Die Typ17-T-Helferzell-assoziierte Immunantwort in der experimentellen Kryptokokkose

Der Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie
der Universität Leipzig

eingereichte

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

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum naturalium
Dr. rer. nat.

vorgelegt
von Master of Science in Biologie, Tina Richter
geboren am 31.12.1981 in Leipzig

Leipzig, den 15.07.2014

„In der Wissenschaft gleichen wir alle nur den Kindern,
die am Rande des Wissens hier und da einen Kiesel aufheben,
während sich der weite Ozean des Unbekannten
vor unseren Augen erstreckt.“

Sir Isaac Newton
(04. Januar 1643 - 31. März 1727)

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

Aus der vorliegenden Arbeit sind Teilgebiete Gegenstand folgender wissenschaftlicher Veröffentlichung:

Grahnert A, Richter T, Piehler D, Eschke M, Schulze B, Müller U, Protschka M, Köhler G, Sabat R, Brombacher F, Alber G. IL-4 receptor-alpha-dependent control of Cryptococcus neoformans in the early phase of pulmonary infection. *PLOS ONE*. 2014; 9(1):e87341

Bibliographische Darstellung

Tina Richter

Die Typ17-T-Helferzell-assoziierte Immunantwort in der experimentellen Kryptokokkose

Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie
Universität Leipzig

Dissertation

135 Seiten, 267 Literaturangaben, 30 Abbildungen, 6 Tabellen

Der weltweit vorkommende fungale Erreger *Cryptococcus neoformans* ist einer der bedeutendsten Auslöser invasiver Mykosen mit hoher Mortalität und stellt vor allem für immungeschwächte Patienten eine große Gefahr dar. Insbesondere *Humanes Immundefizienz-Virus*-infizierte oder Immunsuppressiva-behandelte Patienten (z. Bsp. Transplantat-Empfänger) erwerben oft Pilzinfektionen und weisen trotz der Gabe antifungaler Medikamente nach wie vor eine hohe Sterblichkeit auf, aus diesem Grunde sind neue therapeutische Ansätze erforderlich. Diese können in der strategischen Modulation des Immunsystems bestehen und einen erheblichen Fortschritt bedeuten. Eine Voraussetzung dafür ist eine genaue Analyse der Abwehrmechanismen gegen *C. neoformans*. Es ist bekannt, dass die T-Helferzellen vom Typ1 (Th1) mit einer protektiven Immunantwort assoziiert sind. Hingegen kann unter dem Einfluss von Th2 die Vermehrung von *C. neoformans* nicht kontrolliert werden. Eine mögliche schützende Funktion der Th17-basierenden Immunantwort während der Kryptokokkose wird diskutiert, wurde aber bisher wenig untersucht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein intranasales Infektionmodell in C57BL/6-Wildtypmäusen etabliert und die Entzündungsreaktion im zeitlichen Verlauf charakterisiert. Nach der Analyse der Expression Th17-assoziierter Zytokine erfolgte die Charakterisierung der zellulären Quellen von Interleukin (IL)-17A und IL-22. Während der Kryptokokkose werden in der Lunge vor allem in der Frühphase Th17-assoziierte Zytokine exprimiert. Die stärkste Produktion erfolgt 14 Tage nach Infektion, zu diesem Zeitpunkt sind T-Zellen, insbesondere T-Helferzellen die Hauptquelle dieser Interleukine. Außerdem wurde, mit Hilfe verschiedener immundefizienter Mausinzuchtstämmen, die Funktion der Th17-abhängigen Immunreaktion in der Kryptokokkose analysiert. Es gibt insbesondere in Situationen mit reduzierter Th2-Immunantwort Hinweise auf eine protektive Funktion der Th17-assoziierten Zytokine.

Für die therapeutische Anwendung sind jedoch weiterführende Untersuchungen erforderlich. Dabei sollten vor allem die Zielgene von IL-22 im Fokus stehen. Diese würden, im Gegensatz zu bisher untersuchten Th1-assoziierten Zytokinen, als adjunktives Therapeutikum möglicherweise mit weniger Nebenwirkungen einhergehen.

2

Inhaltsverzeichnis

BIBLIOGRAPHISCHE DARSTELLUNG 1

ABKÜRZUNGEN 5

1 EINLEITUNG 8

1.1 HUMANPATHOGENE PILZE 8

1.2 *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS* 8

1.3 IMMUNANTWORT GEGEN *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS* 12

1.3.1 ANGEBORENE IMMUNANTWORT 12

1.3.1.1 Erkennungsmechanismen 12

1.3.1.2 Die Zellen der angeborenen Immunantwort 12

1.3.2 ADAPTIVE IMMUNANTWORT 13

1.3.2.1 T-Helferzellen 13

1.3.2.1 Induktion der T-Helferzellantwort 16

1.3.2.2 Rolle der T-Helferzellen bei der Kryptokokkose 18

1.3.2.3 Interleukin-17A und F 19

1.3.2.4 Interleukin-22 24

1.3.2.5 Th17-Zytokin-assoziierte Induktion von AMPs 27

1.3.2.6 Zusammenfassung 28

1.4 ZIELSTELLUNG 29

2 MATERIALIEN UND METHODEN 30

2.1 MATERIALIEN 30

2.1.1 MÄUSE 30

2.1.2 *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS*-STÄMME 30

2.1.3 GERÄTE 31

2.1.4 REAGENZIEN & VERBRAUCHSMATERIALIEN 33

2.1.5 PUFFER, MEDIEN & LÖSUNGEN 38

2.1.6 ANTIKÖRPER 40

2.1.6.1 Antikörper zur Restimulation von Primärzellisolaten 40

2.1.6.2 Antikörper für durchflusszytometrische Analysen 40

2.1.6.3 Antikörper für ELISA 42

2.2 METHODEN 43

2.2.1 ANZUCHT VON *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS* 43

2.2.2 INTRANASALE INFEKTION 43

2.2.3 ORGAN- UND BLUTENTNAHME 43

2.2.4 HISTOLOGIE 44

2.2.5 ANALYSE DER ORGANLAST 46

2.2.6 ISOLATION VON LUNGENLEUKOZYTEN 47

2.2.7 PHÄNOTYPISIERUNG VON LUNGENLEUKOZYTEN 47

2.2.8 KULTIVIERUNG, RESTIMULATION UND INTRAZELLULÄRE FÄRBUNG VON LUNGENLEUKOZYTEN 48

2.2.9 ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA) 49

2.2.10 STATISTIK 50

3 ERGEBNISSE 51

3.1 ETABLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG DES EXPERIMENTELLEN MODELLS DER BRONCHOPULMONALEN MYKOSE IN DER C57BL/6-WILDTYPMAUS 51
3.1.1 ZEITLICHER VERLAUF DER CHRONISCHEN KRYPTOKOKKOSE 51
3.1.2 CHARAKTERISIERUNG DER PULMONALEN ENTZÜNDUNGSREAKTION 52
3.1.3 TH17-ASSOZIIERTE IMMUNANTWORT 56
3.1.4 ZUSAMMENFASSUNG 59
3.1.5 CHARAKTERISIERUNG DER IL-17A- UND IL-22-PRODUZIERENDEN ZELLEN IN DER LUNGE 60
3.2 FUNKTIONSANALYSE DER TH17-ASSOZIIERTEN IMMUNANTWORT BEI DER KRYPTOKOKKOSE 65
3.2.1 DEPLETION VON IL-17A UND IL-22 IN MÄUSEN MIT VERMINDERTER TH1-IMMUNANTWORT 66
3.2.2 TH17-ASSOZIIERTE IMMUNANTWORT IN MÄUSEN MIT VERMINDERTER TH1- UND TH2-IMMUNANTWORT 68
3.2.3 VERLAUF DER TH17-ASSOZIIERTEN IMMUNANTWORT IN MÄUSEN MIT VERMINDERTER TH2-IMMUNANTWORT 76
3.3 ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE 79

4 DISKUSSION 80

4.1 ETABLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG DES EXPERIMENTELLEN MODELLS DER BRONCHOPULMONALEN MYKOSE IN DER C57BL/6-WILDTYPMAUS 82
4.1.1 ANALYSE DER ZELLULÄREN QUELLEN VON IL-17A UND IL-22 IN DER LUNGE VON C57BL/6-WILDTYPTIEREN 84
4.2 FUNKTIONSANALYSE DER TH17-ASSOZIIERTEN IMMUNANTWORT BEI DER KRYPTOKOKKOSE 86
4.2.1 DEPLETION VON IL-17A UND IL-22 IN VERSUCHSTIEREN MIT VERMINDERTER TH1-IMMUNANTWORT 86
4.2.2 TH17-ASSOZIIERTE IMMUNANTWORT IN MÄUSEN MIT VERMINDERTER TH1- UND TH2-IMMUNANTWORT 88
4.2.3 VERLAUF DER TH17-ASSOZIIERTEN IMMUNANTWORT IN VERSUCHSTIEREN MIT VERMINDERTER TH2-IMMUNANTWORT 89
4.2.4 ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE DER UNTERSUCHUNGEN ZUR FUNKTION TH17-ASSOZIIERTER ZYTOKINE UND AUSBLICK 90

5 ZUSAMMENFASSUNG 92

6 ABSTRACT 96

7 LITERATURVERZEICHNIS 100

DANKSAGUNG 121

EIGENSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG 123

WISSENSCHAFTLICHER WERDEGANG 125

PUBLIKATIONSLISTE 127

Abkürzungen

°C	Grad Celsius
A	Adenin
Act1	engl. *nuclear factor- NF-κB activator 1*
Ak	Antikörper
AM	alveolar Makrophagen
AMPs	antimikrobielle Peptide
APC	Allophycocyanin
BrefA	Brefeldin A
C	Cytosin
C/EBP	engl. *CCAAT/enhancer binding protein*
CD	engl. *Cluster of Differentiation*, Cluster der Differenzierung
cDNA	engl. *complementary deoxyribonucleic acid,* komplementäre DNA
KbE	koloniebildende Einheiten
CO_2	Kohlendioxid
CTL	C-Typ Lektin-Rezeptor
DC	engl. *Dendritic cells*, Dendritische Zellen
dim	engl. *dim*, schwach positiv
DMEM	engl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dpi	engl. *days post infection*, Tage nach Infektion
ELISA	engl. *enzyme linked immunosorbent assay,* Enzym-gekoppelter Immunadsorptionsnachweis
Erk	engl. *extracellular-signal-regulated kinase,* extrazelluläre signalregulierte Kinase
FBS	fetales bovines Serum
FELASA	engl. *Federation of Laboratory Animal Science Associations,* Vereinigung von europäischen versuchstierkundlichen Gesellschaften
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	engl. *Forward Scatter*, Vorwärtsstreulicht
G	Guanin
GalXM	Galactoxylomannan
GATA3	engl. *GATA-binding protein 3*
G-CSF	engl. *Granulocyte colony-stimulating factor,* Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor
GFP	grün fluoreszierendes Protein

GM-CSF	engl. *Granulocyte macrophage colony-stimulating factor*, Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor
GXM	Glucoronoxylomannan
h	Stunde
HAART	Hochaktive antiretrovirale Therapie
HBD	Humanes beta-Defensin
HIV	*Humanes Immundefizienz-Virus*
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase 1
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ILC	engl. *Innate Lymphoid Cells*
i.n.	intranasal
iNOS	engl. *inducible nitric oxide synthase,* induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
IMDM	engl. *Iscove's Modified Dulbecco's Medium*
i.p.	intraperitoneal
JAK	Janus-Kinase
JNK	c-Jun N-terminale Kinasen
kDa	Kilodalton
KGW	Körpergewicht
LPS	Lipopolysaccharide
LTi	engl. *Lymphoid-tissue-inducer*
M	molar
MAPK	engl. *mitogen-activated protein kinase*
MFI	mittlere Fluoreszenz-Intensität
MHC	engl. *major histocompatibility complex*, Haupthistokompatibilitätskomplex
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOI	engl. *Multiplicity of infection*, Multiplizität der Infektion
mRNA	engl. *messenger ribonucleic acid*, Boten-RNA
NaCl	Natriumchlorid
$NaHCO_3$	Natriumhydrogencarbonat
neg	negativ
NF-κB	engl. *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*

NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NOS2	Stickstoffmonoxid-Synthase-2
PBS	engl. *phosphate buffered saline*, Phosphat-gepufferte Saline
PCR	engl. *polymerase chain reaction*, Polymerase-Kettenreaktion
PE	R-Phycoerythrin
PPRs	engl. *Pattern-Recognition Receptors*
q-PCR	quantitative Echtzeit PCR mit revers transkribierter mRNA
R	Rezeptor
RNA	Ribonukleinsäure
RORγt	engl. *Retinoid-Acid Receptor-related Orphan Receptor gamma t*
rpm	engl. *revolutions per minute*; Umdrehungen pro Minute
RT-PCR	PCR mit revers transkribierter mRNA
s	Sekunde
SAB	Sabouraud
STAT	engl. *Signal Transducer and Activator of Transcription*
SSC	engl. *Sideward Scatter*, Seitwärtsstreulicht
T	Thymin
T-bet	engl. *T-box-expressed-in-T-cells*
TGF-β	engl. *Transforming Growth Factor-beta*, Transformierender Wachstumsfaktor-beta
Th	T-Helferzellen
TNF-α	Tumornekrosefaktor-alpha
TLR	*Toll-like* Rezeptor
TRAF	*TNF receptor associated factor*
Treg	regulatorische T-Zellen
TSLP	engl. *Thymic stromal lymphopoietin*
Tyk	Tyrosin-Kinase
WT	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Humanpathogene Pilze

Pilzinfektionen stellen ein gravierendes medizinisches Problem dar. Ein Viertel der Weltbevölkerung (zirka 1,7 Milliarden Menschen) sind von oberflächlichen Infektionen der Haut und Nägel mit einem fungalen Erreger betroffen [1]. Mukosale Infektionen im Oral- und Genitaltrakt sind weitverbreitet. Beispielsweise leiden 50-70% der Frauen unter mindestens einer *Vulvovaginitis candidomycetica* in ihrem Leben [2]. Invasive Mykosen haben im Vergleich zu oberflächlichen Infektionen eine viel niedrigere Inzidenz, sind jedoch mit inakzeptabel hohen Mortalitätsraten assoziiert. Mehr als 90% aller bekannten Pilz-assoziierten Todesfälle resultieren aus Infektionen mit einer der vier folgenden Gattungen: *Cryptococcus*, *Candida*, *Aspergillus* und *Pneumocystis* [3].

1.2 *Cryptococcus neoformans*

Die Gattung *Cryptococcus* umfasst 37 Arten [4]. Humane Infektionen werden meist durch *Cryptococcus neoformans* und *Cryptococcus gattii* verursacht [4]. Bei *C. neoformans* handelt es sich um einen weltweit verbreiteten opportunistischen Erreger, der insbesondere für immungeschwächte Menschen, wie HIV-Infizierte oder Transplantatrezipienten ein großes Problem darstellen kann [4]. Die Infektion erfolgt üblicherweise durch Inhalation von Sporen oder ausgetrockneten Pilzzellen [5-7]. Diese konnten auf verschiedenen Pflanzen, in Vogelkot (vor allem von Tauben) und damit kontaminierten Böden nachgewiesen werden [8, 9]. Immunkompetente Menschen können die (pulmonale) Infektion in der Regel kontrollieren [10], jedoch nicht eliminieren [11]. Auch Jahre nach der Infektion kann eine Immunschwäche zu einer Reaktivierung des Pilzwachstums führen und schwerwiegende Pathologien hervorrufen. Infolge einer Lungenbesiedlung kommt es zur Dissemination in andere Organe, insbesondere dem Gehirn [4]. Eine Hirnhautentzündung, die am Beginn mit Symptomen wie Kopfschmerz, Fieber, eingeschränktem Sehvermögen und allgemeinem Unwohlsein assoziiert ist, stellt die Haupttodesursache der Kryptokokkose bei HIV-Patienten dar [12]. Jährlich werden zirka eine Million Fälle von *Cryptococcus*-assoziierter Meningitis diagnostiziert, welche in über 600.000 Todesfällen resultieren [13].

Die folgende Abbildung fasst den Aufbau und Infektionsweg des humanpathogenen Pilzes *C. neoformans* zusammen.

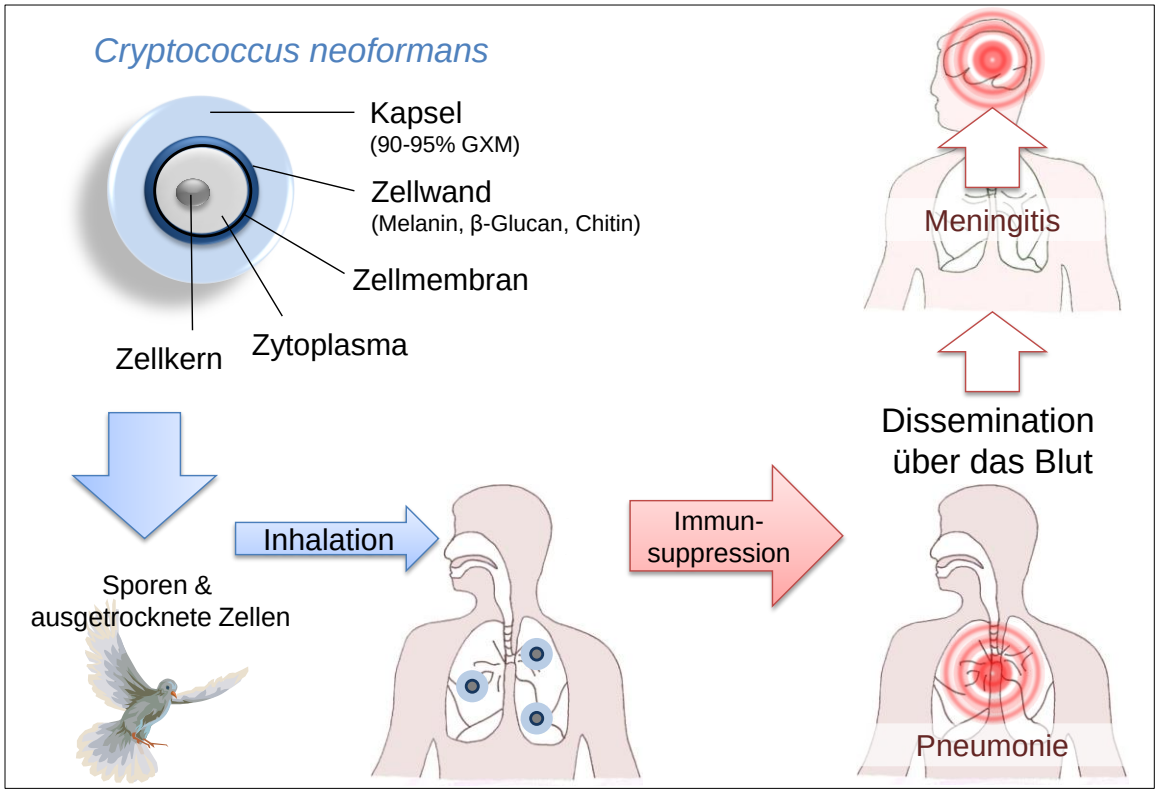


Abbildung 1: Schematische Darstellung zum Aufbau und Infektionsweg von *Cryptococcus neoformans*. Der Pilz *C. neoformans* ist durch seine charakteristische Kapsel gekennzeichnet. Diese besteht zu 90-95% aus dem immunmodulatorisch wirkenden Polysaccharid Glucuronoxylomannan (GXM). In die Zellwand, bestehend aus β-Glucan und Chitin, ist Melanin eingelagert. Ausgetrocknete Pilzzellen und Sporen, welche in Taubenkot vorkommen, werden vom Menschen inhaliert und können nach Immunsuppression in einer Pneumonie resultieren. *C. neoformans* ist in der Lage mit dem Blutstrom ins Gehirn zu disseminieren und eine lebensbedrohliche Meningitis auszulösen.

C. neoformans verfügt über eine Vielzahl von Mechanismen, um der Wirtsabwehr zu entkommen. Diese umfassen die Entwicklung der Polysaccharid-Kapsel, die Produktion von Melanin und Virulenz-assoziierter Enzyme (wie Phospholipase B1 und Urease), die Fähigkeit bei 37°C zu wachsen sowie intrazellulär in Makrophagen zu überleben beziehungsweise proliferieren zu können [14, 15]. Mutanten ohne Kapsel sind weitestgehend avirulent [15, 16]. Die Polysaccharid-kapsel besteht vorwiegend aus Glucuronoxylomannan (90-95%, GXM) und Galactoxylomannan (5-8%, GalXM), welche während der Infektion sezerniert werden und immunmodulatorisch wirken können [15].

Unter anderem wurden folgende Effekte von Kapselbestandteilen beschrieben:

- die Induktion der Apoptose in T- und B-Lymphozyten sowie Makrophagen [17],
- die Produktion inflammatorischer Zytokine durch neutrophile Granulozyten und Hemmung der Chemotaxis dieser [18, 19],
- die Verringerung antimikrobieller Aktivität und Reduktion der Tumornekrosefaktor (TNF)-α und Interleukin (IL)-1β-Bildung sowie Hemmung des Typ1 T-Helferzell (Th1)-induzierenden IL-12 in Monozyten und Makrophagen [20-22] und
- die Herunterregulation der Expression von Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)-Klasse II und B7 mit resultierender Hemmung der T-Zellproliferation [23].

Das Pigment Melanin verleiht *C. neoformans* Schutz vor Phagozytose und oxidativem Burst durch Makrophagen. Zudem ist es an der extrapulmonalen Dissemination beteiligt [24-26]. Melanin wird durch Kupfer-abhängige Laccasen aus Katecholamin synthetisiert. An der Melaninbildung sind zudem Phospholipasen beteiligt. Diese sind zusammen mit den Laccasen in der Zellwand lokalisiert und vermitteln die Zellwandintegrität [26, 27]. Ureasen katalysieren die Hydrolyse von Harnstoff zu Ammoniak und Carbamat, welche das Eindringen von *C. neoformans* in das Zentralnervensystem (ZNS) erleichtern [28, 29]. Verglichen mit anderen Pilzen ist *C. neoformans* relativ thermoresistent und damit in der Lage sich in Säugetieren zu vermehren [30]. *In vivo* konnte gezeigt werden, dass *C. neoformans* fakultativ intrazellulär in Makrophagen überleben und sogar proliferieren kann [31].

In folgender Tabelle sind die Virulenzfaktoren von *C. neoformans* zusammengefasst.

Tabelle 1: Virulenzfaktoren von *Cryptococcus neoformans*. Die Tabelle fasst die Funktion der Virulenzfaktoren in der Pathogenese zusammen (modifiziert nach [32, 33]).

Merkmal	Funktion in der Pathogenes
Kapsel	Immunmodulation, Hemmung der Phagozytose
Laccasen	Hemmung des oxidativem Burst
Melanin	Resistenz vor oxidativem Burst, Hemmung der Phagozytose, Immunmodulation, Resistenz gegenüber antimikrobiellen Peptiden
Phospholipasen	Gewebszerstörung
Ureasen	erleichtern Eindringen ins ZNS, intrazelluläres Wachstum
Wachstum bei 37°C	Thermotoleranz ermöglicht Wachstum in den meisten Säugetieren
Fakultativ intrazellulär	Schutz vor humoralem Immunsystem

1.3 Immunantwort gegen *Cryptococcus neoformans*

Eine effektive Abwehr von *C. neoformans* erfordert ein koordiniertes Zusammenspiel des angeborenen (innaten) und adaptiven Immunsystems.

1.3.1 Angeborene Immunantwort

Die angeborene Immunantwort gegen *Cryptococcus* umfasst das Komplementsystem, welches vor allem die Chemotaxis von Phagozyten fördert und zur Opsonierung von *C. neoformans* beiträgt [14]. Auf der zellulären Seite stehen die Phagozyten, z. Bsp. Dendritische Zellen (DC), Makrophagen und Granulozyten [14]. Die Phagozytose erfolgt nach direkter Erkennung konservierter Pilzstrukturen oder nach Komplementsystem- beziehungsweise Antikörper-vermittelter Opsonisierung [34-36].

1.3.1.1 Erkennungsmechanismen

Die Zellen des angeborenen Immunsystems exprimieren Mustererkennungsrezeptoren (*Pattern-Recognition Receptors*, PRRs) wie *Toll-like* Rezeptoren (TLRs), C-Typ Lektin-Rezeptoren (CTL-Rezeptoren) und Galectine, welche Pathogen-assoziierte Muster (*Pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) auf Pilzen erkennen [37, 38]. Die wichtigsten Pilzstrukturen zur Erkennung von *C. neoformans* sind zum einen das Kapselpolysaccharid GXM sowie die Zellwandkomponenten β-Glucan und Mannan. TLR2 und TLR4 können GXM binden [39]. Dectin-1 ist der wichtigste CTL-Rezeptor zur Erkennung von β-Glucan [39]. Mannan wird durch Galectin-3 erkannt und dient der Unterscheidung von nicht-pathogenen und pathogenen Pilzen [39]. Der Komplementrezeptor CR3 auf Phagozyten erkennt an β-Glucan und GXM angelagertes Komplement. Infolgedessen wird die Phagozytose verstärkt [39].

1.3.1.2 Die Zellen der angeborenen Immunantwort

DCs können *C. neoformans* mittels Phagozytose aufnehmen und fungieren als wichtige Antigen-präsentierende Zellen, die entscheidend zur Aktivierung der adaptiven Immunantwort beitragen [40, 41]. Makrophagen spielen ebenfalls eine bedeutende Rolle bei der Abwehr von *C. neoformans*. So trägt eine adäquate Aktivierung dieser Zellen zur Kontrolle einer Kryptokokken-Infektion bei [32]. Virulenzfaktoren des Pilzes erlauben es ihm jedoch, bei einer unvollständigen Aktivierung der Makrophagen nach der Phagozytose im Phagolysosom zu überleben und sogar zu proliferieren [31]. Dadurch ist *C. neoformans* in der Lage, anderen Abwehrstrategien zu entgehen und eine latente Infektion aufrecht zu erhalten [31, 42-44]. Beispielsweise umgeht er so die Abwehr durch neutrophile Granulozyten, die zum einen mittels oxidativem Burst antifungal wirken können und zum

anderen antimikrobielle Peptide (AMPs), wie β-Defensine, bilden [45-49]. Über den Mechanismus der Expulsion/Extrusion kann *C. neoformans* den Makrophagen wieder verlassen, ohne diesen zu schädigen. Anschließend kann der Erreger entweder im extrazellulären Raum verbleiben, proliferieren und eine Fungämie induzieren oder von einem zum anderen Makrophagen übergehen und im latenten Zustand verharren [50, 51].

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen), als weitere zelluläre Komponente des angeborenen Immunsystems, sind im Stande direkt Perforin-abhängig antifungal zu wirken [52].

Folglich tragen die Zellen der angeborenen Immunantwort selbst bereits zur Kontrolle des Erregers bei und liefern zudem wichtige Signale für die Entwicklung der adaptiven Immunantwort, die für die Kontrolle der Infektion entscheidend ist [53-57].

1.3.2 Adaptive Immunantwort

Die adaptive Immunantwort ist gekennzeichnet durch die hohe Spezifität, mit der Pathogene erkannt werden sowie durch die Entwicklung eines immunologischen Gedächtnisses, das bei einer Reinfektion eine schnellere und effektivere Abwehr ermöglicht. Sie umfasst zelluläre und humorale Komponenten. Protektive Antikörper initiieren den klassischen Aktivierungsweg des Komplementsystems, wirken neutralisierend oder opsonisieren mittels Komplement-unabhängiger Mechanismen [58, 59]. Die Produktion Pilz-spezifischer Antikörper als Folge der adaptiven Immunantwort verstärkt die Phagozytose [39].

Die zelluläre Immunantwort wird durch $CD8^+$ zytotoxische T-Zellen via Perforin und Granzym vermittelt. Die Zytokinproduktion der adaptiven Immunität wird im Wesentlichen durch $CD4^+$ T-Helferzellen realisiert [14, 60-63]. Die Entwicklung einer protektiven Immunität gegen alle Pilze ist an eine adäquate T-Zellaktivierung gebunden [64]. Sowohl T-Helferzellen, als auch zytotoxische T-Zellen sind wichtig für die Eliminierung der Pathogene. Das Vorhandensein von T-Helferzellen ist jedoch entscheidend für das Überleben des Wirtes [64].

1.3.2.1 T-Helferzellen

Nach Antigenstimulation differenzieren naive $CD4^+$ T-Helferzellen (Th) zu verschiedenen Effektorzellen: Th1, Th2, Th17 und regulatorische T-Zellen (Treg). Diese sind durch die Produktion diverser Zytokine sowie verschiedene Effektorfunktionen charakterisiert [65]. Für die Differenzierung zur jeweiligen Effektorzelle ist die Zytokinumgebung entscheidend [66].

Interleukin (IL)-12 und Interferon-gamma (IFN-γ) sind notwendig für die Differenzierung naiver T-Helferzellen zu Th1-Zellen [66]. Im Gegensatz dazu wird für die Entwicklung von Th2-Zellen IL-4 und IL-2/IL-7/ *Thymic stromal lymphopoietin* (TSLP) benötigt [66]. An der Entstehung von Th17-Effektorzellen sind IL-6, IL-21 und der Transformierende Wachstumsfaktor-beta (TGF-β) beziehungsweise IL-1β/IL-23 beteiligt [66, 67]. Die Differenzierung zu Treg setzt die Anwesenheit von TGF-β und IL-2 voraus [66].

Die Th1-Immunantwort verstärkt via IFN-γ die Aktivierung von Makrophagen und resultiert in der Abtötung intrazellulärer Erreger [68, 69]. Im Gegensatz dazu stehen Th2-Zellen via IL-4, IL-5 und IL-13 für die sogenannte humorale Immunantwort, die vor allem gegen extrazelluläre Pathogene gerichtet ist [69].

Th17-Zellen produzieren eine Reihe von Zytokinen, unter anderem IL-17A, IL-17F und IL-22 [70]. Diese Effektorzytokine können sehr schnell während einer mukosalen Infektion produziert werden, so dass ihnen eine entscheidende Rolle bei der Abwehr verschiedener extrazellulärer Pathogene eingeräumt wird [71]. Außerdem wurden Th17-Zellen mit der protektiven Immunantwort gegen verschiedene Bakterien und Pilze in Verbindung gebracht [72].

Treg sind essentiell für die Erhaltung der Homöostase der Immunzellen [73]. Die immunsuppressiven Zytokine IL-10 und TGF-β werden von Treg produziert und hemmen die Proliferation und Zytokinsekretion anderer T-Effektorzellen [74].

In Abbildung 2 sind die Differenzierung, Zytokinproduktion und Effektorfunktion der verschiedenen T-Helferzellsubtypen zusammengefasst.

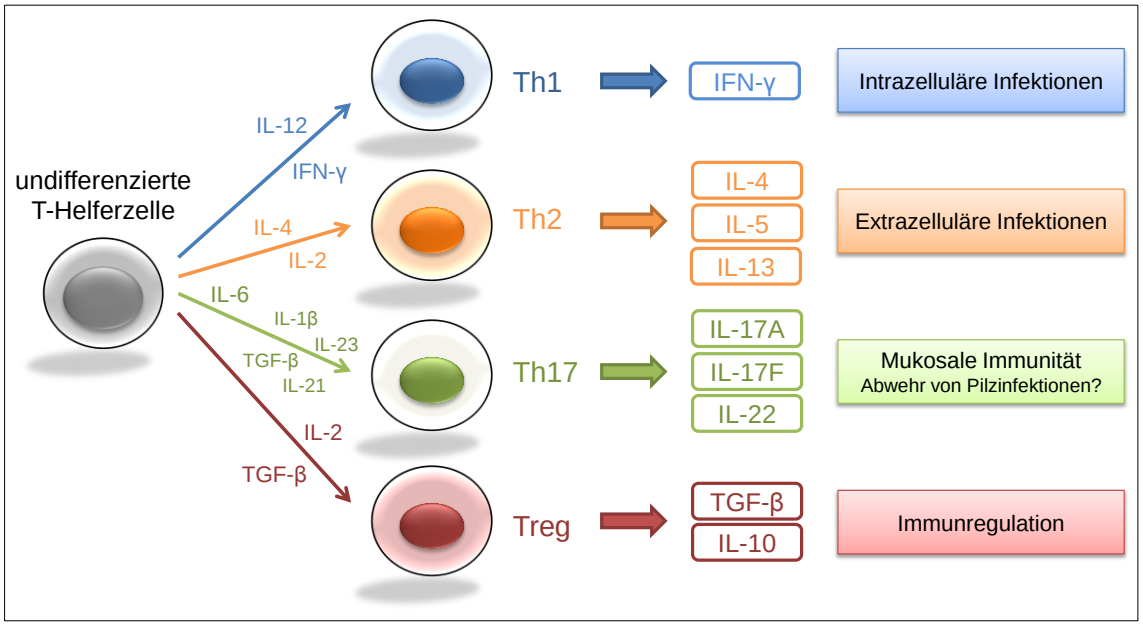


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Differenzierung, Zytokinproduktion und Effektorfunktion der verschiedenen T-Helferzellsubtypen. Die Differenzierung der T-Helferzellsubtypen wird durch das umgebende Zytokinmilieu bestimmt. Für die Entwicklung von Th1-Zellen sind IL-12 und IFN-γ bestimmend. IFN-γ ist das Leitzytokin von Typ1-T-Helferzellen, welche für die Abwehr von intrazellulären Erregern essentiell sind. Th2-Zellen werden nach Stimulation mit IL-4 und IL-2 gebildet. IL-4, IL-5 und IL-13 als Typ2-Zytokine vermitteln Abwehrmechanismen für extrazelluläre Pathogene. Die Funktion von Th17-Zellen bei der mukosalen Immunität und Abwehr fungaler Erreger wird gegenwärtig diskutiert. Die Differenzierung von Th17-Zellen erfolgt in der Anwesenheit von IL-6, IL-21 und TGF-β beziehungsweise IL-1β/IL-23. Die kennzeichnenden Effektorzytokine sind: IL-17A, IL-17F und IL-22. Treg tragen zur Aufrechterhaltung der Homöostase bei und regulieren die Immunantwort. Die Entstehung der Regulatoren basiert auf TGF-β und IL-2, zu den Leitzytokinen werden IL-10 und TGF-β gezählt.

Die Differenzierung der verschiedenen T-Helferzellen ist für die Induktion einer adäquaten Immunantwort gegen unterschiedliche Erreger entscheidend. Neben der Funktion der verschiedenen T-Helfersubpopulationen bei der Abwehr diverser Krankheitserreger wurden auch pathologische Effekte beschrieben. Th1- und Th17-Zellen wurden mit Autoimmunerkrankungen, wie Multiple Sklerose, Morbus Crohn und rheumatoider Arthritis in Verbindung gebracht [75, 76]. Die Th2-assoziierte Immunantwort kann mit allergischen Reaktionen und Asthma assoziiert sein [75, 76]. Eine pathologische Funktion von Treg-Zellen bei verschiedenen Tumorerkrankungen wird aktuell diskutiert [77].

1.3.2.1 Induktion der T-Helferzellantwort

Residente Phagozyten der Lunge, vor allem Dendritische Zellen (DCs) und Alveolarmakrophagen (AM) sind die ersten Immunzellen, welche nach Inhalation von *C. neoformans* dem Pathogen ausgesetzt sind [78]. Beide Zelltypen exprimieren *C. neoformans* erkennende Mustererkennungsrezeptoren [40, 41, 79-83] und bilden nach Phagozytose Zytokine und Chemokine [35, 41, 84-88]. Nach Infektion migrieren DCs zu den thorakalen Lymphknoten [89-91]. Innerhalb der drainierenden Lymphknoten proliferieren die sensibilisierten T-Helferzellen [92] und kolokalisieren anschließend zusammen mit neu rekrutierten DCs innerhalb bronchovaskulärer Infiltrate der Lunge [93]. Eine protektive Immunantwort eines gesunden Wirtes beruht auf einer koordinierten Interaktion zwischen Antigen-präsentierenden Zellen und Th1-Effektorzellen. IFN-γ induziert eine klassische Aktivierung von Makrophagen, welche in der Lage sind Kryptokokken zu zerstören [94-96]. Im Gegensatz dazu resultiert eine alternative Aktivierung der Phagozyten, induziert durch eine Th2-basierte Antwort, in der Proliferation der Pilze mit erhöhtem Risiko einer anschließenden Dissemination [97, 98]. In den folgenden Abschnitten ist die Rolle der verschiedenen T-Helferzellsubtypen in der Kryptokokkose detaillierter dargestellt. Abbildung 3 fasst die Induktion einer protektiven Immunantwort gegen *C. neoformans* zusammen.

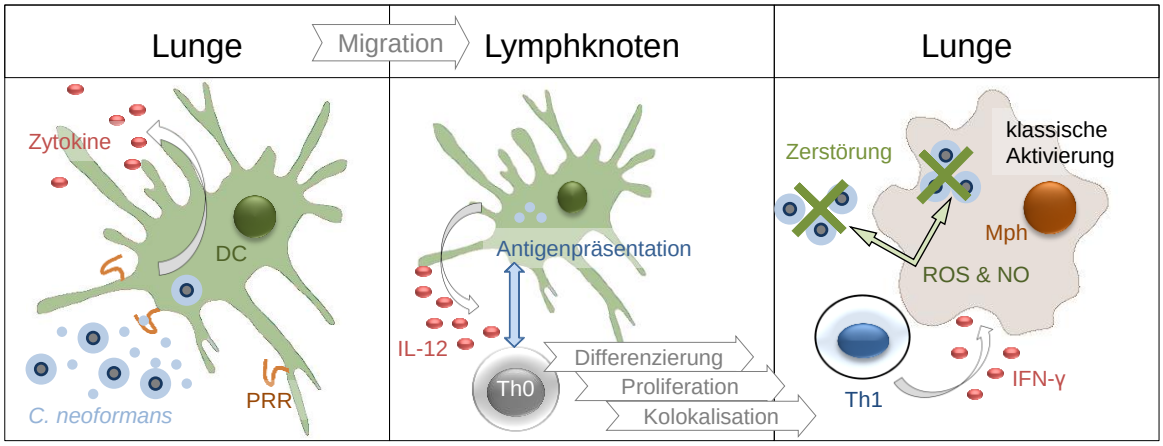


Abbildung 3: Zusammenfassende Darstellung der Induktion einer protektiven T-Helferzellantwort gegen *Cryptococcus neoformans*. *Links:* Myeloide Dendritische Zellen (DC) erkennen (mittels Mustererkennungsrezeptoren (PRRs)) und phagozytieren *C. neoformans*. Infolge dessen werden Zytokine sezerniert. *Mitte*: Aktivierte DCs wandern in lymphatisches Gewebe und präsentieren Kryptokokken-Antigene an naive T-Zellen (Th0) mittels Haupthistokompatibilitätskomplex-Klasse-II (MHCII). In Kombination mit der Kostimulation von CD28 auf T-Helferzellen (Th), über-B7-Moleküle der DCs, erfolgt die Differenzierung zu Th1-Zellen unter Anwesenheit von Interleukin (IL)-12. *Rechts*: Antigen-spezifische Th1-Zellen produzieren Interferon-gamma (IFN-γ), welches in der Lage ist Makrophagen (Mph) klassisch zu aktivieren. Diese Makrophagen weisen eine Stickoxid (NO)-Bildung und eine verstärkte Segregation von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) auf, welche zur Zerstörung von *C. neoformans* beitragen (modifiziert nach [99]).

1.3.2.2 Rolle der T-Helferzellen bei der Kryptokokkose

1.3.2.2.1 Typ1-T-Helferzellen

Die Th1-Immunantwort vermittelt Schutz vor Pilzinfektionen [100]. Es konnte gezeigt werden, dass IL-12 als Th1-induzierendes Zytokin eine essentielle Rolle für die Protektion während der Kryptokokkose hat [101]. Die Expression der Th1-Zytokine Tumornekrosefaktor-alpha (TNF-α) und IFN-γ verbessern die fungale Kontrolle [96, 102-104]. Nach Behandlung mit IFN-γ konnte ein verlängertes Überleben *C. neoformans*-infizierter Mäuse gezeigt werden [103]. Weiterhin werden Makrophagen durch IFN-γ klassisch aktiviert [105]. Diese Makrophagen sind durch die erhöhte Aktivität des Enzyms Stickstoffmonoxid-Synthase-2 (NOS2) gekennzeichnet [105]. NOS2 produziert fungizides Stickstoffmonoxid aus L-Arginin und führt damit zur Zerstörung von *C. neoformans* [105]. Zudem produzieren klassisch aktivierte Makrophagen proinflammatorische Zytokine und regulieren den Haupthistokompatibilitätskomplex-Klasse-II (MHCII) herauf, welcher essentiell für die Interaktion mit Th-Zellen ist [105]. Der *Knockout* von IFN-γ in Mäusen resultiert in erhöhten Pilzlasten [106].

1.3.2.2.2 Typ2-T-Helferzellen

Im Gegensatz zur protektiven Funktion von Th1-Zellen begünstigt eine Th2-assoziierte Immunantwort die Entwicklung der Kryptokokkose [107].

