

Aus dem
Institut für Immunologie
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

**Die Bedeutung von Interleukin-12p75 und Interleukin-12p40 für
die Abwehr einer Infektion mit *Cryptococcus neoformans* im
murinen Modell**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von

Frank Wagner

aus Wippra

Leipzig, 2002

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Gotthold Gäbel

Betreuer: Prof. Dr. Gottfried Alber

Gutachter: Prof. Dr. Gottfried Alber, Institut für Immunologie,
Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig

Prof. Dr. Heinz-Adolf Schoon, Institut für Veterinär-Pathologie,
Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig

Prof. Dr. M. M. Wittenbrink, Institut für Veterinärbakteriologie,
Universität Zürich

Tag der Verteidigung: 13. Mai 2003

Inhaltsverzeichnis

	Inhaltsverzeichnis	I
	Abbildungsverzeichnis	III
	Tabellenverzeichnis	V
	Abkürzungen	VI
1	Einleitung und Zielstellung	1
2	Stand der Forschung	2
2.1	Einführung	2
2.2	Interleukin-12	3
2.2.1	Synthese und Struktur von IL-12	3
2.2.2	IL-12-Rezeptor	6
2.2.3	Funktion von IL-12	6
2.2.4	Rolle von IL-12 bei der Infektionsabwehr	8
2.2.5	Rolle von IL-12 bei der Tumorabwehr	9
2.2.6	Pathophysiologische Bedeutung von IL-12	10
2.3	<i>Cryptococcus neoformans</i>	11
2.3.1	Geschichte	11
2.3.2	Aufbau und Struktur	11
2.3.3	Kultivierung	12
2.3.4	Taxonomie	12
2.3.5	Pathogenität	13
2.3.6	Erregerabwehr	14
2.4	Infektionen mit <i>C. neoformans</i> bei Haustieren	17
3	Tiere, Material und Methoden	19
3.1	Material	19
3.1.1	Mäuse	19
3.1.2	Erreger	20
3.1.3	Puffer und Medien	21
3.2	Methoden	22
3.2.1	Intraperitoneale Infektion von Mäusen	22
3.2.2	Intranasale Infektion von Mäusen	22
3.2.3	Analyse infizierter Mäuse	23
3.2.4	Keimzahlbestimmung nach der Infektion	23
3.2.5	Histologische Untersuchungen	23
3.2.6	Immunhistologische Untersuchungen	24
3.2.7	Serologische Untersuchungen	26
3.2.7.1	Kryptokokken-spezifische Antikörper	26
3.2.7.2	Bestimmung des Antikörpergesamtgehaltes	26
3.2.7.3	Bestimmung des Kryptokokken-Antigens im Serum	28
3.3	Statistik	28
4	Ergebnisse	29
4.1	Intraperitoneale Infektion	29
4.1.1	Organkeimzahlen nach Infektion	29
4.1.2	Bestimmung des Kryptokokken-Antigens im Serum	31
4.1.3	Pathohistologische Charakterisierung der Entzündungsreaktion	33
4.1.3.1	Morphologische Unterschiede der Entzündungsreaktion	33
4.1.3.2	Bestimmung der Anzahl und Größe der Gewebsveränderungen an HE-Schnitten	35

II

4.1.3.3	Immunhistologische Untersuchungen zur zellulären Zusammensetzung der Granulome und Gewebsveränderungen	40
4.1.3.3.1	Zelluläre Zusammensetzung Granulome bei Wildtyp-Mäusen	41
4.1.3.3.2	Zelluläre Zusammensetzung der Granulome bei IL-12p35 ^{-/-} -Mäusen	44
4.1.3.3.3	Zelluläre Zusammensetzung der atypischen Granulome / Gewebsveränderungen bei IL-12p35/p40 ^{-/-} -Mäusen	46
4.1.4	Bestimmung der Serum-Antikörper	49
4.1.4.1	Kryptokokken-spezifische Antikörper	49
4.1.4.2	Antikörpergesamtgehalt	50
4.2	Intranasale Infektion	55
4.2.1	Etablierung der Infektionsbedingungen	55
4.2.2	Organkeimzahlen nach Infektion	55
4.2.3	Bestimmung des Kryptokokken-Antigens im Serum	57
4.2.4	Charakterisierung der Entzündungsreaktion	58
4.2.4.1	Charakterisierung der Entzündungsreaktion an HE-Schnitten	58
4.2.4.2	Immunhistochemische Untersuchungen zur zellulären Zusammensetzung der pathologisch veränderten Areale	62
4.2.4.2.1	Zelluläre Zusammensetzung der pathologisch veränderten Areale bei Wildtyp-Mäusen	62
4.2.4.2.2	Zelluläre Zusammensetzung der pathologisch veränderten Areale bei IL-12p35 ^{-/-} -Mäusen	64
4.2.4.2.3	Zelluläre Zusammensetzung der pathologisch veränderten Areale bei IL-12p35/p40 ^{-/-} -Mäusen	64
4.2.5	Bestimmung der Serum-Antikörper	65
4.2.5.1	Kryptokokken-spezifische Antikörper	65
4.2.5.2	Antikörpergesamtgehalt	67
5	Diskussion	70
5.1	Aktivität von IL-12p75 in der Abwehr von <i>C. neoformans</i>	72
5.2	Aktivität von IL-12p40 in der Abwehr von <i>C. neoformans</i>	74
5.3	Aktivität von IL-23 in der Abwehr von <i>C. neoformans</i>	75
5.4	Vergleich zwischen intraperitonealer und intranasaler Infektion	76
5.5	Ausblick auf künftige Untersuchungen	78
6	Zusammenfassung	79
7	Summary	81
8	Literaturverzeichnis	83

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.	Die durch IL-12 induzierte Th1-Abwehr und die durch IL-4 induzierte Th2-Abwehr bilden die Arme einer Waage.	4
Abbildung 2.	Bedeutung von IL-12 für die Reifung und Differenzierung von NK-Zellen, zytotoxischen Lymphozyten und naiven CD4 ⁺ -T-Zellen und die Beeinflussung des Th1-Th2-Verhältnisses.	5
Abbildung 3.	Charakterisierung der verschiedenen Mausgenotypen in Bezug auf die Proteinsynthese der Makrophagen nach Aktivierung.	20
Abbildung 4.	Schematische Darstellung des ELISA - Aufbaus zum Nachweis von Antikörpern.	27
Abbildung 5.	Zeitlicher Verlauf der Keimbelastung der Lunge von Wildtyp-Mäusen nach intraperitonealer Infektion.	29
Abbildung 6.	Unterschiede in der Keimbelastung der Leber 21 Tage nach intraperitonealer Infektion.	30
Abbildung 7.	Kryptokokken-Antigen-Titer im Serum, 21 Tage nach intraperitonealer Infektion, bestimmt mittels kommerziellem ELISA	32
Abbildung 8.	Granulome und vereinzelt Kryptokokken in der Leber einer Wildtyp-Maus 21 Tage nach intraperitonealer Infektion. HE-Färbung zur Übersicht.	34
Abbildung 9.	Atypische Granulome in der Leber einer IL-12p35/p40 ^{-/-} -Maus 21 Tage nach intraperitonealer Infektion. HE-Färbung zur Übersicht.	34
Abbildung 10.	Granulome in der Leber einer IL-12p35 ^{-/-} -Maus 21 Tage nach intraperitonealer Infektion. HE-Färbung zur Übersicht.	35
Abbildung 11.	Anzahl der Granulome in der Leber (pro mm ²) bei Wildtyp-Mäusen in Abhängigkeit von der Zeit.	36
Abbildung 12.	Entwicklung der Granulomfläche in Bezug auf die Gesamtfläche in der Leber bei Wildtyp-Mäusen in Abhängigkeit von der Zeit.	36
Abbildung 13.	Granulomgröße in der Leber in Abhängigkeit von der Zeit bei Wildtyp-Mäusen nach intraperitonealer Infektion.	37
Abbildung 14.	Unterschiede in der Anzahl der Gewebsveränderungen zwischen den Wildtyp- und den IL-12 ^{-/-} -Mäusen.	38
Abbildung 15.	Unterschiede im Anteil der Gewebsveränderungen an der Lebergesamtfläche bei den einzelnen Mausgenotypen.	39
Abbildung 16.	Vergleich der Größe der Gewebsveränderungen der Leber in µm ² bei Wildtyp-, IL-12p35 ^{-/-} -und IL-12p35/p40 ^{-/-} -Mäusen, 21 Tage nach intraperitonealer Infektion.	40
Abbildung 17.	Übersicht über Entzündungszellen im Lebergewebe von Wildtyp-Mäusen 21 Tage nach intraperitonealer Infektion.	41
Abbildung 18.	Makrophagen im Lebergewebe einer Wildtyp-Maus 21 Tage nach intraperitonealer Infektion.	42
Abbildung 19.	T-Helferzellen im Lebergewebe einer Wildtyp-Maus 21 Tage nach intraperitonealer Infektion.	43
Abbildung 20.	Zytotoxische T-Zellen im Lebergewebe einer Wildtyp-Maus 21 Tage nach intraperitonealer Infektion.	43
Abbildung 21.	Makrophagen im Lebergewebe einer IL-12p35 ^{-/-} -Maus 21 Tage nach intraperitonealer Infektion.	45

IV

Abbildung 22.	T-Helferzellen im Lebergewebe einer IL-12p35 ^{-/-} -Maus 21 Tage nach intraperitonealer Infektion.	45
Abbildung 23.	Zytotoxische T-Zellen im Lebergewebe einer IL-12p35 ^{-/-} -Maus 21 Tage nach intraperitonealer Infektion.	46
Abbildung 24.	Makrophagen im Lebergewebe einer IL-12p35/p40 ^{-/-} -Maus 21 Tage nach intraperitonealer Infektion.	47
Abbildung 25.	T-Helferzellen im Lebergewebe einer IL-12p35/p40 ^{-/-} -Maus 21 Tage nach intraperitonealer Infektion.	48
Abbildung 26.	Zytotoxische T-Zellen im Lebergewebe einer IL-12p35/p40 ^{-/-} -Maus 21 Tage nach intraperitonealer Infektion.	48
Abbildung 27.	Bestimmung der Kryptokokken-spezifischen Antikörper im Serum infizierter Mäuse mittels durchflusszytometrischer Analyse.	50
Abbildung 28.	Bestimmung des IgG2a-Gesamtgehaltes im Serum 21 Tage nach intraperitonealer Infektion.	51
Abbildung 29.	Bestimmung des IgG1-Gesamtgehaltes im Serum 21 Tage nach intraperitonealer Infektion.	52
Abbildung 30.	Bestimmung des IgE-Gesamtgehaltes im Serum 21 Tage nach intraperitonealer Infektion.	53
Abbildung 31.	Verhältnis der IgG2a-Antikörperkonzentration zu den IgG1-Antikörperkonzentration, 21 Tage nach intraperitonealer Infektion.	54
Abbildung 32.	Zeitlicher Verlauf der Keimbelastung der Lunge von Wildtyp-, IL-12p35 ^{-/-} - und IL-12p35/p40 ^{-/-} -Mäusen 21, 35 und 48 Tage nach intranasaler Infektion.	56
Abbildung 33.	Lunge einer Wildtyp-Maus 35 Tage nach intranasaler Infektion.	59
Abbildung 34.	Lunge einer IL-12p35 ^{-/-} -Maus 35 Tage nach intranasaler Infektion.	59
Abbildung 35.	Lunge einer IL-12p35/p40 ^{-/-} -Maus 35 Tage nach intranasaler Infektion.	60
Abbildung 36.	Lunge einer Wildtyp-Maus 48 Tage nach intranasaler Infektion.	61
Abbildung 37.	Lunge einer IL-12p35 ^{-/-} -Maus 48 Tage nach intranasaler Infektion.	61
Abbildung 38.	Lunge einer IL-12p35/p40 ^{-/-} -Maus 48 Tage nach intranasaler Infektion.	62
Abbildung 39.	T-Helferzellen in der Lunge einer Wildtyp-Maus 21 Tage nach intranasaler Infektion.	63
Abbildung 40.	Färbung zytotoxischer T-Zellen in der Lunge einer Wildtyp-Maus 21 Tage nach intranasaler Infektion.	63
Abbildung 41.	T-Helferzellen in der Lunge einer IL-12p35 ^{-/-} -Maus 21 Tage nach intranasaler Infektion.	64
Abbildung 42.	T-Helferzellen in der Lunge einer IL-12p35/p40 ^{-/-} -Maus 21 Tage nach intranasaler Infektion.	65
Abbildung 43.	Bestimmung der Kryptokokken-spezifischen Antikörper im Serum infizierter Mäuse mittels durchflusszytometrischer Analyse 21 und 35 Tage nach intranasaler Infektion.	66
Abbildung 44.	Bestimmung des IgG2a-Gesamtgehaltes im Serum mittels ELISA nach intranasaler Infektion.	68
Abbildung 45.	Bestimmung des IgG1-Gesamtgehaltes im Serum mittels ELISA nach intranasaler Infektion.	69
Abbildung 46.	Zusammenfassende Darstellung der Bedeutung von IL-12p75 und IL-12p40 in der Abwehr von <i>C. neoformans</i> .	71

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.	Darstellung der wirksamen Proteine der p40-Zytokinfamilie bei den gendefizienten und den Wildtyp-Mäusen.	2
Tabelle 2.	Übersicht über die verwendeten Antikörper der Firma Southern Biotechnology zur Ig-Bestimmung mittels ELISA.	27
Tabelle 3.	Übersicht über die Organkeimbelastung in Milz und Gehirn nach intranasaler Infektion. Medianwerte.	57
Tabelle 4.	Medianwerte der Kryptokokken-Antigen-Titer im Serum nach intranasaler Infektion.	57
Tabelle 5.	Unterschiede in der mittleren relativen Fluoreszenz nach durchflusszytometrischer Analyse Kryptokokken-spezifischer Antikörper in Abhängigkeit vom Infektionsweg 21 Tage <i>p. i.</i>	67

Abkürzungen

°C	Grad Celsius
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
APC	Antigenpräsentierende Zelle
BALT	Bronchiolus-assoziiertes-lymphatische Gewebe
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	<i>cluster of differentiation</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
ELISA	Enzymgekoppelter Immunoassay
FACS	Fluoreszenzaktivierter Zellsortierer
FKS	Fetales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung 9,81m/s ²
GXM	Glukuronoxylomannan
HE	Hämatoxylin/Eosin
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
KBE	Koloniebildende Einheiten
LD-50	Dosis bei der die Hälfte der Tiere stirbt
mAk	monoklonaler Antikörper
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
<i>p. i.</i>	nach Infektion (<i>post infectionem</i>)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PE	Phykoerythrin
Th	T-Helfer
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor

1 Einleitung und Zielstellung

Bei Infektionen mit opportunistischen, intrazellulären Pathogenen versucht sich der Erreger durch Eindringen in Zellen dem Zugriff des Immunsystems zu entziehen. Bei solchen Infektionen ist eine effektive zelluläre Abwehr der Schlüssel für den Sieg über den Erreger. Ein solches Pathogen ist der Pilz *Cryptococcus neoformans* (*C. neoformans*). Eine Infektion mit diesem Erreger ist besonders bei Patienten mit einem Defekt der zellulären Abwehr von Bedeutung. Dies ist beispielsweise bei angeborenen und erworbenen Immundefekten (z. B. AIDS) und unter therapeutischer Immunsuppression der Fall. Dort kommt es zur Dissemination von Erregern in das Gehirn und damit zur Ausbildung einer Meningoenzephalitis. Da die gebräuchlichen Behandlungsmethoden (Amphotericin B und Fluconazol) nicht schnell und effektiv genug wirken, erliegen die meisten Patienten der Infektion. Es gilt also, alternative Behandlungsmethoden zu finden.

Ein aussichtsreicher Kandidat dafür ist das Zytokin Interleukin-12 (IL-12), da bereits gezeigt wurde, dass mit rekombinantem IL-12 behandelte Mäuse nach Infektion mit *C. neoformans* im Gegensatz zu unbehandelten Mäusen länger leben und eine effektivere Entzündungsreaktion ausbilden.

IL-12 besteht aus zwei Untereinheiten, dem IL-12p35 und dem IL-12p40. Beide verbinden sich zu IL-12p75, der aktiven Form von IL-12. IL-12p35 und IL-12p40 werden von Makrophagen nach Aktivierung produziert. In die Umgebung wird aber nur IL-12p75 und das im Überschuss produzierte IL-12p40 in erster Linie als Homodimer abgegeben. Ungebundenes IL-12p35 wird nicht vom Makrophagen abgegeben und hat allein keine Wirkung.

OPPMANN et al. (2000) beschrieben jüngst ein neues Zytokin der p40-Familie, IL-23, ein Heterodimer aus der p40- und einer neu gefundenen p19-Untereinheit. Zu diesem Zeitpunkt konnte am Versuchsaufbau nichts mehr geändert werden, da die meisten Untersuchungsergebnisse schon vorlagen. Die Bedeutung von IL-23 muss aber bei der Interpretation mancher Ergebnisse berücksichtigt werden.

In dieser Arbeit sollte der Einfluss von IL-12p75 und IL-12p40 auf die Abwehr einer *C.-neoformans*-Infektion untersucht werden.

Dazu wurden Mäuse mit *C. neoformans* infiziert und ihre Reaktion anhand von Erregernachweisen, histologischen Untersuchungen und Serum-Bestimmungen untersucht.

Um den Einfluss von IL-12p75 vom Einfluss von p40 abgrenzen zu können, müssen sich die Mäuse aber in diesem Punkt unterscheiden. Deswegen kamen gendefiziente Mäuse zum Einsatz. Von einer genetisch einheitlichen Inzuchtlinie (Wildtyp-Mäuse) ausgehend wurde das Gen für IL-12p35 funktionsunfähig gemacht. Diese Mäuse werden als IL-12p35^{-/-}-Mäuse bezeichnet. Außerdem wurden in einer weiteren Linie die Gene sowohl für IL-12p35 als auch für IL-12p40 funktionsunfähig gemacht. Diese Mäuse werden als IL-12p35/p40^{-/-}-Mäuse bezeichnet.

Die Wildtyp-Mäuse sind zur Bildung von IL-12p75, IL-12p40 und IL-23 fähig.

Die IL-12p35^{-/-}-Mäuse sind zur Bildung von IL-12p40 und IL-23 fähig.

Die IL-12p35/p40^{-/-}-Mäuse können diese Proteine nicht mehr bilden (Tabelle 1).

Wildtyp-Mäuse	IL-12p75	IL-12p40	IL-23
IL-12p35 ^{-/-} -Mäuse	---	IL-12p40	IL-23
IL-12p35/p40 ^{-/-} -Mäuse	---	---	---

Tabelle 1. Darstellung der wirksamen Proteine der p40-Zytokinfamilie bei den gendefizienten und den Wildtyp-Mäusen

Unterschiede in der Reaktion zwischen Wildtyp-Mäusen und IL-12p35^{-/-}-Mäusen sind also auf die Wirkung von IL-12p75 zurückzuführen und Unterschiede zwischen IL-12p35^{-/-}-Mäusen und IL-12p35/p40^{-/-}-Mäusen sind auf die Wirkung von IL-12p40 zurückzuführen. Mit diesem System kann der Einfluss von IL-12p75 und IL-12p40 auf die Abwehr einer *C.-neoformans*-Infektion untersucht werden.

2 Stand der Forschung

2.1 Einführung

Die Zellen des Immunsystems gehen aus pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks hervor. Es entstehen zum einen die zellulären Vermittler der unspezifischen Abwehr, Monozyten und Makrophagen, neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten sowie natürliche Killerzellen. Zum anderen entstehen aus den Stammzellen die zellulären Vermittler der spezifischen Abwehr, B-Zellen und T-Zellen, die sich ihrerseits in T-Helferzellen und zytotoxische T-Zellen unterteilen lassen. Für ein effektives Immunsystem müssen beide Teile miteinander kommunizieren können. Diese Aufgabe übernehmen die Zytokine. Sie werden in die Umgebung abgegeben und wirken über spezifische Rezeptoren auf die Zielzellen. Zu den Zytokinen gehören die Interferone, die Interleukine, die Chemokine und die Zytokine der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-Familie. Eingeteilt werden die Zytokine nach den

Rezeptorfamilien, an denen sie binden. Sie regulieren die Ausbildung von Entzündungen und die Bildung von Antikörpern. Ob die Erregerabwehr vorwiegend aus zellulären oder humoralen Komponenten besteht, wird maßgeblich durch die Produktion des Zytokins IL-12 bestimmt (Abbildung 1).

2.2 Interleukin-12

Phagozytierende Zellen und NK-Zellen gehören zum angeborenen Immunsystem und bilden die erste Abwehrlinie bei Infektionen. Während der frühen entzündlichen Antwort auf eine Infektion sind regulatorische Interaktionen zwischen den Zellen notwendig. Diese Aufgabe vermitteln die Zytokine und bewirken eine Aktivierung von phagozytierenden Zellen und NK-Zellen und deren Einwanderung in das Gewebe. Einer der potentesten Aktivatoren dieser Zellen ist dabei IFN- γ . Die IFN- γ -Produktion wird hauptsächlich durch IL-12 induziert (Abbildung 2).

2.2.1 Synthese und Struktur von IL-12

IL-12 wird primär von antigenpräsentierenden Zellen produziert und beeinflusst den immunregulatorischen Prozess von T-Zellen und natürlichen Killerzellen (WOLFF et al. 1991). Es ist für die Regulation des Gleichgewichts von Typ1 und Typ2 T-Helferzellen von entscheidender Bedeutung (Abbildung 1). Die Immunreaktion der Th1-Zellen wird dabei durch IL-12 induziert und tritt vorwiegend bei intrazellulären Erregern in Erscheinung. Die Immunreaktion der Th2-Zellen wird durch IL-4 induziert und dient unter anderem der Abwehr von extrazellulären Erregern, wie z. B. Würmern, Ziliaten und anderen Parasiten.

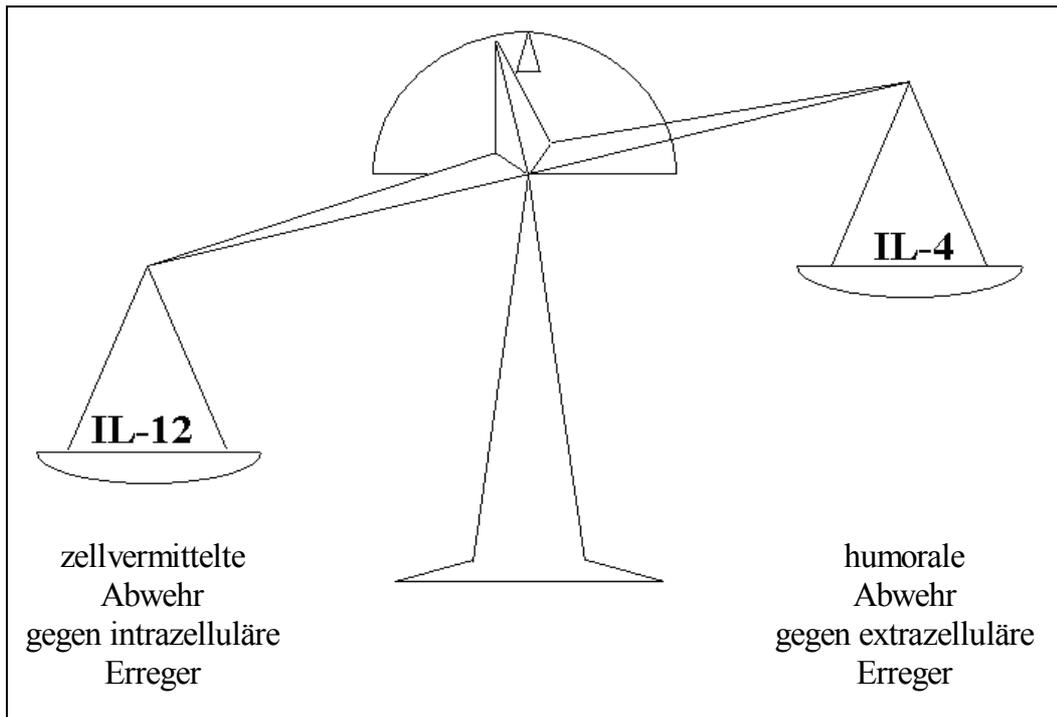


Abbildung 1. Die durch IL-12 induzierte Th1-Abwehr und die durch IL-4 induzierte Th2-Abwehr bilden die Arme einer Waage. Wird die eine Seite verstärkt, so wird die andere regulatorisch verringert.

Je nachdem, ob durch die Infektion mehr IL-12 oder mehr IL-4 gebildet wird, differenzieren naive $CD4^+$ -T-Zellen unterschiedlich aus. Bei einer vermehrten Produktion von IL-12 kommt es zur Differenzierung zu Th1-Zellen, welche über die Produktion von $IFN-\gamma$ positiv auf die antigenpräsentierenden Zellen zurückwirkt und andererseits die Produktion von IL-4 hemmt (Abbildung 2). Die Th1-Zellen unterscheiden sich von den Th2-Zellen durch die Produktion ihrer Zytokine.

Th1-Zellen (Typ1-Abwehr) produzieren u.a. IL-2, $IFN-\gamma$, $TNF-\alpha$ und Lymphotoxin ($TNF-\beta$). Damit bewirken sie eine Aktivierung von Makrophagen und bei B-Zellen einen Klassenwechsel zu IgG2a bei der Maus.

Th2-Zellen (Typ2-Abwehr) produzieren u.a. IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13. Damit dämpfen sie die zellvermittelte Immunantwort und bewirken bei B-Zellen einen Klassenwechsel zu IgE.

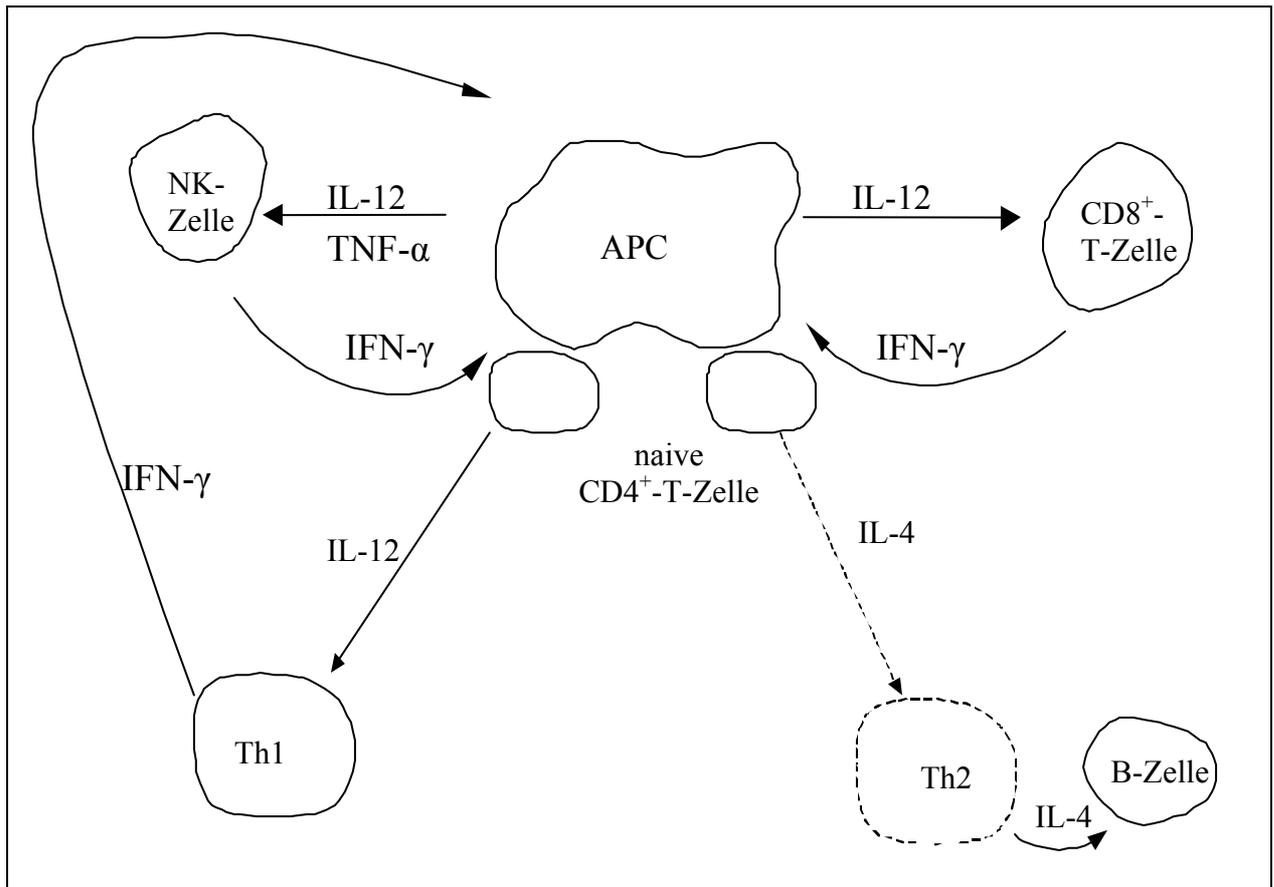


Abbildung 2. Bedeutung von IL-12 für die Reifung und Differenzierung von NK-Zellen, zytotoxischen Lymphozyten und naiven $CD4^+$ -T-Zellen und die Beeinflussung des Th1-Th2-Verhältnisses.

IL-12 ist aufgrund der Induktion der Th1-Antwort außerordentlich wichtig für die Abwehr von intrazellulären Erregern (MATTNER et al. 1996). Die Injektion von rekombinantem IL-12 zeigt in einer Reihe von Maustumor-Modellen, verschiedenen murinen Infektionsmodellen und aerogenen Infektionen eine prophylaktische Wirkung. Daraufhin wurden klinische Studien bei Tumorpatienten, Menschen mit chronischen viralen Erkrankungen und HIV-positiven Patienten durchgeführt (NOGUCHI et al. 1995). Die Bedeutung von IL-12 für eine Infektion mit dem fakultativ intrazellulären Erreger *C. neoformans* sollte demnach sehr groß sein.

Die Struktur von IL-12 weist im Gegensatz zu den meisten anderen Zytokinen eine Besonderheit auf. Es ist ein heterodimeres Protein, dessen beide Untereinheiten durch zwei Disulfidbrücken miteinander verbunden sind und als IL-12p35 und IL-12p40 bezeichnet werden (ausgehend vom Molekulargewicht) (PODLASKI et al. 1992). Zwischen IL-12p35 und IL-12p40 besteht keinerlei Sequenzübereinstimmung. Beide Proteine werden in zwei verschiedenen Genen kodiert, allerdings gibt es Homologien von IL-12p35 mit IL-6 und G-CSF. Es hat, wie andere Zytokine auch, eine α -Helix-reiche Struktur (MERBERG et al.

1992). Die IL-12p40-Kette weist dagegen keinerlei strukturelle Gemeinsamkeiten mit anderen Zytokinen auf. Es gehört aber zur Hämopoetin-Rezeptor-Familie und ähnelt sehr der IL-6-Rezeptor- α -Untereinheit (SCHOENHAUT et al. 1992).

Bisher wurde weder bei IL-12p35 noch bei IL-12p40 eine alleinige biologische Aktivität festgestellt (GUBLER et al. 1991). Das p40-Homodimer IL-12p40 zeigt eine Funktion als IL-12-Antagonist, da es zwar an den IL-12-Rezeptor bindet, dadurch diesen Rezeptor für IL-12p75 blockiert, aber keine eigene biologische Reaktion hervorruft (GATELY et al. 1996; MATTNER et al. 1993).

In der Zellkultur wurde nach Aktivierung von Makrophagen eine 5 bis 500fache Überproduktion an IL-12p40 im Bezug auf das IL-12-Heterodimer festgestellt (D'ANDREA et al. 1992). Ein 20 bis 40facher Überschuss an IL-12p40 in Form von IL-12p40-Homodimer wurde im Serum von Mäusen gefunden, die mit Endotoxin stimuliert wurden (HEINZEL et al. 1997). Diese Ergebnisse lassen eine physiologische, regulierende Funktion von IL-12p40 auf die IL-12-Aktivität vermuten, welche noch experimentell nachzuweisen ist.

2.2.2 IL-12-Rezeptor

Der IL-12-Rezeptor wird primär auf aktivierten T- und NK-Zellen exprimiert (DESAI et al. 1992). Es wurden zwei IL-12R-Untereinheiten in Mensch und Maus entdeckt und als IL-12R β 1 (CHUA et al. 1994) und IL-12R β 2 (PRESKY et al. 1996) bezeichnet. Es handelt sich dabei um transmembrane Glykoproteine mit einem Molekulargewicht von 100 kDa (IL-12R β 1) und 130 kDa (IL-12R β 2). In der Maus ist dabei die β 1-Untereinheit für die Bindung und die β 2-Untereinheit des Rezeptors für die Signaltransduktion verantwortlich.

Auf aktivierten B-Zellen, die bei der Th2-Antwort induziert werden, wird zwar IL-12R β 1, nicht aber IL-12R β 2 exprimiert (SZABO et al. 1997). Eine IL-12-induzierte Signaltransduktion kann somit nicht stattfinden. Im Gegensatz zu IL-12R β 1 scheint die Expression von IL-12R β 2 stark von Zytokinen wie IL-10 und TGF- β abhängig zu sein (WU et al. 1997). Diese Modulation der IL-12R β 2-Expression scheint ein zentraler Punkt der Regulierung der IL-12-Antwort zu sein.

2.2.3 Funktion von IL-12

Die deutlichste und wichtigste Rolle von IL-12 ist die Beeinflussung der Balance zwischen Th1- und Th2-Zellen. Th1-Zellen produzieren IL-2 und IFN- γ , welche die zellvermittelte

Immunantwort unterstützen. Th2-Zellen produzieren IL-4, -5, -6, -10 und -13, welche die humorale Abwehr unterstützen (PAUL und SEDER 1994).

In-vitro-Studien an humanen und murinen Modellen und *In-vivo*-Mausmodelle haben gezeigt, dass IL-12 eine Th1-Antwort fördert. IL-12 beschreitet dabei drei Wege:

- a) es beeinflusst die Entwicklung von naiven T-Zellen beim ersten Antigenkontakt, zur Differenzierung in Th1-Zellen, die in der Lage sind, große Mengen an IFN- γ zu produzieren (SEDER et al. 1993);
- b) es dient als zusätzlicher Stimulator für eine maximale IFN- γ -Produktion von Th1-Zellen bei spezifischem Antigenkontakt (MURPHY et al. 1994);
- c) es stimuliert die ruhenden T-Gedächtniszellen zur Ausbildung von IFN- γ -produzierenden Th1-Zellen bei erneutem Kontakt mit dem vormals sensibilisierenden Antigen (MANETTI et al. 1993).

In einigen Infektionsmodellen konnte der Th1-induzierende Effekt von IL-12 durch Anti-IFN- γ -Antikörper eingeschränkt werden. Aber IFN- γ allein kann den Effekt von IL-12 nicht ersetzen (SCHMITT et al. 1994). Die Rollen von IFN- γ als Kostimulus für eine IL-12-abhängige-Th1-Antwort könnte ein Zeichen für die Bedeutung als Kofaktor für die optimale IL-12 Produktion darstellen (DIGHE et al. 1995).

Außerdem wurde unter experimentellen Bedingungen gezeigt, dass IL-12 über die Bildung von IFN- γ die Th2-Antwort hemmt. Dieser Effekt ist vom Zytokinmilieu und vom Entwicklungsstand der T-Zellen abhängig.

Die wohl wichtigste Eigenschaft von IL-12 ist die Induktion der Produktion von großen Mengen an IFN- γ aus ruhenden und aktivierten T- und NK-Zellen (ASTE-AMEZAGA et al. 1994). Die Produktion von IFN- γ wird zum einen durch verschiedene andere Zytokine und Lymphozyten-aktivierende-Faktoren, wie TNF- α , IL-1 und IL-2, positiv beeinflusst. Zum anderen wirkt die Anwesenheit von IL-4, IL-10 und TGF- β auf die Produktion von IL-12-induziertem IFN- γ -hemmend.

IL-12 kann, je nach Immunglobulin-Isotyp, die humorale Immunantwort entweder verstärken oder unterdrücken. Durch die Verabreichung von IL-12 an Mäuse kann die IgG2a- und IgG2b-Antwort um das 10- bis 100fache gesteigert werden (GERMANN et al. 1995 a). Die Produktion dieser Ig-Isotypen ist an das bei einer Th1-Antwort gebildete IFN- γ gebunden (FINKELMAN et al. 1990). Durch diese Eigenschaft ist IL-12 in der Lage, die Ausbildung

einer IgG1-Isotypen-Antwort zu unterdrücken (BUCHANAN et al. 1995). In einer Vielzahl von murinen Infektionssystemen wurde außerdem eine drastische Reduzierung der IgE-Bildung gezeigt (GERMANN et al. 1995 b). In Fällen, in denen die Immunreaktion schon verstärkt in Richtung Th2 geht, bewirkt zusätzliches IL-12 eine verstärkte Produktion von IgE (JELINEK und BRAATEN 1995). In den meisten Infektionsmodellen wird die Antikörper-Antwort durch IFN- γ vermittelt, wobei ein direkter Effekt von IL-12 nicht auszuschließen ist.

IL-12 kann die lytische Aktivität von NK-Zellen und Lymphokin-aktivierten Killerzellen steigern (GATELY et al. 1992), fördert die spezifische Antwort durch zytolytische T-Lymphozyten (CTL) und bewirkt als Wachstums- und Aktivierungsfaktor die Differenzierung und Aktivierung von T- und NK-Zellen (GATELY et al. 1991). In verschiedenen Untersuchungen wurde gezeigt, dass CD4⁺- und/oder CD8⁺-T-Zellen durch IL-12 gegenüber Apoptose geschützt werden können (CLERICI et al. 1994).

2.2.4 Rolle von IL-12 bei der Infektionsabwehr

Die Induktion einer Th1-Antwort und die Produktion von IFN- γ ist für die Immunität gegenüber verschiedenen pathogenen Erregern wichtig. Studien in IL-12-defizienten Mäusen haben gezeigt, dass endogenes IL-12 für die Ausbildung einer protektiven Th1-Antwort gegenüber verschiedenen intrazellulären Erregern wie Bakterien, Pilzen und Protozoen essentiell ist. Außer in IL-12-defizienten Mäusen können diese Versuche auch mittels neutralisierender monoklonaler Antikörper gegen IL-12 gemacht werden.

Eine Infektion mit *Leishmania major* ist ein typisches Modell für eine Erkrankung, bei der eine Th1-Antwort in Mäusen protektiv ist (REINER und LOCKSLEY 1995). Mausstämme, wie z. B. C57BL/6 und 129Sv/Ev, die während einer *Leishmania*-Infektion eine sehr gute Th1-Antwort ausbilden können, sind in der Lage diese Infektion erfolgreich zu bekämpfen. Im Gegensatz dazu sind BALB/c-Mäuse in diesem Infektionsmodell nicht in der Lage eine protektive Th1-Antwort auszubilden und erliegen der Infektion. Wird bei C57BL/6- und 129Sv/Ev-Mäusen das IL-12 durch Ausschalten des entsprechenden Gens (MAGRAM et al. 1996; MATTNER et al. 1996) oder neutralisierende Antikörper (SCHARTON-KERSTEN et al. 1995) eliminiert, können auch diese Mäuse keine protektive Th1-Antwort mehr ausbilden und erliegen der Infektion.

Endogenes IL-12 ist auch für die Resistenz gegenüber einer Infektion mit *Toxoplasma gondii* wichtig (SCHARTON-KERSTEN et al. 1997), obwohl dies sowohl von IL-12-abhängigen als auch IL-12-unabhängigen Faktoren vermittelt wird. Dabei führt das Fehlen von IL-12

besonders in der akuten Phase, nicht aber in der chronischen Phase der Infektion, zum Tode (GAZZINELLI et al. 1994).

