologie

Nach Schätzungen beruhend auf dem Tuberkulin-Hauttest ist jeder Dritte mit *Mtb* infiziert, jedoch variiert die Verbreitung der Erkrankung weltweit sehr. Die höchste Rate kann in Subsahara-Afrika, Indien, China und den südöstlichen Inseln Asiens beobachtet werden (WHO, 2015a). Die WHO klassifizierte 2014 22 hoch belastete Länder, die über 81 % der Tb-Fälle ausmachen. Die Tb ist besonders in strukturschwachen Ländern sehr stark verbreitet. Armut, schlechte und beengte Lebensverhältnisse, Unter- bzw. Mangelernährung, unzureichende hygienische Verhältnisse und medizinische Unterversorgung sind ein idealer Nährboden für Tb (Dheda *et al.*, 2015). Insbesondere wurde die Ausbreitung von Tb durch den Anstieg von Humanen Immundefizienz-Virus (HIV)-Infektionen, die das Immunsystem schwächen, massiv gefördert (Beck, 2005; Pawlowski *et al.*, 2012). Die meisten Tb-Neuerkrankungen finden sich in Zentral- und Südostasien, Süd- und Mittelfrika sowie Russland und in den Kaukasusstaaten (WHO, 2015a). Die weltweit zunehmende Mobilität und Verstädterung sowie die steigende Lebenserwartung lassen Tb auch in der westlichen Welt zu einem wachsenden Problem werden. Unzureichende oder inadäquate Therapie sowie die Zuwanderung aus Hochrisikogebieten bedingen die Zunahme resistenter Tb – eine Gefahr, die sich nicht nur auf Entwicklungsländer beschränkt (Gomez and McKinney, 2004; Migliori, 2007).

### 1.1.2 Infektionsverlauf

Die Pathogenese und der Verlauf nach einer Infektion mit *Mtb* hängen vor allem von der Anzahl und der Virulenz der Erreger und der individuellen Abwehrlage ab. Man geht davon aus, dass das Bakterium bei einigen Menschen direkt nach dem Eintreten vom Immunsystem des Wirts bekämpft und eliminiert wird. Welche Mechanismen dazu beitragen und wie häufig dies tatsächlich geschieht, ist allerdings größtenteils noch unbekannt. Etwa 5-10 % der Infizierten entwickeln eine aktive, behandlungsbedürftige Tb, die innerhalb der ersten 1-3 Jahre nach Infektion ausbricht. Diese Menschen sind weder in der Lage, die initiale Infektion zu kontrollieren noch eine schützende Immunantwort auszubilden (Flynn and Chan, 2001a). Die große Mehrheit der Infizierten entwickelt jedoch eine klinisch latente Infektion. Das bedeutet, dass eine Infektion zwar vorliegt und diese auch mittels Hauttest nachgewiesen werden kann, die Infizierten aber weder klinische Symptome zeigen noch für andere ansteckend sind. Während dieser Phase persistieren die Bakterien, ohne dass das Immunsystem sie eliminieren kann oder es zu einem weiteren Anstieg der Keimlast kommt (Tufariello *et al.*, 2003). Dieses Gleichgewicht hält häufig ein Leben lang, doch schätzungsweise 5-10 % der latent infizierten Menschen erleiden eine Reaktivierung und damit eine sogenannte Postprimärtuberkulose (Flynn and Chan, 2001a).



**Abb. 1: Infektion und Granulombildung in der Tb.** Der Infektionszyklus startet durch die Aufnahme von infektiösen, *Mtb*-tragenden Tröpfchen. Die Mykobakterien werden von Alveolarmakrophagen aufgenommen, die eine pro-entzündliche Immunantwort auslösen, die wiederum verschiedene Immunzellen anlockt. Die Makrophagen der Läsion differenzieren zu Schaummakrophagen, epitheloiden Makrophagen und Riesenzellen. Die Bildung eines Kollagenrings grenzt die Entzündung ein. Zusätzlich rekrutierte Zellen des adaptiven Immunsystems verhindern die Ausbreitung der Infektion. Kommt es zu einer Reaktivierung des Bakterienwachstums, nekrotisiert und verkäst das Innere des Granuloms.

Obwohl sich der Erreger über das Blut oder das lymphatische System überall im Körper verteilen kann, stellt die Lunge nicht nur die Haupteintrittspforte dar sondern auch den Ort, an dem sich bei mehr als 90 % aller Patienten die Krankheit manifestiert (Flynn *et al.*, 2011). Die Übertragung der Bakterien findet über infektiöse Tröpfchen statt, die von Individuen, die

an aktiver Lungentuberkulose leiden, durch Husten oder Niesen abgegeben werden (Ernst, 2012). Gelangen die Bakterien über die Luftwege in den neuen Wirt, werden sie von Alveolarmakrophagen phagozytiert, die sie über verschiedene bakterizide Mechanismen zu töten versuchen (Russell, 2007). Dazu gehört unter anderem auch die Generierung von reaktiven Stickstoff-Intermediaten (RNI) und reaktiven Sauerstoff-Intermediaten (ROI; Flynn and Chan, 2001a). Die Beseitigungseffizienz hängt von den pathogenen Eigenschaften der aufgenommenen Mykobakterien, den intrinsischen mikrobiziden Möglichkeiten der Alveolarmakrophagen und dem entzündlichen Mikroumfeld an der Infektionsstelle ab (Zuñiga *et al.*, 2012). Überlebende Bakterien vermehren sich innerhalb der Makrophagen und induzieren eine lokale pro-entzündliche Immunantwort, die zur Rekrutierung verschiedenster Zelltypen wie Monozyten, neutrophilen Granulozyten und dendritischen Zellen (DZ) aus den benachbarten Blutgefäßen führt (Ulrichs and Kaufmann, 2006; Russell, 2007). Um die Ausbreitung der Mykobakterien einzudämmen, werden diese in sogenannten Granulomen eingeschlossen. Bei den Granulomen, einem besonderen pathologischen Merkmal der Tb, handelt es sich anfänglich um eine Ansammlung aus Makrophagen, Monozyten und neutrophilen Granulozyten. Die Makrophagen differenzieren in verschiedene spezialisierte Zelltypen wie mehrkernige Riesenzellen (*giant cells*), Schaumzellen (*foamy macrophages*) und epitheloide Makrophagen. Außerdem findet eine umfangreiche Neubildung von Blutgefäßen in der Infektionsstelle statt (Silva Miranda *et al.*, 2012). Im Laufe der Immunantwort und mit Eintreffen von Lymphozyten bildet das Granulom eine organisierte, geschichtete Struktur aus, die von fibrillären Bestandteilen der extrazellulären Matrix umschlossen wird (Ulrichs *et al.*, 2004; Ramakrishnan, 2012). Somit wird ein Schutzwall gegen die Verbreitung der Mykobakterien in Lunge und andere Organe geformt (Jordao and Vieira, 2011). Viele dieser Granulome bestehen in einem ausbalancierten Zustand, in dessen Zentrum die Bakterien latent existieren können (Saunders, B.; Cooper, 2000). Schreitet die Krankheit jedoch fort, nimmt die Vaskularisierung ab und das Zentrum nekrotisiert und verkäst. Kommt es zu einer Verflüssigung und dem Aufbrechen dieser Granulome, können die Bakterien in die Bronchien gelangen und der nun ansteckende Wirt die Erreger über Aushusten weitergeben (Russell *et al.*, 2010). Weniger als 10 % der infizierten Menschen entwickeln letztendlich die klinische Erkrankung, doch bricht sie aus und bleibt unbehandelt, verläuft sie zu 50 % tödlich. Der Ausbruch der Erkrankung erfolgt wegen der langsamen Progression der Infektion meist erst spät und findet vor allem in immuninkompetenten Individuen wie Neugeborenen, alten Menschen und HIV-Infizierten statt (Kaufmann, 2001).

### 1.1.3 Immunologie

Die meisten Menschen entwickeln nach der Infektion mit *Mtb* eine scheinbar angemessene Immunantwort, welche aber trotzdem nicht ausreicht, um die Bakterien vollständig zu eliminieren. Stattdessen entwickelt sich eine klinisch unauffällige, latente Erkrankung, während der das Immunsystem die sich im ruhenden Zustand befindlichen Bakterien

kontrolliert. Ändert sich der Immunstatus des Wirts, können die Bakterien reaktiviert werden (Bold and Ernst, 2009; Ernst, 2012).

Alveolarmakrophagen, welche die ersten natürlichen Wirtszellen von *Mtb* darstellen, weisen ohne zusätzliche Aktivierungsstimuli durch CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen nur eine geringe intrinsische Kapazität auf, das Wachstum der Mykobakterien zu reduzieren (Sharma and Bose, 2001). Nach Bindung an verschiedenste Oberflächenrezeptoren wie den Skavenger-, Komplement- oder Mannoserezeptor (Ernst, 1998; Kleinnijenhuis *et al.*, 2011) wird *Mtb* von den Makrophagen in ein Phagosom aufgenommen. Normalerweise verschmilzt das Phagosom mit einem Lysosom zum Phagolysosom, in welchem Pathogene durch intralysosomale Hydrolasen degradiert werden können (Cohn, 1963). *Mtb* ist jedoch imstande, die Phagosomenreifung zu verhindern, um so das eigene Überleben im Makrophagen zu sichern (Armstrong and Hart, 1971; McDonough *et al.*, 1993; Cohn, 1963). Außerdem erkennen Makrophagen konservierte Pathogen-assoziierte molekulare Strukturen (*pathogen associated molecular patterns*; PAMPs) über Toll-like Rezeptoren (TLRs; Tsolaki, 2009). Dadurch werden Signalwege über Adapterproteine wie *myeloid differentiation primary response gene 88* (MyD88) aktiviert, die zur Translokation des Transkriptionsfaktors *Nuclear factor kappa-light chain-enhancer of activated B-cells* (NF- $\kappa$ B) in den Zellkern führen. Im infizierten Makrophagen wird daraufhin die Expression pro-entzündlicher Zytokine induziert (Kawai and Akira, 2011; McNab *et al.*, 2015; Harding and Boom, 2010). Speziell die Produktion des Zytokins Interleukin-(IL)-12 ist in der Tb-Infektion essentiell, damit DZ reifen und in die Lymphknoten wandern (Khader *et al.*, 2006). Zu Beginn der entzündlichen Immunantwort gegen eine *Mtb*-Infektion nehmen DZ Mykobakterien auf und präsentieren mykobakterielle Antigene auf ihrer Oberfläche. In den Lymphknoten primen DZ über die Expression von Oberflächenmolekülen wie *major histocompatibility complex*-(Haupthistokompatibilitätskomplex; MHC)-II und kostimulatorischen Molekülen sowie der Ausschüttung von immunregulatorischen Zytokinen wie IL-12 naive T-Zellen. So erfolgt eine Polarisierung der T-Helfer (Th)0- zu Th1-Zellen (Banchereau *et al.*, 2000; Pompei *et al.*, 2007; Wolf *et al.*, 2007). Th1-Zellen produzieren daraufhin Zytokine wie IL-2 und Interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), wobei letzteres wiederum Makrophagen aktiviert. Diese können daraufhin Mykobakterien über bakterizide Effektormechanismen wie die Bildung von ROI und RNI abtöten und schütten Zytokine wie IL-8, IL-6 und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) aus (Sharma and Bose, 2001). TNF $\alpha$  unterstützt neben der weiteren Makrophagenaktivierung auch die Granulombildung. Durch die TNF $\alpha$ -abhängige Stimulation des Endothels werden vaskuläre Adhäsionsmoleküle exprimiert, die die Rekrutierung von weiteren Immunzellen zum Infektionsherd induzieren (Semenzato *et al.*, 2000). Eine Neutralisation von TNF $\alpha$  führt im Mausmodell zu einer Reaktivierung des mykobakteriellen Wachstums, verstärkte entzündliche Reaktionen in den Granulomen in der Lunge und verfrühte Sterblichkeit (Flynn, 1995; Mohan *et al.*, 2001). Neben seiner schützenden Wirkung kann TNF $\alpha$  allerdings auch zur Immunpathologie beitragen. Eine Überproduktion an TNF $\alpha$  führt zu schweren Entzündungsreaktionen in Lunge und Milz und einem verfrühten Tode infizierter Mäuse (Bekker *et al.*, 2000).

Obwohl CD4<sup>+</sup> T-Zellen die wichtigste T-Zell-Population in der Immunantwort gegen eine *Mtb*-Infektion darstellen, können weitere T-Zell-Subpopulationen wie zytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Zellen (ZTL),  $\gamma\delta$  T-Zellen und  $\alpha\beta$  T-Zellen mykobakterielle Peptide bzw. Lipide und Glykolipide erkennen. Dadurch werden diese zur Produktion von IFN $\gamma$  angeregt, was wiederum die Aktivierung von Makrophagen unterstützt (Sharma and Bose, 2001). *Mtb*-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen können darüber hinaus infizierte Zellen erkennen und über ihre zytotoxischen Eigenschaften abtöten (Woodworth and Behar, 2006).

Die chronische Natur der mykobakteriellen Infektion führt zu einer permanenten Aktivierung des Immunsystems, um die Kontrolle über die *Mtb*-Vermehrung zu erhalten. Gleichzeitig müssen immunpathologische Effekte für den Wirt verhindert bzw. begrenzt werden. IL-10 scheint dabei eine wichtige Bedeutung zuzukommen. Es moduliert unter anderem die Aktivität von Makrophagen, sodass diese weniger IL-12, TNF $\alpha$  und NO ausschütten (Torrado and Cooper, 2013; Malefy et al., 1999). Zudem soll IL-10 die Expression von Chemokinen, die die T-Zellen zum Entzündungsherd rekrutieren, inhibieren (Redford et al., 2010) und eine starke T-Zell-Aktivierung unterbinden (Torrado and Cooper, 2013). Die Überexpression von IL-10 im Mausmodell führt im Verlauf der Infektion zu einer gesteigerten *Mtb*-Keimzahl und zu einer erhöhten Sterblichkeit, wohingegen IL-10<sup>-/-</sup> Mäuse ein ähnliches *Mtb*-Wachstum wie die Kontrolltiere aufweisen (North, 1998; Roach et al., 2001).

#### 1.1.4 Mausmodell der Tb

Obwohl kein natürliches Reservoir für *Mtb* in der Tierwelt existiert, können dennoch viele Tiere die Erkrankung entwickeln und dienen somit der Untersuchung der zu Grunde liegenden Pathomechanismen (Dharmadhikari and Nardell, 2008).

Die Maus spielt bis heute als experimentelles Modell eine zentrale Rolle, denn sowohl in der Maus als auch im Menschen manifestiert sich die Infektion mit *Mtb* nach einer natürlichen Tröpfcheninfektion hauptsächlich in der Lunge (North and Jung, 2004). Doch hinsichtlich des Infektionsverlaufs unterscheidet sich die experimentelle Tb von der humanen Form. In den ersten drei Wochen nach einer Niedrigdosisinfektion von Mäusen wachsen die Mykobakterien exponentiell, bis sie ein Plateau bei etwa 10<sup>6</sup> Organismen in der Lunge erreichen. Zu diesem Zeitpunkt setzt die adaptive Immunantwort ein, welche die Bakterienanzahl durch die Einwanderung von zuvor im Lymphknoten aktivierten T-Zellen kontrolliert und über Monate stabil hält (Lazarevic et al., 2005). Die Infektion verbleibt in einem persistierenden Zustand, in dem die Mykobakterien in den Makrophagen in einen metabolischen Ruhezustand verfallen (Muñoz-Elías et al., 2005; Rees and Hart, 1961). Eine Schwächung der Wirtsimmunantwort in dieser chronischen Phase kann zu einer schnellen Reaktivierung und einer plötzlich ausbrechenden Tb führen (Flynn and Chan, 2001a). Damit weisen Mäuse keine echte Latenz auf, wie sie im Menschen zu beobachten ist, da die Bakterienlast in dieser stationären Phase permanent sehr hoch ist (Chao and Rubin, 2010; North and Jung, 2004; Pierce et al., 1953). Mäuse sind also im Vergleich zum Menschen relativ resistent gegen Tb, da sie eine große Anzahl an Mykobakterien in der Lunge und

anderen Organen tolerieren, ohne offensichtliche Krankheitssymptome zu zeigen (Dharmadhikari and Nardell, 2008). Gleichzeitig sind Mäuse susceptibler als Menschen, da am Ende eine langsame, aber progressive Bakterienvermehrung zu einer immunvermittelten Zerstörung des Lungengewebes führt, die letztlich nach 250-350 Tagen bei allen Mäusen tödlich endet (Dharmadhikari and Nardell, 2008; Medina and North, 1996). Bei Menschen erkranken hingegen nur 10 % an einer aktiven Tb (Kaufmann, 2001).

Neben den unterschiedlichen bakteriellen Keimlasten finden sich erhebliche Unterschiede in der Lungenpathologie zwischen der murinen und humanen Tb. Die Läsionen, die sich als Antwort auf die *Mtb*-Infektion in der Mauslunge bilden, zeigen deutliche Unterschiede sowohl in der zellulären Zusammensetzung als auch in ihrer Organisation im Vergleich zum Granulom des Menschen. Letzteres zeichnet sich durch eine deutlich begrenzte Struktur aus, in der ein äußerer Bereich aus Lymphozyten einen inneren Bereich aus Makrophagen umgibt (Abb. 1). In der Maus bildet sich eine Ansammlung von Makrophagen und Lymphozyten, die keine klar abgegrenzte Struktur darstellen und nicht die klassische Organisation einnehmen, wie sie im Menschen zu beobachten ist (Hernandez Pando *et al.*, 2010). Granulome im Menschen werden häufig nekrotisch, charakteristisch mit einer zentralen Verkäsung. Sie können fibrotisch werden, kalzifizieren oder sich zu einem Hohlraum entwickeln. Im Gegensatz dazu werden die Granulome in Mauslungen nicht nekrotisch, bevor die Bakterienanzahl extrem ansteigt. Eine Verkäsung oder Hohlraumbildung konnte bislang nicht beobachtet werden (Flynn, 2006).

Neben den beschriebenen Unterschieden konnten aber auch viele Gemeinsamkeiten im Krankheitsverlauf zwischen muriner und humaner Tb nachgewiesen werden, die die Verwendung der Maus als Modellorganismus rechtfertigen. Wie auch im Menschen betrifft die Tb in der Maus vorrangig die Lunge (North and Jung, 2004). Trotz der unterschiedlich hohen mykobakteriellen Keimlasten in der Lunge kann das Immunsystem der Maus die hohe Keimzahl über einen langen Zeitraum kontrollieren. Daher repräsentiert das Modell das immunologische Gleichgewicht zwischen Wirt und Bakterium. Die persistierende Infektion wurde von vielen Gruppen als Modell für latente Tb verwendet (Tufariello *et al.*, 2003). Auch der Einfluss von Risikofaktoren auf das immunologische Gleichgewicht kann in diesem Modell untersucht werden. Darüber hinaus stimmt die murine Immunantwort in vielen Aspekten mit der im Menschen überein. Während der angeborenen Immunantwort erkennen Makrophagen der Maus mykobakterielle Antigene über TLRs und PRRs auf ihrer Zelloberfläche, um so eine für die Immunantwort essentielle Zytokinantwort einzuleiten (Ito *et al.*, 2007; Means *et al.*, 1999; Sandor and Buc, 2005). Außerdem zeigen Mäuse wie auch Menschen eine T-Zell-unabhängige IFN $\gamma$ -Produktion durch natürliche Killer (NK)-Zellen. Darüber hinaus wird angenommen, dass Tb-infizierte Menschen ebenso wie Mäuse eine Th1-Antwort gegen *Mtb* entwickeln können. CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen können aus Blut und Lunge von Tb-Patienten isoliert werden, die *in vitro* spezifisch auf *Mtb*-Antigene mit Proliferation und der Produktion von Th1-Zytokinen antworten, so wie es auch bei T-Zellen aus Mauslungen zu beobachten ist (Arend *et al.*, 2000; Lai *et al.*, 2014; Lalvani *et al.*, 2001; Sharma and Bose, 2001; Ulrichs *et al.*, 2000). Ebenso zeigen IL-12 und TNF $\alpha$  in beiden Spezies

eine protektive Rolle (Cooper *et al.*, 2007; Deveci *et al.*, 2005; Engele *et al.*, 2002; Flynn *et al.*, 1995).

### 1.1.5 Risikofaktoren für die Tb

Das Problem von chronischen oder latenten Erkrankungen wie der Tb besteht darin, dass der Infizierte die persistente Infektion über Jahre oder Jahrzehnte kontrollieren muss. Schätzungsweise 1/3 der Weltbevölkerung ist latenter Träger von *Mtb* und unterliegt einem lebenslangen Risiko der Reaktivierung, gewöhnlich als Folge der Schwächung des Immunsystems. Verschiedene Risikofaktoren wie Rauchen, Unterernährung, immunsupprimierende Therapien aber auch Komorbiditäten wie Diabetes werden mit einer aktiven Tb in Verbindung gebracht (Bates *et al.*, 2015; Koul *et al.*, 2011). Der wohl bekannteste Risikofaktor für Tb heutzutage ist die Koinfektion mit HIV. Von den 9,6 Millionen Tb-Fällen in 2015 waren 1,2 Millionen ebenfalls mit HIV infiziert (12,5 %). Von den 1,5 Millionen Tb-Toten waren 400.000 HIV-positiv (ca. 27 %; WHO, 2015a). Die Schwächung des Immunsystems durch HIV hat die Verbreitung der Tb in einigen Ländern massiv gefördert. Allerdings stellen vor allem in Gebieten mit einem hohen Vorkommen verschiedenster Infektionskrankheiten auch andere Koinfektionen einen potentiellen Risikofaktor dar. So sind latente Tb-Patienten in vielen Gebieten Afrikas, Asiens oder Südamerikas permanent Infektionen mit Parasiten oder anderen Bakterien ausgesetzt, die das Immunsystem in seiner Funktion beeinträchtigen oder modulieren können.

Eine ubiquitär auftretende parasitäre Infektion ist die Helmintheninfektion. Schätzungsweise eine Milliarde Menschen sind mit Helminthen infiziert und häufig findet sich die Infektion in Tb-hochendemischen Gebieten (Hotez *et al.*, 2008). Die Wurminfektionen führen selten zum Tod, etablieren allerdings eine chronische Infektion. Diese induziert eine Th2-lastige und regulatorische Immunantwort im Wirt. Die helmintheninduzierte Immunsuppression prädisponiert den Wirt für die Infektion mit anderen Pathogenen (Actor *et al.*, 1993; Helmbj *et al.*, 1998; Rodriguez *et al.*, 1999). In aktiver und latenter Tb ist die Helminthen-Koinfektion mit einer reduzierten Th1-Antwort assoziiert (Babu *et al.*, 2009a, 2009b; Elias *et al.*, 2006; Resende Co *et al.*, 2007). Auch in experimentellen Studien konnte nachgewiesen werden, dass eine zeitgleiche Wurminfektion einen Risikofaktor für eine experimentelle Tb darstellt (Monin *et al.*, 2015; Potian *et al.*, 2011).

Eine andere wichtige parasitäre Infektionskrankheit, die in vielen Gebieten koendemisch mit der Tb vorkommt, ist die Malaria. Die Bedeutung der Malaria für die Gesundheit geht weit über die unmittelbar durch die Infektion hervorgerufene Morbidität und Mortalität hinaus. Aufgrund einer ausgeprägten Immunmodulation sind Infizierte offenbar anfälliger für bakterielle oder virale Sekundärinfektionen wie z.B. Salmonellen und Epstein-Barr-Virus (Correa *et al.*, 1980; Cunnington and Riley, 2010a; Greenwood *et al.*, 1972; Takem *et al.*, 2014; Troye-Blomberg and Berzins, 2008; Walther *et al.*, 2012, 2005; Warren and Weidanz, 1976; Whittle *et al.*, 1990). In den nachfolgenden Kapiteln werden die Erkrankung sowie die Interaktion des Parasiten mit dem Immunsystem des Wirts beschrieben.

## 1.2 Malaria

Die Malaria, auch Sumpffieber oder Wechselfieber genannt, ist eine weltweit verbreitete Parasitenerkrankung, die von Einzellern der Gattung *Plasmodium* übertragen wird. Die Plasmodien gehören wahrscheinlich zu den ältesten Parasiten, die den Menschen und seine Vorfahren befallen haben. Die ersten Berichte über das Wechselfieber aus dem alten Ägypten und China datieren auf mehr als 1500 Jahre vor unserer Zeitrechnung zurück (Sallares *et al.*, 2012; Cox, 2002; Cox, 2010). Die Malaria war früher auch auf dem europäischen Kontinent verbreitet. In Italien beispielsweise wurden Menschen besonders oft krank, wenn sie in der Nähe von Sümpfen oder anderen stehenden Gewässern wohnten, wo es aufgrund aufsteigender Dämpfe aus dem Boden stank. Deshalb dachten dort lebende Menschen, dass die Krankheitsursache die „schlechte Luft“ wäre (Reiter, 2000). Entsprechend leitet sich der Name „Malaria“ aus dem Italienischen ab und bedeutet „schlechte Luft“ (*male* = schlecht, *aria* = Luft). Die eigentliche Entdeckung von *Plasmodium*-Parasiten im Blut erfolgte durch den französischen Militärarzt Charles Louis Alphonse Laveran im Jahr 1880 während eines Algerieneinsatzes. Einige Jahre später beschrieb der britische Militärarzt Ronald Ross die Theorie, dass die Verbreitung über Anophelesmücken erfolgte, und ebnete damit den Weg zu einer gezielten Malariabekämpfung (Hempelmann and Krafts, 2013; Cox, 2002).

### 1.2.1 Epidemiologie

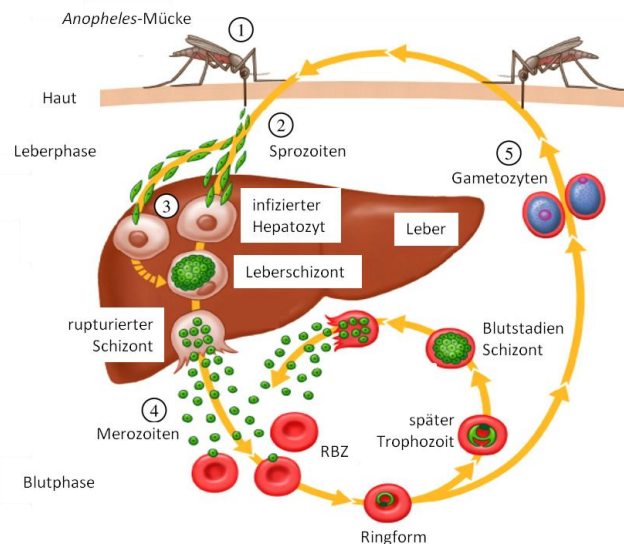
Die Verbreitung der Malaria betrifft hauptsächlich die ärmlichen tropischen und subtropischen Zonen der Welt. Über 80 % derer, die an Malaria sterben, leben in Afrika (WHO, 2015b). Weitere betroffene Regionen sind einige Länder in Südamerika und Südasien sowie zu einem geringeren Ausmaß im Mittleren Osten und Teilen Europas. In 2015 erkrankten 214 Millionen Menschen in 90 Ländern, von denen schätzungsweise 438.000 die Infektion nicht überlebten (WHO, 2015b). 40 % der Weltbevölkerung leben in malariaendemischen Gebieten. Damit repräsentiert Malaria aufgrund der hohen Mortalität und Morbidität neben HIV und Tb eine der tödlichsten und weitverbreitetsten Infektionskrankheiten (Stevenson and Riley, 2004). In den tropischen und subtropischen Teilen Afrikas existieren diverse Faktoren, die das Risiko für Malaria erhöhen. So bieten die klimatischen Verhältnisse ideale Überlebensbedingungen für die Anophelesmücke, dem Überträger der *Plasmodium*-Parasiten. Das warme und feuchte Klima ermöglicht zudem vielerorts eine ganzjährige Übertragung. Die höchste Übertragungsrate findet daher südlich der Sahara und in Teilen Ozeaniens statt, wohingegen sie in kühleren Regionen saisonal beschränkt ist. Der dort vorrangige Parasit ist *P. vivax*, da er geringere Umgebungstemperaturen im Vergleich zu anderen Spezies besser tolerieren kann. Weitere Ausnahmen bilden große Höhenlagen und Wüstenregionen (CDC, 2016). Schlechte sozio-ökonomische Bedingungen, in denen die Durchsetzung von Malariapräventionen in geringerem Maß erfolgt, sind ein weiterer Risikofaktor für eine Infektion (De Silva and

Marshall, 2012). Obwohl es auch in Europa ideale Lebensbedingungen für die Anophelesmücke gibt, haben die ökonomische Entwicklung und das verbesserte Gesundheitswesen zu einer Eliminierung der Malaria geführt.

### 1.2.2 Infektionsverlauf

Die Übertragung der Krankheit an Vertebraten (Nager, Affen, Menschen) erfolgt über den Biss einer weiblichen Anophelesmücke, die mit Parasiten des Geschlechts *Plasmodium* infiziert ist (Beier *et al.*, 1992). Innerhalb von einigen Minuten erreichen die applizierten Sporozoiten über den Blutkreislauf die Leber (Sturm and Heussler, 2007). Dort durchqueren die Sporozoiten die sinusoidale Zellschicht über Kupfferzellen und passieren weiterhin aktiv mehrere Hepatozyten, bevor sie ihre Zielzelle infizieren (Frevort *et al.*, 2005; Baer *et al.*, 2007). In dieser entwickeln sie sich zu einer Gewebsform (Trophozoit), bevor sie sich durch multiple Kernteilungen vermehren, vergrößern und zu Schizonten im Leberstadium differenzieren (Mota and Rodriguez, 2004). Danach werden die reifen Schizonten über membranabgeschnürte Merosomen freigesetzt, die die infektiösen Merozoiten enthalten. Die Merosomen werden über das Blut Richtung Lungenmikrovaskulatur transportiert, wo sie am Ende platzen und tausende pathogene Merozoiten in den Blutkreislauf entlassen, die in Erythrozyten eindringen und das Blutstadium der Infektion einläuten (Baer *et al.*, 2007b; Hafalla *et al.*, 2011).

Das Blutstadium ist die klinisch auffällige Phase, wohingegen die Leberphase unauffällig verläuft. Nach der aktiven Invasion der Erythrozyten durchlaufen die Merozoiten eine asexuelle Reproduktion und entwickeln sich in junge Trophozoiten, sogenannte Ringstadien. Durch weitere Entwicklung und Wachstum bilden sich Schizonten mit 8 bis 32 Kernen, die nach dem Platzen der Erythrozyten als Merozoiten freigesetzt werden, die wiederum einen neuen erythrozytären Infektionszyklus starten (Hafalla *et al.*, 2011; Stevenson and Riley, 2004). Jeder Invasions- und Replikationszyklus dauert zwischen 24 und 72 Stunden, abhängig von der Art der *Plasmodium*-Spezies. Nach mehreren Wochen der erythrozytären Schizogonie entstehen die ersten Mikro- und Makrogamonten (männliche und weibliche Formen), welche die infektiösen Stadien für den Endwirt, die Anophelesmücke, darstellen und somit den Lebenszyklus in der Mücke nach einer Blutmahlzeit fortsetzen. Im Patienten wird die akute Infektion normalerweise kontrolliert und führt zur Etablierung einer chronischen Infektion mit einer geringen Parasitämie. Die auftretenden unregelmäßigen Fieberschüben sind auf einen Anstieg der Parasitämie zurückzuführen (Langhorne *et al.*, 2008).



**Abb. 2: Lebenszyklus der Malaria-Parasiten.** Die Sporozoiten (2) werden über die Anophelesmücke (1) übertragen. Nach Erreichen der Leber infizieren sie Hepatozyten und entwickeln sich zu Leberschizonten (3). Diese rupturieren und setzen Merozoiten frei (4), die wiederum rote Blutzellen (RBZ) infizieren. In diesen entwickeln sie sich über Ringformen zu Trophozoiten und Blutstadienschizonten und werden letzten Endes als Merozoiten freigesetzt, die einen neuen Infektionszyklus starten können (Abbildung modifiziert nach Hill, 2011).

Menschen, die noch nie in Kontakt mit *Plasmodium* gekommen sind, entwickeln nach der ersten Malariainfektion meist eine fiebrige Erkrankung, die zu schwerwiegenden Komplikationen und in einigen Fällen auch zum Tod führen kann. In malariaendemischen Gebieten sind besonders kleine Kinder von schweren Verläufen betroffen und schätzungsweise ein Viertel der Kindestode sind auf eine Malariainfektion zurückzuführen (Snow *et al.*, 2001). Weitere Risikogruppen sind Schwangere, HIV-Infizierte sowie nicht-immune Migranten und Reisende (WHO, 2015b). Ältere Kinder sowie Erwachsene aus endemischen Gegenden sind durch die sich langsam entwickelnde Semi-Immunität durch kontinuierliche Malaria-Reinfektionen gegenüber schweren Krankheitsverläufen und Tod weitestgehend resistent. Eine sterile Immunität durch natürliche Infektionen wird trotzdem nie erreicht (Gupta *et al.*, 1999; Langhorne *et al.*, 2008; Marsh and Kinyanjui, 2006).

### 1.2.3 Immunologie

Die in den ersten Stunden nach einer Malariainfektion ausgeschütteten Zytokine entscheiden über den weiteren Verlauf der Infektion und die Ausprägung der Erkrankung (Choudhury *et al.*, 2000; de Souza *et al.*, 1997). In einer *Plasmodium*-Infektion kann in die Immunantwort gegen die Leberphase von der gegen die Blutphase unterschieden werden. Durch die Infektion mit lebenden Sporozoiten wird eine schwache zelluläre und entzündliche Immunantwort in der Leber induziert. Chakravarty und Kollegen konnten zeigen, dass naive  $CD8^+$  T-Zellen bereits in den drainierenden Lymphknoten der Haut durch Kreuzpräsentation von prozessierten Sporozoiten-Antigenen durch DZ aktiviert werden (Overstreet *et al.*, 2008;

Chakravarty *et al.*, 2007). Diese aktivierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen wandern in die Leber ein und eliminieren die dort infizierten Hepatozyten durch die Freisetzung von Perforin und Granzym (Chakravarty *et al.*, 2007). Die Leber ist zwar ein tolerogenes Organ, beinhaltet aber kompetente antigenpräsentierende Zellen (APZ) wie Kupffer-Zellen und Hepatozyten, die antigenspezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen aktivieren können (Bertolino and Bowen, 2015; Klein and Crispe, 2006). Zusätzlich können auch NK- und CD4<sup>+</sup> T-Zellen zur IFN $\gamma$ -Produktion angeregt werden, was durch eine Kaskade von Immunreaktionen zum Abtöten intrazellulärer Parasiten führt (Malaguarnera and Musumeci, 2002).

Die erythrozytäre Phase wird durch Merozoiten gestartet, die die Leberphase überlebt haben und im Blut rote Blutzellen (RBZ) infizieren. Erythrozyten können weder parasitäre Antigene prozessieren noch besitzen sie MHC-Moleküle, sodass infizierte RBZ (iRBZ) nicht direkt von spezifischen CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Effektorzellen erkannt und bekämpft werden können. Deshalb muss die spezifische Immunantwort über APZ initiiert werden (Langhorne *et al.*, 2002). Die Erkennung von iRBZ oder freien *Plasmodium*-Bestandteilen nach Erythrozytenlyse erfolgt über Erkennungsrezeptoren wie TLRs oder Skavenger-Rezeptoren auf Phagozyten (Baruch *et al.*, 1996). Die Bindung führt über den MyD88-Pfad zu einer beträchtlichen Sezernierung pro-entzündlicher Zytokine (TNF $\alpha$ , IL-1, IFN $\gamma$ ), die die charakteristischen Malariasymptome wie Fieber auslösen (Miller *et al.*, 1994). Allerdings ist die Bedeutung der TLRs als *pattern recognition receptor* (PRRs) in der Pathogenese der Malaria nicht unumstritten, da die Defizienz von TLR2/4/9 in *Plasmodium berghei* ANKA (*PbANKA*)-infizierten Mäusen nicht zu signifikanten Veränderungen im Erscheinungsbild der zerebralen Malaria (ZM; Kapitel 1.2.5) führt (Lepeniev *et al.*, 2008).

Nach dem Erkennen von Parasitenliganden reifen DZ und wandern in die Milz, die den primären Ort der Immunantwort gegen die Blutphase darstellt (Engwerda *et al.*, 2005; Del Portillo *et al.*, 2012). Im Zuge ihrer Reifung schütten DZ IL-12 aus, wodurch wiederum NK-Zellen aktiviert und zur Produktion von IFN $\gamma$  angeregt werden (Trinchieri, 1993). Einige Studien zeigen allerdings, dass die Reifung und Zytokinausschüttung von DZ durch eine Malariainfektion moduliert werden kann, sodass die Immunantwort reduziert wird (Ocaña-Morgner *et al.*, 2008; Urban *et al.*, 1999). Das von den NK-Zellen produzierte IFN $\gamma$  zusammen mit dem von DZ ausgeschütteten IL-12 induziert die Differenzierung von CD4<sup>+</sup> Th0- zu Th1-Zellen (Trinchieri, 1993). Th1 Zellen produzieren IL-2, das zum einen auf die T-Zellen selber wirkt und sie zur Proliferation anregt und zum anderen weiterhin für die Aktivierung von NK-Zellen sorgt. Diese aktivieren über IFN $\gamma$ -Produktion DZ und Makrophagen und verstärken somit die adaptive Immunantwort (Stevenson and Riley, 2004; Lundie, 2011). Aktivierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen dienen weiterhin als Helferzellen für B-Zellen, sodass hochaffine spezifische IgG-Antikörper und ein B-Zell-Gedächtnis gebildet werden können (Plebanski and Hill, 2000). Außerdem sorgen sie wie NK-Zellen durch die Freisetzung von entzündlichen Zytokinen wie IFN $\gamma$  für die Aktivierung von Makrophagen und anderen Immunzellen, sodass diese TNF $\alpha$ , NO und ROI zum Kampf gegen die Parasiten produzieren können (Constant and Bottomly, 1997).

Im Laufe der Infektion entwickelt sich die CD4<sup>+</sup> T-Zell-Antwort in Richtung einer Th2-Antwort, was mit einem veränderten Zytokinprofil einhergeht. Die anti-entzündliche Immunantwort ist hauptsächlich IL-10 und TGF- $\beta$  dominiert. Sie soll immunpathologische Folgen verhindern, die durch eine anhaltende Th1-Antwort induziert werden (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 2003). Der richtige Zeitpunkt, zu dem die anti-entzündliche Immunantwort einsetzt, ist dabei entscheidend. Eine frühe Ausschüttung (innerhalb der ersten 24 h der Infektion) von TGF- $\beta$  unterdrückt vollständig die pro-entzündliche Immunantwort und führt somit zu einem unkontrollierten Parasitenwachstum und frühen Tod durch Anämie (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 2003). Ebenso führt eine frühe IL-10-Sekretion in Mäusen zu einer verspäteten IFN $\gamma$ - und TNF $\alpha$ -Antwort. Parasiten können nicht eliminiert werden und die Tiere weisen eine hohe Mortalität auf (Kobayashi *et al.*, 1996). Im Gegensatz dazu führt das Ausschalten des IL-10-Gens zu einer unkontrollierten pro-entzündlichen Immunantwort in *P. chabaudi*-infizierten Mäusen, was eine verstärkte Pathologie und ein verfrühtes Ableben zur Konsequenz hat (Freitas do Rosario and Langhorne, 2012).

Die Modulation des Immunsystems wie kompromittierte Funktionen von DZ und regulatorische Immunmechanismen wie die IL-10-Produktion beeinflusst nicht nur die Malariainfektion selber, sondern kann sich auch auf sekundär erworbene Infektionen auswirken. In einer Studie in Kenya wurde gezeigt, dass *P. falciparum*-infizierte Kinder eine hohe Anfälligkeit für eine Bakteriämie aufweisen (Scott *et al.*, 2011). Takem *et al.* werteten verschiedene Studien zur zeitgleichen Malaria- und nicht-typhoider Salmonelleninfektion (NTS-Infektion) aus. Auch sie kamen zu dem Ergebnis, dass ein Zusammenhang zwischen Malaria-assoziiierter Immunsuppression und erhöhter NTS-Bakteriämie besteht (Takem *et al.*, 2014). Neben bakteriellen Infektionen kann durch eine *P. falciparum*-Infektion der Krankheitsverlauf einer viralen Infektion wie Epstein-Barr-Virus ebenfalls beeinträchtigt werden (Whittle *et al.*, 1990). Neben humanen Studien untermauern experimentelle Studien den Einfluss einer Malariainfektion auf zeitgleiche Infektionskrankheiten wie Salmonellen und Borrelien (Lokken *et al.*, 2014; Lundqvist *et al.*, 2010; Mooney *et al.*, 2014). Neben der erhöhten Anfälligkeit für Sekundärinfektionen wird die Malaria-assoziierte Immunmodulation mit einer reduzierten Impfeffizienz in Verbindung gebracht (Cunnington and Riley, 2010a; Greenwood *et al.*, 1972; Mooney *et al.*, 2015; Walther *et al.*, 2012). Die immunmodulierenden Eigenschaften werden nicht nur von virulenten *Plasmodium*-Stämmen ausgeübt, sondern auch asymptomatische oder milde Malariaformen können das Immunsystem modulieren.

#### **1.2.4 Die Aufgaben der Milz in der Malariainfektion**

Die Milz übernimmt verschiedene Funktionen von der Einleitung einer adaptiven Immunantwort über Wiederverwertungsprozesse von Eisen und selektiver Zerstörung von beschädigten oder alternden Erythrozyten bis hin zum Abtöten von Pathogenen wie *Plasmodium* (del Portillo *et al.*, 2012). Die Infektion mit Malariaparasiten führt zu dramatischen, wenn auch reversiblen, Veränderungen in der Milz, die hauptsächlich durch

eine Splenomegalie charakterisiert sind. In endemischen Gebieten wird die Milzgröße für die Bestimmung der Intensität der Malariatransmission zur Hilfe genommen (Chaves *et al.*, 2011). Die Splenomegalie wird durch eine umfangreiche lokale Hämatopoese, die normalerweise im Knochenmark stattfindet, verursacht. Um der Blutstadieninfektion Herr zu werden, wird insbesondere eine hohe Zahl an myeloiden Zellen zur Beseitigung der iRBZ benötigt (Belyaev *et al.*, 2013). Die Myelopoese in der Milz kann dabei das 60fache des gesunden Zustands betragen (Lamb *et al.*, 2006; Villeval *et al.*, 1990).

Um der Eliminierung in der Milz während der Blutstadieninfektion zu entgehen, modulieren die Parasiten die Wirtsantwort. Untersuchungen an Patienten, die einer Splenektomie unterzogen wurden, lieferten entscheidende Erkenntnisse über die zentrale Rolle der Milz beim Abbau von Malariaparasiten. Die Patienten, denen die Milz operativ entfernt wurde, konnten während einer akuten *P. falciparum*-Infektion schlechter iRBZ aus der Zirkulation entfernen (Chotivanich *et al.*, 2002). Weiterhin zeigten splenektomierte Patienten im Vergleich zu Patienten mit einer funktionierenden Milz trotz Behandlung mit verschiedenen Antimalariamedikamenten eine verzögerte Eliminierung von iRBZ (Demar *et al.*, 2004; Bach *et al.*, 2005; Bachmann *et al.*, 2009; Chotivanich *et al.*, 2002). Experimente in Mäusen konnten diese Beobachtung unterstützen. Eine Splenektomie verschlimmerte die Infektion mit dem nicht letalen *Py*-Stamm, was sich in einer höheren maximalen Parasitämie und einer verlängerten Blutparasitämie äußerte (Weiss, 1991; Sayles, Peter *et al.*, 1993).

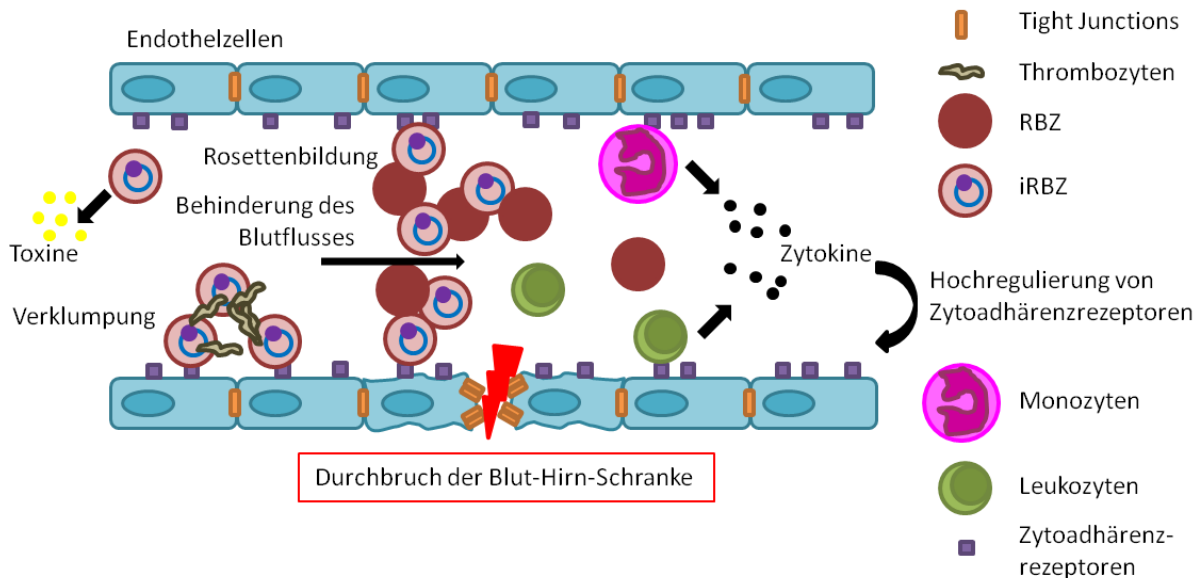
In der roten Pulpa der Milz sitzen Makrophagen, die eine hohe Phagozytoserate aufweisen und iRBZ effizient aufnehmen (Yadava *et al.*, 1996). Dabei ist es auch möglich, dass die Parasiten selektiv aus den iRBZ entfernt und intakte RBZ wieder in die Zirkulation zurückgeführt werden (Chotivanich *et al.*, 2002; Angus *et al.*, 1997). Weiterhin sitzen in der Milz verschiedene DZ-Populationen, die nach der Antigenaufnahme und Reifung in die T-Zell-Regionen einwandern und für die Initiierung einer parasitenspezifischen T-Zell-Antwort von Bedeutung sind (Engwerda *et al.*, 2005). Parasitenspezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen produzieren daraufhin IFN $\gamma$  (Sponaas *et al.*, 2006; Lundie *et al.*, 2010), welches neben den in Kapitel 1.2.3 beschriebenen Effekten eine kleine Population atypischer Vorläuferzellen im Knochenmark induziert, die sich unter anderem zu entzündlichen Monozyten entwickeln können. Diese wandern in die Milz, wo sie iRBZ phagozytieren und zur Kontrolle der akuten Parasitämie beitragen (Sponaas *et al.*, 2009; Belyaev *et al.*, 2013).

Die Erkenntnisse zur Immunantwort in der Milz stammen hauptsächlich aus Untersuchungen im Mausmodell, da Biopsien während einer akuten Malariainfektion aus Patienten aus ethischen Gründen nicht durchgeführt werden dürfen. In *post mortem* Untersuchungen von Kindern, die einer tödlichen *P. falciparum*-Infektion erlagen, konnten immunhistochemische Analysen eine deutliche Auflösung der Milzstruktur nachweisen. Diese ging einher mit einem Verlust der marginalen Zonen, Verlust von B-Zellen und unklaren T-Zell-Zonen, ähnlich den Beobachtungen aus dem Nagetiermodell (del Portillo *et al.*, 2012; Urban *et al.*, 2005).

### 1.2.5 Zerebrale Malaria

Von den *Plasmodium*-Stämmen, die Menschen infizieren, löst die Infektion mit *P. falciparum* die schwerste Form der Erkrankung, Malaria Tropica, aus. Die zerebrale Malaria (ZM) ist dabei die schwerste Komplikation, die während einer Infektion mit *P. falciparum* auftreten kann. Hierbei handelt es sich um eine neurologische Erkrankung, die durch eine schnelle Entwicklung von Kopfschmerzen zu Krampfanfällen und Koma charakterisiert ist. Dabei sind von der ZM hauptsächlich Kinder in Sub-Sahara Afrika betroffen (Doolan *et al.*, 2009; Allan *et al.*, 1995; Milner *et al.*, 2014). Ebenfalls anfällig für die Entwicklung einer ZM sind Menschen mit einer nicht vorhandenen Immunität wie z.B. Reisende aus malariafreien Regionen (WHO, 2015b). Die Mechanismen, die zur Ausbildung einer ZM führen, sind bisher noch nicht vollständig geklärt. Humane Studien liegen nur limitiert vor, da die zerebrale Pathologie erst *post mortem* untersucht werden kann. Autopsien offenbaren aber eine Gehirnschwellung, punktförmige Einblutungen und eine dichte Ansammlung von iRBZ in Mikrogefäßen im Gehirn (Shikani *et al.*, 2012; Milner *et al.*, 2014; Medana and Turner, 2006). Eine pro-entzündliche Immunantwort spielt eine entscheidende Rolle in der Kontrolle der Malariainfektion im Blutstadium, ist jedoch auch an der Ausprägung der Pathologie während der ZM beteiligt (Shikani *et al.*, 2012). Deswegen muss eine ausgewogene pro- und anti-entzündliche Immunantwort induziert werden, um die Parasiten zu beseitigen, aber gleichzeitig die Pathologie zu verhindern. Die Infektion von C57BL/6 Mäusen mit *PbANKA* ist das am weitesten verbreitete Modell, mit dem die Mechanismen der ZM untersucht werden (Langhorne *et al.*, 2011; Stevenson *et al.*, 2010). Hierbei entwickeln die Mäuse eine experimentelle ZM (EZM), die viele Gemeinsamkeiten mit der humanen Krankheitsform aufweist. Auch im Mausmodell sind die exakten Hintergründe zur Ausbildung der EZM bislang nur unvollständig geklärt. Es wird aber eine Kombination aus der Sequestrierung von iRBZ im Gehirn und einer starken entzündlichen Immunreaktion vermutet (Palomo *et al.*, 2013; Villegas-Mendez *et al.*, 2012; Yañez *et al.*, 1996). Bei dieser Immunreaktion sind sowohl lösliche Komponenten wie die Zytokine IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  und Lymphotoxin- $\alpha$  (LT $\alpha$ ), als auch zelluläre Komponenten des Immunsystems wie CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen involviert (Belnoue *et al.*, 2002; Engwerda *et al.*, 2002; Rénia *et al.*, 2006; King and Lamb, 2015). CD4<sup>+</sup> T-Zellen sind speziell in der Anfangsphase der EZM wichtig. Sie produzieren IFN $\gamma$ , das zum einen zur Eliminierung von iRBZ und zum anderen über Endothelaktivierung zur Akkumulation von parasitenspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Gehirn führt (Perez-Mazliah and Langhorne, 2015; Villegas-Mendez *et al.*, 2012). Antigen-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen werden während der *PbANKA*-Infektion in der Milz aktiviert und migrieren kurz vor Einsetzen der neurologischen Symptome ins Gehirn. Dort werden sie von IFN $\gamma$ -aktivierten Endothelzellen aktiviert, welche Parasitenbestandteile phagozytieren und (kruz)präsentieren können (Howland *et al.*, 2015; Poh *et al.*, 2014). Die Antigene werden von ZTL erkannt, die durch die Ausschüttung von Perforin und Granzym B direkt an der Beschädigung der Blut-Hirn-Schranke und somit der Pathologie der EZM beteiligt sind (Haque *et al.*, 2011; Nitcheu *et al.*, 2003). Dass die pathologischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus der Milz stammen, konnte durch

Splenektomien in Mäusen verdeutlicht werden, da diese Mäuse vor EZM geschützt waren (Curfs *et al.*, 1989; Hermsen *et al.*, 1998).



**Abb. 3: Der Durchbruch der Blut-Hirn-Schranke während der ZM.** Die reifen Formen der iRBZ (Schizonten und Trophozoiten), Leukozyten und Thrombozyten adhären an zerebrale Endothelzellen. Die Zytoadhärenz zusammen mit Rosettenbildung, Verklumpung und reduzierter Verformbarkeit von iRBZ verursacht einen veränderten Blutfluss, der zu einer verschlechterten Gewebsperfusion und Hypoxie führt. Weiterhin bilden sequestrierte iRBZ Toxine, die zur Rekrutierung von Leukozyten und Thrombozyten führt, die wiederum pro-entzündliche Zytokine (IL-1, IL-6, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  und LT $\alpha$ ) sowie NO bilden. Diese Mediatoren sorgen für eine Aktivierung der Endothelzellen und Apoptose sowie den Durchbruch der Blut-Hirn-Schranke und Auflösung der Tight Junctions, sodass neuropathologische Ereignisse eintreten, die zu zerebralen Ödemen und Koma führen.

### 1.2.6 Mausmodelle der Malariainfektion

Eine Malariainfektion zeigt sich in heterogenen Krankheitsbildern, für deren Darstellung verschiedene Maus-Erreger-Kombinationen zur Verfügung stehen. Alle Modelle helfen, die Grundlagen der Interaktionen zwischen dem Wirt und dem *Plasmodium*-Parasiten zu charakterisieren (Langhorne *et al.*, 2002). Derzeit gibt es für das experimentelle Mausmodell vier *Plasmodium*-Spezies, die alle aus wilden Baumratten Zentral-Afrikas isoliert und Mitte des 20. Jahrhunderts das erste Mal beschrieben wurden. Diese sind *P. berghei*, *P. vinckei*, *P. yoelii* (*Py*) und *P. chabaudi* und dienen zur Untersuchung verschiedener Ausprägungen der experimentellen Malaria (Langhorne *et al.*, 2002).

Die Infektion von C57BL/6 Mäusen mit *PbANKA* ist das allgemein akzeptierte Modell für die experimentelle Untersuchung der ZM (siehe 1.2.5; Langhorne *et al.*, 2011; Stevenson *et al.*, 2010; White *et al.*, 2010). Dabei entwickeln die Mäuse 6-8 Tage nach der Infektion neurologische Symptome wie Lähmungen, Muskelatrophien, Ataxien und Koma, was schlussendlich zum Tod führt (Engwerda *et al.*, 2002; Nie *et al.*, 2009). Die Ursache für die Entwicklung der EZM wird auf die Sequestrierung von *PbANKA*-iRBZ, ZTL und die lokale Ausschüttung von IFN $\gamma$  zurückgeführt (Villegas-Mendez *et al.*, 2012; Yañez *et al.*, 1996). Verglichen mit der humanen Situation unterscheidet sich das Mausmodell vor allem durch

die geringere Anzahl an im Gehirn sequestrierten iRBZ, sowie die an der Pathologie beteiligten Zytokine und Chemokine, deren Relevanz in der humanen ZM derzeit noch diskutiert wird (Langhorne *et al.*, 2011). Eine Infektion mit dem nah verwandten Nagetierstamm *P. berghei* NK65 (*PbNK65*) dient als Modell für das Malaria-assoziierte akute respiratorische Distress-Syndrom (MA-ARDS), welches durch pulmonale Entzündung, Ödeme und Einblutungen charakterisiert ist und eine schwere Komplikation der Malaria vor allem in Erwachsenen darstellt (Mohan *et al.*, 2008; Mueller *et al.*, 2012; Van den Steen *et al.*, 2010). Außerdem induziert *PbNK65* eine immunvermittelte Leberschädigung (Adachi *et al.*, 2001). Ein gemeinsames Merkmal von muriner und humaner Malaria ist die Ausbildung einer Anämie (Langhorne *et al.*, 2002). Die Gründe der Anämie sind wahrscheinlich eine ineffiziente Erythropoese und eine Hämolyse, hervorgerufen durch die direkte Lyse von iRBZ durch die Parasiten, eine autoimmune RBZ-Zerstörung und eine Entfernung der iRBZ in der Milz (Miller *et al.*, 1989; Price *et al.*, 2001). In der selbstlimitierenden Infektion mit dem nicht tödlichen *Py*-Stamm entwickeln die infizierten Mäuse eine hohe Parasitämie von bis zu 50 % und werden daraus folgend anämisch. Das Modell wird verwendet, um protektive Immunmechanismen zu analysieren, da infizierte Tiere selbstständig in der Lage sind, die Infektion ohne Langzeitfolgen zu beseitigen und ein immunologisches Gedächtnis zu entwickeln (Bousema *et al.*, 2014). *P. chabaudi* hingegen ist der einzige Stamm, der eine chronische Infektion induziert, welche durch wiederkehrende Parasitämien charakterisiert ist (Wykes and Good, 2008; Stevenson and Riley, 2004).

### 1.3 Koinfektionen

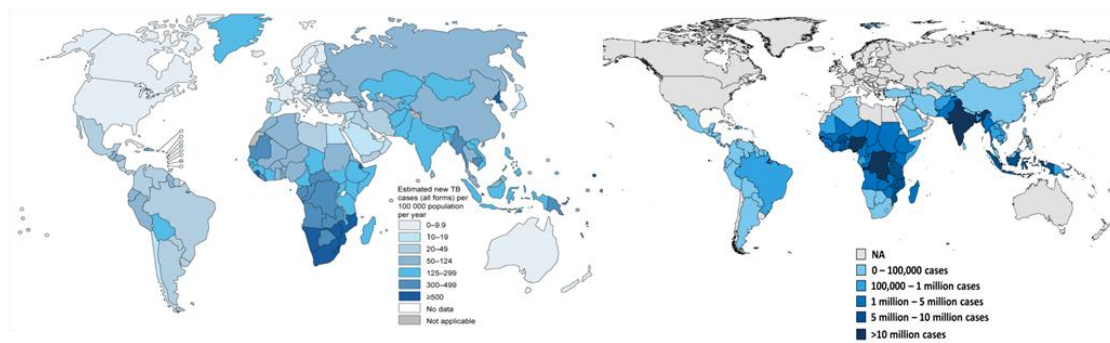
Eine Koinfektion ist die gleichzeitige Infektion eines Organismus mit zwei oder mehreren unterschiedlichen Krankheitserregern oder unterschiedlichen Stämmen desselben Erregers. Koinfektionen können sich auf den Krankheitsverlauf und die Immunantwort auswirken und letztendlich den Behandlungs- und Vakzinierungserfolg gegen die einzelnen Infektionen beeinflussen. Die meisten wissenschaftlichen und medizinischen Untersuchungen von bedeutenden Infektionen betrachten die verursachenden Erreger isoliert. Der Immunstatus des infizierten Wirtes ist jedoch selten ein unbeschriebenes Blatt. Die menschlichen Wirte sind andauernd in Kontakt mit der Umwelt und setzen sich somit konstant einem Infektionsrisiko aus. Daher ist es wahrscheinlich, dass viele Individuen kombinierte Infektionen erfahren (Pasman, 2012). Nicht nur die durch den Erreger ausgelöste Krankheit sondern auch dessen Einfluss auf das Immunsystem kann sich auf die Immunantwort gegen andere Keime auswirken. Dabei können sich persistierende Infektionen theoretisch positiv oder negativ auf eine nachfolgende Infektion auswirken. (Barton *et al.*, 2007; Xiang *et al.*, 2001). So vermindert eine zu Grunde liegende Hepatitis G Virus-Infektion die HIV-Replikation und führt dadurch zu einer 4fach reduzierten Sterberate (Xiang *et al.*, 2001). Jedoch zeigt der Großteil epidemiologischer Studien, dass chronische Infektionen eher einen negativen Einfluss auf die Immunantwort des Wirts haben und damit die Anfälligkeit für Sekundärinfektionen erhöhen.

Dies trifft besonders auf Menschen in Entwicklungsländern zu, denn diese leiden vielfach an subklinischen chronischen Infektionen. Es ist daher von großer Bedeutung, den Einfluss solcher Infektionen auf weitere, neu aufgenommene Pathogene/Antigene zu untersuchen. Eine zeitgleiche chronische Infektion kann sich bereits auf die anfängliche Aufnahme weiterer Pathogene oder Impfstoffe über die Schleimhaut auswirken. Bei einer Helmintheninfektion wird die Integrität der Kolonepithelschicht beeinträchtigt und so die Permeabilität erhöht, was das Eindringen anderer Pathogene begünstigen könnte (Su *et al.*, 2011). Zusätzlich können chronische Infektionen dazu führen, dass die erregereigene Zielzelle als Vermehrungsort für andere Pathogene dient. Die durch eine chronische Entzündung angelockten Immunzellen können beispielsweise Reservoirs für andere Keime bilden. Die Reaktivierung von Herpes-Simplex-Viren in mukosalen Geweben führt zu einer Ansammlung von CC-Motiv-Chemokin-Rezeptor-(CCR)5-exprimierenden CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die die Transmission von HIV erleichtern (Zhu *et al.*, 2009).

Chronische Infektionen können zudem die Ausbildung angemessener T- und B-Zell-Antworten verhindern. Die infolgedessen veränderte Zytokinproduktion und Antikörperantwort sowie reduzierte zytotoxische Eigenschaften können weitere Infektionen begünstigen. Eine chronische Helmintheninfektion führt zur Entwicklung einer Th2- und regulatorischen Immunantwort (van Riet *et al.*, 2007). Die Th2-Antwort reduziert schützende Th1-Mechanismen und verändert die Isotypen von Antikörpern, die für den Schutz oder eine effektive Impfung gegen Krankheitserreger wie *Plasmodium*, *Mtb* oder Hepatitis C Virus benötigt werden (Babu *et al.*, 2009b; Farid *et al.*, 2005; Metenou *et al.*, 2012; Su *et al.*, 2005). HIV ist eines der bekanntesten Beispiele, wie eine zu Grunde liegende Infektion die Betroffenen anfällig für Sekundärinfektionen macht. Die Infizierten sterben letzten Endes an opportunistischen, akuten Infektionen, die sich nur durchsetzen können, da durch das Virus eine übermächtige Immunsuppression induziert wird. Durch die Ausbreitung der HIV-Infektion hat unter anderem die Tb einen Anstieg in der globalen Infektionsrate erfahren (Unaided and Who, 2009). Schätzungsweise ein Drittel der weltweit 33 Millionen HIV-Infizierten sind latent mit Tb infiziert. Deren geschwächter Immunstatus birgt das Risiko einer Reaktivierung der Tb. Die Ursache der Reaktivierung der Tb durch eine HIV-Infektion liegt größtenteils an der HIV-induzierten Verminderung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die ein wichtiger Bestandteil der Immunantwort gegen Tb sind (Kapitel 1.1.3; Pawlowski *et al.*, 2012).

### **1.3.1 Tb-Malaria Koinfektion**

Obwohl es viele Untersuchungen zu den Koinfektionen HIV-Tb und HIV-Malaria gibt, wurde der Koinfektion zwischen Tb und Malaria bislang nur wenig Beachtung geschenkt. Dabei sind beide Infektionskrankheiten in weiten Teilen der Welt koendemisch (Abb. 4) und gehören dort zu den Hauptgründen für Krankenhauseinweisungen und Sterblichkeit von Krankenhauspatienten (Dgedge *et al.*, 2001; Hongoro and McPake, 2003).



