

Das *Cryptococcus neoformans*-assoziierte
Immunrekonstitution-Inflammationssyndrom:
Studie zur Pathogenese im Mausmodell

Der Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie
der Universität Leipzig
eingereichte

D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

Dr. rer. nat.

vorgelegt von

Diplom-Biologin Maria Eschke

geboren am 01.01.1985 in Jena

Leipzig, den 28.09.2015

Meiner Familie

Die vorliegende Dissertationsschrift wurde am Institut für Immunologie der Veterinärmedizinischen Fakultät, Universität Leipzig, unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. vet. Gottfried Alber angefertigt.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden publiziert:

Eschke M, Piehler D, Schulze B, Richter T, Grahnert A, Protschka M, Müller U, Köhler G, Höfling C, Rossner S, and Alber G. A novel experimental model of Cryptococcus neoformans-related Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome (IRIS) provides insights into pathogenesis. Eur J Immunol, 2015; Epub, ahead of print

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|--|------------|
| BIBLIOGRAPHISCHE DARSTELLUNG..... | III |
| ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS..... | IV |
| 1 EINLEITUNG..... | 1 |
| 1.1 Infektion mit <i>Cryptococcus neoformans</i> | 1 |
| 1.1.1 Epidemiologische Situation | 1 |
| 1.1.2 Immunologischer Hintergrund..... | 3 |
| 1.1.3 Maßnahmen zur Prävention und Therapie..... | 5 |
| 1.1.3.1 Probleme bei der Impfstoffentwicklung..... | 5 |
| 1.1.3.2 Antifungale Therapie | 6 |
| 1.1.3.3 Antiretrovirale Therapie (ART) | 6 |
| 1.2 Immunrestitution-Inflammationssyndrom (IRIS) | 7 |
| 1.2.1 Kryptokokken-IRIS | 8 |
| 1.3 Zielstellungen..... | 11 |
| 2 MATERIAL & METHODEN | 12 |
| 2.1 Materialien..... | 12 |
| 2.1.1 Biologisches Material | 12 |
| 2.1.1.1 Mäuse | 12 |
| 2.1.1.2 <i>C. neoformans</i> | 12 |
| 2.1.2 Chemikalien..... | 13 |
| 2.1.3 Verbrauchsmaterialien..... | 13 |
| 2.1.4 Geräte..... | 14 |
| 2.2 Methoden | 15 |
| 2.2.1 Infektion der Mäuse mit <i>C. neoformans</i> | 15 |
| 2.2.2 Blutentnahme und Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) | 15 |
| 2.2.3 Isolierung von Splenozyten | 17 |
| 2.2.4 Bestimmung der Zellzahl..... | 17 |
| 2.2.5 Sortierung von CD4 ⁺ T-Zellen mittels <i>Magnetic-Cell-Sorting</i> (MACS) | 18 |
| 2.2.6 Adoptiver Zelltransfer | 18 |
| 2.2.7 Bestimmung der Organlast und Isolierung von Leukozyten aus Gehirn und Lunge | 19 |
| 2.2.8 Durchflusszytometrie..... | 21 |
| 2.2.8.1 Oberflächenfärbung..... | 21 |
| 2.2.8.2 Intrazelluläre Färbung | 22 |
| 2.2.8.3 Durchflusszytometrische Messung und Auswertung | 23 |
| 2.2.8.4 Sortierung von Mikrogliazellen mittels FACSria TM III..... | 24 |

| | | |
|------------|---|-------------|
| 2.2.9 | Histologie..... | 24 |
| 2.2.10 | Bestimmung der Serum-Zytokinkonzentration mittels <i>Multiplex-Immunoassay</i> | 26 |
| 2.2.11 | Quantitative Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)..... | 27 |
| 2.2.12 | Statistische Auswertung..... | 28 |
| 3 | ERGEBNISSE | 29 |
| 3.1 | Etablierung eines Kryptokokken-IRIS-Mausmodells | 29 |
| 3.1.1 | Der Transfer von Milzzellen induziert ein charakteristisches IRIS-Krankheitsbild in <i>C. neoformans</i> -infizierten RAG-1 ^{-/-} Mäusen | 29 |
| 3.1.2 | Die Rekonstitution mit CD4 ⁺ T-Zellen reicht aus, um infektionsabhängig eine systemische Entzündung hervorzurufen | 31 |
| 3.2 | Funktionelle Analysen im Kryptokokken-IRIS-Mausmodell | 35 |
| 3.2.1 | Die Entzündung im Gehirn <i>C. neoformans</i> -infizierter RAG-1 ^{-/-} CD4 ⁺ T-Zell-Rezipienten ist durch die Aktivierung von Mikrogliazellen und die Rekrutierung von Donor-CD4 ⁺ T-Zellen gekennzeichnet | 35 |
| 3.2.2 | Donor-CD4 ⁺ T-Zellen werden in <i>C. neoformans</i> -infizierten RAG-1 ^{-/-} Mäusen aktiviert und sind die Quelle von IFN- γ | 39 |
| 3.2.3 | Kryptokokken-IRIS kann IFN- γ -unabhängig induziert werden | 42 |
| 4 | DISKUSSION..... | 46 |
| 4.1 | Etablierung eines Mausmodells für Kryptokokken-IRIS | 46 |
| 4.2 | Charakterisierung des Kryptokokken-IRIS-Mausmodells..... | 47 |
| 4.2.1 | Zentrale Rolle von CD4 ⁺ T-Zellen..... | 47 |
| 4.2.2 | Infektionsabhängigkeit der IRIS-Induktion | 47 |
| 4.2.3 | Potentielle Zytokinmediatoren..... | 48 |
| 4.2.4 | IFN- γ -unabhängige Induktion von Kryptokokken-IRIS..... | 51 |
| 4.3 | Limitationen des Kryptokokken-IRIS-Mausmodells..... | 53 |
| 4.4 | Ausblick | 54 |
| 5 | ZUSAMMENFASSUNG..... | 55 |
| 6 | SUMMARY | 57 |
| 7 | LITERATURVERZEICHNIS | 59 |
| 8 | DANKSAGUNG..... | VI |
| 9 | SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG | VII |
| 10 | WISSENSCHAFTLICHER WERDEGANG..... | VIII |
| 11 | PUBLIKATIONSLISTE..... | X |

BIBLIOGRAPHISCHE DARSTELLUNG

Maria Eschke

Das *Cryptococcus neoformans*-assoziierte Immunrekonstitution-Inflammationssyndrom: Studie zur Pathogenese im Mausmodell

Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie

Universität Leipzig

Dissertation

72 Seiten, 142 Literaturangaben, 15 Abbildungen, 6 Tabellen

Ein gravierendes medizinisches Problem bei der Behandlung von immunsupprimierten Patienten besteht darin, dass die Wiederherstellung des Immunsystems im Zusammenhang mit einer *Cryptococcus neoformans*-Infektion zur Entwicklung eines lebensbedrohlichen Immunrekonstitution-Inflammationssyndroms (Kryptokokken-IRIS) führen kann. Die Mechanismen, die dem charakteristischen unkontrollierten Entzündungsgeschehen zugrunde liegen, sind unbekannt. Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde das erste Tiermodell für Kryptokokken-IRIS etabliert, das eine systematische Untersuchung der Krankheitsentstehung ermöglicht. Dazu wurden Lymphozyten-defiziente RAG-1^{-/-} Mäuse mit *C. neoformans* infiziert und vier Wochen später durch adoptiven Zelltransfer immunrekonstituiert. Der alleinige Transfer von CD4⁺ T-Zellen induzierte eine für Kryptokokken-IRIS charakteristische granulomatöse Entzündung sowie die systemische Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine Interleukin (IL)-12p70, Interferon (IFN)- γ , IL-6 und Tumornekrosefaktor (TNF)- α . Das Entzündungsgeschehen war mit der Aktivierung von Mikrogliazellen und der verstärkten Rekrutierung der Donor-CD4⁺ T-Zellen ins Gehirn assoziiert. Die CD4⁺ T-Zellen wurden in *C. neoformans*-infizierten RAG-1^{-/-} Rezipienten infektionsabhängig aktiviert und konnten als Quelle von IFN- γ identifiziert werden. Ferner konnte gezeigt werden, dass IFN- γ für die Induktion von Kryptokokken-IRIS nicht entscheidend ist. Damit hat das hier etablierte Kryptokokken-IRIS-Mausmodell bereits wichtige Erkenntnisse bezüglich zellulärer und molekularer Mediatoren erbracht. In weiterführenden Studien kann es dazu beitragen, neue Therapieansätze zu entwickeln und zu erproben.

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------------|---|
| Abb. | Abbildung |
| °C | Grad Celsius |
| AIDS | engl. <i>acquired immunodeficiency syndrome</i> |
| APC | Allophycocyanin |
| ART | antiretrovirale Therapie |
| BSA | engl. <i>bovine serum albumin</i> |
| CD | engl. <i>cluster of differentiation</i> |
| cDNA | engl. <i>complementary DNA</i> |
| C3 | Komplementfaktor 3 |
| CO ₂ | Kohlendioxid |
| CR | engl. <i>complement receptor</i> |
| CSF | Cerebrospinalflüssigkeit |
| CTL | engl. <i>cytotoxic T lymphocyte</i> |
| Cy | Cyanin |
| DC | engl. <i>dendritic cell</i> |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| DNA | engl. <i>desoxyribonucleic acid</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| ELISA | engl. <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> |
| FACS | engl. <i>fluorescence-activated-cell-sorting</i> |
| Fc | engl. <i>fragment cristallizable</i> |
| FELASA | engl. <i>federation of laboratory animal science associations</i> |
| FITC | Fluoresceinisothiocyanat |
| FKS | fetales Kälberserum |
| FSC | engl. <i>forward scatter channel</i> |
| GXM | Glucuronoxylomannan |
| h | Stunde |
| HBSS | engl. <i>Hank's balanced salt solution</i> |
| HEPES | 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny-ethansulfonsäure |
| HIV | Humanes Immundefizienz-Virus |
| HPRT | Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase |
| HRP | engl. <i>horseradish peroxidase</i> |
| H&E | Hämatoxylin- und Eosin |
| IFN | Interferon |
| IL | Interleukin |
| IMDM | engl. <i>Iscove's modified Dulbecco's medium</i> |
| i.n. | intranasal |

| | |
|--------------------|--|
| iNOS | engl. <i>inducible nitric oxide synthase</i> |
| i.p. | intraperitoneal |
| IP-10 | IFN- γ -induziertes Protein 10 |
| IRIS | engl. <i>immune reconstitution inflammatory syndrome</i> |
| KbE | Kolonie-bildende Einheiten |
| KGW | Körpergewicht |
| MACS | engl. <i>magnetic-cell-sorting</i> |
| MHC | engl. <i>major histocompatibility complex</i> |
| min | Minute |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NaHCO ₃ | Natriumhydrogencarbonat |
| NK-Zelle | Natürliche Killerzelle |
| NO | Stickstoffmonoxid |
| PBS | engl. <i>phosphate-buffered saline</i> |
| PBS-T | PBS-Tween |
| PAMPs | engl. <i>Pathogen-associated molecular patterns</i> , |
| PCR | engl. <i>polymerase chain reaction</i> |
| PE | Phycoerythrin |
| PerCP | Peridinin-Chlorophyll-Protein |
| PRR | engl. <i>pattern recognition receptor</i> |
| RAG-1 | Rekombination-aktivierendes Gen 1 |
| RNA | engl. <i>ribonucleic acid</i> |
| ROS | engl. <i>reactive oxygen species</i> |
| RPMI | engl. <i>Roswell Park Memorial Institute</i> |
| RT-qPCR | reverse Transkription and quantitative PCR |
| SA | Streptavidin |
| SAB | Sabouraud |
| sek | Sekunde |
| SSC | engl. <i>side scatter channel</i> |
| Tab. | Tabelle |
| Th-Zelle | T-Helferzelle |
| TNF | Tumornekrosefaktor |
| TLR | engl. <i>Toll-like receptor</i> |
| WT | Wildtyp |
| ü.N. | über Nacht |
| v/v | engl. <i>volume per volume</i> |
| w/v | engl. <i>weight per volume</i> |
| ZNS | Zentralnervensystem |

1 EINLEITUNG

Ein intaktes Immunsystem ist für die Abwehr von Infektionen essentiell. Bei höheren Wirbeltieren gewährleistet das koordinierte Zusammenspiel der angeborenen und adaptiven Immunabwehr den Schutz vor einer Vielzahl unterschiedlicher Krankheitserreger. Lebensbedrohliche systemische Pilzinfektionen treten vor allem bei Patienten mit einem geschwächten Immunsystem auf. Sie werden deshalb auch als sekundäre oder opportunistische Mykosen bezeichnet. In den letzten drei Jahrzehnten ist die Zahl an schweren invasiven Mykosen aufgrund der zunehmenden Anzahl an Patienten mit Immundefekten stark angestiegen^{1,2}. Ursächlich sind der verstärkte Einsatz immunsupprimierender Therapien bei der Behandlung von Krebs- und Transplantatpatienten sowie die durch das Humane Immunschwäche-Virus (HIV) hervorgerufene AIDS-Pandemie. In diesem Zusammenhang stellt die Kryptokokkose eine bedeutende systemische Mykose dar.

1.1 INFEKTION MIT *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS*

1.1.1 Epidemiologische Situation

Der einzellige bekapselte Basidiomycet *Cryptococcus neoformans* ist ubiquitär in der Umwelt verbreitet³. Die Infektion erfolgt aerogen durch Inhalation von Sporen oder ausgetrockneten Pilzzellen, die z.B. in kontaminierten Böden oder Pflanzen vorhanden sind⁴ (siehe Abb. 1). Ein natürliches Reservoir in urbanen Regionen stellt Taubenkot dar^{5,6,7}. In gesunden Individuen etabliert sich in der Regel eine symptomlose aber persistierende Infektion in der Lunge^{8,9}. Infolge einer Schwächung des Immunsystems kommt es zur Reaktivierung der Infektion mit schwerwiegenden Folgen¹⁰. So kann die unkontrollierte Vermehrung von *C. neoformans* in der Lunge eine Pneumonie induzieren. Zudem ist der Erreger dazu in der Lage über das Blut in andere Organe zu disseminieren. Dabei weist er einen Neurotropismus auf¹¹, der in einer lebensbedrohlichen Hirnhautentzündung resultieren kann. Die Kryptokokkenmeningitis stellt die häufigste Manifestation und Haupttodesursache einer *C. neoformans*-Infektion bei immunsupprimierten Individuen dar¹².

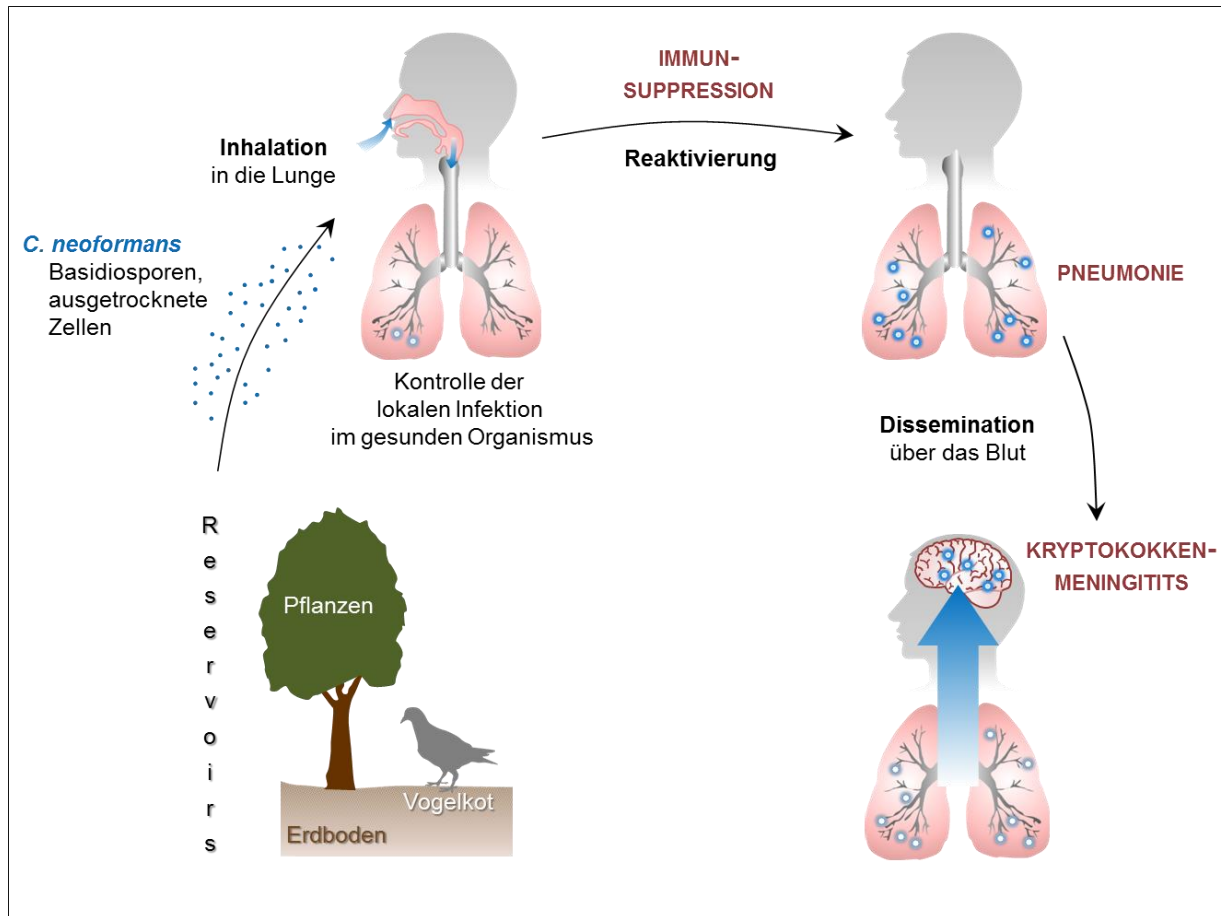


Abb. 1: Der Infektionsweg von *Cryptococcus neoformans*. Infektiöse Partikel von *C. neoformans*, die ubiquitär in kontaminierten Böden sowie Pflanzen vorkommen, gelangen durch Inhalation in die Lunge. In gesunden Individuen entwickelt sich daraufhin i.d.R. eine asymptomatische persistierende lokale Infektion. Infolge einer Immunsuppression kommt es jedoch zur Reaktivierung. Die unkontrollierte Vermehrung des Erregers in der Lunge kann eine Pneumonie hervorrufen. Außerdem ist *C. neoformans* in immunsupprimierten Individuen dazu in der Lage, in das Gehirn zu disseminieren und eine lebensbedrohliche Kryptokokkenmeningitis zu induzieren. (modifiziert nach¹³)

Insbesondere in Entwicklungsländern stellt die Kryptokokkose ein gravierendes medizinisches Problem dar. Der Hauptrisikofaktor ist die Infektion mit HIV, die für 95% der Fälle verantwortlich ist¹⁴. In afrikanischen Ländern südlich der Sahara infizieren sich jährlich mehr als 1.000.000 HIV-Patienten neu mit *C. neoformans* und über 600.000 Menschen sterben an den Folgen einer Kryptokokkenmeningitis¹⁵. Auch in Industrieländern ist eine systemische Kryptokokkeninfektion in 80% der Fälle mit HIV assoziiert¹⁶. Der übrige Teil der Fälle steht überwiegend mit immunsupprimierenden Therapien in Zusammenhang, die beispielsweise im Rahmen einer Transplantation Anwendung finden¹⁷.

1.1.2 Immunologischer Hintergrund

Eine schützende Immunantwort gegen den fakultativ intrazellulären Erreger *C. neoformans* in immunkompetenten Individuen hängt entscheidend von der Induktion der zellulären Immunität ab, die über T-Helferzellen vom Typ 1 (Th1-Zellen) vermittelt wird¹⁸. Sie beruht auf dem koordinierten Zusammenspiel von Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems (siehe Abb. 2). Infolge einer Infektion werden konservierte Pilzstrukturen (*Pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) von *C. neoformans* durch Mustererkennungsrezeptoren (*Pattern-Recognition Receptors*, PRRs) auf Zellen des angeborenen Immunsystems erkannt². Die *Toll-like* Rezeptoren (TLR)-2^{19,20} und TLR4²¹ erkennen den Hauptkapselbestandteil Glucuronoxylomannan (GXM), während TLR9 durch CpG-reiche DNA von *C. neoformans* aktiviert wird²². Mannoserezeptoren binden an Mannoproteine der Polysaccharidkapsel²³ und C-Typ-Lectin-Rezeptoren (CLR) an die Zellwandkomponenten β -Glukan^{24,25,26} und Mannan²⁷. Außerdem können Faktoren der Komplementkaskade wie C3²⁸ sowie Antikörper²⁹ an die Kapsel von *C. neoformans* binden und diese opsonisieren. Nach Erkennung über Komplement-³⁰ bzw. Fc-Rezeptoren^{31,29} können entsprechend markierte Erreger von Phagozyten effektiv aufgenommen werden. Dendritische Zellen (DCs) spielen eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der adaptiven Immunantwort gegen *C. neoformans*³². Infolge der Erkennung und Aufnahme des Pilzes wandern sie in drainierende Lymphknoten, um naiven T-Zellen prozessierte Antigene des aufgenommenen Pilzes zu präsentieren^{33,34,35}. Im Rahmen einer protektiven Immunantwort sezernieren die DCs dabei das Zytokin Interleukin (IL)-12, das die Differenzierung von naiven CD4⁺ T-Zellen zu Th1-Zellen induziert^{36,37,38}. Th1-Zellen produzieren Interferon (IFN)- γ , das insbesondere durch die klassische Aktivierung von Makrophagen entscheidend zur Kontrolle von *C. neoformans* beiträgt^{39,40,41,42}. Klassisch-aktivierte Makrophagen bilden reaktive Stickstoff- und Sauerstoffintermediate, die als antifungale Effektorsubstanzen wirken^{43,44,45,46}. In der Anwesenheit von IFN- γ produzieren Makrophagen außerdem verstärkt den Tumornekrosefaktor (TNF)- α ⁴⁷, der ein weiteres wichtiges Effektorzytokin im Rahmen einer schützenden Th1-Immunantwort gegen *C. neoformans* darstellt^{48,49}. Des Weiteren induziert IFN- γ die Ausdifferenzierung von CD8⁺ T-Zellen zu zytotoxischen T-Zellen, die dazu in der Lage sind z.B. durch Ausschüttung von Perforin und Granzymen infizierte Zellen zu eliminieren^{50,51}. Auch natürliche Killerzellen (NK-Zellen) können infolge ihrer Aktivierung

über IL-12/IFN- γ lytischen Granulainhalt freisetzen und den Erreger direkt abtöten^{52,53}. Zudem fördert IFN- γ die Phagozytose von *C. neoformans* durch Zellen des angeborenen Immunsystems^{54,55}.

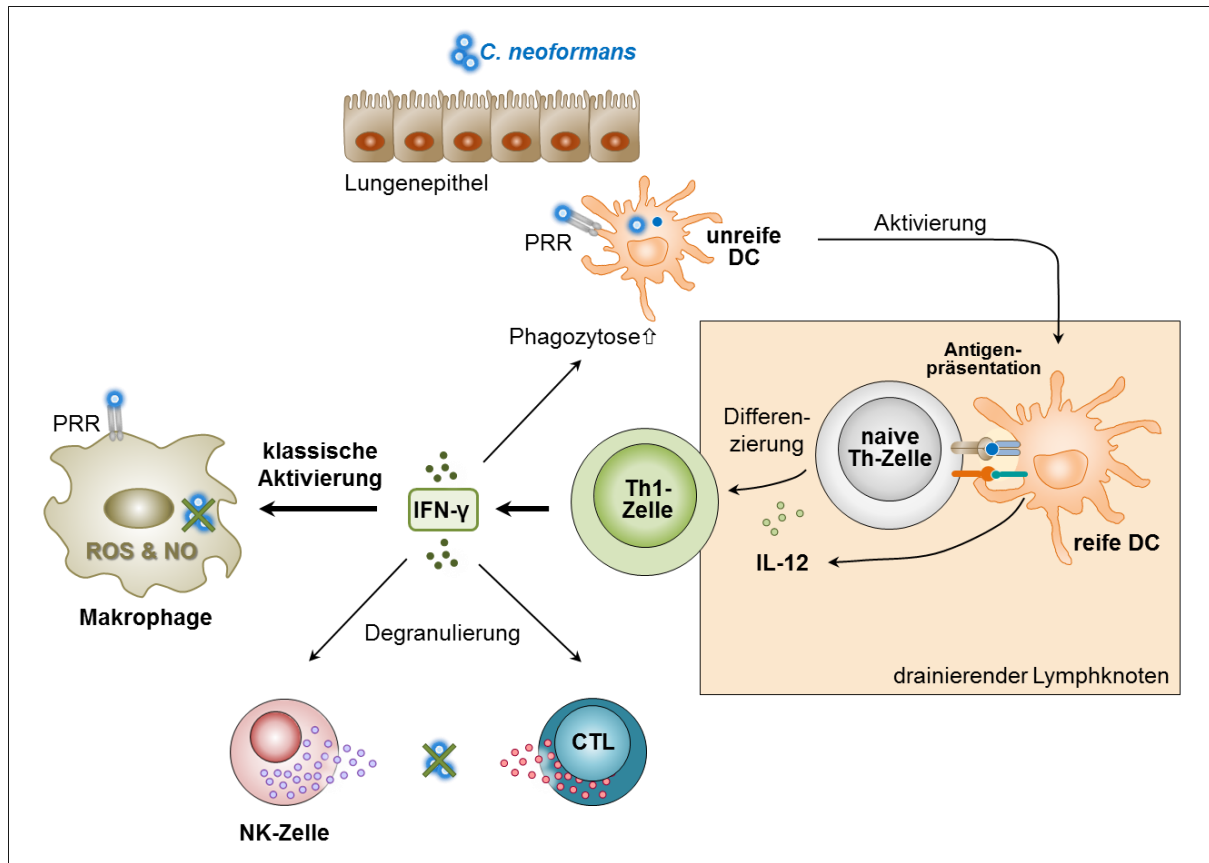


Abb. 2: Vereinfachte Darstellung der schützenden Immunantwort gegen *C. neoformans*. Gelingt es *C. neoformans*, ins Lungengewebe einzudringen, wird er von dendritischen Zellen (DCs) erkannt und aufgenommen. Dadurch wird die Reifung der DCs aktiviert, die in drainierende Lymphknoten wandern, um naiven T-Helfer (Th)-Zellen Kryptokokken-Antigene zu präsentieren. Die Sekretion von Interleukin (IL)-12 durch DCs regt die Differenzierung von Th1-Zellen an, die das zentrale Zytokin Interferon (IFN)- γ freisetzen. IFN- γ induziert die klassische Aktivierung von Makrophagen, die durch die Produktion von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies *C. neoformans* abtöten können. Auch die Degranulation von Natürlichen Killer (NK)-Zellen und zytotoxischen T-Zellen (CTL), die ebenfalls über IFN- γ vermittelt wird, wirkt antifungal. Schließlich fördert IFN- γ die Phagozytose von *C. neoformans* durch Zellen des angeborenen Immunsystems. PRR: *pattern recognition receptor*, ROS: *reactive oxygen species*, NO: Stickstoffmonoxid.

In immunkompetenten Individuen wirkt die Induktion einer Th1-Zell-assoziierten zellulären Immunantwort protektiv gegen *C. neoformans*, obwohl sie nicht zur sterilen Elimination des Erregers führt⁸. Eine Th2-Zell-dominierte Immunreaktion, bei der unter dem Einfluss von IL-4 und IL-13 alternativ aktivierte Makrophagen entstehen, ist hingegen mit einer unkontrollierten Vermehrung und der Dissemination von *C. neoformans* assoziiert^{56,57,58}. Im Verlauf einer

HIV-Infektion kommt es, zusätzlich zur Reduktion der Th-Zellen im Allgemeinen, zu einer Verschiebung der T-Helferzellantwort hin zu Th2^{8,59}. Die IL-12-Produktion ist reduziert⁶⁰ und die antifungale Kapazität von Lymphozyten und Phagozyten beeinträchtigt⁶¹. Durch die geschwächte Th1-Immunantwort bricht der Schutz vor einer unkontrollierten Vermehrung von *C. neoformans* zusätzlich zusammen.

1.1.3 Maßnahmen zur Prävention und Therapie

1.1.3.1 Probleme bei der Impfstoffentwicklung

Bis heute gibt es keinen Impfstoff gegen *C. neoformans*. Eine entscheidende Limitation bei der Entwicklung einer effektiven Vakzine besteht darin, dass eine zelluläre Immunität induziert werden muss, die auch nach Immunsuppression, z.B. in HIV-Patienten mit CD4⁺ T-Zelldefekten, aufrecht erhalten bleibt⁶². Klassische Vakzinierungsstrategien zielen auf die Induktion einer protektiven Antikörperantwort ab. Antikörper allein sind jedoch nicht dazu in der Lage, einen dauerhaften Schutz gegen den fakultativ intrazellulären Erreger *C. neoformans* herzustellen¹. Eine Möglichkeit könnte die Aktivierung einer spezifischen CD8⁺ T-Zellimmunantwort darstellen. Es konnte gezeigt werden, dass CD8⁺ T-Zellen über einen IFN- γ -abhängigen Mechanismus z.T. den Verlust von CD4⁺ T-Zellen kompensieren können⁶³. Eine weitere Strategie könnte in der Induktion einer sogenannten trainierten angeborenen Immunantwort bestehen. Der Begriff trainierte Immunität wurde für Makrophagen und NK-Zellen geprägt, die bei wiederholtem Kontakt mit einem Antigen eine verbesserte Immunreaktion aufweisen^{64,65}. Allerdings sind weitere Untersuchungen notwendig, um Aussagen über die Langlebigkeit der trainierten Immunität treffen zu können⁶². Der IFN- γ -produzierende Kryptokokkenstamm H99 γ ⁶⁶ hat im Tiermodell vielversprechende Ergebnisse erbracht, da er auch in CD4⁺ T-Zell-defizienten Mäusen eine langanhaltende protektive Immunität induziert⁶⁷. Eine Limitation könnte hierbei darin bestehen, dass ein Impfstoff idealerweise Schutz gegen verschiedene Kryptokokkenstämme bieten müsste. Aufgrund des geringen wirtschaftlichen Interesses gibt es aktuell keine klinischen Studien zu potentiellen Vakzinierungskandidaten gegen *C. neoformans*¹.