Für die Kontrolle einer Infektion mit *Mycobacterium avium* sowie mit *Mycobacterium tuberculosis* ist endogenes IL-12 genauso wichtig wie für die Abwehr der anderen intrazellulären Erreger (COOPER et al. 1997).

Die Resistenz gegenüber *Listeria monocytogenes* wird durch neutralisierende Antikörper gegen IL-12 in der Frühphase der Infektion stark herabgesetzt (TRIPP et al. 1995). Eine Eliminierung des IL-12 in der Spätphase der Infektion hatte einen wesentlich geringeren Effekt auf den Resistenzstatus der Versuchstiere. Durch die Verwendung von IL-12p35^{-/-}- und IL-12p40^{-/-}-Mäusen konnte der Einfluss der beiden Untereinheiten näher untersucht werden. Dabei starben IL-12-defiziente Mäuse schon an einer bei Wildtyp-Mäusen subletalen Dosis. Dabei waren IL-12p35^{-/-}-Mäuse, im Gegensatz zu IL-12p40^{-/-}-Mäusen, in der Lage, eine Infektion mit einer mittleren Dosis (in Bezug auf die LD-50) zu überleben (sterile Elimination) und das, trotz des Fehlens von biologisch aktivem IL-12 (BROMBACHER et al. 1999). Analysen in Listerien-infizierten IL-12p35^{-/-}-Mäusen ergaben einen zum Wildtyp vergleichbaren Gehalt an IL-12p40-Dimer und -Monomer. Daraus lässt sich schließen, dass IL-12p40-Monomer, IL-12p40, oder IL-12p40 in Verbindung mit anderen Untereinheiten oder Polypeptidketten eine wichtige Rolle in der Elimination von Listerien hat.

Bei einer Infektion mit *C. neoformans* wurden bei den infizierten Mäusen auch unterschiedliche Empfindlichkeiten in Abhängigkeit von der Art der IL-12-Mutation beobachtet werden (DECKEN et al. 1998). Ähnlich wie bei einer Listerien-Infektion erliegen die IL-12p40^{-/-}-Mäuse eher als die IL-12p35^{-/-}-Mäuse der Infektion. Beide IL-12^{-/-}-Mausstämme erliegen erheblich früher der Infektion als die Wildtyp-Mäuse.

2.2.5 Rolle von IL-12 bei der Tumorabwehr

Eine systemische Behandlung mit relativ hohen Dosen von IL-12 (BRUNDA et al. 1993), oder eine stabile Transduktion von Tumorzellen, welche beide Untereinheiten von IL-12 exprimieren (MARTINOTTI et al. 1995), kann das Wachstum und die Metastasierung von Tumoren in verschiedenen *In-vivo*-Modellen unterdrücken. Geringe Dosen von IL-12 in Verbindung mit einem tumorspezifischem Peptid in einem Adjuvans rufen eine schützende antitumorale Antwort hervor. Die durch IL-12 beeinflussten molekularen und zellulären Reaktionen sind sehr komplex. In einigen Modellen wird der Schutz durch CD8⁺-T-Zellen oder NK-Zellen beeinflusst. Die Neutralisierung von IFN- γ kann diesen antitumoralen Effekt von IL-12 aufheben. Zu dem haben die CD4⁺-Zellen einen Einfluss auf den Effekt von IL-12.

Bei IFN- γ -R1-defizienten Tumorzellen wurde eine höhere Tumorzellaktivität *in vitro* und eine geringere Ansprechbarkeit auf eine IL-12-Therapie *in vivo* festgestellt. (COUGHLIN et al. 1998) IL-12 induziert eine histologisch nachweisbare Ischämie nur in IFN- γ -empfindlichen, nicht aber in IFN- γ -unempfindlichen Tumoren. Außerdem induziert IL-12 eine Hemmung der Angiogenese durch die Produktion von IP-10 (Interferon-induzierendes-Protein) in den Tumorzellen. IL-12 und IFN- γ senken also das Tumorzellwachstum indem sie die angiogene Aktivität der Tumorzellen hemmen.

2.2.6 Pathophysiologische Bedeutung von IL-12

IL-12 kann sowohl durch vermehrte wie auch reduzierte Bildung pathophysiologische Bedeutung bekommen. Um die Rolle von IL-12 in Erkrankungen wie Multipler Sklerose zu bestimmen, bedient man sich Tiermodellen. In diesem Fall eignet sich die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) sehr gut, da es sich um eine Th1-vermittelte, demyelinisierende Entzündung des ZNS handelt. Bei Ratten mit EAE fand man schon vor dem Sichtbarwerden klinischer Symptome einen Anstieg der IL-12 mRNA-Expression (ISSAZADEH et al. 1995). Die Applikation von neutralisierenden Anti-IL-12-Antikörpern bei Einsetzen der klinischen Symptome bewirkte eine deutliche Besserung des Krankheitsbildes bzw. ein Verzögern stärkerer Symptome (LEONARD et al. 1995). Ähnliche Ergebnisse gab es beim Einsatz des IL-12-Antagonisten IL-12p40. Damit wird der Einfluss von IL-12 auf den Entzündungsprozess im Gehirn deutlich.

Asthma ist eine chronische, entzündliche Erkrankung der Atemwege bei Mensch, Pferd und Hund, welche durch aktivierte Th2-Lymphozyten induziert wird (ROBINSON et al. 1992). Es ist nachgewiesen worden, dass bei Asthmatikern die Th2-Antwort erhöht und die Th1-Antwort gegenüber Kontrollpersonen verringert ist (SHIRAKAWA et al. 1997). Die Möglichkeit des Einflusses von IL-12 auf diesen Prozess bezieht sich auf folgende Untersuchungen:

- die Expression von IL-12 mRNA in bronchialen Biopsien ist bei Asthmatikern deutlich verringert gegenüber der Kontrollgruppe (NASEER et al. 1997) und
- die Produktion von IL-12 in Vollblut-Kulturen ist bei den Atopikern signifikant geringer als in der Kontrollgruppe, obwohl die Produktion von IFN- γ normal ist (van der POUW KRAAN et al. 1997).

In Versuchen mit IL-12p40^{-/-}-Mäusen wurde nach einer Behandlung mit Ovalbumin ein vermehrter Einstrom von eosinophilen Granulozyten ins Gewebe, verglichen mit der Wildtyp-

Gruppe, festgestellt (GATELY et al. 1998). Damit einher ging eine Erhöhung der Konzentration von IL-4 und TNF- α in der bronchoalveolären Lavage und eine Erhöhung der Serum-IgE-Konzentration. Die verstärkte Eosinophilie konnte durch Anti-IL-4-Antikörper oder durch Applikation eines TNF-Rezeptor-Fusionsproteins gehemmt werden.

Im Mausmodell der allergischen Lungenentzündung konnte der entzündungshemmende/antiallergische Effekt von IL-12 gezeigt werden. Durch die Gabe von rekombinantem IL-12 wurde dabei sowohl die allergiebedingte Überempfindlichkeitsreaktion als auch die Eosinophilie gehemmt (KIPS et al. 1996).

2.3 *Cryptococcus neoformans*

2.3.1 Geschichte

C. neoformans wurde erstmals 1894 als Pathogen für den Menschen beschrieben. Der erste Bericht einer Kryptokokkose wurde von den beiden deutschen Ärzten Otto Busse und Abraham Buschke (KNOKE und SCHWEISINGER 1994) verfasst und beschreibt den Fall einer Tibialäsion bei einer 31 Jahre alten Frau. Aus den beschriebenen runden Erhabenheiten der Knochenverletzung wurde ein Mikroorganismus isoliert, den sie als Blastomyzeten identifizierten. Damals als *Saccharomyces* bezeichnet, trat der Erreger noch unter vielen verschiedenen Namen bis ins zwanzigste Jahrhundert auf, bis 1950 die Bezeichnung *C. neoformans* eingeführt wurde und sich etablierte.

2.3.2 Aufbau und Struktur

C. neoformans ist ein Schleimkapsel-tragender hefeartiger Pilz. Die typische vegetative (asexuelle) Form hat einen Durchmesser von 2,5 bis 10 μm (CRUICKSHANK et al. 1973). Die Basidiosporen (sexuelle Form) dagegen haben nur einen Durchmesser von 1,8 bis 3 μm (WILLIAMSON et al. 1996). Die meisten Stämme produzieren im Gewebe größere Kapseln als in der Zellkultur, was mit dem höheren CO₂-Partialdruck (GRANGER et al. 1985) im Gewebe und/oder mit Ernährungsfaktoren zusammenhängen kann.

Die Zellen sind im Lichtmikroskop gewöhnlich rund oder oval, haben eine doppelte Kontur und sind stark lichtbrechend. Ohne spezielle Färbeschritte ist die Kapsel lichtmikroskopisch nicht zu sehen. Die gebräuchlichste Methode der Sichtbarmachung ist die Tuschefärbung, bei der sich die Kapsel als freier Raum zwischen Zellwand und Tusche kennzeichnet. Es bildet sich somit ein freier Hof um die Zelle, der gut sichtbar ist. Eine weitere Möglichkeit der Sichtbarmachung der Kapsel ist die Bindung von spezifischen Antikörpern an der

Polysaccharidkapsel, was ein quellungsartiges Phänomen hervorruft, durch welches sich die Kapsel vergrößert (CLEARE et al. 1994). Mit herkömmlichen Färbemethoden lassen sich die Kryptokokken im Gewebe teilweise auch anfärben. In einer Gramfärbung färben sie sich zwischen intensiv violett und zart rosa an. Auch mit Loefflers Methylenblau oder Toluidinblau lässt sich der Pilz anfärben.

2.3.3 Kultivierung

C. neoformans ist in seinen Kultivierungsbedingungen sehr genügsam und recht einfach zu kultivieren. Die meisten Aminosäuren, Zucker, Fette und Vitamine können von dem Pilz umgesetzt werden (VIDOTTO et al. 1996). Eine einfache Sabouraud-Nährlösung reicht zur Kultivierung aus. Bei 37 °C ist eine Vermehrung des Erregers gut möglich. Temperaturen von 40 °C oder mehr führen nach einigen Stunden zum Absterben des Keims (ROSAS und CASADEVALL 1997).

2.3.4 Taxonomie

Zur Klasse der *Blastomycetes* innerhalb der *Deuteromycotina* gehören die imperfekten Sprosspilze. Eine ihrer Formordnungen wird durch die *Cryptococcales* gebildet. Diese leiten sich von den Ascomyceten, und zwar von den *Hemiascomycetes* ab (ROLLE und MAYR 1993).

Es gibt vier Serotypen des Erregers. Die Telomorphe *Filobasidiella neoformans* var. *neoformans* bilden dabei die Serotypen A und D zu der Anamorphen von *C. neoformans* var. *neoformans*. Die Telomorphe *Filobasidiella neoformans* var. *bacillispora* bilden die Serotypen B und C der Anamorphen *C. neoformans* var. *gattii* (CASADEVALL und PERFECT 1998).

Die taxonomische Einordnung des Erregers sieht vereinfacht wie folgt aus:

Reich: Pilze
 Stamm: *Basidiomycota*
 Ordnung: *Filobasidiales*
 Familie: *Filobasidiaceae*
 Gattung: *Filobasidiella*

Telomorph	Anamorph
<i>Filobasidiella neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i>
<i>Filobasidiella neoformans</i> var. <i>bacillispora</i>	<i>C. neoformans</i> var. <i>gattii</i>

Die Telomorphe bilden je einen haploiden α - und a-Typ zur geschlechtlichen Fortpflanzung und damit zur Arterhaltung. Die Teilung der Anamorphe dient dagegen eher der Vermehrung und Verbreitung des Erregers. Für diese Arbeit ist der asexuelle Teil des Generationszyklusses von Interesse, da dieser das eigentliche Pathogen ist.

2.3.5 Pathogenität

Anfällig gegenüber einer Infektion sind vor allem Patienten mit einem T-Zell-Defekt. Dabei kommt *C. neoformans* var. *neoformans* im Vergleich zu *C. neoformans* var. *gattii* bei Mensch und Tier als Erreger häufiger vor. Eine weltweite Verbreitung von *C. neoformans* var. *neoformans* findet durch Vögel als Vektoren statt. Der Erreger ist im Vogelkot sehr lange überlebens- und ansteckungsfähig (LITTMAN und BOROK 1968). Obwohl im Kot von sehr vielen verschiedenen Vogelarten *C. neoformans* var. *neoformans* nachgewiesen wurde, spielen wohl Tauben bei der Verbreitung die größte Rolle. Wahrscheinlich ist der hohe Kreatiningehalt im Taubenkot und die Fähigkeit von *C. neoformans*, Kreatinin zu verstoffwechseln, für das gehäufte Vorkommen verantwortlich (KWON-CHUNG 1991). Dabei ist der Erreger bis zu einem Jahr im Exkrement ansteckungsfähig. Die Vögel sind gegenüber dem Erreger resistent. Die Resistenz ist einerseits eine Folge der hohen Körpertemperatur (41 bis 43 °C) und andererseits ein Effekt der eigenen Darmflora, die das Wachstum von *C. neoformans* unterdrückt (SETHI und RANDHAWA 1968). Eine Infektion von Vögeln ist nur durch intrazerebrale oder intraokuläre Applikation von Kryptokokken möglich.

Der Erreger dringt in ausgetrockneter Form oder als Basidiomycet über die Atemluft in die Lunge ein, tritt in den Alveolen in die Kapillaren über, von wo aus er sich über den Blutkreislauf im ganzen Körper verteilt. Das Überwinden der Blut-Hirn-Schranke ist dabei ein sehr wichtiger Faktor, da nach der Infektion des Gehirns die auftretende Hirnhautentzündung meist zum Tode führt. Die Mechanismen, die beim Übertritt der Blut-Hirn-Schranke eine Rolle spielen sind noch nicht ausreichend geklärt.

Die Infektiosität des Erregers hängt von verschiedenen Faktoren ab. Als wichtigster Faktor ist die Polysaccharidkapsel zu nennen (CHANG und KWON-CHUNG 1994). Deren Hauptkomponente ist Glukuronoxylomannan (GXM), das stark antiphagozytär wirkt. Vier Serotypen von GXM sind bekannt, wobei A und D von *C. neoformans* var. *neoformans* und C und B von *C. neoformans* var. *gattii* produziert werden (DROMER et al. 1993). Es gibt auch Varianten ohne Kapsel, die allerdings avirulent sind.

Die Kapsel der Serotypen A und D wirkt chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten. Andererseits werden Komponenten des alternativen Komplementsystems fixiert, wodurch die Bildung chemotaktischer Peptide, wie zum Beispiel C5a, reduziert wird.

Eine Opsonisierung mit Antikörpern ist möglich, allerdings entziehen sich die Kryptokokken dem Zugriff der antigenpräsentierenden Zellen durch Blockierung des Fc-Rezeptors. Je dicker die Kapsel ist, desto besser ist der Erreger vor Zugriffen geschützt.

Ein weiterer Virulenzfaktor ist Melanin (WILLIAMSON 1997). Es wird aus verschiedenen Katechol-Vorläufern wie Dopa, Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin synthetisiert (POLACHEK 1991). Für diese Synthese zeichnet sich das Enzym Phenolperoxidase verantwortlich. Es ist damit ein wichtiger Virulenzfaktor. Vermutlich wirkt das Melanin als Antioxidans bei der Phagozytose durch antigenpräsentierende Zellen (APC) (JACOBSON und TINNELL 1993). Das als „Redox-Puffer“ wirkende Melanin neutralisiert freie Sauerstoff- und Stickstoffradikale von Granulozyten und Makrophagen und verhindert eine Antikörper-vermittelte Phagozytose. Ausserdem macht es den Erreger gegenüber Amphotericin B unempfindlich, was eine Behandlung erheblich erschwert (WANG et al. 1995). Durch Elektronen-Spin-Resonanz-Spektroskopie wurde die Einlagerung des Melanins in die Zellwand sichtbar. Man geht davon aus, dass diese Melanineinlagerung die Stabilität der Zellwand gegenüber Angriffen stärkt.

Auch das Enzym Urease ist ein weiterer Virulenzfaktor bei einer Kryptokokkeninfektion. In experimentellen Infektionen mit Stämmen unterschiedlicher Urease-Aktivität steigt die Letalität der Versuchstiere mit der Aktivität der Urease (COX et al. 2000).

Die Fähigkeit des Wachstums und der Vermehrung bei einer Körpertemperatur von 37 °C sind eine Grundvoraussetzung für die Infektion bei Säugetieren. Dieser Fakt ist demnach ein nicht zu unterschätzender Virulenzfaktor.

2.3.6 Erregerabwehr

Der Weg der Komplementaktivierung hängt von der Anwesenheit von spezifischen Antikörpern und der Dicke der Kapsel ab (KOZEL 1993). Zur Aktivierung des klassischen Weges ist die Bindung von Antikörpern an der Zellwand des Erregers notwendig. Da in normalem Serum von naiven Tieren oder Menschen entsprechende Antikörper fehlen, kann der klassische Weg nicht aktiviert werden (HOUPPT et al. 1994).

Neutrophile Granulozyten sind professionelle phagozytierende Zellen, die aus pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks heranreifen. Polymorphkernige Zellen sind hocheffektive

antimikrobielle Zellen und eine Neutropenie ist mit verschiedenen schweren und lebensbedrohlichen Infektionen verbunden, nicht nur mit der Kryptokokkose. Neutrophile Granulozyten können Kryptokokken phagozytieren und abtöten (DIAMOND et al. 1972). Entscheidend für das Abtöten ist hierbei die Phagozytose. Während einige Kryptokokken-Stämme sich gut phagozytieren lassen, ist die Phagozytose bei anderen Stämmen deutlich eingeschränkt (KAGAYA et al. 1985). Granulozyten sind häufig ins Entzündungsgeschehen bei *C. neoformans* eingebunden und sind im Gewebe nahe am Erreger zu finden (MILLER und KOHL 1983).

NK-Zellen sind eine Population von Lymphozyten, die kranke und virusinfizierte Zellen abtöten können. Sie zeichnen sich durch große Granula aus und sind vorzugsweise CD3 und T-Zell-Rezeptor negativ und CD16 und NK1.1 / NK2.1 (in der Maus) positiv. Von HIDORE und Murphy (1986) wurde die Interaktion zwischen *C. neoformans* und NK-Zellen untersucht. Es wurde gezeigt, dass die Aktivität von Milz-Lymphozyten der Maus gegen Kryptokokken mit der Aktivität von NK-Zellen korreliert und somit NK-Zellen eine wichtige Rolle in der Abwehr gegenüber *C. neoformans* spielen (MURPHY und McDANIEL 1982). Der Mechanismus der murinen NK-Zellen gegen Kryptokokken beruht einerseits auf direkter Toxizität bei Kontakt gegenüber dem Erreger und andererseits auch möglicherweise auf löslichen zytotoxischen Faktoren, die von den NK-Zellen abgegeben oder induziert werden (HIDORE et al. 1991). NK-Zell-Granula enthalten Zytolysin (auch Perforin genannt), welches Kryptokokken zerstören kann. Außerdem werden noch verschiedene Zytokine, wie z. B. IFN- γ , GM-CSF und TNF- α produziert. Damit werden die Effektorzellen in der Kryptokokken-Abwehr aktiviert und eine effektive Entzündungsreaktion unterstützt.

Eine wichtige Rolle in der Kryptokokken-Abwehr nehmen die Makrophagen ein. Sie können im Gewebe sehr oft in direktem Kontakt mit dem Erreger beobachtet werden. Die Depletion der Makrophagen vermindert die Resistenz gegenüber einer Infektion mit *C. neoformans* erheblich (MONGA 1981). Die Effektivität der Phagozytose der Makrophagen hängt stark von der Anwesenheit von opsonisierenden Antikörpern und von der Expression des entsprechenden Fc-Rezeptors auf der Makrophagenoberfläche ab. Die Antikörper-bedingte Phagozytose ist auf den Fc-Rezeptor angewiesen, welcher konstitutiv auf Makrophagen exprimiert wird. Die Komplement-beeinflusste Phagozytose ist wiederum von der Expression von C3-Rezeptoren (CR1, CR3 und CR4) abhängig, die von der Zytokin-Stimulation beeinflusst wird (CROSS et al. 1997). Auch eine entsprechende Aktivierung der Makrophagen ist für die Phagozytose von größter Bedeutung. Als effektive Methode bei *in-vitro*-Versuchen hat sich dabei die Kombination von LPS und IFN- γ erwiesen (MODY et

al. 1991). *In vivo* ist IFN- γ essentiell für die Makrophagenaktivierung. Bei mit *C. neoformans* infizierten Mäusen hat sich außerdem gezeigt, dass die maximale Phagozytoseeffektivität bei Alveolarmakrophagen am Tag 14 und bei Peritonealmakrophagen zwischen Tag 21 und Tag 28 nach einer respiratorischen Infektion liegt (KARAOUI et al. 1977).

Für die effektive Arbeit der Makrophagen sind die T-Zellen besonders wichtig. Sie produzieren das für die Aktivierung notwendige IFN- γ . Die T-Zell gebundene Immunität ist eine entscheidende Komponente einer schützenden Immunität gegen eine Infektion mit *C. neoformans* (MURPHY 1989). Sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen sind an der systemischen Immunität gegen Kryptokokken beteiligt (siehe Abbildung 2).

Neben der zellulären Seite ist auch die humorale Seite der Immunität für eine effektive Erregerabwehr notwendig (MUKHERJEE et al. 1995). Durch die Opsonisierung der Kryptokokken mit Antikörpern aus B-Zellen wird die Phagozytose durch die Makrophagen besonders effektiv. Über die Hälfte infizierter Patienten besitzen Antikörper vom Subtyp IgG und/oder IgA, teilweise auch noch nach einer Therapie (SPEED et al. 1996). Dabei ist der Antikörperspiegel reziprok proportional zur Konzentration des Antigens.

2.4 Infektionen mit *C. neoformans* bei Haustieren

Bei den Haussäugetieren findet man Infektionen mit *C. neoformans* var. *gattii* und *C. neoformans* var. *neoformans*. Es können dabei die verschiedensten Haustiere bis hin zu Zootieren und im Wasser lebenden Säugetieren an einer Kryptokokkose erkranken. Allerdings kommt es in den seltensten Fällen zu Stellung einer entsprechenden Diagnose in der Tiermedizin.

Bei WENDT et al. (1994) ist zu lesen, dass es beim Rind fast ausschließlich zu Euterentzündungen kommt. Diese sind meist mit einer Störung des Allgemeinbefindens verbunden. Das Eindringen über den Strichkanal ist sehr wahrscheinlich und kann durch Verletzungen an der Zitze erleichtert werden. Nach dem Eindringen des Erregers in das Euter bildet sich eine akute Mastitis mit den typischen Entzündungssymptomen aus. Die entsprechenden Viertel werden ödematös, umfangsvermehrt, warm, schmerzhaft und hart. Die Euterlymphknoten sind dabei fast immer auffällig vergrößert. Das Sekret bekommt ein wässrig-trübes Aussehen und wird viskös. Es werden graugelbe, flockig-schleimige Veränderungen sichtbar. Nach ein bis zwei Wochen wird das Entzündungsgeschehen progressiv chronisch. Das gesamte Euter verhärtet sich weiter, wird teils knotig und bleibt umfangsvermehrt. Es kommt zur Ausbildung von irreversiblen Schäden und die Milchproduktion kann vollständig sistieren. Bei latent infizierten Tieren ist eine Erregerausscheidung bis zu drei Monaten beobachtet worden. Im Endgemelk oder der Residualmilch ist bei chronischen oder latent infizierten Fällen der Erreger effektiv und sicher nachzuweisen. Eine Therapie ist prinzipiell möglich, aber sehr zeit- und kostenintensiv. Herkömmliche Antibiotika sind meist wirkungslos oder verstärken die Erkrankung durch Beseitigung der Konkurrenzflora. Eine Behandlung mit einer Jodlösung tötet die Kryptokokken in der Euterzisterne zwar kurzzeitig ab, schädigt aber auch das Eutergewebe. Außerdem werden durch diese lokale Behandlung die Erreger im Drüsenbereich nicht erfasst. Die einzige tragbare Lösung ist die Krankenschlachtung der infizierten Tiere, bevor sie aufgrund der Allgemeinstörungen abmagern. Dadurch ergeben sich die wirtschaftlichen Schäden und die Bedeutung der Kryptokokkose beim Rind. Bei Schafen und Ziegen sind die Verhältnisse bei einer Infektion vergleichbar.

Laut GREENE (1990) kommt die Kryptokokkose bei der Katze häufiger vor als beim Hund, obwohl Hunde generell häufiger an Mykosen leiden als Katzen.

Die Kryptokokkose ist bei Katzen meist eine chronisch verlaufende Systemmykose, bei der alle inneren Organe und das Gehirn vom Erreger befallen werden können. Dies äußert sich bei Katzen mit Schnupfensymptomen, Zubildungen in der Nase, Hautläsionen, Augenveränderungen und zentralnervösen Störungen (Reihenfolge der aufgezählten Symptome entsprechend der Häufigkeit). Auch hier gilt wie beim Menschen, dass ein geschädigtes Immunsystem die Ausbildung von klinischen Symptomen fördert. So wird die Infektion durch eine Erkrankung mit dem Felinen Leukose-Virus und dem Felinen Immundefizienz-Virus stark begünstigt.

Beim Hund treten meist zentralnervöse Störungen, gefolgt von Augenveränderungen, Appetitlosigkeit mit Erbrechen und Hautläsionen auf (FAGGI et al. 1993). Die Ansteckung erfolgt auch hier meist über Taubenkot, in dem der Erreger bis zu einem Jahr ansteckungsfähig ist. Eine Flächendesinfektion mit 1%igem Formalin oder 0,12%iger Peressigsäure über 60 Minuten wirkt sicher fungizid, ist aber nicht überall durchführbar.

Die Therapie gestaltet sich ausgesprochen zeitaufwendig (4-5 Monate, besser 9 Monate) und kostenintensiv. Als recht wirksam hat sich eine Kombination von Amphotericin B und Fluocytosin erwiesen. Allerdings haben beide Medikamente erhebliche Nebenwirkungen und eine geringe therapeutische Breite. Auch eine Behandlung mit Ketokonazol kann bei Langzeittherapie oder in Kombination zum Erfolg führen. Allerdings gibt es auch hier bei systemischer Behandlung erhebliche Nebenwirkungen (JACOBS et al. 1998).

3 Tiere, Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Mäuse

Das Tierversuchsvorhaben – TVV-Nr. 1/98: „Erforschung der Immunantwort in verschiedenen experimentellen Infektionsmodellen (Borna Disease Virus, *Cryptococcus neoformans*, *Salmonelle ssp.*, *Listeria monocytogenes*, *Leishmania major*, *Leishmania donovani*) in der Maus unter dem besonderen Aspekt der Th1-/Th2-Zell-Balance“ wurde unter dem Aktenzeichen 74-9168.11-1/98 vom Regierungspräsidium Sachsen genehmigt. In diesem Rahmen wurden Mäuse vom Stamm 129Sv/Ev aus der Zucht des Max-Planck-Instituts für Immunbiologie Freiburg übernommen und im Institut für Immunologie der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig weiter unter spezifisch pathogenfreien (SPF) Bedingungen gehalten und gezüchtet. Für die Haltung und die Zucht standen Umluftschränke der Firmen „Thoren“ und „Ehret“ in Verbindung mit Filterkäfigen zur Verfügung. Alle Materialien wurden vor dem Einbringen in den SPF-Bereich autoklaviert. Die Infektionsversuche wurden in einem vom Zuchtbereich getrennten Raum und in einem einzelbelüfteten Käfigsystem vom Typ „Thoren-Caging“ durchgeführt. Der gesamte Mausbereich war vollständig klimatisiert. Es herrschten stets 22-23 °C und 50-55% Luftfeuchtigkeit bei einem Tag-Nacht-Rhythmus von 14 zu 10 Stunden. Futter und Wasser standen den Tieren stets *ad libitum* zur Verfügung. Alle Manipulationen an den Mäusen, die für eine Infektion vorgesehen waren oder sich in einem Versuch befanden, wurden unter einer Sterilwerkbank der Sicherheitsstufe 2 durchgeführt. Die Tiere wurden in einem Alter von 6-12 Wochen in die Versuche genommen, wobei beim Zusammenstellen der Gruppen auf ein einheitliches Alter und Gewicht geachtet wurde. Soweit möglich wurde ebenso auf ein einheitliches Geschlecht der Versuchsgruppen geachtet.

Um die Funktion von IL-12p75 und IL-12p40 beurteilen zu können, wurden gendefiziente Mäuse eingesetzt, bei denen die Gene so verändert wurden, so dass kein aktives Protein gebildet werden konnte (Abbildung 3). Dabei kamen folgende Mausgenotypen zum Einsatz:

- Wildtyp-Mäuse können IL-12p40 und IL-12p75 bilden,
- IL-12p35^{-/-}-Mäuse können zwar noch IL-12p40, aber kein IL-12p75 bilden,
- IL-12p35/p40^{-/-}-Mäuse können weder IL-12p40 noch IL-12p75 bilden.

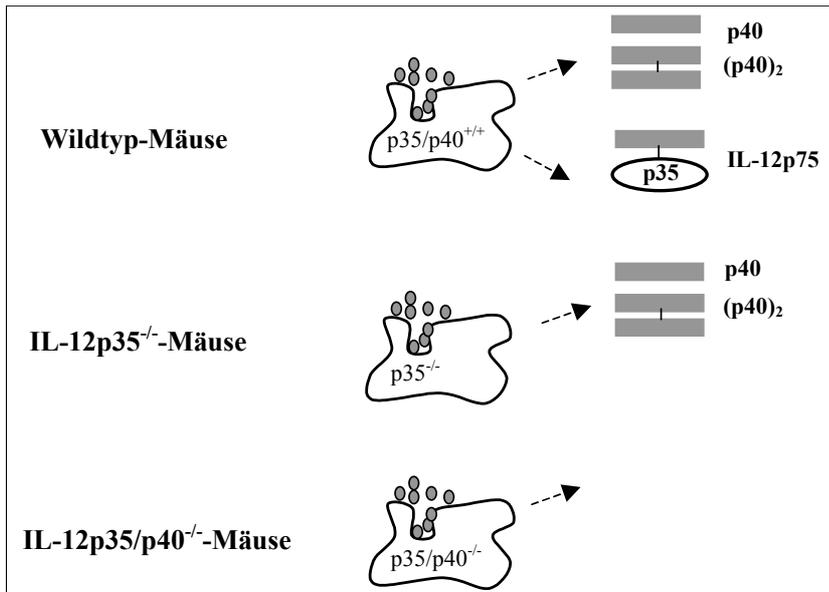


Abbildung 3. Charakterisierung der verschiedenen Mausgenotypen in Bezug auf die Proteinsynthese der Makrophagen nach Aktivierung.

3.1.2 Erreger

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Erreger handelt es sich um den *C. neoformans* var. *neoformans* Stamm 1841 (DECKEN et al. 1998). Der Stamm wurde aus einem klinischen Isolat einer Schienbeinläsion gewonnen. Es handelt sich um einen bekapselten Stamm vom Serotyp D, der hochgradig virulent ist.

Vor Beginn der Versuche wurde eine Wachstumskurve dieses Stammes erstellt. Dabei wurde die Konzentration der Kryptokokken in der Sabouraud-Nährlösung in Abhängigkeit von der Zeit bestimmt, um den Zeitpunkt und die Konzentration der logarithmischen Wachstumsphase zu ermitteln. Mit Hilfe dieser Daten wurde eine Kultur von einem Liter angesetzt und in der späten log-Phase geerntet. Die Kryptokokken wurden dazu 3-mal in PBS gewaschen und für zwei Minuten bei 1000 x g abzentrifugiert. Sie wurden anschließend in einer Konzentration von 10⁸/ml in 10%igem autoklaviertem Milchpulver aufgenommen, zu 1 ml in Kryoröhrchen aliquotiert, bei -80 °C eingefroren und bei -20 °C gelagert. Alle lebenden Kryptokokken wurden aus diesem einheitlichen Vorrat entnommen und vor der Infektion wie in Absatz 2.3.1 beschrieben kultiviert. Für serologische Untersuchungen und Restimulationen wurden hitzeinaktivierte Kryptokokken eingesetzt. Diese wurden in einem Wasserbad für 60 min. bei 60 °C abgetötet. Die Suspension wurde aliquotiert und zu 1 ml in Kryoröhrchen á 1x10⁸ Kryptokokken eingefroren. Um die komplette Inaktivierung sicherzustellen, wurde 1 ml der Suspension auf Sabouraud-Agar ausplattiert und für drei Tage

bei 30 °C im Brutschrank inkubiert. Somit wurde gewährleistet, dass für alle Experimente vergleichbare Kryptokokken genutzt werden konnten.

3.1.3 Puffer und Medien

Sofern nicht anders angegeben, handelt es sich um wässrige Lösungen!

Alle Lösungen wurden bei 4 °C gelagert!

PBS - 1x

100 ml PBS - 10x auf 1 Liter mit Aqua dest. auffüllen

PBS - 10x Stammlösung

3,54 g KH_2PO_4
14,8 g wasserfreies Na_2HPO_4
85 g NaCl
mit Aqua dest. auf 1 Liter auffüllen

PBS-Tween (0,05% Tween 20)

500 µl Tween 20
auf 1000 ml PBS

Serum-Diluent

5 g BSA
1 g Gelatine
mit PBS-Tween auf 1 Liter auffüllen

McIlvain's Puffer pH 4,6

Lsg. A: 0,2 M Na_2HPO_4
Lsg. B: 0,1 M Zitronensäure
468 ml Lsg. A + 532 ml Lsg. B
gut mischen
mit HCl auf pH 4,6 einstellen

Substrat-Puffer

für 10 ELISA - Platten
100 mg ABTS (2,2'-azino-di-3-ethylbenzthiazolin-6-Sulfonsäure)
in 10 ml Aqua dest. lösen
mit McIlvain's Puffer auf 100 ml einstellen
dunkel stellen
vor Gebrauch 50 µl 30%iges H_2O_2 zugeben

Sabouraud-Agar

1% Pepton
2% Glucose
2% Agar

Sabouraud-Nährlösung

1% Pepton
2% Glucose

Blockierungspuffer für ELISA

0,5% BSA
0,1% Gelatine
in PBS

Karbonatpuffer pH 9,5

17,3 g NaHCO_3
8,6 g Na_2CO_3
mit Aqua dest. auf 1 Liter auffüllen

FACS-Puffer

1% FKS
0,1% Natrium-Azid
in PBS

Hexazoniumlösung

50 mg Pararosanilin in 3 ml 1N HCl lösen
0,5 ml 1M Natriumnitratlsg. Zugeben
nach 5 min verwendbar

Substratlösung

3,58 mg Naphthol-AS-D-Chlorazetat in
[0,9 ml DMSO und 0,1 ml Triton X] lösen

3.2 Methoden

3.2.1 Intraperitoneale Infektion von Mäusen

Es wurden drei Versuche mit je fünf bis sieben Tieren pro Genotyp durchgeführt um die Gesammelten Ergebnisse zu bestätigen. In die Auswertung gelangte der letzte Versuch mit je sechs Mäusen pro Genotyp. Am Tag vor Versuche verstarben eine IL-12p35^{-/-}-Maus und zwei IL-12p35/p40^{-/-}-Mäuse.

Für die histologischen Untersuchungen wurde je eine Maus eines Genotyps als naive Kontrolle herangezogen. Für serologische Untersuchungen wurde das Serum von drei bis vier naiven Mäusen pro Genotyp gepoolt und zum Vergleich eingesetzt.

Bevor die Mäuse mit Kryptokokken infiziert werden konnten, wurde eine frische Kultur des Erregers bei 30 °C angesetzt. Dazu wurde ein Kryoröhrchen mit 1×10^8 Kryptokokken aufgetaut und in 200 ml sterile Sabouraud-Nährlösung überführt und bei 30 °C auf einem Schüttelinkubator inkubiert. Nach 24 Stunden wurde die Konzentration an Kryptokokken in der Suspension durch eine Zählung mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Um eine Infektionsdosis von 1×10^4 Kryptokokken pro Tier bei einem Infektionsvolumen von 200 µl zu erreichen, wurde die Suspension auf 5×10^4 Keime pro ml eingestellt. Dazu wurde die benötigte Menge an Kryptokokken in sterilem PBS verdünnt und gut gemischt.

Die Gruppenzusammenstellung der Mäuse erfolgte einige Tage vor der Infektion, damit eventuelle Rang- und Revierkämpfe im Vorfeld des Experimentes geklärt wurden und die Tiere sich an die neue Umgebung gewöhnen konnten. Es wurden prinzipiell nur Tiere einer Versuchsgruppe in einem Käfig gehalten. Erst zum Zeitpunkt der Tötung der Tiere wurde diesen eine Nummer zugeordnet, um die jeweiligen Versuchsergebnisse einzelnen Mäusen zuordnen zu können.

Zur Infektion wurden Insulinspritzen genutzt und jeder Maus 200 µl intraperitoneal injiziert.

3.2.2 Intranasale Infektion von Mäusen

Für die intranasale Infektion wurden zwei Versuche mit drei bzw. vier Mäusen je Genotyp durchgeführt. Zur Auswertung kam der letzte Versuch mit je drei Mäusen.

Die naiven Serumkontrollen wurden auch hier eingesetzt. Naive histologische Kontrollen liegen leider nicht vor.

Die Mäuse wurden durch intraperitoneale Injektion von 0,5 mg Ketamin/Tier und 2,5 mg Xylacin/Tier in eine tiefe Narkose versetzt. Nach dem Wirkungseintritt wurden die Mäuse mit

leicht überstrecktem Kopf in der Hand fixiert. Der Daumen lag auf dem Kehlkopf, um einen eventuellen Schluckreflex feststellen zu können. Nun wurde in jedes Nasenloch 10 µl der Infektionssuspension mit einer Konzentration von 5×10^4 Keimen pro ml in möglichst kleinen Tröpfchen mittels einer Pipette appliziert. Die Mäuse durften die Suspension nicht abschlucken, sie musste in die Trachea laufen und sich dort in den Bronchien verteilen. Deshalb musste die Narkose tief genug und reflexfrei sein. Nach der Applikation wurden die Mäuse mit erhobenem Kopf in Rückenlage in der Einstreu der Käfige gelagert, um ein Zurücklaufen der Suspension zu verhindern.

3.2.3 Analyse infizierter Mäuse

Nach Ablauf der Infektionsdauer wurden die Tiere zur Organentnahme mit Chloroform betäubt und durch Blutentzug getötet. Anschließend wurden die Tiere unter sterilen Bedingungen sezirt. Alle benötigten Organe wurden steril entnommen und in sterile Gefäße mit PBS verbracht und auf Eis bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

Aus dem Blut wurde mittels Zentrifugation für 10 min bei 3000 x g Serum gewonnen, welches bis zur Untersuchung bei -20 °C gelagert wurde. Für die Histologie wurden die entsprechenden Organe oder Organteile in 4%igem Formalin fixiert und später in Paraffin eingebettet. Für immunhistologische Untersuchungen wurden entsprechende Proben in speziellem Einfriermedium (OCT Tissue-Tec[®], Sakura) eingebettet und über flüssigem Stickstoff schockgefroren. Aufbewahrt wurden diese Proben bei -80 °C.

3.2.4 Keimzahlbestimmung nach der Infektion

Für die Keimzahlbestimmung wurden rund 30-40% der Leber (die genauen Gewichte wurden notiert) und eine halbe Lunge in sterilem PBS mittels Zellsieb von 70 µm Porengröße (Cellstrainer[™], Falcon[™], Heidelberg, Deutschland) homogenisiert. Das so gewonnene Homogenat wurde in sterilem PBS in Stufen von 1:10 bis 1:1000 verdünnt. Auf zwei Tage vorher vorbereitete Sabouraud-Agar-Platten wurden je 100µl einer Verdünnungsstufe mittels Trigalskispatel ausgestrichen. Nach dreitägiger Inkubation bei 30 °C wurden die gewachsenen Kolonien gezählt und entsprechend der Verdünnung die Keimbelastung des Organs berechnet. Das Detektionslimit liegt bei dieser Methode bei 10 bis 30 Keimen pro Organ.