**Abb. 4: Geographische Verteilung der Infektionskrankheiten Tb (links) und Malaria (rechts).**

Plasmodien und Mykobakterien existieren schon sehr lange und haben sich parallel in der menschlichen Population entwickelt. Der Nachweis dafür konnte in 2000-3000 Jahre alten Mumien geliefert werden, in denen DNA-Fragmente sowohl von *Mtb* als auch *P. falciparum* nachgewiesen werden konnten (Lalremruata *et al.*, 2013). Erste Hinweise der Neuzeit auf eine Koinfektion konnten bereits im 19. Jahrhundert durch *post mortem* Untersuchungen auf der Inselgruppe der Andamanen erbracht werden. Dort wurde über einen Zeitraum von etwa 50 Jahren die Todesursache von dorthin versetzten Sträflingen untersucht und dokumentiert. Dabei ergab sich eine Assoziation zwischen einer hohen Malariainzidenz und einer hohen Sterblichkeit. Die Malaria selbst war allerdings nur in 11 % der Fälle todesursächlich, zeigte aber darüber hinaus eine starke Korrelation mit der Sterblichkeit durch andere Infektionskrankheiten. Die stärkste Korrelation konnte dabei zwischen Malariavorkommen und der Sterberate aufgrund einer Tb-Infektion gefunden werden (Shanks *et al.*, 2008). Dies deutete darauf hin, dass eine Malariainfektion die Sterberate indirekt erhöhte. Epidemiologische Studien aus der jüngeren Vergangenheit bestärken ebenfalls den Zusammenhang zwischen Tb- und Malariainfektionen. Adebajo *et al.* zeigten 1994 in einer Studie in Nigeria, dass bei Tb-Patienten im Vergleich zu gesunden Studienteilnehmern zu einem größeren Anteil ein positiver Malarianachweis erbracht werden konnte (Adebajo *et al.*, 1994). In einer retrospektiven Analyse von 2007 in Luanda (Angola) wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen den Tb-Fällen und einer Koinfektion mit HIV und/oder Malaria bestand. Dabei wurde festgestellt, dass 37,5 % der Tuberkulosepatienten zeitgleich mit Malaria infiziert waren (Valadas *et al.*, 2013). Weiterhin wurde durch eine unabhängige Studie aus Guinea-Bissau deutlich, dass die Prävention von Malaria in Tb-Patienten zu einer verringerten Mortalität beiträgt. Colombatti *et al.* beobachteten, dass die Sterberate von Tb-Patienten 2004 speziell in der Regensaison, in der die Malariainfektionsrate steigt, auf ihrem Höchststand war. Deshalb wurde ein Interventionsprogramm gegen Malariainfektionen über drei Jahre in dem nationalen Referenzkrankenhaus „Hospital Raoul Follereau“, das die schweren Tb-Fälle aus der gesamten Region behandelt, eingeführt. Dieses beinhaltete, Insektizid-versetzte Bettnetze zu verwenden, die Umgebung zu desinfizieren und die Patienten prophylaktisch mit Malariamedikamenten zu behandeln. Dadurch konnte die Mortalität von Tb-Patienten in der Regensaison signifikant reduziert werden, wohingegen die Sterberate in der Trockenzeit

konstant blieb (Colombatti *et al.*, 2011). Diese Daten veranschaulichen deutlich, dass eine Malaria-Koinfektion für Tb-Patienten ein besonderes Risiko darstellt. Die Modulation des Immunsystems beeinflusst nicht nur den Krankheitsverlauf, sondern kann auch eine Diagnose mittels Immundiagnostik erschweren. Studien zeigten, dass eine gleichzeitige Malariainfektion zu einem nicht eindeutigen IGRA-Ergebnis (*interferon- $\gamma$  release assay*) führen kann (Banfield *et al.*, 2012). Dieser *in vitro* Test basiert auf der IFN $\gamma$ -Ausschüttung durch *Mtb*-spezifische T-Zellen als Antwort auf *Mtb*-Antigene. Er dient damit der Diagnose von latenter (LTBI) sowie akuter Tb.

Auch experimentelle Koinfektionsstudien in der Maus bestätigen einen negativen Einfluss einer Malariainfektion auf den Verlauf der Tb. Die Studien zeigen eine verschlechterte Kontrolle von *Mtb* in Anwesenheit von verschiedenen murinen Malariaparasiten (Mueller *et al.*, 2012; Scott *et al.*, 2004). Unsere Arbeitsgruppe konnte nachweisen, dass eine Koinfektion mit *PbNK65* zu einer verstärkten entzündlichen Immunantwort, Gewebspathologie, starken Zytokinausschüttungen und veränderten T-Zell-Antworten führt. Diese zusammen resultieren in einer verringerten Kontrolle einer chronischen *Mtb*-Infektion (Mueller *et al.*, 2012). Eine ähnliche Beobachtung machten Scott *et al.*, die eine negative Beeinflussung der Kontrolle von Mykobakterien durch eine simultane Infektion mit dem nicht letalen Stamm *Py* beobachten konnten. Allerdings wurden die immunologischen Grundlagen für diese Beobachtung nicht näher beleuchtet (Scott *et al.*, 2004). Ebenso wiesen Hawkes *et al.* einen negativen Effekt einer Malariainfektion auf den Verlauf einer Tb *in vitro* und *in vivo* nach. Die Kokultivierung von Makrophagen mit *P. falciparum*-iRBZ und *Mtb* führte dabei zu einem Kontrollverlust des Wachstums der Mykobakterien, was die Autoren auf verschlechterte anti-mykobakterielle Effektormechanismen der Makrophagen zurückführten (Hawkes *et al.*, 2010). Auch in *M. bovis* *Bacille Calmette Guerin* (BCG)-infizierten Mäusen führte die zusätzliche Infektion mit *P. chabaudi* zu einer erhöhten mykobakteriellen Last (Hawkes *et al.*, 2010).

In verschiedenen experimentellen Studien, die die Koinfektion von Mykobakterien und Plasmodien behandeln, wurde ein unspezifischer Schutz einer mykobakteriellen Infektion gegen Malaria beobachtet (Matsumoto *et al.*, 2000; Mueller *et al.*, 2012; Murphy, 1981; Page *et al.*, 2005). Die Mehrheit der Studien untersuchte den Einfluss des weit verbreiteten Tb-Impfstamms BCG auf eine nachfolgende *Plasmodium*-Infektion (Leisewitz *et al.*, 2008; Matsumoto *et al.*, 2000; Murphy, 1981; Parra *et al.*, 2013; Smrkovski and Strickland, 1978). Hintergrund dafür ist die beobachtete, generell verminderte Kindersterblichkeit durch die BCG-Impfung unabhängig von einer Tb-Infektion (Roth *et al.*, 2005, 2006a, 2006b; Shann, 2010, 2011). Im Mausmodell konnte in mehreren unabhängigen Studien gezeigt werden, dass die Infektion mit BCG den Infektionsverlauf mit diversen *Plasmodium*-Nagetierstämmen mildert (Leisewitz *et al.*, 2008; Matsumoto *et al.*, 2000; Murphy, 1981; Parra *et al.*, 2013; Smrkovski and Strickland, 1978). Dies äußerte sich in einer reduzierten Parasitämie und, je nach *Plasmodium*-und Mausstamm, in einer reduzierten Sterblichkeit der BCG-vakzinierten Tiere. Page *et al.* zeigten darüber hinaus ebenfalls eine schützende Wirkung einer *Mtb*-Infektion gegen eine letale *Py*-Infektion in C57BL/6, nicht aber in BALB/c Mäusen (Page *et al.*,

2005). Unsere Arbeitsgruppe konnte außerdem zeigen, dass sich der Verlauf einer *PbNK65*-Infektion in *Mtb*-infizierten Tieren von dem in uninfizierten Tieren unterscheidet. Koinfizierte Tiere weisen eine signifikant reduzierte Parasitämie im Blut und eine verringerte Pathologie in der Leber auf, was bedeutet, dass die Malariainfektion in *Mtb*-Tieren besser kontrolliert wird (Mueller *et al.*, 2012). Zusammenfassend deuten diese Studien darauf hin, dass die durch eine *Mtb*-Infektion ausgelöste Immunantwort eine Art Schutz gegen Malariainfektionen ausüben kann.

## 1.4 Fragestellung

Die existierenden experimentellen Untersuchungen einer Tb-Malaria-Koinfektion deuten auf eine wechselseitige Beeinflussung des Immunsystems zwischen diesen beiden Erkrankungen hin. Dabei zeigen unabhängige Arbeiten, dass eine Tb-Infektion die Parasitämie verschiedener Malariaerreger reduziert. Eine verringerte Parasitämie, was hauptsächlich durch die Induktion einer Th1-Immunantwort bewerkstelligt wird, kann nachweislich die Entwicklung einer experimentellen zerebralen Malaria (EZM) unterbinden. Deshalb stellte sich die Frage, ob eine zu Grunde liegende Tb-Infektion, bei der eine Th1-Immunantwort induziert wird, den Verlauf einer *PbANKA*-induzierten EZM beeinflussen kann:

- Wie verläuft eine *PbANKA*-Infektion in *Mtb*-infizierten im Vergleich zu naiven Tieren?
- Wie beeinflusst das durch eine *Mtb*-Infektion geprägte immunologische Milieu die Immunantworten gegen die nachfolgende *PbANKA*-Infektion?

Weiterhin konnte im Mausmodell bereits gezeigt werden, dass eine Malariainfektion den Verlauf einer chronischen Tb moduliert. Neben Studien mit dem hoch-virulenten *PbNK65*-Stamm konnten Scott *et al.* zeigen, dass auch eine nicht letale *Py*-Infektion zu einer erhöhten Keimlast in *Mtb*-infizierten Mäusen führt. Allerdings blieben die verantwortlichen immunologischen Ursachen ungeklärt. Die Verwendung des nicht letalen *Py*-Stamms bietet darüber hinaus die Möglichkeit, die Langzeitkonsequenzen einer Malariainfektion auf den Verlauf der chronischen Tb zu untersuchen. Deshalb sollten folgende Aspekte weiterführend untersucht werden:

- Wie wirkt sich eine *Py*-Koinfektion auf die Tb-assozierte Lungenpathologie direkt nach überstandener, akuter *Py*-Infektion aus?
- Welche Langzeitauswirkungen hat die *Py*-Koinfektion auf den Verlauf der chronischen Tb 150 Tage nach dem Abklingen der akuten *Py*-Infektion?
- Welche immunologischen Mechanismen tragen zu der beschriebenen verschlechterten Kontrolle der chronischen Tb bei?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller</b>
Albumin bovine Fraktion V, Protease-frei (BSA)	Serva
Alsever's Lösung	Sigma-Aldrich
Ammoniumchlorid (NH <sub>4</sub> Cl)	Roth
Aqua B. Braun	B. Braun
Aqua destillata (A. dest)	Deionisierungsanlage, Forschungszentrum Borstel
Brij® L23-Lösung (30 %)	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfat (DMSO)	Roth
<i>Distilled Water DNase/RNase free</i>	Invitrogen
DMEM High Glucose (4,5 g/l), w/o L-Glutamin (mit Natriumpyruvat)	PAN Biotech
DNase I	Roche
Drabkin's-Lösung	Sigma-Aldrich
Entellan	Merck
Eosin	Roth
Essigsäure	Roth
Ethanol (EtOH)	Merck
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth
Fötale Kälberserum (FCS)	Biochrom
Giemsa-Lösung	Sigma-Aldrich
L-Glutamin (200 mM)	PAN Biotech
Glyzerin	Roth
Griess-Lösung	Sigma-Aldrich
Hämalaunenlösung (sauer) nach Mayer	Roth
Hamsterserum	Jackson Immuno Research
HEPES Pufferlösung (1 M)	PAN Biotech
Immersionsöl für Mikroskopie	Roth
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO <sub>3</sub> )	Sigma-Aldrich
Karbofuchsin	BD Biosciences
Kollagenase D	Roche
Liberase TL	Roche
Mausserum	PAN Biotech

β-Mercapoethanol (50 mM)	PAN Biotech
Methanol (MeOH)	Merck
Middlebrook 7H11 Agar	DIFCO/BD Biosciences
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Natriumnitrit (NaNO <sub>2</sub> ; 0,1 M)	Fluka
Natriumpyruvat (100 mM)	PAN Biotech
OADC (Oleinsäure, Albumin, Dextrose, Katalase)	BD Biosciences
Paraffin, Paraplast® Embedding Media	McCormick Scientific
Paraformaldehyd (PFA)	Roth
Percoll®	Sigma-Aldrich
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	PAN Biotech
Phosphatgepufferte Salzlösung (10x)	PAN Biotech
Proteaseinhibitorcocktail cOmplete, EDTA frei	Roche
Rattenserum	PAN Biotech
Rinderserum	Biowest
RPMI 1640 w/o L-Glutamin	PAN Biotech
Salzsäure (HCl)	Roth
Triton X-100	Roth
TRIzol®	Thermo Scientific
Trypanblau	Roth
Tween 20	Sigma-Aldrich
Tween 80	Sigma-Aldrich
Wright Stain	Sigma-Aldrich
Xylol	Merck

### 2.1.2 Kulturmedien, Lösungen und Puffer

4 % PFA	4 % (w/v) PFA in PBS
7H11 Agarmedium (für Platten)	2,1 % (w/v) 7H11 Agar, 0,5 % (v/v) Glycerin, 0,1 % (w/v) Asparagin, 10 % (v/v) Rinderserum in A. dest, autoklaviert
Entfärberlösung	92,3 % EtOH (v/v), 4,7 % (v/v) MeOH, 3 % (v/v) HCl
Erylysepuffer	155 mM NH <sub>4</sub> Cl, 10 mM KHCO <sub>3</sub> , 0,1 mM EDTA in H <sub>2</sub> O, steril filtriert
FACS-Puffer	3 % (v/v) FCS (hitzeinaktiviert), 0,1 % (w/v) NaN <sub>3</sub> in PBS, filtriert
Fc-Blockierlösung	1 % (v/v) Rattenserum, 1 % (v/v) Mausserum, 1 % (v/v) Hamsterserum, 1 % (v/v) anti-CD16/32 in FACS-Puffer
Giemsa-Färbelösung	10 % (v/v) Giemsa-Lösung in H <sub>2</sub> O, filtiert
Isotonisches Percoll	10 % PBS (10x) in Percoll

KMDZ-Med	10 % FCS, 2 mM L-Glutamin, 50 $\mu$ M $\beta$ -Mercaptoethanol, 100 U/ml Penicillin, 100 $\mu$ g/ml Streptomycin, steril filtriert
Lysepuffer A	Proteaseinhibitorcocktail, 0,05 % (v/v) Tween 20 in PBS, steril filtriert
Lysepuffer B	Proteaseinhibitorcocktail, 0,2 % (v/v) Triton X-100 in PBS, steril filtriert
MACS-Puffer	0,5 % (w/v) BSA, 2 mM EDTA in PBS, steril filtriert
PM-Medium (PM-Med)	10 % (v/v) FCS (hitzeinaktiviert), 1 % (v/v) L-Glutamin, 1 % (v/v) Natriumpyruvat in RPMI 1640 w/o Glutamin
RPMI-Medium <i>complete</i> (cRPMI)	10 % (v/v) FCS (hitzeinaktiviert), 1 % (v/v) L-Glutamin, 1 % (v/v) HEPES, 1 % (v/v) Natriumpyruvat, 0,1 % (v/v) $\beta$ -Mercapthoethanol in RPMI 1640 w/o Glutamin
Trypanblau-Arbeitslösung	Stammlösung: 0,5 % (w/v) in PBS Arbeitslösung: 1:10 Verdünnung der Stammlösung in PBS
Verdaupuffer	50 $\mu$ g/ml Liberase TL, 100 $\mu$ g/ml DNase I in RPMI
Wright Stain-Lösung	1 mg/ml Wright Stain in Methanol, filtriert
WTA-Puffer	1 % (w/v) BSA, 1 % (v/v) Tween 80 in H <sub>2</sub> O, steril filtriert

### 2.1.3 Anti-Maus Antikörper für die Durchflusszytometrie

Tabelle 1: Verwendete Antikörper für die Durchflusszytometrie

Antikörper	Fluorophor	Klon	Isotyp	Hersteller	Verdünnung
CD11b	PerCP-Cy5.5	M1/70	Rat IgG2b $\kappa$	BioLegend	1:320
CD11c	PE	N418	Armenian Hamster IgG	BioLegend	1:320
CD11c	PE-Cy7	N418	Armenian Hamster IgG	BioLegend	1:640
CD16/CD32	-	93	Rat IgG2a $\lambda$	BioLegend	1:100
CD183 (CXCR3)	PE	CXCR3-173	Armenian Hamster IgG1 $\kappa$	BD Biosciences	1:160
CD19	PE	6D5	Rat IgG2a $\kappa$	BioLegend	1:160
CD28	-	37.51	Syrian Hamster IgG	BioLegend	1:200
CD3e	-	145-2C11	Armenian Hamster IgG1 $\kappa$	BioLegend	1:200
CD3e	APC-Cy7	145-2C11	Armenian Hamster IgG1 $\kappa$	BD Biosciences	1:320
CD3e	PerCP-Cy5.5	17A2	Rat IgG2b $\kappa$	BioLegend	1:100
CD4	BV510	RM4-5	Rat IgG2a $\kappa$	BioLegend	1:320
CD4	PE-Cy7	GK1.5	Rat IgG2b $\kappa$	BioLegend	1:640
CD4	V500	RM4-5	Rat IgG2a $\kappa$	BD Biosciences	1:320
CD44	FITC	IM7	Rat IgG2b $\kappa$	BioLegend	1:640
CD44	PerCP-Cy5.5	IM7	Rat IgG2b $\kappa$	BD Biosciences	1:320

Antikörper	Fluorophor	Klon	Isotyp	Hersteller	Verdünnung
CD45	BV421	30-F11	Rat IgG2b κ	BioLegend	1:1280
CD45	PerCP-Cy5.5	30-F11	Rat IgG2b κ	BD Biosciences	1:1600
CD45	V450	30-F11	Rat IgG2b κ	BD Biosciences	1:1280
CD62L	APC	MEL-14	Rat IgG2a κ	BD Biosciences	1:320
CD80	AF488	16-10A1	Armenian Hamster IgG	BioLegend	1:640
CD86	APC	GL-1	Rat IgG2a κ	BioLegend	1:320
CD8a	APC	53-6.7	Rat IgG2a κ	BD Biosciences	1:320
CD8a	BV421	53-6.7	Rat IgG2a κ	BioLegend	1:640
CD8a	FITC	53-6.7	Rat IgG2a κ	BD Biosciences/ BioLegend	1:160
CD8a	V450	53-6.7	Rat IgG2a κ	BD Biosciences	1:640
CD90.2 (Thy-1.2)	eFluor780	53-2.1	Rat IgG2a κ	eBioscience	1:1280
IFNγ	APC	XMG1.2	Rat IgG1 κ	BD Biosciences	1:160
IFNγ	PerCP-Cy5.5	XMG1.2	Rat IgG1 κ	BioLegend	1:100
IFNγ	Pe-Cy7	XMG1.2	Rat IgG1 κ	BioLegend	1:160
I-A/I-E (MHC-II)	PE-Cy7	M5/114.15.2	Rat IgG2b κ	BioLegend	1:1280
IL-10	PE	JES5-16E3	Rat IgG2b κ	BioLegend	1:100
IL-17A	PerCP-Cy5.5	TC11-18H10.1	Rat IgG1 κ	BioLegend	1:100
IL-2	PE-Cy7	JES6-5H4	Rat IgG2b κ	BD Biosciences/ BioLegend	1:100
Ly6G	APC-Cy7	1A8	Rat IgG2a κ	BioLegend	1:400
MHC-I Ova Pentamer	APC		Polyklonal	ProlImmune	5 µl je Ansatz
NK1.1	PE-Cy7	PK136	Mouse IgG2a κ	BioLegend	1:160
TCR γ/δ	APC	GL3	Armenian Hamster IgG	BioLegend	1:100
TCR γ/δ	PE	GL3	Armenian Hamster IgG	BioLegend	1:160
TNFα	Pacific Blue	MP6-XT22	Rat IgG1 κ	BioLegend	1:160

### 2.1.4 Proteine

Hämoglobin (human)

Sigma-Aldrich

OT2-Peptid

Forschungszentrum Borstel

Ovalbumin *chicken*

Sigma-Aldrich

p25-Peptid

Forschungszentrum Borstel

Rekombinantes murines GM-CSF

BioLegend

Rekombinantes murines IFNγ

BioLegend

### 2.1.5

## 2.1.6 Primer

Tabelle 2: Primer für die quantitative *Real-Time* PCR (qRT-PCR)

Gen	Sequenz (5'-3' Richtung)	
	<i>Forward</i>	<i>reverse</i>
<i>hprrt</i>	TCCTCCTCAGACCGCTTTT	CATAACCTGGTTCATCATCGC
<i>ifny</i>	TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA	TGGCTCTGCAGGATTTTCATG
<i>il-6</i>	GAGGATACCACTCCCAACAGACC	AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA
<i>il-10</i>	GGTTGCCAAGCCTTATCGGA	ACCTGCTCCACTGCCTTGCT
<i>il-12</i>	CATCATCAAACCAGACCCGCCCAA	AACTTGAGGGGAGAAGTAGGAATGG
<i>kc</i>	ACCCAAACCGAAGTCATAGC	TCTCCGTTACTTGGGGACAC
<i>mcp-1</i>	CCTGCTGTTACAGTTGCC	ATTGGGATCATCTTGCTGGT
<i>PbANKA 18S rRNA</i>	AAGCATTAAATAAAGCGAATACATCCTTAC	GGAGATTGGTTTTGACGTTTATGTG
<i>tnfa</i>	CCACCACGCTCTTCTGTCTAC	AGGGTCTGGCCATAGAAGT

Die Primer zur Bestimmung der iNOS-Expression wurden von der Arbeitsgruppe Mikrobielle Grenzflächenbiologie zur Verfügung gestellt.

## 2.1.7 Kits

BD™ <i>Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Inflammation Kit</i>	BD Biosciences
CD11c <i>MicroBeads</i> , Maus	Miltenyi
CD4 <sup>+</sup> <i>T cell Isolation Kit</i> , Maus	Miltenyi
BD Cytofix/Cytoperm™	BD Biosciences
<i>Dead Cell Removal Kit</i>	Miltenyi
Direct-zol™ RNA MiniPrep	Zymo Research
LEGENDplex™ <i>Mouse Inflammation Panel</i>	BioLegend
LightCycler® 480 SYBR Green I Master	Roche
<i>Maxima® First Strand cDNA Kit for quantitative Real-Time-PCR</i>	Thermo Scientific
<i>Pan T cell Isolation Kit II</i> , Maus	Miltenyi
Vybrant CFDA SE <i>Cell Tracer Kit (CFSE)</i>	Thermo Scientific

## 2.1.8 Verbrauchsmaterial

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle während dieser Arbeit verwendeten Kunststoffartikel von Greiner Bio-One erworben.

Costar® 96 Well Platten (Rund- und Flachboden)	Corning®
BD™ Falcon 5 ml	BD Biosciences
Blutentnahmeröhrchen mit EDTA-Beschichtung	fairmed
CryoPure Gefäß 1,8 ml	Sarstedt

Kanülen (18 G, 23 G, 25 G, 26 G, 27 G, stumpf)	BD Biosciences
LS columns	Miltenyi
Mikroröhrchen (0,5 ml, 2 ml)	Sarstedt
Objektträger mit Mattrand	Thermo Scientific
Petrischalen	Sarstedt
Präseparationsfilter (30 µm) CellTrics	Partec
Spritzen (1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml, 50 ml)	BD Biosciences
SuperFrost®Plus Objektträger	Thermo Scientific
Zellsiebe (70 µm, 100 µm)	BD Biosciences

### 2.1.9 Geräte

Aerosolkäfige	Marine & Industrie Technik
Autotechnikon STP120	Thermo Scientific
BD FACS LSR™II	BD Biosciences
BD FACScanto™II	BD Biosciences
Gewebehomogenisatoren nach Potter-Elvehjem (10 ml; Pistillen)	VWR
Hera cell240 Inkubator	Thermo Scientific
Homogenisator PotterS	Braun
Inhalationssystem Modell 099C A4224	Glas-Col®
Kühlzentrifuge Heraeus Multigue 3SR Plus	Thermo Scientific
Kühlzentrifuge Heraeus Freco21	Thermo Scientific
Lab Cycler	SensoQuest
Lichtmikroskop Olympus BX41	Olympus
LightCycler®480 II	Roche
Mehrkanalpipetten Finnpipette® (50 µl und 300 µl)	Thermo Scientific
Multipette® 10 µl	Eppendorf
Mikrotom RM215RT	Leica
NanoDrop 2000	Thermo Scientific
Neubauerzählkammer	Marienfeld-superior
Paraffingießstation LEICA EG1140c	Leica
Paraffin-Streckbad 1052	GFL
Pipettensatz Finnpipette® (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Thermo Scientific
Präparationsbesteck	Hammer
Präzisionswaage AY303	Sartorius AG
QuadroMACS™ Separator	Miltenyi
Rotilabo® Glasstäbe	Roth
Schüttler PMS-1000i	Grant-bio
Sterilwerkbank MSC-Advantage™ Class II	Thermo Scientific

Sunrise Reader	TECAN Sunrise™
Synergy 2 Multi-Detektions-Reader	BioTek
Vi-CELL™ XR Counter	Beckman Coulter
Vortexer VTX-3000L Mixer Uzusio	Harmony
Wasserbad GFL1052	GFL

### 2.1.10 Software

Cell^B (Version 3.3)	Olympus
FACSDiva™ (Version 6.0)	BD Biosciences
FCS Express 4 Flow Cytometry (Version 4.07.0003)	DeNovo™ Software
Gen5 Datenanalyse-Software	BioTek
GraphPad Prism® (Version 5.01)	GraphPad Prism, La Jolla, USA
LightCycler® 480 Software 1.5.0 SP4 (Version 1.5.0.39)	Roche
Magellan V7.0 (Version 2.5)	Grödig

### 2.1.11 Parasiten- und Bakterienstämme

Tabelle 3: Verwendete Parasiten- und Bakterienstämme und deren Herkunft

Spezies	Stamm	Genotyp	Herkunft	Referenz
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	H37Rv NY	Wildtyp	William R. Jacobs (Albert Einstein College Medicine, New York)	
<i>Plasmodium berghei</i>	ANKA	Wildtyp	T. Jacobs (BNITM)	
<i>Plasmodium berghei</i>	ANKA	Ova	T. Jacobs (BNITM)	(Lundie <i>et al.</i> , 2008)
<i>Plasmodium yoelii</i>	17XNL	Wildtyp	T. Jacobs (BNITM)	

### 2.1.12 Mäusstämme

Tabelle 4: Verwendete Mäusstämme und deren Herkunft

Mäusstamm	Genotyp	Züchter	Referenz
NMRI	Wildtyp	Charles River (Sülfeld)	
C57BL/6	Wildtyp	Charles River (Sülfeld)	
C57BL/6	Wildtyp	FZB	
C57BL/6	Tg OT1	FZB	(Hogquist <i>et al.</i> , 1994)
C57BL/6	Tg OT2	FZB	(Barnden <i>et al.</i> , 1998)
C57BL/6	Tg p25	FZB	(Tamura <i>et al.</i> , 2004)

Die für diese Arbeit verwendeten Versuchstiere, die in *in vivo* Experimenten eingesetzt wurden, wurden von Charles River (Sülfeld) bezogen. Als Versuchstiere wurden 8-10

Wochen alte weibliche Mäuse verwendet. Infizierte Tiere wurden in separat belüfteten Käfigen mit speziellen Luftfiltern (IVC-Käfige) im BSL (Biologisches Sicherheitslabor) 3-Bereich gehalten. Die für *in vitro/ex vivo* verwendeten Versuchstiere wurden in der Tierhaltung des FZB unter spezifischen pathogenfreien Bedingungen (SPF) gezüchtet und in IVC-Käfigen im BSL 2-Bereich gehalten. Dafür wurden Mäuse beider Geschlechter im Alter von 8-16 Wochen verwendet. Für das Passagieren und die Vermehrung der Malariaparasiten wurden zudem 6-20 Wochen alte weibliche NMRI-Mäuse verwendet, die von Charles River bezogen und ebenfalls im BSL 2-Bereich gehalten wurden. Die Tierversuchsvorhaben zu den Experimenten, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, waren vom Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein unter der Nummer V 244-72241.123-3 (33-3/10) und V 312-72241.123-3 (51-5/14) genehmigt.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Tierexperimentelles Arbeiten

#### 2.2.1.1 Aerosolinfektion

Für die Infektion der Experimentalmäuse wurde ein Aliquot einer eingefrorenen *Mtb*-Bakterienkultur (angefertigt von Kristine Hagens, FG Schaible) aufgetaut und achtmal mit einer 27 G-Kanüle resuspendiert, um die Aggregatbildung der Mykobakterien zu verhindern. Die Bakteriensuspension wurde in sterilem destilliertem Wasser in einem Gesamtvolumen von 6 ml so verdünnt, dass 200 lebende Bakterien je Lunge aufgenommen werden. 500 µl dieser Bakteriensuspension wurden zur Überprüfung der eingesetzten Infektionslösung abgenommen, in Verdünnungen von  $10^{-2}$  bis  $10^{-5}$  auf 7H11 Agarplatten ausplattiert und 3-4 Wochen bei 37 °C inkubiert. Die Infektion der Experimentalmäuse erfolgte separiert in speziell angefertigten Aerosolkäfigen in einer Aerosolkammer über die natürliche Atemwegsrouten. Die verbliebenen 5,5 ml *Mtb*-Infektionslösung wurden in das Vernebelungsgefäß überführt und das System gestartet. Während der Aerosolinfektion wurden der Durchfluss des Hauptluftstroms auf 60 CFH (Kubik Fuß pro Stunde, entspricht 1,68 m<sup>3</sup>/h) und der Durchfluss der Kompressionsluft zur Vernebelung der Infektionslösung auf 11 CFH (entspricht 0,28 m<sup>3</sup>/h) eingestellt. Nach 900 sek Aufwärmzeit, 2400 sek Vernebelungszeit, 2400 sek Absaugzeit und 900 sek Dekontaminationszeit wurden die Mäuse aus dem Gerät entnommen und in die IVC-Haltungskäfige überführt. Zur Kontrolle der tatsächlichen Infektionsdosis wurde die mykobakterielle Keimlast in den Lungen von infizierten Mäusen 24 h nach der Infektion bestimmt. Dafür wurde die infizierte Lunge in 2 ml PBS/0,05 % Tween 20 durch ein 100 µm Zellsieb gedrückt und die entstandene Zellsuspension gleichmäßig auf sechs 7H11-Agarplatten verteilt und ausgestrichen. Nach 3-4 Wochen Inkubation bei 37 °C konnten die Kolonien ausgezählt und somit das Inokulum bestimmt werden.

### 2.2.1.2 Infektion mit *Plasmodium*-infizierten Erythrozyten

Naive homologe Donormäuse wurden mit einem Blutstabilat, das mit 300-500 µl PBS aufgefüllt wurde, intraperitoneal (i.p.) infiziert. Nach 6-7 Tagen wurde die Parasitämie bestimmt (Kapitel 2.2.1.3): Dafür wurden die Mäuse mittels CO<sub>2</sub> getötet, das Blut über eine Herzpunktion entnommen und in ein EDTA-Röhrchen gegeben. Um die Experimentalmäuse mit einer genauen Anzahl an Parasiten zu infizieren, wurde die Konzentration an Erythrozyten im entnommenen Blut mittels Neubauer-Zählkammer (Kapitel 2.2.3.1) bestimmt und über die Parasitämie die Konzentration der infizierten Erythrozyten ermittelt. Die i.p.-Infektion der Experimentalmäuse erfolgte mit 1x10<sup>5</sup> oder 1x10<sup>4</sup> infizierten Erythrozyten in einem mit PBS aufgefüllten Volumen von 200 µl je Maus.

### 2.2.1.3 Bestimmung der Parasitämie

Zur Bestimmung des Infektionsverlaufs wurde die Menge an Parasiten im Blut der Versuchstiere ausgezählt. Die Parasitämie gibt dabei Aufschluss über das Verhältnis von *Plasmodium*-infizierten Erythrozyten zur Gesamterythrozytenanzahl. Zur Bestimmung wurde ein Blutstropfen aus der Schwanzvene entnommen und mit Hilfe eines Objektträgers auf einem zweiten Objektträger ausgestrichen, sodass eine Einzelschicht an Erythrozyten vorlag. Der luftgetrocknete Ausstrich wurde in Methanol fixiert, 10-15 min in einer Färbeküvette mit Giemsa-Färbelösung gefärbt und mit destilliertem Wasser gespült. Die trockenen Blutausrich wurden unter dem Lichtmikroskop BX41 bei 100-facher Vergrößerung mit Immersionsöl und einem Okular mit integriertem Netzmikrometer ausgewertet. Gezählt wurden infizierte Erythrozyten und die Gesamtzahl an Erythrozyten in verschiedenen Sichtfeldern, wobei die Gesamtzahl mindestens 800-1000 Erythrozyten betrug und gewährleistet wurde, dass die Sichtfelder nicht überlappten. Die Parasitämie (in %) wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Gesamtzahl der infizierten Erythrozyten aus allen Sichtfeldern}}{\text{Gesamtzahl der Erythrozyten aus allen Sichtfeldern}} * 100$$

Alternativ wurden die Blutausrich mittels Wright-Färbelösung gefärbt. Hierbei erfolgen Fixierung und Färbung gleichzeitig in einer Lösung. Nach 3 min Inkubation in der Wright-Färbelösung wurden die Blutausrich 4 min in Wasser inkubiert und danach mit Wasser abgespült, bis keine Färbelösung mehr von dem Objektträger floss. Die getrockneten Blutausrich wurden wie bereits beschrieben ausgewertet.

### 2.2.1.4 Bestimmung des anämischen Zustands

Während der Infektion mit *Py* kommt es in C57BL/6 Mäusen zur Ausbildung einer Anämie. Die Bestimmung der Anämie erfolgte anhand der Cyanmethämoglobin-Konzentration im Blut infizierter Mäuse. Dafür wurden 2 µl Blut aus der Schwanzvene infizierter Mäuse entnommen und in 500 µl Drabkin's-Lösung, die in einem Verhältnis von 1:2000 mit einer 30

% Brij® L23-Lösung versetzt war, verdünnt. Die Proben wurden gut gemischt und 15 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Als Standard wurden verschiedene Konzentrationen (25-250 mg/ml) Hämoglobin verwendet, die ebenfalls in 500 µl Drabkin's-Lösung inkl. Brij® L23 Lösung aufgenommen und 15 min inkubiert wurden. Als Leerwert diente mit Brij® L23-supplementierte Drabkin's-Lösung. Anschließend erfolgte die photometrische Messung bei 540 nm. Die Cyanmethämoglobin-Konzentration der Proben wurde anhand der Standardkurve ermittelt.

### 2.2.1.5 Bewertung des Gesundheitszustands *PbANKA*-infizierter Tiere

*PbANKA*-infizierte C57BL/6 Mäuse entwickeln eine experimentelle zerebrale Malaria, deren Symptome das Auftreten von neurologischen Symptomen wie Ataxie, Krämpfen und Koma beinhaltet. Diese Symptome treten normalerweise zwischen Tag 6 und 8 nach der *PbANKA*-Infektion auf und führen am Ende zum Tod. Mäuse, die zerebrale Symptome entwickelten, wurden täglich mehrfach nach einem vorgegebenen System bewertet (angelehnt an Carroll *et al.*, 2010). Dabei wurden die Eigenschaften Gang, Bewegungsleistung, Körperlage, Stärke in den Extremitäten, Fellpflege, Gewichtsreduktion, Atmung und Pinnareflex jeweils mit 0-2 Punkten bewertet, wobei 0 den krankhaften und 2 den gesunden Zustand darstellte. Um unnötiges Leiden zu vermeiden, wurden Mäuse abgetötet, wenn in Summe eine Bewertung von unter 5 Punkten vorlag.

**Tabelle 5: Bewertungskriterien für den Gesundheitszustand *PbANKA*-infizierter Mäuse**

Parameter	Bewertung	Beschreibung
Gang	0 – 2	Gar nicht – unkoordiniert, unsicher – normal
Bewegungsleistung	0 – 2	Keine – Erkundung von 2-3 Ecken des Käfigs in 90 sec. – Erkundung aller 4 Ecken in 15 sec.
Körperlage	0 – 2	Auf der Seite – gekrümmt, buckelig – volle Streckung, normal
Stärke in den Extremitäten	0 – 2	Hypotonie, kein Greifen – schwaches Zurückziehen – starkes Zurückziehen
Fellpflege	0 – 2	Zerzaust, Fellbüschel gegen den Strich – „Gänsehaut“, mattes Fell – normal, glänzend
Gewichtsreduktion	0 – 2	Über 10% – bis 10% – gar nicht
Atmung	0 – 2	Schnappatmung – flache Atmung – normal
Pinnareflex	0 – 2	Keinen – einseitig nach jeweils drei Versuchen – beidseitig nach jeweils drei Versuchen

### **2.2.1.6 Organentnahme**

Zur Analyse wurden infizierte Mäuse mittels überdosierter CO<sub>2</sub>-Narkose getötet. Nach dem Öffnen der Bauchdecke wurde das Blut mittels einer Spritze und 27 G Kanüle aus der Vena *cava inferior* entnommen und in ein Eppendorf-Röhrchen überführt. Das Blut wurde bei 8000 rpm für 10 min zentrifugiert und das Serum bei -20 °C für spätere Analysen gelagert. Gehirn, Milz und Lunge wurden in der *PbANKA*-Koinfektion entnommen; Milz, Lunge und Leber in der *Py*-Koinfektion. Für histologische Untersuchungen der Lunge wurde ein rechter oberer Lungenlappen entnommen und in 4 % PFA für 24 h inkubiert. Für molekularbiologische Untersuchungen wurde ein rechter unterer Lungenlappen entnommen und in TRIzol® bei -80 °C gelagert. Außerdem wurde das Gehirn sagittal mit einem Skalpell halbiert. Die eine Hälfte wurde in TRIzol® gegeben und bei -80 °C gelagert, die andere Hälfte für die Herstellung einer Einzelzellsuspension verwendet.

### **2.2.1.7 Bestimmung der mykobakteriellen Keimlast**

Für die Bestimmung der mykobakteriellen Keimlast wurden Lunge, Milz und Leber in 2 ml (Lunge und Milz) oder 8 ml (Leber) Lysepuffer A (Kapitel 2.1.2) mit Hilfe eines Spritzenstempels durch ein 100 µm Zellsieb gedrückt. Von dem Homogenat wurden mit WTA-Puffer serielle Verdünnungen hergestellt und 50 µl der Verdünnungen auf je einer halben 7H11-Agarplatte ausgestrichen. Die Platten wurden 3-4 Wochen bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Kolonien zur Bestimmung der Keimlast ausgezählt. Das übrige Homogenat wurde für spätere Analysen bei -80 °C gelagert.

### **2.2.1.8 Gewinnung von Einzelzellsuspensionen**

Zur Durchführung von durchflusszytomtrischen Analysen wurden Einzelzellsuspensionen verschiedener Mausorgane hergestellt. Um im Blut zirkulierende Immunzellen aus den Organen zu entfernen, wurde der Organismus mit 20 ml warmen PBS perfundiert. Dazu wurde in der *PbANKA*-Infektion der linke Ventrikel mit einer 18 G Kanüle angestochen und mit einer stumpfen Kanüle perfundiert. In der *Py*-Infektion erfolgte die Perfusion über den rechten Ventrikel. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Zentrifugationsschritte für 5 min bei 1500 rpm und 4 °C durchgeführt. Die Zellen wurden am Ende einer Isolierung in einem geeigneten Volumen cRPMI (Kapitel 2.1.2) aufgenommen und in einer 1:25 Verdünnung in FACS-Puffer (Kapitel 2.1.2) mittels des Vi-CELL™ XR Gerätes gezählt (Zellen mit der Größe von 3-30 µm).

#### **2.2.1.8.1 Gehirn**

Zur Gewinnung von Lymphozyten aus dem Gehirn wurde dieses aus den Mäusen entnommen und in 2 ml cRPMI mit Hilfe eines Spritzenstempels durch ein 100 µm Zellsieb gedrückt. Anschließend wurde die Gehirnsuspension zusätzlich durch ein 70 µm Zellsieb gedrückt und gezählt.

### **2.2.1.8.2 Milz**

Zur Herstellung einer Einzelzellsuspension aus der Milz wurde diese nach der Präparation in 2 ml cRPMI gegeben und in einer Petrischale mit Hilfe eines Spritzenstempels durch ein 100 µm Zellsieb gedrückt. Die Zellen wurden zentrifugiert und in 2 ml Erylysepuffer (Kapitel 2.1.2) aufgenommen. Nach 3 min Inkubation wurde die Erylyse durch Zugabe von 10 ml cRPMI gestoppt und die Zellsuspension erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml cRPMI resuspendiert, über ein 100 µm Zellsieb in ein neues Röhrchen überführt und die Zellkonzentration bestimmt.

### **2.2.1.8.3 Lunge**

Nach der Entnahme wurde die Lunge in einer 12 Well Platte mit einer Schere klein geschnitten. Die Lungenstücke wurden in 2 ml Verdaupuffer (Kapitel 2.1.2) in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und im Wasserbad schüttelnd bei 37 °C für 90 min inkubiert. Nach dem Verdau wurde die Suspension über ein Zellsieb mit einer Maschenweite von 100 µm in ein neues Falcon-Röhrchen mit 10 ml PBS überführt. Die im Sieb verbliebenen Stücke wurden mit einem Spritzenstempel durch das Sieb gedrückt und das Sieb anschließend mit PBS aus dem Röhrchen gespült. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert, das Zellpellet in 2 ml Erylysepuffer (Kapitel 2.1.2) Lunge aufgenommen und für 3 min bei RT inkubiert. Die Erylyse wurde mit 10 ml cRPMI abgestoppt und die Zellsuspension zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml cRPMI aufgenommen, über ein 100 µm Zellsieb in ein neues Röhrchen überführt und die Zellzahl ermittelt.

### **2.2.1.9 Adoptiver T-Zell-Transfer**

Um die antigenspezifische T-Zell-Antwort zu untersuchen, wurden OT1 T-Zellen aus der Milz von OT1-Mäusen mittels *Pan T Isolation Kit* (Miltenyi) laut Herstellerangaben isoliert.  $2 \times 10^6$  OT1 T-Zellen wurden den Experimentalmäusen drei Tage nach der Infektion mit *PbANKA-OVA* in einem Gesamtvolumen von 200 µl intravenös (i.v.) appliziert.

## **2.2.2 Mikrobiologisches Arbeiten**

### **2.2.2.1 Herstellung von *Plasmodium*-Blutstabilaten**

Zur Herstellung von Blutstabilaten aus infizierten C57BL/6 oder NMRI Mäusen (maximal 1 % Parasitämie) wurden diese durch eine überhöhte CO<sub>2</sub>-Narkose getötet und das Herz punktiert. Das Blut wurde in EDTA-Röhrchen gesammelt, um eine Gerinnung zu vermeiden. Zur Langzeitlagerung wurde das infizierte Blut 1:1 mit Alsever's-Lösung inkl. 10 % Glycerin gemischt, in Kryoröhrchen gefüllt und im Stickstofftank eingefroren. Die Blutstabilate wurden zur i.p.-Infektion von naiven Donormäusen verwendet.

## 2.2.3 Zellbiologische Arbeiten

### 2.2.3.1 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl für *in vitro/ex vivo* Versuche wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Dazu wurde ein Aliquot der Zellsuspension mit einer Trypanblaulösung adäquat verdünnt und in die Zählkammer gefüllt. Trypanblau ist ein Farbstoff, der in tote Zellen eindringt und diese so im Mikroskop blau erscheinen lässt. Da die Plasmamembran lebender Zellen für den Farbstoff undurchlässig ist, wird eine Unterscheidung von lebenden und toten Zellen ermöglicht. Die durchschnittliche Anzahl der lebenden Zellen in einem Großquadrat der Zählkammer, multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor und dem Faktor  $10^4$  (Volumenrechnungsfaktor für  $1 \text{ mm}^3$ ) ergibt die Lebendzellzahl pro Milliliter Zellsuspension. Multipliziert man diese mit dem Kulturvolumen, so erhält man die Gesamtzellzahl.

### 2.2.3.2 Generierung von DZ aus dem Knochenmark

Primäre dendritische Zellen wurden aus 8-16 Wochen alten C57BL/6 Mäusen aus dem Knochenmark (KMDZ) gewonnen. Die Mäuse wurden durch eine überdosierte  $\text{CO}_2$ -Narkose und anschließender zervikalen Dislokation getötet und die Oberschenkel- und Schienbeinknochen frei präpariert. Die Knochenmarkszellen wurden mit KMDZ-Med (Kapitel 2.1.2) mit Hilfe einer 23 G Kanüle ausgespült und pelletiert (1500 rpm, 5 min,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 2 ml Erylysepuffer (Kapitel 2.1.2) aufgenommen und für 2 min bei RT inkubiert, um die Erythrozyten zu entfernen. Die Erylyse wurde durch Zugabe von 20 ml KMDZ-Med abgestoppt und die Zellen erneut pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in KMDZ-Med aufgenommen und je  $5 \times 10^6$  Knochenmarkszellen in 8 ml KMDZ-Med auf Petrischalen verteilt. Zur Differenzierung wurden zusätzlich 20 mg/ml GM-CSF je Schale dazugegeben und die Zellen bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert. Nach drei und sechs Tagen wurden je Petrischale weitere frische 8 ml KMDZ-Med und 20 mg/ml GM-CSF zugegeben, um die Differenzierung zu gewährleisten. Primäre KMDZ wurden an Tag 7 nach der Isolation für Versuche verwendet.

### 2.2.3.3 Gewinnung von Peritonealmakrophagen

Für die Gewinnung von Peritonealmakrophagen (PM) aus naiven und *Py*-infizierten Mäusen wurden die Tiere mit überdosierter  $\text{CO}_2$ -Narkose getötet und die Haut am Bauch abgezogen. Die Bauchdecke wurde mit einer 18 G Kanüle angestochen und 8 ml kaltes PBS in die Peritonealhöhle injiziert. Diese wurde anschließend massiert, um die in ihr befindlichen Zellen zu lösen, das Peritonealexudat mit einer Spritze und stumpfen Kanüle abgesaugt und auf Eis gelagert. Das Spülen mit PBS wurde 1-2 Mal wiederholt, um die Ausbeute zu erhöhen. Die Zellen wurden zentrifugiert (1500 rpm, 5 min,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ), in PM-Med (Kapitel 2.1.2) aufgenommen und auf eine adäquate Menge Petrischalen verteilt. Um die PM aus den Peritonealzellen zu gewinnen, erfolgte eine Inkubation ÜN. Am folgenden Tag wurden die

nicht adhärenen Zellen abgenommen, die adhärenen Zellen mit 5 ml PBS vorsichtig gewaschen, um weitere nicht adhärenen oder nur leicht adhärenen Zellen zu entfernen, und die adhärenen PM geerntet. Dafür wurden die PM für 15 min mit 5 ml kaltem PBS bei 4 °C inkubiert, vorsichtig abgeschabt, pelletiert, in PM-Med aufgenommen und für die Versuche in 96 Well Flachbodenplatten ausgesät.

#### 2.2.3.4 Gewinnung von DZ aus der Milz

Für die Gewinnung von DZ aus naiven und *Py*-infizierten Mäusen wurden die Tiere mit überdosierter CO<sub>2</sub>-Narkose getötet und die Milzen präpariert. In die Milzen wurden 2 ml (naiv) oder 4 ml (*Py*) einer Kollagenase D/DNase I-Lösung (Kollagenase D 1 mg/ml, DNase I 33 µg/ml in RPMI) mit einer Spritze und 25 G Kanüle injiziert. Der Verdau erfolgte für 20 min bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Anschließend wurde die angedaute Milz durch ein 100 µm Zellsieb gedrückt und das Zellsieb mit 10 ml MACS-Puffer (Kapitel 2.1.2) oder cRPMI (Kapitel 2.1.2) gewaschen. Nach einer Zentrifugation (1500 rpm, 5 min, 4 °C) wurde das Pellet in 2 ml (naiv) oder 4 ml (*Py*) Erylysepuffer (Kapitel 2.1.2) aufgenommen und für 3 min bei RT inkubiert. Die Lyse wurde mit 10 ml cRPMI gestoppt und die Zellsuspension erneut zentrifugiert. Die Zellen wurden in 2 ml (naiv) oder 4 ml (*Py*) MACS-Puffer resuspendiert, über ein 100 µm Zellsieb in ein neues Falcon-Röhrchen überführt und die Zellzahl bestimmt. Das Entfernen toter Zellen erfolgte nach Herstellerangaben mit dem *Dead Cell Removal Kit* von Miltenyi. Die gewonnenen lebenden Zellen wurden erneut gezählt und die DZ laut Herstellerangaben weiter mit dem CD11c MicroBeads Kit von Miltenyi über positive Selektion mit dem QuadroMACS™ isoliert.

#### 2.2.3.5 Überleben von *Mtb* in PM und DZ

Für die Analyse des Überlebens von *Mtb* in PM und Milz-DZ wurden diese in einer Anzahl von 1x10<sup>5</sup> bzw. 2x10<sup>5</sup> Zellen ausgesät. Die PM wurden zusätzlich mit IFN $\gamma$  in einer Konzentration von 500 U/ml voraktiviert. Die Infektion mit *Mtb* erfolgte in einer MOI 1 direkt aus den eingefrorenen Stocks. Die Bakterien wurden dafür nach dem Auftauen achtmal mit Hilfe einer Spritze und 27 G Kanüle vereinzelt und in PM-Med (Kapitel 2.1.2) bzw. cRPMI (Kapitel 2.1.2) in einem Volumen von 100 µl auf die jeweiligen Zellen gegeben. Um die Infektionslösung zu kontrollieren, wurde diese in einer seriellen Verdünnung von 10<sup>-1</sup> bis 10<sup>-4</sup> in WTA-Puffer (Kapitel 2.1.2) auf 7H11 Agarplatten gegeben und für 3-4 Wochen bei 37 °C inkubiert. Nach einer Inkubation von 2 h bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> wurde die *Mtb*-Lösung von den Zellen entfernt, die Zellen vorsichtig mit 200 µl Medium gewaschen und in frischen 200 µl Medium bis zum Erntezeitpunkt bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Um die *Mtb*-Aufnahme der PM bzw. Milz-DZ zu bestimmen, wurden die Zellen direkt nach der Inkubation mit *Mtb* geerntet. Dafür wurden die Zellen nach dem Waschen mit 100 µl Lysepuffer B (Kapitel 2.1.2) versetzt, 5-10 min inkubiert und aus dem jeweiligen Well gespült, um eine serielle Verdünnungsreihe von 10<sup>-1</sup> bis 10<sup>-4</sup> in WTA-Puffer anzufertigen, die auf 7H11 Agarplatten

aufgetragen wurde. Die Platten wurden 3-4 Wochen bei 37 °C inkubiert. Die Ernte der weiteren Proben erfolgte zu den angegebenen Zeitpunkten auf die gleiche Weise.

### 2.2.3.6 Isolierung von T-Zellen

Bei der T-Zell-Isolierung wurden 6-10 Wochen alte OT1-, OT2- oder p25-Mäuse verwendet. OT1-Mäuse tragen einen transgenen T-Zell-Rezeptor, der spezifisch das Ovalbumin-Epitop OVA<sub>257-264</sub> (CD8<sup>+</sup> OT1 T-Zellen) erkennt (Hogquist *et al.*, 1994), wohingegen OT2-Mäuse transgene T-Zellen haben, die spezifisch das Ovalbumin-Epitop OVA<sub>323-339</sub> erkennen (Barnden *et al.*, 1998). p25-Mäuse tragen einen transgenen T-Zell-Rezeptor, der spezifisch das Peptid 25 (Aminosäuren 240-254 des reifen Proteins) vom *Mtb*-Antigen Ag85 erkennt, ein Protein mit Mycoloyltransferaseaktivität, das Trehalosedimycolat (TDM) generiert, welches wiederum ein für die *Mtb*-Virulenz wichtiges Zellmembranlipid darstellt (Tamura *et al.*, 2004). Zur Isolierung wurden die Milzen entnommen, mit einem Spritzenstempel durch ein 100 µm Zellsieb gedrückt, welches mehrfach mit cRPMI (Kapitel 2.1.2) gespült wurde, und in ein Falcon-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden pelletiert (5 min, 1500 rpm, 4°C) und die Erythrozyten anschließend in 2 ml Erylysepuffer (Kapitel 2.1.2) für 3 min bei RT lysiert. Die Lyse wurde durch die Zugabe von 10-20 ml cRPMI abgestoppt und die Zellen erneut pelletiert (5 min, 1500 rpm, 4°C). Für das weitere Vorgehen wurde sich an dem Handbuch der verwendeten Isolationskits von Miltenyi orientiert (*Pan T cell kit* und CD4<sup>+</sup> Isolationskit). Die T-Zell-Isolierung erfolgte durch eine Negativselektion, was bedeutet, dass die mit Antikörpern markierten Zellen in der Säule zurückgehalten wurden und die nicht markierten Zellen, in diesem Fall die T-Zellen, durchflossen. Die gewonnenen T-Zellen wurden abschließend für 5 min bei 1500 rpm und 4°C pelletiert und nach Bedarf CFSE markiert (Kapitel 2.2.3.7).

### 2.2.3.7 Carboxyfluorescein-Succinylester (CFSE)-Markierung von T-Zellen

CFSE ist ein Zellfarbstoff, der passiv und in nicht-fluoreszenter Form in die Zellen diffundiert. Intrazellulär werden die Acetatgruppen durch zytosolische Esterasen abgespalten und somit Carboxyfluorescein-Succinylester generiert. Die Succinylestergruppen reagieren mit intrazellulären Aminen und bilden fluoreszierende Konjugate, die nicht mehr aus den Zellen heraus diffundieren können. Bei der Zellteilung werden die gebildeten Protein-Farbstoff-Konjugate gleichmäßig an die Tochterzellen weitergegeben, sodass deren Fluoreszenz halbiert wird. Über die stufenweise Abnahme der Fluoreszenz ist es möglich, die Frequenz der Zellproliferation zu verfolgen.

Die gewonnenen T-Zellen (Kapitel 2.2.3.6) wurden für 5 min bei 1500 rpm pelletiert und in 1 ml warmem PBS/5 % FCS resuspendiert. Bei kleinen Zellmengen (Zellzahl  $\leq 1 \times 10^7$ ) ist die Zugabe von Protein (hier in Form von FCS) zur Färbelösung essentiell, um die Toxizität von CFSE zu minimieren. Zu dieser Suspension wurde 1 ml PBS/5 % FCS inklusive 1 µl CFSE gegeben, sodass eine CFSE-Endkonzentration von 5 µM vorlag. Nach Durchmischung wurden die Zellen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für 10 min inkubiert. Anschließend wurden 20 ml PBS/5 % FCS

dazugegeben und die Zellsuspension für 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 20 ml cRPMI (Kapitel 2.1.2) aufgenommen und erneut zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde ein weiteres Mal wiederholt. Am Ende wurden die T-Zellen in 1-2 ml cRPMI-Medium aufgenommen und gezählt.

### 2.2.3.8 T-Zell-Proliferationsversuch

DZ sind professionelle antigenpräsentierende Zellen, die naive T-Zellen aktivieren und zur Proliferation anregen können (Palucka and Banchereau, 2002). Um die Kapazität der generierten KMDZ (Kapitel 2.2.3.2) in Abhängigkeit einer iRBZ-Infektion zu testen, *Mtb*-spezifische T-Zellen zu aktivieren, wurden  $1 \times 10^4$  KMDZ mit  $2 \times 10^5$  isolierten *Py*-iRBZ (Kapitel 2.2.3.9) für 2 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Als Kontrolle wurden uninfizierte RBZ aus naiven Mäusen verwendet. Danach wurde *Mtb* in einer MOI von 1 oder 3 oder als Kontrolle 40 µg/ml p25 Peptid für 2 h hinzugegeben. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (1000 rpm, 5 min) und der Überstand verworfen, um die nicht aufgenommenen *Mtb* zu entfernen. p25 CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden mit Hilfe des CD4<sup>+</sup> Isolationskits (Miltenyi; Kapitel 2.2.3.6) gewonnen und mit CFSE markiert (Kapitel 2.2.3.7).  $1 \times 10^5$  p25 CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden für drei Tage mit den vorbereiteten infizierten und Kontroll-KMDZ bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kokultiviert und die Proliferation der T-Zellen über den Verlust des CFSE mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

Um die Kapazität von isolierten CD11c<sup>+</sup> Zellen (Kapitel 2.2.3.4) aus naiven und *Py*-infizierten Mäusen zu testen, T-Zell-Proliferation zu induzieren, wurden  $1 \times 10^3$  CD11c<sup>+</sup> Zellen mit 100 µg/ml OVA über Nacht oder mit 1 µM OT2-Peptid für 3 h inkubiert. Anschließend wurden OT2 CD4<sup>+</sup> T-Zellen wie p25 CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit Hilfe des CD4<sup>+</sup> Isolationskits gewonnen, CFSE-markiert und  $1 \times 10^5$  dieser Zellen mit CD11c<sup>+</sup> Zellen für 3 Tage bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kokultiviert. Die Proliferation der T-Zellen wurde ebenfalls über den Verlust des CFSE-Signals mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

### 2.2.3.9 Isolierung von infizierten Erythrozyten (iRBZ)

*Py*-infizierte C57BL/6 Mäuse wurden 7-10 Tage nach der Infektion mit einem *Py*-Blutstabilat durch eine überhöhte CO<sub>2</sub>-Narkose getötet und das Herz punktiert. Das wurde in EDTA-Röhrchen gesammelt, um die Gerinnung zu vermeiden. Danach wurde es in ein 50 ml Falcon überführt und 20 ml PBS zum Waschen dazugegeben. Nach Zentrifugation (1500 g, 5 min, RT, Bremse Stufe 3) wurde der Überstand abgenommen, das Blutpellet in PBS aufgenommen und auf 60 % isotones Percoll pipettiert. Nach einer zwanzigminütigen Zentrifugation bei 1500 g und RT mit einer Bremseneinstellung 3 wurde die rote Interphase, in der sich über ihre Dichte die iRBZ ansammelten, abgenommen und mit 20 ml PBS gewaschen (1500 g, 5 min, RT, Bremse Stufe 3). Nach Wiederholung des Waschschrifts (1000 g, 5 min, RT, Bremse Stufe 3) wurden die iRBZ in PBS aufgenommen und gezählt.

### **2.2.3.10 NO-Bestimmung mittels Griess-Reaktion**

Der Nachweis von NO erfolgte über die Bildung von Nitrat/Nitrit, da die Summe von Nitrat und Nitrit stöchiometrisch wie NO gebildet wird. Die Griess-Reaktion beruht auf der Umsetzung von Griess-Lösung mit Nitrit zu einem Diazofarbstoff, dessen Absorption bei einer Wellenlänge von 548 nm bestimmt wird.

Zur Bestimmung von NO wurden 50 µl Probe mit 50 µl Griess-Lösung versetzt und für 15 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Als Standard wurde eine Konzentrationsreihe von 0,5 bis 100 µM Natriumnitrit angefertigt, die ebenfalls 1:1 mit Griess-Lösung verdünnt und für 15 min inkubiert wurde. Die Messung erfolgte mit dem Tecan Sunrise (Magellan) bei 560 nm.

## **2.2.4 Immunologische Analysen**

### **2.2.4.1 Phänotypisierung der Zellpopulationen mittels Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie erlaubt die statistische Analyse einzelner Zellen im Hinblick auf ihre Lichtstreuungs- und Fluoreszenzeigenschaften. Die Vorwärtslichtstreuung hängt von der Größe der Zellen ab, die Seitwärtslichtstreuung von ihrer Granularität. Die Fluoreszenz kann durch exprimierte, fluoreszente Proteine, angefärbte Zellbestandteile (z.B. DNA) oder markierte Antikörper hervorgerufen werden. Die simultane Messung der Parameter erlaubt eine exakte Unterscheidung verschiedener Populationen innerhalb einer Zellsuspension. Für die Messung wird die Probe gleichmäßig in ein Flusssystem injiziert, die zusammen mit der Trägerflüssigkeit eine Düse passiert und sich somit in einem feinen Flüssigkeitsstrahl befindet. Der Strahl wird an einem Laser vorbeigeleitet, der die Fluorophore in der Probe anregt. Zusätzlich zur Fluoreszenzemission wird gleichzeitig die Vorwärts- und Seitwärtsstreuung des Lichts gemessen. Die freigesetzte Emission wird von Detektoren gemessen und vom System in elektrische Signale umgewandelt. Die Flussgeschwindigkeit und der Probenauftrag werden so eingestellt, dass für jede Messung nur eine einzelne Zelle den Messpunkt passiert. Die Auswertung erfolgt als Statistik über die Eigenschaften einzelner Zellen.

#### **2.2.4.1.1 Oberflächenfärbung**

Für die durchflusszytometrischen Analysen der Einzelzellsuspensionen wurden  $1 \times 10^6$  Milzzellen,  $3 \times 10^5$  Lungenzellen und  $1 \times 10^7$  Gehirnzellen pro Färbung in eine 96 Well Rundboden-Mikrotiterplatte gegeben. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation bei 1000 rpm wurden die Überstände verworfen und das Sediment in 50 µl Fc-Blockierlösung (Kapitel 2.1.2) resuspendiert. Die verwendeten Seren in der Blockierlösung richteten sich nach der Spezies der Antikörper. Die Inkubation erfolgte für 20-30 min bei 4 °C. Die Zellen wurden mit 180 µl FACS-Puffer (Kapitel 2.1.2) gewaschen und zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die Zellen mit 50 µl Antikörperlösung (verwendete Antikörper siehe Tabelle 1) für 30 min bei 4 °C im Dunkeln gefärbt. Die ungebundenen Antikörper wurden durch

Zugabe von 180 µl FACS-Puffer und anschließender Zentrifugation entfernt. Schließlich wurden die Zellen in 200 µl FACS-Puffer aufgenommen und gemessen.

#### **2.2.4.1.2 Intrazelluläre Färbung**

Für die intrazelluläre Färbung wurde das BD Cytofix/Cytoperm™ Kit verwendet.  $1 \times 10^6$  Milzzellen oder  $3 \times 10^5$  Lungenzellen der Einzelzellsuspensionen wurden in eine mit je 5 µg/ml αCD3e/αCD28-beschichtete 96 Well Flachboden-Mikrotiterplatte sowie in eine unbeschichtete 96 Well Flachboden-Mikrotiterplatte (Negativkontrolle) gegeben. αCD3e/αCD28 sorgt für eine Aktivierung der T-Zellen und regt diese zur Zytokinproduktion an. Damit die Zytokine nicht sekretiert werden und somit für die durchflusszytometrische Messung verloren wären, wurde Golgi-Plug™ in einer Endverdünnung von 1:1000 zu den Zellsuspensionen gegeben und für 4,5 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellsuspensionen in eine 96 Well Rundboden-Mikrotiterplatte überführt, zentrifugiert und die Oberfläche der Zellen gefärbt (Kapitel 2.2.4.1.1). Die intrazelluläre Färbung erfolgte im Anschluss an die Oberflächenfärbung. Dafür wurden die Zellsuspensionen nach dem letzten Waschschrift in 100 µl Cytofix/Cytoperm™ resuspendiert und über Nacht bei 4 °C fixiert und permeabilisiert. Am nächsten Tag wurden 100 µl Perm/Wash™-Puffer je Well dazugeben und die Mikrotiterplatte für 5 min bei 1000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und der Waschschrift mit 200 µl Perm/Wash™-Puffer wiederholt. Anschließend wurden die Zellen mit 50 µl Zytokin-Antikörperlösung für 40 min bei 4 °C gefärbt (verwendete Antikörper siehe Tabelle 1). Die ungebundenen Antikörper wurden durch Zugabe von 180 µl Perm/Wash™-Puffer und anschließender Zentrifugation entfernt. Schließlich wurden die Zellen in 200 µl FACS-Puffer aufgenommen und gemessen.