Wichtige Effektorzytokine einer Th2-Immunantwort sind IL-4, IL-5 und IL-13. IL-4 und IL-13 binden an verschiedenen Rezeptorkomplexen, welche sich die hochaffine IL-4-Rezeptor-alpha (IL-4Rα)-Kette teilen [108, 109] und induzieren die Entwicklung von alternativ aktivierten Makrophagen [110]. Diese Makrophagen produzieren kein Stickstoffmonoxid und sind durch die erhöhte Expression von Arginase-1 und des Mannoserezeptors (CD206) gekennzeichnet [110]. Arginase-1 spaltet L-Arginin in Harnstoff, eine leicht zugängliche Stickstoffquelle für *C. neoformans* [105]. Zudem werden in alternativ aktivierten Makrophagen die Chitinase-ähnlichen Proteine YM1 und YM2 induziert, diese bilden Kristalle, welche zur Lungenpathologie beitragen [105]. Die vermehrte Expression von CD206 erhöht die Phagozytoserate [105]. In alternativ aktivierten Makrophagen kommt es im Unterschied zu klassisch aktivierten Makrophagen zur intrazellulären Vermehrung von *C. neoformans* [105].

Die Bedeutung der IL-4- und IL-13-vermittelten Immunantwort im Kontext der Kryptokokkose konnte mit Hilfe des *Knockouts* des IL-4Rα beeindruckend dargestellt werden. Zuvor suszeptible Mäuse zeigten nach intranasaler Infektion mit *C. neoformans* einen resistenten Phänotyp [111].

IL-13 induziert in der Lunge eine Eosinophilie, Becherzellmetaplasie, vermehrte Schleimproduktion und Atemwegshyperreaktivität [107, 112].

Neben IL-4 und IL-13 ist IL-5 ein weiteres bedeutendes Th2-Zytokin für die Differenzierung, Rekrutierung und Aktivierung von eosinophilen Granulozyten [113].

1.3.2.2.3 Typ17-T-Helferzellen

Die Entwicklung von Th17-Zellen basiert auf der Expression des Transkriptionsfaktors RORγt [114]. Im Gegensatz dazu sind die Transkriptionsfaktoren T-bet beziehungsweise GATA3 in die Differenzierung von Th1- und Th2-Zellen involviert und hemmen die Entstehung von IL-17-produzierenden T-Zellen [115, 116].

Obwohl Th17-Zellen auf Grund der Produktion von IL-17 ihren Namen erhielten, sind sie in der Lage eine Reihe von Zytokinen, z. Bsp. IL-17A, IL-17F und IL-22 zu produzieren [117]. IL-17A und IL-17F sind auf Grund der Rekrutierung neutrophiler Granulozyten ins infizierte Gewebe bedeutend für die Abwehr extrazellulärer Bakterien [118]. Produzenten dieser Zytokine, spezielle Funktionen sowie die Zielzellen dieser Interleukine werden im Folgenden ausführlich dargestellt.

1.3.2.3 Interleukin-17A und F

Die Zytokine IL-17A und IL-17F gehören zu einer Familie von 6 Proteinen (IL-17A-F) [119]. Innerhalb dieser Gruppe weisen IL-17A und IL-17F die höchste Homologie von 50% (auf Proteinlevel) auf [120]. Murines IL-17A ist ein 21 kDa Glykoprotein von 147 Aminosäuren [121]. Sowohl IL-17A als auch IL-17F bilden funktionell aktive Homodimere, es konnte jedoch auch ein Heterodimer von IL-17A-IL-17F nachgewiesen werden [122, 123].

Für IL-17A und IL-17F sind eine Reihe von Produzenten beschrieben, darunter finden sich Th17-Zellen, $CD8^+$ Zellen, γδ T-Zellen, natürliche Killer (NK)/NKT-Zellen, *Lymphoid-Tissue-inducer* (LTi)-Zellen, *Innate Lymphoid Cells* (ILC)17 und neutrophile Granulozyten [124-126].

Die Familie der IL-17-Rezeptoren (IL-17R) umfasst die 5 Rezeptor-Untereinheiten IL-17RA-IL-17RE, wobei IL-17RA und IL-17RC als Bindungspartner von IL-17A und IL-17F identifiziert werden konnten [127]. Der IL-17RA wurde zunächst als Rezeptor für IL-17A bei Säugetieren identifiziert [128]. Er bindet zudem IL-17F. Demzufolge ist er notwendig für die IL-17A, IL-17A-IL-17F und IL-17F vermittelte Signaltransduktion [129]. Zudem präzipitiert IL-17RA Liganden-abhängig mit IL-17RC. Die exakte Stöchiometrie des IL-17A-bindenden Rezeptorkomplexes ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Analysen des IL-17RC mit nativen Gelen weisen

auf die Bildung eines Trimers aus zwei IL-17RA Untereinheiten und einer IL-17RC Untereinheit hin [124, 130]. IL-17RA wird ubiquitär exprimiert, wobei hohe Konzentrationen im hämatopoetischen Gewebe detektiert werden konnten [128, 131]. Auch IL-17RC wird auf einer Reihe von Zellen exprimiert, insbesondere Epithelzellen, Fibroblasten und andere Bindegewebszellen konnten identifiziert werden [128, 133]. So sind die Expressionsmuster von IL-17RA und IL-17RC nicht exakt gleich. IL-17RA, nicht jedoch IL-17RC, kann auf verschiedenen Immunzellen detektiert werden [133]. IL-17RC weist sowohl eine hohe Affinität für IL-17A, als auch für IL-17F auf. Im Gegensatz dazu hat IL-17RA eine hohe Affinität für IL-17A, jedoch eine niedrigere Affinität für IL-17F [134].

Als Hauptzielzellen von IL-17A wurden Epithelzellen, Endothelzellen und Fibroblasten identifiziert. Zudem konnten Effekte auf Makrophagen und DCs nachgewiesen werden [124, 135].

Nach Rezeptorbindung erfolgt die Aktivierung von MAP-Kinasen (extrazelluläre signalregulierte Kinase (Erk) und p38 Kinase) sowie der Transkriptionsfaktoren C/EBPβ, C/EBPδ und NF-κB, [124, 136]. Die Aktivierung von NF-κB erfordert das Adaptorprotein Act1 [137] und den TNF-Rezeptor-assoziierten Faktor TRAF6 [138]. IL-17A und IL-17F induzieren die Produktion folgender proinflammatorischer Zytokine: IL-6, Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor (G-CSF) und Granulozyten-Makrophagen-stimulierender Faktor (GM-CSF). Ebenfalles induziert werden die Chemokine CXCL1, CXCL2 und CXCL5 sowie antimikrobielle Peptide. Außerdem verstärken sie die Granulopoese und die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten [119, 120, 139].

In Abbildung 4 sind die zellulären Quellen, Rezeptoren, Zielzellen und Effekte von IL-17A und IL-17F zusammengefasst.

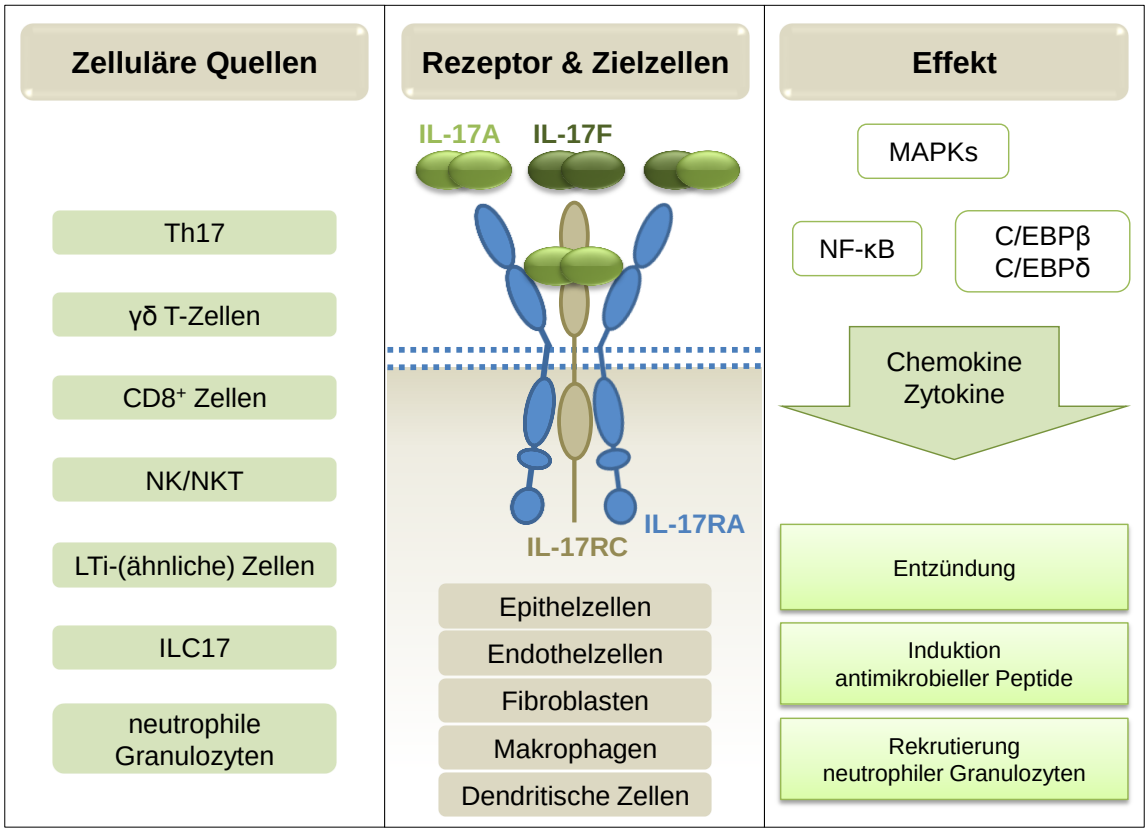


Abbildung 4: Zusammenfassende Darstellung der IL-17A/IL-17F produzierenden Zellen, Rezeptoren, Zielzellen und Effektorfunktionen. IL-17A und IL-17F werden von einer Reihe von Immunzellen, wie T-Helferzellen Typ17 (Th17), γδ T-Zellen, $CD8^+$ T-Zellen, natürlichen Killer (NK)/NKT-Zellen, *Lymphoid-Tissue-inducer* (LTi)-Zellen, *Innate Lymphoid Cells* (ILC)17 und neutrophilen Granulozyten produziert. Beide Zytokine wurden sowohl als Homo- als auch Heterodimer beschrieben und binden an einen Rezeptorkomplex aus IL-17RA und IL-17RC. Hauptzielzellen sind vor allem Epithel- und Endothelzellen sowie Fibroblasten. Zudem konnten Effekte auf Makrophagen und DCs beobachtet werden. Nach Rezeptorbindung erfolgt die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF-κB, MAP-Kinasen, C/EBPβ und C/EBPδ, welche in der Bildung verschiedener Chemokine und Zytokine resultiert und mit einer proinflammatorischen Reaktion, Induktion antimikrobieller Peptide und der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten einher geht (modifiziert nach [124]).

1.3.2.3.1 IL-17A bei der Kryptokokkose

Th17-Zellen kommen in mukosalen Grenzflächen vor, wo eine kontinuierliche Exposition mit Mikroorganismen, darunter ubiquitär vorkommende fungale Pathogene, erfolgt [140]. Untersuchungen zur Rolle der IL-17A-produzierenden T-Zellen bei der Abwehr von Pilzen haben zu widersprüchlichen Ergebnissen geführt. Huang und Mitarbeiter zeigen, dass IL-17A-Rezeptor-defiziente Mäuse eine geringere Resistenz gegenüber einer systemischen *Candida albicans* Infektion aufweisen [141]. Höhere fungale Organlasten in den Nieren sowie ein reduziertes Überleben sind assoziiert mit verringerter Mobilisierung peripherer neutrophiler Granulozyten und deren Rekrutierung in die Nieren [141]. Es gibt jedoch auch Hinweise auf eine negative Rolle von IL-17A und IL-23 bei fungalen Infektionen. IL-23 spielt eine entscheidende Rolle bei der Erhaltung von Th17-Effektorfunktionen [142, 143]. Der *Knockout* von IL-23p19, einer Untereinheit von IL-23, resultiert in einem weniger suszeptiblen Phänotyp nach intragastraler Infektion mit *C. albicans* und intranasaler Infektion mit *Aspergillus fumigatus* und führt zu einer verstärkten Produktion von IL-12 und IFN-γ [144].

Die Rolle Th17-assoziierter Effektorfunktionen in der Kryptokokkose konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden. Nach *Knockout* von IL-23p19 kann ein mäßig reduziertes Überleben und eine verminderte Elimination der Kryptokokken in der Leber gezeigt werden bei stark reduzierter Produktion von IL-17A [145]. Es wurde gefolgert, dass IL-23 die dominantere, protektive Rolle von IL-12 während einer chronischen Infektion durch eine verstärkte Entzündungsreaktion und individuelle Zytokinregulation komplementiert.

Die Behandlung intranasal *C. neoformans*-infizierter Mäuse mit anti-IL-17A-Antikörpern führt in der Frühphase zu erhöhten Pilzlasten in der Lunge [146]. Die Autoren schließen auf eine Rolle von IL-17A in der frühen Immunantwort gegen *C. neoformans* [146]. Eine Beteiligung von IL-17A bei der klassischen Aktivierung von Makrophagen kann zwar nicht nachgewiesen werden, jedoch wird in primären humanen Makrophagen gezeigt, dass eine IL-17A-Behandlung die intrazelluläre Proliferation von *C. neoformans* reduziert [95, 146].

Wozniak und Mitarbeiter können zeigen, dass der Schutz vor einer pulmonalen Infektion mit dem IFN-γ-produzierenden *C. neoformans* Stamm H99γ mit der IL-17A-Synthese assoziiert ist [126]. In dieser Studie werden neutrophile Granulozyten als Hauptquelle von IL-17A identifiziert. Es liegt also nahe, dass die mögliche IL-17A-vermittelte Protektion nicht mit der Th17-Immunantwort in Verbindung zu bringen ist [126]. Der *Knockout* von IL-17A resultiert initial in erhöhten Organlasten, zu einem späteren Zeitpunkt können jedoch keine Unterschiede mehr festgestellt werden [126]. Nach *Knockout* des IL-17RA können

keine Unterschiede im Überleben der Tiere, verglichen mit Wildtyptieren, detektiert werden [126]. Die Th1-assoziierte Immunantwort ist protektiv. Einen Anteil von IL-17A zur optimalen Abwehr der pulmonalen Infektion mit *C. neoformans* wird jedoch diskutiert [126].

Eine erst kürzlich publizierte Studie zeigt, dass IL-17A die Wirtsabwehr gegen einen mäßig virulenten *C. neoformans* Stamm (52D) verstärkt [147]. Die Autoren beschreiben die Rekrutierung von Leukozyten in die Lunge, eine Verstärkung der IFN-γ-Produktion durch T-Zellen und die Aktivierung von myeloiden Zellen als Effekte von IL-17A.

Insgesamt weisen die Daten daraufhin, dass IL-17A einen Beitrag zur optimalen Abwehr, vor allem in der Frühphase der Infektion mit *C. neoformans,* leistet.

1.3.2.4 Interleukin-22

Neben IL-17A und IL-17F ist IL-22 ein weiteres wichtiges Effektorzytokin der Th17-assoziierten Immunantwort (siehe Abbildung 2). IL-22 gehört zur IL-10-Familie und ist ein Glykoprotein von 146 Aminosäuren mit einer errechneten Masse von 16.7 kDa [148, 149]. Western Blot Analysen von rekombinanten IL-22 weisen auf ein höheres Molekulargewicht hin, welches sich möglicherweise aus der Bildung von Homodimeren ergibt [150].

Die Produktion von IL-22 konnte in verschiedenen Immunzellen nachgewiesen werden. So wird IL-22 in Th1, Th17 und humanen Th22-Zellen produziert [149]. Des Weiteren konnten verschiede Zellen der innaten Immunantwort mit der Bildung von IL-22 assoziiert werden, darunter NK/NKT-, LTi-(ähnliche)-Zellen und ILC22 (auch NK22) [149].

IL-22 bindet an einen Heterodimer-Rezeptorkomplex, bestehend aus der IL-10-Rezeptor-Kette-2 (IL-10R2) und der IL-22-Rezeptor-1-Kette (IL-22R1) [149]. IL-22R1 wird ausschließlich auf Gewebszellen, nicht aber auf Immunzellen, exprimiert [149]. IL-10R2 wird ubiquitär exprimiert [151]. IL-22 bindet primär IL-22R1, was nachfolgend die Bindung von IL-10R2 ermöglicht und damit die Formation des dreiteiligen Komplexes komplementiert. Die Bindung von IL-10R2 wird durch eine Konformationsänderung, als Folge der Bindung von IL-22 an IL-22R1 möglich [149]. Folglich bestimmt die Expression der IL-22R1-Kette, ob eine Zelle für IL-22 empfänglich ist [152].

Die Bioverfügbarkeit von IL-22 wird durch das lösliche IL-22-bindende-Protein (IL-22BP), das als natürlicher Antagonist fungiert, reguliert [153].

Die Expression von IL-22R1 konnte in verschiedenen Organen (Haut, Niere, Pankreas, Dünndarm, Leber, Kolon, Lunge und Trachea) gezeigt werden. Dabei wurde die stärkste Expression in der Haut und dem Pankreas nachgewiesen [154]. Innerhalb der Haut wurden verschiedene Zelltypen analysiert und eine starke Expression des IL-22R1 innerhalb der Keratinozyten detektiert [154, 155]. Außerdem konnten IL-22-assoziierte Effekte in verschiedenen Fibroblasten nachgewiesen werden [152]. Weiterhin wurden Hepatozyten und azinöse Zellen des Pankreas als wichtige Zielzellen beschrieben [156, 157]. Interessanterweise, findet man in Schutzschichten des Körpers, welche die erste Barriere zur Abwehr pathogener Organismen darstellen, eine starke Expression von IL-22R1. Diese Barrieren enthalten vor allem Epithelzellen [152]. In verschiedenen funktionellen Studien konnten Epithelzellen des Intestinal- und Respiratorischentraktes als Hauptzielzellen von IL-22 identifiziert werden [152].

Nach Bindung von IL-22 an den Rezeptor erfolgt die Phosphorylierung der Tyrosinkinasen Tyk2 und Janus-Kinase-1 (Jak1) [158], welche in der Aktivierung

der Signaltransduktoren und Transkriptionsfaktoren STAT3 und abhängig vom System auch STAT1 und STAT5 resultieren [159, 160]. Außerdem induziert IL-22 drei MAP-Kinasen: Erk, c-Jun N-terminale Kinasen (JNK) und p38 [158].

IL-22 induziert in Epithelzellen die Expression antimikrobieller Peptide [151, 161]. Im Gegensatz zu den starken proinflammatorischen Effekten von IL-17A induziert IL-22 regenerative Prozesse in Epithelzellen. IL-22 bewirkt Reepithelialisierung, verstärkt die Migration und Proliferation von Epithelzellen und hemmt die Differenzierung der Keratinozyten [151, 162, 163]. Die IL-22-induzierte Modulation der Keratinozytenfunktion ähnelt der bei der Psoriasis und/oder Wundheilung, was die Vermutung zulässt, dass IL-22 in beide Prozesse involviert ist [160, 162, 164]. Darüber hinaus wirkt IL-22 positiv auf die Lungenfunktion und fördert die Barriere-Funktion mittels einer Induktion der Epithelzellproliferation [165]. In Hepatozyten induziert IL-22 antiapoptotische und mitogene Proteine via STAT3 und schützt vor einer systemischen Entzündung durch die Induktion des Lipopolysaccharid-bindenden-Proteins [166]. Außerdem stimuliert IL-22 während der Infektion mit *Citrobacter rodentium* die Produktion von protektivem Mukus (Muc1, Muc3, Muc10 und Muc13) im Darm [167].

Neben dem regenerativen Effekt auf Epithelzellen ist IL-22 auch in der Lage die proinflammatorische Wirkung von TNF-α auf Keratinozyten zu verstärken [168]. Jüngste Untersuchungen zeigen, dass IL-17A die proinflammatorischen Effekte von IL-22 in der Lunge verstärkt [169].

Über die Funktion von IL-22 bei fungalen Infektionen ist wenig bekannt [149]. Eine Reihe von antimikrobiellen Peptiden, welche als Reaktion auf IL-22 produziert werden (beta-Defensin (BD)2, BD3, S100A8 und S100A9), wirken gegen *Candida albicans* [170, 171]. In einem Maus-Infektionsmodell der oropharyngealen Kandidose wird die Rolle von IL-22 untersucht. In Wildtypmäusen kann die Infektion eliminiert werden, hingegen wiesen IL-22-defiziente Tiere ein vermindertes Abwehrvermögen auf [172]. Außerdem kann in einem intragastralen und systemischen Modell eine essentielle Rolle für IL-22 beschrieben werden [173]. Die Autoren zeigen, dass IL-22-defiziente Mäuse das Pilzwachstum weniger gut kontrollieren können. In Abwesenheit von IFN-γ oder des IL-17RA ist IL-22 erhöht nachweisbar und vermittelte Schutz [173].

Menschen mit einer niedrigen Bioaktivität von IL-22, IL-17A und IL-17F, resultierend aus systemischen, neutralisierenden Autoantikörpern gegen diese Zytokine leiden verstärkt unter rezidivierender Kandidose. Diese chronische mukokutane Kandidose tritt im Kontext des Autoimmun-polyglandulären Syndroms Typ 1 auf [174].

Die folgende Abbildung fasst die zellulären Quellen, Rezeptoren, Zielzellen und Effekte von IL-22 zusammen.

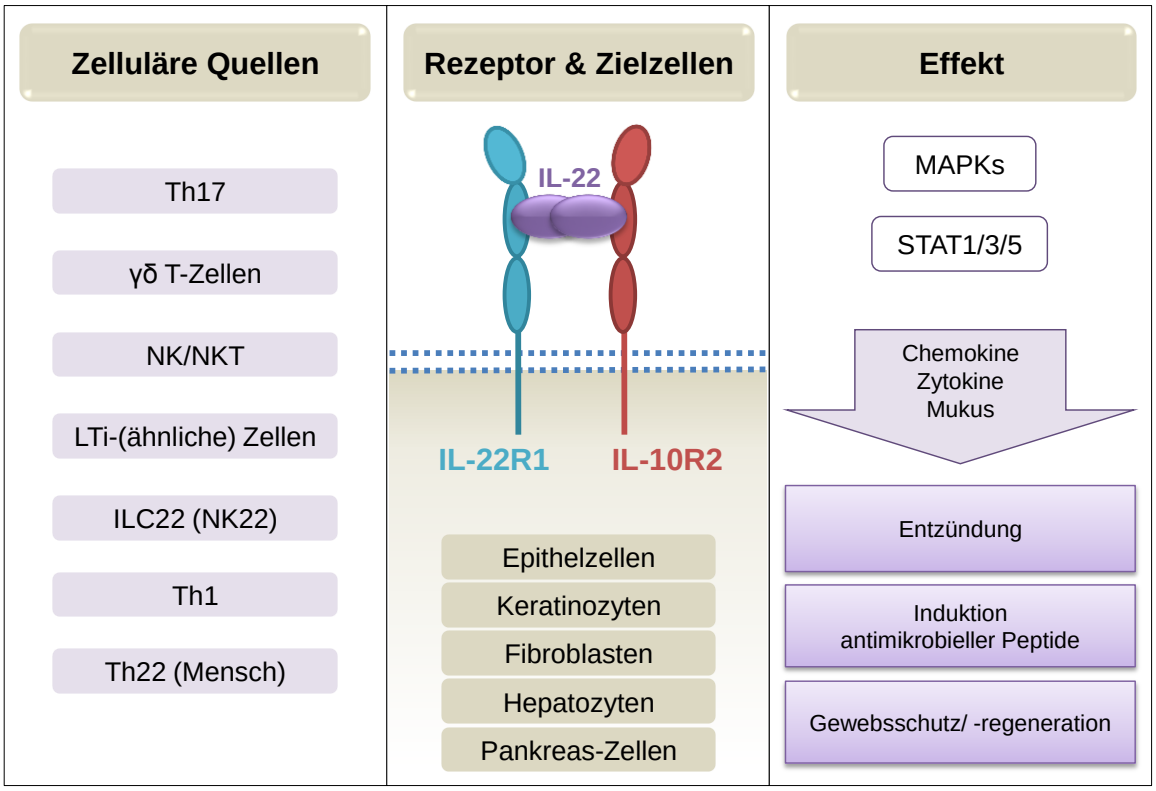


Abbildung 5: Zusammenfassende Darstellung der IL-22-produzierenden Zellen, Rezeptoren, Zielzellen und Effektorfunktionen. Als zelluläre Quellen von IL-22 wurden die Folgenden beschrieben: Th17, γδ T-, NKT, LTi-(ähnliche)-Zellen, ILC22 und Th1 sowie im Menschen Th22. Der Rezeptor für IL-22 setzt sich aus IL-22R1 und IL-10R2 zusammen und eine Wirkung wurde auf Epithelzellen, Keratinozyten, Fibroblasten, Hepatozyten und azinöse Zellen des Pankreas beschrieben. Nach Rezeptorbindung erfolgt eine Aktivierung verschiedener MAP-Kinasen und STAT1/3/5. Neben der Induktion von antimikrobiellen Peptiden konnten sowohl proinflammatorische Effekte, als auch Gewebsregeneration nachgewiesen werden.

1.3.2.5 Th17-Zytokin-assoziierte Induktion von AMPs

IL-17A, IL-17F und IL-22 induzieren die Expression von antimikrobiellen Peptiden (AMPs), z.B. humanes beta-Defensin-2 (HBD2), HBD3 [154] und Calgranulin, in humanen Hautkeratinozyten und bronchialem Epithel [151, 161, 164, 165]. Darüber hinaus induzieren IL-17A und IL-22 synergistisch die Lipocalin-2 Expression in trachealen Epithelzellen der Maus. Diese Induktion ist notwendig für die antimikrobielle Aktivität gegen das Gram-negative Bakterium *Klebsiella pneumoniae* [165]. Auch eine antifungale Wirkung von AMPs auf *C. neoformans* kann nachgewiesen werden [175, 176].

Verglichen mit konventionellen antimikrobiellen Wirkstoffen, welche speziell gegen Bakterien oder Pilze wirken, haben AMPs oft ein breiteres Wirkspektrum mit Aktivität gegen Bakterien, Pilze, Parasiten, behüllte Viren und sogar Krebszellen [177]. AMPs stellen so einen essentiellen Teil der innaten Immunantwort dar und dienen so der ersten Abwehr vor Infektionen [177].

1.3.2.6 Zusammenfassung

Eine Zusammenfassung der wichtigsten Effektorfunktionen der verschiedenen T-Helferzellsubpopulationen während der Kryptokokkose findet sich in der folgenden Abbildung.

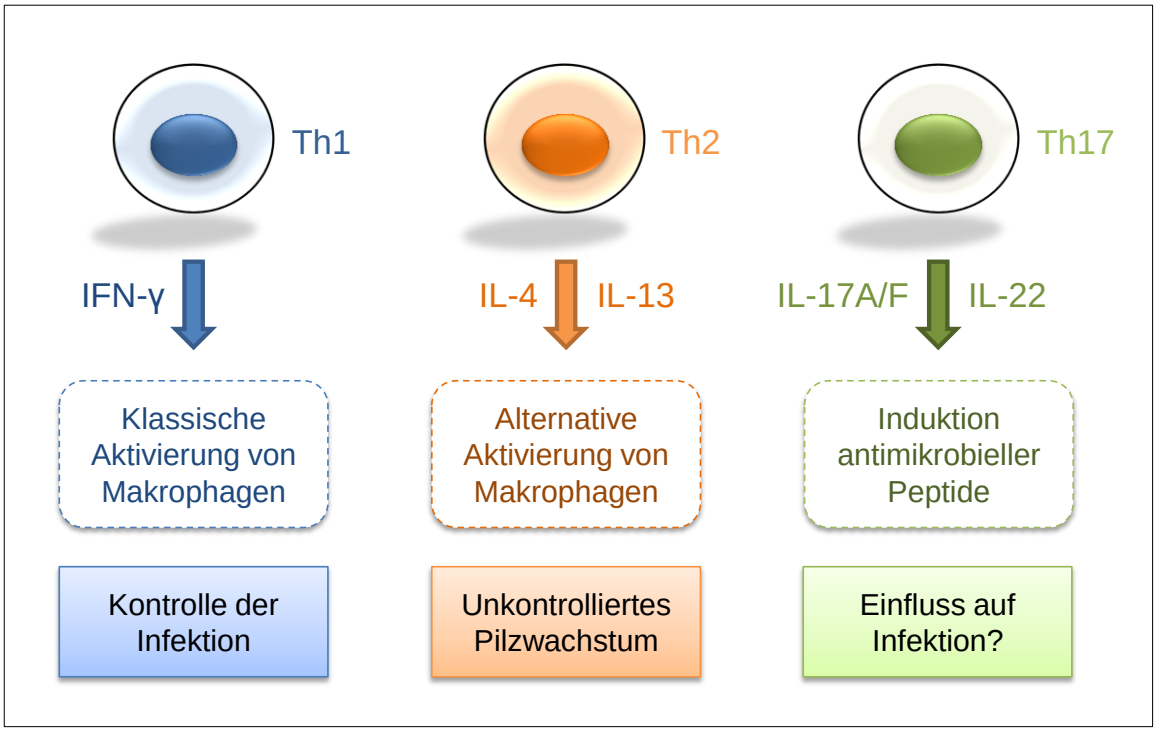


Abbildung 6: Schematische Darstellung der wichtigsten Effektorfunktionen der T-Helferzellsubpopulationen bei der Kryptokokkose. IFN-γ resultiert in der klassischen Aktivierung der Makrophagen, die einen wichtigen Beitrag zur Kontrolle der Infektion leisten. Im Gegensatz dazu aktivieren die Th2-Zytokine IL-4 und IL-13 Makrophagen alternativ. In derartig aktivierten Phagozyten ist *C. neoformans* in der Lage zu überleben und sogar zu proliferieren. Es kommt zum unkontrollierten Pilzwachstum. Eine Funktion der Th17-Zykokine ist die Induktion antimikrobieller Peptide. Ein möglicher protektiver Effekt der Th17-assoziierten Immunantwort bei der Kryptokokkose wird diskutiert.

1.4 Zielstellung

Besonders bei immunsupprimierten Personen ist die Behandlung der akuten Kryptokokkose eine Herausforderung [10]. Die Mortalität bei HIV-Patienten mit Kryptokkoken-Meningitis, nach einem Jahr Behandlung, liegt trotz Kombination von antifungalen Medikamenten mit einer hochaktiven antiretroviralen Therapie (HAART) bei 25% [178]. Die hohen Mortalitätsraten unterstreichen die Signifikanz der Entwicklung neuer Behandlungsstrategien, auch im Hinblick auf die Möglichkeiten neuer Immuntherapeutika. Überdies steigt die Anzahl nicht HIV-assoziierter *C. neoformans* Infektionen mit der Entwicklung der Transplantationsmedizin bzw. der Anwendung von Immunsuppressiva. Obendrein ist die langwierige Behandlung einer *Cryptococcus*-assoziierten Meningitis mit dem vorwiegend verwendeten Antimykotikum Amphotericin B mit erheblichen Nebenwirkungen, wie Übelkeit, Fieber, Hypoxie, Veränderungen des Blutdruckes und Nierenschädigungen behaftet [179]. Für Fluconazol wurden Resistenzentwicklungen von *C. neoformans* beschrieben [180]. Die Entwicklung neuer Prophylaxen oder Behandlungsstrategien erfordert die weiterführende Analyse der Immunantwort gegen *C. neoformans*. Für neue immunmodulatorische Behandlungen oder Impfstrategien könnten, neben protektiven Th1-Zytokinen, möglicherweise auch Th17-assoziierte Zytokine einen neuen Ansatz liefern. Die Rolle dieser Zytokine bei der Abwehr fungaler Erreger, vor allem von IL-17A, wird zwar weiterhin kontrovers diskutiert, im Zusammenhang mit der Kryptokokkose jedoch scheint die Beteiligung an der frühen Abwehr denkbar. Das Vorkommen von Th17-Zellen in der Mukosa sowie die Induktion von AMPs durch IL-17A, IL-17F und IL-22, sprechen für die mögliche Relevanz bei der Abwehr einer pulmonalen Mykose. Eine Immuntherapie mit Th17-assoziierten Zytokinen könnte somit möglicherweise als neuartiges, ergänzendes Therapeutikum interessant werden. Bisher gibt es nur wenige Studien zur Untersuchung der Signifikanz von IL-17A bei einer Infektion mit *C. neoformans*. Die Funktion von IL-22 wurde in keiner bisher publizierten Arbeit untersucht. Ziele dieser Arbeit sind:

1. die Untersuchung der Induktion Th17-assoziierter Zytokine im Verlauf der bronchopulmonalen Infektion mit *C. neoformans* in der Maus,
2. die Charakterisierung der Produzenten dieser Zytokine in der murinen Lunge sowie
3. die Analyse der *in-vivo*-Funktion der Th17-assoziierten Immunantwort, beziehungsweise der einzelnen Th17-Zytokine.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Mäuse

Für Infektionsversuche wurden ausschließlich 8-14 Wochen alte, weibliche Mäuse mit C57BL/6-Hintergrund verwendet. Die Versuchstiere wurden in individuell belüfteten Käfigsystemen, unter spezifisch pathogenfreien (SPF)-Bedingungen, entsprechend der Richtlinien des Tierschutzgesetztes und nach Genehmigung durch die Landesdirektion (Aktenzeichen 24-9168.11/14/19) Leipzig, gehalten.

Die Tiere erhielten steriles Futter und Wasser *ad libitum*. Entsprechend der Vorgaben der Vereinigung von europäischen versuchstierkundlichen Gesellschaften (FELASA) wurde periodisch auf Pathogene getestet. Alle Mäuse waren negativ für Madenwürmer und andere Ekto- und Endoparasiten. Die Morbidität und das Überleben infizierter Tiere wurden täglich überwacht. Die folgende Tabelle fasst die verwendeten Mausstämme zusammen.

Tabelle 2: Verwendete Mauslinien. Es wurden ausschließlich 8-14 Wochen alte, weiblich Mäuse mit C57BL/6-Hintergrund verwendet.

Genotyp	Quelle/Literatur
Wildtyp	Janvier, Saint Berthevin
IL-12p35$^{-/-}$	[181]
IL-4R$\alpha^{-/-}$	[182]
IL-22$^{-/-}$	[183]
IL-12p35$^{-/-}$ x IL-4R$\alpha^{-/-}$	nicht publiziert
IL-12p35$^{-/-}$ x IL-17A$^{-/-}$	[184]
IL-12p35$^{-/-}$ x IL-22$^{-/-}$	nicht publiziert

2.1.2 *Cryptococcus neoformans*-Stämme

Zur Infektion wurde der *Cryptococcus neoformans* Stamm 1841, Serotyp D [101] verwendet. Der Stamm 1841 wurde bereitgestellt durch die Firma Hoffmann-La Roche Ltd., Basel, Schweiz und bei -80°C und einer Konzentration von 1*10^{8} Zellen in 10% Magermilchpulver gelagert. *C. neoformans* 1841 ist ein Isolat aus dem *Liquor cerebrospinalis* eines HIV-Patienten mit Kryptokokken-Meningitis in Basel.

Für die Restimulation isolierter Primärzellen wurde der *C. neoformans* Stamm Cap67 verwendet [185]. Diese kapsellose Mutante wurde durch Dr. Bettina Fries, Albert-Einstein College of Medicine, Bronx, NY bereitgestellt. Für die Restimulation wurde Cap67 eine Stunde bei 60°C inaktiviert.

2.1.3 Geräte

Dispergiergerät	
IKA® ULTRA-TURRAX®, Typ T8	IKA®-Werke GmbH & CO. KG; Staufen, Deutschland
Durchflusszytometer	
BD FACSCanto™ II	BD Bioscience; Heidelberg, Deutschland
BD LSRII™	BD Bioscience; Heidelberg, Deutschland
BD LSRFortessa™	BD Bioscience; Heidelberg, Deutschland
ELISA-Reader	
SpectraMax 340PC™	Molecular Devices; Sunnyvale, USA
Geräte zur Bearbeitung histologischer Proben	
Einbetten: Shandon Pathcentre™	Thermo Fisher Scientific Inc.; Schwerte, Deutschland
Gießen: HistoStar™ Embedding Workstation	Thermo Fisher Scientific Inc.; Schwerte, Deutschland
Schneiden: Microm HM 400 Schlittenmikrotom	Thermo Fisher Scientific Inc.; Schwerte, Deutschland
Färben: Tissue-Tek® Prisma®	Sakura Finetek Germany GmbH; Staufen, Deutschland
Inkubatoren	
Inkubator Typ 400	Bachofer Laboratoriumsgeräte; Reutlingen, Deutschland
Thermo Scientific Forma® Series II Water Jacketed CO_2 Incubator	Thermo Fisher Scientific Inc.; Schwerte, Deutschland

Kühlschrank/ Kühl-Gefrierkombination/ Tiefkühlschrank	
Kühlschrank Bosch Economic Cooler	Robert Bosch GmbH; Stuttgart, Deutschland
Kühl-Gefrierkombination Thermo Cryotechnics, STINOL KG103	Thermo Fisher Scientific Inc.; Schwerte, Deutschland
-80°C Tiefkühlschrank Thermo EC Forma -86C ULT Freezer	Thermo Fisher Scientific Inc.; Schwerte, Deutschland
Mikroskop	
Axiovert 40	Carl Zeiss; Göttingen, Deutschland
Mikroplatten-Wascher	
Ultra Wash Plus	Dynex Technologies GmbH; Denkendorf, Deutschland
Zählkammer	
Neubauer, 0,1 mm Tiefe, 0.0025 mm^2	LO - Laboroptik Ltd; Lancing, UK
Pipetten	
Pipet-Lite	Rainin (Pipetten); Gießen, Deutschland
Rotator	
Stuart rotator SB2	Bibby Scientific Limited; Staffordshire, UK
Schüttelinkubator	
3031	GLF; Burgwedel, Deutschland
Sicherheitswerkbank	
HERAsafe, Klasse 2, Typ H	Thermo Fisher Scientific Inc.; Schwerte, Deutschland
Vortexer	
VWR® Mini Vortexer	VWR®; Darmstadt, Deutschland
Zentrifugen	
Microfuge 22R	Beckman Coulter GmbH; Krefeld, Deutschland
Heraeus Megafuge 40R	Thermo Fisher Scientific Inc.; Schwerte, Deutschland

2.1.4 Reagenzien & Verbrauchsmaterialien

Agar-Agar, Kobe I	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe, Deutschland
Albumin Fraktion V	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe, Deutschland
BD Falcon™ Multiwell-Zellkulturplatten 96-Well (Flachboden) mit Deckel Standard TC-behandelt	Becton, Dickinson and Company; Heidelberg, Deutschland
BD Falcon™ Rundboden-Röhrchen	Becton, Dickinson and Company; Heidelberg, Deutschland
BD Falcon™ Zellsiebe, 100 µm	Becton, Dickinson and Company; Heidelberg, Deutschland
Blutentnahmesystem	
S-Monovette® 1,2 ml, 66 x 8 mm, Lithium-Heparin, steril	Sarstedt AG & Co.; Nümbrecht, Deutschland
Kanüle für S-Monovette® 21Gx1 ½“	Sarstedt AG & Co.; Nümbrecht, Deutschland
Eppendorf Safe-Lock Gefäße 1,5 ml	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH; Wesseling/Berzdorf, Deutschland
CO_2	Linde Gas Deutschland; Pullach, Deutschland
Collagenase A	Roche Deutschland Holding GmbH; Grenzach-Wyhlen, Deutschland
D(+)-Glucose Monohydrat	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe, Deutschland
Deoxyribonuclease I from bovine pancreas Type IV, lyophilized powder, ≥2,000 Kunitz units/mg protein	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; München, Deutschland

ELISA-Platten
Nunc-Immuno™ MicroWell™ 96 well solid plates
MaxiSorp™ flat bottom plate, pinchbar design
Sigma-Aldrich Chemie GmbH;
München, Deutschland

Ethanol, 70%, vergällt — Carl Roth GmbH + Co. KG;
Karlsruhe, Deutschland

FBS — Gibco®, Life Technologies GmbH;
Darmstadt, Deutschland

Fc-Block
Gereinigter Ratte Anti-Maus CD16/CD32 (Maus BD Fc Block™)
Becton, Dickinson and Company;
Heidelberg, Deutschland

flüssiger Stickstoff — AIR LIQUIDE Deutschland GmbH;
Düsseldorf, Deutschland

Gelatine — Merck KGaA; Darmstadt, Deutschland

Ionomycin calcium salt — Sigma-Aldrich Chemie GmbH;
München, Deutschland

Iscove's modified DMEM (IMDM)
with 25mM HEPES, L-Glutamine — PAA; Pasching, Deutschland

Kanülen
Sterican® Standardkanülen, Einmalkanülen, 0,45 x 25 mm, 25 G x 1“
B. Braun Melsungen AG;
Melsungen, Deutschland

KCl — Carl Roth GmbH + Co. KG;
Karlsruhe, Deutschland

Ursotamin® — Ceva Tiergesundheit;
Düsseldorf, Deutschland

KH_2PO_4 — Carl Roth GmbH + Co. KG;
Karlsruhe, Deutschland

Kryoröhrchen mit Außengewinde
1,2 ml — TPP Techno Plastic Products AG;
Trasadingen, Schweiz

Lebend/Tot-Farbstoffe	
Fixable Viability Dye eFluor® 780	eBioscience; Frankfurt, Deutschland
LIVE/DEAD® Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit	Molecular Probes, Life Technologies GmbH; Darmstadt, Deutschland
$MgCl_2$ x $6H_2O$	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; München, Deutschland
$MgSO_4$ x 7 H_2O	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; München, Deutschland
Mikrotiterplatten, 96-well V-Form, ohne Deckel	Dr. Ilona Schubert Laborfachhandel; Leipzig, Deutschland
Milchpulver	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe, Deutschland
NaCl	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe, Deutschland
Na_2CO_3	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe, Deutschland
$NaHCO_3$	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe, Deutschland
Na_2HPO_4	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe, Deutschland
$NaNO_2$	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe, Deutschland
Naphtytendiamidedihydrochlorid	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Deutschland
Natriumazid reinst	Merck KGaA; Darmstadt, Deutschland
Natriumpyruvat	AppliChem GmbH; Darmstadt, Deutschland
NH_4Cl	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe, Deutschland
Paraformaldehyd	Fluka Analytical, Sigma-Aldrich Chemie GmbH; München, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	PAA; Pasching, Deutschland

Percoll PLUS/Percoll — GE Healthcare Europe GmbH; Freiburg, Deutschland

Perfusionsbesteck

Kanüle mit Präzisionsschliff, außen trockensilikonisiert, 21G, 0,8 x 19mm — Dispomed Witt oHG; Gelnhausen, Deutschland

Infusionszubehör INTRAFIX Air P 150cm Luer Lock — B. Braun Melsungen AG; Melsungen, Deutschland

Petrischalen — PESKE-Laborbedarf; Aindling-Arnhofen, Deutschland

Phenolrot — Sigma-Aldrich Chemie GmbH; München, Deutschland

Phorbol 12-myristate 13-acetate — Enzo Life Sciences GmbH; Lörrach, Deutschland

Roti-Histofix 4% — Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe, Deutschland

RPMI 1640

with L-Glutamine, 25mM HEPES, Phenol Red — PAA; Pasching, Deutschland

Rundbodenröhrchen, Gamma-sterilisiert — TPP Techno Plastic Products AG; Trasadingen, Schweiz

Saponin — Sigma-Aldrich Chemie GmbH; München, Deutschland

Selbstklebende Abdeckfolie für Mikrotiterplatte — Dr. Ilona Schubert Laborfachhandel; Leipzig, Deutschland

Serum-Seperator

BD Microtainer® Tubes — Becton, Dickinson and Company; Heidelberg, Deutschland

Skalpellklingen, einzeln steril — C. Bruno Bayha GmbH; Tuttlingen, Deutschland

Spritze

BD Plastipak™ Spritzen mit Luer-Ansatz, 1 ml — Becton, Dickinson and Company; Heidelberg, Deutschland

Spritzenfilter LL / PES / 0,2 µm
6 cm², Ø 33x27 mm — TPP Techno Plastic Products AG; Trasadingen, Deutschland

Standardinfusionslösung (0,9% NaCl) — Baxter; Unterschleißheim, Deutschland

Sterile Blutlanzetten
Solofix® Blutlanzetten — B. Braun Melsungen AG; Melsungen, Deutschland

Streptavidin-PerCP (Durchflusszytometrie)
BioLegend®; Fell, Deutschland

Streptavidin-HRP (ELISA) — SouthernBiotech, BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH; Eching, Deutschland

Sulphanilamid — Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Deutschland

TMB Microwell Peroxidase Substrate System
medac GmbH; Wedel, Deutschland

Trypanblau — Sigma-Aldrich Chemie GmbH; München, Deutschland

Trypton/Pepton aus Casein — Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe, Deutschland

Tween® 20 — Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe, Deutschland

Xylazin (20 mg/ml) — Ceva Tiergesundheit; Düsseldorf, Deutschland

15 ml-Zentrifugenröhrchen
BD Falcon™ 15 ml high-clarity polypropylene conical centrifuge tube
Becton, Dickinson and Company; Heidelberg, Deutschland

50 ml-Zentrifugenröhrchen
50 ml high-clarity polypropylene conical centrifuge tube
Becton, Dickinson and Company; Heidelberg, Deutschland

50/60 ml Spritze
BD Plastipak™ Spritzen mit Luer-Lok™-Ansatz
Becton, Dickinson and Company; Heidelberg, Deutschland

2.1.5 Puffer, Medien & Lösungen

Blockpuffer

0,1% Gelatine
0,5% Albumin Fraktion V
in PBS

Carbonatpuffer

206 mM $NaHCO_3$
81 mM
in Aqua dest.