3.2.5 Histologische Untersuchungen

Für morphometrische Untersuchungen an Leberschnitten wurden die in Formalin fixierten Proben im Institut für Veterinärpathologie der Veterinärmedizinischen Fakultät der

Universität Leipzig in Paraffin eingebettet und mittels Mikrotom auf 5 µm Dicke geschnitten. Die Färbung erfolgte mit Hämatoxylin und Eosin.

Die Ermittlung von Größe und Fläche der Veränderungen wurde am Institut für Anatomie und Histologie der Veterinärmedizinischen Fakultät mit Hilfe des Programms Analysis[®] durchgeführt.

In Vorbereitung dieses Versuches wurde die Leber von infizierten Mäusen komplett aufgeschnitten und die Verteilung von Veränderungen im Gewebe beurteilt. Augenmerk wurde dabei auf das Zentrum, die Peripherie und Gefäßnähe gelegt. Dabei stellte sich heraus, dass die Veränderungen im Gewebe gleichmäßig verteilt waren.

Im Versuch wurde ein großer Leberlappen in fünf Teilen eingefroren. Von jedem dieser Teile wurden drei Schnitte angefertigt und untersucht. Dabei wurde die Größe der gesamten Schnittfläche und die Anzahl aller Gewebsveränderungen ermittelt. So ergaben beide Schnitte eines Teiles einer Leber einen Wert, mit dem weiter gearbeitet wurde.

Bei typischen Granulomen handelt es sich um eine Ansammlung von Makrophagen und Granulozyten im inneren und Epitheloid- oder Riesenzellen in der Peripherie. Im Inneren eines Granuloms befindet sich meist die Ursache der entzündlichen Reaktion. Dieses Zentrum kann unterschiedlich groß sein und Krankheitserreger oder Nekrosen enthalten.

Im vorliegenden Fall kann man bei den Wildtyp-Mäusen von typischen Granulomen sprechen. Bei den IL-12p35^{-/-}-Mäusen handelt es sich eher um atypische Granulome mit zentralen Kryptokokken-Aggregationen. Im Falle der IL-12p35/p40^{-/-}-Mäuse kommt es vorzugsweise zur Aggregation von Kryptokokken mit einzelnen Entzündungszellen drum herum. Von einer Granulombildung kann nur in den wenigsten Fällen gesprochen werden.

3.2.6 Immunhistologische Untersuchungen

Die in OCT Tissue-Tec[®] (Sakura) eingefrorenen Organe wurden an einem Kryotom im Institut für Veterinärpathologie der Veterinärmedizinischen Fakultät bei -14 bis -20 °C geschnitten. Die Schnitte wurden luftgetrocknet und für 10 min mit unverdünntem, eiskaltem 100%igem Azeton fixiert. Danach wurden sie bei -80 °C bis zur Weiteruntersuchung gelagert. Vor der entsprechenden Färbung wurden die Präparate aufgetaut, luftgetrocknet und erneut für 10 min mit 100%igem Azeton fixiert. Anschließend wurden die Schnitte in Cover-Plates[®] eingespannt und gefärbt. Dabei handelt es sich um ein System zum materialsparendem Färben von histologischen Schnitten. Die Objektträger werden dabei so in eine Halterung eingespannt, dass ein dünner Film durch die Kapillarkraft über den Schnitten gehalten wird und bei senkrechter Lagerung gut zu ersetzen ist.

Zuerst wurde dreimal 5 min mit PBS gewaschen. Danach wurde die endogene Peroxidase der Zellen für 30 min mit einer 1%igen Natriumazid-Lösung inaktiviert. Nach einem erneuten Waschschrift wurden mögliche unspezifische Bindungen mit 20%igem Rindernormalserum in PBS geblockt und anschließend wieder gewaschen.

Bei einigen Zellen ließ sich die endogene Peroxidase trotz Einsatz verschiedener Blockierungssysteme nicht blockieren. Bei diesen Zellen wurde nach den Blockschritten mit DAB-Substrat (Vector) inkubiert. Somit wurde das Zytoplasma dieser Zellen braun gefärbt und war gut von den roten Antikörper-gefärbten Zellen zu unterscheiden.

Daran schloss sich die Inkubation mit dem entsprechenden Antikörper an.

Es kamen dabei folgende monoklonale (mAK) Antikörper zum Einsatz:

- Ratte-anti-Maus-CD4-mAk (Klon GK 1.5, IgG2a, gereinigt, BD-Pharmingen, Heidelberg, Deutschland) zur Färbung von CD4⁺-T-Helferzellen
- Ratte-anti-Maus-CD8a-mAk (IgG2a, gereinigt, BD-Pharmingen, Heidelberg, Deutschland) zur Färbung von CD8⁺-T-Helferzellen
- Ratte-anti-Maus-F4/80 mAk (ATCC, IgG2b, Hybridomüberstand, Eigenherstellung J. Lehmann, Leipzig) zur Färbung von Makrophagen
- Ratte-anti-Maus-IgM (Klon b7-6, IgM, Hybridomüberstand, Eigenherstellung Prof. Dr. G. Hartmann, Marburg) zur Färbung von B-Zellen

Die Antikörper wurden in PBS (20% Rindernormalserum) 1:200 (gereinigte Ak) bzw. 1:50 (Hybridomüberstand) verdünnt. Die Inkubation erfolgte für zwei Stunden und wurde, wie alle anderen Schritte auch, bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach dreimaligem Waschen in PBS wurde der Sekundärantikörper, der in einer Verdünnung von 1:200 in PBS (20% Rindernormalserum) aufgebracht wurde, für zwei Stunden inkubiert. Dabei handelte es sich um einen polyklonalen Ziege-anti-Ratte-Ig-Ak (H+L, Southern Biotechnology), der Peroxidase-konjugiert war. Nach dreimaligem Waschen wurde die Substratreaktion der Schnitte mit dem Vector AEC Substrat Kit für Peroxidase (Vector) für 10 min durchgeführt. Die Präparate wurden anschließend mit Hämatoxylin gegengefärbt und mit Glycerin-Gelatine eingedeckt. Als positives Ergebnis wurden alle Zellen mit einer gut sichtbaren roten koronaren Färbung gewertet, die durch die Lokalisation der Oberflächenantigene bedingt ist. Als Positiv-Kontrollen wurden parallel Milz-Schnitte gefärbt und zur Beurteilung herangezogen.

Zur Detektion von neutrophilen und eosinophilen Granulozyten wurde ein Chlorazetat-Esterase-Nachweis gemacht. Zuerst wurden die Paraffinschnitte in einer Alkoholreihe

entparaffinisiert. Ein Inkubationsmedium aus 100 ml PBS, 0,5 ml Hexazoniumlösung und 1 ml Substratlösung wurde vorbereitet. In diesem Medium werden die Schnitte für 1,5 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wird für 10 min in Leitungswasser und fünf Minuten in Aqua dest. gespült. Nach einer 10 minütigen Färbung in Hämatoxylin wird der Farbüberschuss unter Leitungswasser ausgewaschen und der Schnitt „gebläut“. Als Abschluss wird das Ganze auf einer Heizplatte bei 60 °C getrocknet und mit Glycerin-Gelatine eingedeckt. Eine rote zytoplasmatische granuläre Reaktion ist typisch für diese Färbung.

3.2.7 Serologische Untersuchungen

3.2.7.1 Kryptokokken-spezifische Antikörper

Um die Konzentration an spezifischen Antikörpern gegen *C. neoformans* zu bestimmen, sollten ELISA-Platten mit Kryptokokken-Antigen beschichtet werden. Diese Methode führte aber zu keinem zufriedenstellendem Ergebnis, da die Sensibilität des ELISAs zu gering war. Aus diesem Grund wurde der Serumgehalt an spezifischen Anti-Kryptokokken-Ak mittels durchflusszytometrischer Analyse (FACS) quantifiziert. Dazu wurde eine Suspension von 1×10^7 hitzeinaktivierten Kryptokokken in 100 µl FACS-Puffer mit 100 µl einer verdünnten Serumprobe (1:5 verdünnt in FACS-Puffer und 30 min bei 56 °C inaktiviert) für eine halbe Stunde bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde durch Zentrifugation dreimal gewaschen. Danach wurde der Biotin-konjugierte Sekundärantikörper Ziege-anti-Maus-Ig (Southern Biotechnology) in 100 µl FACS-Puffer zugegeben und wieder für eine halbe Stunde bei 4 °C inkubiert. Nach dem sich anschließenden Waschschrift wurde mit 100 µl Streptavidin-PE (Southern Biotechnology) (2,5 µg/ml) nochmals für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Nach den abschließenden Waschschriften wurde das Pellet in ca. 300-500 µl FACS-Puffer resuspendiert und per FACS-Analyse die mittlere Fluoreszenzintensität gemessen.

3.2.7.2 Bestimmung des Antikörpergesamtgehaltes

Die Konzentration der Antikörper-Isotypen IgG1, IgG2a, IgM und IgE wurde mit Hilfe von ELISAs bestimmt.

Der schematische Aufbau sieht wie in Abbildung 4 dargestellt aus:

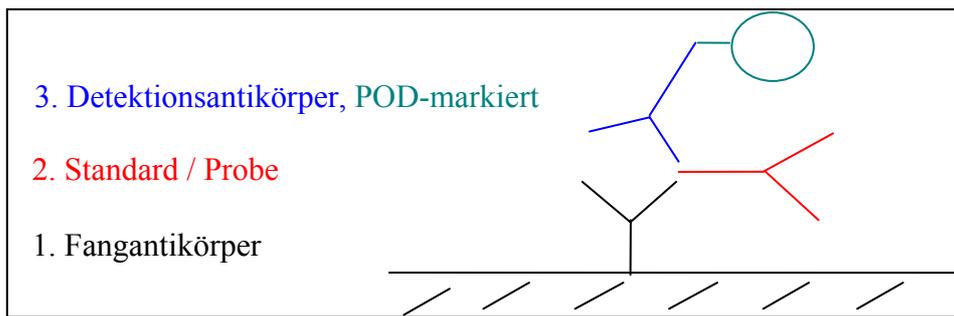


Abbildung 4. Schematische Darstellung des ELISA - Aufbaus zum Nachweis von Antikörpern

Zuerst wurden ELISA-Platten vom Typ Maxisorp (Nunc) mit 50 µl/Kavität Primärantikörper Ziege-anti-Maus-Ig in Karbonatpuffer pH 9,5 über Nacht bei 4 °C beschichtet. Nach dreimaligem Waschen der Platten mit PBS-Tween (200 µl/Kavität) wurden die Platten mit Blockierungspuffer für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem sich anschließenden Waschgang wurde der entsprechende Standard bzw. die zu testenden Seren in Serum-Diluent aufgetragen, zu 50 µl/Kavität zugegeben und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem folgenden Waschschrift wurde der Peroxydase-(POD)-markierte Detektionsantikörper Ziege-anti-Maus-Ig in 10%igem Ziegennormalserum aufgebracht und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Da ein passender Detektionsantikörper für IgE nicht verfügbar war, wurde hier ein Biotin-markierter Antikörper in Verbindung mit Streptavidin-POD eingesetzt, welches außerdem noch eine signalverstärkende Funktion hat. Die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Nach dem letzten noch anstehendem Waschschrift wurde nun der Substrat-Puffer (100 µl/Kavität) aufgetragen und die Intensität der Farbreaktion in einem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von $\lambda=415$ nm bestimmt.

	Fangantikörper	Standard	Detektionsantikörper
IgG1	anti-IgG1 2,5 µg/ml (Nr. C128-Q148U)	Maus IgG1 500 ng/ml (Nr. B048-RE39)	anti-IgG1-POD 1 : 3000 (Nr. A046-M636)
IgG2a	anti-IgG2a 2,5 µg/ml (Nr. C098-MF89G)	Maus IgG2a 500 ng/ml (Nr. L017-R179)	anti-IgG2a-POD 1 : 3000 (Nr. A256-N426S)
IgM	anti-IgM 2,5 µg/ml (Nr. A549-N789)	Maus IgM 500 ng/ml (Pharmingen A510023)	anti-IgM-POD 1 : 3000 (Nr. J254-W835G)
IgE	anti-IgE 2,5 µg/ml (Nr. R35-118)	Maus IgE 2000 ng/ml (Nr. R35-18)	anti-IgE-Biotin 5 µg/ml (Nr. R35-72)

Tabelle 2. Übersicht über die verwendeten Antikörper der Firma Southern Biotechnology zur Ig-Bestimmung mittels ELISA

3.2.7.3 Bestimmung des Kryptokokken-Antigens im Serum

Der Antigengehalt des Serums wurde mit Hilfe des PREMIER Cryptococcal Antigen ELISA Kit untersucht. Die mitgelieferten Platten waren schon mit Antikörpern beschichtet. Die in Serum-Diluent verdünnten Seren und die Positivkontrolle wurden aufgetragen und 10 min inkubiert. Abweichend von der beiliegenden Anleitung des Herstellers, der Serumverdünnungen von 1:10 empfiehlt, waren aber Serumverdünnungen von 1:1000 sinnvoll, um in den Bereich der Positivkontrolle zu kommen. Nach dem anschließenden Waschen wurde das Enzymkonjugat aufgetragen und für 10 min inkubiert. Nach einem erneuten Waschgang wurde die Substratlösung hinzugegeben und wieder für 10 min inkubiert. Danach wurde die Stopplösung eingebracht und nach 2 min die Absorption mit einem ELISA-Reader bei $\lambda=450$ nm bestimmt. Alle zum Test benötigten Lösungen werden mitgeliefert. Aus dem Verhältnis der Absorption von Positivkontrolle und Serum-Proben konnte jetzt der Antigen-Titer errechnet werden. Diese Vorgehensweise entsprach der dem Test beiliegenden Anleitung.

3.3 Statistik

Alle statistischen Berechnungen wurden mit dem Programm SigmaStat für Windows Version 2.03 (SPSS Inc.) durchgeführt. Zum Einsatz dabei kam der Rangsummen-Test. Für die Berechnungen wurden die Ausgangswerte der graphischen Darstellungen genutzt.

4 Ergebnisse

4.1 Intraperitoneale Infektion

4.1.1 Organkeimzahlen nach Infektion

Um einen Überblick über den Infektionsverlauf zu erhalten und die Resistenz von Wildtyp-Mäusen zu untersuchen, wurde im zeitlichen Verlauf von Tag vier bis einundzwanzig nach intraperitonealer Infektion die Organbelastung der Leber untersucht. Die Infektionsdosis betrug dabei 1×10^4 Kryptokokken pro Maus. Diese Dosis wurde auch in allen anderen intraperitonealen Infektionen eingesetzt. Es war davon auszugehen, dass alle inneren Organe und das Gehirn von Kryptokokken befallen werden und sich Kryptokokken-Antigen im Serum verteilt. Dies war in früheren Infektionsversuchen mit dem von uns verwendeten Stamm von *C. neoformans* schon gezeigt worden. Darum genügte es, in einem Organ die Erregerkonzentration zu ermitteln, um Rückschlüsse auf die Besiedlung des ganzen Organismus zu ziehen.

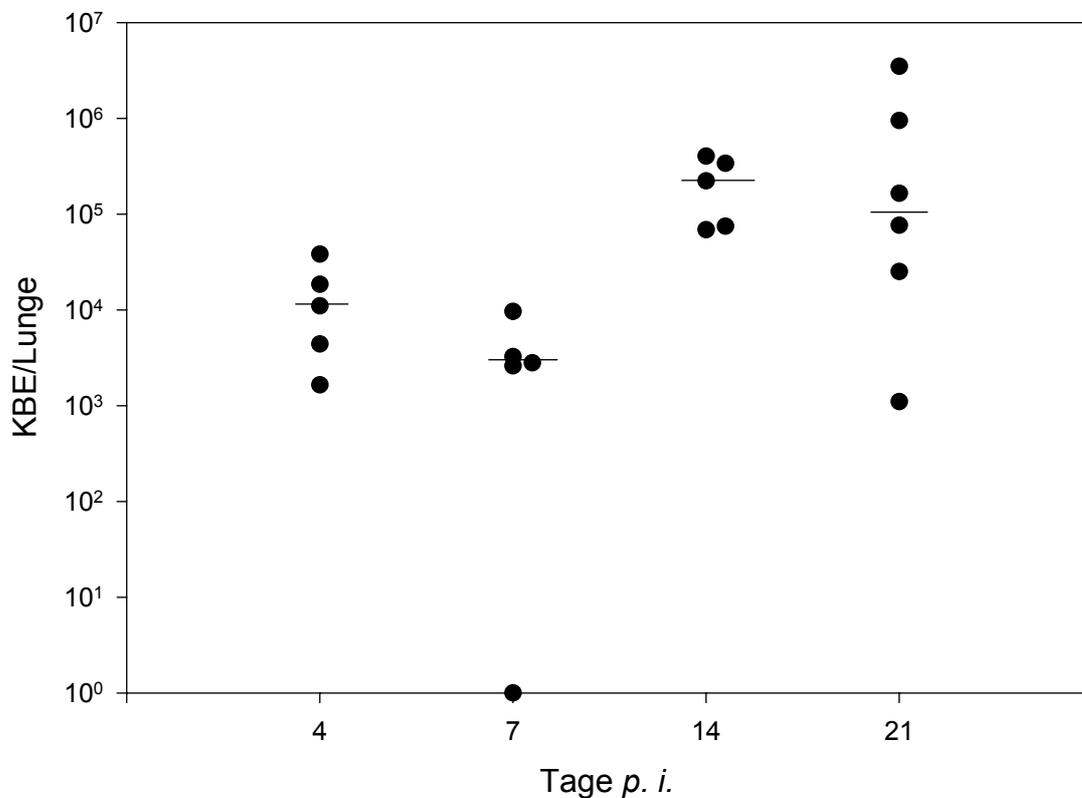


Abbildung 5. Zeitlicher Verlauf der Keimbelastung der Lunge von Wildtyp-Mäusen nach intraperitonealer Infektion (logarithmische Darstellung). Ein Punkt stellt die Keimzahl einer Maus dar. Die Keimbelastung konnte ab Tag 14 *p. i.* von den Wildtyp-Mäusen kontrolliert werden.

Vom vierten auf den siebten Tag *p. i.* fiel die mittlere Keimbelastung in der Lunge der Versuchstiere geringfügig ab (Abbildung 5). Danach stieg die Belastung kontinuierlich bis zum Tag 21 *p. i.* an. Allerdings wurde zu diesem Zeitpunkt die Varianz innerhalb der Versuchsgruppe sehr groß. In den weiteren Experimenten wurden die Ergebnisse am Tag 21 *p. i.* erhoben. Um die T-Zellantwort zu untersuchen, die erst 10-14 Tage *p. i.* messbar wird, eignete sich der Zeitpunkt von 21 Tagen *p. i.* sehr gut. Außerdem war die Gefahr des frühen Sterbens von IL-12p35/p40^{-/-}-Mäusen relativ gering, da DECKEN et al. (1998) feststellten, dass die durchschnittliche Überlebensdauer dieses Mausgenotyps bei einer intravenösen Infektion mit dem *C. neoformans*-Stamm 1841 bei 26 Tagen liegt (abhängig von der Infektionsdosis).

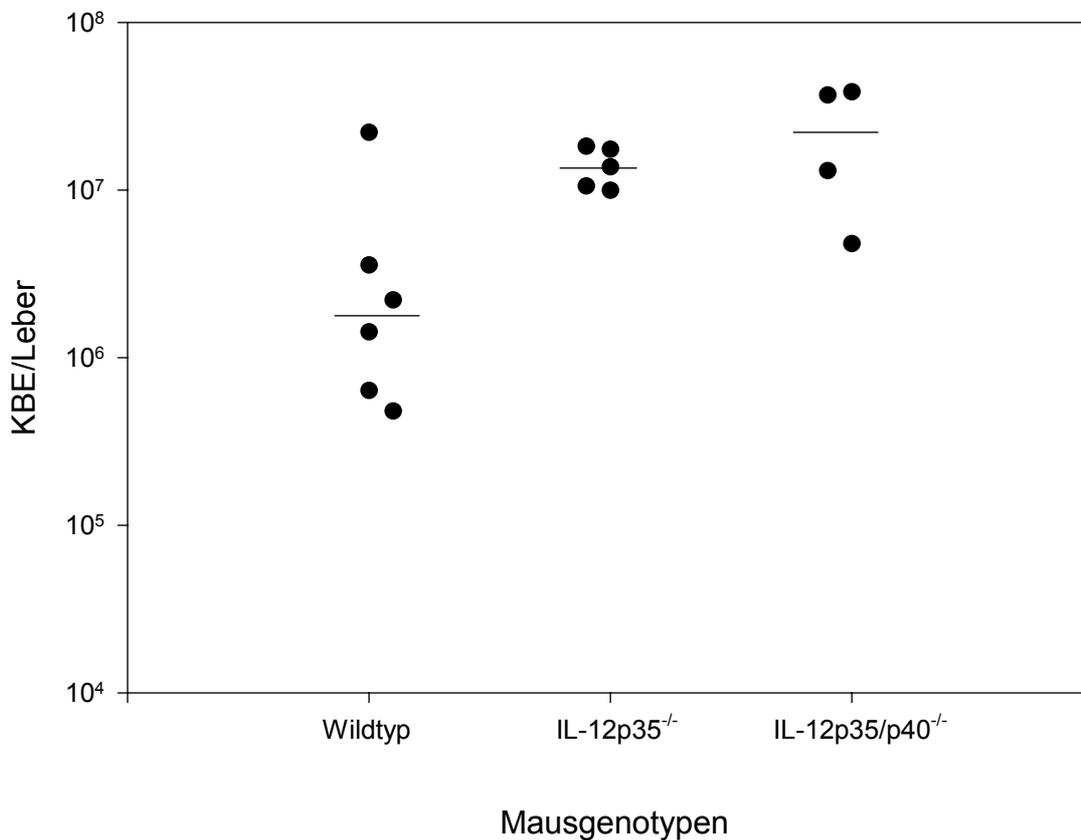


Abbildung 6. Unterschiede in der Keimbelastung der Leber 21 Tage nach intraperitonealer Infektion (logarithmische Darstellung). Ein Punkt stellt die Keimzahl einer Maus dar. Die Keimbelastung der IL-12^{-/-}-Mäuse war gegenüber den Wildtyp-Mäusen deutlich erhöht.

Die Keimbelastung der Organe war ein direktes Indiz dafür, wie gut die Infektionsabwehr des Organismus gegenüber dem Erreger funktionierte. Vergleich man am Tag 21 *p. i.* die

Keimbelastung von Wildtyp-Mäusen mit IL-12^{-/-}-Mäusen (IL-12p35^{-/-}-, IL-12p35/p40^{-/-}-Mäuse), zeigte sich die geringste Anzahl an lebenden Kryptokokken bei den Wildtyp-Mäusen. Bei den IL-12^{-/-}-Mäusen lag die Belastung im Mittel um das 10fache höher (Abbildung 6). Im Vergleich zwischen den beiden IL-12^{-/-}-Mausstämmen zeigte sich eine leichte Erhöhung der Keimbelastung der IL-12p35/p40^{-/-}-Mäuse gegenüber den IL-12p35^{-/-}-Mäusen. Diese Ergebnisse korrelierten mit der Überlebensrate der Tiere. So hatten bis zum Zeitpunkt der Analyse am Tag 21 der Infektion alle Wildtyp-Mäuse überlebt. Bei den IL-12p35^{-/-}-Mäusen starb eine Maus und bei den IL-12p35/p40^{-/-}-Mäusen starben zwei Mäuse 20 Tage *p. i.*, einen Tag vor der geplanten Probengewinnung am Tag 21.

Diese Daten zeigten, dass IL-12 für die Abwehr einer Infektion mit *C. neoformans* erforderlich ist. Der geringe Unterschied bezüglich Organkeimzahl und Überlebenszeit zwischen den IL-12p35^{-/-}-Mäusen, die noch zur Bildung von IL-12p40 fähig sind, und den IL-12p35/p40^{-/-}-Mäusen, die weder IL-12p75 noch IL-12p40 produzieren konnten, wies auf eine protektive, zu IL-12p75 agonistische Funktion von IL-12p40 hin.

4.1.2 Bestimmung des Kryptokokken-Antigens im Serum

Außer der Bestimmung der lebenden Kryptokokken in Organen kann auch das zirkulierende Kryptokokken-Antigen im Serum bestimmt werden. Allerdings bilden die Anti-Kryptokokken-Antikörper mit dem Antigen Immunkomplexe, was bei äquivalenten Mengenverhältnissen von Ag und Ak oder Ak-Überschuß zum Nachweisverlust führt. Freies Antigen hingegen kann im Serum bestimmt werden.

Mit dem kommerziellen PREMIER Cryptococcal Antigen ELISA Kit, welches in Kliniken zur Diagnose einer Kryptokokkose eingesetzt wird, wurde der Titer an freiem Kryptokokken-Antigen im Serum bestimmt.

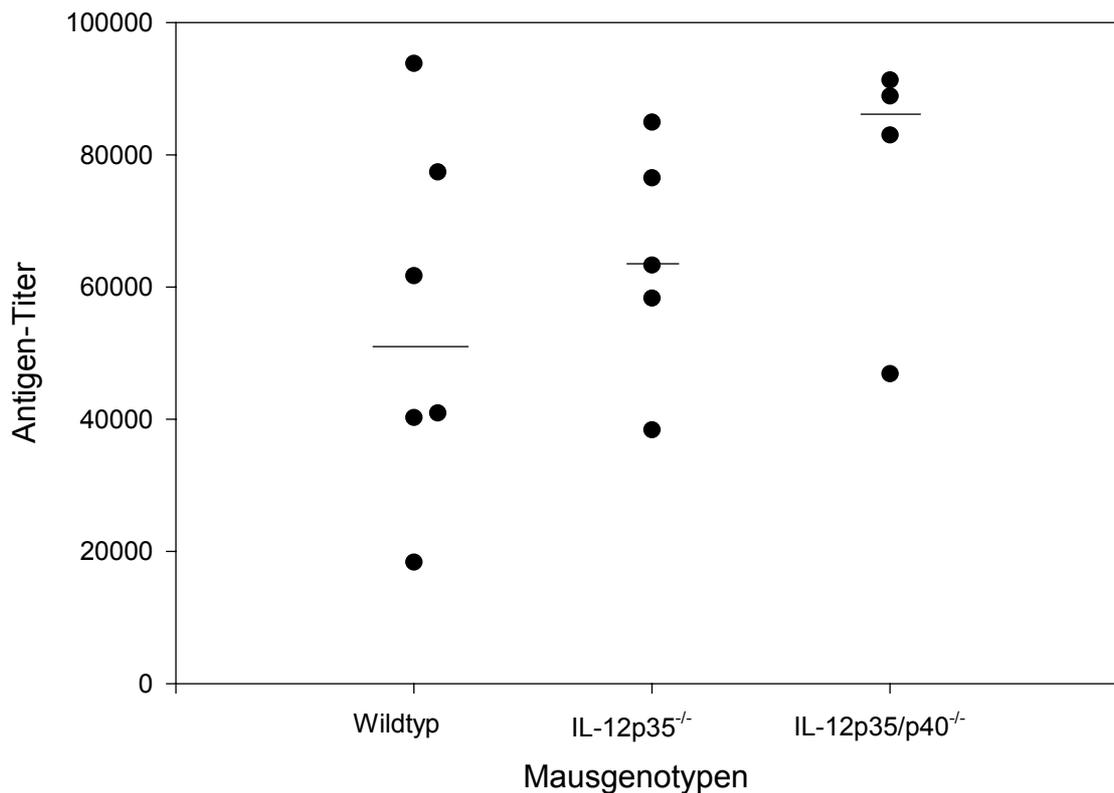


Abbildung 7. Kryptokokken-Antigen-Titer im Serum, 21 Tage nach intraperitonealer Infektion, bestimmt mittels kommerziellem ELISA. Erfasst wird dabei nur freies Antigen im Serum der Mäuse. Die IL-12^{-/-}-Mäuse hatten im Mittel mehr Kryptokokken-Antigen im Serum als die Wildtyp-Mäuse. Dabei war der Titer bei den IL-12p35/p40^{-/-}-Mäusen im Mittel höher als bei den IL-12p35^{-/-}-Mäusen.

Die abgebildeten Daten stammen aus demselben Experiment wie die Daten in Abbildung 6. Nach der Infektion von Wildtyp- und IL-12^{-/-}-Mäusen fanden wir eine ähnliche Staffelung wie bei der Keimzahlbestimmung in der Leber (Abbildung 6). Die Antigen-Titer waren bei den Wildtyp-Mäusen geringer als bei den IL-12^{-/-}-Mäusen. Auch zwischen den beiden IL-12^{-/-}-Genotypen gab es einen Unterschied. Die Titer der IL-12p35/p40^{-/-}-Mäuse waren noch höher als die der IL-12p35^{-/-}-Mäuse. Je mehr Keime in den Organen zu finden waren, desto mehr Antigen war auch im Blut nachweisbar und umso eher starben die Mäuse.

Auch hier wurde durch den Unterschied zwischen den IL-12p35^{-/-}-Mäusen, die noch IL-12p40 bilden konnten, und den IL-12p35/p40^{-/-}-Mäusen deutlich, dass IL-12p40 eine positive Wirkung auf die Infektionsabwehr hatte.

4.1.3 Pathohistologische Charakterisierung der Entzündungsreaktion

4.1.3.1 Morphologische Unterschiede der Entzündungsreaktion

Die Wirtsreaktion bei einer Infektion mit *C. neoformans* geht mit der Bildung von Granulomen einher. Für die Analyse der Granulombildung eignete sich das Lebergewebe besonders gut. Es bildet einen einheitlichen parenchymatösen Hintergrund und wird gut durchblutet, was den Einstrom von Makrophagen und Granulozyten für die Ausbildung von Granulomen begünstigt.

Im Unterschied zu Wildtyp-Mäusen bildeten sich bei den beiden IL-12^{-/-}-Mausstämmen aber nach der Infektion keine typischen Granulome aus. Schon in der Veröffentlichung von DECKEN et al. (1998) wurden Unterschiede in der Granulombildung bei IL-12p35^{-/-}-Mäusen und IL-12p40^{-/-}-Mäusen deutlich. Es wurde gezeigt, dass die Ausbildung von Granulomen von IL-12p40 abhängig ist, da IL-12p35/p40^{-/-}-Mäuse, die kein IL-12p40 bilden können, nicht mehr in der Lage sind, Entzündungszellen zu rekrutieren und Granulome auszubilden. Diesem Phänomen sollte in dieser Arbeit detaillierter nachgegangen werden.

Bei den Wildtyp-Mäusen bildeten sich um die im Gewebe liegenden Kryptokokken typische Granulome mit T-Zellen, Makrophagen, Riesenzellen und Granulozyten (Abbildung 8). Bei den IL-12p35/p40^{-/-}-Mäusen ergab sich dagegen ein ganz anders histologisches Bild. Die Erreger lagerten sich im Gewebe zu Gruppen zusammen. Durch die im Lichtmikroskop transparent erscheinende Kapsel konnte man die Kryptokokken an einem großen hellen Hof erkennen (Abbildung 9). In der Peripherie dieser Kryptokokkenansammlungen waren zum Teil einzelne Entzündungszellen zu finden. Eine typische entzündliche Reaktion blieb aber aus. – Bei den IL-12p35^{-/-}-Mäusen fand sich kein einheitliches Bild. Einerseits lagerten sich auch hier viele Kryptokokken zusammen. Andererseits waren diese Gebilde von Granulozyten umgeben (Abbildung 10). So fanden wir Gewebeveränderungen, die von „typischen Granulomen“ bis zu „reinen Kryptokokkenanhäufungen“ reichten.

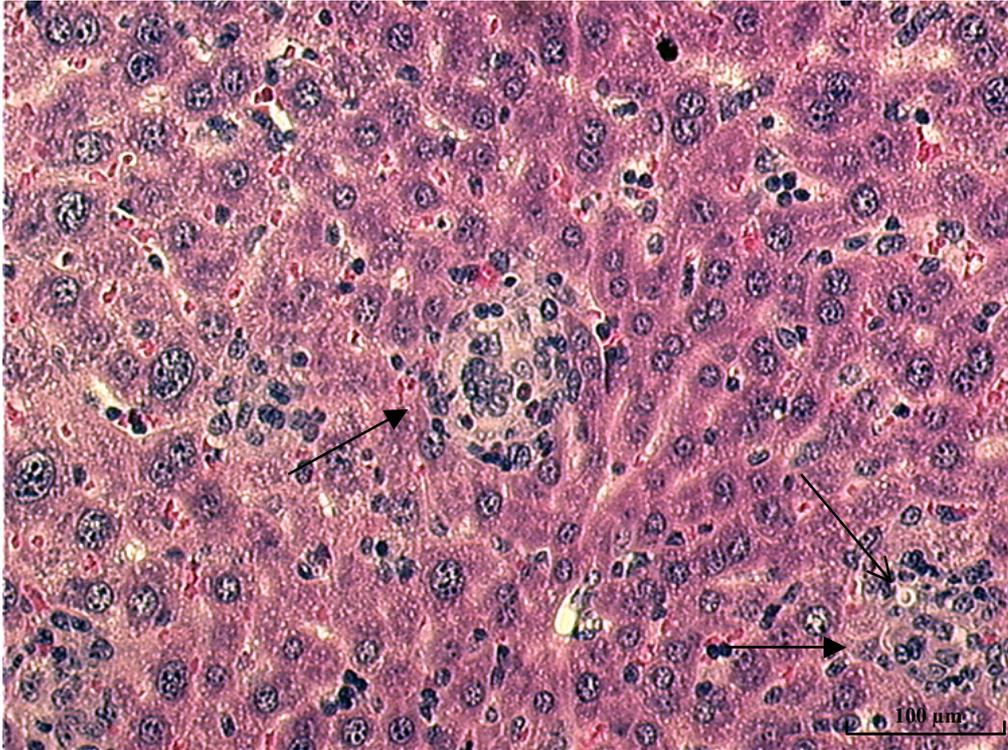


Abbildung 8. Granulome (—▶) und vereinzelt Kryptokokken (→) in der Leber einer Wildtyp-Maus 21 Tage nach intraperitonealer Infektion. HE-Färbung zur Übersicht.

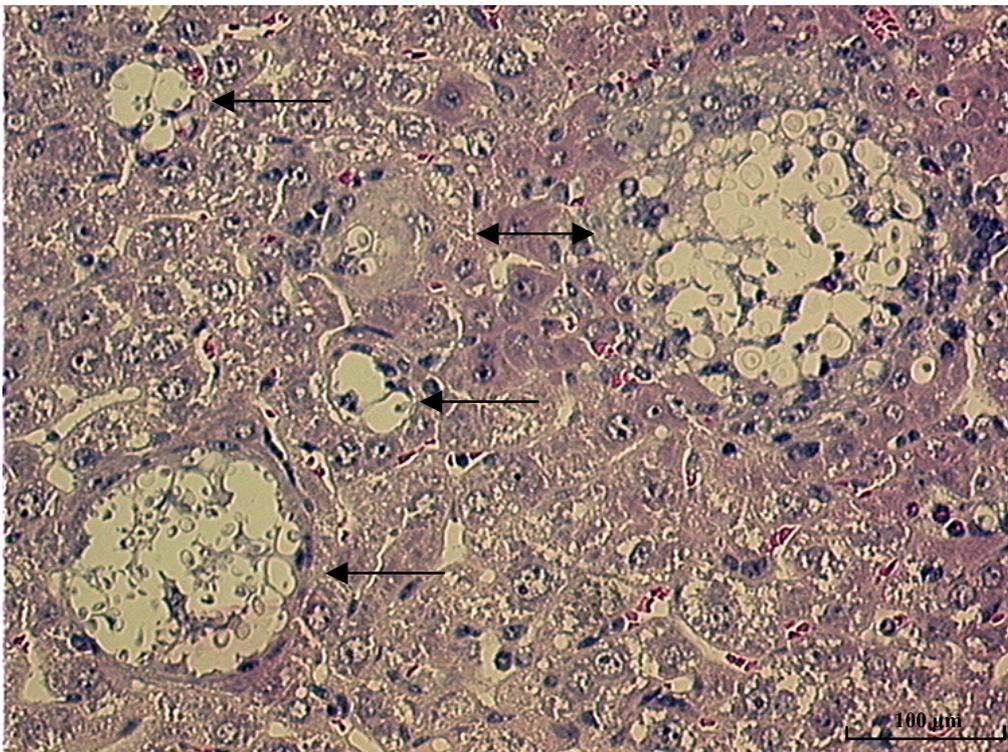


Abbildung 9. Atypische Granulome in der Leber (—▶) einer IL-12p35/p40^{-/-}-Maus 21 Tage nach intraperitonealer Infektion. HE-Färbung zur Übersicht. Es waren große Zusammenlagerung von Kryptokokken mit einzelnen Entzündungszellen in deren Peripherie sichtbar.

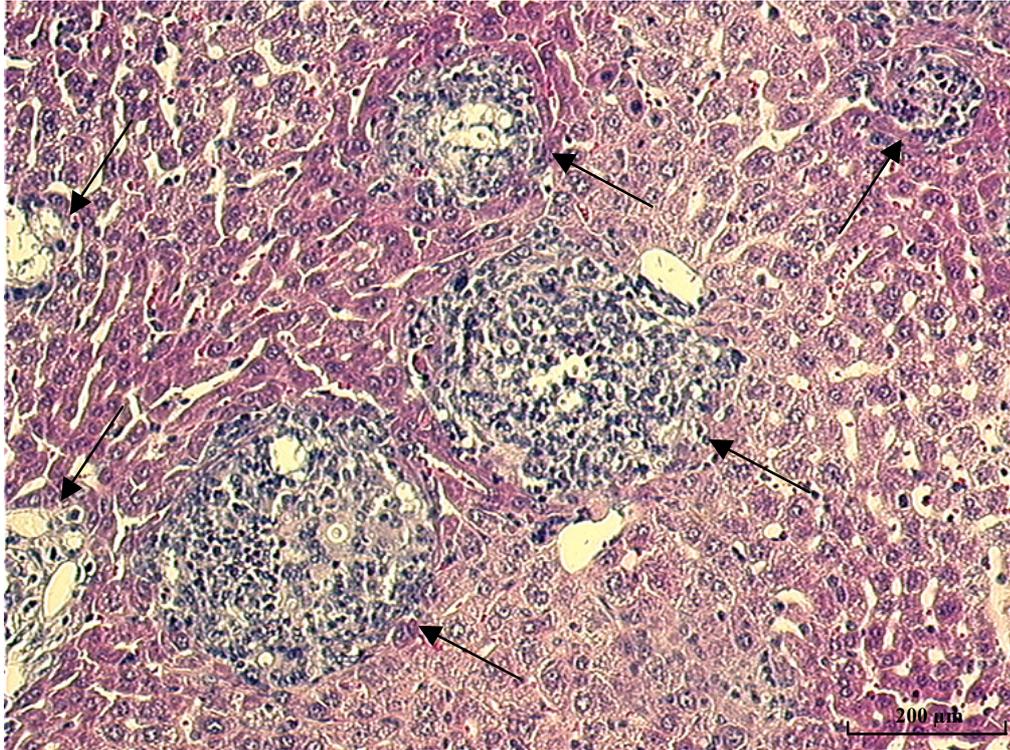


Abbildung 10. Granulome in der Leber (—▶) einer IL-12p35^{-/-}-Maus 21 Tage nach intraperitonealer Infektion. HE-Färbung zur Übersicht. Die Areale waren deutlich größer als bei den Wildtyp-Mäusen.

4.1.3.2 Bestimmung der Anzahl und Größe der Gewebsveränderungen an HE-Schnitten

Bei Wildtyp-Mäusen wurde die Entwicklung der Granulome in zeitlicher Abhängigkeit ermittelt. Dabei wurden die Granulome aus mit Hämatoxylin und Eosin gefärbten Leberschnitten mit einem digitalen Bildanalyse-System ausgemessen. Es wurde die Größe des Sichtfeldes sowie die Anzahl und die Größe der Granulome analysiert. Mit diesen Daten konnte dann die Granulomanzahl pro mm² Gesamtfläche und der prozentuale Anteil der Granulomfläche an der Gesamtfläche berechnet werden.