#### **2.2.4.1.3 Durchflusszytometrische Messung**

Die Messung erfolgte entweder an einem FACS-LSR™II oder einem FACS-Canto™II. Das FACS-LSR™II ist ausgestattet mit einem 355 nm, 405 nm, 488 nm und 633 nm Laser. Das FACS-Canto™II enthält einen 405 nm, 488 nm und 633 nm Laser. Während der durchflusszytometrischen Messung wurde das Programm FACSDiva™ verwendet, die Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mit Hilfe des Programms FCS Express 4 Flow Cytometry (Version 4.07.0003 DeNovo™Software). Die Auswertungsstrategien befinden sich im Anhang (Anhang 2-10).

#### **2.2.4.2 Zytokinquantifizierung mittels BioLegend LEGENDplex™ oder BD™ Cytometric Bead Array (CBA)**

Um die Zytokinkonzentrationen in Organlysaten zu bestimmen, wurden diese nach den Vorgaben des Herstellers in einem BioLegend LEGENDplex™ oder einem BD™ CBA eingesetzt. Die quantitative Analyse erfolgte mittels durchflusszytometrischer Messung am

FACS-LSR™II. Die Daten wurden anschließend quantitativ mit Hilfe der LEGENDplex™ Software (Version 7.0, BioLegend) bzw. FCAP Array™ v1.0.1 (Soft Flow. Inc.) ausgewertet.

## **2.2.5 Histopathologische Analysen**

### **2.2.5.1 Gewebefixierung und Paraffinschnitte**

Ein rechter oberer Lungenflügel wurde für die histologischen Analysen für 24 h in 4 % Paraffin fixiert und anschließend bis zur Weiterverarbeitung in PBS gelagert. Die Proben wurden in einem Autotechnikon entwässert und in Paraffin übertragen (1 h 4 % PFA, 1 h 70 % EtOH, 1 h 80 % EtOH, 1 h 90 % EtOH, 1 h 96 % EtOH, 3 x 1 h 100 % EtOH, 2 x 1 h Xylol und 2 x 1,5 h in Paraffin (65 °C)). Die Organe wurden anschließend in einer Paraffingießstation bei 65 °C in flüssigem Paraffin eingebettet. Von den eingebetteten Organen wurden mittels Rotationsmikrotom 4 µm dicke Schnitte angefertigt, die in 39 °C warmes H<sub>2</sub>O im Wasserbad gegeben wurden, um sie zu strecken und abschließend auf SuperFrost®Plus Objektträger zu übertragen. Die Objektträger wurden bei 37 °C über Nacht getrocknet.

### **2.2.5.2 Hämatoxylin und Eosin (H&E)-Färbung**

Die H&E-Färbung erfolgte zur Visualisierung zellulärer Bestandteile, um histopathologische Veränderungen in den Lungenflügeln zu analysieren. Zuerst wurden die histologischen Schnitte mit Xylol (2 x 10 min) und einer absteigenden Alkoholreihe (2 x 2 min 100 % EtOH, 2 x 2 min 96 % EtOH, 2 min 70 % EtOH) rehydriert. Nach dem Spülen in destilliertem Wasser (A. dest) wurden die Schnitte für 10 min Hämatoxylin gefärbt und anschließend unter fließendem Leitungswasser für 10 min durch Erhöhung des pH-Wertes „gebläut“. Die Schnitte wurden erneut kurz in A. dest gespült und danach für 30 sek mit Eosin gegengefärbt, was zu einer rötlichen Anfärbung des Zytoplasmas führt. Die Schnitte wurden kurz in A. dest gespült und in einer aufsteigenden Alkoholreihe (in 70 % EtOH und 96 % EtOH dippen, 2 x 2 min 100 % EtOH) und Xylol (2 x 2 min) dehydriert und mit Entellan eingedeckt. Die mikroskopische Auswertung und Dokumentation erfolgte mit Hilfe des Lichtmikroskops BX41.

### **2.2.5.3 Quantifizierung der Läsionen in der Lunge**

Die pathologische Bewertung von H&E angefärbten Lungenschnitten erfolgte am Lichtmikroskop BX41 mit Hilfe der Software Cell<sup>^</sup>B. Die Lungenschnitte wurden komplett aufgenommen und auf Zellinfiltrate untersucht. Von den Zellinfiltraten wurde mit Cell<sup>^</sup>B die Fläche ermittelt und ins Verhältnis zur Gesamtfläche gesetzt. So wurde der Anteil der lädierten Fläche bestimmt. Die Bewertung erfolgte blind.

#### **2.2.5.4 Ziehl-Neelson-Färbung von Mykobakterien (*Acid Fast Stain*)**

Zum Nachweis der säurefesten Stäbchen in den histologischen Präparaten wurden die Schnitte zuerst wie in Kapitel 2.2.5.2 entparaffiniert. Anschließend wurden sie für 4 min mit Karbolfuchsin gefärbt und überschüssiges Karbolfuchsin durch Waschen unter fließendem Leitungswasser entfernt. Das Entfärben erfolgte durch Entfärberlösung (Kapitel 2.1.2), bis kein Karbolfuchsin mehr aus den Schnitten lief. Nach Waschen in A. dest wurden die Schnitte wie bereits beschrieben für 5 min mit Hämatoxylin gefärbt (Kapitel 2.2.5.2), wobei die Eosin-Färbung ausgelassen wurde. Nach der Dehydrierung (96 % EtOH, 2 x 2 min 100 % EtOH, 2 x 2 min Xylol) wurden die Schnitte mit Entellan eingedeckt. Die mikroskopische Auswertung und Dokumentation erfolgte mit Hilfe des Lichtmikroskops BX41.

### **2.2.6 Molekularbiologische Analysen**

#### **2.2.6.1 RNA-Isolierung aus Gewebe**

Um die RNA aus Gehirn und Lunge zu isolieren, wurden die bei -80 °C gelagerten Proben aufgetaut und in ein Potterröhrchen mit vorgelegten 0,5-1 ml TRIzol<sup>®</sup> überführt. Die Organe wurden mittels eines Homogenisators und sterilen, gekühlten Teflon-Pistillen homogenisiert. Aus dem Homogenat wurde anschließend mittels Direct-zol<sup>™</sup> RNA MiniPrep Kit die RNA laut Herstellerangaben isoliert. Abschließend wurde die RNA mit 30-50 µl RNase-freiem H<sub>2</sub>O eluiert. Die Konzentration und Reinheit der RNA wurde durch photometrische Messung am NanoDrop1000 bei einer Absorption von 260 nm und 280 nm bestimmt. Die RNA-Proben wurden bei -80 °C gelagert.

#### **2.2.6.2 Reverse Transkription**

Um die Genexpression spezifischer Gene nachzuweisen, wurde die isolierte RNA mittels reverser Transkription in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Die Umschreibung von 400 ng RNA erfolgte nach Angaben des Herstellers mit dem Maxima<sup>®</sup> First Strand cDNA Synthese Kit für q-Real-Time-PCR im LabCycler (10 min 25 °C, 15 min 50 °C, 5 min 85 °C). Nach der Inkubation wurden die Proben bei -80 °C gelagert.

#### **2.2.6.3 Quantitative *Real-Time* PCR mittels LightCycler**

Die PCR ist eine Methode, um einen definierten Bereich der DNA in kürzester Zeit millionenfach zu kopieren. Die aus der reversen Transkription gewonnene cDNA enthält Gene, die zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme exprimiert wurden. Einzelne Gene können gesondert betrachtet werden, indem sie über spezifische Primer mittels PCR amplifiziert werden. In dieser Untersuchung wurde die *Real-Time* PCR mit dem LightCycler<sup>®</sup>480 System von Roche angewendet. Der Nachweis der Amplifikate wurde mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR Green I erbracht. Nach Anlagerung der Primer kommt es zur Bildung von doppelsträngiger DNA, an die sich SYBR Green I anlagern kann, wodurch es zur

Erhöhung des Fluoreszenzsignals kommt, welches wiederum vom LightCycler gemessen wird. Um die Effizienz der Amplifikation zu bestimmen, wurde ein interner Standard, der sich zu gleichen Anteilen aus allen Proben des jeweiligen Versuchs zusammensetzte, in einer seriellen Verdünnungsreihe (1:2, 1:10, 1:20, 1:100, 1:200, 1:1000) verwendet. Für das jeweilige Gen (Tabelle 2) wurden Primer-Mixe mit 10  $\mu\text{M}$  *forward* und 10  $\mu\text{M}$  *reverse* Primer vorbereitet und bei -20 °C gelagert. Die quantitative *Real-Time* PCR wurde nach Herstellerangaben mit dem LightCycler®480 SYBR Green I Master Kit von Roche durchgeführt, wobei 0,2  $\mu\text{l}$  Primer Mix und 1  $\mu\text{l}$  1:10 verdünnte cDNA in einem 10  $\mu\text{l}$  Ansatz eingesetzt wurden. Das Temperaturprotokoll setzte sich wie folgt zusammen:

Temperatur	Zeit	Wiederholungen	
95°C	10 min		Präinkubation/Denaturierung
95°C	10 sek	45x	Amplifikation
63°C	10 sek		
72°C	8 sek		
72°C	1 sek		
95°C	10 sek		Schmelzkurvenanalyse
65°C	10 sek		
Graduell bis 97°C			
37°C	$\infty$		Finaler Kühlschritt

Die Spezifität der *Real-Time* PCR wurde mittels Schmelzkurvenanalyse überprüft. Zur Normalisierung der Werte wurden die Proben zum konstitutiv exprimierten Gen Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl Transferase (HPRT) ins Verhältnis gesetzt und als relative Genexpression angegeben. Die Auswertung erfolgte mit der Software LightCycler®480 1.5.0 SP4 (Version 1.5.0.39, Roche).

### 2.2.7 Statistische Analysen

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software GraphPad Prism® (Version 5.01). Die Beurteilung der statistischen Unterschiede erfolgte bei zwei zu vergleichenden Gruppen mittels Mann-Whitney Test (zweiseitig, Konfidenzintervall 95 %). Für die Analyse von mehr als zwei Gruppen wurde der Kruskal-Wallis Test mit Dunn's-Mehrfach-Vergleichstest angewendet (zweiseitig, 95 % Konfidenzintervall). Die Keimlasten aus *in vitro* Untersuchungen wurden logarithmisch transformiert und mittels ungepaartem T-Test ausgewertet. Statistische Analysen von Überlebenskurven wurden mittels Log Rank Test durchgeführt. Soweit nicht anders angegeben, lagen die ermittelten p-Werte > 0.05 und die zu untersuchenden Unterschiede wurden als nicht signifikant eingestuft. Signifikante Unterschiede wurden mit Sternen gekennzeichnet und sind wie folgt definiert: \*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*  $p \leq 0.001$ .

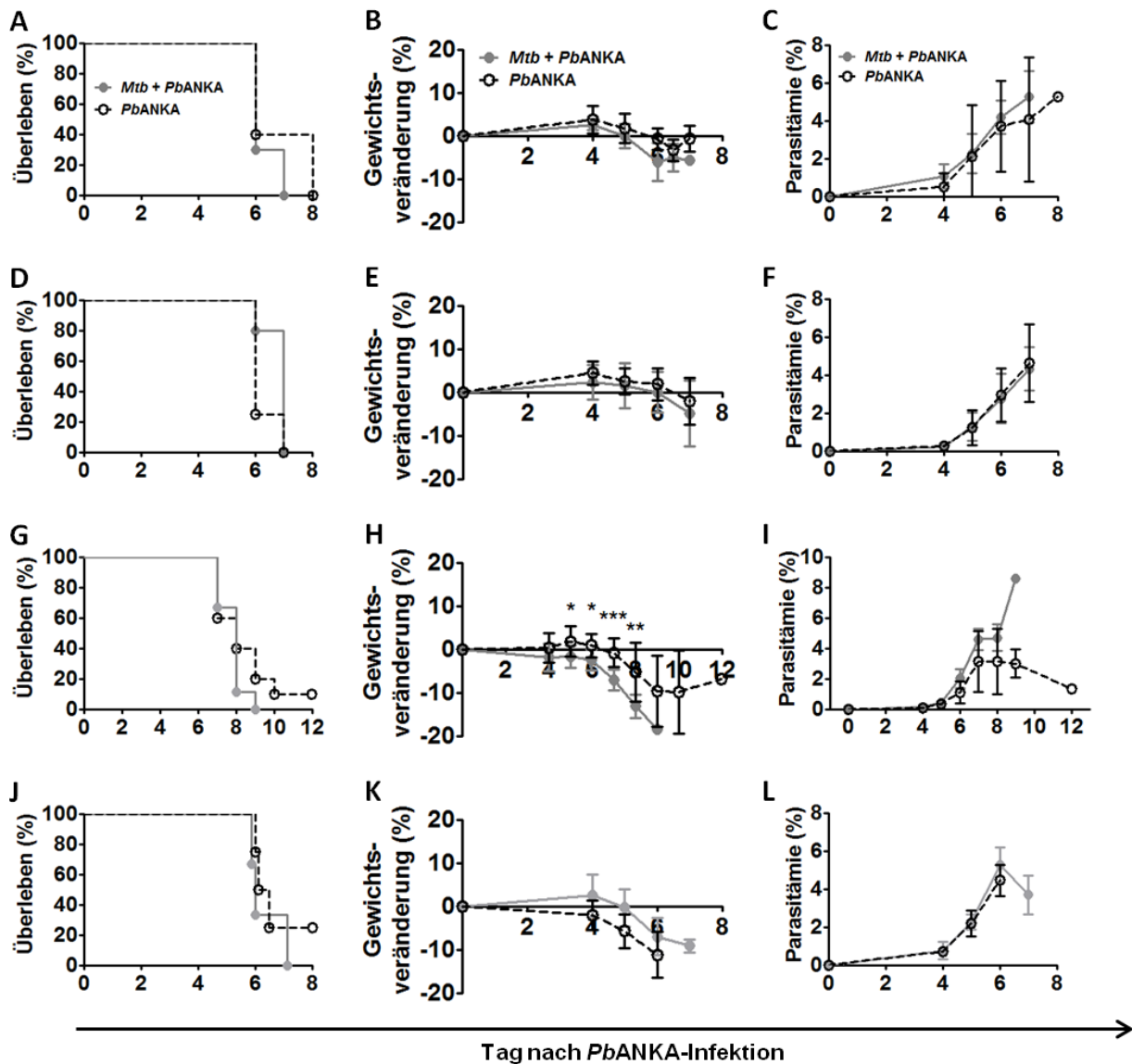
## 3 Ergebnisse

### 3.1 Die *Mtb*-Koinfektion hat keinen Einfluss auf die von *PbANKA*-induzierte EZM in C57BL/6 Mäusen

Verschiedene experimentelle Koinfektionsstudien inklusive die unserer Gruppe haben gezeigt, dass mykobakterielle Infektionen einen gewissen schützenden Effekt auf eine nachfolgende Malariainfektion ausüben (Clark *et al.*, 1976; Matsumoto *et al.*, 2000; Mueller *et al.*, 2012; Murphy, 1981; Page *et al.*, 2005). Dies spiegelt sich insbesondere in einer verringerten Parasitämie in koinfizierten Tieren wider. Interessanterweise kann die Reduktion der Parasitenlast gegen EZM schützen (Baptista *et al.*, 2010; Haque *et al.*, 2011; Mitchell *et al.*, 2005), was vermutlich teilweise auf eine reduzierte Verfügbarkeit an parasitären Antigenen in den kleinen Gefäßen des Gehirns zurückzuführen ist (Howland *et al.*, 2013, 2015). In der vorliegenden Arbeit sollte deswegen untersucht werden, inwiefern eine Infektion mit *Mtb* den Verlauf der *PbANKA*-induzierten EZM begünstigen kann.

#### 3.1.1 Koinfizierte Mäuse entwickeln EZM

Die Infektion von C57BL/6 Mäusen mit *PbANKA* ist das meist verwendete Modellsystem, um die Mechanismen der ZM zu untersuchen. Um den Einfluss einer chronischen Tb-Infektion auf den Verlauf der EZM zu untersuchen, wurden C57BL/6 Mäuse über die Aerosolroute mit dem Laborstamm *Mtb* H37Rv infiziert. 30 Tage später, ein Zeitpunkt, an dem die *Mtb*-Infektion etabliert und die adaptive Immunantwort gegen *Mtb* ausgebildet ist, wurden die Mäuse zusätzlich mit  $1 \times 10^5$  iRBZ i.p. infiziert, was unter Umgehung der Leberphase eine Blutphaseninfektion induziert. Die Leberphase ist in diesem experimentellen Modell nicht notwendig, um eine EZM auszulösen (Kordes *et al.*, 2011). Ab vier Tagen nach der *PbANKA*-Infektion wurde die Parasitämie täglich in Giemsa-gefärbten Blutaussstrichen kontrolliert. Die Untersuchung zeigte keinen Unterschied weder im Gewichtsverlauf noch in der Parasitämie zwischen koinfizierten und *PbANKA*-infizierten Tieren (Abb. 5 B und C). Unabhängig von der *Mtb*-Infektion entwickelten alle Tiere, die mit *PbANKA* infiziert waren, neurologische Symptome wie Ataxie, Tremor und Verlust der Motorik. Dementsprechend erlagen auch alle Tiere nach 6-8 Tagen der *PbANKA*-Infektion, ohne einen signifikanten Unterschied zwischen einzel- und koinfizierten Tieren zu offenbaren (Abb. 5 A).



**Abb. 5: Einfluss einer *Mtb*-Infektion auf die Entwicklung einer EZM in *PbANKA*-infizierten Mäusen.** A-C) C57BL/6 Mäuse wurden über Aerosol mit *Mtb* (Tag 1 KBE 150) und 30 Tage später mit  $1 \times 10^5$  *PbANKA*-iRBZ i.p. infiziert (n = 5-10; ein repräsentatives Experiment von zwei). D-F) C57BL/6 Mäuse wurden über Aerosol mit *Mtb* (Tag 1 KBE 120) und 15 Tage später mit  $1 \times 10^5$  *PbANKA*-iRBZ i.p. infiziert (n = 9-10; das Überleben wurde bei 4-5 Mäusen beobachtet). G-I) C57BL/6 Mäuse wurden über Aerosol mit *Mtb* (Tag 1 KBE 300) und 30 Tage später mit  $1 \times 10^4$  *PbANKA*-iRBZ i.p. infiziert (n = 9-10). J-L) C57BL/6 Mäuse wurden über Aerosol mit *Mtb* (Tag 1 KBE 300) und 30 Tage später mit  $1 \times 10^5$  *PbANKA*-OVA-iRBZ i.p. infiziert (n = 5). Die Parasitämie wurde täglich ab Tag 4 nach der *PbANKA*-Infektion in Blutausstrichen kontrolliert. Die statistische Analyse der Parasitämie und der Gewichtsveränderung erfolgte mit dem Mann Whitney Test (Daten repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (SD)), das Überleben wurde mit dem Log Rank Test ausgewertet. \* p < 0.05; \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.001. Die Experimente D-L wurden einmal durchgeführt. Teile der Daten wurden veröffentlicht (Blank *et al.*, 2015).

Die Manifestation der neurologischen Symptome nach einer *PbANKA*-Infektion erfolgt normalerweise sehr schnell, sodass die Tiere wie auch hier beobachtet etwa 6-8 Tage nach der Infektion sterben. Dieses sehr enge Zeitfenster macht es möglicherweise schwierig, potentielle Effekte der *Mtb*-Infektion auf den Verlauf der EZM zu erkennen. Daher wurde in einem unabhängigen Experiment die *PbANKA*-Infektionsdosis um das zehnfache reduziert.

Dadurch verzögerte sich erwartungsgemäß das Einsetzen der neurologischen Symptome, sodass alle Mäuse außer einer, die keine neurologischen Symptome entwickelte, zwischen Tag 7 und Tag 10 nach der *PbANKA*-Infektion starben (Abb. 5 G). Zwar wurde durch die Koinfektion mit *Mtb* das Gewicht der Tiere signifikant reduziert, jedoch hatte dies keinen Einfluss auf das Überleben im Vergleich zu den *PbANKA*-infizierten Tieren (Abb. 5 G-I). Die Parasitämie war zwischen den beiden Versuchsgruppen vergleichbar, nur eine Maus in der koinfizierten Gruppe entwickelte eine überdurchschnittlich hohe Parasitämie (Abb. 5 I).

Nach Erfahrungen unserer Kooperationspartner ist der transgene *PbANKA*-Stamm, der die MHC-I- und MHC-II-restringierten Epitope des Modellantigens OVA exprimiert (Lundie *et al.*, 2008), weniger virulent als der Wildtypstamm. Da dieser Stamm für spezifische T-Zell-Analysen verwendet werden sollte, wurde untersucht, ob die Koinfektion mit *Mtb* die *PbANKA*-OVA-induzierte EZM beeinflusst. Dafür wurden C57BL/6 Mäuse 30 Tage nach der *Mtb*-Infektion mit  $1 \times 10^5$  *PbANKA*-OVA-iRBZ infiziert und auf das Eintreten von neurologischen Symptomen hin beobachtet. Bei allen koinfizierten und vier von fünf *PbANKA*-OVA-infizierten Mäusen setzten die neurologischen Symptome ein und die Mäuse starben 6-7 Tage nach der *PbANKA*-OVA-Infektion (Abb. 5 J). Die Gewichtsabnahme und der Verlauf der Parasitämie wiesen in den EZM-entwickelnden Mäusen durch die *Mtb*-Infektion ebenfalls keinen Unterschied auf (Abb. 5 K und L). Damit zeigte der transgene Stamm keine abgeschwächte Virulenz im Vergleich zum Wildtypstamm und induzierte die EZM gleichermaßen in koinfizierten und *PbANKA*-OVA-infizierten Mäusen.

In der experimentellen Tb lässt sich eine akute von einer chronischen Phase unterscheiden (siehe Kapitel 1.1.4). In der frühen akuten Phase der *Mtb*-Infektion ist die adaptive Immunantwort des Wirts noch nicht etabliert und die mykobakterielle Vermehrung noch nicht unter Kontrolle. Nach etwa drei Wochen ist die adaptive Immunantwort voll ausgebildet und führt zur Kontrolle des mykobakteriellen Wachstums (Lazarevic *et al.*, 2005). Das immunologische Milieu unterscheidet sich entsprechend zwischen der akuten, durch angeborene Immunantworten dominierte, und der chronischen Phase der experimentellen Tb. Um herauszufinden, ob die akute *Mtb*-Infektion einen Einfluss auf den Verlauf der EZM hat, wurden Mäuse erst über Aerosol mit *Mtb* und 15 Tage nach der *Mtb*-Infektion mit  $1 \times 10^5$  iRBZ infiziert. Auch hier unterschied sich der Krankheitsverlauf zwischen einzel- und koinfizierten Tieren nicht. Alle Mäuse wiesen einen vergleichbaren Gewichtsverlust und eine vergleichbare Parasitämie auf, entwickelten neurologische Symptome und erlagen der EZM zwischen Tag 6 und Tag 7 (Abb. 5 D-F).

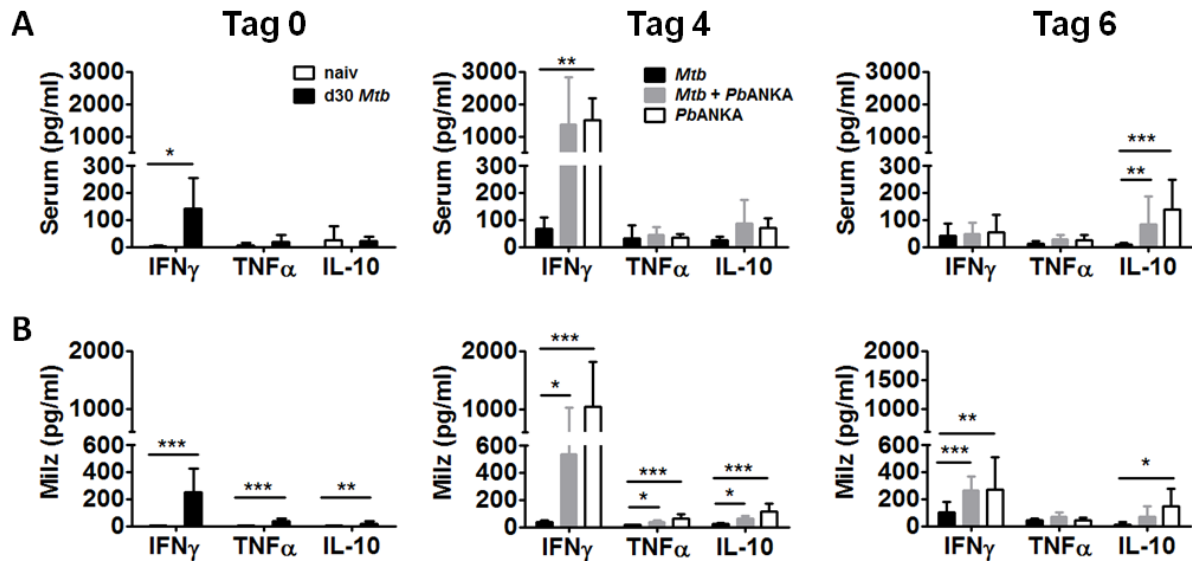
Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass eine zu Grunde liegende *Mtb*-Infektion die Entwicklung der *PbANKA*-induzierten EZM in den hier untersuchten Infektionsmodellen nicht verändert. Dabei verändern sowohl die *PbANKA*-Infektionsdosis als auch der Zeitpunkt der Koinfektion und die damit verbundene *Mtb*-Immunantwort den Verlauf der EZM nicht.

### 3.1.2 Die *Mtb*-Koinfektion hat keinen Einfluss auf die *PbANKA*-induzierte Zytokinantwort

Nachfolgend sollte untersucht werden, inwiefern die *Mtb*-Infektion die Immunantworten, die klassischerweise mit der Entwicklung einer EZM in Zusammenhang stehen, beeinflusst, ohne sich jedoch auf den Krankheitsverlauf auszuwirken. Diese Untersuchungen sollten das Verständnis über die grundlegenden Faktoren, die zur Induktion einer EZM erforderlich sind, erweitern. Dazu wurden alle weiteren Analysen an Mäusen durchgeführt, die 30 Tage nach der *Mtb*-Infektion mit  $1 \times 10^5$  iRBZ infiziert wurden. Nach 30 Tagen ist die bakterielle Vermehrung in der Lunge unter Kontrolle. Nichtsdestotrotz haben sich die Mykobakterien zu diesem Zeitpunkt bereits im Körper ausgebreitet und besiedeln unter anderem auch die Milz, die eine zentrale Rolle bei der Immunität gegen Blutstadien der Malaria spielt (siehe Kapitel 1.2.4). Zu diesem Zeitpunkt induziert die *Mtb*-Infektion also nicht nur eine lokale Immunantwort in der Lunge, sondern auch eine systemische, die mit der Immunantwort gegen die Malariaparasiten in der Milz interferieren könnte.

Zunächst wurden Zytokinanalysen in Serum und Milzlysate von naiven Tieren und Mäusen, die 30 Tage mit *Mtb* infiziert waren, durchgeführt, um den Immunstatus beider Gruppen zum Zeitpunkt der *PbANKA*-Infektion vergleichen zu können. Dafür wurden Blut und Milz entnommen, das Serum gewonnen und die Milz homogenisiert. Die Bestimmung der Zytokinkonzentrationen auf Proteinebene wurde mittels LEGENDplex vorgenommen. Abb. 6 zeigt, dass durch die *Mtb*-Infektion die Produktion von IFN $\gamma$  in Serum und Milz im Vergleich zu naiven Mäusen signifikant erhöht wurde. Ebenso waren die Produktion von TNF $\alpha$  und IL-10 vor der Koinfektion mit *PbANKA* in der Milz von *Mtb*-infizierten Tieren signifikant erhöht. Trotz unterschiedlicher immunologischer Vorprägung waren die Zytokinantworten nach der *PbANKA*-Infektion in vormals naiven oder *Mtb*-infizierten Tieren vergleichbar. Die Zytokinkonzentration in Milz und Serum wurde sowohl vier Tage nach der *PbANKA*-Infektion als auch in moribunden Tieren, die 6-8 Tage nach der *PbANKA*-Infektion getötet wurden, bestimmt. Dabei konnten bei allen Mediatoren keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzel- und koinfizierten Tieren festgestellt werden. Vielmehr waren die Zytokinprofile in koinfizierten Tieren vergleichbar zu denen in *PbANKA*-infizierten Tieren. Dies deutet darauf hin, dass die *PbANKA*-induzierte Immunantwort die *Mtb*-induzierte Immunantwort rasch überschreibt und dominiert.

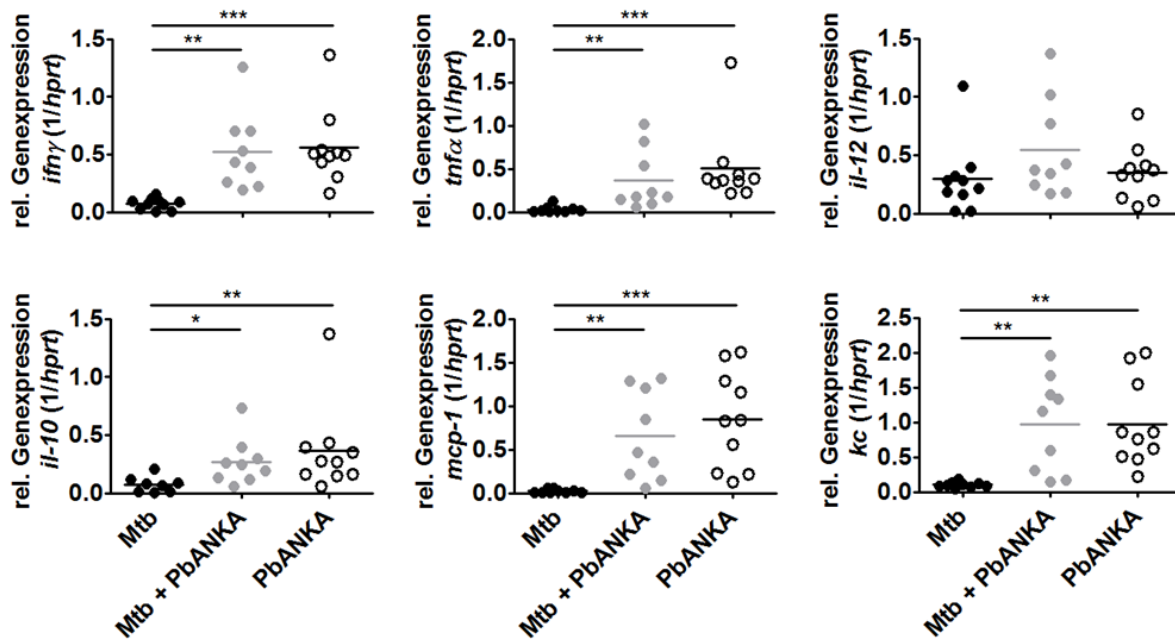
Eine frühe IL-12-Produktion kann die Entwicklung einer EZM durch die zeitige Induktion einer Th1-Immunantwort verhindern (Settles *et al.*, 2014). Deshalb wurde die Konzentration an IL-12 am Tag der Infektion mit *PbANKA* mittels LEGENDplex in Serum und Milz bestimmt. Weder in naiven noch in *Mtb*-infizierten Mäusen konnte IL-12 nachgewiesen werden, da sich die Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze befand. Demensprechend konnte kein Schutz vor EZM durch eine frühe IL-12-Produktion in koinfizierten Tieren induziert werden.



**Abb. 6: Die durch *Mtb* und *PbANKA* induzierten Zytokinantworten in Serum und Milz.** C57BL/6 Mäuse wurden über Aerosol mit *Mtb* (Tag 1 KBE 273 und 86) und 30 Tage später mit  $1 \times 10^5$  *PbANKA*-iRBZ i.p. infiziert. Die Zytokinkonzentrationen wurden in Serum (A) und Milzlysaten (B) von naiven, *Mtb*-, *PbANKA*- und koinfizierten Tieren zu den angegebenen Zeitpunkten nach der *PbANKA*-Infektion mit Hilfe des LEGENDplex gemessen. Die Daten stellen Ergebnisse aus zwei unabhängigen Experimenten dar ( $n = 5-15$ , Mittelwert  $\pm$  SD, Kruskal-Wallis Test mit Dunn's-Mehrfach-Vergleichstest). \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ . Daten wurden veröffentlicht (Blank *et al.*, 2015).

Um die lokale zerebrale Umgebung, die eine wichtige Rolle bei der Initiierung der EZM spielt, beurteilen zu können, wurde die Expression verschiedener Immunmediatoren (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-12, IL-10, MCP-1 und KC) sechs Tage nach der *PbANKA*-Infektion im Gehirn von einzel- und koinfizierten Mäusen untersucht. Dafür wurden die Gehirne entnommen, die RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und das Expressionsniveau der verschiedenen Zytokine mittels qRT-PCR untersucht. Auch hier konnte kein Unterschied zwischen den Versuchsgruppen beobachtet werden. Dabei war die Expression der Mediatoren in den Gehirnen der Mäuse, die nur mit *Mtb* infiziert waren, erwartungsgemäß sehr niedrig (Abb. 7).

Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die chronische *Mtb*-Infektion keinen Einfluss auf das Zytokinmilieu hatte, welches durch die nachfolgende *PbANKA*-Infektion induziert wurde. Da vor allem die Unterschiede der Immunantworten zwischen koinfizierten und *PbANKA*-infizierten Mäusen von Interesse sind, werden im Folgenden nur noch diese beiden Versuchsgruppen miteinander verglichen.

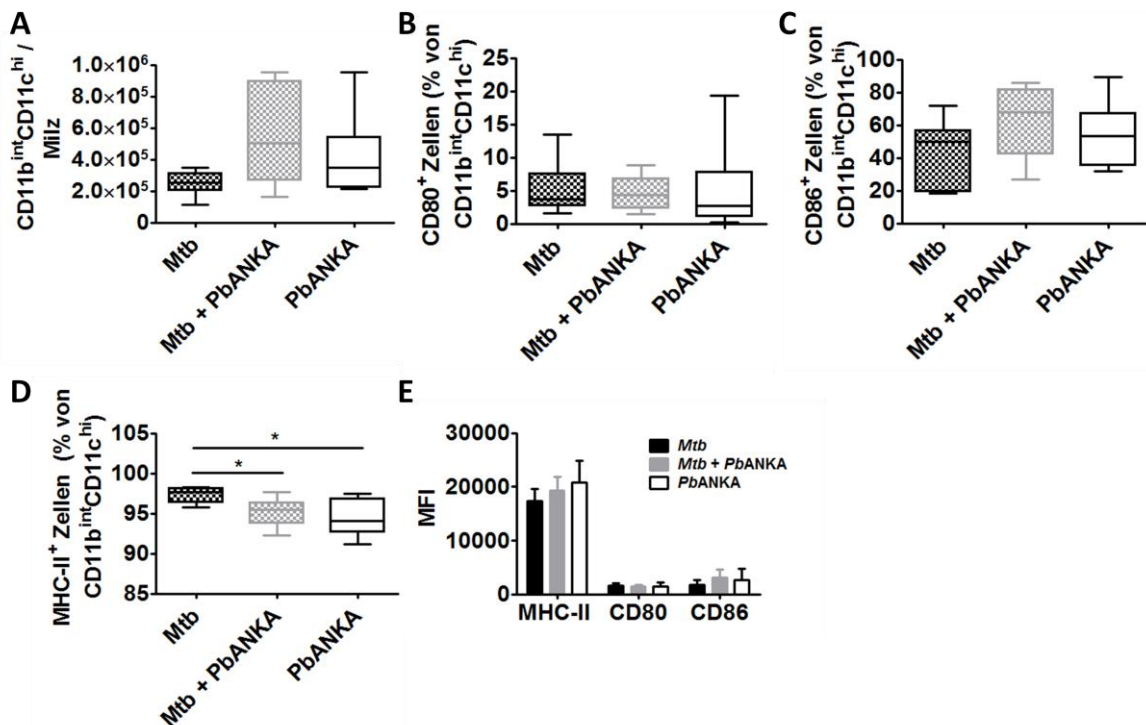


**Abb. 7: Das Expressionsmuster von Chemokinen und Zytokinen im Gehirn.** C57BL/6 Mäuse wurden über Aerosol mit *Mtb* (Tag 1 KBE 635 und 86) und 30 Tage später mit  $1 \times 10^5$  *PbANKA*-iRBZ i.p. infiziert. Die perfundierten Gehirne wurden sechs Tage nach der *PbANKA*-Infektion entnommen, um die RNA zu isolieren und in cDNA umzuschreiben. Mittels qRT-PCR wurde die Chemokin- und Zytokinexpression im relativen Vergleich zum konstitutiv exprimierten Gen HPRT ermittelt. Die Symbole und Balken stellen jeweils einzelne Mäuse und Mittelwerte dar. Die Daten stammen aus zwei unabhängigen Experimenten ( $n = 8-10$ , Kruskal-Wallis Test mit Dunn's-Mehrfach-Vergleichstest). \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ . Daten wurden veröffentlicht (Blank *et al.*, 2015).

### 3.1.3 Die *Mtb*-Koinfektion hat keinen Einfluss auf den Aktivierungsstatus der CD11c<sup>hi</sup> DZ-Population in der Milz

Während der *PbANKA*-Infektion initiieren DZ die parasitenspezifische T-Zell-Antwort in der Milz. Im Zusammenhang mit einer EZM konnte die wichtige Rolle der konventionellen DZ (kDZ) untermauert werden, indem gezeigt wurde, dass die Depletion dieser Zellpopulation die Entwicklung der EZM unterbindet (deWalick *et al.*, 2007). Aufgrund dessen wurde in der vorliegenden Studie untersucht, ob das kDZ-Kompartiment, das durch die Expression von CD11c<sup>hi</sup> charakterisiert ist, durch die zeitgleiche Infektion mit *Mtb* verändert wurde oder der Aktivierungsstatus Unterschiede aufwies. Dafür wurden die Milzen vier Tage nach der *PbANKA*-Infektion isoliert und eine Einzelzellsuspension hergestellt. Für die Färbung und anschließende durchflusszytometrische Analyse wurden  $1 \times 10^6$  Milzzellen eingesetzt, kDZ über spezifische Antikörper identifiziert und hinsichtlich ihrer Expression von kostimulatorischen Molekülen und MHC-II untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass koinfizierte und *PbANKA*-infizierte Mäuse eine vergleichbare Anzahl an kDZ in der Milz aufwiesen (Abb. 8 A). Zusätzlich war der Anteil an kDZ, die MHC-II und die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 exprimierten, sowie deren Expressionsniveau auf der Oberfläche der kDZ, welches man anhand der mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) beurteilen kann, ähnlich (Abb. 8 B-E). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass sowohl

die Anzahl als auch die T-Zell-aktivierenden Eigenschaften von kDZ aus koinfizierten Tieren nicht beeinträchtigt waren.



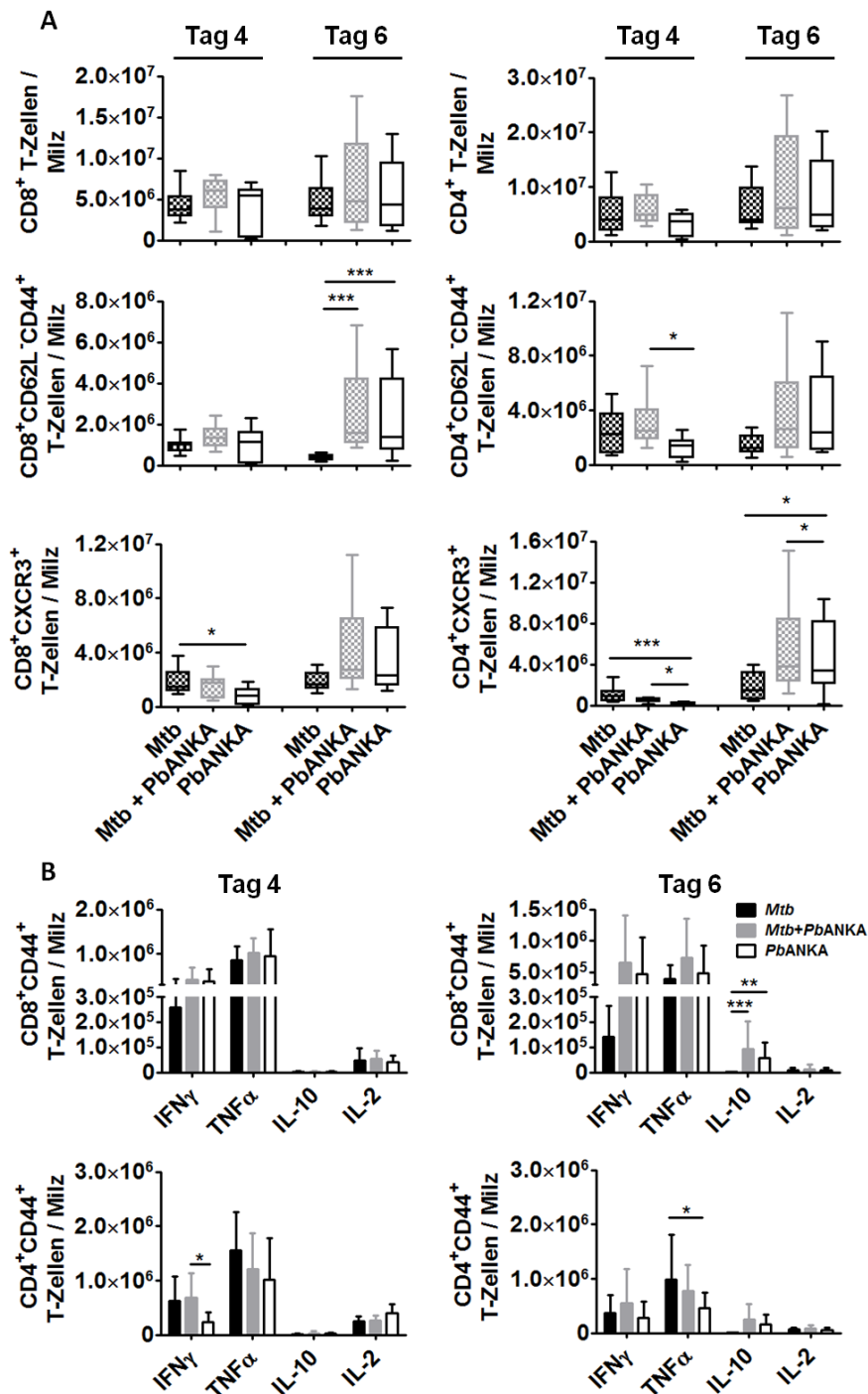
**Abb. 8: Die Koinfektion hat keinen Einfluss auf Anzahl und Aktivierungsstatus der kDZ in der Milz.** C57BL/6 Mäuse wurden über Aerosol mit *Mtb* (Tag 1 KBE 207 und 273) und 30 Tage später mit  $1 \times 10^5$  *PbANKA*-iRBZ i.p. infiziert. Die Milzen wurden vier Tage nach der *PbANKA*-Infektion entnommen und die Einzelzellsuspensionen auf die Anwesenheit und den Aktivierungsstatus von  $CD11b^{int}CD11c^{hi}$  DZ mittels Durchflusszytometrie untersucht. A) Die Milzzellen wurden auf  $CD45^+$  Zellen und weiter auf Ly6G-negative Zellen gated und auf  $CD11b^{int}CD11c^{hi}$  untersucht. B-E)  $CD11b^{int}CD11c^{hi}$  DZ wurden auf ihre Expression von CD80, CD86 und MHC-II untersucht. Die Daten aus zwei unabhängigen Experimenten sind als Box und Whisker Plots mit Median (A-D) oder als Mittelwert  $\pm$  SD (E) gezeigt ( $n = 6-9$ , Kruskal-Wallis Test mit Dunn's-Mehrfach-Vergleichstest). \*  $p < 0.05$ . Die komplette Gatingstrategie kann in Anhang 2 nachvollzogen werden. Daten wurden veröffentlicht (Blank *et al.*, 2015).

### 3.1.4 Die T-Zell-Antworten in der Milz von *PbANKA*-infizierten Tieren werden durch die zeitgleiche *Mtb*-Infektion nicht beeinflusst

Als nächstes wurden die T-Zell-Antworten in der Milz von einzel- und koinfizierten Tieren untersucht. Die Milz stellt den Ort dar, an dem während der *PbANKA*-Infektion das T-Zell-Priming stattfindet. Veränderungen in der T-Zell-Aktivierung in der Milz können sich auf die nachfolgende Rekrutierung von T-Zellen ins Gehirn auswirken. Um potentielle Unterschiede vor und während des Auftretens neurologischer Symptome bestimmen zu können, wurden die Milzen der verschiedenen Versuchsgruppen vier und sechs Tage nach der *PbANKA*-Infektion entnommen, zu Einzelzellsuspensionen verarbeitet und je  $1 \times 10^6$  Milzzellen mit Hilfe von spezifischen Antikörpern auf  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen über durchflusszytometrische Messungen analysiert. Dabei stellte sich heraus, dass die Anzahl sowohl von  $CD4^+$  als auch von  $CD8^+$  T-Zellen in der Milz zwischen koinfizierten und *PbANKA*-infizierten Mäusen kaum

verändert war (Abb. 9 A oben). Sowohl an Tag 4 als auch an Tag 6 nach der *PbANKA*-Infektion waren die CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zell-Zahlen sehr ähnlich und wiesen keinen Unterschied zu den *Mtb*-Kontrolltieren auf. Zusätzlich wurden die T-Zellen auf ihren Effektorphänotyp (CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>) hin untersucht. Die Anzahl von CD8<sup>+</sup> T-Effektorzellen unterschied sich in koinfizierten und *PbANKA*-infizierten Tieren nicht. Die Anzahl an CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup> Effektorzellen war zwar vier Tage nach der *PbANKA*-Infektion in koinfizierten Tieren signifikant erhöht, allerdings war dieser Unterschied im Laufe der Infektion nicht konsistent. Sechs Tage nach der *PbANKA*-Infektion war die Anzahl der T-Effektorzellen beider Gruppen vergleichbar (Abb. 9 A Mitte). Darüber hinaus wurden die T-Zellen auf die Expression von CXC chemokine receptor (CXCR) 3 hin untersucht. Dieser Rezeptor ist notwendig, um die Rekrutierung der T-Zellen aus der Milz ins Gehirn *IFN $\gamma$ -inducible protein-10* (IP-10)-abhängig zu ermöglichen (Nie *et al.*, 2009). Simultane Infektion mit *Mtb* erhöhte vorübergehend die Anzahl CXCR3-exprimierender CD4<sup>+</sup> T-Zellen in koinfizierten Mäusen im Vergleich zu denen, die nur mit *PbANKA* infiziert waren. Beim Einsetzen der neurologischen Symptome waren die Unterschiede allerdings nicht mehr erkennbar. Stattdessen waren die Anzahl CXCR3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen, beide deutlich erhöht gegenüber des zwei Tage früheren Zeitpunkts, vergleichbar zwischen den beiden Gruppen (Abb. 9 A unten).

Die T-Zellen aus der Milz wurden weiterhin hinsichtlich ihrer zytokinproduzierenden Eigenschaften untersucht. Dafür wurden  $1 \times 10^6$  Milzzellen für 4,5 h mit  $\alpha$ CD3e/ $\alpha$ CD28 restimuliert und anschließend mit Antikörpern gegen CD4 und CD8 oberflächlich sowie gegen IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-10 und IL-2 intrazellulär gefärbt. An Tag 4 nach der *PbANKA*-Infektion konnten in allen Versuchsgruppen gleiche Mengen an CD8<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> IFN $\gamma$ -, TNF $\alpha$ - und IL-2-exprimierenden Zellen detektiert werden, wohingegen IL-10 erwartungsgemäß in den CD8<sup>+</sup> T-Zellen kaum nachweisbar war. Ein ähnliches Bild zeigte sich bei den CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> T-Zellen, wobei diese in den *PbANKA*- und koinfizierten Tieren eine IL-10-Produktion zeigten, die sich aber nicht voneinander unterschied (Abb. 9 B links). Die IFN $\gamma$ -produzierenden CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> T-Zellen der koinfizierten Tiere waren im Vergleich zu den *PbANKA*-infizierten Kontrollmäusen signifikant erhöht (Abb. 9 B links). Dieser Unterschied war jedoch zwei Tage später wieder aufgehoben, sodass die koinfizierten Tiere an Tag 6 eine mit *PbANKA*-infizierten Tieren vergleichbare Anzahl IFN $\gamma$ -produzierender CD4<sup>+</sup> T-Zellen aufwiesen (Abb. 9 B rechts). Darüber hinaus unterschied sich die Anzahl zytokinproduzierender T-Zellen sechs Tage nach der *PbANKA*-Infektion zwischen koinfizierten und *PbANKA*-Kontrolltieren nicht (Abb. 9 B rechts). Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die zu Grunde liegende *Mtb*-Infektion die T-Zell-Antworten in *PbANKA*-infizierten Mäusen in der Milz nicht maßgeblich verändert hat.



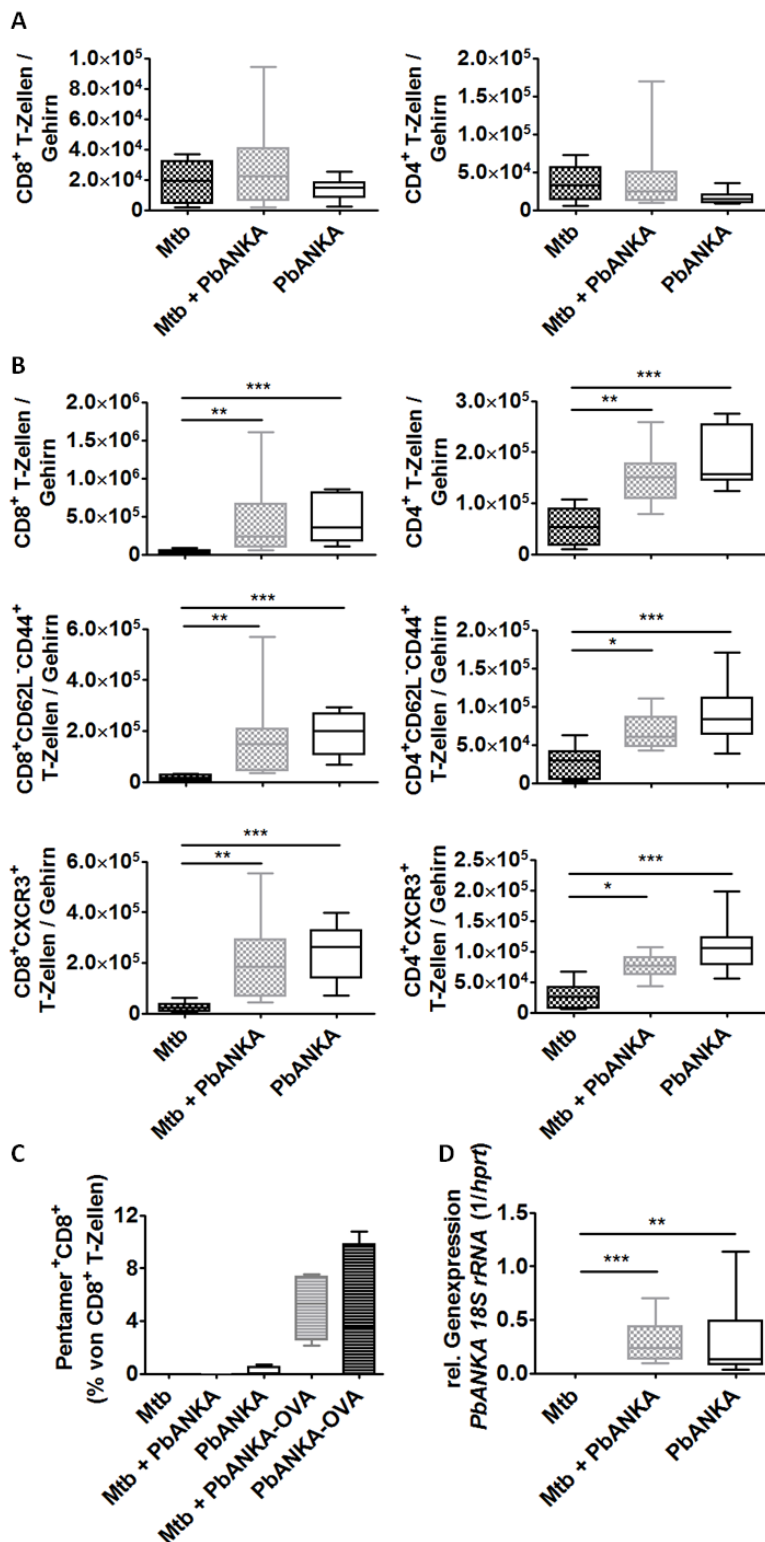
**Abb. 9: Die T-Zell-Antworten in der Milz nach der Koinfektion mit *PbANKA*.** C57BL/6 Mäuse wurden über Aerosol mit *Mtb* (Tag 1 KBE 207, 237 und 635) und 30 Tage später mit  $1 \times 10^5$  *PbANKA*-iRBZ i.p. infiziert. Die Milzen wurden vier und sechs Tage nach der *PbANKA*-Infektion entnommen und die CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen in Einzelzellsuspensionen analysiert. A) Milzzellen wurden auf CD90.2 gated und die Anzahl an CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen bestimmt ebenso wie die Anzahl an T-Effektorzellen (CD62L<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>) und an CXCR3-exprimierenden Zellen. Die Daten sind als Box und Whisker Plots mit Median dargestellt. B) Die Milzzellen wurden *ex vivo* mit  $\alpha$ CD3e/ $\alpha$ CD28 restimuliert (jeweils 5  $\mu$ g/ml) und die CD44-positiven CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen auf die Produktion von IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-10 und IL-2 untersucht. Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SD dargestellt. Die Daten stammen aus zwei (Tag 4) oder drei (Tag 6) unabhängigen Experimenten (n = 8-15, Kruskal-Wallis Test mit Dunn's-Mehrfach-Vergleichstest). \* p < 0.05; \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.001. Die vollständige Gatingstrategie kann in Anhang 3 und 4 nachvollzogen werden. Daten wurden veröffentlicht (Blank *et al.*, 2015).

### 3.1.5 Die Sequestrierung von Parasiten und antigenspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Gehirn von *PbANKA*-infizierten Mäusen erfolgt ungeachtet der zeitgleichen *Mtb*-Infektion

Die Ausbildung der EZM wird mit der Sequestrierung von Leukozyten im Gehirn in Verbindung gebracht. Speziell parasitenspezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen sind für die Immunpathologie im Verlauf der EZM verantwortlich, da sie die Blut-Hirn-Schranke durch ihre zytotoxische Aktivität zerstören (Haque *et al.*, 2011; Nitcheu *et al.*, 2003). Aufgrund dessen wurde untersucht, ob die Koinfektion mit *Mtb* die *PbANKA*-induzierte T-Zell-Infiltration ins Gehirn verändert.

Dafür wurden die Gehirne von allen Versuchsgruppen vier und sechs Tage nach der *PbANKA*-Infektion entnommen und homogenisiert. Die Einzelzellsuspensionen wurden mittels Durchflusszytometrie auf T-Zellen untersucht. Vier Tage nach der *PbANKA*-Infektion war die Anzahl an T-Zellen im Gehirn von einzel- und koinfizierten *PbANKA*-Tieren gering und wies keinen erkennbaren Unterschied zwischen den beiden Gruppen auf (Abb. 10 A). Sechs Tage nach der *PbANKA*-Infektion war ein Anstieg in der Anzahl an T-Zellen verglichen mit den *Mtb*-Kontrolltieren, bei denen die Anzahl erwartungsgemäß konstant blieb, in koinfizierten und *PbANKA*-infizierten Tieren zu beobachten, jedoch war kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen erkennbar (Abb. 10 B oben). Gleiches traf auf die Anzahl an CD62L<sup>-</sup>CD44<sup>+</sup> (Effektor-Phänotyp) und CXCR3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu (Abb. 10 B Mitte und unten).

Die gerade geschilderten Ergebnisse beschreiben die Rekrutierung von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen ins Gehirn ohne Berücksichtigung der Antigenspezifität der rekrutierten T-Zellen. Um zu untersuchen, ob eine *Mtb*-Infektion die Sequestrierung von parasitenspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Gehirn verändert, wurde der transgene *PbANKA*-OVA-Stamm eingesetzt. Dieser transgene Parasitenstamm induziert einen zum WT vergleichbaren Verlauf einer EZM (Kapitel 3.1.1). Drei Tage nach der *PbANKA*-OVA-Infektion wurden OT1 T-Zellen, deren T-Zell-Rezeptor spezifisch für MHC-I-präsentiertes SIINFEKL des OVA ist, aus Milzen von OT1-Mäusen über magnetische Separierung isoliert und  $2 \times 10^6$  OT1 T-Zellen adoptiv in einzel- und koinfizierte Mäuse transferiert. Weitere drei Tage später (Tag 6 nach *PbANKA*-Infektion) wurden die Gehirne der Mäuse entnommen und auf das Vorhandensein von OT1 T-Zellen untersucht. Dazu wurden Einzelzellsuspensionen mit einem spezifischen OT1-Pentamer angefärbt und durchflusszytometrisch identifiziert. Abb. 10 C zeigt, dass Pentamer<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen in *PbANKA*-einzel- und koinfizierten Mäusen nachgewiesen werden konnten. Erwartungsgemäß zeigten die Kontrollgruppen, die mit dem *PbANKA*-WT-Stamm infiziert wurden, keine oder kaum OT1 T-Zellen im Gehirn. Die Anzahl an Pentamer<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen war zwar leicht, aber nicht signifikant in den Gehirnen von koinfizierten Tieren im Vergleich zu denen, die nur mit *PbANKA*-OVA infiziert waren, erhöht (Abb. 10 C).



**Abb. 10: Die Koinfektion mit *Mtb* hat keinen Einfluss auf die *PbANKA*-induzierte Sequestrierung von T-Zellen und Parasiten ins Gehirn.** A und B) C57BL/6 Mäuse wurden über Aerosol mit *Mtb* (Tag 1 KBE 237 und 635) und 30 Tage später mit  $1 \times 10^5$  *PbANKA*-iRBZ i.p. infiziert. Die perfundierten Gehirne wurden vier (A) oder sechs (B) Tage nach der *PbANKA*-Infektion entnommen und auf die Anwesenheit und den Aktivierungsstatus von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen mittels Durchflusszytometrie untersucht. Die Gehirnzellen wurden über CD45 ausgewählt und die Anzahl an CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen analysiert. Außerdem wurde die Anzahl an T-Effektorzellen (CD62L<sup>-</sup>CD44<sup>+</sup>) und CXCR3-exprimierenden CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen bestimmt. Die Daten aus zwei unabhängigen Experimenten sind als Box und Whisker Plots mit Median dargestellt (n = 8-10 in A; n = 10 in B, Kruskal-Wallis Test mit Dunn's-Mehrfach-Vergleichstest).

C) C57BL/6 Mäuse wurden über Aerosol mit *Mtb* (Tag 1 KBE 131) und 30 Tage später mit  $1 \times 10^5$  *PbANKA*- oder *PbANKA*-OVA-iRBZ i.p. infiziert. Drei Tage später wurden  $2 \times 10^6$  OT-1 T-Zellen i.v. adoptiv transferiert. Die perfundierten Gehirne wurden sechs Tage nach der *PbANKA*-OVA-Infektion entnommen und auf die Anwesenheit von CD45<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>MHC-I Pentamer<sup>+</sup> T-Zellen analysiert. Die Daten sind als Box und Whisker Plots mit Median dargestellt (n = 4). D) C57BL/6 Mäuse wurden über Aerosol mit *Mtb* (Tag 1 KBE 635 und 86) und 30 Tage später mit  $1 \times 10^5$  *PbANKA*-iRBZ i.p. infiziert. Die perfundierten Gehirne wurden

sechs Tage nach der *PbANKA*-Infektion entnommen und die Parasitenlast anhand parasitenspezifischer 18S rRNA Transkription (Expression relativ zum Haushaltsgen HPRT) bestimmt. Die Daten aus zwei unabhängigen Experimenten sind als Box und Whisker Plots mit Median dargestellt (n = 9-10, Kruskal-Wallis Test mit Dunn's-Mehrfach-Vergleichstest). \* p < 0.05; \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.001. Die vollständige Gatingstrategie befindet sich in Anhang 5 und 6. Daten wurden veröffentlicht (Blank *et al.*, 2015).

Zusätzlich zu der Sequestrierung von Leukozyten wird die Ausbildung der EZM mit der Sequestrierung von Parasiten im Gehirn assoziiert. Um die Anwesenheit und Menge von Parasiten im Gehirn zu bestimmen, wurde dieses sechs Tage nach der *PbANKA*-Infektion aus perfundierten Mäusen entnommen, die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurde die 18S rRNA der Parasiten mittels qRT-PCR bestimmt. Dabei stellte sich heraus, dass in den Gehirnen beider Versuchsgruppen *PbANKA*-18S rRNA vorhanden war (Abb. 10 D). Es konnte jedoch kein Unterschied zwischen einzel- und koinfizierten Mäusen festgestellt werden.

Zusammenfassend kann man aus den beschriebenen Daten schließen, dass sowohl die Parasiten- als auch die T-Zell-Sequestrierung im Gehirn von *PbANKA*-infizierten Mäusen durch die zusätzliche *Mtb*-Infektion nicht verändert wurde.