Eosinlösung

120 ml Eosin-Stammlösung
600 ml 70%iges Ethanol
0,3 ml Eisessig

Eosin-Stammlösung

14 mM Eosin in 70%igem Ethanol

FACS-Puffer

3% FBS
0,1% Natriumazid reinst
in PBS

Gey's Solution

20% Lösung A
5% Lösung B
5% Lösung C
in Aqua bidest., steril

Gey´s Lösung A (sterilfiltriert)

0,65 M NH_4Cl
25 mM KCl
4 mM Na_2HPO_4
25 mM α-D(+)-Glucose Monohydrat
0,14 mM Phenolrot
in Aqua bidest.

Gey´s Lösung B (sterilfiltriert)

0,21 mM $MgCl_2$ x $6H_2O$
0,06 mM $MgSO_4$ x 7 H_2O
in Aqua bidest.

Gey´s Lösung C (sterilfiltriert)
2,7 mM $NaHCO_3$
in Aqua bidest.

Griess Reagenz
0,1% Naphtytendiamidedihydrochlorid in Aqua dest
1% Sulphanilamid in 5% konzentrierter H_3PO_4

Hämatoxilin nach Mayer
3,3 mM Hämatoxilin
1 mM Natriumjodat
194 mM Aluminium-Kaliumsulfat
302 mM Chloralhydrat
5 mM kristalline Citronensäure
in Aqua dest.

Narkotikum
10% Ursotamin® (100 mg/ml)
2% Xylazin (20 mg/ml)
in PBS

PBS (pH 7,4), steril
137 mM NaCl
2,7 mM KCl
12.9 mM Na_2HPO_4
1,5 mM KH_2PO_4
in Aqua bidest.

Perjodsäurelösung
44 mM Perjodsäure
in Aqua dest.

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

SAB-Platten
1% Trypton/Pepton aus Casein
2% α-D(+)-Glucose Monohydrat
2% Agar-Agar, Kobe I

Serum-Diluent
: 0,1% Gelatine
0,05% Tween® 20
0,5% Albumin Fraktion V
in PBS

FACS-Saponin-Puffer
: 0,5% Saponin in FACS-Puffer

Waschpuffer
: 0,05% Tween® 20 in PBS

2.1.6 Antikörper

2.1.6.1 Antikörper zur Restimulation von Primärzellisolaten

Aufgereinigter NA/LE Hamster anti-Maus CD3e
: Becton, Dickinson and Company; Heidelberg, Deutschland

Aufgereinigter NA/LE Hamster anti-Maus CD28
: Becton, Dickinson and Company; Heidelberg, Deutschland

2.1.6.2 Antikörper für durchflusszytometrische Analysen

Die folgende Tabelle führt die verwendeten Antikörper, der phänotypischen Untersuchung der Lungenleukozyten beziehungsweise intrazelluläre Färbung von Zytokinen zur Charakterisierung der produzierenden Zellen, mit den entsprechenden Isotypkontrollen auf.

Tabelle 3: Antikörper für durchflusszytometrische Analysen. *Fluoreszenzfarbstoffe* Fluorescein (FITC), R-Phycoerythrin (PE), Cyanin (Cy), Allophycocyanin (APC), Peridinin Chlorophyll Protein Complex (PerCP)

Antikörper	Klon	Fluoreszenz-farbstoff	Firma, Standort
B220	RA3-6B2	FITC	eBioscience; Frankfurt, Deutschland
Ratte IgG2a, κ	eBR2a	FITC	eBioscience; Frankfurt, Deutschland
CD3	145-2C11	PE-Cy7/Biotin FITC	eBioscience; Frankfurt, Deutschland BD Bioscience; Heidelberg, Deutschland
Armenischer Hamster IgG	eBio299Arm	PE-Cy7/Biotin/ FITC	eBioscience; Frankfurt, Deutschland eBioscience; Frankfurt, Deutschland
CD4	RM4-5 RM4-5	Alexa Fluor® 700 Pacific Blue™	eBioscience; Frankfurt, Deutschland BioLegend®; Fell, Deutschland
Ratte IgG2a, κ	eBR2a RTK2758	Alexa Fluor® 700 Pacific Blue™	eBioscience; Frankfurt, Deutschland BioLegend®; Fell, Deutschland
CD11b	M1/70	FITC	eBioscience; Frankfurt, Deutschland
Ratte IgG2b, κ	eB149/10H5	FITC	eBioscience; Frankfurt, Deutschland
CD11c	N418	APC	eBioscience; Frankfurt, Deutschland
Armenischer Hamster IgG	eBio299Arm	APC	eBioscience; Frankfurt, Deutschland
CD45	30-F11	FITC	BD Bioscience; Heidelberg, Deutschland
Ratte IgG2b, κ	eB149/10H5	FITC	eBioscience; Frankfurt, Deutschland
CD117 (c-Kit)	2B8	APC-H7	BD Bioscience; Heidelberg, Deutschland
Ratte IgG2b, κ	RTK4530	APC/Cy7	BioLegend®; Fell, Deutschland
CD196 (CCR6)	29-2L17	PE	BioLegend®; Fell, Deutschland
Hamster IgG1, λ1	G235-2356	PE	BD Bioscience; Heidelberg, Deutschland
Gr-1	RB6-8C5	FITC	eBioscience; Frankfurt, Deutschland
Ratte IgG2b, κ	eB149/10H5	FITC	eBioscience; Frankfurt, Deutschland
IL-17A	TC11-18H10.1	Pacific Blue™	BioLegend®; Fell, Deutschland
Ratte IgG1, κ	Ratte IgG1, κ	Pacific Blue™	BioLegend®; Fell, Deutschland
IL-22	Poly5164	Alexa Fluor® 647	BioLegend®; Fell, Deutschland

Ziege IgG	Poly24030	Alexa Fluor® 647	BioLegend®; Fell, Deutschland
NK-1.1	PK136	PerCP/Cy5.5	BioLegend®; Fell, Deutschland
Maus IgG2a, κ	MOPC-173	PerCP/Cy5.5	BioLegend®; Fell, Deutschland
NKp46 (CD335)	29A1.4	FITC	eBioscience; Frankfurt, Deutschland
Ratte IgG2a, κ	eBR2a	FITC	eBioscience; Frankfurt, Deutschland
Siglec-F	E50-2440	Biotin	BD Bioscience; Heidelberg, Deutschland
IgG2a, κ	R35-95	Biotin	BD Bioscience; Heidelberg, Deutschland
T1/ST2 (IL-33R)	DJ8	FITC	MD Bioproducts; Egg b. Zürich, Schweiz
Ratte IgG1, κ	eBRG1	FITC	eBioscience; Frankfurt, Deutschland

2.1.6.3 Antikörper für ELISA

Tabelle 4 führt die für ELISAs verwendete Antikörper, Standards und Konzentrationen auf.

Tabelle 4: Antikörper und Standards für ELISAs.

ELISA	Fängerantikörper	Standard	Detektions-antikörper
IL-17A	Maus IL-17 DuoSet (R&D Systems GmbH; Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland) 2 µg/ml in PBS	Maus IL-17 DuoSet (R&D Systems GmbH; Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland) Bereich: 0,01-10 ng/ml	Maus IL-17 DuoSet (R&D Systems GmbH; Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland) 0,4 µg/ml
IFN-γ	Klon AN18 5 µg/ml in Carbonatpuffer	Rekombinantes murines IFN-γγ (PeproTech Germany; Hamburg, Deutschland) Bereich: 0,01-10 ng/ml	XMG1.2-POD 0,32 µg/ml
IgE	Anti-Maus IgE Klon R35-72 (BD Pharmingen™, Heidelberg, Deutschland) 5 µg/ml in Carbonatpuffer	Murines IgE Standard Klon C38-2 (BD Pharmingen™, Heidelberg, Deutschland) Bereich: 0,002-2 µg/ml	Biotinyliertes anti-Maus IgE Klon R35-118 (BD Pharmingen™, Heidelberg, Deutschland) 1:200

2.2 Methoden

2.2.1 Anzucht von *Cryptococcus neoformans*

Für die Infektion der verschiedenen Maus-Genotypen wurden 200 ml SAB-Medium mit $1*10^8$ Zellen *Cryptococcus neoformans* 1841 (Serotyp D, in 10% Magermilchpulver) inokuliert. Die Kultivierung erfolgte für 18 h bei 30°C und 80 rpm.

Anschließend wurden 10 ml der Zellsuspension in ein konisches 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und dreimal mit je 10 ml PBS gewaschen. Die Zellsuspension wurde dabei mit 300 x g für 8 min bei 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml PBS resuspendiert. Die Verdopplungszeit wurde bestimmt. Dazu wurde die Zellzahl mittels Zählung in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und folgende Formel verwendet:

$$x_t = x_0 * e^{k*t}$$

Formel 1: Formel zur Bestimmung der Verdopplungszeit.
k: Wachstumskoeffizient; $k=\ln(x_t/x_0)/t$; x_0: $1*10^8$; t: Zeit (18 h); x_t: Zellanzahl nach 18 h; Verdopplungszeit: $x_t = 2 * x_0$

Eine Verdopplungszeit von zirka drei Stunden wurde als geeignet erachtet und die Kultur für Experimente verwendet.

Nachfolgend wurde die Suspension auf $2{,}5*10^4$ Zellen/ml in sterilem PBS eingestellt, zur Kontrolle auf SAB-Platten ausgestrichen und für 48 h bei 30°C inkubiert.

2.2.2 Intranasale Infektion

Vor der Infektion wurden die Tiere, je nach Gewicht mit Ursotamin®/Xylazin (75 µg Ursotamin® / g KGW; 15 µg Xylazin / g KGW) intraperitoneal narkotisiert. 20 µl der $2{,}5*10^4$/ml Suspension beziehungsweise 500 koloniebildende Einheiten (KbE) wurden in ein Nasenloch geträufelt. Dabei wurde der Schluckreflex der Tiere kontrolliert.

2.2.3 Organ- und Blutentnahme

Zur Untersuchung der IL-22-Konzentration im Serum wurde den Tieren in mindestens 14-tägigem Abstand submandibulär Blut entnommen. Dafür wurden nicht-narkotisierte Mäuse fixiert und die *Vena facialis* mit einer sterilen Einweglanzette punktiert. Das gewonnene Blut wurde in einem Serumseperator aufgefangen, für mindestens 30 min inkubiert und anschließend zur Gewinnung des Serums für 5 min bei 5000 x g und 4°C zentrifugiert.

Vor der Organentnahme erfolgte eine CO_2-Euthanasie der Labormäuse. Nach äußerer Desinfektion mittels 70%igem Ethanol wurde die Bauchhöhle eröffnet und das Blut mit einem Lithium-Heparin-Blutentnahmeset aus der *Vena cava caudalis* entnommen. Zur Gewinnung des Plasmas wurde das Blut für 10 min bei Raumtemperatur und 1000 x g zentrifugiert.

Anschließend erfolgte die Perfusion des Lungen- und Körperkreislaufes mit Standardinfusionslösung.

Für histologische Untersuchungen wurden das Herz, ½ Lungenflügel (rechts, kardial) mit Trachea, assoziierten Gefäßen und dem Thymus, 2 Leberlappen mit Gallenblase, ¼ Milz (kranial), die rechte Niere und ¼ Gehirn (rechts, kranial) in Roti-Histofix fixiert.

Zur Bestimmung der Pilzlast des Gehirns wurde ½ Gehirn (links) in 1 ml PBS überführt.

Folgende Organe wurden für weiter mRNA-Analysen entnommen, in Kryoröhrchen überführt und mit Hilfe von flüssigem Stickstoff schockgefroren: akzessorischer und ½ kranialer Lungenflügel, ¼ der Milz (medial), parathymale Lymphknoten, Pankreas (ohne Fettgewebe), ½ Leberlappen (links) und rechte Niere (ohne Nebenniere). Die Lagerung bis zur Analyse erfolgte bei -80°C.

Die restlichen Bestandteile der Lunge wurden für durchflusszytometrische Analysen, die Bestimmung der Keimlast der Lunge und zur Restimulation beziehungsweise für intrazelluläre Färbungen von Zytokinen verwendet.

2.2.4 Histologie

Histologische Untersuchungen erfolgten am Gerhard-Domagk-Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Münster unter der Leitung von Frau Univ.-Prof. Dr. Gabriele Köhler.

Nach Einbettung der fixierten Organe in Paraffin wurden sektionsweise Hämatoxylin-Eosin (HE) und Perjodsäure/ Schiffsches Reagenz (*Periodic acid-Schiff*, PAS) Färbungen angefertigt.

Mit Hilfe der HE-Färbung konnte die Granulombildung, Entzündungsreaktion und Zellinfiltration bewertet werden, Zellkerne erscheinen in blau, Muskulatur und Bindegewebe in zart-rosa. Die Färbung erfolgte automatisch nach folgendem Protokoll:

Tabelle 5: Arbeitsschritte der HE-Färbung per Automat

Arbeitsschritt	Reagenz	Zeit (min:sec)
1	Dying Station	12:00
2	Xylol	02:00
3	Xylol	02:00
4	99% Ethanol	01:00
5	95% Ethanol	01:00
6	70% Ethanol	01:00
7	Aqua dest.	01:15
8	Hämatoxilin nach Meyer	06:00
9	fließend wässern	03:00
10	Eosinlösung	03:00
11	Aqua dest.	00:45
12	70% Ethanol	00:30
13	99% Ethanol	01:00
14	95% Ethanol	01:00
15	Xylol	02:00
16	Xylol	01:30

Die Eosinlösung wurde täglich frisch angesetzt.

Die PAS-Reaktion und Quantifizierung diente der Beurteilung der Kryptokokken-Verteilung und Schleimproduktion durch die Becherzellen der Lunge, PAS-positive Strukturen erscheinen rosa bis purpurrot, Zellkerne blau und der Hintergrund zartrosa. Die Färbung erfolgte automatisch nach folgendem Protokoll:

Tabelle 6: Arbeitsschritte der PAS-Färbung per Automat

Arbeitsschritt	Reagenz	Zeit (min:sec)
1	Dying Station	12:00
2	Xylol	02:00
3	Xylol	02:00
4	99% Ethanol	01:00
5	95% Ethanol	01:00
6	70% Ethanol	01:00
7	Wash Station	00:45
8	Perjodsäurelösung	10:00
9	Aqua dest.	00:45
10	Schiff´s Reagenz	10:00
11	Wash Station	03:00
12	Hämatoxilin nach Mayer	05:00
13	Wash Station	03:00
14	70% Ethanol	00:30
15	95% Ethanol	01:00
16	99% Ethanol	01:00
17	Xylol	02:00
18	Xylol	01:30

Die Quantifizierung PAS-positiver Epithelzellen erfolgte durch einen objektiven Forscher. Pro Maus wurden PAS-positive und PAS-negative Zellen in je 2 unterschiedlichen Schnitten quantifiziert. Die Zählung erfolgte mäanderförmig durch den Schnitt. Es wurde an 10 verschiedenen Bronchien mit je 100 Gesamtzellen ausgezählt (insgesamt 1000 Zellen pro Maus).

2.2.5 Analyse der Organlast

Für die Analysen der Keimlast im Gehirn erfolgte die sterile Homogenisierung der in 1 ml PBS gelagerten Organe. Die Suspension wurde mit sterilem PBS titriert und entsprechende Verdünnungen auf SAB plattiert.

Die Bestimmung der Koloniezahl innerhalb des Lungengewebes erfolgte mit einem Teil (50 µl aus 1 ml) der unter *2.2.6* gewonnenen Zellsuspension. Dafür wurde diese mit PBS verdünnt und entsprechend ausplattiert. Die Kolonien wurden nach 72 h Inkubation bei 30°C ausgezählt und die Organlast berechnet.

2.2.6 Isolation von Lungenleukozyten

Nach Gewinnung oben genannter Teile der Lunge (*siehe 2.2.3*) wurden diese mit Hilfe steriler Skalpellklingen zerteilt und in 10 ml RPMI supplementiert mit 10% FBS, 1x Penicillin/Streptomycin, 0,69 mg/ml Collagenase A, 111,11 U/ml DNAse und 1 µM Natriumpyruvat für 30 min unter Rotation bei 37°C inkubiert.

Im Anschluss erfolgte die Herstellung einer Einzelzellsuspension. Die Passage der Suspension durch ein 100 µm Zellsieb wurde mit Hilfe des Stempels einer 1 ml Spritze und mehrmaligem Spülen mit 3% FBS (PBS) realisiert.

Für die Lyse der in der Zellsuspension vorhandenen Erythrozyten, wurde diese anschließend mit 300 x g für 8 min bei 4°C zentrifugiert und das Pellet in 1 ml Gey´s Lösung aufgenommen. Schließlich erfolgte die Lyse auf Eis für 1 min mit folgendem Abstoppen der Reaktion mit 10 ml 3% FBS (PBS).

Die Suspension wurde erneut zentrifugiert und in 1 ml PBS aufgenommen. Zur Bestimmung der Pilzlast erfolgte die Abnahme von 50 µl. Die verbleibenden Zellen wurden erneut pelletiert, in 3 ml 70% Percoll in RPMI mit 10% FBS und 1x Penicillin/Streptomycin ($RPMI^{++}$) aufgenommen und unter 30% Percoll in $RPMI^{++}$ geschichtet.

Die Separation der Leukozyten erfolgte bei 400 x g für 20 min bei RT (Beschleunigung: 2, Bremse: 1). Die in der Interphase befindlichen Lungenleukozyten wurden abgenommen und in 10 ml IMDM mit 10% FBS und 1x Penicillin/Streptomycin ($IMDM^{++}$) überführt. Nach erneuter Zentrifugation (300 x g, 8 min, 4°C) wurde das Pellet in 500 µl $IMDM^{++}$ aufgenommen und die Zellzahl für die weiteren Analysen bestimmt.

2.2.7 Phänotypisierung von Lungenleukozyten

Zur Charakterisierung der verschiedenen Leukozyten-Subpopulationen der Lunge wurden pro Färbung $1*10^5$ isolierte Zellen (*siehe 2.2.6*) verwendet. Die Färbung erfolgte in Mikrotiterplatten (96-Kavitäten V-Form).

Zuerst erfolgte eine Färbung zur Differenzierung lebender und toter Zellen. Dazu wurden die zweimal mit 200 µl PBS gewaschenen Zellen (300 x g, 3 min, 4°C) für 15-30 min auf Eis mit einem Lebend/Tot-Farbstoff gefärbt. Je nach Färbung wurden 50 µl 1:500 (in PBS) Fixable Viability Dye eFluor® 780 (eBioscience) beziehungsweise 1:250 (in PBS) LIVE/DEAD® Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit (Molecular Probes) verwendet.

Danach wurde je einmal mit 200 µl PBS und mit 200 µl FACS-Puffer gewaschen und die Zellen anschließend für 5 min auf Eis mit 0,1 µg/$1*10^6$ Zellen Fc-Block (in 10 µl PBS) inkubiert. Nachfolgend wurden 0,1 µg/$1*10^6$ Zellen der

spezifischen Antikörperkonjugate in FACS-Puffer zugegeben und für mindestens 15 min auf Eis inkubiert. Bei Verwendung biotinylierter Antikörper erfolgte nach einem zusätzlichen Waschschritt die Inkubation mit 0,1 µg/1*10^6 Zellen Streptavidin-PerCP für 15 min auf Eis.

Im Anschluss wurde je einmal mit 200 µl FACS-Puffer und 200 µl PBS gewaschen, bevor die gefärbten Zellen in 50 µl 2% Paraformaldehyd (PBS) für 15 min auf Eis fixiert wurden. Vor Aufnahme der Zellen in 100 µl FACS-Puffer erfolgte ein erneuter Waschschritt mit 200 µl PBS.

Die Analyse der Lungenleukozyten erfolgte mittels BD FACSCanto™ II, BD LSRII™ oder BD LSRFortessa™. Zur Aufnahme wurde BD FACSDiva™ Software Version 6.1.1 verwendet. Die Auswertung erfolgte mit FlowJo Version 7.6.4 (Treestar Inc., Ashland, USA).

2.2.8 Kultivierung, Restimulation und intrazelluläre Färbung von Lungenleukozyten

Für die Analyse der spezifischen Zytokinproduktion wurden 1*10^6 Lungenleukozyten (*siehe 2.2.6*) pro Kavität (in 200 µl) in einer 96-Kavitäten-Rundbodenplatte kultiviert beziehungsweise stimuliert.

Für die Bestimmung der Kryptokokken-spezifischen Zytokinproduktion erfolgte die Restimulation mit einem hitzeinaktivierten, kapsellosen *Cryptococcus neoformans* Stamm (Cap67), MOI 2 für wenigstens 22 h. Die T-Zell-spezifische Zytokinproduktion wurde mit Hilfe der Stimulation mit anti-CD3-Antikörpern (beschichtete Kavitäten, Inkubation der Antikörper über Nacht, 4°C, 5 µg/ml in PBS, 50 µl/Kavität) und anti-CD28-Antikörpern (löslich, 5 µg/ml) für 22 h, analysiert. Eine polyklonale Stimulation wurde mit 40 ng/ml PMA und 1 µg/ml Ionomycin für 6 h realisiert. Zur Kontrolle der konstitutiven Zytokinproduktion wurden Kavitäten ohne Stimulus (Medium-Kontrolle) mitgeführt.

Nach entsprechender Stimulationszeit wurden die Kulturplatten für 3 min bei 300 x g zentrifugiert und 180 µl des Überstandes für die Analyse der Zytokinproduktion mittels ELISA abgenommen.

Für die intrazelluläre Färbung der Zytokine und Analyse der produzierenden Lungenleukozyten-Subpopulationen wurde 4 h vor Färbung beziehungsweise Abnahme der Überstände Brefeldin A (5 g/ml) zugegeben.

Die Analyse der Zytokin-produzierenden Zellen erfolgte mit 1*10^6 Zellen pro Färbung. Die Färbung der toten Zellen sowie die Färbung der Oberflächenmoleküle erfolgte wie unter *2.2.7* beschrieben. Nach der Fixierung und der beschriebenen Waschschritte erfolgte die Permeabilisierung der Zellen mittels FACS-Saponin-Puffer. Dazu wurden die Zellen in diesem Puffer gewaschen und

anschließend mit in FACS-Saponin-Puffer verdünntem Fc-Block und spezifischen Antikörpern inkubiert. Die Blockierung unspezifischer Antikörperbindungen erfolgte für 15 min mit 0,3 µg/1*10^6 Zellen Fc-Block und hitzeinaktiviertem Ratten- und Ziegenserum (1:500) in 10 µl FACS-Saponin-Puffer. Die intrazelluläre Färbung der Zytokine wurde für 30 min auf Eis durchgeführt. Es wurden Antikörperkonzentrationen entsprechend der Angaben der jeweiligen Hersteller verwendet.

Vor der unter *2.2.7* beschrieben Messung und Auswertung wurden die Zellen je einmal mit 200 µl FACS-Saponin-Puffer und 200 µl FACS-Puffer gewaschen und in 100 µl FACS-Puffer aufgenommen.

2.2.9 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

ELISA-Rundbodenplatten wurden über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer mit dem entsprechenden Fängerantikörper (50 µl) in PBS oder Carbonatpuffer beschichtet. Die verwendeten Antikörper, Konzentrationen und Puffer der verschiedenen ELISAs sind in *Tabelle 4* zusammengefasst. Nach der Beschichtung erfolgte einmaliges Waschen (mit Waschpuffer). Alle Waschschritte wurden mit Hilfe eines Mikrotplatten-Waschers durchgeführt. Anschließend erfolgte die Blockierung der unspezifischen Bindungen mit 250 µl Blockpuffer für mindestens 1 h bei RT. Vor Zugabe der Proben beziehungsweise Standards (je nach ELISA 40-70 µl) erfolgte ein zweimaliges Waschen. Die Proben und Standards wurden in Serum-Diluent entsprechend verdünnt und bei Raumtemperatur für mindestens 1 h in einer feuchten Kammer inkubiert. Die verwendeten Standards und Detektionsbereiche sind in *Tabelle 4* dargestellt. Nach dreimaligem Waschen erfolgte die Zugabe des Detektionsantikörpers (50 µl) verdünnt in Serum-Diluent (*siehe Tabelle 4*) und eine erneute Inkubation für mindestens 1 h bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer.

Da der IFN-γ-spezifische Detektionsantikörper direkt mit einer Peroxidase gekoppelt ist, konnte dieser ELISA nach viermaligem Waschen direkt entwickelt werden.

Alle anderen ELISAs wurden zuvor mit 1:3000-1:4000 in Serum-Diluent verdünnter Streptavidin-Meerrettichperoxidase (HRP) (50 µl) für 30 min bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert und nach fünfmaligem Waschen entwickelt.

Die Farbreaktion erfolgte nach Zugabe von je 100 µl Tetramethylbenzidin (TMB)/Kavität. Bei Erreichen einer Optischen Dichte (der höchsten Standardkonzentration) von zirka 1,3 bei 650 nm (-480 nm) wurde die Reaktion mit 50 µl

1M H_3PO_4 abgestoppt. Für die Auswertung erfolgte die Messung bei 450 nm (-630 nm) mit einem Photometer.

Für die Auswertung wurde SoftMax Pro Microplate Data Acquisition & Analysis Software von Molecular Devices (Downingtown, USA) verwendet.

Die Analysen von IL-17F und IL-22 erfolgten am Institut für medizinische Immunologie (Molekulare Immunpathologie) an der Charité in Berlin unter Leitung von Dr. Robert Sabat. Es wurden die Quantikine® ELISA Kits von R&D Systems GmbH (Wiesbaden-Nordenstadt) verwendet und entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.10 Statistik

Die statistische Auswertung der dargestellten Ergebnisse erfolgte mit GraphPad Prism 5 für Windows Version 5.01.

Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurden für kontinuierliche Variablen mit dem unverbundenen T-Test (bei Normalverteilung) beziehungsweise dem Mann-Whitney U-Test (bei Nicht-Normalverteilung) auf statistische Signifikanz getestet. Unterschiede hinsichtlich des Überlebens einer Infektion wurden mit Hilfe des Logrank Tests auf Signifikanz geprüft.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung und Charakterisierung des experimentellen Modells der bronchopulmonalen Mykose in der C57BL/6-Wildtypmaus

Eingangs sollte das intranasale Infektionsmodell in C57BL/6-Wildtyptieren etabliert werden. Dazu erfolgte zunächst eine kinetische Analyse. Ziel dabei war es, den Krankheitsverlauf zu analysieren sowie die Entzündungsreaktion zu charakterisieren. Dabei sollte neben bisher im Fokus stehenden Th1- und Th2- auch die Th17-assoziierten Immunantwort bei der Kryptokokkose untersucht werden. Nach Analyse des Expressionsmusters der Th17-Zytokine IL-17A, IL-17F und IL-22 sollten die zellulären Quellen dieser Interleukine charakterisiert werden. Anhand der Untersuchungen in C57BL/6-Wildtypmäusen sollten anschließend Funktionsstudien in gendefizienten Mäusen auf dem genetischen C57BL/6-Hintergrund vorgenommen werden (siehe *3.2*)

3.1.1 Zeitlicher Verlauf der chronischen Kryptokokkose

Um dem natürlichen Infektionsweg zu imitieren, wurden C57BL/6-Wildtyptiere intranasal infiziert. Der Verlauf der Kryptokokkose wurde über einen Zeitraum von 70 Tagen untersucht, indem nach 7, 14, 21, 42, 56 und 70 Tagen die Keimlast in Lunge und Gehirn bestimmt wurde (siehe Abbildung 7A und B). Um Aussagen über mögliche Verbindungen der verschiedenen T-Helferzellantworten im Verlauf der Kryptokokkose treffen zu können erfolgten neben der Analyse der Th17-assoziierten Immunantwort auch Untersuchungen zu Th1- und Th2-abhängigen Immunreaktionen.

Im dargestellten Versuch ist das Versterben eines Tieres von den insgesamt 7 Tieren 63 Tage nach Infektion (dpi) zu verzeichnen (Abbildung 7C).

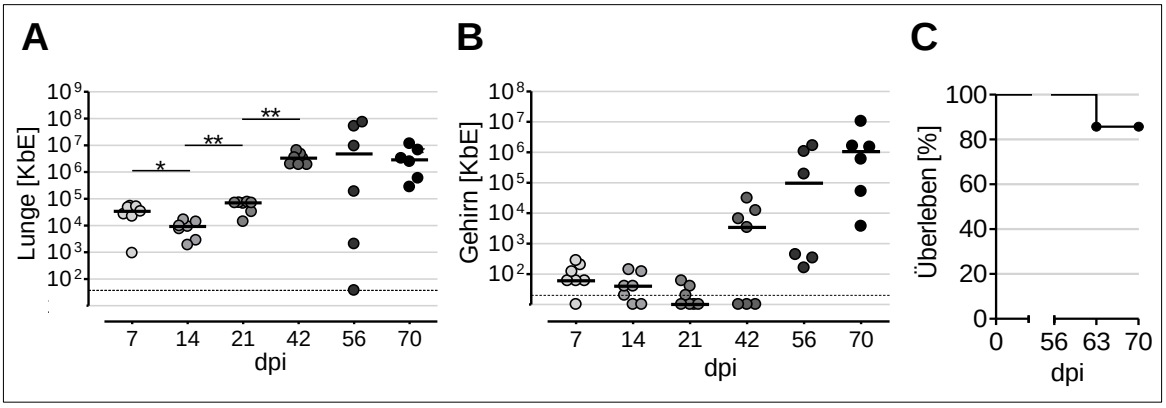


Abbildung 7: Überlebensdaten und Analysen der Pilzlast von Lunge und Gehirn im zeitlichen Verlauf nach *Cryptococcus neoformans* Infektion von C57BL/6-Wildtypmäusen bis 70 Tage nach Infektion (dpi). **A** Keimlast (Kolonie-bildenden Einheiten, KbE) in der Lunge an verschiedenen Tagen nach Infektion. **B** Pilzlast im Gehirn der Versuchstiere. **A/B** Dargestellt ist je eines von zwei repräsentativen Experimenten mit je 6-7 Versuchstieren pro Analysetag. Die gestrichelte Linie stellt das Detektionsminimum dar. Im Streudiagramm sind die Medianwerte dargestellt. Mann-Whitney U-Test. p-Wert: * $p<0.05$, ** $p<0.01$. **C** Überleben in % von C57BL/6-Wildtypmäusen (n=7) nach Infektion mit *C. neoformans*.

Die Analyse der Keimlast der C57BL/6-Wildtyptiere ergibt 14 Tage nach Infektion eine signifikante Reduktion der Pilzanzahl in der Lunge, verglichen mit der nach 7 Tagen detektierten Menge (Abbildung 7A). Im weiteren Verlauf kann bis 42 dpi ein Anstieg der Kryptokokken-Anzahl in der Lunge verzeichnet werden. Am Ende des Untersuchungszeitraumes stagniert die Keimlast in der Lunge. Im Vergleich dazu kann im Gehirn der Versuchstiere ein Anstieg ab 42 Tagen nach Infektion nachgewiesen werden. Ab Tag 56 kann in allen untersuchten Tieren eine Dissemination von *C. neoformans* festgestellt werden (Abbildung 7B).

3.1.2 Charakterisierung der pulmonalen Entzündungsreaktion

Zur Untersuchung der Immunantwort gegen *C. neoformans* im zeitlichen Verlauf erfolgte zunächst eine phänotypische Charakterisierung der isolierten Lungenzellen mittels Durchflusszytometrie (Abbildung 8). Neben der Gesamtzellzahl der rekrutierten Leukozyten wurden auch die T-Helferzellen sowie die eosinophilen Granulozyten analysiert.

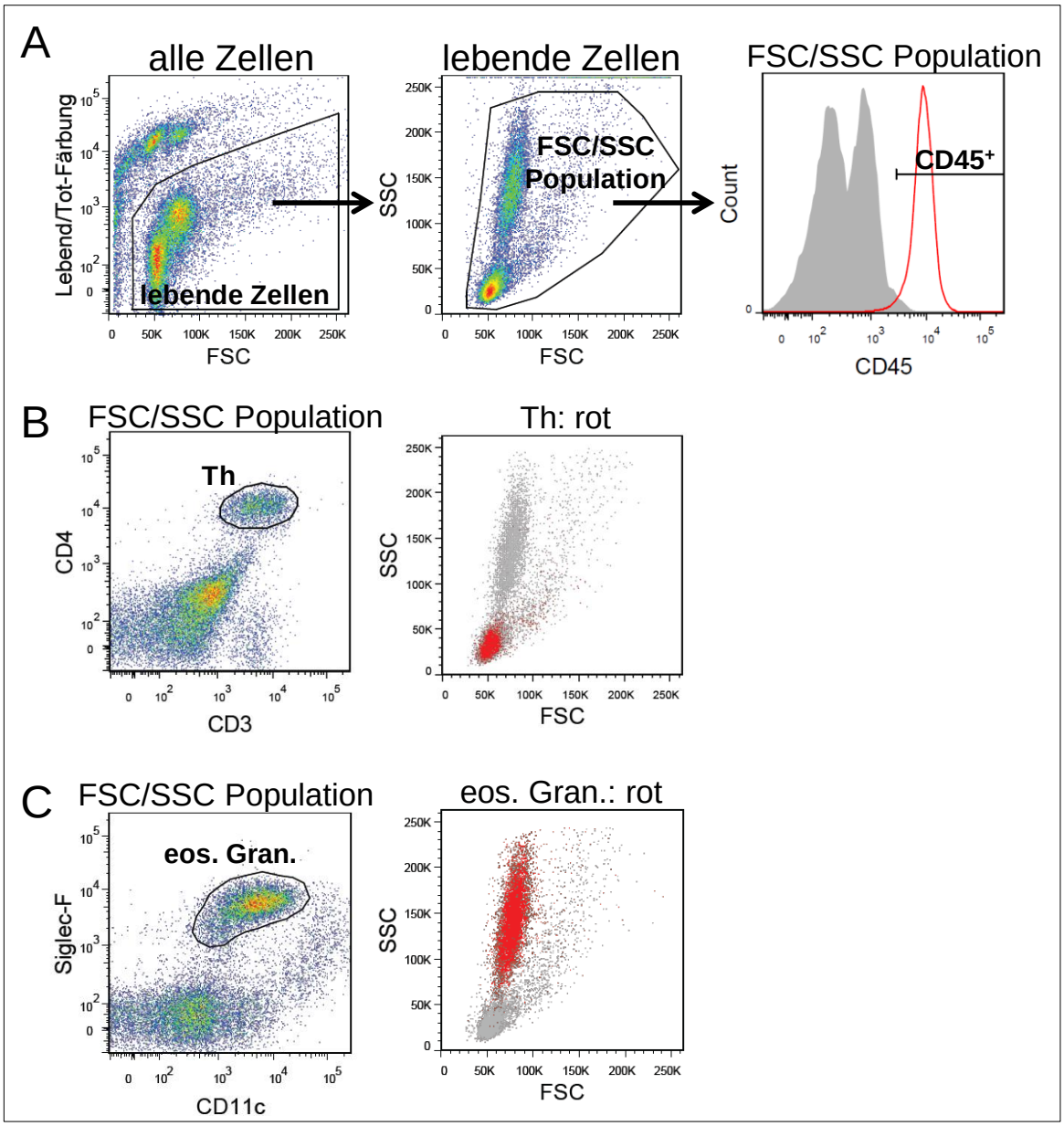


Abbildung 8: Auswertungsstrategie und exemplarische Färbungen der phänotypischen Charakterisierung von Lungenleukozyten mittels Durchflusszytometrie. A Vorgehensweise der Analyse der Lungenleukozyten. Zuerst wurden die lebenden Zellen ausgewählt und mit Hilfe des Vorwärts- und Seitwärtsstreulichtes (FSC und SSC) Zelltrümmer ausgeschlossen. Ausgewählte, lebende Zellen ohne Zelltrümmer (FSC/SSC Population) wurden im Weiteren auf verschiedene Oberflächenmarker untersucht. Im Histogramm sind $CD45^+$ Zellen (rot) im Vergleich zur FSC/SSC Population der Isotypenfärbung (grau) dargestellt. **B** Exemplarische Färbung der $CD3^+$ und $CD4^+$ T-Helferzellen (Th). Zur Kontrolle (rechts) wurde die Th-Zellpopulation (rot) im Vergleich zu allen Zellen der FSC/SSC Population (grau) in der Streulicht-Punktauftragung dargestellt. **C** Exemplarische Färbung der Siglec-F^+ und $CD11c^{neg/dim}$ eosinophilen Granulozyten (eos. Gran.). Zur Kontrolle (rechts) wurden die eosinophilen Granulozyten (rot) im Vergleich zu allen Zellen der FSC/SSC Population (grau) in der Streulicht-Punktauftragung dargestellt. Es sind beispielhafte Färbungen eines C57BL/6-Wildtyp-Einzeltieres 21 Tage nach intranasaler Infektion gezeigt. Für alle Färbungen wurden an allen Analysetagen zur Kontrolle unspezifischer Reaktionen Isotypen-Färbungen mitgeführt.