Dabei zeigte sich, dass erst 1-2 Wochen nach intraperitonealer Infektion mit *C. neoformans* Granulome bei Wildtyp-Mäusen ausgebildet wurden (Abbildung 11). Untersuchungen an Granulomen konnten demnach frühestens 14 Tage *p. i.* durchgeführt werden. Um sicher zu gehen und eine mögliche verzögerte Reaktion der IL-12^{-/-}-Mäuse mit einzukalkulieren, wurden alle nachfolgenden Untersuchungen 21 Tage nach intraperitonealer Infektion durchgeführt. Die Größe der Granulome nahm von Tag 14 auf Tag 21 *p. i.* noch etwas zu (Abbildung 13). Die Immunabwehr hatte also zu diesem Zeitpunkt noch keinen Stillstand erreicht. Man betrachtet demzufolge nur eine Momentaufnahme der Abwehrreaktion zu einem definierten Zeitpunkt. Dieser Zeitpunkt ist mit 21 Tagen *p. i.* gut gewählt, da sowohl die zelluläre als auch die humorale Antwort der Mäuse charakterisiert werden konnte.

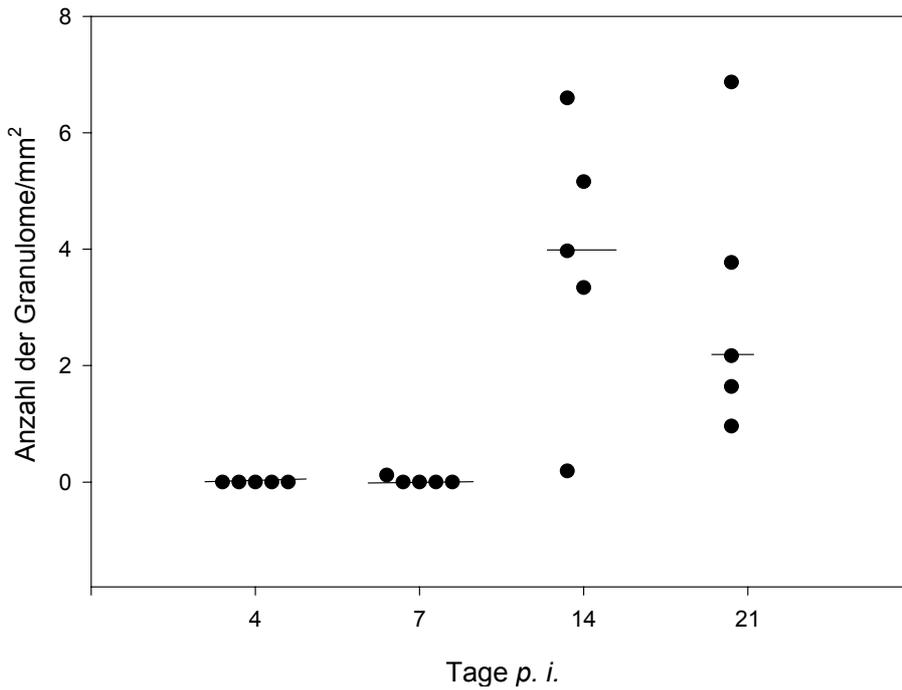


Abbildung 11. Anzahl der Granulome in der Leber (pro mm²) bei Wildtyp-Mäusen in Abhängigkeit von der Zeit. Die Ausbildung der Granulome fand zwischen 7 und 14 Tagen *p. i.* statt. Später schien es keine Bildung neuer Granulome zu geben.

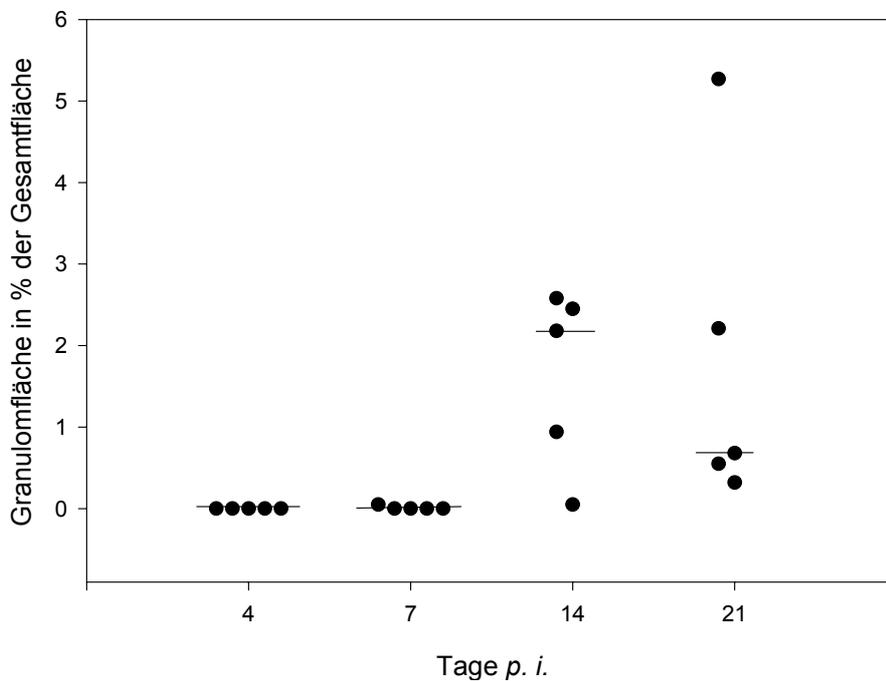


Abbildung 12. Entwicklung der Granulomfläche in Bezug auf die Gesamtfläche in der Leber bei Wildtyp-Mäusen in Abhängigkeit von der Zeit. Der Anteil der Granulome an der Lebergesamtfläche stieg vom Tag 7 zum Tag 14 *p. i.* sprunghaft an. Danach blieb der Flächenanteil der Granulome weitgehend gleich.

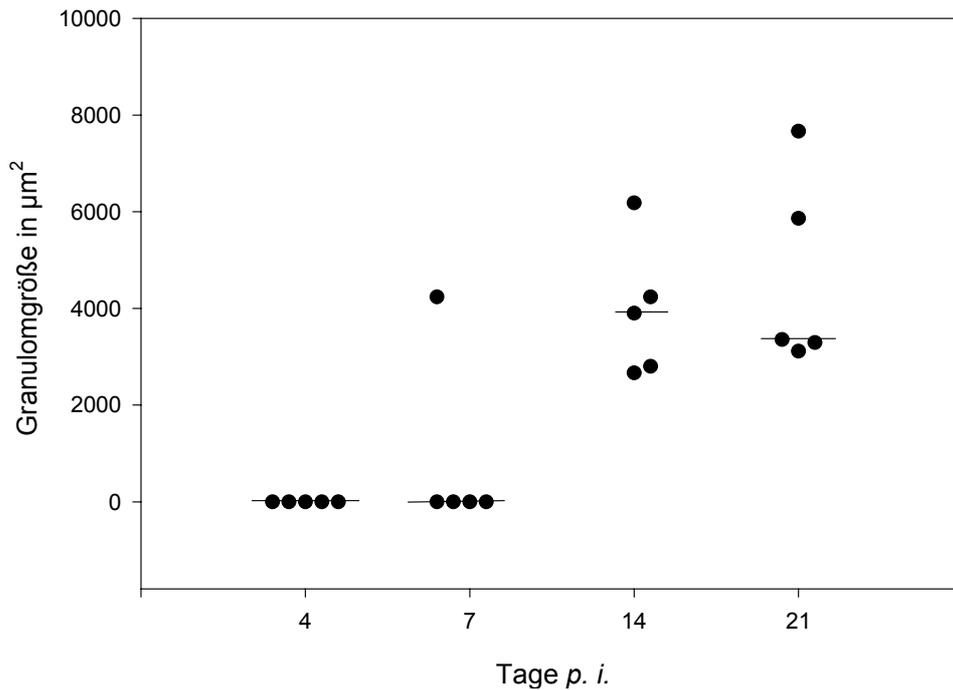


Abbildung 13. Granulomgröße in der Leber in Abhängigkeit von der Zeit bei Wildtyp-Mäusen nach intraperitonealer Infektion. Die Entwicklung der Granulome war 14 Tage *p. i.* weitgehend abgeschlossen. Zum Tag 21 *p. i.* hin wurden die Granulome nur geringfügig größer.

Beim Vergleich der Anzahl der Gewebsveränderungen zeigte sich, dass diese beim Wildtyp signifikant seltener vorkamen ($p \leq 0,001$) als bei den $\text{IL-12}^{-/-}$ -Mäusen (Abbildung 14). Außerdem war die Schwankungsbreite beim Wildtyp recht gering. Bei den $\text{IL-12}^{-/-}$ -Mäusen schwankten die Ergebnisse innerhalb der Gruppe erheblich. Aus diesem Grund konnte auch kein signifikanter Unterschied zwischen den $\text{IL-12p35}^{-/-}$ - und $\text{IL-12p35/p40}^{-/-}$ -Mäusen in Bezug auf die Anzahl der pathologisch veränderten Areale festgestellt werden.

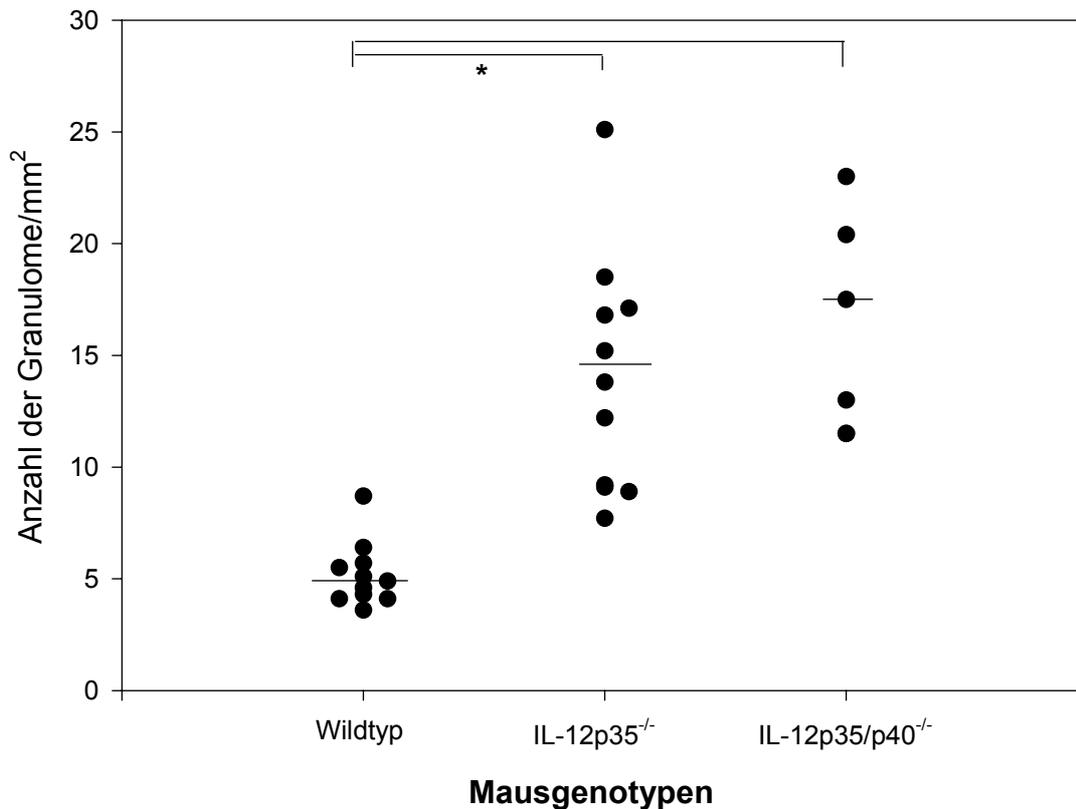


Abbildung 14. Unterschiede in der Anzahl der Gewebsveränderungen zwischen den Wildtyp- und den IL-12^{-/-}-Mäusen. Bei den Wildtyp-Mäusen waren die wenigsten dieser Areale zu finden. Bei den IL-12p35^{-/-}- und den IL-12p35/p40^{-/-}-Mäusen fanden wir dagegen bis zu 2,5mal mehr solcher Areale. Diese Unterschiede sind hoch signifikant ($p \leq 0,001$) im Gegensatz zu den IL-12^{-/-}-Mäusen untereinander.

Der Vergleich der Größe der Gewebsveränderungen ergab ein etwas anderes Bild (Abbildung 15). Auch die Fläche der Areale war beim Wildtyp signifikant kleiner als bei den IL-12^{-/-}-Mäusen ($p \leq 0,001$). Aber auch die Größe der Areale der IL-12p35^{-/-}- und IL-12p35/p40^{-/-}-Mäuse unterschieden sich. Sie waren bei den einfachen IL-12p35^{-/-}-Mäusen signifikant größer als bei den IL-12p35/p40^{-/-}-Mäusen ($p \leq 0,001$). Dies lässt sich durch den schon erwähnten zusätzlichen Einstrom von Entzündungszellen zu den Kryptokokkenzusammenlagerungen bei den IL-12p35^{-/-}-Mäusen erklären.

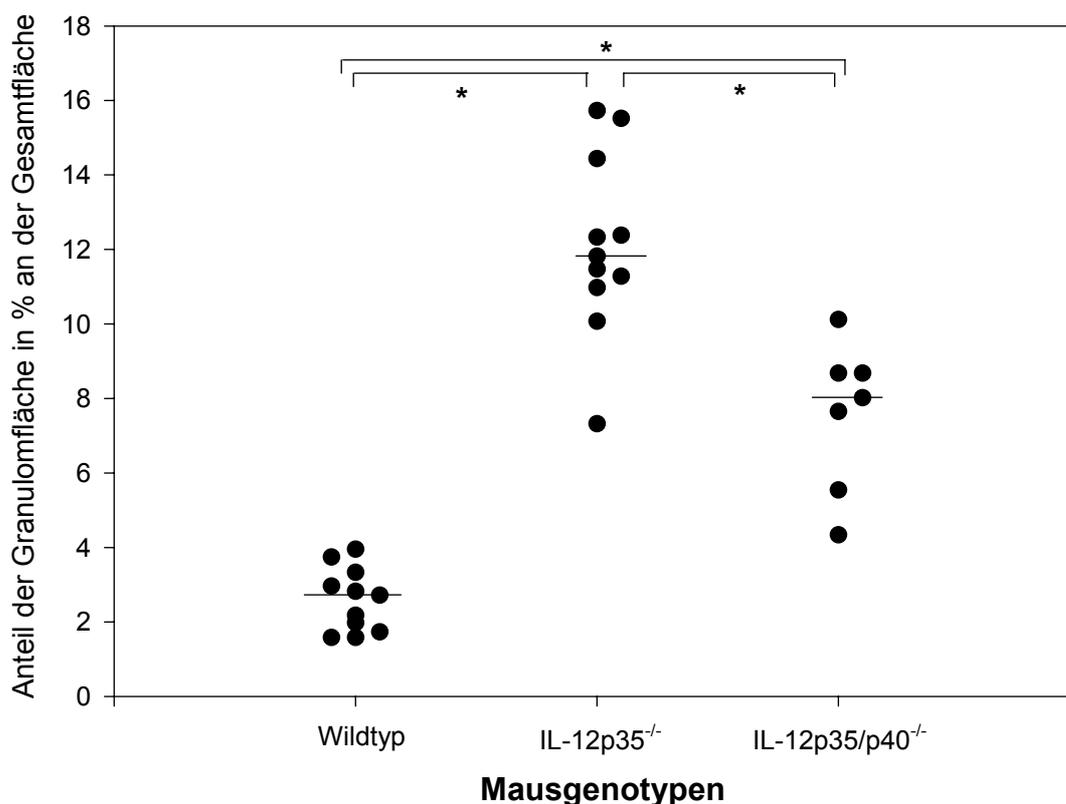


Abbildung 15. Unterschiede im Anteil der Gewebsveränderungen an der Lebergesamtläche bei den einzelnen Mausgenotypen. Bei den Wildtyp-Mäusen war die geringste Fläche von Veränderungen betroffen. Bei den IL-12p35/p40^{-/-}-Mäusen war durchschnittlich dreimal mehr und bei den IL-12p35^{-/-}-Mäusen durchschnittlich viermal mehr der Leberfläche pathologisch verändert. Mittels Rangsummen-Test konnte ein signifikanter Unterschied zwischen allen drei Mausgenotypen bestätigt werden. ($p \leq 0,001$)

Aus den Werten für Anzahl und Größe der Veränderungen ließ sich die durchschnittliche Größe der Gewebsveränderungen in μm^2 berechnen. So ergab sich beim Wildtyp eine Größe von $5136 \mu\text{m}^2$, bei den IL-12p35/p40^{-/-}-Mäusen von $5901 \mu\text{m}^2$ und bei den IL-12p35^{-/-}-Mäusen eine rechnerische Durchschnittsgröße der Areale von $9681 \mu\text{m}^2$. Auffallend dabei war, dass die pathologisch veränderten Areale bei den IL-12p35/p40^{-/-}-Mäusen nur wenig größer waren als beim Wildtyp. Bei den IL-12p35^{-/-}-Mäusen waren sie dagegen fast doppelt so groß. Dies könnte eine Folge von Verschmelzungen verschiedener Areale sein. Abbildung 16 zeigt dazu die graphische Darstellung einzelner Werte. Die größere Fläche der pathologischen Veränderungen der IL-12p35^{-/-}-Mäuse war gegenüber den Wildtyp-Mäusen ($p < 0,001$) und den IL-12p35/p40^{-/-}-Mäusen ($p = 0,006$) signifikant.

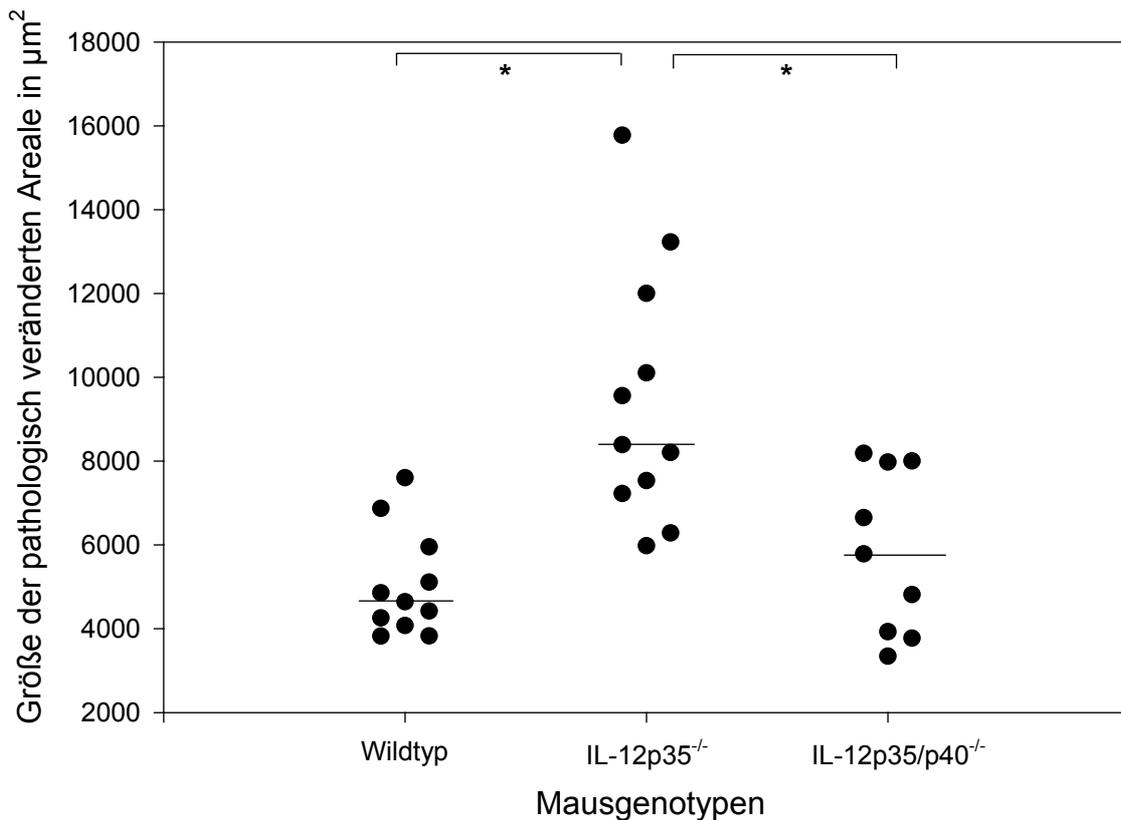


Abbildung 16. Vergleich der Größe der Gewebsveränderungen der Leber in μm^2 bei Wildtyp-, IL-12p35^{-/-}- und IL-12p35/p40^{-/-}-Mäusen 21 Tage nach intraperitonealer Infektion. Die Veränderungen der IL-12p35^{-/-}-Mäuse waren gegenüber den Wildtyp-Mäusen ($p < 0,001$) und den IL-12p35/p40^{-/-}-Mäusen ($p = 0,006$) signifikant größer.

4.1.3.3 Immunhistologische Untersuchungen zur zellulären Zusammensetzung der Granulome und Gewebsveränderungen

Nachdem mittels HE-Färbung die Anzahl und die Größe der nach Infektion gebildeten pathologisch veränderten Areale ermittelt worden war, wurde mittels immunhistochemischer Färbemethoden die Zellzusammensetzung dieser pathologisch veränderten Areale bestimmt. Dabei wurden Makrophagen, neutrophile Granulozyten, CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen und B-Zellen detektiert.

Im Vorfeld wurde erst bestimmt, welche Zellen in welcher Häufigkeit im veränderten Lebergewebe, d. h. als Bestandteil der veränderten Areale und außerhalb derer 21 Tage nach intraperitonealer Infektion zu finden sind (Abbildung 17). Die Zählung wurde wieder mit Hilfe der digitalen Bildanalyse durchgeführt. Dabei wurden die Makrophagen mit einem monoklonalen Anti-F4/80-Antikörper, T-Helferzellen mit Anti-CD4-Antikörpern, zytotoxische T-Zellen mit Anti-CD8-Antikörpern und B-Zellen mit dem monoklonalen Antikörper b7.6 detektiert.

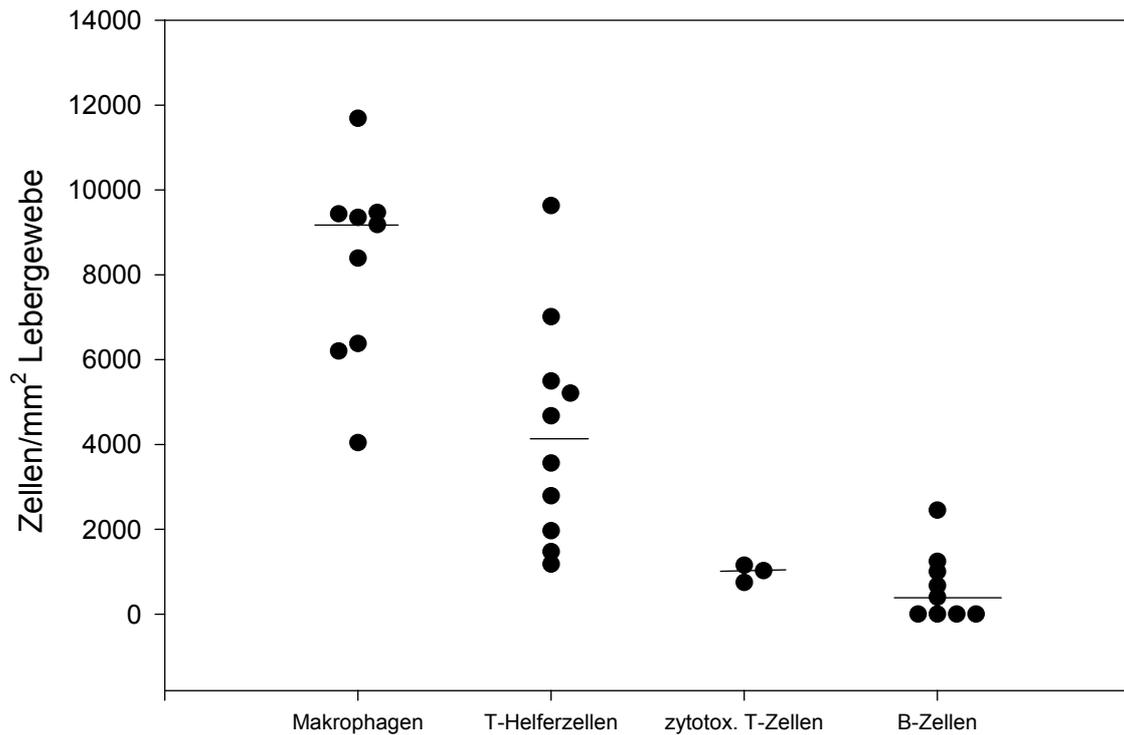


Abbildung 17. Übersicht über Entzündungszellen im Lebergewebe von Wildtyp-Mäusen 21 Tage nach intraperitonealer Infektion. Makrophagen waren im Lebergewebe am häufigsten anzutreffen, dicht gefolgt von T-Helferzellen. Zytotoxische T-Zellen und B-Zellen waren dagegen recht selten.

Bei infizierten Wildtyp-Mäusen waren, verglichen mit den anderen nachgewiesenen Entzündungszellen, am häufigsten Makrophagen im Gewebe zu finden. Auch T-Helferzellen waren häufig zu identifizieren. B-Zellen wurden in einigen Schnitten in geringer Anzahl und bei anderen gar nicht gefunden. Auch zytotoxische T-Zellen wurden im Lebergewebe nur sehr selten gesichtet.

Bei den immunhistochemischen Färbungen fielen immer wieder Zellen mit endogener Peroxidase auf (Abbildung 18). Mittels Färbungen an Serienschnitten wurde ausgeschlossen, dass es sich hierbei um F4/80⁺-Makrophagen, Granulozyten (Gr-1-Färbung und Chlorazetat-Esterase-Färbung) oder CD4⁺- bzw. CD8⁺-T-Zellen handelte.

4.1.3.3.1 Zelluläre Zusammensetzung der Granulome bei Wildtyp-Mäusen

Die zahlreich vorkommenden Makrophagen lagen einerseits verstreut im gesunden Lebergewebe, andererseits waren sie Bestandteil der pathologisch veränderten Areale

(Abbildung 18). Es gab also eine chemotaktische Wirkung auf die Makrophagen, die eine Wanderung zu den Kryptokokken hin bewirkte, um diese zum Lebergewebe hin abzugrenzen. Auf die recht zahlreichen T-Helferzellen schien es ebenfalls einen chemotaktischen Effekt zu geben. Man fand sie fast ausschließlich im Bereich der pathologisch veränderten Areale (Abbildung 19).

Zytotoxische T-Zellen waren in der Peripherie einiger pathologisch veränderter Areale zu finden (Abbildung 20).

Im gesamten Lebergewebe waren nur vereinzelt Zellen mit nicht blockierbarer endogener Peroxidase in den Bereichen der Granulome zu finden (Abbildung 18).

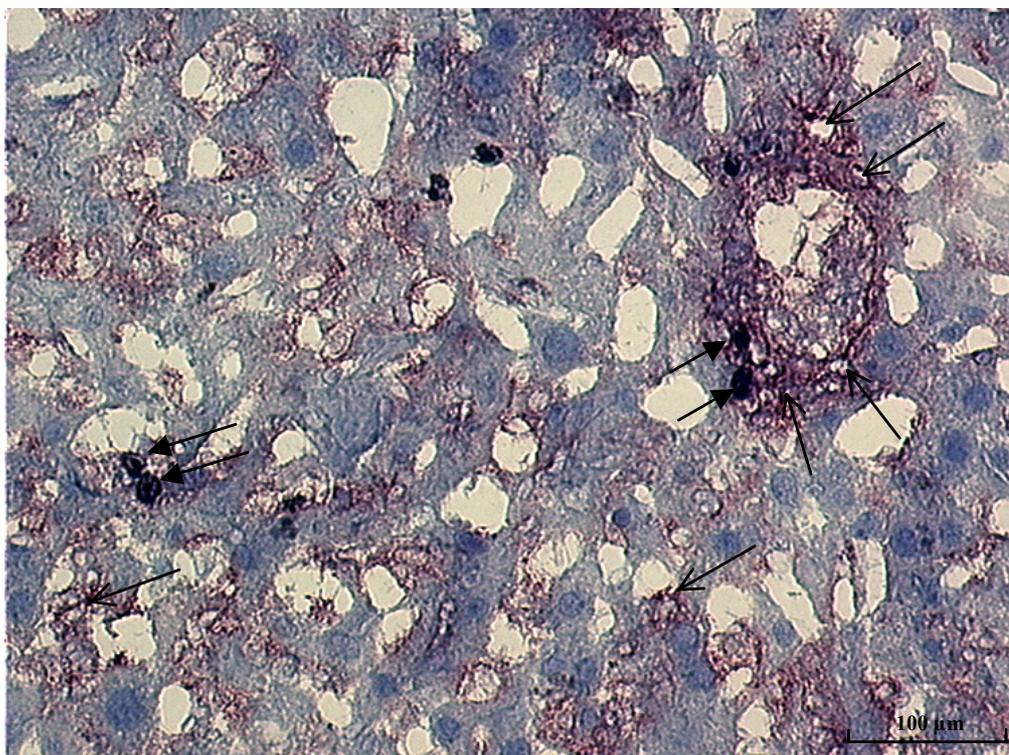


Abbildung 18. Makrophagen im Lebergewebe einer Wildtyp-Maus 21 Tage nach intraperitonealer Infektion. Rechts oben ein pathologisch verändertes Areal mit Entzündungszellen. Einzelne Zellen mit nicht blockierbarer endogener Peroxidase (—▶) waren durch die vorausgehende Substratreaktion sichtbar. Die Makrophagen (→) wurden durch einen mAk, der spezifisch für den F4/80-Oberflächenmarker ist, nachgewiesen.

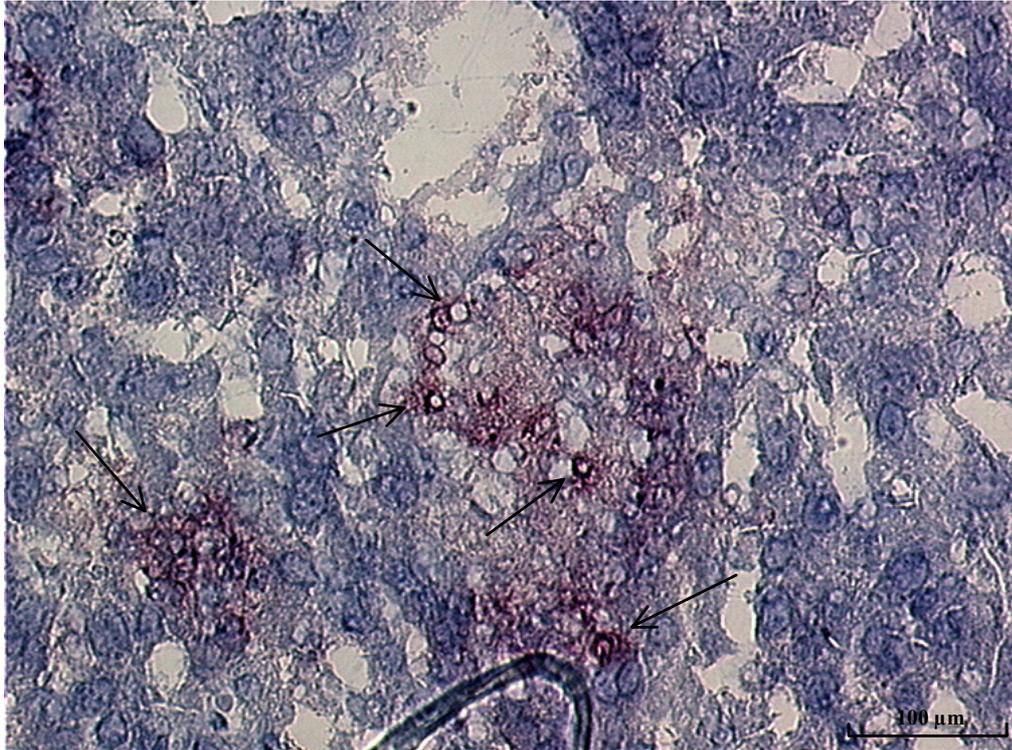


Abbildung 19. T-Helferzellen im Lebergewebe einer Wildtyp-Maus 21 Tage nach intraperitonealer Infektion. Sie waren Bestandteil der Granulome. Die T-Helferzellen (→) wurden durch einen mAk, der spezifisch für den CD4-Oberflächenmarker ist, nachgewiesen.

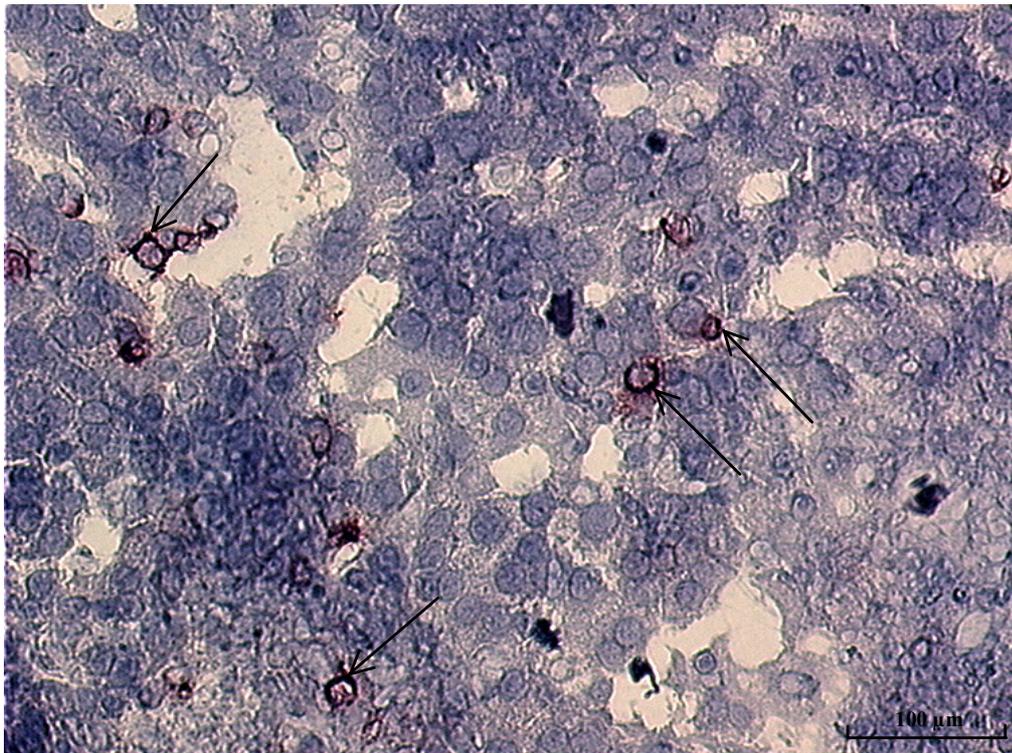


Abbildung 20. Zytotoxische T-Zellen im Lebergewebe einer Wildtyp-Maus 21 Tage nach intraperitonealer Infektion. Wenige Zellen lagen in der Peripherie der Granulome. Die zytotoxischen T-Zellen (→) wurden durch einen mAk, der spezifisch für den CD8-Oberflächenmarker ist, nachgewiesen.

4.1.3.3.2 Zelluläre Zusammensetzung der Granulome bei *IL-12p35^{-/-}*-Mäusen

Die auch bei den *IL-12p35^{-/-}*-Mäusen zahlreich vorkommenden Makrophagen lagen einerseits verstreut im gesunden Lebergewebe, andererseits waren sie Bestandteil der Granulome (Abbildung 21). Auch hier schien es eine chemotaktische Wirkung auf die Makrophagen zu geben, die eine Wanderung zu den Kryptokokken hin bewirkte, um diese zum Lebergewebe hin abzugrenzen. Allerdings war dies wesentlich weniger stark ausgeprägt als bei den Wildtyp-Mäusen.

Es waren nur ganz vereinzelt T-Helferzellen im Lebergewebe zu finden (Abbildung 22). Man fand sie in der näheren Umgebung mancher pathologisch veränderter Areale. Manchmal fehlten sie aber auch ganz.

Auch zytotoxische T-Zellen waren nur sehr selten zu finden (Abbildung 23). In der Nähe mancher Granulome waren ganz vereinzelt zytotoxische T-Zellen zu erkennen.

Bei den *IL-12p35^{-/-}*-Mäusen waren aber im Gegensatz zu den Wildtyp-Mäusen sehr viele Zellen mit nicht blockierbarer endogener Peroxidase in den Bereichen der Granulome zu finden (Abbildung 21). Man kann sagen, dass diese Zellen die Areale zu einem Großteil ausmachten (Abbildung 22).

Je nach Größe der Granulome, sah das Färbemuster recht unterschiedlich aus. Bei den kleinen Arealen fielen recht viele $CD4^+$ -T-Helferzellen auf (Daten nicht gezeigt). In den größeren pathologisch veränderten Arealen dagegen fanden sich sehr viele Zellen mit nicht blockierbarer endogener Peroxidase und wenige $CD4^+$ -T-Helferzellen (Abbildung 22). Im Entzündungsgeschehen der Wildtyp-Mäuse fanden sich sehr wenige dieser Zellen.

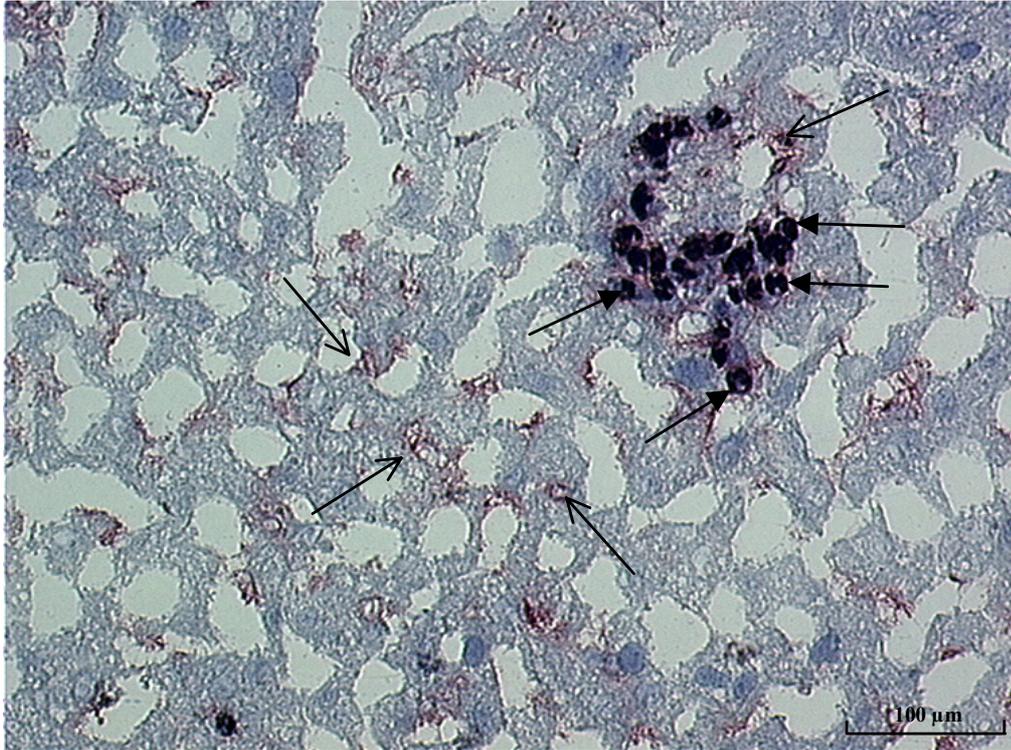


Abbildung 21. Makrophagen im Lebergewebe einer IL-12p35^{-/-}-Maus 21 Tage nach intraperitonealer Infektion. Rechts oben ein Granulom mit Entzündungszellen. Die Makrophagen (→) durch einen mAk, der spezifisch für den F4/80-Oberflächenmarker ist, nachgewiesen. Es waren verstärkt Zellen mit nicht blockierbarer endogener Peroxidase (—▶) in diesem Bereich sichtbar.