1.1.3.2 Antifungale Therapie

Nach den Richtlinien der *World Health Organization* (WHO) sollte nach Diagnose einer Kryptokokkose eine antifungale Therapie erfolgen, die die drei Phasen Induktion, Konsolidierung und Erhaltung umfasst⁶⁸. Der Einsatz potenter fungizider Medikamente in der 14-tägigen Induktionsphase ist entscheidend für den weiteren Krankheitsverlauf. Empfohlen wird die Kombination von Amphotericin B (1 mg/kg KGW/d, intravenös) und Flucytosin (100 mg/kg KGW/d, intravenös oder oral)⁶⁸. Das Polyen Amphotericin B induziert die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies in *C. neoformans*⁶⁹ und schädigt die Zellmembran durch Anlagerung an Ergosterol⁷⁰, während das Nukleosidanalogen Flucytosin die DNA-Synthese hemmt⁷¹. Allerdings stellt die Nephrotoxizität eine schwerwiegende Nebenwirkung von Amphotericin B dar⁷². Formulierungen, wie z.B. liposomales Amphotericin B oder Amphotericin B Lipid-Komplex, die weniger nierenschädigend wirken^{73,74}, sind mit hohen Kosten verbunden (über 1.000 \$ pro Tag⁷⁵) und stehen in Entwicklungsländern nicht zur Verfügung¹⁷. Ein weiteres Problem besteht darin, dass Flucytosin in vielen Ländern der Dritten Welt nicht zugelassen ist^{76,77}. In diesem Fall sollte das Fungistatikum Fluconazol, das die Ergosterolbiosynthese hemmt⁷⁸, bereits während der Induktionstherapie eingesetzt werden⁶⁸. Idealerweise ist Fluconazol erst im Rahmen der 8-wöchigen Konsolidierungsphase vorgesehen (400 mg/Tag). Um das Risiko eines Rückfalls zu minimieren, wird im Anschluss eine Erhaltungstherapie mit Fluconazol empfohlen (200 mg/Tag)⁶⁸. In den letzten Jahren wurde jedoch insbesondere in Entwicklungsländern das vermehrte Auftreten von Resistenzen gegen Fluconazol beobachtet^{79,80}. Aufgrund der zentralen Rolle von IFN- γ in der Induktion einer protektiven Immunantwort gegen *C. neoformans*¹⁸ (siehe Abb. 2) wurde in klinischen Studien untersucht, ob sich die Gabe von IFN- γ über einen kurzen Zeitraum im Rahmen der klassischen antifungalen Induktionstherapie positiv auswirkt^{81,82}. Tatsächlich fördert exogenes IFN- γ die frühe fungizide Aktivität. Allerdings war die verbesserte Erregerkontrolle nicht mit gesteigerten Überlebensraten verbunden.

1.1.3.3 Antiretrovirale Therapie (ART)

Das höchste Risiko einer Kryptokokkose besteht bei HIV-Patienten mit CD4⁺ T-Zell-Zahlen unter 100 Zellen/ μ l Blut⁸³. Dementsprechend begann die Inzidenz in Industrieländern nach Einführung der effektiven kombinierten antiretroviralen Therapie (ART) ab Mitte der 1990er

Jahre zu sinken^{17,84,17}. ART führt zur Inhibition der Replikation von HIV und damit einhergehend zur Immunrekonstitution durch die Wiederherstellung normaler CD4⁺ T-Zell-Zahlen. Der frühe Einsatz von ART sowie die Verfügbarkeit wirksamer fungizider Medikamente sind in Industrieländern mit einer sinkenden Mortalitätsrate von HIV-Patienten verbunden¹⁷. In Entwicklungsländern ist die Sterblichkeit trotz zunehmendem Einsatz der ART aber nach wie vor hoch^{85,86}. Zudem stellt das Immunrekonstitution-Inflammationssyndrom (IRIS) eine schwerwiegende Komplikation der ART dar.

1.2 IMMUNREKONSTITUTION-INFLAMMATIONSSYNDROM (IRIS)

Bei einem erheblichen Anteil der HIV-Patienten mit einer opportunistischen Koinfektion tritt im Rahmen der ART eine lebensbedrohliche Entzündungsreaktion auf, die als Immunrekonstitution-Inflammationssyndrom (IRIS) bezeichnet wird⁸⁷ (siehe Abb. 3).

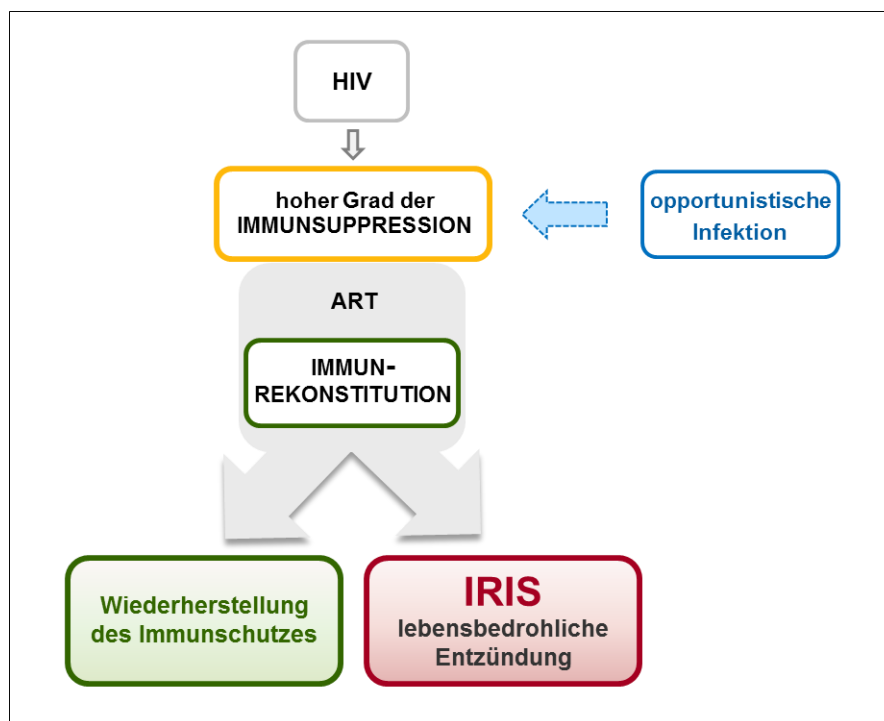


Abb. 3 Schematische Darstellung der IRIS-Entstehung. Individuen mit einem geschwächten Immunsystem, wie z.B. Patienten, die mit dem Humanen Immundefizienz-Virus (HIV) infiziert sind, sind sehr anfällig gegenüber opportunistischen Infektionen. Die antiretrovirale Therapie (ART) führt in HIV-Patienten durch die Normalisierung der CD4⁺ T-Zell-Zahl zur Immunrekonstitution. In vielen Fällen wird dadurch der Immunschutz gegenüber opportunistischen Infektionen wiederhergestellt. Bei einem erheblichen Anteil der HIV-Patienten mit einer opportunistischen Koinfektion kommt es jedoch nach Beginn der ART zur Ausbildung eines lebensbedrohlichen Entzündungsgeschehens, dem sogenannten Immunrekonstitution-Inflammationssyndrom (IRIS).

IRIS kann mit verschiedenen Erregern assoziiert sein, die infolge einer zellulären Immundefizienz eine opportunistische Infektion auslösen können⁸⁷. Die Diagnostik wird dadurch erschwert, dass die Symptome, abhängig von der opportunistischen Infektion, sehr unterschiedlich sind (siehe Tab.1). Die Mortalitätsrate von *Mycobacterium tuberculosis*-assoziiertem IRIS liegt bei ca. 3%, während im Fall von *Cryptococcus neoformans*-assoziiertem IRIS über 20% der Patienten aufgrund der Entwicklung einer Meningitis sterben⁸⁸. IRIS kann nicht nur durch die Rekonstitution von CD4⁺ T-Zellen ausgelöst werden, sondern wurde beispielsweise bei der Infektion mit *Pneumocystis jirovecii* auch im Rahmen der Wiederherstellung einer normalen Anzahl neutrophiler Granulozyten nach einer Neutropenie beobachtet⁸⁹.

Tab. 1: Infektionserreger, die häufig mit IRIS assoziiert sind

| Erreger | Inzidenz | Klinische IRIS-Manifestationen | Ref |
|-----------------------------------|----------|--|--------------------|
| bakteriell | | | |
| <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | 20-25% | Pneumonie, Lymphadenitis, ZNS-Läsionen | 90,91,92 |
| <i>Mycobacterium avium</i> | 4% | Lymphadenitis, Fieber, Hautläsionen | 92,93 |
| fungale | | | |
| <i>Cryptococcus neoformans</i> | 20-25% | Meningitis , Lymphadenitis, Pneumonie, Choreoretinitis, Läsionen von Haut, Knochen und Gelenken | 86,87,94, 95,88,89 |
| <i>Pneumocystis jirovecii</i> | 4% | Pneumonie | 96,97 |
| viral | | | |
| Cytomegalievirus | 38% | Retinitis, Uveitis | 87,88 |
| Varizella-Zoster-Virus | 12% | Herpes Zoster, Myelitis | 88,98 |
| Humanes Polyomavirus 2 | 17% | Progressive multifokale Leukenzephalopathie | 99 |

1.2.1 Kryptokokken-IRIS

Kryptokokken-IRIS stellt ein immunpathologisches entzündliches Geschehen mit hoher Morbidität und Mortalität dar, das in der Regel wenige Wochen bis Monate nach ART-Beginn in HIV-Patienten auftritt^{100,101}. Zwei klinische Szenarien wurden dabei beschrieben: Während „demaskierendes“ IRIS eine subklinische Kryptokokkeninfektion zum Vorschein bringt, die vor Beginn der ART nicht diagnostiziert wurde, tritt „paradoxes“ IRIS nach augenscheinlich erfolgreicher antifungaler Therapie im Rahmen der ART auf und äußert sich in der Regel als

aseptische Meningitis⁹⁴ (siehe Abb.4). Diese beruht wahrscheinlich auf dem Vorhandensein von Kryptokokken-Antigen-Depots¹⁰². Demaskierendes Kryptokokken-IRIS kann verhindert werden, indem Patienten vor Beginn der ART auf das Vorhandensein des Erregers getestet und gegebenenfalls antifungal behandelt werden¹⁰³. Allerdings ist eine späte Induktion der ART, d.h. wenn die CD4⁺ T-Zellzahl bereits einen kritischen Wert von 50 Zellen/ μ l Blut unterschritten hat, mit einem geringen Überleben assoziiert¹⁰¹. In einer umfangreichen klinischen Studie wurde daher der optimale Zeitpunkt für den Beginn der ART bei Patienten mit einer Kryptokokken-Koinfektion ermittelt. Eine 5-wöchige antifungale Therapie vor der ART-Initiierung wirkte sich dabei im Vergleich zum sofortigen Beginn der ART positiv auf das Überleben der Patienten aus¹⁰⁴.

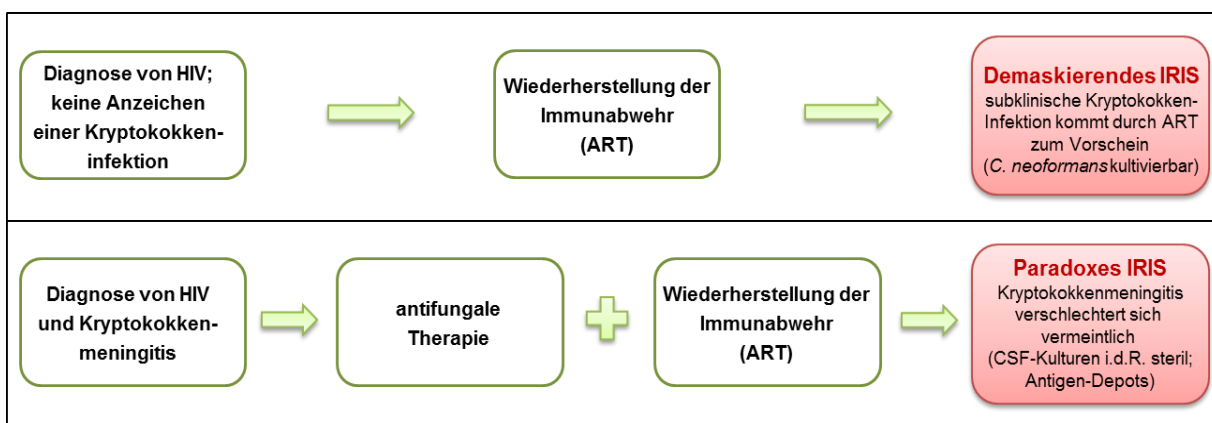


Abb. 4: Die zwei klinischen Szenarien von Kryptokokken-IRIS. Von demaskierendem IRIS spricht man, wenn eine subklinische Kryptokokkeninfektion während der Immunrekonstitution enttarnt wird. Paradoxes IRIS tritt hingegen nach erfolgreicher antifungaler Therapie im Rahmen der Immunrekonstitution auf und ist vermutlich auf das Vorhandensein von Antigendepots zurückzuführen.

IRIS kann generell immer dann auftreten, wenn das Immunsystem nach einer Phase der Suppression wiederhergestellt wird. So spielt Kryptokokken-IRIS nicht nur eine Rolle bei HIV-Patienten, sondern in selteneren Fällen auch bei Transplantatempfängern nach Reduktion der immunsupprimierenden Therapie¹⁰⁵ sowie bei Frauen in der postpartalen Phase infolge der Aufhebung der Schwangerschafts-assoziierten Immunsuppression¹⁰⁶.

Ein großes diagnostisches Problem besteht darin, zwischen einer Kryptokokken-Infektion und Kryptokokken-IRIS zu unterscheiden, da das klinische Bild in Form der Meningitis sehr ähnlich ist, sich jedoch die Ursachen und demzufolge die Behandlungsstrategien grundlegend unterscheiden (siehe Tab.2). Während eine Kryptokokken-Infektion antifungal behandelt

werden sollte, ist im Falle von Kryptokokken-IRIS eine anti-inflammatorische Therapie indiziert. Eine Fehldiagnose hat demzufolge fatale Folgen für den Patienten. Die Therapie von Kryptokokken-IRIS ist momentan auf die Anwendung von Kortikosteroiden beschränkt, die jedoch mit erheblichen Nebenwirkungen verbunden ist. Zusätzlich birgt die umfassende Immunsuppression das Risiko weiterer opportunistischer Infektionen¹⁰⁷.

Tab. 2: Vergleich von Kryptokokken-IRIS und Kryptokokken-Infektion

| Parameter | Kryptokokken-IRIS | Kryptokokkeninfektion |
|-------------------------|---|--|
| Klinische Manifestation | Meningitis | Meningitis |
| Ursache | Wiederherstellung einer spezifischen zellulären Immunantwort | Fehlen einer spezifischen zellulären Immunantwort |
| Entzündung | überschießend, granulomatös | geringgradig, diffus |
| Behandlung | anti-inflammatorisch (Kortikosteroide) | antifungal |

Folgende Risikofaktoren wurden für die Entwicklung von Kryptokokken-IRIS beschrieben: (1) eine geringgradige inflammatorische Reaktion mit niedrigen Leukozytenwerten und Proteinspiegeln in der Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) vor Beginn der ART^{108,109,110}, (2) eine hohe Pilz-^{109,85,110} oder Antigenlast^{111,112,113,114} zum Zeitpunkt der ART-Initiierung sowie (3) eine exzellente Reaktion auf die ART mit einer raschen Rekonstitution von CD4⁺ T-Zellen¹¹⁵. Es wird angenommen, dass IRIS auf eine unkontrollierte, exzessive Reaktion des rekonstituierten Immunsystems auf Kryptokokken-Antigene zurückzuführen ist¹¹⁶. Charakteristisch sind eine granulomatöse Entzündung⁹⁴ sowie ein sogenannter „Zytokinsturm“, d.h. das Vorhandensein großer Mengen an Zytokinen und Wachstumsfaktoren in der CSF^{108,116,117} und im Blut¹¹¹.

1.3 ZIELSTELLUNGEN

Die Mechanismen, die der Entstehung von Kryptokokken-IRIS zugrunde liegen, sind unbekannt. Um Ansatzpunkte für eine gezielte Therapie zu erhalten, sind detaillierte Untersuchungen zur Entwicklung des Entzündungsgeschehens in den jeweils betroffenen Organen erforderlich, die in klinischen Studien schwer möglich sind.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, das erste Tiermodell für Kryptokokken-IRIS zu etablieren. Basierend darauf sollte die systematische Charakterisierung der Pathogenesemechanismen dazu beitragen, zelluläre und molekulare Mediatoren zu identifizieren. Des Weiteren sollte geklärt werden, ob IRIS auf einer überschießenden spezifischen Reaktion gegen die vorliegende Kryptokokken-Infektion beruht oder infektionsunabhängig induziert wird.

Daraus könnten sich neue Möglichkeiten für die Diagnostik und Therapie von Kryptokokken-IRIS ergeben.

2 MATERIAL & METHODEN

2.1 MATERIALIEN

2.1.1 Biologisches Material

2.1.1.1 Mäuse

Für die Etablierung und Charakterisierung des Kryptokokken-IRIS-Mausmodells wurden weibliche Mäuse im Alter von 8-14 Wochen der in Tab. 3 aufgeführten Linien verwendet. Die Haltung der Versuchstiere erfolgte in individuell belüfteten Käfigsystemen unter spezifiziert pathogenfreien (SPF)-Bedingungen entsprechend der Richtlinien der Landesdirektion Leipzig (Genehmigungsnummer: L24-9168.11/18/19). Die Mäuse erhielten steriles Futter und Wasser *ad libitum*. Entsprechend der Vorgaben der Vereinigung von europäischen versuchstierkundlichen Gesellschaften (FELASA) wurden sie regelmäßig auf Freiheit von Ekto- und Endoparasiten kontrolliert.

Tab. 3: Verwendete Mauslinien. In unabhängigen Experimenten wurden die Mauslinien mit C57Bl/6 und Balb/c-Hintergrund eingesetzt, wobei sich vergleichbare Ergebnisse zeigten.

| Genotyp | Genmodifikation | Herkunft |
|------------------------------|--|--|
| RAG-1 ^{-/-} | T- und B-Zell-Defizienz aufgrund eines Defekts des Rekombination-aktivierenden Gens 1 ¹¹⁸ | Dr. Matthias Klein, Johannes Gutenberg Universität Mainz |
| Wildtyp | - | Janvier, Saint Berthevin |
| IFN- γ ^{-/-} | IFN- γ -Defizienz ¹¹⁹ | Prof. Christian Bogdan, Institut für Mikrobiologie, Universität Erlangen |

2.1.1.2 *C. neoformans*

Die Infektion der Mäuse erfolgte mit dem virulenten *C. neoformans*-Serotyp D-Stamm 1841³⁶. Dieser Stamm wurde ursprünglich aus der CSF eines HIV-Patienten mit Kryptokokken-Meningitis in Basel isoliert und durch die Firma Hoffmann-La Roche Ltd (Basel, Schweiz) zur Verfügung gestellt. Die Aufbewahrung erfolgte bei -80°C in 10% Magermilchpulver.

2.1.2 Chemikalien

Allgemeine Laborchemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von ROTH (Karlsruhe, Deutschland), Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) bzw. Applichem (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

| | |
|---|---|
| Reaktionsgefäße (2 ml/1,5 ml/0,5 ml) | Eppendorf, Hamburg, Deutschland |
| Serumseparatoren | Diagonal, Münster, Deutschland |
| FACS [®] -Röhrchen | BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland |
| Zentrifugenröhrchen (15 ml/50 ml) | BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland |
| Einmalpipettenspitzen | Rainin, Gießen, Deutschland |
| BD Plastipak [™] Spritzen mit Luer-Ansatz, 1 ml | BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland |
| Sterican [®] Einmalkanülen (25 G x 1''/30G x ½'') | Braun-Melsungen, Melsungen, Deutschland |
| Solofix [®] Blutlanzetten | Braun-Melsungen, Melsungen, Deutschland |
| Perfusionsbesteck, Kanüle mit Präzisionsschliff, außen trockensilikonisiert, 21 G, 0,8 x 19 mm | Dispomed Witt oHG; Gelnhausen, Deutschland |
| Infusionszubehör Intrafix Air P 150 cm | Braun-Melsungen, Melsungen, Deutschland |
| Kryo-Röhrchen mit Außengewinde 1,2 ml | TPP Techno Plastic Products, Trasadingen, Schweiz |
| 96-well-Mikrotiterplatten mit V-Form | Laborfachhandel Dr. Ilona Schubert, Leipzig, Deutschland |
| Maxisorp-Mikrotiterplatten | Nunc, Wiesbaden, Deutschland |
| Selbstklebende Abdeckfolie für Mikrotiterplatten | Laborfachhandel Dr. Ilona Schubert, Leipzig, Deutschland |
| 100 µm-Zellsiebe | BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland |
| Petrischalen | Peske Laborbedarf, Aindling-Arnhofen, Deutschland |
| Präseparationsfilter CellTrics [®] 30 µm | Partec, Münster, Deutschland |
| LS-Säulen | Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland |

2.1.4 Geräte

| | |
|---|---|
| Sicherheitswerkbank Herasafe, Klasse 2, Typ H | Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland |
| Pipetten Pipet-Lite | Rainin, Gießen, Deutschland |
| Neubauer-Zählkammer | Laboroptik Ltd, Lancing, Großbritannien |
| Mikroskop Axiovert 40 | Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland |
| VWR® Mini-Vortexer | VWR®, Darmstadt, Deutschland |
| Stuart rotator SB2 | Bibby Scientific Limited, Staffordshire, Großbritannien |
| Schüttelinkubator 3031 | GLF, Burgwedel, Deutschland |
| Heraeus Megafuge 40R | Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland |
| Microfuge 22R | Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland |
| Dispergiergerät, IKA® ULTRA-TURRAX® | IKA®-Werke, Staufen, Deutschland |
| Inkubator Typ 400 | Bachofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen, Deutschland |
| Forma® Series II Water Jacketed CO ₂ Incubator | Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland |
| Kühlschrank Bosch Economic Cooler | Robert Bosch GmbH, Stuttgart, Deutschland |
| Kühl-Gefrierkombination Thermo Cryotechnics, STINOL KG103 | Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland |
| Thermo EC Forma -86°C ULT Freezer | Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland |
| LSRFortessa™ | BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland |
| FACSAria™III | BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland |
| Ultrawash PLUS™ Microplate Washer | Dynex Technologies, Denckendorf, Deutschland |
| ELISA-Lesegerät Spectra-Max 340 | Molecular Devices, Sunnyvale, USA |
| QuadroMACSTM-Magnet | Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland |
| HistoStar™ Embedding Workstation | Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland |
| Microm HM 400 | Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland |
| Tissue-Tek® Prisma® | Sakura Finetek, Staufen, Deutschland |
| Handmagnet | eBioscience, Frankfurt, Deutschland |
| FlexMap3D®-Detektiergerät | Luminex, Austin, USA |
| Nanodrop® ND-1000 Spectrophotometer | Peqlab, Erlangen, Deutschland |
| Precellys® 24 Homogenisator | Peqlab, Erlangen, Deutschland |
| iCycler iQ™5 | Bio-Rad, München, Deutschland |

2.2 METHODEN

2.2.1 Infektion der Mäuse mit *C. neoformans*

PBS; pH 7,4: 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,5 mM KH₂PO₄; 12,9 mM Na₂HPO₄

Sabouraud (SAB)-Flüssigmedium: 1% Trypton/Pepton aus Casein, 2% α -D(+)-Glucose-Monohydrat

Für die Infektion wurden 1×10^8 Zellen *C. neoformans* 1841 für 17 h bei 30°C in 200 ml SAB-Medium unter Schütteln (80 rpm, Schüttelinkubator 3031, GLF, Burgwedel, Deutschland) inkubiert. Nachdem die Pilzzellen zweimal mit PBS gewaschen worden sind, wurde die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (Laboroptik Ltd; Lancing, Großbritannien) bestimmt und in sterilem PBS auf $2,5 \times 10^4$ Zellen/ml eingestellt. RAG-1^{-/-} Mäuse wurden durch die intraperitoneale Gabe von 100 mg/kg KGW Ketamin und 5 mg/kg KGW Xylazin (beide Ceva Tiergesundheit, Düsseldorf, Deutschland) narkotisiert und anschließend mit 500 KbE *C. neoformans* 1841 in 20 μ l PBS intranasal infiziert.

2.2.2 Blutentnahme und Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

PBS; pH 7,4: 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,5 mM KH₂PO₄; 12,9 mM Na₂HPO₄

Carbonatpuffer; pH 9,5: 206 mM NaHCO₃; 81 mM Na₂CO₃

Waschpuffer: 0,05% Tween@20 (v/v) in PBS

Blockierungspuffer: 0,1% Gelatine (v/v), 0,5% BSA (w/v) in PBS

Serumdiluent: 0,1% Gelatine (v/v), 0,5% BSA (w/v), 0,05% Tween@20 (v/v) in PBS

Um Aufschluss über den Infektionsstatus der Mäuse zu erhalten, wurde 28 Tage nach der Infektion in den RAG-1^{-/-} Mäusen die Konzentration von Glucuronoxylomannan (GXM) im Serum bestimmt. GXM stellt das Hauptkapselpolysaccharid von *C. neoformans* dar¹²⁰. Als Negativkontrolle für die Analyse dienten Serumproben, die vor der Infektion gewonnen worden waren. Den Mäusen wurde submandibulär Blut entnommen, welches in Serumseparatoren (Diagonal, Münster, Deutschland) überführt und für 5 min bei 5000 g und 4°C zentrifugiert wurde. Anschließend wurde das Serum abgenommen und für 17 h bei 37°C mit Proteinase K (50 μ g/ml, Roche, Mannheim, Deutschland) inkubiert. Für den GXM-ELISA

wurden Maxisorp-Mikrotiterplatten (Nunc, Wiesbaden, Deutschland) für 1,5 h bei 37°C mit 5 µg/ml eines Ziege anti-Maus-IgM-Antikörpers (SouthernBiotech, Birmingham, USA) in Carbonatpuffer beschichtet. Die Platten wurden mit Hilfe des *Ultrawash PLUSTM Microplate Washers* (Dynex Technologies, Denkendorf, Deutschland) mit Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden freie Bindungsstellen auf dem Kunststoffträger mit Blockierungspuffer ü.N. bei 4°C in einer feuchten Kammer abgesättigt. Nachdem die Platten erneut gewaschen worden waren, wurden sie für 1,5 h bei RT in einer feuchten Kammer mit 2,5 µg/ml eines Maus-anti-GXM-Antikörpers (Klon 2D10) in Serumdiluent inkubiert. Die Seren wurden seriell 1:3 in Serumdiluent verdünnt und nach einem weiteren Waschschrift in Duplikaten aufgetragen. Der Standard wurde ebenfalls in Duplikaten in die Platten gegeben. Ausgehend von der höchsten Konzentration (1 µg/ml) wurde dabei eine aus 8 Stufen bestehende 1:2-Verdünnungsreihe hergestellt. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei RT in der feuchten Kammer. Anschließend wurden die Platten erneut gewaschen und es erfolgte eine zweistündige Inkubation mit einem zweiten Maus-anti-GXM-Antikörper (Klon 18B7) in Serumdiluent, die ebenfalls bei RT in der feuchten Kammer durchgeführt wurde. Zur Detektion wurden die Platten nach einem weiteren Waschschrift für 1 h bei RT in der feuchten Kammer mit einem Merretichperoxidase (HRP)-konjugierten Ziege anti-Maus-IgG1-Antikörper (SouthernBiotech, Birmingham, USA) inkubiert und ein letztes Mal gewaschen. Anschließend erfolgte die Entwicklung mit Hilfe des Tetramethylbenzidin (TMB)-Mikrowell-Peroxidase-Systems (KPL, Gaithersburg, USA). Die Peroxidase katalysiert die Übertragung von Reduktionsäquivalenten auf Wasserstoffperoxid. Die Reduktionsäquivalente werden dabei von TMB bereitgestellt, das dadurch in die oxidierte blaue Form übergeht. Je nach Farbtintensität wurde die Reaktion durch die Zugabe von 1 M H₃PO₄ abgestoppt, wobei ein Farbumschlag von blau nach gelb zu beobachten war. Die Extinktion bei 450 nm (Referenzwellenlänge 630 nm) wurde mittels ELISA-Lesegerät Spectra-Max 340 (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) gemessen. Zur Ermittlung der Konzentration von GXM im Serum anhand der Standardkurve wurde die *SoftMax Pro Microplate Data Acquisition & Analysis Software* (Molecular Devices, Downingtown, USA) eingesetzt. Die beiden verwendeten anti-GXM-Antikörper (Klon 2D10 und 18B7) wurden freundlicherweise von Prof. Arturo Casadevall, Albert-Einstein-College, New York, USA, zur Verfügung gestellt.

Die Konzentration von IFN- γ im Überstand isolierter Lungenleukozyten (siehe Abschnitt 2.2.7) wurde ebenfalls mittels ELISA bestimmt. Dazu wurde das *Mouse IFN- γ ELISA Ready-Set-Go!*[®]-Kit (eBioscience, Frankfurt, Deutschland) nach Herstellerangabe verwendet.