### **Zusammenfassung der Ergebnisse 3.1**

- Der Verlauf einer *PbANKA*-induzierten EZM unterscheidet sich nicht in naiven oder *Mtb*-infizierten Tieren; unabhängig von der Anzahl der applizierten iRBZ und dem Zeitpunkt der Koinfektion (während akuter oder chronischer Phase der *Mtb*-Infektion)
- Immunologisch wurden keine Unterschiede nach der *PbANKA*-Infektion zwischen naiven und *Mtb*-infizierten Tieren nachgewiesen:
  - Trotz unterschiedlicher immunologischer Vorprägung ist das Zytokinmilieu nach *PbANKA*-Infektion in Milz und Serum vergleichbar
  - Anzahl und Aktivierungszustand der kDZ in der Milz sind vergleichbar
  - T-Zell-Antworten in der Milz sind vergleichbar
  - Die Parasiten- und CD8<sup>+</sup> T-Zell-Sequestrierung im Gehirn erfolgt in koinfizierten und *PbANKA*-infizierten Mäusen gleichermaßen

## 3.2 Eine Episode der nicht letalen *Py*-Infektion verschlechtert vorübergehend den Verlauf einer experimentellen *Tb*-Infektion

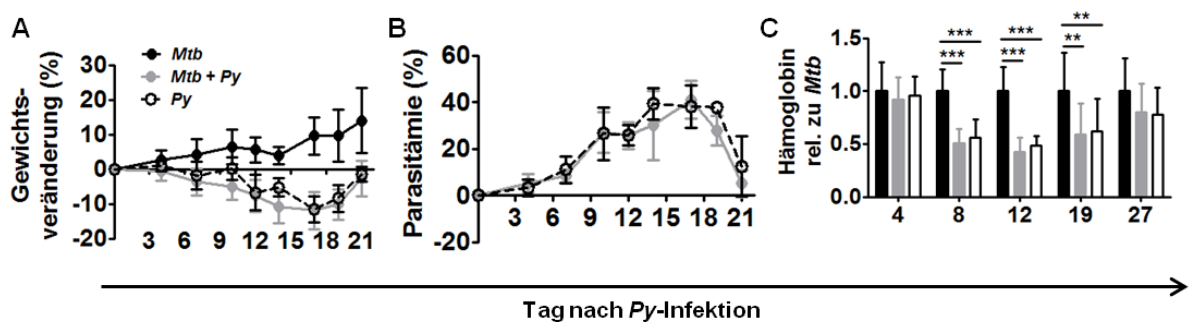
Die Bedeutung der Malaria geht weit über die unmittelbar mit der Infektion verbundenen Morbidität und Mortalität hinaus. Sowohl symptomatische als auch asymptomatische Malariainfektionen können das Immunsystem des Wirts modulieren, was als mögliche Ursache für das erhöhte Auftreten von Sekundärinfektionen bei Malariapatienten, vor allem Kindern, diskutiert wird (Scott *et al.*, 2011; Takem *et al.*, 2014; Troye-Blomberg and Berzins, 2008; Whittle *et al.*, 1990). Experimentelle Koinfektionsstudien bestätigen, dass eine Malariainfektion sekundäre Infektionen mit Bakterien wie Salmonellen oder Viren wie Epstein-Barr-Virus begünstigen kann (Correa *et al.*, 1980; Cunnington and Riley, 2010a, 2010b; Greenwood *et al.*, 1972; Scott *et al.*, 2011; Takem *et al.*, 2014; Troye-Blomberg and Berzins, 2008; Walther *et al.*, 2012, 2005; Warren and Weidanz, 1976; Whittle *et al.*, 1990). Einige Studien zeigen in diesem Zusammenhang, dass auch eine mykobakterielle Infektion durch eine Koinfektion mit verschiedenen murinen Malariaerregern verschlimmert wird, was sich hauptsächlich in einer verringerten Kontrolle der bakteriellen Keimlast widerspiegelt (Hawkes *et al.*, 2010; Mueller *et al.*, 2012; Scott *et al.*, 2004). Die zu Grunde liegenden immunologischen Mechanismen sind allerdings nach wie vor wenig beforscht. In der vorliegenden Arbeit wurde der nicht letale *Py*-Stamm verwendet, um den Einfluss einer Malariainfektion auf die experimentelle *Tb* zu untersuchen. Der Erreger wurde ausgewählt, da er eine selbstlimitierende Infektion in C57BL/6 Mäusen hervorruft, wodurch Langzeitbeobachtungen der Mäuse möglich waren. Dadurch konnten sowohl akute wie auch andauernde immunologische Veränderungen und deren Konsequenzen auf den Verlauf der *Tb* in dem Koinfektionsmodell untersucht werden.

In der folgenden Untersuchung wurden Mäuse zuerst mit *Mtb* infiziert, sodass sich die Infektion etablieren und die Tiere eine spezifische Immunantwort gegen *Mtb* ausbilden konnten. Anschließend erfolgte die Infektion mit *Py*, um zu untersuchen, inwiefern sich eine Episode dieser selbstlimitierenden Malariainfektion auf das immunologische Gleichgewicht und die Kontrolle der *Mtb*-Infektion in der Lunge auswirkt.

### 3.2.1 Unveränderter Verlauf einer *Py*-Infektion in naiven und *Mtb*-infizierten Mäusen

Um den Einfluss einer *Py*-Infektion auf den Verlauf einer experimentellen *Tb* zu untersuchen, wurden C57BL/6 Mäuse über die natürlich Aerosolroute in einer geringen Dosis mit dem Laborstamm *Mtb* H37Rv infiziert. Nach 30 Tagen wurden die Tiere mit  $1 \times 10^5$  *Py*-iRBZ i.p. infiziert. Die Parasitämie wurde ab Tag 4 nach der *Py*-Infektion alle 2-3 Tage mittels Giemsa-gefärbten Blutausstrichen kontrolliert. *Py*-infizierte Mäuse entwickelten erwartungsgemäß eine hohe Parasitämie (Abb. 11 B), die bis zu 50 % der RBZ betreffen kann (Bousema *et al.*, 2014). Interessanterweise unterschied sich die Parasitämie in koinfizierten Tieren nicht von der in *Py*-infizierten Tieren. Dementsprechend war auch der anämische Zustand der Tiere

aus beiden Versuchsgruppen, welcher anhand des Hämoglobinwerts bestimmt wurde, während der akuten *Py*-Infektion vergleichbar (Abb. 11 C). Dieser fiel erwartungsgemäß mit steigender Parasitämie in *Py*-infizierten Tieren verglichen mit denen, die nur *Mtb*-infiziert waren, ab (Abb. 11 B und C). Der Grund dafür ist, dass vermehrt Erythrozyten platzen oder durch die Milz aus dem Kreislauf entfernt werden. Die akute Malariainfektion ging mit einem Gewichtsverlust einher, sodass *Py*- und koinfizierte Tiere in den ersten zwei Wochen nach *Py*-Infektion ungefähr 10 % des Gewichts verloren (Abb. 11 A). Na etwa drei Wochen, mit Ausklang der Blutstadieninfektion, erreichten die Tiere aus beiden Versuchsgruppen jedoch wieder das Ursprungsgewicht. Zusammenfassend kann man aus diesen Daten schließen, dass der Verlauf der Malariainfektion durch die zugrunde liegende *Mtb*-Infektion nicht verändert wurde.

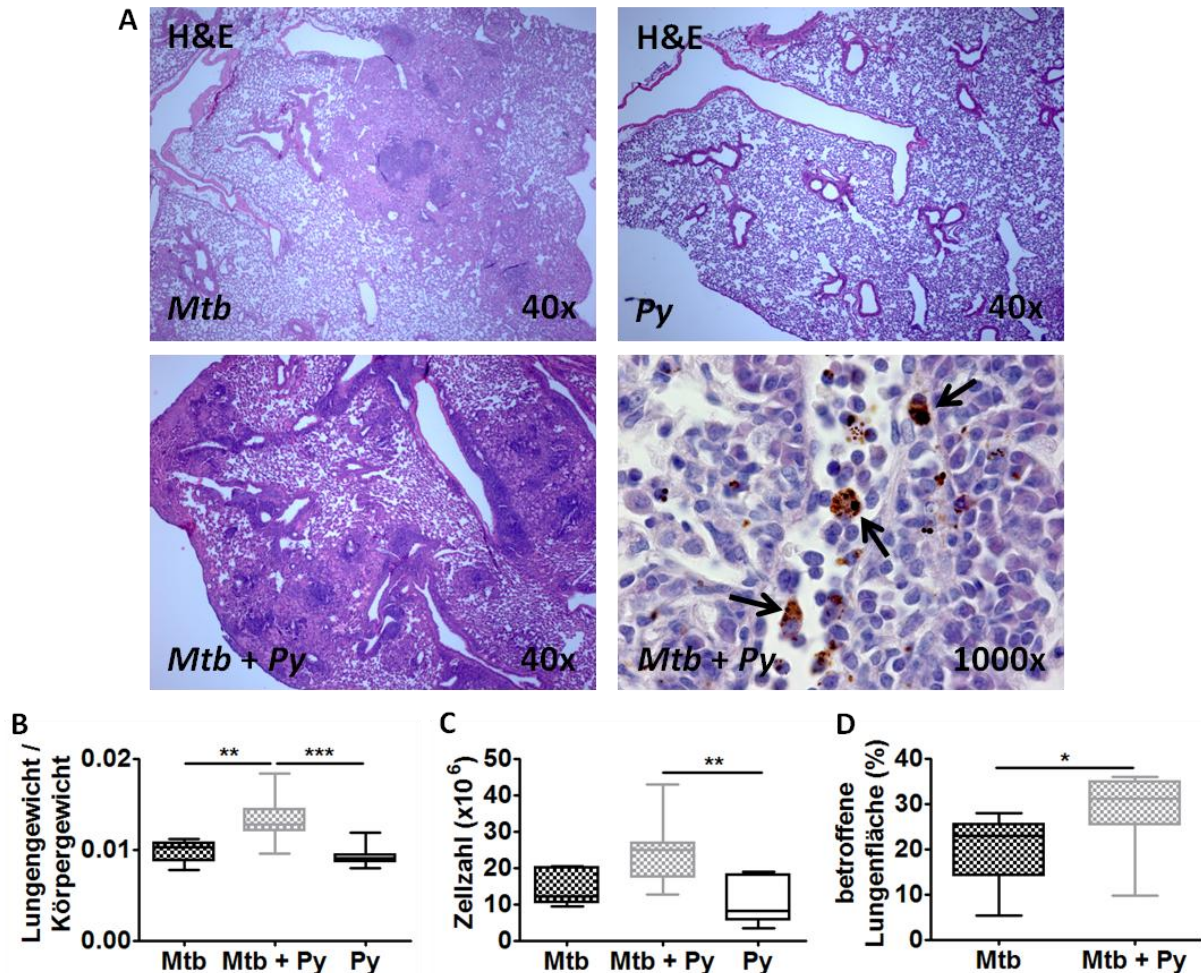


**Abb. 11: Der Verlauf der *Py*-Infektion bleibt unverändert.** C57BL/6 Mäuse wurden über Aerosol (A und B 204 KBE an Tag 1; C 312 KBE an Tag 1) mit *Mtb* H37Rv und 30 Tage später mit  $1 \times 10^5$  *Py*-iRBZ infiziert. A und B) Der Gewichtsverlauf und die Parasitämie wurden alle 2-3 Tage ab Tag 4 nach der *Py*-Infektion bestimmt (n = 7-8; ein repräsentatives Experiment von drei). C) Ab Tag 4 nach der *Py*-Infektion wurde die Hämoglobinkonzentration im Blut bestimmt, indem 2  $\mu$ l Blut aus der Schwanzvene in Drabkin's Lösung, die mit Brij L23 Lösung versetzt war, verdünnt und bei 540 nm gemessen wurde (n = 13-24). Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Kruskal-Wallis Test mit Dunn's multiplum Vergleich. Die Daten stellen den Mittelwert  $\pm$  SD dar. \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001. Daten wurden veröffentlicht (Blank *et al.*, 2016).

### 3.2.2 Eine *Py*-Infektion verstärkt die Lungenpathologie in *Mtb*-infizierten Mäusen

*Mtb*-Infektionen führen zu zellulären Infiltrationen und Bildung von Läsionen in der Lunge, die ein besonderes pathologisches Merkmal dieser Krankheit definieren (Flynn, 2006). Diese Läsionen, die in der Maus überwiegend aus Makrophagen und Lymphozyten zusammengesetzt sind, sind notwendig, um die Infektion räumlich zu begrenzen und zu kontrollieren (Russell, 2007). Eine unkontrollierte Entzündung führt jedoch zu einer Verschlechterung der Erkrankung (O'Garra *et al.*, 2013). Um histopathologische Unterschiede in *Mtb*- und koinfizierten Lungen zu untersuchen, wurden C57BL/6 Mäuse über Aerosol mit *Mtb* und 30 Tage später mit  $1 \times 10^5$  *Py*-iRBZ infiziert. 21 Tage nach der *Py*-Infektion (Tag 51 nach *Mtb*-Infektion) wurde ein Lungenlappen entnommen, in 4 % PFA fixiert und in Paraffin eingebettet. Davon wurden 4  $\mu$ m Schnitte angefertigt und H&E gefärbt. Die Lungen von koinfizierten Tieren wiesen eine stärkere zelluläre Infiltration im Vergleich zu Lungen aus *Mtb*-infizierten Tieren auf (Abb. 12 A). Dabei war außerdem

auffällig, dass die koinfizierten Lungen eine größere Anzahl an Läsionen aufwiesen, die diffus über den gesamten Lungenflügel verteilt lagen (Abb. 12 A unten links). Im Vergleich zu den *Mtb*-infizierten Versuchsgruppen wiesen die Lungen von Mäusen, die nur mit *Py* infiziert waren, erwartungsgemäß keine Läsionen auf (Abb. 12 A oben rechts).



**Abb. 12: *Py*-Koinfektion führt zu verstärkter Lungenpathologie in *Mtb*-infizierten Mäusen.** C57BL/6 Mäuse wurden über Aerosol mit *Mtb* H37Rv (Tag 1 204 und 104 KBE in B; Tag 1 312 KBE in A, C und D) und 30 Tage später mit  $1 \times 10^5$  *Py*-iRBZ i.p. infiziert. Die Lungen wurden 21 Tage nach der *Py*-Infektion (Tag 51 nach *Mtb*-Infektion) entnommen und die Pathologie anhand A) H&E-Färbung, B) Lungengewicht, C) Gesamtzellzahl und D) lädierter Lungenfläche bestimmt. A) Ein Lungenlappen wurde in 4 % PFA fixiert und in Paraffin eingebettet. 4  $\mu$ m dicke Paraffinschnitte wurden mit H&E angefärbt und histopathologisch untersucht. Dargestellt ist jeweils eine repräsentative Aufnahme von 7-8 Tieren pro Gruppe. Die braunen Pigmente zeigen Hämozytoblagerungen (Pfeile). B) Das Lungengewicht in Relation zum Körpergewicht wurde in zwei unabhängigen Experimenten bestimmt (n = 9-15). C) Gesamtzellzahl Lunge ermittelt über Vi-Cell-Counter nach Homogenisierung (n = 6-8). D) Quantifizierung der betroffenen Lungenfläche anhand H&E-gefärbter Lungenschnitte wie in A dargestellt. Die Auswertung erfolgte mit der Software Cell<sup>^</sup>B (n = 7-8). Die Daten sind als Box und Whisker Plots mit Median dargestellt und statistisch mit dem Kruskal-Wallis mit Dunn's-Mehrfach-Vergleichstest (B, C) oder dem Mann-Whitney Test ausgewertet (D). Teile der Daten wurden veröffentlicht (Blank *et al.*, 2016).

Die Auswertung der mikroskopischen Aufnahmen von *Mtb*- und koinfizierten Lungen mit Hilfe einer Flächenbestimmung des Programms Cell<sup>^</sup>B ergab, dass die von Infiltraten

betroffene Fläche in den Lungen von koinfizierten Tieren im Vergleich zu den Tieren, die nur mit *Mtb* infiziert waren, signifikant erhöht war (Abb. 12 D). Dementsprechend war die Gesamtzellzahl in den Lungen, die über eine Zellzählung einer Lungeneinzelzellsuspension ermittelt wurde, in koinfizierten Mäusen signifikant erhöht (Abb. 12 C). Unterstützend zu diesen Beobachtungen konnte weiterhin festgestellt werden, dass die Lungen von koinfizierten Tieren im Vergleich zu denen, die nur mit *Mtb* infiziert waren, ein höheres Gesamtgewicht hatten (Abb. 12 B). Die Lungen von Mäusen, die nur mit *Py* infiziert waren, wiesen das geringste Gewicht und die niedrigste Zellzahl aller drei Versuchsgruppen auf (Abb. 12 B und C).

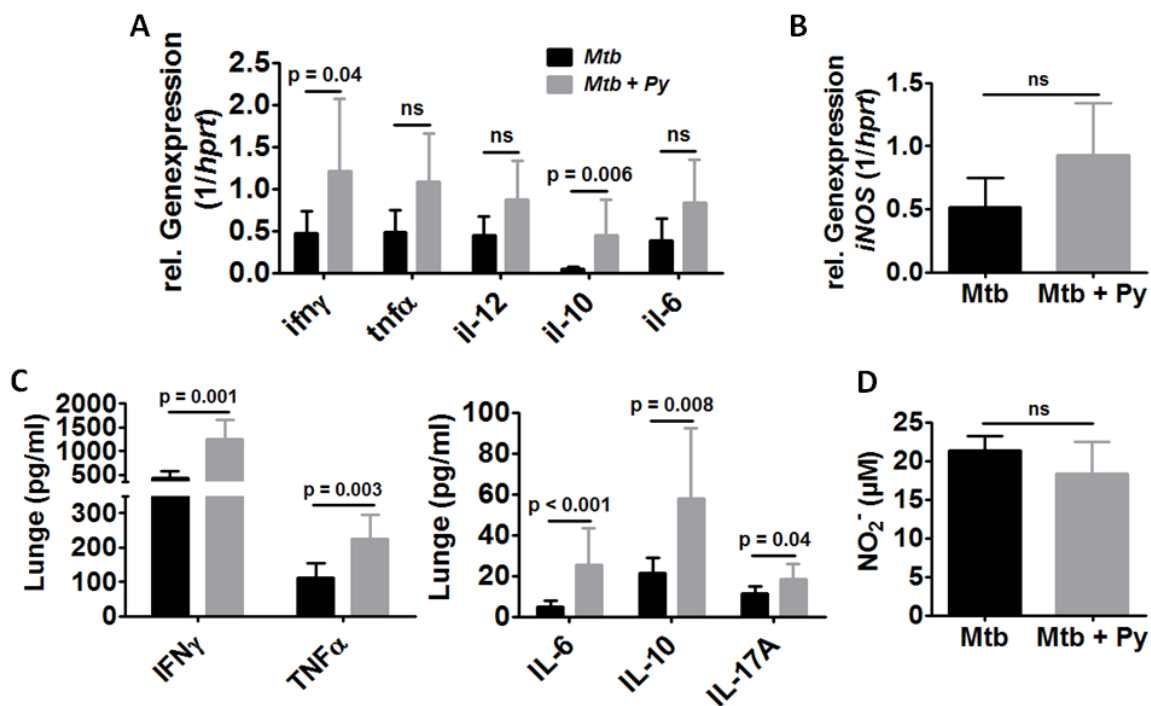
Detaillierte mikroskopische Analysen offenbarten weiterhin die Ablagerung von Hämozin (Hz) in den Lungen von koinfizierten Mäusen (Abb. 12 A unten rechts, Pfeile). Hz ist das sogenannte Malariapigment, das entsteht, wenn der Parasit das Hämoglobin der Wirtszelle abbaut und das für ihn toxische Häm in kristalline Strukturen umwandelt. Es ist aufgrund seines Eisengehalts lichtmikroskopisch als dunkelbraune Aggregate zu erkennen (Boura *et al.*, 2013). Aufgrund seiner immunmodulatorischen Eigenschaften (Boura *et al.*, 2013; Shio *et al.*, 2010) könnte es zu einer verstärkten Entzündung und damit Pathologie beitragen.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass aufgrund der *Py*-Infektion eine verstärkte Zellinfiltration in koinfizierten im Vergleich zu *Mtb*-einfach infizierten Tieren zu erkennen war. Diese spiegelte sich in einer größeren von Infiltraten betroffenen Fläche, einer erhöhten Gesamtzellzahl und einem erhöhten Gewicht der Lungen aus koinfizierten Tieren wider.

### 3.2.3 Die *Py*-Koinfektion verstärkt die Zytokinantworten in der Lunge *Mtb*-infizierter Mäuse

Eine ausgeglichene Immunantwort an pro- und anti-entzündlichen Zytokinen ist auf verschiedenen Ebenen notwendig. Auf der einen Seite ist es wichtig, eine schützende pro-entzündliche Immunantwort zu initiieren, um das mykobakterielle Wachstum einzuschränken, auf der anderen Seite muss trotzdem gewährleistet werden, dass die Immunpathologie vermieden und damit der Erhalt des Gewebes garantiert wird (Orme *et al.*, 2014; Torrado and Cooper, 2013). Um den Einfluss einer *Py*-Infektion auf verschiedene pro- und anti-entzündliche Zytokine in der Lunge von *Mtb*-infizierten Tieren zu untersuchen, wurden diese 21 Tage nach der *Py*-Infektion auf mRNA- und Proteinebene bestimmt. Für die mRNA-Analysen wurde ein Lungenflügel aus den Mäusen entnommen, die RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels qRT-PCR die relative Expression bestimmt. Da die *Py*-Infektion alleine kaum Einfluss auf die Lunge ausübt, wurde bei nachfolgenden Untersuchungen der Fokus auf den Vergleich von koinfizierten und *Mtb*-infizierten Mäusen gelegt. Dabei zeigte sich, dass sowohl die IFN $\gamma$ - als auch die IL-10-Expression in koinfizierten Lungen verglichen mit den Lungen aus *Mtb*-infizierten Mäusen signifikant erhöht war (Abb. 13 A). Die Proteinkonzentrationen verschiedener Zytokine wurden aus Lungenhomogenat mittels LEGENDplex bestimmt. Auf Proteinebene waren zusätzlich zu den eben genannten

Zytokinen TNF $\alpha$ , IL-6 und IL-17A in koinfizierten im Vergleich zu *Mtb*-infizierten Tieren signifikant erhöht (Abb. 13 C). IL-10 ist dafür bekannt, anti-entzündliche Funktionen zu induzieren. Dazu gehört z.B. die Inhibition von antimikrobiellen Effektorfunktionen in Makrophagen, wozu unter anderem die Produktion von Nitritoxid (NO) gehört (Schreiber *et al.*, 2009). Die erhöhte IL-10-Produktion ließ deshalb Grund zur Annahme, dass dieser Effektormechanismus beeinträchtigt sein könnte. Deswegen wurde die mRNA-Expression der induzierbaren Nitritoxid-Synthase (iNOS) und die Produktion von NO im Lungengewebe gemessen. Hierbei stellte sich heraus, dass weder die iNOS-Expression (Abb. 13 B) noch die Freisetzung von NO (Abb. 13 D) beeinträchtigt waren. Zusammenfassend lässt sich schließen, dass die Produktion von sowohl pro- als auch anti-entzündlichen Zytokinen im Lungengewebe von koinfizierten im Vergleich zu *Mtb*-Tieren erhöht war. Die durch die *Py*-Koinfektion bedingte erhöhte Produktion von IL-10 führte dabei nicht zur Inhibition der iNOS-Expression und der NO-Produktion.

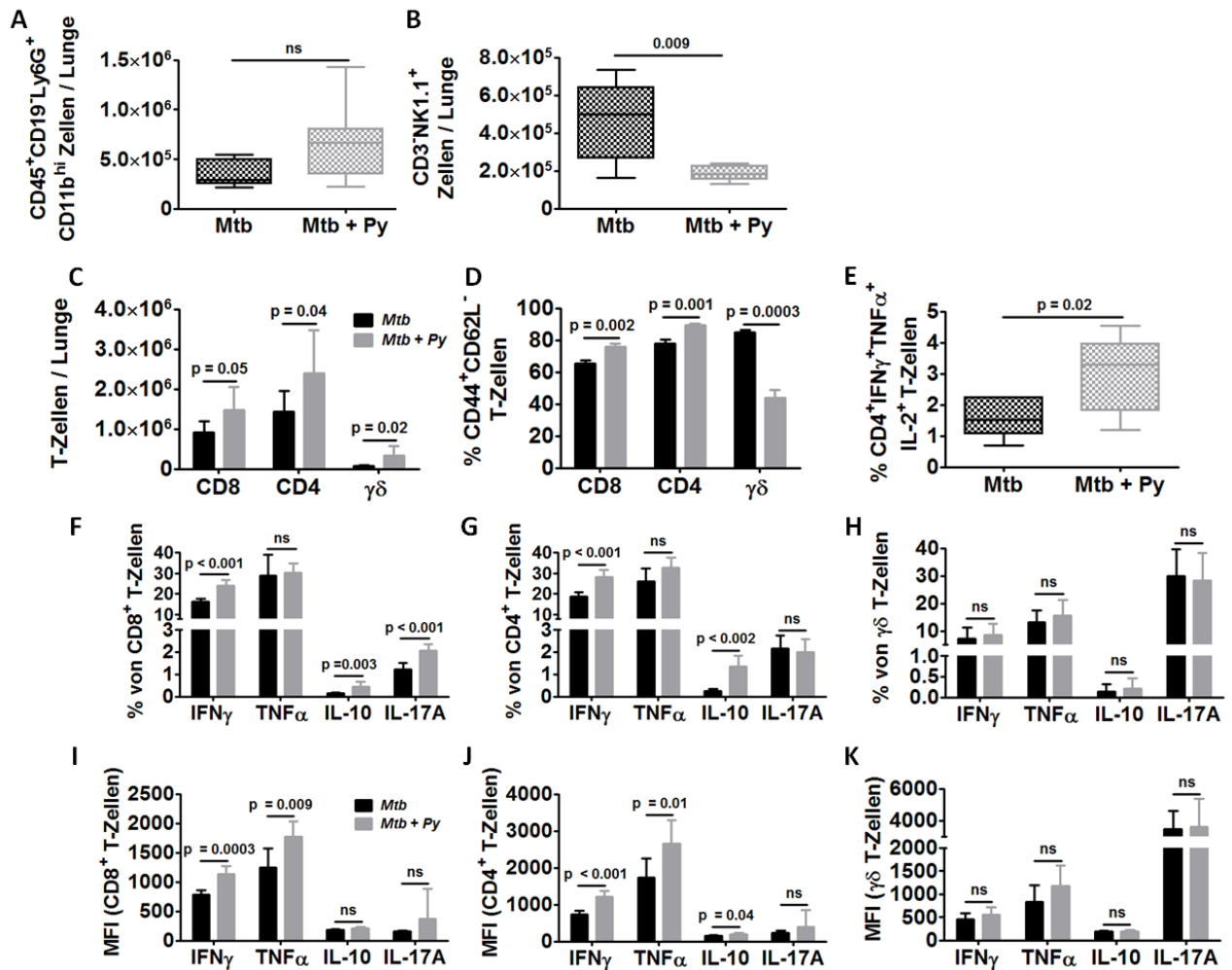


**Abb. 13: Die *Py*-Koinfektion verstärkt die Zytokinantwort in der Lunge.** C57BL/6 Mäuse wurden über Aerosol mit *Mtb* H37Rv (Tag 1 312 KBE in A, B und D; Tag 1 204 KBE in C) und 30 Tage später mit  $1 \times 10^5$  *Py*-iRBZ i.p. infiziert. Die Lungen wurden 21 Tage nach der *Py*-Infektion entnommen, um sie auf A) Zytokin- und B) iNOS-Expression auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR (Expression relativ zum Haushaltsgen HPRT) zu untersuchen. C) Zytokinproteinkonzentrationen wurden mittels LEGENDplex in Lungenlysaten bestimmt. D) Die NO-Produktion in Lungenlysaten wurde über die Umsetzung mit Griess-Reagenz zu NO $_2^-$  bestimmt. Die Daten repräsentieren einen Versuch von 2-3 unabhängigen Experimenten und sind als Mittelwerte  $\pm$  SD gezeigt (n = 5-10; Mann-Whitney Test). Daten wurden veröffentlicht (Blank *et al.*, 2016).

### 3.2.4 Die zelluläre Immunantwort in koinfizierten Mäusen ist nicht beeinträchtigt

Die histopathologischen Veränderungen und die erhöhte Lungenzellzahl in Kombination mit den angestiegenen Zytokinkonzentrationen deuten auf eine vermehrte Rekrutierung und Aktivität von Immunzellen in der Lunge koinfizierter Mäuse hin. Deshalb wurde die zelluläre Immunantwort mittels Durchflusszytometrie charakterisiert. Dafür wurden Lunge und Milz 21 Tage nach der *Py*-Infektion entnommen, Einzelzellsuspensionen hergestellt und mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern für die durchflusszytometrische Analyse gefärbt. Neutrophile Granulozyten gehören zur frühen Immunantwort gegen eine *Tb*-Infektion. Diese Zellen sind nach Aktivierung in der Lage, Mikroben zu phagozytieren und über die Bildung von ROI abzutöten (Kobayashi and Deleo, 2009; Lowe *et al.*, 2012). Ebenso können sie antimikrobielle Komponenten ausschütten und damit nicht nur extrazelluläre Pathogene abtöten, sondern auch zur Rekrutierung von T-Zellen und DZ beitragen. Darüber hinaus können neutrophile Granulozyten netzähnliche Strukturen (*neutrophil extracellular traps*; NETs) freisetzen, mit denen *Mtb* zwar nicht abgetötet aber die Infektion wahrscheinlich lokal begrenzt werden kann (González-Cano *et al.*, 2012). Werden sie allerdings zu stark aktiviert, tragen sie zur Zerstörung des Gewebes bei (Zelante *et al.*, 2007). Aufgrund der erhöhten IL-17A-Ausschüttung (Kapitel 3.2.3), die über die Induktion von *macrophage inflammatory protein-2 alpha* (MIP-2 $\alpha$ )-Produktion zur Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten zum Infektionsherd führen kann, stellte sich die Frage, ob neutrophile Granulozyten vermehrt in koinfizierte Lungen rekrutiert wurden. Die Zellpopulation wurde über CD45<sup>+</sup>CD19<sup>-</sup>Ly6G<sup>+</sup>CD11b<sup>hi</sup> definiert. Es zeigte sich aber, dass die Anzahl an neutrophilen Granulozyten in koinfizierten und *Mtb*-Mäusen vergleichbar war (Abb. 14 A). Daraus kann geschlossen werden, dass die *Py*-Koinfektion zumindest an dem hier untersuchten Zeitpunkt nicht zu einer erhöhten Infiltration von neutrophilen Granulozyten in die *Mtb*-infizierten Lungen führte. Ebenso wie neutrophile Granulozyten werden NK-Zellen früh in die *Mtb*-infizierte Lunge rekrutiert, wo sie maßgeblich zur IFN $\gamma$ -Produktion beitragen (Junqueira-Kipnis *et al.*, 2003). Sie sind zudem in der Lage, *Mtb* oder *Mtb*-infizierte Monozyten zu töten (Junqueira-Kipnis *et al.*, 2003; Raja, 2004). Die durchflusszytometrische Messung ergab, dass die NK-Zellen (CD3<sup>-</sup>NK1.1<sup>+</sup>) in koinfizierten Lungen im Vergleich zu *Mtb*-Kontrollen im Mittel signifikant um etwa die Hälfte reduziert waren (Abb. 14 B).

T-Zellen spielen eine wichtige Rolle in der Immunantwort gegen *Tb* (siehe Kapitel 1.1.3). Die Anzahl an CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> sowie auch  $\gamma\delta$  T-Zellen war in Anwesenheit einer *Py*-Infektion in der Lunge signifikant erhöht (Abb. 14 C). Eine detaillierte Charakterisierung zeigte, dass ebenso der Anteil an T-Effektorzellen, die durch die Expression von CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup> definiert sind, in koinfizierten Tieren leicht erhöht war (Abb. 14 D). Interessanterweise war der Anteil der  $\gamma\delta$  T-Effektorzellen in *Mtb*-Lungen etwa doppelt so groß wie in koinfizierten.



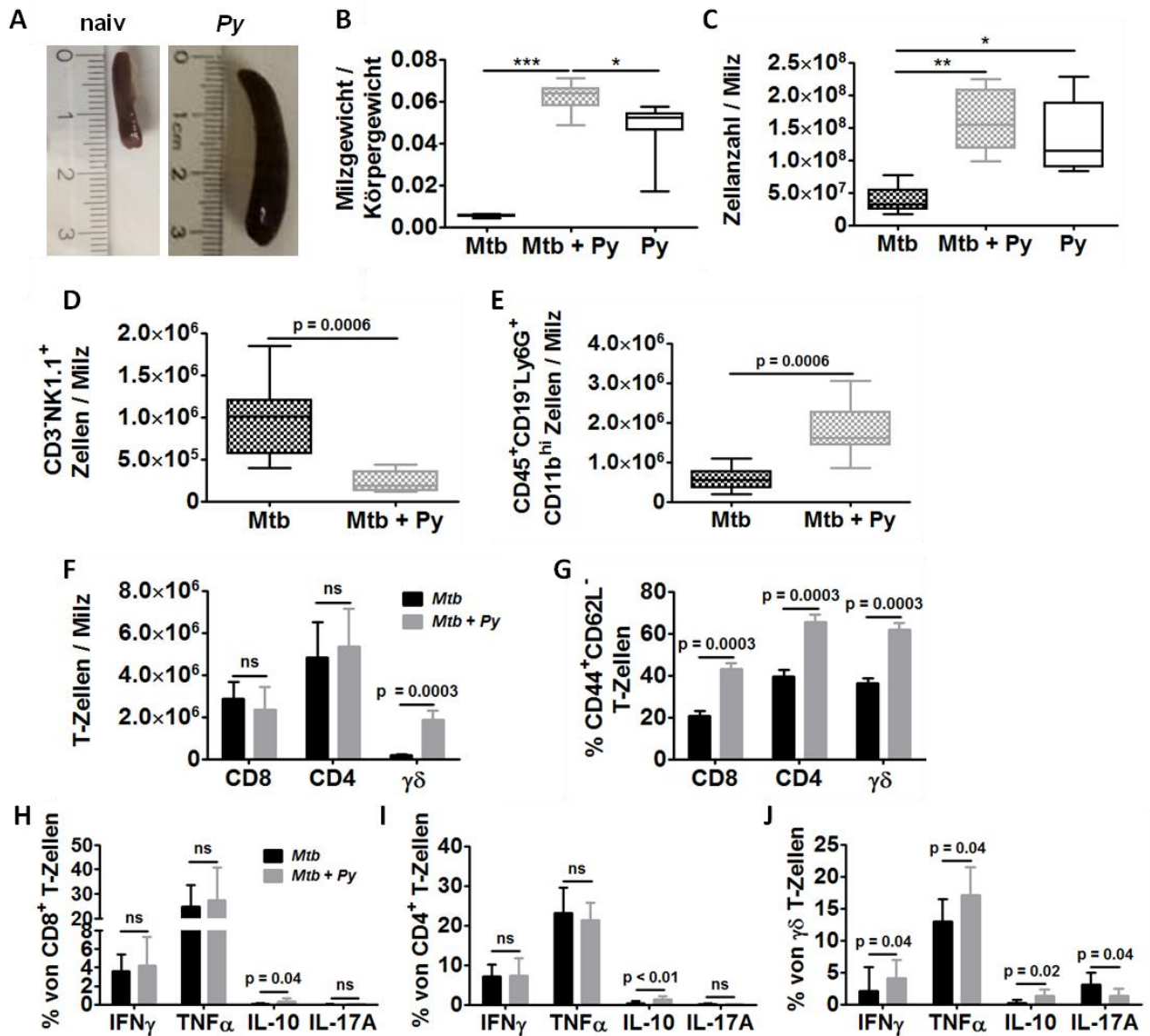
**Abb. 14: Neutrophile Granulozyten, NK-Zellen und T-Zellen in der Lunge.** C57BL/6 Mäuse wurden über Aerosol mit *Mtb* H37Rv (Tag 1 312 KBE) und 30 Tage später mit  $1 \times 10^5$  *Py*-iRBZ i.p. infiziert. Die Lungen wurden 21 Tage nach der *Py*-Infektion entnommen und Einzelzellsuspensionen auf die Anwesenheit und den Aktivierungszustand von neutrophilen Granulozyten, NK-Zellen sowie CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> und γδ T-Zellen untersucht. A) Lungenzellen wurden auf CD45<sup>+</sup>CD19<sup>-</sup>Ly6G<sup>+</sup>CD11b<sup>hi</sup> gated. B) Lungenzellen wurden auf CD3<sup>+</sup>NK1.1<sup>+</sup> gated. C) Lungenzellen wurden auf CD90.2 gated, um die Anzahl an CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> und γδ T-Zellen sowie D) den Anteil an T-Effektorzellen (CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>) zu bestimmen. E-H) Lungenzellen wurden *ex vivo* mit αCD3e/αCD28 (je 5 μg/ml) restimuliert und CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> und γδ T-Zellen mittels Durchflusszytometrie auf IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-10 und IL-17A (F-H) oder CD4<sup>+</sup> T-Zellen auf die gleichzeitige Produktion von IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  und IL-2 (E) untersucht. I-K) Zusätzlich wurden die MFIs der produzierten Zytokine ausgewertet. Die Daten sind als Box und Whisker Plot mit Median dargestellt (A, B und E; n = 7-8; Mann-Whitney Test). Balken repräsentieren Mittelwerte ± SD (C, D, F-K; n = 7-8; Mann-Whitney Test). Die vollständige Gatingstrategie befindet sich in Anhang 7-10. Teile der Daten wurden veröffentlicht (Blank *et al.*, 2016).

Zusätzlich wurden  $3 \times 10^5$  Lungenzellen für 4,5 h mit αCD3e/αCD28 *ex vivo* restimuliert, um die Aktivität der T-Zellen anhand ihrer Zytokinproduktion zu beurteilen. Dabei zeigte sich, dass die Produktion von IFN $\gamma$ , IL-10 und IL-17A durch CD8<sup>+</sup> T-Zellen in koinfizierten im Vergleich zu *Mtb*-infizierten Lungen signifikant erhöht war, wohingegen bei der TNF $\alpha$ -Produktion kein Unterschied bestand (Abb. 14 F). Bei CD4<sup>+</sup> T-Zellen zeigte sich eine signifikant erhöhte Produktion von IFN $\gamma$  und IL-10 in koinfizierten Mäusen, die Produktion von TNF $\alpha$  und IL-2 ähnelte der von *Mtb*-infizierten Mäusen (Abb. 14 G). Zusätzlich zeigten

koinfizierte Lungen einen signifikanten Anstieg an multifunktionalen CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Abb. 14 E), die sich dadurch auszeichnen, gleichzeitig die Zytokine IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  und IL-2 zu produzieren, und die mit dem Schutz gegen Tb assoziiert sind (Forbes *et al.*, 2008). Die Zytokinproduktion von  $\gamma\delta$  T-Zellen unterschied sich hingegen in beiden Versuchsgruppen nicht (Abb. 14 H). Um die Menge an produzierten Zytokinen und nicht nur den Anteil an produzierenden T-Zellen beurteilen zu können, wurden außerdem die MFIs ausgewertet. Dabei zeigte sich, dass die Menge an produziertem IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  von CD8<sup>+</sup> T-Zellen in koinfizierten Lungen verglichen mit Lungen aus *Mtb*-infizierten Tieren signifikant erhöht war (Abb. 14 I). Ein ähnliches Bild ergab sich bei der Zytokinproduktion von CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Neben IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  produzierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus koinfizierten Lungen auch signifikant mehr IL-10 als die aus *Mtb*-infizierten Lungen (Abb. 14 J). Die Menge an Zytokinen, die von  $\gamma\delta$  T-Zellen produziert wurden, unterschied sich hingegen in den beiden Versuchsgruppen nicht (Abb. 14 K).

Die Milz als zentrales Organ der Immunantwort gegen *Plasmodium* übernimmt die wichtigen Funktionen der T-Zell-Aktivierung und der Beseitigung von iRBZ. Entsprechend erfährt sie im Laufe einer Malariainfektion eine massive Umstrukturierung und Vergrößerung (Splenomegalie; Kapitel 1.2.4; Abb. 15 A). Bei der Entnahme an Tag 21 nach *Py*-Infektion zeigte sich diese massive Vergrößerung der Milz nicht nur in *Py*-infizierten Kontrolltieren sondern auch in koinfizierten Tieren, was sich in Zellzahl und Gewicht widerspiegelte (Abb. 15 B und C). Interessanterweise war das Gewicht der Milz koinfizierter Tiere signifikant erhöht im Vergleich zu Milzen aus *Py*-infizierten Tieren (Abb. 15 B). Wie auch in der Lunge war die Anzahl an NK-Zellen (CD3<sup>-</sup>NK1.1<sup>+</sup>) in koinfizierten Milzen verglichen mit Milzen aus *Mtb*-infizierten Tieren signifikant reduziert (Abb. 15 D). Die Anzahl an neutrophilen Granulozyten (CD45<sup>+</sup>CD19<sup>-</sup>Ly6G<sup>+</sup>CD11b<sup>hi</sup>) war durch die *Py*-Infektion in *Mtb*-infizierten Mäusen signifikant erhöht (Abb. 15 E). Die Anzahl der verschiedenen T-Zell-Populationen war durch die *Py*-Infektion nicht erhöht (Abb. 15 F). Obwohl der Anteil an CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup> T-Effektorzellen sowohl bei CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> und  $\gamma\delta$  T-Zellen signifikant erhöht war (Abb. 15 G), trugen diese nach *ex vivo* Restimulation mit  $\alpha$ CD3e/ $\alpha$ CD28 für 4,5 h zu keiner erhöhten Zytokinproduktion bei (Abb. 15 H-J). Lediglich die Produktion von IL-10 war durch die *Py*-Infektion in koinfizierten Milzen im Vergleich zu *Mtb*-Milzen erhöht.

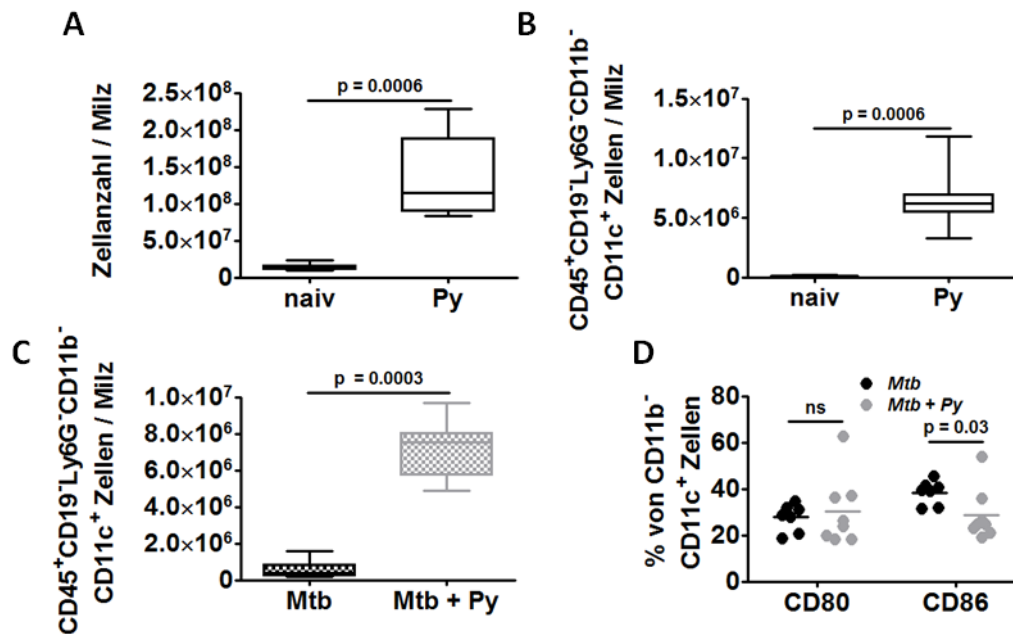
Eine *Py*-Koinfektion führte somit in Lunge und Milz zu einer Reduzierung der NK-Zellen, wohingegen die T-Zell-Anzahl wie auch ihre Funktionalität in Lungen, aber nicht in Milzen koinfizierter Tiere im Vergleich zu *Mtb*-infizierten Tieren erhöht war. In der Milz, aber nicht in der Lunge, war die Anzahl an neutrophilen Granulozyten durch die *Py*-Infektion erhöht. Der erhöhte Anteil an  $\gamma\delta$  T-Zellen in koinfizierten Tieren zeigte eine erhöhte Zytokinproduktion in der Milz, nicht jedoch in der Lunge.



**Abb. 15: Neutrophile Granulozyten, NK-Zellen und T-Zellen in der Milz.** A) Milzen aus naiver (links) und *Py*-infizierter Maus (rechts, zwölf Tage nach der *Py*-Infektion). Maßstab in cm. B-J) C57BL/6 Mäuse wurden über Aerosol mit *Mtb* H37Rv (Tag 1 312 KBE) oder blieben uninfiziert und wurden 30 Tage später mit  $1 \times 10^5$  *Py*-iRBZ i.p. infiziert. Die Milzen wurden 21 Tage nach der *Py*-Infektion entnommen, Gewicht und Zellzahl bestimmt und Einzelzellsuspensionen auf die Anwesenheit und den Aktivierungszustand von neutrophilen Granulozyten, NK-Zellen sowie CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> und γδ T-Zellen untersucht. B) Milzgewicht im Verhältnis zum Körpergewicht. C) Gesamtzellzahl in der Milz. D) Milzzellen wurden auf CD3<sup>+</sup>NK1.1<sup>+</sup> gated. E) Lungenzellen wurden auf CD45<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>Ly6G<sup>+</sup>CD11b<sup>hi</sup> gated. Daten sind als Box und Whisker Plot mit Median dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Kruskal-Wallis mit Dunn's-Mehrfach-Vergleichstest (B, C; n = 7-8) oder dem Mann-Whitney Test (D, E; n = 7-8). F) Milzzellen wurden auf CD90.2 gated, um die Anzahl an CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> und γδ T-Zellen sowie G) den Anteil an T-Effektorzellen (CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>) zu bestimmen. H-J) Milzzellen wurden *ex vivo* mit αCD3e/αCD28 (je 5 μg/ml) restimuliert und CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> und γδ T-Zellen mittels Durchflusszytometrie auf IFN<sub>γ</sub>, TNF<sub>α</sub>, IL-10 und IL-17A untersucht. Balken repräsentieren Mittelwerte ± SD (n = 7-8; Mann-Whitney Test). Die vollständige Gatingstrategie befindet sich in Anhang 7-10. Teile der Daten wurden veröffentlicht (Blank *et al.*, 2016).

### 3.2.5 Die Induktion von CD11c<sup>+</sup> Zellen durch die Py-Koinfektion

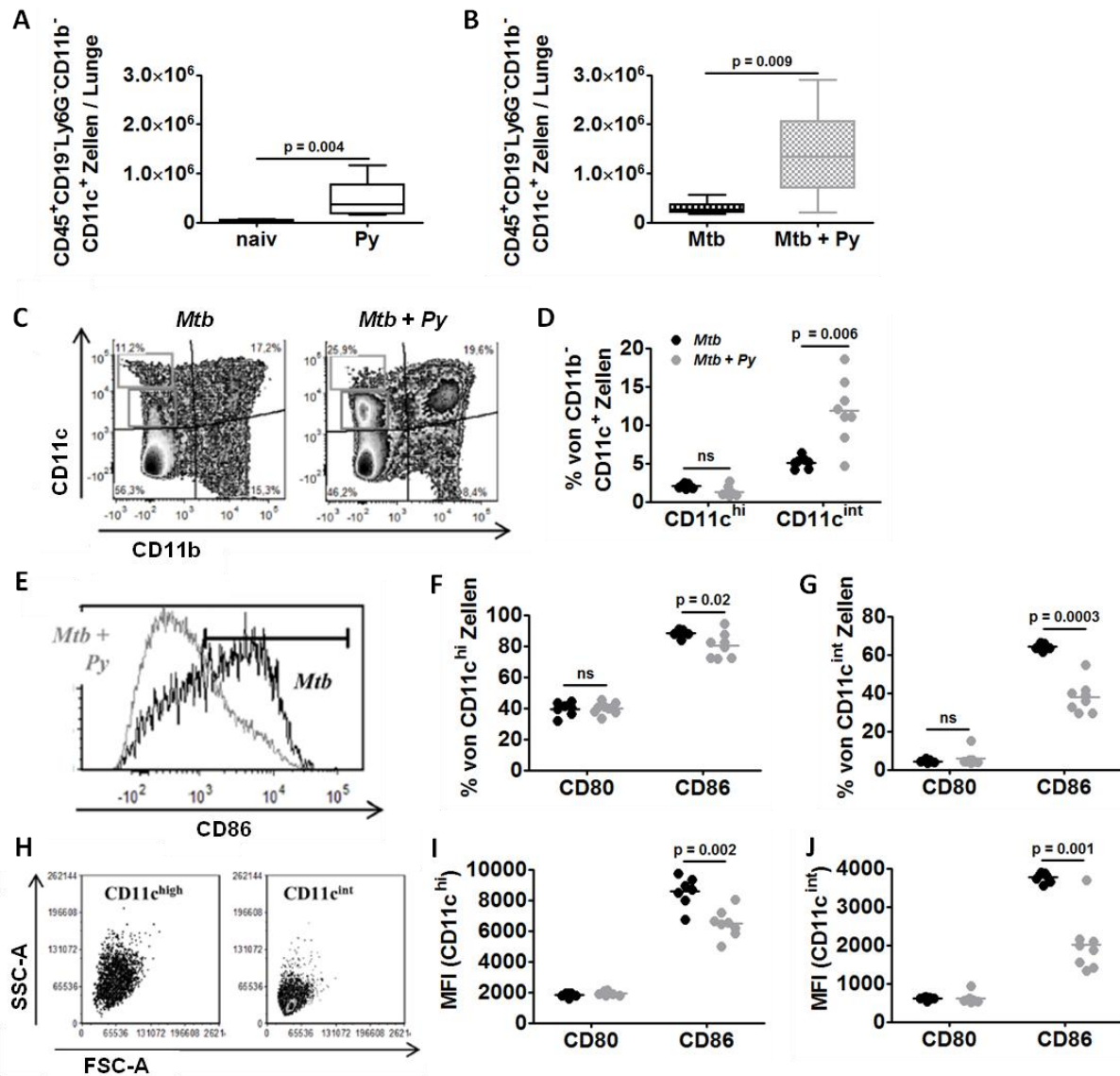
Die bereits erwähnte Splenomegalie (Abb. 16 A, vergleiche auch Abb. 15 A) während einer Malariainfektion ist hauptsächlich eine Folge der erhöhten Rekrutierung myeloider Zellen und der extramedullären Myelopoese in der Milz, um die hohe Anzahl an iRBZ effizient zu beseitigen (Belyaev *et al.*, 2013). Dabei kommt es insbesondere zu einer Zunahme von CD11c<sup>+</sup> kDZ (Langhorne *et al.*, 2004; Voisine *et al.*, 2010; Wykes *et al.*, 2007a; Abb. 16 B). Dementsprechend konnte in der vorliegenden Arbeit auch eine signifikante Anreicherung von CD11c<sup>+</sup> Zellen in Milzen von koinfizierten Tieren im Vergleich zu *Mtb*-infizierten Tieren beobachtet werden (Abb. 16 C). Die Analyse der Expression von kostimulatorischen Molekülen ergab einen signifikant reduzierten Anteil an CD86<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> kDZ in koinfizierten im Vergleich zu *Mtb*-infizierten Tieren, wohingegen der Anteil an CD80<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> kDZ vergleichbar war (Abb. 16 D).



**Abb. 16: Rekrutierung von CD11c<sup>+</sup> kDZ in die Milzen Py-infizierter Tiere.** C57BL/6 Mäuse wurden über Aerosol mit *Mtb* H37Rv (Tag 1 312 KBE) oder blieben uninfiziert und wurden 30 Tage später mit  $1 \times 10^5$  *Py*-iRBZ i.p. infiziert. Die Milzen wurden 21 Tage nach der *Py*-Infektion entnommen und Einzelzellsuspensionen auf die Anwesenheit und den Aktivierungszustand von CD11c<sup>+</sup> Zellen mittels Durchflusszytometrie untersucht. A) Gesamtzellzahlen der Milzen naiver und *Py*-infizierter Mäuse. B und C) Milzzellen wurden auf CD45<sup>+</sup>CD19<sup>-</sup>Ly6G<sup>-</sup>CD11b<sup>-</sup>CD11c<sup>+</sup> gated. D) CD11c<sup>+</sup> kDZ wurden auf die Expression von CD80 und CD86 untersucht. Die Daten (A-C) sind als Box und Whisker Plot mit Median dargestellt. Symbole (D) repräsentieren individuelle Mäuse. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney Test (n = 6-7 (A, B) und n = 7-8 (C,D)). Die vollständige Gatingstrategie befindet sich in Anhang 10. Teile der Daten wurden veröffentlicht (Blank *et al.*, 2016).

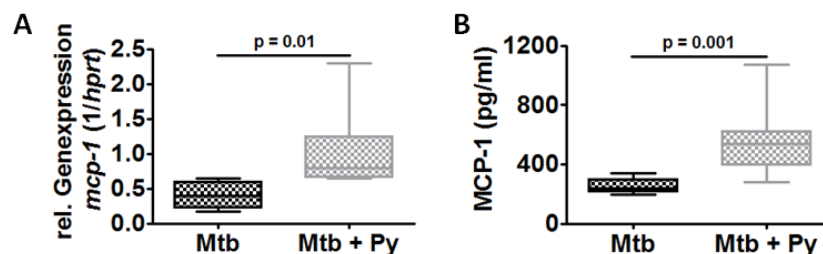
Als nächstes stellte sich die Frage, ob die *Py*-Infektion nicht nur in der Milz sondern auch in der Lunge von *Mtb*-infizierten Tieren zu einer erhöhten Rekrutierung myeloider Zellen führte. Überraschenderweise war im Vergleich zu naiven Tieren ein signifikanter Anstieg an CD11c<sup>+</sup> myeloiden Zellen in Lungen von Tieren zu beobachten, wenn diese nur mit *Py* infiziert waren (Abb. 17 A), obwohl *Py* im Vergleich zu einigen anderen *Plasmodium*-

Stämmen keine auffallende Lungenpathologie induziert (Franke-Fayard *et al.*, 2010; Lamb *et al.*, 2006; Van den Steen *et al.*, 2010). Die Anzahl an diesen Zellen war vergleichbar mit der in *Mtb*-infizierten Lungen (Vergleich Abb. 17 A und B). Jedoch wurde in *Mtb*-infizierten Lungen ein signifikanter Anstieg an  $CD11b^-CD11c^+$  Zellen verzeichnet, wenn die Tiere mit *Py* koinfiziert waren (Abb. 17 B).



**Abb. 17: Rekrutierung von  $CD11b^-CD11c^+$  Zellen durch die *Py*-Koinfektion in die Lunge.** C57BL/6 Mäuse wurden über Aerosol mit *Mtb* H37Rv (Tag 1 312 KBE) oder blieben uninfiziert und wurden 30 Tage später mit  $1 \times 10^5$  *Py*-iRBZ i.p. infiziert. Die Lungen wurden 21 Tage nach der *Py*-Infektion entnommen und Einzelzellsuspensionen auf die Anwesenheit und den Aktivierungszustand von  $CD11c^+$  Zellen mittels Durchflusszytometrie untersucht. A und B) Lungenzellen wurden auf  $CD45^+CD19^-Ly6G^-CD11b^-CD11c^+$  gated. Die Daten sind als Box und Whisker Plots mit Median dargestellt und statistisch mit dem Mann-Whitney Test ausgewertet ( $n = 5-6$  in A,  $n = 7-8$  in B). C und D) Pulmonale  $CD11b^-CD11c^+$  Zellen wurden weiterhin in  $CD11c^{int}$  und  $CD11c^{hi}$  unterteilt. E-G, I und J) Der Anteil von  $CD80$ - und  $CD86$ -exprimierenden Zellen sowie die Expression von  $CD80$  und  $CD86$  wurde in beiden  $CD11b^-CD11c^+$  Zellpopulationen analysiert. Symbole repräsentieren individuelle Mäuse. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney Test ( $n = 7-8$ ). H)  $CD11c^{int}$  und  $CD11c^{hi}$  Populationen wurden in Größe (FSC-A) und Granularität (SSC-A) charakterisiert. Die vollständige Gatingstrategie befindet sich in Anhang 10. Teile der Daten wurden veröffentlicht (Blank *et al.*, 2016).

Die pulmonalen CD11b<sup>-</sup>CD11c<sup>+</sup> Zellen konnten in zwei distinkte Populationen, CD11c<sup>hi</sup> und CD11c<sup>int</sup>, unterteilt werden (Abb. 17 C). Während die CD11c<sup>hi</sup> Population in der Koinfektion unverändert blieb, erhöhte sich der Anteil an CD11c<sup>int</sup> Zellen in Anwesenheit einer *Py*-Infektion signifikant gegenüber den *Mtb*-Tieren (Abb. 17 D). Eine Analyse der kostimulatorischen Moleküle ergab einen reduzierten Anteil von CD86-exprimierenden Zellen in der CD11c<sup>hi</sup> und der CD11c<sup>int</sup> Population von koinfizierten im Vergleich zu *Mtb*-infizierten Tieren (Abb. 17 F und G). Zusätzlich war die Expression von CD86 auf beiden CD11c<sup>+</sup> Populationen der koinfizierten Lungen im Vergleich zu *Mtb*-infizierten Lungen signifikant reduziert (Abb. 17 E, I und J). Der Anteil an CD80-exprimierenden Zellen sowie die Menge des exprimierten CD80 blieb hingegen in beiden Versuchsgruppen unverändert (Abb. 17 F/G, I/J). Über die Vorwärts- (FSC) und Seitwärts- (SSC) Lichtstreuung wurden die beiden CD11b<sup>-</sup>CD11c<sup>+</sup> Zellpopulationen der Lunge weiter charakterisiert (Abb. 17 H). Die CD11c<sup>int</sup> Population lag FSC-A<sup>low</sup>/SSC-A<sup>low</sup>, wohingegen die CD11c<sup>hi</sup> Population FSC-A<sup>low</sup>/SSC-A<sup>hi</sup> war. Das bedeutet, dass die CD11c<sup>hi</sup> Zellen verglichen mit den CD11c<sup>low</sup> granulärer waren. Veränderungen in der Rekrutierung von Leukozyten in den koinfizierten Tieren waren der Anlass, die Expression von *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1) zu kontrollieren, welches für die Regulation der Migration und Infiltration von Monozyten/Makrophagen und DZ verantwortlich ist. Die Expression von MCP-1 war sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene in den Lungen koinfizierter Tiere im Vergleich zu denen, die nur mit *Mtb* infiziert waren, signifikant hochreguliert (Abb. 18 A, B). Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass eine *Py*-Koinfektion mit der Einwanderung von CD11b<sup>-</sup>CD11c<sup>+</sup> Zellen und einer erhöhten Expression von MCP-1 in *Mtb*-infizierten Lungen assoziiert war.



**Abb. 18: Hochregulierung von MCP-1 in koinfizierten Lungen.** C57BL/6 Mäuse wurden über Aerosol mit *Mtb* H37Rv (Tag 1 KBE 312 in A und 204 in B) und 30 Tage später mit  $1 \times 10^5$  *Py*-iRBZ i.p. infiziert. Die Lungen wurden 21 Tage nach der *Py*-Infektion entnommen. A) Die MCP-1-Expression wurde auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR (Expression relativ zum Haushaltsgen HPRT) untersucht. B) MCP-1-Proteinkonzentrationen wurden mittels CBA in Lungenlysaten bestimmt. Die Daten sind als Box und Whisker Plots mit Median dargestellt und statistisch mit dem Mann-Whitney Test ausgewertet (n = 4-6 in A, n = 5-10 in B). Die Daten zeigen ein repräsentatives Experiment von zwei. Teile der Daten wurden veröffentlicht (Blank *et al.*, 2016).

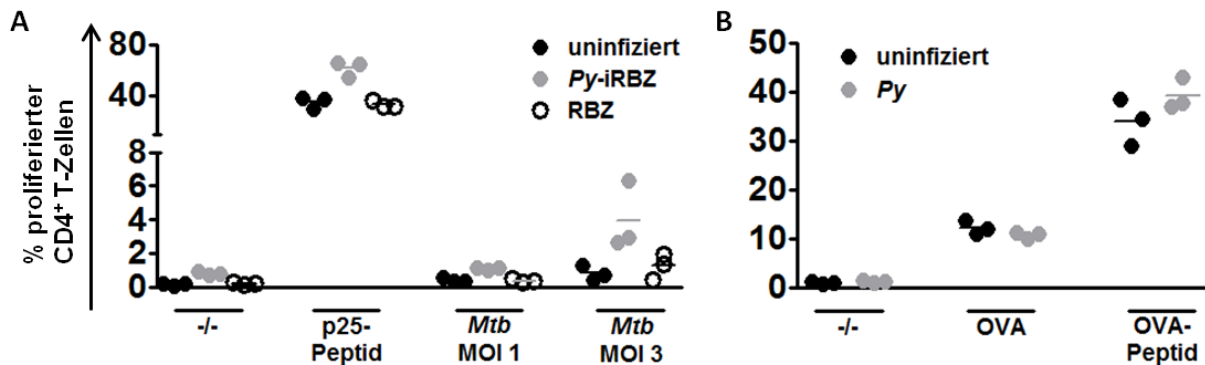
### 3.2.6 CD11c<sup>+</sup> Zellen – eine Nische für *Mtb*?

Eine Malariainfektion führt zu einer vermehrten Rekrutierung von myeloiden Zellen aus dem Knochenmark sowie zu einer verstärkten extramedullären Myelopoese (Belyaev *et al.*, 2013), um eine effiziente Beseitigung von iRBZ zu gewährleisten. Über das Blut werden diese in

verschiedene Organe verteilt und kommen auf ihrem Weg mit iRBZ in Kontakt (Garnica *et al.*, 2005; Shi and Pamer, 2014; Sponaas *et al.*, 2009). Es wurde vielfach gezeigt, dass eine Malariainfektion die Funktionalität von Phagozyten moduliert (Hawkes *et al.*, 2010; Ocaña-Morgner *et al.*, 2003). Dabei kann die Malariainfektion zelluläre Funktionen von Phagozyten wie Phagozytose, Zytokinproduktion oder die Expression von Oberflächenrezeptoren beeinflussen (Ocaña-Morgner *et al.*, 2008; Urban *et al.*, 1999). DZ können dadurch in ihrer Funktion, T-Zellen zu aktivieren, beeinträchtigt werden (Ocaña-Morgner *et al.*, 2008). Um die Konsequenzen einer Interaktion von *Py*-iRBZ mit CD11c<sup>+</sup> Zellen *in vitro* zu untersuchen, wurden DZ aus dem Knochenmark (KMDZ) generiert und hinsichtlich ihrer T-Zell-aktivierenden Eigenschaften untersucht. Knochenmarkszellen aus C57BL/6 Mäusen wurden in Gegenwart von *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) zu KMDZ differenziert und mit *Py*-iRBZ, die aus *Py*-infizierten Mäusen mittels Percoll-Dichtezentrifugation isoliert wurden, für 2 h in einer *multiplicity of infection* (MOI) von 20 inkubiert. Als Kontrollen dienten uninfizierte KMDZ und die Inkubation von KMDZ mit uninfizierten RBZ. Anschließend wurden die KMDZ für 2 h mit *Mtb* H37Rv in einer MOI von 1 bzw. 3 kokultiviert oder mit dem p25 Peptid des *Mtb* Ag85 inkubiert. Danach wurden die KMDZ mit CFSE-markierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus transgenen p25-Mäusen, die spezifisch das p25-Peptid von Ag85 erkennen, für drei Tage inkubiert. Mittels Durchflusszytometrie wurde abschließend analysiert, inwiefern die Kokultivierung mit *Py*-iRBZ die Aktivierung von T-Zellen durch die KMDZ beeinflusste. Die T-Zell-Proliferation wurde dabei anhand des Verlustes des CFSE-Signals ermittelt. Abb. 19 A zeigt, dass naive KMDZ, die mit dem p25-Peptid inkubiert wurden, eine erhebliche T-Zell-Proliferation induzierten. Die Infektion der KMDZ mit *Py*-iRBZ führte zu einer deutlich gesteigerten T-Zell-Proliferation, während uninfizierte RBZ keinen Effekt auf die p25-induzierte T-Zell-Proliferation hatten. Im Gegensatz zu p25 induzierten *Mtb*-infizierte KMDZ erwartungsgemäß eine weitaus geringere T-Zell-Proliferation. P25 entsteht durch Prozessierung des Ag85, einem von *Mtb* sezernierten Protein. Die Menge an eingesetztem p25 Peptid ist vergleichsweise wesentlich höher als das durch eine natürliche *Mtb*-Infektion generierte. Mit steigender MOI nahm die Proliferation leicht zu. Ähnlich wie bei den p25-beladenen KMDZ erhöhte auch hier eine Infektion mit *Py*-iRBZ die *Mtb*-induzierte Proliferation der T-Zellen deutlich. Diese Daten deuten darauf hin, dass *Py*-infizierte KMDZ vollständig funktionierende APZ sind und sogar eine gesteigerte Funktionalität bezüglich T-Zell-Aktivierung aufwiesen.