Die phänotypische Charakterisierung der Leukozyten (CD45-positiver Zellen) in der Lunge zeigt, dass die Gesamtanzahl dieser Zellen in der Lunge mit zunehmender Infektionsdauer ansteigt (Abbildung 9A).

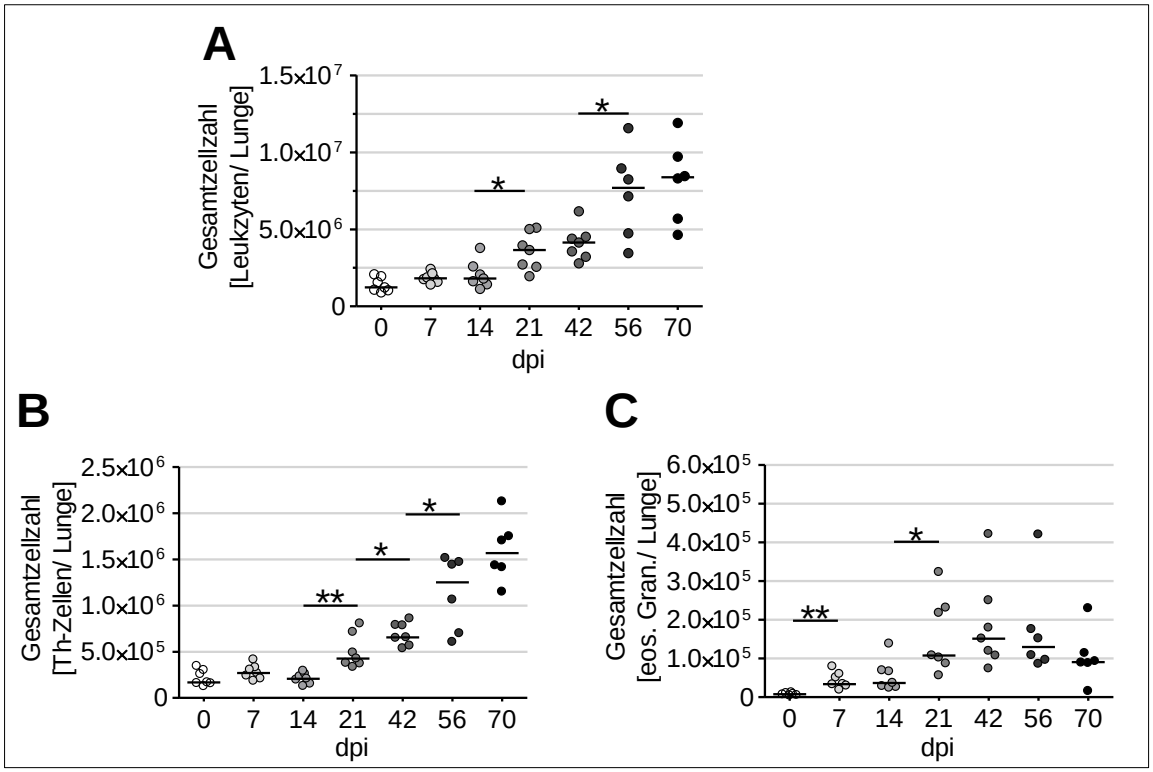


Abbildung 9: Phänotyptische Untersuchung der Lungenleukozyten, T-Helferzellen und eosinophilen Granulozyten nach *Cryptococcus neoformans* Infektion von C57BL/6-Wildtypmäusen. A Gesamtzellzahl der $CD45^+$ Leukozyten pro Lunge. **B** Gesamtzellzahl der $CD3^+$ und $CD4^+$ T-Helferzellen (Th) pro Lunge. **C** Gesamtzellzahl der Siglec-F^+ $CD11c^{neg/dim}$-exprimierenden eosinophilen Granulozyten (eos. Gran.) pro Lunge. Dargestellt ist eines von zwei repräsentativen Experimenten mit je 6-7 Versuchstieren pro Analysetag. Im Streudiagramm sind Medianwerte dargestellt. A/B: T-Test, C: Mann-Whitney U-Test. p-Wert: * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

Die Anzahl an T-Helferzellen in der Lunge steigt über die Zeit an. Die Th2-assoziierten eosinophilen Granulozyten werden vergleichsweise schon sehr früh in die Lunge rekrutiert. So kann bereits 7 Tage nach Infektion ein signifikanter Anstieg der Anzahl dieser Zellpopulation verzeichnet werden. Die maximale Anzahl an eosinophilen Granulozyten ist nach 42 Tagen, d.h. zum Zeitpunkt der Dissemination der Infektion detektierbar.

Die IL-4-abhängige Produktion von IgE ist mittels ELISA im Serum infizierter Tiere ab 28 Tagen nach Infektion detektierbar und steigt mit zunehmendem Infektionsverlauf an (Abbildung 10A). Des Weiteren ist mit Hilfe histologischer Untersuchungen und einer Perjodsäure/ Schiffsches Reagenz (PAS)-Färbung der Lungen eine Analyse der IL-13-abhängigen Mukusproduktion durch die Becherzellen quantifizierbar und der Anstieg des Anteils PAS-positiver Zellen pro Bronchus mit der Zeit nachweisbar (Abbildung 10B).

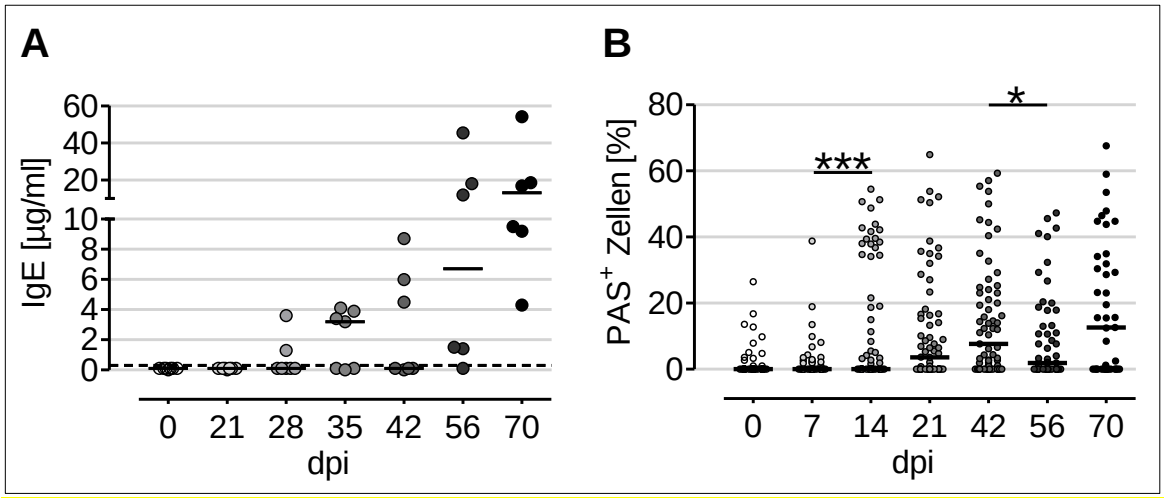


Abbildung 10: Analyse der Th2-assoziierten Immunantwort nach intranasaler *Cryptococcus neoformans* Infektion von C57BL/6-Wildtypmäusen. A Serum-Konzentration von Gesamt-Immunglobulin E (IgE) an verschiedenen Tagen nach Infektion (dpi). Die gestrichelte Linie kennzeichnet das Detektionsminimum. **B** Histologische Untersuchung fixierter Lungenschnitte gefärbt mit Perjodsäure/ Schiffsches Reagenz (Periodic acid-Schiff, PAS) und Quantifizierung PAS-positiver Zellen pro Bronchus in %. Pro Analysetag wurden 6-7 Versuchstiere untersucht. Im Streudiagramm sind die Mediane dargestellt. Mann-Whitney U-Test. p-Wert: * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

Die histologischen Untersuchungen bestätigen die mittels Durchflusszytometrie gewonnenen Ergebnisse. In Abbildung 11 sind exemplarische Hämatoxylin-Eosin (HE)- und PAS-Färbungen einer naiven Lunge im Vergleich zu einer Lunge 56 Tage nach Infektion dargestellt. In der infizierten Lunge sind eindeutig Kryptokokken nachweisbar. Zusätzlich zu den PAS-positiven Becherzellen fällt im Vergleich zu naiven Lungen auch eine massive Zellinfiltration infolge der Infektion auf.

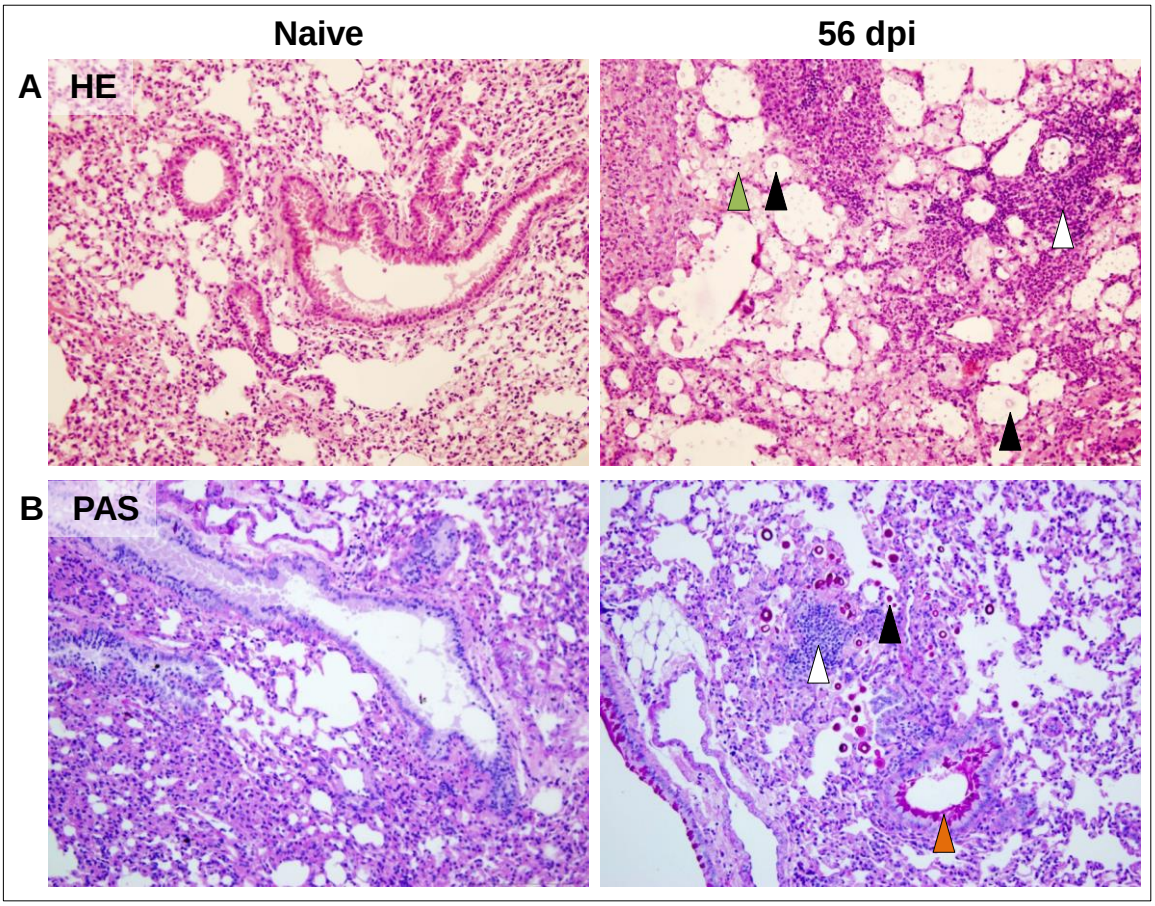


Abbildung 11: Vergleichende histologische Untersuchung von Lungen naiver und infizierter (56 dpi) C57BL/6-Mäuse A Repräsentative Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung. Naive Lungen sind regelrecht belüftet und zeigen keinerlei entzündliches Infiltrat. In infizierten Lungen konnte eindeutig *C. neoformans* (schwarze Pfeile), zum Teil umgeben von Makrophagen (grüner Pfeil), nachgewiesen werden. Zudem fällt eine deutliche Leukozyten-Infiltration auf (weißer Pfeil). **B** Perjodsäure/ Schiffsches Reagenz (PAS)-Färbung: Neben dem Vorhandensein von *C. neoformans* (schwarze Pfeile) unterscheiden sich die infizierten Lungen von den naiven Lungen im Nachweis von deutlich PAS-positivem Epithel (oranger Pfeil) sowie der Leukozyteninfiltration (weißer Pfeil).

3.1.3 Th17-assoziierte Immunantwort

Im Gegensatz zum Anstieg der Th2-abhängigen Immunantwort (Abbildung 9c, Abbildung 10) im Verlauf der Kryptokokkose erreicht die Th17-assoziierte *Cryptococcus*-spezifische Produktion von IL-17A, IL-17F und IL-22 durch isolierte Lungenleukozyten ihr Maximum nach zirka 14 Tagen und fällt im Anschluss bis 70 Tage nach Infektion ab (Abbildung 12). Zum Zeitpunkt der maximalen Produktion (14 dpi) ist eine signifikante Reduktion der Keimlast in der Lunge zu verzeichnen (Abbildung 7A).

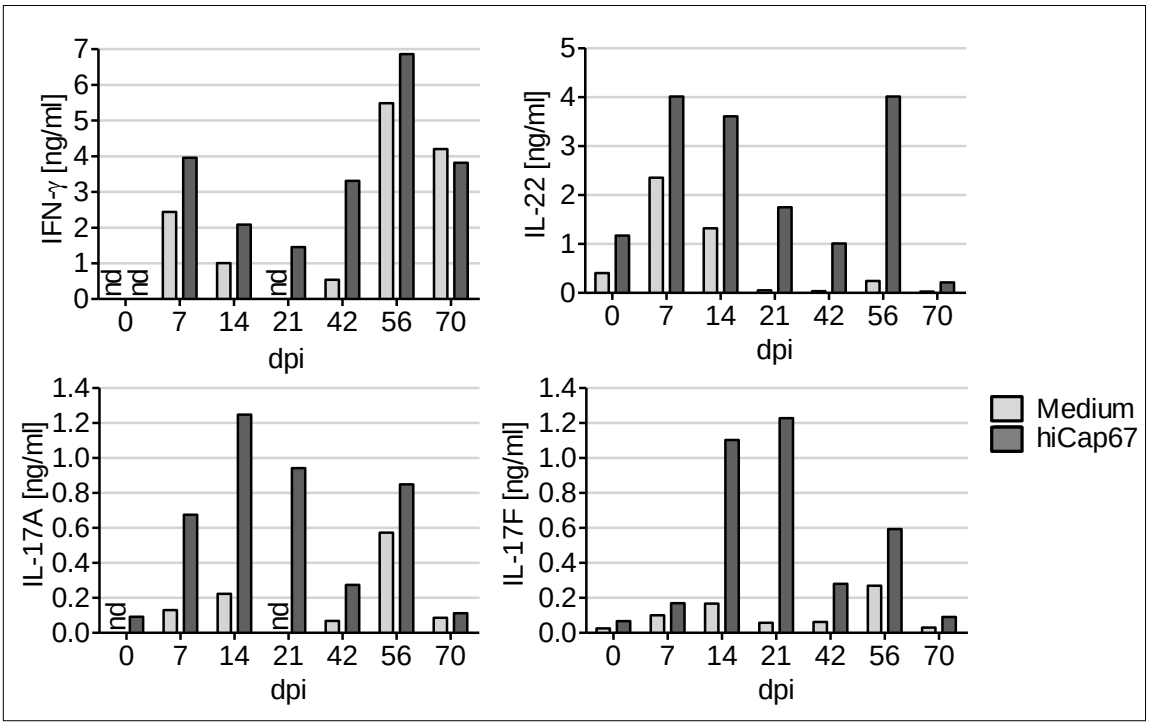


Abbildung 12: Überstandsanalysen der Produktion von Th1- und Th17-assoziierten Zytokinen nach Restimulation isolierter Lungenleukozyten an verschiedenen Tagen nach Infektion mit *Cryptococcus neoformans* von C57BL/6-Wildtypmäusen. Die Überstände gereinigter Lungenleukozyten wurden nach >22 h Restimulation mittels ELISA analysiert. Die Restimulation erfolgte mit dem hitzeinaktivierten *C. neoformans* Stamm Cap67 (hiCap67) und wurde zur Analyse der Antigen-spezifischen Zytokinproduktion im Vergleich zur Medium-Kontrolle dargestellt. Exemplarisch wurden für die Th1-Immunantwort IFN-γ und entsprechend für die Th17-Immunantwort IL-22, IL-17A sowie IL-17F analysiert. Zur Untersuchung wurden die Lungenleukozyten von 6-7 Versuchstieren pro Analysetag vereinigt. Dargestellt ist der Mittelwert. dpi: Tage nach Infektion, nd: nicht detektierbar.

Die Antigen-spezifische Produktion des Th1-Zytokins IFN-γ, welches protektive Funktion aufweist [103], ist schon sehr früh nachweisbar (7 dpi). Das Maximum der IFN-γ-Produktion wird im Unterschied zu den Th17-assoziierten Zytokinen nicht zwischen 7 und 21 dpi erreicht, sondern erst 56 dpi.

IL-17A- und IL-22-produzierende Zellen der Lunge wurden phänotypisiert. Als potentielle Produzenten wurden Th17-Zellen sowie durch IL-17A rekrutierte neutrophile Granulozyten zu den frühen Zeitpunkten analysiert. In Abbildung 13 ist je eine exemplarische Färbung sowie die statistische Analyse im zeitlichen Verlauf dargestellt. Für die Detektion von Th17-Zellen wurde die Expression des für diese Zellen charakteristischen Chemokinrezeptors CCR6 [186] verwendet. Ein signifikanter Anstieg des Anteiles an $CCR6^+$-T-Helferzellen (Th17) ist 14 Tage nach Infektion zu verzeichnen. Dem Anstieg der Th17-Zellen, bezogen auf alle $CD4^+$ Zellen, folgt ebenfalls ein signifikanter Influx von neutrophilen Granulozyten. Tendenziell, jedoch nicht statistisch signifikant, ist die Anzahl der

neutrophilen Granulozyten jedoch bereits 7 Tage nach Infektion erhöht, was auf weitere IL-17A-Produzenten (neben Th17-Zellen) oder eine alternative Rekrutierung hindeuten könnte.

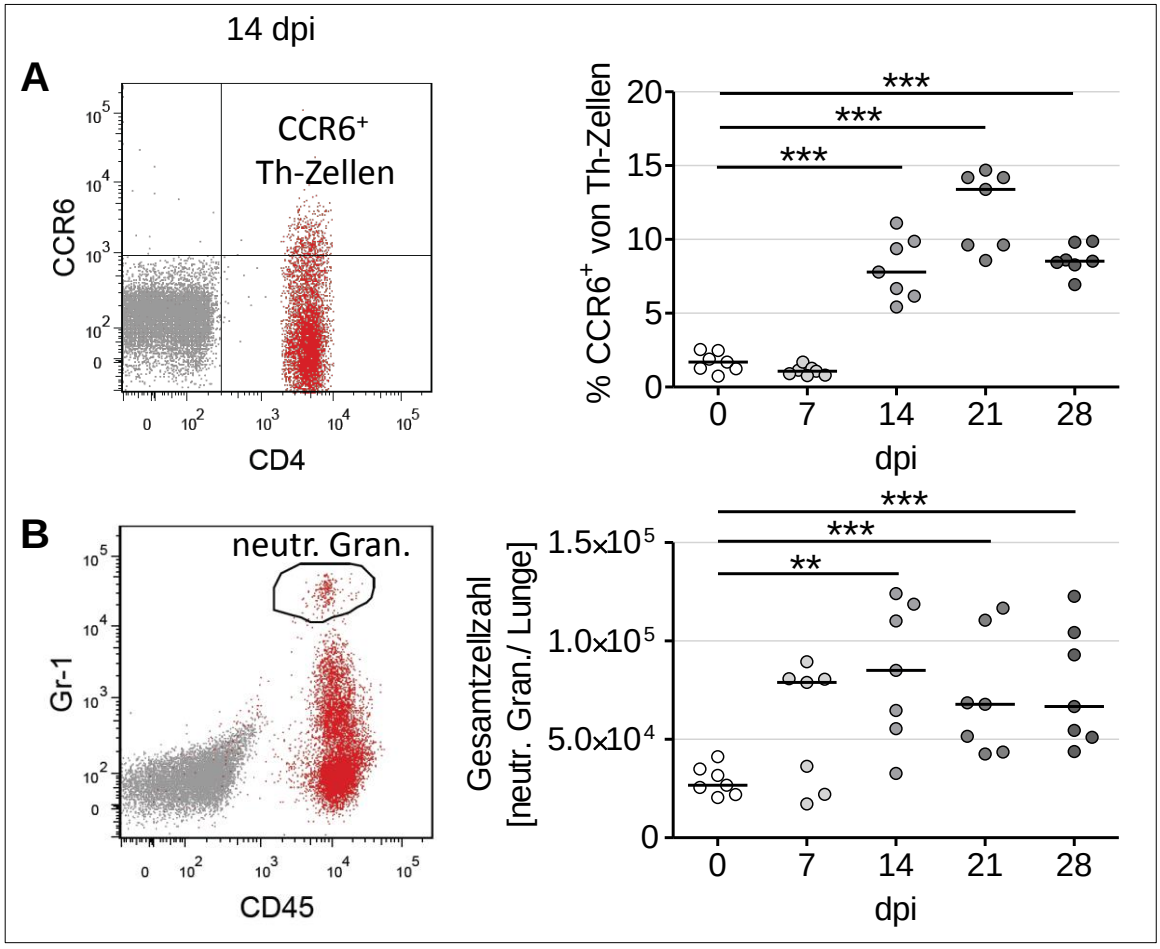


Abbildung 13: Phänotypische Untersuchung von CCR6^{+} Th17-Zellen und Gr-1^{++} neutrophilen Granulozyten nach *Cryptococcus neoformans* Infektion von C57BL/6-Wildtypmäusen. A *Links*: Repräsentative Färbung der CCR6^{+} Th17-Zellen (rot) 14 Tage nach Infektion (dpi) im Vergleich zur Isotypkontrolle (grau). *Rechts*: Analyse der CCR6-Expresion auf Th-Zellen im zeitlichen Verlauf der Infektion. **B** *Links*: Repräsentative CD45/Gr-1-Färbung (14 dpi) von Lungenleukozyten (rot) im Vergleich zur Isotypkontrolle (grau). *Rechts*: Analyse der neutrophilen Granulozyten (neutr. Gran., CD45^{+} Gr-1^{+++}) im zeitlichen Verlauf der Infektion. Dargestellt ist ein Experiment mit je 7 Versuchstieren pro Analysetag. Im Streudiagramm sind die Medianwerte dargestellt. Mann-Whitney U-Test. p-Wert: * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

3.1.4 Zusammenfassung

Zusammenfassend wurde der Verlauf der Kryptokokkose in C57BL/6-Wildtypmäusen nach intranasaler Infektion analysiert. Der besondere Fokus lag dabei vor allem bei der Untersuchung der Th17-assoziierten Immunantwort im Kontext der protektiven Th1- beziehungsweise pathogenen Th2-Immunantwort. In Abbildung 14 sind die Ergebnisse der Analysen der T-Helferzellantworten in den ersten 70 Tagen nach Infektion mit *C. neoformans* grafisch dargestellt.

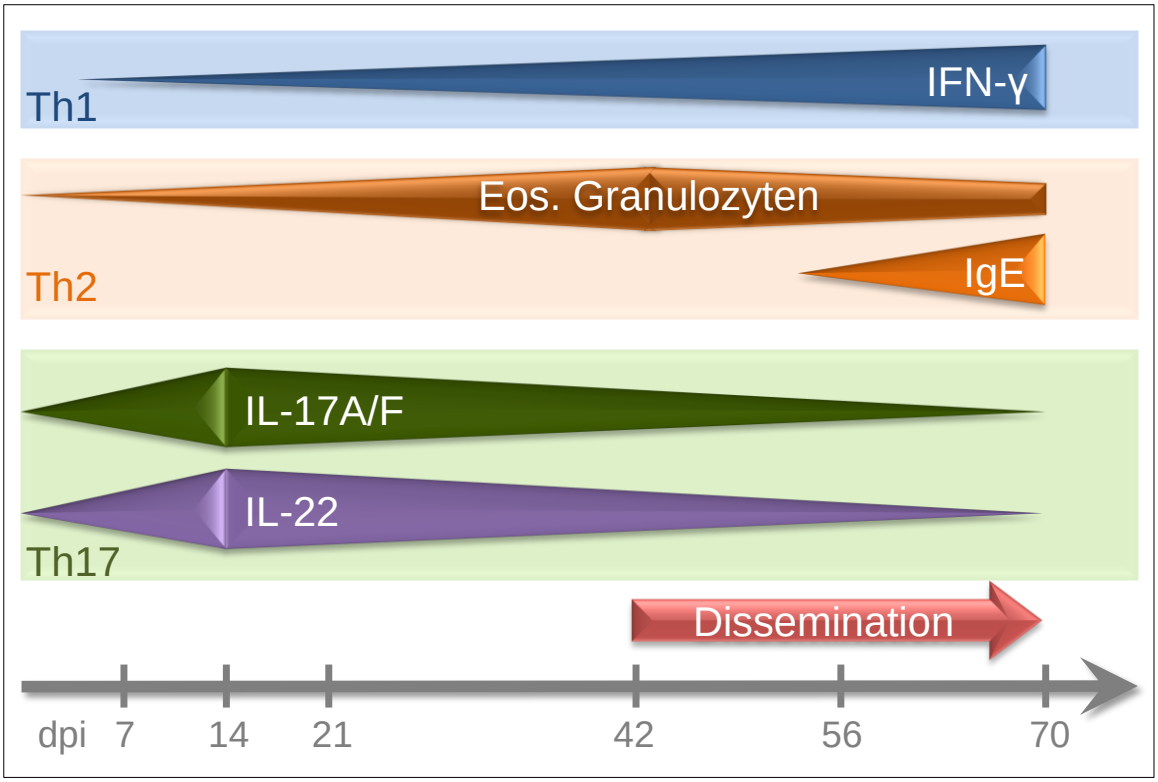


Abbildung 14: Zusammenfassende Darstellung des zeitlichen Verlaufes der verschiedenen T-Helferzell-assoziierten Immunantworten (Th1, Th2 und Th17) in der C57BL/6-Wildtypmaus. Zum Zeitpunkt der maximalen Anzahl an eosinophilen Granulozyten (42 Tage nach Infektion (dpi)) erfolgte die Dissemination von *C. neoformans* ins Gehirn der Versuchstiere.

Interessanterweise ist bereits nach 2 Wochen die stärkste Th17-assoziierte Immunantwort festzustellen. Zu diesem Zeitpunkt ist eine Reduktion der Lungenlast, verglichen mit 7 dpi zu verzeichnen. Daher wurden alle potentiellen IL-17A und IL-22-produzierenden Zellen 14 dpi analysiert.

3.1.5 Charakterisierung der IL-17A- und IL-22-produzierenden Zellen in der Lunge

In der Literatur findet sich eine Reihe von Darstellungen der Zellpopulationen, welche in der Lage sind IL-17A und IL-22 zu produzieren [149, 187].

Über die zellulären Quellen von IL-17A während der Infektion mit *C. neoformans* sind aktuell jedoch nur 2 Studien veröffentlicht [126, 188]. Diese postulieren, dass neutrophile Granulozyten die überwiegende Quelle von IL-17A, nach Infektion mit dem IFN-γ-produzierenden Stamm H99γ, sind. Bezüglich der möglichen Quelle von IL-22 während der Kryptokokkose sind aktuell keine Berichte publiziert.

Nach den Daten aus *3.1.3* war es naheliegend, die zellulären Quellen von IL-17A und IL-22 in der Lunge intranasal infizierter C57BL/6-Wildtypmäuse zu charakterisieren.

Zunächst erfolgte die phänotypische Analyse der Lungenleukozyten (naiv und 14 dpi). In Abbildung 15 ist die Analyse-Strategie der phänotypischen Untersuchungen gezeigt.

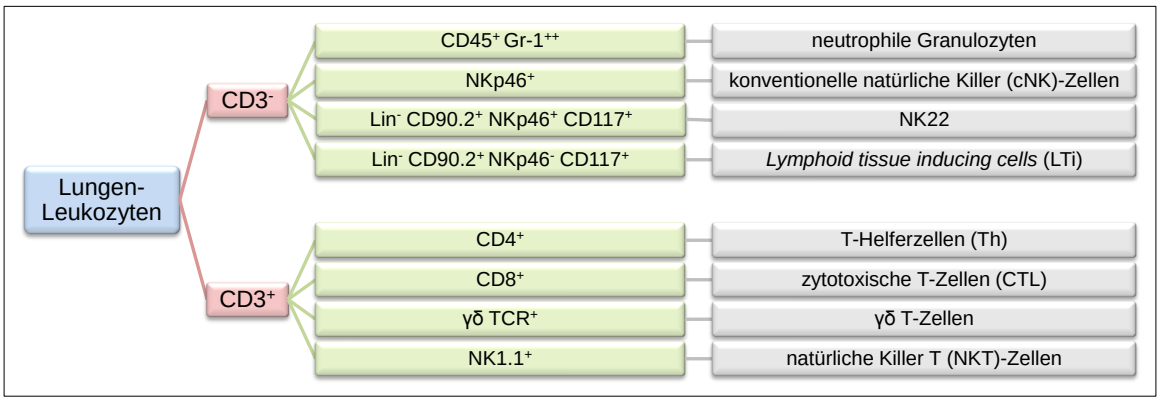


Abbildung 15: Analyse-Strategie der durchflusszytometrischen Untersuchung der möglichen, Zytokin-produzierenden Lungenleukozyten. Nach Ausschluss der toten Zellen erfolgte die Analyse der spezifischen Oberflächenmarker der einzelnen Leukozytensubpopulationen. *Lineage* (Lin): B220, CD11b, CD11c, Gr-1, T1/ST2.

Die folgende Abbildung 16 fasst die prozentualen Anteile möglicher Zytokin-Produzenten in der Lunge 14 Tage nach *C. neoformans* Infektion im Vergleich zu naiven Mäusen zusammen.

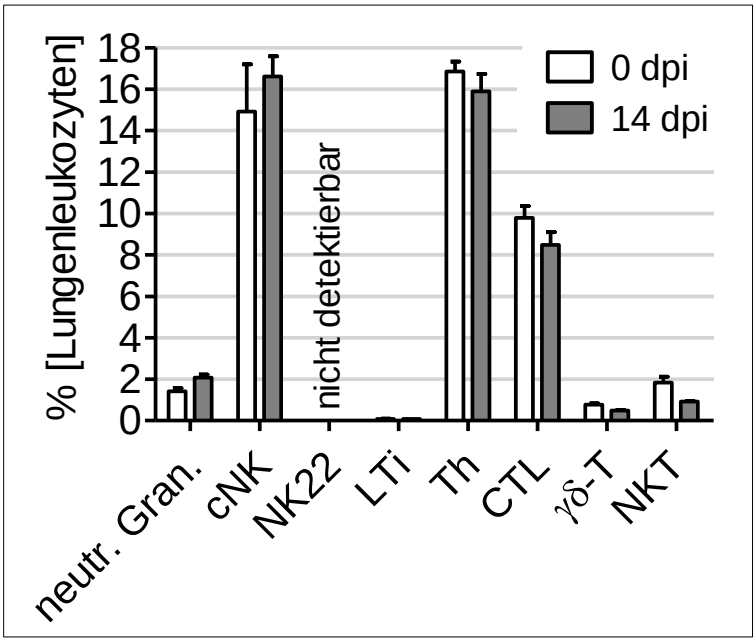


Abbildung 16: Mögliche Th17-assoziierte Zytokin-Produzenten in der Lunge naiver und infizierter C57BL/6-Wildtyptiere. Gezeigt sind die prozentualen Anteile der analysierten Subpopulationen: neutrophile Granulozyten (neutr. Gran.), konventionelle natürliche Killerzellen (cNK), NK22-Zellen, *Lymphoid-tissue-inducer* (LTi)-Zellen, T-Helferzellen (Th), zytotoxische T-Zellen (CTL), γδ T-Zellen (γδ T) und NK-T-Zellen, bezogen auf alle Lungenleukozyten. Pro Analysetag ist ein Experiment mit je 3-7 Versuchstieren dargestellt. Im Diagramm ist der Mittelwert mit Standardfehler dargestellt.

Nach Isolation der Lungenleukozyten aus naiven und infizierten (14 dpi) C57BL/6-Wildtyptieren gelang es folgende möglichen Th17-assoziierten Zytokin-produzenten in der Lunge nachzuweisen: neutrophile Granulozyten, NK/NKT-Zellen und verschiedene T-Zellsubpopulationen. NK22- und LTi-Zellen sind kaum beziehungsweise nicht nachweisbar.

Um herauszufinden, in welchem Maße die nachweisbaren potentiellen Zytokin-produzenten tatsächlich zur Freisetzung von IL-17A und IL-22 während der Kryptokokkose beitragen, wurden Lungenleukozyten polyklonal mit PMA/Ionomycin stimuliert. Bei der Auswertung wurde nach der in Abbildung 17 dargestellten Strategie vorgegangen. Dabei wurden stark granuläre Zellen für die weitere Analyse ausgeschlossen, da diese falsch-positive Signale lieferten. Vorversuche, bei denen alle lebenden Zellen analysiert wurden, zeigten keine Zytokinfärbung der neutrophilen Granulozyten, so dass für die folgenden Experimente auf die Untersuchung dieser verzichtet wurde. Die Analyse der Oberflächenmarker erfolgte nach Auswahl der entsprechenden Zytokin-positiven Zellen.

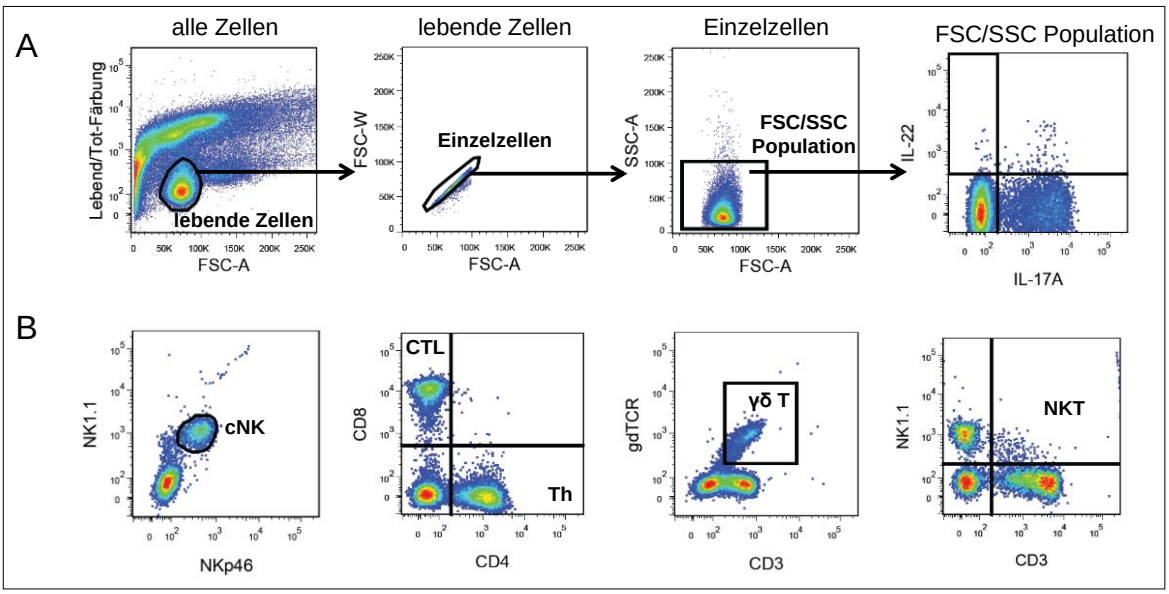


Abbildung 17: Repräsentative durchflusszytometrische Analyse intrazellulär gefärbter Zytokine (IL-17A, IL-22) und Charakterisierung der produzierenden Zellpopulationen 14 Tage nach Infektion. A *Gating*-Strategie zur Analyse Zytokin-positiver Zellen. Es wurden zunächst die lebenden Zellen ausgewählt. Im Anschluss erfolgte der Ausschluss von Dubletten sowie von im Seitwärtsstreulicht stark granulär erscheinenden Zellen. Danach konnte die Zytokin-Färbung dargestellt werden. Zur Charakterisierung der Zytokin-positiven Zellen erfolgte die Analyse der spezifischen Oberflächenmarker. **B** Repräsentative Oberflächenmarker-Färbung der FSC/SSC Population aus A. **A/B** Exemplarisch ist die Färbung von C57BL/6-Wildtyp-Lungenleukozyten nach 6 h Stimulation mit PMA/Ionomycin dargestellt. Zur intrazellulären Akkumulation der Zytokine wurde für die letzten 4 h der PMA/Ionomycin-Stimulation Brefeldin A zugegeben.

Zur Beurteilung der infektionsbedingten Zytokinproduktion erfolgte der Vergleich naiver und infizierter Tiere. In Abbildung 18 ist der Anteil der Zytokin-positiven Zellen, bezogen auf alle restimulierten Lungenleukozyten naiver Tiere und 14 Tage nach Infektion dargestellt. Es wird deutlich, dass ein Anstieg Zytokin-positiver Zellen 14 Tage nach Infektion zu verzeichnen ist. Es sind jedoch nur eine geringe Anzahl IL-22- und IL-17A/IL-22-produzierender Zellen nachweisbar. Zum Ausschluss falsch-positiver Signale wurde eine entsprechende Isotypkontrolle mitgeführt.

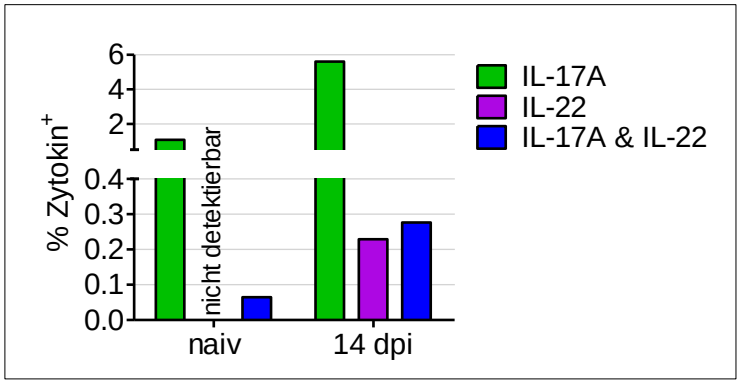


Abbildung 18: Anteil Zytokin-positiver Lungenleukozyten naiver und infizierter (14 dpi) C57BL/6-Wildtypmäuse. Die intrazelluläre Färbung erfolgte nach 6 h PMA/Ionomycin Restimulation (4 h Brefeldin A). Gezeigt ist eins von 2-3 Experimenten mit je 2 Pools von Lungenleukozyten von 3-4 Tieren/Pool. Im Diagramm ist der Mittelwert gezeigt.

Die folgende Abbildung fasst die Ergebnisse der Analyse der IL-17A- und IL-22-produzierenden Zellpopulationen 14 Tage nach Infektion zusammen.

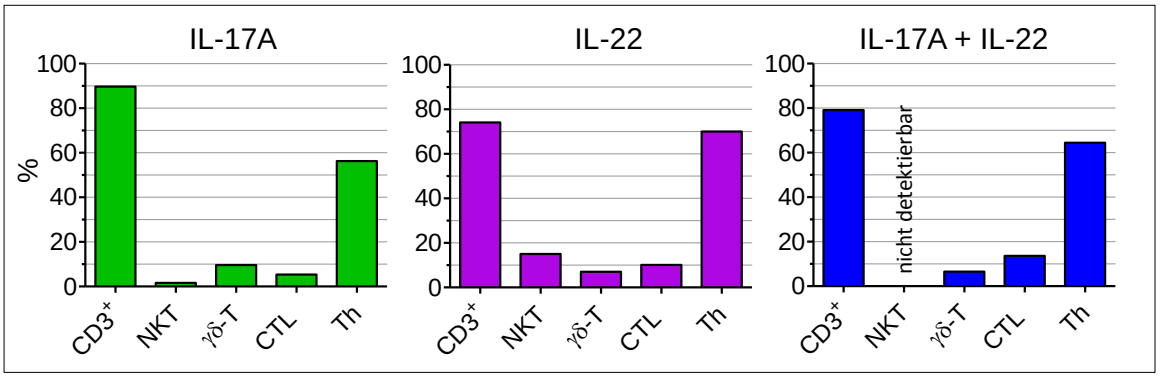


Abbildung 19: IL-17A-/ IL-22-produzierende Zellen der Lunge von C57BL/6-Wildtypmäusen 14 Tage nach *Cryptococcus neoformans* Infektion. Die Färbung erfolgte nach PMA/Ionomycin Stimulation. Dargestellt sind die Ergebnisse von drei (IL-17A), beziehungsweise einem (IL-22, IL-17A und IL-22) Experiment(en) mit je 2 verschiedenen Ansätzen (aus 3-4 Einzeltieren) von Lungenleukozyten. Im Diagramm ist der Mittelwert gezeigt.