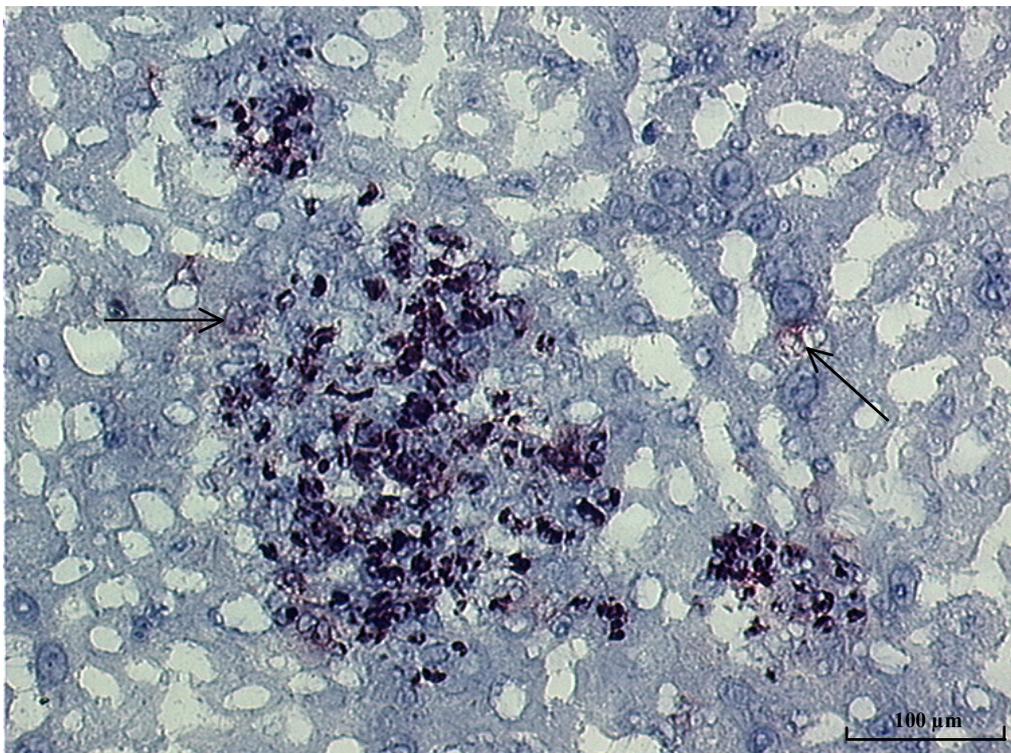


Abbildung 22. T-Helferzellen im Lebergewebe einer IL-12p35^{-/-}-Maus 21 Tage nach intraperitonealer Infektion. Die T-Helferzellen (→) wurden durch einen mAk, der spezifisch für den CD4-Oberflächenmarker ist, nachgewiesen. Es waren nur einzelne T-Zellen außerhalb der Granulome sichtbar. Dafür waren Zellen mit nicht blockierbarer endogener Peroxidase im Bereich der Areale vorherrschend.

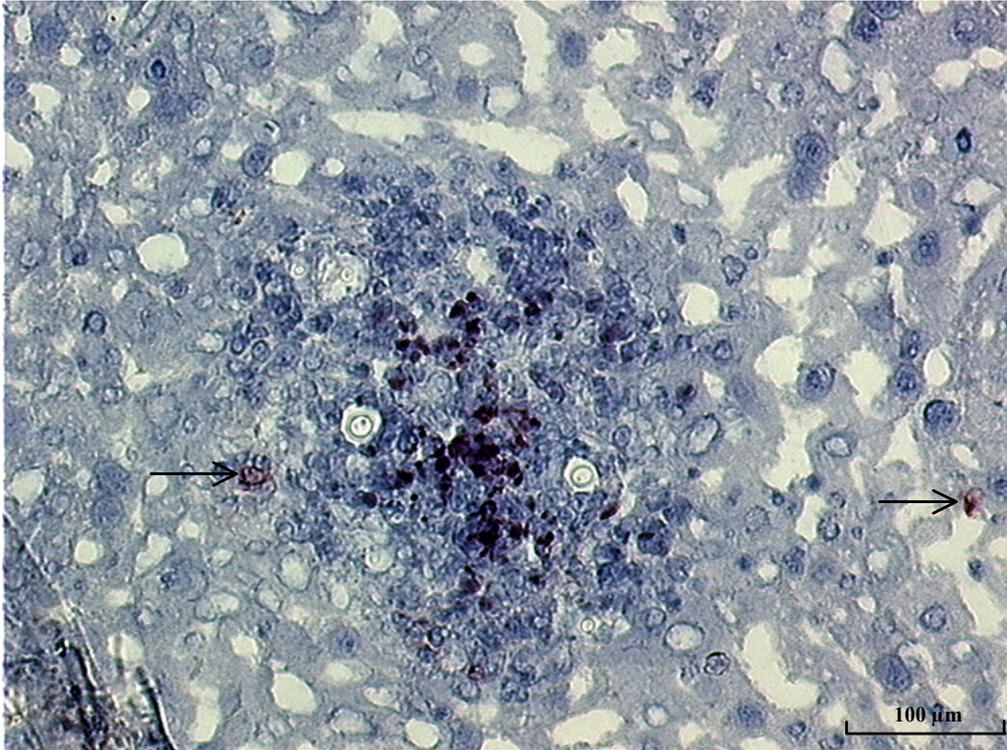


Abbildung 23. Zytotoxische T-Zellen im Lebergewebe einer IL-12p35^{-/-}-Maus 21 Tage nach intraperitonealer Infektion. Die zytotoxische T-Zellen (→) wurden durch einen mAk, der spezifisch für den CD8-Oberflächenmarker ist, nachgewiesen. Nur sehr vereinzelt T-Zellen lagen außerhalb des Granuloms.

4.1.3.3 Zelluläre Zusammensetzung der atypischen Granulome / Gewebsveränderungen bei IL-12p35/p40^{-/-}-Mäusen

Die, wie bei den Wildtyp- und IL-12p35^{-/-}-Mäusen, zahlreich vorkommenden Makrophagen lagen vorwiegend verstreut im gesunden Lebergewebe. Einige wenige waren im Bereich der atypischen Granulome / Gewebsveränderungen zu finden (Abbildung 24). Die chemotaktische Wirkung auf die Makrophagen schien demnach weniger stark ausgeprägt zu sein als bei Wildtyp- und IL-12p35^{-/-}-Mäusen.

T-Helferzellen waren bei den IL-12p35/p40^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp- und IL-12p35^{-/-}-Mäusen im Lebergewebe viele zu finden (Abbildung 25). Man fand sie in der näheren Umgebung der atypischen Granulome / Gewebsveränderungen. Aber auch im Lebergewebe wurden zwischen den veränderten Arealen T-Helferzellen gefunden.

Zytotoxische T-Zellen waren nur wenige zu finden (Abbildung 26). Sie kamen in IL-12p35/p40^{-/-}-Mäusen dennoch häufiger als in Wildtyp- und IL-12p35^{-/-}-Mäusen vor.

Zellen mit nicht blockierbarer endogener Peroxidase fand man in den Bereichen der atypischen Granulome / Gewebsveränderungen (Abbildung 24, 27). Im Bereich mancher Areale waren aber auch keine solchen Zellen zu finden (Abbildung 25). Durchschnittlich lag die Anzahl der Zellen mit nicht blockierbarer endogener Peroxidase bei den IL-12p35/p40^{-/-}-

Mäusen zwischen der Anzahl bei den Wildtyp-Mäusen und der Anzahl bei den IL-12p35^{-/-}-Mäusen.

Auffallend war, dass in der Leber der infizierten IL-12p35/p40^{-/-}-Mäuse mehr T-Helferzellen und zytotoxische T-Zellen zu finden waren als bei den Wildtyp- und IL-12p35^{-/-}-Mäusen.

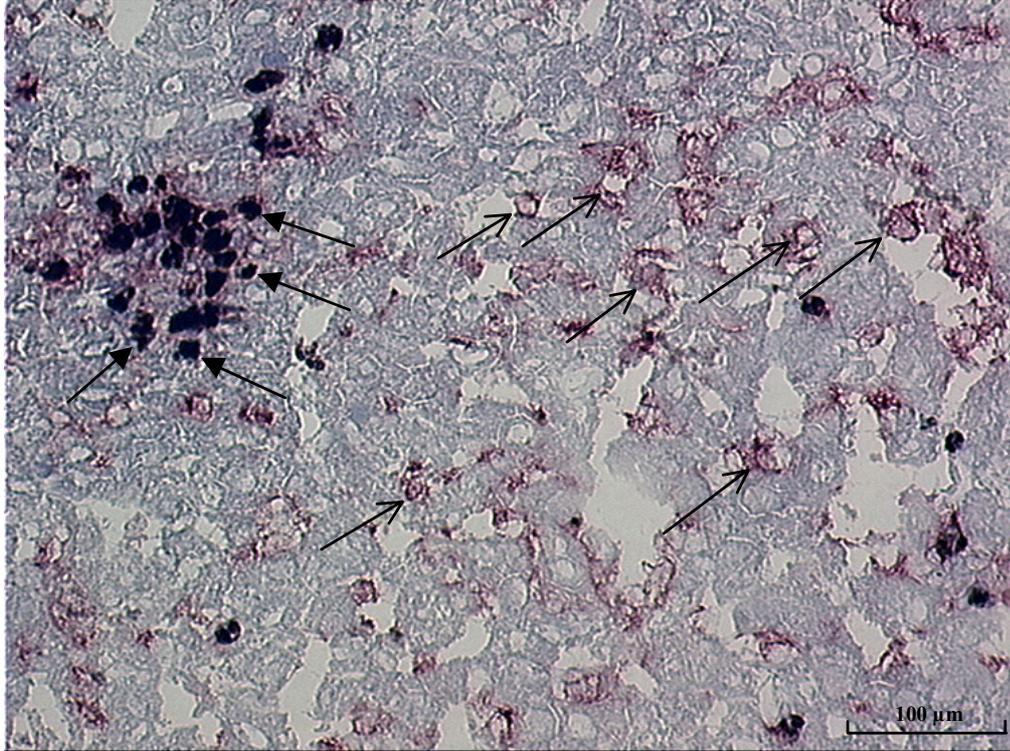


Abbildung 24. Makrophagen im Lebergewebe einer IL-12p35/p40^{-/-}-Maus 21 Tage nach intraperitonealer Infektion. Die Makrophagen (→) durch einen mAk, der spezifisch für den F4/80-Oberflächenmarker ist, nachgewiesen. Links oben ein atypisches Granulom mit Entzündungszellen. Es waren verstärkt Zellen mit nicht blockierbarer endogener Peroxidase (—▶) in diesem Bereich sichtbar.

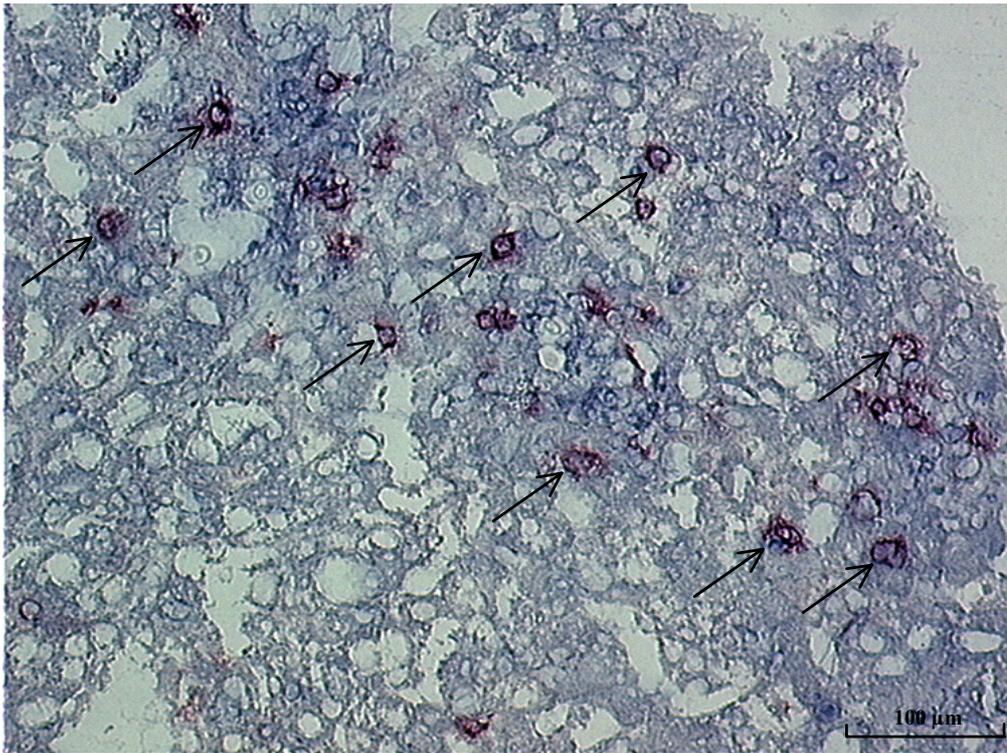


Abbildung 25. T-Helferzellen im Lebergewebe einer IL-12p35/p40^{-/-}-Maus 21 Tage nach intraperitonealer Infektion. Die T-Helferzellen (→) wurden durch einen mAk, der spezifisch für den CD4-Oberflächenmarker ist, nachgewiesen. Es waren viele T-Zellen im Bereich der atypischen Granulome / Gewebsveränderungen und dazwischen sichtbar.

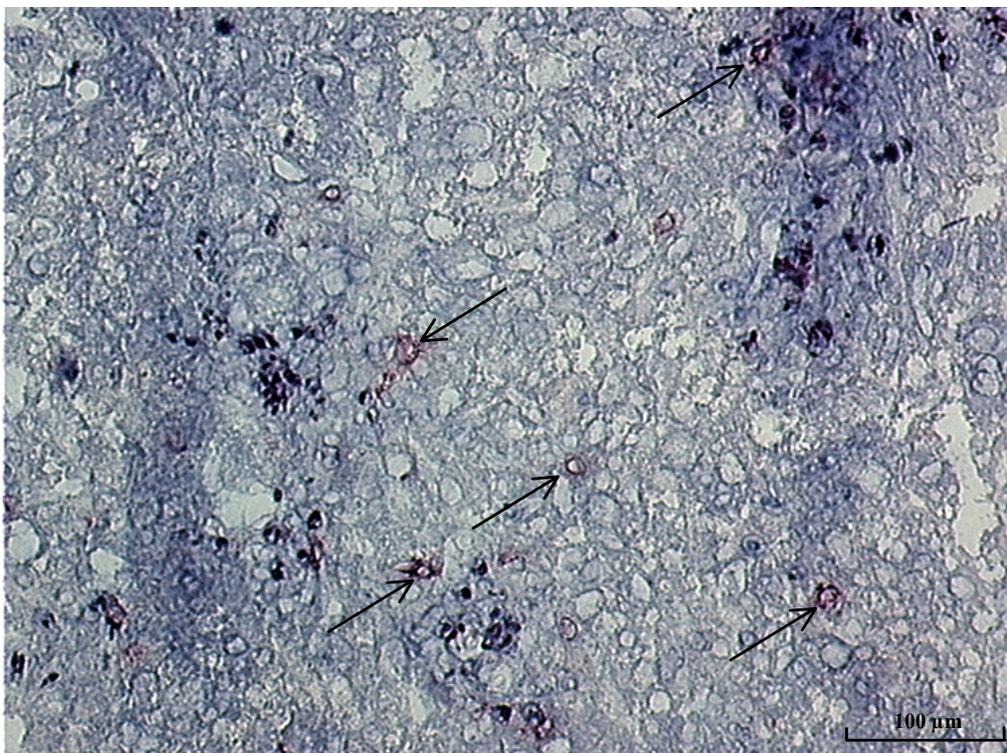


Abbildung 26. Zytotoxische T-Zellen im Lebergewebe einer IL-12p35/p40^{-/-}-Maus 21 Tage nach intraperitonealer Infektion. Die zytotoxische T-Zellen (→) wurden durch einen mAk, der spezifisch für den CD8-Oberflächenmarker ist, nachgewiesen. Zwischen den atypischen Granulome / Gewebsveränderungen waren T-Zellen zu finden.

4.1.4 Bestimmung der Serum-Antikörper

4.1.4.1 Kryptokokken-spezifische Antikörper

Die Bestimmung der Konzentration der Kryptokokken-spezifischen Antikörper wurde mittels einer durchflusszytometrischen Analyse (FACS) durchgeführt, da ein ELISA mit beschichtetem Kryptokokken-Antigen nicht sensitiv genug war. Als Grundlage der FACS-Messung dienten hitzeinaktivierte Kryptokokken. In Vorversuchen hatte sich gezeigt, dass hitzeinaktivierte Kryptokokken ein stärkeres Signal liefern als lebende. Diese wurden mit dem Serum der infizierten Mäuse inkubiert. Die darin enthaltenen freien Kryptokokken-spezifischen Antikörper gingen mit den Kryptokokken eine Bindung ein. Mittels PE-markiertem Sekundärantikörper, der gegen Maus-Immunglobulin gerichtet war, konnte der entstehende Immunkomplex zur Bestimmung der Fluoreszenzintensität markiert werden. Je höher diese Fluoreszenzintensität war, desto mehr freie Antikörper gegen *C. neoformans* waren im Serum vorhanden. Die Einzelwerte der spezifischen Antikörper der Wildtyp-Mäuse und der IL-12p35^{-/-}-Mäuse schwankten innerhalb der Gruppe bis zu einem Faktor von drei (Abbildung 27). Allerdings lagen die Werte auch bis zum dreifachen über dem der nicht infizierten Kontrollgruppen (Daten nicht gezeigt). Die Fluoreszenzintensität bei den IL-12p35/p40^{-/-}-Mäusen war sehr gering und reichte nicht über den Wert der nicht infizierten Kontrollgruppe (naiv). Die Verringerung gegenüber dem Wildtyp war mit $p=0,021$ signifikant.

Dadurch wurde der Einfluss von IL-12p40 sichtbar, das zur Bildung von Kryptokokken-spezifischen Antikörpern notwendig erscheint.

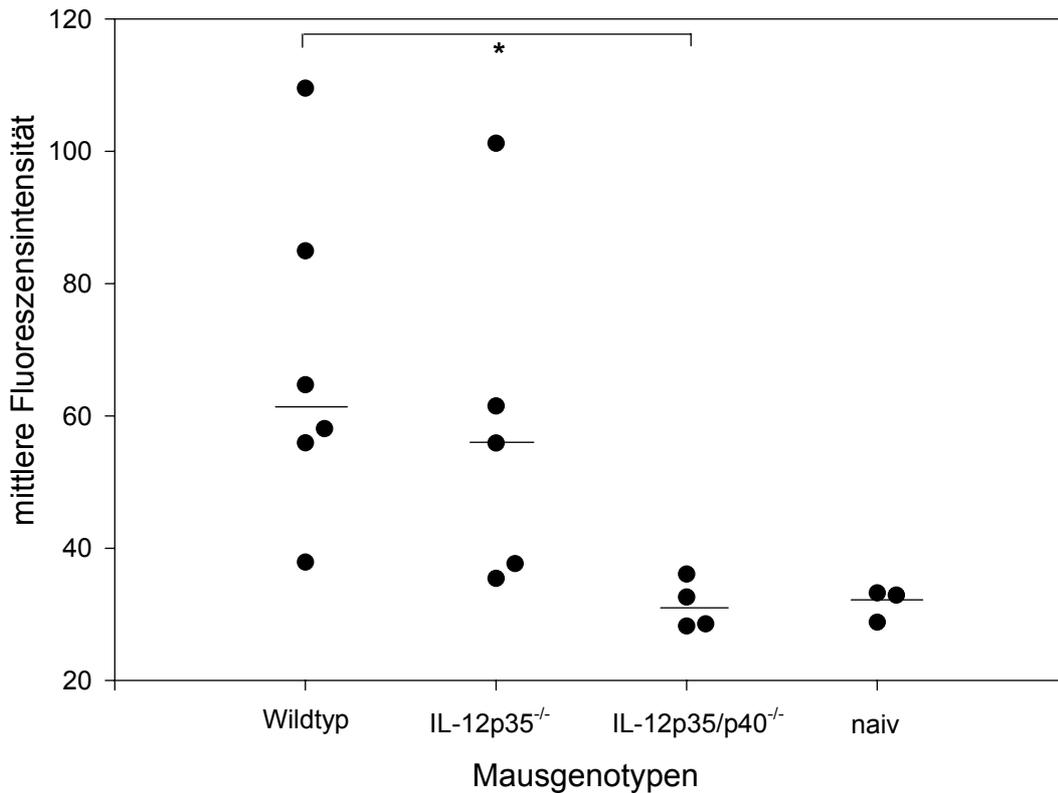


Abbildung 27. Bestimmung der Kryptokokken-spezifischen Antikörper im Serum infizierter Mäuse (Tag 21 *p. i.*) mittels durchflusszytometrischen Analyse. Die IL-12p35/p40^{-/-}-Mäuse sind ohne IL-12p40 nicht in der Lage vergleichbare Mengen an Antikörpern zu bilden. Diese Verringerung ist gegenüber den Wildtyp-Mäusen signifikant ($p=0,021$).

Der Vergleich mit einer Kontrolle aus Kryptokokken und Sekundärantikörper ohne Serum und die Wiederverwendung ein und der selben Instrumenteneinstellungen sollten eine Vergleichbarkeit der einzelnen Daten sichern. Außerdem wurde Serum von naiven Mäusen als Negativkontrolle eingesetzt.

4.1.4.2 Antikörpergesamtgehalt

Mit einem ELISA wurden die Antikörper der Klassen IgM, IgG1, IgG2a und IgE bestimmt. Zu Beginn einer humoralen Immunantwort wird der Immunglobulin-Isotyp IgM gebildet. Er charakterisiert den Beginn einer humoralen Abwehr. Die Bestimmung der IgM-Konzentration ergab bei den Wildtyp-Mäusen Werte zwischen 150 und 400 $\mu\text{g/ml}$, bei den IL-12p35/p40^{-/-}-Mäusen zwischen 200 und 400 $\mu\text{g/ml}$ und bei den IL-12p35^{-/-}-Mäusen zwischen 300 und 500 $\mu\text{g/ml}$. Es fiel dabei eine leichte Erhöhung der IgM-Konzentration bei den IL-12p35^{-/-}-Mäusen im Gegensatz zu den Wildtyp- und IL-12p35/p40^{-/-}-Mäusen auf.

Die beiden IgG-Subtypen IgG2a und IgG1 sind kennzeichnend für eine Th1-Antwort (IgG2a) bzw. eine Th2-Antwort (IgG1).

Bei der Bestimmung der Konzentration von IgG2a fiel auf, dass die IL-12p35^{-/-}-Mäuse nur knapp halb so viele Antikörper produzierten wie die Wildtyp-Mäuse (p=0,008) oder die IL-12p35/p40^{-/-}-Mäuse (p=0,001) (Abbildung 28). Diese Unterschiede waren signifikant. Die Th1-Antwort der IL-12p35^{-/-}-Mäuse schien also weniger ausgeprägt zu sein, als bei den Wildtyp- und IL-12p35/p40^{-/-}-Mäusen.

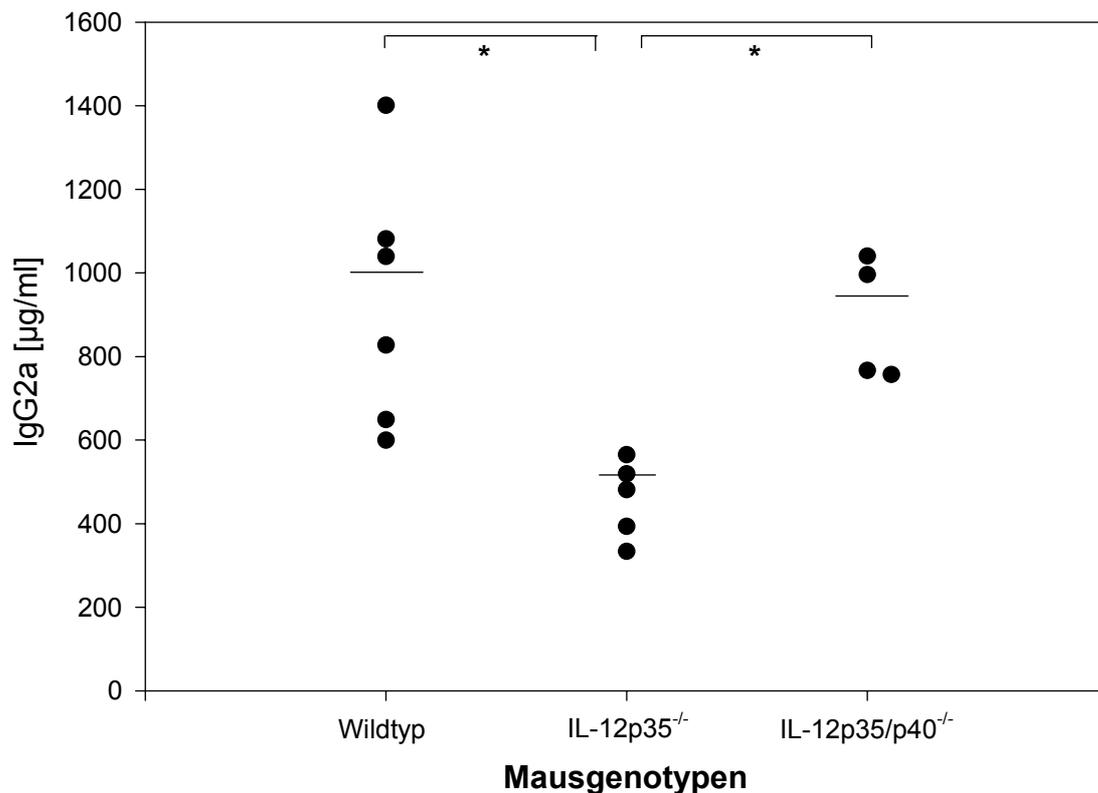


Abbildung 28. Bestimmung des IgG2a-Gesamtgehaltes im Serum 21 Tage nach intraperitonealer Infektion. Die IL-12p35^{-/-}-Mäuse produzierten nur halb soviel IgG2a wie die anderen beiden Mausgenotypen. Diese Verringerung der Produktion war signifikant zu Wildtyp-Mäusen (p=0,008) und zu IL-12p35/p40^{-/-}-Mäusen (p=0,001).

Bei der Bestimmung der Konzentration von IgG1 konnten keine Unterschiede zwischen den Wildtyp-, IL-12p35^{-/-}- und IL-12p35/p40^{-/-}-Mäusen ermittelt werden (Abbildung 29). Allerdings ist die Konzentration an IgG1 bei einigen Wildtyp-Mäusen deutlich höher als bei den IL-12^{-/-}-Mäusen.

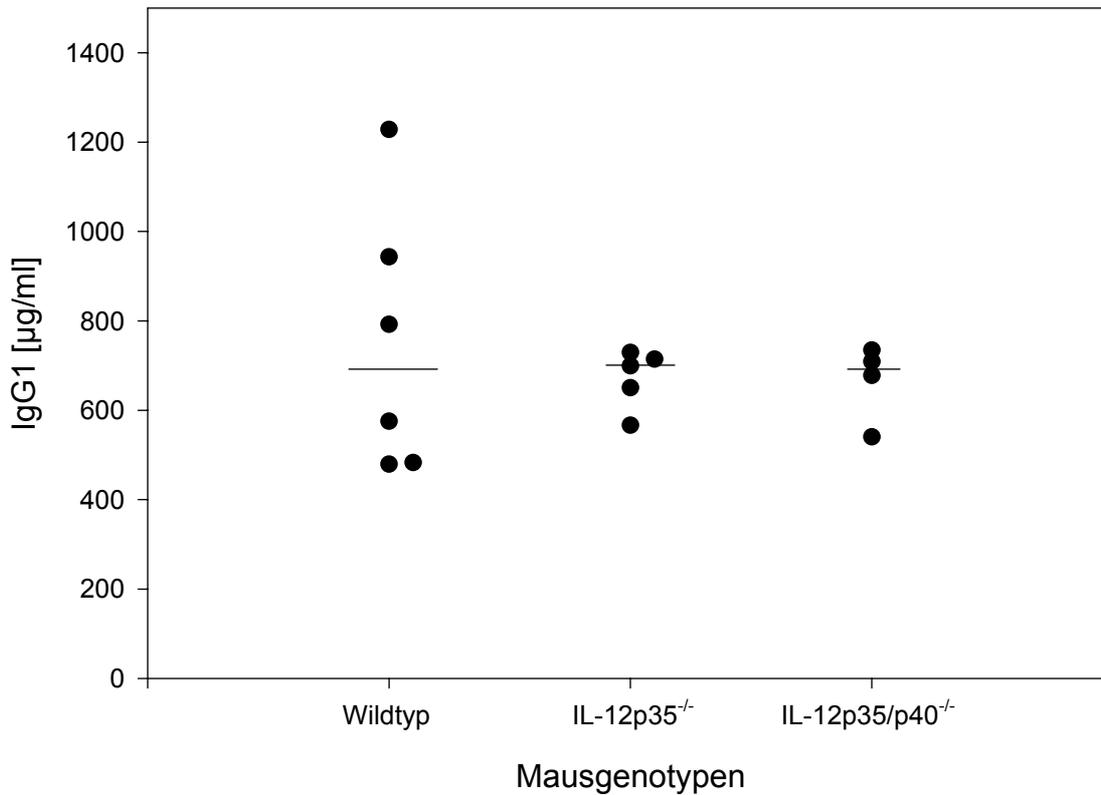


Abbildung 29. Bestimmung des IgG1-Gesamtgehaltes im Serum 21 Tage nach intraperitonealer Infektion. Die Wildtyp-Mäuse schienen etwas mehr an IgG1 im Gegensatz zu den IL-12^{-/-}-Mäusen zu produzieren.

Der Gehalt an IgE wurde bei Wildtyp-, IL-12p35^{-/-}- und IL-12p35/p40^{-/-}-Mäusen bestimmt (Abbildung 30). Bei der Betrachtung der Medianwerte stellt man fest, dass IgE bei den IL-12p35^{-/-}-Mäusen gegenüber den Wildtyp- und IL-12p35/p40^{-/-}-Mäusen nicht signifikant erhöht war.

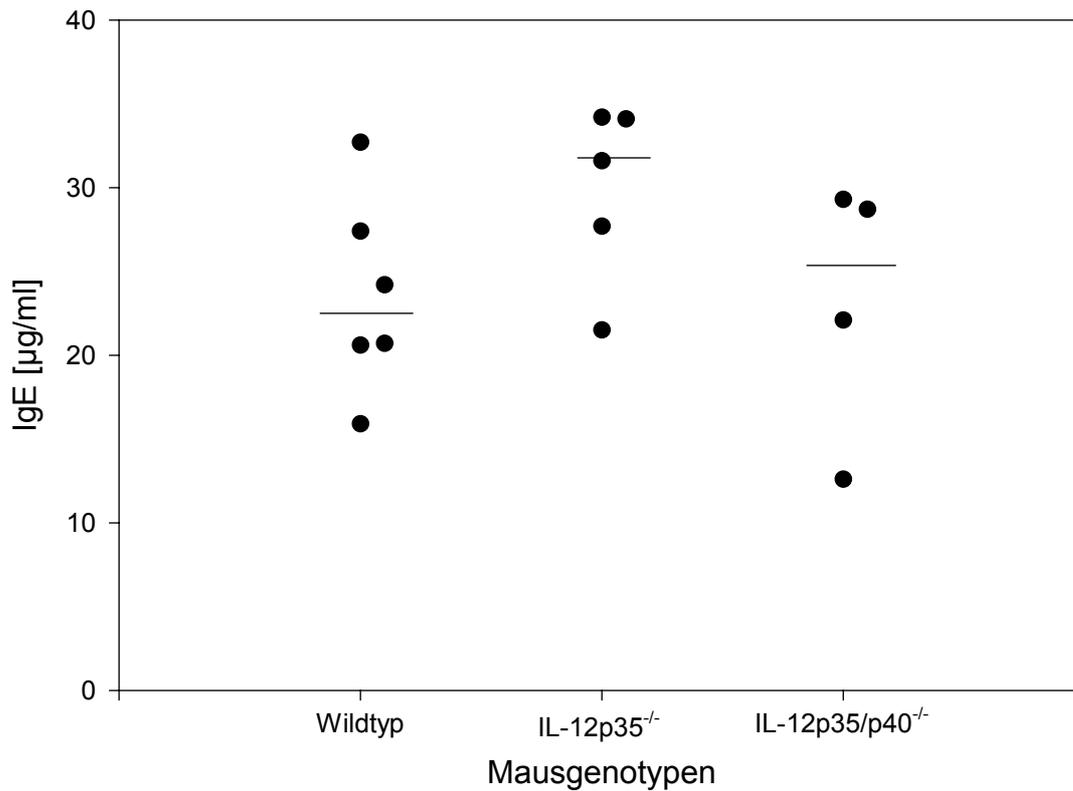


Abbildung 30. Bestimmung des IgE-Gesamtgehaltes im Serum 21 Tage nach intraperitonealer Infektion. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Mausgenotypen.

Bei der Antikörperbestimmung ist das Verhältnis von IgG2a zu IgG1 von Interesse. Es charakterisiert das Verhältnis zwischen der Th1- und der Th2-Antwort (siehe Abbildung 1). Ist dieses Verhältnis größer eins überwiegt eine Antwort vom Typ 1. Bei einem Verhältnis kleiner eins überwiegt eine Antwort vom Typ 2.

Dieses Verhältnis war bei den Wildtyp- und IL-12p35/p40^{-/-}-Mäusen höher als bei den IL-12p35^{-/-}-Mäusen (Abbildung 31). Der Unterschied im Verhältnis zwischen IgG2a und IgG1 war zwischen den Wildtyp-Mäusen und den IL-12p35^{-/-}-Mäusen ($p=0,003$) und zwischen den IL-12p35/p40^{-/-}-Mäusen und den IL-12p35^{-/-}-Mäusen ($p=0,004$) signifikant.

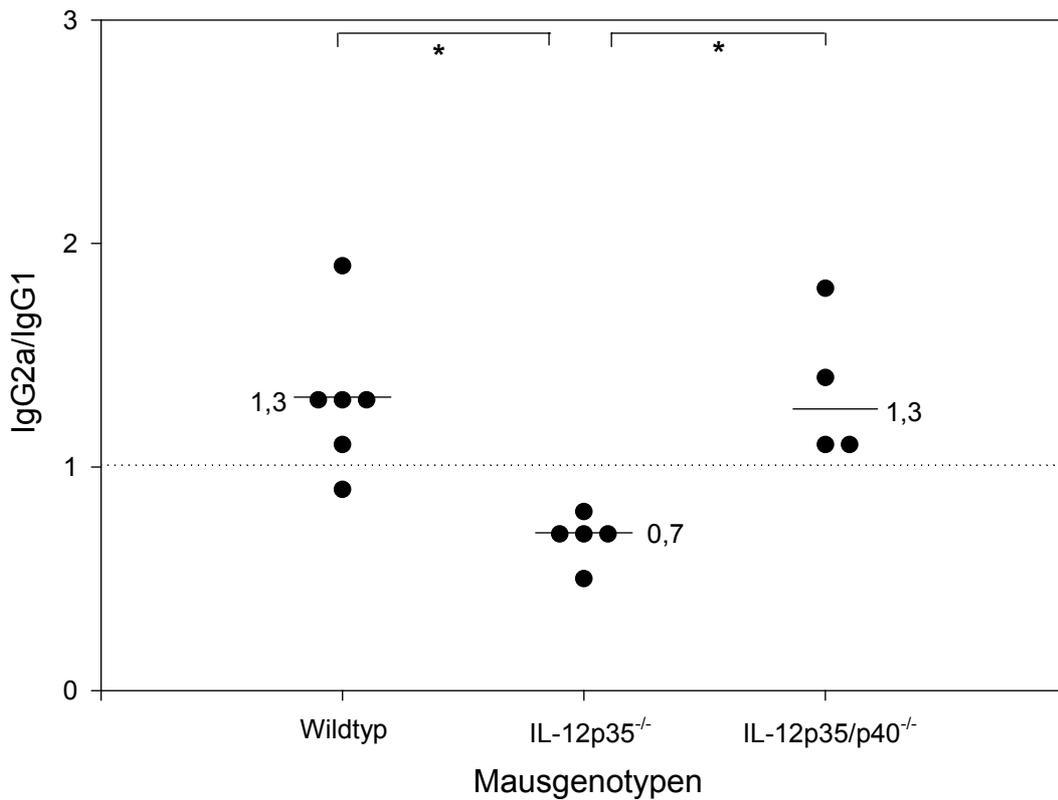


Abbildung 31. Verhältnis der IgG2a-Antikörperkonzentration zu den IgG1-Antikörperkonzentration 21 Tage nach intraperitonealer Infektion. Das Verhältnis war bei den IL-12p35^{-/-}-Mäusen gegenüber den Wildtyp- und IL-12p35/p40^{-/-}-Mäusen signifikant verringert ($p=0,003$, $p=0,004$).

Bei den Wildtyp-Mäusen und den IL-12p35/p40^{-/-}-Mäusen war dieses Verhältnis größer als eins. Bei ihnen überwog eine Immunantwort vom Typ 1. Bei den IL-12p35^{-/-}-Mäusen dagegen war das Verhältnis kleiner als eins. Bei diesen Mäusen überwog also eine Immunantwort vom Typ 2.

4.2 Intranasale Infektion

4.2.1 Etablierung der Infektionsbedingungen

Die intraperitoneale Infektion ist eine Modellinfektion. Die natürliche Infektion mit *C. neoformans* erfolgt über die Atemwege. Um dieser näher zu kommen, wurde zusätzlich eine intranasale Infektion mit *C. neoformans* etabliert. Eine aerogene Infektion war aus technischen Gründen in unserem Institut nicht möglich. Die Infektionsdosis war mit 1×10^3 Kryptokokken je Tier geringer als bei der intraperitonealen Infektion (1×10^4 Kryptokokken je Tier). In einem Vorversuch wurden Mäuse aller drei Genotypen mit Kryptokokken in einer Dosierung von 1×10^2 bis 1×10^5 KBE/Maus intranasal infiziert. Dabei wurde ersichtlich, dass ab einer Dosis von 1×10^3 KBE *C. neoformans* pro Maus ein Plateau in der Keimbelastung der Lunge erreicht wurde. Auch bei höheren Infektionsdosen stieg die Keimbelastung der Lunge nicht über 1×10^7 KBE an.

4.2.2 Organkeimzahlen nach Infektion

Da nicht bekannt war, wie die Mäuse nach intranasaler Infektion reagieren, wurde zu drei verschiedenen Zeitpunkten (21, 35 und 48 Tage *p. i.*) die Keimbelastung der Lunge mit Kryptokokken untersucht (Abbildung 32). Es wurde festgestellt, dass die Keimbelastung bei den Wildtyp-Mäusen vom Tag 21 *p. i.* zum Tag 35 *p. i.* hin anstieg. Zum Tag 48 *p. i.* wurde eine Verringerung der Keimbelastung festgestellt. Auch bei den IL-12^{-/-}-Mäusen stieg die Keimbelastung vom Tag 21 *p. i.* zum Tag 35 *p. i.* hin stark an. Diese hohe Keimbelastung blieb jedoch auch bis zum Tag 48 *p. i.* erhalten. Der Anstieg der Keimbelastung vom Tag 21 *p. i.* zum Tag 35 *p. i.* war bei allen Mausgenotypen signifikant.