Als nächstes sollten *in vivo* durch *Py*-Infektion induzierte CD11c<sup>+</sup> Zellen auf ihre Funktion, T-Zellen aktivieren zu können, untersucht werden, da nicht nur die Aufnahme von iRBZ sondern auch das während einer Malariainfektion *in vivo* herrschende Zytokinmilieu die Funktionalität dieser Zellen beeinflussen kann. Die CD11c<sup>+</sup> Zellen wurden aus der Milz von *Py*-infizierten Tieren isoliert, da ihre Anzahl in der Lunge zu gering war (Abb. 17 A). Für die Untersuchungen wurden C57BL/6 Mäuse i.p. mit  $1 \times 10^5$  *Py*-iRBZ infiziert und 14 Tage nach der Infektion, zum Zeitpunkt des Maximums der Parasitämie (vergleiche Abb. 11 B), CD11c<sup>+</sup> Zellen aus der Milz infizierter und naiver Kontrollmäuse isoliert. Die isolierten CD11c<sup>+</sup> Zellen wurden mit dem Modellantigen OVA oder OVA-Peptiden beladen und mit CFSE-markierten,

transgenen OT2 T-Zellen für drei Tage kokultiviert. Sowohl die CD11c<sup>+</sup> Zellen aus *Py*-infizierten als auch aus naiven Mäusen waren in der Lage, die Proliferation der OT2 T-Zellen zu induzieren (Abb. 19 B). Das bedeutet, dass die durch die Malariainfektion in die Milz rekrutierten CD11c<sup>+</sup> Zellen aus *Py*-infizierten Mäusen vollständig funktionstüchtige APZ waren. Im Vergleich zu den KMDZ konnte hier allerdings keine verstärkte T-Zell-Proliferation durch die Malariainfektion beobachtet werden.

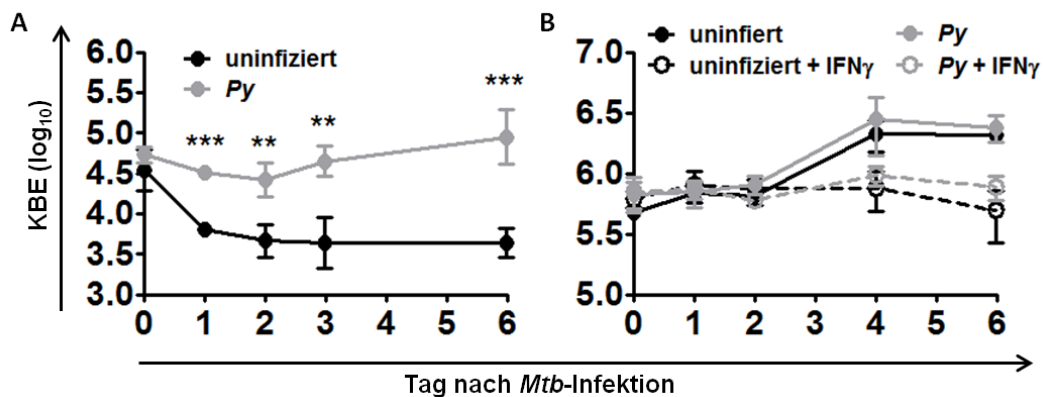


**Abb. 19: T-Zell-Aktivierung durch DZ wird durch *Py*-Infektion nicht beeinträchtigt.** A) KMDZ wurden aus dem Knochenmark von C57BL/6 Mäusen generiert und mit uninfizierten oder *Py*-iRBZ für 2 h inkubiert. Danach wurden die KMDZ für 2 h mit dem p25-Antigen beladen oder mit *Mtb* H37Rv (MOI 1 oder MOI 3) infiziert. Transgene p25 CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden isoliert, CFSE-markiert und mit den CD11c<sup>+</sup> Zellen für drei Tage kokultiviert. Der Verlust des CFSE-Signals, der mittels Durchflusszytometrie bestimmt wurde, wurde als Indikator für die T-Zell-Proliferation verwendet (durchgeführt in Triplikaten, ein repräsentatives Experiment von zwei). B) C57BL/6 Mäuse wurden mit *Py* infiziert und 14 Tage nach der Infektion wurden CD11c<sup>+</sup> Zellen aus den Milzen naiver und *Py*-infizierter Mäuse mittels MACS isoliert. Die isolierten CD11c<sup>+</sup> Zellen wurden mit dem Modellantigen OVA oder OVA-Peptid beladen und mit CFSE-markierten, transgenen OT2 T-Zellen für drei Tage kokultiviert. Der Verlust des CFSE-Signals, der als Indikator für T-Zell-Proliferation diente, wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt (durchgeführt in Triplikaten). Die vollständige Gatingstrategie befindet sich in Anhang 11. Teile der Daten wurden veröffentlicht (Blank *et al.*, 2016).

Im nächsten Schritt sollten *Py*-induzierte CD11c<sup>+</sup> Zellen hinsichtlich ihrer antimikrobiellen Aktivität untersucht werden, da mehrfach gezeigt werden konnte, dass Mykobakterien DZ als Wirtszellen nutzen (Humphreys *et al.*, 2006; Tailleux *et al.*, 2003). Dazu wurden CD11c<sup>+</sup> Zellen aus naiven und *Py*-infizierten Mäusen wie eben beschrieben isoliert.  $2 \times 10^5$  CD11c<sup>+</sup> Zellen wurden mit *Mtb* H37Rv (MOI 1) für 2 h infiziert, zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und das intrazelluläre Überleben über Plattierung von seriellen Verdünnungen auf 7H11 Agarplatten bestimmt. Anhand der kolonienbildenden Einheiten (KBE) wurde deutlich, dass CD11c<sup>+</sup> DZ aus naiven Mäusen in der Lage waren, das Überleben und Wachstum von *Mtb* zu kontrollieren (Abb. 20 A). Im Gegensatz dazu begünstigten DZ aus *Py*-infizierten Mäusen Wachstum und Überleben von *Mtb*. Die mykobakterielle Keimlast in DZ aus *Py*-infizierten Tieren im Vergleich zu DZ aus naiven Tieren war über den gesamten Untersuchungszeitraum signifikant und bis zu 1,5 log-Stufen erhöht. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass CD11c<sup>+</sup> Zellen, die während der *Py*-Infektion induziert werden, ein besseres Reservoir für *Mtb* darstellen als DZ aus naiven Tieren.

Eine der wichtigsten Wirtszellen für *Mtb* sind Makrophagen (Pieters, 2008). Um zu überprüfen, ob auch Makrophagen aus *Py*-infizierten Tieren das Überleben und Wachstum

von *Mtb* fördern, wurden Peritonealmakrophagen (PM) aus naiven und *Py*-infizierten Tieren verwendet. Peritonealexudatzellen wurden aus naiven und *Py*-infizierten Tieren gewonnen und über Adhärenz die PM isoliert. Unstimulierte oder mit IFN $\gamma$  (500 U/ml) voraktivierte PM wurden mit *Mtb* H37Rv in einer MOI 1 infiziert und das intrazelluläre Überleben der Bakterien über die Zeit bestimmt. Sowohl in den PM aus uninfizierten als auch aus *Py*-infizierten Mäusen konnten sich die Mykobakterien vermehren (Abb. 20 B). Jedoch konnte hier zwischen den Versuchsgruppen kein Unterschied festgestellt werden. Weiterhin führte die IFN $\gamma$ -Aktivierung der PM aus beiden Gruppen gleichermaßen zur Kontrolle des mykobakteriellen Wachstums.

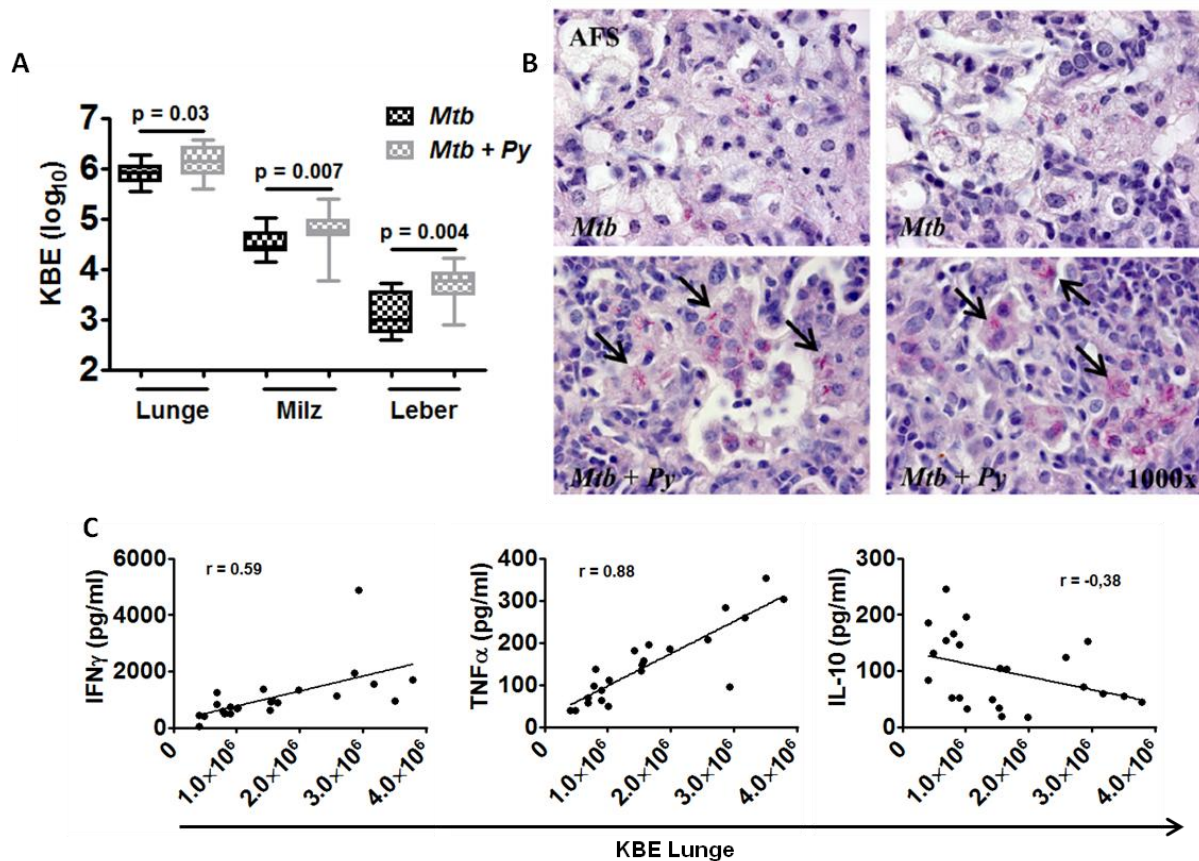


**Abb. 20: Überleben von *Mtb* in DZ und PM naiver und *Py*-infizierter Mäuse.** C57BL/6 Mäuse wurden mit *Py* infiziert und nach 14 Tagen die CD11c<sup>+</sup> Zellen (A) oder die PM (B) aus infizierten oder naiven Tieren gewonnen. DZ und PM (unstimuliert oder voraktiviert mit 500 U/ml IFN $\gamma$ ) wurden für 2 h mit *Mtb* H37Rv (MOI 1) infiziert. Um das intrazelluläre Überleben zu bestimmen, wurden die Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten mit Lysepuffer B geerntet und in seriellen Verdünnungen auf 7H11-Agarplatten ausgestrichen. Die KBE wurden nach 3-4 Wochen ausgezählt. Datenpunkte zeigen Mittelwert  $\pm$  SD aus technischen Replikaten (n = 3-4) von einem aus 2-3 repräsentativen Experimenten. Die Daten wurden logarithmisch transformiert und statistisch mit dem ungepaarten T-Test ausgewertet. \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.001. Teile der Daten wurden veröffentlicht (Blank *et al.*, 2016).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch die *Py*-Infektion eine DZ-Population induziert wurde, die das Wachstum von *Mtb* begünstigt. Gleichzeitig waren die T-Zell-aktivierenden Eigenschaften dieser DZ jedoch nicht beeinträchtigt. Im Gegensatz dazu konnten sich die Mykobakterien in PM, die aus *Py*-infizierten Mäusen gewonnen wurden, nicht besser vermehren als in PM aus naiven Tieren.

Um zu überprüfen, ob das veränderte immunologische Milieu und die Zunahme an CD11c<sup>+</sup> Zellen in koinfizierten Tieren das mykobakterielle Wachstum *in vivo* begünstigte, wurde die KBE in *Mtb*-infizierten Tieren 21 Tage nach *Py*-Koinfektion in Lunge, Milz und Leber bestimmt. In allen Organen der koinfizierten Tiere war die KBE im Vergleich zu den Kontrolltieren leicht, aber dennoch statistisch signifikant erhöht (Abb. 21 A). Um die *Mtb*-Last im Lungengewebe weiter zu analysieren, wurden Schnitte von in Paraffin eingebetteten Lungen einer Ziehl-Neelsen-Färbung unterzogen, um die säurefesten Mykobakterien zu visualisieren. Im Lungengewebe *Mtb*-infizierter Mäuse konnten vor allem einzeln vorliegende Bakterien gefunden werden. Im Vergleich dazu zeigten die koinfizierten Tiere

häufig Aggregate von *Mtb* (Abb. 21 B, Pfeile). Dies deutet darauf hin, dass die mykobakterielle Keimlast real höher lag als die Bestimmung der KBE ergab, da anzunehmen ist, dass solche Bakterienaggregate beim Ausstreichen nicht völlig vereinzelt wurden (Lewin *et al.*, 2003).



**Abb. 21: Py-Koinfektion führt zu einer erhöhten mykobakteriellen Last in Lunge, Milz und Leber.** C57BL/6 Mäuse wurden über Aerosol mit *Mtb* H37Rv (Tag 1 KBE 204, 104 und 312) und 30 Tage später mit  $1 \times 10^5$  iRBZ i.p. infiziert. Die Lungen, Milzen und Lebern wurden 21 Tage nach der *Py*-Infektion entnommen, um die KBE zu bestimmen (A; Lunge und Milz n = 16-23, Leber n = 9-15; Daten aus 2-3 unabhängigen Versuchen vereint; Daten als Box und Whisker Plot mit Median dargestellt; Mann-Whitney Test). B) Lungenlappen wurden in Paraffin eingebettet und 4  $\mu$ m Schnitte mit Ziehl-Neelsen (Acid Fast Stain; AFS) angefärbt, um die Mykobakterien zu visualisieren. Die Pfeile deuten auf mykobakterielle Aggregate hin. Gezeigt sind zwei repräsentative Bilder je Gruppe (n = 7-8). C) IFN $\gamma$ -, TNF $\alpha$ - und IL-10-Proteinkonzentrationen (Kapitel 3.2.3) wurden mittels Pearson's Korrelation mit der Lungen-KBE korreliert. Teile der Daten wurden veröffentlicht (Blank *et al.*, 2016).

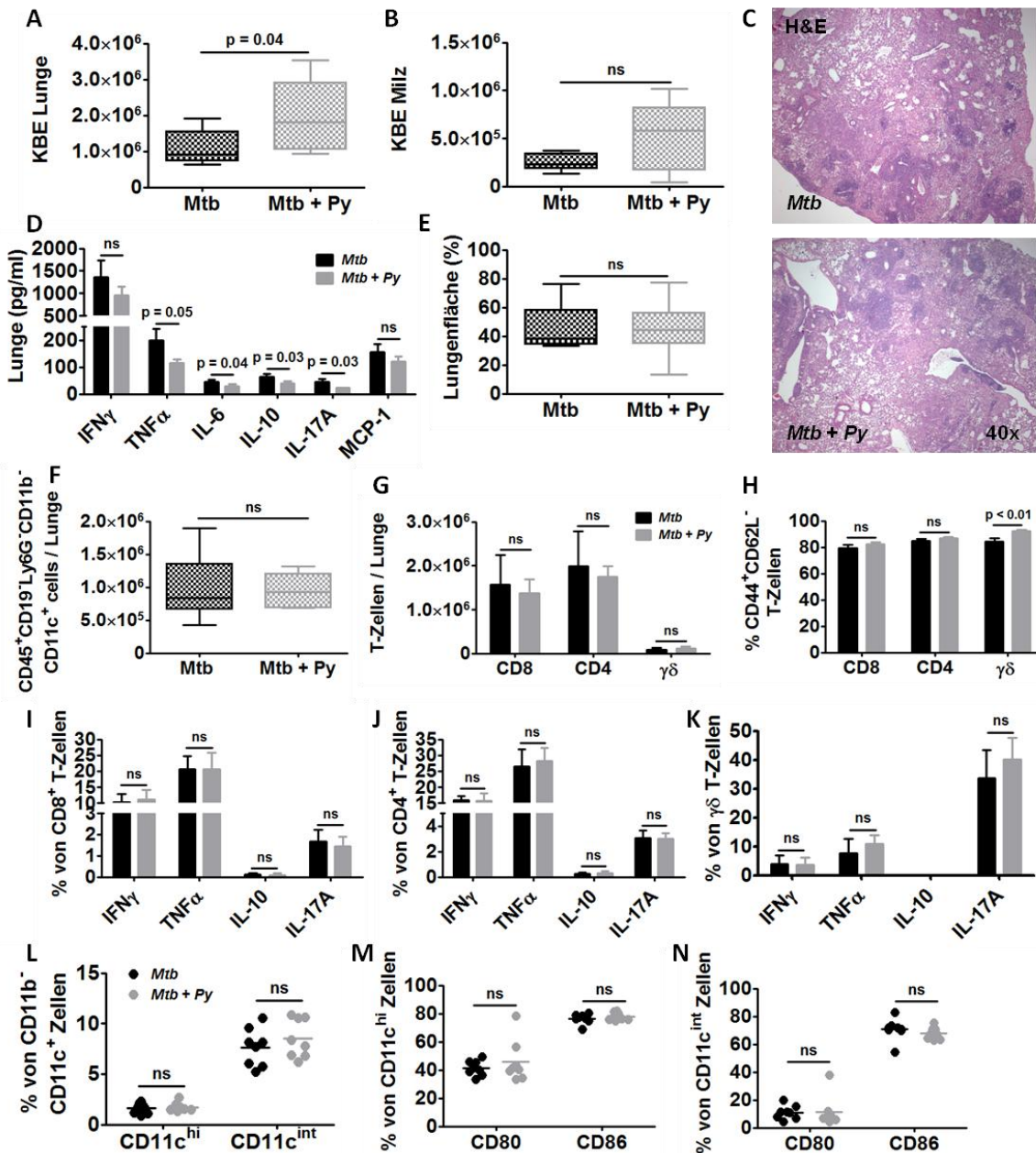
Verschiedene Zytokine sind mit der Kontrolle von *Mtb* assoziiert. So ist IFN $\gamma$  essentiell für die Aktivierung von Makrophagen, die die *Mtb*-Infektion durch verschiedene antimikrobielle Effektormechanismen kontrollieren (Cooper *et al.*, 2002). Daneben ist auch TNF $\alpha$  wegen seiner makrophagenaktivierenden Eigenschaften und seiner Rolle bei der Aufrechterhaltung der Granulomstrukturen wichtig für die Kontrolle der *Mtb*-Infektion (Cavalcanti *et al.*, 2012). Neben seiner schützenden Wirkung kann überschüssiges TNF $\alpha$  allerdings zu einer vermehrten Pathologie und daraus resultierend zu einem Anstieg von *Mtb* im Gewebe führen (Bekker *et al.*, 2000). IL-10 wirkt anti-entzündlich und sorgt für die Deaktivierung von

Makrophagen und deren Effektorfunktionen (Schreiber *et al.*, 2009). Die Zytokinkonzentrationen der koinfizierten Mäuse (siehe Abb. 13 C) wurden mit der KBE der Lunge korreliert, um mögliche Zusammenhänge herausarbeiten zu können (Abb. 21 C). Die Korrelationsanalysen zeigten, dass mit steigender mykobakterieller Last in den Lungen koinfizierter Mäuse ebenfalls die IFN $\gamma$ - und TNF $\alpha$ -Konzentrationen anstiegen. Im Gegensatz dazu korrelierten erhöhte IL-10-Konzentrationen nicht mit einer erhöhten *Mtb*-Anzahl. Stattdessen wiesen koinfizierte Mäuse mit einer höheren KBE überraschenderweise tendenziell niedrigere IL-10-Konzentrationen auf.

Aus diesen Ergebnissen kann man schließen, dass die *Py*-Infektion zum Verlust der Wachstumskontrolle von *Mtb* sowohl *ex vivo* in DZ als auch *in vivo* in Lunge, Milz und Leber führte. Dabei korrelierten höhere IFN $\gamma$ - und TNF $\alpha$ -Konzentration mit einer erhöhten KBE.

### **3.2.7 Die durch *Py* induzierten immunologischen Veränderungen in koinfizierten Mäusen sind nur vorübergehend**

Eine Infektion mit *Py* ist selbstlimitierend. Nach Anstieg der Parasitämie auf etwa 50 % können 3-4 Wochen nach der Infektion keine Erreger mehr im Blut gefunden werden (vergleiche Abb. 11 B; Couper *et al.*, 2008b; Shear and Srinivasan, 1989). Auch die mit der *Py*-Infektion verbundene Immunmodulation und damit einhergehend Organveränderungen wie die Splenomegalie sind reversibel (Achtman *et al.*, 2003). Nachdem unmittelbar nach der akuten *Py*-Koinfektion die beschriebenen Veränderungen in den Lungen von *Mtb*-infizierten Tieren beobachtet wurden, stellte sich als nächstes die Frage, inwiefern sich diese Koinfektion langfristig auf den Verlauf und die Immunkontrolle der *Mtb*-Infektion auswirkt. Daher wurden *Mtb*-infizierte und koinfizierte Tiere 170 Tage nach der *Py*-Infektion (Tag 200 der *Mtb*-Infektion) hinsichtlich des immunologischen Milieus in Lunge und Milz sowie der mykobakteriellen Keimlast untersucht. Um die KBE zu bestimmen, wurden die Organe homogenisiert und in seriellen Verdünnungen auf 7H11 Agar ausplattiert. Die mykobakterielle Keimlast in den Lungen koinfizierter Mäuse war nur leicht, aber weiterhin statistisch signifikant erhöht, wohingegen in der Milz keine Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen mehr zu erkennen waren (Abb. 22 A und B). Allerdings konnte bei der Entnahme beobachtet werden, dass die Milzen der koinfizierten Tiere weiterhin vergrößert waren, wohingegen die Milzen der *Py*-infizierten Mäuse weitestgehend wieder Normalgröße angenommen hatten. Zusätzlich schienen die Milzen und Lebern koinfizierter Mäuse verglichen mit denen aus *Py*-infizierten Tieren dunkler zu sein, was auf eine vermehrte Ablagerung von Hz hindeutet. Für die mikroskopische Analyse wurde ein Lungenflügel in Paraffin eingebettet und 4  $\mu$ m Schnitte H&E gefärbt. Die Lungenpathologie war sowohl in koinfizierten als auch in *Mtb*-infizierten Lungen fortgeschritten (Abb. 22 C). Die Lungen zeigten ausgeprägte Infiltrationen, die in beiden Gruppen durchschnittlich 50 % des Lungengewebes betrafen, teilweise sogar bis zu 80 %. Die Unterschiede, die 21 Tage nach der Koinfektion bestanden, waren nicht mehr vorhanden (Abb. 22 C und E).



**Abb. 22: Langzeitfolgen der Py-Koinfektion.** C57BL/6 Mäuse wurden über Aerosol mit *Mtb* H37Rv (Tag 1 KBE 312) und 30 Tage später mit  $1 \times 10^5$  *Py*-iRBZ i.p. infiziert. Die Lungen und Milzen wurden 170 Tage nach der *Py*-Infektion entnommen. A) Lungen- und B) Milz-KBE wurden bestimmt. Die Daten sind als Box und Whisker Plot mit Median dargestellt und statistisch mit dem Mann-Whitney Test ausgewertet ( $n = 8$ ). C und E) Lungenlappen wurden in Paraffin eingebettet und 4  $\mu$ m Schnitte H&E-gefärbt (ein repräsentatives Bild je Gruppe). Die pulmonale Infiltration wurde mit der Software Cell<sup>^</sup>B flächenmäßig ermittelt ( $n = 8$ ; Box und Whisker Plot mit Median; Mann-Whitney Test). D) Die Zytokinproteinkonzentrationen wurden in Lungenlysaten mittels LEGENDplex gemessen. Lungeneinzelsuspensionen wurden auf die Anwesenheit (G), den Aktivierungszustand (H) und die Funktion (I-K) von  $CD4^+$ ,  $CD8^+$  und  $\gamma\delta$  T-Zellen über Durchflusszytometrie (*ex vivo* restimuliert mit  $\alpha$ CD3e/ $\alpha$ CD28) untersucht. F und L-N) Lungenzellen wurden auf  $CD45^+$  und weiter auf  $CD19^-$  gated und  $Ly6G^-$  Zellen auf die Anwesenheit von  $CD11b^-$  und  $CD11c^+$  Zellen untersucht (F).  $CD11b^- CD11c^+$  Zellen wurden weiter in  $CD11c^{int}$  und  $CD11c^{hi}$  Zellen unterteilt (L). Die  $CD80$ - und  $CD86$ -Expression wurden in beiden  $CD11b^- CD11c^+$  Zellpopulationen analysiert (M und N). Die vollständige Gatingstrategie befindet sich in Anhang 7, 8 und 10. Die Symbole und Balken repräsentieren individuelle Tiere bzw. Mittelwerte  $\pm$  SD und die Daten wurden statistisch mit dem Mann-Whitney Test analysiert ( $n = 8$ ). Teile der Daten wurden veröffentlicht (Blank *et al.*, 2016).

Die nur leicht erhöhte *Mtb*-Keimlast und die vergleichbare Lungenpathologie erklärten, warum die Tiere aus beiden Versuchsgruppen bis zum Analysezeitpunkt überlebten und keine offensichtlichen Krankheitssymptome zeigten.

Übereinstimmend mit den histologischen Beobachtungen konnten keine Unterschiede mehr in der entzündlichen Immunantwort zwischen den beiden untersuchten Gruppen beobachtet werden. Statt der Erhöhung von pro- und anti-entzündlichen Zytokinen in koinfizierten Lungen wie an Tag 21 nach der *Py*-Infektion waren 150 Tage später die Level an TNF $\alpha$ , IL-6, IL-10 und IL-17A in koinfizierten im Vergleich zu *Mtb*-Lungen signifikant reduziert (Abb. 22 D). Durchflusszytometrische Analysen ergaben außerdem vergleichbare Anzahlen an CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> und  $\gamma\delta$  T-Zellen in beiden Versuchsgruppen (Abb. 22 G), die sich kaum in ihrem Effektorphänotyp (CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>; Abb. 22 H) und Zytokinproduktion nach *ex vivo* Restimulation mit  $\alpha$ CD3e/ $\alpha$ CD28 unterschieden (Abb. 22 I-K). Lediglich der Anteil an  $\gamma\delta$  T-Effektorzellen war prozentual erhöht, was aber keinen Einfluss auf die Zytokinsekretion hatte (Abb. 22 H und K). Die Anzahl an CD11b<sup>-</sup>CD11c<sup>+</sup> Zellen, die in koinfizierten Tieren 21 Tage nach der *Py*-Infektion signifikant erhöht war, war 150 Tage später ebenfalls vergleichbar zu der in *Mtb*-infizierten Tieren (Abb. 22 F). Auch der Anteil an CD11c<sup>int</sup> Zellen sowie der CD80<sup>+</sup> und CD86<sup>+</sup> Zellen war zu diesem späten Zeitpunkt vergleichbar zwischen den beiden Versuchsgruppen (Abb. 22 L-N).

Aus diesen Daten kann man schließen, dass eine einmalige Infektion mit *Py* keine Langzeitauswirkungen auf den Krankheitsverlauf und das Überleben von *Mtb*-infizierten Mäusen hatte.

### Zusammenfassung der Ergebnisse 3.2.1

- Eine Episode der nicht letalen *Py*-Infektion verschlechtert vorübergehend den Verlauf einer experimentellen Tb → 21 Tage nach der *Py*-Infektion (Tag 51 nach *Mtb*-Infektion) zeigen koinfizierte Mäuse im Vergleich zu *Mtb*-infizierten Mäusen
  - eine erhöhte Einwanderung von Immunzellen in die Lunge und dementsprechend einen Anstieg an Infiltraten und betroffenem Lungengewebe
  - einen Anstieg an pro- und anti-entzündlichen Zytokinen sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene
  - einen Anstieg an CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> und γδ T-Zellen in der Lunge, verbunden mit einer erhöhten Zytokinproduktion
  - einen signifikanten Anstieg an CD11c<sup>+</sup> Zellen (speziell CD11b<sup>-</sup>CD11c<sup>int</sup>)
  - eine signifikante Erhöhung der KBE in Lunge, Milz und Leber
- 170 Tage nach der Koinfektion ist das immunologische Milieu in der Lunge von koinfizierten und *Mtb*-infizierten Tieren vergleichbar, während die KBE in der Lunge, nicht aber in der Milz weiterhin erhöht ist
- CD11c<sup>+</sup> Zellen aus *Py*-infizierten Mäusen sind vollständig funktionstüchtige APZ
- CD11c<sup>+</sup> Zellen aus *Py*-infizierten, aber nicht aus naiven Mäusen fördern das Überleben und Wachstum von *Mtb ex vivo*

## 4 Diskussion

Das menschliche Immunsystem ist nur selten einem einzigen Krankheitserreger ausgesetzt. Oftmals muss das Immunsystem mehrere Pathogene gleichzeitig bekämpfen. Infolge dessen kann eine eigentlich unterschwellige oder milde Infektion schwerwiegende Auswirkungen haben. Ein Paradebeispiel für Koinfektionen und damit einhergehende Komplikationen ist die erhöhte Anfälligkeit für sekundäre bakterielle Infekte während einer Influenzainfektion. Tatsächlich sind die Sekundärinfektionen die Haupttodesursache in Folge einer Influenzaerkrankung (Jamieson *et al.*, 2013). Häufig überdauert eine infektionsbedingte Immunmodulation oder Immunschwächung die eigentliche Erkrankung, sodass Patienten auch noch nach Abheilung einer Infektion anfällig für Sekundärinfektionen sind. Neben der Influenza ist auch für die Masern bekannt, eine ausgeprägte Immunsuppression zu induzieren (Beckford *et al.*, 1985; Libbey and Fujinami, 2002). Eine Malaria macht Patienten ebenfalls besonders anfällig für sekundäre bakterielle oder virale Infekte (Scott *et al.*, 2011; Takem *et al.*, 2014; Whittle *et al.*, 1990).

Chronische Erkrankungen stellen eine besondere Herausforderung für das Immunsystem dar. Das Problem bei chronischen Infektionen wie der Tb ist, dass sie oftmals über Jahre oder Jahrzehnte vom Immunsystem kontrolliert werden müssen. Vor allem bei Menschen in Gebieten mit hoher Inzidenz verschiedenster Infektionskrankheiten kann potentiell jede Infektion, die im Laufe eines Lebens durchlaufen wird, die Immunkontrolle gegen die zu Grunde liegende chronische Erkrankung beeinträchtigen. Somit kann sich der Verlauf der Erkrankung verschlechtern. Umgekehrt kann eine chronische Infektion zu einer andauernden Modulation des Immunsystems führen und dadurch ebenfalls die Anfälligkeit für Sekundärerkrankungen erhöhen. Das bekannteste Beispiel hierfür ist wahrscheinlich die HIV-Infektion, bei der die Patienten aufgrund der ausgeprägten Immunschwäche an einer der vielen Begleiterkrankungen versterben.

Die Interaktion von Wirt und Pathogenen wird überwiegend isoliert, d.h. in einer ein Wirt – ein Pathogen-Beziehung studiert. Dabei werden Folgen einer im Rahmen einer Infektion mit mehreren Erregern auftretenden Immunmodulation nicht erfasst. In der vorliegenden Arbeit wurde die Koinfektion von Tb und Malaria, zwei Infektionen, an denen jedes Jahr Millionen von Menschen erkranken und versterben, in experimentellen Mausmodellen studiert. Aufgrund ihrer epidemiologischen Überlappungen sind Koinfektionen in vielen Regionen sehr wahrscheinlich. Diese Arbeit konzentrierte sich auf zwei übergeordnete Fragestellungen, wobei zum einen studiert wurde, wie sich eine zu Grunde liegende chronische Tb auf eine akute schwere Malaria auswirkt. Zum anderen wurde der Frage nachgegangen, inwiefern eine Malariainfektion die Kontrolle einer experimentellen Tb beeinträchtigen kann.

## 4.1 EZM

ZM ist die schwerste Komplikation, die bei der durch *P. falciparum* verursachten Malaria Tropica im Menschen auftreten kann. Vor allem Kinder im Vorschulalter sind betroffen und jährlich entwickeln etwa 575.000 eine ZM (Idro *et al.*, 2010). In afrikanischen Kindern setzt das krankheitstypische Koma häufig 1-3 Tage nach dem Auftreten des Fiebers ein. Weitere Symptome sind Hirnhaut- und Hirngefäßschwellungen, intrakranielle Hypertonie, Veränderungen der Netzhaut und des Hirnstamms (Newton *et al.*, 2000). In Erwachsenen ist die ZM eher Teil eines Multiorganversagens. Die Erkrankten entwickeln Fieber, Kopf- und Gliederschmerzen, Delirium und Koma. Ohne Behandlung verläuft die ZM ausnahmslos tödlich, aber auch trotz Behandlung sterben 15-20 % (Dondorp *et al.*, 2005). Von denen, die die ZM überstehen, leiden 25 % an Langzeitkonsequenzen wie Wahrnehmungsstörungen, verschlechterter Motorik und Epilepsie (Carter *et al.*, 2005; John *et al.*, 2008; Ngoungou and Preux, 2008). Ein fundamentales Problem der pathologischen Ursachenfindung ist der Mangel an humanen Daten, da diese erst *post mortem* erhoben werden können (Medana and Turner, 2006; Milner *et al.*, 2014; Shikani *et al.*, 2012). Somit besteht nicht die Möglichkeit, potentielle Unterschiede zwischen Überlebenden und denen, die an der ZM sterben, aufzudecken. Daher stammen die meisten Untersuchungen, die Pathomechanismen erklären, aus Mausstudien, vor allem aus Infektionen von C57BL/6 Mäusen mit *PbANKA* (Amante *et al.*, 2010; Baptista *et al.*, 2010; Belnoue *et al.*, 2003; Hansen and Bernard, 2007; Haque *et al.*, 2011; Lepenies *et al.*, 2008).

Die Infektion von C57BL/6 Mäusen mit *PbANKA* ist zwar das allgemein akzeptierte Modell für die experimentelle Untersuchung der ZM, jedoch wird es auch kontrovers diskutiert (Langhorne *et al.*, 2011; de Souza *et al.*, 2010; Stevenson *et al.*, 2010; White *et al.*, 2010). Speziell die Sequestrierung von iRBZ ans zerebrale Endothel während der EZM wurde lange in Frage gestellt. Dennoch konnte mehrfach gezeigt werden, dass iRBZ im Gehirn sequestrieren (Baptista *et al.*, 2010; Franke-Fayard *et al.*, 2010; Hearn *et al.*, 2000; McQuillan *et al.*, 2011; de Souza and Riley, 2002). Die Sequestrierung von Parasiten ist offenbar eine Voraussetzung für die Kreuzpräsentation von Parasitenantigenen durch Endothelzellen im Gehirn (Howland *et al.*, 2015). In Folge dessen können  $CD8^+$  T-Zellen, die ins Gehirn einwandern, vor Ort aktiviert werden und durch ihre zytotoxischen Eigenschaften das Endothel schädigen, was maßgeblich zum letalen Verlauf der EZM beiträgt (Poh *et al.*, 2014). Die lokale Produktion von pro-entzündlichen Zytokinen wie TNF (Grau *et al.*, 1987),  $IFN\gamma$  (Grau *et al.*, 1989) und  $LT\alpha$  (Engwerda *et al.*, 2002) ist ebenso kritisch für die Entwicklung einer EZM wie die Einwanderung von  $CD8^+$  T-Zellen und die Sequestrierung von iRBZ, da sie beides unterstützen (Amante *et al.*, 2010; Hansen, 2012; de Souza *et al.*, 2010).

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass eine Reduzierung der Parasitämie die Entwicklung einer EZM verhindert (Baptista *et al.*, 2010; Haque *et al.*, 2011; McQuillan *et al.*, 2011; Mitchell *et al.*, 2005), unter anderem vermutlich aufgrund der dadurch geringeren Antigenmenge im Gehirn (Howland *et al.*, 2013). Dabei scheint die Reduzierung der Parasitämie und der Schutz vor EZM vor allem durch die frühe Induzierung pro-entzündlicher

Immunantworten (Th1) zu erfolgen (Mitchell *et al.*, 2005; Oakley *et al.*, 2013; Settles *et al.*, 2014; Tamura *et al.*, 2011).

Verschiedene Gruppen inklusive unserer eigenen konnten zudem zeigen, dass mykobakterielle Infektionen einen gewissen Schutz gegen verschiedene *Plasmodium*-Parasiten vermitteln, wobei sich dieser Schutz hauptsächlich in einer verringerten Parasitämie widerspiegelte (Clark *et al.*, 1976; Leisewitz *et al.*, 2008; Matsumoto *et al.*, 2000; Mueller *et al.*, 2012; Murphy, 1981; Page *et al.*, 2005; Parra *et al.*, 2013; Smrkovski and Strickland, 1978).

Deshalb wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine *Mtb*-Infektion durch die Induktion einer Th1-Immunantwort die Parasitenanzahl reduzieren und damit zum Schutz vor der EZM beitragen könnte.

#### **4.1.1 Eine *Mtb*-Infektion schützt nicht vor einer *PbANKA*-induzierten EZM**

Der BCG-induzierte Schutz gegen nachfolgende *Plasmodium*-Infektionen konnte bereits vor 40 Jahren nachgewiesen werden (Clark *et al.*, 1976; Smrkovski and Strickland, 1978). Smrkovski und Strickland berichteten von einem umfangreichen Schutz gegen eine *PbANKA*-Infektion in den Mäusen, denen vorher BCG verabreicht wurde. Dabei bewirkte eine einzige Dosis zehn Tage vor der *PbANKA*-Infektion, dass 50 % der Mäuse nicht starben, obwohl eine *PbANKA*-Infektion normalerweise immer tödlich verläuft. Überraschenderweise und im Gegensatz zu der eben beschriebenen Studie konnte in der vorliegenden Arbeit kein Einfluss einer *Mtb*-Infektion auf den Verlauf der *PbANKA*-Infektion festgestellt werden. Die koinfizierten Mäuse waren nicht geschützt und erlagen wie die *PbANKA*-Kontrollmäuse der EZM. Daran änderten auch die Modulationen der *PbANKA*-Infektion (Anzahl injizierter iRBZ, Zeitpunkt der Koinfektion, verwendeter *PbANKA*-Stamm) nichts.

Zwischen der vorliegenden Arbeit und der Studie von Smrkovski und Strickland gibt es grundlegende Unterschiede, die die unterschiedlichen Beobachtungen erklären können. In letzterer wurden die Mäuse mit *PbANKA*-Sporoziten infiziert, wohingegen in der vorliegenden Arbeit iRBZ verwendet wurden, um die Malariainfektion zu initiieren. Damit wird die Leberphase der Malariainfektion umgangen und sofort die Blutphase induziert. Diese Infektionsroute wurde gewählt, da sie standardmäßig in EZM-Studien verwendet wird und die gegen die Blutphase gerichtete Immunantwort in der EZM für die Pathologie verantwortlich ist (Amante *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2000; Claser *et al.*, 2011; Niikura *et al.*, 2010; Pais and Chatterjee, 2005; Tamura *et al.*, 2011; Villegas-Mendez *et al.*, 2012). Möglicherweise beeinträchtigte die BCG-Infektion in der Smrkovski-Studie bereits die Leberphase der Parasiten, die in der vorliegenden Arbeit umgangen wurde. Eine ähnliche Beobachtung machte unsere Gruppe in einer Studie, in der wir *Mtb*-infizierte Tiere über Sporoziten mit *PbNK65* infizierten. Hier konnten wir eine reduzierte Parasitämie und eine verzögerte Präpatenz in koinfizierten Mäusen verzeichnen, was auf einen Einfluss der *Mtb*-Infektion auf die Leberstadienentwicklung der Parasiten hindeutet (Mueller *et al.*, 2012).

Außerdem wurde bei Smrkovski und Strickland BCG i.v. verabreicht, was physiologisch nicht relevant ist und eine systemische Infektion induziert, welche in kurzer Zeit zur Besiedlung von Milz und Leber führt (Mittrücker *et al.*, 2007). Im Gegensatz dazu erreicht *Mtb* durch eine Aerosolinfektion zunächst die Lunge und die Keime breiten sich nur langsam auf andere Organe wie Milz und Leber aus. Die Bakterienanzahl, die über eine i.v.-Infektion in Leber und Milz induziert wird, wird in diesen Organen über eine Niedrigdosis-Aerosolinfektion erst einige Wochen später erreicht (Chackerian *et al.*, 2002; Jung *et al.*, 2008).

Der BCG-vermittelte Schutz gegen nicht verwandte Pathogene wie *Plasmodium*-Parasiten scheint unspezifisch zu sein und wird möglicherweise über die Aktivierung des angeborenen Immunsystems vermittelt (Iqbal and Hussain, 2014; Parra *et al.*, 2013). Makrophagen und DZ in Milz und Leber sorgen für die Beseitigung von iRBZ. BCG kann zur Aktivierung von Phagozyten beitragen und induziert außerdem die Freisetzung antimikrobieller Peptide (Parra *et al.*, 2013). Da sich die BCG-Infektion nach der i.v.-Injektion vor allem in Leber und Milz manifestiert, kann eine frühzeitige BCG-vermittelte Immunaktivierung in diesen Organen maßgeblich zur Reduktion der Parasitämie und somit zu einem unspezifischen Schutz beitragen.

Ähnliches ist für die Interaktion einer *Mtb*-Infektion mit der Leberphase der Malariainfektion denkbar (Mueller *et al.*, 2012). Sporozoiten gelangen über Kupffer-Zellen, Leber-ansässige Makrophagen, in die Leber (Frevert *et al.*, 2005). Sollten diese im Rahmen einer vorliegenden *Mtb*-Infektion voraktiviert sein, könnte sich das auf die Anzahl der Sporozoiten, die letztendlich Kupfferzellen durchqueren und Hepatozyten infizieren können, auswirken und dadurch die Entwicklung der Leberstadien beeinträchtigen. Für zukünftige Untersuchungen wäre daher interessant, ob eine *Mtb*-Infektion einen Einfluss auf die *PbANKA*-induzierte EZM hat, wenn mit Sporozoiten anstatt mit iRBZ infiziert wird.

#### **4.1.2 Die *PbANKA*-induzierte Immunantwort ist in *Mtb*-infizierten Tieren unverändert**

Eine Reduzierung der Parasitämie kann die Entwicklung einer EZM verhindern (Baptista *et al.*, 2010; Haque *et al.*, 2011; McQuillan *et al.*, 2011; Mitchell *et al.*, 2005; Tamura *et al.*, 2011). Tamura *et al.* zeigten, dass durch die Verabreichung des Ftl3-Liganden die *PbANKA*-Parasitämie reduziert wird und C57BL/6 Mäuse vor der Entwicklung einer EZM geschützt sind (Tamura *et al.*, 2011). Dabei scheint die Reduzierung der Parasitämie und der Schutz vor EZM vor allem durch die Induktion pro-entzündlicher Immunantworten zu erfolgen (Mitchell *et al.*, 2005; Oakley *et al.*, 2013; Settles *et al.*, 2014; Tamura *et al.*, 2011). So konnten Settles *et al.* zeigen, dass chronische Infektionen, die eine Th1-Antwort induzieren, *PbANKA*-infizierte Mäuse vor der Entwicklung einer EZM schützen (Settles *et al.*, 2014). Die Gruppe zeigte, dass durch die frühe Induktion von Th1-Zytokinen durch eine *Toxoplasma gondii*-(*T. gondii*)-Koinfektion oder durch die Behandlung von Mäusen mit löslichen *T. gondii*-Antigenen die systemische Parasitämie reduziert wurde und damit auch die im Gehirn sequestrierten Parasiten. Dabei spielt eine frühe IL-12-Antwort, die die Produktion von IFN $\gamma$

induziert, eine wesentliche Rolle. Die Phagozytose von *Mtb* durch Makrophagen und DZ führt zur Freisetzung von IL-12 und der Entwicklung einer Th1-Immunantwort (Flynn and Chan, 2001b). Dennoch konnte in der vorliegenden Arbeit weder eine reduzierte Parasitämie noch erhöhte Level an IL-12 in koinfizierten Tieren detektiert werden.

In der vorliegenden Arbeit war unmittelbar vor der *PbANKA*-Infektion die IFN $\gamma$ -Konzentration in Milz und Serum von *Mtb*-infizierten Tieren signifikant erhöht. In einer Koinfektionsstudie mit *PbANKA* und dem nah verwandten Malariaparasiten *PbK173*, der aber keine EZM induziert, konnten Mitchell *et al.* zeigen, dass *PbK173* eine sehr frühe IFN $\gamma$ -Produktion induziert und damit koinfizierte Tiere vor einer *PbANKA*-vermittelten EZM schützt (Mitchell *et al.*, 2005). Allerdings war die Konzentration an IFN $\gamma$  in dieser Studie um ein vielfaches höher als die in der hier vorliegenden Arbeit durch *Mtb* induzierte. Das könnte erklären, warum hier kein Effekt auf die Parasitämie und damit kein Schutz vor der Ausbildung der EZM in koinfizierten Tieren festzustellen war.

Im Gegensatz zu der vorliegenden Studie konnten Page *et al.* einen signifikanten Schutz vor der Infektion mit einem anderen Malariaparasiten, nämlich dem letalen *Py*-Stamm, in *Mtb*-infizierten Tieren nachweisen (Page *et al.*, 2005). Diese Studie zeigte, dass eine Infektion mit *Mtb* zwei oder acht Wochen vor der Infektion mit dem letalen *Py*-Stamm in einer reduzierten Parasitämie und einem signifikant erhöhten Überleben der koinfizierten Mäuse im Vergleich zu denen, die nur mit dem letalen *Py* infiziert wurden, resultierte. Ein Unterschied zu der hier vorliegenden Arbeit war jedoch, dass Page *et al.* einen anderen *Mtb*-Stamm (CDC1551) verwendeten, der bereits nach zwei Wochen eine vergleichsweise hohe Keimlast in der Milz erreicht. Zu diesem Zeitpunkt waren die mit *Mtb* H37Rv infizierten Mäuse in der vorliegenden Studie meist noch negativ für Mykobakterien in der Milz (siehe Anhang 1). Das könnte erklären, warum die Autoren in der Milz eine deutlich gesteigerte Th1-Antwort in Anwesenheit einer *Mtb*-Infektion detektierten, die zum Schutz gegen eine letale *Py*-Infektion beitragen konnte. Genexpressionsanalysen ließen erkennen, dass nicht die Art sondern die Stärke der Th1-Antwort ausschlaggebend für den protektiven Effekt war. Die *Mtb*-Koinfektion führte zu einer Erhöhung klassischer Th1-Zytokine wie IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  sowie der Chemokine CCL5, CXCL9 und CXCL10. Da der Schutz vor der Malariainfektion bereits vor der Etablierung der *Mtb*-spezifischen adaptiven Immunantwort bestand, schlossen die Autoren daraus, dass dieser Effekt nicht durch kreuzreaktive T-Gedächtniszellen ausgelöst wurde. Vielmehr vermuteten sie, dass sowohl eine akute als auch eine chronische *Mtb*-Infektion systemisch ein immunologisches Milieu induziert, das die Immunantwort gegen sekundäre Infektionen stärkt, indem angeborene und pathogenspezifische Antworten gesteigert werden.

Pro-entzündliche Zytokine spielen eine komplexe Rolle in der Pathogenese der EZM und haben sowohl schützende als auch schädliche Effekte. Der Zeitpunkt der TNF $\alpha$ -Produktion während der *PbANKA*-Infektion ist von entscheidender Bedeutung. Früh in der Infektion kann es schützend wirken, aber anhaltend hohe Konzentrationen führen zu Komplikationen (Hunt and Grau, 2003). TNF $\alpha$  steigert die Expression von ICAM-1 auf dem zerebralen Gefäßendothel und sorgt damit für die Zytoadhärenz der iRBZ (Favre *et al.*, 1999). Die

Reduzierung von TNF $\alpha$  spät in der Infektion durch die Behandlung mit Pentoxifylline, was die TNF $\alpha$ -Produktion in Makrophagen verringert, oder mit Antikörpern gegen TNF kann das Fortschreiten der EZM nicht mehr verhindern. In der vorliegenden Arbeit konnte weder vor noch während der *PbANKA*-Infektion ein verändertes Expressionsmuster von TNF $\alpha$  in koinfizierten Tieren detektiert werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte die zu Grunde liegende Tb-Infektion die Immunantwort, die durch *PbANKA* induziert wurde, nicht beeinflussen. Stattdessen stellte sich heraus, dass das immunologische Milieu in koinfizierten Mäusen dem in *PbANKA*-infizierten Mäusen sehr ähnelte. Daher kann man rückschließen, dass die *Mtb*-induzierte Immunantwort von der durch *PbANKA* induzierten dominiert wurde. Kürzlich wurden Gene und assoziierte Signalmoleküle identifiziert, die während der EZM durch *interferon regulatory factor* (IRF) 8 aktiviert werden (Berghout *et al.*, 2013). IRF8 ist ein Mitglied der IRF-Transkriptionsfaktorfamilie, die eine zentrale Rolle im Interferon-Signalweg, bei der Antwort auf Infektionen und der Reifung von DZ spielt (Tamura *et al.*, 2008; Wang and Morse III, 2009). Während einer Infektion aktiviert IRF8 anti-mikrobielle Schutzantworten, fördert pro-entzündliche Signale und verstärkt die frühe Immunantwort (Giese *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2004; Tamura *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 2003). Interessanterweise stellten Berghout und Kollegen fest, dass sich in den Lungen *Mtb*-infizierter Mäuse die Genaktivierung beträchtlich mit der in Gehirnen *PbANKA*-infizierter Tiere überschneidet und 80 % der gemeinsam induzierten Proteine eine IRF8-Bindestelle aufwiesen. In der Tb spielen IRF8-abhängige Signalwege eine protektive Rolle und Mutationen in IRF8 konnten in Mensch (Hambleton *et al.*, 2011) und Maus (Marquis *et al.*, 2009) mit einer erhöhten *Mtb*-Suszeptibilität in Verbindung gebracht werden. Die Autoren schlossen daraus, dass sich beide Infektionskrankheiten eine entzündliche Kernimmunantwort teilen. Diese wirkt schützend vor einer *Mtb*-Infektion, aber gleichzeitig schädlich während einer *PbANKA*-Infektion, sodass *PbANKA*-infizierte Mäuse eine EZM entwickeln. Diese Beobachtungen könnten erklären, warum eine zeitgleiche *Mtb*-Infektion nicht in der Lage ist, Mäuse vor der Entwicklung einer EZM zu schützen. Die induzierten Immunantworten, die die Kontrolle von *Mtb* fördern, fördern gleichzeitig die Entwicklung einer EZM.

#### **4.1.3 Unveränderte Sequestrierung von iRBZ im Gehirn koinfizierter Mäuse**

Ein zentraler Faktor der Pathogenese im Menschen und der daraus resultierenden Veränderung im Hirngewebe scheint die Sequestrierung von iRBZ im Gehirn zu sein. Die Sequestrierung wird durch das Anhaften parasitärer Proteine auf der Oberfläche der iRBZ an das Endothel ausgelöst (Newbold *et al.*, 1999). Durch die Sequestrierung wird der Blutfluss im Gehirn verschlechtert und die daraus resultierende Hypoxie unterstützt vermutlich das Eintreten eines Komas. Außerdem induzieren freigesetzte parasitäre Bestandteile wie das GPI eine Entzündungsreaktion. GPI fungiert dabei als PAMP oder Toxin, nach dessen Bindung durch z.B. Monozyten oder Endothelzellen NF- $\kappa$ B aktiviert wird und zur Transkription von entzündlichen Zytokinen wie TNF $\alpha$ , Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 und

gerinnungsfördernden Molekülen führt (Miller *et al.*, 2013; Schofield and Grau, 2005). Somit wird die Bedeutung der Parasitenlast als zentraler Bestandteil der Pathologie deutlich. Phillipps *et al.* konnten in ihrer Studie zusätzlich feststellen, dass die Parasitämie einer der Hauptrisikofaktoren für die Entwicklung einer schweren *Falciparum*-Malariainfektion darstellt (Phillips *et al.*, 2009).

Obwohl lange kontrovers diskutiert, konnte gezeigt werden, dass auch im Mausmodell bei der Infektion von C57BL/6 Mäusen mit *PbANKA* eine Sequestrierung von iRBZ im Gehirn stattfindet (Baptista *et al.*, 2010; Franke-Fayard *et al.*, 2010; Hearn *et al.*, 2000; McQuillan *et al.*, 2011; de Souza and Riley, 2002). Hearn *et al.* wiesen bei der *PbANKA*-Infektion von (BALB/c x C57BL/6)<sub>F1</sub> Mäusen eine hohe Expression von pro-entzündlichen Zytokinen wie TNF $\alpha$  und IL-1 verbunden mit einer Hochregulierung von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1, CD36 und Thrombospondin auf dem vaskulären Endothel, die für die Bindung von iRBZ sorgen, nach. Baptista *et al.* zeigten darüber hinaus, dass die Sequestrierung von iRBZ für die Entwicklung der EZM notwendig ist. Das alleinige Einwandern von CD8<sup>+</sup> T-Zellen ins Gehirn reicht nicht aus, um eine EZM zu induzieren. Die gleichzeitige Anwesenheit von iRBZ und CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Gehirn spielt eine wichtige Rolle für das Einsetzen der Pathologie (Baptista *et al.*, 2010). In der vorliegenden Arbeit wurde die Sequestrierung von iRBZ über die Detektion parasitärer 18S rRNA über qRT-PCR in Gehirnen von *PbANKA*- und koinfizierten Mäusen nachgewiesen. Dabei wurden keine Unterschiede festgestellt, was bedeutet, dass die Sequestrierung von iRBZ in Gehirnen von *Mtb*-infizierten Tieren nicht beeinträchtigt war. Dies war aufgrund der nicht veränderten Parasitämie in koinfizierten Tieren auch nicht zu erwarten.

#### **4.1.4 Kein Unterschied in der kDZ-Population in der Milz und der CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort im Gehirn koinfizierter Tiere**

Die Milz stellt das Schlüsselorgan für die Initiierung der pathogenen Immunantwort gegen eine *Plasmodium*-Infektion dar (Curfs *et al.*, 1989). Darin inbegriffen ist die Aktivierung von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die an der Entwicklung der EZM beteiligt sind. deWalick *et al.* konnten zeigen, dass kDZ parasitenspezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Milz aktivieren und zur Induktion der EZM beitragen. Durch die Depletion von kDZ zeigten *PbANKA*-infizierte Mäuse drei und fünf Tage nach der Infektion reduzierte IFN $\gamma$ -Serumkonzentrationen und entwickelten keine neurologischen Symptome. Die reduzierte IFN $\gamma$ -Konzentration konnte darauf zurückgeführt werden, dass parasitenspezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus kDZ-depletierten Tieren ohne das effektive Priming durch kDZ nicht mehr auf Parasitenantigene antworten konnten (deWalick *et al.*, 2007). Das von CD4<sup>+</sup> T-Zellen produzierte IFN $\gamma$  führt normalerweise über Endothelzellaktivierung zur Akkumulation von parasitenspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Gehirn (Villegas-Mendez *et al.*, 2012). Die Endothelzellen präsentieren Parasitenantigene an die ZTL, die wiederum durch die Ausschüttung von Perforin und Granzym B direkt an der Beschädigung der Blut-Hirn-Schranke beteiligt sind (Haque *et al.*, 2011; Nitchou *et al.*, 2003). Neben der Inhibierung der Sequestration von iRBZ kann eine EZM also auch über die

Reduzierung von ZTL, die ins Gehirn einwandern, verhindert werden. In der vorliegenden Arbeit konnte kein Unterschied in der kDZ-Anzahl zwischen koinfizierten und *PbANKA*-infizierten Tieren festgestellt werden. Die kDZ unterschieden sich zudem nicht an dem Anteil von CD80-, CD86- und MHC-exprimierenden Zellen sowie der Menge der exprimierten Kostimulatoren. Deshalb konnte nicht davon ausgegangen werden, dass die pathologischen Prozesse, die durch die kDZ eingeleitet werden und damit die Ausbildung der EZM fördern, verhindert werden konnten.

Nach ihrer Aktivierung in der Milz wandern CD8<sup>+</sup> T-Zellen während der *PbANKA*-Infektion CXCR3-abhängig ins Gehirn ein (Campanella *et al.*, 2008; Hansen and Bernard, 2007). Dies geschieht über die Hochregulierung der Chemokine IP-10 und *monokine-induced by IFN $\gamma$*  (Mig) in den Gehirnen *PbANKA*-infizierter Mäuse. Eingewanderte CXCR3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen induzieren wiederum eine zweite Welle an Chemokinen, was eine weitere Rekrutierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen induziert, die allerdings unabhängig von CXCR3 erfolgt (Campanella *et al.*, 2008). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die CXCR3-Expression mit dem Schweregrad der Erkrankung einhergeht und dass CXCR3<sup>-/-</sup> Mäuse resistent gegenüber der Entwicklung einer EZM sind (Campanella *et al.*, 2008; Miu *et al.*, 2008; Van den Steen *et al.*, 2008). In der vorliegenden Arbeit konnte kein Unterschied in der Anzahl CXCR3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen weder in der Milz, aus der die Zellen rekrutiert werden, noch im Gehirn zwischen *PbANKA*- und koinfizierten Mäusen festgestellt werden. Zudem waren die Mengen an z.B. MCP-1 und IFN $\gamma$  im Gehirn in den beiden Versuchsgruppen vergleichbar, wohingegen Campanella *et al.* eine Erhöhung dieser beiden Moleküle beobachten konnten. Daher waren in der vorliegenden Arbeit keine Unterschiede in der Ausprägung der EZM, die auf ZTL zurückzuführen sind, zu erwarten.

Zusammenfassend zeigen die hier beschriebenen Experimente, dass eine zu Grunde liegende *Mtb*-Infektion entgegen der Hypothese nicht zur Kontrolle der Malariaparasiten in koinfizierten Tieren beiträgt und somit den Verlauf einer *PbANKA*-induzierten EZM nicht verändert. Weder die Erkrankungsrate noch die Sterblichkeit der Tiere wurden durch die Koinfektion beeinflusst. Die verschiedenen Pathomechanismen, die für die Entwicklung einer EZM verantwortlich sind wie die Sequestrierung von *PbANKA*-iRBZ und CXCR3-abhängige Einwanderung von antigenspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen ins Gehirn oder auch die entzündliche Immunantwort wurden durch die chronische *Mtb*-Infektion nicht verändert. Vielmehr schien es, dass die *Mtb*-Immunantwort in koinfizierten Mäusen von der *PbANKA*-Immunantwort dominiert wurde. Zum Zeitpunkt des Einsetzens der neurologischen Symptome konnten kaum Unterschiede in der Immunantwort zwischen *PbANKA*- und koinfizierten Mäusen festgestellt werden. Diese Ergebnisse erklären, warum kein Schutz gegen eine *PbANKA*-induzierte EZM in *Mtb*-infizierten Tieren zu beobachten war.

## 4.2 Der Verlauf der experimentellen Tb ist durch eine Py-Koinfektion übergangsweise verschlechtert

Der Malariaerkrankung in Erwachsenen wurde lange Zeit wenig Beachtung geschenkt, da Erwachsene in endemischen Gebieten gewöhnlich einen hohen Grad an schützender Immunität entwickeln. Diese entsteht durch lange und kontinuierliche Erregerexposition. Meist gehen die Infektionen in Erwachsenen mit nur einer geringen Parasitämie unter Abwesenheit klinischer Symptome einher (Bousema *et al.*, 2014; Langhorne *et al.*, 2008). Aber auch milde oder asymptomatische Malariainfektionen können das Immunsystem modulieren und somit zum erhöhten Risiko, eine Sekundärinfektion zu erleiden, beitragen (Takem *et al.*, 2014; Troye-Blomberg and Berzins, 2008).

In dem zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde deshalb die Koinfektion mit dem *Py*-Stamm, der von der Maus selbstständig erfolgreich bekämpft wird und somit ein Modell für eine milde Malariainfektion darstellt, und *Mtb* untersucht. Scott *et al.* konnten bereits zeigen, dass der Verlauf einer chronischen Tb durch die Koinfektion mit *Py* in Mäusen verschlechtert wird. Allerdings wurden die dafür verantwortlichen Immunantworten nicht näher untersucht (Scott *et al.*, 2004). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine *Py*-Infektion vorübergehend die Tb-Erkrankung in koinfizierten Mäusen verschlechtert. Der Einfluss auf das *Mtb*-Wachstum, das anhand der Keimlast beurteilt wurde, war nur moderat. Allerdings erhöhten sich trotzdem die *Mtb*-Keimlasten in Lunge, Milz und Leber von koinfizierten Mäusen signifikant. Zusätzlich deuteten histologische Untersuchungen darauf hin, dass die Mykobakterien in koinfizierten Lungen häufig in Aggregaten vorlagen. Im Vergleich dazu kamen die Mykobakterien meist als Einzelbakterien in *Mtb*-Kontrollmäusen vor. Die *Mtb*-Aggregate wurden vermutlich bei der Organhomogenisierung und Ausplattierung nur unvollständig vereinzelt (Lewin *et al.*, 2003), sodass die *Mtb*-Anzahlen, die über die Keimzahlen ermittelt wurden, wahrscheinlich zu gering ausfielen. Ein entscheidender Unterschied zeigte sich allerdings in der Lungenpathologie, die in koinfizierten Mäusen im Vergleich zu den Mäusen, die nur mit *Mtb* infiziert waren, stärker ausgeprägt war. Dies äußerte sich vor allem in erhöhten Gesamtzellzahlen in der Lunge, was einen Indikator für die Zellinfiltration darstellt, und entsprechend einem größeren Anteil an von Läsionen betroffener Fläche in der Lunge.