Sowohl IL-17A- als auch IL-22-produzierende Zellen sind fast ausschließlich in der Population CD3-positiver Zellen zu finden. Dies trifft ebenso auf IL-17A-/IL-22-Doppelproduzenten zu. Auf die weitere Darstellung und Charakterisierung CD3-negativer Zellen wurde verzichtet, da die Analyse sehr kleiner Subpopulation zu zweifelhaften Ergebnissen führen kann.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass 14 Tage nach Infektion ein deutlicher Anstieg der IL-17A- und IL-22-Produktion zu verzeichnen ist. Nach Restimulation mit PMA/Ionomycin (unter dargestellten Bedingungen) ist es möglich, vor allem $CD3^+$ T-Zellen als zelluläre Quelle zu identifizieren. Dabei scheinen die $CD4^+$ T-Helferzellen die bedeutendsten Produzenten dieser Interleukine zu sein. Folglich wurde zur Untersuchung der Wirkung der Th17-assoziierten Immunantwort versucht, diese Zellen in gentechnisch veränderten Mäusen, bei denen die Th17-Antworten erhöht sind, zu analysieren.

3.2 Funktionsanalyse der Th17-assoziierten Immunantwort bei der Kryptokokkose

Nach der Antigen-Präsentation sind naive T-Helferzellen, abhängig vom umgebenden Milieu, in der Lage in verschiedene T-Helferzellsubpopulationen zu differenzieren. Die Entwicklung von Th1-Zellen ist IL-12- und IFN-γ-abhängig [189, 190]. Eine Th2-gerichtete Immunantwort wird hingegen durch IL-4 gefördert [191-194]. Diese Zytokine induzieren nicht nur einen bestimmten Typ von T-Helferzellen, sondern hemmen zugleich die Differenzierung der anderen T-Helferzellsubpopulationen [195]. Neben der gegenseitigen Regulation von Th1 und Th2, wurde die Hemmung der Th17-Entwicklung durch IL-12, IFN-γ und IL-4 beschrieben [115, 196]. Die Regulation der T-Zelldifferenzierung war Grundlage für die folgenden Untersuchungen zur *in-vivo*-Funktion der Th17-assoziierten Zytokine.

Die Vorarbeiten durch Dr. Melanie Kleinschek, unter Leitung von Prof. Dr. Gottfried Alber, lieferten erste Hinweise bezüglich einer protektiven Funktion der Th17-assoziierten Immunantwort bei der Kryptokokkose [197]. Dabei konnte gezeigt werden, dass nach intraperitonealer Infektion, die Gabe von IL-23 das Überleben der C57BL/6-Wildtyptiere verlängert sowie die Keimlast in Gehirn, Leber und der Peritonealflüssigkeit reduziert. IL-23 induziert die Produktion von IL-17A und IL-22. Folglich konnte eine mögliche protektive Wirkung dieser Zytokine erwogen werden. Im Rahmen der folgenden Arbeit sollte nun die mögliche, schützende Funktion dieser Th17-assoziierten Zytokine näher untersucht werden.

Zuerst sollte versucht werden mit Hilfe der direkten Ausschaltung der Th17-assoziierten Zytokine IL-17A und IL-22 deren Rolle bei der Kryptokokkose zu analysieren. Auf Grund der Vorarbeiten durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Gottfried Alber [101, 145, 197] und der Gruppe von Kyle I. Happel [198] schien es fachlich sowie tierschutzrechtlich vielversprechender die Depletion in IL-12p35-defizienten Tieren, nicht in Wildtyptieren, vorzunehmen und zu untersuchen. Versuchstiere mit einer IL-12p35-Defizienz weisen eine gesteigerte Expression von IL-23 und IL-17A auf [197, 198].

In Abbildung 20 ist die Hemmung der Th17-Zelldifferenzierung durch Th1- und Th2-assoziierte Zytokine, sowie die Auswirkungen einer IL-12p35-Defizienz grafisch dargestellt.

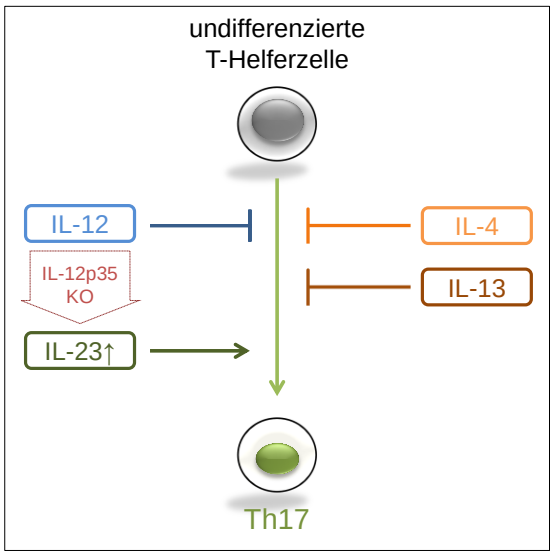


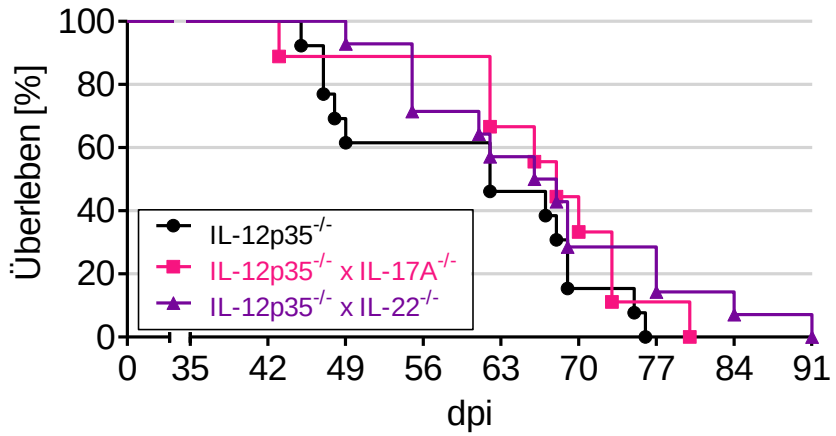
Abbildung 20: Regulation der Th17-Zell-differenzierung. Die Entwicklung der Th17-Zellen wird durch die Th1-assoziierten Zytokine IL-12 und IFN-γ sowie die Th2-Zytokine IL-4 und IL-13 gehemmt. Nach Depletion von IL-12p35 erfolgt die Induktion von IL-23, welches die Entwicklung von Th17-Zellen fördert.

3.2.1 Depletion von IL-17A und IL-22 in Mäusen mit verminderter Th1-Immunantwort

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folglich IL-17A- beziehungsweise IL-22-defiziente Mäuse mit IL-12p35$^{-/-}$ Tieren gekreuzt. Resultierende „doppel-*knockout*"-Mäuse sollten im Vergleich zur Kontrollgruppe (IL-12p35-defiziente Tiere) in einem Überlebensversuch zeigen, in wie weit die IL-17A/IL-22-Defizienz Auswirkungen auf die Überlebenszeit hat.

Bei Vorhandensein einer protektiven Wirkung von IL-17A oder IL-22 während der Kryptokokkose, sollten IL-12p35$^{-/-}$ x IL-17A$^{-/-}$ beziehungsweise IL-12p35$^{-/-}$ x IL-22$^{-/-}$ Tiere schneller versterben als die Kontrollgruppe (IL-12p35$^{-/-}$).

Nach intranasaler Infektion mit *C. neoformans* erliegen alle Versuchstiere der Erkrankung (Abbildung 21). Zwischen den Gruppen kann kein signifikanter Unterschied bezüglich der Überlebenszeit festgestellt werden. Die Überlebens-kurven, Überlebenszeiten sowie verwendeten Versuchstierzahlen sind in der folgenden Abbildung zusammengestellt.



Genotyp	n	Überlebenszeit* (Tage)
IL-12p35$^{-/-}$	13	62
IL-12p35$^{-/-}$ x IL-17A$^{-/-}$	9	68
IL-12p35$^{-/-}$ x IL-22$^{-/-}$	14	67

* Median

Abbildung 21: Überlebensdaten von IL-12p35$^{-/-}$, IL-12p35$^{-/-}$ x IL-17A$^{-/-}$ und IL-12p35$^{-/-}$ x IL-22$^{-/-}$ Mäusen. Überlebenskurven der verschiedenen *Knockout*-Mäuse nach Infektion mit *C. neoformans*. In der Tabelle sind die Anzahl der Versuchstiere sowie die Überlebenszeit (Median) der verschiedenen Genotypen aufgeführt. Die Daten stammen aus 2 unabhängigen Versuchen mit je 4-7 Tieren pro Experiment und Genotyp. Logrank-Test zum Vergleich der Überlebensraten.

Mögliche redundante Funktionen der verschiedenen Th17-assoziierten Zytokine könnten in diesem Fall die Ursache für das Fehlen von Unterschieden sein. Ebenso könnten IL-17/IL-22-unabhängige Funktionen von IL-23 der Grund für das Fehlen von Unterschieden sein.

3.2.2 Th17-assoziierte Immunantwort in Mäusen mit verminderter Th1- und Th2-Immunantwort

Die direkte Ausschaltung von IL-17A bzw. IL-22 ließ keine eindeutigen Interpretationen bezüglich der Funktionen dieser Zytokine zu. Zur Analyse der Funktion der Th17-assoziierten Immunantwort wurde eine IL-12p35$^{-/-}$ x IL-4R$\alpha^{-/-}$ Mauslinie mit verminderter Th1- und Th2-Immunantwort gezüchtet. Es wurde erwartet, dass diese Tiere eine verstärkte Th17-assoziierte Immunantwort aufweisen.

Für die Untersuchungen wurden IL-12p35$^{-/-}$, IL-4R$\alpha^{-/-}$ sowie IL-12p35$^{-/-}$ x IL-4R$\alpha^{-/-}$ Mauslinien verwendet. Die stärkste Steigerung der Th17-assoziierten Immunantwort wurde in den IL-12p35$^{-/-}$ x IL-4R$\alpha^{-/-}$ Mäusen erwartet. Zuerst wurde überprüft, ob sich die verschiedenen Depletionen wie vorhergesagt auf die *Cryptococcus*-spezifische Produktion von Th1- und Th17-assoziierten Zytokinen auswirken. Dafür wurden an zwei verschiedenen Analysetagen Untersuchungen durchgeführt. Es wurden ein früher Zeitpunkt (14 dpi), an welchem die stärkste Th17-assoziierte Zytokinproduktion festgestellt wurde sowie ein etwas späterer Zeitpunkt (42 dpi), mit etablierter Th2-assoziierter Immunantwort in der Wildtypmaus, gewählt. Die Bestimmung der Keimlast in den verschiedenen Organen sollte erste Hinweise bezüglich der Funktion einer beobachteten gesteigerten Interleukin-Produktion liefern. Anschließend sollte mittels eines Überlebensversuches die Resistenz der verschiedenen gentechnisch veränderten Tiere festgestellt werden, um die Bedeutung der verschiedenen T-Helferzellantworten einschätzen zu können. Überlebende Tiere sollten weitere Aufschlüsse bezüglich der Resistenzmechanismen liefern.

Für die weitere Bewertung der erwarteten Steigerung der Th17-assoziierten Immunantwort durch den *Knockout* von IL-12p35 beziehungsweise des IL-4Rα, wurden die Lungenleukozyten der verwendeten Mauslinien 14 und 42 Tage nach Infektion isoliert und mit einem hitzeinaktivierten *C. neoformans* Stamm stimuliert. Die Produktion der verschiedenen Th1- und Th17-assoziierten Zytokine erfolgte mittels ELISA und diente der Beurteilung der dominierenden, möglicherweise protektiven T-Helferzellantwort. Die folgende Abbildung fasst die Ergebnisse zusammen.

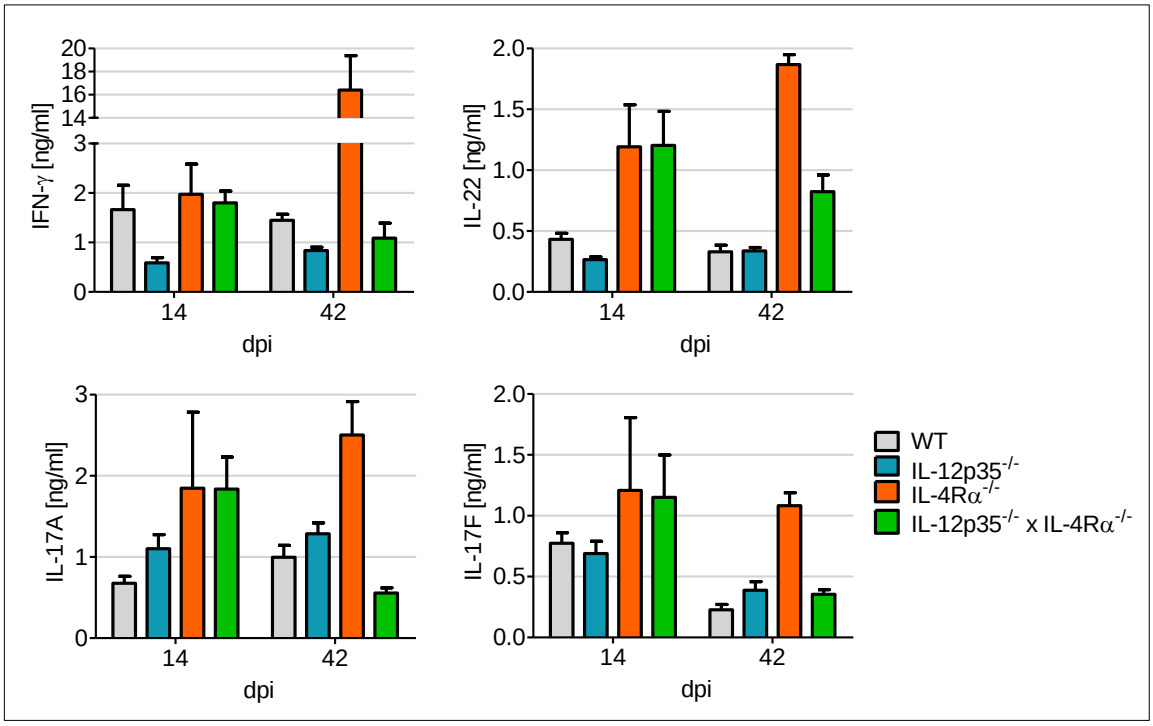


Abbildung 22: Überstandsanalysen der Produktion von Th1- und Th17-assoziierten Zytokinen nach Restimulation isolierter Lungenleukozyten 14 und 42 Tage nach intranasaler Infektion von C57BL/6-Wildtyp- und *Knockout*-Mäusen mit *Cryptococcus neoformans*. Die Überstände gereinigter Lungenleukozyten wurden nach 22-stündiger Restimulation mittels ELISA analysiert. Die Restimulation erfolgte mit dem hitzeinaktivierten *C. neoformans* Stamm Cap67. Exemplarisch wurden für Th1 IFN-γ, für Th17 IL-17A, IL-17F und IL-22 analysiert. Untersucht wurden die Lungenleukozyten von zwei unabhängigen Versuchen mit je zwei Pools von 3-4 Tieren. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler. dpi: Tage nach Infektion.

Die bekannte protektive Th1-assoziierte Immunantwort ist zu dem frühen Zeitpunkt (14 dpi) ausschließlich in den IL-12p35-defizienten Mäusen verringert. Wildtyptiere, IL-4Rα$^{-/-}$, aber auch IL-12p35$^{-/-}$ x IL-4Rα$^{-/-}$ Mäuse weisen in etwa die gleichen Mengen an *Cryptococcus*-spezifischem sezerniertem IFN-γ auf. In den IL-12p35$^{-/-}$ Tieren kann eine IL-12-unabhängige IFN-γ-Produktion verzeichnet werden, welche durch die Defizienz des IL-4Rα verstärkt wird. 42 Tage nach Infektion kann ausschließlich in den IL-4Rα-defizienten Tieren eine verstärkte Th1-Antwort detektiert werden.

Bezüglich der Th17-assoziierten Zytokine kann 14 Tage nach Infektion in beiden IL-4Rα-defizienten Tieren die erhöhte Produktion nachgewiesen werden. Zu diesem frühen Zeitpunkt scheinen die Th2-assoziierten Zytokine IL-4 und/oder IL-13 in einer Hemmung von IL-17A, IL-17F und IL-22 zu resultieren. Später in der Infektion kann eine Zunahme der Konzentration der untersuchten Th17-assoziierten Zytokine ausschließlich in den IL-4Rα$^{-/-}$ Mäusen detektiert werden.

Neben der Analyse der Zytokinproduktion infolge der Antigen-spezifischen Restimulation isolierter Leukozyten, erfolgte die phänotypische Charakterisierung der verschiedenen T-Helferzellsubpopulationen 42 Tage nach Infektion in der Lunge (Abbildung 23A, C, D). Des Weiteren wurde die Frequenz eosinophiler Granulozyten zur Beurteilung des Voranschreitens der Th2-abhängigen Immunpathologie quantifiziert (Abbildung 23B).

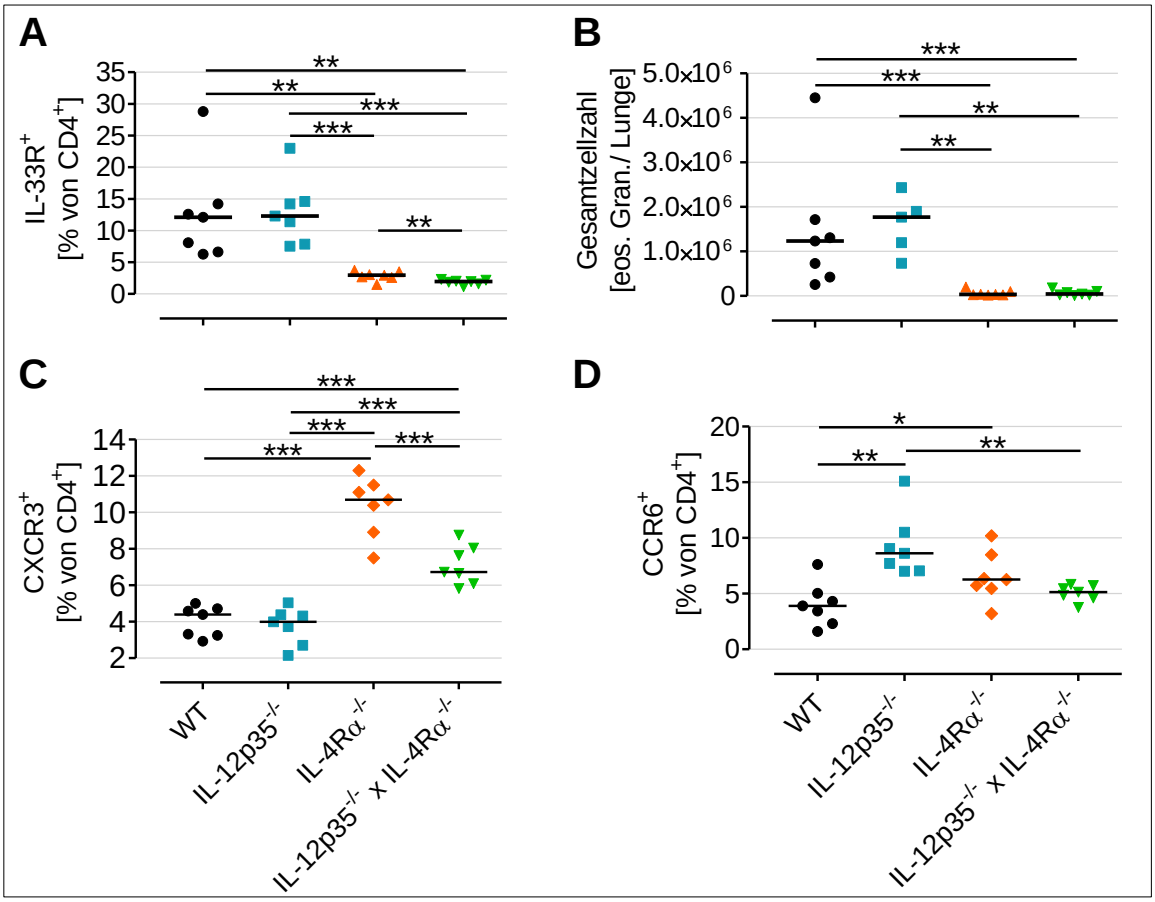


Abbildung 23: Phänotyptische Untersuchung der Lungenleukozyten 42 Tage nach *Cryptococcus neoformans*-Infektion von C57BL/6-Wildtyp- und verschiedenen *Knockout*-Mäusen. A Anteil IL-33R$^+$ (Th2)-Zellen bezogen auf CD4$^+$ Lungenlymphozyten. **B** Gesamtzellzahl der eosinophilen Granulozyten pro Lunge. **C** Anteil CXCR3$^+$ (Th1)-Zellen bezogen auf CD4$^+$ Lungenlymphozyten. **D** Anteil CCR6$^+$ (Th17)-Zellen bezogen auf CD4$^+$ Lungenlymphozyten. Dargestellt ist ein Experiment mit je 5-7 Versuchstieren pro Genotyp. Im Streudiagramm sind die Medianwerte dargestellt. A/C/D T-Test. B Mann-Whitney U-Test. p-Wert: * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

Die Analyse des IL-33-Rezeptors (IL-33R) auf CD4$^+$ (T-Helferzellen) [199] diente der Quantifizierung des Anteiles an Th2-Zellen (Abbildung 23A). Wie erwartet kann bestätigt werden, dass eine Ausschaltung des IL-4Rα eine hochsignifikante Reduktion dieser Zellen zur Folge hat. Damit übereinstimmend sind in diesen Tieren signifikant weniger eosinophile Granulozyten detektierbar (Abbildung 23B).

Die Untersuchung CXCR3^{+} T-Helferzellen sollte der Abschätzung der Th1-assoziierten Immunantwort [200] dienen (Abbildung 23C). Es zeigt sich, dass die IL-4R$\alpha^{-/-}$ Tiere die stärkste Th1-Immunantwort aufweisen, vergleichbar der Überstandsanalyse (Abbildung 22). Im Gegensatz zur IFN-γ-Produktion ist der Anteil CXCR3^{+}-Zellen in den IL-12p35$^{-/-}$ x IL-4R$\alpha^{-/-}$ Tieren im Vergleich zur Wildtypgruppe und den IL-12p35-defizienten Tieren erhöht.

Bezüglich der Expression von CCR6 auf T-Helferzellen kann keine Korrelation der Ergebnisse der Überstandsanalysen und der phänotypischen Untersuchungen festgestellt werden (Abbildung 22 und Abbildung 23D). Als Ursache der vermehrten IL-17A, IL-17F und IL-22 Sekretion in der IL-4Rα-defizienten Gruppe 42 Tage nach Infektion scheinen folglich andere Zellen als T-Helferzellen beteiligt zu sein. Erste Untersuchungen zeigen, dass $\gamma\delta$ T-Zellen als Produzenten der gesteigerten Zytokin-Sezernierung in Frage kommen.

Die Analyse der Keimlast in Lunge und Gehirn nach 14 und 42 Tagen sollte nun weitere Aufschlüsse bezüglich der Wirkung der modulierten Zytokinproduktion liefern. Die Abbildung 24 legt die ermittelten Keimlasten an *C. neoformans* in Lunge und Gehirn dar.

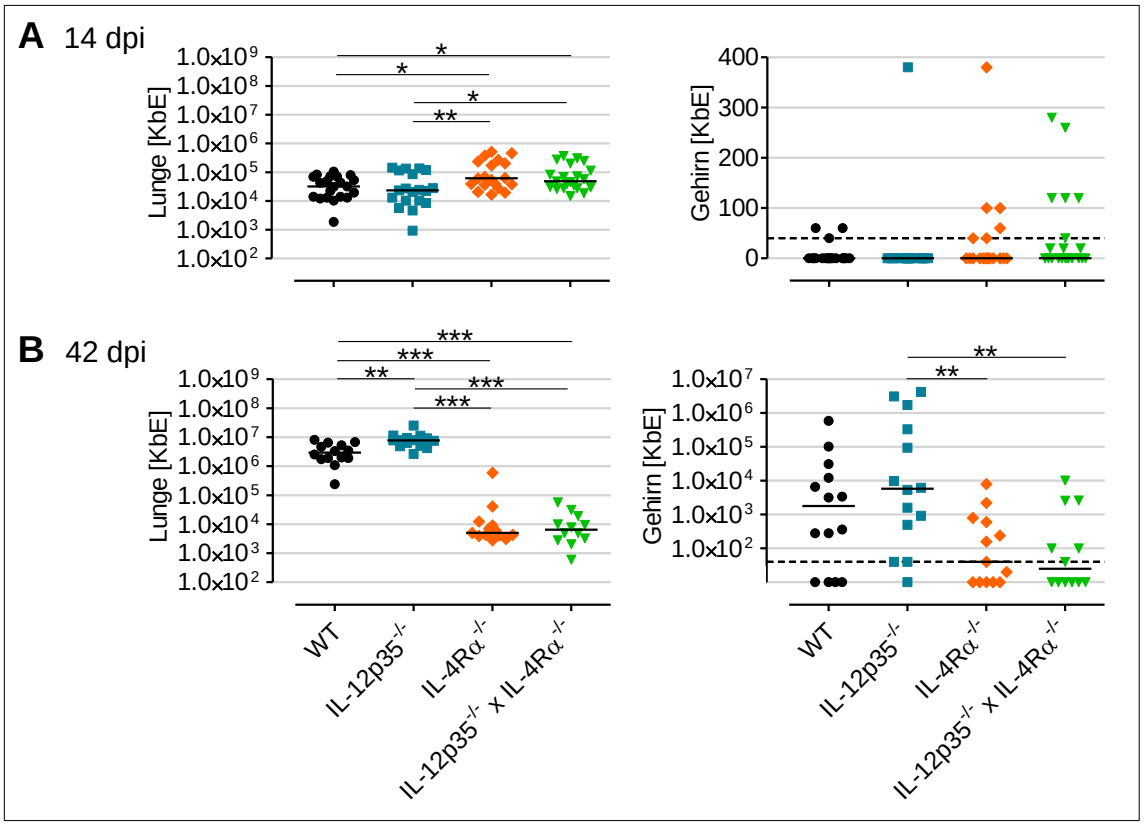
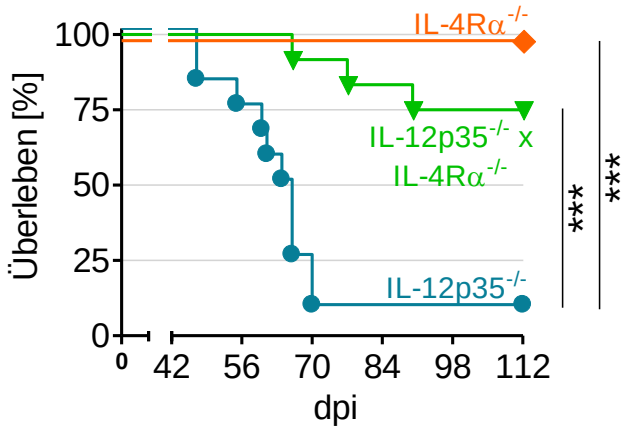


Abbildung 24: Analyse der Organlast (Lunge und Gehirn) nach Infektion mit *Cryptococcus neoformans* von C57BL/6-Wildtyp und IL-12p35-, IL-4Rα- und IL-12p35 x IL-4Rα-defizienten Mäusen. A Die Untersuchung erfolgte 14 Tage nach Infektion (dpi). **B** Die Analyse erfolgte 42 dpi. **A/B** Dargestellt sind die Daten aus 2-3 unabhängigen Experimenten mit je 6-7 Versuchstieren pro Genotyp. Im Streudiagramm sind die Medianwerte dargestellt. Die gestrichelte Linie stellt das Detektionsminimum dar. Mann-Whitney U-Test. p-Wert: * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

In beiden IL-4Rα-defizienten Mauslinien kann 14 Tage nach der Infektion eine gesteigerte Produktion, im Vergleich zu den anderen Gruppen, Th17-assoziierter Zytokine festgestellt werden (Abbildung 22). Zum frühen Zeitpunkt sind unerwarteterweise signifikant mehr Pilze in der Lunge IL-4Rα-defizienter Tiere nachweisbar.

Nach 42 Tagen weisen IL-12p35-defiziente Tiere wie erwartet die höchsten Keimlasten in der Lunge auf. Beide IL-4Rα-defizienten Genotypen zeigen die gleichen, signifikant reduzierten Mengen an Pilz in der Lunge. Im Gehirn der IL-4Rα-defizienten Tiere finden sich ebenfalls reduzierte Mengen an *C. neoformans*. Abschließend lässt sich feststellen, dass die Steigerung der Th17-assoziierten Immunantwort zu einem frühen Zeitpunkt wahrscheinlich keine hemmenden Effekte auf die Proliferation von *C. neoformans* ausübt. Zu diesem Zeitpunkt sind höchstwahrscheinlich andere Mechanismen für die Induktion einer effektiven Immunantwort gegen *C. neoformans* relevant und werden diskutiert.

Ein Überlebensversuch sollte weitere Hinweise bezüglich der Resistenz der verwendeten gentechnisch veränderten Mausstämme gegenüber der Pilzinfektion geben.
Wie erwartet sind IL-4Rα$^{-/-}$ Tiere vollständig resistent gegenüber *C .neoformans*, während IL-12p35$^{-/-}$ Mäuse der Infektion fast zu 100% erliegen. Interessanterweise ist der überwiegende Teil (75%) der IL-12p35$^{-/-}$ x IL-4Rα$^{-/-}$ Tiere in der Lage die Infektion zu überleben (Abbildung 25).



Genotyp	n	Überlebende Tiere (Anzahl)	Überlebenszeit (Tagen)
IL-4Rα$^{-/-}$	13	13	>180
IL-12p35$^{-/-}$ x IL-4Rα$^{-/-}$	12	9	>180
IL-12p35$^{-/-}$	12	1	65*
			* Median

Abbildung 25: Überlebensdaten von IL-12p35$^{-/-}$, IL-12p35$^{-/-}$ x IL-4Rα$^{-/-}$ und IL-4Rα$^{-/-}$ Mäusen. Überlebenskurven der verschiedenen *Knockout*-Mäuse nach Infektion mit *C. neoformans*. In der Tabelle sind die Gesamtzahl der Versuchstiere, überlebende Tiere sowie die Überlebenszeit (Median) der verschiedenen Genotypen aufgeführt. Die Ergebnisse stammen aus 2 unabhängigen Versuchen. Logrank-Test zum Vergleich der Überlebensraten. p-Wert: * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

Trotz Abwesenheit des Th1-induzierenden IL-12 sind die IL-12p35$^{-/-}$ x IL-4Rα$^{-/-}$ Versuchstiere resistent. Diese Tiere (IL-12p35$^{-/-}$ x IL-4Rα$^{-/-}$) weisen außerdem eine reduzierte Th2-assoziierte Immunantwort auf, vergleichbar mit jener der IL-4Rα-defizienten Tiere (Abbildung 23A & B). Hinsichtlich der für die Protektion entscheidenden IFN-γ-Produktion kann 42 dpi kein Unterschied zwischen der IL-12p35 x IL-4Rα- und der IL-12p35-defizienten Linie festgestellt werden

(Abbildung 22). Jedoch weisen die IL-12p35$^{-/-}$ x IL-4Rα$^{-/-}$ Tiere eine gesteigerte IL-22-Produktion durch Lungenleukozyten auf (Abbildung 22).

Die widerstandsfähigsten Tiere wurden nach zirka 180 Tagen analysiert um mögliche Resistenzmechanismen aufzuklären. In den überlebenden IL-12p35$^{-/-}$ x IL-4Rα$^{-/-}$ Tieren kann eine signifikant niedrigere Anzahl an Pilzen in der Lunge gemessen werden (Abbildung 26).

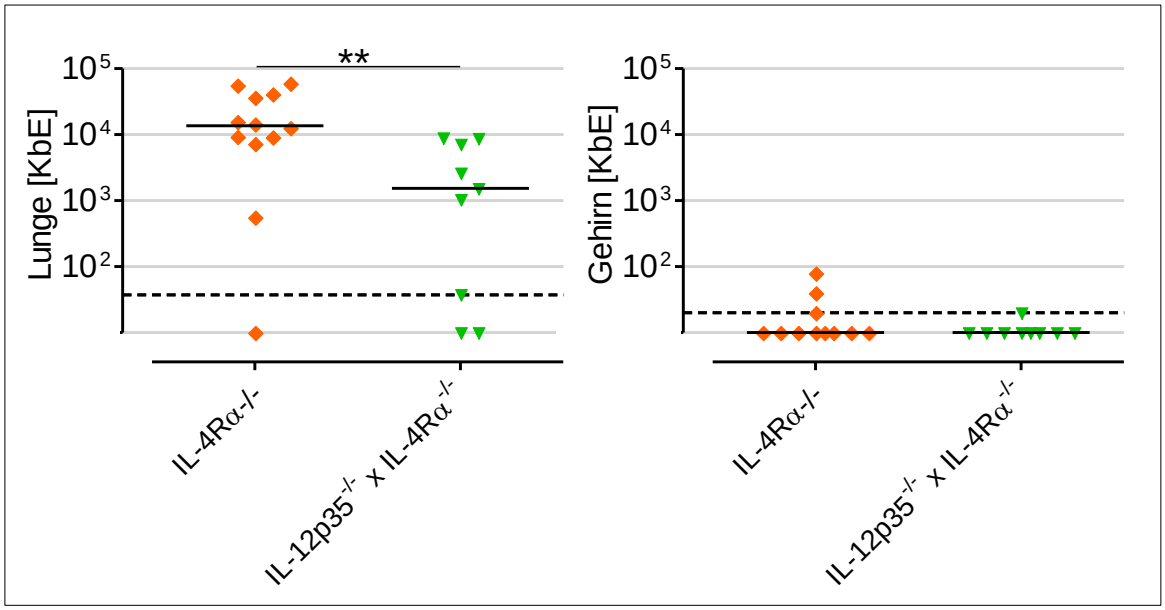


Abbildung 26: Analyse der Organlast (Lunge und Gehirn) nach Infektion mit *Cryptococcus neoformans* von C57BL/6-IL-4Rα- und IL-12p35 x IL-4Rα-defizienten Mäusen. Die Untersuchung erfolgte >180 Tage nach Infektion (dpi). Analysiert wurden überlebende Versuchstiere aus 2 unabhängigen Experimenten mit je 4-7 Versuchstieren pro Genotyp und Experiment. Im Streudiagramm sind die Medianwerte dargestellt. Die gestrichelte Linie repräsentiert das Detektionsminimum. Mann-Whitney U-Test. p-Wert: * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

Im Gehirn der überwiegenden Anzahl von Tieren können keine Kryptokokken nachgewiesen werden.

Nach Kryptokokkenantigen-spezifischer Restimulation der isolierten Lungenleukozyten kann tendenziell eine gesteigerte Menge sezernierter Th17-assoziierter Zytokine nachgewiesen werden (Abbildung 27).

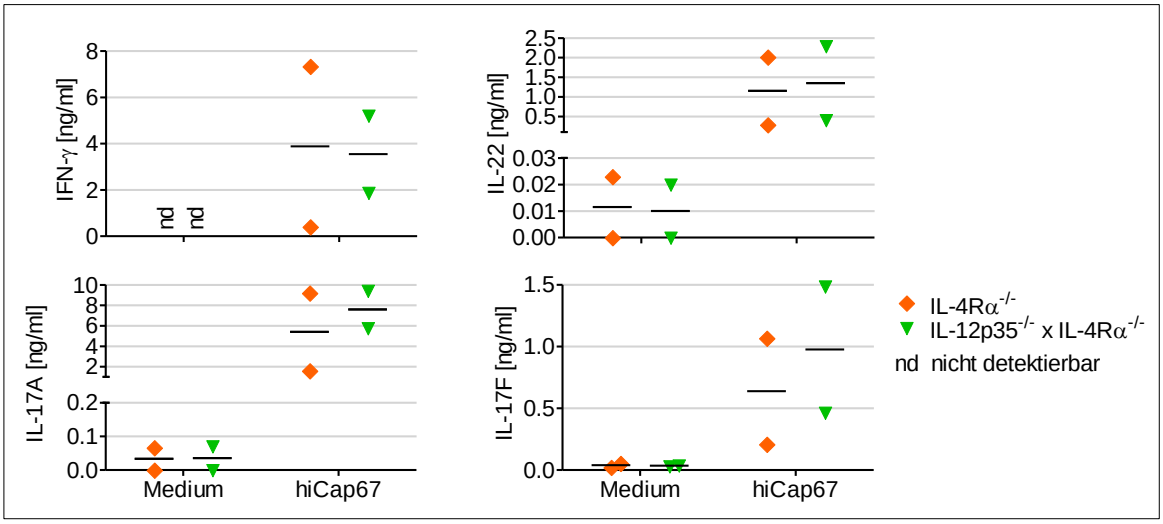


Abbildung 27: Überstandsanalysen der Produktion von Th1- und Th17-assoziierten Zytokinen nach Restimulation isolierter Lungenleukozyten >180 Tage nach Infektion mit *Cryptococcus neoformans* von C57BL/6-IL-4Rα- und IL-12p35 x IL-4Rα-defizienten Mäusen. Die Überstände gereinigter Lungenleukozyten wurden nach 22-stündiger Restimulation mittels ELISA analysiert. Die Restimulation erfolgte mit dem hitzeinaktivierten *C. neoformans* Stamm Cap67 und wurde zur Analyse der Antigen-spezifischen Zytokinproduktion zusammen mit der Medium-Kontrolle aufgetragen. Exemplarisch für Th1 wurden IFN-γ, für Th17 IL-17A, IL-17F und IL-22 analysiert. Zur Untersuchung wurden die Lungenleukozyten von 4-7 überlebenden Versuchstieren pro Analysetag vereinigt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler. nd: nicht detektierbar.

Die IFN-γ-Produktion der beiden Mausstämme ist vergleichbar. Es muss eine IL-12p35-unabhängige IFN-γ-Produktion diskutiert werden.
Die Untersuchungen zeigen an beiden Analysetagen (14 und 42 dpi), dass eine Steigerung der Th17-assoziierten Zytokinproduktion bei den resistenten IL-4Rα-defizienten Tieren, im Vergleich zu Wildtypmäusen und IL-12p35-defizienten Tieren, vorliegt. Infolgedessen schien es aussichtsreich, diese Tiere im Vergleich zur Wildtypgruppe an weiteren Zeitpunkten zu untersuchen. Die Ergebnisse dieser Analysen werden im nächsten Abschnitt abgebildet.

3.2.3 Verlauf der Th17-assoziierten Immunantwort in Mäusen mit verminderter Th2-Immunantwort

Der Einfluss der IL-4Rα-Ketten-Expression auf die Th2-vermittelte Entzündungsreaktion während der Kryptokokkose wurde im BALB/c-Modell bereits näher untersucht [111]. Die gesteigerte Antigen-spezifische IL-17A-Produktion durch Splenozyten am Tag 70 nach Infektion lieferte erste Hinweise auf eine IL-4/IL-13-abhängige Hemmung der Th17-assoziierten Immunantwort [111].

Die Untersuchung des Verlaufes der Produktion von IL-17A, IL-17F und IL-22 in der Lunge sollte nun weitere Aufschlüsse bezüglich der Regulation der T-Helferzellantworten liefern. Es erfolgte die Analyse intranasal infizierter Wildtyptiere im Vergleich zu IL-4Rα-defizienten Mäusen nach 7, 14, 21, 42 und 70 Tagen.

Die Analyse der Keimlasten von Wildtyp- und IL-4Rα-defizienten Tieren in der Lunge zeigt einen ganz neuen Aspekt der Funktion der Th2-assoziierten Immunantwort in der Kryptokokkose. Resistente IL-4Rα-defiziente Tiere scheinen zu Beginn der Infektion suszeptibler und weisen in der Lunge größere Mengen an Pilz auf als die Kontrollgruppe. Ab 21 Tagen nach der Infektion weisen jedoch die Wildtyptiere höhere Keimlasten auf (Abbildung 28).

Die Restimulation der isolierten Lungenleukozyten zeigt, dass die Th1-assoziierte IFN-γ-Produktion der IL-4Rα-defizienten Tiere ausschließlich 42 Tage nach der Infektion, verglichen mit der Kontrollgruppe, erhöht ist (Abbildung 29). 7 Tage nach Infektion wurde in der Gruppe der IL-4Rα-defizienten Tiere weniger IFN-γ detektiert, als bei den Wildtypen. Die *Cryptococcus*-spezifische IL-22-Sezernierung ist nach Deletion des IL-4Rα hingegen über den gesamten Zeitraum gesteigert. IL-17A und IL-17F sind ab 21 Tage nach Infektion in den IL-4Rα-defizienten Tieren erhöht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen weisen auf einen möglichen protektiven Effekt der Th17-assoziierten Zytokine bei der Kryptokokkose hin.

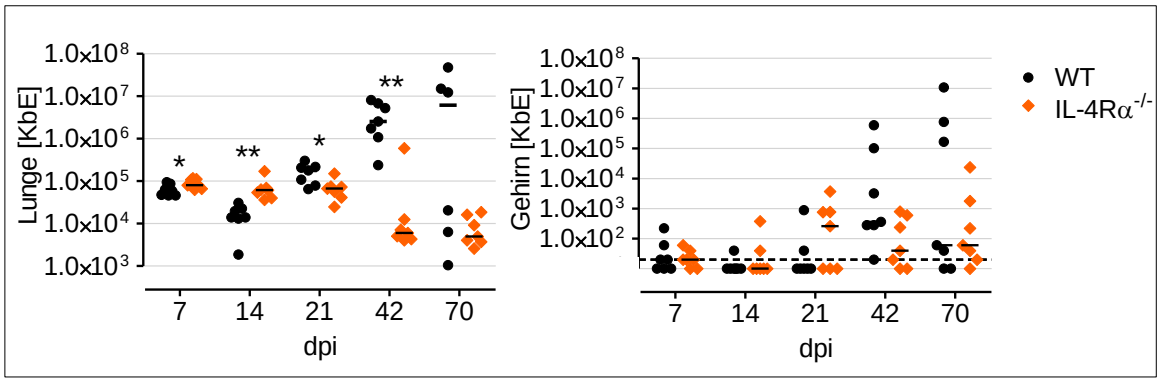


Abbildung 28: Analyse der Organlast (Lunge und Gehirn) nach Infektion mit *Cryptococcus neoformans* von C57BL/6-Wildtyp- und IL-4Rα-defizienten Mäusen im zeitlichen Verlauf. Die Untersuchungen erfolgten 7,14, 21, 42 und 70 Tage nach Infektion (dpi). Dargestellt sind Daten aus verschiedenen Experimenten mit je 6-7 Versuchstieren pro Genotyp und Analysezeitpunkt. Die gestrichelte Linie stellt das Detektionsminimum dar. Für statistische Analysen wurden jeweils die Keimlasten (Kolonie-bildende Einheiten, KbE) der Wildtyptiere mit denen der IL-4Rα-defizienten Mäusen eines Zeitpunktes verglichen. Im Streudiagramm sind Mediane dargestellt. T-Test. p-Wert: * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

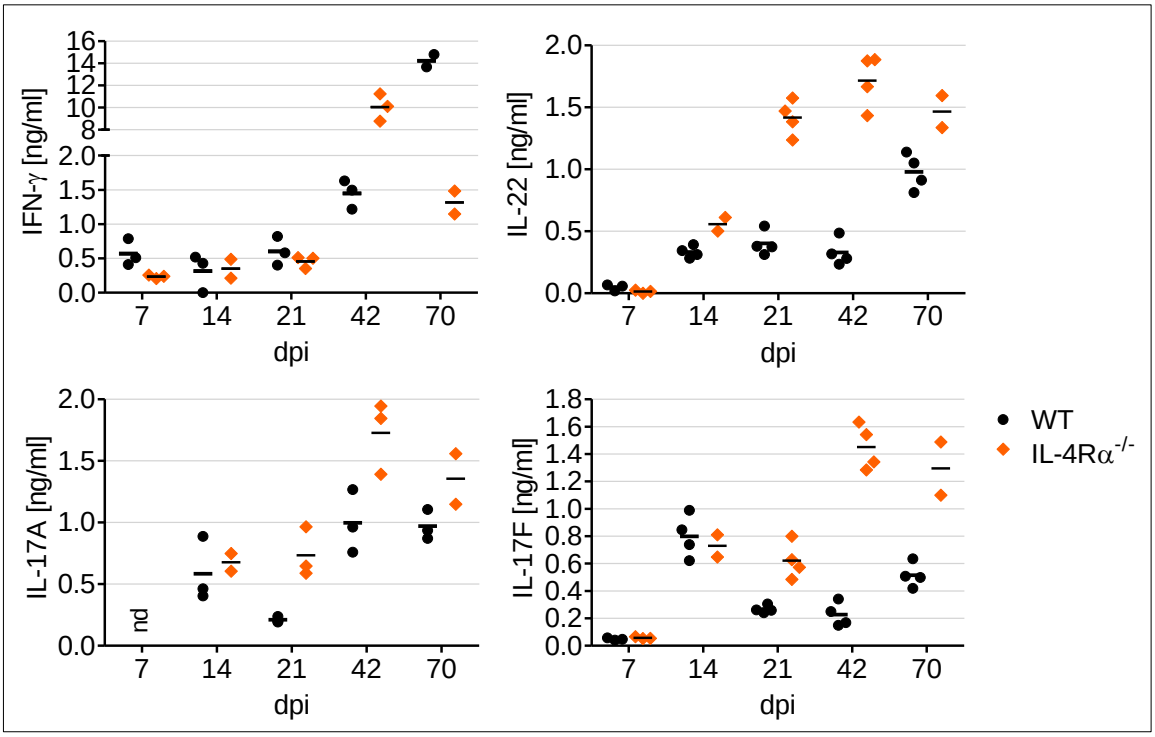


Abbildung 29: Überstandsanalysen der *Cryptococcus*-spezifischen Produktion von Th1- und Th17-assoziierten Zytokinen nach Restimulation isolierter Lungenleukozyten im zeitlichen Verlauf nach Infektion mit *Cryptococcus neoformans* von C57BL/6-Wildtyp- und IL-4Rα-defizienten Mäusen. Die Analysen erfolgten 7, 14, 21, 42 und 70 Tage nach Infektion (dpi). Die Überstände gereinigter Lungenleukozyten wurden nach 22-stündiger Restimulation mittels ELISA analysiert. Die Restimulation erfolgte mit dem hitzeinaktivierten *C. neoformans* Stamm Cap67. Exemplarisch wurden für Th1 IFN-γ und für Th17 IL-17A, IL-17F und IL-22 analysiert. Zur Untersuchung wurden die Lungenleukozyten von 6-7 Versuchstieren pro Analysetag vereinigt. Dargestellt sind die Mittelwerte. nd: nicht detektierbar.

3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die folgende Abbildung fasst die verwendeten gentechnisch veränderten Mausstämme, Zielstellungen, das Überleben und die erzielten Ergebnisse bezogen auf die Th17-assoziierte Immunantwort zusammen.

Maus-Genotyp	Ziel	Überleben	Ergebnis
Wildtyp	Etablierung & Charakterisierung der Th17-Expression	71% >180 Tage*	höchste *C.n.*-spezifische Th17-Zytokinproduktion: 14 dpi T-Helferzellen Hauptquelle von IL-17A & IL-22
IL-12p35$^{-/-}$	Funktionsanalyse mit Hilfe der Th17-Induktion	4% 64 Tage*	keine Steigerung der Th17-Zytokinproduktion
IL-12p35$^{-/-}$ x IL-17A$^{-/-}$	Funktionsanalyse mit Hilfe der IL-17A-Defizienz	0% 68 Tage*	IL-17A-Defizienz ohne Auswirkung auf Überleben
IL-12p35$^{-/-}$ x IL-22$^{-/-}$	Funktionsanalyse mit Hilfe der IL-22-Defizienz	0% 67 Tage*	IL-22-Defizienz ohne Auswirkung auf Überleben
IL-4Rα$^{-/-}$	Funktionsanalyse mit Hilfe der Th17-Induktion	100% >180 Tage*	gesteigerte Th17-Zytokinproduktion: >14 dpi Reduktion der Keimlast: ab 21 dpi
IL-12p35$^{-/-}$ x IL-4Rα$^{-/-}$	Funktionsanalyse mit Hilfe der Th17-Induktion	75% >180 Tage*	gesteigerte Th17-Zytokinproduktion: 14 dpi kein Effekt auf Keimlast: 14 dpi

Abbildung 30: Zusammenfassende Darstellung der erzielten Ergebnisse der Untersuchungen zur Rolle der Th17-assoziierten Immunantwort bei der Kryptokokkose. Dargestellt sind alle verwendeten Mauslinien, die Zielstellung, das Überleben bis 112 Tage in % nach Infektion mit *Cryptococcus neoformans* (*C.n.*), der Median der Überlebenszeit (*) sowie die Resultate bezogen auf die Th17-assoziierte Immunantwort.

4 Diskussion

Die wachsende Bedeutung von Infektionen mit fungalen Erregern macht die Erforschung immunologischer Therapiemöglichkeiten als ergänzende Behandlungsmethoden, neben üblichen Antimykotika, erforderlich. Steigende Patientenzahlen mit einer medizinisch induzierten Immunsuppression, z. Bsp. im Rahmen einer Organtransplantation oder Chemotherapie, verstärken die Notwendigkeit der Untersuchung zusätzlicher Heilmethoden. Eine zunehmende Anzahl immunsupprimierter Patienten ist zudem auf die HIV-Pandemie zurückzuführen [201]. Leider ist es bisher nicht gelungen, aktive Immunisierungen gegen Pilzinfektionen bei Menschen zulassungsreif zu entwickeln. Aktuell ist keine Impfung gegen fungale Erreger in einer fortgeschrittenen klinischen Studie [201]. Eine detaillierte Analyse der Immunantwort gegen Pilze ist deshalb essentiell, um mögliche immunmodulatorische Therapieansätze zu entwickeln und wirksame Antigene und Adjuvantien für eine Immunisierung zu finden.

In-vitro- und *in-vivo*-Studien zur Behandlung von *Cryptococcus*-Infektionen mittels Immunmodulation konzentrieren sich vor allem auf zwei Ansätze: die Bedeutung monoklonaler Antikörper sowie die Rolle von Zytokinen.

Neben der Applikation von rekombinanten Interleukinen zur Unterstützung der Behandlung akuter Pilzinfektionen scheint die Gabe monoklonaler Antikörper, gegen Kapsel- oder Zellwandbestandteile des Pilzes, eine Option zur Verbesserung der Rekonvaleszenz. Präklinische *in-vitro*-Studien sowie Experimente in Tiermodellen, können die protektiven Effekte von monoklonalen Antikörpern nachweisen [202-208]. Erste Ergebnisse einer klinischen Studie in Phase 1 zeigen jedoch leider nur eine moderate und vorübergehende Reduktion des Antigen-Titers im Serum von HIV-Patienten mit Kryptokokkenmeningitis, nach Gabe des monoklonalen Antikörpers 18B7 [209].

In den letzten Jahren standen vor allem die Zytokine der protektiven Th1- und nicht-protektiven Th2-Immunantwort im Fokus der Untersuchungen der Kryptokokken-Infektion [10]. Präklinische Untersuchungen können die protektiven Effekte von IFN-γ, IL-12 und IL-18 im Tiermodell zeigen [96, 101, 103, 210-212]. Außerdem sind immunstimulatorische Effekte durch TNF-α und IL-2 nachweisbar [213-216]. In klinischen Studien war es möglich, eine Korrelation von TNF-α, IFN-γ und IL-6 mit dem Überleben beziehungsweise der Bekämpfung der Infektion in HIV-infizierten Patienten mit Kryptokokkenmeningitis festzustellen [217]. Die ersten Ergebnisse der Verwendung von rekombinanten IFN-γ weisen darauf hin, dass nach einer entsprechenden Behandlung die Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit (*Liquor cerebrospinalis*) schneller frei von Pilzen ist. Dabei wurde IFN-γ als adjunktives Therapeutikum in HIV-

infizierten Patienten mit Kryptokokkenmeningitis, in Phase 2 einer klinischen Studie, verwendet [218]. Es muss bemerkt werden, dass die Behandlung mit IFN-γ mit Nebenwirkungen einhergeht. In einer klinischen Studie (Phase II/III) wurden Patienten mit metastasierendem Melanom auf Nebenwirkungen nach IFN-γ-Behandlung untersucht. Es fiel auf, dass eine Behandlung mit dem starken Immunmodulator in Grippe-ähnlichen Symptomen und Schädigungen der Leber resultiert [219].

Die Ergebnisse einiger *in-vivo*-Versuche weisen auf eine mögliche protektive Funktion von Th17-assoziierten Zytokinen hin [126, 145-147, 197]. So kann gezeigt werden, dass die Behandlung mit anti-IL-17A-Antikörpern, nach intranasaler Infektion, in der Frühphase zu erhöhten Pilzlasten in den Lungen führt [146]. In einer anderen Studie resultiert die Ausschaltung von IL-17A in initial erhöhten Organlasten. Außerdem führt die Defizienz des IL-17RA zu Veränderungen im Überleben der Kryptokokken-Infektion [126]. Die aktuellste Arbeit beschreibt die Funktion von IL-17A bei der Abwehr von *C. neoformans*. Es kann nachgewiesen werden, dass eine Abwesenheit von IL-17A in der Beeinträchtigung der Beseitigung des Pilzes in der Spätphase der Infektion resultiert [147].

Der genaue Beitrag der Th17-assoziierten Immunantwort sowie der einzelnen Zytokine, während der Kryptokokkose ist weiterhin unzureichend untersucht. Gegenstand der vorliegenden Dissertation war es, durch detaillierte Analysen die Effekte der Th17-assoziierten Zytokine IL-17A und IL-22 im Verlauf der chronischen Kryptokokken-Infektion aufzuklären. Für die Untersuchungen wurde das etablierte intranasale Modell der bronchopulmonalen Mykose gewählt. Dabei bildete eine Reihe von Untersuchungen in BALB/c-Mäusen die Grundlage [107, 111, 220]. Die Untersuchungen erfolgten in C57BL/6-Mäusen, da die verwendeten gentechnisch veränderten Mäuse auf diesem genetischen Hintergrund verfügbar waren.

Müller und Mitarbeiter zeigen, dass BALB/c-Wildtyptiere bis 100 Tage nach intranasaler Infektion, mit dem in dieser Studie verwendeten Stamm *C. neoformans* 1841, zu 100% der Infektion erliegen [111]. Außerdem ist publiziert, dass BALB/c-Wildtyptiere mit zunehmender Infektion eine Th2-assoziierte Immunantwort entwickelten. So kommt es 42 Tage nach Infektion zu einem signifikanten Anstieg des Gesamt-IgE-Gehalts im Serum sowie der Menge an eosinophilen Granulozyten in der Lunge [220].

4.1 Etablierung und Charakterisierung des experimentellen Modells der bronchopulmonalen Mykose in der C57BL/6-Wildtypmaus

Überlebensversuche von Dr. Daniel Piehler und Dr. Andreas Grahnert (nicht veröffentlichte Daten) zeigen, dass 112 dpi 71% der C57BL/6-Wildtyptiere, beziehungsweise >150 dpi noch 57% der Tiere nach intranasaler Infektion, mit der in dieser Arbeit verwendeten Infektionsdosis von 500 Kolonie-bildenden Einheiten, überleben. Im Vergleich zu diesen, resistenteren C57BL/6-Wildtypmäusen versterben 100% der BALB/c-Wildtyptiere bis 125 dpi [107, 111].

Im Vergleich zur BALB/c-Maus scheinen Tiere auf dem C57BL/6-Hintergrund resistenter, obwohl diese eine frühere und ausgeprägtere Th2-Antwort ausbilden. So kann bereits 7 Tage nach Infektion eine Eosinophilie in der Lunge nachgewiesen werden, welche jedoch bis 42 Tage nach Infektion wieder abnimmt. Dabei fällt der extrem hohe Anteil dieser Granulozyten, bezogen auf die Gesamt-Leukozyten auf (bis 55%). Sowohl C57BL/6- als auch BALB/c-Mäuse finden Anwendung in einer Vielzahl von Studien mit intrazellulären Erregern, darunter: Melioidose [221], Listeriose [222], Leishmaniose [223, 224], Yersiniose [225, 226] und Infektionen mit der Gattung *Mycobacterium* [227, 228]. Im überwiegenden Teil der Infektionsmodelle sind Tiere mit C57BL/6-Hintergrund resistenter [229]. *In-vitro*-Studien mit Makrophagen von C57BL/6- und BALB/c-Tieren zeigen, dass deren Phagozyten unterschiedliche Reaktionen nach Stimulation mit Lipopolysacchariden (LPS) aufweisen [230-232]. Makrophagen von C57BL/6-Mäusen produzierten größere Mengen an TNF-α und IL-12 [229]. Die vermehrte IL-12-Produktion resultiert in einer gesteigerten IFN-γ-, beziehungsweise verringerten IL-13-Sezernierung durch T-Helferzellen [229]. Diese Differenzen in der Immunantwort sind vermutlich ursächlich für die unterschiedliche Suszeptibilität der beiden Mausinzuchtstämme.

In einer Studie von Hardison und Mitarbeitern wird die Rolle von IL-17A in der Frühphase der Infektion mit dem IFN-γ-produzierenden *C. neoformans* Stamm H99γ postuliert [146]. Nach Infektion erfolgte die Behandlung mit anti-IL-17A-Antikörpern. Sieben Tage nach Infektion kann ein signifikanter Anstieg der Keimlast in der Lunge gezeigt werden. Bereits 14 Tage nach Infektion können jedoch keine Unterschiede mehr festgestellt werden. Wie in der vorliegenden Arbeit dargestellt, kann im intranasalen Modell die höchste Produktion an Th17-assoziierten Zytokinen 14 Tage nach Infektion detektiert werden. Zu diesem Zeitpunkt kann auch eine signifikante Reduktion, verglichen mit der Keimlast an Tag 7 nach Infektion in der Lunge gemessen werden. Diese Ergebnisse könnten ein Hinweis auf die frühe protektive Funktion der Th17-Immunantwort bei der

Kryptokokkose sein. Für Schlussfolgerungen bezüglich der Beteiligung der exprimierten Th17-assoziierten Zytokine bei der Hemmung des Pilzwachstums 14 Tage nach Infektion müssten jedoch weiterführende Experimente durchgeführt werden. Dafür würde es notwendig sein, entsprechende Zytokine im Frühstadion der Infektion lokal zu neutralisieren und entsprechende Analysen der Keimlasten durchzuführen.
Neben der *Cryptococcus*-spezifischen Sezernierung von IL-17A, IL-17F und IL-22 durch Lungenleukozyten kann der signifikante Anstieg des Anteils an Th17-Zellen bezogen auf $CD4^+$ T-Zellen in der Lunge sowie der Influx von neutrophilen Granulozyten in die Lunge gezeigt werden.
IL-17A induziert den Granulozyten-Kolonie stimulierenden Faktor (G-CSF) und CXCL1. Diese resultieren in der Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten [233-235]. Über die Rolle von neutrophilen Granulozyten in der murinen Kryptokokkose ist wenig bekannt. Eine Studie untersuchte ihre Rolle nach intratrachealer Infektion [236]. Dabei erfolgte die Depletion dieser mit einem Ly6G-spezifischen monoklonalen Antikörper. Neutropenische Tiere sind überraschenderweise in der Lage die Infektion länger zu überleben, aber weisen einen Tag nach Infektion höhere Keimlasten in der Lunge auf als die Kontrollgruppe. Die Autoren postulieren eine regulatorische Funktion der neutrophilen Granulozyten [236]. In einer anderen Studie erfolgte, in *C. neoformans* (Stamm $H99_{\gamma}$)-immunisierten Mäusen, eine Depletion der neutrophilen Granulozyten. Es kann keine Veränderung der Pilzlast in der Lunge festgestellt werden [188]. Es wird geschlussfolgert, dass in diesem Modell die neutrophilen Granulozyten nicht zur Beseitigung der Infektion beitragen [188].

Ganz allgemein tragen diese Zellen des angeborenen Immunsystems zur Abwehr von Pathogenen mittels oxidativer und nicht-oxidativer Mechanismen bei [237, 238]. In einer Vielzahl von Modellen resultierte die Depletion von neutrophilen Granulozyten in einem suszeptiblen Phänotyp, darunter

- Bakterien (*Francisella tularensis* [239] *Listeria monocytogenes* [240, 241], *Legionella pneumophila* [242] *Mycobacterium bovis* [243], *Mycobacterium tuberculosis* [244, 245], *Salmonella typhimurium* [246], *Yersinia enterocolitica* [246]),
- Pilze (*Candida albicans* [247]),
- Protozoen (*Leishmania major* [248], *Toxoplasma gondii* [249]) und
- Viren (*Herpes simplex virus* [250], *Junin virus* [251]).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass neutrophile Granulozyten während der Abwehr der Kryptokokkose eine eher untergeordnete Rolle spielen.

Im späteren Verlauf der Kryptokokkose ist ein Rückgang der Th17-assoziierten Zytokinproduktion zu verzeichnen. Dieser ist möglicherweise auf den Verlust der jeweiligen Produzenten oder die Hemmung der Transkription/Translation der Interleukine zurückzuführen. Es ist bekannt, dass die IL-4Rα-abhängige Immunantwort die IL-17A-Produktion hemmt [107]. So kann in IL-13-defizienten Tieren nach intranasaler Infektion mit *C. neoformans* eine signifikante Induktion von IL-17A in Splenozyten, verglichen mit Wildtyptieren, nachgewiesen werden [107]. In der vorliegenden Arbeit kann auch in C57BL/6-Wildtyptieren eine Zunahme der Th2-assoziierten Immunantwort im Verlauf der Infektion gezeigt werden. Folglich ist die Abnahme der Th17-assoziierten Immunantwort mit zunehmender Infektion höchstwahrscheinlich auf die aufkommende Th2-Antwort zurückzuführen. Die Hemmung der Th17-Differenzierung durch IL-4 ist bekannt [252].

Zum Zeitpunkt der Dissemination von *C. neoformans* ist in den Lungen die größte Anzahl an Th2-assoziierten eosinophilen Granulozyten zu verzeichnen. Dieser Befund steht im Einklang mit der in der Literatur beschriebenen pathogenen Wirkung der eosinophilen Granulozyten in der Kryptokokkose [107, 113]. Vergleichbar mit dem Anstieg der Th2-Immunantwort kann ein Anstieg an *Cryptococcus*-spezifisch produziertem IFN-γ verzeichnet werden, welches möglicherweise für das Überleben eines Teils der Versuchstiere verantwortlich ist. Um die Th17-assoziierte Immunantwort während der Infektion mit *C. neoformans* näher zu untersuchen, sollten im Folgenden die IL-17A- und IL-22-produzierenden Zellen der Lunge charakterisiert werden.

4.1.1 Analyse der zellulären Quellen von IL-17A und IL-22 in der Lunge von C57BL/6-Wildtyptieren

Dafür musste vorab analysiert werden, welche möglichen zellulären Quellen überhaupt in der Lunge von C57BL/6-Wildtyptieren vorhanden sind. Es erfolgte die Phänotypisierung der Lungenleukozyten mit Hilfe verschiedener spezifischer Oberflächenmoleküle 0 und 14 Tage nach der Infektion. Es sind eindeutig neutrophile Granulozyten, NK-Zellen und verschiedene T-Zellsubpopulationen in der Lunge naiver sowie infizierter Tiere, zu detektieren. Die innaten lymphoiden Zellen Typ 3 (*Innate lymphoid cells* 3, ILC3), NK22 (auch ILC22, oder NCR^+ ILC3) und LTi-Zellen können nicht bzw. nur in extrem geringen Mengen nachgewiesen werden. Eine Studie von Monticelli und Mitarbeitern [253] bestätigt dieses Ergebnis. Die Autoren zeigen, dass in der Lunge naiver C57BL/6-Wildtyptiere und *Rag1*-defizienten Mäusen ausschließlich ILC2 (auch Nuozyten oder NHC) vorhanden sind. Es sind weder konventionelle LTi-Zellen noch NK22 zu detektieren [253].

Für die weitere Charakterisierung der Zytokin-produzierenden Zellen wurde die intrazelluläre Färbung der entsprechenden Interleukine nach Permeabilisierung der Zellen durchgeführt. Der Vorteil der auf der Durchflusszytometrie basierenden Methode liegt vor allem in der Vielzahl analysierbarer Oberflächenmarker der Zellen, die eine genauere Charakterisierung zulassen. Für die Detektion der Zytokine war es notwendig, die Lungenleukozyten zu stimulieren und mit Hilfe von Brefeldin A in der Zelle anzureichern. Als Stimuli wurden PMA und Ionomycin gewählt, um so alle möglichen Produzenten zu aktivieren. Dabei scheint die *ex vivo*-Manipulation der Zellen als Nachteil, da während der Stimulation möglicherweise die Proliferation bestimmter Zellen beziehungsweise das Sterben Anderer erfolgt. Folglich kann die *in-vivo*-Situation eventuell nicht naturgetreu reflektiert werden. Um ein der *in-vivo*-Situation entsprechendes Abbild der tatsächlichen Verteilung der Th17-assoziierten Zytokin-Produzenten zu erhalten, scheint zum einen die Verwendung einer Reportermaus, zum anderen die Applikation von Brefeldin A direkt in die Maus mit anschließender Färbung der isolierten Zellen, ohne Stimulation, diskutabel.

Zur Einschätzung der *Cryptococcus*-induzierten Produktion der Zytokine erfolgte der Vergleich naiver und infizierter Tiere (14 dpi). Es kann eindeutig gezeigt werden, dass die Lungenleukozyten der infizierten Tiere mehr IL-17A-/ IL-22-produzierende Zellen aufweisen. Damit kann ausgeschlossen werden, dass die detektierte Zytokinproduktion ausschließlich auf eine unspezifische Stimulation der Zellen zurückzuführen ist. Die Analyse der IL-17A- und IL-22-positiven Zellen ergibt, dass 14 Tage nach Infektion vor allem T-Zellen, insbesondere T-Helferzellen, die Hauptproduzenten der untersuchten Interleukine sind. Auch in einem Modell der Antigen-induzierten Entzündungsreaktion ist beschrieben, dass unter den Zellen des Immunsystems vor allem $CD4^+$ T-Zellen zur IL-22-Produktion in der Lunge beitragen. Bei etwa einem Drittel der IL-22-produzierenden Zellen kann dabei auch die Produktion von IL-17A nachgewiesen werden [254]. Ebenso ist in einem Modell der Lungenentzündung, das durch Kieselsäure-Partikel induziert wurde, gezeigt, dass γδ T-Zellen und $CD4^+$ T-Zellen, nicht jedoch Makrophagen, neutrophile Granulozyten, NK-Zellen oder CTLs, eine deutliche IL-17A-Expression aufweisen [255].

Die Ergebnisse der Charakterisierung der IL-17A-produzierenden Zellen bei der Kryptokokkose widersprechen den Untersuchungen von Wozniak *et al.* [126, 188], in denen beschrieben wird, dass neutrophile Granulozyten die Hauptquelle von IL-17A sind. Dabei ist zu beachten, dass in diesen Studien mit einem IFN-γ-produzierenden *C. neoformans* Stamm (H99γ) gearbeitet wurde. Die intranasale Infektion der BALB/c-Wildtyptiere erfolgte mit 10.000 KbE. Die Untersuchung der Zytokin-produzierenden Zellen wurde 7 Tage nach Infektion durchgeführt, wobei

die Zellen direkt nach Isolation gefärbt worden sind. Die Autoren können nicht ausschließen, dass auch die Zielzellen von IL-17A erfasst werden und bestätigten diese Vermutung sogar. So weisen sie in einem Mausstamm mit einer Defizienz in der IL-17RA-Signalweiterleitung 47% weniger IL-17A-positive neutrophile Granulozyten nach, als in entsprechenden Kontrollen. Sowohl IL-17A, als auch IL-22 wirken vor allem auf Nicht-Immunzellen. Überdies ist beschrieben, dass der IL-22-Rezeptorkomplex auf Zellen nicht-hämatopoetischer Herkunft beschränkt ist [256].

Bezüglich der geringen Anzahl IL-22-positiver Zellen könnte eine Optimierung der Nachweisbedingungen oder die Verwendung anderer Antikörperklone möglicherweise zur Verstärkung der Signale führen. Außerdem bleibt zu diskutieren, dass zwei verschiedene Th17-Subpopulationen beschrieben wurden [257]. Die konventionellen Th17-Zellen (Th17(β)), bei denen die Differenzierung mittels IL-6 und TGF-β erfolgt und Th17(23)-Zellen, welche durch Stimulation mit IL-6, IL-23 und IL-1β entstehen. Th17(β)-Zellen exprimieren IL-17A, IL-17F und IL-10. Th17(23)-Zellen exprimieren IL-17A, IL-17F, IL-22 und IFN-γ. Möglicherweise entstehen in der Lunge *C. neoformans* infizierter C57BL/6-Wildtypen vor allem Th17(β)-Zellen, was die geringe Anzahl IL-22-positiver Zellen erklären könnte. Diese Vermutung wird durch die Analyse IFN-γ-produzierender T-Zellen (Daten nicht gezeigt) unterstützt, da nur eine geringe Anzahl doppelt-positiver (IFN-γ + IL-17A und IFN-γ + IL-22) $CD4^+$ Zellen detektierbar ist.

4.2 Funktionsanalyse der Th17-assoziierten Immunantwort bei der Kryptokokkose

Neben der Analyse der Produzenten von IL-17A und IL-22 während der Kryptokokkose sollte auch deren möglicher Beitrag zu einer protektiven Immunantwort untersucht werden. Zunächst sollte in Abwesenheit beider Zytokine deren Einfluss auf den Infektionsverlauf analysiert werden. Die Hemmung der Th17-Entwicklung durch IL-12 und IFN-γ wurde bereits beschrieben [115, 196]. Folglich sollte der *Knockout* von IL-12 in einer Steigerung der Th17-assoziierten Immunantwort resultieren. Zur Untersuchung der Funktion der Th17-assoziierten Zytokine in der Kryptokokkose wurden IL-12p35-defiziente Mäuse mit IL-17A- beziehungsweise IL-22-defizienten Tieren gekreuzt.

4.2.1 Depletion von IL-17A und IL-22 in Versuchstieren mit verminderter Th1-Immunantwort

In Überlebensversuchen, bei welchen IL-12p35-defiziente Tiere als Kontrolle dienten, können keine Unterschiede nach *Knockout* von IL-17A und IL-22 festgestellt werden. Im Fall der IL-17A-defizienten Mäuse könnte dieses Ergebnis

darauf zurückzuführen sein, dass IL-17F das Fehlen von IL-17A kompensieren kann, da sich beide Zytokine einen Rezeptorkomplex teilen und demzufolge ähnliche, biologische Funktionen ausüben [127, 258, 259]. Womöglich könnte die Verwendung einer IL-17RA-defizienten Maus die protektive Funktion beider Zytokine zeigen.

Überdies haben auch IL-17A und IL-22 ähnliche Funktionen. So induzieren beide Zytokine eine innate Immunantwort in Epithelzellen [187]. Folglich ist es schwierig die Funktionen der einzelnen Interleukine auf Grund ihrer redundanten Funktionen direkt, durch den *Knockout* der einzelnen Zytokine nachzuweisen. Der Synergismus von IL-17A und IL-22 muss noch näher untersucht werden. Es wird jedoch diskutiert, dass dieser ein Resultat des Zusammenlaufens des STAT3 und NF-κB Signalweges ist [187].

Die Rolle der Th17-assoziierten Zytokine bei fungalen Infektionen ist umstritten. Es gibt jedoch Hinweise, dass sie sowohl in Tiermodellen, als auch im Menschen eine entscheidende Funktion bei Schleimhautinfektionen aufweisen [71, 260].

Die Produktion von IL-22 in der Mukosa stellt möglicherweise unter limitierten inflammatorischen Bedingungen einen primitiven Resistenzmechanismus gegen Pilze dar [140]. So spielt IL-22 bei der Infektion mit *Candida albicans* eine Rolle bei der frühen Abwehr, indem es das Pilzwachstum hemmt und zur Epithelintegrität beiträgt [173]. Zudem wird gezeigt, dass IL-22 essentiell für die Regeneration des Lungenepithels nach einer Influenza-Infektion ist [267]. IL-22-defiziente Mäuse zeigen verstärkte Lungenschäden, verglichen mit Wildtyptieren. Eine andere Arbeit jedoch zeigt, dass IL-22 keine eindeutig protektive Funktion bei Abwehr von *Mycobacterium tuberculosis* aufweist [261]. Bei Abwesenheit von IL-22 kann kein Unterschied im Überleben der Tiere, verglichen mit der Kontrolle, gezeigt werden. So scheint die Funktion von IL-22 bei der Abwehr unterschiedlicher Pathogene verschieden und abhängig von einer Vielzahl von Faktoren wie dem Erreger selbst, dem Infektionsweg und der Zytokin-Umgebung.

IL-17A trägt bei der Infektion mit *Aspergillus* zur Gewebspathologie in der Lunge bei [144]. In einem Modell der oropharyngealen Kandidose allerdings ist IL-17A und die IL-17RA-vermittelte Signalweiterleitung entscheidend für die Resistenz [172]. Demzufolge ist auch die Rolle von IL-17A bei der antifungalen Wirtsabwehr nicht immer gleichartig.

4.2.2 Th17-assoziierte Immunantwort in Mäusen mit verminderter Th1- und Th2-Immunantwort

Auf Grund der Ergebnisse des *Knockouts* der einzelnen Zytokine (IL-17A und IL-22) wurde im Folgenden eine IL-12p35$^{-/-}$ x IL-4R$\alpha^{-/-}$ Mauslinie gezüchtet. Es wurde erwartet, dass die Reduktion der Th1- (IL-12p35$^{-/-}$) und Th2-Immunantwort (IL-4R$\alpha^{-/-}$) in einer Steigerung der Th17-assoziierten Zytokine resultiert.

Frühphase

14 Tage nach Infektion erfolgte die Untersuchungen der T-Helferzell-assoziierten Immunantwort in der Lunge. Dazu wurden die isolierten Leukozyten mit einem hitzeinaktiviertem *C. neoformans*-Stamm restimuliert. Sowohl IL-4Rα-, als auch IL-4Rα x IL-12p35-defiziente Mäuse weisen 14 Tage nach Infektion eine erhöhte IL-17A-, IL-17F- und IL-22-Produktion auf. Die Keimlast in der Lunge der IL-4Rα-defizienten Tiere ist jedoch 14 Tage nach Infektion höher als die der Wildtyptiere. Die Steigerung der Th17-assoziierten Zytokine in den IL-4R$\alpha^{-/-}$ Tieren zu einem frühen Zeitpunkt hat keinen Einfluss auf das lokale Pilzwachstum. Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Kontrolle von *C. neoformans* in der Frühphase der pulmonalen Infektion werden in einer Publikation von Dr. Andreas Grahnert und Tina Richter intensiv diskutiert [263]. Wildtyptiere sind in der Lage, die Infektion zum frühen Zeitpunkt besser zu kontrollieren und weisen eine vermehrte Makrophagen und DC-Rekrutierung in die Lunge auf. Die mRNA-Analysen von Lungengewebe ergaben, dass IL-4R$\alpha^{-/-}$ Tieren eine geringere Expression der Chemokine CCL2 und CCL20 aufweisen, welche höchstwahrscheinlich ursächlich ist für genannte Unterschiede in der Rekrutierung der Phagozyten. Außerdem kann eine verringerte IFN-γ Expression in der Lunge IL-4Rα-defizienter Tiere nachgewiesen werden. Diese wird durch die Untersuchungen der Überstände nach Restimulation isolierter Lungenleukozyten untermauert. Zellen von IL-4R$\alpha^{-/-}$ Tiere weisen eine signifikant verringerte Produktion von NO auf.

Bezüglich der protektiven Th1-Immunantwort konnte mit Hilfe der IL-4Rα x IL-12p35-defizienten Tiere gezeigt werden, dass 14 Tage nach Infektion eine IL-12p35-unabhängige IFN-γ-Produktion erfolgt, welche möglicherweise auf IL-18 zurückzuführen sein könnte. Eine IL-12p35-unabhängige IFN-γ-Produktion konnte bereits 2001 durch Müller und Mitarbeiter in einem experimentellen Modell der *Trypanosoma cruzi*-Infektion gezeigt werden [264]. Weiterführende Analysen werden die Rolle von IL-18 in der Kryptokokkose näher beleuchten. Außerdem wird die Funktion des IL-12p35-unabhängigen IFN-γ weiter untersucht. Dazu wird dieses neutralisiert und der Einfluss auf das Pilzwachstum analysiert.

Spätphase

Zu einem späteren Zeitpunkt (42 dpi) kann bei beiden IL-4Rα$^{-/-}$ Mausstämmen eine gesteigerte IL-22-Produktion detektiert werden. IL-17A und IL-17F sind nur in den IL-4Rα$^{-/-}$ Tieren erhöht.

In Überlebensversuchen kann die Resistenz der IL-4Rα-defizienten Mäuse wie erwartet bestätigt werden, alle Tiere überleben die Infektion. Überraschenderweise sind auch die IL-4Rα x IL-12p35-defizienten Tiere resistent gegenüber der Infektion mit *C. neoformans*. So überlebten, trotz fehlendem IL-12p35, 75% der Tiere die Infektion, wobei IL-12p35-defiziente Tiere zu fast 100% versterben.

Zur weiteren Aufklärung der Resistenzmechanismen wurden die überlebenden Tiere zirka 180 Tage nach Infektion analysiert. Interessanterweise kann zu diesem späten Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied bei der Pilzanzahl in der Lunge detektiert werden. Nach Restimulation der Lungenleukozyten kann jedoch nur eine tendenzielle Steigerung der Th17-assoziierten Zytokinproduktion in den IL-4Rα x IL-12p35-defizienten Tieren, welche weniger Pilze aufweisen, gezeigt werden. Hinsichtlich der IFN-γ-Produktion kann kein Unterschied ausgemacht werden. Demzufolge könnte eine Steigerung der Th17-assoziierten Zytokine, zu einem späteren Zeitpunkt der Infektion, einen Einfluss auf die Proliferation von *Cryptococcus* haben. Womöglich induzieren diese Interleukine antimikrobielle Peptide, welche in der Reduktion der Keimlast in der Lunge resultieren.

Ziel folgender Analysen wird nun sein, in IL-4Rα-defizienten Tieren mit Hilfe einer *Microarray*-Analyse die Zielgene der protektiven Interleukine zu definieren und im Anschluss diese mittels real-time RT-PCR, später auf Proteinebene, zu bestätigen. Derartige Zielmoleküle könnten antimikrobielle Peptide sein. Die antifungale Aktivität verschiedener Säugetier-Cathelicidine gegenüber *C. neoformans* konnte bereits gezeigt werden [175]. Zudem ist die antimikrobielle Wirkung eines Prolin-reichen Peptids (SP-B, aus dem Schwein) auf *C. neoformans* bekannt [176]. Wang und Mitarbeiter beschreiben die antifungale Aktivität des Maus-beta-Defensins-1 (mBD-1) gegenüber *C. neoformans* [265].

4.2.3 Verlauf der Th17-assoziierten Immunantwort in Versuchstieren mit verminderter Th2-Immunantwort

Nach den Untersuchungen der verschiedenen gentechnisch veränderten Mausstämme 14 und 42 Tage nach Infektion sollte der Verlauf der Th17-Immunantwort der IL-4Rα$^{-/-}$ Tiere näher untersucht werden, da diese Tiere an beiden Untersuchungstagen eine gesteigerte Th17-assoziierte Zytokinproduktion aufweisen. Interessanterweise kann in der Frühphase der Infektion (7 und 14 dpi) in den IL-4Rα-defizienten Tieren eine höhere Keimlast in der Lunge verglichen mit

Wildtyptieren detektiert werden [263]. Ab Tag 21 jedoch kann eine signifikante Hemmung der Proliferation von *Cryptococcus* in der Lunge IL-4Rα-defizienter Mäuse detektiert werden. Genau zu diesem Zeitpunkt ist eine Steigerung aller detektierter Th17-assoziierter Zytokine nachweisbar. Eine erhöhte Produktion von IFN-γ kann hingegen erst 42 Tage nach Infektion nachgewiesen werden. Diese Analysen weisen auf eine protektive Rolle der Th17-assoziierten Immunantwort hin. Diese scheint jedoch nicht mit der Rekrutierung der neutrophilen Granulozyten assoziiert. Die Induktion der Th17-abhängigen Resistenzmechanismen bleibt zu untersuchen.

4.2.4 Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchungen zur Funktion Th17-assoziierter Zytokine und Ausblick

Insgesamt sprechen die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse tendenziell für eine protektive Funktion der Th17-assoziierten Zytokine IL-17A und IL-22.

Schlussfolgernd könnten Th17-assoziierte Interleukine also eine Option für die Immunmodulation bei einer antifungalen Therapie der *Cryptococcus*-Infektion darstellen. Dafür sind jedoch weitere Analysen nötig. Der Fokus sollte dabei insbesondere auf IL-22 liegen, da dieses Interleukin auf Grund seiner Wirkung in der Lunge besonders interessant erscheint und schließlich die Lunge als Eintrittspforte der humanen *Cryptococcus*-Infektion beschrieben ist [266]. In einem Modell der Antigen-induzierten Entzündungsreaktion kann gezeigt werden, dass die Neutralisation von IL-22 die Antigen-induzierte IL-13-Produktion, die Rekrutierung von eosinophilen Granulozyten und Becherzellhyperplasie in den Atemwegen verstärkt [254]. Die intranasale Applikation von rekombinanten IL-22 wiederum vermindert den Influx von eosinophilen Granulozyten. Bei der pulmonalen Infektion mit dem extrazellulären gram-negativen Bakterium *Klebsiella pneumoniae* verstärkte IL-22 die Epithelzell-Proliferation und transepitheliale Resistenz in der Lunge [165]. Eine aktuelle Studie der Funktion von IL-22 während der Influenza-Infektion kann darlegen, dass IL-22 für die Wiederherstellung der normalen Lungenfunktion notwendig ist [267].