Bei näherer Betrachtung der Ergebnisse des Tages 21 fiel auf, dass die Wildtyp-Mäuse durchschnittlich die meisten Kryptokokken in der Lunge aufwiesen und die IL-12p35/p40^{-/-}-Mäuse die wenigsten. Dies ist bemerkenswert, wenn man die Organkeimbelastung nach intraperitonealer Infektion in Betracht zieht (Abbildung 6). Die Fähigkeit des Organismus den Erreger zu eliminieren scheint also vom Infektionsweg abhängig zu sein.

Bei den Wildtyp-Mäusen schien eine effektive Immunantwort stattzufinden, die am Tag 48 *p. i.* zur Reduktion der Keimbelastung in der Lunge führte. Die IL-12^{-/-}-Mäuse waren zu einer Verringerung der Keimbelastung nicht fähig. Sie konnten die Keimbelastung in der Lunge nur auf einem hohen Niveau kontrollieren. Die Immunantwort schien ohne IL-12p75 (IL-12p35^{-/-}-Mäuse) bzw. ohne IL-12p40 (IL-12p35/p40^{-/-}-Mäuse) eingeschränkt zu sein.

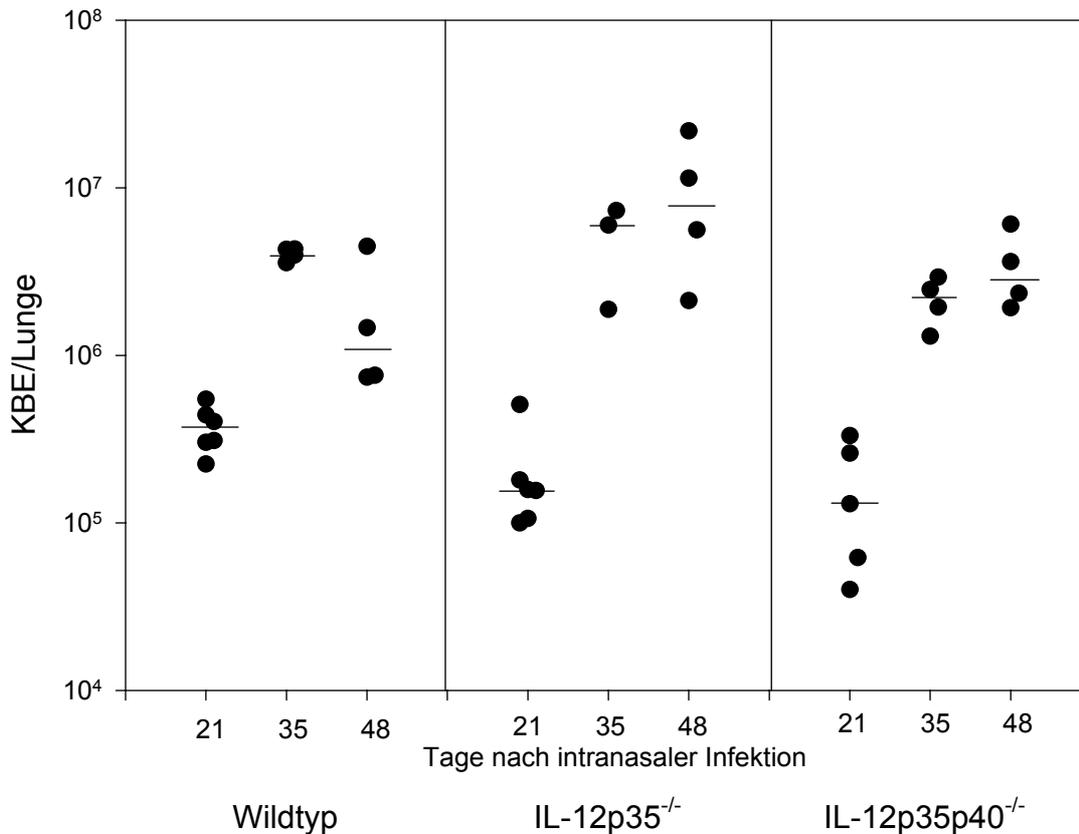


Abbildung 32. Zeitlicher Verlauf der Keimbelastung der Lunge von Wildtyp-, IL-12p35^{-/-}- und IL-12p35/p40^{-/-}-Mäusen 21, 35 und 48 Tage nach intranasaler Infektion (logarithmische Darstellung).

Neben der Lunge wurde auch die Milz und das Gehirn auf Besiedelung mit Kryptokokken untersucht (Tabelle 3).

Am Tag 21 nach intranasaler Infektion war die Ausbreitung der Kryptokokken in die anderen inneren Organe gering. Die Dissemination der Kryptokokken ins Gehirn und in die Milz wurde hierbei besonders für die IL-12^{-/-}-Mäuse sehr deutlich. Dabei war sie im Gehirn bei den IL-12p35^{-/-}-Mäusen am Tag 48 noch um den Faktor 40 größer als bei den IL-12p35/p40^{-/-}-Mäusen. Bei den Wildtyp-Mäusen fand praktisch keine Ausbreitung ins Gehirn statt. Spätere Infektionen mit 100 KBE intranasal haben gezeigt, dass die IL-12p35^{-/-}-Mäuse eher sterben als die Wildtyp-Mäuse und die IL-12p35/p40^{-/-}-Mäuse (Werner, C., Schütze, N. und Alber, G.; unveröffentlicht). Daran kann man die immunpathogene Wirkung von IL-12p40 nach intranasaler Infektion gut erkennen.

	Wildtyp-Mäuse	IL-12p35 ^{-/-} -Mäuse	IL-12p35/p40 ^{-/-} -Mäuse
Milz Tag 21	3	0	6
Milz Tag 35	3	70	17
Milz Tag 48	245	1345	335
Gehirn Tag 21	20	7	0
Gehirn Tag 35	0	75	0
Gehirn Tag 48	0	141600	3570

Tabelle 3. Übersicht über die Organkeimbelastung in Milz und Gehirn nach intranasaler Infektion. Medianwerte. Bei den Wildtyp-Mäusen fand keine Besiedelung des Gehirns statt. Bei den IL-12p35/p40^{-/-}-Mäusen lag sie um den Faktor 40 höher als bei den IL-12p35^{-/-}-Mäusen. (Werte in KBE/Organ)

Die unterschiedliche Dissemination zwischen Wildtyp- und IL-12^{-/-}-Mäusen war höchstwahrscheinlich für den Ausgang der Infektion bestimmend, da die Ansiedlung von *C. neoformans* im Gehirn zu einer Meningoenzephalitis und dadurch zum Tod führt.

4.2.3 Bestimmung des Kryptokokken-Antigens im Serum

Mit dem PREMIER Cryptococcal Antigen ELISA Kit wurde das freie, im Serum zirkulierende Kryptokokken-Antigen 21 Tage nach intranasaler Infektion bestimmt. Es ergab sich dabei für alle Mäuse ein Titer, der geringer als 10 war (Tabelle 4). Nach intraperitonealer Infektion lag dieser mindestens um den Faktor 1000 höher (Abbildung 7). Nur bei einer Wildtyp-Maus, bei der zu diesem Zeitpunkt Erreger in Milz und Gehirn nachgewiesen werden konnten, war überhaupt eine Reaktion im ELISA zu sehen. Aber auch diese Reaktion lag unter der vom Test bestimmten Nachweisgrenze für die verwendete 1:10-Serumverdünnung. Am Tag 35 *p. i.* war bei den Wildtyp-Mäusen und den IL-12p35/p40^{-/-}-Mäusen ein Titer von rund 40 messbar. Bei den IL-12p35^{-/-}-Mäusen lag er mit knapp 80 fast doppelt so hoch. Bis zum Tag 48 *p. i.* stieg der Titer bei den Wildtyp-Mäusen um das zehnfache des Tages 35 *p. i.* an. Bei den IL-12p35/p40^{-/-}-Mäusen stieg der Titer vom Tag 35 *p. i.* zum Tag 48 *p. i.* um das 15fache. Der Anstieg des Titers der IL-12p35^{-/-}-Mäuse vom Tag 35 *p. i.* zum Tag 48 *p. i.* lag knapp darüber. Insgesamt war bei den IL-12p35^{-/-}-Mäusen der höchste Anstieg des Titers über den Zeitraum von 48 Tagen *p. i.* zu verzeichnen.

	Wildtyp-Mäuse	IL-12p35 ^{-/-} - Mäuse	IL-12p35/p40 ^{-/-} - Mäuse
Tag 21	< 1:10	< 1:10	< 1:10
Tag 35	1:43	1:76	1:39
Tag 48	1:429	1:1406	1:661

Tabelle 4. Medianwerte der Kryptokokken-Antigen-Titer im Serum nach intranasaler Infektion. Die Werte errechnen sich aus jeweils sechs Mäusen am Tag 21 und vier Mäusen an den Tagen 35 und 48. Erst zum Tag 48 *p. i.* waren vergleichbare Werte mit der intraperitonealen Infektion messbar. (Werte sind Verdünnungsstufen bei denen das Signal noch positiv war)

4.2.4 Charakterisierung der Entzündungsreaktion

4.2.4.1 Charakterisierung der Entzündungsreaktion an HE-Schnitten

Bei den Wildtyp-Mäusen bildeten sich 35 Tage nach intranasaler Infektion mit *C. neoformans* stark verdichtete Regionen in der Lunge aus (Abbildung 33). Diese atypischen Granulome bestanden aus Kryptokokken und eingeströmten Entzündungszellen und schienen gleichmäßig im Gewebe verteilt zu sein. Eine geordnete Struktur war in vielen Fällen nicht zu erkennen.

Bei den IL-12p35^{-/-}-Mäusen fanden sich ebenfalls diese atypischen Granulome (Abbildung 34). Hier war der Anteil der Kryptokokken in den pathologisch veränderten Arealen höher als bei den Wildtyp-Mäusen, obwohl die absolute Anzahl an Kryptokokken, die durch Ausplattieren von Lungenhomogenat bestimmt wurde, bei den Wildtyp-Mäusen so groß wie bei den IL-12p35^{-/-}-Mäusen war. Die Bereiche, in denen viele Entzündungszellen vorkommen, erscheinen dichter als bei den Wildtyp-Mäusen.

Die IL-12p35/p40^{-/-}-Mäuse bildeten solche atypischen Granulome im Lungengewebe nur in geringem Maße aus. Bei ihnen konzentrierte sich die Reaktion des Gewebes auf den Bereich der Bronchien (Abbildung 35). Hier fand sich in verstärktem Maße eine Aktivierung des BALT.

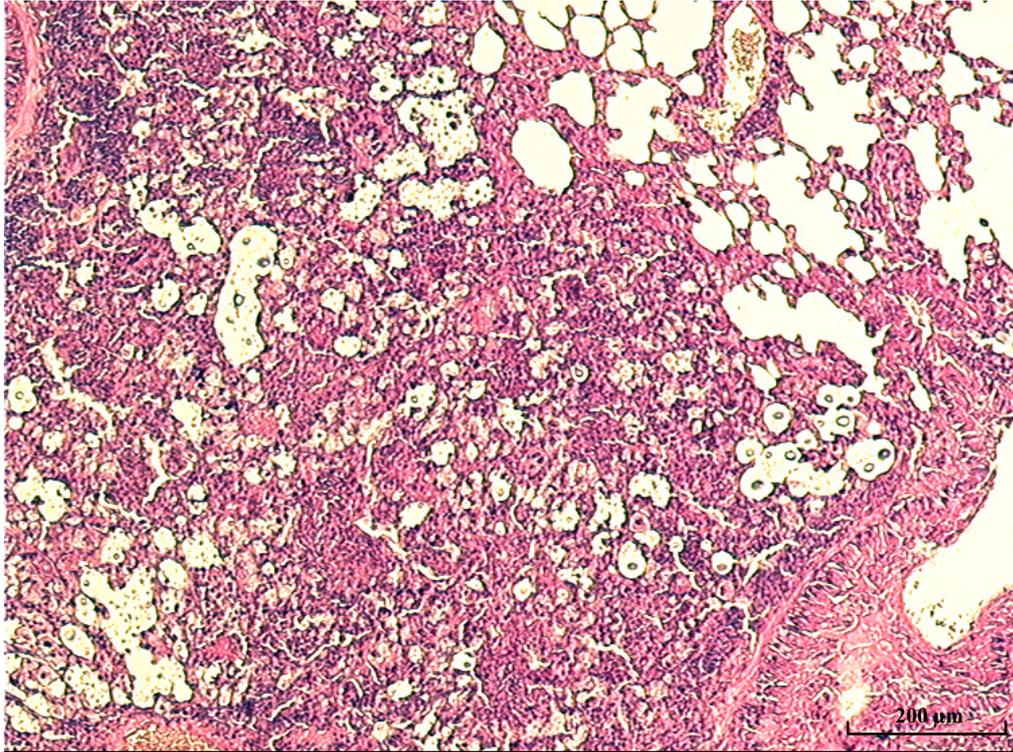


Abbildung 33. Lunge einer Wildtyp-Maus 35 Tage nach intranasaler Infektion. HE-Färbung eines atypischen Granuloms mit Kryptokokken und Entzündungszellen.

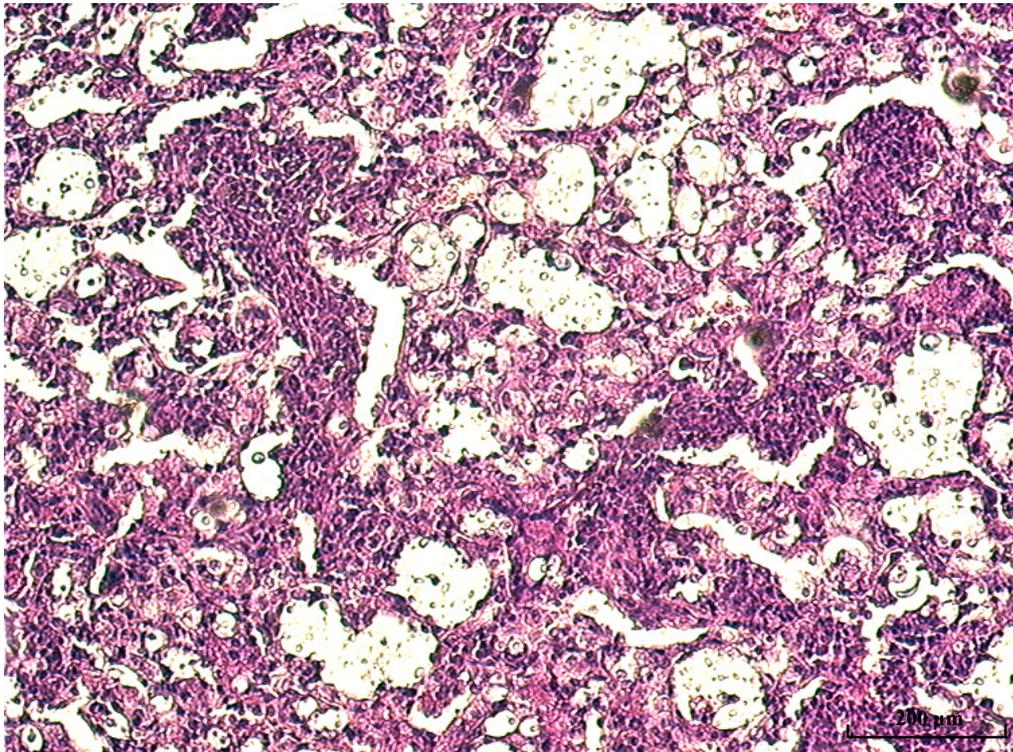


Abbildung 34. Lunge einer IL-12p35^{-/-}-Maus 35 Tage nach intranasaler Infektion. HE-Färbung eines atypischen Granuloms mit Kryptokokken und Entzündungszellen.

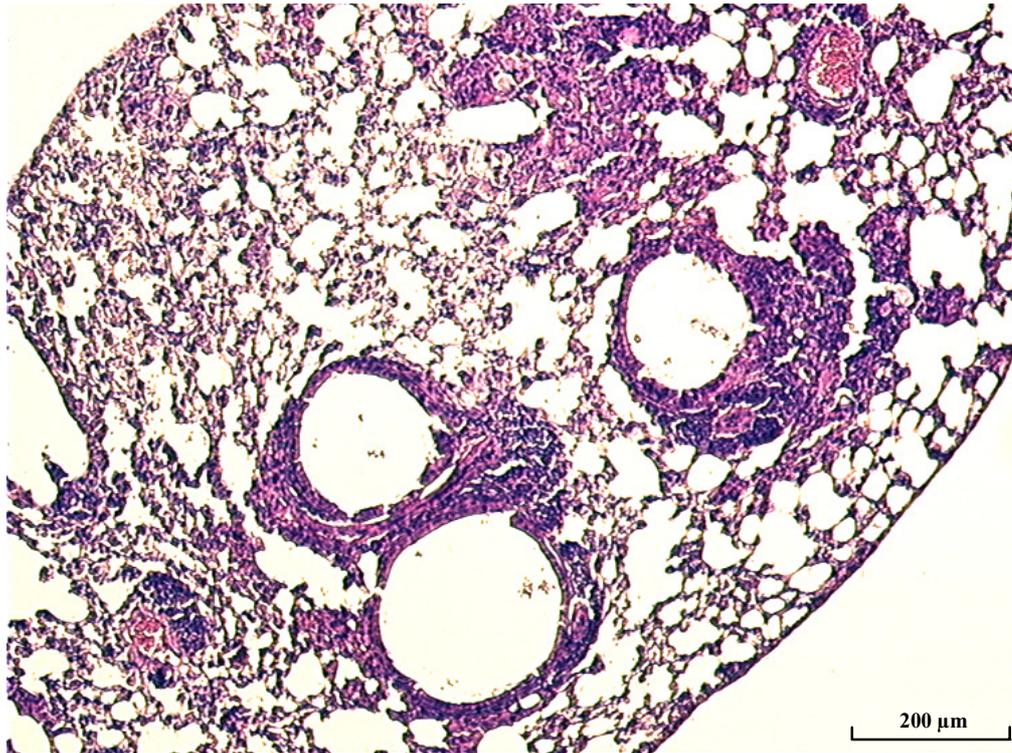


Abbildung 35. Lunge einer IL-12p35/p40^{-/-}-Maus 35 Tage nach intranasaler Infektion. HE-Färbung mit Verdichtungen im peribronchialen Gewebe durch Entzündungszellen, die auf eine Aktivierung des BALT hinweist.

48 Tage nach intranasaler Infektion bildeten sich bei den Wildtyp-Mäusen Areale aus, die an riesige atypische Granulome erinnerten (Abbildung 36). Im Zentrum fanden sich Kryptokokken und zersetztes, unstrukturiertes Lungengewebe. Das Ganze wurde durch einen Wall aus Entzündungszellen nach außen hin abgegrenzt.

Bei den IL-12p35^{-/-}-Mäusen waren ähnliche atypische Granulome zu finden (Abbildung 37). Auch bei ihnen wurde zersetztes Lungengewebe mit Kryptokokken gefunden, welches von Entzündungszellen nach außen hin abgegrenzt war. Schon mit bloßem Auge konnten diese Areale in den histologischen Schnitten gesehen werden und nahmen teilweise deutlich mehr als die Hälfte der Schnittfläche ein (Daten nicht gezeigt).

Auch bei den IL-12p35/p40^{-/-}-Mäusen wurden atypische Granulome aus unstrukturiertem Lungengewebe und Kryptokokken gefunden (Abbildung 38). Allerdings waren sie zum umliegenden Gewebe hin nur schlecht durch Entzündungszellen abgegrenzt, so dass die Grenzen zwischen gesundem und pathologisch verändertem Gewebe verwischten.

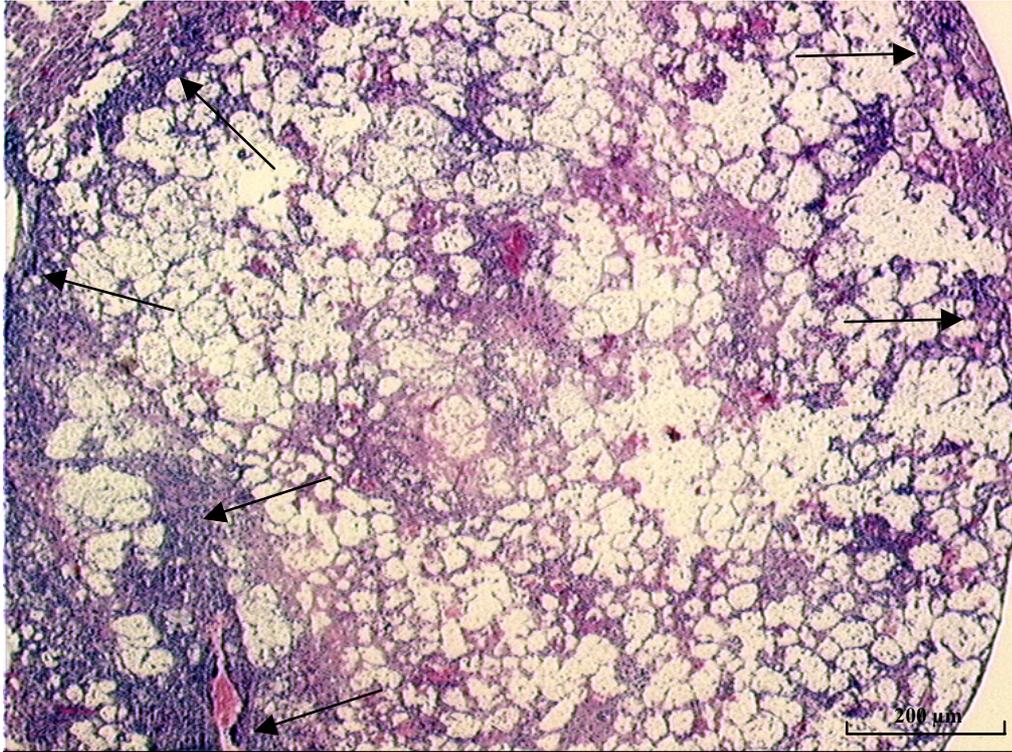


Abbildung 36. Lunge einer Wildtyp-Maus 48 Tage nach intranasaler Infektion. HE-Färbung eines atypischen Granuloms aus Kryptokokken und zersetztem Gewebe, mit einem Wall aus Entzündungszellen (—▶).

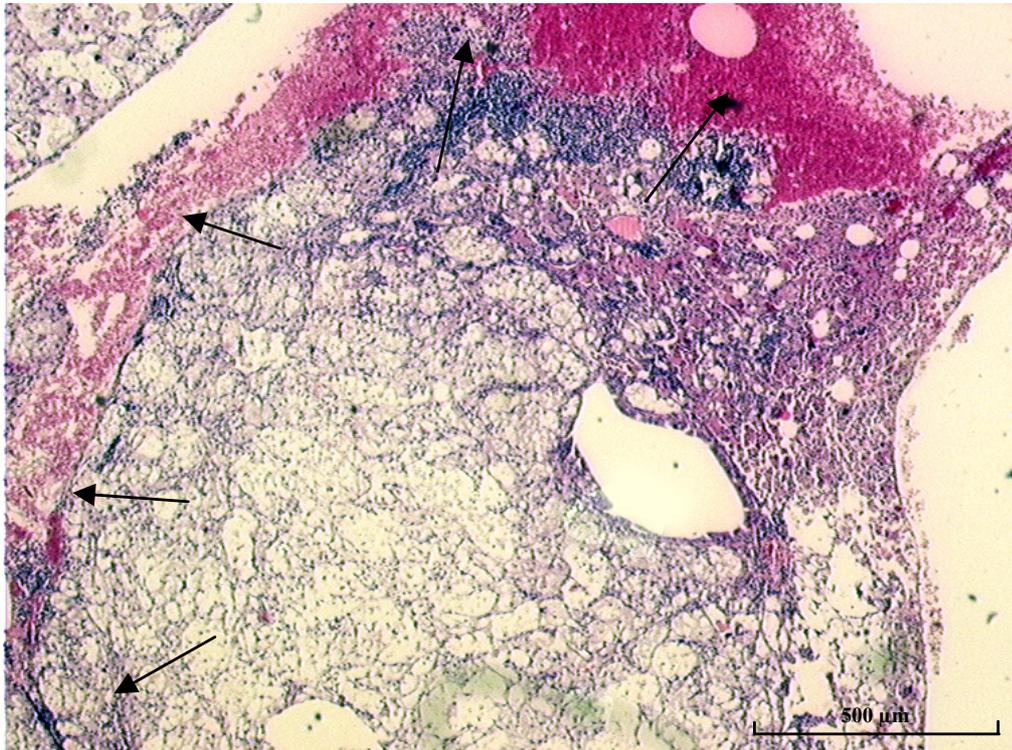


Abbildung 37. Lunge einer IL-12p35^{-/-}-Maus 48 Tage nach intranasaler Infektion. HE-Färbung eines atypischen Granuloms aus Kryptokokken und zersetztem Gewebe, mit einem Wall aus Entzündungszellen (—▶).

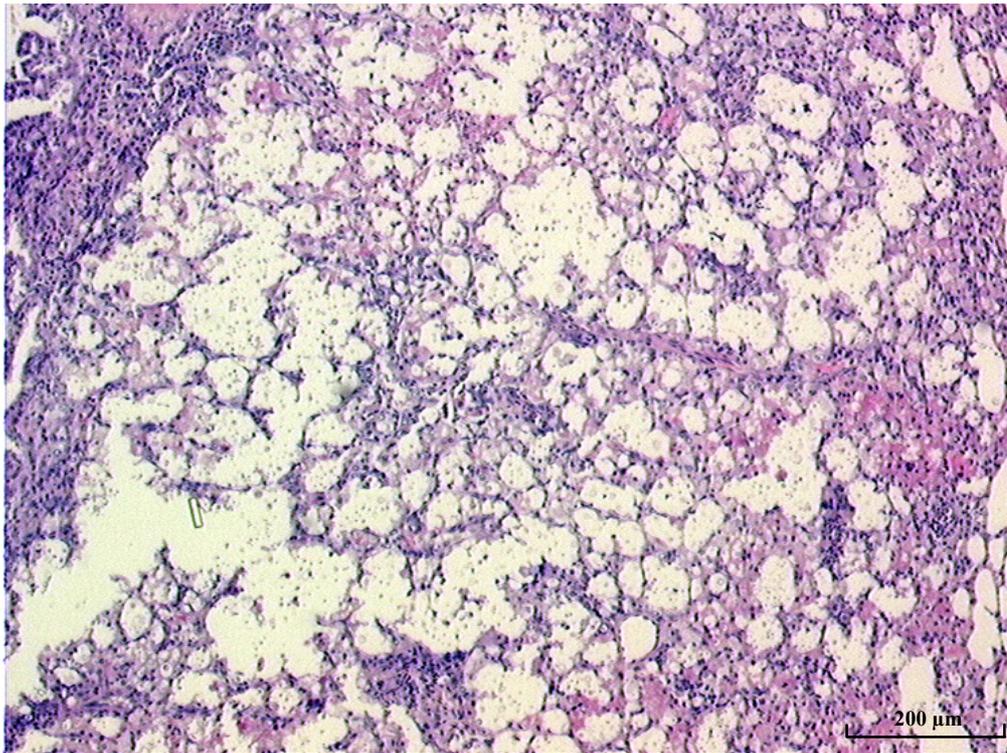


Abbildung 38. Lunge einer IL-12p35/p40^{-/-}-Maus 48 Tage nach intranasaler Infektion. HE-Färbung. Das Konglomerat aus Kryptokokken und eingeschmolzenem Lungengewebe wird hier nur oben links von einer mononukleären Demarkation begrenzt.

4.2.4.2 Immunhistochemische Untersuchungen zur zellulären Zusammensetzung der pathologisch veränderten Areale

4.2.4.2.1 Zelluläre Zusammensetzung der pathologisch veränderten Areale bei Wildtyp-Mäusen

Im Lungengewebe der Wildtyp-Mäuse waren nur wenige T-Helferzellen zu finden. Lokalisiert waren sie in der Peripherie mancher kleiner Bronchien (Abbildung 39).

Zytotoxische T-Zellen waren im Lungengewebe von Wildtyp-Mäusen nicht zu finden (Abbildung 40).

In den verdichteten, pathologisch veränderten Arealen waren viele Zellen mit nicht blockierbarer endogener Peroxidase zu finden (Abbildung 40). Zwischen diesen dunkelbraun gefärbten Zellen waren die blau eingefärbten Kryptokokken mit ihren Kapseln sehr gut zu sehen.

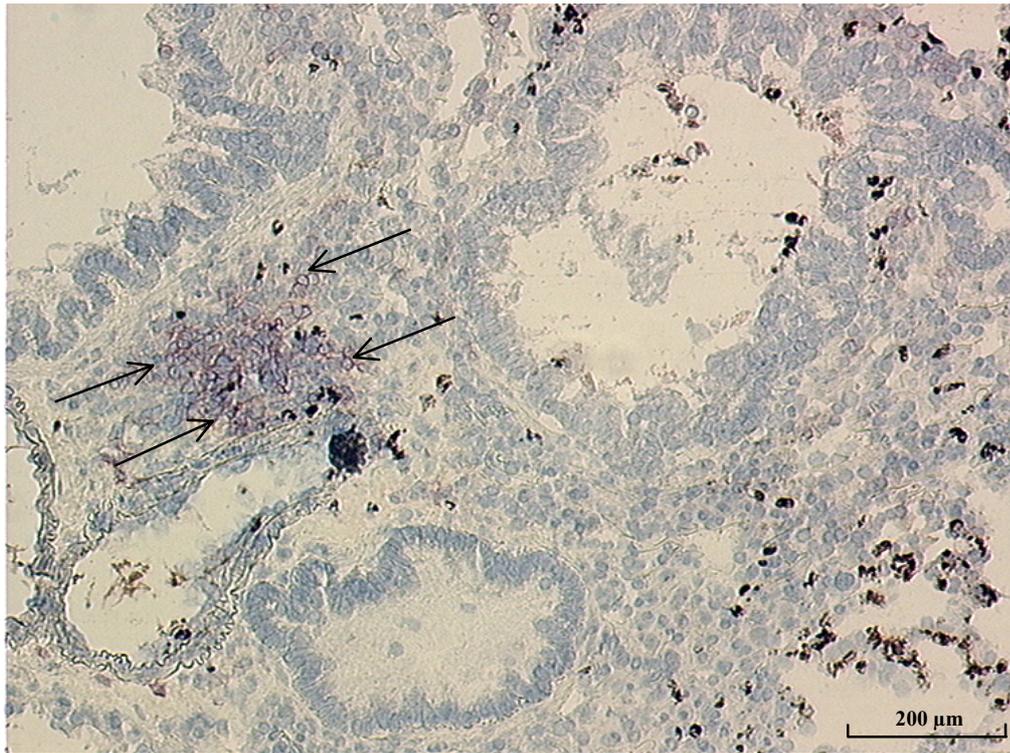


Abbildung 39. T-Helferzellen in der Lunge einer Wildtyp-Maus 21 Tage nach intranasaler Infektion. Die T-Helferzellen (→) wurden durch einen mAk, der spezifisch für den CD4-Oberflächenmarker ist, nachgewiesen. Es sind nur wenige CD4⁺-T-Zellen im Gewebe zu finden.

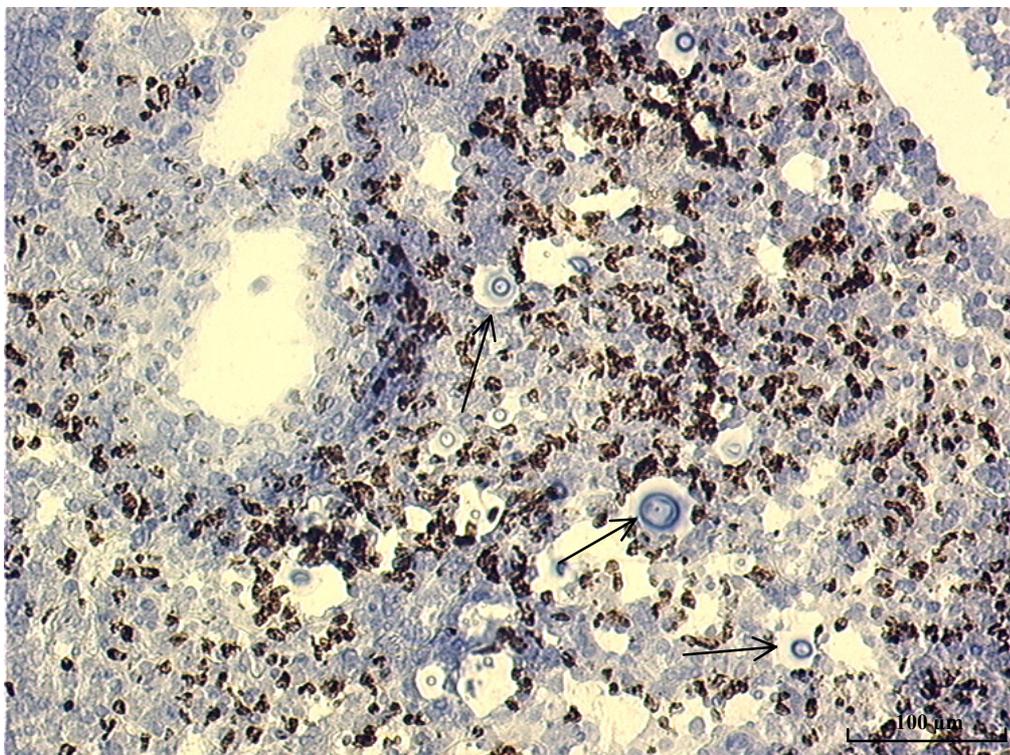


Abbildung 40. Färbung zytotoxischer T-Zellen in der Lunge einer Wildtyp-Maus 21 Tage nach intranasaler Infektion. Die zytotoxischen T-Zellen wurden durch einen mAk, der spezifisch für den CD8-Oberflächenmarker ist, nachgewiesen. Es waren keine CD8⁺-T-Zellen in der Lunge zu finden. Die dunkelbraun gefärbten Zellen waren Zellen mit nicht blockierbarer endogener Peroxidase. Es waren einige Kryptokokken (→) gut im Gewebe zu erkennen.

4.2.4.2.2 Zelluläre Zusammensetzung der pathologisch veränderten Areale bei *IL-12p35^{-/-}*-Mäusen

Im Lungengewebe infizierter *IL-12p35^{-/-}*-Mäuse waren mehr T-Helferzellen zu finden als bei Wildtyp-Mäusen (Abbildung 41). Auch hier waren diese am Rand der kleinen Bronchien lokalisiert.

Zytotoxische T-Zellen waren auch bei *IL-12p35^{-/-}*-Mäusen nicht zu finden (nicht dargestellt). Die Zellen mit nicht blockbarer endogener Peroxidase waren stark vertreten und im gesamten Bereich der atypischen Granulome zu finden (Abbildung 41).

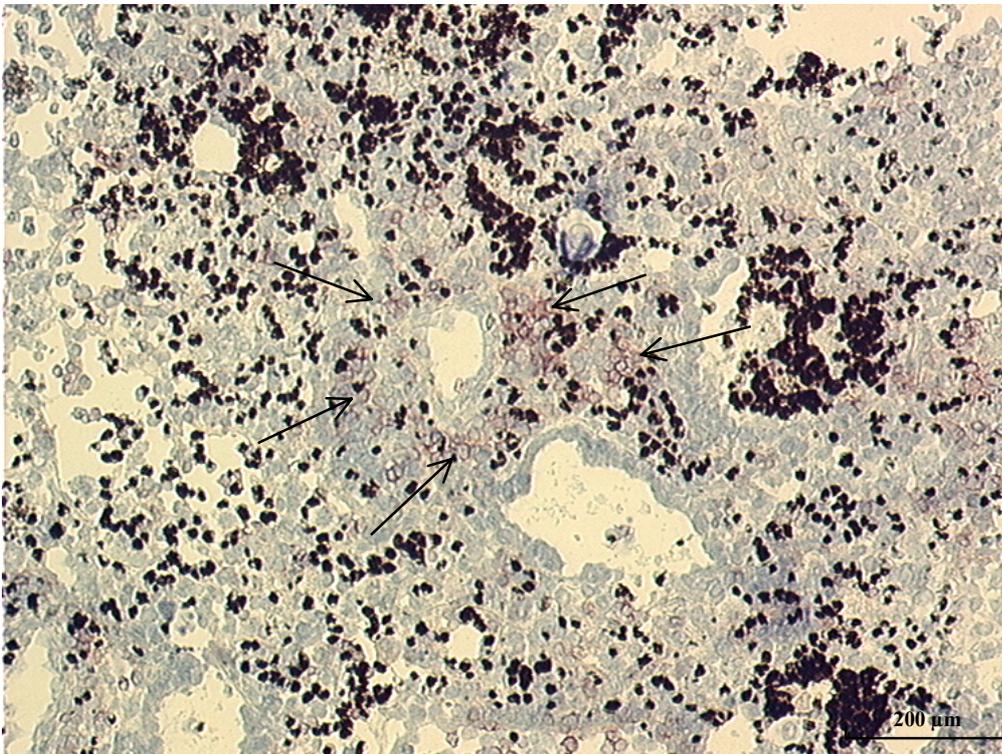


Abbildung 41. T-Helferzellen in der Lunge einer *IL-12p35^{-/-}*-Maus 21 Tage nach intranasaler Infektion. Die T-Helferzellen (→) wurden durch einen mAk, der spezifisch für den CD4-Oberflächenmarker ist, nachgewiesen. Es waren CD4⁺-T-Zellen um Bronchiolae herum zu finden.

4.2.4.2.3 Zelluläre Zusammensetzung der pathologisch veränderten Areale bei *IL-12p35/p40^{-/-}*-Mäusen

Im Lungengewebe infizierter *IL-12p35/p40^{-/-}*-Mäuse waren mehr T-Helferzellen zu finden als bei Wildtyp-Mäusen (Abbildung 42). Auch hier fand man diese am Rand fast aller kleinen Bronchien.

Zytotoxische T-Zellen waren auch bei *IL-12p35/p40^{-/-}*-Mäusen nicht zu finden (nicht gezeigt).

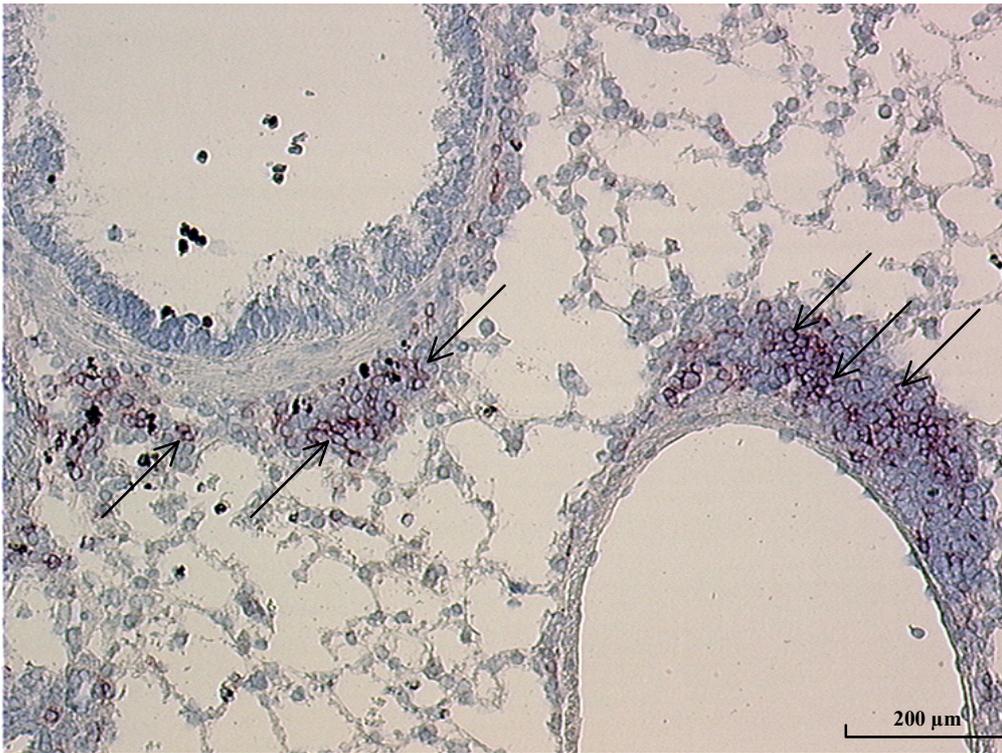


Abbildung 42. T-Helferzellen in der Lunge einer IL-12p35/p40^{-/-}-Maus 21 Tage nach intranasaler Infektion. Die T-Helferzellen (→) wurden durch einen mAk, der spezifisch für den CD4-Oberflächenmarker ist, nachgewiesen. Um fast alle kleinen Bronchien herum waren CD4⁺-T-Zellen zu finden.