### 4.2.1 NO als wichtiger Abwehrmechanismus trotz Erhöhung von IL-10 nicht beeinträchtigt

Während der chronischen Tb verursachte die *Py*-Infektion eine Rekrutierung von Immunzellen in die Lunge, die mit einer erhöhten Produktion von pro- und anti-entzündlichen Zytokinen zusammenfiel. Die T-Zell-Antworten wurden durch die Koinfektion nicht reduziert, sondern im Gegenteil verstärkt. Nach *ex vivo* Restimulation produzierten CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus koinfizierten Lungen sowohl mehr pro-entzündliche Zytokine wie IFN $\gamma$  als auch anti-entzündliche Zytokine wie IL-10, wohingegen die Zytokinproduktion durch

$\gamma\delta$  T-Zellen unverändert blieb. IL-10 ist ein anti-entzündliches Zytokin, welches Th1-Antworten hemmt, und spielt in der Immunantwort gegen Malaria eine wichtige Rolle, indem es Immunpathologie verhindert (Couper *et al.*, 2008a, 2008b; Freitas do Rosario *et al.*, 2012). Ebenso wirkt IL-10 pro-entzündlichen Immunantworten entgegen, die maßgeblich an der schützenden Immunantwort gegen *Mtb* beteiligt sind (Boussiotis *et al.*, 2000; Murray and Young, 1999; Murray *et al.*, 1997; Redford *et al.*, 2010; Schreiber *et al.*, 2009). Mehrfach konnte gezeigt werden, dass ein Überschuss an IL-10 das Fortschreiten der Tb fördert (Beamer *et al.*, 2011; Jamil *et al.*, 2007). Durch IL-10 werden Makrophagen inaktiviert und schützende antimikrobielle Effektorfunktionen reduziert (Shibata *et al.*, 1998). Dazu gehört z.B. die IFN $\gamma$ -induzierte Produktion von RNI und die Anreicherung von lysosomalen Enzymen, die zum Abtöten von Mikroben beitragen (Decker *et al.*, 2002; Gazzinelli *et al.*, 1992). In der Maus ist die Bildung von RNI der wichtigste Abwehrmechanismus gegen *Mtb* (Adams *et al.*, 1997; Herbst *et al.*, 2011). Das gebildete NO führt dabei in IFN $\gamma$ -aktivierten Makrophagen zur Einleitung von programmiertem Zelltod (Apoptose) in den infizierten Wirtszellen. Die Rolle von NO wurde außerdem dadurch bestätigt, dass die Inhibition der iNOS2 zu einer Reaktivierung der Tb mit einem starken Erregerwachstum und einem verfrühten Versterben der Tiere führt (Flynn *et al.*, 1998; MacMicking *et al.*, 1997). Allerdings waren in der vorliegenden Arbeit trotz erhöhter IL-10-Konzentration in der Lunge koinfizierter Tiere die iNOS-Expression und die NO-Konzentration nicht verändert. Dies könnte eine Begründung für den nur geringen Unterschied im *Mtb*-Wachstum in koinfizierten verglichen mit *Mtb*-Mäusen darstellen. Die Bedeutung von iNOS geht über das direkte Abtöten von *Mtb* durch RNI hinaus. Während einer persistierenden Infektion ist die Produktion von RNI unerlässlich, um schädliche entzündliche Immunantworten zu regulieren. Die Abwesenheit von RNI führt zu einem Anstieg an neutrophilen Granulozyten in der Lunge und zur Verstärkung der Gewebsnekrose am Infektionsort (Beisiegel *et al.*, 2009; Chan *et al.*, 1995; Cooper *et al.*, 2000). Es scheint also schlüssig, dass keine vermehrte Infiltration von neutrophilen Granulozyten in die Lungen koinfizierter Mäuse zu beobachten war, da die RNI-Konzentration nicht erniedrigt war.

#### **4.2.2 Neutrophile Granulozyten und NK-Zellen tragen nicht zur verstärkten Infiltration in koinfizierte Lungen bei**

Die Feststellung, dass die Anzahl an neutrophilen Granulozyten in koinfizierten Lungen vergleichbar mit der in *Mtb*-infizierten Lungen war, steht im Kontrast zur erhöhten Ausschüttung von IL-17A in Anwesenheit von *Py*. IL-17A ist dafür bekannt, die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten an den Infektionsherd zu fördern (Miyamoto *et al.*, 2003). IL-17 induziert die Sekretion von MIP-2 und IL-6, welche wiederum neutrophile Granulozyten zum Infektionsort rekrutieren. Die Hauptproduzenten von IL-17A in einer Tb-Infektion sind  $\gamma\delta$  T-Zellen (Okamoto Yoshida *et al.*, 2010), die in der hier beschriebenen Arbeit jedoch nicht zu einer vermehrten Produktion beizutragen schienen. Eine andere Quelle für IL-17A könnten Th17-Zellen sein, ein spezieller Typ von Th-Zellen, die nach dem von ihnen

produzierten IL-17 benannt wurden (Lyadova and Panteleev, 2015). Allerdings konnte in der vorliegenden Arbeit auch keine gesteigerte IL-17A-Produktion von CD4<sup>+</sup> T-Zellen in koinfizierten Tieren beobachtet werden. Im Gegensatz dazu wurden mehr IL-17A-produzierende CD8<sup>+</sup> T-Zellen in koinfizierten Lungen detektiert, die vermutlich zur gesteigerten IL-17A-Konzentration in der Lunge beitrugen. Andere Quellen für das IL-17 könnten *innate lymphoid cells* (ILC) oder invariante Natürliche Killer T-Zellen (iNKT-Zellen) sein.

Der in der vorliegenden Arbeit beobachtete Anstieg an IFN $\gamma$  in koinfizierten Lungen könnte zur Inhibierung der Akkumulation neutrophiler Granulozyten beigetragen haben (Nandi and Behar, 2011). IFN $\gamma$  reguliert nicht nur die Produktion von IL-17-induzierten Chemokinen wie KC oder MIP-2 herunter, sondern unterdrückt ebenfalls die Expression von E- und P-Selektinen auf Endothelzellen. Selektine sind für die Einwanderung neutrophiler Granulozyten in das entzündete Gewebe nötig (Desvignes and Ernst, 2009; Melrose *et al.*, 1998). Zusätzlich kann IFN $\gamma$  direkt auf neutrophile Granulozyten einwirken, indem es deren Zelltod beschleunigt, wie es *in vitro* nachgewiesen werden konnte (Nandi and Behar, 2011). Die Quelle des IFN $\gamma$  waren im vorliegenden Modell vermutlich vornehmlich T-Zellen, da NK-Zellen, die in der frühen Phase einer *Mtb*-Infektion normalerweise zur IFN $\gamma$ -Produktion beitragen (Korbel *et al.*, 2008), während der Koinfektion mit *Py* signifikant reduziert waren. Die Depletion von NK-Zellen vor und während einer *Mtb*-Infektion hat generell keinen Einfluss auf die Kontrolle des *Mtb*-Wachstums (Junqueira-Kipnis *et al.*, 2003). Fehlen allerdings T-Zellen, können NK-Zellen den Schutz gegen eine *Mtb*-Infektion bis zu einem gewissen Maß gewährleisten und sind dann notwendig, um die Pathologie so gering wie möglich zu halten (Feng *et al.*, 2006). Da die IFN $\gamma$ -Konzentrationen erhöht und die T-Zell-Antworten während der Koinfektion nicht beeinträchtigt waren, kann daraus geschlossen werden, dass die Reduzierung der NK-Zellen keine Auswirkung auf den Verlauf der *Mtb*-Infektion hatte.

#### **4.2.3 Die Rekrutierung einer CD11c<sup>int</sup> Population in die Lungen koinfizierter Mäuse – eine Nische für *Mtb*?**

Das Bekämpfen einer akuten Infektion wie Malaria basiert auf der Stimulierung der Myelopoese, um eine angemessene Immunantwort zu gewährleisten (Belyaev *et al.*, 2013). Während des Blutstadiums der Malariainfektion wird eine große Anzahl an phagozytischen Immunzellen wie Monozyten, Makrophagen und DZ benötigt, um in der Milz iRBZ zu beseitigen und T-Zellen zu primen. Von diesen Zelltypen sind CD11c<sup>+</sup> DZ sowohl am T-Zell-Priming als auch an der Kontrolle der Parasitämie beteiligt (deWalick *et al.*, 2007; Voisine *et al.*, 2010; Wykes *et al.*, 2007a). Daraus folgend konnten beträchtliche Mengen an CD11c<sup>+</sup> DZ in der Milz während der Infektion mit *Py* und anderen Nagetier-Malariaerregern nachgewiesen werden (Langhorne *et al.*, 2004; Voisine *et al.*, 2010; Wykes *et al.*, 2007a). Auch in der vorliegenden Studie wurde eine erhöhte Anzahl an CD11c<sup>+</sup> Zellen in den Milzen von *Py*-infizierten Tieren und dementsprechend auch in koinfizierten Mäusen im Vergleich zu

*Mtb*-Kontrolltieren nachgewiesen, wohingegen die T-Zell-Anzahl in den beiden Versuchsgruppen vergleichbar war. Damit lässt sich die beobachtete Splenomegalie wahrscheinlich hauptsächlich durch das Einwandern myeloider Zellen erklären. Interessanterweise wurde eine signifikante Zunahme an CD11c<sup>+</sup> Zellen, genauer gesagt an CD11b<sup>-</sup>CD11c<sup>+</sup> Zellen, auch in der Lunge von koinfizierten Tieren im Vergleich zu *Mtb*-infizierten Tieren beobachtet. Während in der Milz die meisten CD11c<sup>+</sup> Zellen kDZ darstellen, ist die Klassifizierung in der Lunge komplizierter, da auch Alveolarmakrophagen CD11c exprimieren (Kopf *et al.*, 2015; Lancelin and Guerrero-Plata, 2011). Daher kann über die CD11c-Expression allein der Zelltyp in der Lunge nicht bestimmt werden. Von den pulmonalen CD11b<sup>-</sup>CD11c<sup>+</sup> Zellen waren nur CD11c<sup>int</sup> Zellen in den koinfizierten Tieren signifikant erhöht, wohingegen die Anzahl an CD11c<sup>hi</sup> vergleichbar zu den *Mtb*-Tieren war. Die Analyse von Größe und Granularität mittels FSC-SSC ergab für die CD11c<sup>int</sup> Population im Vergleich zur CD11c<sup>hi</sup> Population eine geringere Granularität und somit einen DZ-ähnlichen Phänotyp. Bei den CD11c<sup>hi</sup> Zellen handelt es sich vermutlich eher um Alveolarmakrophagen, welche granulärer sind als DZ (Kirby *et al.*, 2006). Beide CD11c Populationen wiesen in koinfizierten verglichen mit *Mtb*-Mäusen eine Reduzierung des kostimulatorischen Oberflächenmoleküls CD86 auf. Dies deutete darauf hin, dass die *Py*-Infektion mit der Zellaktivierung interferierte, was bereits mehrfach beschrieben wurde (Ocaña-Morgner *et al.*, 2003; Orengo *et al.*, 2008; Urban and Todryk, 2006). Ungeachtet dessen waren die T-Zell-Antworten in koinfizierten Lungen nicht vermindert. *Mtb*-spezifische Immunantworten werden durch DZ in den drainierenden Lymphknoten innerhalb der ersten Wochen der *Mtb*-Infektion induziert (Wolf *et al.*, 2008). In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Infektion mit *Py* erst 30 Tage nach der *Mtb*-Infektion. Zu diesem Zeitpunkt war die spezifische Immunantwort gegen *Mtb* bereits etabliert, sodass die reduzierte Expression von CD86 vermutlich keinen Einfluss mehr auf die Aktivierung der T-Zell-Immunantwort hatte.

Um zu klären, ob eine *Py*-Infektion mit der Funktionalität von DZ interferiert, wurden verschiedene *in vitro* Analysen durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass die *Mtb*-spezifische T-Zell-Antwort durch die Koinfektion mit *Py* nicht beeinträchtigt wurde. In der vorliegenden Arbeit waren KMDZ, die vor der Infektion mit *Mtb* mit *Py*-iRBZ inkubiert wurden, in der Lage, p25 CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu aktivieren und diese zur Proliferation anzuregen. CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus p25-Mäusen tragen einen transgenen T-Zell-Rezeptor, der spezifisch das Peptid 25 (Aminosäuren 240-254 des reifen Proteins) vom *Mtb*-Antigen Ag85 erkennt. Ag85 ist ein sekretorisches Protein mit Mycoloyltransferaseaktivität, das TDM generiert, welches wiederum ein für die *Mtb*-Virulenz wichtiges Zellmembranlipid darstellt (Tamura *et al.*, 2004). Die p25 T-Zell-Aktivierung war durch *Py*-iRBZ-vorstimulierte KMDZ verglichen mit unbehandelten oder RBZ-vorinkubierten KMDZ sogar verstärkt, was vermuten lässt, dass die KMDZ durch Infektion mit iRBZ bereits voraktiviert wurden. Dies könnte sich in einer Hochregulierung von MHC-II oder kostimulatorischen Molekülen äußern. In einem alternativen Ansatz wurden CD11c<sup>+</sup> DZ aus der Milz *Py*-infizierter Mäuse isoliert und mit dem Modellantigen OVA inkubiert. Auch die CD11c<sup>+</sup> Zellen aus *Py*-infizierten Mäusen waren wie CD11c<sup>+</sup> Zellen aus naiven Mäusen in der Lage, die Proliferation von OT2 T-Zellen zu

induzieren. Unterstützend zu den Ergebnissen aus der vorliegenden Arbeit wurde in Studien gezeigt, dass die DZ-Reifung und -Aktivierung durch eine Malariainfektion nicht beeinträchtigt wird und somit die T-Zell-Aktivierung normal erfolgt (Perry *et al.*, 2004; Seixas *et al.*, 2001). Diese Beobachtungen stehen allerdings im Gegensatz zu anderen Studien, die zeigten, dass Vorinkubation von DZ mit *Py*-iRBZ oder *P. falciparum*-iRBZ die LPS-induzierte Hochregulierung von kostimulatorischen und MHC-II-Molekülen verhindert (Ocaña-Morgner *et al.*, 2003; Urban *et al.*, 1999). Die voneinander abweichenden Beobachtungen könnten auf die für die Infektion verwendeten verschiedenen *Plasmodium*-Stämme, unterschiedliche iRBZ-MOI oder unterschiedliche DZ-Untergruppen zurückzuführen sein. Elliott *et al.* untersuchten beispielsweise die dosisabhängige Aktivierung von DZ, die mit *P. falciparum*-iRBZ infiziert wurden. Dabei konnten sie zeigen, dass eine MOI von 100, wie sie auch von Ocaña-Morgner *et al.* bei der Infektion mit *Py*-iRBZ verwendet wurde, zu einer Inhibierung der DZ führte, wohingegen eine MOI von 10 keinen Einfluss auf die LPS-induzierte Reifung hatte. Die Gruppe um Wykes verglich die Auswirkungen verschiedener muriner *Plasmodium*-Stämme auf die Funktionalität von DZ. Dabei fanden sie eine Dichotomie in Phänotyp und Funktion letaler und nicht letaler Stämme (Wykes and Good, 2008). Zusätzlich unterscheiden sich die Beobachtungen bezüglich des DZ-Aktivierungszustands nach einer Malariainfektion *in vivo* und *in vitro*. Reifen DZ *in vitro*, fehlt ihnen bei diesem Prozess der Stimulus über die CD40-Ligation mit T-Zellen. Kürzlich zeigten Straw *et al.*, dass DZ *in vivo* keinen reifen Phänotypen nach der Stimulation mit *T. gondii* ausbilden, wenn die Signalwege CD40-CD40L über T-Zellen fehlen (Straw *et al.*, 2003). Darüber hinaus sind DZ *in vivo* nicht zwangsläufig mit iRBZ infiziert, sondern werden auch über das durch eine systemische Infektion induzierte Zytokinmilieu beeinflusst. Dies kann sich entschieden von der *in vitro* Situation unterscheiden. Daher kann die Beobachtung aus der vorliegenden Arbeit, dass DZ *in vitro* vollständig funktionierende APZ sind, nicht zwangsläufig auf die *in vivo* Situation übertragen werden.

In einer kürzlich veröffentlichten Studie untersuchten Kim *et al.* den Verlauf der Infektion mit unterschiedlich virulenten *Mtb*-Stämmen in Abhängigkeit von in die Lunge einwandernden Immunzellen (Kim *et al.*, 2015). Dabei stellten sie fest, dass die Virulenz nicht alleine von der Keimlast abhängt, da zwischen dem sehr virulenten K-Stamm der Beijing-Familie und dem Laborstamm H37Rv nur ein geringer Keimlastunterschied zwölf Wochen nach der *Mtb*-Infektion bestand. Stattdessen wiesen sie eine virulenzabhängige Einwanderung verschiedener Immunzellpopulationen in Lungen infizierter Mäuse nach. Dazu gehörten auch plasmazytoide DZ (pDZ), ein Zelltyp, der von lymphoiden Vorläuferzellen abstammt und in der Studie über  $F4/80^-CD11c^+CD11b^-Siglec-H^+PDCA-1^+$  charakterisiert wurde. Weiterhin konnten die Autoren feststellen, dass die pDZ simultan Th1- und Th2-Immunantworten induzierten. Das könnte bedeuten, dass virulentere Infektionen einen favorisierten Zelltyp induzieren, um die wirtsschützende Th1-Immunantwort abzuschwächen. So wird die Beseitigung der Infektion und der Schutz vor Immunpathologie verhindert. In der vorliegenden Arbeit könnte es sich bei der in koinfizierte Lungen rekrutierten Zellpopulation ebenfalls um pDZ handeln, welche unter anderem dadurch charakterisiert sind, dass sie kein

CD11b exprimieren. Allerdings kann dies nicht mit abschließender Sicherheit gesagt werden, da andere charakteristische Oberflächenmarker nicht untersucht wurden. pDZ scheinen in der Malariainfektion zu einer Aktivierung von regulatorischen T-Zellen und einer Freisetzung von IL-10 zu führen (Jangpatarapongsa *et al.*, 2008). Ebenso könnte es sich bei der in die Lungen rekrutierten Zellpopulation um regulatorische DZ handeln, die durch die Expression von CD11c<sup>low</sup>CD45RB<sup>hi</sup> und die Sekretion von IL-10 charakterisiert sind (Fujita *et al.*, 2006; Wakkach *et al.*, 2003). Wong *et al.* konnten nachweisen, dass regulatorische DZ während einer *Py*-Infektion in die Milz rekrutiert werden und dort dann die Hauptpopulation ausmachen. Darüber hinaus induzieren regulatorische DZ IL-10-exprimierende CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Wong and Rodriguez, 2008). Möglicherweise wurden in der hier vorliegenden Arbeit durch die *Py*-Infektion regulatorische DZ nicht nur in die Milz, sondern auch in die Lunge koinfizierter Tiere rekrutiert und trugen entweder direkt oder über die Aktivierung von T-Zellen zur IL-10-Produktion bei. Damit würde die für *Mtb* schädliche Th1-Immunantwort abgeschwächt werden.

Neben ihrer Rolle im T-Zell-Priming dienen DZ wie auch andere Phagozyten als Wirtszelle für *Mtb* in der Lunge infizierter Mäuse (Wolf *et al.*, 2007). Wolf *et al.* konnten außerdem zeigen, dass nach den ersten zwei Wochen der Infektion DZ und nicht Makrophagen der vorwiegende infizierte Zelltyp in der Mauslunge sind (Wolf *et al.*, 2007). Während der ersten vier Wochen nach der Infektion steigt der Anteil an rekrutierten myeloiden DZ und Makrophagen in der Lunge an. Die Rekrutierung führt dazu, dass die Alveolarmakrophagen, die anfänglich infiziert wurden, durch die neu eingewanderten Zellen als Reservoir abgelöst werden (Wolf *et al.*, 2007). Während Makrophagen in der Lage sind, Mykobakterien über die IFN $\gamma$ -induzierte NO-Produktion abzutöten (Herbst *et al.*, 2011), scheitern infizierte DZ, die Mykobakterien zu eliminieren und fördern stattdessen deren Überleben (Bodnar *et al.*, 2001). In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass *Mtb* in DZ aus *Py*-infizierten Mäusen deutlich besser als in DZ aus naiven Tieren überleben konnte. Dagegen unterschied sich das Überleben von *Mtb* in PM aus den beiden Versuchsgruppen nicht. Nachweislich begünstigt die durch Polyethylenglykol-konjugiertes GM-CSF oder Flt3-Liganden induzierte Anreicherung von DZ in der Lunge eine *Mtb*-Infektion *in vivo*. Dies zeigte sich in einer erhöhten mykobakteriellen Keimlast und verfrühten Sterblichkeit im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren (Alaniz *et al.*, 2004). In der gleichen Studie verschlechterte sich durch die Anreicherung von DZ auch die Kontrolle einer *Listeria*-Infektion. Die DZ beherbergten lebende Bakterien, die in der steigenden Anzahl der DZ geeigneten Lebensraum gefunden hatten. Die Tatsache, dass DZ Mykobakterien weniger effizient als Makrophagen abtöten können und zusätzlich resistenter gegenüber zytotoxischer T-Zell-Lyse sind (Medema *et al.*, 2001), machen sie zu einer attraktiven zellulären Nische für *Mtb*. In der vorliegenden Arbeit induzierte die *Py*-Koinfektion eine signifikante Zunahme an CD11c<sup>+</sup> Zellen in der Lunge von *Mtb*-infizierten Tieren. Zusammen mit der Tatsache, dass isolierte CD11c<sup>+</sup> Zellen aus *Py*-Tieren das Überleben und Wachstum von *Mtb* begünstigen, deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die *Py*-induzierten DZ eine geeignete Nische für *Mtb* darstellen könnten. Eine ähnliche Beobachtung wurde vor kurzem in einer Studie gemacht,

in der *Mtb*-infizierte Mäuse mit Poly-IC behandelt wurden (Antonelli *et al.*, 2010). Poly-IC ist als synthetisches Analogon einer dsRNA ein TLR3-Ligand, der eine Typ I IFN-Antwort induziert. Es wird derzeit in verschiedenen Studien gegen virale Infektionen, bösartige Tumore und als Adjuvans getestet (Gibbert *et al.*, 2010; Ichinohe *et al.*, 2005; Nagato and Celis, 2014; Pollack *et al.*, 2016; Salem *et al.*, 2016). In der Arbeit von Antonelli und Kollegen löste die Poly-IC-Behandlung eine IFN-abhängige pulmonale Rekrutierung einer CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>int</sup> Population aus, die eine erhöhte mykobakterielle Last aufwies. Die Autoren vermuten, dass die schädliche Auswirkung der Poly-IC-Behandlung eine Folge der Akkumulation einer permissiven myeloiden Zellpopulation in der Lunge war. Weiterhin konnten die Autoren zeigen, dass diese Population CCL2 (MCP-1)-abhängig in die Lungen einwandert. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde eine signifikant erhöhte Konzentration an MCP-1 nach Koinfektion mit *Py* in *Mtb*-infizierten Lungen nachgewiesen, welche möglicherweise die erhöhte Rekrutierung myeloider Zellen, speziell der CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>, bedingte.

Kürzlich zeigten Cambier *et al.*, dass pathogene Mykobakterien (z.B. *Mtb* oder *M. marinum*) im Vergleich zu nicht pathogenen (z.B. *M. smegmatis*) ihre PAMPs durch ein zelloberflächenassoziiertes Phthiocerol Dimycoceroserat-Lipid maskieren. So vermeiden sie, über TLR-MyD88-abhängige Mechanismen von Makrophagen erkannt und abgetötet zu werden. Die pathogenen Mykobakterien sorgen zusätzlich dafür, dass hauptsächlich Makrophagen zum Infektionsherd gelockt werden, die kaum iNOS exprimieren, damit nicht mikrobizid sind und als überlebenswichtige Nische dienen. Im Zebrafisch-Modell zeigten die Autoren weiterhin, dass die *M. marinum*-permissive, wenig mikrobizide Zellpopulation CCR2-abhängig zum Infektionsort rekrutiert wird (Cambier *et al.*, 2014).

Die beschriebenen Studien suggerieren eine wichtige Rolle von MCP-1 und CCR2 in der Rekrutierung von potentiell permissiven Immunzellen in die *Mtb*-infizierte Lunge. Neben der *Tb* kommt CCL2 auch in der *Py*-Infektion eine Bedeutung zu. Während einer Malariainfektion fördert eine systemische IFN $\gamma$ -Antwort die Ausschüttung von CCL2 und CCL7, was zur Auswanderung von frühen myeloiden Vorläuferzellen aus dem Knochenmark führt (Belyaev *et al.*, 2013). Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten, signifikant erhöhten Konzentrationen an IFN $\gamma$  und MCP-1 in den Lungen koinfizierter Mäuse könnten für die gesteigerte pulmonale Rekrutierung von myeloiden Zellen verantwortlich sein. Zusätzlich verursacht TNF $\alpha$  ebenfalls das Anlocken von Immunzellen, indem es dafür sorgt, dass Adhäsionsmoleküle auf Endothelien (Kim *et al.*, 2008) und die Bildung von Chemokinen hochreguliert werden (Algood *et al.*, 2005; Roach *et al.*, 2002). In dieser Arbeit konnte ein signifikanter Anstieg an TNF $\alpha$  in koinfizierten Tieren im Vergleich zu *Mtb*-Kontrollen beobachtet werden. Zusätzlich korrelierte die TNF $\alpha$ -Konzentration positiv mit der mykobakteriellen Keimlast in koinfizierten Lungen, was die Bedeutung in der Rekrutierung von Immunzellen aufgrund der Hochregulierung von Adhäsionsmolekülen unterstützen könnte. Darüber hinaus sorgt TNF $\alpha$  für eine Überaktivierung von DZ, die deren Funktion blockiert (Wykes *et al.*, 2007b) und was ihre Bedeutung als Reservoir für *Mtb* hervorheben könnte.

#### 4.2.4 DZ könnten zur Ausbreitung von *Mtb* beitragen

Granulome sind charakteristische histopathologische Läsionen in der Tb und können sich in jedem Gewebe bilden, das mit *Mtb* infiziert ist. Sie bestehen aus einer speziellen Ansammlung von Immunzellen, die in einer bestimmten Reihenfolge um den Infektionsherd lokalisiert sind. Innerhalb dieser Strukturen können DZ Mykobakterien oder mykobakterielle Antigene aufnehmen und diese an T-Zellen präsentieren.

Kürzlich wurde gezeigt, dass *Mtb*-infizierte, entzündliche DZ die granulomatöse Entzündung im infizierten Gewebe ausweiten. Infizierte CD11c<sup>+</sup> DZ verlassen dabei die mykobakteriellen Granulome und bilden Kontakte mit *Mtb*-spezifischen T-Zellen aus, wobei sie neue multifokale Läsionen in der Lunge initiieren (Harding *et al.*, 2015). Damit können DZ das Überleben von *Mtb* fördern und zur Ausbreitung der Pathologie beitragen. In der vorliegenden Arbeit konnte neben der verstärkten Rekrutierung von CD11c<sup>+</sup> Zellen auch die vermehrte Ausbildung granulomatöser Läsionen in koinfizierten Mäusen im Vergleich zu denen, die nur mit *Mtb* infiziert waren, nachgewiesen werden. Damit könnte die erhöhte Anzahl an CD11c<sup>+</sup> Zellen auch zu einer Verbreitung der Mykobakterien über die Lunge und die Bildung neuer Infektionsherde beitragen. So würden sie die verstärkte Gewebspathologie, die hier beobachtet werden konnte, fördern.

Auch in anderen Infektionskrankheiten wie bei der Infektion mit *Listeria monocytogenes*, *Francisella tularensis*, *Burkholderia pseudomallei* oder *Streptococcus pneumoniae* fördern DZ die Verbreitung der Pathogene innerhalb des Wirts und die Bildung neuer Infektionsorte (Bar-Haim *et al.*, 2008; Pron *et al.*, 2001; Rosendahl *et al.*, 2013; Williams *et al.*, 2014). *Mtb* kann über die Lunge hinaus in andere Organe disseminieren. DZ könnten die Aufgabe eines Transportvehikels für *Mtb* erfüllen und die Bakterien während der chronischen Infektion verteilen, da sie lebende intrazelluläre *Mtb* beinhalten und kontinuierlich die Granulome verlassen (Schreiber and Sandor, 2010). Dies wird durch die Tatsache unterstützt, dass DZ nur geringfügig in der Lage sind, Mykobakterien abzutöten (Bodnar *et al.*, 2001; Sinha *et al.*, 2007; Wolf *et al.*, 2007). In der vorliegenden Arbeit konnte eine angestiegene Keimlast nicht nur in der Lunge, sondern auch in Milz und Leber koinfizierter Mäuse verglichen mit *Mtb*-infizierten Mäusen beobachtet werden. Damit könnten die durch die Koinfektion zusätzlich mobilisierten CD11c<sup>+</sup> Zellen nicht nur zu einem besseren Überleben von *Mtb* innerhalb der Lunge geführt, sondern zusätzlich die Verbreitung im Wirt unterstützt haben.

#### 4.2.5 Fördert Hz die Entzündung und die Einwanderung von Immunzellen?

Hz ist das sogenannte Malariapigment und entsteht aus dem Hämoglobinabbau in RBZ durch *Plasmodium*-Parasiten. Durch Hydrolyse erhält der Parasit zum Leben notwendige Aminosäuren, setzt aber zeitgleich toxisches Häm frei. Da die Parasiten keine Hämoxygenase (HO) besitzen, mit der Häm abgebaut werden kann, wandeln sie das Häm in unlösliches, kristallines Hz um und lagern es in ihre Futtervakuole ein (Olivier *et al.*, 2014). Während einer Malariainfektion nehmen zirkulierende und im Gewebe lokalisierte Phagozyten Hz

entweder im Zuge der Internalisierung von iRBZ oder nach dessen Freisetzung aus geplatzen infizierten Erythrozyten auf. Dadurch wird das Malariapigment in verschiedenen Organen angereichert und kann zur Veränderung des Immunsystems führen (Parroche *et al.*, 2007).

Humane Makrophagen nehmen Hz schnell auf, sodass es bis zu 30 % ihres Zellvolumens ausmachen kann. Das aufgenommene Hz verbleibt über einen langen Zeitraum unverändert innerhalb dieser Zellen (Shio *et al.*, 2010). Üblicherweise zeigen *post mortem* Untersuchungen Hz-Ablagerungen im Gewebe verstorbener Malariapatienten (Hathila *et al.*, 2015; Lacerda *et al.*, 2012). Die Menge an eingelagertem Hz innerhalb von Monozyten und neutrophilen Granulozyten wird mit der Schwere der Malariaerkrankung in Verbindung gebracht. Erwachsene, die einer *P. falciparum*-Infektion erlagen, wiesen einen größeren Anteil an Hz-positiven neutrophilen Granulozyten oder Monozyten im Vergleich zu Patienten auf, die die Infektion überlebten (Hänscheid *et al.*, 2007; Lyke *et al.*, 2003). Zusätzlich konnten Amodu *et al.* nachweisen, dass Kinder mit zerebraler Malaria mehr neutrophile Granulozyten hatten, die Hz beinhalten, als Kinder, die nur eine milde Malariainfektion entwickelten (Amodu *et al.*, 1998). Neutrophile Granulozyten nehmen nach dem Freisetzen der Schizonten aus iRBZ die parasitäre Futtervakuole auf, welche das Hz enthält. Die Aufnahme führt dazu, dass die neutrophilen Granulozyten in den Zustand einer funktionellen Erschöpfung verfallen. Dadurch wird die Produktion von ROI vermindert, was ein wichtiger mikrobieller Abwehrmechanismus ist (Dasari *et al.*, 2011). Cunnington *et al.* konnten diese Beobachtung experimentell in Zusammenhang mit einer erhöhten Anfälligkeit für Salmonelleninfektionen bringen. Während der Hämolyse in einer Malariainfektion sorgt die Induzierung der HO in Granulozyten für die Tolerierung der zytotoxischen Effekte des freigesetzten Häms. Dies wird über die verringerte Produktion von ROI gewährleistet. Erfolgt zusätzlich zur Malariainfektion eine Infektion mit *Salmonella typhimurium*, die vornehmlich Granulozyten befällt, erleiden Mäuse eine akute, fatale Bakteriämie mit erhöhten bakteriellen Keimlasten.

In experimentellen Modellen konnte die Hz-Ablagerung über die Zeit untersucht werden. Dabei fanden sich Hz-Einlagerungen noch Monate nach Behandlung einer Malariainfektion in verschiedenen Organen der Maus wieder (Frita *et al.*, 2012). Eine weitere Gruppen konnte nachweisen, dass Hz an der durch Malaria induzierten Pathologie beteiligt ist (Shio *et al.*, 2010). Die Infektion von Ratten mit natürlichem Hz aus *P. falciparum* Kulturen oder synthetischem Hz (sHz) induzierte die Produktion von TNF $\alpha$  und Chemokinen wie *macrophage inflammatory protein* (MIP)-1 $\alpha$  und MIP-1 $\beta$ . Weiterhin produzieren murine Makrophagen nach der Inkubation mit Hz TNF $\alpha$  (Ihekwereme *et al.*, 2014; Pichyangkul *et al.*, 1994; Shio *et al.*, 2010). Diese Beobachtungen könnten erklären, warum ein Anstieg in TNF $\alpha$  in koinfizierten im Vergleich zu *Mtb*-Lungen beobachtet werden konnte. Jaramillo *et al.* zeigten außerdem, dass synthetisches sHz zur Rekrutierung von Leukozyten führt (Jaramillo *et al.*, 2004). Die Autoren induzierten Luftsäckchen im Rücken von BALB/c Mäusen, die mit sHz angeimpft wurden. Das sHz führte zur Hochregulierung von verschiedenen pro-entzündlichen Zytokinen und Chemokinen im Exsudat. Zusätzlich wurden Leukozyten in die Luftsäckchen rekrutiert. In der vorliegenden Arbeit konnte Hz im Lungengewebe koinfizierter

Tiere beobachtet werden. Das Hz könnte daher zur Hochregulierung von Zytokinen und Chemokinen in koinfizierten Lungen beigetragen und damit die Rekrutierung von *Mtb*-permissiven Zellen unterstützt haben. Eine Kolokalisation von *Mtb* mit Hz-einlagernden Phagozyten konnte nicht beobachtet werden. Somit scheint Hz keinen vorteilhaften Einfluss auf das Überleben von *Mtb* innerhalb der Wirtszelle zu haben. Allerdings könnte es die Aktivierung und Funktion der eingewanderten Immunzellen und somit das immunologische Milieu in der Lunge verändert und dadurch den Verlauf der *Mtb*-Infektion beeinflusst haben. Zusätzlich zur Anreicherung von Hz in Organen im Zuge der Einwanderung von Hz-beladenen Phagozyten sind einige Parasitenstämme wie *P. falciparum* und der Nagetierstamm *P. berghei* dafür bekannt, im Wirtsgewebe zu sequestrieren. Dazu gehören vor allem die Lunge, aber auch die Milz und Leber, wobei die beiden letztgenannten Organe zur Beseitigung von iRBZ beitragen. Die Infektion mit dem letalen Stamm *PbNK65* induziert eine schwere Lungenpathologie (Van den Steen *et al.*, 2010), deren Ausprägung mit der Ablagerung von Hz im Lungengewebe in Verbindung gebracht werden konnte (Deroost *et al.*, 2013). Diese schwere Lungenpathologie könnte ein Grund dafür sein, warum die Auswirkungen auf die Kontrolle der experimentellen Tb in der Koinfektion mit *PbNK65* viel stärker sind als in der hier gezeigten Koinfektion mit *Py* (Mueller *et al.*, 2012).

#### **4.2.6 Die Langzeitfolgen der Koinfektion mit *Py***

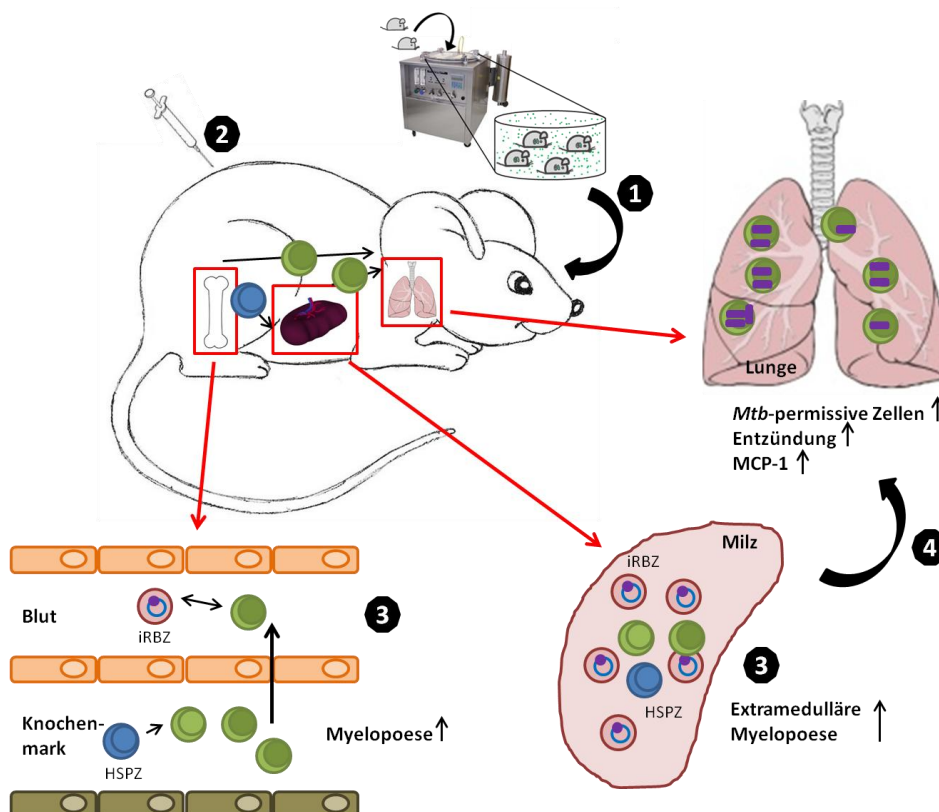
Die Unterschiede in der Anlockung von Immunzellen in die Lunge und der Lungenpathologie in *Mtb*-infizierten Mäusen konnten kurz nach der akuten *Py*-Infektion beobachtet werden. Die Unterschiede zwischen koinfizierten und *Mtb*-Mäusen waren 150 Tage später allerdings nicht mehr nachweisbar. Das impliziert, dass die *Py*-Infektion nur einen vorübergehenden Einfluss auf die Tb-Erkrankung genommen hat. Diese Beobachtung wird zusätzlich durch die Tatsache gestützt, dass beide Versuchsgruppen bis zum späten Analysezeitpunkt ohne offensichtliche klinische Symptome überlebten. Dies könnte der transienten Natur der *Py*-Infektion geschuldet sein. Die Parasitämie wird innerhalb von 3-4 Wochen überwunden und infolgedessen nehmen die *Py*-induzierten Immunantworten mit der Zeit ab. Die Splenomegalie, die 14 Tage nach der *Py*-Infektion, zum Zeitpunkt der maximalen Parasitämie, am stärksten ausgeprägt ist, nimmt im Laufe der Zeit nach überstandener *Py*-Infektion wieder ab. Dennoch verbleibt die Milz über 120 Tage signifikant größer als Milzen naiver Mäuse (Murphy and Lefford, 1979).

Das Hz, das eventuell zur erhöhten Entzündung in der Lunge beigetragen hat, wird mit der Zeit in Leber und Milz umverteilt (Deroost *et al.*, 2013; Frita *et al.*, 2012). Die Mäuse in der hier beschriebenen Studie wurden nur einmal mit *Py* infiziert. Im Gegensatz dazu erfahren Menschen, die in malariaendemischen Gebieten leben, kontinuierliche Reinfektionen mit Malariaparasiten. Diese Menschen sind somit anhaltender Immunmodulation ausgesetzt, was ihre Anfälligkeit für Tb ebenso wie für andere Sekundärinfektionen erhöhen könnte. Im Mausmodell lässt sich die Reinfektion und die damit verbundenen Einflüsse allerdings nur schwer untersuchen, da C57BL/6 Mäuse, nachdem sie die Parasitämie überwunden haben,

eine Resistenz gegenüber *Py* entwickeln (Lucas *et al.*, 1993). Dies ist ein Unterschied zur humanen Situation, wo sich eine Immunität relativ langsam über die Zeit entwickelt und zudem eine sterile Immunität nicht erreicht wird (Langhorne *et al.*, 2008). Nichtsdestotrotz ist eine einzige *Py*-Infektion in der Lage, die lokale Immunantwort in der Lunge vorübergehend zu verändern. Die verstärkte Entzündung in den Lungen koinfizierter Mäuse nach einer Episode einer *Py*-Infektion könnte darauf hinweisen, dass eine immer wiederkehrende, konstante Malariaexposition einen Risikofaktor für Tb-Patienten darstellen könnte.

#### 4.2.7 Hypothese

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse konnte eine Hypothese erarbeitet werden. Durch die Infektion über Aerosole mit *Mtb* manifestiert sich eine entzündliche Infektion in der Lunge (1). Die nachfolgende Infektion mit *Py* (2) führt zur gesteigerten Myelopoese im Knochenmark und zur gesteigerten extramedullären Myelopoese in der Milz (3). Zusätzlich werden myeloide Zellen aus dem Knochenmark mobilisiert. Die neu gebildeten myeloiden Zellen wandern aufgrund eines Chemokingradienten, der durch die lokale Entzündung in der Lunge durch die *Mtb*-Infektion ausgelöst wird, in die Lunge ein (4). Da diese Zellen suszeptibler für *Mtb* sind, bieten sie ein neues, zusätzliches Reservoir, sodass eine vermehrte Bakterienreplikation stattfinden kann und die Tb verstärkt wird.



**Abb. 23: Hypothese für den Einfluss einer *Py*-Infektion in *Mtb*-infizierten Mäusen.** Die Details können dem Text entnommen werden.

Aufgrund der selbstlimitierenden Natur der *Py*-Infektion ist der Effekt nur transient. Durch eine kontinuierliche Reinfektion, wie sie in malariaendemischen Gebieten stattfindet, könnte eine permanente Immunmodulierung und Rekrutierung permissiver Immunzellen in die Lunge stattfinden und für eine konstante Verschlechterung der Tb sorgen.

### 4.3 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene Fragestellungen einer Tb-Malaria-Koinfektion untersucht. Zum einem wurde untersucht, wie sich eine *PbANKA*-Infektion in *Mtb*-infizierten Tieren entwickelt. Existierende experimentelle Untersuchungen zeigten, dass eine verringerte Parasitämie eine EZM verhindern kann. Die Verringerung der Parasitämie kann vor allem durch eine frühe Th1-Immunantwort vermittelt werden. Mehrere Gruppen konnten bereits zeigen, dass auch mykobakterielle Infektionen die Parasitämie verschiedener *Plasmodium*-Stämme reduzieren kann. Deshalb stellte sich die Frage, ob in *Mtb*-infizierten Tieren die Entwicklung einer EZM durch die *Mtb*-induzierte Th1-Immunantwort verhindert werden kann. Dies war allerdings nicht der Fall. Vielmehr wurde die *Mtb*-Immunantwort rasch von der durch *PbANKA*-induzierten dominiert und alle Tiere erlagen einer EZM. In dieser Arbeit wurde eine Blutstadieninfektion der Malaria gewählt, da sich die pathologischen Mechanismen, die zur EZM führen, in der Blutphase abspielen. Ältere Studien haben gezeigt, dass eine BCG-Infektion die Sterblichkeit *PbANKA*-infizierter Tiere erheblich verringert. Dabei wurden die Tiere mit *PbANKA*-Sporozoiten infiziert. Die Parasiten wandern dann zuerst in die Leber, wo die mykobakterielle Infektion scheinbar auf die Entwicklung der Sporozoiten Einfluss nehmen kann. Deshalb soll in einer nächsten experimentellen Studie der Einfluss einer *Mtb*- oder BCG-Infektion auf die Sporozoitenvermittelte *PbANKA*-Infektion untersucht werden. Durch die Integration beider natürlichen Infektionsrouten in das experimentelle Design würde die natürliche Situation genauer widerspiegelt. Die ZM ist eine Komplikation, an der nach wie vor jährlich über eine halbe Million Menschen, hauptsächlich Kinder, sterben. BCG wird mit einer verringerten Kindersterblichkeit unabhängig von Tb in Verbindung gebracht. Da die Malaria eine der Hauptursachen für Kindersterblichkeit darstellt, stellt sich die Frage, inwiefern BCG eine solch schwere Komplikation wie die ZM zu reduzieren vermag und welche immunologischen Mechanismen dem zu Grunde liegen. Diese konnten in den genannten frühen experimentellen Studien aus technischen Gründen noch nicht aufgeklärt werden.

Neben dem Einfluss von *Mtb* auf den Verlauf der EZM wurde in der vorliegenden Arbeit ebenfalls untersucht, wie sich eine *Py*-Koinfektion auf eine chronische Tb auswirkt. *Py* induziert im Vergleich zu *PbANKA* eine nicht letale Infektion, die nach etwa drei Wochen ohne Behandlung von den Mäusen überwunden wird. Es wurde festgestellt, dass die Infektion von *Mtb*-Mäusen mit *Py* zu einer erhöhten mykobakteriellen Keimlast in Lunge, Milz und Leber 21 Tage nach der Koinfektion führte. Die Daten deuten darauf hin, dass neben einer starken entzündlichen Immunantwort eine *Py*-abhängige Mobilisierung myeloider Zellen erfolgte, die MCP-1-abhängig in die Lungen koinfizierter Mäuse

einwanderten und als Wirtszelle für *Mtb* dienten. Der genaue Nachweis dafür, dass *Mtb* in den rekrutierten CD11c<sup>+</sup> Zellen überlebt, muss über eine Kollokalisationsfärbung noch erbracht werden. Die *Py*-abhängige, verstärkte Immunantwort in koinfizierten Mäusen konnte nur vorübergehend beobachtet werden. 150 Tage später waren die Immunantwort *Mtb*- und koinfizierter Mäuse vergleichbar und unterschieden sich nur noch in einer leicht erhöhten mykobakteriellen Keimlast in der Lunge. Der Grund dafür kann in dem transienten Charakter der *Py*-Infektion liegen. Real werden Menschen in endemischen Gebieten allerdings fortwährend mit Malaria infiziert. Bezogen auf das in der vorliegenden Arbeit beschriebene experimentelle System würde diese Situation eine permanente Rekrutierung permissiver Zellen in die Lungen koinfizierter Mäuse bedeuten. Liegen mehr zu infizierende Wirtszellen für *Mtb* vor, könnte die Tb einen massiv verschlechterten Verlauf nehmen. Daher sollen als nächstes *Mtb*-infizierte Mäuse mehrfach mit *Py* infiziert werden. Obwohl *Py*-infizierte Mäuse gegen eine erneute *Py*-Infektion resistent sind, könnte sich dies in koinfizierten Tieren anders verhalten. Außerdem erfahren die Mäuse einen Immunstimulus, der sich auf die Tb-Infektion auswirken könnte. Weiterhin könnte als Modell die Koinfektion in BALB/c Mäusen durchgeführt werden. Dieser Mausstamm basiert auf einem eher Th2-lastigen genetischen Hintergrund, der aber in *Mtb*- und *Py*-Einzelfektionen keinen Unterschied zu den C57BL/6 Mäusen aufweist. Allerdings könnte sich die immunologische Vorprägung auf den Verlauf der Koinfektion auswirken. Die Gruppe von Salgame zeigte in einem Helminthen-*Mtb*-Koinfektionsmodell, dass BALB/c Mäuse eine erhöhte mykobakterielle Keimlast aufwiesen, wohingegen in C57BL/6 Mäusen kein Unterschied zu erkennen war. Somit könnte der Einfluss der genetischen Variabilität, wie sie in der humanen Situation in einem noch viel größeren Umfang vorliegt, auf den Verlauf einer chronischen Tb im Zusammenhang mit einer *Py*-Koinfektion untersucht werden.

Die Aufklärung der genannten Fragestellungen kann dazu beitragen, die Immunmodulation während einer Tb-Malaria-Koinfektion besser zu verstehen. Unabhängig von ihrer klinischen Relevanz bieten diese experimentellen Koinfektionsmodelle wichtige Werkzeuge, Faktoren zu identifizieren, die den jeweiligen Krankheitsverlauf positiv wie negativ beeinflussen. Somit können wir unser Wissen über schützende und schädliche Immunmechanismen in der Tb und Malaria erweitern.

## Literaturverzeichnis

Achtman, A.H., Khan, M., MacLennan, I.C.M., and Langhorne, J. (2003). Plasmodium chabaudi chabaudi infection in mice induces strong B cell responses and striking but temporary changes in splenic cell distribution. *J. Immunol.* *171*, 317–324.

Actor, J.K., Shirai, M., Kullberg, M.C., Buller, R.M., Sher, A., and Berzofsky, J.A. (1993). Helminth infection results in decreased virus-specific CD8+ cytotoxic T-cell and Th1 cytokine responses as well as delayed virus clearance. *Proc Natl Acad Sci USA* *90*, 948–952.

Adachi, K., Tsutsui, H., Kashiwamura, S., Seki, E., Nakano, H., Takeuchi, O., Takeda, K., Okumura, K., Van Kaer, L., Okamura, H., et al. (2001). Plasmodium berghei infection in mice induces liver injury by an IL-12- and toll-like receptor/myeloid differentiation factor 88-dependent mechanism. *J. Immunol. (Baltimore, Md 1950)* *167*, 5928–5934.

Adams, L.B., Dinauer, M.C., Morgenstern, D.E., and Krahenbuhl, J.L. (1997). Comparison of the roles of reactive oxygen and nitrogen intermediates in the host response to Mycobacterium tuberculosis using transgenic mice. *Tuber. Lung Dis.* *78*, 237–246.

Adebajo, A.O., Smith, D.J., Hazleman, B.L., and Wreghitt, T.G. (1994). Seroepidemiological associations between tuberculosis, malaria, hepatitis B, and AIDS in West Africa. *J Med Virol* *42*, 366–368.

Alaniz, R.C., Sandall, S., Thomas, E.K., and Wilson, C.B. (2004). Increased dendritic cell numbers impair protective immunity to intracellular bacteria despite augmenting antigen-specific CD8+ T lymphocyte responses. *J. Immunol. (Baltimore, Md 1950)* *172*, 3725–3735.

Algood, H.M.S., Lin, L., and Flynn, J.L. (2005). Tumor Necrosis Factor and Chemokine Interactions in the Formation and Maintenance of Granulomas in Tuberculosis. *Clin. Infect. Dis.* *15261*, 189–193.

Allan, R.J., Beattie, P., Bate, C., Van Hensbroek, M.B., Morris-Jones, S., Greenwood, B.M., and Kwiatkowski, D. (1995). Strain variation in tumor necrosis factor induction by parasites from children with acute falciparum malaria. *Infect. Immun.* *63*, 1173–1175.

Amante, F.H., Haque, A., Stanley, A.C., Rivera, F.D.L., Randall, L.M., Wilson, Y.A., Yeo, G., Pieper, C., Crabb, B.S., de Koning-Ward, T.F., et al. (2010). Immune-mediated mechanisms of parasite tissue sequestration during experimental cerebral malaria. *J. Immunol.* *185*, 3632–3642.

Amodu, O.K., Adeyemo, A.A., Olumese, P.E., and Gbadegesin, R.A. (1998). Intraleucocytic Pigment and Clinical Severity in Children. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* *92*, 54–56.

Angus, B.J., Chotivanich, K., Udomsangpetch, R., and White, N.J. (1997). In vivo removal of malaria parasites from red blood cells without their destruction in acute falciparum malaria. *Blood* *90*, 2037–2040.

Antonelli, L.R. V, Rothfuchs, A.G., Gonçalves, R., Roffê, E., Cheever, A.W., Bafica, A., Salazar, A.M., Feng, C.G., and Sher, A. (2010). Intranasal Poly-IC treatment exacerbates tuberculosis in mice through the pulmonary recruitment of a pathogen-permissive

monocyte/macrophage population. *J. Clin. Invest.* 120, 1674–1682.

Arend, S.M., Andersen, P., van Meijgaarden, K.E., Skjot, R.L., Subronto, Y.W., van Dissel, J.T., and Ottenhoff, T.H. (2000). Detection of active tuberculosis infection by T cell responses to early-secreted antigenic target 6-kDa protein and culture filtrate protein 10. *J. Infect. Dis.* 181, 1850–1854.

Armstrong, J.A., and Hart, P.D. (1971). Response of cultured macrophages to *Mycobacterium tuberculosis*, with observations on fusion of lysosomes with phagosomes. *J. Exp. Med.* 134, 713–740.

Artavanis-Tsakonas, K., Tongren, J.E., and Riley, E.M. (2003). The war between the malaria parasite and the immune system: immunity, immunoregulation and immunopathology. *Clin. Exp. Immunol.* 133, 145–152.

Babu, S., Bhat, S.Q., Kumar, N.P., Anuradha, R., Kumaran, P., Gopi, P.G., Kolappan, C., Kumaraswami, V., and Nutman, T.B. (2009a). Attenuation of toll-like receptor expression and function in latent tuberculosis by coexistent filarial infection with restoration following antifilarial chemotherapy. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 3.

Babu, S., Bhat, S.Q., Kumar, N.P., Jayantasri, S., Rukmani, S., Kumaran, P., Gopi, P.G., Kolappan, C., Kumaraswami, V., and Nutman, T.B. (2009b). Human type 1 and 17 responses in latent tuberculosis are modulated by coincident filarial infection through cytotoxic T lymphocyte antigen-4 and programmed death-1. *J. Infect. Dis.* 200, 288–298.

Bach, O., Baier, M., Pullwitt, A., Fosiko, N., Chagaluka, G., Kalima, M., Pfister, W., Straube, E., and Molyneux, M. (2005). *Falciparum* malaria after splenectomy: A prospective controlled study of 33 previously splenectomized Malawian adults. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 99, 861–867.

Bachmann, A., Esser, C., Petter, M., Predehl, S., von Kalckreuth, V., Schmiedel, S., Bruchhaus, I., and Tannich, E. (2009). Absence of erythrocyte sequestration and lack of multicopy gene family expression in *Plasmodium falciparum* from a splenectomized malaria patient. *PLoS One* 4.

Baer, K., Roosevelt, M., Clarkson, A.B., Van Rooijen, N., Schnieder, T., and Frevert, U. (2007a). Kupffer cells are obligatory for *Plasmodium yoelii* sporozoite infection of the liver. *Cell. Microbiol.* 9, 397–412.

Baer, K., Klotz, C., Kappe, S.H.I., Schnieder, T., and Frevert, U. (2007b). Release of hepatic *Plasmodium yoelii* merozoites into the pulmonary microvasculature. *PLoS Pathog.* 3, e171.

Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.J., Pulendran, B., and Palucka, K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 18, 767–811.

Banfield, S., Pascoe, E., Thambiran, A., Siafarikas, A., and Burgner, D. (2012). Factors associated with the performance of a blood-based interferon- $\gamma$  release assay in diagnosing tuberculosis. *PLoS One* 7, e38556.

Baptista, F.G., Pamplona, A., Pena, A.C., Mota, M.M., Pied, S., and Vigário, A.M. (2010).

Accumulation of *Plasmodium berghei*-infected red blood cells in the brain is crucial for the development of cerebral malaria in mice. *Infect. Immun.* **78**, 4033–4039.

Bar-Haim, E., Gat, O., Markel, G., Cohen, H., Shafferman, A., and Velan, B. (2008). Interrelationship between dendritic cell trafficking and *Francisella tularensis* dissemination following airway infection. *PLoS Pathog.* **4**.

Barnden, M.J., Allison, J., Heath, W.R., and Carbone, F.R. (1998). Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based alpha- and beta-chain genes under the control of heterologous regulatory elements. *Immunol. Cell Biol.* **76**, 34–40.

Barton, E.S., White, D.W., Cathelyn, J.S., Brett-McClellan, K.A., Engle, M., Diamond, M.S., Miller, V.L., and Virgin, H.W. (2007). Herpesvirus latency confers symbiotic protection from bacterial infection. *Nature* **447**, 326–329.

Baruch, D.I., Gormely, J.A., Ma, C., Howard, R.J., and Pasloske, B.L. (1996). *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 is a parasitized erythrocyte receptor for adherence to CD36, thrombospondin, and intercellular adhesion molecule 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 3497–3502.

Bates, M., Marais, B.J., and Zumla, A. (2015). Tuberculosis Comorbidity with Communicable and Noncommunicable Diseases. *Cold Spring Harb Perspect Med* **5**, 1–16.

Beamer, G.L., Flaherty, D.K., Assogba, B.D., Stromberg, P., Gonzalez-juarrero, M., Waal, R. De, Vesosky, B., Turner, J., and Malefyt, R.D.W. (2011). Interleukin-10 promotes *Mycobacterium tuberculosis* disease progression in CBA/J mice. *J. Immunol.* **181**, 5545–5550.

Beck, J.M. (2005). The immunocompromised: Host HIV infection. *Proc. Am. Thorac. Soc.* **2**, 423–427.

Beckford, A., Kaschula, R., and Stephen, C. (1985). Factors associated with fatal cases of measles. A retrospective autopsy study. *S Afr Med J.* **68**, 858–863.

Beier, J.C., Beier, M.S., Vaughan, J.A., Pumpuni, C.B., Davis, J.R., and Noden, B.H. (1992). Sporozoite transmission by *Anopheles gambiae* experimentally infected with *Plasmodium falciparum*. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **8**, 404–408.

Beisiegel, M., Kursar, M., Koch, M., Loddenkemper, C., Kuhlmann, S., Zedler, U., Stäber, M., Hurwitz, R., and Kaufmann, S.H.E. (2009). Combination of host susceptibility and virulence of *Mycobacterium tuberculosis* determines dual role of nitric oxide in the protection and control of inflammation. *J. Infect. Dis.* **199**, 1222–1232.

Bekker, L.G., Moreira, a L., Bergtold, a, Freeman, S., Ryffel, B., and Kaplan, G. (2000). Immunopathologic effects of tumor necrosis factor alpha in murine mycobacterial infection are dose dependent. *Infect. Immun.* **68**, 6954–6961.

Belnoue, E., Kayibanda, M., Vigario, A.M., Deschemin, J.-C., van Rooijen, N., Viguier, M., Snounou, G., and Rénia, L. (2002). On the pathogenic role of brain-sequestered alphabeta CD8+ T cells in experimental cerebral malaria. *J. Immunol.* **169**, 6369–6375.

Belnoue, E., Costa, F., and Vigário, A. (2003). Chemokine receptor CCR2 is not essential for

the development of experimental cerebral malaria. *Infect. Immun.* 2–6.

Belyaev, N.N., Biró, J., Langhorne, J., and Potocnik, A.J. (2013). Extramedullary myelopoiesis in malaria depends on mobilization of myeloid-restricted progenitors by IFN- $\gamma$  induced chemokines. *PLoS Pathog.* 9, e1003406.

Berghout, J., Langlais, D., Radovanovic, I., Tam, M., MacMicking, J.D., Stevenson, M.M., and Gros, P. (2013). Irf8-Regulated Genomic Responses Drive Pathological Inflammation during Cerebral Malaria. *PLoS Pathog.* 9, e1003491.

Bertolino, P., and Bowen, D.G. (2015). Malaria and the liver: immunological hide-and-seek or subversion of immunity from within? *Front. Microbiol.* 6, 41.

Blank, J., Behrends, J., Jacobs, T., and Schneider, B.E. (2015). Mycobacterium tuberculosis Coinfection Has No Impact on Plasmodium berghei ANKA-Induced Experimental Cerebral Malaria in C57BL/6 Mice. *Infect. Immun.* 84, 502–510.

Blank, J., Eggers, L., Behrends, J., Jacobs, T., and Schneider, B.E. (2016). One Episode of Self-Resolving Plasmodium yoelii Infection Transiently Exacerbates Chronic Mycobacterium tuberculosis Infection. *Front. Microbiol.* 7, doi: 10.3389/micb2016.00152.

Bodnar, K., Serbina, N., and Flynn, J.L. (2001). Fate of Mycobacterium tuberculosis within murine dendritic cells. *Infect. Immun.* 69, 800–809.

Bold, T.D., and Ernst, J.D. (2009). Who benefits from granulomas, mycobacteria or host? *Cell* 136, 17–19.

Boura, M., Frita, R., Góis, A., Carvalho, T., and Hänscheid, T. (2013). The hemozoin conundrum: is malaria pigment immune-activating, inhibiting, or simply a bystander? *Trends Parasitol.* 29, 469–476.

Bousema, T., Okell, L., Felger, I., and Drakeley, C. (2014). Asymptomatic malaria infections: detectability, transmissibility and public health relevance. *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 833–840.

Boussiotis, V.A., Tsai, E.Y., Yunis, E.J., Thim, S., Delgado, J.C., Dascher, C.C., Berezovskaya, A., Rousset, D., Reynes, J., and Goldfeld, A.E. (2000). IL-10 – producing T cells suppress immune responses in anergic tuberculosis patients. *J. Clin. Invest.* 105, 1317–1324.

Brennan, P.J. (2003). Structure, function, and biogenesis of the cell wall of Mycobacterium tuberculosis. *Tuberculosis* 83, 91–97.

Cambau, E., and Drancourt, M. (2014). Steps towards the discovery of Mycobacterium tuberculosis by Robert Koch, 1882. *Clin. Microbiol. Infect.* 20, 196–201.

Cambier, C.J., Takaki, K.K., Larson, R.P., Hernandez, R.E., Tobin, D.M., Urdahl, K.B., Cosma, C.L., and Ramakrishnan, L. (2014). Mycobacteria manipulate macrophage recruitment through coordinated use of membrane lipids. *Nature* 505, 218–222.

Campanella, G.S. V, Tager, A.M., El Khoury, J.K., Thomas, S.Y., Abrazinski, T. a, Manice, L. a, Colvin, R. a, and Luster, A.D. (2008). Chemokine receptor CXCR3 and its ligands CXCL9 and CXCL10 are required for the development of murine cerebral malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

U. S. A. *105*, 4814–4819.

Carroll, R.W., Wainwright, M.S., Kim, K.-Y., Kidambi, T., Gómez, N.D., Taylor, T., and Haldar, K. (2010). A rapid murine coma and behavior scale for quantitative assessment of murine cerebral malaria. *PLoS One* *5*, 1–12.

Carter, J.A., Mung'ala-Odera, V., Neville, B.G.R., Murira, G., Mturi, N., Musumba, C., and Newton, C.R.J.C. (2005). Persistent neurocognitive impairments associated with severe falciparum malaria in Kenyan children. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* *76*, 476–481.

Cavalcanti, Y.V.N., Brelaz, M.C.A., Neves, J.K.D.A.L., Ferraz, J.C., and Pereira, V.R.A. (2012). Role of TNF-alpha, IFN-gamma, and IL-10 in the development of pulmonary tuberculosis. *Pulm. Med.* *2012*, 1–10.

Chackerian, A. a, Alt, J.M., Perera, T. V, Dascher, C.C., and Behar, S.M. (2002). Dissemination of Mycobacterium tuberculosis Is Influenced by Host Factors and Precedes the Initiation of T-Cell Immunity. *Infect. Immun.* *70*, 4501–4509.

Chakravarty, S., Cockburn, I. a, Kuk, S., Overstreet, M.G., Sacci, J.B., and Zavala, F. (2007). CD8+ T lymphocytes protective against malaria liver stages are primed in skin-draining lymph nodes. *Nat. Med.* *13*, 1035–1041.

Chan, J., Tanaka, K., Carroll, D., Flynn, J., and Bloom, B.R. (1995). Effects of Nitric Oxide Synthase Inhibitors on Murine Infection with Mycobacterium tuberculosis. *Microbiology* *63*, 736–740.

Chao, M.C., and Rubin, E.J. (2010). Letting sleeping dogs lie: does dormancy play a role in tuberculosis? *Annu. Rev. Microbiol.* *64*, 293–311.