Ganz konkret werden derzeit werden folgende Mausstämme gezüchtet:
IL-12p35$^{-/-}$ x IL-22R1$^{-/-}$, IL-22R1$^{-/-}$ x IL-4Rα$^{-/-}$ und IL-12p35$^{-/-}$ x IL-22R1$^{-/-}$ x IL-4Rα$^{-/-}$.

Ferner ist die Untersuchung IL-17RA$^{-/-}$, IL-17A/ IL-22-transgener Mausstämme zur besseren Einschätzung der Zytokin-Funktionen bei der Kryptokokkose denkbar.

Wie bereits diskutiert, sind insbesondere die Zielgene von IL-22 von besonderem Interesse für zukünftige Untersuchungen. Die geplanten *Microarray*-Analysen und

darauf aufbauende Untersuchungen auf Proteinebene im Rahmen von Toxizitätsstudien nach Applikation könnten Aufschluss über eine mögliche antimikrobielle Aktivität dieser Moleküle auf *C. neoformans* geben.

5 Zusammenfassung

Cryptococcus neoformans, ein weltweit vorkommender fungaler Erreger, ist einer der bedeutendsten Auslöser invasiver Mykosen mit hoher Mortalität und stellt vor allem für immungeschwächte Patienten eine große Gefahr dar. Trotz antifungaler Therapien weisen insbesondere immunsupprimierte Patienten weiterhin eine hohe Sterblichkeit auf. Zirka eine Million Fälle einer Kryptokokkenmeningitis resultieren in über 600.000 Todesfällen pro Jahr. Damit wird die Entwicklung neuer Prophylaxe- und/oder Therapiestrategien erforderlich. Voraussetzung dafür ist die weiterführende Analyse der Immunantwort gegen *C. neoformans*.
Im experimentellen murinen Modell der Kryptokokkose ist der Schutz mit der Typ1-T-Helferzellantwort (Th1)-assoziiert. Die Th2-Antwort hingegen ist nachteilig und begünstigt sowohl die Vermehrung als auch die Verbreitung der Pilze im Körper. In einer Reihe von Studien wird eine signifikante Rolle der Th17-assoziierten Zytokine Interleukin (IL)-17A und IL-22 bei der Induktion antimikrobieller Mechanismen diskutiert. Es gibt einige wenige Hinweise auf die Beteiligung von IL-17A in der Abwehr einer *Cryptococcus*-Infektion. Die Funktion von IL-22 bei der Kryptokokkose ist gänzlich unbekannt. Für neue immunmodulatorische Behandlungen oder Impfstrategien könnten daher, neben protektiven Th1-Zytokinen, möglicherweise auch Th17-assoziierte Zytokine einen neuen Ansatz liefern und somit als neuartiges, ergänzendes Therapeutikum interessant werden.

Ziel der Arbeit war, die Funktion der Th17-assozierten Zytokine bei der Infektion mit *C. neoformans* zu untersuchen. Dafür erfolgte

1. die Etablierung des experimentellen Modells in der C57BL/6-Wildtypmaus und die Untersuchung der Expression Th17-assoziierter Zytokine (IL-17A, IL-17F und IL-22) im Verlauf der chronischen Infektion,
3. die Charakterisierung der zellulären Quellen von IL-17A und IL-22 in der murinen Lunge sowie
4. die Analyse der *in-vivo*-Funktion der Th17-assoziierten Immunantwort.

Zusammenfassung der Ergebnisse:

I. Th17-assoziierte Zytokine werden vor allem in der Frühphase der Kryptokokkose exprimiert.

C57BL/6-Wildtypmäuse wurden intranasal mit *C. neoformans* infiziert. An verschiedenen Zeitpunkten (0, 7, 14, 21, 42 und 70 dpi) nach der Infektion wurden die Lungenleukozyten isoliert und auf die Produktion von Th17-assoziierten Zytokinen untersucht. Dafür erfolgte die Restimulation mit Kryptokokken-Antigen. Die Überstände der Primärkulturen wurden mittels *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) analysiert.

14 Tage nach Infektion (dpi) erfolgt die maximale Expression von IL-17A, IL-17F und IL-22.

II. T-Zellen, insbesondere T-Helferzellen sind die Hauptproduzenten von IL-17A und IL-22 bei der Kryptokokkose.

Zum Zeitpunkt der stärksten Th17-assoziierten Zytokinproduktion (14 dpi) wurden isolierte Lungenleukozyten infizierter C57BL/6-Wildtypmäuse polyklonal (PMA/Ionomycin, 6 h) stimuliert. Den Primärkulturen wurde zur intrazellulären Anreicherung von IL-17A bzw. IL-22 Brefeldin A zugesetzt (4 h). Zur Untersuchung der Quellen der Th17-assoziierten Zytokine erfolgte die Färbung der Zellen mit spezifischen Oberflächenmarkern. IL-17A und IL-22 wurden intrazellulär gefärbt. Die Analyse erfolgte mittels Durchflusszytometrie.

Sowohl IL-17A- als auch IL-22-produzierende Zellen sind fast ausschließlich CD3-positiv. Vor allem die T-Helferzellen, aber auch NKT-, γδ-T-Zellen und zytotoxische T-Zellen (CTL) exprimieren Th17-assozierte Zytokine.

III. Die Ergebnisse der Untersuchungen mit verschiedenen immundefizienten Mäusen deuten auf eine protektive Funktion der Th17-assoziierten Zytokine hin.

Für die Analyse der *in-vivo*-Funktion der Th17-assoziierten Zytokine wurde mit verschiedenen immundefizienten Mausinzuchtstämmen gearbeitet.

a) Funktionsanalyse mit Hilfe der IL-17A- bzw. IL-22-Defizienz.

Zuerst wurde versucht mit Hilfe der Depletion von IL-17A oder IL-22 Rückschlüsse auf deren Rolle bei der Kryptokokkose zu ziehen. Frühere Studien zeigten eine stärkere Expression von IL-17A und IL-23 in IL-12p35-defizienten Tieren. So schien es erfolgsversprechender, die Th17-assoziierte Immunantwort in einem Modell

mit gesteigerter Expression der entsprechenden Zytokine zu untersuchen. Folglich wurden die Depletionen von IL-17A bzw. IL-22 nicht im Wildtypen vorgenommen. Es wurde ein Überlebensversuch nach Infektion mit *C. neoformans* von folgenden Mausstämmen durchgeführt:
IL-12p35$^{-/-}$, IL-12p35$^{-/-}$ x IL-17A$^{-/-}$ und IL-12p35$^{-/-}$ x IL-22$^{-/-}$

Die IL-17A- bzw. IL-22-defizienten Tiere verstarben nicht wie erwartet früher als die Kontrollgruppe. Auf weitere Analysen wurde daher verzichtet. Mögliche redundante Funktionen der Th17-assoziierten Zytokine lassen keine Schlussfolgerung bezüglich der Rolle von IL-17A und IL-22 bei der Kryptokokkose zu. Deshalb wurde im Folgenden versucht die Th17-assoziierte Immunantwort zu steigern.

b) Funktionsanalyse mit Hilfe immundefizienter Mausstämme mit gesteigerter Th17-assoziierter Immunantwort.

Dafür wurden Mäuse mit verminderter Th1- und Th2-Immunantwort (IL-12p35$^{-/-}$ x IL-4Rα$^{-/-}$) gezüchtet. Auf Grund der Regulation der T-Zelldifferenzierung wurde erwartet, dass die Verminderung von Th1 und Th2 in einer Steigerung der Th17-assoziierten Immunantwort resultiert. Ein Überlebendversuch von:
C57BL/6-Wildtyptieren, IL-12p35$^{-/-}$, IL-4Rα$^{-/-}$ und IL-12p35$^{-/-}$ x IL-4Rα$^{-/-}$ sollte erste Rückschlüsse bezüglich der Funktion der Th17-basierenden Immunantwort zulassen. An verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion (14 und 42 dpi) wurde die T-Helferzellantwort untersucht.

Mausinzuchtstämme mit verminderter Th1-Immunantwort (IL-12p35$^{-/-}$) erliegen der Infektion, die mit reduzierter Th2-Immunantwort (IL-4Rα$^{-/-}$), hingegen überleben. Interessanterweise sind IL-12p35$^{-/-}$ x IL-4Rα$^{-/-}$, trotz verminderter protektiver Th1-Immunantwort, resistent gegen *C. neoformans* und weisen zu einem frühen Zeitpunkt eine gesteigerte Th17-assoziierte Immunantwort auf. In Tieren mit verminderter Th2-Immunantwort (IL-4Rα$^{-/-}$) kann zu einem frühen und späten Zeitpunkt eine deutlich gesteigerter Produktion Th17-assoziierter Zytokine nachgewiesen werden.

c) **Untersuchung des Infektionsverlaufes von Tieren mit gesteigerter Th17-assoziierter Immunantwort.**
Es erfolgte die detaillierte Analyse des Infektionsverlaufes (0, 7, 14, 21, 42 und 70 dpi) von:
C57BL/6-Wildtyptieren und IL-4Rα$^{-/-}$ Mäusen.
Mäuse mit verminderter Th2-Immunantwort (IL-4Rα$^{-/-}$) haben im Vergleich zu Wildtyptieren ab 21 dpi eine deutlich stärkere *Cryptococcus*-spezifische Th17-assoziierte Zytokinproduktion und weisen ab diesem Zeitpunkt weniger Pilze in der Lunge auf. Die Induktion des Th1-assoziierten, protektiven IFN-γ ist erst nach 42 Tagen nachzuweisen, so dass die Th17-assoziierten Zytokine zumindest in dieser Phase zur Kontrolle der Erreger und dem Überleben von IL-4Rα-defizienten Tieren beitragen könnten.

Schlussfolgernd scheinen derzeit die Th1-assoziierten Zytokine für den Einsatz zur Immunmodulation bei einer antifungalen Therapie der *Cryptococcus*-Infektion erfolgversprechender als die Th17-assoziierten Interleukine. Weitere Analysen der Funktion von IL-22, vor allem der entsprechenden antifungalen Zielmoleküle, könnten jedoch in Zukunft alternative Behandlungsstrategien darstellen. Entsprechende Untersuchungen dazu sind in Planung. Der Einsatz derartiger Effektormoleküle von IL-22 (z. Bsp. antimikrobielle Peptide) würde möglicherweise ohne bzw. mit weniger Nebenwirkungen, durch die Modulation des Immunsystem, einhergehen und könnten damit Vorteile gegenüber den Th1-assoziierten Interleukinen bieten und somit die Behandlung invasiver Mykosen optimieren.

6 Abstract

The fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* is ubiquitously distributed. It is one of the most important fungi resulting in invasive mycosis. Despite antifungal therapies immunocompromised individuals suffering from fungal infection exhibit high mortality rates. Approximately one million cases of cryptococcal meningitis result in more than 600.000 annual deaths. There is an urgent need to investigate the immune response against *C. neoformans* to develop new prophylactic or therapeutic approaches.

In the murine model protective immunity against *C. neoformans* is dependent on T helper (Th) 1 cells, whereas Th2 cells are detrimental. Several studies presume a significant role of Th17-associated production of interleukin (IL)-17A and IL-22 in regulating antimicrobial immunity at the barrier surfaces. There is some evidence for Th17 cells contributing to protection against fungi. IL-17A was shown to be beneficial for cryptococcal clearance. However, the functional role of IL-22 remains unclear.

Th17-associated cytokines may provide an alternative approach for novel immunomodulatory therapies or vaccination strategies compared to Th1-related cytokines.

Aim of the study:

1. Establishment of an experimental model of bronchopulmonary infection with *C. neoformans* using C57BL/6 wild-type mice and examination of Th17-associated cytokine (IL-17A, IL-17F and IL-22) expression during chronic infection.
2. Characterization of cellular sources of IL-17A and IL-22 in the murine lung.
3. Functional analysis of Th17-associated immune response using different immunodeficient strains of inbred mice.

Summary:

I. Th17-associated cytokines are mainly expressed during the early phase of cryptococcosis.

Isolated lung leukocytes of intranasal infected C57BL/6 wild-type mice (0, 7, 14, 21, 42 and 70 days post infetion) were restimulated using cryptococcal antigen to analyze the production of Th17-type cytokines in supernatants of primary cultures.

14 days after infection (dpi) peak values of IL-17A, IL-17F and IL-22 are detectable.

II. During cryptococcosis IL-17A and IL-22 are preferentially produced by T cells (especially T helper cells).

Analysis of cellular sources of Th17-related cytokines was done by flow cytometry. All potential producing cells were analyzed at the time point with maximal cytokine expression (14 dpi).

IL-17A and IL-22 producing cells are almost all CD3-positive. These cells are mainly T helper cells but also NKT cells, γδ T cells and cytotoxic T lymphocytes (CTL) expressing Th17-associated cytokines.

III. The use of different immunodeficient mice points to a protective role of Th17-associated cytokines during cryptococcosis.

Different immunodeficient strains of inbred mice were used to analyze the *in vivo* function of Th17-type cytokines.

a) Functional analysis using IL-17A- or IL-22-deficient mice.

The knockout of IL-17A or IL-22 during cryptococcosis was applied to draw conclusions regarding the function of these cytokines. Previous investigations show a higher expression of IL-17A and IL-23 in IL-12p35-deficient mice. Thus, it was obvious to investigate the Th17-related immune response in mice with increased expression of these cytokines.

No differences in survival of the fungal infection are detectable in IL-17A and IL-22 knockout animals with reduced Th1-related immune response (IL-12p35$^{-/-}$). Possible redundant functions of Th17-associated cytokines disallow conclusions regarding the role of IL-17A and IL-22 during cryptococcosis.

b) Functional analysis using different immunodeficient animals with increased Th17-related immune response.

Animals with decreased Th1 und Th2 immune response (IL-12p35$^{-/-}$ x IL-4Rα$^{-/-}$ mice) were investigated for Th17-type cytokines after *C. neoformans* infection. Based on the mutual cross-regulation of Th1 and Th2 cells it was expected that a reduction of Th1 and Th2 leads to an increase of the Th17-associated immune response. The decrease of both T helper cells (Th1 and Th2) should reflect a phenotype with distinct Th17-related immunity. Survival experiments using

C57BL/6 wild-type, IL-12p35$^{-/-}$, IL-4Rα$^{-/-}$ and IL-12p35$^{-/-}$ x IL-4Rα$^{-/-}$ were done.

Inbred mice with a reduced Th1-related immune response (IL-12p35$^{-/-}$) are susceptible, whereas animals with reduced Th2-related immune response (IL-4Rα$^{-/-}$) are resistant. Interestingly, despite the loss of the protective Th1-related immune response, IL-12p35$^{-/-}$ x IL-4Rα$^{-/-}$ mice are almost as resistant as IL-4Rα$^{-/-}$. Only at an early time point (14 dpi) an increased expression of Th17-related cytokines is detectable after knockout of IL-12p35 and IL-4Rα. After reduction of Th2-related immune response (IL-4Rα$^{-/-}$) an increase of Th17-associated cytokines is detectable (14 and 42 dpi). Based on these findings, mice with the highest elevation of Th17-related immunity (IL-4Rα$^{-/-}$) were analyzed in more detail.

c) Time course during infection using animals with increased Th17-reated immune response.

The time course during infection (0, 7, 14, 21, 42 und 70 dpi) was investigated using: C57BL/6 wild-type and IL-4Rα$^{-/-}$.

Animals with reduced Th2-related immune response show an increased *Cryptococcus*-specific Th17-associated cytokine expression from 21 dpi onwards. As of this date less fungi are detectable in the lung of IL-4Rα-deficient mice. An increase of protective Th1-associated IFN-γ is measured after 42 dpi. Hence Th17-associated cytokines may contribute to the control and survival of the pathogen in IL-4Rα-deficient mice.

In conclusion, Th1-associated cytokines seem to be of greater benefit for immunomodulation during antifungal therapy of cryptococcosis as compared to Th17-related cytokines. Further analysis of the function of IL-22 (especially for

antifungal target genes) could provide an alternative treatment strategy but requires further investigations in future studies. Utilization of effector molecules of IL-22 (e.g. antimicrobial peptides) may result in reduced side effects or be even without any. This could represent an improvement over Th1-associated cytokines and will optimize the treatment of invasive mycoses.

7 Literaturverzeichnis

1. Havlickova B, Czaika VA, Friedrich M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses* 2008; 51 Suppl 4:2-15.
2. Sobel JD. Vulvovaginal candidosis. *Lancet* 2007; 369(9577):1961-1971.
3. Brown GD, Denning DW, Gow NA, Levitz SM, Netea MG, White TC. Hidden killers: human fungal infections. *Sci Transl Med* 2012; 4(165):165rv13.
4. Li SS, Mody CH. Cryptococcus. *Proc Am Thorac Soc* 2010; 7(3):186-196.
5. Botts MR, Giles SS, Gates MA, Kozel TR, Hull CM. Isolation and characterization of Cryptococcus neoformans spores reveal a critical role for capsule biosynthesis genes in spore biogenesis. *Eukaryot Cell* 2009; 8(4):595-605.
6. Giles SS, Dagenais TR, Botts MR, Keller NP, Hull CM. Elucidating the pathogenesis of spores from the human fungal pathogen Cryptococcus neoformans. *Infect Immun* 2009; 77(8):3491-3500.
7. Velagapudi R, Hsueh YP, Geunes-Boyer S, Wright JR, Heitman J. Spores as infectious propagules of Cryptococcus neoformans. *Infect Immun* 2009; 77(10):4345-4355.
8. Lazera MS, Pires FD, Camillo-Coura L, Nishikawa MM, Bezerra CC, Trilles L, *et al.* Natural habitat of Cryptococcus neoformans var. neoformans in decaying wood forming hollows in living trees. *J Med Vet Mycol* 1996; 34(2):127-131.
9. Kwon-Chung KJ, Bennett JE. Distribution of alpha and alpha mating types of Cryptococcus neoformans among natural and clinical isolates. *Am J Epidemiol* 1978; 108(4):337-340.
10. Antachopoulos C, Walsh TJ. Immunotherapy of Cryptococcus infections. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18(2):126-133.
11. Dromer F, Ronin O, Dupont B. Isolation of Cryptococcus neoformans var. gattii from an Asian patient in France: evidence for dormant infection in healthy subjects. *J Med Vet Mycol* 1992; 30(5):395-397.
12. Brizendine KD, Pappas PG. Cryptococcal meningitis: current approaches to management in patients with and without AIDS. *Curr Infect Dis Rep* 2010; 12(4):299-305.
13. Park BJ, Wannemuehler KA, Marston BJ, Govender N, Pappas PG, Chiller TM. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *AIDS* 2009; 23(4):525-530.
14. Voelz K, May RC. Cryptococcal interactions with the host immune system. *Eukaryot Cell* 2010; 9(6):835-846.
15. Zaragoza O, Rodrigues ML, De JM, Frases S, Dadachova E, Casadevall A. The capsule of the fungal pathogen Cryptococcus neoformans. *Adv Appl Microbiol* 2009; 68:133-216.

16. Doering TL. How sweet it is! Cell wall biogenesis and polysaccharide capsule formation in Cryptococcus neoformans. *Annu Rev Microbiol* 2009; 63:223-247.
17. Vecchiarelli A, Pericolini E, Gabrielli E, Chow SK, Bistoni F, Cenci E, *et al.* Cryptococcus neoformans galactoxylomannan is a potent negative immunomodulator, inspiring new approaches in anti-inflammatory immunotherapy. *Immunotherapy* 2011; 3(8):997-1005.
18. Retini C, Vecchiarelli A, Monari C, Tascini C, Bistoni F, Kozel TR. Capsular polysaccharide of Cryptococcus neoformans induces proinflammatory cytokine release by human neutrophils. *Infect Immun* 1996; 64(8):2897-2903.
19. Dong ZM, Murphy JW. Cryptococcal polysaccharides induce L-selectin shedding and tumor necrosis factor receptor loss from the surface of human neutrophils. *J Clin Invest* 1996; 97(3):689-698.
20. Monari C, Retini C, Casadevall A, Netski D, Bistoni F, Kozel TR, *et al.* Differences in outcome of the interaction between Cryptococcus neoformans glucuronoxylomannan and human monocytes and neutrophils. *Eur J Immunol* 2003; 33(4):1041-1051.
21. Vecchiarelli A, Retini C, Pietrella D, Monari C, Tascini C, Beccari T, *et al.* Downregulation by cryptococcal polysaccharide of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 beta secretion from human monocytes. *Infect Immun* 1995; 63(8):2919-2923.
22. Retini C, Kozel TR, Pietrella D, Monari C, Bistoni F, Vecchiarelli A. Interdependency of interleukin-10 and interleukin-12 in regulation of T-cell differentiation and effector function of monocytes in response to stimulation with Cryptococcus neoformans. *Infect Immun* 2001; 69(10):6064-6073.
23. Retini C, Vecchiarelli A, Monari C, Bistoni F, Kozel TR. Encapsulation of Cryptococcus neoformans with glucuronoxylomannan inhibits the antigen-presenting capacity of monocytes. *Infect Immun* 1998; 66(2):664-669.
24. Nosanchuk JD, Casadevall A. Impact of melanin on microbial virulence and clinical resistance to antimicrobial compounds. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50(11):3519-3528.
25. Panepinto JC, Williamson PR. Intersection of fungal fitness and virulence in Cryptococcus neoformans. *FEMS Yeast Res* 2006; 6(4):489-498.
26. Zhu X, Williamson PR. Role of laccase in the biology and virulence of Cryptococcus neoformans. *FEMS Yeast Res* 2004; 5(1):1-10.
27. Siafakas AR, Sorrell TC, Wright LC, Wilson C, Larsen M, Boadle R, *et al.* Cell wall-linked cryptococcal phospholipase B1 is a source of secreted enzyme and a determinant of cell wall integrity. *J Biol Chem* 2007; 282(52):37508-37514.
28. Olszewski MA, Noverr MC, Chen GH, Toews GB, Cox GM, Perfect JR, *et al.* Urease expression by Cryptococcus neoformans promotes

microvascular sequestration, thereby enhancing central nervous system invasion. *Am J Pathol* 2004; 164(5):1761-1771.

29. Cox GM, Mukherjee J, Cole GT, Casadevall A, Perfect JR. Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis. *Infect Immun* 2000; 68(2):443-448.
30. Perfect JR. Cryptococcus neoformans: the yeast that likes it hot. *FEMS Yeast Res* 2006; 6(4):463-468.
31. Feldmesser M, Kress Y, Novikoff P, Casadevall A. Cryptococcus neoformans is a facultative intracellular pathogen in murine pulmonary infection. *Infect Immun* 2000; 68(7):4225-4237.
32. Kronstad JW, Attarian R, Cadieux B, Choi J, D'Souza CA, Griffiths EJ, *et al.* Expanding fungal pathogenesis: Cryptococcus breaks out of the opportunistic box. *Nat Rev Microbiol* 2011; 9(3):193-203.
33. Casadevall A, Steenbergen JN, Nosanchuk JD. 'Ready made' virulence and 'dual use' virulence factors in pathogenic environmental fungi--the Cryptococcus neoformans paradigm. *Curr Opin Microbiol* 2003; 6(4):332-337.
34. Shoham S, Huang C, Chen JM, Golenbock DT, Levitz SM. Toll-like receptor 4 mediates intracellular signaling without TNF-alpha release in response to Cryptococcus neoformans polysaccharide capsule. *J Immunol* 2001; 166(7):4620-4626.
35. Pietrella D, Corbucci C, Perito S, Bistoni G, Vecchiarelli A. Mannoproteins from Cryptococcus neoformans promote dendritic cell maturation and activation. *Infect Immun* 2005; 73(2):820-827.
36. Mitchell TG, Perfect JR. Cryptococcosis in the era of AIDS--100 years after the discovery of Cryptococcus neoformans. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8(4):515-548.
37. Bourgeois C, Majer O, Frohner IE, Tierney L, Kuchler K. Fungal attacks on mammalian hosts: pathogen elimination requires sensing and tasting. *Curr Opin Microbiol* 2010; 13(4):401-408.
38. Jouault T, Sarazin A, Martinez-Esparza M, Fradin C, Sendid B, Poulain D. Host responses to a versatile commensal: PAMPs and PRRs interplay leading to tolerance or infection by Candida albicans. *Cell Microbiol* 2009; 11(7):1007-1015.
39. Brown GD. Innate antifungal immunity: the key role of phagocytes. *Annu Rev Immunol* 2011; 29:1-21.
40. Syme RM, Spurrell JC, Amankwah EK, Green FH, Mody CH. Primary dendritic cells phagocytose Cryptococcus neoformans via mannose receptors and Fcgamma receptor II for presentation to T lymphocytes. *Infect Immun* 2002; 70(11):5972-5981.
41. Kelly RM, Chen J, Yauch LE, Levitz SM. Opsonic requirements for dendritic cell-mediated responses to Cryptococcus neoformans. *Infect Immun* 2005; 73(1):592-598.

42. Levitz SM, Nong SH, Seetoo KF, Harrison TS, Speizer RA, Simons ER. Cryptococcus neoformans resides in an acidic phagolysosome of human macrophages. *Infect Immun* 1999; 67(2):885-890.
43. Alvarez M, Casadevall A. Cell-to-cell spread and massive vacuole formation after Cryptococcus neoformans infection of murine macrophages. *BMC Immunol* 2007; 8:16.
44. Del PM. Role of phagocytosis in the virulence of Cryptococcus neoformans. *Eukaryot Cell* 2004; 3(5):1067-1075.
45. Chaturvedi V, Wong B, Newman SL. Oxidative killing of Cryptococcus neoformans by human neutrophils. Evidence that fungal mannitol protects by scavenging reactive oxygen intermediates. *J Immunol* 1996; 156(10):3836-3840.
46. Miller MF, Mitchell TG. Killing of Cryptococcus neoformans strains by human neutrophils and monocytes. *Infect Immun* 1991; 59(1):24-28.
47. Mambula SS, Simons ER, Hastey R, Selsted ME, Levitz SM. Human neutrophil-mediated nonoxidative antifungal activity against Cryptococcus neoformans. *Infect Immun* 2000; 68(11):6257-6264.
48. Lehrer RI, Ganz T. Antimicrobial polypeptides of human neutrophils. *Blood* 1990; 76(11):2169-2181.
49. Eisenhauer PB, Lehrer RI. Mouse neutrophils lack defensins. *Infect Immun* 1992; 60(8):3446-3447.
50. Alvarez M, Casadevall A. Phagosome extrusion and host-cell survival after Cryptococcus neoformans phagocytosis by macrophages. *Curr Biol* 2006; 16(21):2161-2165.
51. Ma H, Croudace JE, Lammas DA, May RC. Expulsion of live pathogenic yeast by macrophages. *Curr Biol* 2006; 16(21):2156-2160.
52. Marr KJ, Jones GJ, Zheng C, Huston SM, Timm-McCann M, Islam A, *et al.* Cryptococcus neoformans directly stimulates perforin production and rearms NK cells for enhanced anticryptococcal microbicidal activity. *Infect Immun* 2009; 77(6):2436-2446.
53. Huffnagle GB, Yates JL, Lipscomb MF. T cell-mediated immunity in the lung: a Cryptococcus neoformans pulmonary infection model using SCID and athymic nude mice. *Infect Immun* 1991; 59(4):1423-1433.
54. Huffnagle GB, Lipscomb MF. Pulmonary cryptococcosis. *Am J Pathol* 1992; 141(6):1517-1520.
55. Mody CH, Lipscomb MF, Street NE, Toews GB. Depletion of CD4+ (L3T4+) lymphocytes in vivo impairs murine host defense to Cryptococcus neoformans. *J Immunol* 1990; 144(4):1472-1477.
56. Lim TS, Murphy JW. Transfer of immunity to cryptococcosis by T-enriched splenic lymphocytes from Cryptococcus neoformans-sensitized mice. *Infect Immun* 1980; 30(1):5-11.
57. Mody CH, Paine R, III, Jackson C, Chen GH, Toews GB. CD8 cells play a critical role in delayed type hypersensitivity to intact Cryptococcus neoformans. *J Immunol* 1994; 152(8):3970-3979.

58. Netski D, Kozel TR. Fc-dependent and Fc-independent opsonization of Cryptococcus neoformans by anticapsular monoclonal antibodies: importance of epitope specificity. *Infect Immun* 2002; 70(6):2812-2819.
59. Taborda CP, Casadevall A. CR3 (CD11b/CD18) and CR4 (CD11c/CD18) are involved in complement-independent antibody-mediated phagocytosis of Cryptococcus neoformans. *Immunity* 2002; 16(6):791-802.
60. Levitz SM, Dupont MP, Smail EH. Direct activity of human T lymphocytes and natural killer cells against Cryptococcus neoformans. *Infect Immun* 1994; 62(1):194-202.
61. Zheng CF, Ma LL, Jones GJ, Gill MJ, Krensky AM, Kubes P, *et al.* Cytotoxic CD4+ T cells use granulysin to kill Cryptococcus neoformans, and activation of this pathway is defective in HIV patients. *Blood* 2007; 109(5):2049-2057.
62. Ernst WA, Thoma-Uszynski S, Teitelbaum R, Ko C, Hanson DA, Clayberger C, *et al.* Granulysin, a T cell product, kills bacteria by altering membrane permeability. *J Immunol* 2000; 165(12):7102-7108.
63. Voskoboinik I, Smyth MJ, Trapani JA. Perforin-mediated target-cell death and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol* 2006; 6(12):940-952.
64. Cutler JE, Deepe GS, Jr., Klein BS. Advances in combating fungal diseases: vaccines on the threshold. *Nat Rev Microbiol* 2007; 5(1):13-28.
65. Bettelli E, Korn T, Kuchroo VK. Th17: the third member of the effector T cell trilogy. *Curr Opin Immunol* 2007; 19(6):652-657.
66. Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). *Annu Rev Immunol* 2010; 28:445-489.
67. Kurebayashi Y, Nagai S, Ikejiri A, Koyasu S. Recent advances in understanding the molecular mechanisms of the development and function of Th17 cells. *Genes Cells* 2013; 18(4):247-265.
68. Murray HW, Spitalny GL, Nathan CF. Activation of mouse peritoneal macrophages in vitro and in vivo by interferon-gamma. *J Immunol* 1985; 134(3):1619-1622.
69. Kidd P. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern Med Rev* 2003; 8(3):223-246.
70. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol* 2009; 27:485-517.
71. Kolls JK, Khader SA. The role of Th17 cytokines in primary mucosal immunity. *Cytokine Growth Factor Rev* 2010; 21(6):443-448.
72. Curtis MM, Way SS. Interleukin-17 in host defence against bacterial, mycobacterial and fungal pathogens. *Immunology* 2009; 126(2):177-185.
73. Sehrawat S, Rouse BT. Tregs and infections: on the potential value of modifying their function. *J Leukoc Biol* 2011; 90(6):1079-1087.

74. Mills KH. Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? *Nat Rev Immunol* 2004; 4(11):841-855.
75. Damsker JM, Hansen AM, Caspi RR. Th1 and Th17 cells: adversaries and collaborators. *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1183:211-221.
76. Zhu J, Paul WE. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* 2008; 112(5):1557-1569.
77. Whiteside TL. What are regulatory T cells (Treg) regulating in cancer and why? *Semin Cancer Biol* 2012; 22(4):327-334.
78. Osterholzer JJ, Milam JE, Chen GH, Toews GB, Huffnagle GB, Olszewski MA. Role of dendritic cells and alveolar macrophages in regulating early host defense against pulmonary infection with Cryptococcus neoformans. *Infect Immun* 2009; 77(9):3749-3758.
79. Geijtenbeek TB, Kwon DS, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Middel J, *et al.* DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* 2000; 100(5):587-597.
80. Geijtenbeek TB, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Adema GJ, van KY, *et al.* Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* 2000; 100(5):575-585.
81. Levitz SM. Macrophage-Cryptococcus interactions. *Immunol Ser* 1994; 60:533-543.
82. Wozniak KL, Vyas JM, Levitz SM. In vivo role of dendritic cells in a murine model of pulmonary cryptococcosis. *Infect Immun* 2006; 74(7):3817-3824.
83. Wozniak KL, Levitz SM. Cryptococcus neoformans enters the endolysosomal pathway of dendritic cells and is killed by lysosomal components. *Infect Immun* 2008; 76(10):4764-4771.
84. Biondo C, Midiri A, Gambuzza M, Gerace E, Falduto M, Galbo R, *et al.* IFN-alpha/beta signaling is required for polarization of cytokine responses toward a protective type 1 pattern during experimental cryptococcosis. *J Immunol* 2008; 181(1):566-573.
85. Lupo P, Chang YC, Kelsall BL, Farber JM, Pietrella D, Vecchiarelli A, *et al.* The presence of capsule in Cryptococcus neoformans influences the gene expression profile in dendritic cells during interaction with the fungus. *Infect Immun* 2008; 76(4):1581-1589.
86. Nakamura K, Miyagi K, Koguchi Y, Kinjo Y, Uezu K, Kinjo T, *et al.* Limited contribution of Toll-like receptor 2 and 4 to the host response to a fungal infectious pathogen, Cryptococcus neoformans. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2006; 47(1):148-154.
87. Nakamura K, Miyazato A, Xiao G, Hatta M, Inden K, Aoyagi T, *et al.* Deoxynucleic acids from Cryptococcus neoformans activate myeloid dendritic cells via a TLR9-dependent pathway. *J Immunol* 2008; 180(6):4067-4074.

88. Siegemund S, Alber G. Cryptococcus neoformans activates bone marrow-derived conventional dendritic cells rather than plasmacytoid dendritic cells and down-regulates macrophages. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2008; 52(3):417-427.
89. Bauman SK, Huffnagle GB, Murphy JW. Effects of tumor necrosis factor alpha on dendritic cell accumulation in lymph nodes draining the immunization site and the impact on the anticryptococcal cell-mediated immune response. *Infect Immun* 2003; 71(1):68-74.
90. Osterholzer JJ, Surana R, Milam JE, Montano GT, Chen GH, Sonstein J, *et al.* Cryptococcal urease promotes the accumulation of immature dendritic cells and a non-protective T2 immune response within the lung. *Am J Pathol* 2009; 174(3):932-943.
91. Traynor TR, Kuziel WA, Toews GB, Huffnagle GB. CCR2 expression determines T1 versus T2 polarization during pulmonary Cryptococcus neoformans infection. *J Immunol* 2000; 164(4):2021-2027.
92. Lindell DM, Moore TA, McDonald RA, Toews GB, Huffnagle GB. Distinct compartmentalization of CD4+ T-cell effector function versus proliferative capacity during pulmonary cryptococcosis. *Am J Pathol* 2006; 168(3):847-855.
93. Osterholzer JJ, Curtis JL, Polak T, Ames T, Chen GH, McDonald R, *et al.* CCR2 mediates conventional dendritic cell recruitment and the formation of bronchovascular mononuclear cell infiltrates in the lungs of mice infected with Cryptococcus neoformans. *J Immunol* 2008; 181(1):610-620.
94. Beenhouwer DO, Shapiro S, Feldmesser M, Casadevall A, Scharff MD. Both Th1 and Th2 cytokines affect the ability of monoclonal antibodies to protect mice against Cryptococcus neoformans. *Infect Immun* 2001; 69(10):6445-6455.
95. Voelz K, Lammas DA, May RC. Cytokine signaling regulates the outcome of intracellular macrophage parasitism by Cryptococcus neoformans. *Infect Immun* 2009; 77(8):3450-3457.
96. Wormley FL, Jr., Perfect JR, Steele C, Cox GM. Protection against cryptococcosis by using a murine gamma interferon-producing Cryptococcus neoformans strain. *Infect Immun* 2007; 75(3):1453-1462.
97. Hernandez Y, Arora S, Erb-Downward JR, McDonald RA, Toews GB, Huffnagle GB. Distinct roles for IL-4 and IL-10 in regulating T2 immunity during allergic bronchopulmonary mycosis. *J Immunol* 2005; 174(2):1027-1036.
98. Stenzel W, Muller U, Kohler G, Heppner FL, Blessing M, McKenzie AN, *et al.* IL-4/IL-13-dependent alternative activation of macrophages but not microglial cells is associated with uncontrolled cerebral cryptococcosis. *Am J Pathol* 2009; 174(2):486-496.

99. Boulware DR, Meya DB, Bergemann TL, Wiesner DL, Rhein J, Musubire A, *et al.* Clinical features and serum biomarkers in HIV immune reconstitution inflammatory syndrome after cryptococcal meningitis: a prospective cohort study. *PLoS Med* 2010; 7(12):e1000384.
100. Romani L. Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol* 2004; 4(1):1-23.
101. Decken K, Kohler G, Palmer-Lehmann K, Wunderlin A, Mattner F, Magram J, *et al.* Interleukin-12 is essential for a protective Th1 response in mice infected with Cryptococcus neoformans. *Infect Immun* 1998; 66(10):4994-5000.
102. Flesch IE, Schwamberger G, Kaufmann SH. Fungicidal activity of IFN-gamma-activated macrophages. Extracellular killing of Cryptococcus neoformans. *J Immunol* 1989; 142(9):3219-3224.
103. Kawakami K, Kohno S, Kadota J, Tohyama M, Teruya K, Kudeken N, *et al.* T cell-dependent activation of macrophages and enhancement of their phagocytic activity in the lungs of mice inoculated with heat-killed Cryptococcus neoformans: involvement of IFN-gamma and its protective effect against cryptococcal infection. *Microbiol Immunol* 1995; 39(2):135-143.
104. Milam JE, Herring-Palmer AC, Pandrangi R, McDonald RA, Huffnagle GB, Toews GB. Modulation of the pulmonary type 2 T-cell response to Cryptococcus neoformans by intratracheal delivery of a tumor necrosis factor alpha-expressing adenoviral vector. *Infect Immun* 2007; 75(10):4951-4958.
105. Olszewski MA, Zhang Y, Huffnagle GB. Mechanisms of cryptococcal virulence and persistence. *Future Microbiol* 2010; 5(8):1269-1288.
106. Arora S, Hernandez Y, Erb-Downward JR, McDonald RA, Toews GB, Huffnagle GB. Role of IFN-gamma in regulating T2 immunity and the development of alternatively activated macrophages during allergic bronchopulmonary mycosis. *J Immunol* 2005; 174(10):6346-6356.
107. Muller U, Stenzel W, Kohler G, Werner C, Polte T, Hansen G, *et al.* IL-13 induces disease-promoting type 2 cytokines, alternatively activated macrophages and allergic inflammation during pulmonary infection of mice with Cryptococcus neoformans. *J Immunol* 2007; 179(8):5367-5377.
108. Yang M, Hogan SP, Henry PJ, Matthaei KI, McKenzie AN, Young IG, *et al.* Interleukin-13 mediates airways hyperreactivity through the IL-4 receptor-alpha chain and STAT-6 independently of IL-5 and eotaxin. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001; 25(4):522-530.
109. Ingram JL, Kraft M. IL-13 in asthma and allergic disease: asthma phenotypes and targeted therapies. *J Allergy Clin Immunol* 2012; 130(4):829-842.
110. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 2003; 3(1):23-35.

111. Muller U, Stenzel W, Kohler G, Polte T, Blessing M, Mann A, *et al.* A gene-dosage effect for interleukin-4 receptor alpha-chain expression has an impact on Th2-mediated allergic inflammation during bronchopulmonary mycosis. *J Infect Dis* 2008; 198(11):1714-1721.

112. Hershey GK. IL-13 receptors and signaling pathways: an evolving web. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111(4):677-690.

113. Huffnagle GB, Boyd MB, Street NE, Lipscomb MF. IL-5 is required for eosinophil recruitment, crystal deposition, and mononuclear cell recruitment during a pulmonary Cryptococcus neoformans infection in genetically susceptible mice (C57BL/6). *J Immunol* 1998; 160(5):2393-2400.

114. Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, *et al.* The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* 2006; 126(6):1121-1133.

115. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, *et al.* Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 2005; 6(11):1123-1132.

116. Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, *et al.* A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 2005; 6(11):1133-1141.

117. Ouyang W, Kolls JK, Zheng Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity* 2008; 28(4):454-467.

118. Aujla SJ, Dubin PJ, Kolls JK. Th17 cells and mucosal host defense. *Semin Immunol* 2007; 19(6):377-382.

119. Kolls JK, Linden A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* 2004; 21(4):467-476.

120. Weaver CT, Hatton RD, Mangan PR, Harrington LE. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol* 2007; 25:821-852.

121. Rouvier E, Luciani MF, Mattei MG, Denizot F, Golstein P. CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a herpesvirus saimiri gene. *J Immunol* 1993; 150(12):5445-5456.

122. Wright JF, Guo Y, Quazi A, Luxenberg DP, Bennett F, Ross JF, *et al.* Identification of an interleukin 17F/17A heterodimer in activated human CD4+ T cells. *J Biol Chem* 2007; 282(18):13447-13455.

123. Chang SH, Dong C. A novel heterodimeric cytokine consisting of IL-17 and IL-17F regulates inflammatory responses. *Cell Res* 2007; 17(5):435-440.

124. Gaffen SL. Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nat Rev Immunol* 2009; 9(8):556-567.

125. Spits H, Di Santo JP. The expanding family of innate lymphoid cells: regulators and effectors of immunity and tissue remodeling. *Nat Immunol* 2011; 12(1):21-27.

126. Wozniak KL, Hardison SE, Kolls JK, Wormley FL. Role of IL-17A on resolution of pulmonary C. neoformans infection. *PLoS One* 2011; 6(2):e17204.

127. Aggarwal S, Gurney AL. IL-17: prototype member of an emerging cytokine family. *J Leukoc Biol* 2002; 71(1):1-8.

128. Yao Z, Fanslow WC, Seldin MF, Rousseau AM, Painter SL, Comeau MR, *et al.* Herpesvirus Saimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to a novel cytokine receptor. *Immunity* 1995; 3(6):811-821.

129. Hymowitz SG, Filvaroff EH, Yin JP, Lee J, Cai L, Risser P, *et al.* IL-17s adopt a cystine knot fold: structure and activity of a novel cytokine, IL-17F, and implications for receptor binding. *EMBO J* 2001; 20(19):5332-5341.

130. You Z, Shi XB, DuRaine G, Haudenschild D, Tepper CG, Lo SH, *et al.* Interleukin-17 receptor-like gene is a novel antiapoptotic gene highly expressed in androgen-independent prostate cancer. *Cancer Res* 2006; 66(1):175-183.

131. Ishigame H, Kakuta S, Nagai T, Kadoki M, Nambu A, Komiyama Y, *et al.* Differential roles of interleukin-17A and -17F in host defense against mucoepithelial bacterial infection and allergic responses. *Immunity* 2009; 30(1):108-119.

132. Haudenschild D, Moseley T, Rose L, Reddi AH. Soluble and transmembrane isoforms of novel interleukin-17 receptor-like protein by RNA splicing and expression in prostate cancer. *J Biol Chem* 2002; 277(6):4309-4316.

133. Yao Z, Spriggs MK, Derry JM, Strockbine L, Park LS, VandenBos T, *et al.* Molecular characterization of the human interleukin (IL)-17 receptor. *Cytokine* 1997; 9(11):794-800.

134. Kuestner RE, Taft DW, Haran A, Brandt CS, Brender T, Lum K, *et al.* Identification of the IL-17 receptor related molecule IL-17RC as the receptor for IL-17F. *J Immunol* 2007; 179(8):5462-5473.

135. Shen F, Gaffen SL. Structure-function relationships in the IL-17 receptor: implications for signal transduction and therapy. *Cytokine* 2008; 41(2):92-104.

136. Kawaguchi M, Onuchic LF, Huang SK. Activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK)1/2, but not p38 and c-Jun N-terminal kinase, is involved in signaling of a novel cytokine, ML-1. *J Biol Chem* 2002; 277(18):15229-15232.

137. Qian Y, Liu C, Hartupee J, Altuntas CZ, Gulen MF, Jane-Wit D, *et al.* The adaptor Act1 is required for interleukin 17-dependent signaling associated with autoimmune and inflammatory disease. *Nat Immunol* 2007; 8(3):247-256.

138. Schwandner R, Yamaguchi K, Cao Z. Requirement of tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)6 in interleukin 17 signal transduction. *J Exp Med* 2000; 191(7):1233-1240.

139. Kawaguchi M, Adachi M, Oda N, Kokubu F, Huang SK. IL-17 cytokine family. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114(6):1265-1273.

140. Zelante T, De LA, D'Angelo C, Moretti S, Romani L. IL-17/Th17 in anti-fungal immunity: what's new? *Eur J Immunol* 2009; 39(3):645-648.

141. Huang W, Na L, Fidel PL, Schwarzenberger P. Requirement of interleukin-17A for systemic anti-Candida albicans host defense in mice. *J Infect Dis* 2004; 190(3):624-631.

142. Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 2006; 24(2):179-189.

143. Stockinger B, Veldhoen M. Differentiation and function of Th17 T cells. *Curr Opin Immunol* 2007; 19(3):281-286.

144. Zelante T, De LA, Bonifazi P, Montagnoli C, Bozza S, Moretti S, *et al.* IL-23 and the Th17 pathway promote inflammation and impair antifungal immune resistance. *Eur J Immunol* 2007; 37(10):2695-2706.

145. Kleinschek MA, Muller U, Brodie SJ, Stenzel W, Kohler G, Blumenschein WM, *et al.* IL-23 enhances the inflammatory cell response in Cryptococcus neoformans infection and induces a cytokine pattern distinct from IL-12. *J Immunol* 2006; 176(2):1098-1106.

146. Hardison SE, Wozniak KL, Kolls JK, Wormley FL, Jr. Interleukin-17 is not required for classical macrophage activation in a pulmonary mouse model of Cryptococcus neoformans infection. *Infect Immun* 2010; 78(12):5341-5351.

147. Murdock BJ, Huffnagle GB, Olszewski MA, Osterholzer JJ. IL-17A enhances host defense against cryptococcal lung infection through effects mediated by leukocyte recruitment, activation, and IFN-gamma production. *Infect Immun* 2013.

148. Xie MH, Aggarwal S, Ho WH, Foster J, Zhang Z, Stinson J, *et al.* Interleukin (IL)-22, a novel human cytokine that signals through the interferon receptor-related proteins CRF2-4 and IL-22R. *J Biol Chem* 2000; 275(40):31335-31339.

149. Witte E, Witte K, Warszawska K, Sabat R, Wolk K. Interleukin-22: a cytokine produced by T, NK and NKT cell subsets, with importance in the innate immune defense and tissue protection. *Cytokine Growth Factor Rev* 2010; 21(5):365-379.

150. de Oliveira NM, Ferreira JR, Jr., Colau D, Fischer H, Nascimento AS, Craievich AF, *et al.* Interleukin-22 forms dimers that are recognized by two interleukin-22R1 receptor chains. *Biophys J* 2008; 94(5):1754-1765.

151. Wolk K, Witte E, Wallace E, Docke WD, Kunz S, Asadullah K, *et al.* IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial

defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: a potential role in psoriasis. *Eur J Immunol* 2006; 36(5):1309-1323.

152. Wolk K, Witte E, Witte K, Warszawska K, Sabat R. Biology of interleukin-22. *Semin Immunopathol* 2010; 32(1):17-31.
153. Xu W, Presnell SR, Parrish-Novak J, Kindsvogel W, Jaspers S, Chen Z, *et al.* A soluble class II cytokine receptor, IL-22RA2, is a naturally occurring IL-22 antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(17):9511-9516.
154. Wolk K, Kunz S, Witte E, Friedrich M, Asadullah K, Sabat R. IL-22 increases the innate immunity of tissues. *Immunity* 2004; 21(2):241-254.
155. Wolk K, Haugen HS, Xu W, Witte E, Waggie K, Anderson M, *et al.* IL-22 and IL-20 are key mediators of the epidermal alterations in psoriasis while IL-17 and IFN-gamma are not. *J Mol Med (Berl)* 2009; 87(5):523-536.
156. Dumoutier L, Van RE, Colau D, Renauld JC. Human interleukin-10-related T cell-derived inducible factor: molecular cloning and functional characterization as an hepatocyte-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(18):10144-10149.
157. Aggarwal S, Xie MH, Maruoka M, Foster J, Gurney AL. Acinar cells of the pancreas are a target of interleukin-22. *J Interferon Cytokine Res* 2001; 21(12):1047-1053.
158. Lejeune D, Dumoutier L, Constantinescu S, Kruijer W, Schuringa JJ, Renauld JC. Interleukin-22 (IL-22) activates the JAK/STAT, ERK, JNK, and p38 MAP kinase pathways in a rat hepatoma cell line. Pathways that are shared with and distinct from IL-10. *J Biol Chem* 2002; 277(37):33676-33682.
159. Dumoutier L, Louahed J, Renauld JC. Cloning and characterization of IL-10-related T cell-derived inducible factor (IL-TIF), a novel cytokine structurally related to IL-10 and inducible by IL-9. *J Immunol* 2000; 164(4):1814-1819.
160. Zheng Y, Danilenko DM, Valdez P, Kasman I, Eastham-Anderson J, Wu J, *et al.* Interleukin-22, a T(H)17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis. *Nature* 2007; 445(7128):648-651.
161. Liang SC, Tan XY, Luxenberg DP, Karim R, Dunussi-Joannopoulos K, Collins M, *et al.* Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med* 2006; 203(10):2271-2279.
162. Li W, Danilenko DM, Bunting S, Ganesan R, Sa S, Ferrando R, *et al.* The serine protease marapsin is expressed in stratified squamous epithelia and is up-regulated in the hyperproliferative epidermis of psoriasis and regenerating wounds. *J Biol Chem* 2009; 284(1):218-228.
163. Nograles KE, Zaba LC, Guttman-Yassky E, Fuentes-Duculan J, Suarez-Farinas M, Cardinale I, *et al.* Th17 cytokines interleukin (IL)-17 and

IL-22 modulate distinct inflammatory and keratinocyte-response pathways. *Br J Dermatol* 2008; 159(5):1092-1102.

164. Boniface K, Bernard FX, Garcia M, Gurney AL, Lecron JC, Morel F. IL-22 inhibits epidermal differentiation and induces proinflammatory gene expression and migration of human keratinocytes. *J Immunol* 2005; 174(6):3695-3702.
165. Aujla SJ, Chan YR, Zheng M, Fei M, Askew DJ, Pociask DA, *et al.* IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. *Nat Med* 2008; 14(3):275-281.
166. Wolk K, Witte E, Hoffmann U, Doecke WD, Endesfelder S, Asadullah K, *et al.* IL-22 induces lipopolysaccharide-binding protein in hepatocytes: a potential systemic role of IL-22 in Crohn's disease. *J Immunol* 2007; 178(9):5973-5981.
167. Sugimoto K, Ogawa A, Mizoguchi E, Shimomura Y, Andoh A, Bhan AK, *et al.* IL-22 ameliorates intestinal inflammation in a mouse model of ulcerative colitis. *J Clin Invest* 2008; 118(2):534-544.
168. Eyerich S, Eyerich K, Pennino D, Carbone T, Nasorri F, Pallotta S, *et al.* Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. *J Clin Invest* 2009; 119(12):3573-3585.
169. Sonnenberg GF, Nair MG, Kirn TJ, Zaph C, Fouser LA, Artis D. Pathological versus protective functions of IL-22 in airway inflammation are regulated by IL-17A. *J Exp Med* 2010; 207(6):1293-1305.
170. Feng Z, Jiang B, Chandra J, Ghannoum M, Nelson S, Weinberg A. Human beta-defensins: differential activity against candidal species and regulation by Candida albicans. *J Dent Res* 2005; 84(5):445-450.
171. Murthy AR, Lehrer RI, Harwig SS, Miyasaki KT. In vitro candidastatic properties of the human neutrophil calprotectin complex. *J Immunol* 1993; 151(11):6291-6301.
172. Conti HR, Shen F, Nayyar N, Stocum E, Sun JN, Lindemann MJ, *et al.* Th17 cells and IL-17 receptor signaling are essential for mucosal host defense against oral candidiasis. *J Exp Med* 2009; 206(2):299-311.
173. De LA, Zelante T, D'Angelo C, Zagarella S, Fallarino F, Spreca A, *et al.* IL-22 defines a novel immune pathway of antifungal resistance. *Mucosal Immunol* 2010; 3(4):361-373.
174. Kisand K, Boe Wolff AS, Podkrajsek KT, Tserel L, Link M, Kisand KV, *et al.* Chronic mucocutaneous candidiasis in APECED or thymoma patients correlates with autoimmunity to Th17-associated cytokines. *J Exp Med* 2010; 207(2):299-308.
175. Benincasa M, Scocchi M, Pacor S, Tossi A, Nobili D, Basaglia G, *et al.* Fungicidal activity of five cathelicidin peptides against clinically isolated yeasts. *J Antimicrob Chemother* 2006; 58(5):950-959.
176. Cabras T, Longhi R, Secundo F, Nocca G, Conti S, Polonelli L, *et al.* Structural and functional characterization of the porcine proline-rich

antifungal peptide SP-B isolated from salivary gland granules. *J Pept Sci* 2008; 14(3):251-260.

177. Wang H, Xu K, Liu L, Tan JP, Chen Y, Li Y, *et al.* The efficacy of self-assembled cationic antimicrobial peptide nanoparticles against Cryptococcus neoformans for the treatment of meningitis. *Biomaterials* 2010; 31(10):2874-2881.
178. Lortholary O, Poizat G, Zeller V, Neuville S, Boibieux A, Alvarez M, *et al.* Long-term outcome of AIDS-associated cryptococcosis in the era of combination antiretroviral therapy. *AIDS* 2006; 20(17):2183-2191.
179. Laniado-Laborin R, Cabrales-Vargas MN. Amphotericin B: side effects and toxicity. *Rev Iberoam Micol* 2009; 26(4):223-227.
180. Orni-Wasserlauf R, Izkhakov E, Siegman-Igra Y, Bash E, Polacheck I, Giladi M. Fluconazole-resistant Cryptococcus neoformans isolated from an immunocompetent patient without prior exposure to fluconazole. *Clin Infect Dis* 1999; 29(6):1592-1593.
181. Mattner F, Magram J, Ferrante J, Launois P, Di PK, Behin R, *et al.* Genetically resistant mice lacking interleukin-12 are susceptible to infection with Leishmania major and mount a polarized Th2 cell response. *Eur J Immunol* 1996; 26(7):1553-1559.
182. Mohrs M, Ledermann B, Kohler G, Dorfmuller A, Gessner A, Brombacher F. Differences between IL-4- and IL-4 receptor alpha-deficient mice in chronic leishmaniasis reveal a protective role for IL-13 receptor signaling. *J Immunol* 1999; 162(12):7302-7308.
183. Kreymborg K, Etzensperger R, Dumoutier L, Haak S, Rebollo A, Buch T, *et al.* IL-22 is expressed by Th17 cells in an IL-23-dependent fashion, but not required for the development of autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2007; 179(12):8098-8104.
184. Schulz SM, Kohler G, Schutze N, Knauer J, Straubinger RK, Chackerian AA, *et al.* Protective immunity to systemic infection with attenuated Salmonella enterica serovar enteritidis in the absence of IL-12 is associated with IL-23-dependent IL-22, but not IL-17. *J Immunol* 2008; 181(11):7891-7901.
185. Jacobson ES, Ayers DJ, Harrell AC, Nicholas CC. Genetic and phenotypic characterization of capsule mutants of Cryptococcus neoformans. *J Bacteriol* 1982; 150(3):1292-1296.
186. Wang C, Kang SG, Lee J, Sun Z, Kim CH. The roles of CCR6 in migration of Th17 cells and regulation of effector T-cell balance in the gut. *Mucosal Immunol* 2009; 2(2):173-183.
187. Eyerich S, Eyerich K, Cavani A, Schmidt-Weber C. IL-17 and IL-22: siblings, not twins. *Trends Immunol* 2010; 31(9):354-361.
188. Wozniak KL, Kolls JK, Wormley FL, Jr. Depletion of neutrophils in a protective model of pulmonary cryptococcosis results in increased IL-17A production by gamma/delta T cells. *BMC Immunol* 2012; 13:65.

189. Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O'Garra A, Murphy KM. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science* 1993; 260(5107):547-549.

190. Lighvani AA, Frucht DM, Jankovic D, Yamane H, Aliberti J, Hissong BD*, et al.* T-bet is rapidly induced by interferon-gamma in lymphoid and myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(26):15137-15142.

191. Hsieh CS, Heimberger AB, Gold JS, O'Garra A, Murphy KM. Differential regulation of T helper phenotype development by interleukins 4 and 10 in an alpha beta T-cell-receptor transgenic system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89(13):6065-6069.

192. Le GG, Ben-Sasson SZ, Seder R, Finkelman FD, Paul WE. Generation of interleukin 4 (IL-4)-producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4-producing cells. *J Exp Med* 1990; 172(3):921-929.

193. Seder RA, Paul WE, Davis MM, Fazekas de St GB. The presence of interleukin 4 during in vitro priming determines the lymphokine-producing potential of CD4+ T cells from T cell receptor transgenic mice. *J Exp Med* 1992; 176(4):1091-1098.

194. Swain SL, Weinberg AD, English M, Huston G. IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. *J Immunol* 1990; 145(11):3796-3806.

195. Zhu J, Paul WE. Peripheral CD4+ T-cell differentiation regulated by networks of cytokines and transcription factors. *Immunol Rev* 2010; 238(1):247-262.

196. Infante-Duarte C, Horton HF, Byrne MC, Kamradt T. Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. *J Immunol* 2000; 165(11):6107-6115.

197. Kleinschek MA, Muller U, Schutze N, Sabat R, Straubinger RK, Blumenschein WM*, et al.* Administration of IL-23 engages innate and adaptive immune mechanisms during fungal infection. *Int Immunol* 2010; 22(2):81-90.

198. Happel KI, Zheng M, Young E, Quinton LJ, Lockhart E, Ramsay AJ*, et al.* Cutting edge: roles of Toll-like receptor 4 and IL-23 in IL-17 expression in response to Klebsiella pneumoniae infection. *J Immunol* 2003; 170(9):4432-4436.

199. Lohning M, Stroehmann A, Coyle AJ, Grogan JL, Lin S, Gutierrez-Ramos JC*, et al.* T1/ST2 is preferentially expressed on murine Th2 cells, independent of interleukin 4, interleukin 5, and interleukin 10, and important for Th2 effector function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(12):6930-6935.

200. Groom JR, Luster AD. CXCR3 in T cell function. *Exp Cell Res* 2011; 317(5):620-631.

201. Cassone A. Fungal vaccines: real progress from real challenges. *Lancet Infect Dis* 2008; 8(2):114-124.

202. Rodrigues ML, Travassos LR, Miranda KR, Franzen AJ, Rozental S, de SW*, et al.* Human antibodies against a purified glucosylceramide from

Cryptococcus neoformans inhibit cell budding and fungal growth. *Infect Immun* 2000; 68(12):7049-7060.

203. Rodrigues ML, Shi L, Barreto-Bergter E, Nimrichter L, Farias SE, Rodrigues EG, *et al.* Monoclonal antibody to fungal glucosylceramide protects mice against lethal Cryptococcus neoformans infection. *Clin Vaccine Immunol* 2007; 14(10):1372-1376.
204. Rosas AL, Nosanchuk JD, Casadevall A. Passive immunization with melanin-binding monoclonal antibodies prolongs survival of mice with lethal Cryptococcus neoformans infection. *Infect Immun* 2001; 69(5):3410-3412.
205. Rachini A, Pietrella D, Lupo P, Torosantucci A, Chiani P, Bromuro C, *et al.* An anti-beta-glucan monoclonal antibody inhibits growth and capsule formation of Cryptococcus neoformans in vitro and exerts therapeutic, anticryptococcal activity in vivo. *Infect Immun* 2007; 75(11):5085-5094.
206. Dromer F, Charreire J, Contrepois A, Carbon C, Yeni P. Protection of mice against experimental cryptococcosis by anti-Cryptococcus neoformans monoclonal antibody. *Infect Immun* 1987; 55(3):749-752.
207. Casadevall A, Cleare W, Feldmesser M, Glatman-Freedman A, Goldman DL, Kozel TR, *et al.* Characterization of a murine monoclonal antibody to Cryptococcus neoformans polysaccharide that is a candidate for human therapeutic studies. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42(6):1437-1446.
208. Bryan RA, Jiang Z, Howell RC, Morgenstern A, Bruchertseifer F, Casadevall A, *et al.* Radioimmunotherapy is more effective than antifungal treatment in experimental cryptococcal infection. *J Infect Dis* 2010; 202(4):633-637.
209. Larsen RA, Pappas PG, Perfect J, Aberg JA, Casadevall A, Cloud GA, *et al.* Phase I evaluation of the safety and pharmacokinetics of murine-derived anticryptococcal antibody 18B7 in subjects with treated cryptococcal meningitis. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49(3):952-958.
210. Kawakami K, Tohyama M, Xie Q, Saito A. IL-12 protects mice against pulmonary and disseminated infection caused by Cryptococcus neoformans. *Clin Exp Immunol* 1996; 104(2):208-214.
211. Kawakami K, Koguchi Y, Qureshi MH, Miyazato A, Yara S, Kinjo Y, *et al.* IL-18 contributes to host resistance against infection with Cryptococcus neoformans in mice with defective IL-12 synthesis through induction of IFN-gamma production by NK cells. *J Immunol* 2000; 165(2):941-947.
212. Zhang T, Kawakami K, Qureshi MH, Okamura H, Kurimoto M, Saito A. 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* 1997; 65(9):3594-3599.

213. Kawakami K, Qureshi MH, Koguchi Y, Zhang T, Okamura H, Kurimoto M, *et al.* Role of TNF-alpha in the induction of fungicidal activity of mouse peritoneal exudate cells against Cryptococcus neoformans by IL-12 and IL-18. *Cell Immunol* 1999; 193(1):9-16.

214. Collins HL, Bancroft GJ. Cytokine enhancement of complement-dependent phagocytosis by macrophages: synergy of tumor necrosis factor-alpha and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for phagocytosis of Cryptococcus neoformans. *Eur J Immunol* 1992; 22(6):1447-1454.

215. Zhou Q, Gault RA, Kozel TR, Murphy WJ. Immunomodulation with CD40 stimulation and interleukin-2 protects mice from disseminated cryptococcosis. *Infect Immun* 2006; 74(4):2161-2168.

216. Zhou Q, Gault RA, Kozel TR, Murphy WJ. Protection from direct cerebral cryptococcus infection by interferon-gamma-dependent activation of microglial cells. *J Immunol* 2007; 178(9):5753-5761.

217. Siddiqui AA, Brouwer AE, Wuthiekanun V, Jaffar S, Shattock R, Irving D, *et al.* IFN-gamma at the site of infection determines rate of clearance of infection in cryptococcal meningitis. *J Immunol* 2005; 174(3):1746-1750.

218. Pappas PG, Bustamante B, Ticona E, Hamill RJ, Johnson PC, Reboli A, *et al.* Recombinant interferon- gamma 1b as adjunctive therapy for AIDS-related acute cryptococcal meningitis. *J Infect Dis* 2004; 189(12):2185-2191.

219. Schiller JH, Pugh M, Kirkwood JM, Karp D, Larson M, Borden E. Eastern cooperative group trial of interferon gamma in metastatic melanoma: an innovative study design. *Clin Cancer Res* 1996; 2(1):29-36.

220. Piehler D, Stenzel W, Grahnert A, Held J, Richter L, Kohler G, *et al.* Eosinophils contribute to IL-4 production and shape the T-helper cytokine profile and inflammatory response in pulmonary cryptococcosis. *Am J Pathol* 2011; 179(2):733-744.

221. Leakey AK, Ulett GC, Hirst RG. BALB/c and C57BL/6 mice infected with virulent Burkholderia pseudomallei provide contrasting animal models for the acute and chronic forms of human melioidosis. *Microb Pathog* 1998; 24(5):269-275.

222. Cheers C, Haigh AM, Kelso A, Metcalf D, Stanley ER, Young AM. Production of colony-stimulating factors (CSFs) during infection: separate determinations of macrophage-, granulocyte-, granulocyte-macrophage-, and multi-CSFs. *Infect Immun* 1988; 56(1):247-251.

223. Heinzel FP, Rerko RM, Hujer AM. Underproduction of interleukin-12 in susceptible mice during progressive leishmaniasis is due to decreased CD40 activity. *Cell Immunol* 1998; 184(2):129-142.

224. Scharton TM, Scott P. Natural killer cells are a source of interferon gamma that drives differentiation of CD4+ T cell subsets and induces early

resistance to Leishmania major in mice. *J Exp Med* 1993; 178(2):567-577.

225. Autenrieth IB, Beer M, Bohn E, Kaufmann SH, Heesemann J. Immune responses to Yersinia enterocolitica in susceptible BALB/c and resistant C57BL/6 mice: an essential role for gamma interferon. *Infect Immun* 1994; 62(6):2590-2599.
226. Bohn E, Heesemann J, Ehlers S, Autenrieth IB. Early gamma interferon mRNA expression is associated with resistance of mice against Yersinia enterocolitica. *Infect Immun* 1994; 62(7):3027-3032.
227. Appelberg R, Castro AG, Pedrosa J, Silva RA, Orme IM, Minoprio P. Role of gamma interferon and tumor necrosis factor alpha during T-cell-independent and -dependent phases of Mycobacterium avium infection. *Infect Immun* 1994; 62(9):3962-3971.
228. Brett SJ, Butler R. Resistance to Mycobacterium lepraemurium is correlated with the capacity to generate macrophage activating factor(s) in response to mycobacterial antigens in vitro. *Immunology* 1986; 59(3):339-345.
229. Watanabe H, Numata K, Ito T, Takagi K, Matsukawa A. Innate immune response in Th1- and Th2-dominant mouse strains. *Shock* 2004; 22(5):460-466.
230. Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol* 2000; 164(12):6166-6173.
231. Kuroda E, Kito T, Yamashita U. Reduced expression of STAT4 and IFN-gamma in macrophages from BALB/c mice. *J Immunol* 2002; 168(11):5477-5482.
232. Kuroda E, Yamashita U. Mechanisms of enhanced macrophage-mediated prostaglandin E2 production and its suppressive role in Th1 activation in Th2-dominant BALB/c mice. *J Immunol* 2003; 170(2):757-764.
233. Ley K, Smith E, Stark MA. IL-17A-producing neutrophil-regulatory Tn lymphocytes. *Immunol Res* 2006; 34(3):229-242.
234. Linden A, Laan M, Anderson GP. Neutrophils, interleukin-17A and lung disease. *Eur Respir J* 2005; 25(1):159-172.
235. Witowski J, Pawlaczyk K, Breborowicz A, Scheuren A, Kuzlan-Pawlaczyk M, Wisniewska J, *et al.* IL-17 stimulates intraperitoneal neutrophil infiltration through the release of GRO alpha chemokine from mesothelial cells. *J Immunol* 2000; 165(10):5814-5821.
236. Mednick AJ, Feldmesser M, Rivera J, Casadevall A. Neutropenia alters lung cytokine production in mice and reduces their susceptibility to pulmonary cryptococcosis. *Eur J Immunol* 2003; 33(6):1744-1753.
237. Burg ND, Pillinger MH. The neutrophil: function and regulation in innate and humoral immunity. *Clin Immunol* 2001; 99(1):7-17.
238. Basset C, Holton J, O'Mahony R, Roitt I. Innate immunity and pathogen-host interaction. *Vaccine* 2003; 21 Suppl 2:S12-S23.

239. Sjostedt A, Conlan JW, North RJ. Neutrophils are critical for host defense against primary infection with the facultative intracellular bacterium Francisella tularensis in mice and participate in defense against reinfection. *Infect Immun* 1994; 62(7):2779-2783.

240. Leal IS, Appelberg R, Silva MT. Neutrophils are involved in the non-specific resistance to listeriosis induced by mycobacterial infections. *Immunology* 1996; 89(3):442-448.

241. Conlan JW, North RJ. Neutrophils are essential for early anti-Listeria defense in the liver, but not in the spleen or peritoneal cavity, as revealed by a granulocyte-depleting monoclonal antibody. *J Exp Med* 1994; 179(1):259-268.

242. Tateda K, Moore TA, Deng JC, Newstead MW, Zeng X, Matsukawa A, *et al.* Early recruitment of neutrophils determines subsequent T1/T2 host responses in a murine model of Legionella pneumophila pneumonia. *J Immunol* 2001; 166(5):3355-3361.

243. Fulton SA, Reba SM, Martin TD, Boom WH. Neutrophil-mediated mycobacteriocidal immunity in the lung during Mycobacterium bovis BCG infection in C57BL/6 mice. *Infect Immun* 2002; 70(9):5322-5327.

244. Pedrosa J, Saunders BM, Appelberg R, Orme IM, Silva MT, Cooper AM. Neutrophils play a protective nonphagocytic role in systemic Mycobacterium tuberculosis infection of mice. *Infect Immun* 2000; 68(2):577-583.

245. Seiler P, Aichele P, Raupach B, Odermatt B, Steinhoff U, Kaufmann SH. Rapid neutrophil response controls fast-replicating intracellular bacteria but not slow-replicating Mycobacterium tuberculosis. *J Infect Dis* 2000; 181(2):671-680.

246. Conlan JW. Critical roles of neutrophils in host defense against experimental systemic infections of mice by Listeria monocytogenes, Salmonella typhimurium, and Yersinia enterocolitica. *Infect Immun* 1997; 65(2):630-635.

247. Fulurija A, Ashman RB, Papadimitriou JM. Neutrophil depletion increases susceptibility to systemic and vaginal candidiasis in mice, and reveals differences between brain and kidney in mechanisms of host resistance. *Microbiology* 1996; 142 (Pt 12):3487-3496.

248. Tacchini-Cottier F, Zweifel C, Belkaid Y, Mukankundiye C, Vasei M, Launois P, *et al.* An immunomodulatory function for neutrophils during the induction of a CD4+ Th2 response in BALB/c mice infected with Leishmania major. *J Immunol* 2000; 165(5):2628-2636.

249. Sayles PC, Johnson LL. Exacerbation of toxoplasmosis in neutrophil-depleted mice. *Nat Immun* 1996; 15(5):249-258.

250. Tumpey TM, Chen SH, Oakes JE, Lausch RN. Neutrophil-mediated suppression of virus replication after herpes simplex virus type 1 infection of the murine cornea. *J Virol* 1996; 70(2):898-904.

251. Gonzalez PH, Ponzinibbio C, Laguens RP. Effect of polymorphonuclear depletion on experimental Argentine hemorrhagic fever in guinea pigs. *J Med Virol* 1987; 22(3):289-297.

252. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, *et al.* Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 2005; 6(11):1123-1132.

253. Monticelli LA, Sonnenberg GF, Abt MC, Alenghat T, Ziegler CG, Doering TA, *et al.* Innate lymphoid cells promote lung-tissue homeostasis after infection with influenza virus. *Nat Immunol* 2011; 12(11):1045-1054.

254. Takahashi K, Hirose K, Kawashima S, Niwa Y, Wakashin H, Iwata A, *et al.* IL-22 attenuates IL-25 production by lung epithelial cells and inhibits antigen-induced eosinophilic airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 128(5):1067-1076.

255. Lo RS, Dumoutier L, Couillin I, Van VC, Yakoub Y, Uwambayinema F, *et al.* IL-17A-producing gammadelta T and Th17 lymphocytes mediate lung inflammation but not fibrosis in experimental silicosis. *J Immunol* 2010; 184(11):6367-6377.

256. Sonnenberg GF, Fouser LA, Artis D. Functional biology of the IL-22-IL-22R pathway in regulating immunity and inflammation at barrier surfaces. *Adv Immunol* 2010; 107:1-29.

257. Kurebayashi Y, Nagai S, Ikejiri A, Koyasu S. Recent advances in understanding the molecular mechanisms of the development and function of Th17 cells. *Genes Cells* 2013; 18(4):247-265.

258. Haak S, Croxford AL, Kreymborg K, Heppner FL, Pouly S, Becher B, *et al.* IL-17A and IL-17F do not contribute vitally to autoimmune neuro-inflammation in mice. *J Clin Invest* 2009; 119(1):61-69.

259. von VS, Ley K. IL-17A controls IL-17F production and maintains blood neutrophil counts in mice. *J Immunol* 2009; 183(2):865-873.

260. Rutz S, Eidenschenk C, Ouyang W. IL-22, not simply a Th17 cytokine. *Immunol Rev* 2013; 252(1):116-132.

261. Behrends J, Renauld JC, Ehlers S, Holscher C. IL-22 Is Mainly Produced by IFNgamma-Secreting Cells but Is Dispensable for Host Protection against Mycobacterium tuberculosis Infection. *PLoS One* 2013; 8(2):e57379.

262. Romani L, Fallarino F, De LA, Montagnoli C, D'Angelo C, Zelante T, *et al.* Defective tryptophan catabolism underlies inflammation in mouse chronic granulomatous disease. *Nature* 2008; 451(7175):211-215.

263. Grahnert A, Richter T, Piehler D, Eschke M, Schulze B, Muller U, *et al.* IL-4 Receptor-Alpha-Dependent Control of Cryptococcus neoformans in the Early Phase of Pulmonary Infection. *PLoS One* 2014; 9(1):e87341.

264. Muller U, Kohler G, Mossmann H, Schaub GA, Alber G, Di Santo JP, *et al.* IL-12-independent IFN-gamma production by T cells in experimental

Chagas' disease is mediated by IL-18. *J Immunol* 2001; 167(6):3346-3353.

265. Wang Y, Jiang Y, Gong T, Cui X, Li W, Feng Y, *et al.* High-level expression and novel antifungal activity of mouse beta defensin-1 mature peptide in Escherichia coli. *Appl Biochem Biotechnol* 2010; 160(1):213-221.
266. Hull CM, Heitman J. Genetics of Cryptococcus neoformans. *Annu Rev Genet* 2002; 36:557-615.
267. Pociask DA, Scheller EV, Mandalapu S, McHugh KJ, Enelow RI, Fattman CL, *et al.* IL-22 is essential for lung epithelial repair following influenza infection. *Am J Pathol* 2013; 182(4):1286-1296.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Gottfried Alber. Dabei danke ich ihm für die Bereitstellung des Themas, die Betreuung und Begutachtung der Dissertation sowie die vielzähligen Diskussionen der Ergebnisse und Ratschläge zur Optimierung meiner Arbeit. Er hatte stets ein offenes Ohr und es war mir möglich mich in seinem Team weiterzuentwickeln, eine Vielzahl von Methoden zu erlernen sowie meine Präsentation wissenschaftlicher Daten zu verbessern.

Für die Betreuung der Promotion an der Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie der Universität Leipzig sowie die Begutachtung der Dissertation gilt mein Dank Prof. Dr. Sunna Hauschildt. Ihre kompetente Hinterfragung diente mir auch schon während meiner Masterarbeit der selbstkritischen Betrachtung der erzielten Ergebnisse und immunologischen Hintergründe.

Dr. Robert Sabat und Dr. Kerstin Wolk danke ich für die Gespräche und unzähligen E-Mails, welche für die Interpretation der Ergebnisse sehr hilfreich waren. Ihrem Team danke ich für die Bearbeitung unzähliger Proben.

Herzlich danken möchte ich der gesamten Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Gottfried Alber. Eine bessere Arbeitsatmosphäre scheint nicht vorstellbar. Im einzelnen danke ich vor allem Maria Eschke, Dr. Daniel Piehler und Dr. Andreas Grahnert mit denen die intensivste Zusammenarbeit erfolgte. Außerdem möchte ich Dr. Heiner von Buttlar, Dr. habil. Uwe Müller, Dr. Martina Protschka, Anett Grohs, Petra Krumbholz, Doris Bismarck, Dr. Stefanie Fritsche und Bianca Schulze für die freundliche Kooperation danken.

Für das Korrekturlesen der Dissertation danke ich Dr. Daniel Piehler, Maria Eschke, Fanny Weinmar und Dr. Maik Drechsler.

Die Betreuung der Versuchstiere erfolgte durch die Mitarbeiter der Versuchstieranlange am Max-Planck-Institut für evolutionäre Anthropologie, insbesondere Rowina Voigtländer und Sarah Leitenroth haben sich verantwortungsvoll und verlässlich um die Pflege der Mäuse gekümmert. Ihnen möchte ich dafür speziell danken.

Die professionelle Bearbeitung und Beurteilung der histologischen Untersuchungen der Organe erfolgte unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Gabriele Köhler. Ihr und dem gesamten Team vielen Dank.

Die Bereitstellung meines Arbeitsplatzes erfolgte dankenswerterweise durch Prof. Dr. Manfred Blessing.

Dank einer Förderung der DFG (AL 371/6-1) war es mir überhaupt möglich dieses interessante Thema zu bearbeiten und mich finanziell abzusichern.

Nicht zuletzt gilt mein Dank natürlich meiner Familie. Ganz besonders möchte ich meinem Partner Jörg für seine ständige Geduld und Unterstützung danken.

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Dissertation, selbstständig ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt zu haben. Dabei wurden keine unzulässigen oder andere als die angegebenen Hilfsmittel in Anspruch genommen. Direkt oder indirekt aus fremden Quellen übernommene Informationen wurden als solche kenntlich gemacht.

Bei der geistigen Herstellung der Arbeit wurde kein Promotionsberater in Anspruch genommen. Auch wurden vom Antragsteller keine unmittelbar oder mittelbar geldwerten Leistungen an Dritte vergeben, um im Gegenzug Leistungen zu erhalten, welche mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation in Verbindung stehen.

Bislang habe ich mich keinem anderen Promotionsverfahren unterzogen. Die Dissertation wurde weder in der gegenwärtigen noch in anderer Fassung weder der Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie noch einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung vorgelegt.

Leipzig, den 15.07.2014

Tina Richter

Publikationsliste

Wissenschaftliche Veröffentlichungen

Die Publikationen wurden in Journalen mit Begutachtungs-System eingereicht veröffentlicht.

Aus der vorliegenden Arbeit sind Teilgebiete Gegenstand folgender wissenschaftlicher Veröffentlichung:

1. Grahnert A, Richter T, Piehler D, Eschke M, Schulze B, Müller U, Protschka M, Köhler G, Sabat R, Brombacher F, Alber G. IL-4 receptor-alpha-dependent control of Cryptococcus neoformans in the early phase of pulmonary infection. *PLOS ONE.* 2014; 9(1):e87341

Weitere Veröffentlichungen:

2. Allmendinger J, Paradies F, Kamprad M, Richter T, Pustowoit B, Liebert UG. Determination of rubella virus-specific cell-mediated immunity using IFN gamma-ELISpot. *Journal of Medical Virology.* 2010; 82(2):335-40
3. Piehler D, Stenzel W, Grahnert A, Held J, Richter L, Köhler G, Richter T, Eschke M, Alber G and Müller U. Eosinophils contribute to IL-4 production and shape the T helper cytokine profile and inflammatory response in pulmonary cryptococcosis. *Am. J. Pathol.* 2011; 5(3):299-310
4. Müller U, Piehler D, Stenzel W, Köhler G, Frey O, Held J, Grahnert A, Richter T, Eschke M, Kamradt T, Brombacher F, Alber G. Lack of IL-4 receptor expression on T helper cells reduces T helper 2 cell polyfunctionality and confers resistance in allergic bronchopulmonary mycosis. *Mucosal Immunol.* 2012; 5(3):299-310
5. Piehler D, Grahnert A, Eschke M, Richter T, Köhler G, Stenzel W, Alber G. T1/ST2 promotes T helper 2 cell activation and polyfunctionality in bronchopulmonary mycosis. *Mucosal Immunol.* 2012; 6(2):405-14
6. Müller U, Stenzel W, Piehler D, Grahnert A, Protschka M, Köhler G, Frey O, Held J, Eschke M, Richter T, Kamradt T, Brombacher F, Alber G. Abrogation of IL-4 receptor-alpha-dependent alternatively activated macrophages is sufficient to confer resistance against pulmonary cryptococcosis despite an ongoing Th2 response; *International Immunology.* 2013; 25(8):459-70

Poster

1) Richter T, Grahnert A, Piehler D, Eschke M, Müller U, Warszawska K, Köhler G, Sabat R, Alber G. T helper 17 cells contribute to local fungal control in lung of mice. *10th Leipzig Research Festival for Life Sciences* 2011.

2) Richter T, Grahnert A, Piehler D, Eschke M, Müller U, Warszawska K, Köhler G, Sabat R, Alber G. T helper 17 cells contribute to local fungal control in lung of mice. *The Saxon Biotechnology Symposium* 2012.

3) Richter T, Grahnert A, Piehler D, Eschke M, Müller U, Warszawska K, Köhler G, Sabat R, Alber G. T helper 17 cells contribute to local fungal control in lung of mice. *2. Infektionsmedizinisches Symposium Mitteldeutschlands* 2012.

4) Richter T, Grahnert A, Piehler D, Eschke M, Müller U, Warszawska K, Köhler G, Sabat R, Alber G. T helper 17 cells contribute to local fungal control in lung of mice. *International Meeting of the German Society for Cell Biology Molecular concepts in epithelial differentiation, pathogenesis and repair* 2012.

5) Richter T, Eschke M, Piehler D, Protschka M, Schulze B, Alber G. *Cryptococcus neoformans* exploits macrophages for its survival. *11th Leipzig Research Festival for Life Sciences* 2012.

6) Richter T, Grahnert A, Piehler D, Eschke M, Müller U, Warszawska K, Köhler G, Sabat R, Alber G. T helper 17 cells contribute to local fungal control in lung of mice. *Wissenschaftliches Symposium 10 Jahre BIO CITY LEIPZIG* 2013.

7) Richter T, Grahnert A, Eschke M, Piehler D, Bianca Schulze, Müller U, Köhler G, Wolk K, Sabat R, Alber G. Production and regulation of IL-17A and IL-22 during a fungal infection. *Nationale Forschungsplattform für Zoonosen, Junior Scientist Zoonoses Meeting* 2013.

Vorträge

1) Richter T, Piehler D, Grahnert A, Eschke M, Mueller U, Warszawsla K, Koehler G, Sabat R, Alber G. Th17 cells can compensate for Th1 deficiency in pulmonary cryptococcosis. *Arbeitskreis Infektions-immunologie der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, 16. Mini-symposium „Infektion und Immunabwehr“ Burg Rothenfels* 2012.

2) Richter T. Can Th17 cells compensate for Th1 deficiency in pulmonary cryptococcosis? *Gemeinsames Kolloquium des Instituts für Immunologie der Veterinärmedizinischen Fakultät, Universität Leipzig und des Instituts für Immunologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena* 2012.

3) Richter T. Can Th17 cells compensate for Th1 deficiency in pulmonary cryptococcosis? *Doktoranden-Kolloquium des BBZ, Universität Leipzig* 2013.