Zytotoxische T-Zellen waren nach intranasaler Infektion weder in Wildtyp- noch in IL-12^{-/-}-Mäusen zu finden.

Die Anzahl der T-Helferzellen war im Lungengewebe der IL-12^{-/-}-Mäuse höher als im Gewebe der Wildtyp-Mäuse.

4.2.5 Bestimmung der Serum-Antikörper

4.2.5.1 Kryptokokken-spezifische Antikörper

Der Gehalt an Kryptokokken-spezifischen Antikörpern im Serum von Mäusen 21 und 35 Tage nach intranasaler Infektion wurde mittels einer durchflusszytometrischen Analyse bestimmt (Abbildung 43). Es kam dabei dasselbe Protokoll wie nach intraperitonealer Infektion zum Einsatz. Die Antikörper-Konzentration steigt vom Tag 21 zum Tag 35 *p. i.* hin bei den Wildtyp- und den IL-12p35^{-/-}-Mäusen an. Bei den IL-12p35/p40^{-/-}-Mäusen war nur eine geringe Erhöhung festzustellen. Am Tag 35 *p. i.* wurde auch eine Erhöhung der Antikörper-Konzentration der IL-12p35^{-/-}-Mäuse gegenüber den Wildtyp- und IL-12p35/p40^{-/-}-Mäusen sichtbar. Am Tag 48 *p. i.* fielen alle Werte ab. Bei den IL-12p35^{-/-}-Mäusen waren kaum Werte messbar, die deutlich über denen von naiven Tieren lagen. Signifikante

Unterschiede konnten aber nirgends festgestellt werden, da die Streuung der einzelnen Werte zu groß war.

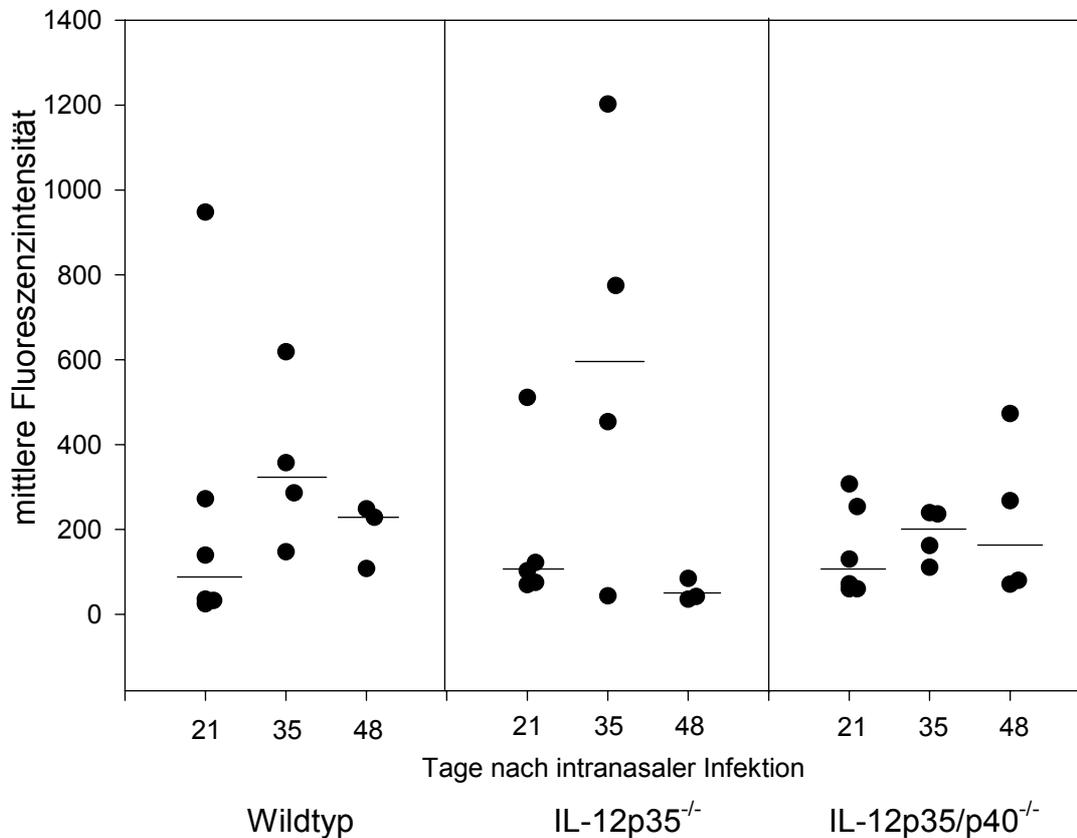


Abbildung 43. Bestimmung der Kryptokokken-spezifischen Antikörper im Serum infizierter Mäuse mittels durchflusszytometrischer Analyse 21, 35 und 48 Tage nach intranasaler Infektion. Serum von naiven Mäusen ergab eine mittlere Fluoreszenzintensität von 30.

Das interessanteste Bild boten die IL-12p35^{-/-}-Mäuse. Bei ihnen war sowohl der Anstieg der Fluoreszenz am Tag 35 *p. i.* als auch deren Abfall am Tag 48 *p. i.* am stärksten. Ob dieser Einbruch der humoralen Abwehr mitverantwortlich für den schlechten Allgemeinzustand der Mäuse war, kann nur spekuliert werden.

Vergleicht man die mittleren relativen Fluoreszenzintensitäten der FACS-Analyse 21 Tage nach intraperitonealer Infektion (Absatz 4.1.4.1) mit der nach intranasaler Infektion werden sehr deutliche Unterschiede sichtbar (Tabelle 5). So waren alle aus intranasal infizierten Mäusen stammenden Messwerte höher als solche aus intraperitoneal infizierten Tieren.

	intraperitoneale Infektion	intranasale Infektion
Wildtyp-Mäuse	63	264
IL-12p35 ^{-/-} - Mäuse	54	510
IL-12p35/p40 ^{-/-} - Mäuse	31	296

Tabelle 5. Unterschiede in der mittleren relativen Fluoreszenz nach durchflusszytometrischer Analyse Kryptokokken-spezifischer Antikörper in Abhängigkeit vom Infektionsweg 21 Tage *p. i.* Dargestellt sind Mittelwerte aus den einzelnen Gruppen.

Die intranasale Infektion, die der natürlichen aerogenen Infektion sehr nahe kam, induzierte eine 4-10-mal höhere Antikörperantwort gegen *C. neoformans* als die direkte Applikation der Erreger in die Bauchhöhle.

4.2.5.2 Antikörpergesamtgehalt

Wie bei der intraperitonealen Infektion wurde auch bei der intranasalen im Serum der Mäuse der Antikörpergesamtgehalt der Isotypen IgG1 und IgG2a mittels ELISA bestimmt.

Bei den Wildtyp-Mäusen blieb der Gehalt an IgG2a vom Tag 21 *p. i.* zum Tag 35 *p. i.* gleich. Zum Tag 48 *p. i.* hin stieg der Wert um das 1,5fache an (Abbildung 44).

Bei den IL-12p35^{-/-}-Mäusen stieg der Gehalt an IgG2a vom Tag 21 *p. i.* zum Tag 35 *p. i.* an. Zum Tag 48 *p. i.* hin war aber keine weitere Erhöhung sichtbar. Über den ganzen Zeitraum betrachtet lagen die Werte an IgG2a bei den IL-12p35^{-/-}-Mäusen im selben Bereich wie bei den Wildtyp-Mäusen. Allerdings stieg der Gehalt an IgG2a bei den IL-12p35^{-/-}-Mäusen eher an.

Bei den IL-12p35/p40^{-/-}-Mäusen stieg der Gehalt an IgG2a vom Tag 21 *p. i.* zum Tag 35 *p. i.* hin um das Doppelte an. Auch vom Tag 35 *p. i.* zum Tag 48 *p. i.* hin war eine weitere Steigerung sichtbar. Der Gehalt an IgG2a war bei den IL-12p35/p40^{-/-}-Mäusen am Tag 48 *p. i.* doppelt so hoch wie bei den Wildtyp- und den IL-12p35^{-/-}-Mäusen. Ein signifikanter Unterschied bestand zwischen den Wildtyp- und den IL-12p35/p40^{-/-}-Mäusen am Tag 35 *p. i.* ($p=0,022$).

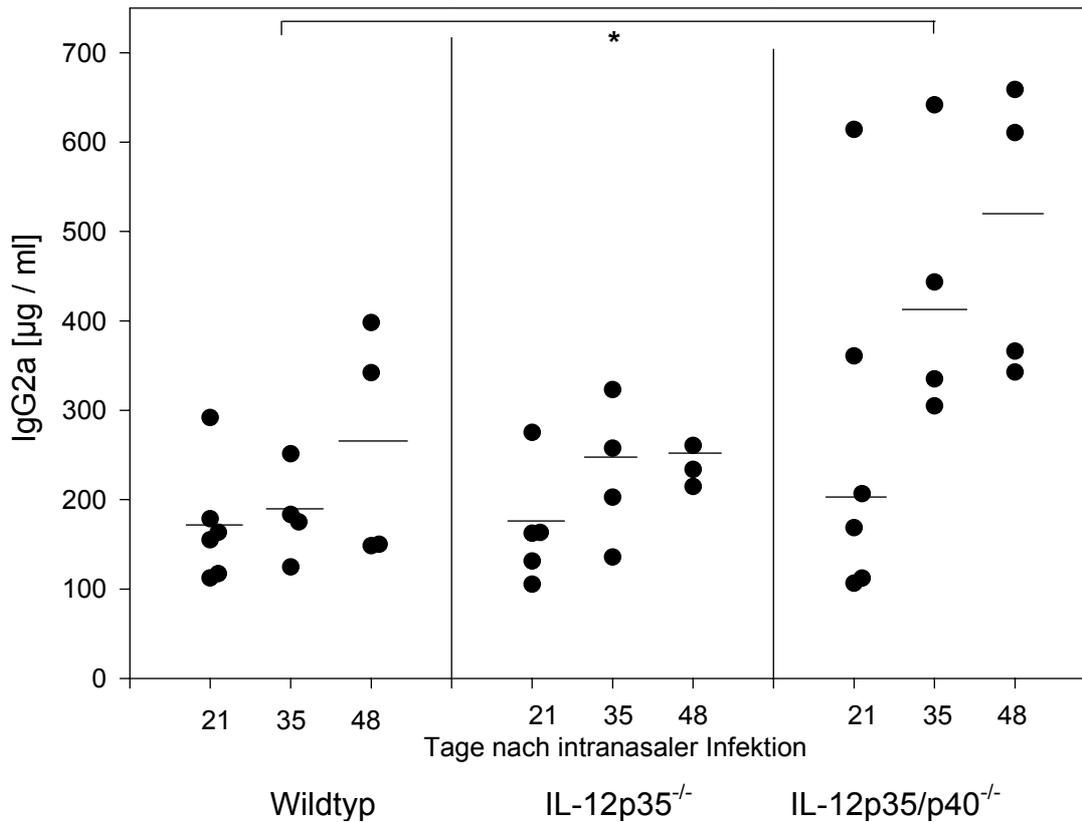


Abbildung 44. Bestimmung des IgG2a-Gesamtgehaltes im Serum mittels ELISA nach intranasaler Infektion. Die IL-12p35/p40^{-/-}-Mäuse produzierten nach intranasaler Infektion die größten Mengen an IgG2a. Der Unterschied zwischen den Wildtyp-Mäusen und den IL-12p35/p40^{-/-}-Mäusen am Tag 35 *p. i.* war signifikant ($p=0,022$).

Der Gehalt an IgG1 stieg bei den Wildtyp-Mäusen vom Tag 21 *p. i.* zum Tag 35 *p. i.* hin geringfügig an (Abbildung 45). Vom Tag 35 *p. i.* zum Tag 48 *p. i.* hin stieg er sprunghaft um das 2,5fache an.

Bei den IL-12p35^{-/-}-Mäusen war der Gehalt an IgG1 am Tag 21 *p. i.* etwas geringer als bei den Wildtyp-Mäusen. Zum Tag 35 *p. i.* hin stieg er aber um fast das Doppelte an und lag bei den IL-12p35^{-/-}-Mäusen höher als bei den Wildtyp-Mäusen. Vom Tag 35 *p. i.* zum Tag 48 *p. i.* hin stieg auch bei den IL-12p35^{-/-}-Mäusen der Gehalt an IgG1 um das 2,5fache an und lag im Bereich der Wildtyp-Mäuse.

Bei den IL-12p35/p40^{-/-}-Mäusen lag der Gehalt an IgG1 am Tag 21 *p. i.* etwas höher als bei den Wildtyp-Mäusen. Zum Tag 35 *p. i.* hin stieg der Wert um ein Drittel an und lag zu diesem Zeitpunkt im Bereich der IL-12p35^{-/-}-Mäuse. Vom Tag 35 *p. i.* zum Tag 48 *p. i.* hin stieg der Gehalt an IgG1 noch einmal um ein Viertel an. Es war also am Tag 48 *p. i.* bei den IL-12p35/p40^{-/-}-Mäusen nur halb soviel des IgG1 vorhanden wie bei den Wildtyp- und

IL-12p35^{-/-}-Mäusen. Der Unterschied zu den Wildtyp-Mäusen ($p=0,003$) und zu den IL-12p35^{-/-}-Mäusen ($p=0,007$) war signifikant.

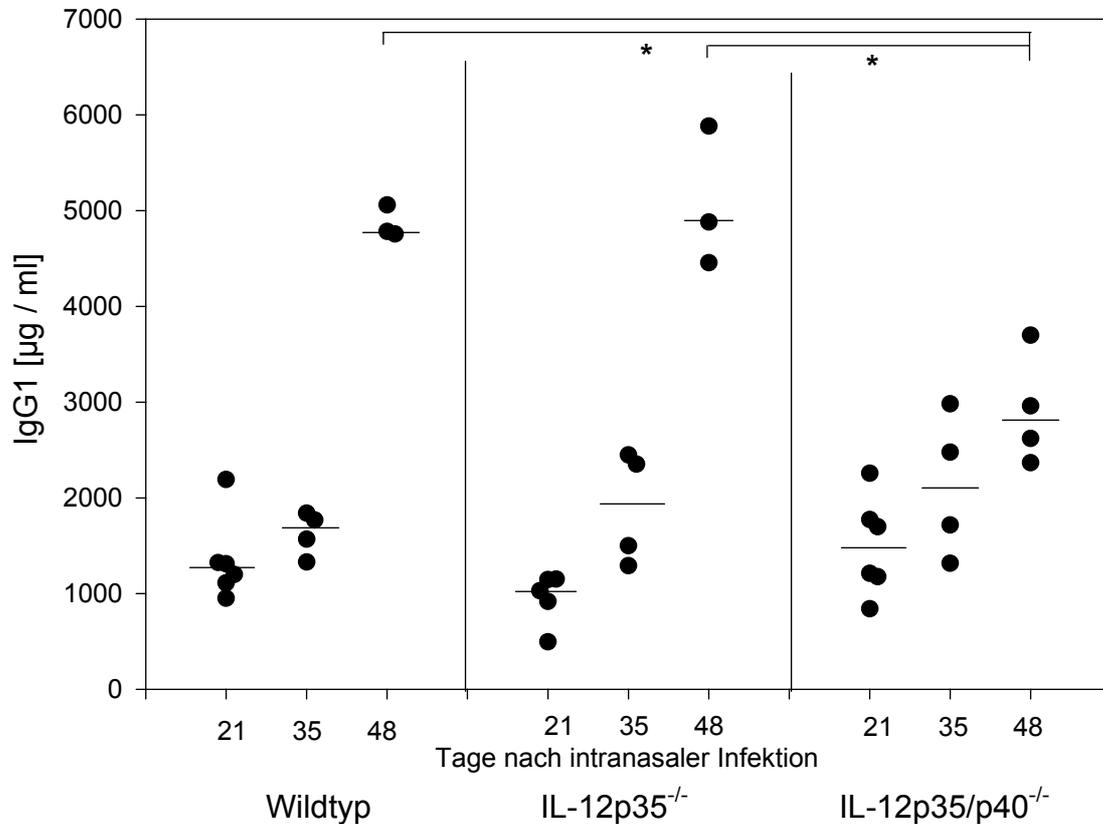


Abbildung 45. Bestimmung des IgG1-Gesamtgehaltes im Serum mittels ELISA nach intranasaler Infektion. Die IL-12p35/p40^{-/-}-Mäuse produzierten nach intranasaler Infektion die geringsten Mengen an IgG1. Der Unterschied zwischen den IL-12p35/p40^{-/-}-Mäusen und den Wildtyp- und den IL-12p35^{-/-}-Mäusen am Tag 48 *p. i.* war signifikant ($p \leq 0,007$).

Das Fehlen von IL-12p40 bei den IL-12p35/p40^{-/-}-Mäusen hatte nach intranasaler Infektion anscheinend die Ausbildung einer verstärkten Th1-Antwort zur Folge. Dies ist erstaunlich, da diesen Mäusen auch IL-12p75 fehlte, welches solch eine Antwort induzierte.

5 Diskussion

Um die Bedeutung von IL-12p75 und IL-12p40 auf die Abwehr einer Infektion mit *C. neoformans* zu klären, wurde die Immunantwort von Wildtyp-Mäusen, IL-12p35^{-/-}-Mäusen und IL-12p35/p40^{-/-}-Mäusen auf die Infektion verglichen. Dabei wurden sowohl die Kontrolle der Erregerkonzentration in den Organen, histologische Veränderungen und Antikörperkonzentrationen berücksichtigt. Abbildung 46 gibt einen Überblick über die nachfolgend diskutierten Punkte.

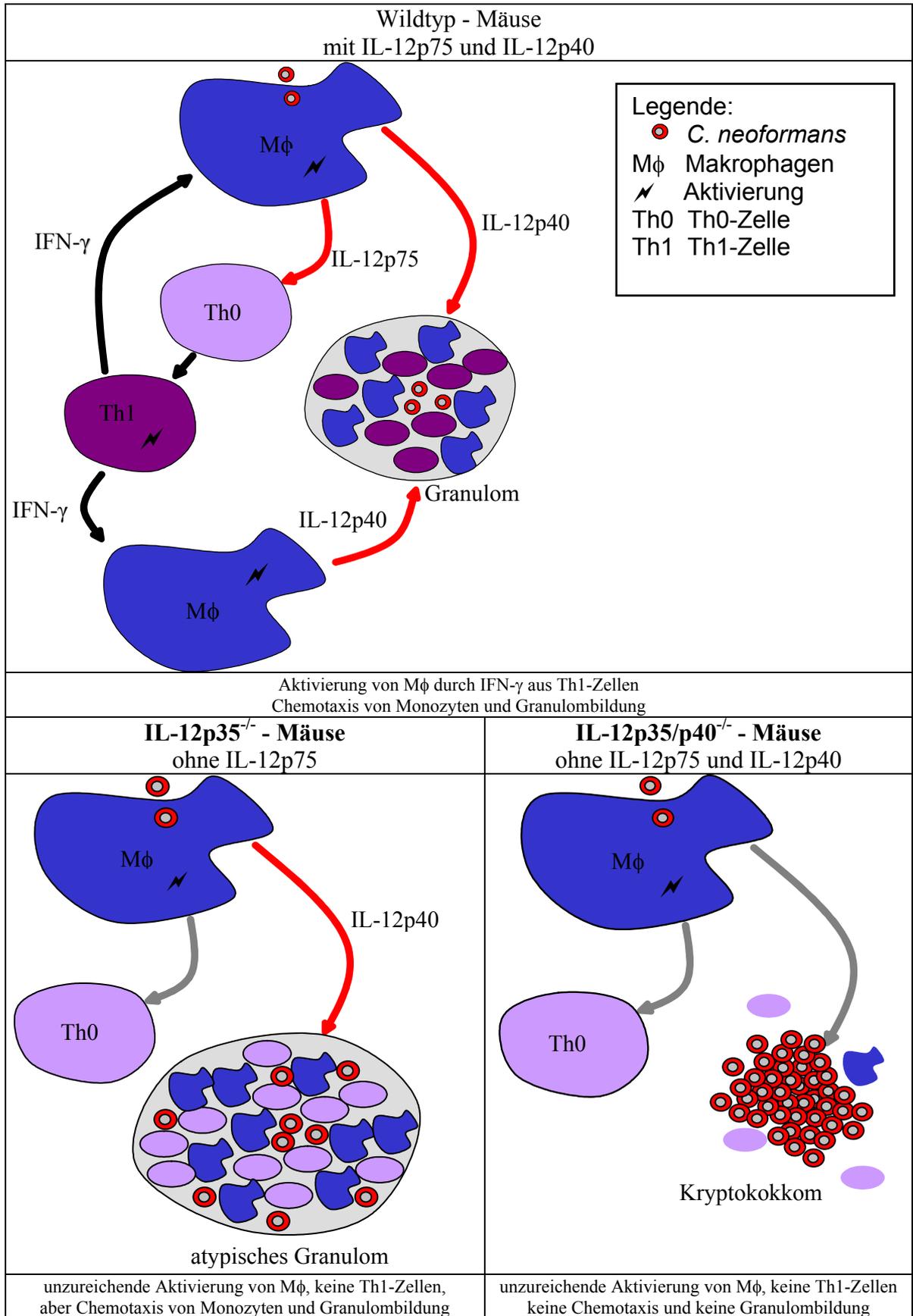


Abbildung 46. Zusammenfassende Darstellung der Bedeutung von IL-12p75 und IL-12p40 in der Abwehr von *C. neoformans*.

5.1 Aktivität von IL-12p75 in der Abwehr von *C. neoformans*

Um die Wirkung von IL-12p75 bei der Abwehr einer Infektion mit *C. neoformans* zu erkennen, musste die Immunreaktion von Wildtyp-Mäusen mit der von IL-12p35^{-/-}-Mäusen verglichen werden.

Die geringere Keimbelastung der Organe bei den Wildtyp-Mäusen zeigte, dass IL-12p75 für die Kontrolle der Infektion notwendig war. Es waren nicht nur weniger lebende Kryptokokken in den Organen zu finden, sondern auch weniger Kryptokokken-Antigen im Serum der Wildtyp-Mäuse nachweisbar. Dies lässt Rückschlüsse auf die Dissemination und die Bildung von Immunkomplexen zu. Bei einer Dissemination der Kryptokokken über das Gefäßsystem in die Organe ist Antigen im Serum nachweisbar. Der höhere Titer der IL-12p35^{-/-}-Mäuse spricht also für eine stärkere Verteilung des Erregers im Organismus. IL-12p75 kann diese Dissemination eindämmen. Auch die längere Überlebensdauer der Wildtyp-Mäuse zeigt den protektiven Einfluss von IL-12p75 auf die Infektion mit *C. neoformans*. DECKEN et al. (1998) zeigten sogar, dass bei einer Langzeitbehandlung mit IL-12p75 Wildtyp-Mäuse bis zum Abbruch des Experimentes am Tag 180 nicht starben. Damit überlebten sie etwa dreimal so lang wie unbehandelte Mäuse. Auch die Keimbelastung und die damit verbundene Entzündungsreaktion ging bei Behandlung mit IL-12p75 zurück. ZHANG et al. (1997) zeigten, dass murine Peritoneal-Exsudat-Zellen erst nach Stimulation mit IL-12 und IL-18 durch die Bildung von IFN- γ und NO in der Lage sind, Kryptokokken abzutöten. HOAG et al. (1997) haben gezeigt, dass resistente C.B-17-Mäuse, welche nach intranasaler Infektion mit *C. neoformans* den Erreger vollständig eliminierten, durch Behandlung mit Anti-IL-12-Antikörpern und Anti-IFN- γ -Antikörpern nicht mehr zu dieser sterilen Elimination fähig waren. Nur unbehandelt, d. h. mit einem funktionellem IL-12/IFN- γ -System, bildeten sie eine protektive Th1-Antwort aus. Nach Neutralisierung von IL-12 und IFN- γ bildete sich eine Th2-Antwort aus, die nicht protektiv war.

Bei der Betrachtung der Entzündungsreaktion im Gewebe waren bei den Wildtyp-Mäusen typische Granulome sichtbar (DECKEN et al. 1998). Auch bei den IL-12p35^{-/-}-Mäusen bildeten sich in den meisten Fällen Granulome rund um die Kryptokokken aus. Allerdings waren diese Granulome wesentlich größer und häufiger als bei den Wildtyp-Mäusen. Das lässt darauf schließen, dass die Entzündungsreaktion der IL-12p35^{-/-}-Mäuse bei der Immunabwehr von *C. neoformans* nicht so effektiv war wie bei den Wildtyp-Mäusen. Die Effektivität der Entzündungszellen bei der Erregerbeseitigung scheint ohne IL-12p75 nicht gegeben zu sein. Daher konnten sich einerseits mehr Kryptokokken zusammenlagern und

andererseits wurden mehr Entzündungszellen für die Kontrolle der Infektion benötigt. Die Granulome wurden dadurch größer. Auch hier zeigte sich, dass IL-12p75 für die Kontrolle der Infektion notwendig war. Die IL-12p35^{-/-}-Mäuse waren demnach noch zur Ausbildung von Granulomen fähig. Daraus lässt sich schließen, dass IL-12p75 für die Chemotaxis von Entzündungszellen und damit zur Granulombildung nicht notwendig ist. Wie unter 5.2 ausgeführt, ist für die Granulombildung IL-12p40 erforderlich.

Die Lokalisierung der Makrophagen um die Kryptokokken herum als Bestandteil des Granuloms war bei den Wildtyp-Mäusen sehr deutlich. Es gab also wirksame chemotaktische Faktoren, welche die Makrophagen zum Entzündungsherd lockten. Ohne IL-12p75 war diese Chemotaxis noch vorhanden, aber nicht so stark ausgeprägt. Es waren zwar Makrophagen direkt in den pathologisch veränderten Arealen, aber deren Anzahl war bei den IL-12p35^{-/-}-Mäusen teilweise geringer als bei den Wildtyp-Mäusen. Bei den T-Helferzellen ging die Anzahl ohne IL-12p75 deutlich zurück. Dies konnte entweder eine Folge von verminderter Chemotaxis sein oder eine direkte Auswirkung der defekten Differenzierung von naiven T-Helferzellen zu Th1-Zellen. Das gehäufte Auftreten von Zellen mit nicht blockierbarer endogener Peroxidase bei den IL-12p35^{-/-}-Mäusen könnte ein Hinweis auf die geschwächte Abwehr sein. Da die „normalen“ Mechanismen der Abwehr ohne IL-12p75 nicht für eine Kontrolle der Infektion ausreichen, musste das Immunsystem auf Alternativen zurückgreifen. Diese häufig auftretenden Zellen sind recht schwierig einzuordnen. Einerseits ist es nicht gelungen, durch verschiedene Systeme und Protokolle die endogene Peroxidase wirksam zu blockieren. Andererseits konnten diese Zellen weder als Makrophagen, T-Helferzellen, zytotoxische T-Zellen, Granulozyten oder B-Zellen identifiziert werden. Es könnte sich demnach hier um unzureichend differenzierte Zellen (Vorläuferzellen des lymphatischen Systems) handeln. Diese zeichnen sich durch eine hohe Aktivität endogener Peroxidase aus und besitzen andere als die hier untersuchten Oberflächenantigene. Dieser Effekt ist mit einer „Linksverschiebung“ bei neutrophilen Granulozyten vergleichbar.

KAWAKAMI et al. (1999) zeigten den Einfluss einer IL-12-Behandlung nach intratrachealer Infektion mit *C. neoformans* anhand einer Zellpopulationsanalyse mittels durchflusszytometrischer Analyse von Lungenhomogenat. Nach der Behandlung waren mehr Makrophagen, T-Helferzellen und neutrophile Granulozyten in der Lunge auffindbar.

Auf die Ausbildung von Kryptokokken-spezifischen Antikörpern hatte IL-12p75 anscheinend keinen Einfluss, da die IL-12p35^{-/-}-Mäuse soviel Antikörper produzierten wie die Wildtyp-Mäuse. Betrachtet man dagegen den IgG2a-Gesamtgehalt, fällt auf, dass die Wildtyp-Mäuse doppelt soviel IgG2a produzierten wie die IL-12p35^{-/-}-Mäuse. IL-12p75 ist, wie bereits aus

anderen Untersuchungen bekannt, für die bei einer Th1-Antwort typischen Produktion von IgG2a notwendig. KAWAKAMI et al. (1997) haben festgestellt, dass nach intratrachealer Infektion mit *C. neoformans* die Expression an mRNA von Th1-Zytokinen (TNF- α , IL-12p40, IL-18) und iNOS nicht nachweisbar oder nur sehr geringem Umfang vorhanden war. Erst nach IL-12-Behandlung der Mäuse stieg die Expression dieser Proteine markant an. Die Expression von Th2- und regulatorischen Zytokinen (z. B. TGF- β) konnte schon in einem frühen Infektionsstadium in beträchtlichen Mengen nachgewiesen werden und wurde interessanterweise durch die IL-12-Behandlung nicht verringert.

5.2 Aktivität von IL-12p40 in der Abwehr von *C. neoformans*

Um die Wirkung von IL-12p40 bei der Abwehr einer Infektion mit *C. neoformans* zu erkennen, musste die Immunreaktionen von IL-12p35^{-/-}-Mäusen mit der von IL-12p35/p40^{-/-}-Mäusen verglichen werden.

Die Keimbelastung der Leber nach intranasaler Infektion war bei den IL-12p35/p40^{-/-}-Mäusen größer als bei den IL-12p35^{-/-}-Mäusen. IL-12p40 hat demnach ähnlich wie IL-12p75 eine protektive Rolle bei der Erregerabwehr. Ohne IL-12p40 war eine Kontrolle der Infektion auf einem geringen Niveau der Keimbelastung nicht mehr möglich. Besonders deutlich wurde dieses Phänomen beim Antigen-Titer bei den IL-12p35/p40^{-/-}-Mäusen. Durch das Fehlen von IL-12p40 war viel mehr Antigen im Blut nachweisbar.

Andererseits spielt IL-12p40 bei der Antikörperbildung gegen *C. neoformans* eine große Rolle. Die IL-12p35/p40^{-/-}-Mäuse waren kaum in der Lage, spezifische Antikörper gegen *C. neoformans* zu bilden. Daher konnte nur wenig Antigen im Serum gebunden und nachgewiesen werden. Andererseits ist es eher unwahrscheinlich, dass das Kryptokokken-Antigen vollständig von Antikörpern opsoniert worden ist. Die fehlende Opsonisierung des Antigens verringert aber die Beseitigung durch phagozytierende Zellen. IL-12p40 ist also direkt oder indirekt für die Bildung von spezifischen Antikörpern notwendig und unterstützt möglicherweise damit die Phagozytose von Antigen.

Beim Antikörpergesamtgehalt, der Kryptokokken-spezifische und Nicht-Kryptokokken-spezifische Antikörper umfasst, ergab sich dagegen ein etwas anderes Bild. Hier war der Gehalt an IgG2a, welches verstärkt bei einer Th1-Antwort von B-Zellen gebildet wird, bei den IL-12p35^{-/-}-Mäusen geringer als bei den IL-12p35/p40^{-/-}-Mäusen.

Eine durch IL-12p75 induzierte Th1-Antwort bewirkt generell die Produktion von IgG2a durch die Aktivierung von B-Zellen und einen Klassenwechsel von IgM zu IgG2a. Ein Fehlen von IL-12p75 bewirkt demnach eine geringere Bildung von IgG2a. Dies war auch bei den

IL-12p35^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen zu sehen. Fehlen dazu noch erregerspezifische Antikörper, wie bei den IL-12p35/p40^{-/-}-Mäusen, scheint ein Regelmechanismus in Kraft zu treten, der die Bildung von IgG2a auf einem alternativen Weg bewirkt. Diese Theorie muß noch in weiteren Experimenten verifiziert werden. Ein Umschwung von einer Th1-Antwort zu einer Th2-Antwort wird somit verhindert. Allerdings wirkte sich dies nicht auf die Produktion von IgG1 aus.

Bei der histologischen Untersuchung des Gewebes von IL-12p35/p40^{-/-}-Mäusen fielen große Ansammlungen von Kryptokokken mit wenigen Entzündungszellen auf. Eine gerichtete zelluläre Entzündungsreaktion fand ohne IL-12p40 praktisch nicht statt. Die Anzahl dieser fast reaktionslosen Kryptokokkenansammlungen war etwas höher als bei den IL-12p35^{-/-}-Mäusen. Dies steht höchstwahrscheinlich mit der höheren Keimbelastung in direktem Zusammenhang. Die Größe dieser Areale war bei den IL-12p35^{-/-}-Mäusen fast doppelt so groß wie bei den IL-12p35/p40^{-/-}-Mäusen. Dies ist aber keinesfalls positiv zu bewerten. Die geringe Größe war durch das Fehlen von Entzündungszellen bedingt, was auf das Fehlen von IL-12p40 zurückzuführen ist.

Es waren zwar Makrophagen im Gewebe zu finden, allerdings gab es keine räumliche Korrelation zu den Kryptokokken. IL-12p40 ist demnach für die Chemotaxis auf die Makrophagen von entscheidender Bedeutung. Bei den IL-12p35/p40^{-/-}-Mäusen waren im Vergleich zu den IL-12p35^{-/-}-Mäusen und den Wildtyp-Mäusen mehr T-Helferzellen zu finden. Dies könnte, ähnlich wie der erhöhte IgG2a-Gehalt, ein Regelmechanismus sein, über den das Fehlen von IL-12p40 kompensiert werden sollte. Interessanterweise konnten HA et al. (1999) zeigen, dass homodimeres IL-12p40 tatsächlich auf Makrophagen chemotaktisch wirkt. Dies bestätigt unsere Interpretation der Rolle von IL-12p40 in der Entzündungsreaktion gegen *C. neoformans*.

5.3 Aktivität von IL-23 in der Abwehr von *C. neoformans*

Im November 2000 wurde von OPPMANN et al. (2000) von einem neuen Protein mit einem Molekulargewicht von 19 Kilodalton berichtet. Dieses als p19 bezeichnete Protein ähnelt in seiner Struktur dem IL-12p35. p19 hat allein keine biologische Funktion, verbindet sich aber mit IL-12p40 zu einem Zytokin, welches IL-23 genannt wurde. Von IL-23 wird eine ähnliche Wirkung wie IL-12p75 angenommen, da es auch am IL-12Rβ1 bindet. Besonders interessant ist die Wirkung bei den IL-12p35^{-/-}-Mäusen einzuschätzen, da hier neben p40 möglicherweise auch p19 gebildet wurde und somit potentiell IL-23 entstanden sein könnte. Außerdem ist man beim Fehlen von IL-12p35 von einer verstärkten Bildung an IL-12p40 ausgegangen.

Daher könnte bei den IL-12p35^{-/-}-Mäusen der Effekt von IL-23 besonders zum Tragen kommen. Allerdings ist die Frage der Affinität von IL-12p40 zu p19 und zu IL-12p40 selbst noch nicht geklärt. Man weiss also nicht, ob bei den IL-12p35^{-/-}-Mäusen verstärkt IL-12(p40)₂ oder IL-23 gebildet wird.

5.4 Vergleich zwischen intraperitonealer und intranasaler Infektion

Der intranasale Infektionsweg kommt der natürlichen aerogenen Infektion recht nahe. Deshalb sollte dieses Infektionsmodell zur Untersuchung der Immunantwort gegen *C. neoformans* eingehender berücksichtigt werden.

Auch bei intranasaler Infektion war IL-12p75 für die Kontrolle der Keimbelastung der Organe notwendig. Interessanterweise war die Keimbelastung der Lunge bei den IL-12p35^{-/-}-Mäusen etwas höher als bei den IL-12p35/p40^{-/-}-Mäusen.

Die Dissemination der Kryptokokken aus der Lunge in die Milz und ins Gehirn war gering. Ein Fehlen von IL-12p75 bewirkte eine Besiedlung besonders des Gehirns. Interessant dabei ist, dass sich ein Fehlen von IL-12p75 und IL-12p40 nicht noch stärker auf die Dissemination auswirkte. Gegenüber den IL-12p35^{-/-}-Mäusen zeigten die IL-12p35/p40^{-/-}-Mäuse eine geringere Ausbreitung der Kryptokokken in den Organen. Vielleicht ist dieser Effekt nicht auf das Fehlen von IL-12p40, sondern auf die vermehrte Produktion von IL-23 durch IL-12p35^{-/-}-Mäuse zurückzuführen. Diese Theorie muss in nachfolgenden Arbeiten weiter untersucht werden. KAWAKAMI et al. (1996) haben durch IL-12-Behandlung intratracheal infizierter Mäuse gezeigt, dass dadurch die Dissemination der Erreger ins Gehirn verhindert wird.

Ähnlich wie der Erregergehalt in anderen Organen war auch der Antigengehalt bei den IL-12p35^{-/-}-Mäusen höher als bei den Wildtyp-Mäusen und den IL-12p35/p40^{-/-}-Mäusen. Die Mäuse, die kein IL-12p75, aber IL-12p40 und IL-23, bilden konnten, waren kaum in der Lage, die Infektion zu kontrollieren.

Der Gehalt an Kryptokokken-spezifischen Antikörpern war nach intranasaler Infektion fünf- bis zehnmal höher als nach intraperitonealer Infektion. Dieser Infektionsweg zeigte also eine wesentlich ausgeprägtere humorale Antwort. Betrachtet man den IgG2a-Gesamtgehalt, sieht man einen Anstieg am Tag 48 *p. i.* bei den IL-12^{-/-}-Mäusen. -Trotzdem waren die Werte um die Hälfte geringer als nach 21 Tagen nach intraperitonealer Infektion. Dafür war der IgG1-Gesamtgehalt, bei Betrachtung des Tages 21 *p. i.*, nach intranasaler Infektion doppelt so hoch. -Der Typ der Immunantwort schien sich im Gegensatz zur intraperitonealen Infektion in Richtung Th2 (d. h. verstärkte Antikörperbildung) verschoben zu haben.

Die Lunge gehört immunologisch zum System der mukosalen Abwehr. Die Besonderheit dabei ist eine verstärkte Th2-Antwort in der Abwehr von eindringenden mukosalen Pathogenen (JANEWAY und TRAVERS 1997). Dieser Fakt könnte den generell hohen Gehalt an IgG1-Antikörpern nach intranasaler Infektion erklären.

In der Lunge bildeten sich bei den Wildtyp-Mäusen stark verdichtete Areale aus Kryptokokken, Entzündungszellen und verdichtetem peribronchialen Gewebe. Eine geordnete Struktur, die auf ein typisches Granulom hinweist, war erst 48 Tage *p. i.* zu erkennen. Bis zum Tag 35 *p. i.* erschienen die Bereiche der Lunge, in die der Erreger aufgenommen wurde, diffus verändert. Die Lunge reagiert demnach nach intranasaler Infektion stärker aber ungerichteter als die Leber nach intraperitonealer Infektion. Allerdings sollte man nicht vergessen, dass bei intranasaler Infektion 10^3 Kryptokokken direkt in die Lunge gelangten und sich nach intraperitonealer Infektion 10^4 Kryptokokken in fast allen inneren Organen der Maus gleichzeitig und gleichmäßig verteilten. Nach intranasaler Infektion war die Besiedelung der Lunge also schneller und stärker. Daher war auch eine stärkere Immunreaktion notwendig, um den Erreger zu kontrollieren.