Chaves, L.F., Taleo, G., Kalkoa, M., and Kaneko, A. (2011). Spleen rates in children: an old and new surveillance tool for malaria elimination initiatives in island settings. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* *105*, 226–231.

Chen, L., Zhang, Z., and Sendo, F. (2000). Neutrophils play a critical role in the pathogenesis of experimental cerebral malaria. *Clin. Exp. Immunol.* *120*, 125–133.

Chotivanich, K., Udomsangpetch, R., McGready, R., Proux, S., Newton, P., Pukrittayakamee, S., Looareesuwan, S., and White, N.J. (2002). Central role of the spleen in malaria parasite clearance. *J. Infect. Dis.* *185*, 1538–1541.

Choudhury, H.R., Sheikh, N. a., Bancroft, G.J., Katz, D.R., and De Souza, J.B. (2000). Early nonspecific immune responses and immunity to blood-stage nonlethal Plasmodium yoelii malaria. *Infect. Immun.* *68*, 6127–6132.

Clark, I.A., Allison, A.C., and Cox, F.E. (1976). Protection of mice against Babesia and Plasmodium with BCG. *Nature* *259*, 309–311.

Claser, C., Malleret, B., Gun, S.Y., Wong, A.Y.W., Chang, Z.W., Teo, P., See, P.C.E., Howland, S.W., Ginhoux, F., and Rénia, L. (2011). CD8+ T cells and IFN- $\gamma$  mediate the time-dependent accumulation of infected red blood cells in deep organs during experimental cerebral

malaria. PLoS One 6, e18720.

Cohn, Z.A. (1963). The fate of bacteria within phagocytic cells. *J. Exp. Med.* 117, 27–42.

Colombatti, R., Penazzato, M., Bassani, F., Vieira, C.S., Lourenço, A.A., Vieira, F., Teso, S., Giaquinto, C., and Riccardi, F. (2011). Malaria prevention reduces in-hospital mortality among severely ill tuberculosis patients: a three-step intervention in Bissau, Guinea-Bissau. *BMC Infect. Dis.* 11, doi: 10.1186/1471-2334-11-57.

Constant, S.L., and Bottomly, K. (1997). Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches. *Annu. Rev. Immunol.* 15, 297–322.

Cooper, a M., Pearl, J.E., Brooks, J. V, Ehlers, S., and Orme, I.M. (2000). Expression of the nitric oxide synthase 2 gene is not essential for early control of Mycobacterium tuberculosis in the murine lung. *Infect. Immun.* 68, 6879–6882.

Cooper, A.M., Adams, L.B., Dalton, D.K., Appelberg, R., and Ehlers, S. (2002). IFN-g and NO in mycobacterial disease: New jobs for old hands. *Trends Microbiol.* 10, 221–226.

Cooper, A.M., Solache, A., and Khader, S.A. (2007). Interleukin-12 and tuberculosis: an old story revisited. *Curr. Opin. Immunol.* 19, 441–447.

Correa, M., Narayanan, P.R., and Miller, H.C. (1980). Suppressive activity of splenic adherent cells from Plasmodium chabaudi-infected mice. *J. Immunol.* 125, 749–754.

Couper, K., Blount, D., and Riley, E. (2008a). IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J. Immunol.* 180, 5771–5777.

Couper, K.N., Blount, D.G., Wilson, M.S., Hafalla, J.C., Belkaid, Y., Kamanaka, M., Flavell, R. a, de Souza, J.B., and Riley, E.M. (2008b). IL-10 from CD4CD25Foxp3CD127 adaptive regulatory T cells modulates parasite clearance and pathology during malaria infection. *PLoS Pathog.* 4, e1000004.

Cox, F.E. (2010). History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. *Parasit. Vectors* 3, 5.

Cox, F.E.G. (2002). History of Human Parasitology. *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 595–612.

Cunnington, A.J., and Riley, E.M. (2010a). Suppression of vaccine responses by malaria: insignificant or overlooked? *Expert Rev. Vaccines* 9, 409–429.

Cunnington, A.J., and Riley, E.M. (2010b). Suppression of vaccine responses by malaria : insignificant or overlooked? *Expert Rev. Vaccines* 9, 409–429.

Curfs, J.H., Schetters, T.P., Hermsen, C.C., Jerusalem, C.R., van Zon, a a, and Eling, W.M. (1989). Immunological aspects of cerebral lesions in murine malaria. *Clin. Exp. Immunol.* 75, 136–140.

Dasari, P., Reiss, K., Lingelbach, K., Baumeister, S., Lucius, R., Udomsangpetch, R., Bhakdi, S.C., and Bhakdi, S. (2011). Digestive vacuoles of Plasmodium falciparum are selectively phagocytosed by and impair killing function of polymorphonuclear leukocytes. *Blood* 118,

4946–4956.

Decker, T., Stockinger, S., Karaghiosoff, M., Müller, M., and Kovarik, P. (2002). IFNs and STATs in innate immunity to microorganisms. *J. Clin. Invest.* *109*, 1271–1277.

Demar, M., Legrand, E., Hommel, D., Esterre, P., and Carme, B. (2004). Plasmodium falciparum malaria in splenectomized patients: two case reports in French Guiana and a literature review. *Am J Trop Med Hyg* *71*, 290–293.

Deroost, K., Tyberghein, A., Lays, N., Noppen, S., Schwarzer, E., Vanstreels, E., Komuta, M., Prato, M., Lin, J., Pamplona, A., et al. (2013). Hemozoin Induces Lung Inflammation and Correlates with Malaria-Associated Acute Respiratory Distress Syndrome. *Am J Respir Cell Mol Biol* *48*, 589–600.

Desvignes, L., and Ernst, J.D. (2009). Interferon-g-Responsive Nonhematopoietic Cells Regulate the Immune Response to Mycobacterium tuberculosis. *Immunity* *31*, 974–985.

Deveci, F., Handan Akbulut, H., Turgut, T., and Hamdi Muz, M. (2005). Changes in serum cytokine levels in active tuberculosis with treatment. *Mediators Inflamm.* *2005*, 256–262.

deWalick, S., Amante, F.H., McSweeney, K. a, Randall, L.M., Stanley, A.C., Haque, A., Kuns, R.D., MacDonald, K.P. a, Hill, G.R., and Engwerda, C.R. (2007). Cutting edge: conventional dendritic cells are the critical APC required for the induction of experimental cerebral malaria. *J. Immunol.* *178*, 6033–6037.

Dgedge, M., Novoa, A., Macassa, G., Sacarlal, J., Black, J., Michaud, C., and Cliff, J. (2001). The burden of disease in Maputo City , Mozambique : registered and autopsied deaths in 1994. *WHO* *79*, 546–552.

Dharmadhikari, A.S., and Nardell, E.A. (2008). What animal models teach humans about tuberculosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *39*, 503–508.

Dheda, K., Barry, C.E., and Maartens, G. (2015). Tuberculosis. *Lancet* *6736*, 1–17.

Dondorp, A., Nosten, F., Stepniewska, K., Day, N., and White, N. (2005). Artesunate versus quinine for treatment of severe falciparum malaria: a randomised trial. *Lancet* *366*, 717–725.

Doolan, D.L., Dobano, C., and Baird, J.K. (2009). Acquired immunity to Malaria. *Clin. Microbiol. Rev.* *22*, 13–36.

Elias, D., Mengistu, G., Akuffo, H., and Britton, S. (2006). Are intestinal helminths risk factors for developing active tuberculosis? *Trop. Med. Int. Heal.* *11*, 551–558.

Engele, M., Stössel, E., Castiglione, K., Schwerdtner, N., Wagner, M., Bölskei, P., Röllinghoff, M., and Stenger, S. (2002). Induction of TNF in human alveolar macrophages as a potential evasion mechanism of virulent Mycobacterium tuberculosis. *J. Immunol.* *168*, 1328–1337.

Engwerda, C.R., Mynott, T.L., Sawhney, S., De Souza, J.B., Bickle, Q.D., and Kaye, P.M. (2002). Locally up-regulated lymphotoxin alpha, not systemic tumor necrosis factor alpha, is the principle mediator of murine cerebral malaria. *J. Exp. Med.* *195*, 1371–1377.

- Engwerda, C.R., Beattie, L., and Amante, F.H. (2005). The importance of the spleen in malaria. *Trends Parasitol.* *21*, 75–80.
- Ernst, J.D. (1998). Macrophage Receptors for *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* *66*, 1277–1281.
- Ernst, J.D. (2012). The immunological life cycle of tuberculosis. *Nat. Rev. Immunol.* *12*, 581–591.
- Farid, A., Al-Sherbiny, M., Osman, A., Mohamed, N., Saad, A., Shata, M.T., Lee, D.H., Prince, A.M., and Strickland, G.T. (2005). *Schistosoma* infection inhibits cellular immune responses to core HCV peptides. *Parasite Immunol.* *27*, 189–196.
- Favre, N., Da, C., Ryffel, B., Weiss, N.A., Imhof, B.A., Rudin, W., and Cd, I.- (1999). Role of ICAM-1 ( CD54 ) in the development of murine cerebral malaria. *Microbes Infect.* *1*, 961–968.
- Feng, C.G., Kaviratne, M., Rothfuchs, A.G., Cheever, A., Hieny, S., Young, H. a, Wynn, T. a, and Sher, A. (2006). NK cell-derived IFN-gamma differentially regulates innate resistance and neutrophil response in T cell-deficient hosts infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Immunol.* *177*, 7086–7093.
- Flynn, J.L. (2006). Lessons from experimental *Mycobacterium tuberculosis* infections. *Microbes Infect.* *8*, 1179–1188.
- Flynn, J.L., and Chan, J. (2001a). Tuberculosis : Latency and Reactivation. *Infect. Immun.* *69*, 4195–4201.
- Flynn, J.L., and Chan, J. (2001b). Immunology of Tuberculosis. *Annu. Rev. Immunol.* *19*, 93–129.
- Flynn, J.L., Goldstein, M.M., Chan, J., Triebold, K.J., Pfeffer, K., Lowenstein, C.J., Schreiber, R., Mak, T.W., and Bloom, B.R. (1995). Tumor necrosis factor- $\alpha$  is required in the protective immune response against *mycobacterium tuberculosis* in mice. *Immunity* *2*, 561–572.
- Flynn, J.L., Scanga, C.A., Tanaka, K.E., and Chan, J. (1998). Effects of aminoguanidine on latent murine tuberculosis. *J. Immunol.* *160*, 1796–1803.
- Flynn, J.L., Chan, J., and Lin, P.L. (2011). Macrophages and control of granulomatous inflammation in tuberculosis. *Mucosal Immunol.* *4*, 271–278.
- Forbes, E.K., Sander, C., Ronan, E.O., McShane, H., Hill, A.V.S., Beverley, P.C.L., and Tchilian, E.Z. (2008). Multifunctional, high-level cytokine-producing Th1 cells in the lung, but not spleen, correlate with protection against *Mycobacterium tuberculosis* aerosol challenge in mice. *J. Immunol.* *181*, 4955–4964.
- Franke-Fayard, B., Fonager, J., Braks, A., Khan, S.M., and Janse, C.J. (2010). Sequestration and tissue accumulation of human malaria parasites: can we learn anything from rodent models of malaria? *PLoS Pathog.* *6*, e1001032.
- Freitas do Rosario, A.P., and Langhorne, J. (2012). T cell-derived IL-10 and its impact on the

regulation of host responses during malaria. *Int. J. Parasitol.* **42**, 549–555.

Freitas do Rosario, a. P., Lamb, T., Spence, P., Stephens, R., Lang, A., Roers, A., Muller, W., O'Garra, A., and Langhorne, J. (2012). IL-27 Promotes IL-10 Production by Effector Th1 CD4+ T Cells: A Critical Mechanism for Protection from Severe Immunopathology during Malaria Infection. *J. Immunol.* **188**, 1178–1190.

Frevort, U., Engelmann, S., Zougbedé, S., Stange, J., Ng, B., Matuschewski, K., Liebes, L., and Yee, H. (2005). Intravital observation of *Plasmodium berghei* sporozoite infection of the liver. *PLoS Biol.* **3**, e192.

Frita, R., Carapau, D., Mota, M.M., and Hänscheid, T. (2012). In Vivo Hemozoin Kinetics after Clearance of *Plasmodium berghei* Infection in Mice. *Malar. Res. Treat.* **2012**, 373086.

Fujita, S., Seino, K.I., Sato, K., Sato, Y., Eizumi, K., Yamashita, N., Taniguchi, M., and Sato, K. (2006). Regulatory dendritic cells act as regulators of acute lethal systemic inflammatory response. *Blood* **107**, 3656–3664.

Garnica, M.R., De Moraes, L.V., Rizzo, L.V., and De Andrade, H.F. (2005). Supplementation of CXCL12 (CXCL12) induces homing of CD11c+ dendritic cells to the spleen and enhances control of *Plasmodium berghei* malaria in BALB/c mice. *Immunology* **115**, 399–406.

Gazzinelli, R.T., Oswald, I.P., James, S.L., and Sher, a (1992). IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN-gamma-activated macrophages. *J. Immunol.* **148**, 1792–1796.

Gibbert, K., Dietze, K.K., Zelinskyy, G., Lang, K.S., Barchet, W., Kirschning, C.J., and Dittmer, U. (2010). Polyinosinic-Polycytidylic Acid Treatment of Friend Retrovirus-Infected Mice Improves Functional Properties of Virus-Specific T Cells and Prevents Virus-Induced Disease. *J. Immunol.* **185**, 6179–6189.

Giese, N.A., Gabriele, L., Doherty, T.M., Klinman, D.M., Tadesse-Heath, L., Contursi, C., Epstein, S.L., and Morse, H.C. (1997). Interferon (IFN) consensus sequence-binding protein, a transcription factor of the IFN regulatory factor family, regulates immune responses in vivo through control of interleukin 12 expression. *J. Exp. Med.* **186**, 1535–1546.

Gomez, J.E., and McKinney, J.D. (2004). M. tuberculosis persistence, latency, and drug tolerance. *Tuberculosis* **84**, 29–44.

González-Cano, P., Chacón-Salinas, R., Ramos-Kichik, V., Hernández-Pando, R., Estrada-Parra, S., and Estrada-García, I. (2012). Double Edge Sword: The Role of Neutrophils in Tuberculosis. In *Understanding Tuberculosis - Analyzing the Origin of Mycobacterium Tuberculosis Pathogenicity*, pp. 277–297.

Grau, G., Fajardo, L., Piquet, P., Allet, B., Lambert, P., and Vassalli, P. (1987). Tumor necrosis factor (cachectin) as an essential mediator in murine cerebral malaria. *Science* (80- ). **237**, 1210–1212.

Grau, G.E., Heremans, H., Piquet, P.F., Pointaire, P., Lambert, P.H., Billiau, A., and Vassalli, P. (1989). Monoclonal antibody against interferon gamma can prevent experimental cerebral

malaria and its associated overproduction of tumor necrosis factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *86*, 5572–5574.

Greenwood, B.M., Bradley-Moore, A.M., Palit, A., and Bryceson, A.D.M. (1972). Immunosuppression in children with malaria. *Lancet* 169–172.

Gupta, S., Snow, R.W., Donnelly, C. a, Marsh, K., and Newbold, C. (1999). Immunity to non-cerebral severe malaria is acquired after one or two infections. *Nat. Med.* *5*, 340–343.

Hafalla, J.C., Silvie, O., and Matuschewski, K. (2011). Cell biology and immunology of malaria. *Immunol. Rev.* *240*, 297–316.

Hambleton, S., Salem, S., Bustamante, J., Bigley, V., Boisson-Dupuis, S., Azevedo, J., Fortin, A., Haniffa, M., Ceron-Gutierrez, L., Bacon, C.M., et al. (2011). *IRF8* Mutations and Human Dendritic-Cell Immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.* *365*, 127–138.

Hänscheid, T., Egan, T.J., and Grobusch, M.P. (2007). Haemozoin: from melatonin pigment to drug target, diagnostic tool, and immune modulator. *Lancet Infect. Dis.* *7*, 675–685.

Hansen, D.S. (2012). Inflammatory responses associated with the induction of cerebral malaria: lessons from experimental murine models. *PLoS Pathog.* *8*, e1003045.

Hansen, D., and Bernard, N. (2007). NK cells stimulate recruitment of CXCR3+ T cells to the brain during *Plasmodium berghei*-mediated cerebral malaria. *J. Immunol.* *178*, 5779–5788.

Haque, A., Best, S.E., Unosson, K., Amante, F.H., de Labastida, F., Anstey, N.M., Karupiah, G., Smyth, M.J., Heath, W.R., and Engwerda, C.R. (2011). Granzyme B expression by CD8+ T cells is required for the development of experimental cerebral malaria. *J. Immunol.* *186*, 6148–6156.

Harding, C. V, and Boom, W.H. (2010). Regulation of antigen presentation by *Mycobacterium tuberculosis*: a role for Toll-like receptors. *Nat. Rev. Microbiol.* *8*, 296–307.

Harding, J.S., Rayasam, A., Schreiber, H.A., Fabry, Z., and Sandor, M. (2015). *Mycobacterium*-Infected Dendritic Cells Disseminate Granulomatous Inflammation. *Sci. Rep.* *5*, 15248.

Hathila, R.N., Patel, P.R., and Tailor, H.J. (2015). Autopsy Findings in Malaria cases; a Hospital Based Study. *Asian Pac. J. Heal. Sci.* *2*, 12–14.

Hawkes, M., Li, X., Crockett, M., Diassiti, A., Liles, W.C., Liu, J., and Kain, K.C. (2010). Malaria exacerbates experimental mycobacterial infection in vitro and in vivo. *Microbes Infect.* *12*, 864–874.

Hearn, J., Rayment, N., and Landon, D. (2000). Immunopathology of cerebral malaria: morphological evidence of parasite sequestration in murine brain microvasculature. *Infect. Immun.* *68*, 5364–5376.

Helmbj, H., Kullberg, M., and Troye-Blomberg, M. (1998). Altered Immune Responses in Mice with Concomitant *Schistosoma mansoni* and *Plasmodium chabaudi* Infections. *Infect. Immun.* *66*, 5167–5174.

- Hempelmann, E., and Krafts, K. (2013). Bad air , amulets and mosquitoes : 2 , 000 years of changing perspectives on malaria. *Malar. J.* *12*, 1–13.
- Herbst, S., Schaible, U.E., and Schneider, B.E. (2011). Interferon gamma activated macrophages kill mycobacteria by nitric oxide induced apoptosis. *PLoS One* *6*, e19105.
- Hermesen, C.C., Mommers, E., van de Wiel, T., Sauerwein, R.W., and Eling, W.M. (1998). Convulsions due to increased permeability of the blood-brain barrier in experimental cerebral malaria can be prevented by splenectomy or anti-T cell treatment. *J. Infect. Dis.* *178*, 1225–1227.
- Hernandez Pando, R., Bini, E.I., and Hernandez, R.E. (2010). The contribution of diverse animal models in the evaluation of new vaccines against Tb. In *The Art & Science of Tuberculosis Vaccine Development*, pp. 521–543.
- Hett, E.C., and Rubin, E.J. (2008). Bacterial growth and cell division: a mycobacterial perspective. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *72*, 126–156.
- Hill, A.V.S. (2011). Vaccines against malaria. *Phil. Trans. R. Soc. B* *366*, 2806–2814.
- Hogquist, K. a, Jameson, S.C., Heath, W.R., Howard, J.L., Bevan, M.J., and Carbone, F.R. (1994). T Cell Receptor Antagonist Peptides Induce Positive Selection. *Cell* *76*, 17–27.
- Hongoro, C., and McPake, B. (2003). Hospital costs of high-burden diseases: Malaria and pulmonary tuberculosis in a high HIV prevalence context in Zimbabwe. *Trop. Med. Int. Heal.* *8*, 242–250.
- Hotez, P.J., Brindley, P.J., Bethony, J.M., King, C.H., Pearce, E.J., and Jacobson, J. (2008). Helminth infections: the great neglected tropical diseases. *J. Clin. Invest.* *118*, 1311–1321.
- Howland, S.W., Poh, C.M., Gun, S.Y., Claser, C., Malleret, B., Shastri, N., Ginhoux, F., Grotenbreg, G.M., and Rénia, L. (2013). Brain microvessel cross-presentation is a hallmark of experimental cerebral malaria. *EMBO Mol. Med.* *5*, 916–931.
- Howland, S.W., Poh, C.M., and Rénia, L. (2015). Activated Brain Endothelial Cells Cross-Present Malaria Antigen. *PLOS Pathog.* *11*, e1004963.
- Humphreys, I.R., Stewart, G.R., Turner, D.J., Patel, J., Karamanou, D., Snelgrove, R.J., and Young, D.B. (2006). A role for dendritic cells in the dissemination of mycobacterial infection. *Microbes Infect.* *8*, 1339–1346.
- Hunt, N.H., and Grau, G.E. (2003). Cytokines: Accelerators and brakes in the pathogenesis of cerebral malaria. *Trends Immunol.* *24*, 491–499.
- Ichinohe, T., Watanabe, I., Ito, S., Fujii, H., Moriyama, M., Tamura, S., Takahashi, H., Sawa, H., Chiba, J., Kurata, T., et al. (2005). Synthetic Double-Stranded RNA Poly ( I : C ) Combined with Mucosal Vaccine Protects against Influenza Virus Infection. *J. Virol.* *79*, 2910–2919.
- Idro, R., Marsh, K., John, C.C., and Newton, C.R.J. (2010). Europe PMC Funders Group Cerebral Malaria ; Mechanisms Of Brain Injury And Strategies For Improved Neuro-Cognitive Outcome. *Pediatr. Res.* *68*, 267–274.

Ihekwereme, C.P., Esimone, C.O., and Nwanegbo, E.C. (2014). Hemozoin inhibition and control of clinical malaria. *Adv. Pharmacol. Sci.* 2014, doi: 10.1155/2014/984150.

Iqbal, N.T., and Hussain, R. (2014). Non-specific immunity of BCG vaccine: A perspective of BCG immunotherapy. *Trials Vaccinol.* 3, 143–149.

Ito, T., Schaller, M., Hogaboam, C.M., Standiford, T.J., Chensue, S.W., and Kunkel, S.L. (2007). TLR9 activation is a key event for the maintenance of a mycobacterial antigen-elicited pulmonary granulomatous response. *Eur. J. Immunol.* 37, 2847–2855.

Jamieson, A.M., Pasman, L., Yu, S., Gamradt, P., Homer, R.J., Decker, T., and Medzhitov, R. (2013). Role of Tissue Protection in Lethal Respiratory Viral-Bacterial Coinfection. *Science* (80- ). 340, 1230–1234.

Jamil, B., Shahid, F., Hasan, Z., Nasir, N., Razzaki, T., Dawood, G., and Hussain, R. (2007). Interferon $\gamma$ /IL10 ratio defines the disease severity in pulmonary and extra pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis* 87, 279–287.

Jangpatarapongsa, K., Chootong, P., Sattabongkot, J., Chotivanich, K., Sirichaisinthop, J., Tungpradabkul, S., Hisaeda, H., Troye-Blomberg, M., Cui, L., and Udomsangpetch, R. (2008). Plasmodium vivax parasites alter the balance of myeloid and plasmacytoid dendritic cells and the induction of regulatory T cells. *Eur. J. Immunol.* 38, 2697–2705.

Jaramillo, M., Plante, I., Ouellet, N., Vandal, K., Tessier, P.A., and Olivier, M. (2004). Hemozoin-Inducible Proinflammatory Events In Vivo: Potential Role in Malaria Infection. *J. Immunol.* 172, 3101–3110.

John, C.C., Bangirana, P., Byarugaba, J., Opoka, R.O., Idro, R., Jurek, A.M., Wu, B., and Boivin, M.J. (2008). Cerebral malaria in children is associated with long term cognitive impairment. *Pediatrics* 122, e92–e99.

Jordao, L., and Vieira, O. V (2011). Tuberculosis: New Aspects of an Old Disease. *Int. J. Cell Biol.* 2011, 1–13.

Jung, Y.J., LaCourse, R., Ryan, L., and North, R.J. (2008). “Immunization” against airborne tuberculosis by an earlier primary response to a concurrent intravenous infection. *Immunology* 124, 514–521.

Junqueira-Kipnis, A.P., Kipnis, A., Jamieson, A., Juarrero, M.G., Diefenbach, A., Raulet, D.H., Turner, J., and Orme, I.M. (2003). NK cells respond to pulmonary infection with Mycobacterium tuberculosis, but play a minimal role in protection. *J. Immunol.* 171, 6039–6045.

Kaufmann, S.H. (2001). How can immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nat. Rev. Immunol.* 1, 20–30.

Kawai, T., and Akira, S. (2011). Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity. *Immunity* 34, 637–650.

Khader, S. a, Partida-Sanchez, S., Bell, G., Jelley-Gibbs, D.M., Swain, S., Pearl, J.E., Ghilardi, N., Desauvage, F.J., Lund, F.E., and Cooper, A.M. (2006). Interleukin 12p40 is required for

dendritic cell migration and T cell priming after *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J. Exp. Med.* *203*, 1805–1815.

Kim, H., Hwang, J.-S., Woo, C.-H., Kim, E.-Y., Kim, T.-H., Cho, K.-J., Seo, J.-M., Lee, S.-S., and Kim, J.-H. (2008). TNF- $\alpha$ -induced up-regulation of intercellular adhesion molecule-1 is regulated by a Rac-ROS-dependent cascade in human airway epithelial cells. *Exp. Mol. Med.* *40*, 167.

Kim, W.S., Kim, J.-S., Cha, S. Bin, Han, S.J., Kim, H., Kwon, K.W., Kim, S.J., Eum, S.-Y., Cho, S.-N., and Shin, S.J. (2015). Virulence-Dependent Alterations in the Kinetics of Immune Cells during Pulmonary Infection by *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One* *10*, e0145234.

King, T., and Lamb, T. (2015). Interferon- $\gamma$ : The Jekyll and Hyde of Malaria. *PLOS Pathog.* *11*, e1005118.

Kirby, A.C., Raynes, J.G., and Kaye, P.M. (2006). CD11b regulates recruitment of alveolar macrophages but not pulmonary dendritic cells after pneumococcal challenge. *J. Infect. Dis.* *193*, 205–213.

Klein, I., and Crispe, I.N. (2006). Complete differentiation of CD8<sup>+</sup> T cells activated locally within the transplanted liver. *J. Exp. Med.* *203*, 437–447.

Kleinnijenhuis, J., Oosting, M., Joosten, L.A.B., Netea, M.G., and Van Crevel, R. (2011). Innate Immune Recognition of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin. Dev. Immunol.* *2011*, 1–12.

Kobayashi, S.D., and Deleo, F.R. (2009). Towards a comprehensive understanding of the role of neutrophils in innate immunity: a systems biology-level approach. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* *1*, 309–333.

Kobayashi, F., Morii, T., Matsui, T., Fujino, T., Watanabe, Y., Weidanz, W.P., and Tsuji, M. (1996). Production of interleukin 10 during malaria caused by lethal and nonlethal variants of *Plasmodium yoelii yoelii*. *Parasitol. Res.* *82*, 385–391.

Kopf, M., Schneider, C., and Nobs, S.P. (2015). The development and function of lung-resident macrophages and dendritic cells. *Nat Immunol* *16*, 36–44.

Korbel, D.S., Schneider, B.E., and Schaible, U.E. (2008). Innate immunity in tuberculosis: myths and truth. *Microbes Infect.* *10*, 995–1004.

Kordes, M., Matuschewski, K., and Hafalla, J.C.R. (2011). Caspase-1 Activation of Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and IL-18 Is Dispensable for Induction of Experimental Cerebral Malaria. *Infect. Immun.* *79*, 3633–3641.

Koul, A., Arnoult, E., Lounis, N., Guillemont, J., and Andries, K. (2011). The challenge of new drug discovery for tuberculosis. *Nature* *469*, 483–490.

Lacerda, M.V.G., Fragoso, S.C.P., Alecrim, M.G.C., Alexandre, M.A.A., Magalhães, B.M.L., Siqueira, A.M., Ferreira, L.C.L., Araujo, J.R., Mourao, M.P.G., Ferrer, M., et al. (2012). Postmortem characterization of patients with clinical diagnosis of *Plasmodium vivax* malaria: To what extent does this parasite kill? *Clin. Infect. Dis.* *55*, 67–74.

- Lai, R., Jeyanathan, M., Shaler, C.R., Damjanovic, D., Khera, A., Horvath, C., Ashkar, A. a, and Xing, Z. (2014). Restoration of innate immune activation accelerates Th1-cell priming and protection following pulmonary mycobacterial infection. *Eur. J. Immunol.* *44*, 1375–1386.
- Lalremruata, A., Ball, M., Bianucci, R., Welte, B., Nerlich, A.G., Kun, J.F.J., and Pusch, C.M. (2013). Molecular Identification of Falciparum Malaria and Human Tuberculosis Co-Infections in Mummies from the Fayum Depression (Lower Egypt). *PLoS One* *8*, 9–12.
- Lalvani, A., Pathan, A.A., Shane, H.M.C., Wilkinson, R.J., Latif, M., Conlon, C.P., Pasvol, G., and Hill, A.V.S. (2001). Rapid Detection of Mycobacterium tuberculosis Infection by enumeration of Antigen-specific T cells. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *163*, 824–828.
- Lamb, T.J., Brown, D.E., Potocnik, A.J., and Langhorne, J. (2006). Insights into the immunopathogenesis of malaria using mouse models. *Expert Rev. Mol. Med.* *8*, 1–22.
- Lancelin, W., and Guerrero-Plata, A. (2011). Isolation of Mouse Lung Dendritic Cells. *J. Vis. Exp.* 6–9.
- Langhorne, J., Quin, S.J., and Sanni, L.A. (2002). Mouse Models of Blood-Stage Malaria Infections : Immune Responses and Cytokines Involved in Protection and Pathology. *Chem Immunol* *80*, 204–228.
- Langhorne, J., Albano, F.R., Hensmann, M., Sanni, L., Cadman, E., Voisine, C., and Sponaas, A.-M. (2004). Dendritic cells, pro-inflammatory responses, and antigen presentation in a rodent malaria infection. *Immunol. Rev.* *201*, 35–47.
- Langhorne, J., Ndungu, F.M., Sponaas, A.-M., and Marsh, K. (2008). Immunity to malaria: more questions than answers. *Nat. Immunol.* *9*, 725–732.
- Langhorne, J., Buffet, P., Galinski, M., Good, M., Harty, J., Leroy, D., Mota, M.M., Pasini, E., Renia, L., Riley, E., et al. (2011). The relevance of non-human primate and rodent malaria models for humans. *Malar. J.* *10*, 23.
- Lazarevic, V., Nolt, D., and Flynn, J.L. (2005). Long-term control of Mycobacterium tuberculosis infection is mediated by dynamic immune responses. *J. Immunol.* *175*, 1107–1117.
- Leisewitz, a L., Rockett, K., and Kwiatkowski, D. (2008). BCG-malaria co-Infection has paradoxical effects on C57BL/6 and A/J mouse strains. *Parasite Immunol.* *30*, 1–12.
- Lepenies, B., Cramer, J.P., Burchard, G.D., Wagner, H., Kirschning, C.J., and Jacobs, T. (2008). Induction of experimental cerebral malaria is independent of TLR2/4/9. *Med. Microbiol. Immunol.* *197*, 39–44.
- Lewin, A., Freytag, B., Meister, B., Sharbati-Tehrani, S., Schäfer, H., and Appel, B. (2003). Use of a Quantitative TaqMan-PCR for the Fast Quantification of Mycobacteria in Broth Culture, Eukaryotic Cell Culture and Tissue. *J. Vet. Med. Ser. B Infect. Dis. Vet. Public Heal.* *50*, 505–509.
- Libbey, J.E., and Fujinami, R.S. (2002). Virus-induced Immunosuppression. In *Polymicrobial Diseases*, p. Chapter 19; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

- Liu, J., Guan, X., Tamura, T., Ozato, K., and Ma, X. (2004). Synergistic activation of interleukin-12 p35 gene transcription by interferon regulatory factor-1 and interferon consensus sequence-binding protein. *J. Biol. Chem.* *279*, 55609–55617.
- Lokken, K.L., Mooney, J.P., Butler, B.P., Xavier, M.N., Chau, J.Y., Schaltenberg, N., Begum, R.H., Müller, W., Luckhart, S., and Tsolis, R.M. (2014). Malaria parasite infection compromises control of concurrent systemic non-typhoidal *Salmonella* infection via IL-10-mediated alteration of myeloid cell function. *PLoS Pathog.* *10*, e1004049.
- Lowe, D.M., Redford, P.S., Wilkinson, R.J., O’Garra, A., and Martineau, A.R. (2012). Neutrophils in tuberculosis - friend or foe. *Trends Immunol.* *33*, 14–25.
- Lucas, B., Engel, A., Camus, D., and Haque, A. (1993). *Plasmodium yoelii* in mice - antigen reactivity of CD4- and CD8-bearing T cells. *Cell. Immunol.* *150*, 59–71.
- Lundie, R.J. (2011). Antigen presentation in immunity to murine malaria. *Curr. Opin. Immunol.* *23*, 119–123.
- Lundie, R.J., de Koning-Ward, T.F., Davey, G.M., Nie, C.Q., Hansen, D.S., Lau, L.S., Mintern, J.D., Belz, G.T., Schofield, L., Carbone, F.R., et al. (2008). Blood-stage *Plasmodium* infection induces CD8<sup>+</sup> T lymphocytes to parasite-expressed antigens, largely regulated by CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 14509–14514.
- Lundie, R.J., Young, L.J., Davey, G.M., Villadangos, J.A., Carbone, F.R., Heath, W.R., and Crabb, B.S. (2010). Blood-stage *Plasmodium berghei* infection leads to short-lived parasite-associated antigen presentation by dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* *40*, 1674–1681.
- Lundqvist, J., Larsson, C., Nelson, M., Andersson, M., Bergström, S., and Persson, C. (2010). Concomitant infection decreases the malaria burden but escalates relapsing fever borreliosis. *Infect. Immun.* *78*, 1924–1930.
- Lyadova, I. V., and Panteleev, A. V. (2015). Th1 and Th17 Cells in Tuberculosis: Protection, Pathology, and Biomarkers. *Mediators Inflamm.* *2015*, doi: 10.1155/2015/854507.
- Lyke, K.E., Diallo, D.A., Dicko, A., Kone, A., Coulibaly, D., Guindo, A., Cissoko, Y., Sangare, L., Coulibaly, S., Dakouo, B., et al. (2003). Association of intraleukocytic *Plasmodium falciparum* malaria pigment with disease severity, clinical manifestations, and prognosis in severe malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* *69*, 253–259.
- MacMicking, J.D., North, R.J., LaCourse, R., Mudgett, J.S., Shah, S.K., and Nathan, C.F. (1997). Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 5243–5248.
- Malaguarnera, L., and Musumeci, S. (2002). The immune response to *Plasmodium falciparum* malaria. *Lancet Infect Dis* *2*, 472–478.
- Malefyt, R.D.W., Abrams, J., Bennett, B., Figdor, C.G., and de Vries, J.E. (1999). Interleukin 10 (IL-10) Inhibits Cytokine Synthesis by Human Monocytes: An Autoregulatory Role of IL-10 Produced by Monocytes. *J. Exp. Med.* *174*, 1209–1220.
- Marquis, J.-F., LaCourse, R., Ryan, L., North, R.J., and Gros, P. (2009). Disseminated and

Rapidly Fatal Tuberculosis in Mice Bearing a Defective Allele at IFN Regulatory Factor 8. *J. Immunol.* *182*, 3008–3015.

Marsh, K., and Kinyanjui, S. (2006). Immune effector mechanisms in malaria. *Parasite Immunol.* *28*, 51–60.

Matsumoto, S., Yukitake, H., Kanbara, H., Yamada, H., Kitamura, a, and Yamada, T. (2000). *Mycobacterium bovis* bacillus calmette-guérin induces protective immunity against infection by *Plasmodium yoelii* at blood-stage depending on shifting immunity toward Th1 type and inducing protective IgG2a after the parasite infection. *Vaccine* *19*, 779–787.

McDonough, K.A., Kress, Y., and Bloom, B.R. (1993). The interaction of *Mycobacterium tuberculosis* with macrophages: a study of phagolysosome fusion. *Infect. Immun.* *2*, 232–235.

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

McQuillan, J.A., Mitchell, A.J., Ho, Y.F., Combes, V., Ball, H.J., Golenser, J., Grau, G.E., and Hunt, N.H. (2011). Coincident parasite and CD8 T cell sequestration is required for development of experimental cerebral malaria. *Int. J. Parasitol.* *41*, 155–163.

Means, T.K., Wang, S., Lien, E., Yoshimura, A., Golenbock, D.T., and Fenton, M.J. (1999). Human toll-like receptors mediate cellular activation by *Mycobacterium tuberculosis*. *J.Immunol.* 3920–3927.

Medana, I.M., and Turner, G.D.H. (2006). Human cerebral malaria and the blood-brain barrier. *Int. J. Parasitol.* *36*, 555–568.

Medema, J.P., Schuurhuis, D.H., Rea, D., van Tongeren, J., de Jong, J., Bres, S. a, Laban, S., Toes, R.E., Toebe, M., Schumacher, T.N., et al. (2001). Expression of the serpin serine protease inhibitor 6 protects dendritic cells from cytotoxic T lymphocyte-induced apoptosis: differential modulation by T helper type 1 and type 2 cells. *J. Exp. Med.* *194*, 657–667.

Medina, E., and North, R.J. (1996). Evidence Inconsistent with a Role for the Bcg Gene (*Nramp1*) in Resistance of Mice to Infection with Virulent *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Exp. Med.* *183*, 1045–1051.

Melrose, J., Tsurushita, N., Liu, G., and Berg, E.L. (1998). IFN-gamma inhibits activation-induced expression of E- and P-selectin on endothelial cells. *J. Immunol.* *161*, 2457–2464.

Metenou, S., Kovacs, M., Dembele, B., Coulibaly, Y.I., Klion, A.D., and Nutman, T.B. (2012). Interferon regulatory factor modulation underlies the bystander suppression of malaria antigen-driven IL-12 and IFN-g in filaria-malaria co-infection. *Eur. J. Immunol.* *42*, 641–650.

Migliori, G. (2007). Tuberculosis and migration. *WHO* *2*, 68–87.

Miller, K.L., Silverman, P.H., Kullgren, B., and Mahlmann, L.J. (1989). Tumor necrosis factor alpha and the anemia associated with murine malaria. *Infect Immun* *57*, 1542–1546.

Miller, L.H., Good, M.F., and Milon, G. (1994). Malaria pathogenesis. *Science* *264*, 1878–

---

1883.

Miller, L.H., Ackerman, H.C., Su, X., and Wellems, T.E. (2013). Malaria biology and disease pathogenesis: insights for new treatments. *Nat. Med.* *19*, 156–167.

Milner, D.A., Whitten, R.O., Kamiza, S., Carr, R., Liomba, G., Dzamalala, C., Seydel, K.B., Molyneux, M.E., and Taylor, T.E. (2014). The systemic pathology of cerebral malaria in African children. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* *4*, doi: 10.3389/fcimb.2014.00104.

Mitchell, A.J., Hansen, A.M., Hee, L., Helen, J., Potter, S.M., Walker, J.C., Hunt, N.H., and Ball, H.J. (2005). Early Cytokine Production Is Associated with Protection from Murine Cerebral Malaria Early Cytokine Production Is Associated with Protection from Murine Cerebral Malaria. *Infect. Immun.* *73*, 5645–5653.

Mittrücker, H.-W., Steinhoff, U., Köhler, A., Krause, M., Lazar, D., Mex, P., Miekley, D., and Kaufmann, S.H.E. (2007). Poor correlation between BCG vaccination-induced T cell responses and protection against tuberculosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 12434–12439.

Miu, J., Mitchell, A.J., Müller, M., Carter, S.L., Manders, P.M., McQuillan, J. a, Saunders, B.M., Ball, H.J., Lu, B., Campbell, I.L., et al. (2008). Chemokine gene expression during fatal murine cerebral malaria and protection due to CXCR3 deficiency. *J Immunol* *180*, 1217–1230.

Miyamoto, M., Prause, O., Sjöstrand, M., Laan, M., Lötvall, J., and Lindén, A. (2003). Endogenous IL-17 as a mediator of neutrophil recruitment caused by endotoxin exposure in mouse airways. *J. Immunol.* *170*, 4665–4672.

Mohan, A., Sharma, S.K., and Bollineni, S. (2008). Acute lung injury and acute respiratory distress syndrome in malaria. *J. Vector Borne Dis.* *45*, 179–193.

Mohan, V.P., Scanga, C.A., Yu, K., Holly, M., Tanaka, K.E., Tsang, E., Tsai, M.C., Flynn, J.L., Chan, J., Mohan, V.P., et al. (2001). Effects of Tumor Necrosis Factor Alpha on Host Immune Response in Chronic Persistent Tuberculosis : Possible Role for Limiting Pathology. *Infect. Immun.* *69*, 1847–1855.

Monin, L., Griffiths, K.L., Lam, W.Y., Gopal, R., Kang, D.D., Ahmed, M., Rajamanickam, A., Cruz-Lagunas, A., Zúñiga, J., Babu, S., et al. (2015). Helminth-induced arginase-1 exacerbates lung inflammation and disease severity in tuberculosis. *J. Clin. Invest.* *125*, 4699–4713.

Mooney, J.P., Butler, B.P., Lokken, K.L., Xavier, M.N., Chau, J.Y., Schaltenberg, N., Dandekar, S., George, M., Santos, R.L., Luckhart, S., et al. (2014). The mucosal inflammatory response to non-typhoidal *Salmonella* in the intestine is blunted by IL-10 during concurrent malaria parasite infection. *Mucosal Immunol.* *7*, 1302–1311.

Mooney, J.P., Lee, S.-J., Lokken, K.L., Nanton, M.R., Nuccio, S.-P., McSorley, S.J., and Tsolis, R.M. (2015). Transient Loss of Protection Afforded by a Live Attenuated Non-typhoidal *Salmonella* Vaccine in Mice Co-infected with Malaria. *PLoS Negl. Trop. Dis.* *9*, e0004027.

Mota, M.M., and Rodriguez, A. (2004). Migration through host cells: The first steps of *Plasmodium* sporozoites in the mammalian host. *Cell. Microbiol.* *6*, 1113–1118.

Mueller, A.-K., Behrends, J., Hagens, K., Mahlo, J., Schaible, U.E., and Schneider, B.E. (2012).

Natural Transmission of *Plasmodium berghei* Exacerbates Chronic Tuberculosis in an Experimental Co-Infection Model. *PLoS One* 7, e48110.

Muñoz-Elías, E.J., Timm, J., Botha, T., Chan, W., Gomez, J.E., McKinney, J.D., and Mun, E.J. (2005). Replication Dynamics of *Mycobacterium tuberculosis* in Chronically Infected Mice. *Infect. Immun.* 73, 546–551.

Murphy, J.R. (1981). Host defenses in murine malaria: nonspecific resistance to *Plasmodium berghei* generated in response to *Mycobacterium bovis* infection or *Corynebacterium parvum* stimulation. *Infect. Immun.* 33, 199–211.

Murphy, J., and Lefford, M. (1979). Host defenses in murine malaria: evaluation of the mechanisms of immunity to *Plasmodium yoelii* infection. *Infect. Immun.* 23, 384–391.

Murray, P., and Young, R. (1999). Increased antimycobacterial immunity in interleukin-10-deficient mice. *Infect. Immun.* 67, 3087–3095.

Murray, P., Wang, L., and Onufryk, C. (1997). T cell-derived IL-10 antagonizes macrophage function in mycobacterial infection. *J. Immunol.* 158, 315–321.

Nagato, T., and Celis, E. (2014). A novel combinatorial cancer immunotherapy: poly-IC and blockade of the PD-1/PD-L1 pathway. *Oncoimmunology* 3, e28440.

Nandi, B., and Behar, S.M. (2011). Regulation of neutrophils by interferon- $\gamma$  limits lung inflammation during tuberculosis infection. *J. Exp. Med.* 208, 2251–2262.

Newbold, C., Craig, a., Kyes, S., Rowe, a., Fernandez-Reyes, D., and Fagan, T. (1999). *Plasmodium falciparum*: Pathogenesis, polymorphism and the infected red cell surface. *Transfus. Clin. Biol.* 6, 57–60.

Newton, C.R.J., Hien, T.T., and White, N. (2000). Cerebral malaria. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 69, 433–441.

Ngougou, E.B., and Preux, P.M. (2008). Cerebral malaria and epilepsy. *Epilepsia* 49, 19–24.

Nie, C.Q., Bernard, N.J., Norman, M.U., Amante, F.H., Lundie, R.J., Crabb, B.S., Heath, W.R., Engwerda, C.R., Hickey, M.J., Schofield, L., et al. (2009). IP-10-mediated T cell homing promotes cerebral inflammation over splenic immunity to malaria infection. *PLoS Pathog.* 5, e1000369.

Niikura, M., Kamiya, S., Nakane, A., Kita, K., and Kobayashi, F. (2010). IL-10 plays a crucial role for the protection of experimental cerebral malaria by co-infection with non-lethal malaria parasites. *Int. J. Parasitol.* 40, 101–108.

Nitcheu, J., Bonduelle, O., Combadiere, C., Tefit, M., Seilhean, D., Mazier, D., and Combadiere, B. (2003). Perforin-Dependent Brain-Infiltrating Cytotoxic CD8<sup>+</sup> T Lymphocytes Mediate Experimental Cerebral Malaria Pathogenesis. *J. Immunol.* 170, 2221–2228.

North, R.J. (1998). Mice incapable of making IL-4 or IL-10 display normal resistance to infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin. Exp. Immunol.* 113, 55–58.

- North, R.J., and Jung, Y.-J. (2004). Immunity to tuberculosis. *Annu. Rev. Immunol.* 22, 599–623.
- O’Garra, A., Redford, P.S., McNab, F.W., Bloom, C.I., Wilkinson, R.J., and Berry, M.P.R. (2013). The immune response in tuberculosis. *Annu. Rev. Immunol.* 31, 475–527.
- Oakley, M.S., Sahu, B.R., Lotspeich-Cole, L., Solanki, N.R., Majam, V., Pham, P.T., Banerjee, R., Kozakai, Y., Derrick, S.C., Kumar, S., et al. (2013). The transcription factor T-bet regulates parasitemia and promotes pathogenesis during *Plasmodium berghei* ANKA murine malaria. *J. Immunol.* 191, 4699–4708.
- Ocaña-Morgner, C., Mota, M.M., and Rodriguez, A. (2003). Malaria blood stage suppression of liver stage immunity by dendritic cells. *J. Exp. Med.* 197, 143–151.
- Ocaña-Morgner, C., Wong, K. a, and Rodriguez, A. (2008). Interactions between dendritic cells and CD4+ T cells during *Plasmodium* infection. *Malar. J.* 7, doi: 10.1186/1475–2875 – 7–88.
- Okamoto Yoshida, Y., Umemura, M., Yahagi, A., O’Brien, R.L., Ikuta, K., Kishihara, K., Hara, H., Nakae, S., Iwakura, Y., and Matsuzaki, G. (2010). Essential role of IL-17A in the formation of a mycobacterial infection-induced granuloma in the lung. *J. Immunol.* 184, 4414–4422.
- Olivier, M., Van Den Ham, K., Shio, M.T., Kassa, F.A., and Fougeray, S. (2014). Malarial Pigment Hemozoin and the Innate Inflammatory Response. *Front. Immunol.* 5, 1–10.
- Orengo, J.M., Wong, K. a, Ocaña-Morgner, C., and Rodriguez, A. (2008). A *Plasmodium yoelii* soluble factor inhibits the phenotypic maturation of dendritic cells. *Malar. J.* 7, doi: 10.1186/1475–2875 – 7–254.
- Orme, I.M., Robinson, R.T., and Cooper, A.M. (2014). The balance between protective and pathogenic immune responses in the TB-infected lung. *Nat. Immunol.* 16, 57–63.
- Overstreet, M.G., Cockburn, I.A., and Zavala, F. (2008). Protective CD8+ T cells against *Plasmodium* liver stages: immunobiology of an “unnatural” immune response. *October* 225, 272–283.
- Page, K., Jedlicka, A., and Fakhri, B. (2005). Mycobacterium-induced potentiation of type 1 immune responses and protection against malaria are host specific. *Infect. Immun.* 73, 8369–8380.
- Pais, T.F., and Chatterjee, S. (2005). Brain macrophage activation in murine cerebral malaria precedes accumulation of leukocytes and CD8+ T cell proliferation. *J. Neuroimmunol.* 163, 73–83.
- Palomo, J., Fauconnier, M., Coquard, L., Gilles, M., Meme, S., Szeremeta, F., Fick, L., Franetich, J.-F., Jacobs, M., Togbe, D., et al. (2013). Type I interferons contribute to experimental cerebral malaria development in response to sporozoite or blood-stage *Plasmodium berghei* ANKA. *Eur. J. Immunol.* 43, 2683–2695.
- Palucka, K., and Banchereau, J. (2002). How dendritic cells and microbes interact to elicit or subvert protective immune responses. *Curr. Opin. Immunol.* 14, 420–431.

- Parra, M., Liu, X., Derrick, S.C., Yang, A., Tian, J., Kolibab, K., Kumar, S., and Morris, S.L. (2013). Molecular Analysis of Non-Specific Protection against Murine Malaria Induced by BCG Vaccination. *PLoS One* *8*, e66115.
- Parroche, P., Lauw, F.N., Goutagny, N., Latz, E., Monks, B.G., Visintin, A., Halmen, K. a, Lamphier, M., Olivier, M., Bartholomeu, D.C., et al. (2007). Malaria hemozoin is immunologically inert but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9. *Pnas* *104*, 1919–1924.
- Pasman, L. (2012). The complication of coinfection. *Yale J. Biol. Med.* *85*, 127–132.
- Pawlowski, A., Jansson, M., Sköld, M., Rottenberg, M.E., and Källenius, G. (2012). Tuberculosis and HIV co-infection. *PLoS Pathog.* *8*, e1002464.
- Perez-Mazliah, D., and Langhorne, J. (2015). CD4 T-Cell Subsets in Malaria: TH1/TH2 Revisited. *Front. Immunol.* *5*, 1–8.
- Perry, J. a., Rush, A., Wilson, R.J., Olver, C.S., and Avery, a. C. (2004). Dendritic Cells from Malaria-Infected Mice Are Fully Functional APC. *J. Immunol.* *172*, 475–482.
- Phillips, A., Bassett, P., Zeki, S., Newman, S., and Pasvol, G. (2009). Risk factors for severe disease in adults with falciparum malaria. *Clin. Infect. Dis.* *48*, 871–878.
- Pichyangkul, S., Saengkrai, P., and Webster, A.K. (1994). Plasmodium falciparum pigment induces monocytes to release high levels of tumor necrose factor- $\alpha$  and interleukin- $1\beta$ . *Am J Trop Med Hyg* *51*, 430–435.
- Pierce, B.Y.C.H., Dubos, K.J., and Schaefer, W.B. (1953). Multiplication and survival of tubercle bacilli in the organs of mice. *J. Exp. Med.* *97*, 189–206.
- Pieters, J. (2008). Mycobacterium tuberculosis and the Macrophage: Maintaining a Balance. *Cell Host Microbe* *3*, 399–407.
- Plebanski, M., and Hill, a V (2000). The immunology of malaria infection. *Curr. Opin. Immunol.* *12*, 437–441.
- Poh, C.M., Howland, S.W., Grotenbreg, G.M., and Rénia, L. (2014). Damage to the Blood-Brain Barrier during Experimental Cerebral Malaria Results from Synergistic Effects of CD8+ T Cells with Different Specificities. *Infect. Immun.* *82*, 4854–4864.
- Pollack, I., Jakacki, R., Butterfield, L., Hamilton, R., Panigrahy, A., Normolle, D., Connelly, A., Dibridge, S., Mason, G., Whiteside, T., et al. (2016). Immune responses and outcome after vaccination with glioma-associated antigen peptides and poly-ICLC in a pilot study for pediatric recurrent low-grade gliomas. *Neuro Oncol. Mar 15*, now26 [Epub ahead of print].
- Pompei, L., Jang, S., Zamlynny, B., Ravikumar, S., McBride, A., Hickman, S.P., and Salgame, P. (2007). Disparity in IL-12 release in dendritic cells and macrophages in response to Mycobacterium tuberculosis is due to use of distinct TLRs. *J. Immunol.* *178*, 5192–5199.
- Del Portillo, H. a, Ferrer, M., Brugat, T., Martin-Jaular, L., Langhorne, J., and Lacerda, M.V.G. (2012). The role of the spleen in malaria. *Cell. Microbiol.* *14*, 343–355.

del Portillo, H.A., Ferrer, M., Brugat, T., Martin-Jaular, L., Langhorne, J., and Lacerda, M.V.G. (2012). The role of the spleen in malaria. *Cell. Microbiol.* *14*, 343–355.

Potian, J. a, Rafi, W., Bhatt, K., McBride, A., Gause, W.C., and Salgame, P. (2011). Preexisting helminth infection induces inhibition of innate pulmonary anti-tuberculosis defense by engaging the IL-4 receptor pathway. *J. Exp. Med.* *208*, 1863–1874.

Price, R.N., Simpson, J. a, Nosten, F., Luxemburger, C., Hkirjaroen, L., ter Kuile, F., Chongsuphajaisiddhi, T., and White, N.J. (2001). Factors contributing to anemia after uncomplicated falciparum malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* *65*, 614–622.

Pron, B., Boumaila, C., Jaubert, F., Berche, P., Milon, G., Geissmann, F., and Gaillard, J.L. (2001). Dendritic cells are early cellular targets of *Listeria monocytogenes* after intestinal delivery and are involved in bacterial spread in the host. *Cell. Microbiol.* *3*, 331–340.

Raja, A. (2004). Immunology of tuberculosis. *Indian J Med Res* *120*, 213–232.

Ramakrishnan, L. (2012). Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. *Nat. Rev. Immunol.* *12*, 352–366.

Redford, P.S., Boonstra, A., Read, S., Pitt, J., Graham, C., Stavropoulos, E., Bancroft, G.J., and O’Garra, A. (2010). Enhanced protection to *Mycobacterium tuberculosis* infection in IL-10-deficient mice is accompanied by early and enhanced Th1 responses in the lung. *Eur. J. Immunol.* *40*, 2200–2210.

Rees, R.J., and Hart, P.D. (1961). Analysis of the host-parasite equilibrium in chronic murine tuberculosis by total and viable bacillary counts. *Br. J. Exp. Pathol.* *42*, 83–88.

Reiter, P. (2000). From Shakespear to Dofoe: malaria in England and the Little Ice Age. *Emerg. Infect. Dis.* *6*, 1–11.

Rénia, L., Potter, S.M., Mauduit, M., Rosa, D.S., Kayibanda, M., Deschemin, J.-C., Snounou, G., and Grüner, A.C. (2006). Pathogenic T cells in cerebral malaria. *Int. J. Parasitol.* *36*, 547–554.

Resende Co, T., Hirsch, C.S., Toossi, Z., Dietze, R., and Ribeiro-Rodrigues, R. (2007). Intestinal helminth co-infection has a negative impact on both anti-*Mycobacterium tuberculosis* immunity and clinical response to tuberculosis therapy. *Clin. Exp. Immunol.* *147*, 45–52.

van Riet, E., Hartgers, F.C., and Yazdanbakhsh, M. (2007). Chronic helminth infections induce immunomodulation: Consequences and mechanisms. *Immunobiology* *212*, 475–490.

Roach, D.R., Martin, E., Bean, A.G.D., Rennick, D.M., Briscoe, H., and Britton, W.J. (2001). Endogenous inhibition of antimycobacterial immunity by IL-10 varies between mycobacterial species. *Scand. J. Immunol.* *54*, 163–170.

Roach, D.R., Bean, A.G.D., Demangel, C., France, M.P., Briscoe, H., and Britton, W.J. (2002). TNF Regulates Chemokine Induction Essential for Cell Recruitment, Granuloma Formation, and Clearance of Mycobacterial Infection. *J. Immunol.* *168*, 4620–4627.

Rodriguez, M., Terrazas, L.I., Marquez, R., and Bojalil, R. (1999). Susceptibility to

Trypanosoma cruzi is modified by a previous non-related infection. *Parasite Immunol.* *21*, 177–185.

Rosendahl, A., Bergmann, S., Hammerschmidt, S., Goldmann, O., and Medina, E. (2013). Lung dendritic cells facilitate extrapulmonary bacterial dissemination during pneumococcal pneumonia. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* *3*, doi: 10.3389/fcimb.2013.00021.

Roth, A., Gustafson, P., Nhaga, A., Djana, Q., Poulsen, A., Garly, M.L., Jensen, H., Sodemann, M., Rodrigues, A., and Aaby, P. (2005). BCG vaccination scar associated with better childhood survival in Guinea-Bissau. *Int. J. Epidemiol.* *34*, 540–547.

Roth, A., Garly, M.L., Jensen, H., Nielsen, J., and Aaby, P. (2006a). Bacillus Calmette-Guérin vaccination and infant mortality. *Expert Rev. Vaccines* *5*, 277–293.

Roth, A.E., Stensballe, L.G., Garly, M.L., and Aaby, P. (2006b). Beneficial non-targeted effects of BCG-Ethical implications for the coming introduction of new TB vaccines. *Tuberculosis* *86*, 397–403.

Russell, D.G. (2007). Who puts the tubercle in tuberculosis? *Nat. Rev. Microbiol.* *5*, 39–47.

Russell, D.G., Barry, C.E., and Flynn, J.L. (2010). Tuberculosis: what we don't know can, and does, hurt us. *Science* *328*, 852–856.

Salem, M.L., Attia, Z.I., and Galal, S.M. (2016). Acute inflammation induces immunomodulatory effects on myeloid cells associated with anti-tumor responses in a tumor mouse model. *J. Adv. Res.* *7*, 243–253.

Sallares, R., Bouwman, A., and Anderung, C. (2012). The Spread of Malaria to Southern Europe in Antiquity: New Approaches to Old Problems. *Med. Hist.* *48*, 311–328.

Sandor, F., and Buc, M. (2005). Toll-like Receptors. I. Structure, Function and Their Ligands. *Folia Biol.* *51*, 148–156.

Saunders, B.; Cooper, A.M. (2000). Restraining mycobacteria: role of granulomas in mycobacterial infections. *Immunol. Cell Biol.* *78*, p.334–341.

Sayles, Peter, C., Yanez, D.M., and Wassom, D.L. (1993). Plasmodium yoelii - splenectomy alters the antibody responses of infected mice. *Exp. Parasitol.* *76*, 377–384.

Schofield, L., and Grau, G.E. (2005). Immunological processes in malaria pathogenesis. *Nat. Rev. Immunol.* *5*, 722–735.

Schreiber, H.A., and Sandor, M. (2010). The Role of Dendritic Cells in Mycobacterium-Induced Granulomas. *Immunol Lett.* *130*, 26–31.

Schreiber, T., Ehlers, S., Heitmann, L., Rausch, A., Mages, J., Murray, P.J., Lang, R., and Hölscher, C. (2009). Autocrine IL-10 induces hallmarks of alternative activation in macrophages and suppresses antituberculosis effector mechanisms without compromising T cell immunity. *J. Immunol.* *183*, 1301–1312.

Scott, C.P., Kumar, N., Bishai, W.R., and Manabe, Y.C. (2004). Short report: modulation of

Mycobacterium tuberculosis infection by Plasmodium in the murine model. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* *70*, 144–148.

Scott, J.A.G., Berkley, J.A., Mwangi, I., Ochola, L., Uyoga, S., MacHaria, A., Ndila, C., Lowe, B.S., Mwarumba, S., Bauni, E., et al. (2011). Relation between falciparum malaria and bacteraemia in Kenyan children: A population-based, case-control study and a longitudinal study. *Lancet* *378*, 1316–1323.

Seixas, E., Cross, C., Quin, S., and Langhorne, J. (2001). Direct activation of dendritic cells by the malaria parasite, *Plasmodium chabaudi chabaudi*. *Eur. J. Immunol.* *31*, 2970–2978.

Semenzato, G., Adami, F., Maschio, N., and Agostini, C. (2000). Immune mechanisms in interstitial lung diseases. *Allergy* *55*, 1103–1120.

Settles, E.W., Moser, L.A., Harris, T.H., and Knoll, L.J. (2014). *Toxoplasma gondii* upregulates interleukin-12 to prevent *Plasmodium berghei*-induced experimental cerebral malaria. *Infect. Immun.* *82*, 1343–1353.

Shanks, G.D., Hay, S.I., and Bradley, D.J. (2008). Malaria's indirect contribution to all-cause mortality in the Andaman Islands during the colonial era. *Lancet Infect. Dis.* *8*, 564–570.

Shann, F. (2010). The non-specific effects of vaccines. *Arch. Dis. Child.* 662–667.

Shann, F. (2011). The nonspecific effects of vaccines and the expanded program on immunization. *J. Infect. Dis.* *204*, 182–184.

Sharma, S., and Bose, M. (2001). Role of Cytokines in Immune Response to Pulmonary Tuberculosis. *Asian Pacific J. Allergy Immunol.* *19*, 213–219.

Shear, H., and Srinivasan, R. (1989). Role of IFN-gamma in lethal and nonlethal malaria in susceptible and resistant murine hosts. *J. Immunol.* *143*, 2038–2044.

Shi, C., and Pamer, E.G. (2014). Monocyte Recruitment During Infection and Inflammation. *Nat Rev Immunol* *11*, 762–774.

Shibata, Y., Foster, L. a, Kurimoto, M., Okamura, H., Nakamura, R.M., Kawajiri, K., Justice, J.P., Van Scott, M.R., Myrvik, Q.N., and Metzger, W.J. (1998). Immunoregulatory roles of IL-10 in innate immunity: IL-10 inhibits macrophage production of IFN-gamma-inducing factors but enhances NK cell production of IFN-gamma. *J. Immunol.* *161*, 4283–4288.

Shikani, H.J., Freeman, B.D., Lisanti, M.P., Weiss, L.M., Tanowitz, H.B., and Desruisseaux, M.S. (2012). Cerebral malaria: we have come a long way. *Am. J. Pathol.* *181*, 1484–1492.

Shio, M.T., Kassa, F. a, Bellemare, M.-J., and Olivier, M. (2010). Innate inflammatory response to the malarial pigment hemozoin. *Microbes Infect.* *12*, 889–899.

Silva Miranda, M., Breiman, A., Allain, S., Deknuydt, F., and Altare, F. (2012). The tuberculous granuloma: an unsuccessful host defence mechanism providing a safety shelter for the bacteria? *Clin. Dev. Immunol.* *2012*, doi: 10.1155/2012/139127.

De Silva, P.M., and Marshall, J.M. (2012). Factors contributing to urban malaria transmission

in sub-saharan Africa: A systematic review. *J. Trop. Med.* 2012, doi: 10.1155/2012/819563.

Sinha, A., Salam, N., Gupta, S., and Natarajan, K. (2007). Mycobacterium tuberculosis and Dendritic Cells : Recognition , Activation and Functional Implications. *Indian J. Biochem. Biophys.* 44, 279–288.

Smrkovski, L.L., and Strickland, G.T. (1978). Rodent malaria: BCG-induced protection and immunosuppression. *J. Immunol.* 121, 1257–1261.

Snow, R.W., Trape, J.F., and Marsh, K. (2001). The past, present and future of childhood malaria mortality in Africa. *Trends Parasitol.* 17, 593–597.

de Souza, J.B., and Riley, E.M. (2002). Cerebral malaria: the contribution of studies in animal models to our understanding of immunopathogenesis. *Microbes Infect.* 4, 291–300.

de Souza, J., Williamson, K., Otani, T., and Playfair, J. (1997). Early interferon-gamma responses in lethal and non-lethal murine blood-stage malaria. *Infect. Immun.* 65, 1593–1598.

de Souza, J.B., Hafalla, J.C.R., Riley, E.M., and Couper, K.N. (2010). Cerebral malaria: why experimental murine models are required to understand the pathogenesis of disease. *Parasitology* 137, 755–772.

Sponaas, A.-M., Cadman, E.T., Voisine, C., Harrison, V., Boonstra, A., O’Garra, A., and Langhorne, J. (2006). Malaria infection changes the ability of splenic dendritic cell populations to stimulate antigen-specific T cells. *J. Exp. Med.* 203, 1427–1433.

Sponaas, A.-M., Freitas do Rosario, A.P., Voisine, C., Mastelic, B., Thompson, J., Koernig, S., Jarra, W., Renia, L., Mauduit, M., Potocnik, A.J., et al. (2009). Migrating monocytes recruited to the spleen play an important role in control of blood stage malaria. *Blood* 114, 5522–5531.

Van den Steen, P.E., Deroost, K., Van Aelst, I., Geurts, N., Martens, E., Struyf, S., Nie, C.Q., Hansen, D.S., Matthys, P., Van Damme, J., et al. (2008). CXCR3 determines strain susceptibility to murine cerebral malaria by mediating T lymphocyte migration toward IFN-gamma-induced chemokines. *Eur. J. Immunol.* 38, 1082–1095.

Van den Steen, P.E., Geurts, N., Deroost, K., Van Aelst, I., Verhenne, S., Heremans, H., Van Damme, J., and Opdenakker, G. (2010). Immunopathology and dexamethasone therapy in a new model for malaria-associated acute respiratory distress syndrome. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 181, 957–968.

Stevenson, M.M., and Riley, E.M. (2004). Innate immunity to malaria. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 169–180.

Stevenson, M.M., Gros, P., Olivier, M., Fortin, A., and Serghides, L. (2010). Cerebral malaria: human versus mouse studies. *Trends Parasitol.* 26, 274–275.

Straw, A.D., MacDonald, A.S., Denkers, E.Y., and Pearce, E.J. (2003). CD154 plays a central role in regulating dendritic cell activation during infections that induce Th1 or Th2 responses. *J Immunol* 170, 727–734.

Sturm, A., and Heussler, V. (2007). Live and let die: manipulation of host hepatocytes by exoerythrocytic Plasmodium parasites. *Med. Microbiol. Immunol.* *196*, 127–133.

Su, C.W., Cao, Y., Kaplan, J., Zhang, M., Li, W., Conroy, M., Walker, W.A., and Shi, H.N. (2011). Duodenal helminth infection alters barrier function of the colonic epithelium via adaptive immune activation. *Infect. Immun.* *79*, 2285–2294.

Su, Z., Segura, M., Morgan, K., Concepcion, J., Stevenson, M.M., and Loredó-osti, J.C. (2005). Impairment of Protective Immunity to Blood-Stage Malaria by Concurrent Nematode Infection. *Society* *73*, 3531–3539.

Tailleux, L., Neyrolles, O., Honoré-Bouakline, S., Perret, E., Sanchez, F., Abastado, J.-P., Lagrange, P.H., Gluckman, J.C., Rosenzweig, M., and Herrmann, J.-L. (2003). Constrained intracellular survival of Mycobacterium tuberculosis in human dendritic cells. *J. Immunol.* *170*, 1939–1948.

Takem, E.N., Roca, A., and Cunningham, A.J. (2014). The association between malaria and non-typhoid Salmonella bacteraemia in children in sub-Saharan Africa : a literature review. *Malar. J.* *13*, doi: 10.1186/1475–2875 – 13–400.

Tamura, T., Nagamura-Inoue, T., Shmeltzer, Z., Kuwata, T., and Ozato, K. (2000). ICSBP directs bipotential myeloid progenitor cells to differentiate into mature macrophages. *Immunity* *13*, 155–165.

Tamura, T., Ariga, H., Kinashi, T., Uehara, S., Kikuchi, T., Nakada, M., Tokunaga, T., Xu, W., Kariyone, A., Saito, T., et al. (2004). The role of antigenic peptide in CD4+ T helper phenotype development in a T cell receptor transgenic model. *Int. Immunol.* *16*, 1691–1699.

Tamura, T., Yanai, H., Savitsky, D., and Taniguchi, T. (2008). The IRF family transcription factors in immunity and oncogenesis. *Annu. Rev. Immunol.* *26*, 535–584.

Tamura, T., Kimura, K., Yuda, M., and Yui, K. (2011). Prevention of experimental cerebral malaria by Flt3 ligand during infection with Plasmodium berghei ANKA. *Infect. Immun.* *79*, 3947–3956.

Torrado, E., and Cooper, A.M. (2013). Cytokines in the balance of protection and pathology during mycobacterial infections. *Adv Exp Med Biol.* *783*, 121–140.

Trinchieri, G. (1993). Interleukin-12 and its role in the generation of TH1 cells. *Immunol. Today* *14*, 335–338.

Troye-Blomberg, M., and Berzins, K. (2008). Immune interactions in malaria co-infections with other endemic infectious diseases: implications for the development of improved disease interventions. *Microbes Infect.* *10*, 948–952.

Tsolaki, A.G. (2009). Innate Immune Recognition in Tuberculosis Infection. *Adv. Exp. Med. Biol.* *653*, 185–197.

Tufariello, J.M., Chan, J., and Flynn, J.L. (2003). Latent tuberculosis: mechanisms of host and bacillus that contribute to persistent infection. *Lancet Infect. Dis.* *3*, 578–590.

Ulrichs, T., and Kaufmann, S.H.E. (2006). New insights into the function of granulomas in human tuberculosis. *J. Pathol.* *208*, 261–269.

Ulrichs, T., Anding, P., Porcelli, S., Kaufmann, S.H.E., Munk, M.E., Hds, B., Rc, N., Tb, C., Heckeshorn-zehlendorf, C.H., Commission, E., et al. (2000). Increased Numbers of ESAT-6- and Purified Protein Derivative- Specific Gamma Interferon-Producing Cells in Subclinical and Active Tuberculosis Infection. *Society* *68*, 6073–6076.

Ulrichs, T., Kosmiadi, G. a, Trusov, V., Jörg, S., Pradl, L., Titukhina, M., Mishenko, V., Gushina, N., and Kaufmann, S.H. (2004). Human tuberculous granulomas induce peripheral lymphoid follicle-like structures to orchestrate local host defence in the lung. *J. Pathol.* *204*, 217–228.

Unaids, and Who (2009). AIDS epidemic update. *Aids* *37*, 1287–1296.

Urban, B.C., and Todryk, S. (2006). Malaria pigment paralyzes dendritic cells. *J. Biol.* *5*, Epub 2006 Apr 12.

Urban, B.C., Ferguson, D.J., Pain, a, Willcox, N., Plebanski, M., Austyn, J.M., and Roberts, D.J. (1999). Plasmodium falciparum-infected erythrocytes modulate the maturation of dendritic cells. *Nature* *400*, 73–77.

Urban, B.C., Hien, T.T., Day, N.P., Phu, N.H., Roberts, R., Pongponratn, E., Jones, M., Mai, N.T.H., Bethell, D., Turner, G.D.H., et al. (2005). Plasmodium falciparum. *Society* *73*, 1986–1994.

Valadas, E., Gomes, A., Sutre, A., and Brilha, S. (2013). Tuberculosis with malaria or HIV co-infection in a large hospital in Luanda, Angola. *J Infect Dev Ctries* *7*, 269–272.

Villegas-Mendez, A., Greig, R., Shaw, T.N., de Souza, J.B., Gwyer Findlay, E., Stumhofer, J.S., Hafalla, J.C.R., Blount, D.G., Hunter, C.A., Riley, E.M., et al. (2012). IFN-Producing CD4+ T Cells Promote Experimental Cerebral Malaria by Modulating CD8+ T Cell Accumulation within the Brain. *J. Immunol.* *189*, 968–979.

Villeval, J.L., Gearing, A., and Metcalf, D. (1990). Changes in hemopoietic and regulator levels in mice during fatal or nonfatal malarial infections. II. Nonerythroid populations. *Exp. Parasitol.* *71*, 375–385.

Voisine, C., Mastelic, B., Sponaas, A., and Langhorne, J. (2010). Classical CD11c+ dendritic cells, not plasmacytoid dendritic cells, induce T cell responses to Plasmodium chabaudi malaria. *Int J Parasitol* *40*, 711–719.

Wakkach, A., Fournier, N., Brun, V., Breitmayer, J.P., Cottrez, F., and Groux, H. (2003). Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo. *Immunity* *18*, 605–617.

Walther, B., Miles, D.J.C., Waight, P., Palmero, M.S., Ojuola, O., Touray, E.S., Whittle, H., van der Sande, M., Crozier, S., and Flanagan, K.L. (2012). Placental malaria is associated with attenuated CD4 T-cell responses to tuberculin PPD 12 months after BCG vaccination. *BMC Infect. Dis.* *12*, doi: 10.1186/1471-2334 – 12–16.

Walther, M., Tongren, J.E., Andrews, L., Korbelt, D., King, E., Fletcher, H., Andersen, R.F.,

Bejon, P., Thompson, F., Dunachie, S.J., et al. (2005). Upregulation of TGF-beta, FOXP3, and CD4+CD25+ regulatory T cells correlates with more rapid parasite growth in human malaria infection. *Immunity* 23, 287–296.

Wang, H., and Morse III, H.C. (2009). IRF8 regulates myeloid and B lymphoid lineage diversification. *Immunol Res.* 43, 109–117.

Wang, I.M., Contursi, C., Masumi, a, Ma, X., Trinchieri, G., and Ozato, K. (2000). An IFN-gamma-inducible transcription factor, IFN consensus sequence binding protein (ICSBP), stimulates IL-12 p40 expression in macrophages. *J. Immunol.* 165, 271–279.

Warren, H.S., and Weidanz, W.P. (1976). Malarial immunodepression in vitro: adherent spleen cells are functionally defective as accessory cells in the response to horse erythrocytes. *Eur. J. Immunol.* 6, 816–819.

Weiss, L. (1991). Barrier cells in the spleen. *Immunol. Today* 12, 24–29.

White, N.J., Turner, G.D.H., Medana, I.M., Dondorp, A.M., and Day, N.P.J. (2010). The murine cerebral malaria phenomenon. *Trends Parasitol.* 26, 11–15.

Whittle, H.C., Brown, J., Marsh, K., Blackman, M., Jobe, O., and Shenton, F. (1990). The effects of *Plasmodium falciparum* malaria on immune control of B lymphocytes in Gambian children. *Clin. Exp. Immunol.* 80, 213–218.

WHO (2015a). Global Tuberculosis Report 2015. World Heal. Organ. 1–5.

WHO (2015b). World Malaria Report 2015. World Health.

Williams, N.L., Morris, J.L., Rush, C.M., and Ketheesan, N. (2014). Migration of dendritic cells facilitate systemic dissemination of *Burkholderia pseudomallei*. *Infect. Immun.* 82, 4233–4240.

Wolf, A.J., Linas, B., Trevejo-Nuñez, G.J., Kincaid, E., Tamura, T., Takatsu, K., and Ernst, J.D. (2007). *Mycobacterium tuberculosis* infects dendritic cells with high frequency and impairs their function in vivo. *J. Immunol.* 179, 2509–2519.

Wolf, A.J., Desvignes, L., Linas, B., Banaiee, N., Tamura, T., Takatsu, K., and Ernst, J.D. (2008). Initiation of the adaptive immune response to *Mycobacterium tuberculosis* depends on antigen production in the local lymph node, not the lungs. *J. Exp. Med.* 205, 105–115.

Wong, K.A., and Rodriguez, A. (2008). *Plasmodium* infection and endotoxic shock induce the expansion of regulatory dendritic cells. *J Immunol.* 180, 716–726.

Woodworth, J., and Behar, S.M. (2006). *Mycobacterium tuberculosis* specific CD8+ T cells and their role in immunity. *Crit Rev Immunol.* 26, 317–352.

Wykes, M.N., and Good, M.F. (2008). What really happens to dendritic cells during malaria? *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 864–870.

Wykes, M.N., Liu, X.Q., Beattie, L., Stanistic, D.I., Stacey, K.J., Smyth, M.J., Thomas, R., and Good, M.F. (2007a). *Plasmodium* strain determines dendritic cell function essential for

survival from malaria. *PLoS Pathog.* 3, e96.

Wykes, M.N., Liu, X.Q., Jiang, S., Hirunpetcharat, C., and Good, M.F. (2007b). Systemic tumor necrosis factor generated during lethal *Plasmodium* infections impairs dendritic cell function. *J. Immunol.* 179, 3982–3987.

Xiang, J., Wünschmann, S., Diekema, D.J., Klinzman, D., Patrick, K.D., George, S.L., and Stapleton, J.T. (2001). Effect of coinfection with GB virus C on survival among patients with HIV infection. *N. Engl. J. Med.* 345, 707–714.

Yadava, A., Kumar, S., Dvorak, J.A., Milon, G., and Miller, L.H. (1996). Trafficking of *Plasmodium chabaudi* adami-infected erythrocytes within the mouse spleen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 4595–4599.

Yañez, D.M., Manning, D.D., Cooley, a J., Weidanz, W.P., and van der Heyde, H.C. (1996). Participation of lymphocyte subpopulations in the pathogenesis of experimental murine cerebral malaria. *J. Immunol.* 157, 1620–1624.

Zelante, T., De Luca, A., Bonifazi, P., Montagnoli, C., Bozza, S., Moretti, S., Belladonna, M.L., Vacca, C., Conte, C., Mosci, P., et al. (2007). IL-23 and the Th17 pathway promote inflammation and impair antifungal immune resistance. *Eur. J. Immunol.* 37, 2695–2706.

Zhu, C., Rao, K., Xiong, H., Gagnidze, K., Li, F., Horvath, C., and Plevy, S. (2003). Activation of the murine interleukin-12 p40 promoter by functional interactions between NFAT and ICSBP. *J. Biol. Chem.* 278, 39372–39382.

Zhu, J., Hladik, F., Woodward, A., Klock, A., and Peng, T. (2009). Persistence of HIV-1 Receptor-Positive Cells after HSV-2 Reactivation: A Potential Mechanism for Increased HIV-1 Acquisition. *Nat Med* 15, 886–892.

Zuñiga, J., Torres-García, D., Santos-Mendoza, T., Rodriguez-Reyna, T.S., Granados, J., and Yunis, E.J. (2012). Cellular and humoral mechanisms involved in the control of tuberculosis. *Clin. Dev. Immunol.* 2012, doi: 10.1155/2012/193923.

## Abbildungsverzeichnis

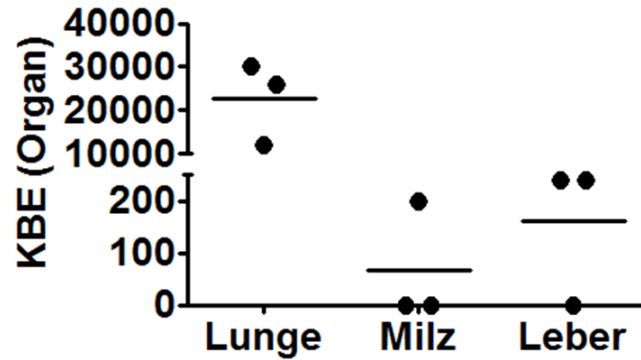
Abb. 1: Infektion und Granulombildung in der Tb. ....	2
Abb. 2: Lebenszyklus der Malariaparasiten. ....	10
Abb. 3: Der Durchbruch der Blut-Hirn-Schranke während der ZM.....	15
Abb. 4: Geographische Verteilung der Infektionskrankheiten Tb (links) und Malaria (rechts). .....	18
Abb. 5: Einfluss einer <i>Mtb</i> -Infektion auf die Entwicklung einer EZM in <i>PbANKA</i> -infizierten Mäusen.....	43
Abb. 6: Die durch <i>Mtb</i> und <i>PbANKA</i> induzierten Zytokinantworten in Serum und Milz.....	46
Abb. 7: Das Expressionsmuster von Chemokinen und Zytokinen im Gehirn.....	47
Abb. 8: Die Koinfektion hat keinen Einfluss auf Anzahl und Aktivierungsstatus der kDZ in der Milz.....	48
Abb. 9: Die T-Zell-Antworten in der Milz nach der Koinfektion mit <i>PbANKA</i> . ....	50
Abb. 10: Die Koinfektion mit <i>Mtb</i> hat keinen Einfluss auf die <i>PbANKA</i> -induzierte Sequestrierung von T-Zellen und Parasiten ins Gehirn.....	52
Abb. 11: Der Verlauf der <i>Py</i> -Infektion bleibt unverändert. ....	55
Abb. 12: <i>Py</i> -Koinfektion führt zu verstärkter Lungenpathologie in <i>Mtb</i> -infizierten Mäusen..	56
Abb. 13: Die <i>Py</i> -Koinfektion verstärkt die Zytokinantwort in der Lunge. ....	58
Abb. 14: Neutrophile Granulozyten, NK-Zellen und T-Zellen in der Lunge. ....	60
Abb. 15: Neutrophile Granulozyten, NK-Zellen und T-Zellen in der Milz. ....	62
Abb. 16: Rekrutierung von CD11c <sup>+</sup> kDZ in die Milzen <i>Py</i> -infizierter Tiere. ....	63
Abb. 17: Rekrutierung von CD11b <sup>-</sup> CD11c <sup>+</sup> Zellen durch die <i>Py</i> -Koinfektion in die Lunge. ....	64
Abb. 18: Hochregulierung von MCP-1 in koinfizierten Lungen.....	65
Abb. 19: T-Zell-Aktivierung durch DZ wird durch <i>Py</i> -Infektion nicht beeinträchtigt. ....	67
Abb. 20: Überleben von <i>Mtb</i> in DZ und PM naiver und <i>Py</i> -infizierter Mäuse. ....	68
Abb. 21: <i>Py</i> -Koinfektion führt zu einer erhöhten mykobakteriellen Last in Lunge, Milz und Leber.....	69
Abb. 22: Langzeitfolgen der <i>Py</i> -Koinfektion.....	71
Abb. 23: Hypothese für den Einfluss einer <i>Py</i> -Infektion in <i>Mtb</i> -infizierten Mäusen.....	92

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Antikörper für die Durchflusszytometrie.....	23
Tabelle 2: Primer für die quantitative <i>Real-Time</i> PCR (qRT-PCR).....	25
Tabelle 3: Verwendete Parasiten- und Bakterienstämme und deren Herkunft.....	27
Tabelle 4: Verwendete Mausstämme und deren Herkunft.....	27
Tabelle 5: Bewertungskriterien für den Gesundheitszustand <i>PbANKA</i> -infizierter Mäuse .....	30

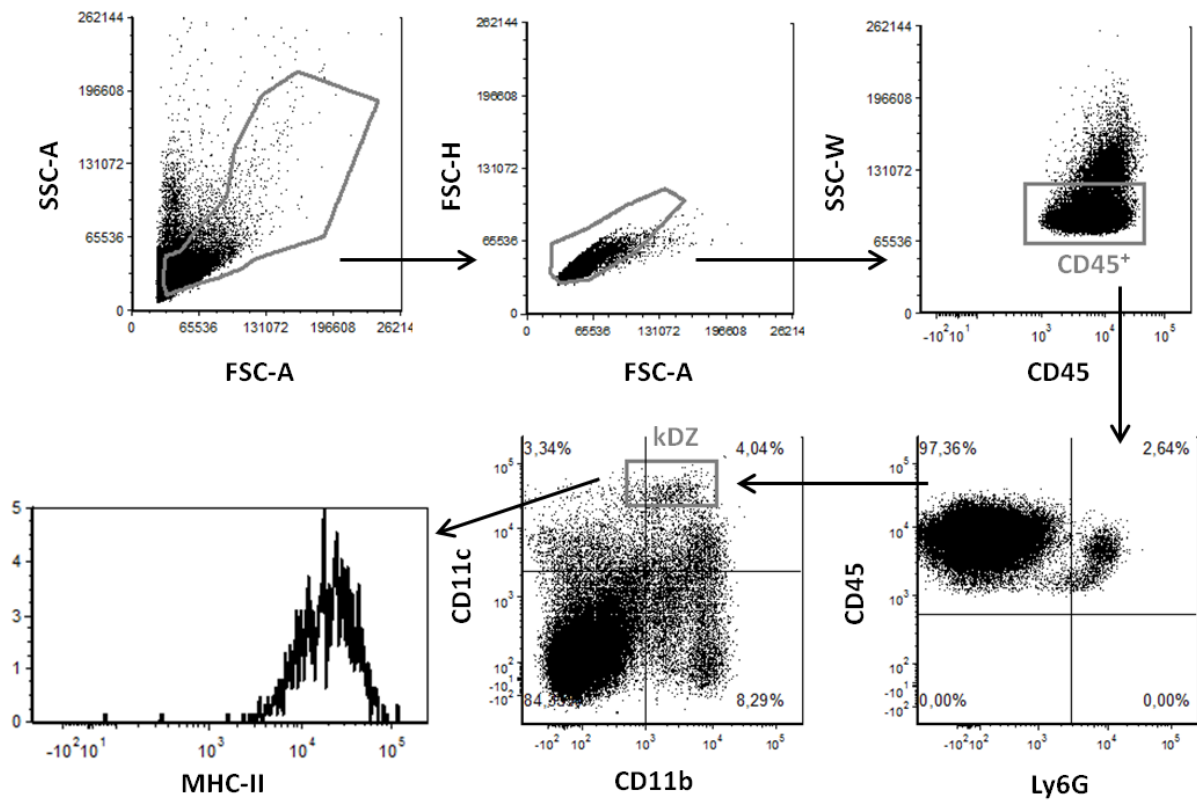
## Anhang

**Anhang 1: Tag 15 *Mtb*-Keimlast in Lunge, Milz und Leber.** C57BL/6 Mäuse wurden über Aerosol mit *Mtb* (Tag 1 KBE 120) infiziert. Die Lungen, Milzen und Lebern wurden 15 Tage nach der *Mtb*-Infektion entnommen, um die KBE zu bestimmen (n = 3).



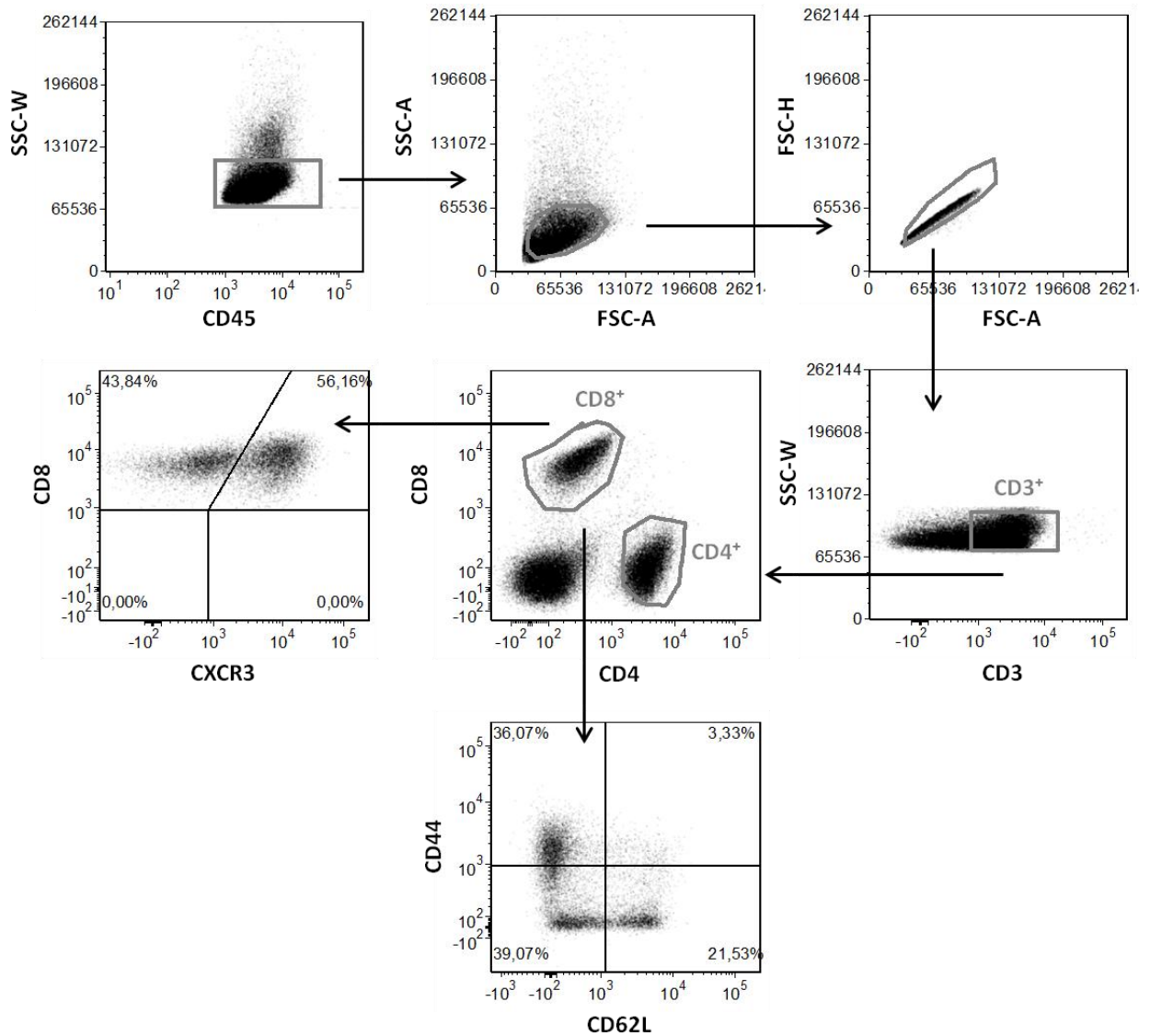
**Anhang 2: Gatingstrategie der durchflusszytometrischen Analysen für kDZ in der EZM.**

Ausschluss von Dubletten, Selektion einer  $CD45^+$  Zellpopulation, Selektion von kDZ aus  $CD45^+Ly6G^-$  Zellen, Analyse der MHC-II-Expression (CD80- und CD86-Expression analog)



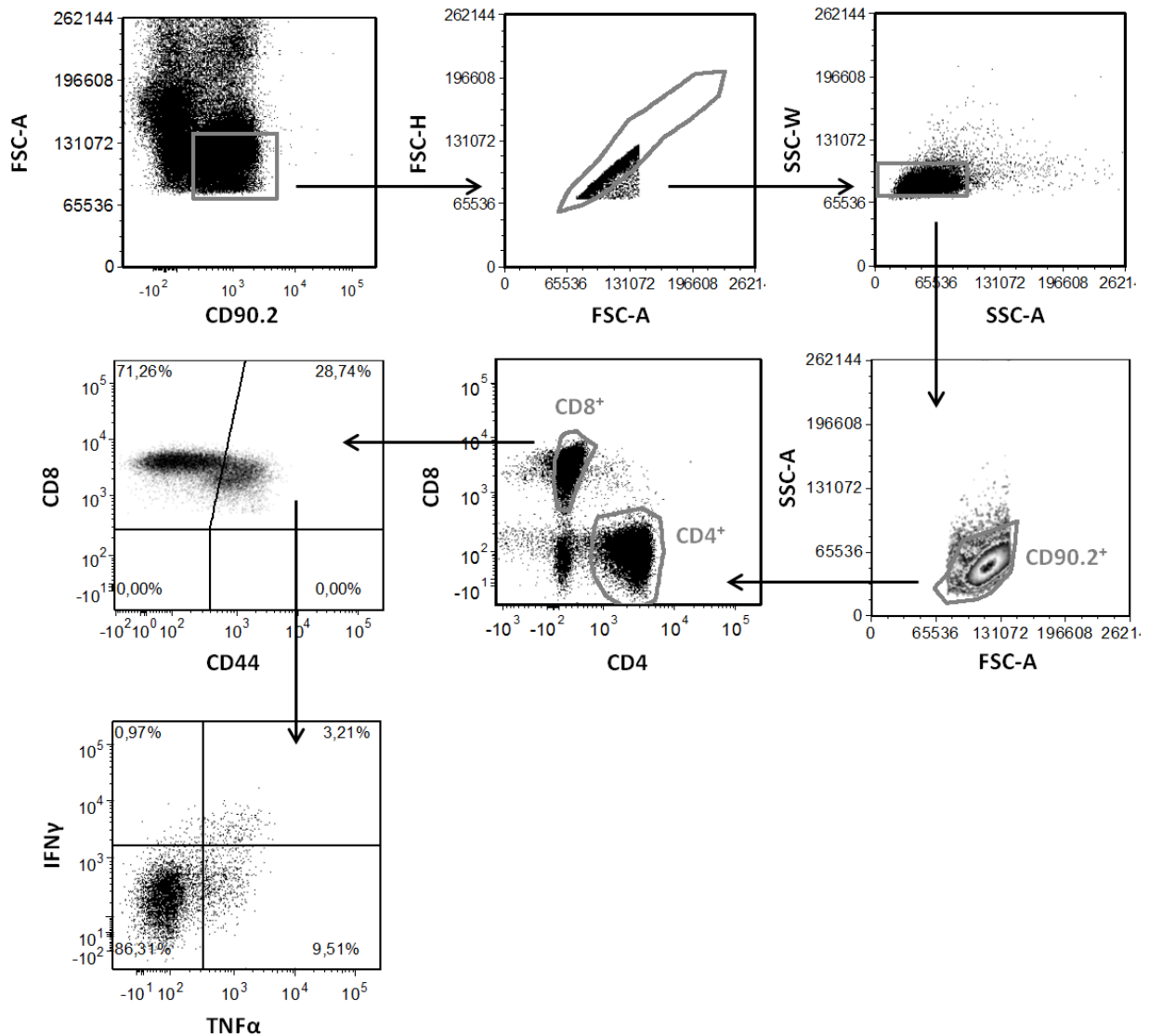
### Anhang 3: Gatingstrategie der durchflusszytometrischen Analysen für T-Zell-Populationen der Milz in der EZM.

Ausschluss von Dubletten, Selektion einer  $CD3^+$  Zellpopulation, Selektion von  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen aus  $CD3^+$  Zellen, Analyse der CXCR3-, CD44- und CD62L-Expression von  $CD8^+$  T-Zellen (für  $CD4^+$  T-Zellen analog)



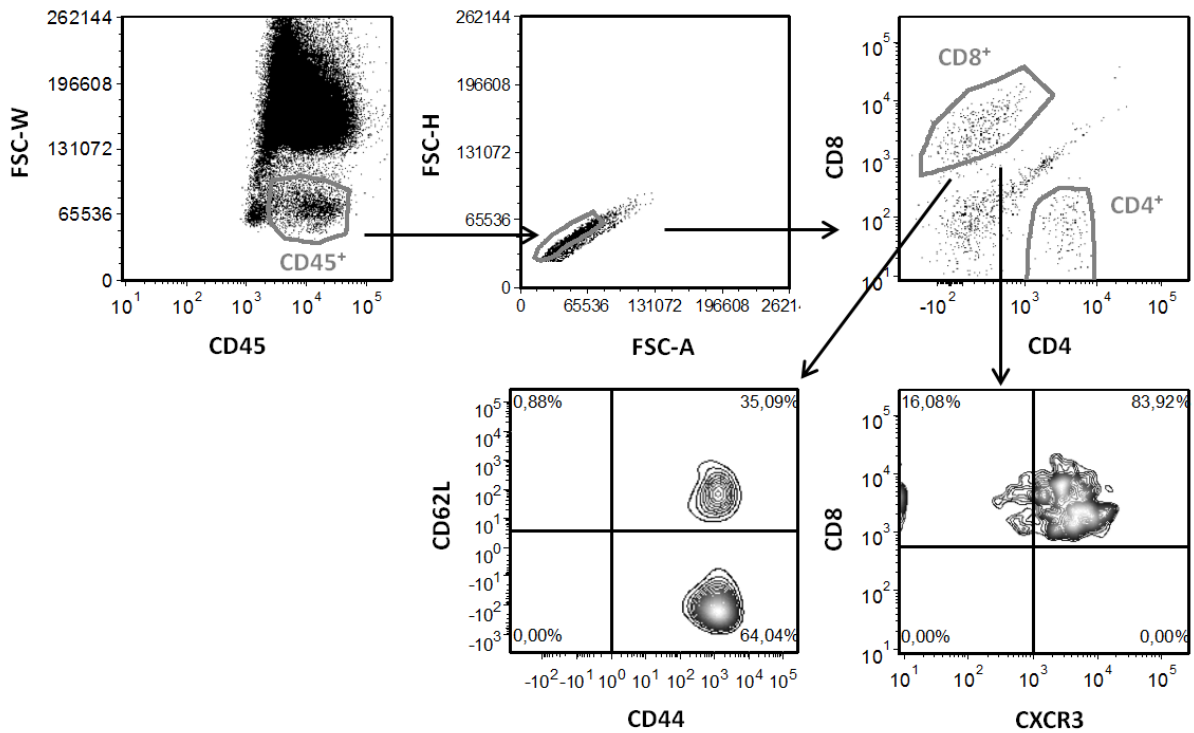
#### Anhang 4: Gatingstrategie der durchflusszytometrischen Analysen für die Zytokinproduktion von T-Zellen der Milz in der EZM.

Ausschluss von Dubletten, Selektion einer  $CD90.2^+$  Zellpopulation, Selektion von  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen aus  $CD90.2^+$  Zellen, Auswahl der  $CD44^+CD8^+$  T-Zellen (für  $CD4^+$  T-Zellen analog) und Analyse auf  $IFN\gamma$ - und  $TNF\alpha$ -Produktion (für IL-10- und IL-2-Produktion analog)



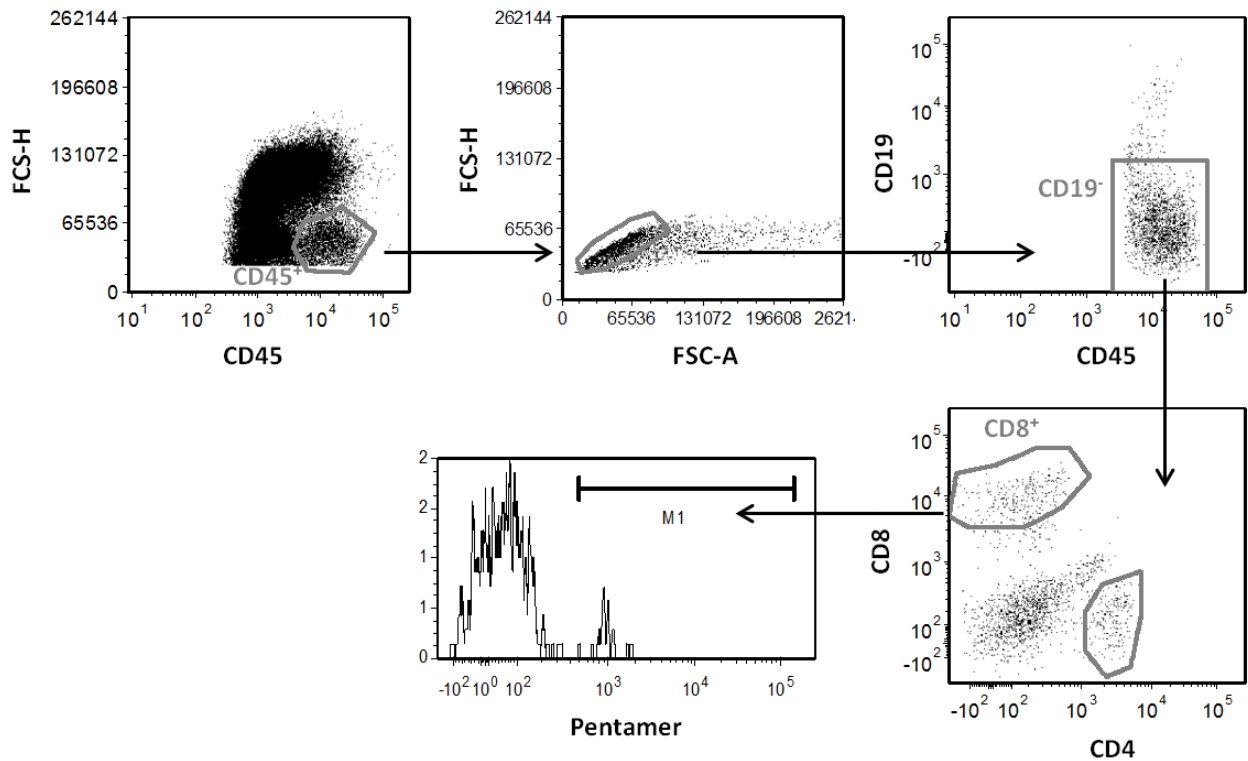
**Anhang 5: Gatingstrategie der durchflusszytometrischen Analysen für T-Zell-Populationen des Gehirns in der EZM.**

Selektion einer CD45<sup>+</sup> Zellpopulation, Ausschluss von Dubletten, Selektion von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen, Analyse der CXCR3-, CD44- und CD62L-Expression von CD8<sup>+</sup> T-Zellen (für CD4<sup>+</sup> T-Zellen analog)



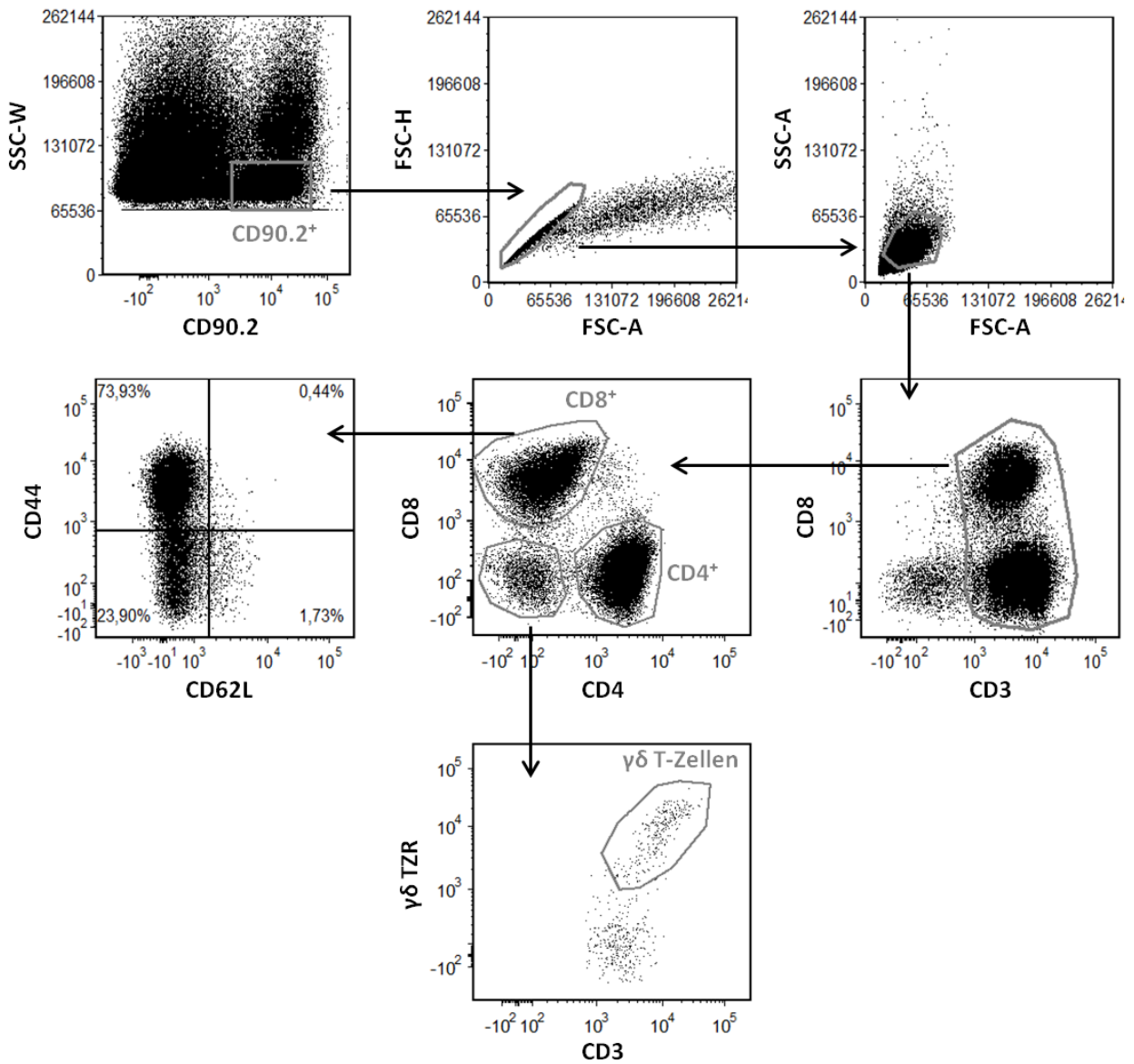
**Anhang 6: Gatingstrategie der durchflusszytometrischen Analysen für Pentamer<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen des Gehirns in der EZM.**

Selektion einer CD45<sup>+</sup> Zellpopulation, Ausschluss von Dubletten und CD19<sup>+</sup> Zellen, Selektion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus CD19<sup>-</sup> Zellen, Analyse der Pentamer<sup>+</sup> Zellen (M1)



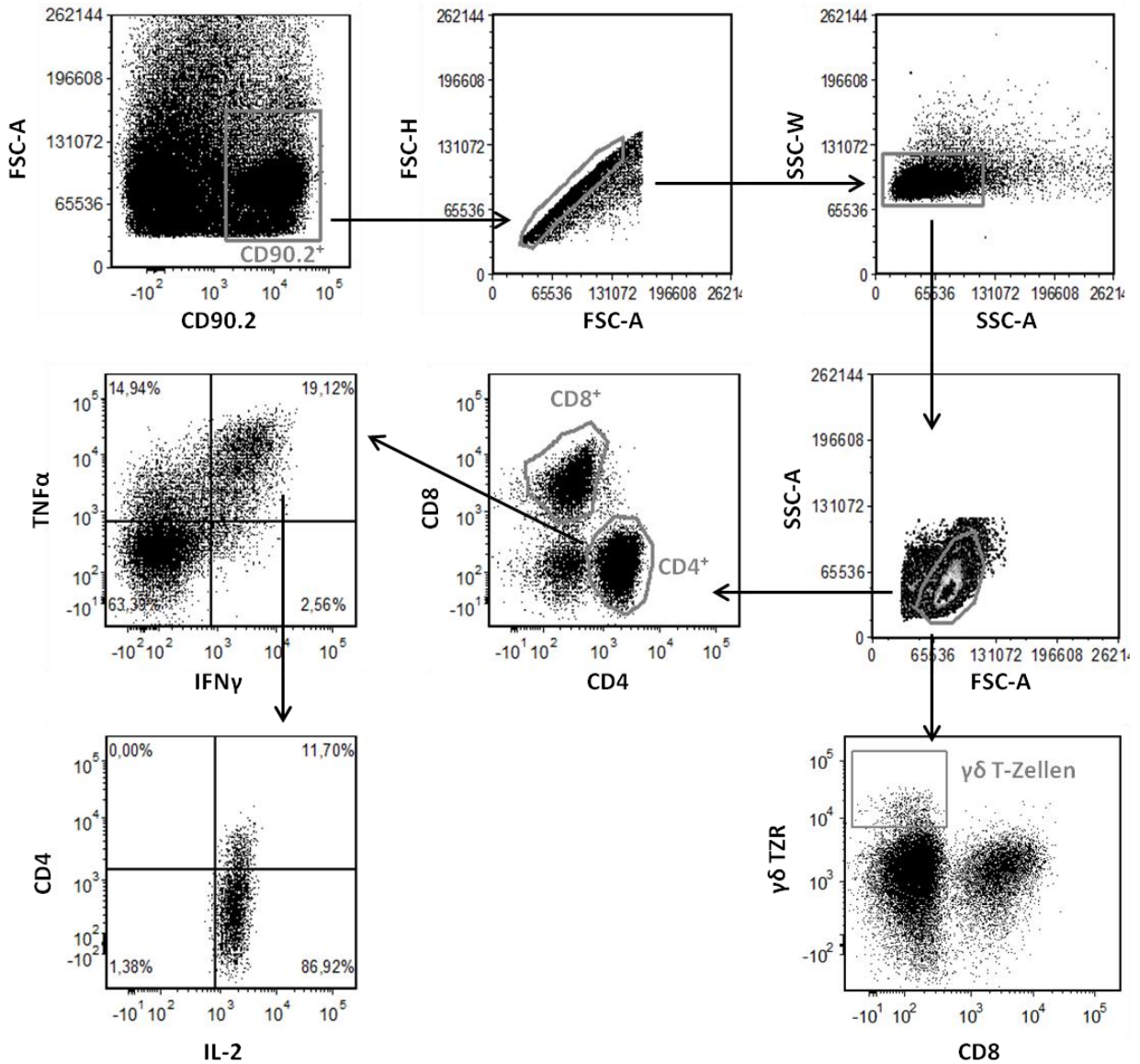
## Anhang 7: Gatingstrategie der durchflusszytometrischen Analysen für T-Zell-Populationen in der *Mtb-Py*-Koinfektion.

Selektion einer CD90.2<sup>+</sup> Zellpopulation, Ausschluss von Dubletten und Selektion von CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> und  $\gamma\delta$  T-Zellen aus CD3<sup>+</sup> Zellen, Analyse der CD44- und CD62L-Expression von CD8<sup>+</sup> T-Zellen (für CD4<sup>+</sup> und  $\gamma\delta$  T-Zellen analog)



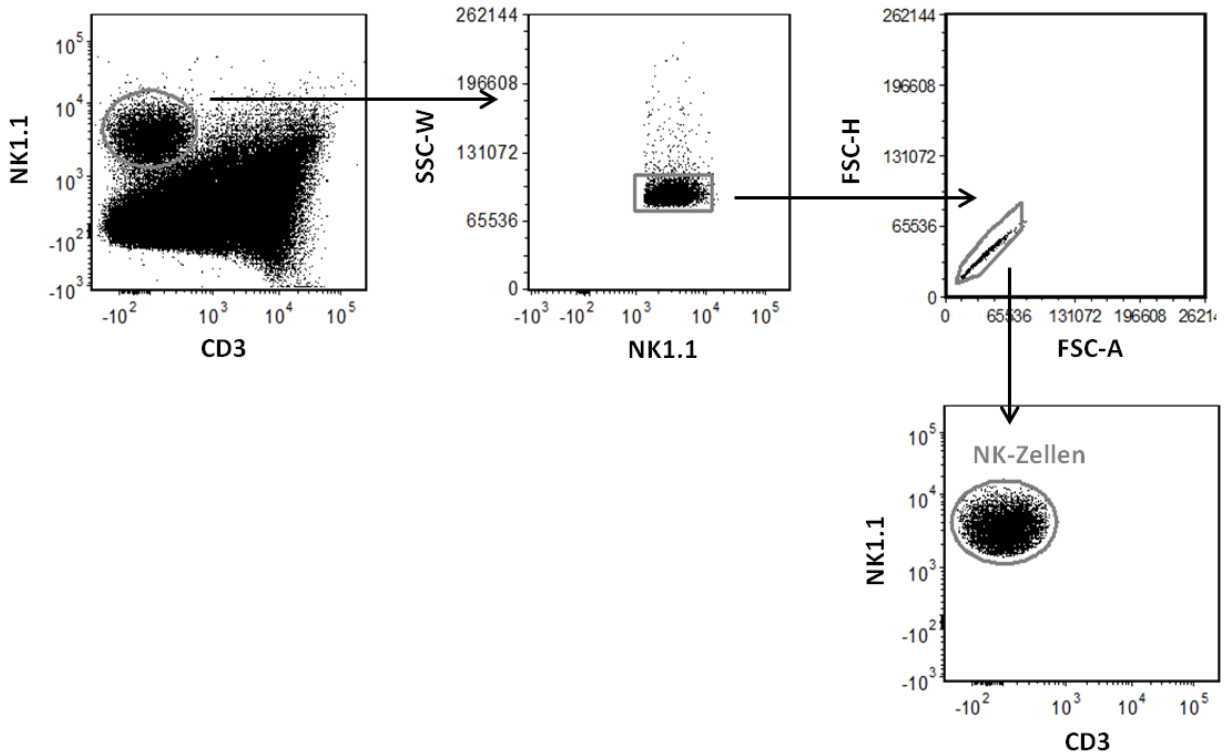
## Anhang 8: Gatingstrategie der durchflusszytometrischen Analysen für die Zytokinproduktion der T-Zellen in der *Mtb-Py*-Koinfektion.

Selektion einer CD90.2<sup>+</sup> Zellpopulation, Ausschluss von Dubletten und Selektion von CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> und  $\gamma\delta$  T-Zellen, Analyse der IFN $\gamma$ - und TNF $\alpha$ -Produktion von CD4<sup>+</sup> T-Zellen (für IL-10- und IL-17A-Produktion analog, CD8<sup>+</sup> und  $\gamma\delta$  T-Zellen analog zu CD4<sup>+</sup> T-Zellen), Analyse der IL-2-Produktion von CD4<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup>TNF $\alpha$ <sup>+</sup> T-Zellen



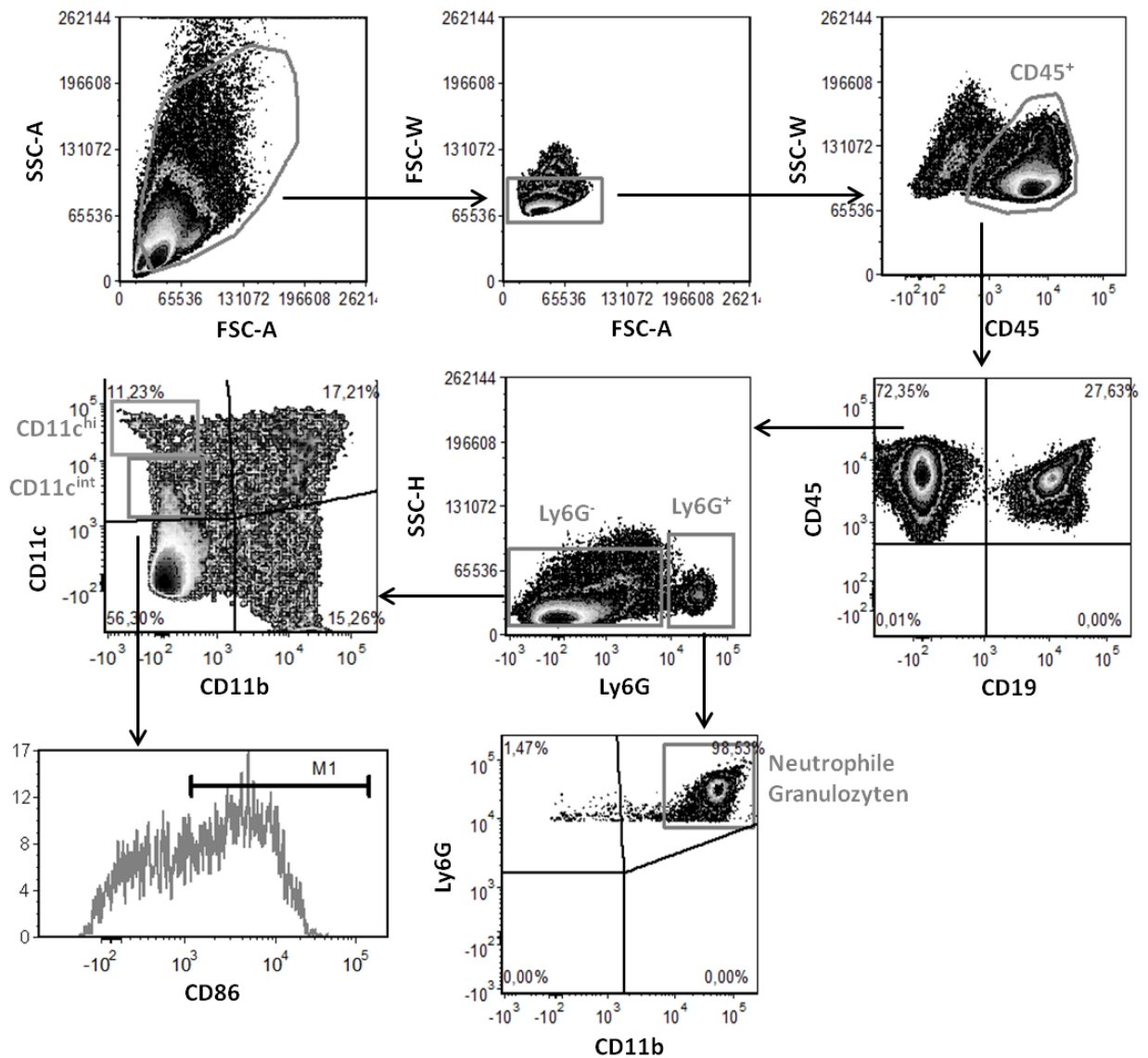
**Anhang 9: Gatingstrategie der durchflusszytometrischen Analysen für NK-Zellen**

Selektion einer  $CD3^-NK1.1^+$  Zellpopulation, Ausschluss von Dubletten, Selektion von NK-Zellen



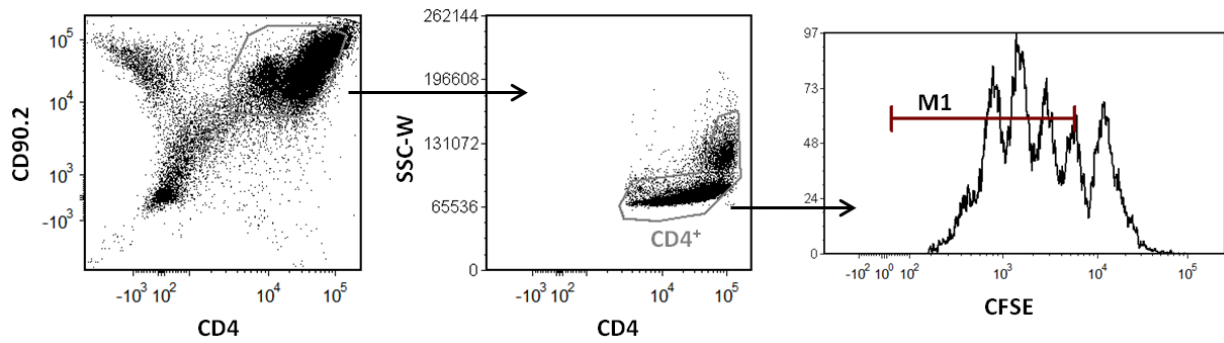
### Anhang 10: Gatingstrategie der durchflusszytometrischen Analysen für neutrophile Granulozyten und CD11c<sup>+</sup> Zellen in der *Mtb*-*Py*-Koinfektion.

Ausschluss von Dubletten und Selektion einer CD45<sup>+</sup> Zellpopulation, Ausschluss von CD19<sup>+</sup> Zellen, Selektion von neutrophilen Granulozyten aus Ly6G<sup>+</sup> Zellen, Selektion von CD11c<sup>+</sup> Zellen aus Ly6G<sup>-</sup> Zellen (CD11c<sup>int</sup> und CD11c<sup>hi</sup>), Analyse von CD86-Expression auf CD11c<sup>int</sup> Zellen (Expression von CD80 analog zu CD86; Expression von CD86 und CD80 auf CD11c<sup>hi</sup> Zellen analog zu CD11c<sup>int</sup> Zellen)



**Anhang 11: Gatingstrategie der durchflusszytometrischen Analyse für die CD4<sup>+</sup> T-Zell-Proliferation.**

Ausschluss von Dubletten und Selektion einer CD4<sup>+</sup> Zellpopulation, Analyse des CFSE-Signals der CD4<sup>+</sup> T-Zellen (M1)



## Lebenslauf



### Persönliche Daten

Vorname, Name Jannike Blank  
Geburtstag 11.02.1985  
Geburtsort Lübeck

### Berufserfahrung

11/2012 – heute Forschungszentrum Borstel, Nachwuchsgruppe Koinfektion, wissenschaftliche Mitarbeiterin/Doktorandin

- Anfertigung der Doktorarbeit mit dem Thema: *Der Verlauf einer experimentellen zerebralen Malaria und der experimentellen Tuberkulose während einer Tuberkulose-Malaria-Koinfektion*
- Einmonatiger Forschungsaufenthalt in Lissabon zur Erlernung forschungsrelevanter Methoden

### Studium und Ausbildung

10/2010 – 11/2012 Universität zu Lübeck, Master of Science in Molecular Life Science (NC 1,8)

- Masterarbeit am Forschungszentrum Borstel, Forschungsgruppe Zelluläre Mikrobiologie, unter der Anleitung von Dr. Bianca Schneider: *Etablierung eines in vitro Modells zur Untersuchung der Rolle der Autophagie in der Antigenpräsentation*

10/2007 – 09/2010 Universität zu Lübeck, Bachelor of Science in Molecular Life Science (NC 2,2)

- Bachelorarbeit an der Universität zu Lübeck, Institut für Molekulare Medizin, unter der Anleitung von Prof. Dr. Tobias Restle: *Expression, Reinigung und erste Charakterisierung der Nukleinsäurebindungseigenschaften von rekombinanten, humanen TRBP*

09/2004 – 09/2007 Ausbildung zur Augenoptikerin, Fielmann AG in Lübeck

08/1995 – 06/2004 Leibniz Gymnasium Bad Schwartau, Abitur (NC 2,1)

**Auszeichnung und Stipendien**

- 02/2016 Einwerbung eines DAAD-Reisestipendiums für Kongressreisen  
Einwerbung von Reisekostenbeihilfe bei der DGfI
- 06/2014 Einwerbung eines Böhringer Ingelheim Travel Grants für Forschungsaufenthalt  
in Lissabon
- 11/2012 Auszeichnung der Masterarbeit durch den VEIAP
- 09/2007 Auszeichnung durch Zeiss Academy für Ausbildungsabschluss als Landesbeste

## Publikationen und Kongressbeiträge

### Publikationen

Blank, J, Eggers, L, Behrends, J, Jacobs, T und Schneider, BE. One episode of self-resolving Plasmodium yoelii infection transiently exacerbates chronic Mycobacterium tuberculosis infection. Front Microbiol. 2016 Feb 15;7:152.

Blank, J, Behrends, J, Jacobs, T und Schneider, BE. Mycobacterium tuberculosis coinfection has no impact on Plasmodium berghei ANKA-induced experimental cerebral malaria in C57BL/6 mice. Infect Immun. 2015 Dec 7;84(2):502-10.

Mueller, AK, Behrends, J, Blank, J, Schaible, UE und Schneider, BE. An experimental model to study tuberculosis-malaria coinfection upon natural transmission of Mycobacterium tuberculosis and Plasmodium berghei. J Vis Exp. 2014 Feb 17;(84):e50829.

### Kongressbeiträge

März 2016: 20. Symposium "Infektion und Immunabwehr". Burg Rothenfels, Deutschland. One episode of self-resolving Plasmodium yoelii infection transiently exacerbates chronic Mycobacterium tuberculosis infection. Vortrag.

März 2016: Keystone Symposia Conference: Tuberculosis Co-Morbidities and Immunopathogenesis. Keystone, Colorado, USA. One episode of self-resolving Plasmodium yoelii infection transiently exacerbates chronic Mycobacterium tuberculosis infection. Vortrag und Posterpräsentation.

Oktober 2015: 39<sup>th</sup> Symposium of the North German Immunologists. Borstel, Deutschland. Co-infection with Plasmodium yoelii impairs control of chronic Mycobacterium tuberculosis infection. Borstel, Deutschland. Posterpräsentation mit Erhalt des Posterpreises.

Oktober 2014: 38<sup>th</sup> Symposium of the North German Immunologists. Borstel, Deutschland. Malaria-tuberculosis co-infection: Dissecting the immunological interactions during concurrent Plasmodium and Mycobacterium infection. Vortrag.

September 2014: 44<sup>th</sup> Annual Meeting of the German Society of Immunology (DGfI). Bonn, Deutschland. Mycobacterium tuberculosis co-infection exacerbates experimental cerebral malaria in C57BL/6. Posterpräsentation.

Oktober 2013: 5<sup>th</sup> Autumn School "Current Concepts in Immunology" (DGfI). Merseburg, Deutschland. Malaria-tuberculosis co-infection: Dissecting the immunological interactions during concurrent Plasmodium and Mycobacterium infection. Posterpräsentation.

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei allen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

Ich bedanke mich bei Dr. Bianca Schneider, die mir dieses interessante Projekt zur Bearbeitung zur Verfügung gestellt hat. Außerdem danke ich ihr für die zahlreichen Tipps, ihre Betreuung, Hilfe und Unterstützung, die sie mir jederzeit zukommen lassen hat. Außerdem danke ich ihr dafür, dass sie mich dabei unterstützt hat, den Forschungsaufenthalt in Lissabon und das Keystone-Meeting während meiner Doktorarbeit zu realisieren.

PD Dr. Norbert Reiling und Prof. Dr. Rudolph Manz möchte ich für die Übernahme des Erst- und Zweitgutachtens sowie Prof. Dr. Norbert Tautz für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes danken.

Meinem Zweitbetreuer PD Dr. Thomas Jacobs danke ich für die zahlreichen konstruktiven Gespräche und die Ideen, die sich daraus entwickelt haben sowie die Bereitstellung der Malariaparasiten. Ein Dankeschön auch an seine Arbeitsgruppe, die mich in der Zeit, in der ich am BNI gearbeitet habe, wunderbar aufgenommen und integriert hat.

Ein ganz besonderer Dank geht an Dr. Jochen Behrends für seine Hilfe bei diversen FACS-Fragestellungen, von der Planung über Durchführung bis hin zur Auswertung. Immer geduldig und jederzeit, wirklich jederzeit bereit!

Vielen Dank auch an meine Arbeitsgruppe Koinfektion – uns gibt es jetzt zwei Jahre und ich finde, dass wir uns zu einem super Team zusammen gefunden haben, im Labor wie auch privat. Lars war eine Riesenhilfe in vielen langen S3-Sessions (an dieser Stelle auch nochmal einen großen Dank an seine Vorgängerin Nadine). Sarah hat in der letzten Zeit mit einer Engelsgeduld gefühlt tausende von Paper für mich rausgesucht! Und Julia hat immer aufbauende Worte parat! Julia, Sarah, ihr seid mir wirklich sehr ans Herz gewachsen!

Dann geht natürlich noch ein Dank an die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ulrich Schaible, in der ich jederzeit Hilfe und Unterstützung erfahren habe. Besonders hervorheben möchte ich meine gute Freundin Maike. Über die Jahre hat sich eine wunderbare, tiefe Freundschaft entwickelt. Und du hast meine Autofahrten unglaublich bereichert! Ich drück dir für deine Arbeit ganz doll die Daumen!

Vielen Dank auch an die noch nicht Genannten, die den Arbeitsalltag bereichert haben, auf persönlicher wie auch dienstlicher Ebene.

## **Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Dissertation von mir selbstständig und ohne Zuhilfenahme weiterer als der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt wurde. Die Arbeit wurde weder zu einem früheren Zeitpunkt noch wird sie gleichzeitig an einer anderen Hochschule als der Universität zu Lübeck zur Begutachtung eingereicht. Ein Antrag zur Zulassung an einer anderen Universität wurde nicht gestellt. Dies ist mein erstes Promotionsverfahren.

Lübeck, den 25.04.2016

Jannike Blank