2.2.3 Isolierung von Splenozyten

PBS; pH 7,4: 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,5 mM KH₂PO₄; 12,9 mM Na₂HPO₄

Erythrozytenlysepuffer (Gey's Lösung): 20% Lösung A; 5% Lösung B; 5% Lösung C

Gey's Lösung A: 0,65 M NH₄Cl; 25 mM KCL; 4 mM Na₂HPO₄, 25 mM α -D(+)-Glucose-Monohydrat, 0,14 mM Phenolrot

Gey's Lösung B: 0,21 mM MgCl₂ x 6 H₂O; 0,06 mM MgSO₄ x 7 H₂O

Gey's Lösung C: 2,7 mM NaHCO₃

Wildtypmäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet. Anschließend wurde die Milz entnommen und zur Herstellung einer Einzelzellsuspension durch ein 100 μ m-Zellsieb (BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland) passagiert. Nach einer 6-minütigen Zentrifugation bei 300 g und 4°C erfolgte die Lyse der Erythrozyten, indem das Zellpellet in 1 ml Gey's Lösung aufgenommen und für 1 Minute auf Eis inkubiert wurde. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 10 ml PBS abgestoppt. Nachdem die Zellen zweimal mit PBS gewaschen worden waren (300 g, 6 min, 4°C), wurde die Zellzahl bestimmt (siehe Abschnitt 2.2.4) und anschließend auf $1,25 \times 10^8$ Zellen/ml in PBS eingestellt.

2.2.4 Bestimmung der Zellzahl

Zur Einstellung einer definierten Zellzahl wurde diese mit Hilfe der Neubauer Zählkammer (Laboroptik Ltd; Lancing, Großbritannien) ermittelt. Dazu wurden Aliquots der Zellsuspensionen mit Trypanblau (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) verdünnt. Dieser Vitalfarbstoff wird von lebenden Zellen ausgeschlossen. Tote Zellen haben hingegen die Fähigkeit der Trypanblauexklusion durch Zellmembranschädigung verloren und erscheinen blau unter dem Mikroskop. Dadurch können lebende von toten Zellen unterschieden werden. Die Zellzahl wurde berechnet, indem der Mittelwert der ungefärbten Zellen in den ausgezählten Quadranten der Neubauer Zählkammer mit dem Faktor 10^4 und der Verdünnung multipliziert wurde.

2.2.5 Sortierung von CD4⁺ T-Zellen mittels *Magnetic-Cell-Sorting* (MACS)

PBS; pH 7,4: 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,5 mM KH₂PO₄; 12,9 mM Na₂HPO₄

MACS-Puffer: 2 mM EDTA, 0,5% BSA (v/v) in PBS

Wildtypmäuse bzw. IFN- γ ^{-/-} Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet. Anschließend wurde die Milz entnommen und durch ein 100 μ m-Zellsieb (BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland) passagiert. Aus der dadurch erhaltenen Einzelzellsuspension wurden CD4⁺ T-Zellen mittels des *T cell isolation Kits II* (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland) entsprechend der Herstellerangabe isoliert. Durch die aufeinanderfolgende Inkubation mit einem Biotin-Antikörpercocktail und Anti-Biotin-MicroBeads wurden zunächst alle Zellen außer der gewünschten CD4⁺ Population markiert. Nach einem Waschschrift in MACS-Puffer (10 min, 300 g, 4°C) wurde die Zellsuspension auf eine LS-Säule gegeben, die zuvor in einen QuadroMACSTM-Magneten platziert worden war (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland). Während die markierten unerwünschten Zellen in der Säule zurückgehalten werden, können die unmarkierten CD4⁺ T-Zellen die Säule passieren und im Durchlauf gesammelt werden. Die Reinheit der CD4⁺ Fraktion wurde mittels Durchflusszytometrie (siehe Abschnitt 2.2.8) überprüft und lag bei >95%. Die Zellzahl wurde mittels Neubauer-Zählkammer (siehe Abschnitt 2.2.4) bestimmt und auf 1×10^7 Zellen/ml eingestellt.

2.2.6 Adoptiver Zelltransfer

Um IRIS in *C. neoformans*-infizierten RAG-1^{-/-} Mäusen zu induzieren, wurden 32 Tage nach der Infektion $2,5 \times 10^7$ Splenozyten bzw. 2×10^6 gereinigte CD4⁺ T-Zellen in 200 μ l PBS intravenös (i.v.) injiziert. Der Transfer von CD4⁺ T-Zellen erfolgte vergleichend in *C. neoformans*-infizierte und naive RAG-1^{-/-} Mäuse, um infektionsabhängige Effekte von jenen abgrenzen zu können, die allein auf die Lymphopenie-induzierte Proliferation¹²¹ zurückzuführen sind. In allen Experimenten wurden Infektionskontrollen mitgeführt, d.h. *C. neoformans*-infizierte RAG-1^{-/-} Mäuse, die 32 Tage nach der Infektion 200 μ l PBS i.v. erhielten. Nach dem Transfer wurde täglich das Gewicht der Mäuse bestimmt.

2.2.7 Bestimmung der Organlast und Isolierung von Leukozyten aus Gehirn und Lunge

| | |
|---|---|
| <u>PBS; pH 7,4:</u> | 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,5 mM KH ₂ PO ₄ ; 12,9 mM Na ₂ HPO ₄ |
| <u>SAB-Platten:</u> | 1% Trypton/Pepton aus Casein, 2% α -D(+)-Glucose-Monohydrat, 2% Agar |
| <u>HBSS; pH 7,4:</u> | 137 mM NaCl; 5,4 mM KCl; 0,4 mM KH ₂ PO ₄ ; 0,3 mM Na ₂ HPO ₄ ; 4,3 mM NaHCO ₃ ; 0,6 mM MgSO ₄ ; 0,1% Glucose |
| <u>HBSS-FKS:</u> | 3% FKS (Gibco, Life Technologies) in HBSS |
| <u>RPMI-Medium:</u> | RPMI-1640 mit L-Glutamin, 25 mM HEPES und Phenolrot (PAA, Pasching, Deutschland), 10% FKS (Gibco, Life Technologies), 1% Penicillin/Streptomycin (PAA, Pasching, Deutschland) |
| <u>Verdauungslösung:</u> | 0,69 mg/ml Kollagenase A (Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland), 111,11 U/ml DNase IV (Sigma-Aldrich, München, Deutschland), 1 μ M Natriumpyruvat (Applichem, Darmstadt, Deutschland) in RPMI-Medium |
| <u>PBS-FKS:</u> | 3% FKS (Gibco, Life Technologies) in PBS |
| <u>IMDM-Medium:</u> | IMDM mit L-Glutamin, 25 mM HEPES und Phenolrot (PAA, Pasching, Deutschland), 10% FKS (Gibco, Life Technologies), 1% Penicillin/Streptomycin (PAA, Pasching, Deutschland) |
| <u>Erythrozytenlysepuffer (Gey's Lösung):</u> | 20% Lösung A; 5% Lösung B; 5% Lösung C |
| <u>Gey's Lösung A:</u> | 0,65 M NH ₄ Cl; 25 mM KCl; 4 mM Na ₂ HPO ₄ , 25 mM α -D(+)-Glucose-Monohydrat, 0,14 mM Phenolrot |
| <u>Gey's Lösung B:</u> | 0,21 mM MgCl ₂ x 6 H ₂ O; 0,06 mM MgSO ₄ x 7 H ₂ O |
| <u>Gey's Lösung C:</u> | 2,7 mM NaHCO ₃ |

Die Mäuse wurden durch CO₂-Begasung (Linde Gas, Pullach, Deutschland) und anschließende terminale Blutentnahme aus der *Vena cava caudalis* euthanasiert. Anschließend erfolgten die Perfusion des Lungen- und Körperkreislaufes mit 0,9% NaCl (Baxter, Unterschleißheim, Deutschland) und die sterile Entnahme von Lunge und Gehirn. ½ Gehirn wurde in 1 ml PBS mittels Ultra-Turrax T8 (IKA-Werke, Staufen, Deutschland) homogenisiert und serielle Verdünnungen wurden auf SAB-Medium ausplattiert. Nach einer

48-stündigen Inkubation bei 30°C erfolgte die Auszählung der Kolonie-bildenden Einheiten (KbE) zur Berechnung der Organlast. Jeweils ½ Gehirn wurde für die Herstellung einer Einzelzellsuspension durch ein 70 µm Zellsieb passagiert. Die Anreicherung von Leukozyten erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation. Dazu wurden Lösungen verschiedener Dichten aus einem Percoll-Konzentrat (Amersham-Pharmacia, Freiburg, Deutschland) in HBSS-FKS hergestellt. Die Zellen der Gehirne von 3 Mäusen wurden jeweils vereinigt, in 10 ml einer Percoll-Lösung mit einer Dichte (ρ) von 1,098 g/ml aufgenommen und mit 5 ml isotonischem Percoll ($\rho=1,122$ g/ml) unterschichtet. Anschließend wurden aufeinanderfolgend Percoll-Lösungen abnehmender Dichten ($\rho=1,072$ g/ml, $\rho=1,050$ g/ml, $\rho=1,030$ g/ml; jeweils 9 ml) überschichtet. Der Gradient wurde durch den Auftrag von 9 ml HBSS-FKS ($\rho=1,006$ g/ml) abgeschlossen und für 30 min bei 20°C und 400 g ohne Bremse zentrifugiert. Während der Zentrifugation verteilen sich die Zellen entsprechend ihrer Dichte über den Gradienten. Die Fraktionen der Leukozyten, die sich an den Phasengrenzen $\rho=1,098/1,072$ g/ml und $\rho=1,072/1,050$ g/ml angereichert haben, wurden einzeln abgenommen, in HBSS-FKS gewaschen (300 g, 10 min, 4°C) und wieder vereinigt. Anschließend wurden die Expression von MHC-II auf Mikrogliazellen sowie die Frequenz an CD4⁺ T-Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt (siehe Abschnitt 2.2.8).

Das Lungengewebe wurde mit Hilfe von Skalpellklingen (C. Bruno Bayha GmbH, Tuttlingen, Deutschland) zerkleinert, für 30 min in der Verdaulösung unter Rotation bei 37°C inkubiert und zur Herstellung einer Einzelzellsuspension durch ein 100 µm Zellsieb passagiert (BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland). Nachdem die Zellen in PBS-FKS gewaschen worden waren (300 g, 6 min, 4°C), erfolgte die Lyse der Erythrozyten. Dazu wurde das Zellpellet in 1 ml Gey's Lösung aufgenommen und für 1 Minute auf Eis inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 10 ml PBS-FKS abgestoppt. Die Suspension wurde erneut zentrifugiert (300 g, 6 min, 4°C) und das Zellpellet in 1 ml PBS-FKS resuspendiert. Für die Bestimmung der Organlast wurden 50 µl abgenommen. Es wurde wie für das Gehirn beschrieben vorgegangen. Bei den übrigen Zellen erfolgte die Anreicherung von Lungenleukozyten mittels Dichtegradientenzentrifugation. Eine 70% und eine 30% Lösung wurden aus einem Percoll-Konzentrat (Amersham-Pharmacia, Freiburg, Deutschland) in RPMI-Medium hergestellt. Die Zellen wurden in 3 ml 70% Percoll resuspendiert und mit 3 ml 30% Percoll überschichtet. Nach der Zentrifugation (400 g, 20 min, 20°C, ohne Bremse) wurden die Leukozyten, die sich an der Phasengrenze gesammelt haben, abgenommen und in IMDM-Medium

gewaschen (300 g, 6 min, 4°C). Die Zellzahl wurde ermittelt (siehe Abschnitt 2.2.4) und auf 1×10^7 Zellen/ml in IMDM-Medium eingestellt. Anschließend wurden die Frequenz und die absolute Anzahl an übertragenen $CD4^+$ T-Zellen sowie deren Proliferation und Aktivierung mittels Durchflusszytometrie analysiert (siehe Abschnitt 2.2.8). Für die Untersuchung der IFN- γ -Expression mittels intrazellulärer Zytokinfärbung (siehe Abschnitt 2.2.8.2) wurden die Leukozyten für 6 h in der Anwesenheit des Sekretionshemmstoffes Brefeldin A in IMDM-Medium inkubiert (37°C, 5% CO_2). Parallel erfolgte eine 6-stündige Kultivierung der Lungenleukozyten ohne Brefeldin A zur Bestimmung der IFN- γ -Konzentration im Überstand mittels ELISA (siehe Abschnitt 2.2.2).

2.2.8 Durchflusszytometrie

PBS; pH 7,4: 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,5 mM KH_2PO_4 ; 12,9 mM Na_2HPO_4

FACS-Puffer: 3% FKS (Gibco, Life Technologies), 0,1 % Natriumazid (v/v) in PBS

FACS-Saponin-Puffer: 0,5 % Saponin (v/v) in FACS-Puffer

2.2.8.1 Oberflächenfärbung

Die angereicherten Leukozyten aus Gehirn und Lunge wurden in 96-well-Mikrotiterplatten mit V-Form (Laborfachhandel Dr. Ilona Schubert, Leipzig, Deutschland) überführt und einmal mit PBS gewaschen (300 g, 3 min, 4°C). Anschließend erfolgte zunächst eine Färbung zur Differenzierung vitaler und toter Zellen. Die Zellen wurden für 20 min mit einem Amin-reaktiven Lebend-Tot-Farbstoff (*fixable viability dye* eFluor®780 bzw. eFluor®506, beide eBioscience, Frankfurt, Deutschland) inkubiert. Dieser und alle folgenden Färbeschritte erfolgten im Dunkeln auf Eis. Während die Lebend-Tot-Farbstoff in tote Zellen eindringen und dort mit freien Aminen reagieren können, ist ihre Reaktivität bei vitalen Zellen auf Amine der Zelloberfläche beschränkt. Demzufolge werden tote Zellen stärker angefärbt, als vitale, was deren Unterscheidung bei der Auswertung ermöglicht. Nachdem die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen worden waren (300 g, 3 min, 4°C), wurden sie zur Blockierung unspezifischer Bindungen für 10 min mit anti-CD16/CD32 (BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland) inkubiert. Anschließend erfolgte eine 15-minütige Inkubation mit dem

jeweiligen spezifischen Primär-Antikörper (siehe Tab. 4). Für alle Färbungen wurden zur Kontrolle der Spezifität die entsprechenden Isotypen-Kontrollen (eBioscience, Frankfurt, Deutschland) mitgeführt. Nach zweimaligem Waschen in PBS (300 g, 3 min, 4°C) wurden die Zellen für 15 min mit 2% Paraformaldehyd (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) fixiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von FACS-Puffer gestoppt. Die Ansätze wurden erneut zentrifugiert (300 g, 3 min, 4°C) und in FACS-Puffer aufgenommen.

Tab. 4: Übersicht der bei der Oberflächenfärbung verwendeten Antikörper.

| Spezifität | Fluoreszenzfarbstoff | Klon | Isotyp | Herkunft |
|------------|----------------------|-------------|--------------|------------------|
| CD45 | PE-Cy7 | 30-F11 | Ratte IgG2b | eBioscience* |
| CD11b | FITC | Ma/70 | Ratte IgG2b | eBioscience |
| MHC-II | PE | M5/114.15.2 | Ratte IgG2b | eBioscience |
| CD3e | APC | 145-2C11 | Hamster IgG | eBioscience |
| CD4 | Alexa Fluor®700 | GK1.5 | Ratte IgG2a | Biolegend** |
| CD69 | PE | H1.2F3 | Hamster IgG1 | BD Bioscience*** |

* eBioscience, Frankfurt, Deutschland

** Biolegend, Fell, Deutschland

*** BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland

2.2.8.2 Intrazelluläre Färbung

Zur Untersuchung der Expression von IFN- γ in Lungenleukozyten erfolgte im Anschluss an die Oberflächenfärbung die intrazelluläre Färbung des Zytokins. Die fixierten Zellen wurden zur Permeabilisierung der Zellmembran mit FACS-Saponin-Puffer gewaschen (300 g, 3 min, 4°C). Zur Blockierung unspezifischer Bindungen wurden sie für 10 min mit anti-CD16/CD32 (BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland) und Ratten-IgG (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) in FACS-Saponin-Puffer inkubiert. Anschließend erfolgte eine 15-minütige Inkubation mit einem FITC-konjugierten anti-IFN- γ -Antikörper (Klon: XMG1.2, Isotyp: Ratte IgG1, eBioscience, Frankfurt, Deutschland), der ebenfalls in FACS-Saponin-Puffer angesetzt wurde.

Auch zur Untersuchung der Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 wurde im Anschluss an die Oberflächenfärbung eine intrazelluläre Färbung der Lungenleukozyten durchgeführt.

Da Ki-67 im Zellkern lokalisiert ist, erfordert die Analyse die Permeabilisierung von Zell- und Kernmembran. Aus diesem Grund wurde das *FoxP3 staining kit* (eBioscience, Frankfurt, Deutschland) verwendet. Zunächst wurden die Zellen für 30 min mit der Fixations/Permeabilisierungs-Lösung inkubiert. Anschließend wurden sie mit dem Permeabilisierungspuffer gewaschen (300 g, 3 min, 4°C) und für 10 min mit anti-CD16/CD32 (BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland) und Ratten-IgG (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) in Permeabilisierungspuffer inkubiert. Die spezifische Färbung erfolgte durch den Einsatz des PerCP-eFluor®710-konjugierten anti-Ki-67-Antikörpers (Klon: SoIA15, Isotyp: Ratte IgG2a, eBioscience, Frankfurt, Deutschland), der für 30 min in Permeabilisierungspuffer zugegeben wurde.

Bei der intrazellulären Färbung von IFN- γ und Ki-67 wurden ebenfalls zur Kontrolle der Spezifität die entsprechenden Isotypen-Kontrollen mitgeführt. Nach der Inkubation in der entsprechenden Färbelösung wurden die Zellen zweimal mit FACS-Puffer gewaschen (300 g, 3 min, 4°C) und schließlich in FACS-Puffer aufgenommen.

2.2.8.3 Durchflusszytometrische Messung und Auswertung

Bei der durchflusszytometrischen Messung werden die Fluoreszenz-markierten Zellen in einem Flüssigkeitsstrom einzeln von Laserstrahlen erfasst. Anhand ihrer Lichtstreuung können Größe und Granularität bestimmt werden. Das Vorwärtsstreulicht (FSC, engl. *forward scatter channel*) ist proportional zur Zellgröße, während das Seitwärtsstreulicht (SSC, engl. *side scatter channel*) ein Maß für die Zellgranularität ist. In einem Dot-Plot, bei dem die Parameter FSC und SSC gegeneinander aufgetragen sind, lassen sich so verschiedene Zellpopulationen voneinander unterscheiden. Durch das von den Lasern ausgesandte Licht kommt es zu einer Anregung der gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe, die daraufhin Licht einer spezifischen Wellenlänge emittieren, das in den einzelnen Fluoreszenzkanälen detektiert wird. Allerdings können sich bei einer Mehrfarbenanalyse die emittierten Wellenlängen der Fluoreszenzfarbstoffe überlappen. Das führt zu falsch positiven Signalen, da ein Detektor für ein bestimmtes Fluorochrom auch Anteile des emittierten Lichts eines anderen Fluorochroms registrieren kann. Vor der Messung wurden daher diese falsch positiven Signale rechnerisch gegeneinander korrigiert, d.h. kompensiert. Dazu wurden ungefärbte Zellen sowie Einzelfärbungen in Form von Kompensations-Beads (BD Bioscience, Heidelberg) verwendet, die mit einem der Fluorochrom-gekoppelten Antikörper markiert worden sind. Die

Kompensationsparameter wurden dann für die jeweilige Messung beibehalten. In der vorliegenden Arbeit wurde das BD LSRFortessaTM-Durchflusszytometer verwendet (BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland). Die Auswertung der Messergebnisse erfolgte mittels FlowJo-Software (Version 7.6.5, Treestar Inc., Ashland, USA).

2.2.8.4 Sortierung von Mikrogliazellen mittels FACSAriaTMIII

Beim FACSAriaTMIII (BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland) handelt es sich um ein Durchflusszytometer, das zusätzlich mit einer Zellsortiereinrichtung ausgestattet ist. Im Anschluss an die laserbasierte Zellcharakterisierung wird der Flüssigkeitsstrahl in einzelne Tropfen eingeteilt. Jeder Tropfen enthält eine Zelle und wird entsprechend ihrer Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften am Abrisspunkt vom Flüssigkeitsstrahl elektrisch geladen. In einem elektrostatischen Feld werden die Tropfen ladungsabhängig abgelenkt und in unterschiedliche Auffangröhrchen sortiert. In der vorliegenden Arbeit wurden auf diese Weise Mikrogliazellen isoliert. Dazu wurde die Zielpopulation vorab mittels FACS Diva Software (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) stringent definiert. Mikrogliazellen sind durch eine hohe Expression von CD11b und eine intermediäre Expression von CD45 gekennzeichnet. Die entsprechende Population wurde nach dem Ausschluss von toten Zellen und Dupletten eingegrenzt und sortiert. Die Reinheit der Mikrogliazellen lag bei >97%.

2.2.9 Histologie

Hämatoxylin nach Mayer: 3,3 mM Hämatoxylin, 1 mM Natriumjodat, 194 mM Aluminium-Kaliumsulfat; 302 mM Chloralhydrat, 5 mM kristalline Zitronensäure

Eosinstammlösung: 14 mM Eosin in 70% Ethanol

Eosinlösung: 120 ml Eosinstammlösung, 600 ml 70% Ethanol, 0,3 ml Eisessig

Die histologische Befundung der Leber erfolgte am Institut für Pathologie des Klinikums Fulda unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Gabriele Köhler. Das Gewebe wurde in 4% Formaldehyd (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) fixiert und mittels *HistoStarTM Embedding Workstation* (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) in Paraffin (Leica, Heidelberg, Deutschland) eingebettet. Mit einem Schlittenmikrotom (Microm HM 400, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) wurden 4 µm-dicke Schnitte angefertigt.

Die Hämatoxylin- und Eosin (H&E)-Färbung ermöglichte eine Bewertung der Entzündungsreaktion und Zellinfiltration. Basophile Strukturen, wie Zellkerne wurden durch Hämatoxylin blau angefärbt, während eosinophile Strukturen, wie das Zytoplasma und Kollagen durch die Eosin-Färbung rosa erschienen. Die H&E-Färbung erfolgte automatisiert (siehe Tab. 5) mittels Tissue-Tek[®] Prisma[®] (Sakura Finetek, Staufen, Deutschland). Zunächst wurden die Paraffinschnitte über eine absteigende Alkoholreihe rehydriert, mit Hämatoxylin gefärbt und unter fließendem warmem Leitungswasser gebläut. Anschließend wurden sie mit Eosin gefärbt, über eine aufsteigende Alkoholreihe in Xylol überführt und mittels Entellan eingedeckt.

Tab. 5: Schritte der automatisierten Hämatoxylin- und Eosin (H&E)-Färbung. Die Eosin-Lösung wurde täglich frisch angesetzt.

| Nr. | Schritt/Reagenz | Zeit (min:sek) |
|-----|------------------------|----------------|
| 1 | <i>Dying Station</i> | 12:00 |
| 2 | Xylol | 02:00 |
| 3 | Xylol | 02:00 |
| 4 | 99% Ethanol | 01:00 |
| 5 | 95% Ethanol | 01:00 |
| 6 | 70% Ethanol | 01:00 |
| 7 | Aqua dest. | 01:15 |
| 8 | Hämatoxylin nach Mayer | 06:00 |
| 9 | fließend wässern | 03:00 |
| 10 | Eosinlösung | 03:00 |
| 11 | Aqua dest. | 00:45 |
| 12 | 70% Ethanol | 00:30 |
| 13 | 99% Ethanol | 01:00 |
| 14 | 95% Ethanol | 01:00 |
| 15 | Xylol | 02:00 |
| 16 | Xylol | 01:30 |

2.2.10 Bestimmung der Serum-Zytokinkonzentration mittels *Multiplex-Immunoassay*

Die Bestimmung der Zytokinkonzentration im Serum erfolgte mittels *Multiplex-Immunoassay* (Luminex®). Der Vorteil dieser Methode gegenüber einem klassischen ELISA (siehe Abschnitt 2.2.2) besteht darin, dass gleichzeitig die Konzentrationen verschiedener Analyten innerhalb einer Probe gemessen werden können. Das wird durch den Einsatz von Polyesterol-Mikrosphären (*Beads*) ermöglicht, die unterschiedliche Anteile zweier Fluorochrome enthalten. Dadurch können über 100 verschiedene Farbtöne generiert werden. Der primäre Antikörper gegen einen nachzuweisenden Analyten ist jeweils ausschließlich an Mikrosphären einer einzigen Fluorochrom-Zusammensetzung gebunden, wodurch später eine Unterscheidung möglich ist. In der vorliegenden Studie wurde für die Bestimmung der Konzentration von IL-12p70, IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-5 und IL-4 im Serum das *ProcartaPlex Mouse Essential Th1/Th2 Cytokine Panel (6 plex)* entsprechend der Herstellerangabe verwendet (eBioscience, Frankfurt, Deutschland). Zunächst wurden die Antikörpergekoppelten, Fluorochrom-markierten, magnetischen Mikrosphären in eine 96-well-Flachboden-Mikrotiterplatte gegeben und in einem Handmagneten (eBioscience, Frankfurt, Deutschland) für 2 min immobilisiert. Nach einem Waschschrift erfolgte die Zugabe der Serumproben. Parallel wurde das Gemisch der Standards in Duplikaten aufgetragen und in 7 Stufen 1:4 seriell verdünnt. Die anschließende 1,5-stündige Inkubation diente der Antikörper-Zytokin-Bindung. Anschließend wurden die Ansätze erneut gewaschen und für 30 min mit den biotinylierten Detektionsantikörpern inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurde Phycoerythrin (PE)-konjugiertes Streptavidin zugegeben, das an Biotin bindet. Die Ansätze wurden ein letztes Mal gewaschen, in *Reading Buffer* resuspendiert und im FlexMap3D®-Detektiergerät (Luminex, Austin, USA) gemessen. Ein roter Laser erkennt die verschiedenen Mikrosphären anhand ihrer spezifischen Eigenfluoreszenz, wodurch diese differenziert und klassifiziert werden können. Ein zweiter grüner Laser misst das Reportersignal PE, das die Quantifizierung des gebundenen Zytokins ermöglicht. Die Auswertung erfolgte mittels xPONENT-Software (Luminex, Austin, USA).

2.2.11 Reverse Transkription und quantitative Polymerasekettenreaktion (RT-qPCR)

Die Transkription des IFN- γ -induzierten Proteins 10 (IP-10, CXCL10) im Gehirn sowie in isolierten Mikrogliazellen (siehe Abschnitt 2.2.8.4) wurde mittels RT-qPCR bestimmt. Das Gehirngewebe wurde sofort nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff (Air Liquide, Düsseldorf, Deutschland) schockgefroren und bis zur Analyse bei -80°C gelagert. Die Homogenisierung erfolgte unter Verwendung von peqGold TriFastTM und Precellys-Keramik-Kit (Durchmesser der enthaltenen Keramikkügelchen 1,4 mm) in einem Precellys[®]24 Homogenisator (alle Peqlab, Erlangen, Deutschland) zweimal für 30 s bei 5000 rpm. Die RNA wurde mittels Phenol-Chloroform extrahiert, in Isopropanol präzipitiert, zweimal mit 70% Ethanol gewaschen und in DEPC-Wasser aufgenommen. Um eventuelle Verunreinigungen der RNA mit genomischer DNA zu entfernen, wurden die Proben in der Anwesenheit eines *RiboLock* RNase-Inhibitors (20 Einheiten/Probe, Thermo Fischer Scientific, Schwerte, Deutschland) mit RNase-freier DNase (2,5 Einheiten/Probe, Thermo Fischer Scientific, Schwerte, Deutschland) verdaut. Die RNA-Ausbeute wurde durch Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge (λ) von 260 nm bestimmt und die Qualität der Aufreinigung aus dem Verhältnis von $\text{OD}_{\lambda=260\text{nm}}$ zu $\text{OD}_{\lambda=280\text{nm}}$ abgeschätzt (Nanodrop[®] ND-1000 Spectrophotometer, Peqlab, Erlangen, Deutschland). Zur cDNA-Gewinnung wurde 1 μg Gesamt-RNA mittels *High capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) entsprechend der Herstellerangabe unter Verwendung eines Gemisches von *random/oligo(dT)₁₈-Primern* im *PTC-200 Peltier Thermal Cycler* (Bio-Rad, München, Deutschland) revers transkribiert. Die Amplifikation der cDNA-Moleküle (siehe Tab. 6) erfolgte in Duplikaten mit Hilfe des *iTaqTM Universal SYBR[®] Green Supermixes* in einem *iCycler iQTM5* (beide Bio-Rad, München, Deutschland).

Tab. 6: PCR-Protokoll für die cDNA-Amplifikation mit dem *iCycler iQTM5*

| Anzahl der Zyklen | Schritt | Temperatur | Dauer |
|-------------------|--|-------------------------------|----------------------------|
| 1 | Polymerase-Aktivierung und DNA-Denaturierung | 95 °C | 2 min |
| 40 | DNA-Denaturierung | 95 °C | 15 s |
| | <i>Annealing</i> + Elongation | 61 °C | 30 s |
| 1 | Schmelzkurve zur Qualitätskontrolle | 65-95°C in 0,5°C-Schritten | 2 min (2 s pro Schritt) |

Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green interkaliert mit doppelsträngiger DNA. Die detektierte Fluoreszenzintensität verhält sich dabei proportional zur Menge der PCR-Produkte. Für die Amplifikation von IP-10 wurde als Vorwärtsprimer 5'-CGTCATTTTCTGCCTCATCCTG-3' und als Rückwärtsprimer 5'-CATCGTGGCAATGATCTCAACA-3' (GenBank-Nummer NM_021274.2; Positionen 93-114 und 273-252) verwendet. Die relative Quantifizierung und Berechnung der x-fachen Induktion von IP-10 wurde nach der $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ Methode durchgeführt^{122,123}, wobei die Normalisierung mit Hypoxanthin-Guanin-Phosphoryltransferase (HPRT) als Referenzgen erfolgte.

(Vorwärtsprimer: 5'-GTTGGATACAGGCCAGACTTTGTTG-3'; Rückwärtsprimer: 5'-GATTCAACTTGCGCTCATCTTAGGC-3'; GenBank-Nummer NM_013556; Positionen 660-684 und 822-798)

2.2.12 Statistische Auswertung

Die graphische sowie statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte unter Verwendung der GraphPad Prism 5.01 Software (San Diego, USA). Zunächst wurden die Daten mittels D'Agostino-Pearson-Test auf Normalverteilung getestet. Bei Vorliegen einer Normalverteilung wurden die Daten mit dem Mittelwert dargestellt. In diesem Fall wurde zum Vergleich von drei Gruppen eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit Bonferroni Post-Hoc-Test durchgeführt, während Unterschiede zwischen zwei Gruppen mittels Student's t-Test analysiert worden sind. Wiesen die Daten keine Normalverteilung auf, wurden sie mit dem Median dargestellt. Zum Vergleich von drei Gruppen wurde dabei der Kruskal-Wallis H-Test mit Dunn's Post-Hoc-Test angewendet, während Unterschiede zwischen zwei Gruppen mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-Test analysiert worden sind. Das Signifikanzniveau ist jeweils in den Abbildungsunterschriften angegeben: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

3 ERGEBNISSE

3.1 ETABLIERUNG EINES KRYPTOKOKKEN-IRIS-MAUSMODELLS

3.1.1 Der Transfer von Splenozyten induziert ein charakteristisches IRIS-Krankheitsbild in *C. neoformans*-infizierten RAG-1^{-/-} Mäusen

Zur Etablierung eines Mausmodells für Kryptokokken-IRIS wurden zunächst immundefiziente RAG-1^{-/-} Mäuse, die aufgrund eines Defekts des Rekombination-aktivierenden Gens (RAG)-1 weder T- noch B-Zellen besitzen¹¹⁸, intranasal mit *C. neoformans* infiziert und 4 Wochen später durch den adoptiven Transfer von Splenozyten aus naiven Wildtyp-Spendermäusen immunrekonstituiert (siehe Abb. 4A). Zum Zeitpunkt des Zelltransfers war der Hauptbestandteil der Kryptokokkenkapsel Glucuronoxylomannan (GXM) im Serum nachweisbar (siehe Abb. 4B). Das deutet auf die Dissemination von *C. neoformans* hin, die in Patienten mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von IRIS assoziiert ist¹¹⁰.

Der Transfer der Splenozyten induzierte in den *C. neoformans*-infizierten RAG-1^{-/-} Empfängermäusen eine rapide Verschlechterung des Allgemeinzustandes, die sich im raschen Gewichtsverlust widerspiegelte (siehe Abb. 4C). In Infektionskontrollmäusen, die keine Splenozyten erhalten haben, blieb das Gewicht hingegen über einen Zeitraum von 10 Tagen stabil, bevor es zu einer leichten Abnahme kam (siehe Abb. 4C). Bei der Analyse der Tiere 14 Tage nach Transfer zeigte sich in *C. neoformans*-infizierten RAG-1^{-/-} Splenozyten-Rezipienten eine granulomatöse Entzündung (siehe Abb. 4D), die typischerweise auch bei Patienten mit Kryptokokken-IRIS beobachtet wird⁸⁹. Die Granulome waren durch das Vorhandensein vieler myeloider und einiger lymphoider Entzündungszellen gekennzeichnet, die die Kryptokokken vom übrigen Gewebe abgrenzten (siehe Abb. 4D). Im Unterschied dazu waren Kryptokokkenherde in Infektionskontrollmäusen nicht von Entzündungszellen umgeben (siehe Abb. 4D).

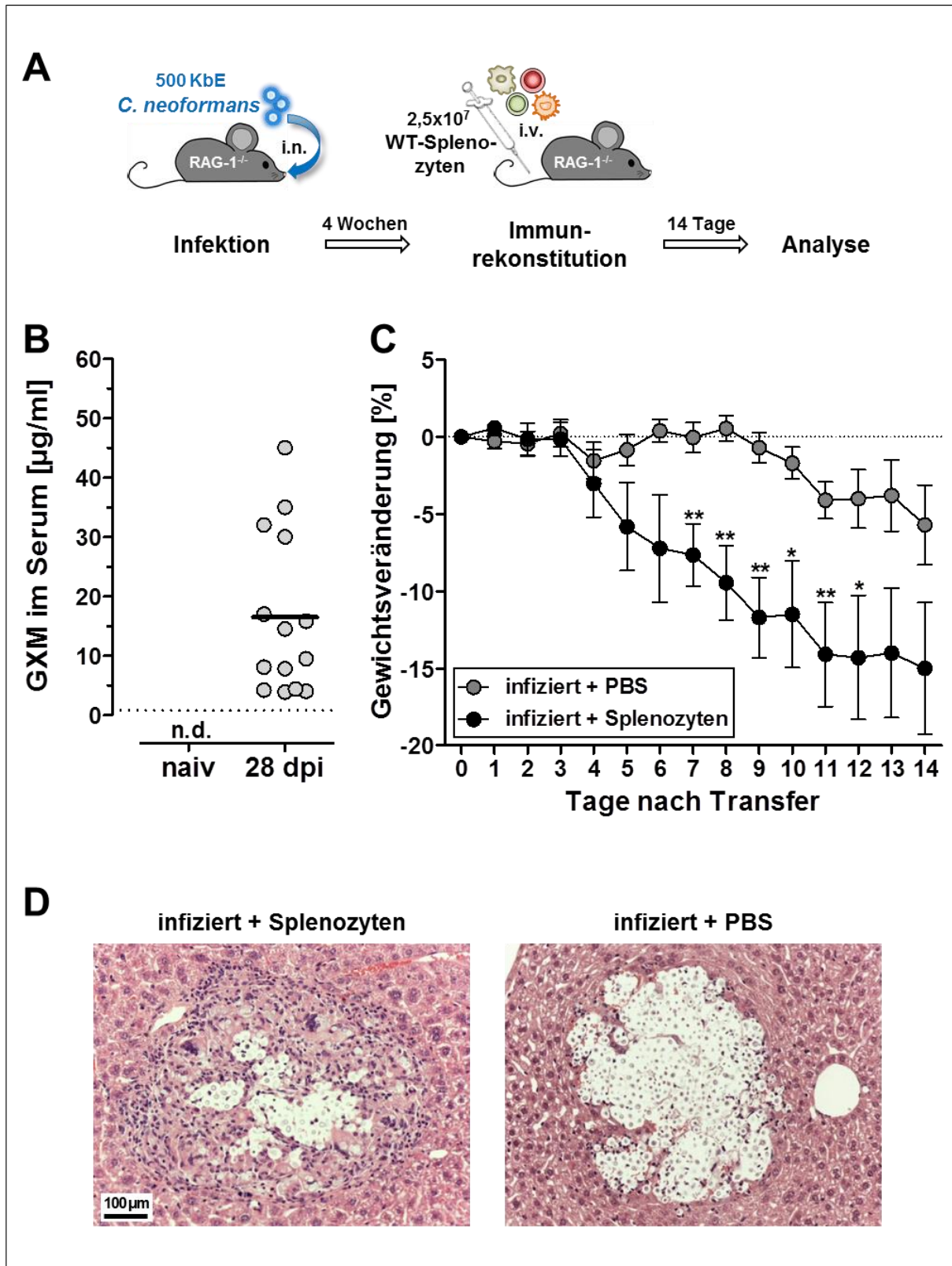


Abb. 5: *C. neoformans*-infizierte RAG-1^{-/-} Mäuse entwickeln nach dem Transfer von Wildtyp-Splenozyten charakteristische IRIS-Symptome. (A) Immundefiziente RAG-1^{-/-} Mäuse wurden intranasal (i.n.) mit 500 Kolonie-bildenden Einheiten (KbE) *C. neoformans* infiziert. 4 Wochen nach der Infektion erfolgte die Immunrekonstitution durch den intravenösen (i.v.) Transfer von 2,5x10⁷ Wildtyp (WT)-Splenozyten, die aus naiven Spendermäusen isoliert wurden. Infektionskontrollmäuse erhielten eine entsprechende Menge an PBS. (B) Zum Zeitpunkt des Transfers 28 Tage nach Infektion (dpi) war der Hauptkapselbestandteil von *C. neoformans* Glucuronoxylomannan (GXM) im Serum nachweisbar. Eines von zwei unabhängigen Experimenten ist mit dem Mittelwert dargestellt. n.d.: nicht detektierbar (C) Nach dem Transfer der Splenozyten wurde täglich das Gewicht der Mäuse bestimmt. Dargestellt ist eines von zwei unabhängigen Experimenten. Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert mit Standardfehler des Gewichtes der Mäuse einer Gruppe am jeweiligen Tag (n=7). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Student's t-Test. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ (D) 2 Wochen nach der Immunrekonstitution wurde eine histopathologische Untersuchung mittels Hämatoxylin & Eosin (H&E)-Färbung der Leber durchgeführt. Linkes Bild: In Splenozyten-Rezipienten zeigte sich eine granulomatöse Entzündung. Vornehmlich myeloide aber auch einige lymphoide Zellen schließen die Kryptokokken im Granulomzentrum ein. Rechtes Bild: In der Leber von Infektionskontrollen fanden sich Kryptokokken aber keine Entzündungszellen. (Vergrößerung x200).

3.1.2 Die Rekonstitution mit CD4⁺ T-Zellen reicht aus, um infektionsabhängig eine systemische Entzündung hervorzurufen

Da in HIV-Patienten die ART-bedingte Wiederherstellung normaler CD4-T-Zell-Zahlen Kryptokokken-IRIS induzieren kann¹²⁴, wurden in einem weiteren Versuch gereinigte CD4⁺ T-Zellen aus naiven Wildtyp-Spendermäusen in *C. neoformans*-infizierte RAG-1^{-/-} Mäuse transferiert (siehe Abb. 6A). Der Versuchsaufbau schloss wiederum Infektionskontrollmäuse ohne T-Zelltransfer ein. Es ist bekannt, dass T-Zellen in einer lymphopenischen Umgebung auch ohne eine Infektion spontan aktiviert und zur Expansion angeregt werden können (sog. Lymphopenie-induzierte Proliferation)¹²¹. Um infektionsabhängige Effekte von jenen abgrenzen zu können, die allein auf die Lymphopenie-induzierte Proliferation zurückzuführen sind, erfolgte bei einer zusätzlichen Kontrollgruppe der Transfer gereinigter CD4⁺ T-Zellen in naive RAG-1^{-/-} Mäuse.

Der Transfer von CD4⁺ T-Zellen induzierte in *C. neoformans*-infizierten RAG-1^{-/-} Mäusen ein ähnliches Bild wie der Transfer von Splenozyten (vgl. Abb. 5 und 6). So verloren die *C. neoformans*-infizierten RAG-1^{-/-} Rezipienten von CD4⁺ T-Zellen bereits 1 Woche nach dem Transfer im Vergleich zu den beiden Kontrollgruppen signifikant an Gewicht (siehe Abb. 6B). Damit einhergehend induzierte die CD4⁺ T-Zell-Rekonstitution in *C. neoformans*-infizierten RAG-1^{-/-} Mäusen eine charakteristische granulomatöse Entzündung, u.a. in der Leber (siehe Abb. 6C). In naiven Rezipienten von CD4⁺ T-Zellen waren nur einzelne kleine

lymphoide Zellansammlungen zu finden, während in Infektionskontrollmäusen 8 Tage nach Transfer Kryptokokken aber keine Anzeichen einer Entzündung vorhanden waren. (siehe Abb. 6C). Zu diesem Zeitpunkt hatte die Rekonstitution der CD4⁺ T-Zellen keinen Einfluss auf die Erregerkontrolle in der Lunge und im Gehirn (siehe Abb. 6D).

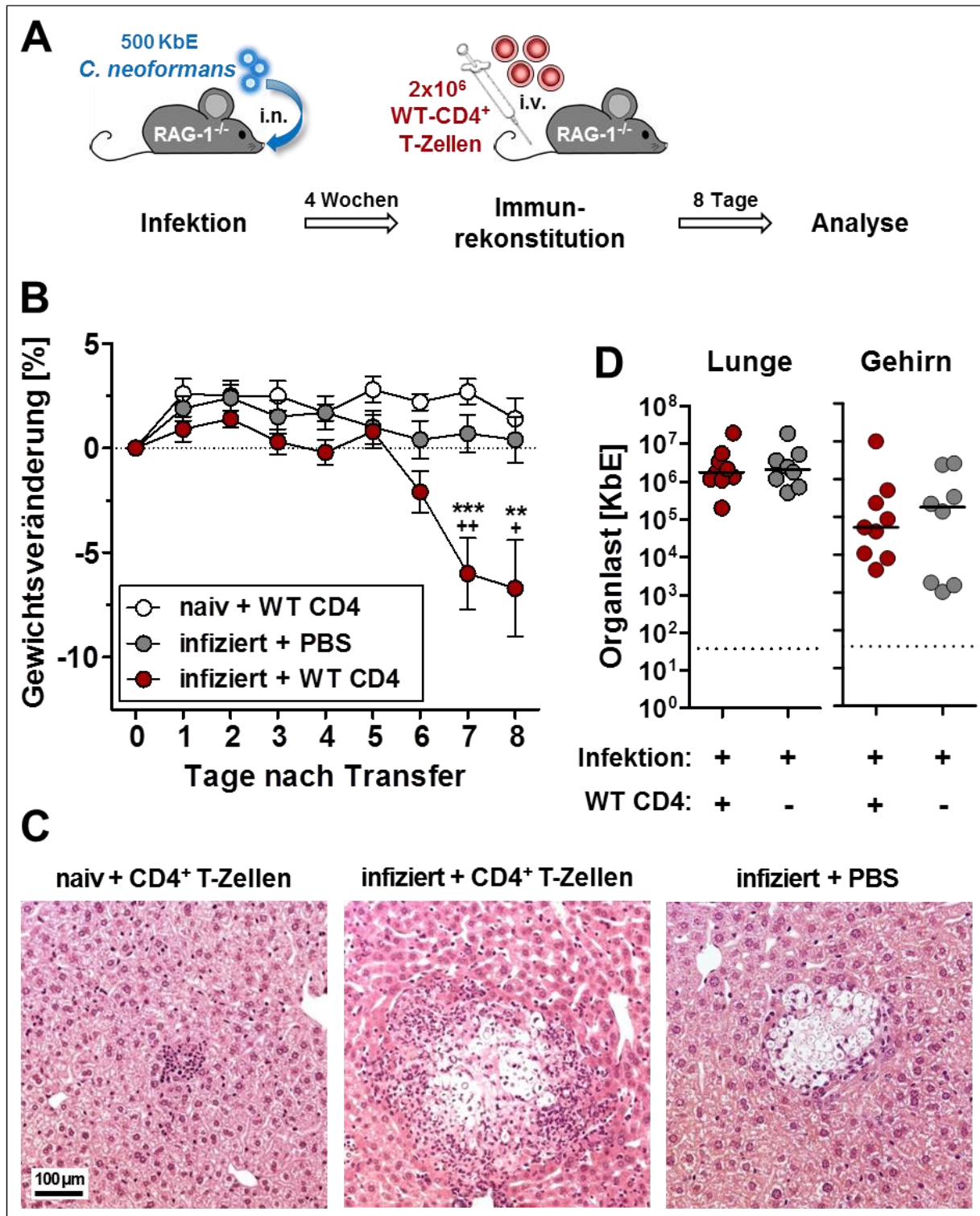


Abb. 6: Der Transfer von CD4⁺ T-Zellen reicht aus, um in *C. neoformans* infizierten RAG-1^{-/-} Mäusen eine Entzündungsreaktion zu induzieren. (A) Immundefiziente RAG-1^{-/-} Mäuse wurden intranasal (i.n.) mit 500 Kolonie-bildenden Einheiten (KbE) *C. neoformans* infiziert und 4 Wochen später durch den intravenösen (i.v.) Transfer von 2x10⁶ gereinigten Wildtyp (WT)-CD4⁺ T-Zellen aus naiven Spendermäusen immunrekonstituiert. Infektionskontrollmäuse erhielten anstelle der CD4⁺ T-Zellen eine entsprechende Menge PBS. Als zusätzliche Kontrolle erfolgte der Transfer von CD4⁺ T-Zellen in naive RAG-1^{-/-} Mäuse. (B) Dargestellt ist der Gewichtsverlauf im Anschluss an die Immunrekonstitution. Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert des Gewichts der Mäuse mit Standardfehler einer Gruppe am jeweiligen Tag (n=8-9). Die statistische Auswertung erfolgte mittels einfaktorieller ANOVA mit Bonferroni Post-Hoc-Test. Signifikante Unterschiede zwischen infizierten und naiven Rezipienten von CD4⁺ T-Zellen sind mit „*“ und zwischen infizierten Rezipienten und Infektionskontrollen mit „+“ angegeben. +P<0,05; ** und ++ P<0,01; *** P<0,001. Gezeigt ist 1 repräsentatives aus 5 unabhängigen Experimenten. (C) 8 Tage nach Transfer wurde eine histopathologische Untersuchung der Leber mittels Hämatoxylin & Eosin (H&E)-Färbung durchgeführt. In infizierten RAG-1^{-/-} Rezipienten von CD4⁺ T-Zellen zeigt sich eine granulomatöse Entzündung (mittleres Bild). In Infektionskontrollen sind Kryptokokken, aber kaum Entzündungszellen zu finden (rechtes Bild) und in naiven RAG-1^{-/-} Rezipienten von CD4⁺ T-Zellen sind einige kleine Herde lymphoider Zellen sichtbar (linkes Bild). Vergrößerung: x200 (D) Die Pilzlast in Lunge und Gehirn von Infektionskontrollen und infizierten Rezipienten von CD4⁺ T-Zellen wurde 8 Tage nach Transfer bestimmt. Dargestellt sind die Einzeltiere (n=8-9) und Mediane von einem repräsentativen aus 5 unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-Test. Das Detektionsminimum wird durch die gestrichelte Linie markiert.

Ein Kennzeichen von Kryptokokken-IRIS ist der sogenannte „Zytokinsturm“, d.h. die massive Freisetzung vornehmlich proinflammatorischer Zytokine, wie IFN- γ , IL-6, TNF- α , IL-2 sowie IL-17^{111,117}. Daher wurde im Mausmodell die Serum-Zytokinkonzentration in einer kinetischen Analyse an den Tagen 1, 3 und 8 nach Transfer der CD4⁺ T-Zellen bestimmt. Während an den beiden frühen Zeitpunkten in allen Gruppen nur marginale Mengen von IL-12p70, IFN- γ , IL-6 und TNF- α nachweisbar waren, wurden an Tag 8 nach Transfer in infizierten Rezipienten von CD4⁺ T-Zellen signifikant erhöhte Konzentrationen im Vergleich zu Infektionskontrollen und naiven Rezipienten gemessen (siehe Abb. 7). Die Menge an IFN- γ im Serum war zu diesem Zeitpunkt besonders hoch. Die proinflammatorischen Zytokine IL-17, IL-1 β und IL-2 waren hingegen auch 8 Tage nach Transfer der CD4⁺ T-Zellen nicht im Serum von *C. neoformans*-infizierten RAG-1^{-/-} Mäusen detektierbar (Daten nicht gezeigt). Schlussfolgernd induziert die Rekonstitution der CD4⁺ T-Zellen in *C. neoformans*-infizierten Rezipienten die systemische Freisetzung bestimmter proinflammatorischer Zytokine. Interessanterweise fiel 8 Tage nach Transfer auch eine erhöhte Konzentration des Th2-assoziierten Zytokins IL-5 im Serum infizierter Rezipienten von CD4⁺ T-Zellen im Vergleich

zu den beiden Kontrollgruppen auf (siehe Abb. 7). IL-4 war im Unterschied dazu nicht nachweisbar (Daten nicht gezeigt).

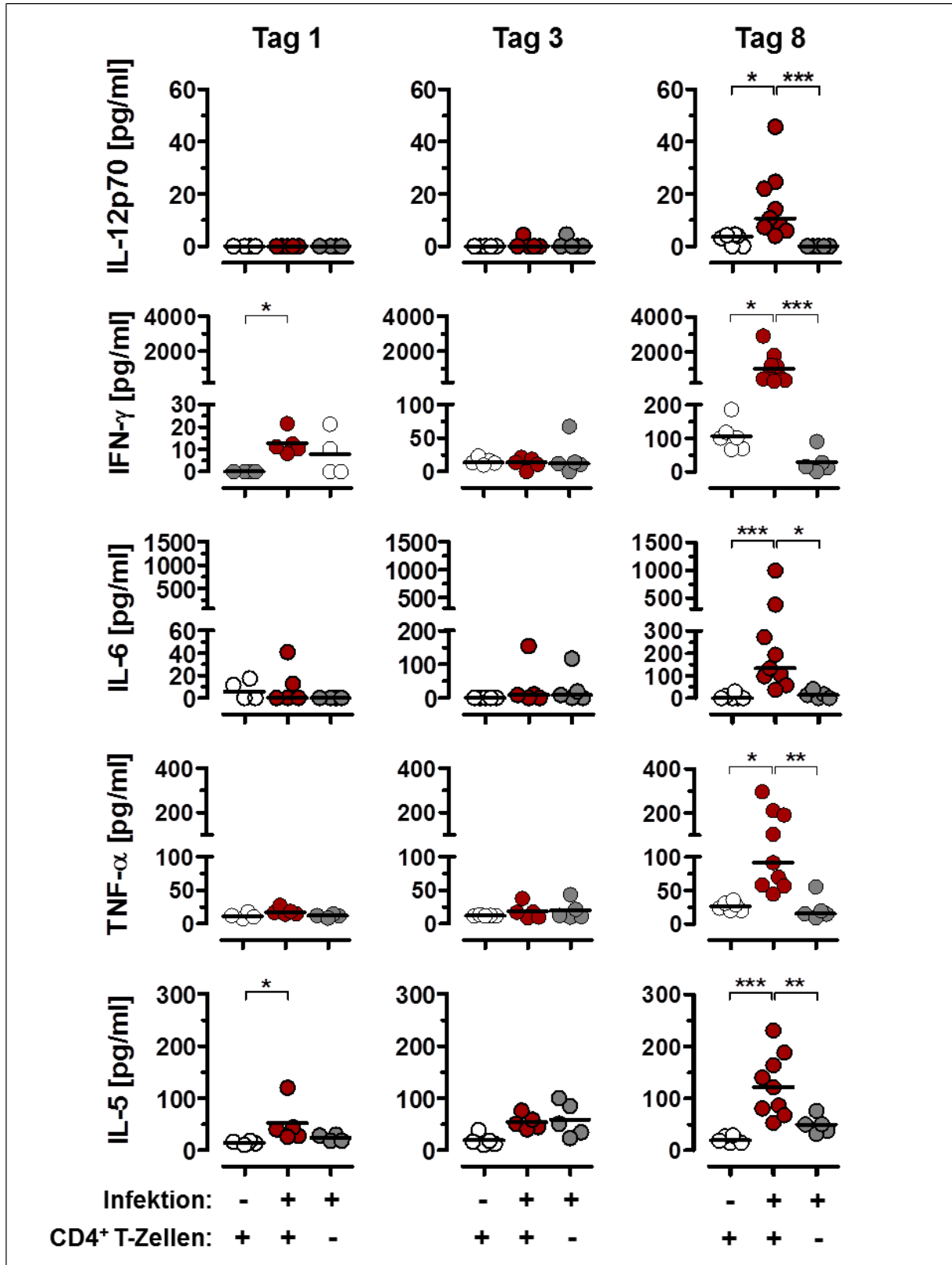


Abb. 7: CD4⁺ T-Zellen induzieren die systemische Freisetzung bestimmter proinflammatorischer Zytokine in *C. neoformans* infizierten RAG-1^{-/-} Mäusen. Der Versuchsaufbau entspricht dem in Abb. 6A dargestellten Schema. An den Tagen 1, 3 und 8 nach Transfer der CD4⁺ T-Zellen wurde die Konzentration von IL-12p70, IFN- γ , IL-6 TNF- α und IL-5 im Serum mittels Multiplex-Analyse bestimmt. Dargestellt sind jeweils die Datenpunkte der Einzeltiere mit den Mittelwerten bzw. Medianen aus einem repräsentativen Experiment (n=2). Die statistische Auswertung erfolgte mittels einfaktorieller ANOVA mit Bonferroni-Post-Hoc-Test bzw. Dunn's-Post-Hoc-Test. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

Insgesamt weisen die Daten darauf hin, dass CD4⁺ T-Zellen abhängig von der *C. neoformans*-Infektion dazu in der Lage sind, eine systemische Entzündung in RAG-1^{-/-} Mäusen hervorzurufen, die der Situation in Kryptokokken-IRIS-Patienten ähnelt.

3.2 FUNKTIONELLE ANALYSEN IM KRYPTOKOKKEN-IRIS-MAUSMODELL

3.2.1 Die Entzündung im Gehirn *C. neoformans*-infizierter RAG-1^{-/-} CD4⁺ T-Zell-Rezipienten ist durch die Aktivierung von Mikrogliazellen und die Rekrutierung von Donor-CD4⁺ T-Zellen gekennzeichnet

Die Meningitis ist die häufigste Manifestation und Haupttodesursache von Kryptokokken-IRIS⁸⁸. Daher lag ein Fokus bei der Charakterisierung des Mausmodells darauf, Aufschluss über das Entzündungsgeschehen im Gehirn zu erhalten. Dazu wurde zunächst die Aktivierung von Mikrogliazellen untersucht. Funktionell gesehen sind Mikrogliazellen residente Makrophagen im ZNS, die unter normalen Bedingungen einen ruhenden Phänotyp aufweisen. Infolge pathologischer Veränderungen werden sie aber rasch aktiviert¹²⁵. Daraufhin regulieren Mikrogliazellen unter anderem die Expression des Haupthistokompatibilitätskomplexes MHC-II herauf, um Antigene zu präsentieren¹²⁵. Die durchflusszytometrische Analyse von Mikrogliazellen im Kryptokokken-IRIS-Mausmodell zeigte, dass die Rekonstitution von CD4⁺ T-Zellen in *C. neoformans*-infizierte RAG-1^{-/-} Mäusen die Expression von MHC-II induziert. Während in naiven Rezipienten und Infektionskontrollen nur ein kleiner Prozentsatz der Mikrogliazellen MHC-II auf ihrer Oberfläche exprimierten, lag der Anteil MHC-II⁺ Mikrogliazellen in infizierten Rezipienten deutlich höher (siehe Abb. 8A).

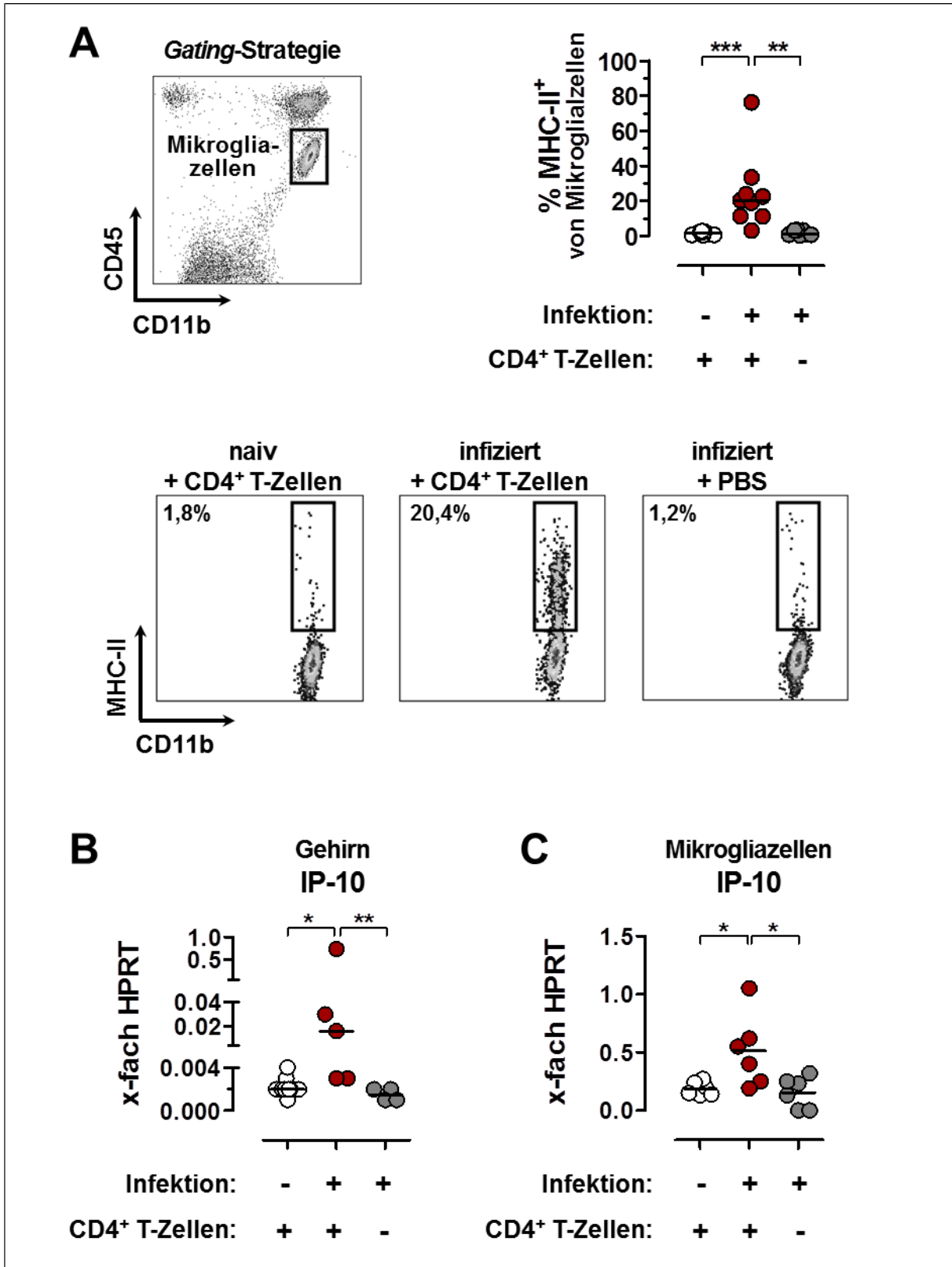


Abb. 8: Die Rekonstitution von CD4⁺ T-Zellen induziert die Aktivierung von Mikrogliazellen in *C. neoformans* infizierten RAG-1^{-/-} Mäusen. Der Versuchsaufbau entspricht dem in Abb. 6A dargestellten Schema. **(A)** An Tag 8 nach Transfer wurde durchflusszytometrisch die Expression von MHC-II auf Mikrogliazellen analysiert. Nach dem Ausschluss von toten Zellen wurden zunächst Mikrogliazellen, die durch die intermediäre Expression von CD45 und die hohe Expression von CD11b gekennzeichnet sind, eingegrenzt. Innerhalb dieser Population wurde dann die Frequenz an MHC-II⁺ Zellen bestimmt. Repräsentative Ergebnisse sind in der unteren Reihe dargestellt. Im Histogramm sind die Daten aus drei unabhängigen Experimenten mit ihrem Median zusammengefasst. Die Gehirne von 3 Mäusen wurden jeweils vereinigt, sodass aus 9 Mäusen pro Gruppe pro Experiment jeweils 3 Einzelpunkte resultieren. Die statistische Auswertung erfolgte mittels einfaktorieller ANOVA mit Dunn's-Post-Hoc-Test. ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$. **(B)** An Tag 8 nach Transfer wurde mittels RT-qPCR die Transkription des IFN- γ -induzierten Proteins 10 (IP-10, CXCL10) im Gehirn bestimmt. Dargestellt sind Einzeltiere mit den Medianen aus einem repräsentativen Experiment (n=2). Die statistische Auswertung erfolgte mittels einfaktorieller ANOVA mit Dunn's-Post-Hoc-Test. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$. **(C)** Mikrogliazellen wurden an Tag 8 nach Transfer isoliert und auf die Transkription von IP-10 hin untersucht. Im Histogramm sind die Daten aus zwei unabhängigen Experimenten mit dem Mittelwert zusammengefasst. Die Gehirne von 3 Mäusen wurden jeweils vereinigt, sodass aus 9 Mäusen pro Gruppe pro Experiment jeweils 3 Einzelpunkte resultieren. Die statistische Auswertung erfolgte mittels einfaktorieller ANOVA mit Bonferroni-Post-Hoc-Test. * $P < 0,05$

Der Transfer der CD4⁺ T-Zellen induzierte im Gehirn von *C. neoformans*-infizierten Rezipienten im Vergleich zu Infektionskontrollmäusen und naiven Rezipienten eine erhöhte Transkription des IFN- γ -induzierten Proteins (IP-10, CXCL10), das als Chemokin an der Rekrutierung von T-Zellen beteiligt ist¹²⁶ (siehe Abb. 8B). Mikrogliazellen konnten als Produzenten von IP-10 in *C. neoformans* infizierten RAG-1^{-/-} CD4⁺ T-Zell-Rezipienten identifiziert werden (siehe Abb. 8C). Im Rahmen der durchflusszytometrischen Untersuchung von angereicherten Gehirn-Leukozyten wurden in infizierten Rezipienten erhöhte Frequenzen an Donor-CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zu naiven Rezipienten nachgewiesen (siehe Abb. 9). Es muss darauf hingewiesen werden, dass die absolute Zahl von CD4⁺ T-Zellen im Gehirn sehr gering war, sodass Leukozyten mehrerer Mäuse zusammen analysiert wurden. Wie erwartet wurden auch im Anschluss an eine Immunfluoreszenzfärbung nur einzelne wenige CD4⁺ T-Zellen im Gehirn der Rezipienten gefunden, wobei die Anzahl für eine Quantifizierung nicht ausreichte (Daten nicht gezeigt). Insgesamt weisen die Daten aber daraufhin, dass Donor-CD4⁺ T-Zellen verstärkt ins Gehirn von *C. neoformans*-infizierten RAG-1^{-/-} Mäusen rekrutiert werden.

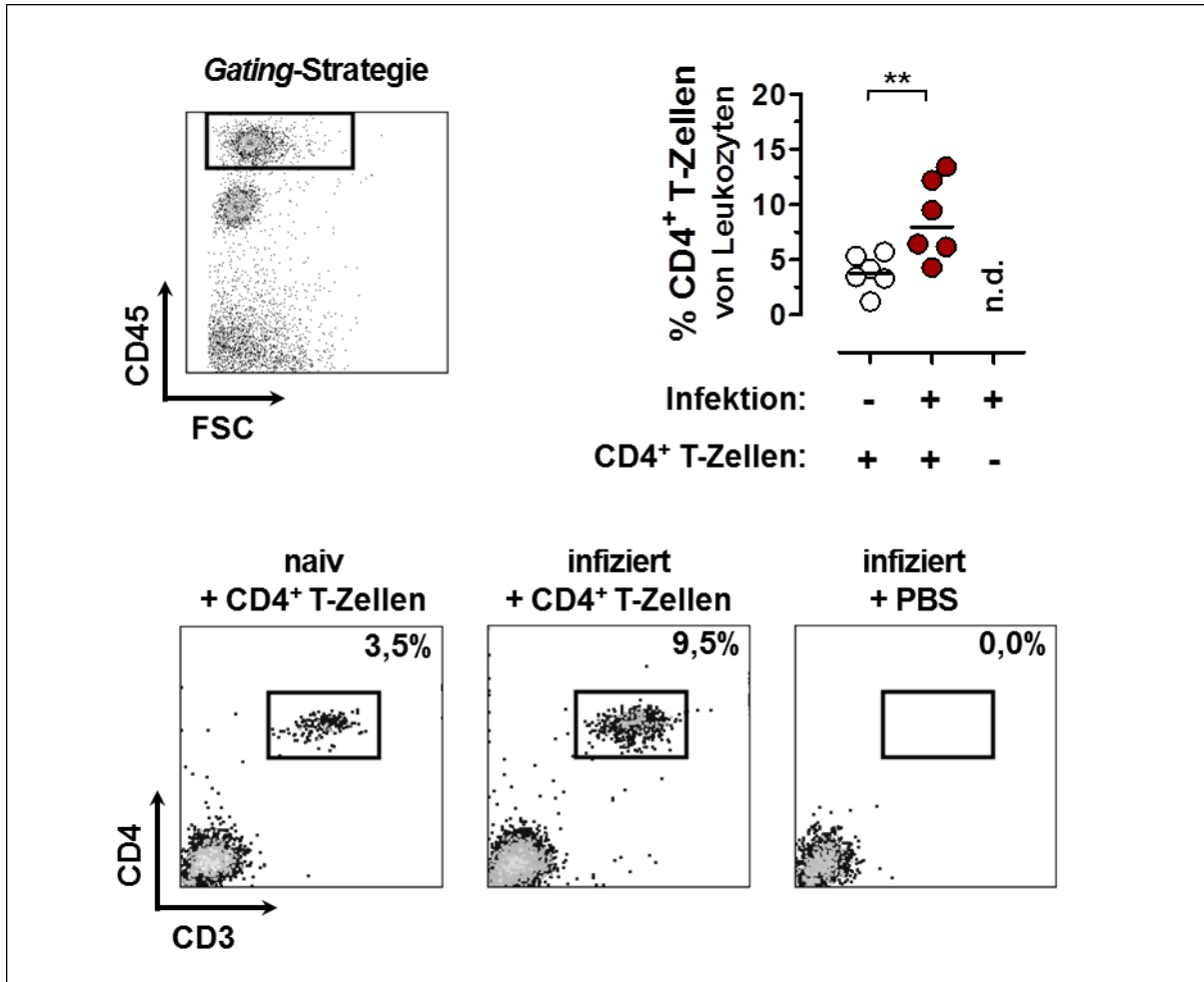


Abb. 9: Die Donor-CD4⁺ T-Zellen werden in *C. neoformans* infizierten RAG-1^{-/-} Mäusen verstärkt ins Gehirn rekrutiert. Der Versuchsaufbau entspricht dem in Abb. 6A dargestellten Schema. Die Frequenz an Donor-CD4⁺ T-Zellen innerhalb angereicherter Gehirnleukozyten wurde 8 Tage nach Transfer mittels Durchflusszytometrie ermittelt, indem nach dem Ausschluss von toten Zellen CD45⁺ Leukozyten eingegrenzt wurden und der Anteil an CD3⁺CD4⁺ Zellen bestimmt wurde. Repräsentative Ergebnisse der Analyse sind in der unteren Reihe gezeigt. Im Diagramm sind die Daten aus zwei unabhängigen Experimenten mit dem Median zusammengefasst. Die Gehirne von 3 Mäusen wurden jeweils vereinigt, sodass aus 9 Mäusen pro Gruppe pro Experiment jeweils 3 Einzelpunkte resultieren. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-Test. ** $P < 0,01$. n.d. nicht detektierbar.

3.2.2 Donor-CD4⁺ T-Zellen werden in *C. neoformans*-infizierten RAG-1^{-/-} Mäusen aktiviert und sind die Quelle von IFN- γ

CD4⁺ T-Zellen induzieren eine systemische Entzündung in *C. neoformans*-infizierten aber nicht in naiven RAG-1^{-/-} Mäusen (siehe Abb. 6, 7, 8 und 9). Daher war eine vergleichende Analyse der CD4⁺ Zellen in infizierten und naiven Rezipienten von Interesse. An Tag 8 nach Transfer waren die meisten CD4⁺ T-Zellen in der Lunge zu finden, wobei keine Unterschiede zwischen naiven und infizierten Rezipienten bestanden (siehe Abb. 10A). Aufgrund der geringen absoluten Zahlen im Gehirn erfolgten die Untersuchungen zur Proliferation und Aktivierung anhand der CD4⁺ T-Zellen in der Lunge. Mittels Durchflusszytometrie wurde in naiven und infizierten Rezipienten eine vergleichbar hohe Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 in den CD4⁺ T-Zellen detektiert (siehe Abb. 10B). Das weist auf die Lymphopenie-induzierte Proliferation der Spenderzellen in beiden Gruppen hin. Das Entzündungsgeschehen in *C. neoformans* infizierten RAG-1^{-/-} Rezipienten 8 Tage nach Transfer war jedoch mit einer erhöhten Expression des Aktivierungsmarkers CD69 auf den CD4⁺ T-Zellen assoziiert (siehe Abb. 10C).

Mittels intrazellulärer Zytokinfärbung wurde untersucht, inwiefern Donor-CD4⁺ T-Zellen und CD4⁻ Immunzellen des Rezipienten zur Produktion von IFN- γ beitragen (siehe Abb. 11). In *C. neoformans*-infizierten RAG-1^{-/-} Rezipienten produziert ein signifikant höherer Prozentsatz der Donor-CD4⁺ T-Zellen konstitutiv IFN- γ als in naiven Rezipienten (siehe Abb. 11A). Bezüglich der Frequenz an IFN- γ ⁺ CD4⁻ Rezipienten-Zellen wurde hingegen kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen festgestellt (siehe Abb. 11A). Im Überstand von Lungenzellen infizierter Rezipienten war ohne zusätzliche Stimulation bereits nach 6 h eine signifikant erhöhte Konzentration an IFN- γ im Vergleich zu Infektionskontrollen und naiven Rezipienten nachweisbar (siehe Abb. 11B). Insgesamt weisen die Ergebnisse darauf hin, dass die transferierten CD4⁺T-Zellen für die Produktion von IFN- γ in infizierten Rezipienten verantwortlich sind.

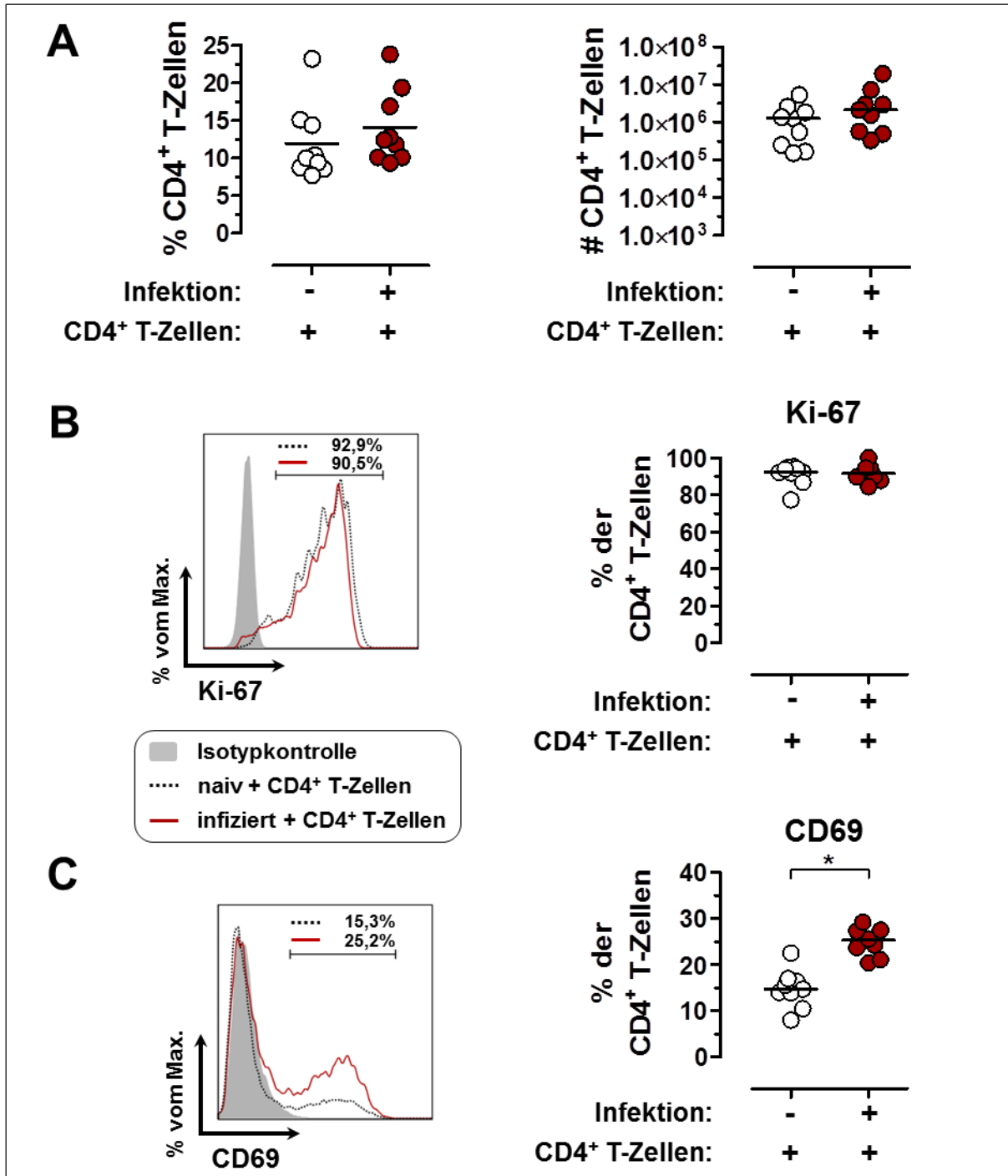


Abb. 10: Die Donor-CD4⁺ T-Zellen werden in *C. neoformans* infizierten RAG-1^{-/-} Rezipienten aktiviert. Der Versuchsaufbau entspricht dem in Abb. 6A dargestellten Schema. (A) An Tag 8 nach Transfer wurde in der Lunge von naiven und infizierten Rezipienten durchflusszytometrisch die Frequenz (links) sowie die absolute Anzahl (rechts) an vitalen CD4⁺ T-Zellen bestimmt. Die CD4⁺ T-Zellen wurden phänotypisch auf die Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 (B) sowie auf die Expression des Aktivierungsmarkers CD69 (C) hin untersucht. Auf der linken Seite sind jeweils repräsentative Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse dargestellt. In den Diagrammen sind die Datenpunkte der Einzeltiere sowie die Mediane eines repräsentativen Experimentes gezeigt (n=4). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-Test. * $P < 0,05$

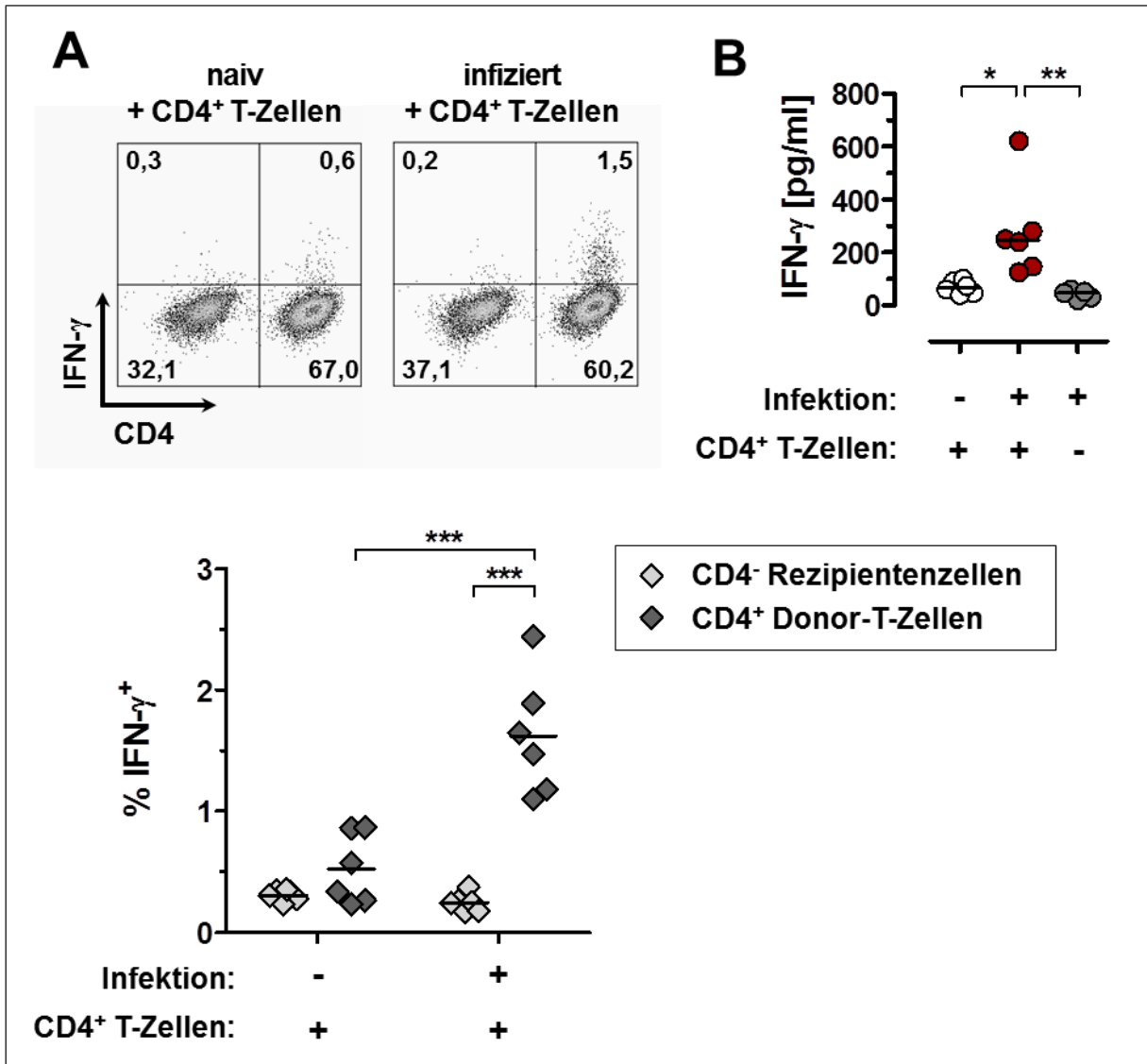


Abb. 11: Die Donor-CD4⁺ T-Zellen sind die Quelle von IFN- γ in *C. neoformans* infizierten RAG-1^{-/-} Rezipienten. Der Versuchsaufbau entspricht dem in Abb. 6A dargestellten Schema. (A) An Tag 8 nach Transfer wurde in der Lunge von naiven und infizierten Rezipienten mittels intrazellulärer Zytokinfärbung die Frequenz an Donor-CD4⁺ T-Zellen und CD4⁻ Rezipienten-Zellen bestimmt, die IFN- γ -produziert. Dazu wurden Lungenzellen für 6 h in der Anwesenheit des Sekretionshemmstoffes Brefeldin A kultiviert. Oben: Nach dem Ausschluss von toten Zellen wurden CD45⁺ Leukozyten eingegrenzt. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse der Expression von IFN- γ in Donor-CD4⁺ T-Zellen und CD4⁻ Rezipienten-Zellen. Unten: Im Diagramm sind die Datenpunkte der Einzeltiere sowie die Mittelwerte eines repräsentativen Experimentes gezeigt (n=4). Die statistische Auswertung erfolgte mittels einfaktorieller ANOVA mit Bonferroni-Post-Hoc-Test. *** $P < 0,001$. Die Frequenz an IFN- γ ⁺CD4⁻ Zellen in den Infektionskontrollen war vergleichbar mit der Frequenz in naiven und infizierten Rezipienten (Daten nicht gezeigt.) (B) Nach einer 6-stündigen Kultivierung von Lungenzellen ohne Brefeldin A wurde die Menge an IFN- γ im Überstand mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind die Datenpunkte der Einzeltiere sowie die Mediane eines repräsentativen Experimentes (n=4). Die statistische Auswertung erfolgte mittels einfaktorieller ANOVA mit Dunn's-Post-Hoc-Test. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

3.2.3 Kryptokokken-IRIS kann IFN- γ -unabhängig induziert werden

In den vorherigen Experimenten wurden die Donor-CD4⁺ T-Zellen als Quelle von IFN- γ identifiziert (siehe Abb. 11). Um die Bedeutung dieses Zytokins für die Induktion von Kryptokokken-IRIS zu untersuchen, wurden zur IFN- γ Produktion unfähige IFN- γ ^{-/-} CD4⁺ T-Zellen in *C. neoformans* infizierte RAG-1^{-/-} Mäuse transferiert (siehe Abb. 12A). Als Vergleich hierzu diente der Transfer von Wildtyp CD4⁺ T-Zellen, die IFN- γ produzieren können.

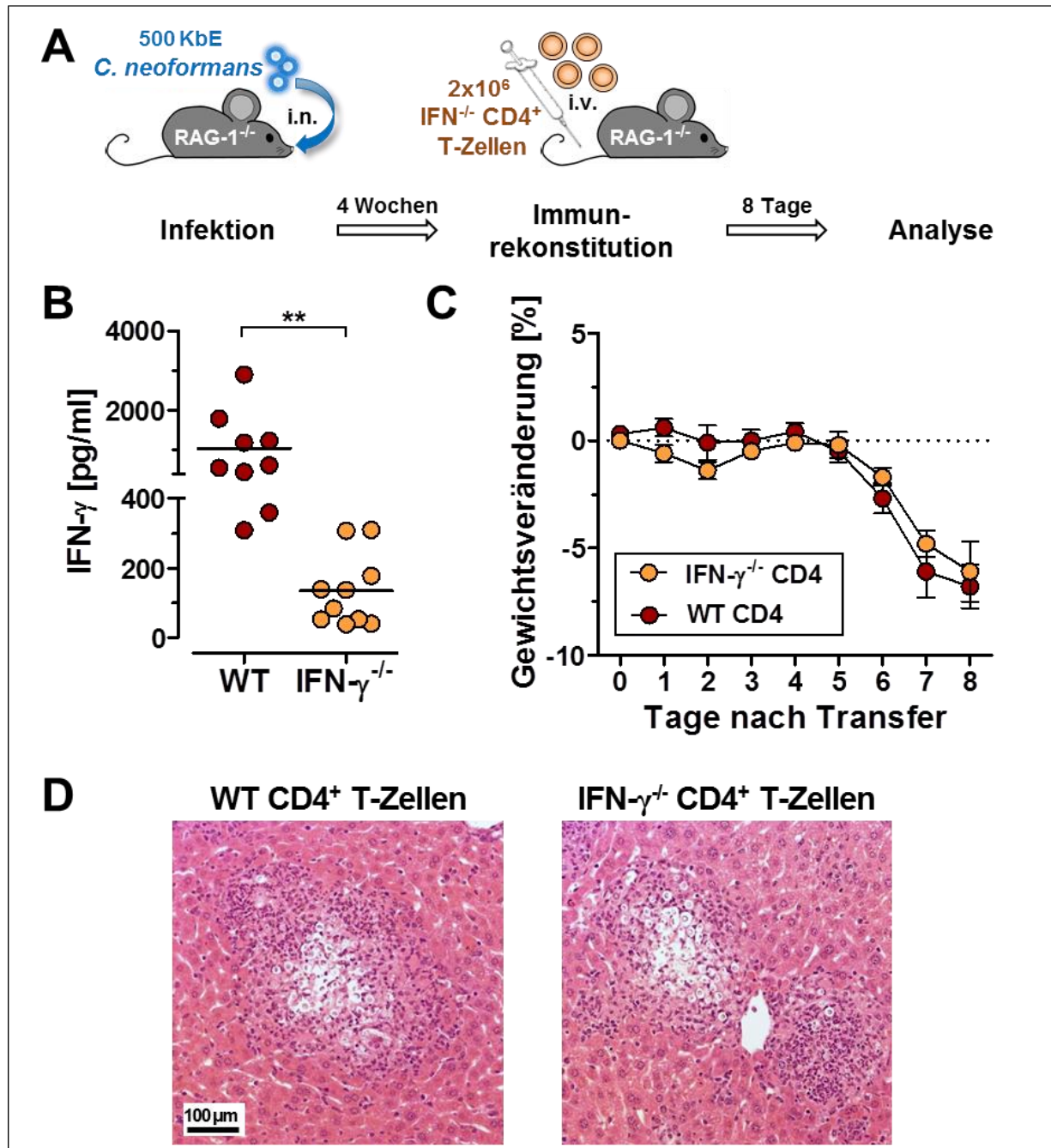


Abb. 12: Kryptokokken-IRIS wird im Mausmodell IFN- γ -unabhängig induziert. (A) Immundefiziente RAG-1^{-/-} Mäuse wurden intranasal (i.n.) mit 500 Kolonie-bildenden Einheiten (KbE) *C. neoformans* infiziert und 4 Wochen später durch den intravenösen (i.v.) Transfer von 2x10⁶ gereinigten Wildtyp (WT) oder IFN- γ ^{-/-} CD4⁺ T-Zellen aus naiven Spendermäusen immunrekonstituiert. (B) An Tag 8 nach Transfer wurde die Konzentration von IFN- γ im Serum mittels Multiplex-Analyse bestimmt. Dargestellt sind die Datenpunkte der Einzeltiere mit den Mittelwerten aus einem repräsentativen Experiment (n=2). Die statistische Auswertung erfolgte mittels einfaktorieller ANOVA mit Bonferroni-Post-Hoc-Test. ** $P < 0,01$. (C) Im Anschluss an die Immunrekonstitution wurde täglich das Gewicht der Mäuse bestimmt. Dargestellt ist eines von zwei unabhängigen Experimenten. Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert der Mäuse einer Gruppe am jeweiligen Tag mit Standardfehler (n=8-9). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Student's t-Test. (D) Die histopathologische Untersuchung der Leber mittels Hämatoxylin & Eosin (H&E)-Färbung zeigte 8 Tage nach dem Transfer in Rezipienten von WT und IFN- γ ^{-/-} CD4⁺ T-Zellen eine granulomatöse Entzündung. Vergrößerung: x200.

An Tag 8 nach Transfer war die IFN- γ -Serum-Konzentration in infizierten Rezipienten von IFN- γ ^{-/-} CD4⁺ T-Zellen wie erwartet signifikant geringer als in infizierten Rezipienten von Wildtyp CD4⁺ T-Zellen (siehe Abb. 12B) und entsprach jener in naiven Empfängermäusen von Wildtyp CD4⁺ T-Zellen (vgl. Abb. 12B und Abb. 7). Allerdings induzierte der Transfer von IFN- γ ^{-/-} CD4⁺ T-Zellen einen ähnlichen Gewichtsverlust (siehe Abb. 12C) sowie eine vergleichbare granulomatöse Entzündung in *C. neoformans* infizierten RAG-1^{-/-} Mäusen (siehe Abb. 12D) wie der Transfer von Wildtyp CD4⁺ T-Zellen. Das weist darauf hin, dass Kryptokokken-IRIS IFN- γ ^{-/-}-unabhängig induziert werden kann.

Um weiteren Aufschluss bezüglich der Pathogenese zu erhalten, war eine Untersuchung der IFN- γ ^{-/-}-abhängigen und -unabhängigen Effekte von Interesse. Die Serumkonzentrationen von IL-12p70, IL-6 und TNF- α waren in *C. neoformans* infizierten RAG-1^{-/-} Mäusen 8 Tage nach Transfer von IFN- γ ^{-/-} CD4⁺ T-Zellen genauso hoch wie nach dem Transfer von Wildtyp CD4⁺ T-Zellen (siehe Abb. 13A). Das lässt darauf schließen, dass die systemische Freisetzung dieser proinflammatorischen Zytokine IFN- γ -unabhängig induziert wird. Im Unterschied dazu war die Serum-Konzentration des Th2-assoziierten Zytokins IL-5 in infizierten Rezipienten von IFN- γ ^{-/-} CD4⁺ T-Zellen signifikant erhöht (siehe Abb. 13A). Es ist bekannt, dass die Expression von MHC-II in Mikrogliazellen und Makrophagen IFN- γ -abhängig induziert wird¹²⁷. Dementsprechend war 8 Tage nach Transfer in *C. neoformans*-infizierten RAG-1^{-/-} Rezipienten von Wildtyp- aber nicht von IFN- γ ^{-/-} CD4⁺ T-Zellen eine erhöhte Expression von MHC-II auf Mikrogliazellen nachweisbar (siehe Abb. 13B). Dagegen unterschied sich die Transkription von IP-10 in Mikrogliazellen nicht zwischen *C. neoformans*-infizierten RAG-1^{-/-} Rezipienten von Wildtyp und IFN- γ ^{-/-} CD4⁺ T-Zellen (siehe Abb. 13B). Auch die

Rekrutierung der Donor-CD4⁺ T-Zellen (siehe Abb.13D) ins Gehirn sowie deren Aktivierung (siehe Abb.13E) waren in *C. neoformans*-infizierten RAG-1^{-/-} Rezipienten von IFN- γ ^{-/-} und Wildtyp CD4⁺ T-Zellen vergleichbar. Die IFN- γ -unabhängigen Effekte könnten entsprechend der in Abb. 15 dargestellten Abbildung an der Induktion von Kryptokokken-IRIS beteiligt sein.

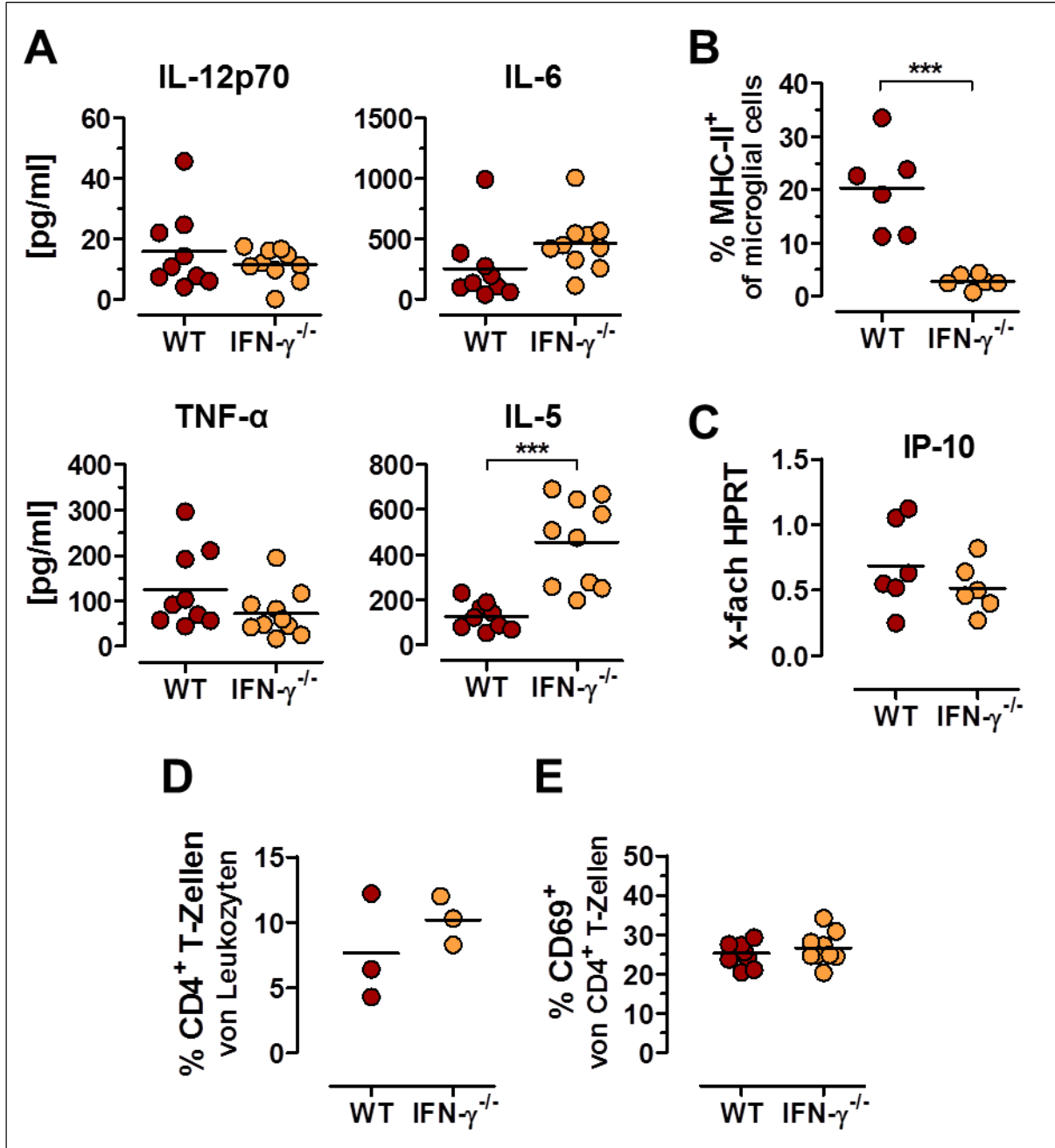


Abb. 13: IFN- γ -abhängige und -unabhängige Effekte im Kryptokokken-IRIS-Mausmodell. Der Versuchsaufbau entspricht dem in Abb. 12A dargestellten Schema. **(A)** An Tag 8 nach Transfer wurde die Konzentration von IL-12p70, IL-6, TNF- α und IL-5 im Serum mittels Multiplex-Analyse bestimmt. Dargestellt sind die Datenpunkte der Einzeltiere mit den Mittelwerten aus einem repräsentativen Experiment ($n=2$). Die statistische Auswertung erfolgte mittels einfaktorieller ANOVA mit Bonferroni-Post-Hoc-Test. *** $P<0,001$. **(B)** An Tag 8 nach Transfer wurde durchflusszytometrisch die Expression von MHC-II auf Mikrogliazellen analysiert. Die Vorgehensweise bei der Auswertung ist in Abb. 8A gezeigt. Im Diagramm sind die Daten aus zwei unabhängigen Experimenten mit dem Mittelwert zusammengefasst. Die Gehirne von 3 Mäusen wurden jeweils vereinigt, sodass aus 9 Mäusen pro Gruppe pro Experiment jeweils 3 Einzelpunkte resultieren. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Student's t-Test. *** $P<0,001$. **(C)** Mikrogliazellen wurden an Tag 8 nach Transfer isoliert und auf die Transkription von IP-10 hin untersucht. Dargestellt sind die Daten aus zwei unabhängigen Experimenten mit dem Mittelwert. Die Gehirne von 3 Mäusen wurden jeweils vereinigt, sodass aus 9 Mäusen pro Gruppe pro Experiment jeweils 3 Einzelpunkte resultieren. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Student's t-Test. **(D)** An Tag 8 nach Transfer wurde die Frequenz an Donor-CD4⁺ T-Zellen innerhalb angereicherter Gehirnleukozyten mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Vorgehensweise bei der Auswertung ist in Abb. 9 dargestellt. Im Diagramm sind die Daten aus 2 unabhängigen Experimenten mit dem Mittelwert zusammengefasst. Die Gehirne von 3 Mäusen wurden vereinigt, sodass aus 9 Mäusen pro Gruppe pro Experiment 3 Einzelpunkte resultieren. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Student's t-Test. **(E)** Die Donor-CD4⁺ T-Zellen wurden an Tag 8 nach Transfer auf die Expression des Aktivierungsmarkers CD69 hin untersucht. Die Vorgehensweise bei der Auswertung ist in Abb. 9 erklärt. Dargestellt sind die Datenpunkte der Einzeltiere sowie die Mediane eines repräsentativen Experimentes ($n=2$). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-Test.

4 DISKUSSION

4.1 ETABLIERUNG EINES MAUSMODELLS FÜR KRYPTOKOKKEN-IRIS

Bei Kryptokokken-IRIS handelt es sich um ein lebensbedrohliches Entzündungsgeschehen das auftreten kann, wenn es im Kontext einer Kryptokokken-Infektion infolge einer Immunsuppression zu einer raschen Wiederherstellung des Immunsystems kommt. Insbesondere bei der ART von HIV-infizierten Patienten stellt Kryptokokken-IRIS ein schwerwiegendes medizinisches Problem dar^{94,95}. Die Therapie von Kryptokokken-IRIS ist momentan auf die Gabe von Kortikosteroiden beschränkt, die allerdings aufgrund ihrer breiten immunsupprimierenden Wirkung wiederum opportunistische Infektionen begünstigen können¹⁰⁷. Die Entwicklung gezielter Behandlungsstrategien gegen Kryptokokken-IRIS setzt Kenntnisse der zugrunde liegenden immunpathologischen Mechanismen voraus. In der vorliegenden Studie wurde daher ein experimentelles Tiermodell für Kryptokokken-IRIS etabliert, das erstmals eine systematische Untersuchung der Krankheitsentstehung ermöglicht. Als Grundlage für den Versuchsaufbau dienten immundefiziente RAG-1^{-/-} Mäuse, welche durch das Fehlen von T- und B-Zellen gekennzeichnet sind¹¹⁸. Um den natürlichen Infektionsweg nachzustellen wurden die lymphopenischen RAG-1^{-/-} Mäuse intranasal mit einem virulenten Kryptokokkenstamm infiziert. Da in Patienten die Dissemination von *C. neoformans* vor Beginn der ART mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von IRIS assoziiert ist¹¹⁰, wurde im Mausmodell mit der Immunrekonstitution abgewartet, bis ebenfalls ein Hinweis auf die hämatogene Streuung des Pilzes vorlag. Dies war vier Wochen nach der Infektion der Fall, als der Hauptkapselbestandteil von *C. neoformans* Glucuronoxylomannan (GXM) im Serum der Mäuse nachgewiesen werden konnte (siehe Abb. 5B). Daraufhin wurde die Immunrekonstitution in den *C. neoformans*-infizierten RAG-1^{-/-} Mäusen durch den adoptiven Transfer von Splenozyten aus gesunden Wildtyp-Spendermäusen simuliert. Der rasche Gewichtsverlust der Mäuse im Vergleich zu Infektionskontrollen (siehe Abb. 5C) lieferte bereits ein Anzeichen dafür, dass die Immunrekonstitution pathologische Prozesse induziert. Tatsächlich konnte bereits zwei Wochen nach dem Transfer der Splenozyten eine für Kryptokokken-IRIS charakteristische granulomatöse Entzündung⁸⁹ in *C. neoformans*-infizierten RAG-1^{-/-} Rezipienten beobachtet werden (siehe Abb. 5D). Die Etablierung des ersten Mausmodells für Kryptokokken-IRIS war somit erfolgreich. Durch gezielte

experimentelle Variationen konnte darauf basierend der Einfluss einzelner immunologischer Faktoren auf die Krankheitsentstehung studiert werden.

4.2 CHARAKTERISIERUNG DES KRYPTOKOKKEN-IRIS-MAUSMODELLS

4.2.1 Zentrale Rolle von CD4⁺ T-Zellen

Das Auftreten von Kryptokokken-IRIS in ART-behandelten HIV-Patienten¹²⁴ weist auf eine zentrale Rolle von CD4⁺ T-Zellen in der Pathogenese hin. Dies konnte im Mausmodell bestätigt werden¹²⁸. So reichte der Transfer gereinigter CD4⁺ T-Zellen aus, um ein entsprechendes Entzündungsgeschehen in *C. neoformans*-infizierten RAG-1^{-/-} Mäusen zu induzieren (siehe Abb. 6). Neben CD4⁺ T-Zellen besitzen RAG-1^{-/-} Mäuse auch keine CD8⁺ T-Zellen und keine B-Zellen¹¹⁸. Die Rekonstitution von CD4⁺ T-Zellen verursachte in *C. neoformans*-infizierten RAG-1^{-/-} Rezipienten aber ein vergleichbares klinisches Bild wie der Transfer von Gesamt-Splenozyten. Daraus kann geschlossen werden, dass CD8⁺ T-Zellen und B-Zellen für die Induktion von Kryptokokken-IRIS entbehrlich sind.

4.2.2 Infektionsabhängigkeit der IRIS-Induktion

Ein langanhaltender Zustand der Lymphopenie ist mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von IRIS verbunden¹²⁹. Es ist bekannt, dass T-Zellen in einer lymphopenischen Umgebung als Reaktion auf Selbstantigene, die über MHC-Moleküle präsentiert werden, spontan proliferieren¹²¹. Ursächlich für diese sogenannte Lymphopenie-induzierte Proliferation ist der verbesserte Zugang zu Antigen-präsentierenden Zellen sowie zu limitierenden Wachstumsfaktoren, wie IL-7 und IL-15, um die die Zellen normalerweise konkurrieren¹³⁰. Die Lymphopenie-induzierte Proliferation kann mit einem Verlust der T-Zellrezeptor-Diversität einhergehen und wurde mit Immunpathologien in Verbindung gebracht¹³¹. Für Autoimmunerkrankungen wurde ein *Two-Hit*-Modell postuliert¹³². Demnach ist für die Induktion von Autoimmunität die Kombination von mindestens zwei Faktoren notwendig. Die Lymphopenie stellt dabei einen Faktor dar. Zum Zusammenbruch der Selbsttoleranz kommt es jedoch erst, wenn die Balance zusätzlich durch einen weiteren Faktor gestört wird. Dies können genetische Prädispositionen, Umweltfaktoren oder das Fehlen von

regulatorischen Mechanismen sein¹³². Im Mausmodell wird IRIS in *C. neoformans*-infizierten, nicht aber in naiven, lymphopenischen RAG-1^{-/-} Mäusen induziert (siehe Abb. 6). Für die Entstehung von Kryptokokken-IRIS kann demzufolge ebenfalls ein *Two-Hit*-Modell postuliert werden, bei dem die Anwesenheit von Kryptokokken-Antigenen als zweiter Faktor für die Induktion der überschießenden Entzündungsreaktion in einer lymphopenischen Umgebung fungiert (siehe Abb. 14).

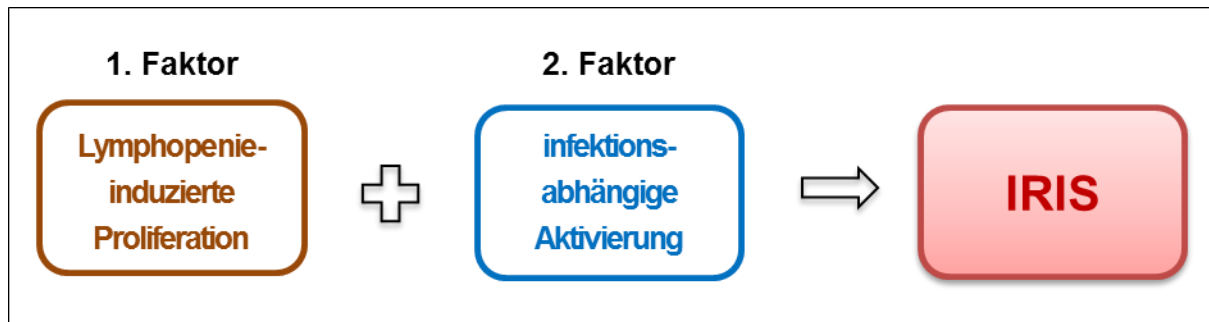


Abb. 14: *Two-Hit*-Modell der Kryptokokken-IRIS-Entstehung. Für die Induktion von Kryptokokken-IRIS sind zwei Faktoren notwendig: (1) die lymphopenische Umgebung, die eine spontane Expansion von rekonstituierten T-Zellen ermöglicht und (2) das Vorhandensein von Kryptokokken-Antigenen, die das Immunsystem zusätzlich aktivieren (adaptiert nach¹³²).

4.2.3 Potentielle Zytokinmediatoren

In klinischen Studien wurde das Zytokinprofil von HIV-Patienten vor und nach der ART bestimmt^{108,111}. Dabei zeigte sich, dass in IRIS-Patienten der Mangel an proinflammatorischen Zytokinen vor Beginn der ART während der Immunrestitution besonders rasch aufgehoben und sogar in einen Überschuss („Zytokinsturm“) umgekehrt wird. So liegen im Serum von Kryptokokken-IRIS-Patienten kurz nach ART-Beginn erhöhte Konzentrationen des Akute-Phase-Reaktion-auslösenden Zytokins IL-6 sowie des Akute-Phase-Proteins C-reaktives Protein (CRP) vor. Auch Wachstumsfaktoren (IL-7 und G-CSF) sowie Th2-assoziierte Zytokine, wie z.B. IL-13 sind in hohen Mengen nachweisbar¹¹¹. Zum Zeitpunkt der IRIS-Diagnose sind zusätzlich die Th1-assoziierten Zytokine IFN- γ und TNF- α im Vergleich zu ART-behandelten HIV-Patienten, die kein IRIS entwickeln, stark erhöht¹⁰⁸. Basierend auf den Ergebnissen dieser Studien wurde die Vermutung aufgestellt, dass die Unfähigkeit der *C. neoformans*-Kontrolle vor ART in Zellen des angeborenen Immunsystems ein verstärktes proinflammatorisches Potential induzieren könnte, das infolge der Immunrestitution eine

unkontrollierte Th1-dominierte Immunreaktion gegen persistierende Kryptokokken-Antigene fördert, die schließlich in IRIS resultiert¹¹⁶. Das im Rahmen der vorliegenden Arbeit neu etablierte Mausmodell für Kryptokokken-IRIS eignet sich zur Überprüfung entsprechender Hypothesen. Dazu wurde zunächst in einer kinetischen Analyse die Serumkonzentration proinflammatorischer Zytokine nach der Rekonstitution der CD4⁺ T-Zellen bestimmt. Wie erwartet äußerte sich die IRIS-charakteristische Entzündung in *C. neoformans*-infizierten RAG-1^{-/-} Rezipienten von CD4⁺ T-Zellen auch in der systemischen Freisetzung proinflammatorischer Zytokine. Als potentielle molekulare Mediatoren waren 8 Tage nach dem Transfer der CD4⁺ T-Zellen IL-12p70, IFN- γ , IL-6 und TNF- α im Serum von *C. neoformans*-infizierten RAG-1^{-/-} Rezipienten nachweisbar (siehe Abb. 7). Die systemische Freisetzung von Th1- (IL-12p70, IFN- γ , TNF- α) und Th2- (IL-5) assoziierten Zytokinen weist auf ein komplexes inflammatorisches Geschehen hin, das auch in Kryptokokken-IRIS-Patienten beobachtet wird¹¹¹. An Tag 1 und 3 nach dem Transfer von CD4⁺ T-Zellen waren nur marginale Mengen von IL-12p70, IFN- γ , IL-6, TNF- α und IL-5 im Serum von *C. neoformans*-infizierten RAG-1^{-/-} Mäusen vorhanden. Die Untersuchung des Aufkommens dieser Zytokine zwischen Tag 3 und Tag 8 nach Transfer der CD4⁺ T-Zellen könnte somit in weiterführenden Studien weitere wertvolle Hinweise hinsichtlich ihrer Kinetik geben. IL-17A, IL-2 und IL-1 β konnten auch 8 Tage nach Transfer nicht im Serum von *C. neoformans*-infizierten RAG-1^{-/-} Rezipienten detektiert werden und spielen demzufolge vermutlich eine untergeordnete Rolle in der IRIS-Pathogenese. Besonders auffallend war im Kryptokokken-IRIS-Mausmodell die massive systemische Freisetzung von IFN- γ , das normalerweise eine Schlüsselrolle in der schützenden Immunantwort gegen *C. neoformans* einnimmt^{66,81,133} (siehe Abb. 2). Die Organlast in Lunge und Gehirn unterschied sich jedoch 8 Tage nach dem Transfer der CD4⁺ T-Zellen nicht zwischen *C. neoformans*-infizierten RAG-1^{-/-} Rezipienten und Infektionskontrollen (siehe Abb. 6D). Daraus kann geschlossen werden, dass die systemische Freisetzung der Zytokine nicht zu einer verbesserten Erregerkontrolle beiträgt. Als therapeutische Maßnahme wäre daher eine Blockade dieser potentiellen molekularen Mediatoren von Kryptokokken-IRIS durchaus denkbar. Dazu muss aber zunächst geklärt werden, inwiefern sie tatsächlich für die IRIS-Pathogenese relevant sind. In der vorliegenden Studie wurde der Einfluss von IFN- γ genauer beleuchtet. Mittels intrazellulärer Zytokinfärbung wurden die Donor-CD4⁺ T-Zellen als Quelle von IFN- γ identifiziert (siehe Abb. 11). Somit konnte durch den Transfer von IFN- γ ^{-/-} CD4⁺ T-Zellen in *C. neoformans*-

infizierte RAG-1^{-/-} Mäuse die Rolle von IFN- γ für die Induktion von Kryptokokken-IRIS untersucht werden. Wie erwartet entsprach die IFN- γ -Serum-Konzentration in *C. neoformans*-infizierten IFN- γ ^{-/-} CD4⁺ T-Zell-Rezipienten jener in naiven Wildtyp (IFN- γ ^{+/+}) CD4⁺ T-Zell-Rezipienten (vgl. Abb. 12B und Abb. 7). Während naive Wildtyp CD4⁺ T-Zell-Rezipienten kein IRIS entwickelten (siehe Abb. 6), zeigten *C. neoformans*-infizierte RAG-1^{-/-} Rezipienten von IFN- γ ^{-/-} CD4⁺ T-Zellen jedoch interessanterweise einen ähnlichen Gewichtsverlust und eine vergleichbare granulomatöse Entzündung wie *C. neoformans*-infizierte RAG-1^{-/-} Rezipienten von Wildtyp CD4⁺ T-Zellen (siehe Abb. 12). Das weist darauf hin, dass Kryptokokken-IRIS IFN- γ -unabhängig induziert werden kann. Im Unterschied dazu trägt IFN- γ entscheidend zur Entstehung von *Mycobacterium avium*-IRIS bei¹³⁴. Daraus kann geschlossen werden, dass die IRIS-induzierenden Mechanismen je nach assoziiertem opportunistischen Pathogen sehr unterschiedlich sein können. Während TNF- α bei *M. avium*-IRIS IFN- γ -abhängig sezerniert wird, erfolgt bei Kryptokokken-IRIS die systemische Freisetzung von TNF- α , IL-6 und IL-12p70 unabhängig von IFN- γ (siehe Abb. 13A). Möglicherweise können bei Kryptokokken-IRIS die anderen proinflammatorischen Zytokine für IFN- γ kompensieren und erst die kombinierte Blockade mehrerer Zytokine kann die Entstehung der Erkrankung verhindern. Das kann in nachfolgenden Studien mit Hilfe des hier etablierten Mausmodells überprüft werden. Entsprechende Experimente sollten auch Aufschluss darüber geben, ob IFN- γ im späteren Verlauf von Kryptokokken-IRIS zur Pathogenese beiträgt oder nur einen Biomarker darstellt. Weiterhin kann das Mausmodell zur Identifikation der zellulären Quellen von IL-12, TNF- α und IL-6 genutzt werden. Während für die Produktion von IL-12 vornehmlich Antigen-präsentierende Zellen beschrieben sind¹³⁵, können TNF- α und IL-6 von einer Reihe hämatopoetischer und nicht-hämatopoetischer Zellen gebildet werden^{136,137}. Erste Untersuchungen bezüglich der Quelle von IL-6 im Kryptokokken-IRIS-Mausmodell weisen auf nicht-hämatopoetische Zellen hin (Daten nicht gezeigt). IL-6^{-/-} CD4⁺ T-Zellen induzierten ein vergleichbares Entzündungsgeschehen in *C. neoformans*-infizierten RAG-1^{-/-} Mäusen wie Wildtyp CD4⁺ T-Zellen (Daten nicht gezeigt). Auch die Serumkonzentration von IL-6 war gleich. Daraus kann geschlossen werden, dass die Donor-CD4⁺ T-Zellen für die systemische IL-6-Freisetzung nicht entscheidend sind. Die erhöhte Serumkonzentration von IL-5 in Rezipienten von IFN- γ ^{-/-} CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zu Wildtyp CD4⁺ T-Zell-Rezipienten (siehe Abb. 13A) ist vermutlich darauf

zurückzuführen, dass die Differenzierung von Th2-Zellen in der Abwesenheit von IFN- γ begünstigt ist¹³⁸.

4.2.4 IFN- γ -unabhängige Induktion von Kryptokokken-IRIS

Eine neue wichtige Erkenntnis der Charakterisierung des im Rahmen der vorliegenden Studie etablierten Mausmodells besteht darin, dass Kryptokokken-IRIS IFN- γ -unabhängig induziert werden kann (siehe Abb. 12). IFN- γ -abhängige Effekte, wie die erhöhte MHC-II-Expression in Mikrogliazellen, tragen demzufolge nicht unmittelbar zur Krankheitsentstehung bei (siehe Abb. 15). Eine basale Expression von MHC-II lag jedoch auch in Rezipienten von IFN- γ ^{-/-} CD4⁺ T-Zellen vor. Inwiefern die Antigen-Präsentation für die Aktivierung der CD4⁺ T-Zellen und die Induktion von Kryptokokken-IRIS entscheidend ist, könnte in weiterführenden Studien durch den Transfer von CD4⁺ T-Zellen in MHC-II-defiziente RAG-1^{-/-} Mäuse untersucht werden. Interessanterweise wurde die Transkription des IFN- γ -induzierten Proteins 10 (IP-10) in Mikrogliazellen, im Unterschied zur MHC-II Expression, unabhängig von IFN- γ aus CD4⁺ T-Zellen induziert (siehe Abb. 13C) und war mit einer verstärkten Rekrutierung der Donor-CD4⁺ T-Zellen ins Gehirn assoziiert (siehe Abb. 13D). Eine erhöhte Konzentration von IP-10, das chemotaktisch auf CD4⁺ T-Zellen wirkt¹²⁶, ist auch in der CSF von Kryptokokken-IRIS-Patienten zu beobachten¹³⁹. Die gesteigerte IP-10-Produktion durch Mikrogliazellen im Kryptokokken-IRIS-Mausmodell weist auf deren Aktivierung im Zuge der Rekonstitution von CD4⁺ T-Zellen hin und lässt auf eine Beteiligung bei der Induktion von Kryptokokken-IRIS schließen (siehe Abb. 15). Ob IP-10 tatsächlich für die Rekrutierung der Donor-CD4⁺ T-Zellen ins Gehirn verantwortlich ist, müsste in nachfolgenden Experimenten durch den Einsatz von IP-10-defizienten RAG-1^{-/-} Empfängermäusen verifiziert werden. Die im Rahmen der vorliegenden Studie erhaltenen Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen für die Induktion von Kryptokokken-IRIS entscheidend ist (siehe Abb. 15). So wiesen die Donor-CD4⁺ T-Zellen unabhängig von der Fähigkeit zur IFN- γ -Produktion bereits eine Woche nach dem Transfer in *C. neoformans*-infizierte RAG-1^{-/-} Rezipienten eine erhöhte Expression des Aktivierungsmarkers CD69 auf. NK-Zellen des Rezipienten waren hingegen nicht durch eine verstärkte CD69-Expression gekennzeichnet (Daten nicht gezeigt). Weiterführende Untersuchungen anhand des hier etablierten Mausmodells sind notwendig, um den Mechanismus der CD4⁺ T-Zell-Aktivierung aufzuklären. Dabei wird von besonderem

Interesse sein, ob die Pathogenese von der Spezifität der $CD4^+$ T-Zellen gegenüber Kryptokokken-Antigenen abhängt. Dies kann überprüft werden, indem $CD4^+$ T-Zellen aus DO11.10 Spendermäusen, die spezifisch das irrelevante Antigen Ovalbumin erkennen¹⁴⁰ in *C. neoformans*-infizierte RAG-1^{-/-} Mäuse transferiert werden. Die Analyse der $CD4^+$ T-Zell-Aktivierung sollte maßgeblich zum Verständnis der Kryptokokken-IRIS-Entstehung beitragen.

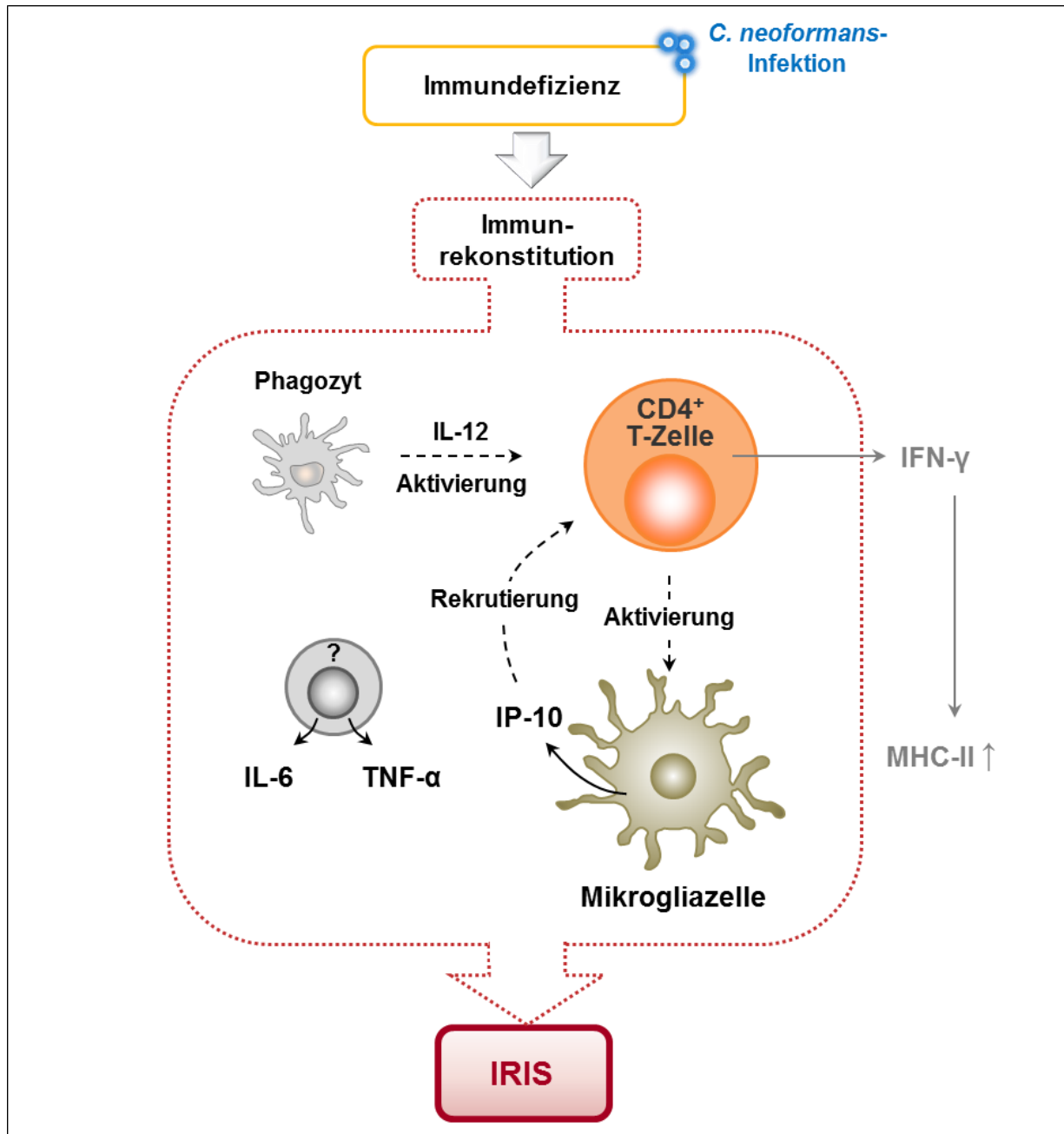


Abb. 15: Schematische Übersicht einer ersten Charakterisierung der Kryptokokken-IRIS-Entstehung im Mausmodell. CD4⁺ T-Zellen spielen eine zentrale Rolle in der Pathogenese. Sie werden über einen bislang unbekanntem Mechanismus vermutlich durch Signale von Phagozyten infektionsabhängig aktiviert und zur Produktion von IFN- γ angeregt. IFN- γ -abhängige Effekte, wie die erhöhte Expression von MHC-II in Mikrogliazellen, sind jedoch für die Induktion von Kryptokokken-IRIS nicht essentiell. Die Krankheitsentstehung ist mit der Aktivierung von Mikrogliazellen assoziiert, die IP-10 exprimieren und dadurch vermutlich in der Lage sind, verstärkt CD4⁺ T-Zellen ins Gehirn zu rekrutieren. Die proinflammatorischen Zytokine IL-12, IL-6 und TNF- α stellen potentielle Mediatoren von Kryptokokken-IRIS dar.

4.3 LIMITATIONEN DES KRYPTOKOKKEN-IRIS-MAUSMODELLS

Im Kryptokokken-IRIS-Mausmodell werden durch die Immunrestitution *C. neoformans*-infizierter lymphopenischer RAG-1^{-/-} Mäuse die wesentlichen Aspekte der humanen Erkrankung simuliert. Damit bietet es ein System, in dem die grundlegenden Pathogenese-Mechanismen systematisch erforscht werden können. Allerdings weist es, wie jedes Tiermodell, auch einige Limitationen auf, da es die diverse klinische Situation nicht in ihrer ganzen Komplexität widerspiegeln kann. Demaskierendes und paradoxes Kryptokokken-IRIS stellen zwei unterschiedliche klinische Szenarien der Erkrankung dar⁹⁴ (siehe Abb. 4). Bei demaskierendem IRIS liegt eine subklinische Kryptokokkeninfektion vor, die vor Beginn der ART nicht diagnostiziert wurde. Paradoxes IRIS tritt hingegen nach erfolgreicher antifungaler Therapie im Rahmen der Immunrestitution auf und ist vermutlich auf das Vorhandensein von Kryptokokken-Antigendepots zurückzuführen¹⁰². Die IRIS-Induktion im Mausmodell beruht aktuell auf einer aktiven Kryptokokken-Infektion und stellt demzufolge demaskierendes IRIS dar. In nachfolgenden Experimenten könnte jedoch auch paradoxes Kryptokokken-IRIS im Mausmodell untersucht werden, indem *C. neoformans*-infizierte RAG-1^{-/-} Mäuse vor dem Transfer von CD4⁺ T-Zellen antifungal behandelt werden. Während RAG-1^{-/-} Mäuse aufgrund des vollständigen Fehlens von Lymphozyten einen extremen Grad der Immundefizienz aufweisen, sind in Kryptokokken-IRIS-Patienten zum Zeitpunkt der Immunrestitution noch geringe CD4⁺ T-Zellzahlen vorhanden. *C. neoformans*-spezifische Gedächtnis-CD4⁺ T-Zellen könnten demzufolge entscheidend die Induktion von IRIS fördern. Anhaltspunkte diesbezüglich könnten sich im Mausmodell durch den Transfer von Antigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen aus *C. neoformans*-infizierten Spendermäusen¹⁴¹ im Vergleich zu naiven CD4⁺ T-Zellen in *C. neoformans*-infizierten RAG-1^{-/-} Mäuse ergeben. Die Inzidenz

von Kryptokokken-IRIS bei ART-behandelten HIV-Patienten liegt bei etwa 20%⁸⁸. Daher könnte eine vergleichende Analyse der immunologischen Mechanismen, die der Entwicklung von Kryptokokken-IRIS zugrunde liegen und jener, die zur Wiederherstellung des Immunschutzes führen, entscheidend zum Verständnis der Pathogenese beitragen. Entsprechende Untersuchungen sind jedoch in dem hier etablierten Mausmodell nicht möglich, da alle *C. neoformans*-infizierten RAG-1^{-/-} Mäuse infolge der Immunrestitution IRIS entwickeln. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass im Mausmodell durch den extremen Grad der Immundefizienz in RAG-1^{-/-} Mäusen, die Dissemination der *C. neoformans*-Infektion und die fulminante Immunrestitution alle drei Risikofaktoren für die Entwicklung von Kryptokokken-IRIS erfüllt sind^{85,109,110}.

4.4 AUSBLICK

Trotz der Limitationen stellt das hier etablierte Kryptokokken-IRIS-Mausmodell ein neues nützliches System für die Erforschung der Pathogenese dar. In weiterführenden Untersuchungen kann es unter anderem dazu genutzt werden, die wichtige Frage nach den IRIS-auslösenden Komponenten von *C. neoformans* zu klären. Auch ein Ungleichgewicht zwischen proinflammatorischen Effektormechanismen und regulatorischen Mechanismen könnte für die Pathogenese ursächlich sein¹⁰². Obwohl Kryptokokken-IRIS nicht mit einer geringeren Anzahl an regulatorischen T-Zellen assoziiert ist¹⁴², könnte eine eingeschränkte Funktionalität dieser Zellen zur Krankheitsentstehung beitragen. Durch die Manipulation weiterer potentieller zellulärer und molekularer Mediatoren, die sich aus der vorliegenden Arbeit (siehe Abb. 15) sowie aus klinischen Studien^{108,111,139} ableiten, werden sich neue Erkenntnisse bezüglich der Entstehung des unkontrollierten Entzündungsgeschehens ergeben. Unzweifelhaft wird dies zur Entwicklung neuer Therapieansätze beitragen, die wiederum anhand des präklinischen Kryptokokken-IRIS-Mausmodells erprobt werden können.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Infektion mit dem opportunistischen fungalen Erreger *Cryptococcus neoformans* kann in immungeschwächten Individuen nicht adäquat kontrolliert werden und eine lebensbedrohliche Hirnhautentzündung hervorrufen. Maßnahmen der Immunrestitution, wie z.B. die antiretrovirale Therapie (ART) von Patienten, die mit dem Humanen Immundefizienz-Virus (HIV) infiziert sind, zielen darauf ab, den Schutz vor opportunistischen Infektionen wiederherzustellen. Allerdings kann die rasche Aufhebung einer Immunsuppression im Kontext einer Kryptokokken-Infektion ein pathologisches Entzündungsgeschehen hervorrufen, das als *C. neoformans*-assoziiertes Immunrestitution-Inflammationssyndrom (Kryptokokken-IRIS) bezeichnet wird. Kryptokokken-IRIS stellt ein gravierendes medizinisches Problem mit hoher Morbidität und Mortalität dar. Bislang ist wenig über die Pathogenese bekannt. Die Behandlung beschränkt sich daher aktuell auf die Gabe von Kortikosteroiden, die aufgrund ihrer breiten immunsupprimierenden Wirkung jedoch wiederum für opportunistische Infektionen prädisponieren. Um diesen Teufelskreis zu durchbrechen, müssen gezielte Therapieansätze entwickelt werden. Dazu ist eine detaillierte, systematische Untersuchung der auslösenden immunpathologischen Mechanismen notwendig. Ein geeignetes experimentelles Tiermodell sollte entscheidend zum grundlegenden Verständnis der Pathogenese von Kryptokokken-IRIS beitragen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, das erste Tiermodell für Kryptokokken-IRIS zu etablieren und zu charakterisieren. Das Modell basiert auf immundefizienten, RAG-1^{-/-} Mäusen, die aufgrund eines Defekts des Rekombination-aktivierenden Gens 1 keine T- und B-Zellen besitzen. In diesen Mäusen konnte IRIS induziert werden, indem sie mit *C. neoformans* infiziert und 4 Wochen später durch den Transfer von Splenozyten aus Wildtyp-Spendermäusen immunrestituiert wurden. So wiesen *C. neoformans*-infizierte RAG-1^{-/-} Rezipienten von Splenozyten neben einem raschen Gewichtsverlust eine für Kryptokokken-IRIS charakteristische granulomatöse Entzündung auf. Ein vergleichbares klinisches Bild zeigte sich nach dem alleinigen Transfer von CD4⁺ T-Zellen in *C. neoformans*-infizierte RAG-1^{-/-} Mäusen. Das lässt auf eine zentrale Rolle von CD4⁺ T-Zellen in der Pathogenese von Kryptokokken-IRIS schließen. Die überschießende Entzündungsreaktion infolge des CD4⁺ T-Zell-Transfers wurde in den lymphopenischen RAG-1^{-/-} Mäusen infektionsabhängig induziert und äußerte sich auch in der systemischen Freisetzung von Interleukin (IL)-12p70, Interferon (IFN)- γ , IL-6, Tumornekrosefaktor (TNF)- α und IL-5. Mittels intrazellulärer Zytokinfärbung

wurden die Donor-CD4⁺ T-Zellen als Quelle von IFN- γ identifiziert. Somit konnte durch den Transfer von zur IFN- γ -Produktion unfähigen (IFN- γ ^{-/-}) CD4⁺ T-Zellen in *C. neoformans*-infizierte RAG-1^{-/-} Mäuse die Relevanz dieses proinflammatorischen Zytokins für die Induktion von Kryptokokken-IRIS untersucht werden. Interessanterweise zeigten auch *C. neoformans*-infizierte RAG-1^{-/-} Rezipienten von IFN- γ ^{-/-} CD4⁺ T-Zellen einen raschen Gewichtsverlust und eine granulomatöse Entzündung. Das lässt darauf schließen, dass IFN- γ allein für die Induktion von Kryptokokken-IRIS nicht entscheidend ist. Die Zytokinspiegel von IL-12p70, TNF- α und IL-6 im Serum unterschieden sich nicht zwischen *C. neoformans*-infizierten RAG-1^{-/-} Rezipienten von IFN- γ ^{-/-} und Wildtyp CD4⁺ T-Zellen. Diese proinflammatorischen Zytokine stellen somit potentielle molekulare Mediatoren von Kryptokokken-IRIS dar. Mikrogliazellen könnten ebenfalls an der Pathogenese beteiligt sein. Sie wiesen infolge der Rekonstitution von CD4⁺ T-Zellen, unabhängig von deren Fähigkeit zur IFN- γ -Produktion, in *C. neoformans*-infizierten RAG-1^{-/-} Rezipienten eine erhöhte Transkription des IFN- γ -induzierten Proteins 10 (IP-10) auf, das chemotaktisch auf T-Zellen wirkt. Damit einhergehend fand sich in *C. neoformans*-infizierten RAG-1^{-/-} Mäusen eine verstärkte Rekrutierung der Donor-CD4⁺ T-Zellen ins Gehirn. Des Weiteren nahmen die CD4⁺ T-Zellen in *C. neoformans*-infizierten RAG-1^{-/-} Rezipienten einen aktivierten Phänotyp an, der sich anhand der erhöhten Expression des Oberflächenrezeptors CD69 widerspiegelte.

Zusammenfassend werden in dem neu etablierten Kryptokokken-IRIS-Mausmodell die wesentlichen Aspekte der humanen Erkrankung simuliert. Damit bietet sich ein System, in dem die grundlegenden Pathogenese-Mechanismen systematisch erforscht werden können. Eine erste Charakterisierung im Rahmen der vorliegenden Studie hat bereits wichtige Erkenntnisse bezüglich zellulärer und molekularer Mediatoren ergeben. Basierend darauf können weiterführende Experimente zur Identifizierung neuer immunmodulatorischer Therapieansätze beitragen, die wiederum im Kryptokokken-IRIS-Mausmodell getestet werden können.

6 SUMMARY

Cryptococcus neoformans is an opportunistic fungal pathogen that can cause fatal meningitis in immunocompromised individuals. Strategies of immune reconstitution, such as antiretroviral therapy (ART) of patients infected with the human immunodeficiency virus (HIV), are necessary to restore protective immunity against opportunistic infections. However, in the context of *C. neoformans* infection rapid reversal of immunosuppression can provoke an aberrant inflammatory disease referred to as immune reconstitution inflammatory syndrome (IRIS). Cryptococcal IRIS represents a significant medical problem associated with high morbidity and mortality. The underlying pathomechanisms are poorly understood. Therefore, only non-specific anti-inflammatory treatment by use of corticosteroids is currently available harboring the risk of further opportunistic infections. Adequate clinical management of cryptococcal IRIS requires specific therapeutic approaches based on a detailed understanding of mechanisms of pathogenesis. Thus, the aim of this study was to establish the first experimental model of cryptococcal IRIS that allows for a systematic analysis of disease development. To reproduce clinical symptoms of cryptococcal IRIS lymphocyte-deficient recombination activating gene (RAG)-1^{-/-} mice were infected with *C. neoformans* and four weeks later adoptively transferred with wild-type splenocytes. *C. neoformans*-infected RAG-1^{-/-} recipients of splenocytes not only showed rapid wasting but also a granulomatous inflammation that is characteristic for cryptococcal IRIS. A similar deterioration of *C. neoformans*-infected RAG-1^{-/-} mice was observed following sole CD4⁺ T cell reconstitution highlighting a central role of CD4⁺ T cells in pathogenesis. Infection-dependent multi-organ inflammation in *C. neoformans*-infected RAG-1^{-/-} recipients of CD4⁺ T cells was accompanied by a systemic release of interleukin (IL)-12p70, interferon (IFN)- γ , IL-6, tumor necrosis factor (TNF)- α and IL-5. Intracellular cytokine staining revealed that donor CD4⁺ T cells are the source of IFN- γ . Interestingly, adoptive transfer of IFN- γ ^{-/-} CD4⁺ T cells, incapable of IFN- γ production, into *C. neoformans*-infected RAG-1^{-/-} mice induced a comparable rapid weight loss and granulomatous inflammation as did transfer of wild-type (IFN- γ ^{+/+}) CD4⁺ T cells, indicating that IFN- γ -mediated effects are not required for disease induction. Increased serum levels of IL-12p70, IL-6 and TNF- α in *C. neoformans*-infected RAG-1^{-/-} recipients of wild-type and IFN- γ ^{-/-} CD4⁺ T cells point to a potential role of these pro-inflammatory cytokines during cryptococcal IRIS. Microglial cells are likely involved in pathogenesis. They showed elevated transcription of the T cell chemoattractant IFN- γ -induced protein 10 (IP-10) in

C. neoformans-infected recipients of wild-type and IFN- $\gamma^{-/-}$ CD4⁺ T cells that was associated with an increased recruitment of donor CD4⁺ T cells to the brain. Furthermore, donor CD4⁺ T cells were found to acquire an activated phenotype during IRIS induction characterized by expression of the activation marker CD69, even in the absence of IFN- γ production.

In conclusion, the novel mouse model presented here recapitulates the principal immunological scenario of cryptococcal IRIS and reveals insights into fundamental aspects of disease development. Thus, it is useful for the development and testing of new specific treatment strategies.

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. **Brown GD, Denning DW, Gow NA, Levitz SM, Netea MG, and White TC.** Hidden killers: human fungal infections. *Sci Transl Med*, 2012;4(165):165rv13.
2. **Romani L.** Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol*, 2011;11(4):275-288.
3. **Kozubowski L and Heitman J.** Profiling a killer, the development of *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Microbiol Rev*, 2012;36(1):78-94.
4. **Lin X and Heitman J.** The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *Annu Rev Microbiol*, 2006;60:69-105.
5. **Emmons CW.** Prevalence of *Cryptococcus neoformans* in pigeon habitats. *Public Health Rep*, 1960;75:362-364.
6. **Nielsen K, De Obaldia AL, and Heitman J.** *Cryptococcus neoformans* mates on pigeon guano: implications for the realized ecological niche and globalization. *Eukaryot Cell*, 2007;6(6):949-959.
7. **Rosario I, Hermoso de Mendoza M, Déniz S, Soro G, Alamo I, and Acosta B.** Isolation of *Cryptococcus* species including *C. neoformans* from cloaca of pigeons. *Mycoses*, 2005;48(6):421-424.
8. **Garcia-Hermoso D, Janbon G, and Dromer F.** Epidemiological evidence for dormant *Cryptococcus neoformans* infection. *J Clin Microbiol*, 1999;37(10):3204-3209.
9. **Goldman DL, Khine H, Abadi J, Lindenberg DJ, Pirofski La, Niang R, and Casadevall A.** Serologic evidence for *Cryptococcus neoformans* infection in early childhood. *Pediatrics*, 2001;107(5):e66.
10. **Lortholary O, Nunez H, Brauner MW, and Dromer F.** Pulmonary cryptococcosis. *Semin Respir Crit Care Med*, 2004;25(2):145-157.
11. **Chrétien F, Lortholary O, Kansau I, Neuville S, Gray F, and Dromer F.** Pathogenesis of cerebral *Cryptococcus neoformans* infection after fungemia. *J Infect Dis*, 2002;186(4):522-530.
12. **Brizendine KD and Pappas PG.** Cryptococcal meningitis: current approaches to management in patients with and without AIDS. *Curr Infect Dis Rep*, 2010;12(4):299-305.
13. **Hull CM and Heitman J.** Genetics of *Cryptococcus neoformans*. *Annu Rev Genet*, 2002;36:557-615.

14. **Leal AL, Faganello J, Fuentefria AM, Boldo JT, Bassanesi MC, and Vainstein MH.** Epidemiological profile of cryptococcal meningitis patients in Rio Grande do Sul, Brazil. *Mycopathologia*, 2008;166(2):71-75.
15. **Park BJ, Wannemuehler KA, Marston BJ, Govender N, Pappas PG, and Chiller TM.** Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *AIDS*, 2009;23(4):525-530.
16. **Pyrgos V, Seitz AE, Steiner CA, Prevots DR, and Williamson PR.** Epidemiology of cryptococcal meningitis in the US: 1997-2009. *PLoS One*, 2013;8(2):e56269.
17. **Sloan DJ and Parris V.** Cryptococcal meningitis: epidemiology and therapeutic options. *Clin Epidemiol*, 2014;6:169-182.
18. **Olszewski MA, Zhang Y, and Huffnagle GB.** Mechanisms of cryptococcal virulence and persistence. *Future Microbiol*, 2010;5(8):1269-1288.
19. **Biondo C, Midiri A, Messina L, Tomasello F, Garufi G, Catania MR, Bombaci M, Beninati C, Teti G, and Mancuso G.** MyD88 and TLR2, but not TLR4, are required for host defense against *Cryptococcus neoformans*. *Eur J Immunol*, 2005;35(3):870-878.
20. **Yauch LE, Mansour MK, Shoham S, Rottman JB, and Levitz SM.** Involvement of CD14, toll-like receptors 2 and 4, and MyD88 in the host response to the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* in vivo. *Infect and Immun*, 2004;72(9):5373-5382.
21. **Shoham S, Huang C, Chen JM, Golenbock DT, and Levitz SM.** Toll-like receptor 4 mediates intracellular signaling without TNF- α release in response to *Cryptococcus neoformans* polysaccharide capsule. *J Immunol*, 2001;166(7):4620-4626.
22. **Nakamura K, Miyazato A, Xiao G, Hatta M, Inden K, Aoyagi T, Shiratori K, Takeda K, Akira S, Saijo S, Iwakura Y, Adachi Y, Ohno N, Suzuki K, Fujita J, Kaku M, and Kawakami K.** Deoxynucleic acids from *Cryptococcus neoformans* activate myeloid dendritic cells via a TLR9-dependent pathway. *J Immunol*, 2008;180(6):4067-4074.
23. **Dan JM, Kelly RM, Lee CK, and Levitz SM.** Role of the mannose receptor in a murine model of *Cryptococcus neoformans* infection. *Infect Immun*, 2008;76(6):2362-2367.
24. **Herre J, Willment JA, Gordon S, and Brown GD.** The role of Dectin-1 in antifungal immunity. *Crit Rev Immunol*, 2004;24(3):193-203

25. **Huysamen C and Brown GD.** The fungal pattern recognition receptor, Dectin-1, and the associated cluster of C-type lectin-like receptors. *FEMS Microbiol Lett*, 2009;290(2):121-128.
26. **Taylor PR, Tsoni SV, Willment JA, Dennehy KM, Rosas M, Findon H, Haynes K, Steele C, Botto M, and Gordon S.** Dectin-1 is required for beta-glucan recognition and control of fungal infection. *Nat Immunol*, 2007;8(1):31-38.
27. **Kingeter LM and Lin X.** C-type lectin receptor-induced NF- κ B activation in innate immune and inflammatory responses. *Cell Mol Immunol*, 2012;9(2):105-112.
28. **Kozel TR and Pfrommer GS.** Activation of the complement system by *Cryptococcus neoformans* leads to binding of iC3b to the yeast. *Infect Immun*, 1986;52(1):1-5.
29. **Netski D and Kozel TR.** Fc-dependent and Fc-independent opsonization of *Cryptococcus neoformans* by anticapsular monoclonal antibodies: importance of epitope specificity. *Infect Immun*, 2002;70(6):2812-2819.
30. **Levitz SM, Tabuni A, Kozel TR, MacGill RS, Ingalls RR, and Golenbock DT.** Binding of *Cryptococcus neoformans* to heterologously expressed human complement receptors. *Infect Immun*, 1997;65(3):931-935.
31. **Kozel TR.** Opsonization and phagocytosis of *Cryptococcus neoformans*. *Arch Med Res*, 1993;24(3):211-218.
32. **Osterholzer JJ, Milam JE, Chen GH, Toews GB, Huffnagle GB, and Olszewski MA.** Role of dendritic cells and alveolar macrophages in regulating early host defense against pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*, 2009;77(9):3749-3758.
33. **Bauman SK, Huffnagle GB, and Murphy JW.** Effects of tumor necrosis factor alpha on dendritic cell accumulation in lymph nodes draining the immunization site and the impact on the anticryptococcal cell-mediated immune response. *Infect Immun*, 2003;71(1):68-74.
34. **Osterholzer JJ, Surana R, Milam JE, Montano GT, Chen GH, Sonstein J, Curtis JL, Huffnagle GB, Toews GB, and Olszewski MA.** Cryptococcal urease promotes the accumulation of immature dendritic cells and a non-protective T2 immune response within the lung. *Am J Pathol*, 2009;174(3):932-943.

35. **Traynor TR, Kuziel WA, Toews GB, and Huffnagle GB.** CCR2 expression determines T1 versus T2 polarization during pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection. *J Immunol*, 2000;164(4):2021-2027.
36. **Decken K, Kohler G, Palmer-Lehmann K, Wunderlin A, Mattner F, Magram J, Gately MK, and Alber G.** Interleukin-12 is essential for a protective Th1 response in mice infected with *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*, 1998;66(10):4994-5000.
37. **Kawakami K, Tohyama M, Xie Q, and Saito A.** IL-12 protects mice against pulmonary and disseminated infection caused by *Cryptococcus neoformans*. *Clin Exp Immunol*, 1996;104(2):208-214.
38. **Siegemund S and Alber G.** *Cryptococcus neoformans* activates bone marrow-derived conventional dendritic cells rather than plasmacytoid dendritic cells and down-regulates macrophages. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2008;52(3):417-427.
39. **Arora S, Hernandez Y, Erb-Downward JR, McDonald RA, Toews GB, and Huffnagle GB.** Role of IFN-gamma in regulating T2 immunity and the development of alternatively activated macrophages during allergic bronchopulmonary mycosis. *J Immunol*, 2005;174(10):6346-6356.
40. **Chen GH, McDonald RA, Wells JC, Huffnagle GB, Lukacs NW, and Toews GB.** The gamma interferon receptor is required for the protective pulmonary inflammatory response to *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*, 2005;73(3):1788-1796.
41. **Hardison SE, Ravi S, Wozniak KL, Young ML, Olszewski MA, and Wormley FL.** Pulmonary infection with an interferon-gamma-producing *Cryptococcus neoformans* strain results in classical macrophage activation and protection. *Am J Pathol*, 2010;176(2):774-785.
42. **Zhou Q, Gault RA, Kozel TR, and Murphy WJ.** Protection from direct cerebral *cryptococcus* infection by interferon-gamma-dependent activation of microglial cells. *J Immunol*, 2007;178(9):5753-5761.
43. **Hardison SE, Herrera G, Young ML, Hole CR, Wozniak KL, and Wormley FL.** Protective immunity against pulmonary cryptococcosis is associated with STAT1-mediated classical macrophage activation. *J Immunol*, 2012;189(8):4060-4068.
44. **Lovchik JA, Lyons CR, and Lipscomb MF.** A role for gamma interferon-induced nitric oxide in pulmonary clearance of *Cryptococcus neoformans*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1995;13(1):116-124.

45. **Tohyama M, Kawakami K, Futenma M, and Saito A.** Enhancing effect of oxygen radical scavengers on murine macrophage anticryptococcal activity through production of nitric oxide. *Clin Exp Immunol*, 1996;103(3):436-441.
46. **Yoshida K, Akaike T, Doi T, Sato K, Ijiri S, Suga M, Ando M, and Maeda H.** Pronounced enhancement of. NO-dependent antimicrobial action by an. NO-oxidizing agent, imidazolineoxyl N-oxide. *Infect Immun*, 1993;61(8):3552-3555.
47. **Levitz SM, Tabuni A, Kornfeld H, Reardon CC, and Golenbock DT.** Production of tumor necrosis factor alpha in human leukocytes stimulated by *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*, 1994;62(5):1975-1981.
48. **Aguirre K, Havell EA, Gibson GW, and Johnson LL.** Role of tumor necrosis factor and gamma interferon in acquired resistance to *Cryptococcus neoformans* in the central nervous system of mice. *Infect Immun*, 1995;63(5):1725-1731.
49. **Herring AC, Lee J, McDonald RA, Toews GB, and Huffnagle GB.** Induction of interleukin-12 and gamma interferon requires tumor necrosis factor alpha for protective T1-cell-mediated immunity to pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection. *Infect Immun*, 2002;70(6):2959-2964.
50. **Huffnagle GB, Lipscomb MF, Lovchik JA, Hoag KA, and Street NE.** The role of CD4+ and CD8+ T cells in the protective inflammatory response to a pulmonary cryptococcal infection. *J Leukoc Biol*, 1994;55(1):35-42.
51. **Ma LL, Spurrell JC, Wang JF, Neely GG, Epelman S, Krensky AM, and Mody CH.** CD8 T cell-mediated killing of *Cryptococcus neoformans* requires granulysin and is dependent on CD4 T cells and IL-15. *J Immunol*, 2002;169(10):5787-5795.
52. **Marr KJ, Jones GJ, Zheng C, Huston SM, Timm-McCann M, Islam A, Berenger BM, Ma LL, Wiseman JC, and Mody CH.** *Cryptococcus neoformans* directly stimulates perforin production and rearms NK cells for enhanced anticryptococcal microbicidal activity. *Infect Immun*, 2009;77(6):2436-2446.
53. **Wiseman JC, Ma LL, Marr KJ, Jones GJ, and Mody CH.** Perforin-dependent cryptococcal microbicidal activity in NK cells requires PI3K-dependent ERK1/2 signaling. *J Immunol*, 2007;178(10):6456-6464.
54. **Kawakami K, Kohno S, Kadota J, Tohyama M, Teruya K, Kudoken N, Saito A, and Hara K.** T cell-dependent activation of macrophages and enhancement of their phagocytic activity in the lungs of mice inoculated with heat-killed *Cryptococcus*

- neoformans: involvement of IFN-gamma and its protective effect against cryptococcal infection. *Microbiol Immunol*, 1995;39(2):135-143.
55. **Yuan R, Casadevall A, Oh J, and Scharff MD.** T cells cooperate with passive antibody to modify *Cryptococcus neoformans* infection in mice. *Proc Natl Acad Sci*, 1997;94(6):2483-2488.
56. **Jain AV, Zhang Y, Fields WB, McNamara DA, Choe MY, Chen GH, Erb-Downward J, Osterholzer JJ, Toews GB, and Huffnagle GB.** Th2 but not Th1 immune bias results in altered lung functions in a murine model of pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection. *Infect Immun*, 2009;77(12):5389-5399.
57. **Stenzel W, Müller U, Köhler G, Heppner FL, Blessing M, McKenzie AN, Brombacher F, and Alber G.** IL-4/IL-13-dependent alternative activation of macrophages but not microglial cells is associated with uncontrolled cerebral cryptococcosis. *Am J Pathol*, 2009;174(2):486-496.
58. **Müller U, Stenzel W, Köhler G, Werner C, Polte T, Hansen G, Schütze N, Straubinger RK, Blessing M, McKenzie AN, Brombacher F, and Alber G.** IL-13 induces disease-promoting type 2 cytokines, alternatively activated macrophages and allergic inflammation during pulmonary infection of mice with *Cryptococcus neoformans*. *J Immunol*, 2007;179(8):5367-5377.
59. **Klein SA, Dobmeyer JM, Dobmeyer TS, Pape M, Ottmann OG, Helm EB, Hoelzer D, and Rossol R.** Demonstration of the Th1 to Th2 cytokine shift during the course of HIV-1 infection using cytoplasmic cytokine detection on single cell level by flow cytometry. *AIDS*, 1997;11(9):1111-1118.
60. **Bordon J, Plankey MW, Young M, Greenblatt RM, Villacres MC, French AL, Zhang J, Brock G, Appana S, Herold B, Durkin H, Golub JE, and Fernandez-Botran R.** Lower levels of interleukin-12 precede the development of tuberculosis among HIV-infected women. *Cytokine*, 2011;56(2):325-331.
61. **Harrison TS and Levitz SM.** Mechanisms of impaired anticryptococcal activity of monocytes from donors infected with human immunodeficiency virus. *J Infect Dis*, 1997;176(2):537-540.
62. **Wager CML and Wormley Jr FL.** Is Development of a Vaccine against *Cryptococcus neoformans* Feasible? *PLoS Pathog*, 2015;11(6):e1004843.

63. **Lindell DM, Moore TA, McDonald RA, Toews GB, and Huffnagle GB.** Generation of antifungal effector CD8⁺ T cells in the absence of CD4⁺ T cells during *Cryptococcus neoformans* infection. *J Immunol*, 2005;174(12):7920-7928.
64. **Netea MG, Quintin J, and van der Meer JW.** Trained immunity: a memory for innate host defense. *Cell Host Microbe*, 2011;9(5):355-361.
65. **Netea MG.** Training innate immunity: the changing concept of immunological memory in innate host defence. *Eur J Clin Invest*, 2013;43(8):881-884.
66. **Wormley FL, Jr., Perfect JR, Steele C, and Cox GM.** Protection against cryptococcosis by using a murine gamma interferon-producing *Cryptococcus neoformans* strain. *Infect Immun*, 2007;75(3):1453-1462.
67. **Wozniak KL, Young ML, and Wormley FL, Jr.** Protective immunity against experimental pulmonary cryptococcosis in T cell-depleted mice. *Clin Vaccine Immunol*, 2011;18(5):717-723
68. **World Health Organization.** Rapid Advice: Diagnosis, Prevention and Management of Cryptococcal Disease in HIV-infected Adults, Adolescents and Children. Geneva: World Health Organization, 2011.
69. **Sangalli-Leite F, Scorzoni L, Mesa-Arango AC, Casas C, Herrero E, Gianinni MJ, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M, and Zaragoza O.** Amphotericin B mediates killing in *Cryptococcus neoformans* through the induction of a strong oxidative burst. *Microbes Infect*, 2011;13(5):457-467.
70. **Baginski M, Sternal K, Czub J, and Borowski E.** Molecular modelling of membrane activity of amphotericin B, a polyene macrolide antifungal antibiotic. *Acta Biochim Pol*, 2005;52(3):655-658.
71. **Vermes A, Guchelaar HJ, and Dankert J.** Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. *J Antimicrob Chemother*, 2000;46(2):171-179.
72. **Deray G.** Amphotericin B nephrotoxicity. *J Antimicrob Chemother*, 2002;49 Suppl 1:37-41.
73. **Cornely OA, Maertens J, Bresnik M, Ebrahimi R, Ullmann AJ, Bouza E, Heussel CP, Lortholary O, Rieger C, and Boehme A.** Liposomal amphotericin B as initial therapy for invasive mold infection: a randomized trial comparing a high-loading dose

- regimen with standard dosing (AmBiLoad Trial). *Clin Infect Dis*, 2007;44(10):1289-1297.
74. **Denning DW and Hope WW.** Therapy for fungal diseases: opportunities and priorities. *Trends Microbiol*, 2010;18(5):195-204.
75. **Bicanic T, Ogden D, Whitney L, Loyse A, and Jarvis J.** British HIV Association opportunistic infection guidelines: in defence of amphotericin B deoxycholate. *HIV Med*, 2012;13(10):636-637.
76. **Bicanic T, Wood R, Bekker LG, Darder M, Meintjes G, and Harrison TS.** Antiretroviral roll-out, antifungal roll-back: access to treatment for cryptococcal meningitis. *Lancet Infect Dis*, 2005;5(9):530-531.
77. **Loyse A, Dromer F, Day J, Lortholary O, and Harrison TS.** Flucytosine and cryptococcosis: time to urgently address the worldwide accessibility of a 50-year-old antifungal. *J Antimicrob Chemother*, 2013;68(11):2435-2444.
78. **Bodey GP.** Azole antifungal agents. *Clin Infect Dis*, 1992;14 Suppl 1:S161-S169.
79. **Cheong JWS and McCormack J.** Fluconazole resistance in cryptococcal disease: emerging or intrinsic? *Med Mycol*, 2013;51(3):261-269.
80. **Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Bijie H, Dzierzanowska D, Klimko NN, Letscher-Bru V, Lisalova M, Muehlethaler K, Rennison C, and Zaidi M.** Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: 10.5-year analysis of susceptibilities of noncandidal yeast species to fluconazole and voriconazole determined by CLSI standardized disk diffusion testing. *J Clin Microbiol*, 2009;47(1):117-123.
81. **Jarvis JN, Meintjes G, Rebe K, Williams GN, Bicanic T, Williams A, Schutz C, Bekker LG, Wood R, and Harrison TS.** Adjunctive interferon-gamma immunotherapy for the treatment of HIV-associated cryptococcal meningitis: a randomized controlled trial. *AIDS*, 2012;26(9):1105-1113.
82. **Pappas PG, Bustamante B, Ticona E, Hamill RJ, Johnson PC, Reboli A, Aberg J, Hasbun R, and Hsu HH.** Recombinant interferon-gamma 1b as adjunctive therapy for AIDS-related acute cryptococcal meningitis. *J Infect Dis*, 2004;189(12):2185-2191.
83. **Jarvis JN and Harrison TS.** HIV-associated cryptococcal meningitis. *AIDS*, 2007;21(16):2119-2129.

84. **Dromer F, Mathoulin-Pelissier S, Fontanet A, Ronin O, Dupont B, and Lortholary O.** Epidemiology of HIV-associated cryptococcosis in France (1985-2001): comparison of the pre- and post-HAART eras. *AIDS*, 2004;18(3):555-562.
85. **Jarvis JN, Bicanic T, Loyse A, Namarika D, Jackson A, Nussbaum JC, Longley N, Muzoora C, Phulusa J, Taseera K, Kanyembe C, Wilson D, Hosseinipour MC, Brouwer AE, Limmathurotsakul D, White N, van der Horst C, Wood R, Meintjes G, Bradley J, Jaffar S, and Harrison T.** Determinants of mortality in a combined cohort of 501 patients with HIV-associated Cryptococcal meningitis: implications for improving outcomes. *Clin Infect Dis*, 2014;58(5):736-745.
86. **Kambugu A, Meya DB, Rhein J, O'Brien M, Janoff EN, Ronald AR, Kanya MR, Mayanja-Kizza H, Sande MA, and Bohjanen PR.** Outcomes of cryptococcal meningitis in Uganda before and after the availability of highly active antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis*, 2008;46(11):1694-1701.
87. **French MA, Price P, and Stone SF.** Immune restoration disease after antiretroviral therapy. *AIDS*, 2004;18(12):1615-1627.
88. **Muller M, Wandel S, Colebunders R, Attia S, Furrer H, and Egger M.** Immune reconstitution inflammatory syndrome in patients starting antiretroviral therapy for HIV infection: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*, 2010;10(4):251-261.
89. **Singh N and Perfect JR.** Immune reconstitution syndrome associated with opportunistic mycoses. *Lancet Infect Dis*, 2007;7(6):395-401.
90. **Abdool Karim SS, Naidoo K, Grobler A, Padayatchi N, Baxter C, Gray AL, Gengiah T, Gengiah S, Naidoo A, and Jithoo N.** Integration of antiretroviral therapy with tuberculosis treatment. *N Engl J Med*, 2011;365(16):1492-1501.
91. **Blanc FX, Sok T, Laureillard D, Borand L, Rekacewicz C, Nerrienet E, Madec Y, Marcy O, Chan S, and Prak N.** Earlier versus later start of antiretroviral therapy in HIV-infected adults with tuberculosis. *N Engl J Med*, 2011;365(16):1471-1481.
92. **French MA, Lenzo N, John M, Mallal SA, McKinnon EJ, James IR, Price P, Flexman JP, and TayGÇÉKearney M.** Immune restoration disease after the treatment of immunodeficient HIV-infected patients with highly active antiretroviral therapy. *HIV Med*, 2000;1(2):107-115.
93. **Phillips P, Bonner S, Gataric N, Bai T, Wilcox P, Hogg R, O'Shaughnessy M, and Montaner J.** Nontuberculous mycobacterial immune reconstitution syndrome in HIV-

- infected patients: spectrum of disease and long-term follow-up. *Clin Infect Dis*, 2005;41(10):1483-1497.
94. **Haddow LJ, Colebunders R, Meintjes G, Lawn SD, Elliott JH, Manabe YC, Bohjanen PR, Sungkanuparph S, Easterbrook PJ, French MA, and Boulware DR.** Cryptococcal immune reconstitution inflammatory syndrome in HIV-1-infected individuals: proposed clinical case definitions. *Lancet Infect Dis*, 2010;10(11):791-802.
95. **Longley N, Harrison TS, and Jarvis JN.** Cryptococcal immune reconstitution inflammatory syndrome. *Curr Opin Infect Dis*, 2013;26(1):26-34.
96. **Achenbach CJ, Harrington RD, Dhanireddy S, Crane HM, Casper C, and Kitahata MM.** Paradoxical immune reconstitution inflammatory syndrome in HIV-infected patients treated with combination antiretroviral therapy after AIDS-defining opportunistic infection. *Clin Infect Dis*, 2012;54(3):424-433.
97. **Calligaro G, Meintjes G, and Mendelson M.** Pulmonary manifestations of the immune reconstitution inflammatory syndrome. *Curr Opin Pulm Med*, 2011;17(3):180-188.
98. **Feller L, Wood NH, and Lemmer J.** Herpes zoster infection as an immune reconstitution inflammatory syndrome in HIV-seropositive subjects: a review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2007;104(4):455-460.
99. **Martin-Blondel G, Delobel P, Blancher A, Massip P, Marchou B, Liblau RS, and Mars LT.** Pathogenesis of the immune reconstitution inflammatory syndrome affecting the central nervous system in patients infected with HIV. *Brain*, 2011;134(4):928-946.
100. **Egger M, May M, Chene G, Phillips AN, Ledergerber B, Dabis F, Costagliola D, D'Arminio MA, de WF, Reiss P, Lundgren JD, Justice AC, Staszewski S, Leport C, Hogg RS, Sabin CA, Gill MJ, Salzberger B, and Sterne JA.** Prognosis of HIV-1-infected patients starting highly active antiretroviral therapy: a collaborative analysis of prospective studies. *Lancet*, 2002;360(9327):119-129.
101. **Lawn SD, Harries AD, Anglaret X, Myer L, and Wood R.** Early mortality among adults accessing antiretroviral treatment programmes in sub-Saharan Africa. *AIDS*, 2008;22(15):1897-1908.
102. **Bonham S, Meya DB, Bohjanen PR, and Boulware DR.** Biomarkers of HIV Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome. *Biomark Med*, 2008;2(4):349-361.

103. **Jarvis JN, Lawn SD, Vogt M, Bangani N, Wood R, and Harrison TS.** Screening for cryptococcal antigenemia in patients accessing an antiretroviral treatment program in South Africa. *Clin Infect Dis*, 2009;48(7):856-862.
104. **Boulware DR, Meya DB, Muzoora C, Rolfes MA, Huppler HK, Musubire A, Taseera K, Nabeta HW, Schutz C, Williams DA, Rajasingham R, Rhein J, Thienemann F, Lo MW, Nielsen K, Bergemann TL, Kambugu A, Manabe YC, Janoff EN, Bohjanen PR, and Meintjes G.** Timing of antiretroviral therapy after diagnosis of cryptococcal meningitis. *N Engl J Med*, 2014;370(26):2487-2498.
105. **Sun HY and Singh N.** Opportunistic infection-associated immune reconstitution syndrome in transplant recipients. *Clin Infect Dis*, 2011;53(2):168-176.
106. **Singh N and Perfect JR.** Immune reconstitution syndrome and exacerbation of infections after pregnancy. *Clin Infect Dis*, 2007;45(9):1192-1199.
107. **Perfect JR, Dismukes WE, Dromer F, Goldman DL, Graybill JR, Hamill RJ, Harrison TS, Larsen RA, Lortholary O, Nguyen MH, Pappas PG, Powderly WG, Singh N, Sobel JD, and Sorrell TC.** Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the infectious diseases society of america. *Clin Infect Dis*, 2010;50(3):291-322.
108. **Boulware DR, Bonham SC, Meya DB, Wiesner DL, Park GS, Kambugu A, Janoff EN, and Bohjanen PR.** Paucity of initial cerebrospinal fluid inflammation in cryptococcal meningitis is associated with subsequent immune reconstitution inflammatory syndrome. *J Infect Dis*, 2010;202(6):962-970.
109. **Chang CC, Dorasamy AA, Gosnell BI, Elliott JH, Spelman T, Omarjee S, Naranbhai V, Coovadia Y, Ndung'u T, Moosa MY, Lewin SR, and French MA.** Clinical and mycological predictors of cryptococcosis-associated immune reconstitution inflammatory syndrome. *AIDS*, 2013;27(13):2089-2099.
110. **Lortholary O, Fontanet A, Memain N, Martin A, Sitbon K, and Dromer F.** Incidence and risk factors of immune reconstitution inflammatory syndrome complicating HIV-associated cryptococcosis in France. *AIDS*, 2005;19(10):1043-1049.
111. **Boulware DR, Meya DB, Bergemann TL, Wiesner DL, Rhein J, Musubire A, Lee SJ, Kambugu A, Janoff EN, and Bohjanen PR.** Clinical features and serum biomarkers in HIV immune reconstitution inflammatory syndrome after cryptococcal meningitis: a prospective cohort study. *PLoS Med*, 2010;7(12):e1000384.

112. **Liechty CA, Solberg P, Were W, Ekwaru JP, Ransom RL, Weidle PJ, Downing R, Coutinho A, and Mermin J.** Asymptomatic serum cryptococcal antigenemia and early mortality during antiretroviral therapy in rural Uganda. *Trop Med Int Health*, 2007;12(8):929-935.
113. **Shelburne SA, Visnegarwala F, Darcourt J, Graviss EA, Giordano TP, White AC, Jr., and Hamill RJ.** Incidence and risk factors for immune reconstitution inflammatory syndrome during highly active antiretroviral therapy. *AIDS*, 2005;19(4):399-406.
114. **Sungkanuparph S, Filler SG, Chetchotisakd P, Pappas PG, Nolen TL, Manosuthi W, Anekthananon T, Morris MI, Supparatpinyo K, Kopetskie H, Kendrick AS, Johnson PC, Sobel JD, and Larsen RA.** Cryptococcal immune reconstitution inflammatory syndrome after antiretroviral therapy in AIDS patients with cryptococcal meningitis: a prospective multicenter study. *Clin Infect Dis*, 2009;49(6):931-934.
115. **Bicanic T, Meintjes G, Rebe K, Williams A, Loyse A, Wood R, Hayes M, Jaffar S, and Harrison T.** Immune reconstitution inflammatory syndrome in HIV-associated cryptococcal meningitis: a prospective study. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2009;51(2):130-134.
116. **Wiesner DL and Boulware DR.** Cryptococcus-Related Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome (IRIS): Pathogenesis and Its Clinical Implications. *Curr Fungal Infect Rep*, 2011;5(4):252-261.
117. **Worsley CM, Suchard MS, Stevens WS, Van RA, and Murdoch DM.** Multi-analyte profiling of ten cytokines in South African HIV-infected patients with Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome (IRIS). *AIDS Res Ther*, 2010;7:36.
118. **Mombaerts P, Iacomini J, Johnson RS, Herrup K, Tonegawa S, and Papaioannou VE.** RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell*, 1992;68(5):869-877.
119. **Dalton DK, Pitts-Meek S, Keshav S, Figari IS, Bradley A, and Stewart TA.** Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon-gamma genes. *Science*, 1993;259(5102):1739-1742.
120. **Cherniak R and Sundstrom JB.** Polysaccharide antigens of the capsule of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*, 1994;62(5):1507-1512.
121. **Surh CD and Sprent J.** Homeostasis of naive and memory T cells. *Immunity*, 2008;29(6):848-862.

122. **Livak KJ and Schmittgen TD.** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 2001;25(4):402-408.
123. **Pfaffl MW.** A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 2001;29(9):e45-.
124. **Guihot AI, Bourgarit A, Carcelain G, and Autran B.** Immune reconstitution after a decade of combined antiretroviral therapies for human immunodeficiency virus. *Trends Immunol*, 2011;32(3):131-137.
125. **Saijo K and Glass CK.** Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. *Nat Rev Immunol*, 2011;11(11):775-787.
126. **Dufour JH, Dziejman M, Liu MT, Leung JH, Lane TE, and Luster AD.** IFN-gamma-inducible protein 10 (IP-10; CXCL10)-deficient mice reveal a role for IP-10 in effector T cell generation and trafficking. *J Immunol*, 2002;168(7):3195-3204.
127. **Reith W, LeibundGut-Landmann S, and Waldburger JM.** Regulation of MHC class II gene expression by the class II transactivator. *Nat Rev Immunol*, 2005;5(10):793-806.
128. **Eschke M, Piehler D, Schulze B, Richter T, Grahnert A, Protschka M, Müller U, Köhler G, Höfling C, Rossner S, and Alber G.** A novel experimental model of *Cryptococcus neoformans*-related immune reconstitution inflammatory syndrome (IRIS) provides insights into pathogenesis. *Eur J Immunol*, 2015; Epub, ahead of print.
129. **Croce F, Piconi S, Atzeni F, Sarzi-Puttini P, Galli M, and Clerici M.** HIV/AIDS: epidemic update, new treatment strategies and impact on autoimmunity. *Clin Exp Rheumatol*, 2008;26(1 Suppl 48):S48-S52.
130. **Singh NJ and Schwartz RH.** The lymphopenic mouse in immunology: from patron to pariah. *Immunity*, 2006;25(6):851-855.
131. **Datta S and Sarvetnick N.** Lymphocyte proliferation in immune-mediated diseases. *Trends Immunol*, 2009;30(9):430-438.
132. **Krupica T, Jr., Fry TJ, and Mackall CL.** Autoimmunity during lymphopenia: a two-hit model. *Clin Immunol*, 2006;120(2):121-128.
133. **Lutz JE, Clemons KV, and Stevens DA.** Enhancement of antifungal chemotherapy by interferon-gamma in experimental systemic cryptococcosis. *J Antimicrob Chemother*, 2000;46(3):437-442.

134. **Barber DL, Mayer-Barber KD, Antonelli LR, Wilson MS, White S, Caspar P, Hieny S, Sereti I, and Sher A.** Th1-driven immune reconstitution disease in Mycobacterium avium-infected mice. *Blood*, 2010;116(18):3485-3493.
135. **Trinchieri G.** Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu Rev Immunol*, 1995;13(1):251-276.
136. **Vassalli P.** The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu Rev Immunol*, 1992;10(1):411-452.
137. **Kishimoto T, Akira S, Narazaki M, and Taga T.** Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood*, 1995;86(4):1243-1254.
138. **Zhu J and Paul WE.** CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood*, 2008;112(5):1557-1569.
139. **Chang CC, Omarjee S, Lim A, Spelman T, Gosnell BI, Carr WH, Elliott JH, Moosa MY, Ndung'u T, French MA, and Lewin SR.** Chemokine levels and chemokine receptor expression in the blood and the cerebrospinal fluid of HIV-infected patients with cryptococcal meningitis and cryptococcosis-associated immune reconstitution inflammatory syndrome. *J Infect Dis*, 2013;208(10):1604-1612.
140. **Murphy KM, Heimberger AB, and Loh DY.** Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4⁺ CD8⁺ TCR α 0 thymocytes in vivo. *Science*, 1990;250(4988):1720-1723.
141. **Kirchhoff D, Frentsch M, Leclerk P, Bumann D, Rausch S, Hartmann S, Thiel A, and Scheffold A.** Identification and isolation of murine antigen-reactive T cells according to CD154 expression. *Eur J Immunol*, 2007;37(9):2370-2377.
142. **Tan DB, Yong YK, Tan HY, Kamarulzaman A, Tan LH, Lim A, James I, French M, and Price P.** Immunological profiles of immune restoration disease presenting as mycobacterial lymphadenitis and cryptococcal meningitis. *HIV Med*, 2008;9(5):307-316.

8 DANKSAGUNG

Es ist mir ein Anliegen, mich bei all jenen zu bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Dissertation maßgeblich unterstützt haben:

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Gottfried Alber für die Überantwortung des interessanten Themas, die engagierte Betreuung und die ständige Diskussionsbereitschaft.

Prof. Dr. Thomas Magin danke ich für die Betreuung der Promotion an der Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie der Universität Leipzig sowie für die Begutachtung der Arbeit.

Bei Prof. Dr. Thomas Kamradt möchte ich mich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Dr. Jörg Lehmann und Dr. Ulla Schwertassek danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung des *Multiplex-Immunoassays* und Prof. Dr. Gabriele Köhler für die histologischen Befunde.

Beim Team der Versuchstieranlage am Max-Planck-Institut für evolutionäre Anthropologie unter Leitung von Rowina Voigtländer möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit und die sorgfältige Pflege der Mäuse bedanken.

Allen Weggefährten in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Gottfried Alber danke ich für die harmonische Arbeitsatmosphäre und die große Hilfs- und Diskussionsbereitschaft. Dr. Daniel Piehler, Dr. Tina Richter, Dr. Martina Protschka, Dr. Uwe Müller, Dr. Andreas Grahnert, Bianca Schulze, Anett Grohs und Silke Lehnert bin ich für die tatkräftige Unterstützung bei den aufwendigen Experimenten zu großem Dank verpflichtet.

Meinem Lektoren-Team Dr. Doris Bismarck und Dr. Daniel Piehler danke ich für die gründliche Durchsicht des Manuskripts und die konstruktive Kritik.

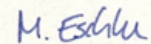
Für die finanzielle Unterstützung des Projekts danke ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Schließlich möchte ich mich bei meiner Familie für die bedingungslose Unterstützung und die unerschütterliche Zuversicht bedanken. Danke dafür, dass ihr während der gesamten Zeit mit mir mitgefiebert und mich durch die Höhen und Tiefen dieser Arbeit begleitet habt!

9 SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel: „Das *Cryptococcus neoformans*-assoziierte Immunrekonstitution-Inflammationssyndrom: Studie zur Pathogenese im Mausmodell“ selbstständig und ausschließlich unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt habe.

Leipzig, den 28.09.2015



Maria Eschke

11 PUBLIKATIONSLISTE

WISSENSCHAFTLICHE VERÖFFENTLICHUNGEN

Teile der vorliegenden Dissertation wurden in einer Fachzeitschrift mit Begutachtungs-System publiziert:

1. Eschke M, Piehler D, Schulze B, Richter T, Grahnert A, Protschka M, Müller U, Köhler G, Höfling C, Rossner S, and Alber G. A novel experimental model of *Cryptococcus neoformans*-related Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome (IRIS) provides insights into pathogenesis. Eur J Immunol, 2015; Epub, ahead of print

Weitere Veröffentlichungen:

2. Piehler D, Eschke M, Schulze B, Protschka M, Müller U, Grahnert A, Richter T, Heyen L, Köhler G, Brombacher F, and Alber G. The IL-33 receptor (ST2) regulates early IL-13 production in fungus-induced allergic airway inflammation. Mucosal Immunol, 2015; in press
3. Schulze B, Piehler D, Eschke M, von Buttlar H, Köhler G, Sparwasser T, and Alber G. CD4⁺FoxP3⁺ regulatory T cells suppress fatal T helper 2 cell immunity during pulmonary fungal infection. Eur J Immunol, 2014;44(12): 3596-3604
4. Brown GD, Meintjes G, Kolls JK, Gray C, Horsnell W; Working Group from the EMBO-AIDS Related Mycoses Workshop, Achan B, Alber G, Aloisi M, Armstrong-James D, Beale M, Bicanic T, Black J, Bohjanen P, Botes A, Boulware DR, Brown G, Bunjun R, Carr W, Casadevall A, Chang C, Chivero E, Corcoran C, Cross A, Dawood H, Day J, De Bernardis F, De Jager V, De Repentigny L, Denning D, Eschke M, Finkelman M, Govender N, Gow N, Graham L, Gryscek R, Hammond-Aryee K, Harrison T, Heard N, Hill M, Hoving JC, Janoff E, Jarvis J, Kayuni S, King K, Kolls J, Kullberg BJ, Laloo DG, Letang E, Levitz S, Limper A, Longley N, Machiridza TR, Mahabeer Y, Martinsons N, Meiring S, Meya D, Miller R, Molloy S, Morris L, Mukaremera L, Musubire AK, Muzoora C, Nair A, Nakiwala Kimbowa J, Netea M, Nielsen K, O'hern J, Okurut S, Parker A, Patterson T, Pennap G, Perfect J, Prinsloo C, Rhein J, Rolfes MA, Samuel C, Schutz C, Scriven J, Sebolai OM, Sojane K, Sriruttan C, Stead D, Steyn A, Thawer NK, Thienemann F, Von Hohenberg M, Vreulink JM, Wessels J, Wood K, Yang YL. AIDS-related mycoses: the way forward. Trends Microbiol, 2014;22(3):107-9

5. Grahnert A, Richter T, Piehler D, Eschke M, Schulze B, Müller U, Protschka M, Köhler G, Sabat R, Brombacher F, and Alber G. IL-4 Receptor-Alpha-Dependent Control of *Cryptococcus neoformans* in the Early Phase of Pulmonary Infection. PLoS ONE, 2014;9(1): e87341
6. Müller U, Stenzel W, Piehler D, Grahnert A, Protschka M, Köhler G, Frey O, Held J, Richter T, Eschke M, Kamradt T, Brombacher F, and Alber G. Abrogation of IL-4 receptor- α -dependent alternatively activated macrophages is sufficient to confer resistance against pulmonary cryptococcosis despite an ongoing T(h)2 response. Int Immunol, 2013;25(8):459-70
7. Piehler D, Grahnert A, Eschke M, Richter T, Köhler G, Stenzel W, and Alber G. T1/ST2 promotes T helper 2 cell activation and polyfunctionality in bronchopulmonary mycosis. Mucosal Immunol, 2013;6(2):405-14
8. Müller U, Piehler D, Stenzel W, Köhler G, Frey O, Held J, Grahnert A, Richter T, Eschke M, Kamradt T, Brombacher F, and Alber G. Lack of IL-4 receptor expression on T helper cells reduces T helper 2 cell polyfunctionality and confers resistance in allergic bronchopulmonary mycosis. Mucosal Immunol, 2012;5(3):299-310
9. Piehler D, Stenzel W, Grahnert A, Held J, Richter L, Köhler G, Richter T, Eschke M, Alber G, and Müller U. Eosinophils contribute to IL-4 production and shape the T helper cytokine profile and inflammatory response in pulmonary cryptococcosis. Am J Pathol, 2011;179(2):733-44

POSTER

1. Eschke M, Richter T, Piehler D, Grahnert A, Schulze B, Müller U, Köhler G, and Alber G. „*Cryptococcus neoformans*-related Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome (IRIS) Analysis of Pathomechanisms in a mouse model“ 12th Leipzig Research Festival for Life Sciences, 2013.
2. Eschke M, Richter T, Piehler D, Grahnert A, Schulze B, Müller U, Köhler G, and Alber G. „*Cryptococcus neoformans*-related Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome (IRIS) Analysis of Pathomechanisms in a mouse model“ 3. Infektionsmedizinisches Symposium Mitteldeutschland – Nachwuchs forscht. 2013.

3. Eschke M, Richter T, Piehler D, Grahnert A, Schulze B, Müller U, Köhler G, and Alber G. „*Cryptococcus neoformans*-related Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome (IRIS) Analysis of Pathomechanisms in a mouse model“ *Nationale Forschungsplattform für Zoonosen, Junior Scientist Zoonoses Meeting*, 2013
4. Eschke M, Schulze B, Richter T, Piehler D, Grahnert A, Müller U, Köhler G, and Alber G. „*Cryptococcus neoformans*-related Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome (IRIS) Analysis of Pathomechanisms in a mouse model“ *9th Spring School on Immunology*, 2013.
5. Eschke M, Richter T, Piehler D, Grahnert A, Schulze B, Müller U, Köhler G, and Alber G. „*Cryptococcus neoformans*-related Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome (IRIS) Analysis of Pathomechanisms in a mouse model“ *11th Leipzig Research Festival for Life Sciences*, 2012.
6. Eschke M, Grahnert A, Piehler D, Richter T, Köhler G, Stenzel W, Müller U, and Alber G. „A murine model of *Cryptococcus neoformans*-related Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome (IRIS)“ *2. Infektionsmedizinisches Symposium Mitteldeutschland – Nachwuchs forscht*. 2012.

VORTRÄGE

1. Eschke M. „*Cryptococcus neoformans*-related Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome (IRIS): Analysis of Pathomechanisms in a mouse model“ *9th German Meeting on Immune Regulation. Akademie Berlin-Schmöckwitz*, 2015
2. Eschke M. „*Cryptococcus neoformans*-related Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome (IRIS): Analysis of Pathomechanisms in a mouse model“ *3. Leipziger Doktorandenforum, Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig*, 2014.
3. Eschke M. „*Cryptococcus neoformans*-related Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome (IRIS): Analysis of Pathomechanisms in a mouse model“ *EMBO Workshop on AIDS-related Mycoses. Cape Town, South Africa*. 2013.
4. Eschke M. „A murine model of *Cryptococcus neoformans*-related Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome (IRIS)“ *16. Minisymposium “Infektion und Immunabwehr” Burg Rothenfels*. 2012.