Diese Reaktion ist bei den IL-12p35^{-/-}-Mäusen noch stärker ausgeprägt als bei den Wildtyp-Mäusen. IL-12p75 ist also auch hier für eine effektive Abwehr und Kontrolle des Erregers notwendig.

Bei den IL-12p35/p40^{-/-}-Mäusen blieb solch eine massive Gewebsreaktion größerer Areale aus. Es waren nur Verdichtungen im peribronchialen Gewebe zu sehen, was einer Aktivierung des BALT entspricht. IL-12p40 ist demnach auch nach intranasaler Infektion für eine gerichtete zelluläre Entzündungsreaktion notwendig. Dies bestätigt die bei intraperitonealer Infektion entdeckte, chemotaktische Wirkung von IL-12p40.

T-Helferzellen waren bei IL-12p35/p40^{-/-}-Mäusen fast ausschließlich am Rand der kleinen Bronchien zu finden. Dabei waren bei den Wildtyp-Mäusen die wenigsten CD4⁺-Zellen zu finden und bei den IL-12p35/p40^{-/-}-Mäusen die meisten. Sobald IL-12p75 fehlte, nahm die Zahl der T-Helferzellen zu. Und wenn zusätzlich noch IL-12p40 fehlte, nahm diese Zellpopulation weiter zu. Das ist mit dem Ergebnis nach intraperitonealer Infektion vergleichbar. Diese T-Helferzellen müssten dann Th2-Zellen sein, da durch das Fehlen von IL-12p75 verstärkt IL-4 zur Wirkung kommt (siehe Abbildung 1 und 2) und damit die Th0-Zellen zu Th2-Zellen ausdifferenzieren. Damit würde sich auch der erhöhte IgG1-Gesamtgehalt des Serums erklären lassen.

Die protektive Wirkung von IL-12p40 nach intraperitonealer Infektion ist eindeutig. Bei intranasaler Infektion mit *C. neoformans* scheint die Wirkung von IL-12p40 eher

immunpathologisch zu sein. Den IL-12p35^{-/-}-Mäusen ging es aufgrund der höheren Organkeimzahlen in der Lunge und der stärkeren Dissemination des Erregers in andere Organe klinisch schlechter als den IL-12p35/p40^{-/-}-Mäusen, die kein IL-12p40 bilden können. Verstärkt wurde das ganze durch eine stärkere morphologische Veränderung der Lunge, die den Gesundheitsstatus der Tiere nachhaltig beeinträchtigte. Daraus lässt sich eine immunpathologische Wirkung von IL-12p40 in Abwesenheit von IL-12p75 erahnen.

5.5 Ausblick auf künftige Untersuchungen

Trotz der neuen Erkenntnisse zu IL-12p75 und IL-12p40 sind einige neue Fragen aufgetreten. Diese betreffen in erster Linie den Einfluss von IL-23. Für weitergehende Untersuchungen müssen erst einmal die Voraussetzungen geschaffen werden. Man braucht ein System, in dem die IL-23-Produktion definiert ausgeschaltet ist oder ausgeschaltet werden kann. Zum einen kann dies mit neutralisierenden Antikörpern gegen IL-23 und p19 realisiert werden. Zum anderen wäre der Einsatz von IL-23^{-/-}-Mäusen (d. h. p19^{-/-}-Mäuse) auf dem Stammhintergrund 129Sv/Ev denkbar. Allerdings sind weder passende Antikörper noch die entsprechenden gendefizienten Mäuse zur Zeit verfügbar. Diese zu schaffen, ist also das nächste Ziel der Forschung auf dem Sektor der p40-Zytokinfamilie. Die zu erwartenden Informationen sind wichtig für die Beurteilung der Immunreaktion der IL-12p35^{-/-}-Mäuse. Man weiß nämlich nicht, ob vorwiegend IL-12p40 oder IL-23 gebildet wird und welchen Einfluss sie auf die Abwehr von *C. neoformans* haben.

6 Zusammenfassung

Wagner, Frank:

Die Bedeutung von Interleukin-12p75 und Interleukin-12p40 für die Abwehr einer Infektion mit *Cryptococcus neoformans* im murinen Modell

Institut für Immunologie der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Leipzig, April 2001

82 Seiten; 46 Abbildungen; 5 Tabellen und 97 Literaturangaben

Um die Rolle von Interleukin-12p75 (IL-12p75) und Interleukin-12p40 (IL-12p40) in der Abwehr einer Kryptokokken-Infektion im Mausmodell zu untersuchen, wurden Mäuse auf 129Sv/Ev Stammhintergrund intraperitoneal und intranasal mit *Cryptococcus neoformans* (*C. neoformans*) infiziert. Dabei wurden die Unterschiede im Infektionsverlauf und in der Immunreaktion von Wildtyp-, IL-12p35^{-/-} und IL-12p35/p40^{-/-}-Mäusen analysiert. Unterschiede zwischen den Wildtyp- und den IL-12p35^{-/-}-Mäusen lassen auf die Bedeutung von IL-12p75 schließen, wogegen Unterschiede zwischen IL-12p35^{-/-}- und IL-12p35/p40^{-/-}-Mäusen auf die Rolle von IL-12p40 schließen lassen. Untersucht wurden sowohl die Erregerkonzentration in den Organen, Antigenspiegel im Blut, histologische Veränderungen und Serumantikörperkonzentrationen.

Nach intraperitonealer Infektion war die Keimbelastung der Organe bei den Wildtyp-Mäusen geringer als bei beiden IL-12^{-/-}-Mausstämmen. Bei Wildtyp-Mäusen waren nicht nur weniger lebende Kryptokokken in den Organen zu finden, sondern auch weniger Kryptokokken-Antigen im Serum als bei beiden IL-12^{-/-}-Mäusen nachweisbar. Das zeigt, dass IL-12p75 für die Kontrolle der intraperitonealen Infektion mit *C. neoformans* notwendig ist. IL-12p40 hatte ähnlich wie IL-12p75, wenn auch in etwas geringerer Masse, eine protektive Rolle bei der Erregerabwehr. Ohne IL-12p40 war eine Kontrolle der Infektion auf einem geringen Niveau der Keimbelastung nicht möglich. Besonders deutlich wurde dieses Phänomen beim Antigentiter bei den IL-12p35/p40^{-/-}-Mäusen. Durch das Fehlen von IL-12p40 wurde bei den IL-12p35/p40^{-/-}-Mäusen viel mehr Antigen über das Blut im Serum verteilt als bei den IL-12p35^{-/-}- oder den Wildtyp-Mäusen.

Die Wirtsreaktion bei einer Infektion mit *C. neoformans* geht mit der Bildung von Granulomen einher. Ohne IL-12p75 kam es zwar noch zur Bildung von Granulomen, diese zeigten aber eine veränderte zelluläre Zusammensetzung. Die IL-12p35/p40^{-/-}-Mäuse waren

nicht zur Ausbildung von typischen Granulomen fähig. Bei ihnen kam es zu einer vermehrten Ansammlung von Kryptokokken fast ohne Entzündungszellen. IL-12p40 ist also für die Ausbildung einer zellulären Entzündungsreaktion notwendig.

IL-12p40 ist auch für die Antikörperbildung gegen *C. neoformans* erforderlich. Die IL-12p35/p40^{-/-}-Mäuse waren kaum in der Lage, spezifische Antikörper gegen *C. neoformans* zu bilden.

IL-12p75 ist für die Ausbildung einer Th1-Antwort notwendig. Infizierte Wildtyp-Mäuse produzierten doppelt soviel IgG2a, welches für ein Th1-Antwort typisch ist, wie die IL-12p35^{-/-}-Mäuse.

Der intranasale Infektionsweg kommt der natürlichen aerogenen Infektion recht nahe. Deshalb wurde – zusätzlich zur intraperitonealen Infektion - dieser Infektionsweg zur Untersuchung der Immunantwort gegen *C. neoformans* berücksichtigt.

Auch bei intranasaler Infektion ist IL-12p75 für die Kontrolle der Keimbelastung der Organe notwendig. Interessanterweise war die Keimbelastung der Lunge bei den IL-12p35^{-/-}-Mäusen etwas höher als bei den IL-12p35/p40^{-/-}-Mäusen. Bei den Wildtypmäusen war die Dissemination der Kryptokokken aus der Lunge in die Milz und ins Gehirn gering. Ein Fehlen von IL-12p75 bewirkte allerdings eine Besiedlung besonders des Gehirns.

Nach intranasaler Infektion kam es in der Lunge von Wildtyp-Mäusen zu atypischen Granulomen mit zentraler Einschmelzung von Gewebe und Kryptokokken. Diese Reaktion war bei den IL-12p35^{-/-}-Mäusen noch stärker ausgeprägt als bei den Wildtyp-Mäusen. Bei den IL-12p35/p40^{-/-}-Mäusen blieb eine Gewebsreaktion größerer Areale aus. Es waren nur eine Aktivierung des BALT zu sehen. IL-12p40 ist demnach auch nach intranasaler Infektion für eine zelluläre Entzündungsreaktion notwendig. Möglicherweise kann sich diese Eigenschaft von IL-12p40 bei intranasaler Infektion in einer immunpathologischen Reaktion äußern, die bei IL-12p35^{-/-}-Mäusen für eine massive Infiltration der Lunge mit Entzündungszellen verantwortlich ist.

Der Gehalt an Kryptokokken-spezifischen Antikörpern war nach intranasaler Infektion fünf- bis zehnmal höher als nach intraperitonealer Infektion. Der intranasale Infektionsweg zeigte also eine wesentlich ausgeprägtere humorale Antwort. Der Typ der Immunantwort schien sich im Gegensatz zur intraperitonealen Infektion in Richtung Th2 (d. h. verstärkte Antikörperbildung) verschoben zu haben.

Sowohl nach intraperitonealer wie auch nach intranasaler Infektion mit *C. neoformans* lassen sich die immunstimulatorischen Aktivitäten von IL-12p75 und von IL-12p40 nachweisen,

auch wenn diese sich in Abhängigkeit vom Infektionsweg etwas unterschiedlich manifestieren.

7 Summary

Wagner, Frank:

The importance of interleukin-12p75 and interleukin-12p40 for immunity against *Cryptococcus neoformans* studied in a murine model

Institute of Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig

Leipzig, April 2002

82 pages, 46 figures, 5 tables, 97 references

To analyse the role of interleukin-12p75 (IL-12p75) and interleukin-12p40 (IL-12p40) in the defence against *Cryptococcus neoformans* (*C. neoformans*) a murine infection model was established and studied. Mice of wild-type 129Sv/Ev background as well as IL-12p35^{-/-} and IL-12p35/p40^{-/-} 129Sv/Ev mice were infected intraperitoneally or intranasally with *C. neoformans*. The differences between the immune response of these genotypes were analysed. Comparing wild-type and IL-12p35^{-/-}-mice allows for conclusions related to the importance of IL-12p75, comparing IL-12p40-producing IL-12p35^{-/-} mice with IL-12p35/p40^{-/-} mice shows the importance of IL-12p40. Fungal organ burden, serum antigen levels, inflammatory cell responses, and antibody production were examined.

The fungal organ load in wild-type mice was smaller than in both mutant IL-12^{-/-}-mice. In wild-type mice fewer cryptococci were found in organs and less cryptococcal antigen in serum than in IL-12p35^{-/-} and IL-12p35/p40^{-/-} mice. This underlines the importance of IL-12p75 for the control of the infection with *C. neoformans*. In addition, IL-12p40 was found to have a similar but weaker role as IL-12p75 in protection against *C. neoformans*. In the absence of IL-12p40 IL-12p35/p40^{-/-} mice developed higher antigen titers than IL-12p35^{-/-} and wild-type mice.

The host response against infection with *C. neoformans* is associated with granuloma formation. Recruitment of inflammatory cells to granulomas was altered in the absence of IL-12p75. In addition, IL-12p40 contributed significantly to granuloma formation since

IL-12p35/p40^{-/-} mice developed no or only very poor granulomatous responses. Therefore, IL-12p40 is required for inflammatory cell responses.

IL-12p40 was also found to be required for antibody production against *C. neoformans*. Infected IL-12p35/p40^{-/-}-mice had only very low levels of specific antibodies against *C. neoformans*.

IL-12p75 is known to be essential for protective Th1 response against intracellular microorganisms. Th1 responses are commonly associated with the production of IgG2a. Infected wild-type mice produced 2-fold higher IgG2a levels than IL-12p35^{-/-}-mice.

To adapt the infection model more to the natural infection mode the intraperitoneal infection route was changed to an intranasal route. Following intranasal infection IL-12p75 also proved to be necessary for control of the fungal organ load. Interestingly the organ load was higher in IL-12p35^{-/-}-mice than in IL-12p35/p40^{-/-}-mice which suggest a role of IL-12p40 in cell recruitment. Following intranasal application of cryptococci fungal dissemination to spleen and brain was reduced as compared to the intraperitoneal infection route. Without IL-12p75 dissemination of *C. neoformans* to the brain occurred. This shows that IL-12p75 is involved in control of dissemination from lung to brain.

The inflammatory response of IL-12p35^{-/-}-mice was stronger than the tissue response of wild-type mice. The massive tissue reactions of IL-12p35^{-/-}-mice caused big areas of diffuse cellular infiltration in their lungs. In IL-12p35/p40^{-/-}-mice inflammatory responses could be observed only in the peribronchial tissue. This shows that IL-12p40 is not only needed for a cellular inflammatory response following intraperitoneal but also following intranasal infection. Following intranasal infection IL-12p40 can induce immunopathological effects.

Intranasal infection of mice with *C. neoformans* resulted in five to ten times higher antibody responses than intraperitoneal infection. This suggests that intranasal infection of mice results in a more Th2-biased humoral response.

In summary, these experiments show that besides IL-12p75 also IL-12p40 contributes to cellular immunity against *C. neoformans*. The immunostimulatory properties of both, IL-12p75 and IL-12p40, can be observed after intraperitoneal and intranasal infection routes with similar but also distinct manifestations.

Literaturverzeichnis

ASTE-AMEZAGA, M., A. D'ANDREA, M. KUBIN, und G. TRINCHIERI (1994):
Cooperation of natural killer cell stimulatory factor/interleukin-12 with other stimuli in the induction of cytokines and cytotoxic cell-associated molecules in human T and NK cells.
Cell Immunol. 156:480-492

BROMBACHER, F., A. DORFMULLER, J. MAGRAM, W. J. DAI, G. KOHLER, A. WUNDERLIN, K. PALMER-LEHMANN, M. K. GATELY, und G. ALBER (1999):
IL-12 is dispensable for innate and adaptive immunity against low doses of *Listeria monocytogenes*.
Int.Immunol. 11:325-332

BRUNDA, M. J., L. LUISTRO, R. R. WARRIER, R. B. WRIGHT, B. R. HUBBARD, M. MURPHY, S. F. WOLF, und M. K. GATELY (1993):
Antitumor and antimetastatic activity of interleukin 12 against murine tumors.
J.Exp.Med. 178:1223-1230

BUCHANAN, J. M., L. A. VOGEL, V. H. Van CLEAVE, und D. W. METZGER (1995):
Interleukin 12 alters the isotype-restricted antibody response of mice to hen eggwhite lysozyme.
Int.Immunol. 7:1519-1528

CASADEVALL, A., und J. R. PERFECT (1998)
Cryptococcus neoformans
2. Aufl. American Society for Microbiology, S. 29-37

CHANG, Y. C. und K. J. KWON-CHUNG. (1994):
Complementation of a capsule-deficient mutation of *Cryptococcus neoformans* restores its virulence.
Mol.Cell Biol. 14:4912-4919

CHUA, A. O., R. CHIZZONITE, B. B. DESAI, T. P. TRUITT, P. NUNES, L. J. MINETTI, R. R. WARRIER, D. H. PRESKY, J. F. LEVINE, und M. K. GATELY (1994):
Expression cloning of a human IL-12 receptor component. A new member of the cytokine receptor superfamily with strong homology to gp130.
J.Immunol. 153:128-136

CLEARE, W., S. MUKHERJEE, E. D. SPITZER, und A. CASADEVALL (1994):
Prevalence in *Cryptococcus neoformans* strains of a polysaccharide epitope which can elicit protective antibodies.
Clin.Diagn.Lab Immunol. 1:737-740

CLERICI, M., A. SARIN, R. L. COFFMANN, T. A. WYNN, S. P. BLATT, C. W. HENDRIX, S. F. WOLF, G. M. SHEARER, und P. A. HENKART (1994):
Type 1/type 2 cytokine modulation of T-cell programmed cell death as a model for human immunodeficiency virus pathogenesis.
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 91:11811-11815

- COOPER, A. M., J. MAGRAM, J. FERRANTE, und I. M. ORME (1997):
Interleukin 12 (IL-12) is crucial to the development of protective immunity in mice intravenously infected with *Mycobacterium tuberculosis*.
J.Exp.Med. 186:39-45
- COUGHLIN, C. M., K. E. SALHANY, M. S. GEE, D. C. LaTEMPLE, S. KOTENKO, X. MA, G. GRI, M. WYSOCKA, J. E. KIM, L. LIU, F. LIAO, J. M. FARBER, S. PESTKA, G. TRINCHIERI, und W. M. LEE (1998):
Tumor cell responses to IFN γ affect tumorigenicity and response to IL-12 therapy and antiangiogenesis.
Immunity 9:25-34
- COX, R. A. (1989):
Immunology of the Fungal Diseases.
CRC Press, Boca Raton, FL, S. 94-138.
- COX, G. M., J. MUKHERJEE, G. T. COLE, A. CASADEVALL und J. R. PERFECT (2000)
Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis.
Infect.Immun. 68:443-448
- CROSS, C. E., H. L. COLLINS, und G. J. BANCROFT (1997):
CR3-dependent phagocytosis by murine macrophages: different cytokines regulate ingestion of a defined CR3 ligand and complement-opsonized *Cryptococcus neoformans*.
Immunology 91:289-296
- CRUICKSHANK, J. G., R. CAVILL, und M. JELBERT (1973):
Cryptococcus neoformans of unusual morphology.
Appl.Microbiol. 25:309-312
- D'ANDREA, A., M. RENGARAJU, N. M. VALIANTE, J. CHEHIMI, M. KUBUN, M. ASTE, S. H. CHAN, M. KOBAYASHI, D. YOUNG, und E. NICKBARG (1992): Production of natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) by peripheral blood mononuclear cells.
J.Exp.Med. 176:1387-1398
- DECKEN, K., G. KÖHLER, K. PALMER-LEHMANN, A. WUNDERLIN, F. MATTNER, J. MAGRAM, M. K. GATELY, und G. ALBER (1998):
Interleukin-12 is essential for a protective Th1 response in mice infected with *Cryptococcus neoformans*.
Infect.Immun. 66:4994-5000
- DESAI, B. B., P. M. QUINN, A. G. WOLITZKY, P. K. MONGINI, R. CHIZZONITE, und M. K. GATELY (1992):
IL-12 receptor. II. Distribution and regulation of receptor expression.
J.Immunol. 148:3125-3132
- DIAMOND, R. D., R. K. ROOT, und J. E. BENNETT (1972):
Factors influencing killing of *Cryptococcus neoformans* by human leukocytes in vitro.
J.Infect.Dis. 125:367-376

DIGHE, A. S., D. CAMPBELL, C. S. HSIEH, S. CLARKE, D. R. GREAVES, S. GORDON, K. M. MURPHY, und R. D. SCHREIBER (1995):

Tissue-specific targeting of cytokine unresponsiveness in transgenic mice.

Immunity 3:657-666

DROMER, F., E. GUEHO, O. RONIN, und B. DUPONT. (1993):

Serotyping of *Cryptococcus neoformans* by using a monoclonal antibody specific for capsular polysaccharide.

J.Clin.Microbiol. 31:359-363

FAGGI, E., G. GARGANI, C. PIZZIRANI, S. PIZZIRANI, und N. SAPONETTO (1993):

Cryptococcosis in domestic mammals.

Mycoses 36:165-170

FINKELMAN, F. D., J. HOLMES, I. M. KATONA, J. F. URBAN, M. P. BECKMANN, L. S. PARK, K. A. SCHOOLEY, R. L. COFFMAN, T. R. MOSMANN, und W. E. PAUL (1990):

Lymphokine control of in vivo immunoglobulin isotype selection.

Annu.Rev.Immunol. 8:303-333

GATELY, M. K., D. M. CARVAJAL, S. E. CONNAUGHTON, S. GILLESSEN, R. R. WARRIER, K. D. KOLINSKY, V. L. WILKINSON, C. M. DWYER, G. F. HIGGINS, Jr., F. J. PODLASKI, D. A. FAHERTY, P. C. FAMILLETTI, A. S. STERN, und D. H. PRESKY (1996):

Interleukin-12 antagonist activity of mouse interleukin-12 p40 homodimer in vitro and in vivo.

Ann.N.Y.Acad.Sci. 795:1-12

GATELY, M. K., B. B. DESAI, A. G. WOLITZKY, P. M. QUINN, C. M. DWYER, F. J. PODLASKI, P. C. FAMILLETTI, F. SINIGAGLIA, R. CHIZZONITE, und U. GUBLER (1991):

Regulation of human lymphocyte proliferation by a heterodimeric cytokine, IL-12 (cytotoxic lymphocyte maturation factor).

J.Immunol. 147:874-882

GATELY, M. K., L. M. RENZETTI, J. MAGRAM, A. S. STERN, L. ADORINI, U. GUBLER, und D. H. PRESKY (1998):

The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses.

Annu.Rev.Immunol. 16:495-521

GATELY, M. K., A. G. WOLITZKY, P. M. QUINN, und R. CHIZZONITE (1992):

Regulation of human cytolytic lymphocyte responses by interleukin-12.

Cell Immunol. 143:127-142

GAZZINELLI, R. T., M. WYSOCKA, S. HAYASHI, E. Y. DENKERS, S. HIENY, P. CASPAR, G. TRINCHIERI, und A. SHER (1994):

Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN-gamma synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*.

J.Immunol. 153:2533-2543

IV

GERMANN, T., M. BONGARTZ, H. DLUGONSKA, H. HESS, E. SCHMITT, L. KOLBE, E. KOLSCH, F. J. PODLASKI, M. K. GATELY, und E. RUDE (1995):
Interleukin-12 profoundly up-regulates the synthesis of antigen- specific complement-fixing IgG2a, IgG2b and IgG3 antibody subclasses in vivo.
Eur.J.Immunol. 25:823-829

GERMANN, T., S. GUCKES, M. BONGARTZ, H. DLUGONSKA, E. SCHMITT, L. KOLBE, E. KOLSCH, F. J. PODLASKI, M. K. GATELY, und E. RUDE (1995):
Administration of IL-12 during ongoing immune responses fails to permanently suppress and can even enhance the synthesis of antigen- specific IgE.
Int.Immunol. 7:1649-1657

GRANGER, D. L., J. R. PERFECT, und D. T. DURACK (1985):
Virulence of *Cryptococcus neoformans*. Regulation of capsule synthesis by carbon dioxide.
J.Clin.Invest 76:508-516

GREENE, C. E.
Infectious Diseases of the Dog and Cat. (1990)
Saunders, S.687-695.

GUBLER, U., A. O. CHUA, D. S. SCHOENHAUT, C. M. DWYER, W. McCOMAS, R. MOTYKA, N. NABAVI, A. G. WOLITZKY, P. M. QUINN, und P. C. FAMILLETTI (1991):
Coexpression of two distinct genes is required to generate secreted bioactive cytotoxic lymphocyte maturation factor.
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 88:4143-4147

HA, S. J., C. H. LEE, S. B. LEE, C. M. KIM, K. L. JANG, H. S. SHIN, und Y. C. SUNG (1999):
A novel function of IL-12p40 as a chemotactic molecule for macrophages.
J.Immunol. 163:2902-2908

HEINZEL, F. P., A. M. HUJER, F. N. AHMED, und R. M. RERKO (1997):
In vivo production and function of IL-12 p40 homodimers.
J.Immunol. 158:4381-4388

HIDORE, M. R. und J. W. MURPHY (1986):
Correlation of natural killer cell activity and clearance of *Cryptococcus neoformans* from mice after adoptive transfer of splenic nylon wool-nonadherent cells.
Infect.Immun. 51:547-555

HIDORE, M. R., N. NABAVI, F. SONLEITNER, und J. W. MURPHY (1991):
Murine natural killer cells are fungicidal to *Cryptococcus neoformans*.
Infect.Immun. 59:1747-1754

HOAG, K. A., M. F. LIPSCOMB, A. A. IZZO, und N. E. STREET (1997):
IL-12 and IFN-gamma are required for initiating the protective Th1 response to pulmonary cryptococcosis in resistant C.B-17 mice.
Am.J.Respir.Cell Mol.Biol. 17:733-739

HOUPT, D. C., G. S. PFROMMER, B. J. YOUNG, T. A. LARSON, und T. R. KOZEL (1994) :

Occurrences, immunoglobulin classes, and biological activities of antibodies in normal human serum that are reactive with *Cryptococcus neoformans* glucuronoxylomannan.

Infect.Immun. 62:2857-2864

ISSAZADEH, S., A. LJUNGDahl, B. HOJEBERG, M. MUSTAFA, und T. OLSSON (1995):

Cytokine production in the central nervous system of Lewis rats with experimental autoimmune encephalomyelitis: dynamics of mRNA expression for interleukin-10, interleukin-12, cytolysin, tumor necrosis factor alpha and tumor necrosis factor beta.

J.Neuroimmunol. 61:205-212

JACOBS, G. J., C. E. GREENE und L.MEDLEAU (1998):

Kryptokokkose bei Hund und Katze.

Waltham Focus 4:21-27

JACOBSON, E. S. und S. B. TINNELL (1993)

Antioxidant function of fungal melanin.

J.Bacteriol. 175:7102-7104

JANEWAY, C. A. jr. und P. TRAVERS. (1997):

Immunologie.

Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg - Berlin - Oxford. S. 241-284

JELINEK, D. F. und J. K. BRAATEN (1995):

Role of IL-12 in human B lymphocyte proliferation and differentiation.

J.Immunol. 154:1606-1613

KAGAYA, K., T. YAMADA, Y. MIYAKAWA, Y. FUKAZAWA, und S. SAITO (1985):

Characterization of pathogenic constituents of *Cryptococcus neoformans* strains.

Microbiol.Immunol. 29:517-532

KARAOUI, R. M., N. K. HALL, und H. W. LARSH (1977):

Role of macrophages in immunity and pathogenesis of experimental cryptococcosis induced by the airborne route--Part II: Phagocytosis and intracellular fate of *Cryptococcus neoformans*.

Mykosen 20:409-412

KAWAKAMI, K., M. TOHYAMA, X. QIFENG, und A. SAITO (1997):

Expression of cytokines and inducible nitric oxide synthase mRNA in the lungs of mice infected with *Cryptococcus neoformans*: effects of interleukin-12.

Infect.Immun. 65:1307-1312

KAWAKAMI, K., M. TOHYAMA, Q. XIE, und A. SAITO (1996):

IL-12 protects mice against pulmonary and disseminated infection caused by *Cryptococcus neoformans*.

Clin.Exp.Immunol. 104:208-214

KAWAKAMI, K., K. SHIBUYA, M. H. QURESHI, T. ZHANG, Y. KOGUCHI, M. TOHYAMA, Q. XIE, S. NAOE, und A. SAITO (1999):
Chemokine responses and accumulation of inflammatory cells in the lungs of mice infected with highly virulent *Cryptococcus neoformans*: effects of interleukin-12.
FEMS Immunol.Med.Microbiol. 25:391-402

KIPS, J. C., G. J. BRUSSELLE, G. F. JOOS, R. A. PELEMAN, J. H. TAVERNIER, R. R. DEVOS, und R. A. PAUWELS (1996):
Interleukin-12 inhibits antigen-induced airway hyperresponsiveness in mice.
Am.J.Respir.Crit Care Med. 153:535-539

KNOKE, M. und G. SCHWESINGER (1994):
One hundred years ago: the history of cryptococcosis in Greifswald. Medical mycology in the nineteenth century.
Mycoses 37:229-233

KOZEL, T. R. (1993)
Opsonization and phagocytosis of *Cryptococcus neoformans*.
Arch.Med.Res. 24:211-218

KWON-CHUNG, K. J. (1991):
The discovery of creatinine assimilation in *Cryptococcus neoformans*, and subsequent work on the characterization of the two varieties of *C. neoformans*.
Zentralbl.Bakteriol. 275:390-393

LEONHARD, J. P., K. E. WALDBURGER, und S. J. GOLDMAN (1995):
Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against interleukin 12.
J.Exp.Med. 181:381-386

LITTMANN, M. L. und R. BOROK (1968):
Relation of the pigeon to cryptococcosis: natural carrier state, heat resistance and survival of *Cryptococcus neoformans*.
Mycopathol.Mycol.Appl. 35:329-345

MAGRAM, J., S. E. CONNAUGHTON, R. R. WARRIER, D. M. CARVAJAL, C. Y. WU, J. FERRANTE, C. STEWART, U. SARMIENTO, D. A. FAHERTY, und M. K. GATELY (1996):
IL-12-deficient mice are defective in IFN gamma production and type 1 cytokine responses.
Immunity 4:471-481

MANETTI, R., P. PARRONCHI, M. G. GIUDIZI, M. P. PICCINNI, E. MAGGI, G. TRINCHIERI, und S. ROMAGNANI (1993):
Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells.
J.Exp.Med. 177:1199-1204

MARTINOTTI, A., A. STOPPACCIARO, M. VAGLIANI, C. MELANI, F. SPREAFICO, M. WYSOCKA, G. PARMIANI, G. TRINCHIERI, und M. P. COLOMBO (1995):
CD4 T cells inhibit in vivo the CD8-mediated immune response against murine colon carcinoma cells transduced with interleukin-12 genes.
Eur.J.Immunol. 25:137-146

MATTNER, F., S. FISCHER, S. GUCKES, S. JIN, H. KAULEN, E. SCHMITT, E. RUDE, und T. GERMANN (1993):
The interleukin-12 subunit p40 specifically inhibits effects of the interleukin-12 heterodimer.
Eur.J.Immunol. 23:2202-2208

MATTNER, F., J. MAGRAM, J. FERRANTE, P. LAUNOIS, K. Di PADOVA, R. BEHIN, M. K. GATELY, J. A. LOUIS, und G. ALBER (1996):
Genetically resistant mice lacking interleukin-12 are susceptible to infection with *Leishmania major* and mount a polarized Th2 cell response.
Eur.J.Immunol. 26:1553-1559

MERBERG, D. M., S. F. WOLF, und S. C. CLARK (1992):
Sequence similarity between NKSF and the IL-6/G-CSF family [letter].
Immunol.Today 13:77-78

MILLER, G. P. und S. KOHL (1983):
Antibody-dependent leukocyte killing of *Cryptococcus neoformans*.
J.Immunol. 131:1455-1459

MODY, C. H., C. L. TYLER, R. G. SITRIN, C. JACKSON, und G. B. TOEWS (1991):
Interferon-gamma activates rat alveolar macrophages for anticryptococcal activity.
Am.J.Respir.Cell Mol.Biol. 5:19-26

MONGA, D. P. (1981):
Role of macrophages in resistance of mice to experimental cryptococcosis.
Infect.Immun. 32:975-978

MUKHERJEE, S., S. C. LEE, und A.CASADAVALL (1995):
Antibodies to *Cryptococcus neoformans* glucuronoxylomannan enhance antifungal activity of murine macrophages.
Infect Immun. 63:573-579

MURPHY, E. E., G. TERRES, S. E. MACATONIA, C. S. HSIEH, J. MATTSON, L. LANIER, M. WYSOCKA, G. TRINCHIERI, K. MURPHY, und A. O'GARRA (1994):
B7 and interleukin 12 cooperate for proliferation and interferon gamma production by mouse T helper clones that are unresponsive to B7 costimulation.
J.Exp.Med. 180:223-231

MURPHY, J. W. und D. O. McDANIEL (1982):
In vitro reactivity of natural killer (NK) cells against *Cryptococcus neoformans*.
J.Immunol. 128:1577-1583

NASEER, T., E. M. MINSHALL, D. Y. LEUNG, S. LABERGE, P. ERNST, R. J. MARTIN, und Q. HAMID (1997):

Expression of IL-12 and IL-13 mRNA in asthma and their modulation in response to steroid therapy.

Am.J.Respir.Crit Care Med. 155:845-851

NOGUCHI, Y., E. C. RICHARDS, Y. T. CHEN, und L. J. OLD (1995):

Influence of interleukin 12 on p53 peptide vaccination against established Meth A sarcoma.

Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 92:2219-2223

OPPMANN, B., R. LESLEY, B. BLOM, J. C. TIMANS, Y. XU, B. HUNTE, F. VEGA, N. YU, J. WANG, K. SINGH, F. ZONIN, E. VAISBERG, T. CHURAKOVA, M. LIU, D. GORMAN, J. WAGNER, S. ZURAWSKI, Y. LIU, J. S. ABRAMS, K. W. MOORE, D. RENNICK, R. WAAL-MALEFYT, C. HANNUM, J. F. BAZAN, und R. A. KASTELEIN (2000):

Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12.

Immunity. 13:715-725

PAUL, W. E. und R. A. SEDER (1994):

Lymphocyte responses and cytokines.

Cell 76:241-251

POLACHECK, I. (1991):

The discovery of melanin production in *Cryptococcus neoformans* and its impact on diagnosis and the study of virulence.

Zentralbl.Bakteriol. 276:120-123

PODLASKI, F. J., V. B. NANDURI, J. D. HULMES, Y. C. PAN, W. LEVIN, W. DANHO, R. CHIZZONITE, M. K. GATELY, und A. S. STERN (1992):

Molecular characterization of interleukin 12.

Arch.Biochem.Biophys. 294:230-237

van der POUW KRAAN TC, L. C. BOEIJE, E. R. de GROOT, S. O. STAPEL, A. SNIJDERS, M. L. KAPSENBERG, J. S. van der ZEE, und L. A. AARDEN (1997):

Reduced production of IL-12 and IL-12-dependent IFN-gamma release in patients with allergic asthma.

J.Immunol. 158:5560-5565

PRESKY, D. H., H. YANG, L. J. MINETTI, A. O. CHUA, N. NABAVI, C. Y. WU, M. K. GATELY, und U. GUBLER (1996):

A functional interleukin 12 receptor complex is composed of two beta- type cytokine receptor subunits.

Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 93:14002-14007

REINER, S. L. und R. M. LOCKSLEY (1995):

The regulation of immunity to *Leishmania major*.

Annu.Rev.Immunol. 13:151-177

ROBINSON, D. S., Q. HAMID, S. YING, A. TSICOPOULOS, J. BARKANS, A. M. BENTLEY, C. CORRIGAN, S. R. DURHAM, und A. B. KAY (1992):
Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma.
N.Engl.J.Med. 326:298-304

ROLLE, M. und A. MAYR (1993)
Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seduchenlehre
6. Aufl. Ferdinand Enke Verlag Stuttgart S. 814-820

ROSAS, A. L. und A. CASADEVALL (1997):
Melanization affects susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to heat and cold
FEMS Microbiol.Lett. 153:265-272.

SCHARTON-KERSTEN, T., L. C. AFONSO, M. WYSOCKA, G. TRINCHIERI, und P. SCOTT (1995):
IL-12 is required for natural killer cell activation and subsequent T helper 1 cell development in experimental leishmaniasis.
J.Immunol. 154:5320-5330

SCHARTON-KERSTEN, T. M., G. YAP, J. MAGRAM, und A. SHER (1997):
Inducible nitric oxide is essential for host control of persistent but not acute infection with the intracellular pathogen *Toxoplasma gondii*.
J.Exp.Med. 185:1261-1273

SCHMITT, E., P. HOEHN, C. HUELS, S. GOEDERT, N. PALM, E. RUDE, und T. GERMANN (1994):
T helper type 1 development of naive CD4+ T cells requires the coordinate action of interleukin-12 and interferon-gamma and is inhibited by transforming growth factor-beta.
Eur.J.Immunol. 24:793-798

SCHOENHAUT, D. S., A. O. CHUA, A. G. WOLITZKY, P. M. QUINN, C. M. DWYER, W. McCOMAS, P. C. FAMILLETTI, M. K. GATELY, und U. GUBLER (1992):
Cloning and expression of murine IL-12.
J.Immunol. 148:3433-3440

SEED, B. R., J. KALDOR, B. CAIRNS und M. PEGORER (1996):
Serum antibody response to active infection with *Cryptococcus neoformans* and its varieties in immunocompetent subjects.
Journal of Medical & Veterinary Mycology. 34:187-193

SEDER, R. A., R. GAZZINELLI, A. SHER, und W. E. PAUL (1993):
Interleukin 12 acts directly on CD4+ T cells to enhance priming for interferon gamma production and diminishes interleukin 4 inhibition of such priming.
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 90:10188-10192

SETHI, K. K. und H. S. RANDHAWA (1968):
Survival of *Cryptococcus neoformans* in the gastrointestinal tract of pigeons following ingestion of the organism.
J.Infect.Dis. 118:135-138

- SHIRAKAWA, T., T. ENOMOTO, S. SHIMAZU, und J. M. HOPKIN (1997):
The inverse association between tuberculin responses and atopic disorder.
Science 275:77-79
- SZABO, S. J., A. S. DIGHE, U. GUBLER, und K. M. MURPHY (1997):
Regulation of the interleukin (IL)-12R beta 2 subunit expression in developing T helper 1
(Th1) and Th2 cells.
J.Exp.Med. 185:817-824
- TRIPP, C. S., O. KANAGAWA, und E. R. UNANUE (1995):
Secondary response to *Listeria* infection requires IFN-gamma but is partially independent of
IL-12.
J.Immunol. 155:3427-3432
- VIDOTTO, V., S. AOKI, und G. CAMPANINI (1996):
A vitamin-free minimal synthetic medium for *Cryptococcus neoformans*.
Mycopathologia 133:139-142
- WANG, Y., P. AISEN und A. CASADEVALL (1995):
Cryptococcus neoformans Melanin and Virulence: Mechanism of Action
Infect.Immun. 63:3131-3136
- WENDT, K., BOSTEDT, H., MIELKE, H. und FUCHS, H.-W. (1994):
Euter- und Gesäugekrankheiten.
Gustav Fischer Verlag Jena. S. 428-430
- WILLIAMSON, J. D., J. F. SILVERMAN, C. T. MALLAK, und J. D. CHRISTIE (1996):
Atypical cytomorphologic appearance of *Cryptococcus neoformans*: a report of five cases.
Acta Cytol. 40:363-370
- WILLIAMSON, P. R. (1997):
Laccase and melanin in the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*.
Front Biosci. 2:e99-e107
- WOLF, S. F., P. A. TEMPLE, M. KOBAYASHI, D. YOUNG, M. DICIG, L. LOWE, R.
DZIALO, L. FITZ, C. FERENZ, und R. M. HEWICK (1991):
Cloning of cDNA for natural killer cell stimulatory factor, a heterodimeric cytokine with
multiple biologic effects on T and natural killer cells.
J.Immunol. 146:3074-3081
- WU, C., R. R. WARRIER, X. WANG, D. H. PRESKY, und M. K. GATELY (1997):
Regulation of interleukin-12 receptor beta1 chain expression and interleukin-12 binding by
human peripheral blood mononuclear cells.
Eur.J.Immunol. 27:147-154

ZHANG, T., K. KAWAKAMI, M. H. QURESHI, H. OKAMURA, M. KURIMOTO, und A. SAITO (1997):
Interleukin-12 (IL-12) and IL-18 synergistically induce the fungicidal activity of murine peritoneal exudate cells against *Cryptococcus neoformans* through production of gamma interferon by natural killer cells.
Infect.Immun. 65:3594-3599

Diese Arbeit entstand mit freundlicher finanzieller Unterstützung der:

H. Wilhelm Schaumann Stiftung

Weitere Danksagungen gelten:

den Mitarbeitern des Institutes für Immunologie
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig,

dem Institut für Veterinärpathologie
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig,

dem Institut für Anatomie und Histologie
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig.