

Aus dem Institut/der Klinik für Neuropathologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die differenzielle Rolle von Makrophagen und Mikroglia im  
Kontext der murinen Kryptokokkose

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Michael Meisen

aus Berlin

Datum der Promotion: 30.05.2015

## **Abstrakt (deutsch):**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die durch den opportunistischen Pilz *Cryptococcus neoformans* verursachte Krankheit, die Kryptokokkose untersucht. Hierzu wurde ein murines Infektionsmodell verwendet, bei dem analog zur humanen Situation, die Erkrankung durch Inhalation provoziert wurde. Daraufhin kam es sofort zu einem Befall der Lungen und binnen 60 Tagen zu einer zentralnervösen Kryptokokkose.

Im Detail wurde vor allem das zelluläre Entzündungsinfiltrat in beiden Organsystemen untersucht. Hierbei wurde ein Augenmerk auf Makrophagen, Mikrogliazellen und CD4<sup>+</sup> Lymphozyten, als auch deren immunologische, funktionelle und molekulare Phänotypen gelegt. Auch die zu den verschiedenen Zeitpunkten vorherrschenden Immunphänotypen im Sinne einer T-Helferzellen-1/T-Helferzellen-2 (TH1/TH2) Antwort und der klassischen Makrophagenaktivierung (M1) sowie der alternativen Makrophagenaktivierung (M2) wurden beleuchtet.

Es zeigte sich, dass als Reaktion auf die Infektion in der Lunge großvolumige Makrophagen auftraten, die initial einen prädominant M2-, im Verlauf simultan auftretende distinkte M1- und M2-Phänotypen aufwiesen. Auf dem Höhepunkt der Infektion traten auch pulmonale Riesenzellen mit einem polyfunktionalen M1/M2-Phänotyp auf.

Diese morphologischen Beobachtungen ließen sich mittels qPCR auch auf mRNA Ebene untermauern: Es zeigte sich eine simultane Expression von Markern der TH1- und TH2-Stimulation, die jedoch zu distinkter M1- bzw. M2-Polarisierung der Makrophagenpopulationen führte.

Im Gehirn verlief die Infektion deutlich anders. Es zeigten sich differente Läsionstypen, von denen nur meningeale und granulomatöse Läsionen großvolumige Makrophagen als Reaktion auf die Infektion aufwiesen. Diese Zellen zeigten trotz morphologischer Ähnlichkeit zu den großvolumigen Makrophagen der Lunge lediglich eine Immunreaktivität für Marker der M2-Polarisierung. Marker der M1-Polarisierung, als auch Riesenzellen konnten im ZNS nicht beobachtet werden.

Dies deckt sich mit den Ergebnissen auf mRNA Ebene: Hier zeigte sich ein schwacher TH2-Phänotyp, jedoch eine kräftige Expression der M2-Polarisationsmarker. Ein TH1-

Phänotyp wurde nur sehr schwach ausgebildet und Marker der M1-Polarisierung wurden nicht reguliert.

In dieser Arbeit zeigte sich ebenfalls, dass die Rolle der Arginase-1, als *bis dato* paradigmatischer M2-Polarisationsmarker eine spezifische Rolle zuteil wird. Ausschließlich residentelle Makrophagen der Lunge und des ZNS exprimierten Arginase-1, nicht jedoch großvolumige Makrophagen des ZNS oder der Lunge, die CD206 als Marker der M2-Polarisierung exprimierten. Wir beschreiben somit neue Daten zur Charakterisierung spezifischer Moleküle der Aktivierung von Makrophagen und Mikrogliazellen in verschiedenen Lokalisationen.

Zusammenfassend kann somit geschlossen werden, dass es distinkte Unterschiede der Immunantwort zwischen den infizierten Lungen und Gehirnen gibt, die zudem vom untersuchten Zeitpunkt der Infektion abhängen.

Die Lunge zeigte einen kräftigen M1/TH1-, als auch einen kräftigen M2/TH2-Phänotyp. Die Immunzellen des Gehirns zeigten lediglich einen subtilen TH2-Phänotyp und eine kräftige Expression von Molekülen der M2-Polarisation.

## **Abstract (english):**

In the present work, cryptococcosis, a disease caused by an opportunistic fungus, was investigated. Therefore a murine model of aerogenically induced cryptococcosis was used. Within 60 days of the infection lung- and subsequent CNS cryptococcosis was established.

Focusing on the inflammatory cell response within the above mentioned organs microglial cells, macrophages and CD4<sup>+</sup> lymphocytes and their functional, molecular and morphological phenotype as well as classically (M1-) and alternatively activated (M2) macrophage polarization were studied.

It was shown that as a reaction to the infection, large foamy macrophages, besides the resident alveolar macrophages, appeared in the lungs. They initially displayed a predominantly M2-phenotype, which eventually turned into distinct but simultaneously present M1- and M2-phenotypes. As the infection reached its climax, multinucleated giant cells, showing a polyfunctional M1/M2-phenotype, were detectable in the lungs. Accordingly, qPCR delivered corroborative results showing a concomitant increase of molecules of the TH1- and TH2-stimulation, however leading to a distinct M1- and M2-polarisation of macrophages.

The CNS pathology differed substantially. Three different lesion types were identified, of which only the meningeal and the granulomatous lesions contained large foamy macrophages. Although morphologically resembling the foamy macrophages from the lungs, their immunological phenotype differed profoundly. They only showed an immune reactivity for molecules associated with M2-polarization but not with M1-polarization. Multinucleated giant cells were absent.

These findings were consistent with the mRNA results, showing only a mild regulation of TH2-makers, a strong expression of M2-molecules but no substantial TH1/M1-phenotype.

Interestingly the role of arginase-1 in the context of macrophage polarization was further elucidated insofar as up to now arginase-1 was identified as a general and paradigmatic marker for M2-polarization. In the present work, exclusively resident macrophages of

the lung and the brain showed immune reactivity for arginase-1. Foamy macrophages were only immune reactive for CD206 a marker of M2-polarization but not for arginase-1. Hence arginase-1 seems to have a very distinct and so far elusive role in the context of macrophage polarization.

In summary, it was shown, that there are distinct differences of the immune response between the infected lungs and brains concerning the involved immune cells and their functional, morphological and molecular phenotype, additionally depending on the investigated time point.

In the lungs, there was a simultaneous increase of markers of TH1/M1- and TH2/M2-polarization, starting with an initial M2-phenotype. Immune cells of the CNS on the other hand only developed a subtle TH2-, a strong M2- but no TH1/M1-phenotype.

## Abkürzungsverzeichnis:

### **A**

AIDS	= erworbenes Immundefizienzsyndrom (englisch: Acquired immunodeficiency syndrome)
APC	= antigenpräsentierende Zelle
Arg-1	= Arginase-1

### **B**

BSA	= bovines Serumalbumin
-----	------------------------

### **C**

CD	= Moleküle der Zelloberflächendifferenzierung englisch: cluster of differentiation)
CDC	= Zentren für Krankheitskontrolle und Prävention (englisch: Centers for Disease Control and Prevention)
CFU	= koloniebildende Einheit (englisch: colony forming unit)
<i>C. g.</i>	= <i>Cryptococcus gattii</i>
<i>C. n.</i>	= <i>Cryptococcus neoformans</i>
COX-2	= Cyklooxygenase-2
Ct	= Schwellenzyklus (englisch: cycle of threshold)

### **D**

DAP12	= DNAX Aktivatorprotein 12 (TYROBP)
dpi	= Tage <i>post infectionem</i> (englisch: days post infection)

### **F**

FACS	= Durchflusszytometrie (englisch: fluorescence-activated cell sorting)
FCS	= fetales Kälberserum
FEM	= Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin
FSC	= Vorwärtstreulicht (englisch: forward scatter)

### **H**

HBSS	= Hanks gepufferte Salzlösung
H&E	= Hämatoxilin & Eosin
HIV	= Humaner Immundefizienz Virus
<i>Hprt</i>	= Hypoxanthinguaninphosphoribosyltransferase
HRP	= Meerrettichperoxidase (englisch: horseradish peroxidase)

### **I**

IFN- $\gamma$	= Interferon- $\gamma$
Ig	= Immunglobulin
IL	= Interleukin
IL-4R	= Interleukin-4 Rezeptor
iNOS	= induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
i.p.	= intraperitoneal
IRF-5	= Interferon Regulationsfaktor-5

### **K**

KLF	= Krüppel-like Faktor
-----	-----------------------

## L

LPS = Lipopolysaccharide

## M

MHC = Haupthistokompatibilitätskomplex (englisch: major histocompatibility complex)

MPS = mononukleär-phagozytäres Systems

MW = Mittelwert

## N

Naiv = nicht infiziert

n.b. = nicht berechenbar

NFκB = nukleärer Faktor ‚kappa Leichtkettenverstärker‘ von aktivierten B-Zellen (englisch: nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells)

NK-Zellen = natürlichen Killerzellen

## P

PAS = Perjodsäure-Schiff Reaktion

PBS = gepufferte Salzlösung (englisch: phosphate buffered saline)

PCR = Polymerasekettenreaktion

p.i. = *post infectionem*

PPAR = peroxisomale Proliferator-Aktivator Rezeptor (englisch: peroxisome proliferator-activated receptor)

## Q

qPCR = quantitative *Real-Time* PCR

## R

ROS = reaktive Sauerstoffspezies

RQ = relative Quantität (englisch: relative quantity)

## S

SEM = Standardfehler des Mittelwertes (englisch: standard error of the mean)

SOCS = Zytokinsuppressorprotein (englisch: suppressor of cytokine signaling)

SSC = Seitwärtsstreulicht (englisch: sideward scatter)

STAT = Signaltransduktionsmolekül (englisch: signal transducer and activator of transcription)

## T

TAM = tumor-assoziierte Makrophagen

TfH = folliculäre T-Helferzelle

TH-Zelle = T-Helferzelle

TLR = „Toll-like“ Rezeptor

TNF-α = Tumornekrosefaktor-α

T<sub>reg</sub> = regulatorische T-Zelle

TREM2 = auf myeloischen Zellen exprimierter auslösender Rezeptor 2 (englisch: Triggering receptor expressed on myeloid cells 2)

## Z

ZNS = zentrales Nervensystem

<b>1.</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>10</b>
1.1	<i>Cryptococcus neoformans</i> und die pulmonale Kryptokokkose.....	10
1.2	Pathologie und Relevanz der zerebralen Kryptokokkose.....	11
1.3	Das menschliche Immunsystem.....	13
1.4	Das Konzept der TH1/TH2 Antwort.....	13
1.5	Konzepte der Makrophagenpolarisierung und –aktivierung.....	15
1.6	Molekulare Mechanismen der Makrophagenpolarisierung und –aktivierung.....	18
1.7	Die Bedeutung des adaptiven Immunsystems für die Kryptokokkose.....	19
1.8	Die Rolle von Makrophagen im Rahmen der Kryptokokkose.....	20
1.8.1	Vor- und nachteilige Eigenschaften von polarisierten Makrophagen.....	20
1.8.2	Makrophagenabhängige und –unabhängige Mechanismen der ZNS Invasion durch <i>C. n.</i> .....	21
1.9	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit.....	23
<b>2.</b>	<b>METHODEN.....</b>	<b>25</b>
2.1	Mäuse und Infektionsmodell.....	25
2.1.1	Mäuse.....	25
2.1.2	Modell.....	25
2.1.3	Kryptokokkenzucht und Herstellung der Infektionslösung.....	25
2.1.4	Infektion.....	25
2.1.5	Infektionskontrolle und –verlauf.....	26
2.2	Histologie.....	26
2.2.1	Gewebebegewinnung.....	26
2.2.2	Hämatoxilin & Eosin (H&E) Färbung.....	27
2.2.3	Immunhistochemie.....	27
2.2.4	Perjodsäure-Schiff Reaktion (PAS Färbung).....	27
2.2.5	Immunfluoreszenz.....	28
2.3	Immunologische Techniken.....	28
2.3.1	Isolation pulmonaler Leukozyten.....	28
2.3.2	Isolation zerebraler Leukozyten.....	30
2.3.2	Durchflusszytometrie.....	31
2.3.3	RNA Extraktion.....	32
2.3.4	Quantitative <i>Real-Time</i> PCR.....	33
2.4	Statistik.....	36
<b>3.</b>	<b>MATERIAL.....</b>	<b>37</b>
3.1	Allgemeine Chemikalien.....	37
3.2	Zellkulturreagenzien.....	37
3.3	Laborausrüstung.....	38
3.4	Reagenzien für die Histologie.....	38
3.5	Antikörper.....	38



3.6	Kommerzielle Kits .....	39
<b>4.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>40</b>
4.1	Klinischer Verlauf der murinen Kryptokokkose .....	41
4.2	Quantifizierung des pulmonalen Pilzbefalles .....	41
4.3	Histopathologische Studie der pulmonalen Kryptokokkose .....	42
4.4	Morphologische und funktionelle Charakterisierung der Entzündungsreaktion der pulmonalen Kryptokokkose mittels Immunhistochemie .....	53
4.5	Durchflusszytometrische Charakterisierung pulmonaler Leukozyten .....	69
4.5.1	Bestimmung pulmonaler Leukozyten .....	71
4.5.2	Bestimmung pulmonaler Makrophagen .....	72
4.5.3	Analyse der IL-4R $\alpha$ Expression auf pulmonalen Makrophagen nach Infektion mit <i>C. n.</i> ..	73
4.5.4	Bestimmung pulmonaler CD4 <sup>+</sup> Lymphozyten .....	76
4.5.5	Analyse der IL-4R $\alpha$ Expression auf pulmonalen CD4 <sup>+</sup> Lymphozyten .....	77
4.6	Charakterisierung der pulmonalen Entzündungsreaktion auf molekularer Ebene .....	81
4.6.1	Quantifizierung molekularer Marker der pulmonalen TH1/M1-Polarisierung .....	81
4.6.2	Quantifizierung molekularer Marker der pulmonalen TH2/M2-Polarisierung .....	85
4.6.3	Quantifizierung molekularer Marker der Makrophagenfusion in der Lunge .....	89
4.7	Quantifizierung des zerebralen Pilzbefalles .....	92
4.8	Neuropathologische Charakterisierung der zerebralen Kryptokokkose .....	93
4.9	Funktionelle Charakterisierung der Entzündungsreaktion der zerebralen Kryptokokkose mittels Immunhistochemie .....	101
4.10	Durchflusszytometrische Untersuchung zerebraler Leukozyten .....	112
4.10.1	Bestimmung zerebraler Leukozyten .....	113
4.10.2	Bestimmung zerebraler Makrophagen .....	114
4.10.3	Analyse der IL-4R $\alpha$ Expression auf pulmonalen Makrophagen bei <i>C. n.</i> Infektion .....	115
4.10.4	Bestimmung von Mikrogliazellen .....	118
4.10.5	Analyse der IL-4R $\alpha$ Expression auf Mikrogliazellen bei <i>C. n.</i> Infektion .....	119
4.11	Charakterisierung der zerebralen Entzündungsreaktion auf molekularer Ebene .....	122
4.11.1	Quantifizierung molekularer Marker der zerebralen TH1/M1-Polarisierung .....	122
4.11.2	Quantifizierung molekularer Marker der zerebralen TH2/M2-Polarisierung .....	126
4.11.3	Quantifizierung molekularer Marker der zerebralen Makrophagenfusion .....	130
<b>5.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>133</b>
5.1	Gibt es eine zeitabhängige und organspezifische TH1/M1- und TH2/M2-Antwort im Kontext der Kryptokokkose? .....	133
5.2	Morphologische, funktionelle und molekulare Charakteristika von Makrophagen des ZNS im Vergleich zu pulmonalen Makrophagen in Abhängigkeit vom Untersuchungszeitpunkt .....	137
5.3	Bilden Makrophagen im Kontext der pulmonalen Kryptokokkose in Abhängigkeit zum Zeitpunkt der Infektion polyfunktionale Phänotypen aus? .....	144
5.4	Findet eine Riesenzellformation im Kontext des murinen Kryptokokkose Modells in Abhängigkeit zum Zeitpunkt der Infektion und zum infizierten Organ statt? .....	146

5.5 Ausblick zur Theorie des zerebralen „sensings“ – dendritische Zellen als Schaltstellen der zerebralen Immunantwort.....	152
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>154</b>
<b>7. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG .....</b>	<b>162</b>

## 1. Einleitung

### 1.1 *Cryptococcus neoformans* und die pulmonale Kryptokokkose

Die Gattung *Cryptococcus* beinhaltet 39 heterobasidiomycete Pilzspezies. Diese werden als Knospungshefen bezeichnet und weisen eine variabel ausgebildete schleimhaltige Bekapselung auf. Nur die Vertreter *Cryptococcus gattii* (*C. g.*) und *Cryptococcus neoformans* (*C. n.*) gelten im Allgemeinen als humanpathogen und als Verursacher der Kryptokokkose des Menschen [2].

Das Eindringen in den Organismus wird durch Inhalation von „Ausbreitungseinheiten“, den sogenannten Diasporen, verursacht. Weltweit sind diese nahezu ubiquitär verbreitet und entstammen dem Erdreich oder werden von Vögeln, insbesondere Tauben, und deren Kot verbreitet [3]. *C. n.* kann auch lokale Infektionen der Haut, der Augen und anderer Organe verursachen. In aller Regel ist jedoch die Lunge das Portal zur Infiltration des menschlichen Organismus und gleichzeitig auch Ort der initialen Besiedlung durch *C. n.*. Nach Eindringen in den Organismus lagern sich die Pilze in den Primärlymphknoten ab. Immunkompetente Individuen entwickeln in der Regel keine oder nur geringe Symptome einer Infektion mit *C. n.*, was darauf hindeutet, dass sie in der Lage sind, die Infektion erfolgreich zu bekämpfen oder zu kontrollieren [2].

Nichtsdestotrotz verbleiben einige Hefen in einem „schlafenden Stadium“ (engl.: 'dormant state'), in den Primärlymphknoten [4, 5]. Die „schlafenden“ Hefen werden reaktiviert, sobald es zu einer Änderung des Immunstatus des Wirtes kommt. Hierzu zählen beispielsweise die iatrogene medikamentöse Immunsupprimierung im Rahmen der Therapie von Tumorerkrankungen, Transplantationen, Erkrankungen des Knochenmarkes oder der Übertritt in das Stadium der erworbenen Immundefizienz (AIDS), nach Infektion mit dem Humanen Immundefizienz Virus (HIV). Die reaktivierten Pilze verursachen initial eine pulmonale Kryptokokkose, können im weiteren Verlauf jedoch in nahezu alle Organe des Körpers disseminieren. Dabei zeigen sie eine Präferenz für das zentrale Nervensystem.

Auf diesem Wege entwickeln die Patienten schwere Meningoenzephalitiden, die unbehandelt in der Regel letal verlaufen [2].

Zwar ist *C. n.* präferenzzieller Verursacher der Kryptokokkose bei immunsupprimierten Patienten, doch auch immunkompetente Menschen können an Kryptokokkose erkranken. Hierbei handelt es sich zumeist um *C. g.* als verursachenden Erreger. Dieser

galt bis vor wenigen Jahren als endemisch in tropischen und subtropischen Regionen. Seit 1999 häufen sich die Fälle der durch *C. g.* verursachten Kryptokokkose bei immunkompetenten Menschen auf Vancouver Island, bekannt als „Vancouver Island Outbreak“ [6]. Im weiteren Verlauf erreichte diese durch *C. g.* verursachte Epidemie sowohl das Festland British Columbias, als auch Teile des pazifischen Nordwestens der USA [7].

## **1.2 Pathologie und Relevanz der zerebralen Kryptokokkose**

Der genaue Mechanismus der Infiltration des zentralen Nervensystems durch *C. n.* ist bis heute Gegenstand wissenschaftlicher Forschung. Es gibt jedoch bereits fundiertes neuropathologisches Wissen über die verschiedenen Ausprägungsformen der zerebralen Kryptokokkose.

Prinzipiell sind zwei grundlegende klinische Erscheinungsbilder zu unterscheiden, die teils auch kombiniert auftreten können. Hierbei handelt es sich um die Kryptokokkenenzephalitis und die Kryptokokkenmeningitis.

Nach der Dissemination von *C. n.* ins zentrale Nervensystem (ZNS) kann sich eine Enzephalitis entwickeln, deren histomorphologische Korrelate intraparenchymatöse Läsionen variabler Ausprägung sind. Das Spektrum reicht hierbei von kleinen, attenuiert erscheinenden Läsionen bis hin zu mehrschichtigen Granulomen von enormer Größe.

Andererseits kann sich eine Meningitis entwickeln, deren histomorphologische Korrelate wiederum längliche, den Meningen folgende, extraparenchymatöse Läsionen sind. Da diese Läsionen in der Lage sind, das umliegende Parenchym zu infiltrieren, kann sich eine kombinierte Meningoenzephalitis entwickeln [8]. Die Abbildung 1 illustriert immunhistochemische Färbungen einer akuten humanen ZNS Kryptokokkose eines AIDS Patienten aus dem Institut für Neuropathologie der Charité Berlin.

Gerade im Kontext von HIV Infektionen kommt es aufgrund der schweren Immundefizienz häufig zur Dissemination von *C. n.* und somit auch zur zerebralen Kryptokokkose. Aus diesem Grund zählen die amerikanischen Zentren für Krankheitskontrolle und Prävention („Centers for Disease Control and Prevention“, kurz: CDC) die extrapulmonale Kryptokokkose bereits seit 1987 zur Gruppe der sogenannten AIDS-definierenden Krankheiten [9]. Mehr als ein Viertel Jahrhundert später sind die therapeutischen Optionen noch immer limitiert und meist nicht zufriedenstellend,

weshalb die Kryptokokkenmeningitis weiterhin eine gefürchtete Komplikation bei HIV<sup>+</sup> Patienten darstellt. Eine aktuelle epidemiologische Studie schätzt die Inzidenz der HIV assoziierten Kryptokokkenmeningitiden weltweit auf fast 1.000.000 Fälle pro Jahr und die damit einhergehenden Todesfälle auf über 600.000 pro Jahr [10]. Die Zahl der Todesfälle durch Kryptokokkenmeningitiden übersteigt sogar die im Jahr 2002 weltweit geschätzten tuberkuloseassoziierten Todesfälle [11].

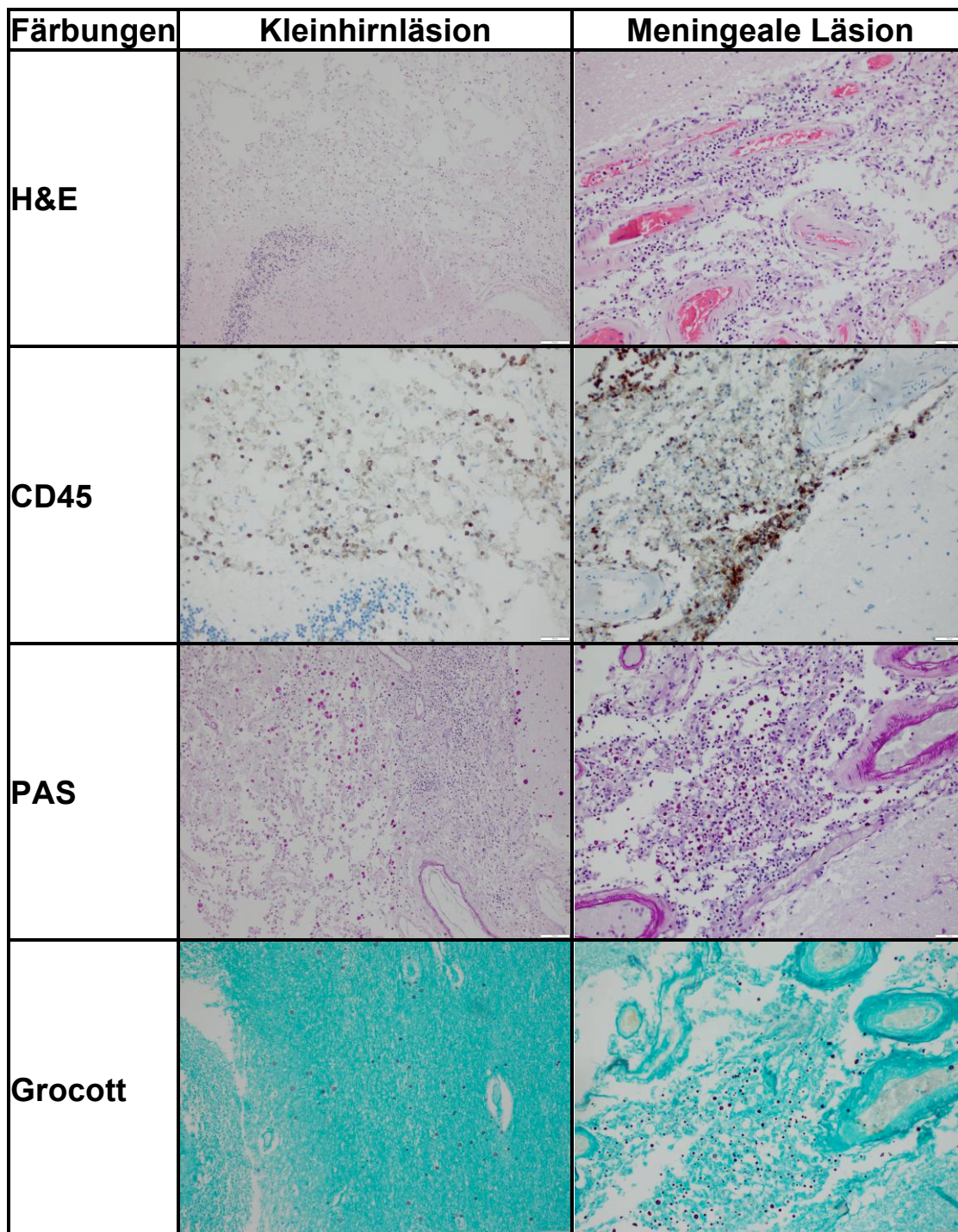


Abbildung 1: Immunhistochemische Färbungen eines humanen Gehirns mit ZNS Kryptokokkose aus dem Institut für Neuropathologie der Charité Berlin. Vergrößerung 200x

### **1.3 Das menschliche Immunsystem**

Das Immunsystem des menschlichen Körpers dient als Verteidigungsmechanismus gegen Pathogene aller Art, exogener oder endogener Herkunft. Dabei werden grundlegend zwei Arme des Immunsystems unterschieden: Die angeborene, unspezifische Immunantwort und die adaptive, erworbene Immunantwort. Im Folgenden sollen ganz knapp die wesentlichen Grundlagen, die für die vorliegende Arbeit von Relevanz sind, erwähnt werden.

Das angeborene Immunsystem dient, nachdem Erreger die ersten physiologischen Barrieren wie z.B. Epithelien überschritten haben, als sogenannte zweite „Verteidigungslinie“. Es besteht einerseits aus humoralen Elementen, wie z.B. den Proteinen des Komplement-Systems. Andererseits besteht es aus zellulären Elementen, im Wesentlichen z.B. aus Granulozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen (DCs) und natürlichen Killerzellen (NK-Zellen).

Diese sind in der Lage pathogen-assoziierte molekulare Muster anhand einer Vielzahl von membranständigen Mustererkennungsrezeptoren zu identifizieren. Bestimmte Muster körperfremder Erreger, wie beispielsweise Lipopolysaccharide (LPS), werden mithilfe von Rezeptoren wie den „Toll-like“ Rezeptoren (TLRs) erkannt. Körpereigene kernhaltige Zellen werden durch die Expression der Klasse I Rezeptoren des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC class I) erkannt. Die Klasse II des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC class II) dient der Präsentation von prozessierten Antigenen durch professionelle antigenpräsentierende Zellen (APCs), wie Makrophagen, B-Zellen und dendritischen Zellen. Diese stellen die Verbindung zwischen angeborener und erworbener Immunität dar. Die durch MHC class II Rezeptoren auf APCs präsentierten Antigene werden mittels T-Zell-Rezeptoren durch T-Helferzellen (TH Zellen), die das Oberflächenprotein 4 (CD4<sup>+</sup>, englisch: cluster of differentiation) tragen, erkannt. Diese regen einerseits B-Zellen zur spezifischen Antikörperproduktion an und sezernieren andererseits Zytokine, die weitere Immunzellen wie Makrophagen stimulieren [12].

### **1.4 Das Konzept der TH1/TH2 Antwort**

CD4<sup>+</sup> Lymphozyten mit ihrem T-Zellrezeptor stellen eine wichtige Schaltstelle der erregerabhängigen Immunantwort dar. Bereits in den 1980er Jahren definierten

Mosmann et al. [13] entsprechend ihres Zytokinprofils, zwei Subpopulationen von TH Zellen: TH1 und TH2 Zellen.

Im Verlauf der letzten Jahrzehnte wurden über die TH1 und TH2 Zellen hinaus weitere T-Zellpopulationen entdeckt. Hierzu zählen mitunter regulatorische T Zellen ( $T_{reg}$ ), TH9, TH17, TH22 und folliculäre TH Zellen (T<sub>fh</sub>) [14].

Anhand von Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass TH1 und TH2 Zellen spezifische Zytokine sezernieren. Diese Zytokine wirken als autokrine Wachstums- und Differenzierungsfaktoren und bewirken zum anderen die Differenzierung naiver TH0-Zellen hin zur jeweiligen TH Polarisation [15].

Darüber hinaus gibt es Querverbindungen der beiden dichotom erscheinenden TH1 und TH2 Immunantworten, wodurch eine gegenseitige Beeinflussung und Regulation stattfindet. Auf diese Weise wird eine gewisse Balancierung der Immunantwort gewährleistet [16].

Im Folgenden werden kurz grundsätzliche Mechanismen der TH1/TH2 Immunologie dargestellt:

Der Kontakt mit intrazellulären Parasiten, Bakterien und Viren durch neutrophile Granulozyten und APCs führt zur Produktion von Interleukin 12 (IL-12). IL-12 gilt als einer der stärksten Induktoren der TH1 Antwort und führt zur Polarisierung naiver TH0 Zellen zu TH1 Zellen. Darüberberhinaus werden NK-Zellen stimuliert, was zur Produktion von Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) führt. Außerdem werden CD8<sup>+</sup> zytotoxische Lymphozyten aktiviert, und Makrophagen nehmen einen mikrobiziden bzw. „Pathogen-zerstörenden“, sogenannten „klassischen“ (M1-) Phänotyp an. Charakteristisch für diesen Phänotyp ist eine kräftige Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) durch Makrophagen [17].

Die proinflammatorische IL-12-medierte TH1 Antwort ist eine Voraussetzung für die erfolgreiche Bekämpfung verschiedenster Infektionen, wie beispielsweise von *Leishmania spp.*, *Candida albicans*, *Toxoplasma gondii*, *Salmonella enteritidis*, *Mycobacteria tuberculosis*, *Listeria monocytogenes* [18-20].

Der TH1 Antwort gegenüber steht die TH2 Antwort. Die unter dem Einfluss von IL-4 und IL-13 polarisierten TH2 Zellen produzieren Zytokine wie IL-4 (autokrin), IL-5, IL-6, IL-10, IL-11 und IL-13 (autokrin). Diese Zytokine können beispielsweise zu vermehrter

Aktivierung von B-Zellen, Mastzellen und eosinophilen Granulozyten führen. Durch aktivierte B-Zellen kommt es zu einer verstärkten Produktion von Immunglobulin E (IgE) [12, 21, 22]. Makrophagen nehmen im Rahmen der TH2 Antwort einen distinkten, sogenannten „alternativ aktivierten“ (M2-) Phänotyp an [23]. Diese Vorgänge spielen eine wichtige Rolle in der Bekämpfung von extrazellulären Parasiten, allen voran Helminthen, aber auch von (exogenen) Allergenen. Daher gelten diese Abwehrmechanismen als Hauptaufgaben der TH2 Immunantwort [24, 25].

IL-4 ist eines der wichtigsten Zytokine der TH2 Immunantwort und bedarf zur Vermittlung seiner Wirkung eines speziellen Rezeptors, dem IL-4 Rezeptor (IL-4R). Dieser Rezeptor besteht aus der IL-4R- $\alpha$  Kette und einer allgemeinen - $\gamma$ c Kette. Nach der Bindung von IL-4 an die IL-4R- $\alpha$  Kette dimerisieren die beiden Teile und stoßen verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden an. Die Vermittlung der IL-4 typischen Wirkungen auf molekularer Ebene wird durch das Protein STAT6 (englisch: signal transducer and activator of transcription) vermittelt. STAT6 moduliert die Expression von IL-4 assoziierten Genen [26].

Mittels genetisch veränderter Mausmodelle, die entweder veränderte STAT6 Bindungsdomänen oder keine IL-4R- $\alpha$  Kette besaßen, ließ sich dieser Zusammenhang bestätigen. Diese Tiere zeigten keine Transkriptionsmodulation IL-4 assoziierter Gene [27]. Für die Vermittlung der Wirkung von IL-4 sind somit die IL-4R- $\alpha$  Kette als auch STAT6 essentiell.

### **1.5 Konzepte der Makrophagenpolarisierung und –aktivierung**

Makrophagen wurden erstmals im Jahre 1905 von Elie Metchnikoff beschrieben [28]. Mittlerweile ist bekannt, dass Makrophagen weit mehr Funktionen erfüllen, als die der reinen Immunabwehr. Sie verrichten gewebsspezifische homöostatische Aufgaben, partizipieren am Umbau von Geweben während der Ontogenese, helfen bei der Steuerung metabolischer Prozesse und übernehmen noch eine Vielzahl weiterer Funktionen [29-31].

Makrophagen erfüllen diese Vielzahl an Aufgaben durch die Ausbildung morphologisch und funktionell verschiedenster Phänotypen. Dieser Vorgang wird als Polarisierung bezeichnet. Je nach Stimulus, z. B. durch beschädigte Zellen, aktivierte Lymphozyten oder auch mikrobielle Produkte, bildet sich ein distinkter Phänotyp aus. Die beiden



Enden des Spektrums der Phänotypen werden als Vollbilder der klassischen Aktivierung (M1) bzw. alternativen Aktivierung (M2) bezeichnet. Dies verhält sich analog zur TH1 und TH2 Polarisierung von Lymphozyten [30, 32]. Zwischen M1- und M2-polarisierten Makrophagen bestehen auf morphologischer, funktioneller, als auch molekularer Ebene deutliche und krankheitsrelevante Unterschiede.

M1-polarisierte Makrophagen produzieren große Mengen an proinflammatorischen Zytokinen und ROS. Weiterhin führen sie zu einer Verstärkung der TH1 Antwort. Insgesamt zeigen sie vor allem stark mikrobizide und auch partiell tumorizide Eigenschaften [1], wobei hier noch einmal spezielle sogenannte tumor-assoziierte Makrophagen (TAMs) mit ganz eigenem Zytokinprofil existieren [33].

Die Aufgaben von M2-polarisierten Makrophagen liegen dahingegen in der Kontrolle parasitärer Erreger wie Helminthen und dem Gewebsumbau im Kontext von Reparationsprozessen. M2-Makrophagen können mittels verschiedener Mechanismen, wie der Sekretion von pro-angiogenetischen Faktoren, Induktion der Zellmigration und Invasion, als auch der Modulation der „Antitumorantwort“, zur Tumorprogression führen [34, 35]. Diese Aufgaben erfüllen sie mitunter durch eine gesteigerte phagozytotische Aktivität [36] und der Präsentation einer Vielzahl von sogenannten „scavenger“ Rezeptoren. Weiterhin produzieren sie große Mengen Ornithin und Polyamine durch das Enzym Arginase (Arg-1) [29, 32]. Da Arg-1 bei dieser Reaktion mit der M1-typischen NO-Synthase um das Substrat Arginin konkurriert, können im betroffenen Gewebe weniger ROS durch M1-Makrophagen produziert werden.

Eine weitere Eigenschaft der M2-polarisierten Makrophagen ist die Fähigkeit, in bestimmten Kontexten, wie beispielsweise der Schistosomiasis, als auch der Kryptokokkose [37], mehrkernige Riesenzellen zu bilden. Dabei handelt es sich um einen mehrstufigen Prozess, bei dem es zur IL-4 vermittelten Fusion von mehreren Makrophagen kommt [38-41]. Initiation dieses Prozesses ist die Ausbildung eines fusionskompetenten Phänotyps der Makrophagen, mittels exogener Stimulation durch IL-4 und IL-13 und durch endogene Stimulation mittels dem DNAX Aktivatorprotein 12 (DAP12; TYROBP) [42]. Dabei kommt es zur Expressionssteigerung fusionstypischer Gene, als auch zur Präsentation von membranständigen Rezeptoren, die für die Fusion notwendig sind. Einer der wichtigsten DAP12-assoziierten Rezeptoren ist in diesem Kontext der auf myeloischen Zellen exprimierte auslösende Rezeptor 2 (englisch:

triggering receptor expressed on myeloid cells 2, kurz: TREM2) [39, 42]. Zur Fusion nähern sich die fusionskompetenten Makrophagen chemotaktisch an und können dann mittels Reorganisation ihres Zytoskeletts und ihrer Membranlipide fusionieren [39].

Neben der typischerweise durch IL-4 und IL-13 vermittelten M2-Polarisierung, kann es durch Signale wie IL-10, Glukokortikoiden oder Immunkomplexen zu einer Makrophagenpolarisierung kommen, die der M2-Polarisierung ähnelt. Diese Makrophagen werden als M2-like bezeichnet und besitzen distinkt unterschiedliche Eigenschaften im Vergleich zu M2-Makrophagen. Ersichtlich wird dies anhand der Produktion unterschiedlicher Zytokine [30].

Den Wissenschaftlern Arora et al. gelang es, durch *in vitro* Versuche an Makrophagenkulturen, zu zeigen, dass Makrophagen prinzipiell in der Lage sind, einen polyfunktionalen M1/M2-Phänotyp anzunehmen, sofern sie simultan mit IL-4 und IFN- $\gamma$  stimuliert werden [43]. Es ist festzuhalten, dass die Zustände der Makrophagenpolarisierung dynamisch sind und nicht als statische Prozesse betrachtet werden können. So kann es im Verlauf eines pathologischen Prozesses zu einem Wechsel von M1- zu M2-Polarisierung kommen. Die initiale M1-Polarisierung der Makrophagen dient dabei der Initiierung und Aufrechterhaltung von Inflammation, wobei die M2-Polarisierung zur Resolution oder Chronifizierung von Inflammation führt [44]. Aktuell unklar ist jedoch, ob es sich hierbei um die *de novo* Polarisierung von makrophagozytären Vorläuferzellen oder einer Remodellierung der bereits polarisierten Makrophagen handelt. Bekannt ist, dass TH Zellen, die ebenfalls eine überraschende Flexibilität und Plastizität zeigen, bei diesem Prozess eine Schlüsselrolle einnehmen [45].

Neueste Erkenntnisse belegen die Beteiligung von polarisierten Makrophagen an einer Vielzahl von Erkrankungen. So spielen polarisierte Makrophagen bei rheumathoider Arthritis, atopischer Dermatitis, Diabetes Typ II, dem metabolischen Syndrom, Artherosklerose, chronisch venösen Ulcera, systemischem Lupus erythematoses, Asthma bronchiale und bei verschiedensten Tumoren und Lymphomen eine Rolle [1]. Es überrascht daher nicht, dass Makrophagen und der Prozess ihrer Polarisation immer häufiger Ziel gerichteter Therapien sind. Diese finden entweder aktuell Eingang in die klinische Praxis wie die therapeutische Gabe von Antikörpern gegen CCL2/CCR bei Brust- und Prostatakrebs [46, 47] oder waren mit *bis dato* unbekanntem

Wirkmechanismus bereits lange etabliert. Dies gilt beispielsweise für die bei Diabetes Typ II verwendeten Insulinsensitizer Glitazone, dessen Ziel der peroxisomale Proliferator-Aktivator Rezeptor  $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ) ist: Eine der Hauptaufgaben von PPAR- $\gamma$  ist die M2-Polarisierung von Makrophagen [48-50].

### **1.6 Molekulare Mechanismen der Makrophagenpolarisierung und –aktivierung**

Neben den bereits erwähnten funktionellen Unterschieden zeigen M1- und M2-polarisierte Makrophagen ebenfalls distinkt unterschiedliche molekulare Eigenschaften, die über verschiedene zelluläre Signalkaskaden vermittelt werden.

Die M1-Polarisation wird vor allem durch Aktivierung der TLRs beispielsweise durch LPS und über Interferone wie IFN- $\beta$  und IFN- $\gamma$  vermittelt. Dies führt zur intrazellulären Aktivierung von Schlüsselproteinen der M1-Polarisation in Makrophagen wie STAT1, dem nukleären Faktor ‚kappa Leichtkettenverstärker‘ von aktivierten B-Zellen (englisch: nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells; kurz: NF $\kappa$ B) und dem Interferon Regulationsfaktor 5 (IRF5). Diese führen zum einen zur Induktion von M1-typischen Zytokinen wie IL-12, IL-23 und TNF, zum anderen kommt es zu einer Förderung der TH1 und TH17 Antwort im Sinne einer prozyklischen Verstärkung [51]. Im Zuge dieser Polarisierung werden M1-spezifische Gene wie *TNF- $\alpha$* , *Cox-2*, *CCL5* und *iNOS* in ihrer Aktivität hochreguliert [1].

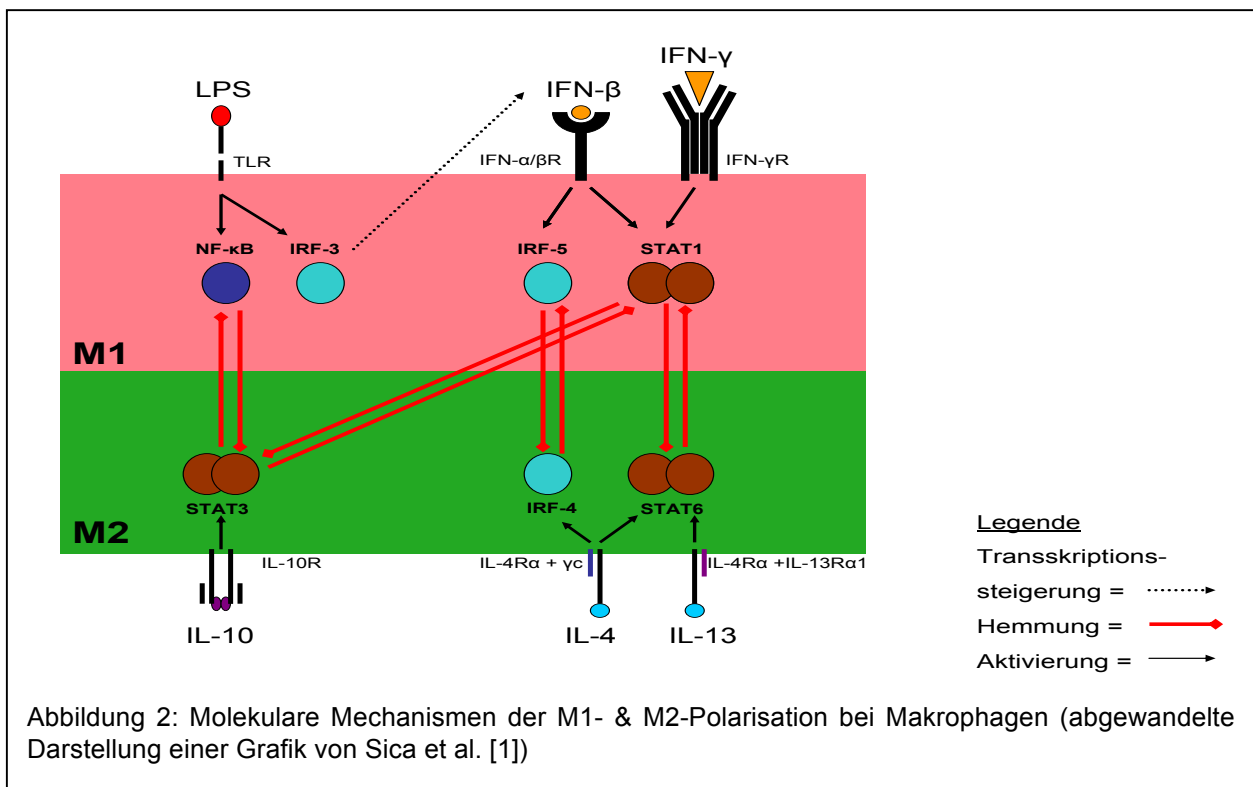
Die M2-Polarisierung hingegen wird vor allem durch die Gene *Il4* und *Il13* und die Expression der IL-4 Rezeptoren I und II vermittelt [23, 29, 52]. Mittels STAT6 Aktivierung führt dies zur Aktivitätssteigerung von M2-spezifischen Genen wie *PPAR $\gamma$* , *Arg-1*, *Mrc1*, *Fizz1* und *Ym1* [53], wobei spezies-spezifische Unterschiede existieren.

Wie bereits erwähnt führt Stimulation durch IL-10 zu einer M2-like Polarisierung mit nicht nur funktionellen, sondern auch molekularen Unterschieden. So wird die Wirkung von IL-10 nicht durch STAT6, sondern durch STAT3 vermittelt und führt zur Expressionssteigerung von M2-like typischen Genen wie *Il10*, *Tgfb1* und *Mrc1* [32, 54].

Ähnlich der balancierten TH1/TH2 Immunantwort, werden im Zuge der Makrophagenpolarisierung ebenfalls Regulationskreisläufe aktiviert. So kommt es bei TLR- und Interferon-vermittelter M1-Polarisierung via STAT1 zur direkten Hemmung von STAT6 und somit der M2-Polarisierung. Darüber hinaus wird SOCS3, ein weiteres Zytokinsuppressionsprotein, aktiviert (englisch: suppressor of cytokine signaling 3, kurz:

SOCS3). Dieses hemmt STAT3, das Schlüsselprotein der Signaltransduktion der M2-  
like Polarisierung [55].

Komplementär dazu werden im Zuge der M2-Polarisierung durch STAT6 in Verbindung  
mit dem sogenannten Krüppel-like Faktor 4 (KLF4) und einem weiteren  
Zytokinsuppressionsprotein (SOCS1) M1-typische Gene in ihrer Aktivität gehemmt [56].  
Diese gegenseitige Kontrolle führt zu einer balancierten und gerichteten Polarisierung  
von Makrophagen.



## 1.7 Die Bedeutung des adaptiven Immunsystems für die Kryptokokkose

Das Überleben von Patienten, die an Kryptokokkose erkrankt sind, hängt maßgeblich von der koordinierten Arbeitsweise ihres Immunsystems und dessen Zellen ab. In verschiedenen Mausmodellen zeigte sich, dass für eine erfolgreiche Bekämpfung von *C. n.* eine TH1 Antwort essentiell ist [57-65]. Menschen, deren Immunsystem große Mengen an IFN- $\gamma$  im Sinne einer TH1 Antwort produzierten, zeigten eine intakte Granulomformation und waren somit in der Lage, den Erreger zu kontrollieren und eine Dissemination zu verhindern [37, 66]. Zur Ausbildung dieser protektiven TH1 Antwort erwiesen sich IL-12 als essentiell und IL-23 als unterstützend [67-71]. Erste Studien

lieferten Hinweise für eine vorteilhafte Rolle der TH17 Antwort bezüglich der Vermeidung des Vollbildes der Kryptokokkose [57, 72-74]. Die Rolle der TH17 Antwort im Kontext der Kryptokokkose muss jedoch noch weiter beleuchtet werden.

Die Wissenschaftler Zhang et al. zeigten, dass dies nicht für hochvirulente Stämme wie den *C. n.* Stamm H99 gilt, da dieser trotz intakter TH1 und TH17 Antwort nicht an der Dissemination gehindert werden konnte [73].

Komplementär zu einer protektiven TH1 Antwort, resultierte eine TH2 Antwort mit kräftiger IL-4 und IL-13 Produktion beim Menschen, als auch in experimentellen Mausmodellen, in einem ungünstigeren Krankheitsverlauf [70, 73, 75]. Hierbei kam es zu unkontrolliertem Wachstum von Kryptokokken in der Lunge und im Gehirn. In diesen murinen Modellen kam es lediglich zur M2-Polarisierung von peripheren Makrophagen, nicht jedoch von Mikrogliazellen [76]. Interessanterweise zeigte sich, dass eine heterozygote Ausprägung des IL-4R $\alpha$  in einem intermediären Phänotyp bezüglich der Lungenpathologie und des Gesamtüberlebens resultierte [77].

Bei den TH1, TH2 und TH17 Immunantworten handelt es sich nicht um starre Konzepte, sondern um dynamische Prozesse im Verlauf einer Infektion. Gezeigt werden konnte dies u. a. durch die Studien von Arora et al.: Wildtyp-Mäuse zeigten in den ersten 3 Wochen nach Infektion mit *C. n.* ein TH2 typisches Zytokinexpressionsprofil. Im weiteren Verlauf der Infektion wandelte sich das Zytokinexpressionsprofil und entsprach dem einer TH1 Antwort. Diese TH1 Antwort war jedoch nicht mehr in der Lage die Infektion zu diesem fortgeschrittenen Zeitpunkt noch erfolgreich zu kontrollieren [43].

## **1.8 Die Rolle von Makrophagen im Rahmen der Kryptokokkose**

### **1.8.1 Vor- und nachteilige Eigenschaften von polarisierten Makrophagen**

Der Schlüssel zum Verständnis der Effekte der TH1, TH2 und TH17 Immunantwort im Rahmen der Kryptokokkose sind Makrophagen. Das Zusammenspiel der Makrophagen mit den TH Zellen und die davon abhängige Polarisierung sind maßgeblich für die erfolgreiche Bekämpfung von *C. n.* verantwortlich [57, 65, 73, 74, 76, 78, 79].

Die vorteilhafte bzw. protektive Rolle der TH1 Antwort bei der Kryptokokkose leitet sich aus der Polarisierung von Makrophagen hin zu einem M1-Phänotyp ab. Hierbei nehmen

die M1-polarisierten Makrophagen, wie bereits in Kapitel 1.5 beschrieben, einen stark mikrobiziden bzw. fungiziden Phänotyp an. Diese Eigenschaft basiert mitunter auf der Fähigkeit substantielle Mengen an ROS durch M1-typische Enzyme wie iNOS zu produzieren [59, 73, 80-83]. Somit sind sie in der Lage, intrazellulär gelegene Kryptokokken erfolgreich zu eliminieren [36] oder zumindest wieder aus ihrem Zytosol nach extrazellulär „auszustoßen“ [57], um intrazellulärem Tropismus entgegenzuwirken.

Im Gegensatz dazu kommt es durch eine TH2 Antwort zu einer Polarisierung von Makrophagen hin zu einem M2-Phänotyp [84, 85]. Dieser Makrophagenphänotyp steigert zwar seine phagozytotische Aktivität [36], ist jedoch nicht in der Lage, die intrazelluläre Vermehrung von *C. n.* zu verhindern oder *C. n.* wieder „auszustoßen“ [57]. Somit stellen murine M2-Makrophagen, im Gegenteil zu M1-Makrophagen, sogar eine Nische zur ungestörten intrazellulären Vermehrung von *C. n.* innerhalb der Makrophagen dar [57, 73, 86]. Darüber hinaus sind M2-polarisierte Makrophagen nicht in der Lage, *C. n.* an der Dissemination zu hindern, sondern fungieren als eine Art Vehikel zur Dissemination von *C. n.* [82, 87-91]. Dadurch tragen M2-polarisierte Makrophagen auf mindestens zwei Arten zur Vermehrung und Dissemination von *C. n.* und somit zum Progress der Kryptokokkose bei. Dabei ist bislang nicht untersucht ob und wie Kryptokokken ihre „Lebensdauer“, das lysosomale Autophagie-System, sowie die Mechanismen des intrazellulären Überlebens beeinflussen.

Insgesamt ist also festzuhalten, dass die Polarisierung von Makrophagen eine Schlüsselstelle in der Immunabwehr gegen *C. n.* darstellt. Diese zentrale Rolle stellt ein vielversprechendes Ziel für zukünftige immunmodulatorische Therapien der Kryptokokkose dar.

### **1.8.2 Makrophagenabhängige und –unabhängige Mechanismen der ZNS Invasion durch *C. n.***

Wie in Kapitel 1.8.1 bereits erwähnt, sind Makrophagen maßgeblich am Infektionszyklus von *C. n.* beteiligt und dienen nicht nur als Replikationsnische, sondern sind darüber hinaus an der Dissemination von *C. n.* aus der Lunge in extrapulmonale Organe beteiligt [78, 90-93].

Insgesamt werden drei makrophagenabhängige und –unabhängige Möglichkeiten der Dissemination ins ZNS von *C. n.* diskutiert [88]. Es handelt sich dabei um je ein transzelluläres oder parazelluläres Überschreiten der Blut-Hirn-Schranke und um den Mechanismus des „Trojanischen Pferdes“. Hierbei fungieren Makrophagen als Vehikel für *C. n.* zur Dissemination ins ZNS.

Die Theorie des transzellulären Mechanismus wurde anhand von humanen Kryptokokken-Meningoenzephalitiden, als auch anhand von Mausmodellen entwickelt. Shi et al. konnten anhand von intravitaler Mikroskopie an Mausgehirnen zeigen, dass *C. n.* durch das Blut in kleinste zerebrale Kapillaren gespült wird, bis die Pilze passiv „stecken“ bleiben, um dann aktiv das Endothel zu durchqueren [94]. Chen et al. und Chang et al. konnten anhand von humanen mikrovaskulären Endothelkulturen zeigen, dass *C. n.* eine Änderung der Zytoskelettstruktur der Endothelzellen induziert, um in die Endothelzelle einzudringen [95, 96]. *C. n.* wird dabei in Form von membranassoziierten Vakuolen aufgenommen und auf der basolateralen Seite der Endothelzelle wieder abgegeben [95, 97]. Durch Infektionsversuche mit einem Urease-defizienten *C. n.* Stamm konnten Olszewski et al. zeigen, dass es sich hierbei um einen Urease-abhängigen Vorgang handelt [98]. Allgemein katalysiert Urease die Reaktion von Harnstoff zu Ammoniak und Kohlendioxid. Die bei der anschließenden Autoprotolyse des Ammoniaks entstehenden Hydroxidionen ermöglichen Erregern wie *Helicobacter pylori* [99] oder *Proteus mirabilis* [100] in sauren Milieus besser zu überleben und stellen somit einen Virulenzfaktor dar. Bei *C. n.* führt die Anwesenheit von Urease hingegen zur vermehrten Sequestration von Mikrokapillaren wie beispielsweise im ZNS und führte zu einer verstärkten Invasion des ZNS durch *C. n.* [98].

Darüber hinaus wird ein parazellulärer Mechanismus diskutiert, der jedoch auf weniger Evidenz fußt und weiter beleuchtet werden muss. Bei diesem Mechanismus kommt es zu einem Abbau des tight-junction-Proteins Occludin in Anwesenheit von *C. n.*, was zu einer Durchlässigkeit und dem parazellulären Überschreiten der Blut-Hirn-Schranke durch *C. n.* führen kann [96].

Der einzige makrophagenabhängige Mechanismus der Dissemination ist der des „Trojanischen Pferdes“. Hierbei disseminieren Kryptokokken ins ZNS, indem sie intrazellulär in einem Makrophag überleben und diesen als Vehikel zur Überschreitung der Blut-Hirn-Schranke nutzen. Diese Theorie basiert auf Beobachtungen in der Tyε26

Maus, welche eine T- und NK-Zelldefizienz aufweist. Durch Depletion von Alveolarmakrophagen in diesem Mausmodell, kam es zu einer signifikant geringeren Anzahl von ZNS-Infektionen [93]. Weiterhin wird diese Theorie gestützt durch Beobachtungen bei Kryptokokkenmeningitiden von AIDS Patienten und in Mausmodellen. Hier zeigte sich eine enge Assoziation von Makrophagen, die Kryptokokken beherbergten, zum leptomeningealen Raum [89]. Ein weiteres Argument für die Theorie der Makrophagen als „Trojanisches Pferd“ lieferte eine Studie von Charlier et al.. Hierbei wurde in einem Mausmodell die Infektion mit freien Pilzen und die Infektion mit Makrophagen, die *ex vivo* Kryptokokken phagozytiert hatten, verglichen. Die Infektion mit Makrophagen, die bereits Kryptokokken beherbergten, bewirkte eine nahezu vierfach höhere Pilzlast im ZNS [88].

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass wahrscheinlich mehrere parallele Wege der Dissemination von *C. n.* ins ZNS existieren. Aktuell gibt es für die makrophagenabhängige Theorie des „Trojanischen Pferdes“ und die Theorie des transzellulären Transportes die breiteste Evidenz. Im Hinblick auf Möglichkeiten der therapeutischen Intervention stellen erneut Makrophagen ein interessantes Ziel einer gerichteten Therapie dar.

## **1.9 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit**

In der Zusammenschau der in der Arbeitsgruppe bereits durchgeführten Experimente, als auch anhand der durch Kollegen gewonnenen Erkenntnisse im Kontext der Kryptokokkose, wurden umschriebene Fragen formuliert. Diese Arbeit dient dem Zweck der Beleuchtung eines Teiles dieser *bis dato* unbeantworteten Fragen.

Die Reaktion von Lunge und Gehirn auf eine Infektion mit *C. n.*, als auch die ausgelösten pathologischen Veränderungen, unterschieden sich in Abhängigkeit vom Untersuchungszeitpunkt deutlich. Die Lunge als Eintrittspforte der Infektion zeigte eine frühe, akute bis subakute Reaktion auf die Infektion. Das ZNS blieb dahingegen lange protegiert. Dies führte zu der Hypothese, dass es in starker Abhängigkeit zur Zeit *post infectionem* (p.i.) eine organspezifische TH1/M1 - TH2/M2 Antwort im verwendeten Balb/c Mausmodell der pulmonal induzierten Kryptokokkose gibt. Zur Beantwortung dieser Frage wurden drei Untersuchungszeitpunkte gewählt, bei denen das reine Lungenstadium (20dpi), das Stadium der Dissemination (40dpi), als auch das Stadium der ZNS Kryptokokkose (60dpi), jeweils in beiden Organen untersucht wurde.



Aus der Beobachtung, dass die Makrophagenpolarisierung im Kontext der Kryptokokkose eine Schlüsselstelle der Immunabwehr darstellt, ergab sich folgende Frage: Welches sind typische morphologische, funktionelle und molekulare Charakteristika der beteiligten pulmonalen und zentralnervösen Makrophagen bzw. Mikrogliazellen und ihrer jeweiligen Polarisierung in den verschiedenen Stadien der Infektion? Diese Frage wurde anhand von FACS Analysen, q-PCR, Immunhistochemie und Immunfluoreszenzfärbungen beleuchtet.

Das Konzept der Makrophagenpolarisierung wurde in den vergangenen Jahren stetig beforscht und weiterentwickelt, aktuell auch durch sog. „Transkriptom“-Analysen, bei denen sämtliche transkribierte Moleküle in definierten „Zuständen“ analysiert werden. Wie bereits erwähnt, war es *in vitro* bereits möglich, intermediäre Phänotypen polarisierter Makrophagen zu beobachten und zu charakterisieren. Basierend darauf, stellte sich die Frage, ob es einen Zeitpunkt im Verlauf des von mir verwendeten pulmonal induzierten Kryptokokkosemodells gibt, zu welchem pulmonale und/oder Makrophagen des ZNS einen intermediär polarisierten Phänotyp ausbilden. Diese Frage sollte sowohl anhand von q-PCR Analysen polarisationstypischer Gene in Makrophagen, als auch anhand des Nachweises der Präsentation von polarisationstypischen Proteinen mittels mehrfacher und co-lokalisierter Doppelimmunfluoreszenzfärbungen beantwortet werden.

Bislang sind die molekularen Mechanismen der Riesenzellbildung bei der Kryptokokkose, im Kontext der alternativen Makrophagenaktivierung nicht beschrieben. Speziell dieses Phänomen sollte diese Arbeit funktionell und organspezifisch mittels q-PCR und co-lokalisierten Doppelimmunfluoreszenzfärbungen beleuchten.

## **2. Methoden**

### **2.1 Mäuse und Infektionsmodell**

#### **2.1.1 Mäuse**

Es wurden 12 Monate alte männliche Balb/c Mäuse verwendet, die während der gesamten Zeit der Zucht und der Experimente in der Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin (FEM) unter Beobachtung standen. Erworben wurden diese Tiere bei der FEM, Charité Universitätsmedizin Berlin. Ihre Haltung erfolgte nach standardisierten Richtlinien der FEM bezüglich des Lichts, Futters etc..

#### **2.1.2 Modell**

Es erfolgte eine intranasale Infektion der Balb/c Mäuse mit 20µl einer gepufferten Salzlösung (PBS), die 500 koloniebildende Einheiten (CFUs) des *C. n.* Stamms 1841, Serotyp D enthielt. Dieses Vorgehen wurde bereits in der Arbeitsgruppe durchgeführt und beschrieben [74]. Die intranasale Applikation von *C. n.* führte zu einer pulmonalen Infektion. Nach ca. 40-60 Tagen p.i. kam es zu einer Dissemination des Erregers, mit präferenzialer Aussaat in das zentrale Nervensystem.

#### **2.1.3 Kryptokokkenzucht und Herstellung der Infektionslösung**

Ein in entrahmter Milch gefrorenes Aliquot mit ca.  $1 \times 10^8$  CFUs des *C. n.* Stamms 1841, Serotyp D wurde bei 30°C im Rüttelinkubator über Nacht in Sabouraud Dextrose Medium gezüchtet (1% Trypton, 2% Glucose). Die Lösung wurde zweimal mit sterilem PBS gewaschen und die Pilze wurden in einer Neubauerzählkammer gezählt. Durch weitere Verdünnung mit sterilem PBS wurde die Lösung auf eine Zielkonzentration von  $2,5 \times 10^4$ /ml Pilzen eingestellt.

#### **2.1.4 Infektion**

Für die Infektion wurden Mäuse intraperitoneal (i.p.) mit einer 1:1 Mischung aus 2% Xylazin und 10% Ketamin, verdünnt mit steriler 0,9%iger Kochsalzlösung, anästhesiert. Es wurden 0,1ml dieser Lösung pro 10g Körpergewicht verwendet. Anschließend wurden pro Maus und Nasenloch 10µl der vorher hergestellten Infektionslösung per „gavage“ appliziert. Jede Maus wurde so mit einer Gesamtmenge von 500 CFUs infiziert.

Sämtliche Experimente wurden nach den Richtlinien des internationalen Tierschutzes durchgeführt und sind von der lokalen Tierethikkommission (Landesamt für Gesundheit und Soziales; G0375-09) genehmigt und überwacht worden.

### **2.1.5 Infektionskontrolle und –verlauf**

Um die Infektion und ihren Verlauf zu dokumentieren, wurden Aliquots von Homogenaten ganzer Lungen und Gehirne auf mikrobiologische Nährmedien in Petrischalen aufgetragen. Um dem Pilz optimale Wachstumsbedingungen zu gewähren, wurde Sabouraud-Dextrose Agar (1% Trypton, 2% Glucose, 2% Agar) verwendet. Nach 72 Stunden Inkubation bei 30°C wurden die gewachsenen Kolonien gezählt (CFUs).

## **2.2 Histologie**

### **2.2.1 Gewebegewinnung**

An den Versuchstagen wurden die Mäuse i.p. mit einer 1:1 Mischung aus 2% Xylazin und 10% Ketamin, verdünnt mit steriler 0,9%iger Kochsalzlösung, euthanasiert. Hierzu wurden 0,2 ml des Anästhetikums pro 10g Körpergewicht verwendet (letale Dosis). Anschließend wurden die Mäuse mit 0,9% Kochsalzlösung intrakardial perfundiert. Es wurden ganze Gehirne und Lungen entnommen und mithilfe von Tissue Tek auf Korkplättchen befestigt. Die Organe wurden in Isopentan, welches mit Trockeneis auf etwa -120°C vorgekühlt wurde, schockgefroren. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -80°C gelagert. Für Immunhistochemie und Immunfluoreszenz wurden aus den Geweben mit Hilfe eines Gefriermikrotoms 9µm dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden auf Objektträger gebracht und bei -20°C bis zur Durchführung der entsprechenden Färbungen gelagert. Vor jeder Färbung wurden die gefrorenen Schnitte auf Raumtemperatur gebracht und 10 Minuten in Aceton und 7 Minuten in Chloroform fixiert.

Aus früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe war bekannt, dass nicht alle Gehirne der pulmonal infizierten Mäuse histologisch erkennbare Läsionen aufwiesen. Daher wurde vor der Anfertigung der zu untersuchenden Gehirnschnitte alle 100µm ein Testschnitt durchgeführt. Dieser Schnitt wurde hinsichtlich des Befalls durch *C. n.* untersucht. War dieser vorhanden, so wurden konsekutiv 9µm dicke Gehirnschnitte zur weiteren histologischen Analyse angefertigt. Die weitere Behandlung der angefertigten Gehirnschnitte erfolgte wie weiter oben beschrieben.

### **2.2.2 Hämatoxilin & Eosin (H&E) Färbung**

Diese Standardfärbung der Histologie beruht auf der Blaufärbung der Zellkerne durch Hämatoxilin und der Rosafärbung von Zytoplasma, Kollagen und anderen Teilen der Extrazellulärmatrix durch Eosin.

Initial wurden die zu färbenden Schnitte für 3 Minuten in gereiftem Hämalaun inkubiert und anschließend unter laufendem Leitungswasser für 2 Minuten gebläut. Daraufhin wurden sie 30 Sekunden mit Eosin gefärbt und kurz mit Leitungswasser gewaschen. Zur Dehydratation wurden die Schnitte mit einer aufsteigenden Alkoholreihe behandelt. Sie wurden für 20 Sekunden in 70% Ethanol und je 1 Minute in 80%, 96% und 100% Ethanol inkubiert. Abschließend wurden sie für 1 Minute mit Xylol behandelt und mithilfe des ROTI-HISTOKIT II mit einem Deckgläschen versehen und versiegelt.

### **2.2.3 Immunhistochemie**

Für die Immunhistochemie wurden die Schnitte wie oben beschrieben vorbehandelt und anschließend 30 Minuten in PBS mit 5% bovinem Serumalbumin (BSA) und 10% speziess angepasstem Normalserum inkubiert. Die Schnitte wurden mit Primärantikörpern (siehe Tabelle 9) für 1 Stunde bei Raumtemperatur behandelt und anschließend gründlich mit PBS abgewaschen. Daraufhin wurde ein speziesspezifischer mit Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelter Zweitantikörper verwendet. Dieser wurde nach 40 Minuten Inkubationszeit ebenfalls gründlich mit PBS abgewaschen. Das nun entstandene Peroxidaseprodukt wurde mit 3,3' Diaminobenzidine in Chromogenlösung, mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als Cosubstrat, sichtbar gemacht.

In einigen Fällen erfolgte eine Gegenfärbung mit gereiftem Hämalaun für 5 Sekunden, 3 Minuten Bläuung unter fließendem Leitungswasser und abschließender aufsteigender Alkoholreihe und Versiegelung des Schnittes wie bei der H&E Färbung beschrieben.

Negativ Kontrollen, ohne Applikation des Erstantikörpers, bestätigten die Spezifität der Reaktion. Alle Färbungen wurden in der gleichen Vergrößerung mithilfe eines Olympus BX50 Mikroskopes und der cell<sup>^</sup>D Software (Olympus, Tokio, Japan) aufgenommen und analysiert.

### **2.2.4 Perjodsäure-Schiff Reaktion (PAS Färbung)**

Die Perjodsäure-Schiff Reaktion wird in der Histologie allgemein auch als PAS Färbung bezeichnet und dient der Anfärbung von verschiedenen Bestandteilen von Zellen und der Extrazellulärmatrix. Angefärbt werden beispielsweise Glykogen, Proteoglykane und

andere Moleküle. Diese Bestandteile färben sich magenta-rot bis pink. Zellkerne färben sich blauviolett und das Zytoplasma zart rosa.

Mit der PAS Färbung lassen sich die in dieser Arbeit verwendeten Pilze und ihre charakteristische Schleimkapsel eindrücklich darstellen.

Initial wurden die Schnitte mit destilliertem Wasser behandelt, um anschließend für 15 Minuten mit 0,5%iger Perjodsäure behandelt zu werden. Nach kurzer Spülung in destilliertem Wasser folgte eine Inkubation für 20 Minuten mit Schiff'scher Reagenz. Nach 5-minütiger Behandlung mit Leitungswasser, folgten 5 Minuten Inkubation in gereiftem Hämalaun und erneute 5-minütige Behandlung mit Leitungswasser. Anschließend wurde der Schnitt, analog zur H&E Färbung, mit einer aufsteigenden Alkoholreihe behandelt und mit einem Deckgläschen versiegelt.

### **2.2.5 Immunfluoreszenz**

Für die Immunfluoreszenz wurden Schnitte wie für die weiter oben beschriebene Immunhistochemie vorbereitet und anschließend für 30 Minuten mit PBS geblockt, welches mit 5% BSA und speziesspezifischem Serum versetzt war. Um doppelte Immunfluoreszenzfärbungen herzustellen, wurden die primären Antikörper aus Tabelle 9 wie in der Immunhistochemie appliziert und anschließend bei 4°C über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte gewaschen und jeweils mit einem sekundären Antikörper aus Tabelle 9, welcher mit einem der Fluorochrome DyLight 649, Alexa Fluor488 oder Cy3 gekoppelt war, für 1 Stunde inkubiert. Parallel zu den Färbungen wurden Kontrollschnitte nach dem gleichen Verfahren, jedoch ohne den primären Antikörper, behandelt, um die Spezifität der Methode zu gewährleisten. Die gefärbten Schnitte wurden mit wässrigem Medium, welches z.T. DAPI enthielt, versiegelt und anhand des Zeiss Observer Z1 Mikroskops (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) begutachtet und unter zur Hilfenahme der Axio Vision 4 Software (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) analysiert.

## **2.3 Immunologische Techniken**

### **2.3.1 Isolation pulmonaler Leukozyten**

Die Isolation pulmonaler Leukozyten erfolgte nach einem in der Arbeitsgruppe bereits durchgeführten und beschriebenen Protokoll [79].

Nach intrakardialer Perfusion mit 0,9%iger Kochsalzlösung wurden ganze Lungen entnommen und manuell durch Skalpellklingen zerkleinert. Anschließend wurden die

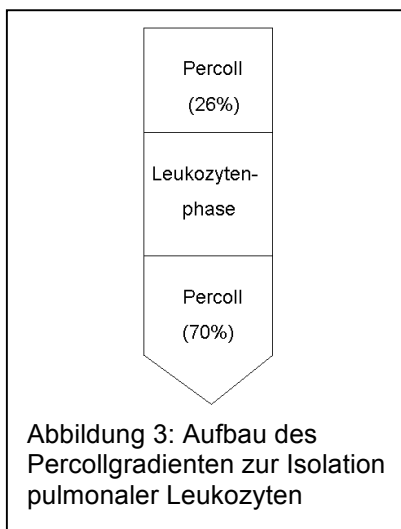
zerkleinerten Lungen für 30-45 Minuten auf einem Rüttelinkubator bei 37°C in einer Lösung aus RPMI 1640, 10% fetalem Kälberserum (FCS), Collagenase A (35 mg/ml), DNase Typ IV (1,5mg/ml) und Pyruvat (1mM) enzymatisch zerkleinert.

Diese Lösung wurde durch ein Zellsieb mit einer Maschengröße von 70µm gegeben, um eine Suspension einzelner Zellen zu erhalten.

Verbleibende Erythrozyten wurden durch die Zugabe von Erythrozytenlysepuffer lysiert. Die Lungenzellen wurden erst mit PBS gewaschen und daraufhin in RPMI 1640 resuspendiert. Es folgte die Zentrifugation des Percollgradienten und die Ausplattierung auf Sabouraud-Dextrose-Agar.

Für den Percollgradienten wurde die Einzelzellsuspension pulmonaler Zellen in Percoll-Lösung resuspendiert, welche auf 70% mit RPMI 1640 und 3%igem FCS verdünnt wurde. Dieses Gemisch wurde unter eine, mit RPMI 1640 und 3%igem FCS verdünnte, 26%ige Percollschicht gegeben (siehe Abbildung 3). Durch eine 20-minütige Zentrifugation bei 2700 rpm und 4°C bei niedrigster Beschleunigung und ohne Abbremsung bildete sich eine Interphase zwischen den beiden Schichten unterschiedlicher Dichte des Percolls. Diese Interphase enthielt die pulmonalen Leukozyten. Auf diese Weise konnten die pulmonalen Leukozyten vom *gros* der restlichen Lungenzellen und Zelltrümmer getrennt werden.

Die pulmonalen Leukozyten wurden zweimal mit PBS gewaschen und in 1ml PBS mit 3% FCS resuspendiert. Mit Hilfe einer Neubauerzählkammer wurden die pulmonalen Leukozyten gezählt. Dies erfolgte unter Zusatz von 1:10 verdünntem Trypanblau zur Vitalitätsbeurteilung. Auf diesem Wege wurden Daten über die Gesamtleukozytenzahl der Lungen gewonnen, welche anhand der Durchflusszytometrie weiter analysiert wurden.

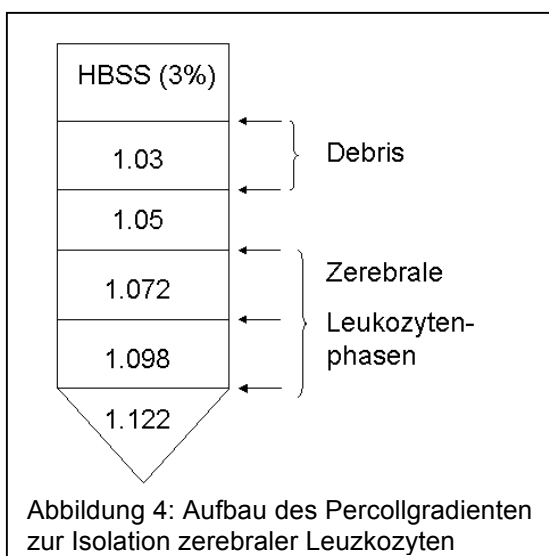


### 2.3.2 Isolation zerebraler Leukozyten

Nach der Euthanasierung der Mäuse wurden Gehirne rasch entnommen und durch ein Zellsieb mit 70µm Maschengröße gegeben. Daraufhin wurden die zerebralen Leukozyten durch Zentrifugation eines Percoll-Gradienten isoliert. Hierzu wurde ein Protokoll in leicht abgewandelter Form verwandt, welches bei Ford et al. [101] beschrieben ist (siehe ebenfalls Ergebnisse, Kapitel 4.10).

Es wurden Homogenate einzelner und mehrerer Gehirne (abhängig vom Versuchsschema) bei 4°C und 1200 rpm für 8 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Percolllösung wurde 1:10 mit 1.5M NaCl verdünnt, die zerebralen Zellen hierin resuspendiert und weiter mit HBSS und 3% FCS auf eine Dichte von 1.098 in 10ml verdünnt. Diese Schicht wurde mit 5ml Percoll der Dichte 1.122 unterschichtet und anschließend mit je 9ml der folgenden Dichten Schritt für Schritt vorsichtig überschichtet: 1.072, 1.05 und 1.03. Abschließend wurde eine 9ml Schicht HBSS mit 3% FCS aufgetragen (siehe Abbildung 4).

Der Percoll-Gradient wurde für 30 Minuten bei 4°C und 2700 rpm bei niedrigstmöglicher Beschleunigung und ohne Verwendung der Bremse zentrifugiert. Die obersten Schichten, bestehend aus Myelin und Zelldebris, wurde abgetragen. Zwischen den verschiedenen Percoll-dichten bildeten sich drei Interphasen, in denen sich die zerebralen Leukozyten konzentrierten. Diese Schichten wurden separat entnommen, mit HBSS und 3% FCS gewaschen und anschließend wieder vereint. Die Menge der so extrahierten zerebralen Leukozyten wurden unter Zugabe von 1:10 Trypanblau, zur Vitalitätsbestimmung, in einer Neubauerzählkammer gezählt, anschließend gefärbt und schlussendlich durchflusszytometrisch analysiert.



### 2.3.2 Durchflusszytometrie

Färbungen verschiedener Oberflächenmarker von Lungen- und Gehirnzellen wurden durchgeführt, indem sie mit fluorochromgekoppelten spezifischen Antikörpern behandelt wurden. Bei der Analyse durch das FACS (englisch: fluorescence-activated cell sorting) Gerät, regte dieses die hindurch laufenden Zellen mittels Laser an. Die auf diese Weise angeregten Fluorochrome emittierten spezifische Lichtspektren, welche durch das FACS Gerät gemessen wurden. Dies gab Aufschluss über die Anwesenheit und die Anzahl der zu untersuchenden Oberflächenmarker in verschiedenen Zellpopulationen. Die gesamte Färbeprozedur wurde unter Kühlung durch Eis durchgeführt. Durch die in Kapitel 2.3.1 und 2.3.2 beschriebenen Prozeduren wurden Lösungen mit einzelnen Lungen- und Gehirnleukozyten hergestellt. Zu Beginn der Färbeprozedur wurden die Leukozyten für 8 Minuten bei 4°C und 1200 rpm in PBS und 1% FCS gewaschen. Um unspezifische Bindung der Antikörper zu verhindern, wurde vor der eigentlichen Färbung ein Block mit anti-Fc CD16/32 (20 µg/ml) für 10-15 Minuten durchgeführt. Anschließend wurde die Zellsuspension mit den entsprechenden Antikörpern für 20 Minuten bei 4°C in dunkler Umgebung gefärbt. Um überschüssige und nicht gebundene Antikörper zu entfernen, wurde die frisch gefärbte Zellsuspension erneut mit PBS und 1% FCS gewaschen. Um noch genauer zwischen einer spezifischen Bindung des fluorochromgekoppelten Antikörpers und nativ vorhandener Autofluoreszenz unterscheiden zu können, wurde bei jeder Färbung auch ein Teil der Leukozytensuspension ungefärbt analysiert.

Vor der eigentlichen Analyse wurden aufgrund der Verwendung mehrerer Fluorochrome die Kompensationseinstellungen für die verwendeten Fluorochrome und deren Spektren optimiert. Dies geschah entsprechend der Anleitung des Herstellers anhand von Polystyrolmikropartikeln, sogenannten Kompensationsperlen (CompBeads BD™, "Compensation Particles Anti-Rat/Anti-hamster Ig, κ" set).

Die gefärbten Leukozyten wurden durchflusszytometrisch mit einem FACS CANTO II analysiert und mit Hilfe von FlowJo Software (Tristar, Ashland, USA) ausgewertet.

Initial mussten Zelldebris und nicht gewünschte Bestandteile aus der Messung ausgeschlossen werden. Dazu wurde eine Übersicht aller aufgezeichneten Ereignisse im forward- und sideward scatter (FSC & SSC) angezeigt, was Aufschluss über die Größe und Granularität der untersuchten Zellen gab. In dieser Übersicht wurden die zu analysierenden Zellen durch ein sogenanntes 'gate' eingegrenzt. Diese Population



wurde als Gesamtheit der Leukozyten bezeichnet. Nur diese Zellen wurden in der weiteren Analyse berücksichtigt.

Bei Gehirnen und Lungen wurden verschiedene weitergehende Auswahlstrategien angewendet. In der Lunge wurden aus der Gesamtleukozytenpopulation  $F4/80^+$  Zellen identifiziert und als Makrophagen bezeichnet.

Im Gehirn wurde die Zellpopulation, die eine intermediäre Expression des Markers CD45 zeigte und gleichzeitig  $CD11b^+$  war, als Mikrogliazellen bezeichnet. Es wurde eine weitere  $CD11b^+$  Zellpopulation identifiziert. Im Gegensatz zu den Mikrogliazellen zeigte diese Zellpopulation jedoch eine hohe Expression des Markers CD45 und wurde als zerebrale Makrophagen bezeichnet (siehe Ergebnisse, Kapitel 4.10) [101]. Darüber hinaus wurde in Lungen und Gehirnen aus der initial festgelegten Leukozytenpopulation eine Lymphozytenpopulation identifiziert. Diese für das Oberflächenprotein  $CD4^+$  Zellen wurden im Weiteren als  $CD4^+$  Lymphozyten bezeichnet. Zwar tragen auch einige wenige andere Zellpopulationen, wie beispielsweise dendritische Zellen, das Oberflächenprotein CD4, jedoch lassen diese sich histomorphologisch von den  $CD4^+$  Lymphozyten differenzieren.

Alle oben genannten Leukozytensubpopulationen wurden nach ihrer Identifizierung auf die Expression des IL-4 Rezeptors- $\alpha$  (IL-4R $\alpha$ ) untersucht.

### **2.3.3 RNA Extraktion**

Die RNA wurde mit Hilfe des Trizol / Chloroform Verfahrens entsprechend der Anleitung des Herstellers aus gefrorenem Lungen- und Gehirngewebe extrahiert.

Hierzu wurden ca. 50 Gewebeschnitte mit einer Dicke von  $10\mu\text{m}$  mit einem Gefriermikrotom gewonnen und in einem 1.5ml Eppendorf Tube gesammelt. Diese wurden in 1ml Trizol resuspendiert und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Es wurden  $200\mu\text{l}$  Chloroform hinzugefügt, für 15 Sekunden kräftig geschüttelt und bei  $4^\circ\text{C}$  und  $12.000x\text{ g}$  für 10 Minuten zentrifugiert. Die wässrige RNA-haltige Phase, wurde in ein frisches Tube überführt und mit  $0,5\mu\text{l}$  Glykogen versetzt. Unter sanfter Durchmischung wurden weitere  $500\mu\text{l}$  Isopropanol hinzugefügt, für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für weitere 10 Minuten bei  $4^\circ\text{C}$  und  $12.000x\text{ g}$  zentrifugiert. Das auf diese Weise entstandene RNA Präzipitat wurde zweifach mit 75%igem Ethanol gewaschen, bei Raumtemperatur getrocknet, in  $60\mu\text{l}$  RNase freiem Wasser resuspendiert und für 10 Minuten auf  $60^\circ\text{C}$  erhitzt.

Die Konzentration der Gesamt-RNA wurde photometrisch mit einer „Infinite 200 NanoQuant“ Platte bestimmt.

Um noch vorhandene DNA und DNasen aus dem extrahierten RNA-Gemisch zu entfernen, wurde das „DNase free Kit“ entsprechend der Anleitung des Herstellers verwendet. Hierzu wurde ein DNase Verdauungsreagenz hinzugefügt und mit den Proben für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Es folgte die Zugabe eines DNase Inaktivierungsreagenz mit dem die Proben für 2 Minuten bei Raumtemperatur behandelt und abschließend bei 10.000x g für 2 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert wurden.

### 2.3.4 Quantitative *Real-Time* PCR

Es wurden 1-2µg der extrahierten RNA unter Zuhilfenahme des „High-Capacity cDNA Archive Kit“ entsprechend der Anleitung des Herstellers revers transkribiert. Um dies zu erreichen wurden den 50µl der DNase behandelten RNA-haltigen Proben die Reagenzien aus Tabelle 1 hinzugefügt. Anschließend wurden sie entsprechend des Programms aus Tabelle 2 revers transkribiert.

Reagenz	Volumen [µl]
10x RT Puffer	10
25x dNTP Mix (100µM)	4
10x zufällige RT Primer	10
Reverse Transkriptase	5
Nukleasefreies Wasser	21

Tabelle 1: Reagenzien für den Ansatz der reversen Transkription

Temperatur	Zeit [Minuten]
Schritt 1: 25°C	10
Schritt 2: 37°C	120
Schritt 3: 85°C	5
Schritt 4: 4°C	Bereithaltung zur Analyse

Tabelle 2: Teilschritte der reversen Transkription

Die quantitative *Real-Time* PCR (qPCR) beruht auf dem Prinzip der Polymerasekettenreaktion (PCR), jedoch mit dem Unterschied, dass die qPCR neben der Vervielfältigung auch eine Quantifizierung der DNA ermöglicht.

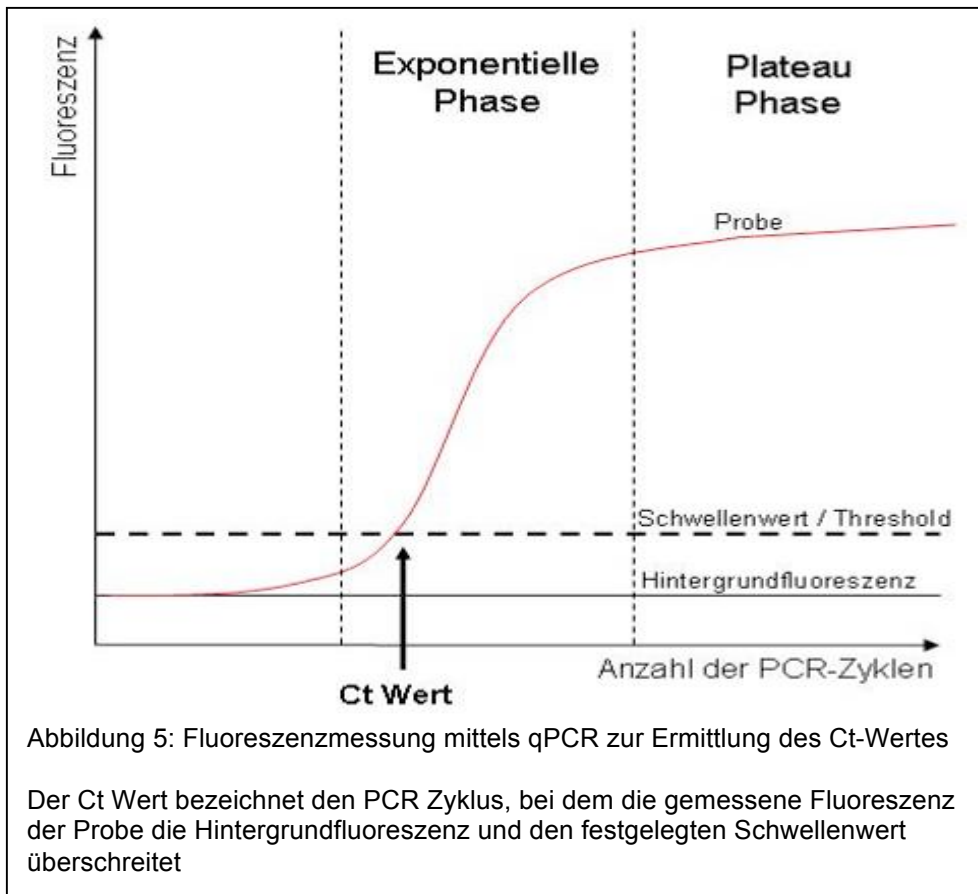
Die Durchführung erfolgte in Triplets mit 20ng cDNA mithilfe des Universal „FastStart PCR Master Mix“ und eines „7900HT *Real-Time* PCR“ System. Die hierfür verwendeten

TaqMan Sonden wurden bei Applied Biosystems erworben und sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Die so erhobenen Daten wurden mit der SDS2.4 und der RQ Manager 1.2.1 Software (Applied Biosystems, Foster City, USA) analysiert. Neben der zu untersuchenden Genexpression wurden auch sogenannte „housekeeper“ für eine Referenzgenexpression untersucht. Hierbei handelte es sich um das Gen der Hypoxanthinphosphoribosyltransferase (*Hprt*). Initial wurden die Proben einmalig auf 95°C für 20 Sekunden erhitzt. Anschließend durchlief die qPCR Reaktion insgesamt 45 Zyklen, wobei jeder Zyklus aus folgenden Teilschritten bestand: 1) Denaturierung der Doppelstränge durch Erhitzung auf 95°C für 1 Sekunde. 2) Primerhybridisierung durch Abkühlung auf 60°C für weitere 20 Sekunden.

Zur Berechnung der relativen Genexpression wurde die „delta-delta-Ct“ Methode verwendet. Hierzu wird eine relative Genexpression ermittelt, indem die gemessene Genexpression des Zielgens auf eine nicht reguliertes „housekeeper“-Gen bezogen wird ( $\Delta Ct$ ). Die Genexpression des Zielgens wird anschließend bezüglich einer naiven Kontrollprobe normalisiert ( $\Delta\Delta Ct$ , siehe Abbildung 6). Der Ct Wert (englisch: cycle of threshold) bezeichnet hierbei den Zyklus, bei dem sich die in der PCR gemessene Fluoreszenz deutlich von der Hintergrundfluoreszenz abhebt. Je früher dies der Fall ist, desto mehr Kopien des untersuchten Gens befanden sich initial in der Probe (siehe Abbildung 5).

Zusätzlich zu den Ct Werten, wurden auch RQ Werte (englisch: relative quantity) berechnet und dargestellt. Die relative Genexpressionsänderung wird hierbei als ein Vielfaches der naiv gemessenen Expression des untersuchten Gens in logarithmischer Weise dargestellt. Diese Darstellung der relativen Genexpressionsänderung ermöglicht eine besonders sensitive Analyse der Genexpressionsregulation im Vergleich zur naiv gemessenen Genexpression.



Schritt 1: Bezug zur endogenen Kontrolle  
 $Ct_{\text{Zielgen}} - Ct_{\text{Referenzgen}} = \Delta Ct_{\text{Probe}}$

Schritt 2: Normalisierung bezüglich der Kontrollprobe  
 $\Delta Ct_{\text{Probe}} - Ct_{\text{naive Kontrolle}} = \Delta \Delta Ct$

Schritt 3: Relative Genexpression (RQ)  
 $2^{-\Delta \Delta Ct}$

Abbildung 6: Die „delta-delta-Ct“ ( $\Delta \Delta Ct$ ) Methode

“TaqMan® Gene Exp Assay” Name	Referenznummer
Il13	Mm00434204_m1
Il4	Mm00445260_m1
Arg1	Mm01190441_g1
Ptgs2	Mm00478374_m1
Stat1	Mm00439531_m1
Stat6	Mm01160477_m1
Mrc1	Mm00485170_m1
Nos2	Mm00440485_m1
Ifng	Mm00801778_m1

“TaqMan® Gene Exp Assay” Name	Referenznummer
Tyrobp	Mm00449152_m1
Trem2	Mm04209424_g1

Tabelle 3: TaqMan® Sonden und deren Referenznummer

## 2.4 Statistik

Die erhobenen Daten wurden mithilfe der Software GraphPad Prism 5.0.2 (GraphPad Software Inc. La Jolla, USA) statistisch analysiert und grafisch dargestellt. Es wurde der Kruskal-Wallis Test und die Dunns Korrektur verwendet, um die einzelnen Gruppen miteinander zu vergleichen und statistische Signifikanzen zu berechnen. Als statistisch signifikant wurden p-Werte  $<0,05$  gewertet, wobei p-Werte  $<0,01$  als statistisch hochsignifikant gewertet wurden.

Weiterhin wurde der Mittelwert (MW) der jeweiligen Gruppe, als auch der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt.

Lediglich die durchflusszytometrische Untersuchung der Gehirne wich von diesem Schema ab. Aufgrund der aus früheren Untersuchungen aus der Arbeitsgruppe bekannt niedrigen zerebralen Leukozytenzahl, wurden an den Untersuchungszeitpunkten je 3-7 halbe Gehirne zu Pools zusammengefügt und analysiert. Somit repräsentieren die dargestellten Datenpunkte der Grafiken der zerebralen Durchflusszytometrie in diesem Fall je Pools, besteht aus 3-7 halben Gehirnen. Aufgrund des Zusammenfügens der Gehirne zu einigen wenigen Pools reduzierte sich das „n“ soweit, dass hier entsprechend leider von einer statistischen Analyse abgesehen werden musste. Aus tierschutzrechtlichen Gründen war es nicht möglich *a posteriori* die Zahl der Tiere zu erhöhen.

### 3. Material

#### 3.1 Allgemeine Chemikalien

Produkt	Hersteller / Händler
Agar	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumchlorid	Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland
Anti-Mouse Fc CD16/CD32	eBioscience, San Diego, USA
Collagenase A	Roche, Risch, Schweiz
DNase Typ IV	Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland
Ethanol	JT Baker, Center Valley, USA
EDTA	Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland
Glucose	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glykogen	Invitrogen, Carlsbad, USA
Isopropanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ketamin	Ceva Tiergesundheit, Düsseldorf, Deutschland
Kochsalzlösung	Fresenius, Schweinfurt, Deutschland
Magermilchpulver	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Pyruvat	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Trizol	Invitrogen, Carlsbad, USA
Trypton	Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland
Xylazine	Ceva Tiergesundheit, Düsseldorf, Deutschland
Xylol	JT Baker, Center Valley, USA

Tabelle 4: Allgemeine Chemikalien und ihre Hersteller

#### 3.2 Zellkulturreagenzien

Produkt	Hersteller / Händler
Hanks gepufferte Salzlösung (HBSS)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Percoll	GE Healthcare Live Science, Freiburg, Deutschland
RPMI 1640	PAA, Pasching, Österreich
Trypan Blau	Live Technologies Corporation, Carlsbad, USA

Tabelle 5: Zellkulturreagenzien und ihre Hersteller

Produkt	Zusammensetzung
Erythrozytenlysepuffer	115mM Ammoniumchlorid 10mM Kaliumbikarbonat 0.086mM EDTA
FACS Puffer	PBS (pH.7.4) 1% FCS

Tabelle 6: Pufferlösungen und ihre Zusammensetzung

### 3.3 Laborausüstung

Produkt	Hersteller / Händler
FACS Canto II	BD Bioscience, San Jose, USA
Kryostat HM560	Microm, Walldorf, Deutschland
Microplate Reader TECAN Infinite 200	Tecan, Grödig, Österreich
Neubauerzählkammer	Assistent, Sondheim, Deutschland
Olympus BX50	Olympus, Tokio, Japan
Real-Time PCR System 7900 HT	Applied Biosystems, Foster City, USA
Sterile Werkbank	Heraeus Christ, Zürich, Schweiz

Tabelle 7: Laborausüstung und ihre Hersteller

### 3.4 Reagenzien für die Histologie

Produkt	Hersteller / Händler
Aceton	Merck, Darmstadt, Deutschland
Aluminiumkalium-dodecahydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland
Chloralhydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Chloroform	Merck, Darmstadt, Deutschland
Eosin-Y	Brunschwig Chemie, Amsterdam Niederlande
Ethanol	JT Baker, Center Valley, USA
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA, Paschin, Österreich
Mayers Hämatoxylin Lösung	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumjodat	Merck, Darmstadt, Deutschland
PBS	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Perjodsäure	VWR, Darmstadt, Deutschland
ROTI-HISTOKITT II	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Schiff'sche Reagenz	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tissue Tek	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Xylol	JT Baker, Center Valley, USA
Vectorshield Mounting Medium with DAPI H1200	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA
Zitronensäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ziegenserum	Vector Laboratories, Burlingame, USA

Tabelle 8: Reagenzien für die Histologie und ihre Hersteller

### 3.5 Antikörper

Produkt	Spezifität	Verdünnung	Hersteller / Händler
Arginase-1	Maus anti Maus	1:500	BD Bioscience, San Jose, USA
CD4	Ratte anti Maus	1:500	BD Bioscience, San Jose, USA
CD11b	Ratte anti Maus	1:100	BD Bioscience, San Jose, USA

Produkt	Spezifität	Verdünnung	Hersteller / Händler
CD206	Ratte anti Maus	1:100 (ZNS)	AbDSerotec, Raleigh USA
CD206	Ratte anti Maus	1:500 (Lunge)	AbDSerotec, Raleigh USA
iNOS	Kaninchen anti Maus	1:500	Calbiochem, Beeston Großbritannien
MHC class II	Ratte anti Maus	unverdünnt	Zellkultur: Hybridomzellen, Klon M5.114.15.2, ATCC, USA
DAP12	Kaninchen anti Mensch	1:100	Novus Biologicals, Littleton, USA
DyLight 649	Ziege anti Ratte	1:300	Dianova, Hamburg, Deutschland
Biotin/Extravidin-Cy3	Hase anti Ratte	1:100	Dianova, Hamburg, Deutschland
Cy3	Ziege anti Hase	1:500	Dianova, Hamburg, Deutschland
Alexa Fluor488	Esel anti Hase	1:300	Live Technologies Corporation, Carlsbad, USA
<b>Sekundärantikörper</b>			
Meerrettich-peroxidase	Ziege anti Ratte	1:100	GE Healthcare Live Science, Freiburg, Deutschland
Meerrettich-peroxidase	Ziege anti Kaninchen	1:100	Dianova, Hamburg, Deutschland

Tabelle 9: Antikörper für die Histologie, deren Spezifität und ihre Hersteller

Spezifität	Fluorochrome	Verdünnung	Hersteller / Händler
CD4	FITC	1:300	BD Bioscience, San Jose, USA
CD11b	PE	1:400	BD Bioscience, San Jose, USA
CD45	APC-Cy7	1:200	BD Bioscience, San Jose, USA
F4/80	PE Cy-7	1:100	eBioscience, San Diego, USA
IL-4 Rezeptor $\alpha$	Biotin	1:100	BD Bioscience, San Jose, USA

Tabelle 10: Antikörper für die Durchflusszytometrie, verwendete Fluorochrome und ihre Hersteller

### 3.6 Kommerzielle Kits

Produkt	Hersteller / Händler
Compensation Particles Anti-Rat/Anti-hamster Ig, $\kappa$ set	BD Bioscience, San Jose, USA
DAKO ARK KIT Peroxidase K3954	DAKO, Hamburg, Deutschland
DNase free Kit	Applied Biosystems, Foster City, USA
High-Capacity cDNA Archive Kit	Applied Biosystems, Foster City, USA
Liquid DAB+ Substrat Chromogen System	DAKO, Hamburg, Deutschland

Tabelle 11: Kommerzielle Kits und ihre Hersteller



#### 4. Ergebnisse

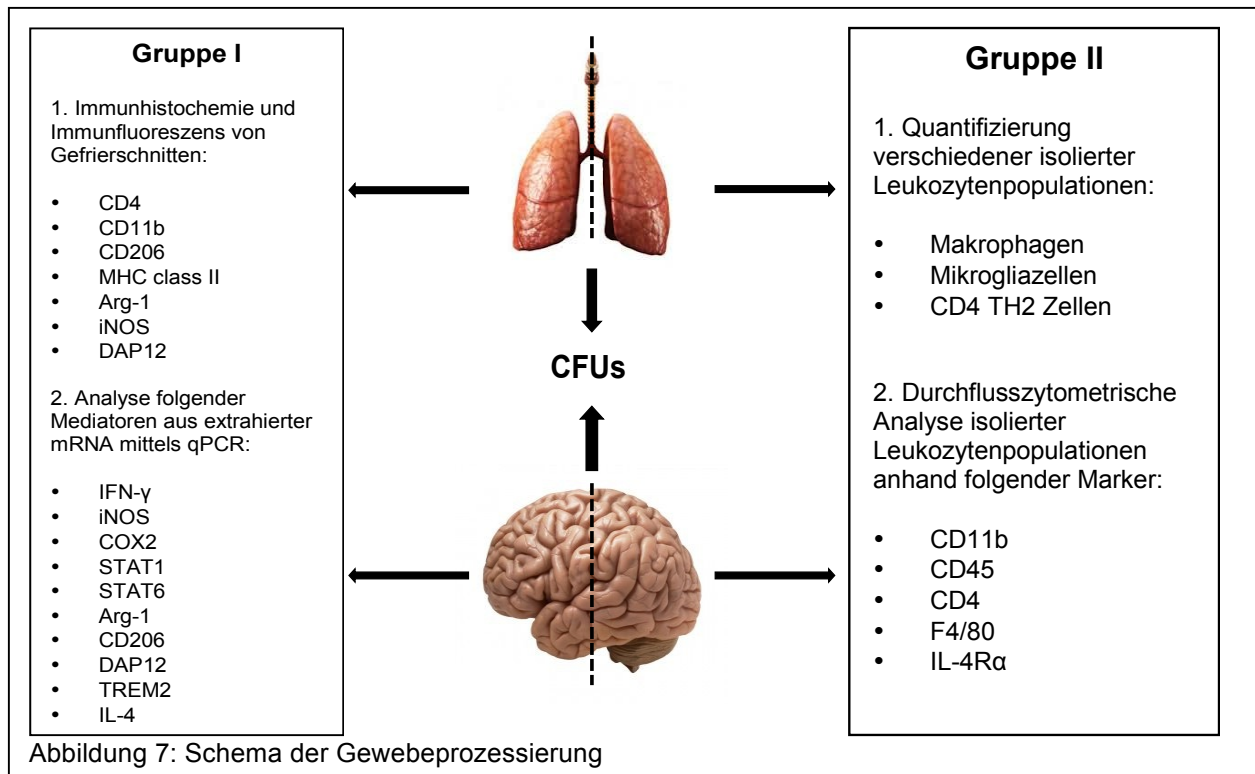
Es wurden Balb/c Mäuse intranasal mit 500 CFUs des hochvirulenten Stammes *C. n.* 1841 infiziert. Untersucht wurden Gehirne und Lungen dieser Tiere an den Tagen 20, 40 und 60 p.i.. Als Referenz diente eine Gruppe nicht infizierter (naiver) Balb/c Mäuse.

Insgesamt wurden pro Zeitpunkt durchschnittlich 14 Mäuse verwendet, die in zwei Gruppen aufgeteilt wurden, wie dies aus der Abbildung 7 ersichtlich wird. Der Pilzbefall wurde bei beiden Gruppen in Form von CFUs bestimmt.

Gruppe I diente zum einen der Charakterisierung des morphologischen Phänotyps sowie der Charakterisierung von Phänomenen, die mit der Invasion von Entzündungszellen *in situ* einhergehen. Zum anderen diente die Gruppe I zur Analyse der zu Grunde liegenden molekularen Prozesse der Makrophagenpolarisierung und –funktion.

Gruppe II diente im Gegensatz dazu zur Quantifizierung und Charakterisierung des immunologischen Phänotyps von residenten und rekrutierten Entzündungszellen. Im Einzelnen wurden pulmonale CD4<sup>+</sup> Lymphozyten, Makrophagen / Monozyten, Alveolarmakrophagen, Riesenzellen und zerebrale CD4<sup>+</sup> Lymphozyten und Mikrogliazellen untersucht und anhand bestimmter Markermoleküle funktionell charakterisiert. Die experimentelle Vorgehensweise führte dazu, dass die durchflusszytometrischen Untersuchungen der Gehirne in Form von Pools mit leicht differierender Größe, bestehend aus mehreren zusammengefügt halben Gehirnen, stattfanden.

Der Abbildung 7 ist die Vorgehensweise der Untersuchungen zu den einzelnen Zeitpunkten zu entnehmen.



#### 4.1 Klinischer Verlauf der murinen Kryptokokkose

Nach inhalativer Infektion mit *C. n.* wurde der Verlauf der pulmonalen und anschließend der zerebralen Kryptokokkose charakterisiert.

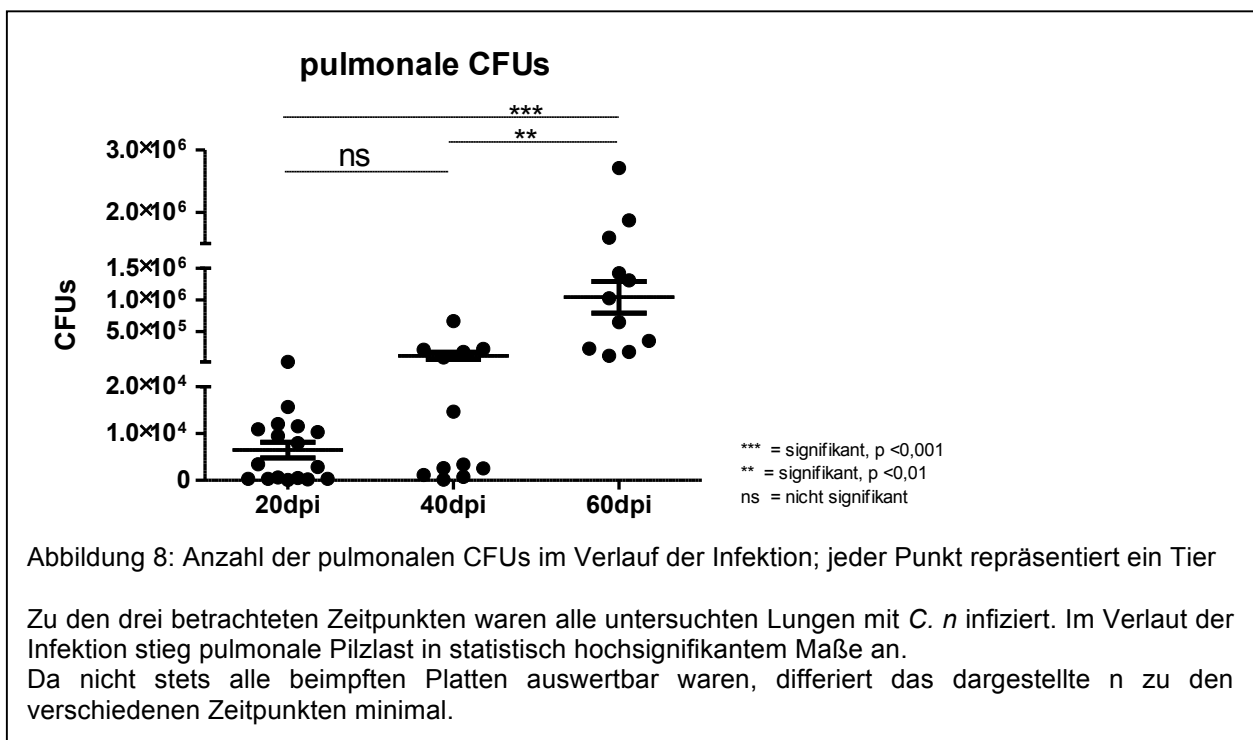
In den 60 Tagen des Beobachtungszeitraumes kam es zu keinem Todesfall in den Versuchsgruppen und zu keinem signifikanten Gewichtsverlust der Mäuse. Weiterhin zeigten sich keine typischen klinischen Krankheitszeichen wie struppiges Fell, Apathie oder neurologische Ausfallerscheinungen.

#### 4.2 Quantifizierung des pulmonalen Pilzbefalles

Wie aus der Abbildung 8 zu entnehmen ist, zeigten 20 Tage nach der Infektion (20dpi) mit *C. n.* alle Tiere einen pulmonalen Pilzbefall. Dieser variierte zwischen 100 und  $\sim 2,4 \times 10^4$  (23.550) CFUs. Im Mittel befanden sich in den Lungen der infizierten Tiere zu diesem Zeitpunkt  $\sim 6,5 \times 10^3$  (6.483) CFUs. Der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) betrug  $\sim 1,7 \times 10^3$  (1.677) CFUs.

In den nächsten 20 Tagen war ein Anstieg der pulmonalen Pilzlast zu beobachten, wie aus Abbildung 8 ersichtlich wird.

An Tag 40 nach der Infektion (40dpi) waren ebenfalls alle untersuchten Lungen mit Pilzen infiziert. Der Befall variierte zwischen  $140$  und  $\sim 6,7 \times 10^5$  (667.500) CFUs. Im Mittel beinhalten die Lungen  $\sim 1,2 \times 10^5$  (116.854) CFUs. Der SEM betrug  $\sim 5,6 \times 10^4$  (56.315) CFUs. Wie in der Abbildung 8 erkennbar ist, stieg die pulmonale Pilzlast im Zeitraum zwischen Tag 40 und 60 p.i. in statistisch signifikantem Maße an. 60 Tage nach der Infektion (60dpi) waren alle Lungen mit Kryptokokken infiziert, wobei die Last der Pilze zwischen  $\sim 1,2 \times 10^5$  (120.000) und  $\sim 2,7 \times 10^6$  (2.710.000) CFUs schwankte. Im Mittel befanden sich zu diesem Zeitpunkt  $\sim 1 \times 10^6$  (1.043.030) CFUs in den infizierten Lungen. Der SEM belief sich auf  $\sim 2,5 \times 10^5$  (249.971) CFUs. Betrachtet man den gesamten Verlauf der Infektion und vergleicht die initiale Pilzlast, an Tag 20 p.i., mit der an Tag 60 p.i., so ist hier ein hochsignifikanter Anstieg festzustellen. Zusammenfassend ist also festzuhalten, dass stets alle Lungen von *C. n.* besiedelt wurden und im gesamten Verlauf der Infektion eine statistisch hochsignifikante Zunahme der Erregerzahl stattfand.



### 4.3 Histopathologische Studie der pulmonalen Kryptokokkose

Wie aus der Abbildung 9 zu entnehmen ist, stellten sich erwartungsgemäß nicht infizierte Lungen in der H&E Färbung regelgerecht pneumatisiert mit intakter Zytoarchitektur dar. Die Lungen waren weiterhin frei von lymphomonozytären entzündlichen Zellinfiltraten. Die Lumina der Bronchien und Alveolen stellten sich frei

dar und beherbergten keine Kryptokokken. Das Epithel war regelrecht niedrigprismatisch und zeigte, je nach Größe der Bronchien und Bronchiolen, einige wenige Becherzellen (siehe Abbildung 10). Anhand der Perjodsäure-Schiff Reaktion (PAS Färbung), die Glykogen, Mukopolysaccharide und andere Mukusbestandteile magenta-rot bis pink anfärbt, ließ sich die zu diesem Zeitpunkt kaum vorhandene Schleimproduktion der Bronchusepithelien illustrieren (Abbildung 11). Bei den vorhandenen Makrophagen handelte es sich um residente und ruhende Alveolarmakrophagen mit vergleichsweise kleinem Zelldurchmesser.

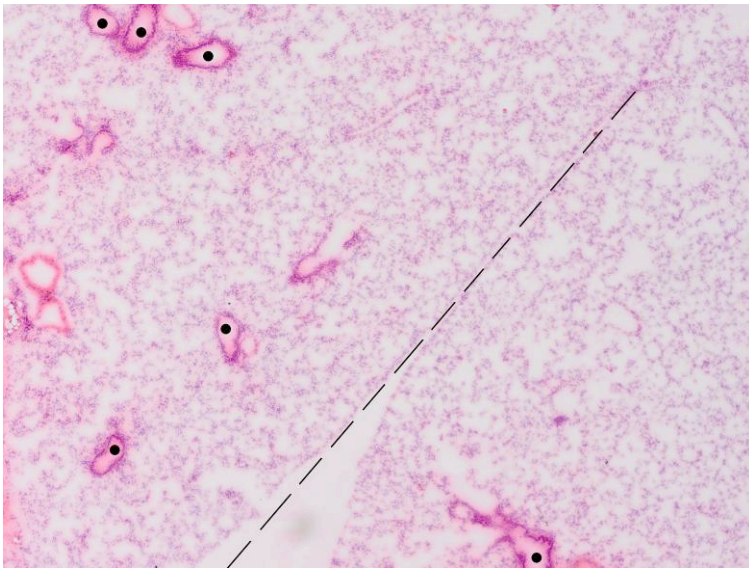


Abbildung 9:  
H&E Färbung, einer nicht infizierten Lunge. 40x Vergrößerung

Das Parenchym der beiden durch eine gestrichelte Linie getrennten Lungenlappen stellt sich zytoarchitektonisch regelrecht dar.

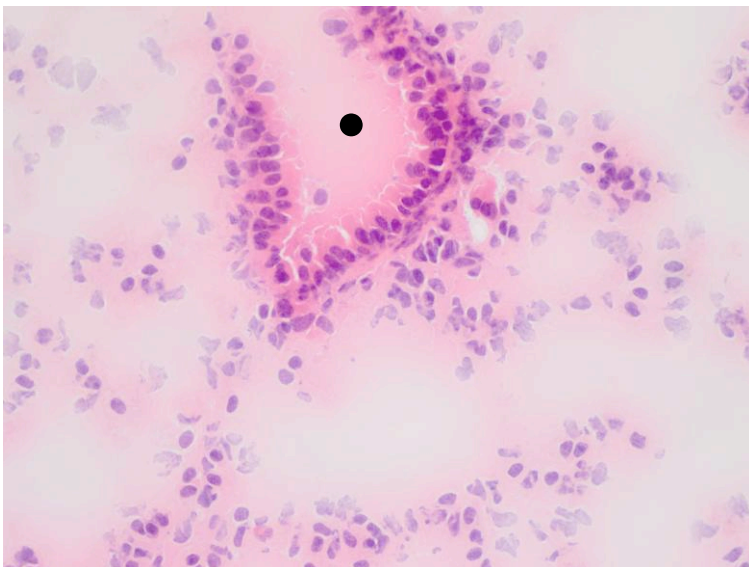


Abbildung 10:  
H&E Färbung, einer nicht infizierten Lunge. 400x Vergrößerung

Der abgebildete Bronchus einer nicht infizierten Lunge stellte sich frei von entzündlich lymphomonozytären Infiltraten und Kryptokokken dar. Das Bronchusepithel war regelrecht niedrigprismatisch.

Legende:  
Punkt (●) = Bronchus

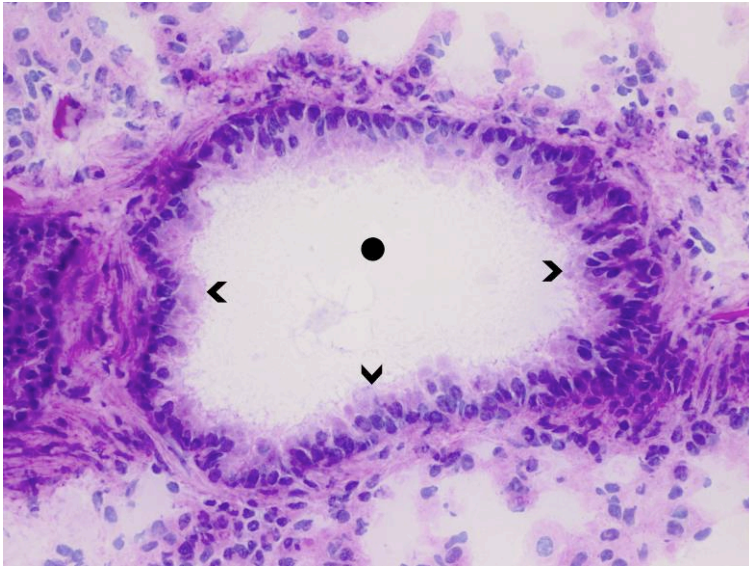


Abbildung 11:  
PAS Färbung, einer nicht infizierten  
Lunge. 400x Vergrößerung

Das Bronchusepithel stellt sich  
regelmäßig niedrigprismatisch mit  
geringem Becherzellbesatz und einer  
physiologischerweise geringen  
Mukosproduktion dar.

Legende:  
Punkt (●) = Bronchus  
Pfeilspitze (>) = Bronchusepithel

20 Tage p.i. änderte sich dieses Bild bereits deutlich. Wie aus Abbildung 12 ersichtlich wird, befanden sich die Kryptokokken mit ihrer meist noch erhaltenen charakteristisch runden Schleimkapsel zu diesem Zeitpunkt vor allem in den Lumina der Bronchien und Alveolen. Ein Teil der Pilze befand sich jedoch bereits im angrenzenden peribronchialen Lungenparenchym (Abbildung 12).

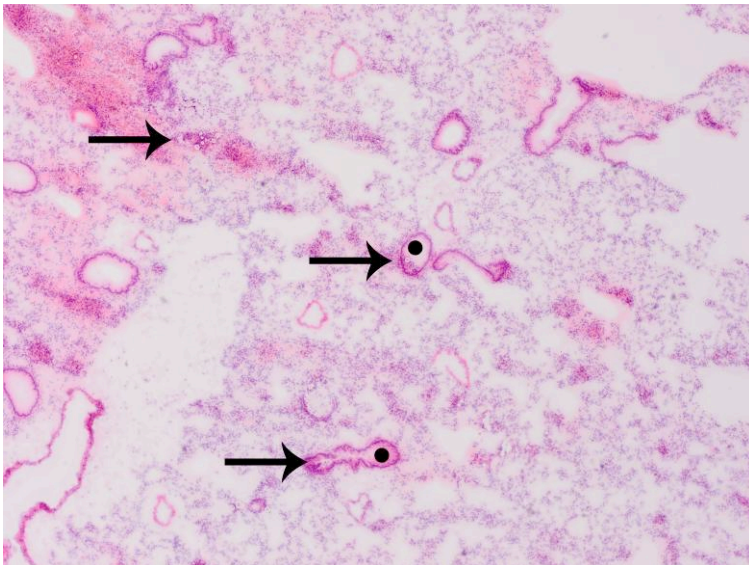


Abbildung 12:  
Lunge, 20dpi, H&E Färbung.  
40x Vergrößerung

Die Zytoarchitektur der Lungen war  
20 Tage p.i. noch weitestgehend  
erhalten. Es zeigten sich einige  
intraluminal und peribronchial  
gelegene Kryptokokken.

Legende:  
Pfeil (→) = *C. n.*  
Punkt (●) = Bronchus

Das in Abbildung 13 mit Pfeilspitzen markierte Epithel zeigte erste Veränderungen. Die Zahl der Becherzellen stieg und das gesamte Epithel wurde hochprismatischer und sekretorisch aktiver. Dies zeigte sich durch den vermehrt intraluminal und intrazellulär vorhandenen PAS<sup>+</sup> Mukus.

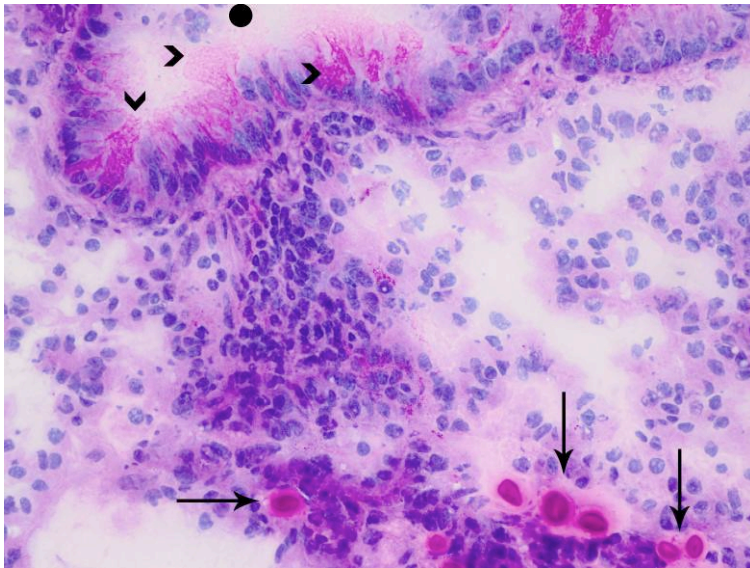


Abbildung 13:  
Lunge, 20dpi, PAS Färbung.  
400x Vergrößerung

Das Epithel des abgebildeten, mit einem Punkt markierten, Bronchus stellte sich als Reaktion auf die Infektion mit *C. n.* hochprismatischer und sekretorisch aktiver dar.

Legende:  
Pfeil (→) = *C. n.*  
Punkt (●) = Bronchus  
Kurzer Pfeil (>) = Bronchusepithel

Begleitet wurden die intraluminal und peribronchial befindlichen Kryptokokken von einem dezenten entzündlichen Infiltrat, welches vornehmlich aus Lymphozyten und einer neu in Erscheinung getretenen Makrophagenpopulation bestand (Abbildungen 14 & 15).

Diese neu aufgetreten Makrophagen unterschieden sich morphologisch von den residenten Alveolarmakrophagen vor allem durch ihren deutlich größeren Zelldurchmesser und ihr feingranuläres und schaumiges Zytoplasma. Diese sog. „Schaumzellen“ stellten sich vielerorts angefüllt mit phagozytierten Pilzen dar.

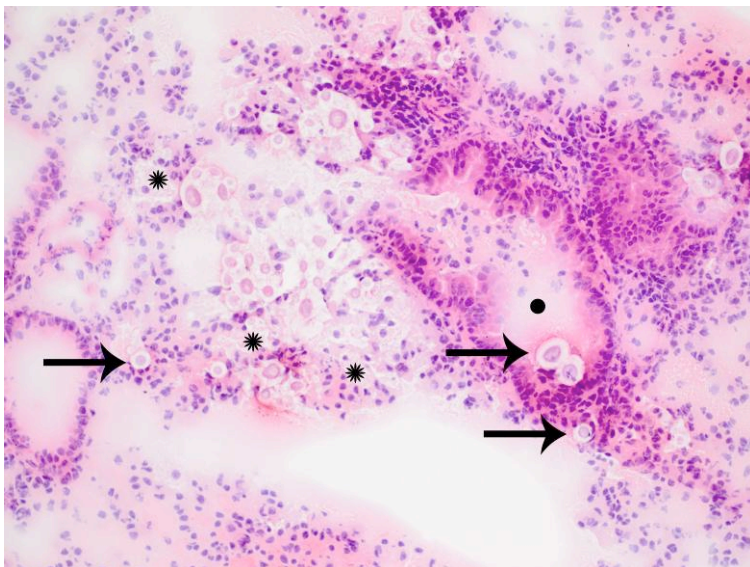


Abbildung 14:  
Lunge, 20dpi, H&E Färbung.  
200x Vergrößerung

Intraluminal und peribronchial gelegene Kryptokokken wurden von einem Entzündungsinfiltrat aus Lymphozyten und einer neuen Makrophagenpopulation (sog. „Schaumzellen“) begleitet.

Legende:  
Pfeil (→) = *C. n.*  
Punkt (●) = Bronchus  
Stern (\*) = großvolumige Makrophagen (sog. „Schaumzellen“)

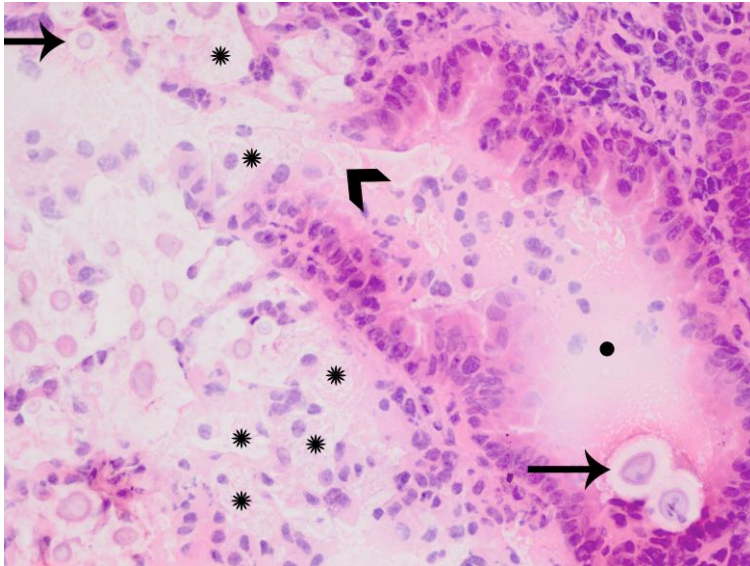


Abbildung 15:  
Lunge, 20dpi, H&E Färbung.  
400x Vergrößerung

Der abgebildete Bronchus zeigte sich an der mit einer Pfeilspitze markierten Stelle in seiner Integrität verletzt. Diese Eintrittspforte für Pilze wurde von großvolumigen Makrophagen gesäumt.

Legende:  
Pfeil (→) = *C. n.*  
Punkt (●) = Bronchus  
Stern (\*) = großvolumige Makrophagen (sog. „Schaumzellen“)

An Tag 40 p.i. waren zunehmend mehr intra- und peribronchial gelegene Kryptokokken zu finden, jedoch beschränkte sich die Infektion nicht mehr strikt auf das peribronchiale Parenchym.

Das *gros* der zuvor intraluminal gelegenen Kryptokokken hatte sich zu fokalen Herden um die Bronchien und Alveolen organisiert. Es bildeten sich, wie in Abbildung 16 mit einem Kreis hervorgehoben, flächig konfluierende Pilzherde, die bereits tief ins Parenchym reichten. Umrandet wurden sie von einem kräftig ausgeprägten Entzündungszellinfiltrat, bestehend aus Makrophagen, Histiocyten und Lymphozyten, im Sinne eines initialen, nicht nekrotisierenden Granuloms. Riesenzellen sah man zu diesem Zeitpunkt noch nicht (Abbildung 16).

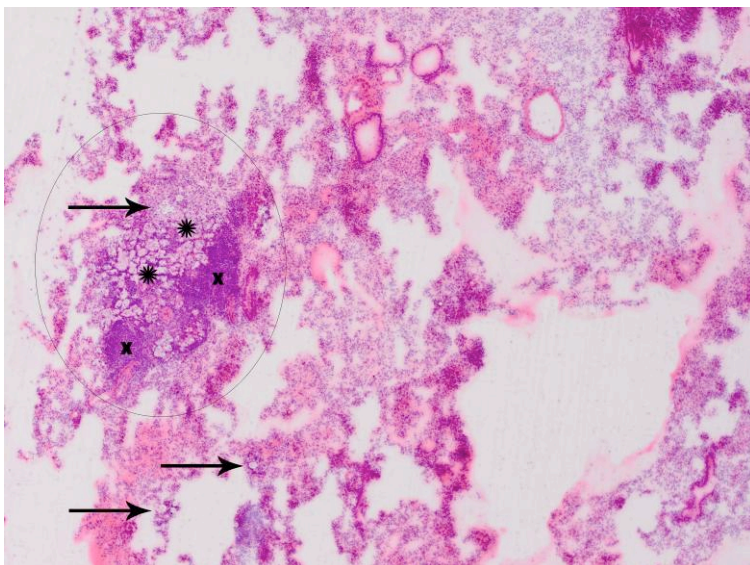


Abbildung 16:  
Lunge, 40dpi, H&E Färbung.  
40x Vergrößerung

Es bildeten sich, wie hier mit einem Kreis hervorgehoben, flächenhafte Pilzherde, die bereits tiefer ins Parenchym reichten und von Entzündungszellen gesäumt wurden.

Legende:  
Pfeil (→) = *C. n.*  
Punkt (●) = Bronchus  
Stern (\*) = Areal mit großvolumigen Makrophagen (sog. „Schaumzellen“)  
Kreuz (X) = Areal mit Lymphozyten

Wie in Abbildung 17 zu erkennen ist, waren die Epithelveränderungen weiter progredient. Das Epithel der Alveolen und Bronchien zeigte sich stark hochprismatisch

mit basalen Zellkernen. Die Durchmesser der Lumina nahmen weiter ab, wodurch die Bronchien teilweise okkludiert erschienen.

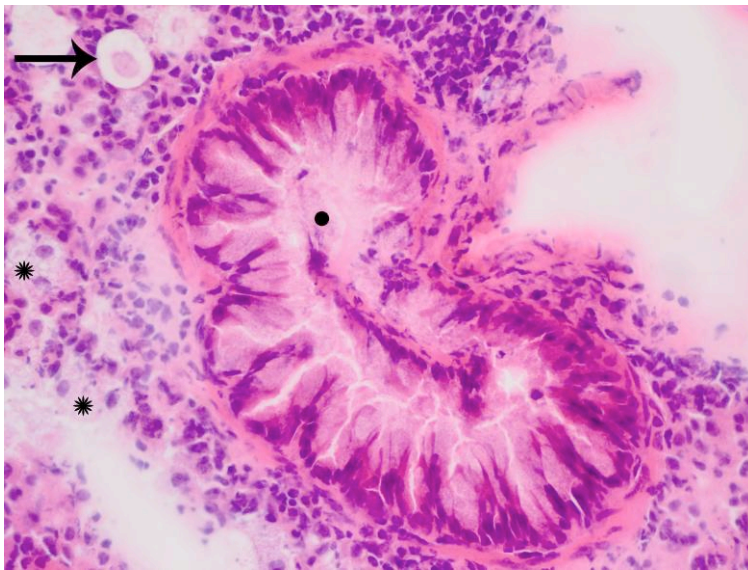


Abbildung 17:  
Bronchus einer Lunge, 40dpi, H&E  
Färbung, 400x Vergrößerung.

Abgebildet ist ein durch deutlich  
gesteigerte Mukusproduktion  
okkludiert erscheinender Bronchus.

Legende:  
Pfeil (→) = *C. n.*  
Punkt (●) = Bronchus  
Stern (\*) = großvolumigen  
Makrophagen  
(sog. „Schaumzellen“)

Der Becherzellgehalt der Bronchusepithelien und damit auch die Mukusproduktion und –sekretion nahmen weiter zu. Dies wird anhand des PAS gefärbten Bronchus auf Abbildung 18 ersichtlich, der durch die mit Pfeilen markierten Kryptokokken und dem kräftig PAS<sup>+</sup> gefärbten Mukus vollständig okkludiert erscheint.

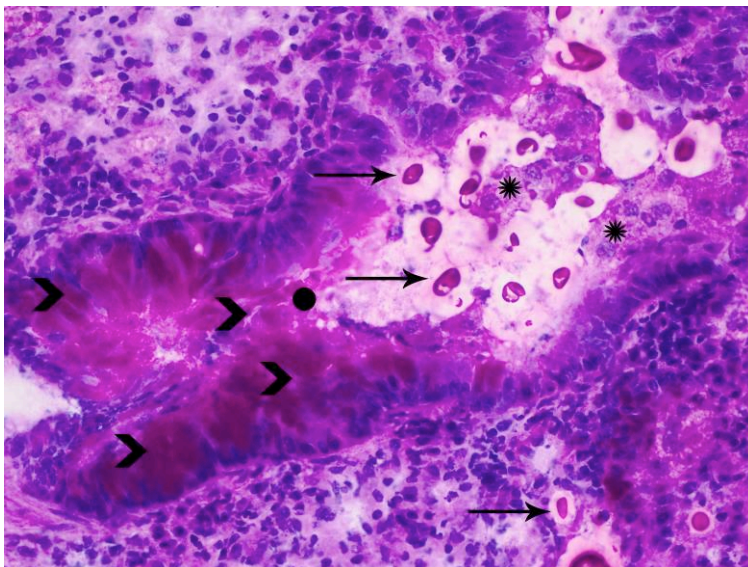


Abbildung 18:  
Bronchus einer Lunge, 40dpi, PAS  
Färbung, 400x Vergrößerung.

Der abgebildete Bronchus schien  
vollständig mit Kryptokokken, Mukus  
und einem lymphomonozytären  
Infiltrat okkludiert.

Legende:  
Pfeil (→) = *C. n.*  
Punkt (●) = Bronchus  
Pfeilspitzen (>) = Bronchusepithel  
Stern (\*) = großvolumige  
Makrophagen (sog. „Schaumzellen“)

Als zelluläre Reaktion auf die Kryptokokkeninvasion stellte sich an Tag 40 p.i. ein bereits deutlich größeres und dichteres entzündliches Zellinfiltrat, bestehend aus Lymphozyten und Makrophagen mit kleinem und großem Zellvolumen dar.

Vielfach fanden sich auch Makrophagen mit intrazellulär gelegenen Kryptokokken, welche einen geringeren Durchmesser als frei vorliegende Kryptokokken zeigten. Eingestreut waren auch granulozytäre Zellelemente mit diffuser Verteilung erkennbar (Abbildung 19).



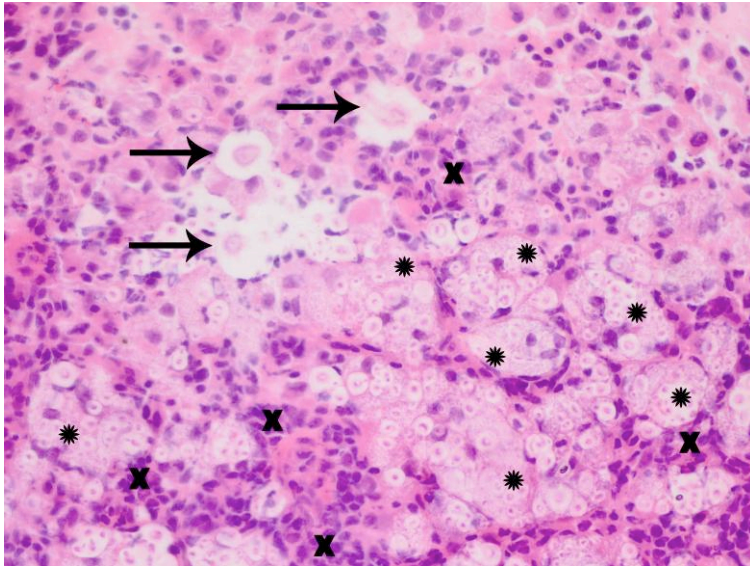


Abbildung 19:  
Lunge, 40dpi, H&E Färbung.  
400x Vergrößerung.

Diese Detailaufnahme des zellulären Entzündungsinfiltrats zeigte Lymphozyten, großvolumige Makrophagen und einzelne frei im Gewebe liegende Kryptokokken.

Legende:  
Pfeil (→) = *C. n.*  
Punkt (●) = Bronchus  
Stern (\*) = großvolumige Makrophagen (sog. „Schaumzellen“)  
Kreuz (X) = Lymphozyten

An Tag 60 p.i., dem Ende des Untersuchungszeitraums, fanden die bisher beschriebenen Veränderungen ihre maximale Ausprägung. Die im naiven Tier noch lockere und stark pneumatisierte Zytoarchitektur der Lunge war vielerorts kaum mehr zu erkennen. Sogenannte Kryptokokkome reichten bis in die Tiefen des Parenchyms und machten nun einen Großteil des Lungengewebes aus. Sie bestanden aus dicht zusammen liegenden, konfluierenden und flächigen Konglomeraten aus Kryptokokken. Begleitet wurden die Konglomerate von einem granulomatös geschichteten und kräftigen Entzündungsinfiltrat. Diese zentral nekrotisierenden Granulome wurden von einem Wall aus Makrophagen, Riesenzellen, Lymphozyten und wenigen Granulozyten gesäumt (Abbildung 20).

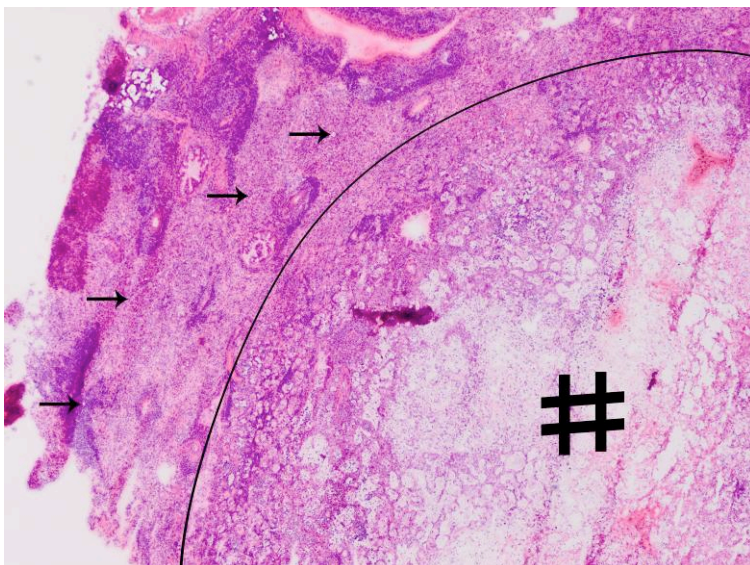


Abbildung 20:  
Lunge, 60dpi, H&E Färbung.  
40x Vergrößerung.

Diese Übersichtsaufnahme illustrierte die flächenhafte Ausbreitung der pulmonalen Kryptokokkose mit Bildung ausgedehnter Granulome, wodurch die reguläre Zytoarchitektur kaum mehr erkennbar war.

Legende:  
Pfeil (→) = *C. n.*  
Doppelkreuz (#) = Kryptokokkom

Das Epithel der Bronchien stellte sich progredient hochprismatisch mit basalen Zellkernen dar (Abbildung 21).

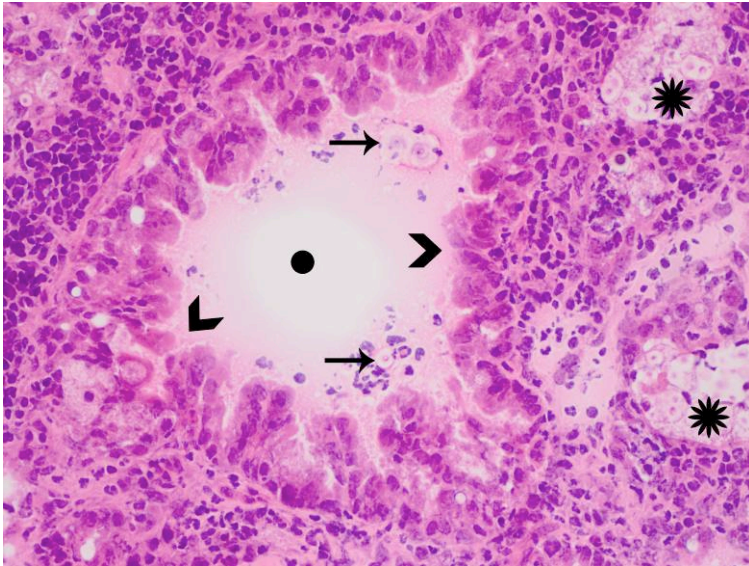


Abbildung 21:  
Lunge, 60dpi, H&E Färbung.  
400x Vergrößerung

Dieser Bronchus zeigte ein für den Zeitpunkt 60dpi typisches, stark hochprismatisches Epithel mit intraluminal persistierenden Kryptokokken.

Legende:  
Punkt (●) = Bronchus  
Pfeilspitzen (>) = Bronchusepithel  
Pfeil (→) = *C. n.*  
Stern (\*) = großvolumige Makrophagen (sog. „Schaumzellen“)

Anhand der PAS Färbung in Abbildung 22 ließ sich die deutliche Becherzellhyperplasie mit konsekutiv übersteigter Mukusproduktion illustrieren. Die Lumina der Bronchien und Alveolen waren nun vielerorts durch die beschriebenen Epithelveränderungen in Verbindung mit in den Lumina persistierenden Kryptokokken vollständig okkludiert.

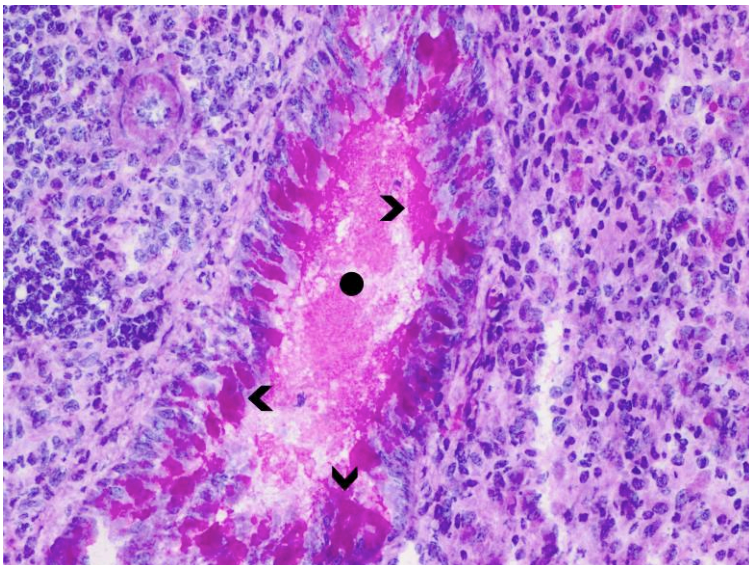


Abbildung 22:  
Lunge, 60dpi, PAS Färbung.  
400x Vergrößerung

Die kräftig magenta bis pinke Färbung des abgebildeten Bronchus und seines Epithels, spiegelt die übersteigerte Mukusproduktion wider.

Legende:  
Punkt (●) = Bronchus  
Pfeilspitzen (>) = Bronchusepithel

Wie bereits erwähnt und auf Abbildung 23 illustriert, kam es in den Lungen 60 Tage nach der Infektion mit *C. n.* zur Bildung fester, derber und bereits makroskopisch fühl- und sichtbarer Knoten.

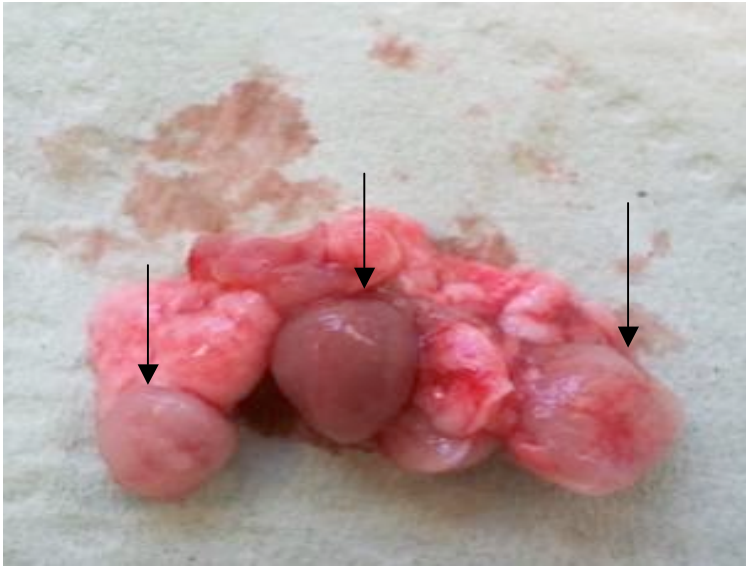


Abbildung 23:  
Makroskopisches Präparat einer mit *C. n.* infizierten und frisch resizierten murinen Lunge, 60dpi

60 Tage p.i. waren bereits makroskopisch derbe Knoten innerhalb der untersuchten Lungen fühl- und sichtbar.

Das histomorphologische Korrelat dieser Knoten waren Granulome, in diesem speziellen Fall auch Kryptokokkome, von enormer Größe und mit zentraler Nekrose. Diese Granulome waren angefüllt mit Kryptokokken, wie dies aus Abbildung 24 ersichtlich wird. Die Granulome wurden von einem mehrschichtigen Randwall aus Entzündungszellen gesäumt, wie dies auf Abbildung 24 zu erkennen ist. Die innere, den Kryptokokken direkt anliegende Schicht bestand vornehmlich aus großvolumigen Makrophagen, Histozyten und einigen mehrkernigen Riesenzellen. Die äußere Schicht bestand vor allem aus lymphozytären Zellen.

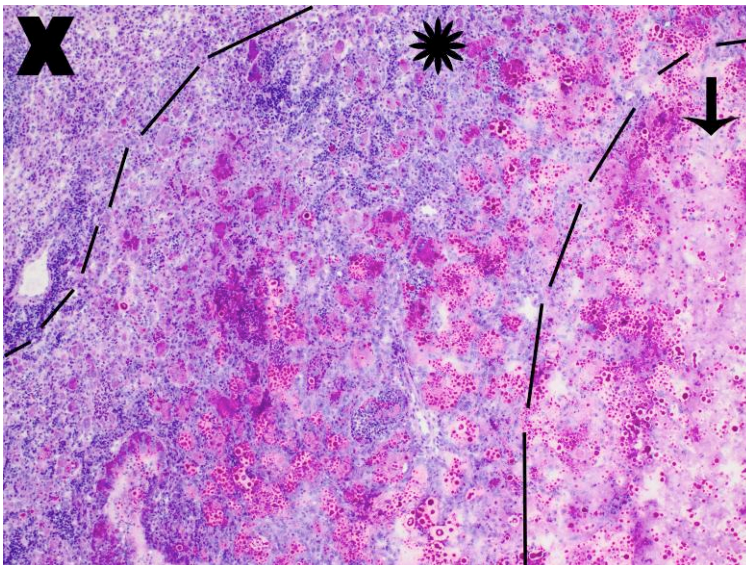


Abbildung 24:  
Lunge, 60dpi, PAS Färbung.  
100x Vergrößerung

Die Schichtung eines Kryptokokkoms ist mit gestrichelten Linien verdeutlicht. Das rechts gelegene und zentral nekrotisierende Kryptokokkom bestand aus Kryptokokken, großvolumigen Makrophagen und Riesenzellen, mit einem Lymphozytensaum.

Legende:  
Pfeil (→) = *C. n.*  
Stern (\*) = großvolumige Makrophagen (sog. „Schaumzellen“)  
Kreuz (X) = Lymphozyten

Die an Tag 20 p.i. erstmals aufgetretenen schaumzellig großen Makrophagen stellen nun auch außerhalb der Granulome morphologisch den Großteil der vorhandenen Makrophagenpopulation dar (Abbildung 25).

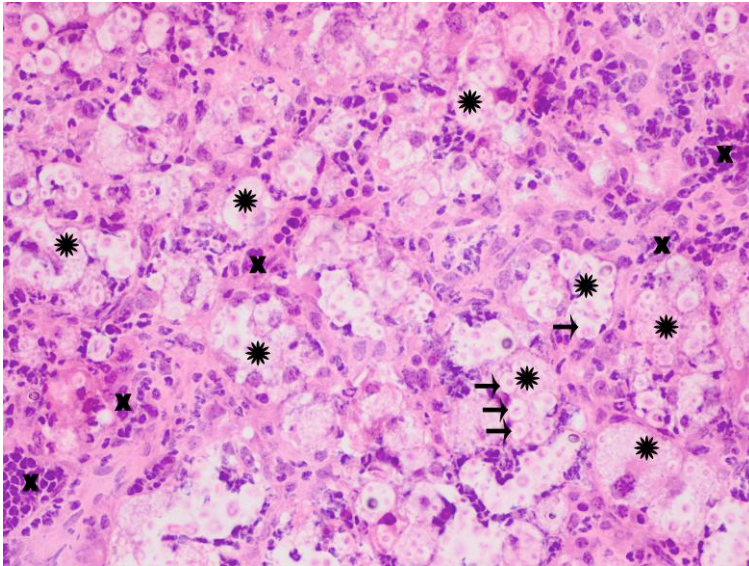


Abbildung 25:  
Lunge, 60dpi, H&E Färbung.  
400x Vergrößerung

Das zelluläre Entzündungsinfiltrat bestand vornehmlich aus großvolumigen schaumzelligem Makrophagen, vielfach mit *C. n.* gefüllt, und Lymphozyten.

Legende:  
Pfeil (→) = *C. n.*  
Stern (\*) = großvolumige Makrophagen (sog. „Schaumzellen“)  
Kreuz (X) = Lymphozyten

Assoziiert mit der Entstehung der beschriebenen Granulome zum Zeitpunkt 60dpi war das Auftreten einer neuen, noch großvolumigeren Makrophagenpopulation. Diese mehrkernigen Riesenzellen vom sog. Langhanstyp befanden sich im inneren Ring des Randwalles der Granulome (Abbildung 24).

Wie auch das Auftreten von Granulomen, war das Auftreten von mehrkernigen Riesenzellen ein Novum zu diesem Zeitpunkt und wurde an keinem anderen untersuchten Zeitpunkt gefunden. Die Riesenzellen beinhalteten zumeist zahlreiche kleine Kryptokokken bzw. deren Fragmente (Abbildungen 26 & 27).

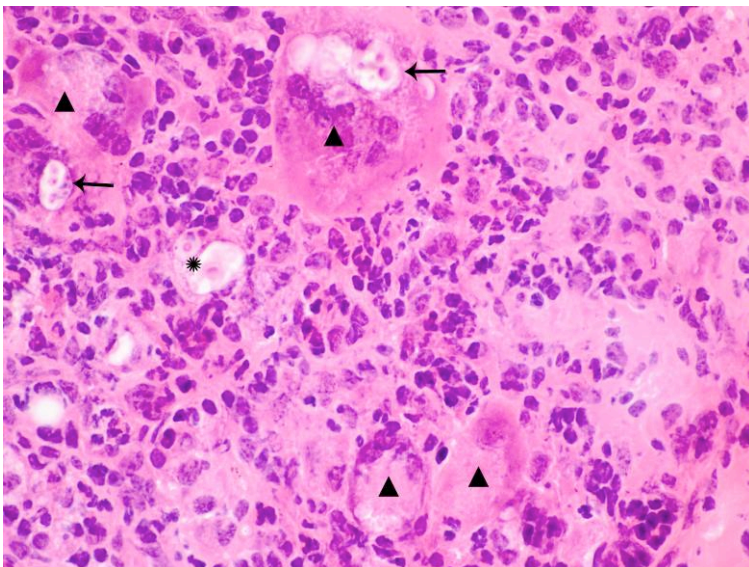


Abbildung 26:  
Lunge, 60dpi, H&E Färbung.  
600x Vergrößerung

Der Ausschnitt aus dem Randwall des auf Abbildung 24 abgebildeten Granuloms zeigte neben den großvolumigen Makrophagen auch erstmals noch größere und mehrkernige Riesenzellen.

Legende:  
Pfeil (→) = *C. n.*  
Dreieck (▲) = mehrkernige Riesenzellen

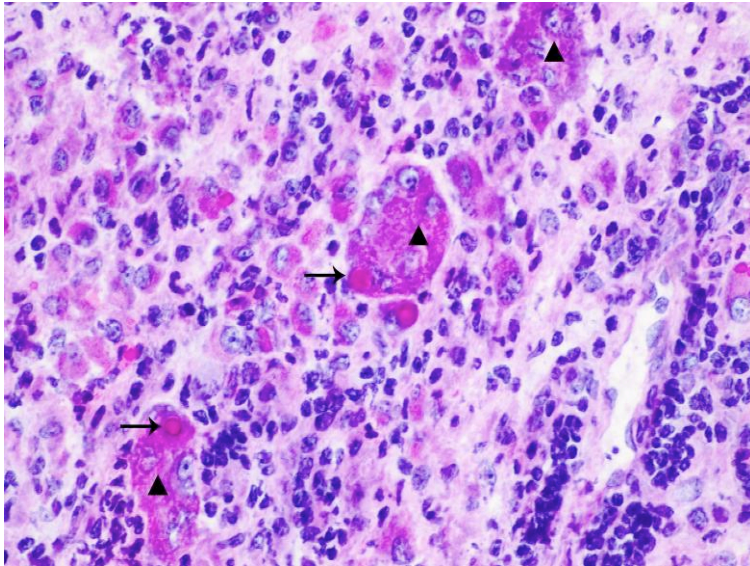


Abbildung 27:  
Lunge, 60dpi, PAS Färbung  
600x Vergrößerung

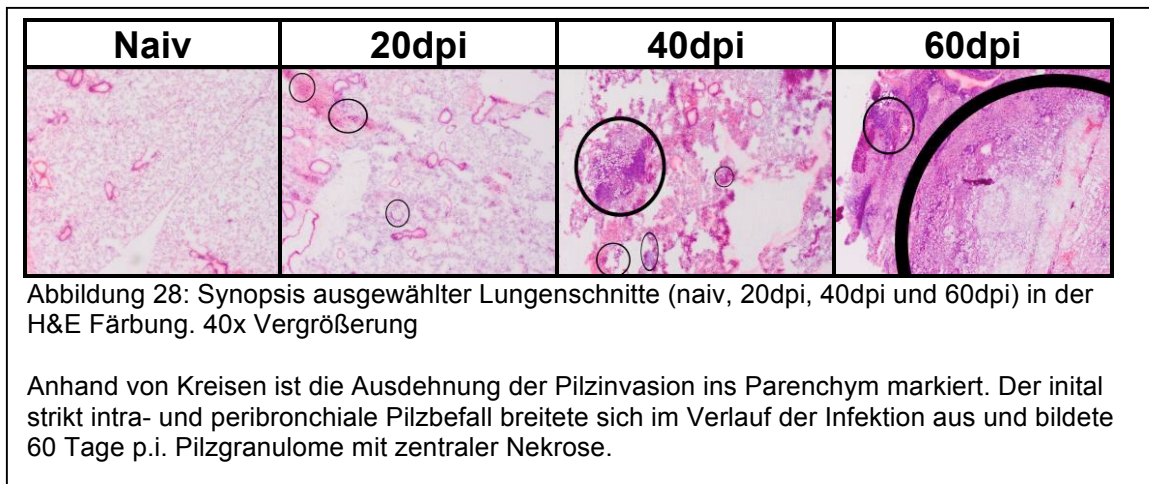
Die mit einem Dreieck markierten Riesenzellen aus der inneren Schicht des Kryptokokkoms auf Abbildung 24 enthielten kräftig magenta bis pink gefärbte intrazellulär persistierende Kryptokokken.

Legende:  
Pfeil (→) = *C. n.*  
Dreieck (▲) = mehrkernige Riesenzellen

Betrachtet man zusammenfassend die Entwicklung des histomorphologischen Bildes der pulmonalen Kryptokokkose, so ist festzustellen, dass sich die Kryptokokken nach intranasaler Applikation initial intra- und peribronchial befanden und im Verlauf der Infektion zu immer größeren Ansammlungen konfluieren und bis in die Tiefen des Parenchyms reichten. 60 Tage p.i. kam es zur Bildung von Pilzgranulomen mit Riesenzellen und zentraler Nekrose (Abbildung 28).

Die Bronchien zeigten im Verlauf der Infektion progrediente Veränderungen. Ihr Epithel wurde zunehmend hochprismatischer und zeigte vermehrt eine Becherzellhyperplasie mit konsekutiv übersteigter Mukusproduktion.

Das zelluläre Entzündungsinfiltrat nahm analog zum Pilzbefall im Verlauf der Infektion quantitativ zu. Beginnend ab Tag 20 p.i. bestand es aus zunehmend mehr großvolumigen schaumzelligen Makrophagen und Lymphozyten. 60 Tage p.i. traten in Assoziation mit der Granulomformation auch erstmals mehrkernige Riesenzellen auf.



#### 4.4 Morphologische und funktionelle Charakterisierung der Entzündungsreaktion der pulmonalen Kryptokokkose mittels Immunhistochemie

In den Lungen von nicht infizierten Tieren stellte sich, wie anhand der H&E Färbung bereits erläutert, eine reguläre Zytoarchitektur mit wenigen, diffus verteilten Alveolarmakrophagen dar. Diese waren neben ihrer typischen Morphologie anhand ihrer CD11b Expression zu identifizieren (Abbildung 29). CD11b ist ein heterodimeres Integrin, das auf der Oberfläche vieler Leukozyten exprimiert wird und eine regulatorische Funktion im Kontext von Inflammation im Allgemeinen zeigt. CD11b wird besonders kräftig auf den Zelloberflächen von Monozyten und Makrophagen, sowie auf Mikrogliazellen exprimiert.

Der Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse II (englisch: major histocompatibility complex class II, abgekürzt: MHC class II) kann, neben seiner geringen konstitutionellen Expression auf APCs, durch Aktivierung induziert werden. In den untersuchten naiven Lungen zeigte sich nur eine schwache konstitutionelle Expression von MHC class II auf den Alveolarmakrophagen, nicht jedoch eine Aktivierung (Abbildung 30).

Der Mannoserezeptor CD206, als ein Marker der sog. alternativen (M2-) Makrophagenaktivierung, wurde in den naiven Lungen nur sehr schwach konstitutionell von einigen Alveolarmakrophagen in den Bereichen um die Bronchien exprimiert (Abbildung 31).

Arg-1 ist ein Enzym, welches neben dem Harnstoffzyklus auch in Makrophagen produziert wird und dort als ein Marker der alternativen (M2-) Makrophagenaktivierung gewertet wird. Wie aus Abbildung 32 ersichtlich wird, wurde Arg-1 im nicht infizierten Tier schwach von Alveolarmakrophagen exprimiert. Die kräftige Braunfärbung des

Bronchusepithels in der Arg-1 Färbung ist hier als interne Kontrolle der Färbung zu werten, da das Bronchusepithel dieses Enzym kräftig konstitutionell produziert.

Ein „Marker“ der sog. klassischen (M1-) Makrophagenaktivierung, die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS), wurde von den Alveolarmakrophagen in naiven Lungen nicht produziert (Abbildung 33).

Es ist also insgesamt davon auszugehen, dass Alveolarmakrophagen konstitutionell einen alternativ aktivierten, „antiinflammatorischen“ M2-Phänotyp aufweisen, da sie sich mit sämtlichen entsprechenden Markern signifikant wenngleich auch relativ schwach anfärben ließen.

Neben den Makrophagen befanden sich in den Lungen nicht infizierter Tiere, außerhalb von Lymphknoten, nur vereinzelt und diffus verteilte CD4<sup>+</sup> Lymphozyten (Abbildung 34)

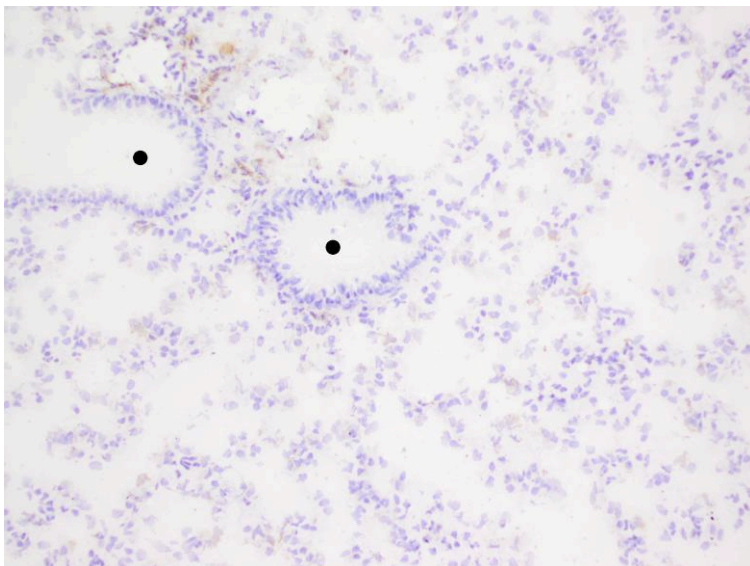


Abbildung 29:  
Lunge, naiv, CD11b Färbung.  
200x Vergrößerung

Naive Lungen zeigten nur wenige und diffus verteilte CD11b<sup>+</sup> Alveolarmakrophagen.

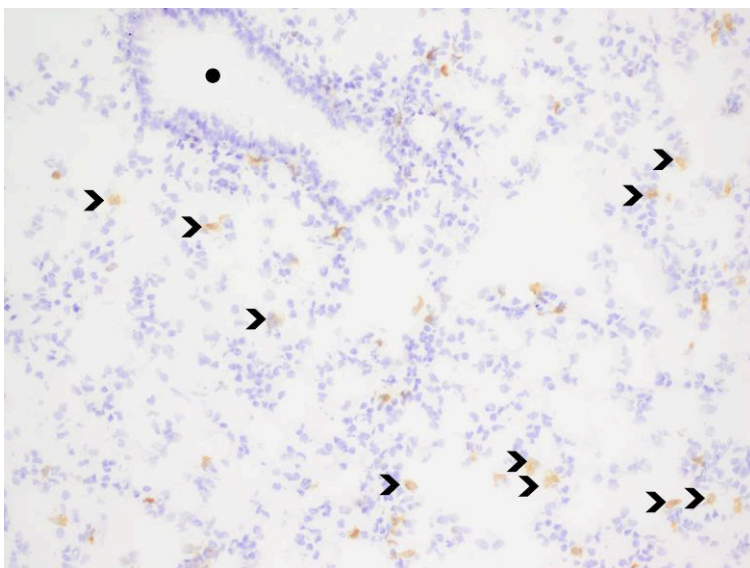


Abbildung 30  
Lunge, naiv, MHC class II Färbung.  
200x Vergrößerung

Die nur schwachbraune Färbung der Alveolarmakrophagen weist auf eine konstitutionelle Expression, nicht jedoch auf eine Aktivierung hin.

Legende:  
Punkt (●) = Bronchus  
Pfeilspitzen (>) =  
Alveolarmakrophagen

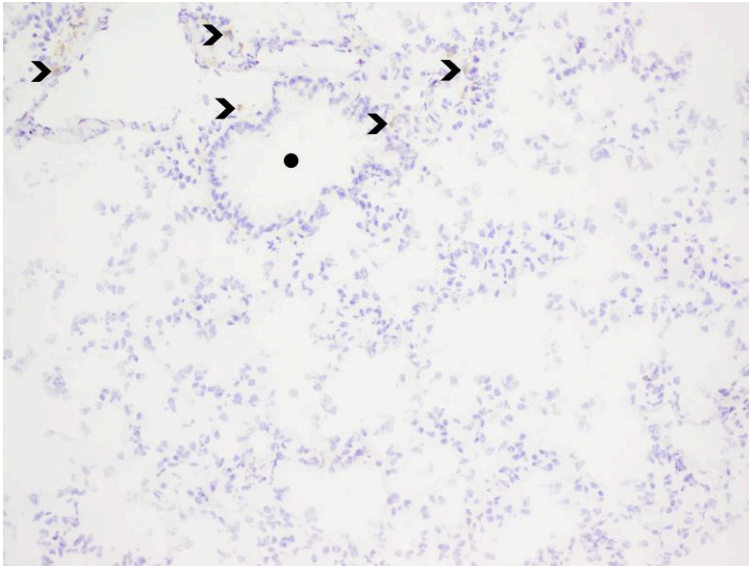


Abbildung 31:  
Lunge, naiv, CD206 Färbung.  
200x Vergrößerung

Einige kleine residente Alveolarmakrophagen zeigten bereits physiologisch eine schwache CD206 Expression.

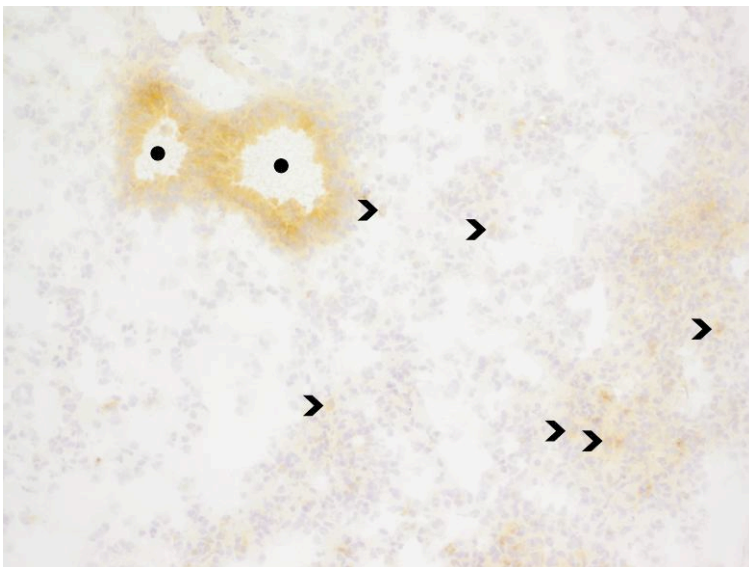


Abbildung 32:  
Lunge, naiv, Arg-1 Färbung.  
200x Vergrößerung

Aufgrund konstitutioneller Expression stellt sich das Epithel der Bronchien kräftig Arg-1<sup>+</sup> dar. Die Alveolarmakrophagen zeigten dahingegen nur eine schwache konstitutionelle Arg-1 Expression.

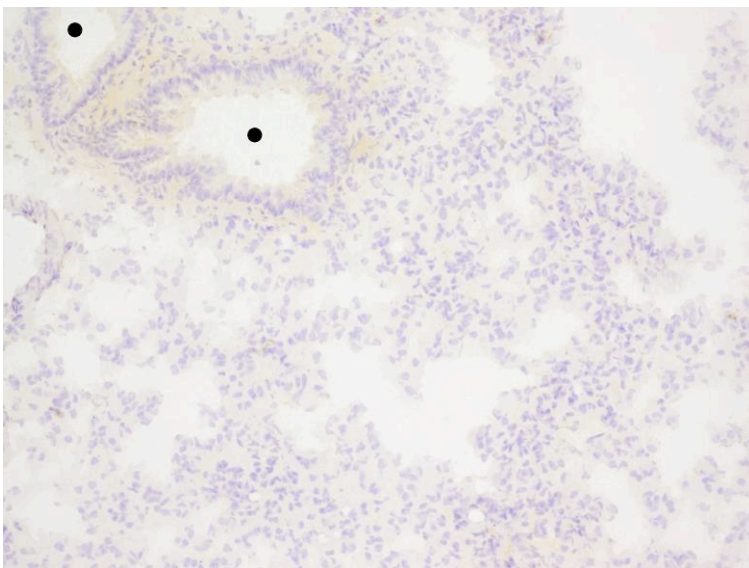


Abbildung 33:  
Lunge, naiv, iNOS Färbung.  
200x Vergrößerung

In den Lungen nicht infizierter Tiere fanden sich keine Zellen die positiv in der iNOS Färbung dargestellt waren, insbesondere keine Alveolarmakrophagen.

Legende:  
Punkt (●) = Bronchus  
Pfeilspitzen (>) =  
Alveolarmakrophagen



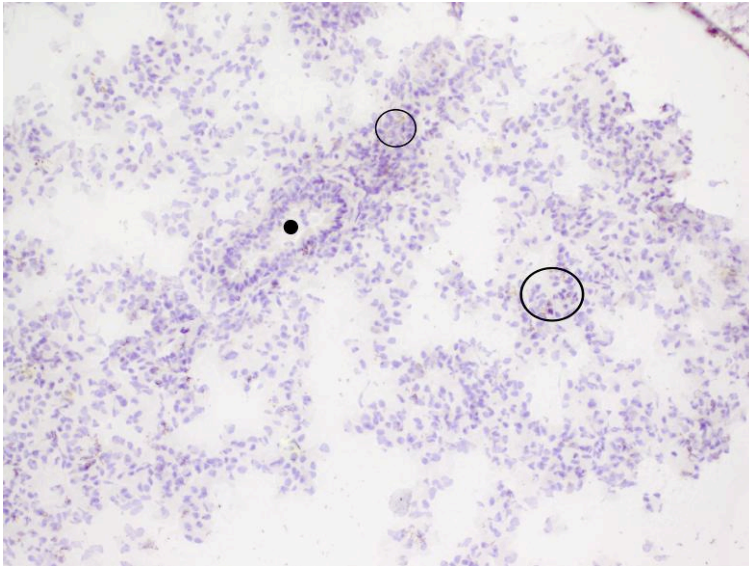


Abbildung 34:  
Lunge, naiv, CD4 Färbung.  
200x Vergrößerung

In der physiologischen Situation fanden sich außerhalb von Lymphknoten nur vereinzelte und diffus verteilte CD4<sup>+</sup> Lymphozyten.

Legende:  
Punkt (●) = Bronchus  
Pfeilspitzen (>) =  
Alveolarmakrophagen  
Kreis (O) = CD4<sup>+</sup> Lymphozyten

Diese Situation änderte sich 20 Tage nach der Infektion mit *C. n.* in den Bereichen, die Kontakt zu Pilzherden hatten. Die Menge der kräftig CD11b<sup>+</sup>, kleinen Alveolarmakrophagen nahm sichtbar zu (Abbildung 35). Als Reaktion auf die Infektion fand eine Aktivierung dieser Makrophagen statt, was anhand des deutlich vermehrt exprimierten Aktivierungsmarkers MHC class II zu sehen war (Abbildung 36). Wie auf den Abbildungen 37 und 38 zu erkennen ist, zeigten diese Makrophagen eine leicht verstärkte Produktion von Arg-1 und CD206 im Vergleich zum nicht infizierten Tier. Auch die in der H&E Färbung bereits erwähnten, an Tag 20 erstmals aufgetretenen, schaumzelligen großvolumigen Makrophagen waren CD11b<sup>+</sup> angefärbt (Abbildung 35). Diese Population von großen Makrophagen färbte sich mit CD206 und MHC class II positiv an, jedoch nicht mit Arg-1 (Abbildungen 36-38). Abbildung 39 zeigt, dass sich auch an Tag 20 noch keine iNOS<sup>+</sup> Zellen fanden.

Somit zeigten zu diesem Zeitpunkt beide Makrophagenpopulationen einen sog. M2-Phänotyp, jedoch mit unterschiedlichem immunhistochemischen Profil und daher wahrscheinlich auch mit unterschiedlicher Funktion.

Alveolarmakrophagen waren CD11b<sup>+</sup> Arg-1<sup>dim</sup> CD206<sup>dim</sup> (iNOS<sup>-</sup>).

Schaumzellige Makrophagen waren CD11b<sup>+</sup> MHC class II<sup>+</sup> CD206<sup>+</sup> (iNOS<sup>-</sup>).

Die Anzahl der CD4<sup>+</sup> Lymphozyten nahm im Vergleich zum nicht infizierten Tier leicht zu (Abbildung 40).

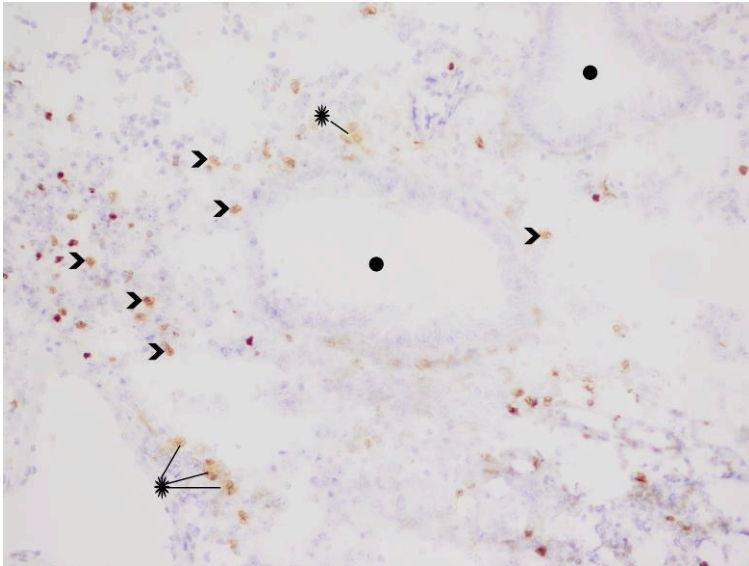


Abbildung 35:  
Lunge, 20dpi, CD11b Färbung.  
200x Vergrößerung

20 Tage p.i. fand sich neben einer gesteigerten Anzahl kleiner Alveolarmakrophagen auch erstmals eine neue, großvolumige Makrophagenpopulation. Diese ist hier mit Sternen markiert.

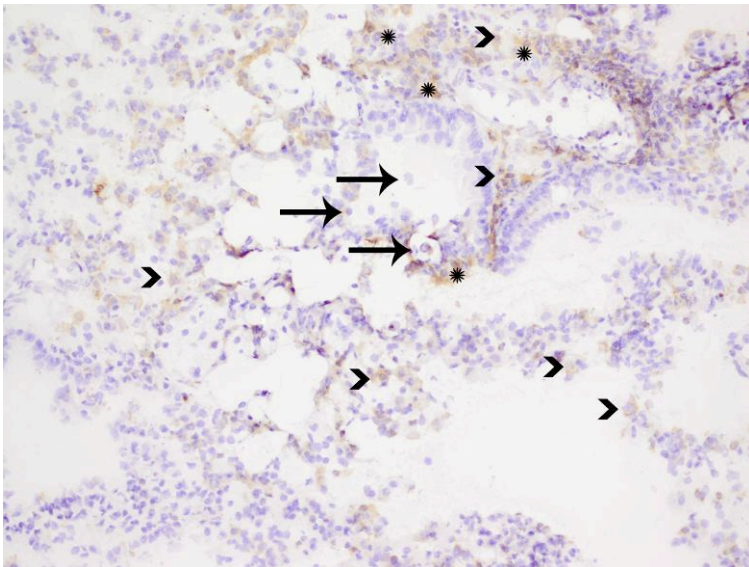


Abbildung 36:  
Lunge, 20dpi, MHC class II Färbung.  
200x Vergrößerung

20 Tage p.i. stellten sich vermehrt kleine Alveolarmakrophagen in der MHC class II Färbung dar. Die erstmals aufgetretenen großvolumigen Makrophagen stellten sich ebenfalls MHC class II<sup>+</sup> dar.

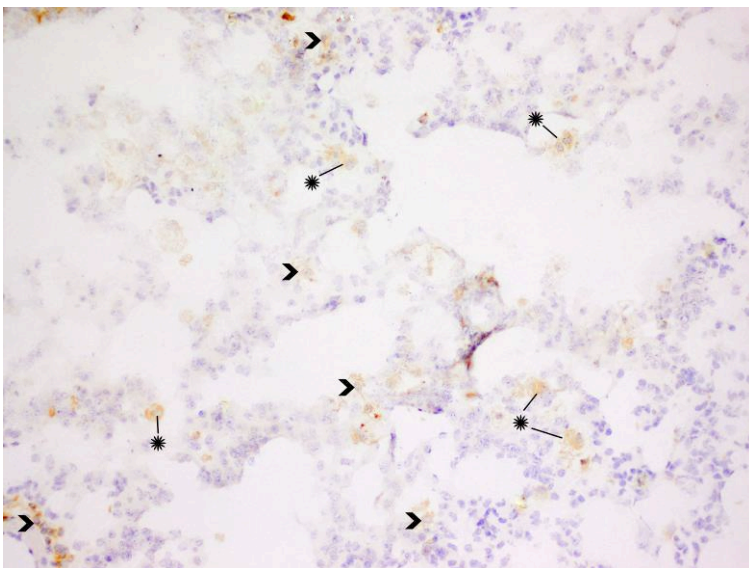


Abbildung 37:  
Lunge, 20dpi, CD206 Färbung.  
200x Vergrößerung

Peribronchial zeigte sich eine stärkere CD206 Reaktivität von Alveolarmakrophagen. Darüber hinaus stellten sich auch die neu aufgetretenen schaumzelligen Makrophagen CD206<sup>+</sup> dar.

Legende:  
Pfeilspitzen (>) =  
Alveolarmakrophagen  
Stern (\*) = großvolumige  
Makrophagen (sog. „Schaumzellen“)

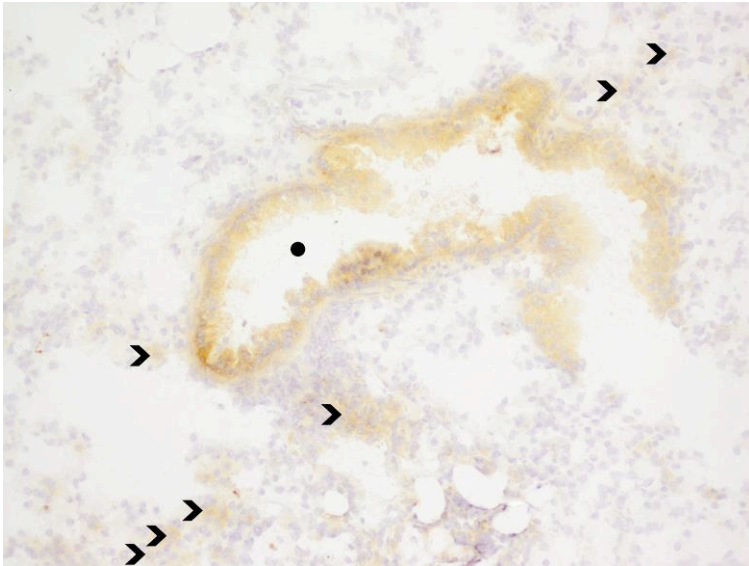


Abbildung 38:  
Lunge, 20dpi, Arg-1 Färbung.  
200x Vergrößerung

Neben der kräftigen konstitutionellen Arg-1 Expression der Bronchien stellten sich ausschließlich kleine Alveolarmakrophagen Arg-1<sup>+</sup> dar.

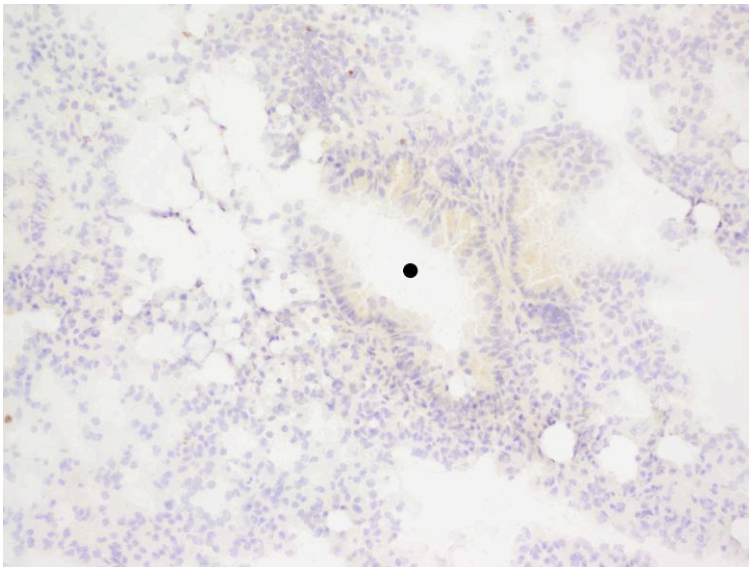


Abbildung 39:  
Lunge, 20dpi, iNOS Färbung.  
200x Vergrößerung

20 Tage p.i. zeigten sich weder kleine Alveolarmakrophagen noch großvolumige schaumzellige Makrophagen iNOS<sup>+</sup>.

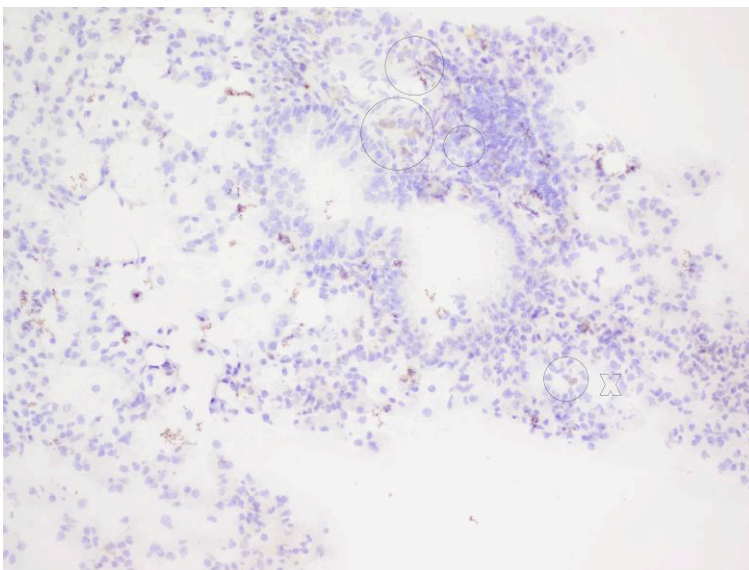


Abbildung 40:  
Lunge, 20dpi, CD4 Färbung.  
200x Vergrößerung

20 Tage p.i. fanden sich vermehrt CD4<sup>+</sup> Lymphozyten. Diese stellten sich nicht mehr diffus, sondern peribronchial gruppiert dar.

Legende:  
Kreis (O) = CD4<sup>+</sup> Lymphozyten  
Pfeilspitzen (>) =  
Alveolarmakrophagen  
Punkt (●) = Bronchus

40 Tage p.i. änderten sich die an den Pilzherden vorherrschenden immunhistochemischen Charakteristika der entzündlichen Infiltrate weiter.

Die Anzahl der großvolumigen, schaumzelligen CD11b<sup>+</sup> Makrophagen nahm im Vergleich zum Zeitpunkt 20dpi deutlich zu (Abbildung 41).

Ein Teil dieser Makrophagen ließ sich mit einem Antikörper gegen iNOS anfärben, was auf eine NO Produktion (mikrobizid) und somit auf eine sog. klassische M1-Polarisierung hinwies (Abbildung 45).

Eine andere Makrophagenpopulation, mit ebenfalls großem Zellvolumen, zeigte eine Expression von CD206 (Abbildungen 43 & 54).

Die CD11b<sup>+</sup> Alveolarmakrophagen zeigten keine weitere Vermehrung. Ihr diffus verteiltes Auftreten entsprach weiterhin eher der naiven Situation, wohingegen die großvolumigen Makrophagen eine deutliche Assoziation zu den Bronchien und sich formierenden Granulomen zeigten.

Die Immunreaktivität für Arg-1 nahm bei den Alveolarmakrophagen im Vergleich zum Zeitpunkt 20dpi deutlich zu, wobei sich keine großvolumigen Makrophagen Arg-1<sup>+</sup> zeigten (Abbildung 44). Wie auf Abbildung 43 zu erkennen ist, zeigten einige dieser Alveolarmakrophagen weiterhin eine schwache Expression für CD206.

Auch zu diesem Zeitpunkt zeigten die kleinen Alveolarmakrophagen keine Immunreaktivität für iNOS (Abbildung 45). Somit wiesen die Alveolarmakrophagen weiterhin einen „antiinflammatorischen“ M2-Phänotyp auf.

So zeigten sich Alveolarmakrophagen als erwartungsgemäß als CD11b<sup>+</sup> und bezüglich der M2-Marker als Arg-1<sup>dim</sup> CD206<sup>dim</sup>. Bezüglich des M1-Markers iNOS stellten sie sich negativ dar (iNOS<sup>-</sup>, siehe Abbildung 45).

Im Gegensatz dazu zeigten einige der großvolumigen sog. „Schaumzellen“ einen klassisch aktivierten M1-Phänotyp und einen alternativ aktivierten M2-Phänotyp.

Schaumzellige Makrophagen zeigten sich ebenfalls erwartungsgemäß CD11b<sup>+</sup> (Abbildung 41). Weiterhin zeigten sie einen aktivierten Phänotyp, da sie sich MHC class II<sup>+</sup> darstellten (Abbildung 42). Interessanterweise zeigten sich einige der schaumzelligen Makrophagen CD206<sup>+</sup> und iNOS<sup>-</sup>, andere waren dahingegen iNOS<sup>+</sup> und CD206<sup>-</sup> (Abbildungen 43 & 45). Dies deutet auf eine mögliche Polyfunktionalität dieser Zellen hin.

Die Menge der CD4<sup>+</sup> Lymphozyten nahm mit fortschreitender Infektion und Entzündung weiter zu. Ihr Verteilungsmuster änderte sich von initial eher fokal akzentuierter Verteilung, zu dicht gepackten Ansammlungen im Bereich der sich formierenden Granulome (Abbildung 46).

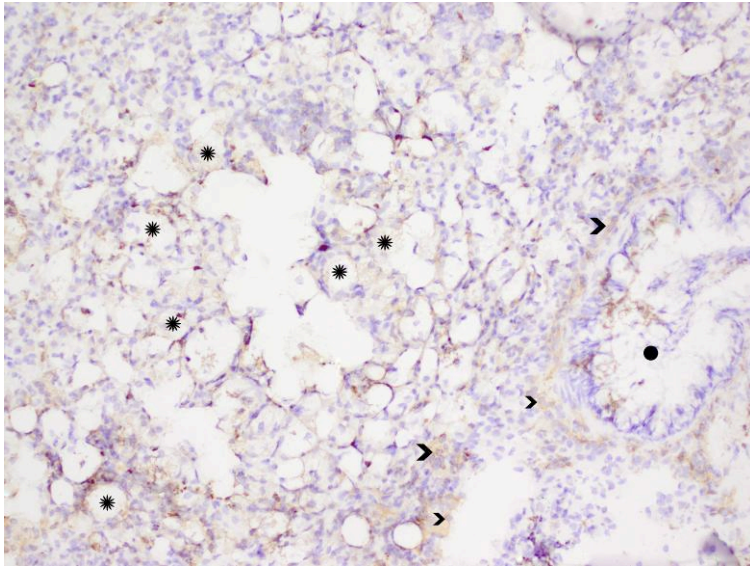


Abbildung 41:  
Lunge, 40dpi, CD11b Färbung.  
200x Vergrößerung

Es stellten sich 40 Tage p.i. vermehrt CD11b<sup>+</sup> „Schaumzellen“ dar. Sie traten vor allem in Assoziation zu den sich formierenden Granulomen auf. Die kleinen, ebenfalls CD11b<sup>+</sup>, Alveolarmakrophagen traten morphologisch scheinbar in den Hintergrund.

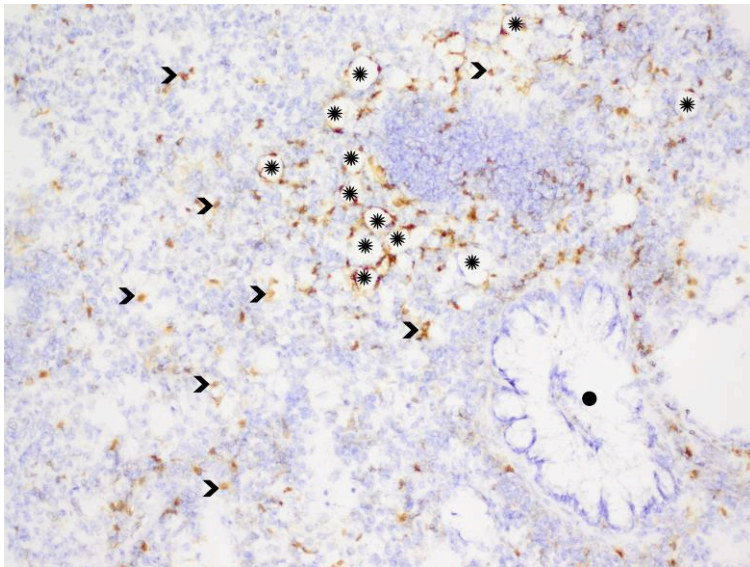


Abbildung 42:  
Lunge, 40dpi, MHC class II Färbung.  
200x Vergrößerung

Die großvolumigen Makrophagen zeigten einen kräftig MHC class II<sup>+</sup>, aktivierten Phänotyp. Die kleinen Alveolarmakrophagen waren ebenfalls, wenn auch schwächer, MHC class II<sup>+</sup>.

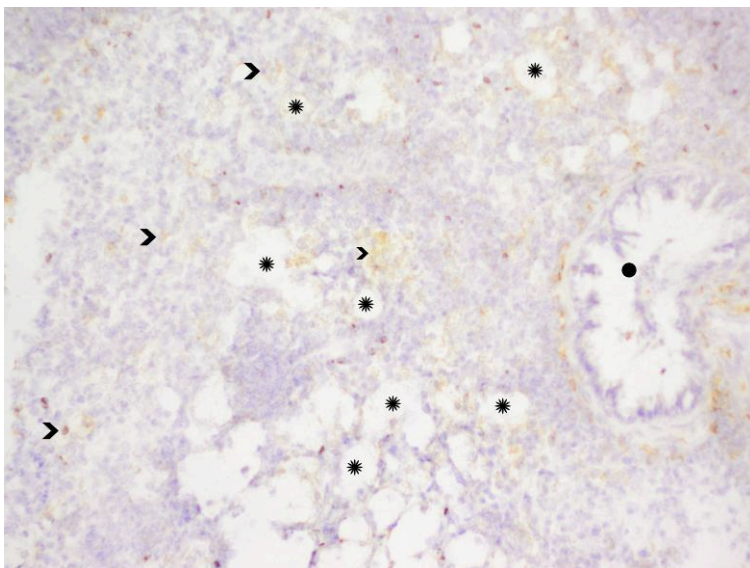


Abbildung 43:  
Lunge, 40dpi, CD206 Färbung.  
200x Vergrößerung

Einige der großvolumigen Makrophagen stellten sich schwach CD206<sup>+</sup> dar. Auch die Alveolarmakrophagen zeigten weiterhin eine schwache, konstitutionelle CD206 Expression.

Legende:  
Pfeilspitzen (>) =  
Alveolarmakrophagen  
Stern (\*) = großvolumige  
Makrophagen (sog. „Schaumzellen“)  
Punkt (●) = Bronchus

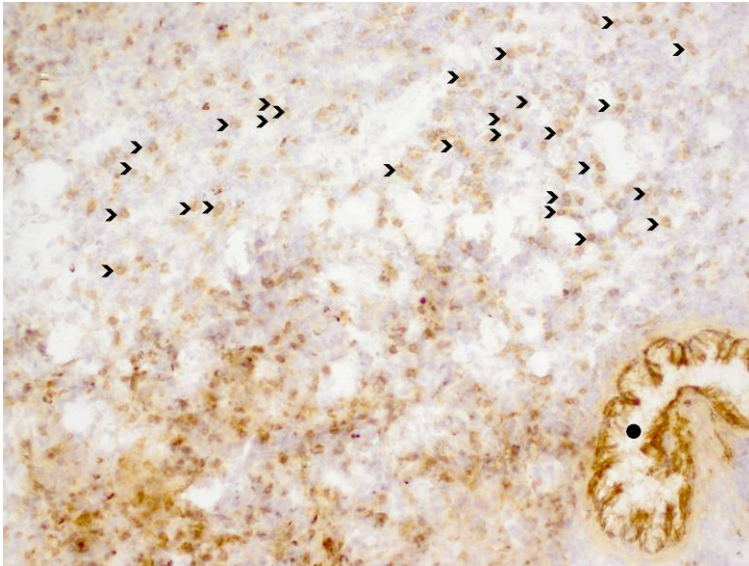


Abbildung 44:  
Lunge, 40dpi, Arg-1 Färbung.  
200x Vergrößerung

Neben der kräftig braun gefärbten, konstitutionellen Arg-1 Expression des Bronchusepithels, zeigten sich ausschließlich Alveolarmakrophagen Arg-1<sup>+</sup>.

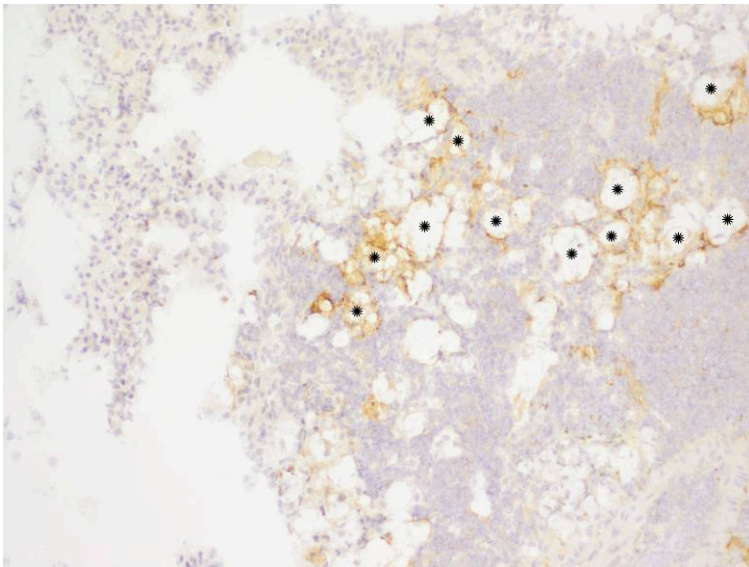


Abbildung 45:  
Lunge, 40dpi, iNOS Färbung.  
200x Vergrößerung

An Tag 40 p.i. kam es zu einer deutlichen Immunreaktivität für iNOS auf Makrophagen. Es stellten sich jedoch ausschließlich großvolumige Makrophagen als iNOS<sup>+</sup> dar. Alveolarmakrophagen waren iNOS<sup>-</sup>.

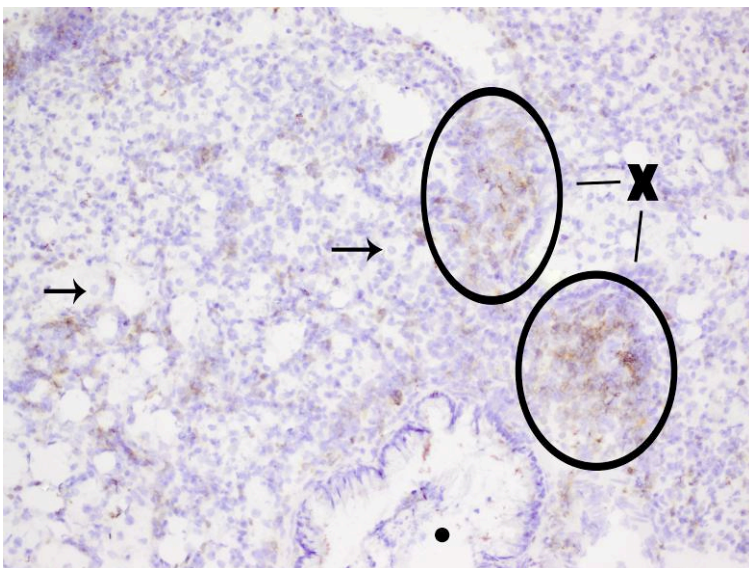


Abbildung 46:  
Lunge, 40dpi, CD4 Färbung.  
200x Vergrößerung

Die Zahl CD4<sup>+</sup> Lymphozyten nahm 40 Tage p.i. weiter zu. Ihr Verteilungsmuster änderte sich von initial diffus verteilt, zu dicht gelagerten Ansammlungen im Bereich der Pilzgranulome.

Legende:  
Kreuz (X) = CD4<sup>+</sup> Lymphozyten  
Stern (\*) = großvolumige Makrophagen (sog. „Schaumzellen“)  
Punkt (•) = Bronchus  
Pfeil (→) = C. n.

Nach weiteren 20 Tagen, befanden sich die Infektion und die begleitende Entzündungsreaktion auf ihrem Höhepunkt. 60 Tage p.i. wurde das histologische Bild

von kräftig CD11b<sup>+</sup> großvolumigen Makrophagen dominiert (Abbildung 47). Ein Teil dieser Population steigerte die Intensität der Immunreaktivität von CD206 weiter, was anhand der Abbildung 49 zu sehen ist.

Auch die Intensität der Immunreaktivität für iNOS fand in den großvolumigen Makrophagen an Tag 60 ihren Höhepunkt (Abbildung 51).

Die kleineren ebenfalls CD11b<sup>+</sup> Alveolarmakrophagen traten zu diesem Zeitpunkt scheinbar weiter in den Hintergrund (Abbildung 49). Wie aus der Abbildung 51 ersichtlich wird, produzierten sie auch auf dem Höhepunkt der Infektion kein iNOS.

Arg-1 färbte dahingegen weiterhin ausschließlich die kleinen Alveolarmakrophagen an (Abbildung 50).

Anders verhielt es sich mit der Immunreaktivität für CD206, in dieser Färbung stellten sich zwar auch kleinere Alveolarmakrophagen schwach dar, jedoch fiel das *gros* der CD206 Färbung auf sehr zahlreiche großvolumige Makrophagen (Abbildung 49). Diese Zellen zeigten weiterhin einen aktivierten Zustand in der MHC class II Färbung (Abbildung 48).

Die Zahl CD4<sup>+</sup> Lymphozyten nahm zum Höhepunkt der Infektion weiter zu, was anhand größerer und noch dichterere Ansammlungen von CD4<sup>+</sup> Lymphozyten zu erkennen war (Abbildung 52).

Insgesamt ist also festzustellen, dass die kleinen Alveolarmakrophagen weiterhin einen „antiinflammatorisch polarisierten“ M2-Phänotyp aufwiesen. Dahingegen wies ein Teil der Population großvolumiger Makrophagen Eigenschaften des M1-Phänotyps und ein anderer Teil dieser Population Eigenschaften eines M2-Phänotyps auf. Die M2-Polarisation ging hierbei der M1-Polarisation zeitlich voraus. Den Hinweisen auf eine mögliche Polyfunktionalität dieser Zellen wurde weiter unten mittels co-lokalisierter Doppelimmunfluoreszenzfärbungen nachgegangen.

Die bereits im H&E (Bild 26) beschriebenen an Tag 60 p.i. erstmals auftretenden Riesenzellen stellten sich in der Immunhistochemie als kräftig CD11b<sup>+</sup> dar. Überraschenderweise zeigten sie einerseits eine kräftige iNOS und andererseits eine kräftige CD206 Expression. Dies galt jedoch nicht für Arg-1 und MHC class II, für die die besagten Riesenzellen keine Immunreaktivität zeigten. Um zweifelsfrei zu klären, ob es sich bei den CD206<sup>+</sup> und iNOS<sup>+</sup> Riesenzellen um eine Population mit intermediärem

Phänotyp handelte, oder um verschiedene Subpopulationen, die jeweils Marker der alternativen (M2-) und klassischen (M1-) Makrophagenpolarisierung zeigten, wurden zusätzlich Doppelimmunfluoreszenzfärbungen angefertigt. Hierbei wurde der Riesenzellmarker DAP12 co-lokalisiert mit CD206 und iNOS. Anhand der Abbildung 53 ist zu erkennen, dass die Riesenzellen sowohl DAP12<sup>+</sup>, als auch CD206<sup>+</sup> sind. Aus der Überlagerung der Immunfluoreszenzbilder in Abbildung 53 konnten Rückschlüsse über eine Co-lokalisierung gezogen werden. Es zeigte sich, dass die DAP12<sup>+</sup> Zellen nicht nur Marker der alternativen M2- (CD206), sondern gleichzeitig auch Marker der klassischen M1-Polarisierung (iNOS) exprimierten. Somit konnte gezeigt werden, dass Riesenzellen gleichzeitig Eigenschaften der M1- und M2-Polarisierung aufwiesen und somit polyfunktional sind.

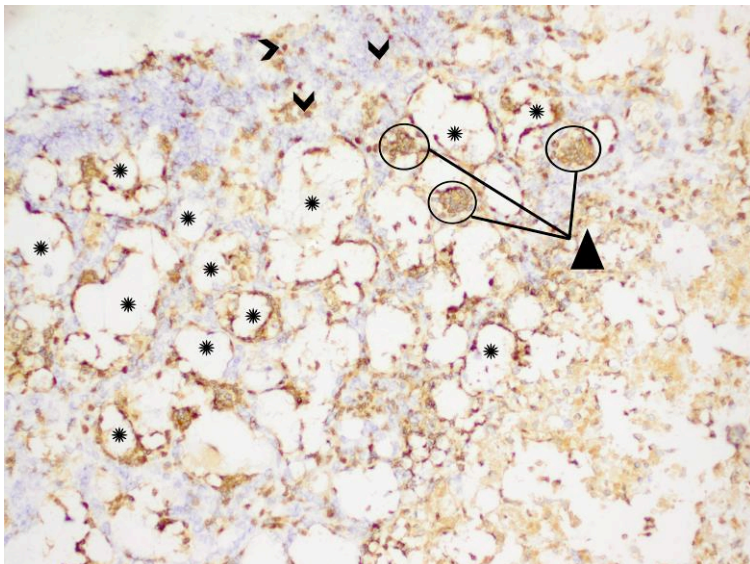


Abbildung 47:  
Lunge, 60dpi, CD11b Färbung.  
200x Vergrößerung

Die kräftig CD11b<sup>+</sup> großvolumigen Makrophagen dominierten das histomorphologische Bild. Kleinere Alveolarmakrophagen waren dazwischen nur noch vereinzelt erkennbar. Die erstmals aufgetretenen mehrkernigen Riesenzellen zeigten erwartungsgemäß ebenfalls eine kräftige CD11b Expression.

Legende:  
Pfeilspitzen (>) =  
Alveolarmakrophagen  
Stern (\*) = großvolumige  
Makrophagen  
Dreieck (▲) = mehrkernige  
Riesenzellen

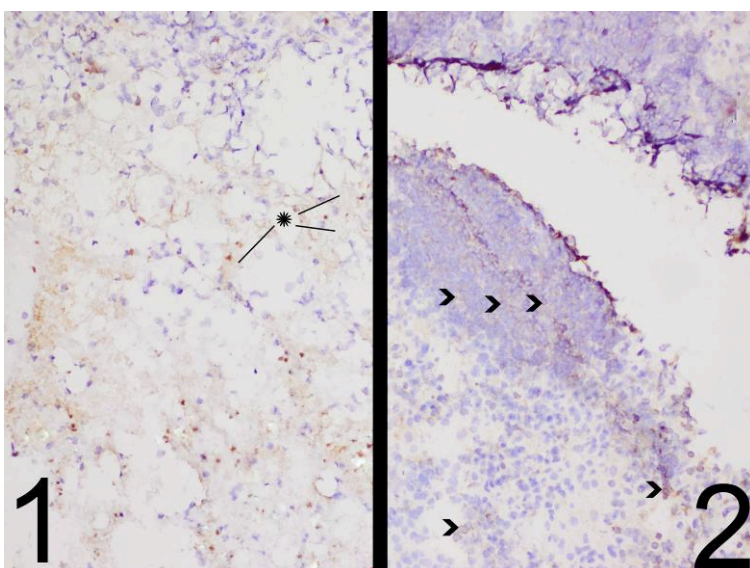


Abbildung 48:  
Lunge, 60dpi, MHC class II Färbung.  
200x Vergrößerung

Das nebenstehende Bild besteht aus zwei Ausschnitten desselben Präparates.

Das linke Bild zeigt einen Ausschnitt aus einem Pilzgranulom, da dort die schwach MHC class II<sup>+</sup> großvolumigen Makrophagen erkennbar waren.

Das rechte Bild zeigt einen Ausschnitt aus dem peripheren Lungenparenchym, da dort die residenten, schwach MHC class II<sup>+</sup> Alveolarmakrophagen vorkamen.



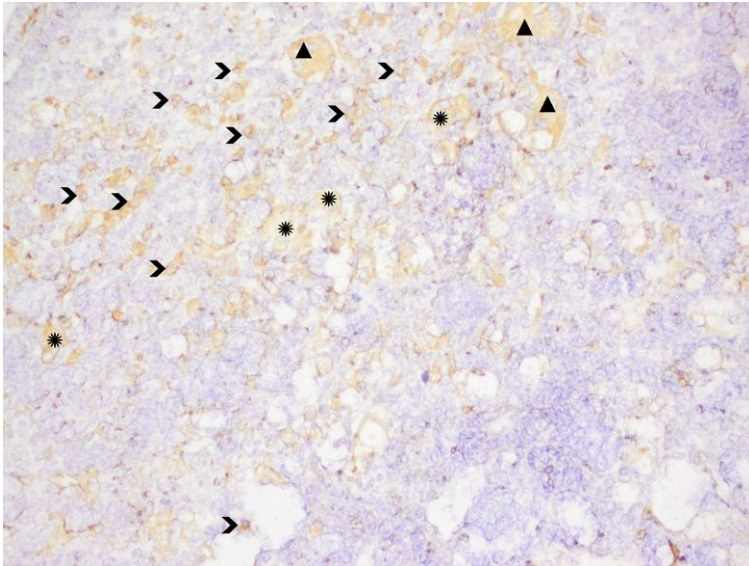


Abbildung 49:  
Lunge, 60dpi, CD206 Färbung.  
200x Vergrößerung

Großvolumige Makrophagen und Riesenzellen stellten sich kräftig CD206<sup>+</sup> dar. Alveolarmakrophagen waren schwach CD206<sup>+</sup> angefärbt.

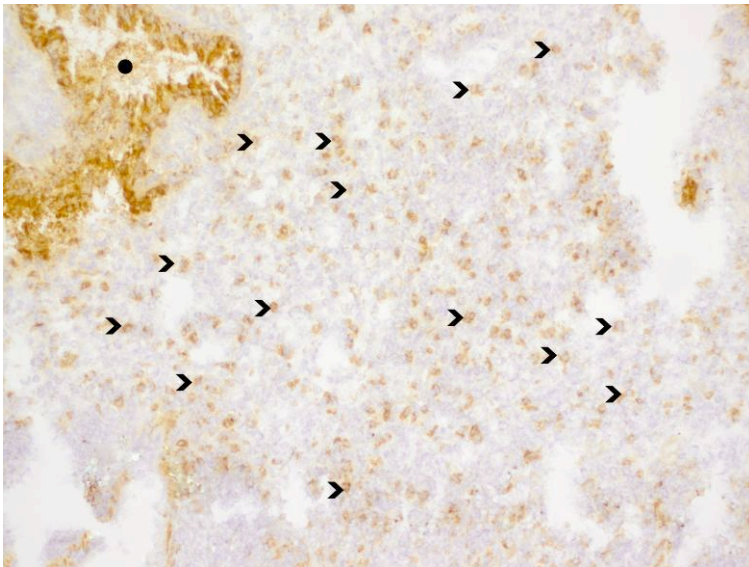


Abbildung 50:  
Lunge, 60dpi, Arg-1 Färbung.  
200x Vergrößerung

Es stellten sich weiterhin die kleinen Alveolarmakrophagen Arg-1<sup>+</sup> dar. Großvolumige, schaumzellige Makrophagen stellten sich Arg-1<sup>-</sup> dar.

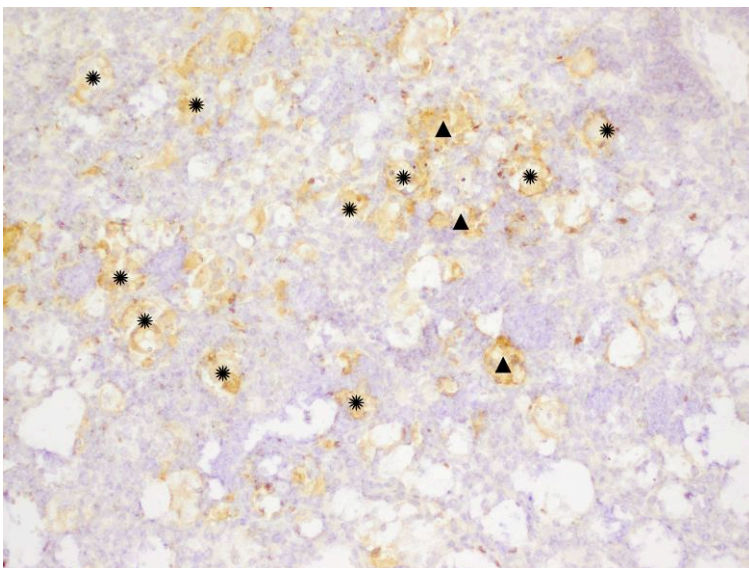


Abbildung 51:  
Lunge, 60dpi, iNOS Färbung.  
200x Vergrößerung

An Tag 60 p.i. zeigte sich die *bis dato* stärkste iNOS Produktion in Makrophagen. Es zeigten sich jedoch ausschließlich großvolumige Makrophagen und mehrkernige Riesenzellen immunreaktiv für iNOS. Alveolarmakrophagen waren iNOS<sup>-</sup>.

Legende:  
Pfeilspitzen (>) =  
Alveolarmakrophagen  
Stern (\*) = großvolumige  
Makrophagen (sog. „Schaumzellen“)  
Dreieck (▲) = mehrkernige  
Riesenzellen

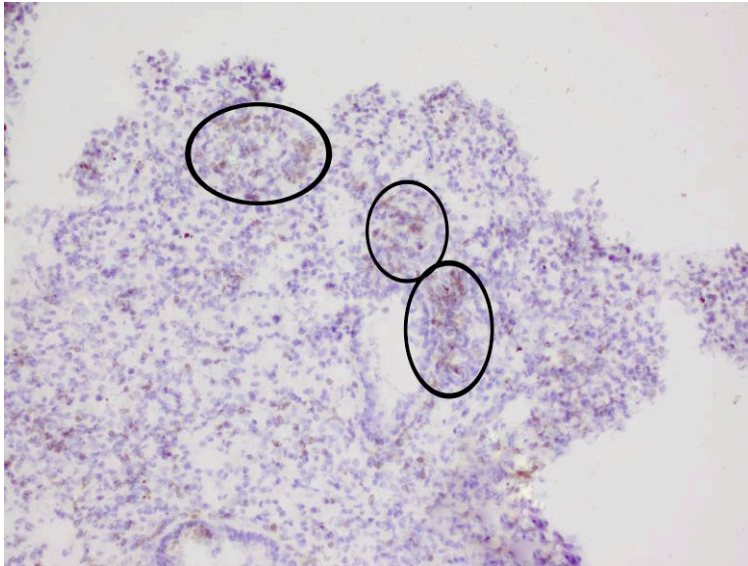


Abbildung 52:  
Lunge, 60dpi, CD4 Färbung.  
200x Vergrößerung

Die Zahl der CD4<sup>+</sup> Lymphozyten nahm weiter zu. Sie gruppierten sich zu ausgedehnten lymphozytären Ansammlungen.

Legende:  
Pfeilspitzen (>) =  
Alveolarmakrophagen  
Stern (\*) = großvolumige  
Makrophagen (sog. „Schaumzellen“)  
Dreieck (▲) = mehrkernige  
Riesenzellen

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass sich im Verlauf der Infektion das Entzündungszellinfiltrat nicht nur in seiner Menge und Zusammensetzung sondern auch in seinen immunologischen Eigenschaften veränderte.

So stieg zwar die Zahl der kleinen Alveolarmakrophagen im Verlauf der Infektion an, jedoch zeigten sie durchweg einen M2-polarisierten Phänotyp in Form von leichter CD206 und kräftiger Arg-1 Expression.

Ab Tag 20 p.i. ließen sich großvolumige schaumzellige Makrophagen identifizieren, die zu diesem Zeitpunkt noch kein iNOS produzierten. Aufgrund ihrer kräftigen CD206 Expression zeigten auch sie zu diesem Zeitpunkt einen M2-Phänotyp.

40 Tage nach der Infektion mit *C. n.* waren vornehmlich großvolumige Makrophagen in den Bereichen der Pilzherde zu finden. Einige Makrophagen dieser Population zeigten eine zunehmend kräftige CD206 Expression, andere jedoch eine kräftige iNOS Produktion. Diese Dichotomie deutet auf eine Polyfunktionalität dieser Schaumzellen hin, bei denen sich sowohl Moleküle der M1-, als auch Moleküle der M2-Polarisation zeigten.

Auf dem Höhepunkt der Infektion, 60dpi, traten neben den bereits genannten Makrophagenpopulationen auch mehrkernige Riesenzellen auf. Diese zeigten Eigenschaften beider Polarisierungen, indem sie immunreaktiv für iNOS und CD206 waren. Somit ist festzuhalten, dass mehrkernige Riesenzellen eine Polyfunktionalität aufwiesen und einen M1- als auch M2-Phänotyp ausbilden konnten.

Zusammengefasst zeigten Riesenzellen den folgenden Immunphänotyp  $CD11b^+$   $DAP12^+$   $CD206^+$   $iNOS^+$   $MHC\ class\ II^{dim}$   $Arg1^-$ .

Die  $CD4^+$  Lymphozyten zeigten keine Veränderung ihres Phänotyps. Insgesamt nahmen sie im Verlauf der Infektion jedoch deutlich zu und veränderten ihr Verteilungsmuster von initial diffus zu fokal akzentuierten Ansammlungen.

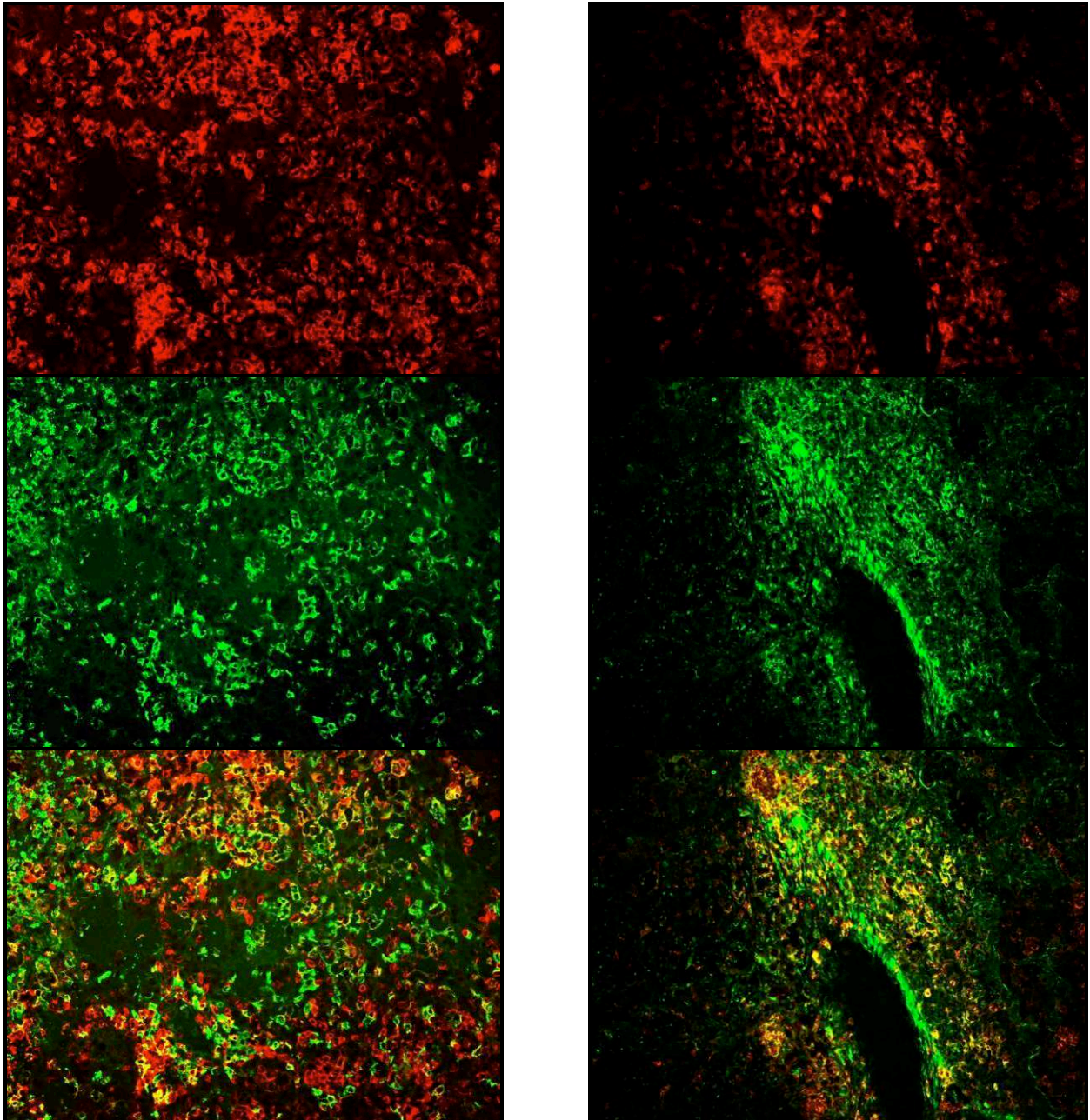


Abbildung 53: Lunge, 60dpi. 200x Vergrößerung,  
Linke Seite von oben nach unten: DAP12 Färbung in Cy3 (rot), CD206 Färbung in AF649 (grün),  
Überlagerung von DAP12 (rot) und CD206 (grün); bei Überlagerung gelb.  
Rechte Seite von oben nach unten: DAP12 Färbung in Cy3 (rot), iNOS Färbung in AF649 (grün),  
Überlagerung von DAP12 (rot) und iNOS (grün); bei Überlagerung gelb.

Makrophagen und großvolumige und mehrkernige Riesenzellen stellten sich im ersten Bild je  $DAP12^+$  (rot) dar. Weiterhin stellten sich Makrophagen und Riesenzellen im mittleren Bild grün  $CD206^+$  (links) und  $iNOS^+$  (rechts) dar. In der jeweiligen Überlagerung der Bilder stellten sich nur jene Zellen gelb dar, die beide untersuchten Marker exprimierten. Im linken unteren Bild sind  $DAP12^+$  und  $CD206^+$  Zellen identifizierbar. Im rechten unteren Bild zeigten sich  $DAP12^+$  und  $iNOS^+$  Zellen.

Den weiter oben bereits erwähnten Hinweisen auf eine mögliche Polyfunktionalität der schaumzelligen Makrophagen, im Sinne einer Co-Expression von Markern der M1- und der M2-Polarisierung wurde mittels Doppelimmunfluoreszenzfärbungen nachgegangen. Aus der Abbildung 54 wird ersichtlich, dass schaumzellige Makrophagen prinzipiell iNOS als Marker der M1-Polarisation und CD206 als Marker der M2-Polarisation exprimierten. Aus der Überlagerung der Fluoreszenzfärbungen wurde jedoch ersichtlich, dass es sich hierbei nicht um eine Co-Expression beider Marker handelte. Vielmehr handelte es sich hierbei um morphologisch ähnliche, jedoch funktionell distinkte Subpopulationen der Makrophagen die jeweils entweder M1- oder M2-polarisiert waren.

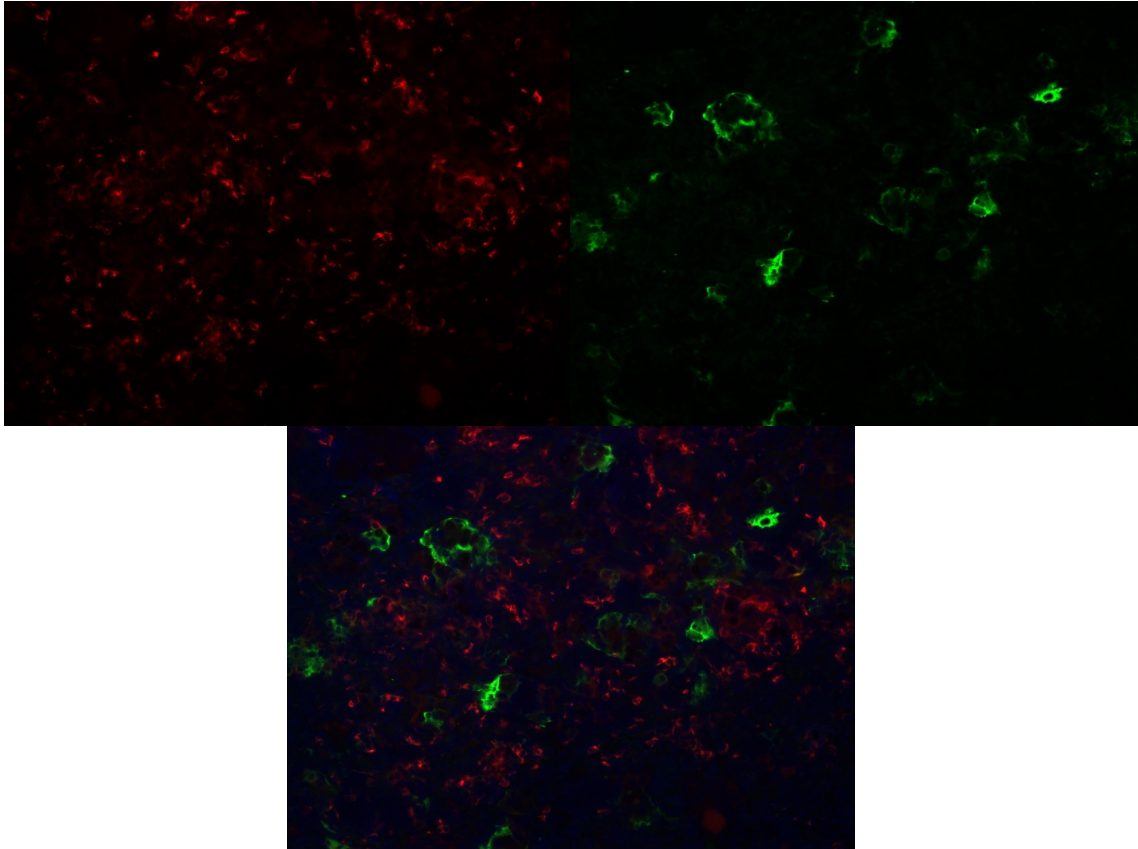


Abbildung 54: Lunge, 40dpi. 200x Vergrößerung,  
 Oberes linkes Bild: CD206 Färbung in DyLight 649 (rot)  
 Oberes rechtes Bild: iNOS Färbung in Cy3 (grün)  
 Unteres mittleres Bild: CD206 (rot) und iNOS (grün); bei Überlagerung gelb, DAPI Kernfärbung (blau)

Die CD206<sup>+</sup> Makrophagen stellten sich im linken oberen Bild rot gefärbt dar. Weiterhin stellten sich großvolumige Makrophagen im rechten oberen Bild grün (iNOS<sup>+</sup>) dar. Bei der Überlagerung dieser beiden Bilder würden sich alle gleichzeitig CD206<sup>+</sup> und iNOS<sup>+</sup> Zellen als gelb gefärbt darstellen. Hier kam es nicht zu einer, durch Geldfärbung angezeigten, Co-Expression dieser Marker. Es handelte sich vielmehr um zwei distinkte und funktionell unterschiedlich polarisierte Subpopulationen der Makrophagen.

Lunge	Naiv / nicht infiziert	20dpi	40dpi	60dpi
CD206				
Arg-1				

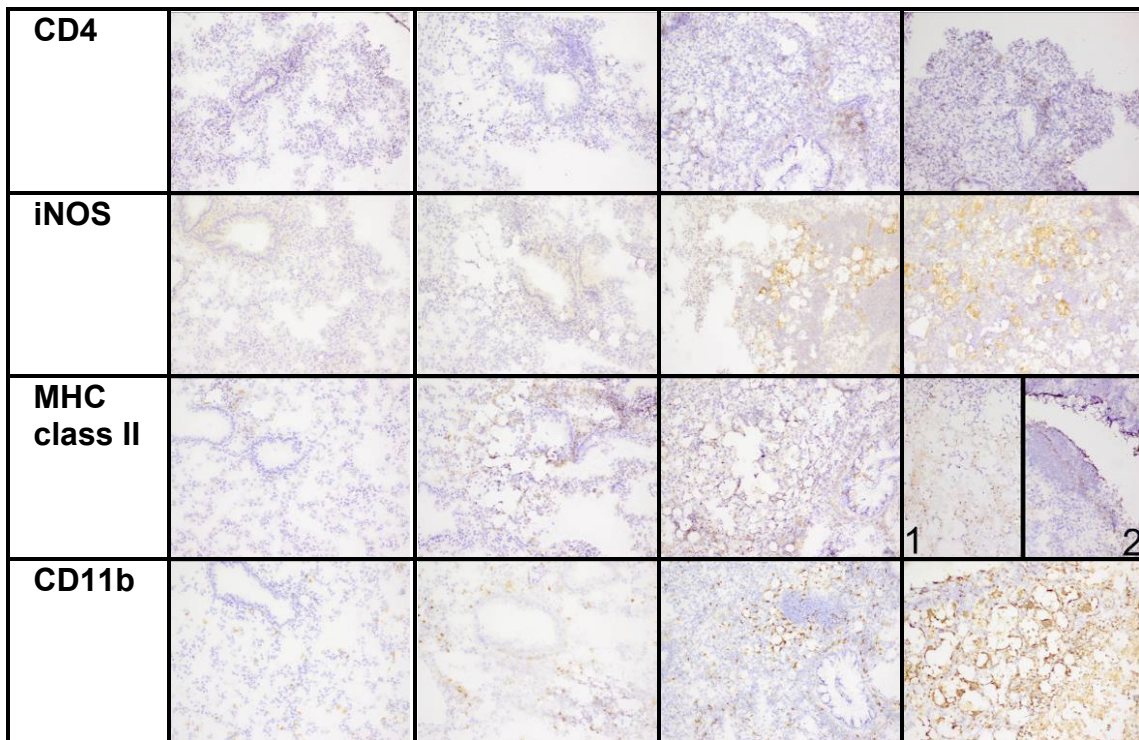


Abbildung 55: Synopsis immunhistochemischer Färbungen von Lungen zu den Zeitpunkten naiv, 20dpi, 40dpi und 60dpi, Vergrößerung 200x

#### 4.5 Durchflusszytometrische Charakterisierung pulmonaler Leukozyten

Die isolierten pulmonalen Leukozyten wurden durchflusszytometrisch untersucht, wobei initial ein sogenanntes „gate“ für die Gesamtheit der Leukozytenpopulation entsprechend ihrer Größe und Granularität gewählt wurde. Aus der Gesamtleukozytenpopulation wurden anhand von Oberflächenmarkern  $CD4^+$  Lymphozyten und  $F4/80^+$  Makrophagen identifiziert. Diese beiden Leukozytenpopulationen wurden auf ihre Expression des  $IL-4R\alpha$  untersucht. Repräsentative Übersichten der untersuchten Populationen zu den Zeitpunkten naiv (nicht infiziert), 20dpi und 60dpi sind den Abbildungen 56-58 zu entnehmen.

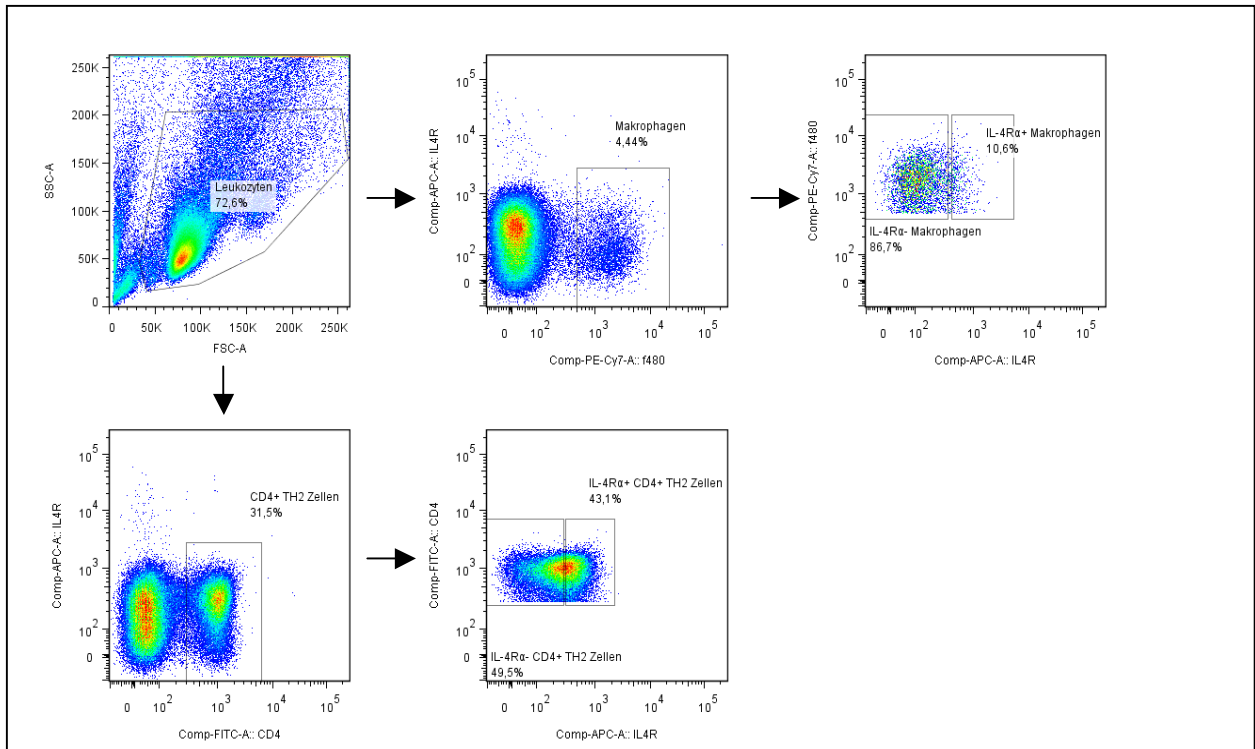


Abbildung 56: „Gating“-Strategie und Übersicht der sogenannten „dot plot“ Darstellungen einer durchflusszytometrisch untersuchten Lunge, naiv / nicht infiziert

Im ersten Bild ganz links oben wurde die Gesamtpopulation der Leukozyten aufgrund ihrer Größe und Granularität eingegrenzt. Hieraus ließen sich anhand der Oberflächenmarker CD4 (unten links) und F4/80 (Mitte oben) weitere Leukozytensubpopulationen identifizieren und auf ihre Expression des IL-4Rα untersuchen (oben rechts und Mitte unten).

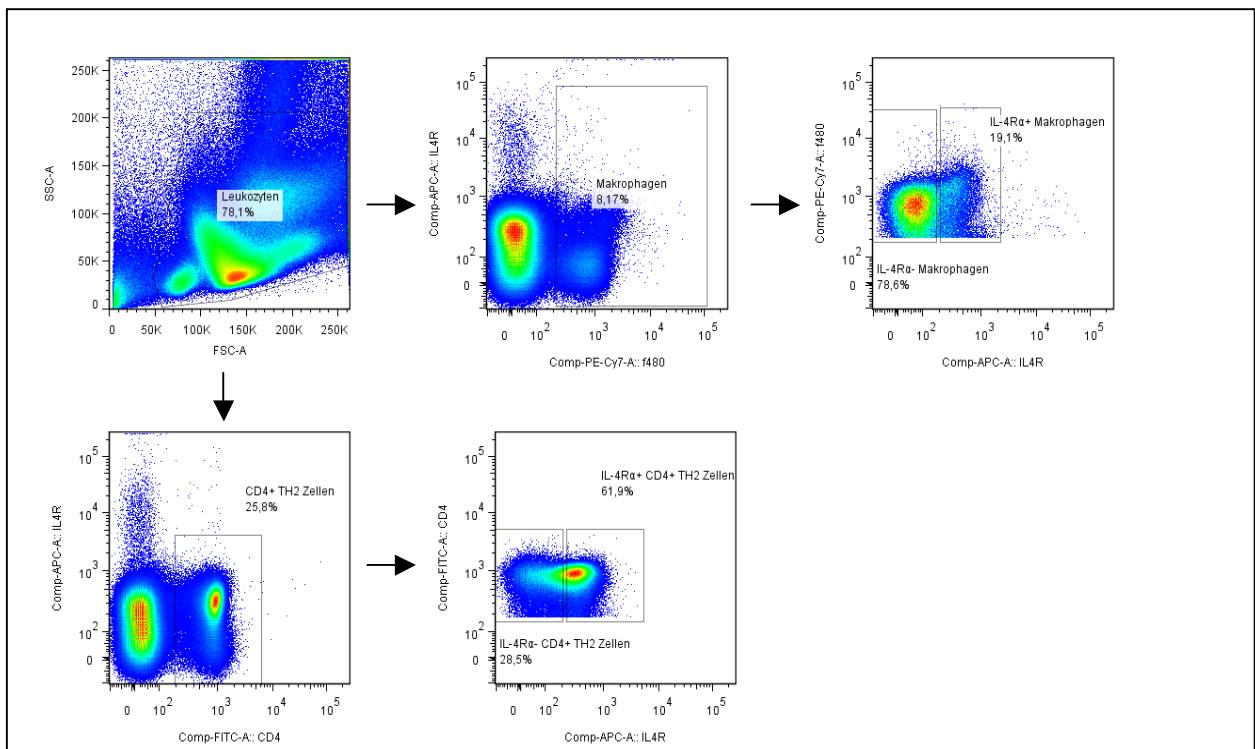
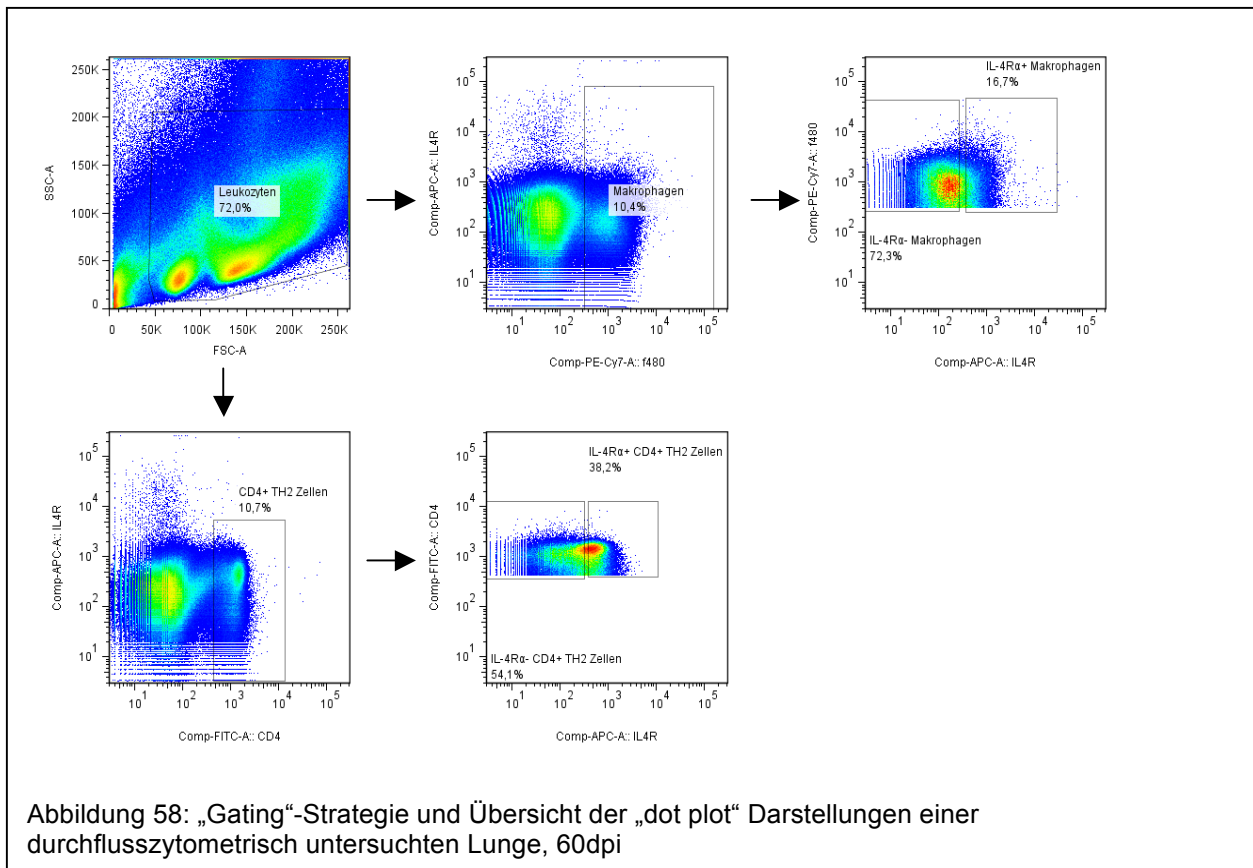


Abbildung 57: „Gating“-Strategie und Übersicht der „dot plot“ Darstellungen einer durchflusszytometrisch untersuchten Lunge, 20dpi



#### 4.5.1 Bestimmung pulmonaler Leukozyten

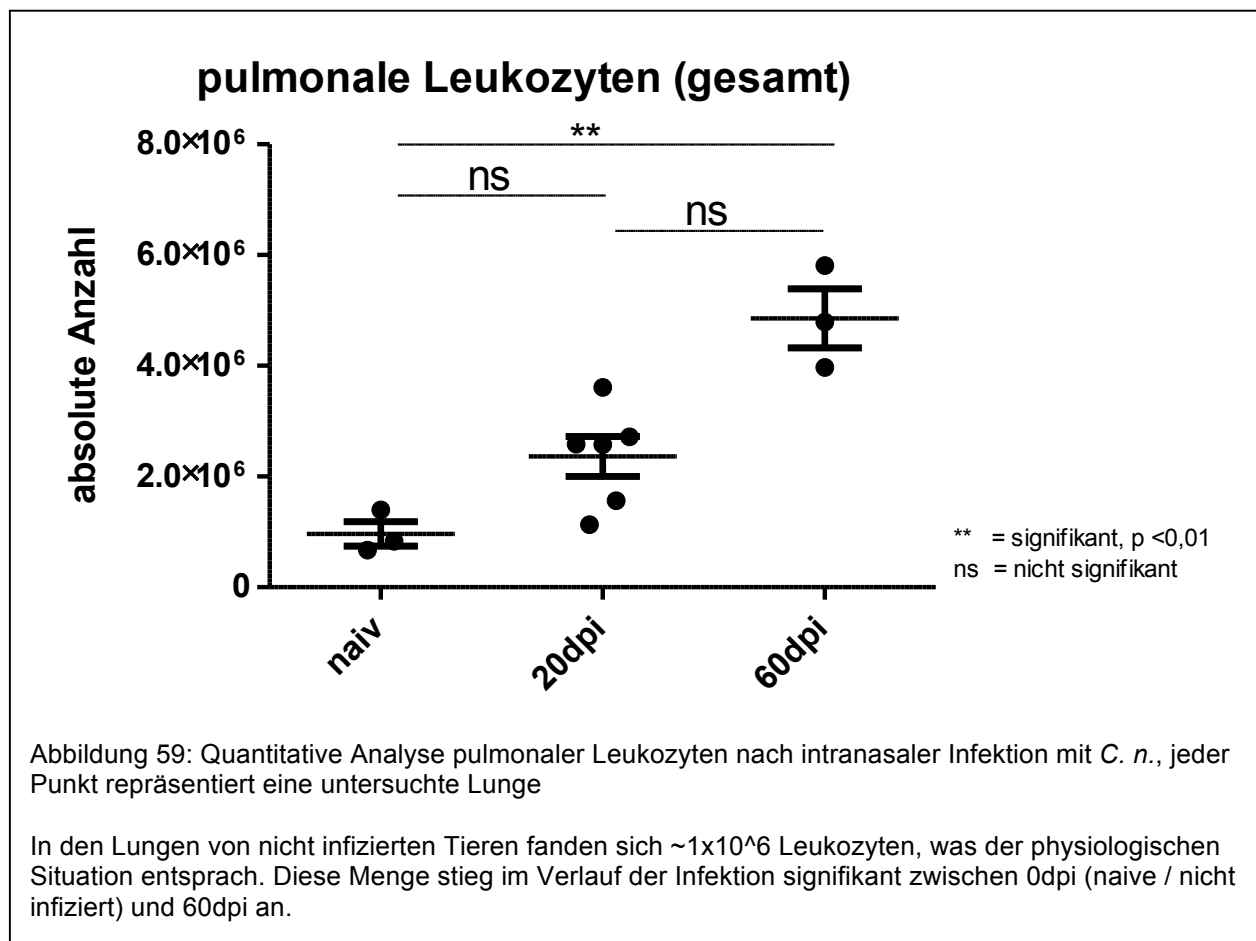
Wie auf Abbildung 59 zu erkennen ist, waren in den Lungen nicht infizierter Tiere im Mittel  $\sim 9,6 \times 10^5$  (962.973) Leukozyten vorhanden, wobei der SEM  $\sim 2,2 \times 10^5$  (220.429) betrug. Der relativ hohe SEM war vor allem auf unvermeidbare Varianzen in der Präparation zurückzuführen z.B. die Mitnahme parabronchialer Lymphknoten bei Präparation und Entnahme von Lungen.

20 Tage nach der Infektion mit *C. n.* stieg die Anzahl der pulmonalen Leukozyten deutlich an. Im Mittel befanden sich zu diesem Zeitpunkt  $\sim 2,4 \times 10^6$  (2.362.632) Leukozyten in den Lungen der infizierten Tiere, wobei der SEM  $\sim 3,6 \times 10^5$  (362.212) betrug.

Nach weiteren 40 Tagen, befand sich die Infektion auf ihrem Höhepunkt, was mit einem kräftigen Anstieg der Leukozytenzahlen einherging. Zu diesem Zeitpunkt befanden sich im Mittel  $\sim 4,9 \times 10^6$  (4.855.425) Leukozyten in den untersuchten Lungen, wobei der SEM  $\sim 5,3 \times 10^5$  (532.543) betrug.



Insgesamt war, wenn auch nur zwischen der Gruppe naiver Tiere und der Gruppe 60dpi hochsignifikant, ein stetiger Trend zur Rekrutierung von pulmonalen Leukozyten zu erkennen. Dies resultierte in einer stetigen Steigerung ihrer Gesamtzahl.

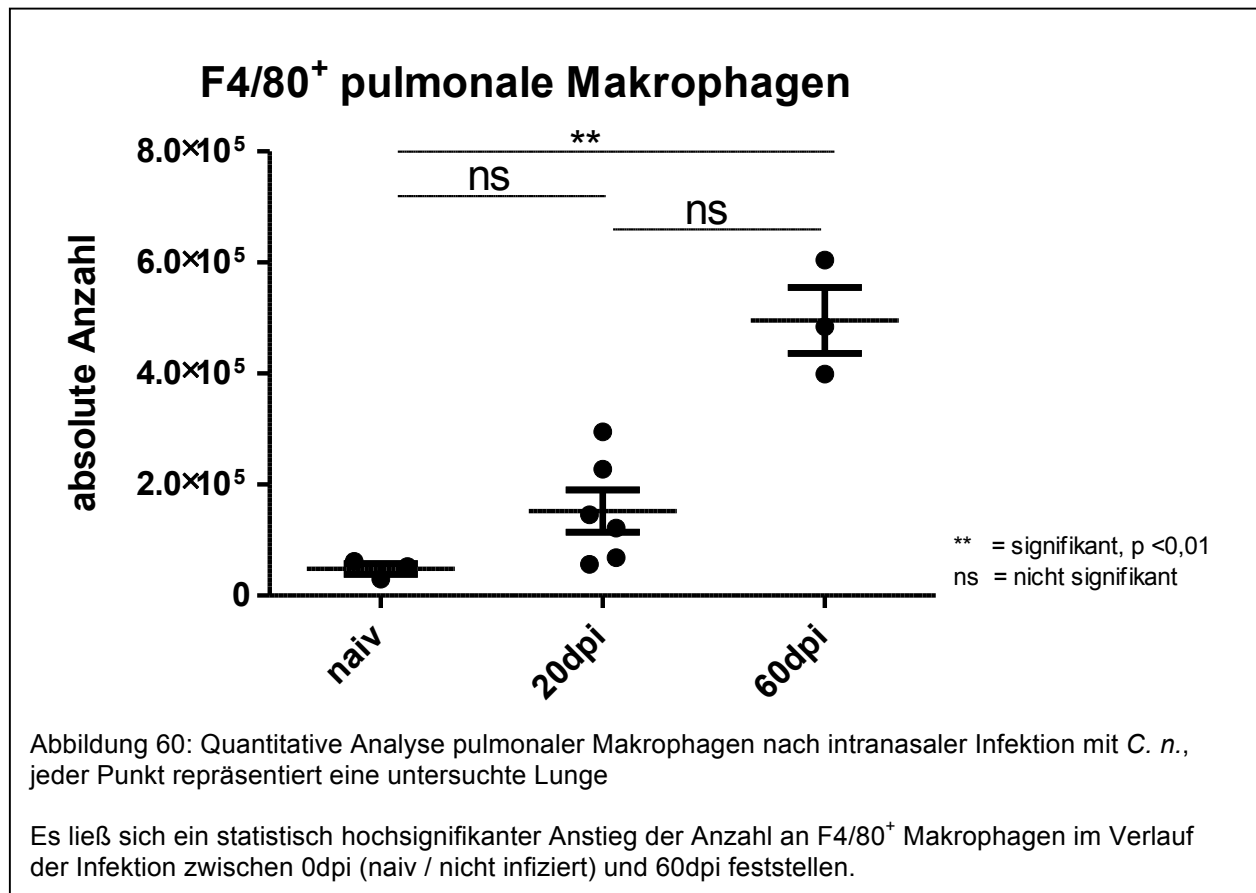


#### 4.5.2 Bestimmung pulmonaler Makrophagen

Wie in der Abbildung 60 zu sehen ist, ließen sich bereits in den Lungen von nicht infizierten Tieren einige Makrophagen mit einem Antikörper gegen F4/80 identifizieren. Im Mittel betrug die Zahl der Makrophagen in den nicht infizierten Lungen  $\sim 4,8 \times 10^4$  (48.011) mit einem SEM von  $\sim 9,6 \times 10^3$  (9.640). Bei diesen Makrophagen handelte es sich um physiologisch vorhandene residente Alveolarmakrophagen. Diese Makrophagen stellen den pulmonalen Teil des mononukleär-phagozytären Systems (MPS) des Immunsystems dar. Im Verlauf der nächsten 20 Tage wurden weitere Makrophagen in die Lungen rekrutiert. Zu diesem Zeitpunkt befanden sich im Mittel  $\sim 1,5 \times 10^5$  (152.438) Makrophagen in den Lungen. Der SEM betrug  $\sim 3,8 \times 10^4$  (38.005).

In den folgenden 40 Tagen bis Tag 60 p.i. kam es zu einem kräftigen Anstieg der pulmonalen Makrophagenanzahl. Im Mittel befanden sich 60 Tage p.i.  $\sim 5 \times 10^5$  (495.739) Makrophagen in den untersuchten Lungen. Der SEM betrug  $\sim 6 \times 10^4$  (59.566).

Betrachtete man den Gesamtverlauf der Infektion, indem man die Anzahl der pulmonalen Makrophagen von nicht infizierten Tieren mit denen an Tag 60 p.i. verglich, so ließ sich ein statistisch hochsignifikanter Anstieg beobachten.



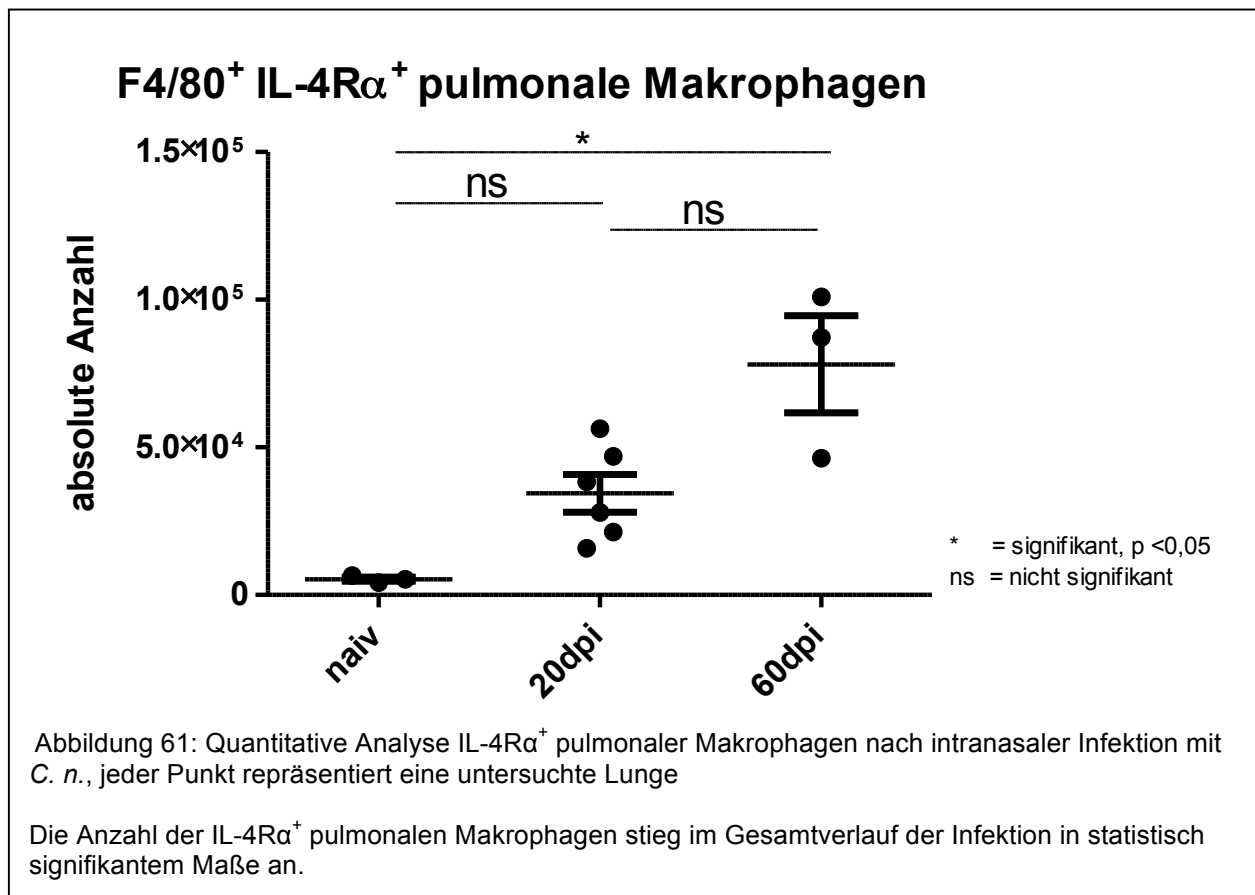
#### 4.5.3 Analyse der IL-4R $\alpha$ Expression auf pulmonalen Makrophagen nach Infektion mit *C. n.*

Makrophagen wurden nicht nur quantitativ, sondern auch qualitativ, hinsichtlich ihrer IL-4R $\alpha$  Expression analysiert (Abbildung 61).

Die Expression des IL-4R $\alpha$ , der IL-4 und IL-13 binden kann, ist eine Voraussetzung für die alternative Aktivierung bzw. M2-Polarisierung von Makrophagen durch die genannten Zytokine.

Bereits in den Lungen von nicht infizierten Tieren fanden sich im Mittel  $\sim 5,3 \times 10^3$  (5.335) Makrophagen die den IL-4R $\alpha$  trugen. Der SEM betrug 702.

Nach weiteren 20 Tagen Infektion kam es zu einem Anstieg dieser Population. Zu diesem Zeitpunkt befanden sich durchschnittlich  $\sim 3,4 \times 10^4$  (34.444) IL-4R $\alpha^+$  Makrophagen in den Lungen der untersuchten Tiere, wobei der SEM  $\sim 6,4 \times 10^3$  (6.358) betrug. 60 Tage nach der Infektion mit *C. n.* kam es zu einem weiteren Anstieg der IL-4R $\alpha^+$  Makrophagen. Zu diesem Zeitpunkt belief sich ihre Menge auf  $\sim 7,8 \times 10^4$  (78.106), wobei der SEM  $1,6 \times 10^4$  (16.408) betrug (Abbildung 61).



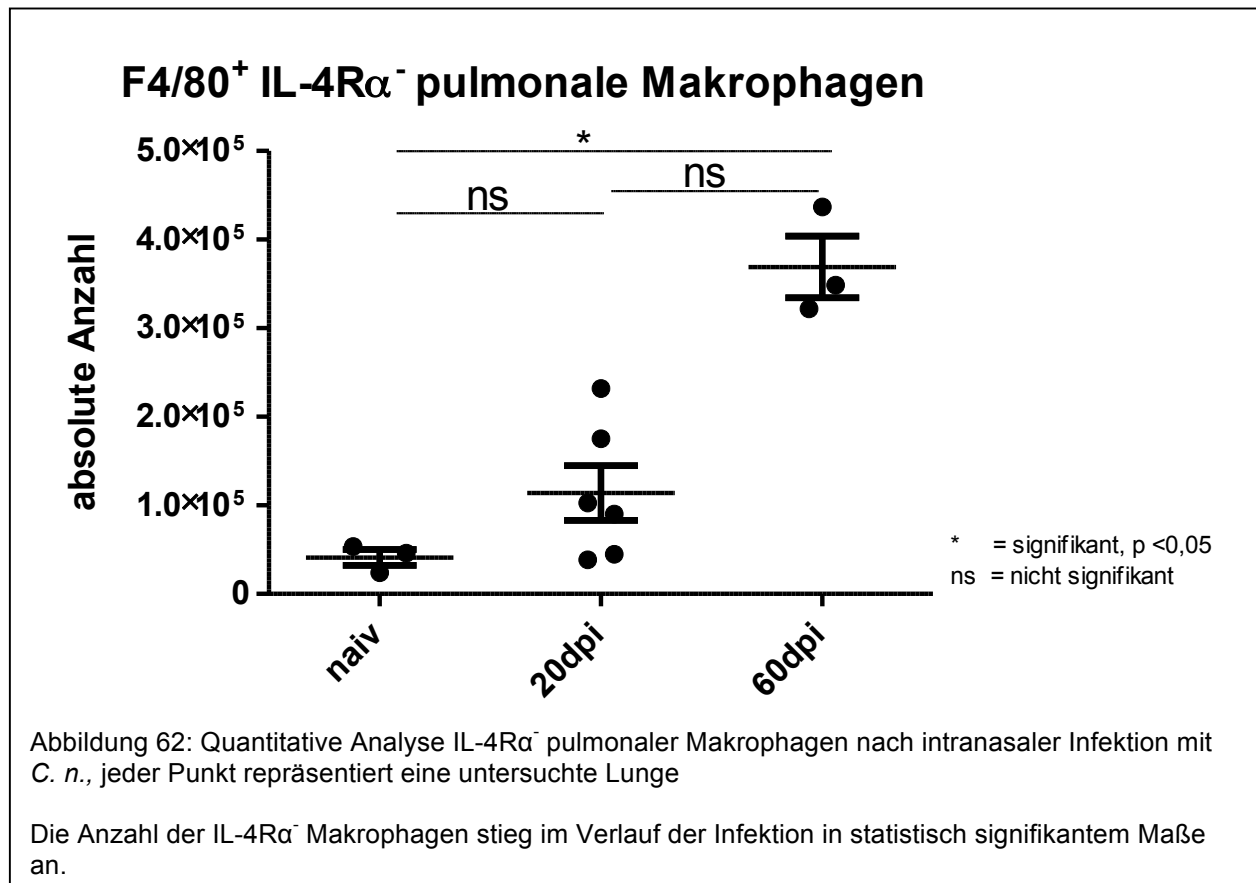
Vergleich man die Anzahl der IL-4R $\alpha^+$  Makrophagen im naiven Zustand mit denen 60 Tage p.i., so ließ sich ein deutlicher und statistisch signifikanter Anstieg der IL-4R $\alpha^+$  Makrophagenpopulation berechnen.

Betrachtet man die komplementäre Population an Makrophagen, die den IL-4R $\alpha$  nicht exprimierten, so waren vergleichbare Trends erkennbar, allerdings zeigte stets der deutlich größere Anteil von Makrophagen (ungefähr drei bis sieben Mal so viele) keine Expression des IL-4R $\alpha$  (Abbildung 63). Die Lungen von nicht infizierten Tieren enthielten durchschnittlich  $\sim 3,9 \times 10^4$  (38.784) IL-4R $\alpha^-$  Makrophagen, bei einem SEM von  $\sim 9 \times 10^3$  (8.907).

Innerhalb der nächsten 20 Tage der Infektion kam es zu einem Anstieg der Gesamtmenge an IL-4R $\alpha$ <sup>-</sup> Makrophagen. Zu diesem Zeitpunkt befanden sich in den untersuchten Lungen im Mittel  $\sim 1,1 \times 10^5$  (113.946) IL-4R $\alpha$ <sup>-</sup> Makrophagen, wobei der SEM  $\sim 3,1 \times 10^4$  (30.976) betrug.

Nach weiteren 40 Tagen Infektion mit *C. n.* kam es zu einem erneuten Anstieg der IL-4R $\alpha$ <sup>-</sup> Makrophagenpopulation. Auf dem Höhepunkt der Infektion, 60 Tage p.i., befanden sich durchschnittlich  $\sim 3,7 \times 10^5$  (369.102) IL-4R $\alpha$ <sup>-</sup> Makrophagen in den untersuchten Lungen. Der SEM betrug hierbei  $\sim 3,5 \times 10^4$  (34.738).

Insgesamt war also ein statistisch signifikanter Anstieg der Menge an IL-4R $\alpha$ <sup>-</sup> Makrophagen im Verlauf der Infektion zu berechnen (Abbildung 62).



### IL-4R $\alpha$ Expression pulmonaler Makrophagen

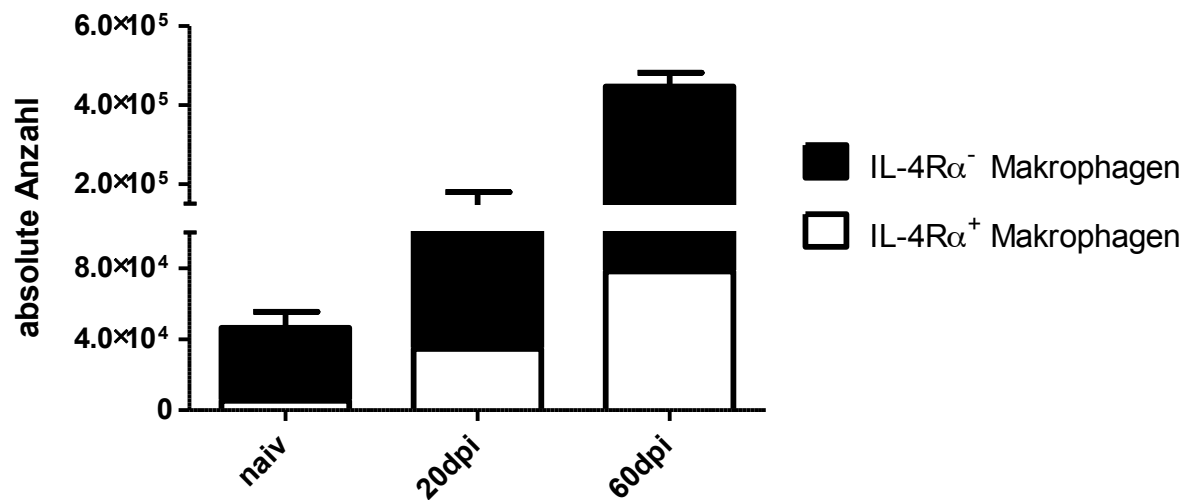


Abbildung 63: Synopsis der quantitativen Analyse IL-4R $\alpha^{+/-}$  pulmonaler Makrophagen nach intranasaler Infektion mit *C. n.*

Die Gesamtpopulation pulmonaler Makrophagen stieg quantitativ im Verlauf der Infektion deutlich an. Dies galt auch für die jeweiligen Einzelpopulationen, der IL-4R $\alpha^+$  und IL-4R $\alpha^-$  Makrophagen, wobei stets mehr Makrophagen IL-4R $\alpha^-$  waren.

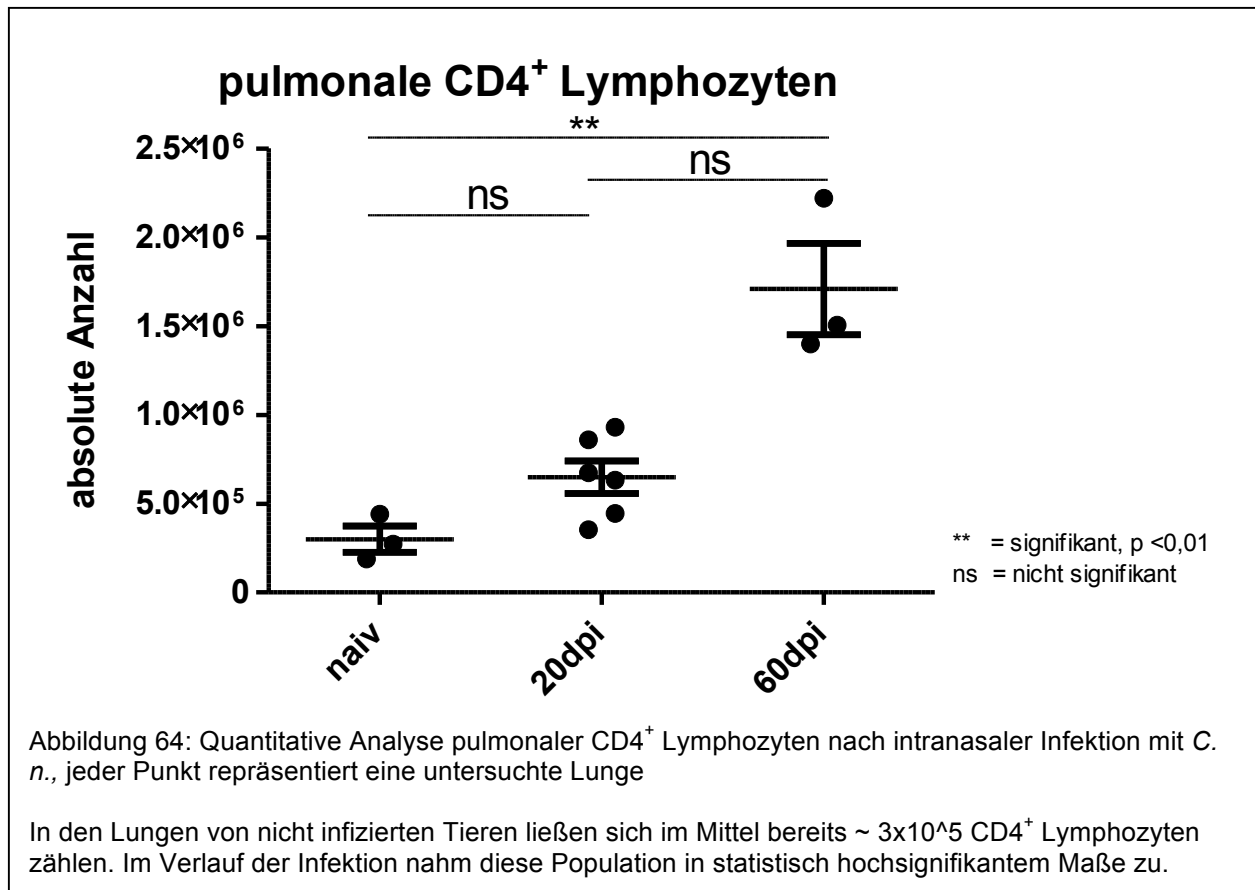
#### 4.5.4 Bestimmung pulmonaler CD4<sup>+</sup> Lymphozyten

T Helferzellen spielen eine entscheidende Rolle in der Aktivierung und Regulierung des Immunsystems und können sich unter Zytokineinfluss in drei grundlegende Zelltypen differenzieren, die TH1, TH2 und TH17 Zellen. CD4<sup>+</sup> Lymphozyten differenzieren sich unter dem Einfluss von IL-4 und spielen eine Schlüsselrolle in der humoralen Immunantwort (siehe Kapitel 1.3 und 1.4).

Wird die Gesamtheit der CD4<sup>+</sup> Lymphozyten betrachtet, so waren bereits in Lungen von nicht infizierten Tieren im Mittel  $\sim 3 \times 10^5$  (299.312) CD4<sup>+</sup> Lymphozyten zu finden. Der SEM betrug  $\sim 7,4 \times 10^4$  (73.848). Diese Menge stieg 20 Tage p.i. an, sodass sich zum diesem Zeitpunkt durchschnittlich  $\sim 6,5 \times 10^5$  (649.305) CD4<sup>+</sup> Lymphozyten in den untersuchten Lungen befanden, wobei der SEM  $\sim 9,2 \times 10^4$  (92.019) betrug.

40 weitere Tage nach Infektion mit *C. n.* stieg die Gesamtmenge der CD4<sup>+</sup> Lymphozyten erneut an. Ihre Zahl belief sich zum Zeitpunkt 60dpi im Mittel auf  $\sim 1,7 \times 10^6$  (1.707.881), mit einem SEM von  $\sim 2,6 \times 10^4$  (25.741).

Im Gesamtverlauf der Infektion zeigte sich also eine kräftige Rekrutierung von Lymphozyten die in einem statistisch hochsignifikanten Anstieg der Anzahl CD4<sup>+</sup> Lymphozyten resultierte (Abbildung 64).



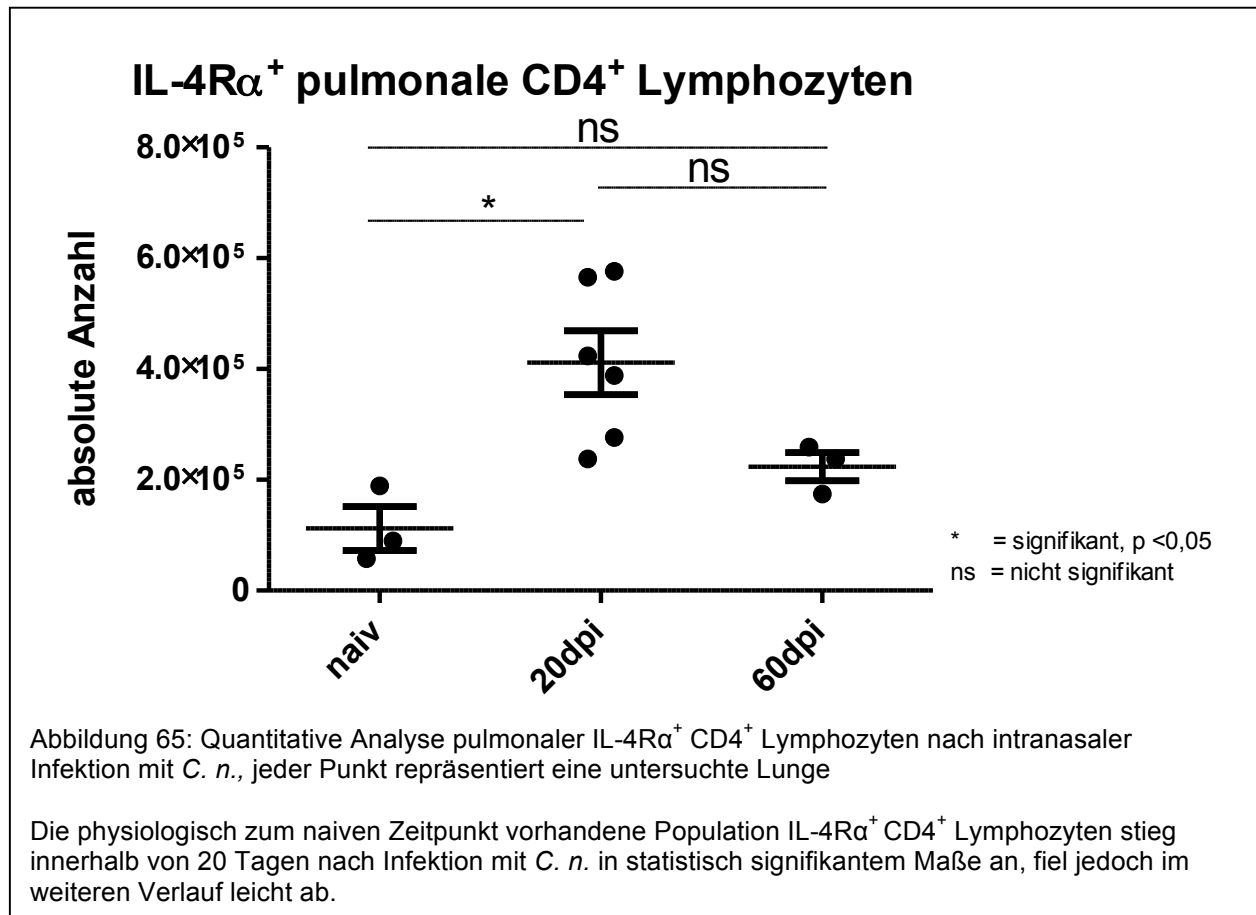
#### 4.5.5 Analyse der IL-4R $\alpha$ Expression auf pulmonalen CD4<sup>+</sup> Lymphozyten

Neben der quantitativen Analyse der CD4<sup>+</sup> Lymphozyten, wurde diese Lymphozytenpopulation auch qualitativ, hinsichtlich ihrer IL-4R $\alpha$  Expression untersucht. Der IL-4R $\alpha$  auf der Oberfläche von T-Zellen ist eine Voraussetzung zur Bindung von IL-4 und somit zur IL-4-getriebenen Differenzierung zu Lymphozyten.

Wird die Population der IL-4R $\alpha$ <sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Lymphozyten betrachtet, so ist anhand der Abbildung 65 ersichtlich, dass sich bereits in den nicht infizierten Lungen im Schnitt  $\sim 1,1 \times 10^5$  (112.113) CD4<sup>+</sup> Lymphozyten fanden, die den IL-4R $\alpha$  exprimierten. Der SEM betrug  $\sim 4 \times 10^4$  (39.630).

Im Verlauf der nächsten 20 Tage kam es zu einem deutlichen und statistisch signifikanten Anstieg der Population der IL-4R $\alpha$ <sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Lymphozyten. So befanden sich in den Lungen zum Zeitpunkt 20dpi im Mittel  $\sim 4,1 \times 10^5$  (411.385) IL-4R $\alpha$ <sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Lymphozyten, wobei der SEM  $\sim 5,8 \times 10^4$  (57.747) betrug. Dies stellte den Höhepunkt der IL-4R $\alpha$  Expression durch CD4<sup>+</sup> Lymphozyten dar. Dieser war bereits 20 Tage nach der Infektion erreicht, wohingegen die maximale Expression des IL-4R $\alpha$  auf pulmonalen Makrophagen erst 60 Tage p.i. erreicht war.

Nach weiteren 40 Tagen kam es zu einem Abfall der Menge an IL-4R $\alpha$ <sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Lymphozyten, sodass sich zu diesem Zeitpunkt im Mittel  $\sim 2,2 \times 10^5$  (223.677) in den untersuchten Lungen befanden. Der SEM belief sich auf  $\sim 2,5 \times 10^4$  (25.424).



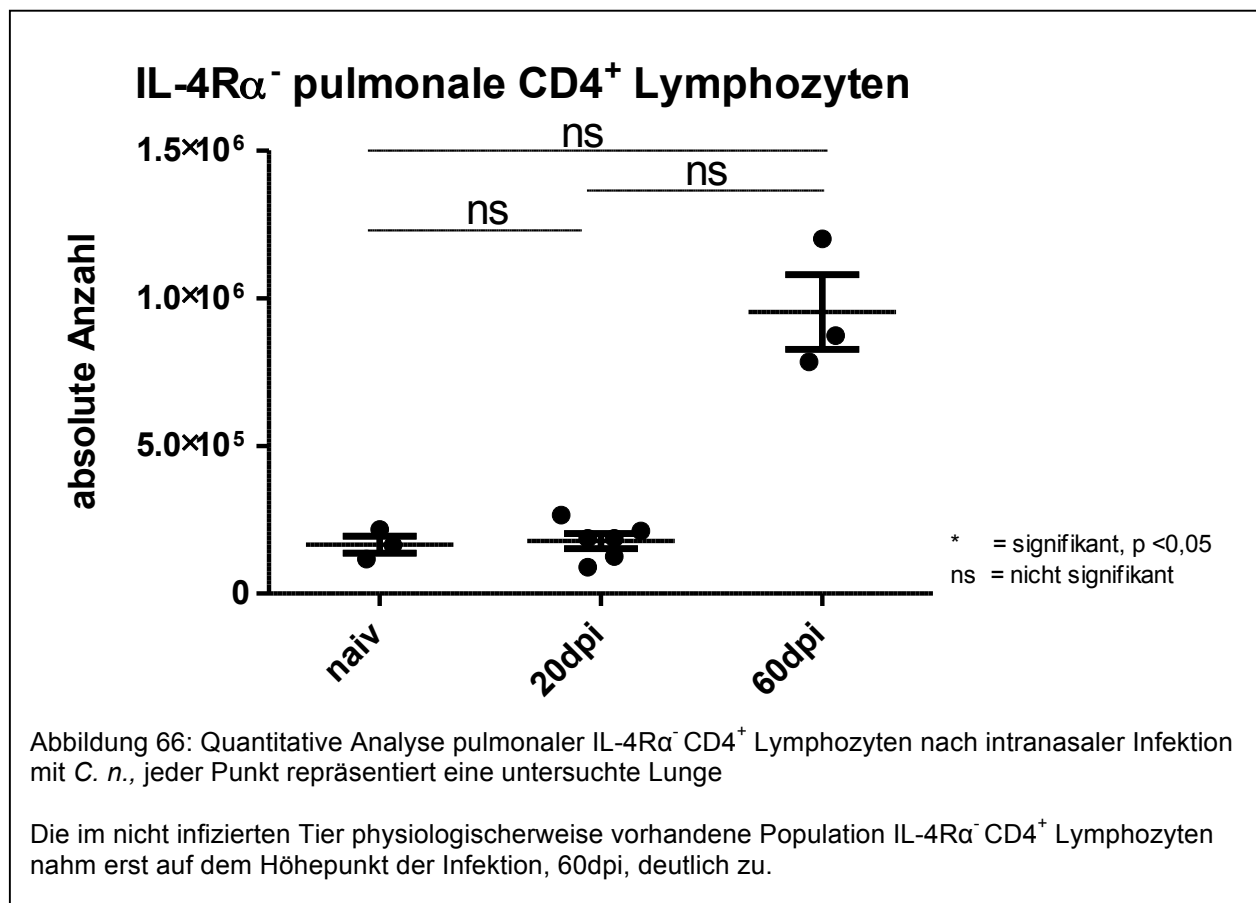
Es wurde auch die komplementäre Population der IL-4R $\alpha$ <sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> Lymphozyten analysiert, da diese Teil der nicht mittels IL-4 und IL-13 vermittelten Immunantwort sind. Wie aus Abbildung 66 ersichtlich wird, waren in den Lungen von nicht infizierten Tieren im Schnitt  $\sim 1,7 \times 10^5$  (165.869) CD4<sup>+</sup> Lymphozyten zu finden, die den IL-4R $\alpha$  nicht exprimierten. Der SEM betrug  $\sim 2,9 \times 10^4$  (28.999).

Nach 20 Tagen Infektion mit *C. n.* stieg die Menge der IL-4R $\alpha$ <sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> Lymphozyten kaum an. Zu diesem Zeitpunkt betrug deren Menge im Mittel  $\sim 1,8 \times 10^5$  (177.768), der SEM belief sich auf  $\sim 2,6 \times 10^4$  (25.552).

Auf dem Höhepunkt der Infektion, 60dpi, kam es zu einem starken Anstieg der Menge an IL-4R $\alpha$ <sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> Lymphozyten. Zu diesem Zeitpunkt belief sich deren Menge auf durchschnittlich  $\sim 9,5 \times 10^5$  (952.882), wobei der SEM  $\sim 1,3 \times 10^5$  (126.514) betrug.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass auch im Gesamtverlauf der Infektion der Anstieg der IL-4R $\alpha$ <sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> Lymphozyten statistisch nicht signifikant war, obwohl ein

deutlicher Trend zum Anstieg zwischen den Zeitpunkten 20dpi und 60dpi zu erkennen war. Dies lässt sich vor allem durch ein geringes „n“ und eine relativ große Streuung der Einzelwerte erklären (Abbildung 66).



Wie aus Abbildung 67 ersichtlich wird, differierten die Verhältnisse von IL-4R $\alpha$ <sup>-</sup> und IL-4R $\alpha$ <sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Lymphozyten zu den untersuchten Zeitpunkten deutlich. Bei nicht infizierten Lungen bestand ein ausgeglichenes Verhältnis der beiden Populationen. 20 Tage nach der Infektion mit *C. n.* änderte sich dieses Verhältnis deutlich zu Gunsten der IL-4R $\alpha$ <sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> Lymphozyten, welche deutlich anstiegen, wohingegen die Zahl der IL-4R $\alpha$ <sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Lymphozyten annähernd gleich blieb. Damit exprimierte 20 Tage p.i. das *gros* der CD4<sup>+</sup> Lymphozyten den IL-4R $\alpha$ .

60 Tage p.i. änderte sich diese Situation erneut. Es kam zu einem starken Anstieg der IL-4R $\alpha$ <sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> Lymphozyten, wohingegen die Population der IL-4R $\alpha$ <sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Lymphozyten abnahm. Somit exprimierte das *gros* der CD4<sup>+</sup> Lymphozyten den IL-4R $\alpha$  zu diesem Zeitpunkt nicht mehr.



### IL-4R $\alpha$ Expression pulmonaler CD4<sup>+</sup> Lymphozyten

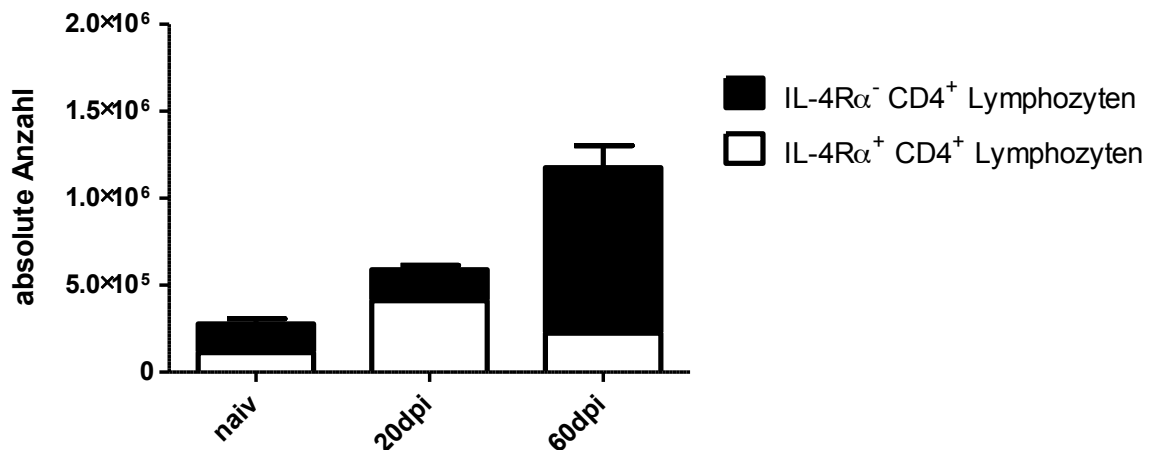


Abbildung 67: Synopsis der quantitativen Analyse pulmonaler CD4<sup>+</sup> Lymphozyten hinsichtlich ihrer IL-4R $\alpha$  Expression nach intranasaler Infektion mit *C. n.*

Die Gesamtmenge der pulmonalen CD4<sup>+</sup> Lymphozyten stieg im Verlauf der Infektion in signifikantem Maße an. Die beiden Einzelpopulationen IL-4R $\alpha$ <sup>-</sup> und IL-4R $\alpha$ <sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Lymphozyten verhielten sich unterschiedlich. Die Expression des IL-4R $\alpha$  erreichte bereits 20 Tage nach Infektion mit *C. n.* ihren Höhepunkt. 60 Tage p. i. exprimierten die meisten CD4<sup>+</sup> Lymphozyten den IL-4R $\alpha$  jedoch nicht mehr.

Betrachtet man die präsentierten durchflusszytometrisch erhobenen Daten in Gänze, so lassen sich quantitative und immunologisch qualitative Veränderungen der pulmonalen Makrophagen und CD4<sup>+</sup> Lymphozyten feststellen.

Makrophagen nahmen im Verlauf der Infektion quantitativ in statistisch signifikantem Maße zu. Den Höhepunkt ihrer IL-4R $\alpha$  Expression und damit die Fähigkeit durch IL-4 alternativ aktiviert zu werden und einen M2-Phänotyp auszubilden zeigten sie erst 60 Tage nach Infektion.

Die CD4<sup>+</sup> Lymphozyten nahmen im Verlauf der Infektion analog zu den Makrophagen quantitativ in statistisch signifikantem Maße zu. Im Gegensatz zu den Makrophagen zeigten sie jedoch ihre stärkste IL-4R $\alpha$  Expression bereits zum Zeitpunkt 20dpi. Diese Diskrepanz unterstreicht den interaktiven Prozess zwischen Makrophagen und CD4<sup>+</sup> Lymphozyten, bei dem die frühe Expression des IL-4R $\alpha$  auf CD4<sup>+</sup> Lymphozyten und damit ihre Fähigkeit zur TH2 Differenzierung eine Voraussetzung für die spätere Interaktion mit Makrophagen, die den IL-4R $\alpha$  tragen, ist.

## **4.6 Charakterisierung der pulmonalen Entzündungsreaktion auf molekularer Ebene**

Mittels quantitativer *realtime* PCR wurden molekulare Marker / Zytokine der TH1/TH2 Antwort, Marker der M1/M2-Polarisierung und Marker der Makrophagenfusion bei naiven Tieren und infizierten Tieren zu den Zeitpunkten 20dpi, 40dpi und 60dpi untersucht. Es wurden sowohl Ct als auch RQ Werte dargestellt. Somit konnte einerseits eine Genexpressionssteigerung im Vergleich zur Referenz, dem sog. „housekeeper“, und andererseits eine relative Genexpressionsregulation in Bezug zur Genexpression bei nicht infizierten (naiven) Tieren dargestellt werden. Dies ist notwendig, da manche Gene bei nicht infizierten Tieren bereits basal exprimiert werden, manche jedoch nicht. Für letzteren Fall lässt sich dann kein sinnvoller RQ Wert berechnen.

### **4.6.1 Quantifizierung molekularer Marker der pulmonalen TH1/M1-Polarisierung**

Das Hauptzytokin der TH1 Antwort IFN- $\gamma$  wurde bereits bei nicht infizierten Tieren basal exprimiert. Es zeigte sich im Verlauf der Infektion ein starker Anstieg der Expression von IFN- $\gamma$  (MW von RQ ~ 20dpi: 1,32, 40dpi: 3,98, 60dpi: 16,6). Zwischen dem naiven Zeitpunkt und dem Zeitpunkt 40dpi stellte sich der Expressionsanstieg als signifikant dar. Zwischen den Zeitpunkten 20dpi und 60dpi stellte sich die Expressionssteigerung sogar als hochsignifikant dar. Die Einzelwerte und deren Veränderungen im Verlauf sind den Tabellen 12 und 13, als auch den Abbildungen 68 und 69 zu entnehmen.

Die Genexpression des Moleküls STAT1, welches durch die TH1 Antwort (insbesondere IFN- $\gamma$ ) induziert wird und die Signaltransduktion in M1-polarisierten Makrophagen vermittelt, zeigte ebenfalls eine basale Expression. Zu Tag 20 p.i. wurde diese nicht relevant reguliert. Zum Zeitpunkt 40dpi war ein kräftiger Anstieg zu messen (MW von RQ bei 40dpi ~4,37), gefolgt von einem Abfall der Genexpression zum Zeitpunkt 60dpi (MW von RQ bei 60dpi ~1,82, siehe Abbildung 69).

Betrachtet man insgesamt den Anstieg der Expression vom naiven Zeitpunkt zum Zeitpunkt 40dpi, stellte sich dieser als statistisch signifikant dar. Dies galt ebenfalls für die Expressionssteigerung vom Zeitpunkt 20dpi zum Zeitpunkt 60dpi. Zwischen den Zeitpunkten 20dpi und 40dpi stellte sich die kräftige Expressionssteigerung sogar als statistisch hochsignifikant dar (siehe Abbildungen 68 & 69). Der Rückgang der STAT1 Expression könnte mit der weiter unten dargestellten Expression von STAT6 zu diesem

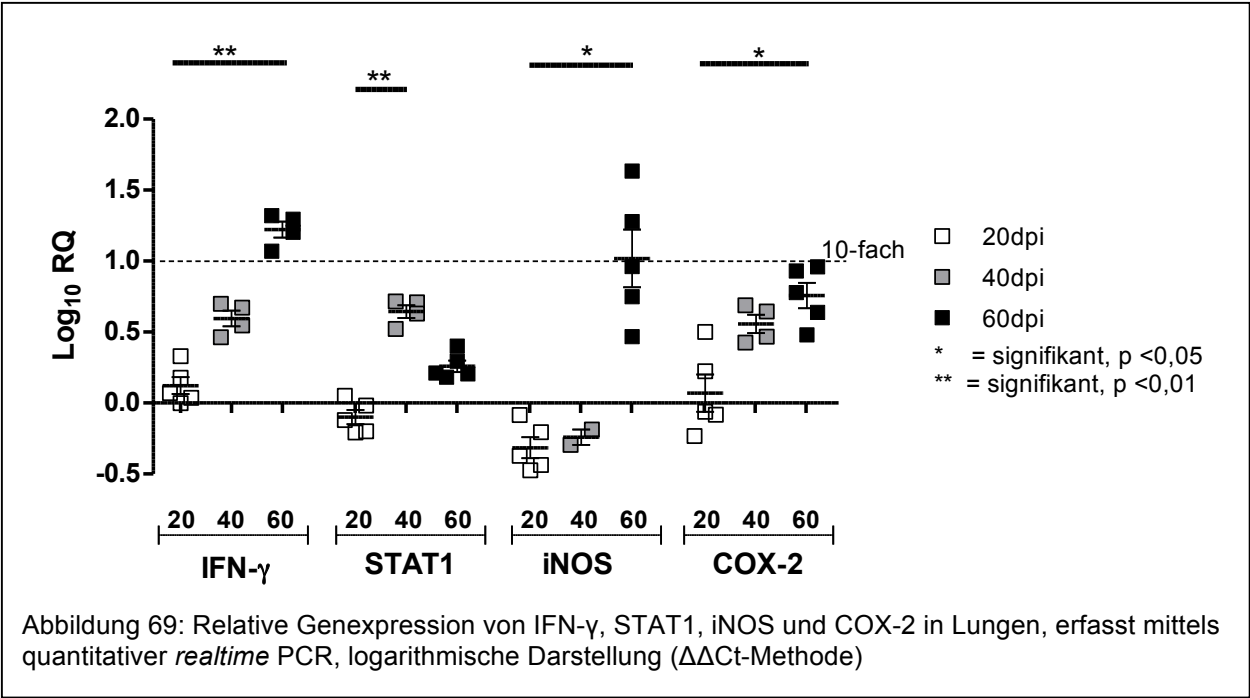
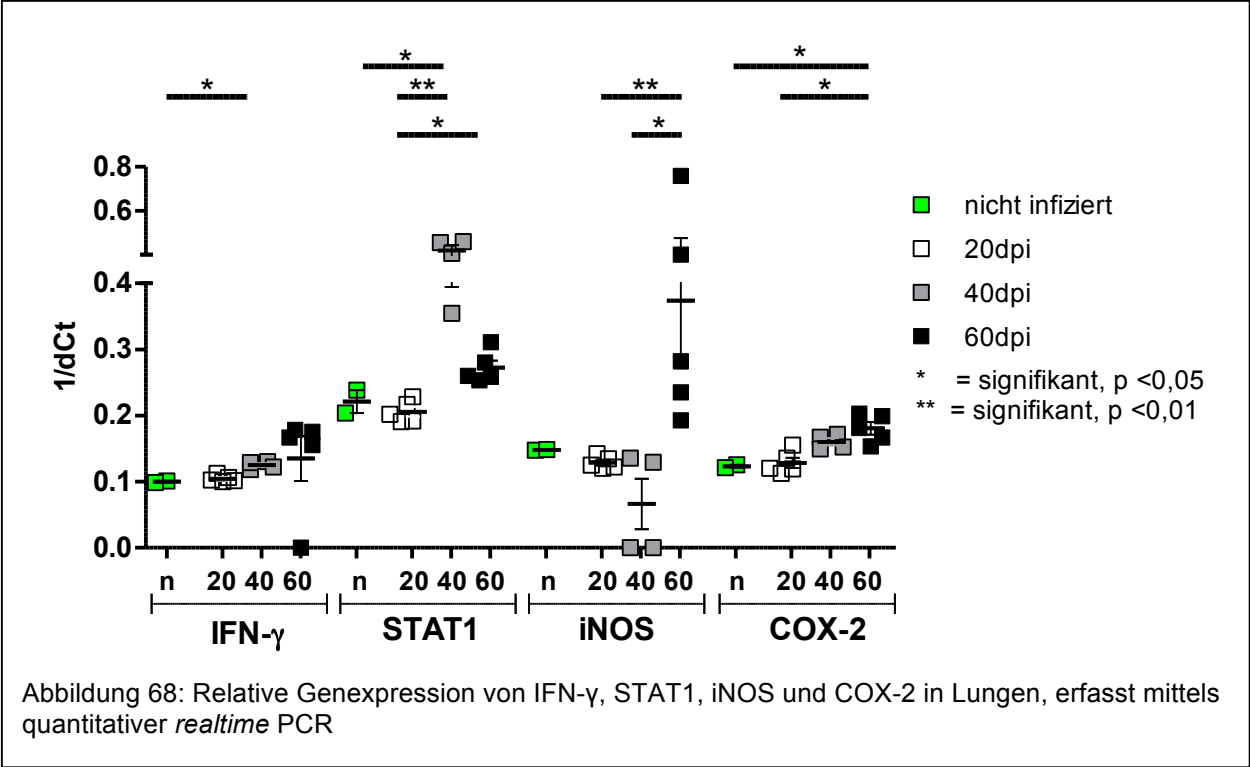
Zeitpunkt erklärt werden, da diese beiden intrazellulären Proteine antagonistisch aufeinander wirken. STAT6 stieg (siehe unten) zum Zeitpunkt 60dpi leicht an und könnte somit die erwähnte Antagonisierung von STAT1 bewirkt haben (siehe Abbildungen 68 & 69).

Die genauen Werte können den Tabellen 12 und 13 und den Abbildungen 68 und 69 entnommen werden.

Die Analyse der Genexpression des Enzyms iNOS, welches als Hauptvertreter der M1-Antwort gewertet werden kann, zeigte ebenfalls eine basale Bildung in den Lungen bei nicht infizierten Mäusen. Zu den Zeitpunkten 20dpi und 40dpi ließ sich keine relevante Regulation der Genexpression dokumentieren (faktisch liegen die gemessenen Werte sogar etwas unterhalb des „naiven Niveaus“). An Tag 60 p.i. stieg die pulmonale Expression von iNOS statistisch hochsignifikant an. Im Mittel war die Expression zu diesem Zeitpunkt etwa zehnfach höher als bei nicht infizierten Tieren. Die genauen Werte und Mittelwerte, als auch deren Beziehung zueinander, sind der Tabellen 12 und 13 und den Abbildungen 68 und 69 zu entnehmen.

Die Zykllooxygenase 2 (Cox-2), ebenfalls ein relevanter Marker der M1-Antwort, wurde bereits bei nicht infizierten Tieren exprimiert. Im Verlauf der pulmonalen Infektion zeigte sich ein klarer Anstieg der Werte (MW von RQ ~ 20dpi: 1,17, 40dpi: 3,63, 60dpi: 5,75). Vergleicht man die Expression nicht infizierter Tiere, als auch von Tieren zum Zeitpunkt 20dpi, mit der Expression von Tieren zum Zeitpunkt 60dpi, so stellt sich ein statistisch signifikanter Anstieg dar. Die exakten Werte können der Tabellen 12 und 13 und ihre Verhältnisse zueinander den Abbildungen 68 und 69 entnommen werden.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass insgesamt ein deutlicher Trend zur stetigen Expressionssteigerung der Marker der TH1 Antwort (IFN- $\gamma$ ), als auch der Marker der M1-Polarisierung (iNOS > COX-2) bestand. Eine Ausnahme bildete hierbei das M1-Markerprotein Protein STAT1, dessen Expression seinen Höhepunkt bereits zum Zeitpunkt 40dpi zeigte und anschließend wieder leicht abfiel (siehe Abbildungen 68 & 69).



TH1/M1-Marker	1/dCt Werte			
	naiv	20dpi	40dpi	60dpi
INF- $\gamma$	0,101	0,102	0	0,167
	0,099	0,106	0,118	0,155
		0,101	0,130	0

TH1/M1-Marker	1/dCt Werte			
		0,112	0,129	0,178
		0,100	0,122	0,176
MW ~	0,100	0,105	0,125	0,135
<b>iNOS</b>	0,148	0,142	/	0,401
	0,149	0,120	0	0,193
		0,122	0,129	0,282
		0,125	0	0,235
		0,135	0,136	0,759
MW ~	0,148	0,129	0,066	0,374
<b>COX-2</b>	0,126	0,136	/	0,181
	0,121	0,120	0,168	0,153
		0,119	0,149	0,199
		0,155	0,172	0,167
		0,113	0,153	0,203
MW ~	0,123	0,129	0,160	0,181
<b>STAT1</b>	0,204	0,202	/	0,254
	0,239	0,217	0,355	0,260
		0,192	0,456	0,259
		0,228	0,407	0,280
		0,191	0,460	0,311
MW ~	0,221	0,206	0,419	0,273

Tabelle 12: 1/dCT Werte der TH1/M1-Marker bzw. Zytokine im Verlauf der pulmonalen Infektion

TH1/M1-Marker	Log <sub>10</sub> RQ Werte		
	20dpi	40dpi	60dpi
<b>INF-γ</b>	0,069	/	1,204
	0,178	0,465	1,069
	0,037	0,699	n.b.
	0,329	0,671	1,320
	-0,002	0,546	1,295
MW ~	0,123	0,595	1,222
<b>iNOS</b>	-0,085	/	1,279
	-0,474	n.b.	0,467
	-0,436	-0,295	0,962
	-0,373	n.b.	0,749

TH1/M1-Marker	Log <sub>10</sub> RQ Werte		
	-0,206	-0,187	1,634
MW ~	-0,315	-0,241	1,018
<b>COX-2</b>	0,224	/	0,778
	-0,062	0,645	0,480
	-0,083	0,426	0,930
	0,501	0,689	0,638
	-0,233	0,468	0,959
MW ~	0,069	0,557	0,757
<b>STAT1</b>	-0,120	/	0,182
	-0,019	0,521	0,212
	-0,199	0,709	0,205
	0,051	0,630	0,295
	-0,208	0,715	0,402
MW ~	-0,099	0,644	0,259

Tabelle 13: Log<sub>10</sub> RQ Werte der TH1/M1-Marker bzw. Zytokine im Verlauf der pulmonalen Infektion ( $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode) (n.b. = nicht berechenbar)

#### 4.6.2 Quantifizierung molekularer Marker der pulmonalen TH2/M2-Polarisierung

Das sogenannte „Masterzytokin“ der TH2 Antwort IL-4 wurde bei nicht infizierten Tieren schwach basal exprimiert. Überraschenderweise wurde die Produktion von IL-4 nach der pulmonalen Infektion nahezu eingestellt und zu keinem Zeitpunkt relevant reguliert. (Lediglich eine singuläre Messung erbrachte einen Messwert bei 60dpi: RQ ~19,95) Die Einzelwerte sind den Tabellen 14 und 15 und den Abbildungen 70 und 71 zu entnehmen.

Das ebenfalls zentrale Zytokin der TH2 Antwort IL-13 wurde bereits in den Lungen von nicht infizierten Tieren schwach exprimiert. 20 Tage p.i. wurde die IL-13 Expression bei allen bis auf ein Tier nicht wesentlich reguliert. Im weiteren Verlauf der Infektion stieg die IL-13 Expression jedoch konstant und in statistisch signifikantem Maße an. Zwischen den Zeitpunkten 20dpi und 60dpi stellte sich dieser Anstieg sogar als statistisch hochsignifikant dar. Die genauen Werte sind den Tabellen 14 und 15 und der Abbildung 70 zu entnehmen. Es wurde darauf verzichtet eine logarithmische Darstellung von RQ Werten zu berechnen bzw. darzustellen, da sich aufgrund der geringen Ausgangsexpression keine mathematisch logischen RQ Werte ergaben (Division von Werten ~0).

Die Genexpression des Signaltransduktionsmoleküls STAT6 (als Antagonist von STAT1) welches wesentlich die M2-Polarisierung in Makrophagen vermittelt, zeigte sich im nicht infizierten Tier bereits deutlich basal exprimiert.

Sie wurde zu den Zeitpunkten 20dpi und 40dpi herabreguliert um 60 Tage p.i. anzusteigen. Die Veränderungen dieses Verlaufes stellten sich als statistisch nicht signifikant dar. Die genauen Einzelwerte sind den Tabellen 14 und 15 und den Abbildungen 70 und 71 zu entnehmen.

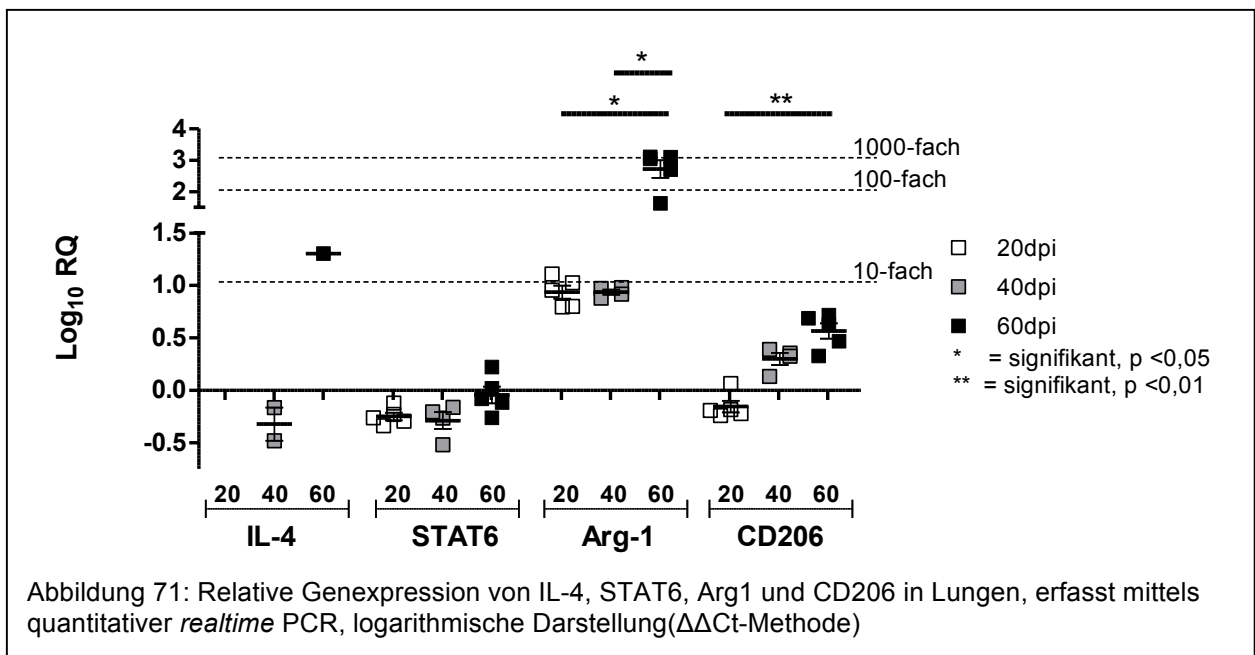
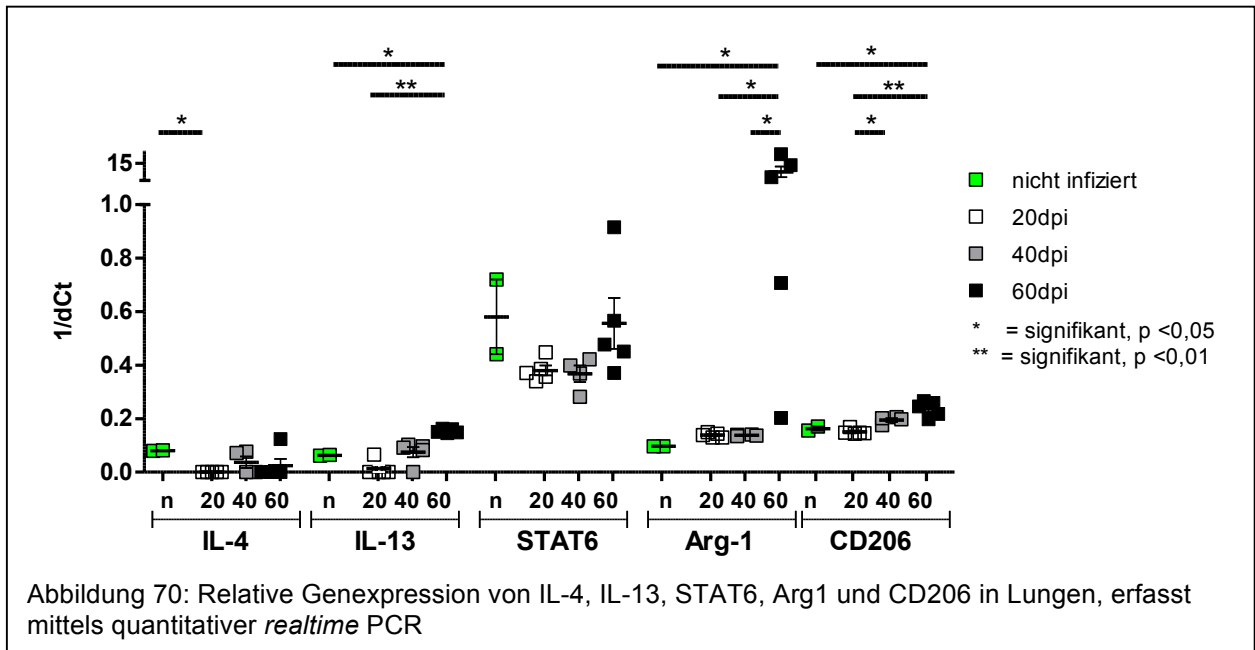
Arg-1, als Marker der alternativen Makrophagenaktivierung und zentrales Molekül in der Kooperation mit iNOS um das gemeinsame Substrat Arginin (siehe Kapitel 1.5), wurde ebenfalls basal exprimiert. Zu den Zeitpunkten 20dpi und 40dpi zeigte sich jeweils ein Anstieg der Expression, welcher sich als statistisch signifikant berechnen ließ (MW von RQ 20dpi: ~8,71, 40dpi: ~8,71). Dieser Trend setzte sich mit einem kräftigen Anstieg zum Zeitpunkt 60dpi fort, welcher sich ebenfalls als statistisch signifikant darstellte. Die RQ Werte betragen nun im Mittel ~524,81. Die exakten Werte und deren Beziehung zueinander sind den Tabellen 14 und 15 und den Abbildungen 70 und 71 zu entnehmen.

Die Genexpression des Maus-Mannose-Rezeptors CD206 (*Mrc1*), welcher ebenfalls als Marker der alternativen M2-Makrophagenaktivierung gewertet wird, zeigte sich bei nicht infizierten Tieren basal (schwach) exprimiert. Im Verlauf der Infektion ließ sich ein stetiger Anstieg (MW von RQ ~ 20dpi: 0,71, 40dpi: 2,0, 60dpi: 3,63) messen. Dieser Anstieg stellte sich zwischen den Zeitpunkten nicht infiziert und 60dpi, als auch zwischen den Zeitpunkten 20dpi und 40dpi als statistisch signifikant dar. Der Anstieg der CD206 Expression vom Zeitpunkt 20dpi zum Zeitpunkt 60dpi stellte sich sogar als statistisch hochsignifikant dar. Die exakten Werte sind den Tabellen 14 und 15 und den Abbildungen 70 und 71 zu entnehmen.

Zusammenfassend wurde IL-4 nicht messbar reguliert, während IL-13 ab dem Zeitpunkt 40dpi eine deutlich gesteigerte Expression zeigte.

Die STAT6 Expression war im Zusammenhang mit der STAT1 Expression spiegelbildlich reguliert, was wahrscheinlich die gegenseitige Regulation widerspiegelte, wenngleich sich keine statistische Signifikanz berechnen ließ. Dennoch zeigte sich im

Verlauf der Infektion eine deutliche Zunahme der Expression der M2-Markermoleküle Arg-1 und CD206.



TH2/M2-Marker	1/dCt Werte			
	naiv	20dpi	40dpi	60dpi
IL-4	0,079	0	/	0
	0,081	0	0	0
		0	0,077	0
		0	0	0



TH2/M2-Marker	1/dCt Werte			
		0	0,071	0,123
MW ~	0,080	0	0,037	0,025
<b>STAT6</b>	0,441	0,386	/	0,566
	0,720	0,357	0,369	0,451
		0,339	0,399	0,371
		0,448	0,282	0,477
		0,370	0,422	0,916
MW ~	0,581	0,380	0,368	0,556
<b>Arg-1</b>	0,097	0,144	/	22,322
	0,096	0,15	0,140	0,202
		0,13	0,14	3,779
		0,129	0,134	13,42
		0,139	0,137	0,707
MW ~	0,096	0,138	0,138	8,085
<b>CD206</b>	0,155	0,147	/	0,266
	0,171	0,148	0,175	0,198
		0,145	0,206	0,259
		0,144	0,201	0,246
		0,169	0,197	0,218
MW ~	0,163	0,151	0,195	0,237
<b>IL-13</b>	0,061	0	0	0,151
	0,064	0,065	0,102	0,146
		0	0,096	0,162
		0	0,083	0,160
		0	0,091	0,149
MW ~	0,063	0,013	0,075	0,154

Tabelle 14: 1/dCT Werte der TH2/M2-Marker bzw. Zytokine im Verlauf der pulmonalen Infektion (n.b. = nicht berechenbar)

TH2/M2-Marker	Log <sub>10</sub> RQ Werte		
	20dpi	40dpi	60dpi
<b>IL-4</b>	n.b.	/	n.b.
	n.b.	n.b.	n.b.
	n.b.	-0,164	n.b.
	n.b.	n.b.	n.b.
	n.b.	-0,481	1,305

TH2/M2-Marker	Log <sub>10</sub> RQ Werte		
MW ~	n.b.	-0,323	1,305
<b>STAT6</b>	-0,229	/	0,019
	-0,294	-0,265	-0,117
	-0,337	-0,205	-0,261
	-0,121	-0,519	-0,081
	-0,262	-0,163	0,222
MW ~	-0,249	-0,288	-0,044
<b>Arg-1</b>	1,025	/	3,109
	1,109	0,978	1,634
	0,801	0,970	3,043
	0,795	0,879	3,1
	0,956	0,917	2,697
MW ~	0,937	0,936	2,716
<b>CD206</b>	-0,192	/	0,716
	-0,183	0,132	0,328
	-0,222	0,389	0,686
	-0,240	0,355	0,624
	0,065	0,325	0,469
MW ~	-0,155	0,3	0,565

Tabelle 15: Log<sub>10</sub> RQ Werte der TH2/M2-Marker bzw. Zytokine im Verlauf der pulmonalen Infektion ( $\Delta\Delta Ct$ -Methode) (n.b. = nicht berechenbar)

#### 4.6.3 Quantifizierung molekularer Marker der Makrophagenfusion in der Lunge

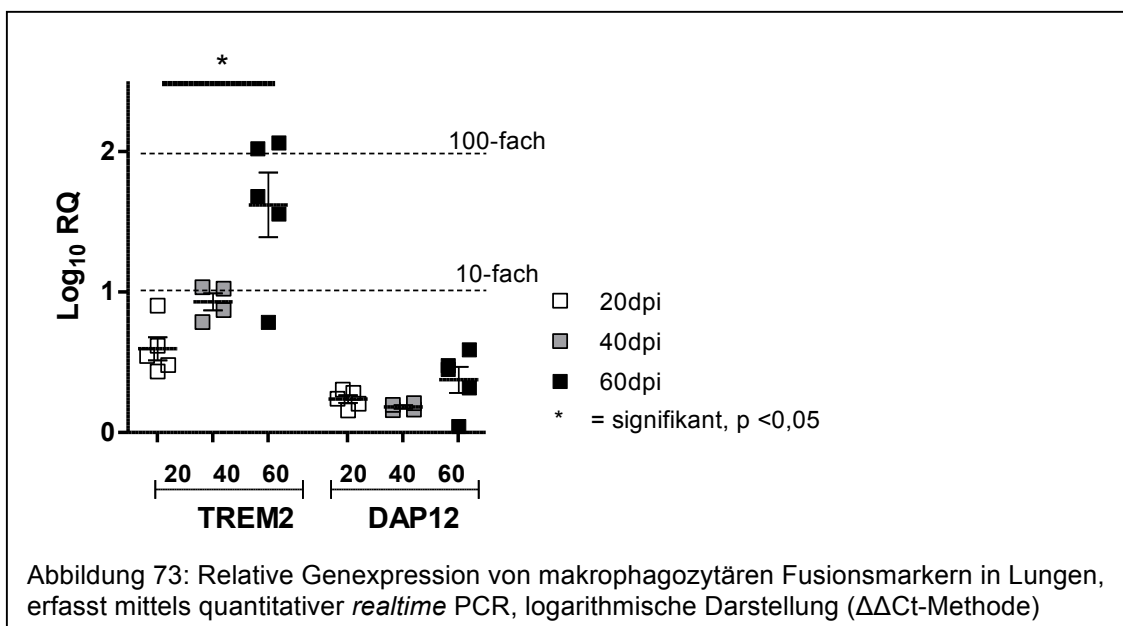
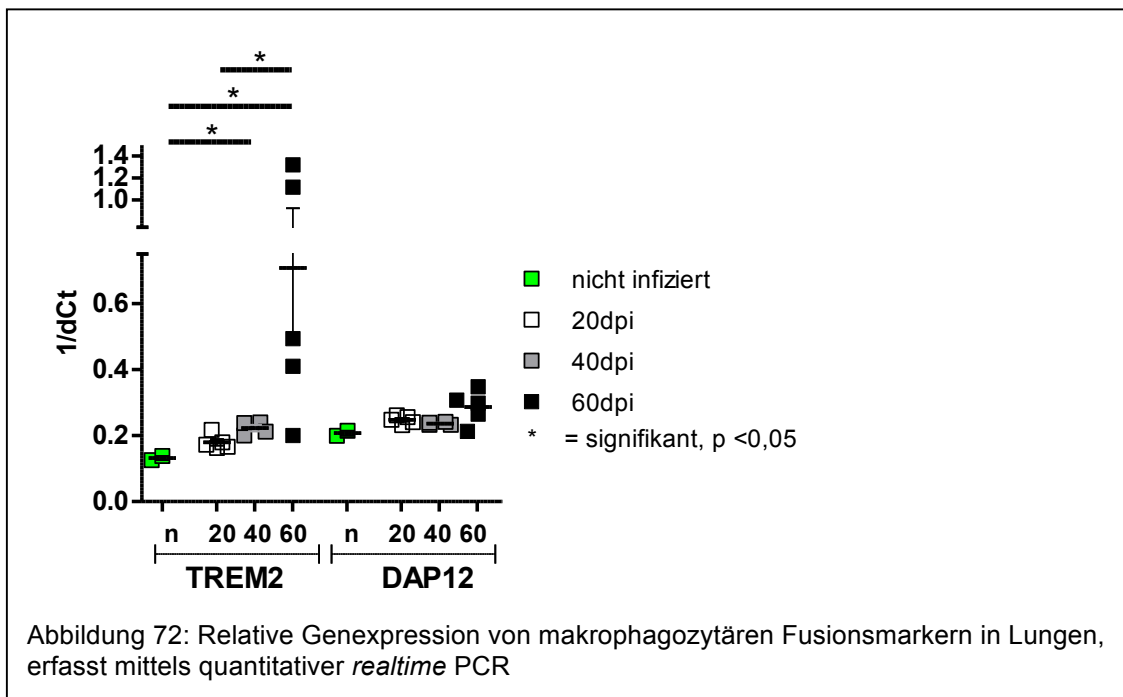
TREM2 ist das Adapterprotein für DAP12, welches zentral in den Prozess der Makrophagenfusion involviert ist. Hier bestand bereits bei nicht infizierten Tieren eine basale Expression. Im Verlauf der Infektion wurde TREM2 deutlich und in statistisch signifikantem Maße in seiner Expression gesteigert. Besonders stark stellte sich dieser Anstieg zum Zeitpunkt 60dpi dar. Die genauen Werte sind den Tabellen 16 und 17 und den Abbildungen 72 und 73 zu entnehmen.

DAP12 stellt unter anderem einen wichtigen Baustein des mehrstufigen Prozesses dar, der Makrophagen fusionskompetent werden lässt, um somit mehrkernige Riesenzellen zu bilden.

DAP12 wurde bereits in den Lungen von nicht infizierten Tieren basal in geringer produziert. Im Verlauf der Infektion ließ sich ein nicht signifikanter Anstieg der Genexpressionslevel beobachten (MW von RQ ~ 20dpi: 1,74, 40dpi: 1,04, 60dpi: 2,4).

Die genauen Werte sind den Tabellen 16 und 17 und den Abbildungen 72 und 73 zu entnehmen.

Zusammenfassend ist also festzustellen, dass die Marker der Makrophagenfusionskompetenz DAP12 und TREM2 im Verlauf der Infektion zunehmend kräftiger exprimiert wurden, wobei TREM2 sich als führend darstellte und vor allem zum Zeitpunkt 60dpi um ein vielfaches im Vergleich zum nicht infizierten Tier hochreguliert wurde. Diese Analysen deckten sich mit dem histologisch beobachteten Auftreten von mehrkernigen Riesenzellen in der Lunge zum Zeitpunkt 60dpi.



Makrophagenfusionsmarker	1/dCt Werte			
	naiv	20dpi	40dpi	60dpi
<b>TREM2</b>	0,1257	0,166	/	0,494
	0,1378	0,180	0,240	0,200
		0,173	0,200	1,32
		0,217	0,238	1,117
		0,162	0,212	0,41
MW ~	0,132	0,18	0,223	0,708
<b>DAP12</b>	0,199	0,232	/	0,265
	0,215	0,257	0,233	0,213
		0,241	0,232	0,307
		0,262	0,242	0,299
		0,248	0,239	0,348
MW ~	0,207	0,248	0,237	0,286

Tabelle 16: 1/dCT Werte der Makrophagenfusionsmarker im Verlauf der pulmonalen Infektion

Makrophagenfusionsmarker	Log <sub>10</sub> RQ Werte		
	20dpi	40dpi	60dpi
<b>TREM2</b>	0,48	/	1,68
	0,617	1,035	0,785
	0,545	0,787	2,061
	0,904	1,025	2,02
	0,434	0,872	1,554
MW ~	0,596	0,93	1,62
<b>DAP12</b>	0,157	/	0,318
	0,282	0,163	0,043
	0,206	0,16	0,476
	0,306	0,210	0,448
	0,240	0,197	0,589
MW ~	0,238	0,182	0,375

Tabelle 17, Log<sub>10</sub> RQ Werte der Makrophagenfusionsmarker im Verlauf der pulmonalen Infektion (ΔΔCt-Methode) (n.b. = nicht berechenbar)

#### 4.7 Quantifizierung des zerebralen Pilzbefalles

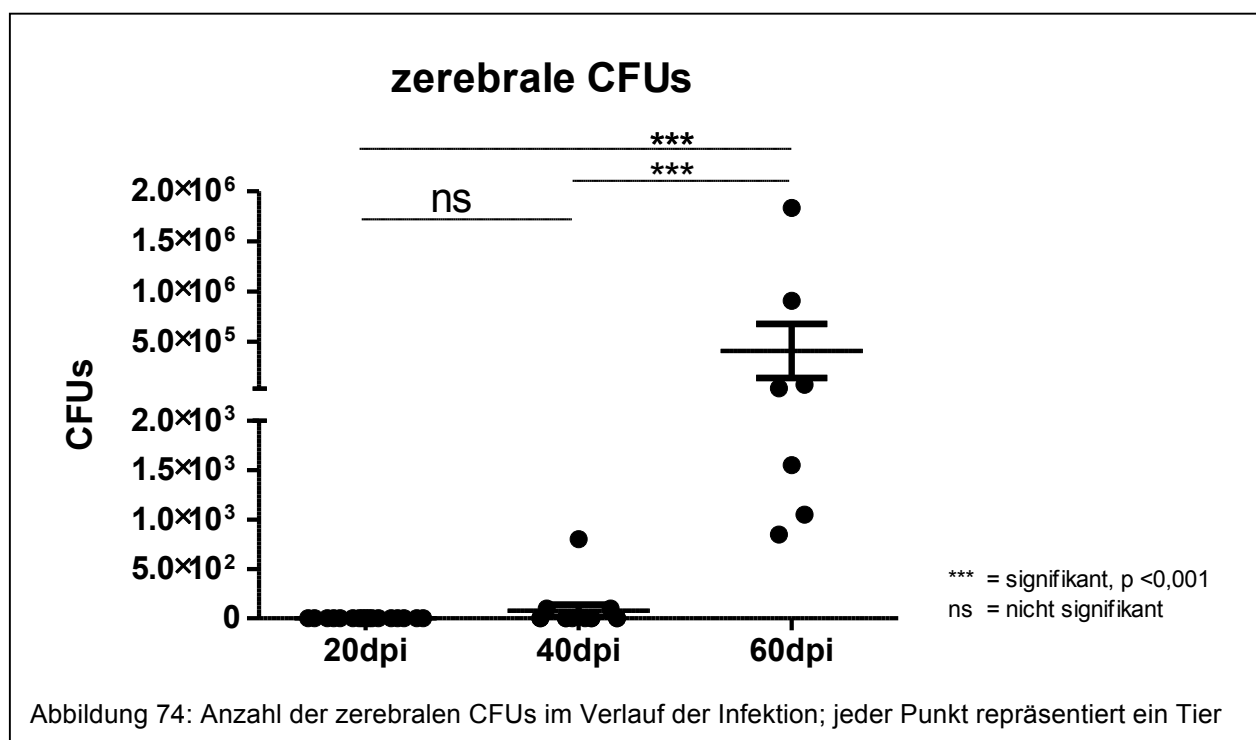
20 Tage p.i. zeigte keines der untersuchten Gehirne einen Erregerbefall. Im Verlauf der darauffolgenden 20 Tage traten erstmals Pilze im ZNS auf (Abbildung 74).

An Tag 40 p.i. wiesen 3 der 14 untersuchten Gehirne einen geringen Pilzbefall auf. Dieser variierte zwischen 100 und 800 CFUs, wobei sich im Mittel 77 CFUs in den Gehirnen befanden. Der SEM betrug 61 CFUs.

Innerhalb der nächsten 20 Tage trat ein kräftiger und statistisch signifikanter Anstieg der zentralnervösen Pilzlast auf. An Tag 60 p.i. waren alle untersuchten Gehirne von Pilzen befallen. Das Ausmaß der Infektion variierte sehr stark zwischen 850 und  $\sim 1,8 \times 10^6$  (1.833.750) CFUs. Durchschnittlich befanden sich  $\sim 4,1 \times 10^5$  (407.743) CFUs in den Gehirnen. Der SEM betrug  $\sim 2,7 \times 10^4$  (26.8742) CFUs. Diese große Varianz der zerebralen Infektion spiegelte die, aus vorherigen Arbeiten bekannten, starken interindividuellen Unterschiede im Infektionsverlauf und der Dissemination wider [76].

Betrachtet man weiterhin den Gesamtverlauf der Infektion, so ist anhand der Abbildung 74 festzustellen, dass die Erregerlast vom Zeitpunkt 20dpi zum Zeitpunkt 60dpi hochsignifikant anstieg.

Diese Ergebnisse zeigen, dass der Befall des ZNS theoretisch 40 Tage p.i. in einem Teil der untersuchten Gehirne begann, was sich histologisch jedoch noch nicht nachweisen ließ. 60 Tage p.i. waren alle Gehirne von Pilzen befallen.



#### 4.8 Neuropathologische Charakterisierung der zerebralen Kryptokokkose

In der H&E Färbung wurden Gehirne von naiven Tieren und Tieren 20, 40 und 60 Tage nach Infektion mit *C. n.* untersucht. Die Gehirne von nicht infizierten Tieren, sowie von Tieren 20 und 40 Tage nach der Infektion stellten sich in der H&E Färbung nach systematischer Aufarbeitung (alle 100µm wurde ein Schnitt untersucht) regelgerecht dar. Es ließen sich mikroskopisch keine Erreger im Parenchym, den Meningen oder aber im Cerebellum darstellen, obwohl 40 Tage p.i. der Erregernachweis für 3 der 14 untersuchten Gehirne positiv ausfiel. Zum einen könnte dies an der technischen Durchführung der Schnitthanfertigung gelegen haben. Hierbei könnten sich einzelne Kryptokokken im nicht untersuchten Gewebe zwischen den analysierten Schnitten befunden haben. Zum anderen könnten sich die wenigen zu diesem Zeitpunkt detektierten Kryptokokken noch im Blut und Liquor der Tiere befunden haben, da diese Flüssigkeiten als Teil des Gesamtgehirnhomogenates ebenfalls in den mikrobiologischen Erregernachweis eingingen. Nach Perfusion der Gehirne und anschließender Kryoasservierung waren diese dann naturgemäß nicht mehr erkennbar.

Es ließen sich weder supra- noch infratentoriell vermehrt Leukozyten zu den Zeitpunkten 20dpi und 40dpi feststellen. Bei den vorhandenen Makrophagen handelte es sich ausschließlich um Mikrogliazellen und einige wenige, im plexus choroideus gelegene, sogenannte Plexusmakrophagen (Abbildungen 75-77).

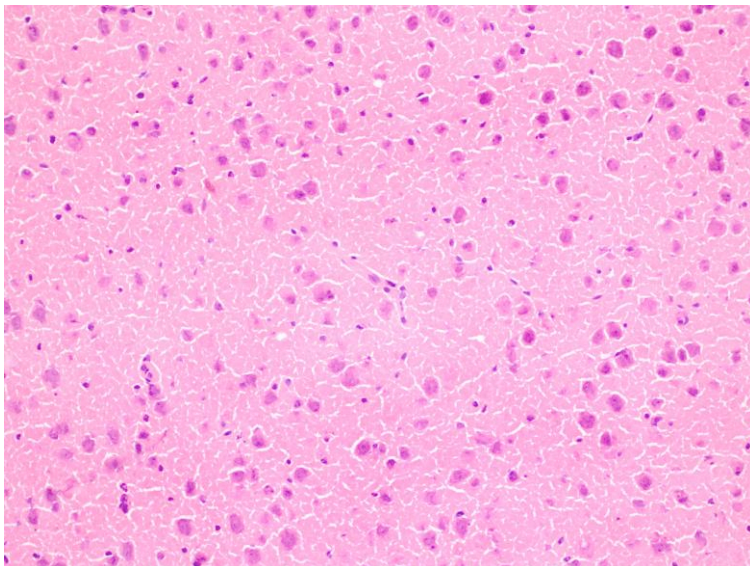


Abbildung 75:  
ZNS, naiv, H&E Färbung.  
200x Vergrößerung

In den Gehirnen naiver Tiere zeigte sich zytoarchitektonisch eine regelhafte Darstellung des Marklagers und Cortex des Groß- und Kleinhirns.

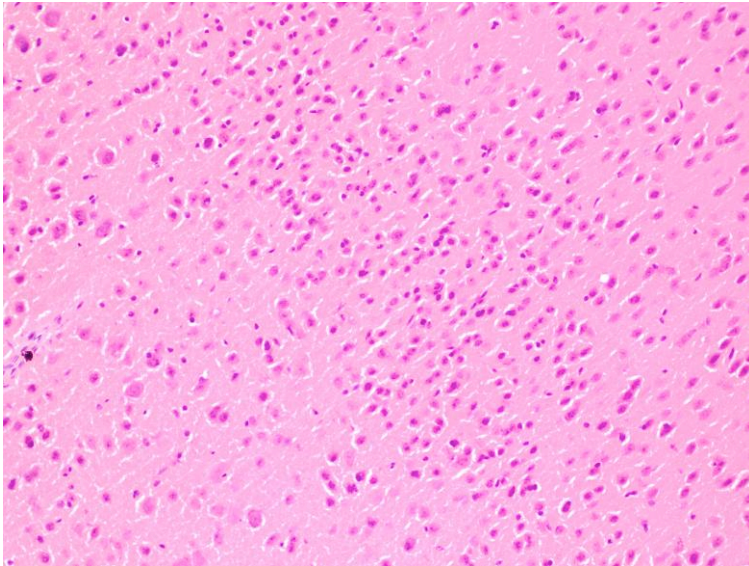


Abbildung 76:  
ZNS, 20dpi, H&E Färbung.  
200x Vergrößerung

20 Tage nach der Infektion mit *C. n.* zeigte sich weder histomorphologisch noch mikrobiologisch ein Befall des zentralen Nervensystems.

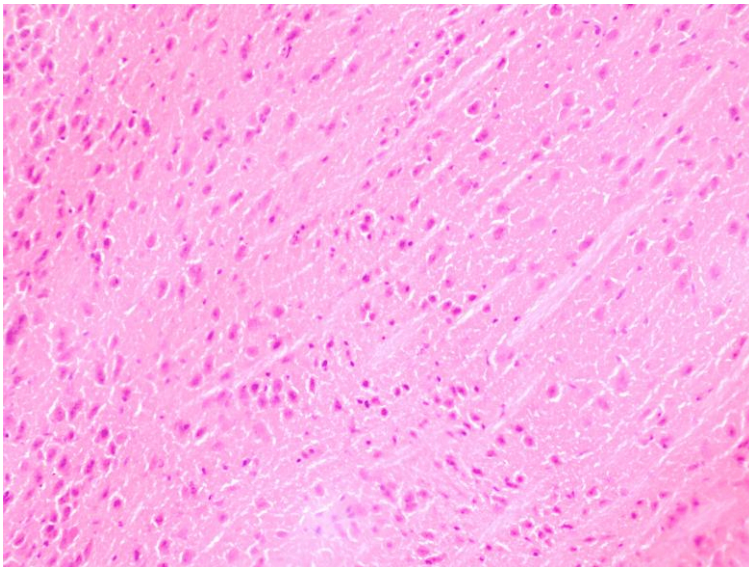


Abbildung 77:  
ZNS, 40dpi, H&E Färbung.  
200x Vergrößerung

40 Tage nach der Infektion mit *C. n.* zeigte sich zwar mikrobiologisch ein Pilzbefall weniger Gehirne, doch histomorphologisch ließen sich diese Pilze nicht darstellen. Das Cerebellum und supratentorielle Cerebrum stellten sich zytoarchitektonisch regelhaft und unverändert im Vergleich zur naiven Situation dar.

60 Tage nach der Infektion mit *C. n.* ließen sich nur in zwei der sieben untersuchten Gehirnen mit histopathologischen Methoden darstellbare Läsionen finden, obwohl alle sieben Gehirne einen Pilzbefall auf mikrobiologischen Nährmedien zeigten.

Ursachen für diese Diskrepanz waren vor allem in der technischen Durchführung zu suchen, da eine Anfertigung von zu analysierenden Schnitten in Abständen von 100µm dazu führen kann, dass sich einzelne Kryptokokken oder auch kleinere Kryptokokkome der histologischen Darstellung entziehen, obwohl sie mit mikrobiologischen Methoden erfasst werden konnten (s.o.).

Betrachtet man die durch *C. n.* hervorgerufenen Läsionen des zentralen Nervensystems bei Menschen, so werden grundlegend zwei Arten von Läsionen unterschieden, die sog. intra- und extraparenchymatösen Läsionen. Die extraparenchymatösen Läsionen sind in aller Regel meningealen Ursprungs, breiten sich entlang der Meningen aus und können im Verlauf auch das umliegende Parenchym infiltrieren.

Die intraparenchymatösen Läsionen werden weiterhin in zwei Arten aufgeteilt. Zum einen können häufig kleine, fokale Kryptokokkome gefunden werden, die wenig Reaktion des umliegenden Gewebes hervorrufen und keine Kapselbildung oder Schichtung aufweisen. Zum anderen können in selteneren Fällen große, ausgedehnte Läsionen mit granulomartiger Schichtung und kräftiger Entzündungsreaktion des umliegenden Parenchyms gefunden werden [8].

Analog zur humanen Situation konnten auch bei den von mir untersuchten Gehirnen diese Läsionstypen identifiziert werden. Auch die Reaktion des umliegenden Parenchyms stellte sich analog zur humanen Situation dar. Dies unterstreicht deutlich, mit welcher Güte das von mir verwendete Infektionsmodell die reale, humane Situation abbildet.

Prinzipiell waren drei Muster verschiedener Läsionen zu unterscheiden:

- 1) intraparenchymatöse, kleine und fokale Läsionen,
- 2) intraparenchymatöse, große, ausgedehnte und granulomartige Läsionen,
- 3) extraparenchymatöse, längliche, den Meningen folgende Läsionen



Abbildung 78:  
ZNS, 60dpi, H&E Färbung.  
40x Vergrößerung

Dieser fokale Läsionstyp präsentierte sich mit geringem Durchmesser, geringem Gehalt an Pilzen und einer sehr schwach ausgeprägten Reaktion des umliegenden Parenchyms.



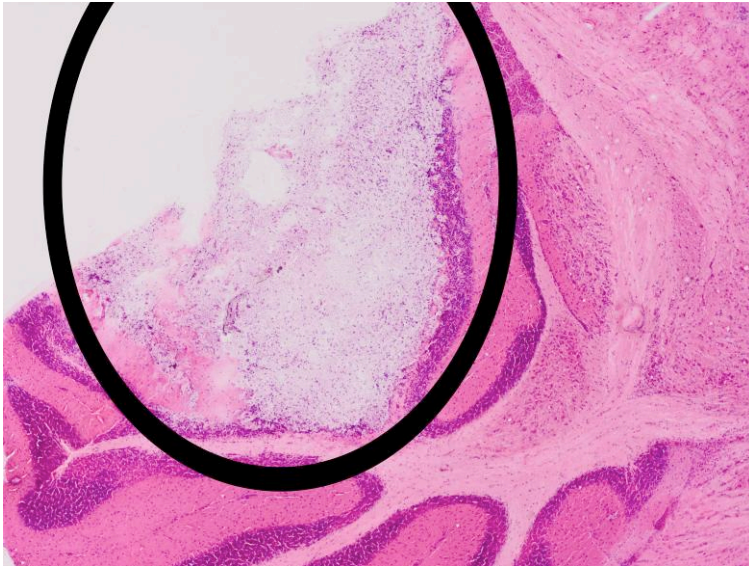


Abbildung 79:  
ZNS, 60dpi, H&E Färbung.  
40x Vergrößerung

Dieser ausgedehnte Läsionstyp zeigte einen granulomartigen Aufbau mit einem Zentrum, das unzählige konfluierende Kryptokokken beherbergte. Gesäumt wurde dieses Zentrum von einem zweischichtigen Randwall bestehend aus Entzündungszellen wie Makrophagen und Lymphozyten.

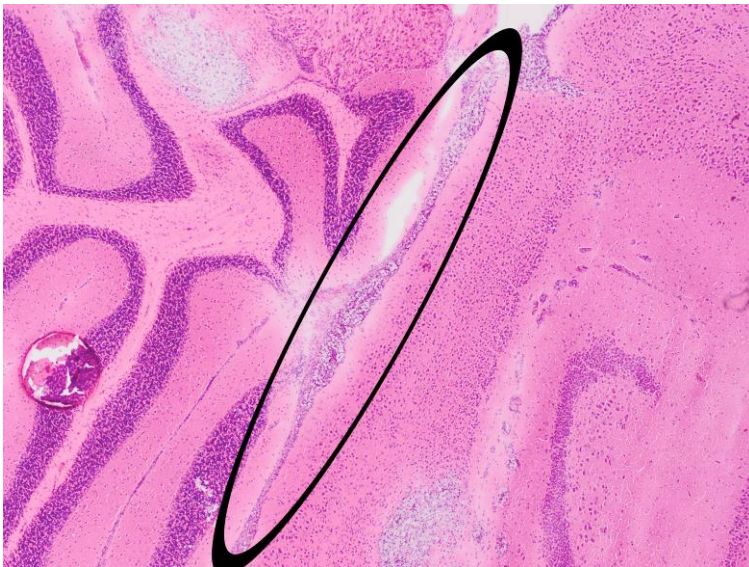


Abbildung 80  
ZNS, 60dpi, H&E Färbung.  
40x Vergrößerung

Diese meningeale Läsion zeichnete sich durch eine längliche Form aus, die durch die Meningen vorgegeben war. Am oberen Ende ist zu erkennen, dass dieser Läsionstyp extraparenchymal liegt, jedoch fokal in das angrenzende Parenchym eindringt. Das umliegende Parenchym zeigte eine intermediäre zelluläre Reaktion mit einigen Monozyten und Lymphozyten an den Läsionsrändern.

Diese drei Läsionstypen unterschieden sich hinsichtlich ihrer Morphologie und der verursachten Entzündungsreaktion deutlich.

Betrachtet man die Größe und Form der Läsionen, so ist anhand der Abbildungen 78-80 zu erkennen, dass die beiden intraparenchymatösen Läsionen zwar ihre runde Form gemeinsam haben, sich jedoch deutlich bezüglich ihrer Ausdehnung unterschieden. Der Durchmesser der kleinen, fokalen Läsionen war um ein Vielfaches kleiner als der Durchmesser der granulomartigen und ausgedehnten intraparenchymatösen Läsionen. Bezüglich Form und Größe wich die meningeale Läsion von den beiden vorher genannten deutlich ab. Wie in Abbildung 80 zu sehen ist, wuchs diese Läsion entlang ihrer Leitstruktur, den Meningen, und wies daher eine längliche Form variabler Länge auf.

Neben der Größe und der Form differierten die verschiedenen Läsionstypen auch in der Reaktivität des angrenzenden Parenchyms.

Vergleicht man die beiden intraparenchymatösen Läsionen, wird ersichtlich, dass die Zahl der enthaltenen Kryptokokken aufgrund der Läsionsgröße deutlich differierte. Nichtsdestotrotz unterschieden sich diese beiden Läsionen vor allem im Randbereich, dort wo die Kryptokokken auf das umliegende Parenchym trafen. So zeigte sich bei den ausgedehnten Läsionen ein granulomartiger Aufbau mit einer zentralen Ansammlung aus Kryptokokken, die von einem zweischichtigen Randwall aus Entzündungszellen gesäumt wurde.

Wie der Abbildung 82 zu entnehmen ist, bestand der innere Ring vornehmlich aus monozytären Zellen, die einen großen Zelldurchmesser zeigten und ein feingranuliertes schaumiges Zytoplasma aufwiesen.

Der äußere Ring des Randwalles bestand vornehmlich aus lymphozytären Zellen, die an das noch intakte Parenchym angrenzten. Dieser Aufbau entspricht formal einem geschichteten (entzündlichen) Granulom.

Der kleinere Typ intraparenchymatöser Läsionen zeigte diesen mehrschichtigen Randwall nicht. Wie der Abbildung 81 zu entnehmen ist, zeigte das umliegende Parenchym kaum eine Reaktion im Randbereich der Läsion. Es ließen sich weder vermehrt Makrophagen, noch Lymphozyten mit spezieller Assoziation zur Läsion finden.

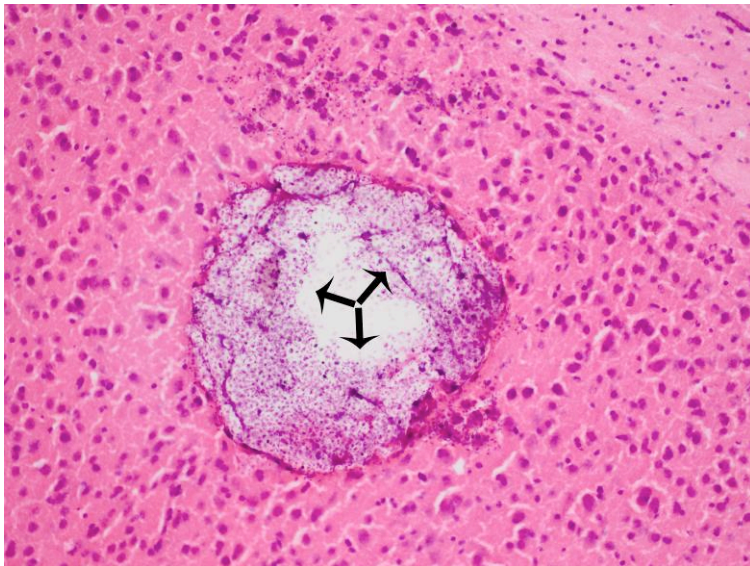


Abbildung 81:  
H&E Färbung einer fokalen zerebralen intraparenchymatösen Läsion, 60dpi. 200x Vergrößerung.

Die fokale mit Kryptokokken gefüllte intraparenchymatöse Läsion verursachte kaum eine lymphomonozytäre Reaktion oder Mikrogliazellenaktivierung des umliegenden Parenchyms.

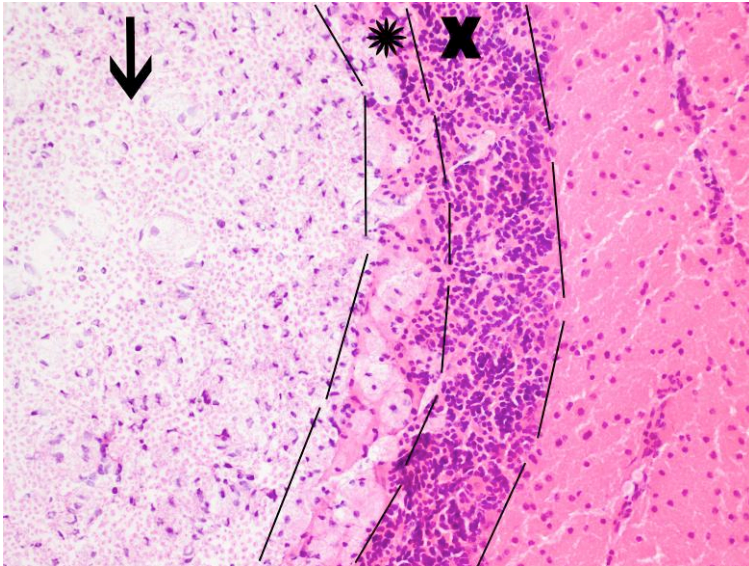


Abbildung 82:  
H&E Färbung einer ausgedehnten intraparenchymatösen cerebellären Läsion, 60dpi. 200x Vergrößerung

Links befindet sich der Kern des Granuloms, der hauptsächlich aus Kryptokokken bestand. Die innere Schicht bestand aus großvolumigen Makrophagen. Die äußere Schicht des Randwalles bestand vor allem aus Lymphozyten.

Legende:  
Stern (\*) = großvolumige Makrophagen (sog. „Schaumzellen“)  
Pfeil (→) = *C. n.*  
Kreuz (X) = Lymphozyten

Die meningealen Läsionen zeigten hinsichtlich der Reaktivität des umliegenden Parenchyms einen intermediären Phänotyp. Wie anhand der Abbildung 83 ersichtlich wird, zeigten diese Läsionen zwar keinen mehrschichtigen Randwall, jedoch wurden sie diskontinuierlich von Entzündungszellen gesäumt.

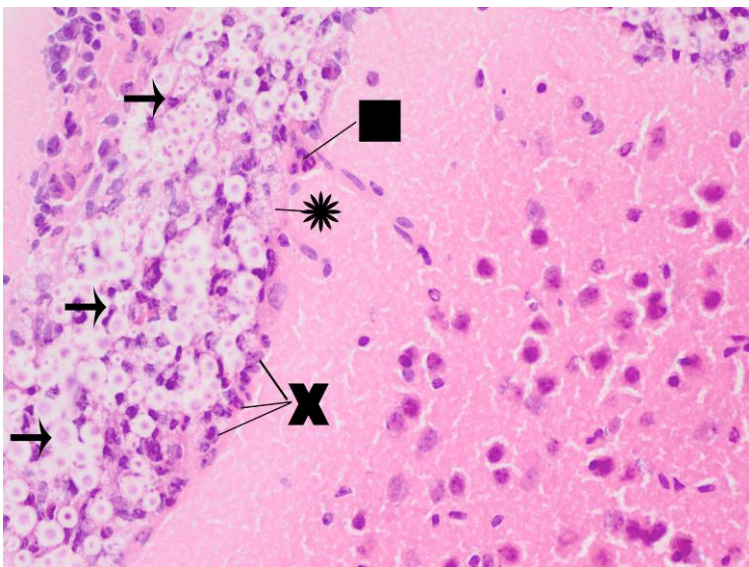


Abbildung 83:  
H&E Färbung einer meningealen Läsion, 60dpi. 400x Vergrößerung

Diese meningeale Läsion zwischen Cerebellum und Cerebrum war mit Kryptokokken gefüllt. Sie wurde diskontinuierlich von einem Rand aus Lymphozyten, großvolumigen Makrophagen und neutrophilen Granulozyten gesäumt.

Legende:  
Stern (\*) = großvolumige Makrophagen (sog. „Schaumzellen“)  
Pfeil (→) = *C. n.*  
Kreuz (X) = Lymphozyten  
Quadrat (■) = neutrophile Granulozyten

Des Weiteren zeigten meningeale Läsionen eine Besonderheit bezüglich ihrer Ausbreitung. So waren meningeale Läsionen zwar prinzipiell extraparenchymatös und weitgehend auf die Meningen beschränkt, jedoch waren die Erreger fokal in der Lage das umliegende Parenchym zu infiltrieren, wie dies auf Abbildung 84 zu sehen ist. Bei genauer Betrachtung fällt darüber hinaus eine Besonderheit der Ausbreitung aus. Die Erreger infiltrierten das Parenchym, indem sie sich unter Mitnahme meningealer Schichten in das Parenchym vorwälzten.

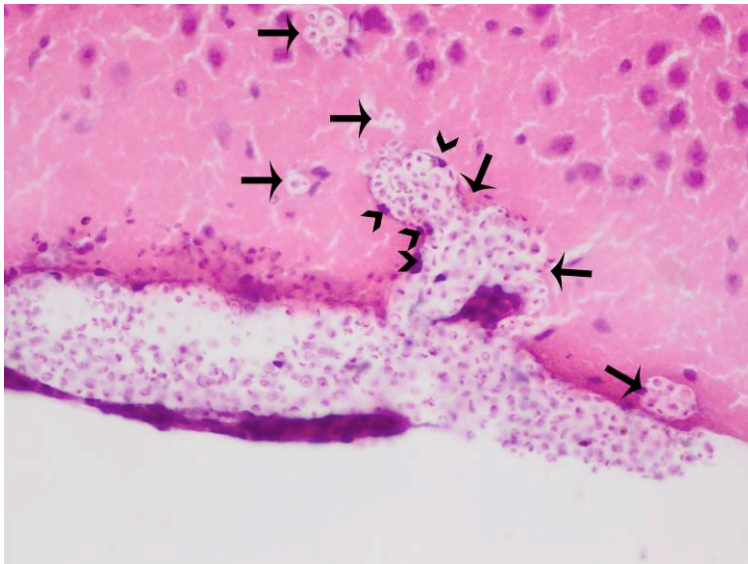


Abbildung 84:  
H&E Färbung einer meningealen  
Läsion mit Infiltration des  
Parenchyms, 60dpi.  
400x Vergrößerung

Die Erreger dieser meningealen  
Läsion drangen unter Mitnahme von  
meningealen Strukturen in das  
angrenzende Parenchym vor.

Legende:  
Pfeil (→) = C. n.  
Pfeilspitzen (>) = arachnoidale  
Deckzellen

Vergleicht man weiterhin einzelne Kryptokokken der zentralnervösen Herde mit denen pulmonaler Läsionen, wird augenscheinlich, dass Kryptokokken im zentralen Nervensystem einen anderen morphologischen Phänotyp mit deutlich geringerem Zelldurchmesser und deutlich kleinerer Schleimkapsel zeigten (Abbildung 85).

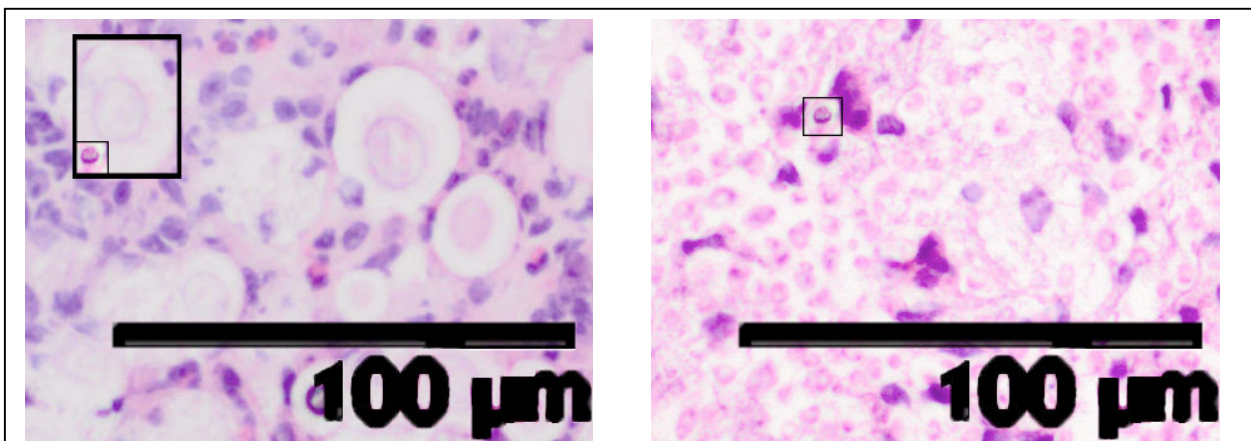


Abbildung 85: Ausschnitt von H&E Färbungen von einer Lunge 60dpi (links) und einem Gehirn 60dpi (rechts), Vergrößerung des Originalbildes 200x.

Die Größe der intrazerebral gelegenen Kryptokokken betrug bei histomorphologischer Betrachtung nur ein Bruchteil der Größe intrapulmonaler Kryptokokken. Um dies zu illustrieren, wurde hier der schwarz umrandete zerebrale Pilz aus dem rechten Bild direkt neben einen pulmonalen Pilz aus dem linken Bild gelegt.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die untersuchten Gehirne zu den Zeitpunkten 20dpi und 40dpi keine wesentlichen histomorphologischen Unterschiede im Vergleich zur naiven Situation zeigten, wengleich bereits eine minimale Erregerlast mit mikrobiologischen Methoden dokumentierbar war. Erst 60 Tage p.i. zeigten sich, analog zur humanen Situation drei verschiedene Typen von zerebralen und cerebellären Läsionen.

Die fokal intraparenchymatösen Läsionen zeigten kleine Durchmesser und kaum eine Entzündungszellreaktion des umliegenden Gewebes.

Die ausgedehnten intraparenchymatösen Läsionen zeigten einen großen Durchmesser und einen granulomartigen Aufbau mit großen konfluierenden Ansammlungen von Kryptokokken. Gesäumt wurden diese Läsionen von einem kräftig ausgeprägten zweischichtigen Randwall aus Entzündungszellen. Hierzu zählten vor allem großvolumige Makrophagen und Lymphozyten, sowie weiter distal reaktive Mikrogliazellen.

Die extraparenchymatösen meningealen Läsionen zeigten eine längliche Ausdehnung variabler Größe und eine intermediäre Entzündungszellreaktion. Sie wurden diskontinuierlich von einem zarten Saum aus Makrophagen, Lymphozyten und einigen neutrophilen Granulozyten gesäumt. Weiterhin waren die Erreger in der Lage das den Meningen angrenzende Parenchym zu infiltrieren.

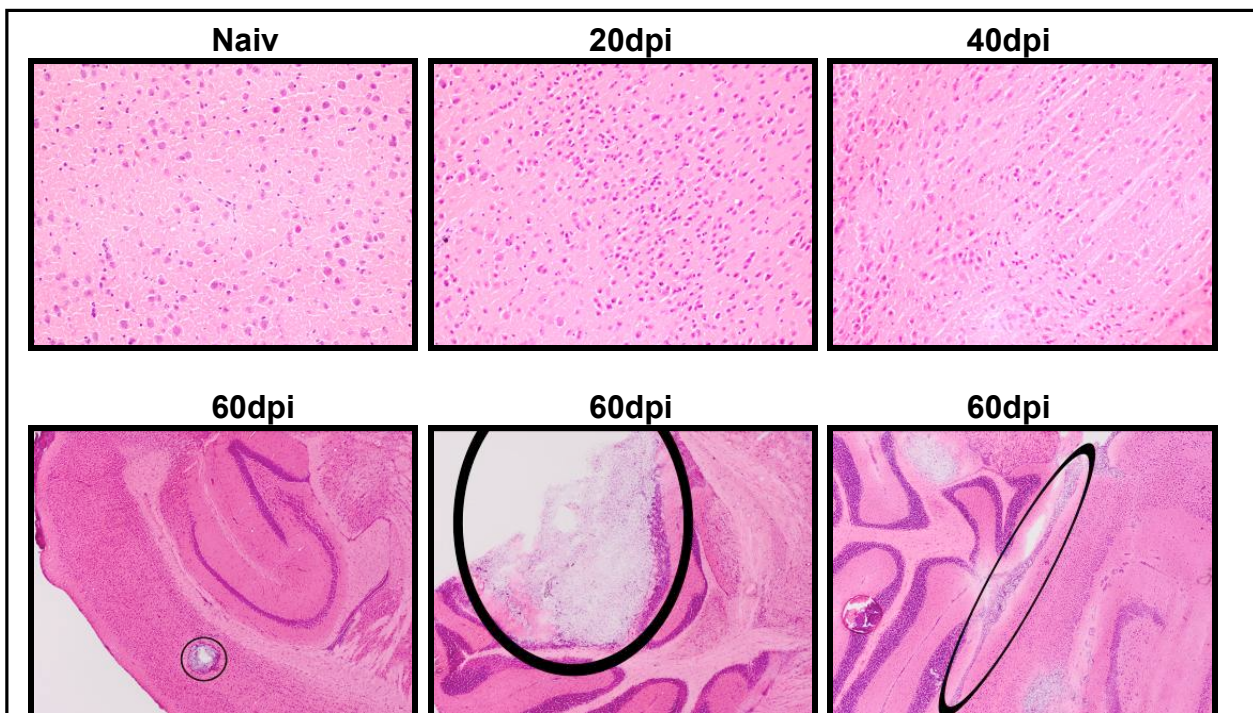


Abbildung 86: Synopsis der H&E Färbung muriner Gehirne. Vergrößerung obere Reihe 200x, untere Reihe 40x

Weder 20, noch 40 Tage nach der Infektion mit *C. n.* ließ sich histologisch eine zentrale Infektion beobachten. Die untersuchten Gehirne stellten sich frei von Kryptokokken und zytoarchitektonisch regelhaft dar (obere Reihe). Erst 60 Tage p.i. zeigten sich histomorphologische Korrelate einer zentralen Infektion. Diese präsentierten sich in drei unterschiedlichen Formen, die sich hinsichtlich ihrer Morphologie und zellulären Entzündungsreaktion deutlich voneinander unterschieden (untere Reihe).

#### 4.9 Funktionelle Charakterisierung der Entzündungsreaktion der zerebralen Kryptokokkose mittels Immunhistochemie

Über die rein morphologische Beschreibung im H&E Bild hinaus, wurden die drei genannten Läsionstypen mittels Immunhistochemie auch hinsichtlich ihrer Entzündungsreaktion charakterisiert.

Die fokalen intraparenchymatösen Läsionen zeigten kaum eine Reaktion des umliegenden Parenchyms. An ihren Rändern fanden sich nur wenige CD11b<sup>+</sup> Makrophagen (Abbildung 87). Das umliegende Parenchym enthielt ebenfalls schwach CD11b<sup>+</sup> Mikrogliazellen (Abbildung 87).

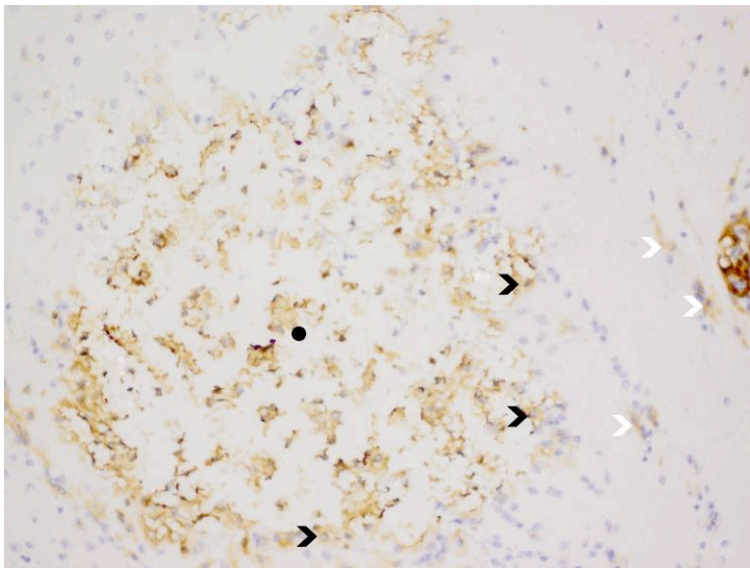


Abbildung 87:  
Fokal intraparenchymatöse Läsion  
eines Gehirns, 60dpi, CD11b  
Färbung. 200x Vergrößerung

Nur vereinzelt zeigten sich an den Rändern der Läsion CD11b<sup>+</sup> Makrophagen. Die in geringer Entfernung zur Läsion erkennbaren hirneigenen residenten Mikrogliazellen stellten sich ebenfalls CD11b<sup>+</sup> dar.

Wie in Abbildung 88 zu erkennen ist, zeigten diese kleinen Makrophagen einen nur schwach aktivierten Phänotyp in der MHC class II Färbung. Auch die Mikrogliazellen des umgebenen Parenchyms zeigten diese schwache Aktivierung.

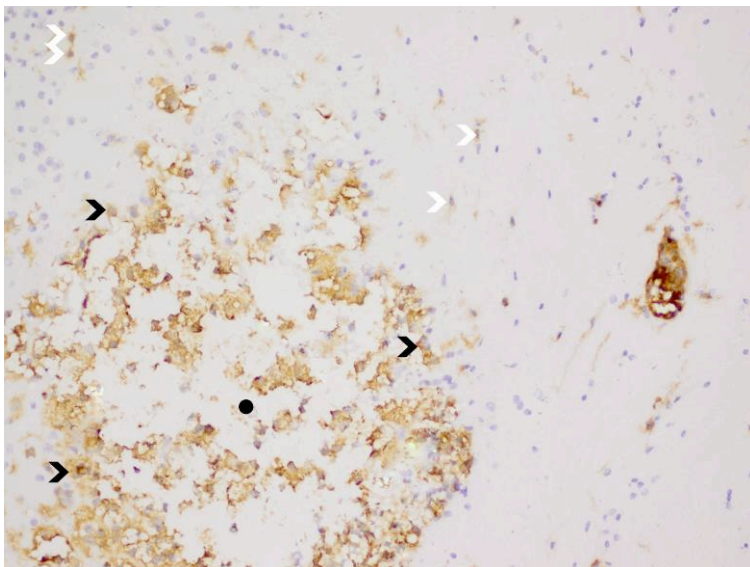


Abbildung 88:  
Fokal intraparenchymatöse Läsion  
eines Gehirns, 60dpi, MHC class II  
Färbung. 200x Vergrößerung

Die am Rande der Läsion befindlichen Makrophagen zeigten nur eine schwache Immunreaktivität für MHC class II, was auf einen nur leicht aktivierten Phänotyp hinwies. Gleiches galt für die in der Nähe befindlichen Mikrogliazellen.

Legende:  
Punkt (●) = Läsion  
Schwarze Pfeilspitzen (>) =  
Makrophagen  
Weiße Pfeilspitzen (▷) =  
Mikrogliazellen

Nur vereinzelt zeigten die Makrophagen am Rande der fokalen intraparenchymatösen Läsion eine Expression für CD206. Somit zeigte das *gros* der Makrophagen dieses Läsionstypes keine M2-Polarisation (Abbildung 89).

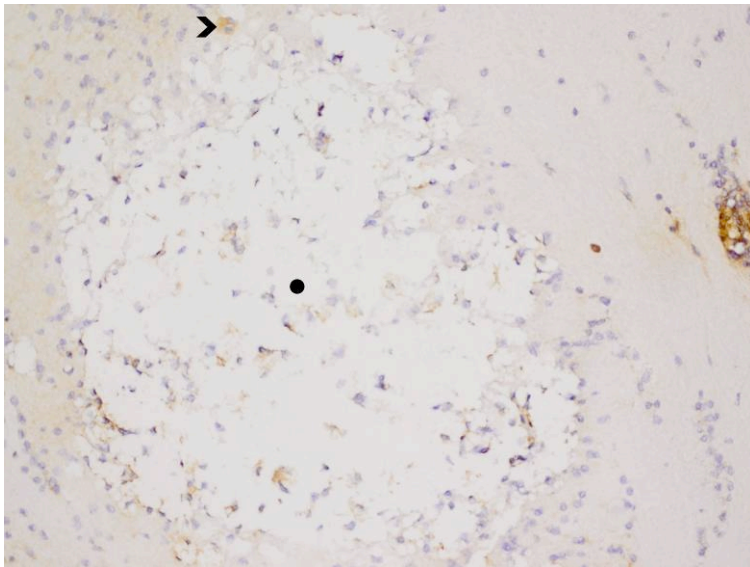


Abbildung 89:  
Fokal intraparenchymatöse Läsion  
eines Gehirns, 60dpi, CD206  
Färbung. 200x Vergrößerung

Es fanden sich nahezu keine CD206<sup>+</sup>  
Zellen in Assoziation mit der Läsion.

Obwohl die Makrophagen am Rande dieser Läsion keinen klaren M2-Phänotyp zeigten, waren Marker der klassischen M1-Polarisierung ebenfalls nicht exprimiert. So zeigten die zerebralen Makrophagen, im Gegensatz zu den pulmonalen Makrophagen, auch auf dem Höhepunkt der Infektion keine relevante iNOS Produktion (Abbildung 90).

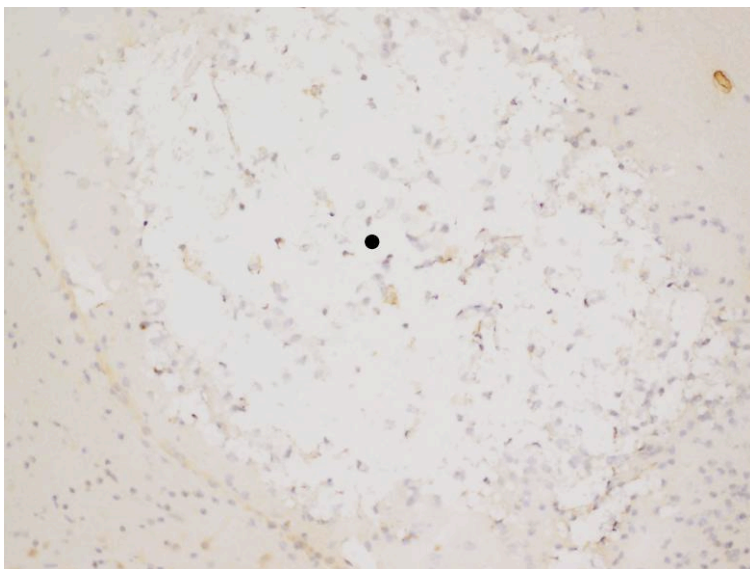


Abbildung 90:  
Fokal intraparenchymatöse Läsion  
eines Gehirns, 60dpi, iNOS Färbung.  
200x Vergrößerung

Die mit dieser Läsion assoziierten  
Makrophagen zeigten keine  
relevante Immunreaktivität für iNOS.

Legende:  
Punkt (●) = Läsion  
Schwarze Pfeilspitzen(>) =  
Makrophagen

Im Randbereich der Läsion zeigten sich keine Zellen, die immunreaktiv für CD4 oder CD8 (nicht abgebildet) waren. Somit waren CD4<sup>+</sup> (und CD8<sup>+</sup>) Lymphozyten nicht Teil der zellulären Entzündungsreaktion fokaler intraparenchymatöser Läsionen (Abbildung 91).

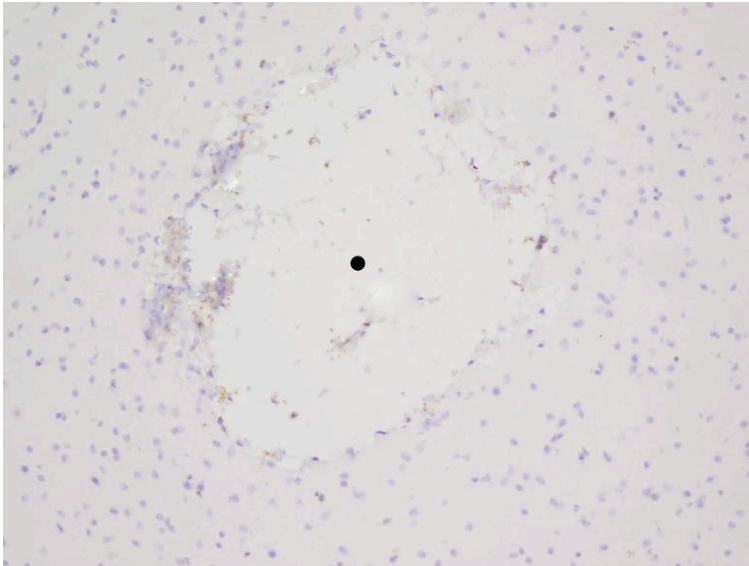


Abbildung 91:  
Fokal intraparenchymatöse Läsion  
eines Gehirns, 60dpi, CD4 Färbung.  
200x Vergrößerung

Es fanden sich im Bereich der Läsion  
keine CD4<sup>+</sup> Lymphozyten.

Legende:  
Punkt (●) = Läsion

Insgesamt ließ sich also feststellen, dass das zelluläre Entzündungsinfiltrat zu diesem Zeitpunkt nicht wesentlich aus CD4<sup>+</sup> Lymphozyten, sondern nur aus wenigen Makrophagen bestand. Diese zeigten keine eindeutige Polarisierung, sondern einen eher „attenuierten“ oder nur schwach aktivierten Phänotyp. Deutlich anders stellte sich das zelluläre Entzündungsinfiltrat der ausgedehnten intraparenchymatösen granulomatösen Läsion dar.

Wie auf Abbildung 92 zu sehen ist, wurden diese Läsionen von einer Vielzahl großvolumiger und kräftig CD11b<sup>+</sup> Makrophagen gesäumt.

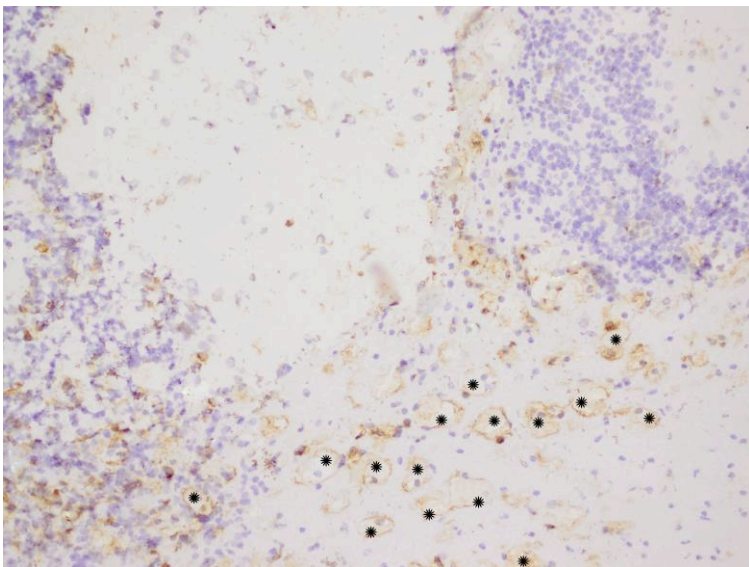


Abbildung 92:  
Ausgedehnt intraparenchymatöse  
Läsion eines Gehirns, 60dpi, CD11b  
Färbung. 200x Vergrößerung

In der inneren Schicht des  
Randwalles aus Entzündungszellen  
zeigten sich zahlreiche  
großvolumige, kräftig CD11b<sup>+</sup>  
Makrophagen.

Legende:  
Stern (\*) = großvolumige  
Makrophagen (sog. „Schaumzellen“)



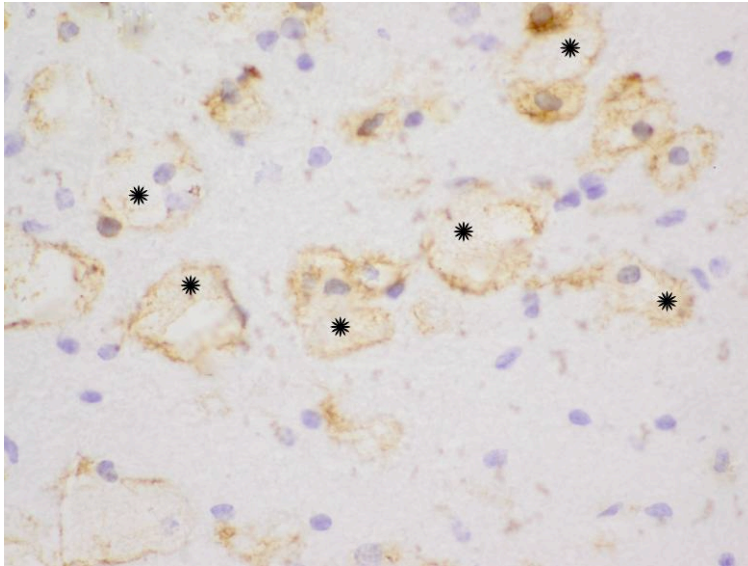


Abbildung 93:  
Ausgedehnt Intraparenchymatöse  
Läsion eines Gehirns, 60dpi, CD11b  
Färbung. 600x Vergrößerung

Diese Vergrößerung der kräftig  
CD11b<sup>+</sup> Makrophagen der inneren  
Schicht des Randwalles illustriert ihr  
großes Zellvolumen und ihr  
feingranuläres, schaumiges  
Zytoplasma.

Legende:  
Stern (\*) = großvolumige  
Makrophagen (sog. „Schaumzellen“)

Im Gegensatz zu den Makrophagen am Rande der kleinen, fokalen Läsionen zeigten die großvolumigen Makrophagen der granulomatösen Läsion einen kräftig aktivierten Phänotyp in der MHC class II Färbung (Abbildung 94).

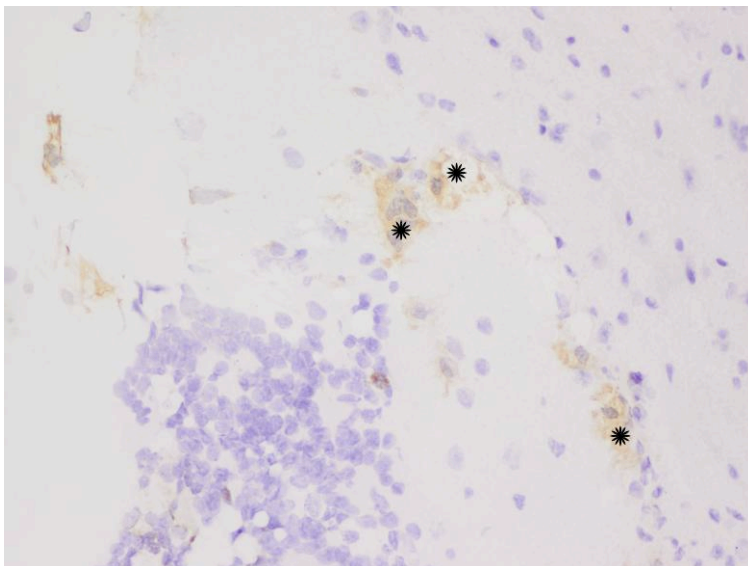


Abbildung 94:  
Ausgedehnt intraparenchymatöse  
Läsion eines Gehirns, 60dpi, MHC  
class II Färbung. 600x Vergrößerung

Die abgebildeten Makrophagen der  
inneren Schicht des  
Entzündungszellrandwalles zeigten  
einen stark aktivierten Phänotyp,  
erkennbar anhand ihrer kräftigen  
Immunreaktivität für MHC class II  
Moleküle.

Legende:  
Stern (\*) = großvolumige  
Makrophagen (sog. „Schaumzellen“)

Auch in der Immunreaktivität für CD206 zeigten sich Unterschiede zur kleineren, fokalen Läsion. So waren dort kaum CD206<sup>+</sup> Zellen zu finden. Die großvolumigen Makrophagen der granulomatösen Läsion zeigten dahingegen eine kräftige Anfärbung mit CD206 und somit auch eine deutliche M2-Polarisierung (Abbildung 95).

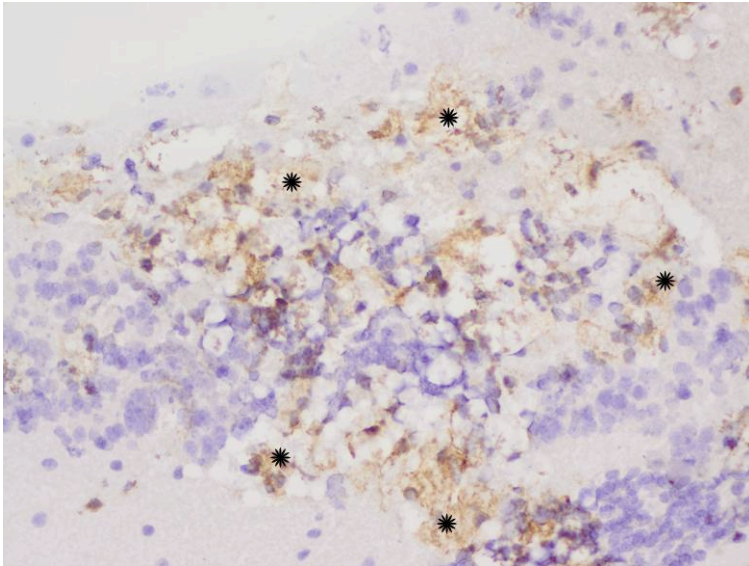


Abbildung 95:  
Ausgedehnt intraparenchymatöse  
Läsion eines Gehirns, 60dpi, CD206  
Färbung. 400x Vergrößerung

Die großvolumigen Makrophagen  
des entzündlichen Randwalles dieser  
Läsion stellten sich als kräftig  
CD206<sup>+</sup> dar und zeigten somit eine  
eindeutige M2-Polarisierung (sog.  
alternative Aktivierung).

Legende:  
Stern (\*) = großvolumige  
Makrophagen (sog. „Schaumzellen“)

Obwohl pulmonale Makrophagen mit ähnlich großvolumiger schaumiger Morphologie zu diesem Zeitpunkt iNOS in der Lunge produzierten, war dies im ZNS nicht der Fall. Wie anhand der Abbildung 96 zu erkennen ist, zeigten die großvolumigen Makrophagen im Randwall des Granuloms keine Immunreaktivität für iNOS.

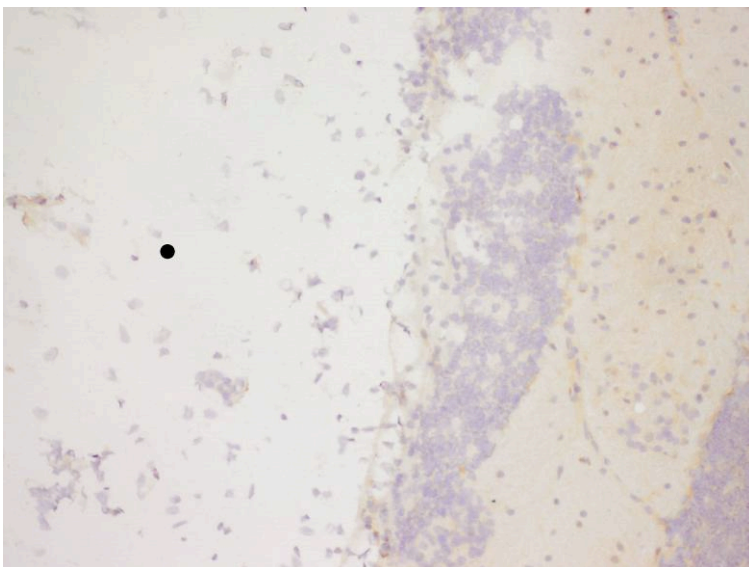


Abbildung 96:  
Ausgedehnt intraparenchymatöse  
Läsion eines Gehirns, 60dpi, iNOS  
Färbung. 400x Vergrößerung

Weder die Entzündungszellen noch  
die residenten Mikrogliazellen  
stellten sich iNOS<sup>+</sup> dar. Somit waren  
diese Zellen nicht klassisch aktiviert,  
bzw. zeigten keine M1-Polarisierung.

Legende:  
Punkt (●) = Läsion

Meningeale Läsionen zeigten bezüglich der Ausprägung ihrer zellulären Entzündungsreaktion einen intermediären Phänotyp, im Vergleich zu den beiden intraparenchymatösen Läsionen.

Wie auf Abbildung 97 zu erkennen ist, wurden die Ränder der mit Kryptokokken gefüllten Läsion von kräftig CD11b<sup>+</sup> großvolumigen Makrophagen gesäumt.

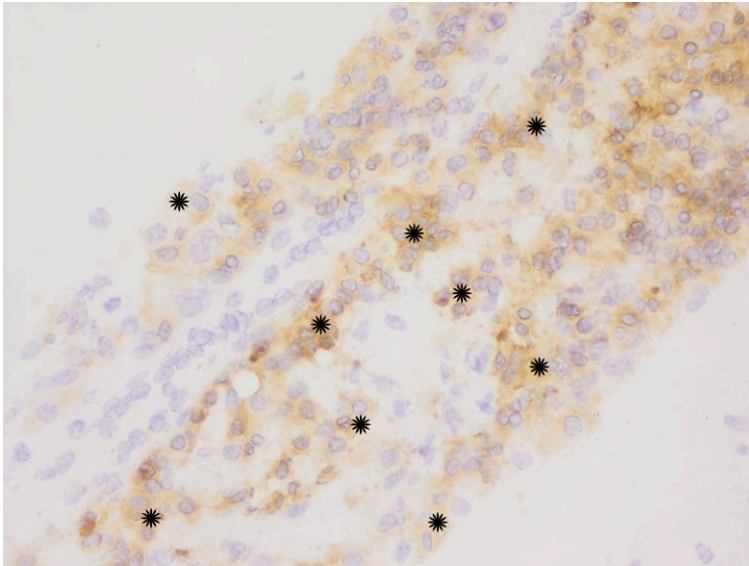


Abbildung 97:  
Meningeale Läsion eines Gehirns,  
60dpi, CD11b Färbung.  
400x Vergrößerung

Entlang des Randes der Läsion, als  
auch in ihrem Zentrum fanden sich  
zahlreiche kräftig CD11b<sup>+</sup>  
großvolumige Makrophagen.

Aus Abbildung 98 wird ersichtlich, dass die CD11b<sup>+</sup> Makrophagen des  
Entzündungszellsaums sich ebenfalls kräftig immunreaktiv für MHC class II zeigten und  
somit einen stark aktivierten Phänotyp aufwiesen.

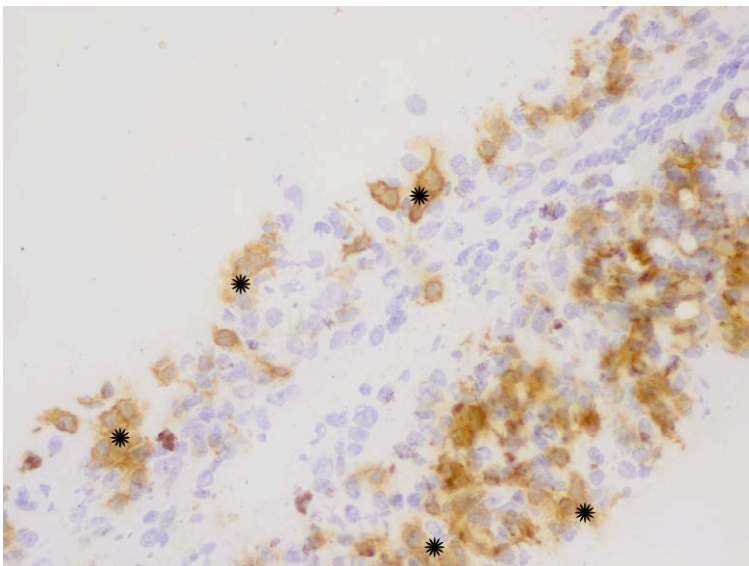


Abbildung 98:  
Meningeale Läsion eines Gehirns,  
60dpi, MHC class II Färbung.  
400x Vergrößerung

Die Makrophagen des Randsaums  
der Läsion zeigten einen stark  
aktivierten Phänotyp, erkennbar  
anhand ihrer kräftigen  
Immunreaktivität für MHC class II  
Moleküle.

Legende:  
Stern (\*) = großvolumige  
Makrophagen (sog. „Schaumzellen“)

Auch für Marker der alternativen M2-Makrophagenpolarisierung, wie CD206, zeigten  
sich die Makrophagen des entzündlichen Randsaums kräftig immunreaktiv (Abbildung  
99).

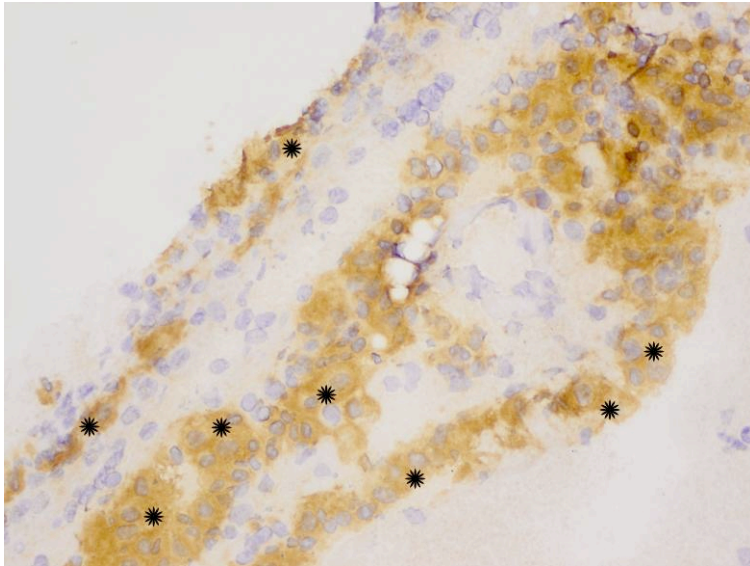


Abbildung 99:  
Meningeale Läsion eines Gehirns,  
60dpi, CD 206 Färbung.  
400x Vergrößerung

Die markierten, großvolumigen Makrophagen zeigten sich kräftig CD206<sup>+</sup>, was auf eine alternative Aktivierung bzw. M2-Polarisierung hinwies.

Legende:  
Stern (\*) = großvolumige Makrophagen (sog. „Schaumzellen“)

Analog zu den Makrophagen der ausgedehnten, granulomatösen intraparenchymatösen Läsion, zeigten auch die großvolumigen Makrophagen der meningealen Läsionen keine Produktion von iNOS, wie dies auf Abbildung 100 zu sehen ist.

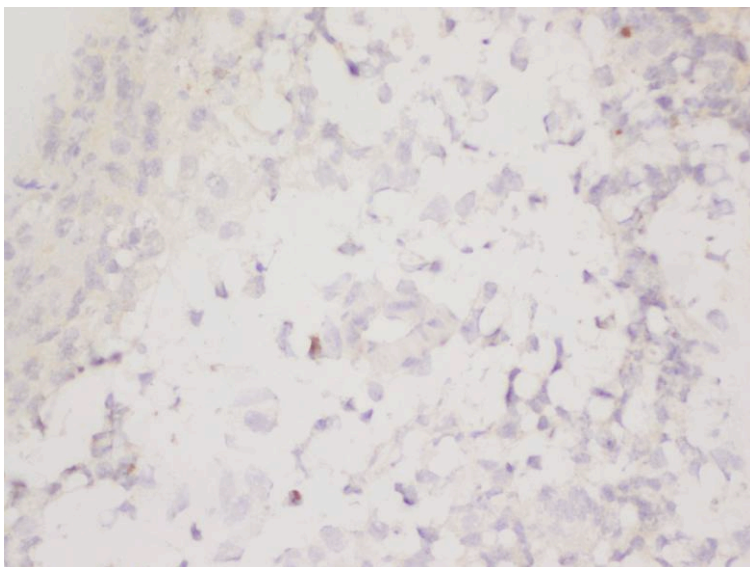


Abbildung 100:  
Meningeale Läsion eines Gehirns,  
60dpi, iNOS Färbung.  
400x Vergrößerung

Wie auch die Makrophagen der ausgedehnt intraparenchymatösen Läsionen, zeigten die Makrophagen der meningealen Läsionen keine iNOS Produktion.

Arg-1 als Marker der alternativen Makrophagenaktivierung nahm unter den eingesetzten Markern eine Sonderstellung ein. Die weiter oben bereits erwähnten Plexusmakrophagen, des plexus choroideus, waren die einzige Population von Makrophagen, die sich bereits im nicht infizierten Gehirn Arg-1<sup>+</sup> anfärben ließen (siehe Abbildung 101). Bei dieser spezialisierten und extraparenchymatös gelegenen Population von Makrophagen handelt es sich um eine residente Population von Makrophagen im plexus choroideus.

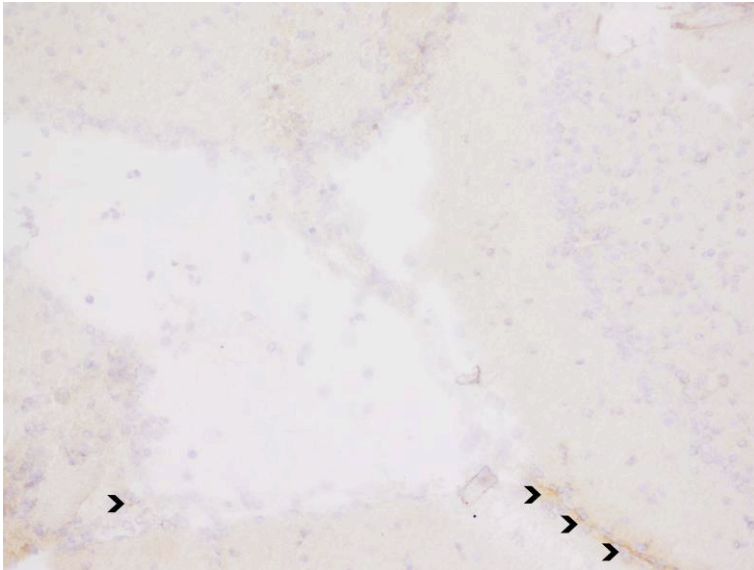


Abbildung 101:  
Plexus choroideus eines nicht infizierten Gehirns, Arg-1 Färbung.  
200x Vergrößerung

Ausschließlich Plexusmakrophagen stellten sich in nicht infizierten Gehirnen Arg-1<sup>+</sup> dar.

Legende:  
Schwarze Pfeilspitzen(>) =  
Makrophagen

Wie den Abbildungen 102 und 103 zu entnehmen ist, stellten sich auch zu den Zeitpunkten 20dpi und 40dpi Plexusmakrophagen Arg-1<sup>+</sup> angefärbt dar.

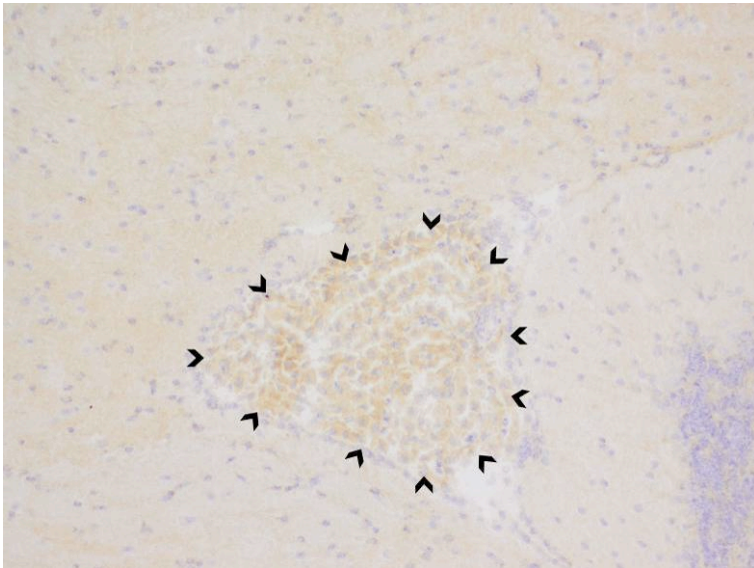


Abbildung 102:  
Plexus choroideus eines Gehirns,  
20dpi, Arg-1 Färbung.  
200x Vergrößerung

Die mit schwarzen Pfeilen markierten Plexusmakrophagen zeigten sich Arg-1<sup>+</sup>, nicht jedoch die umliegenden Mikrogliazellen.

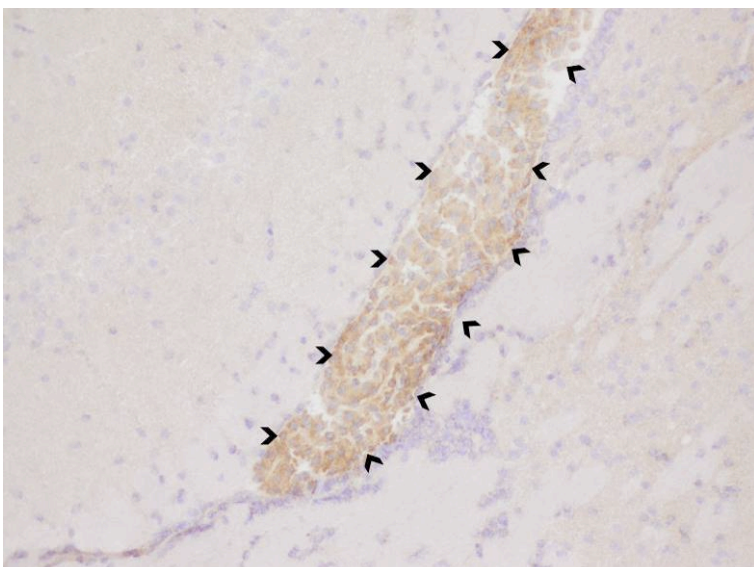


Abbildung 103:  
Plexus choroideus eines Gehirns,  
40dpi, Arg-1 Färbung.  
200x Vergrößerung

40 Tage p.i. zeigten ebenfalls ausschließlich Plexusmakrophagen eine Immunreaktivität für Arg-1.

Legende:  
Schwarze Pfeilspitzen(>) =  
Plexusmakrophagen

Zum Zeitpunkt 60dpi zeigten sich die bereits beschriebenen 3 Läsionsformen. Jedoch stellten sich weiterhin lediglich die residenten Plexusmakrophagen kräftig Arg-1<sup>+</sup> dar (Abbildung 104).

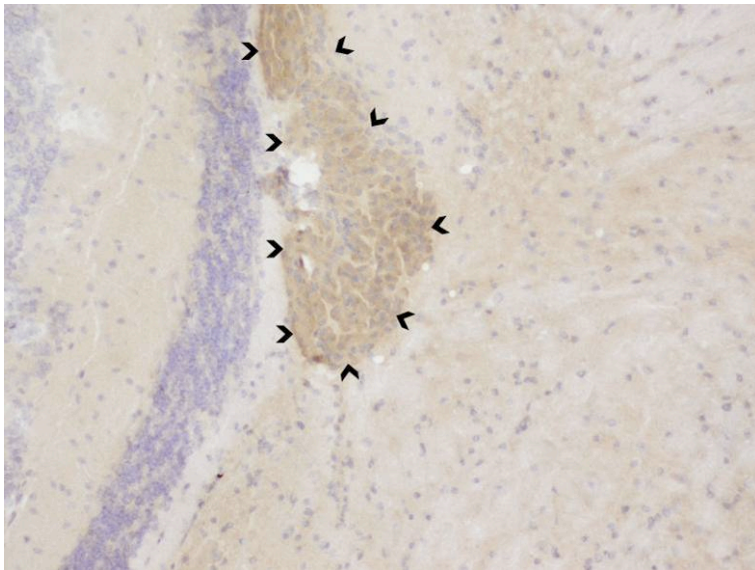


Abbildung 104:  
Plexus choroideus eines Gehirns,  
60dpi, Arg-1 Färbung.  
200x Vergrößerung

Die Immunreaktivität für Arg-1 der  
Plexusmakrophagen zeigte sich  
auch 60 Tage p.i. unverändert.

Legende:  
Schwarze Pfeilspitzen(>) =  
Plexusmakrophagen

Wie aus den Abbildungen 105 und 106 zu entnehmen ist, zeigten weder die großvolumigen schaumzelligeren Makrophagen der granulomatösen Läsion noch die großvolumigen Makrophagen der meningealen Läsionen eine Immunreaktivität für Arg-1.

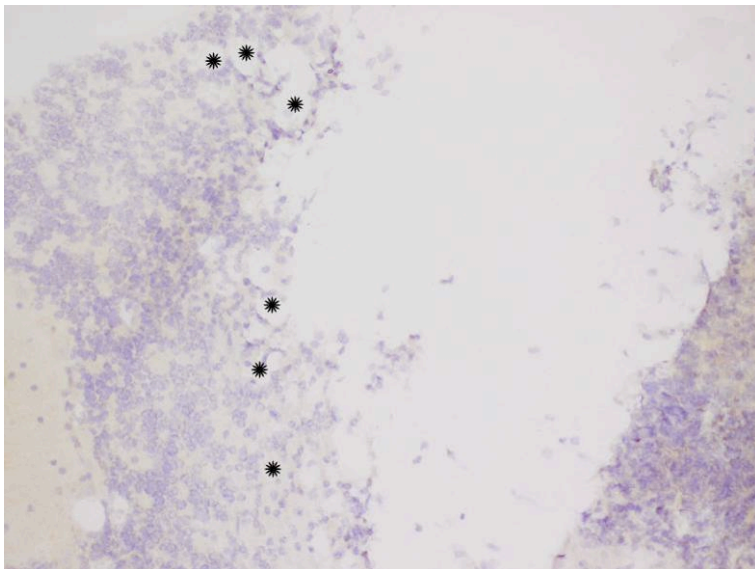


Abbildung 105:  
Ausgedehnt intraparenchymatöse  
Läsion eines Gehirns, 60dpi, Arg-1  
Färbung. 200x Vergrößerung

Die mit Sternen markierten  
großvolumigen Makrophagen des  
Randwalles der ausgedehnt  
intraparenchymatösen Läsion  
zeigten keine Immunreaktivität für  
Arg-1.

Legende:  
Stern (\*) = großvolumige  
Makrophagen (sog. „Schaumzellen“)

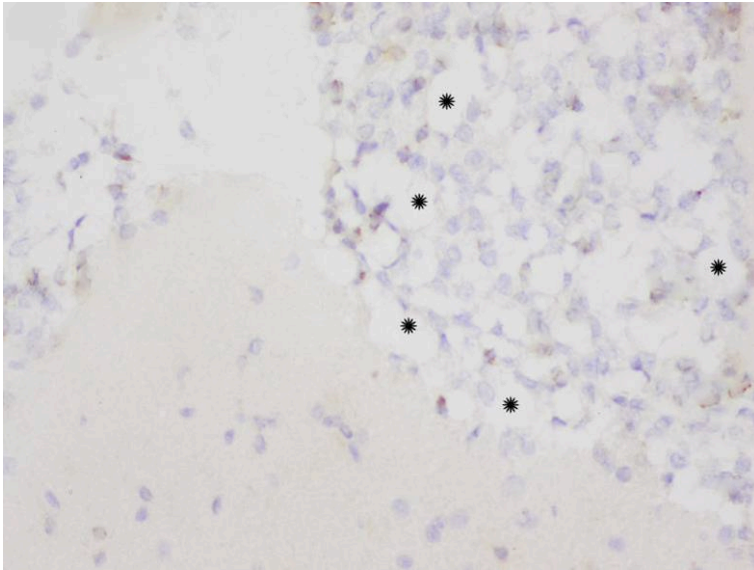


Abbildung 106:  
Meningeale Läsion eines Gehirns,  
60dpi, Arg-1 Färbung.  
400x Vergrößerung

Analog zu den Makrophagen der  
ausgedehnt intraparenchymatösen  
Läsionen, zeigten auch die  
Makrophagen der meningealen  
Läsionen keine Arg-1 Produktion.

Legende:  
Stern (\*) = großvolumige  
Makrophagen (sog. „Schaumzellen“)

Auch die residenten Mikrogliazellen und die wenigen, lediglich schwach aktivierten Makrophagen der inert erscheinenden fokalen intraparenchymatösen Läsion zeigten sich Arg-1<sup>-</sup> (Abbildung 107).

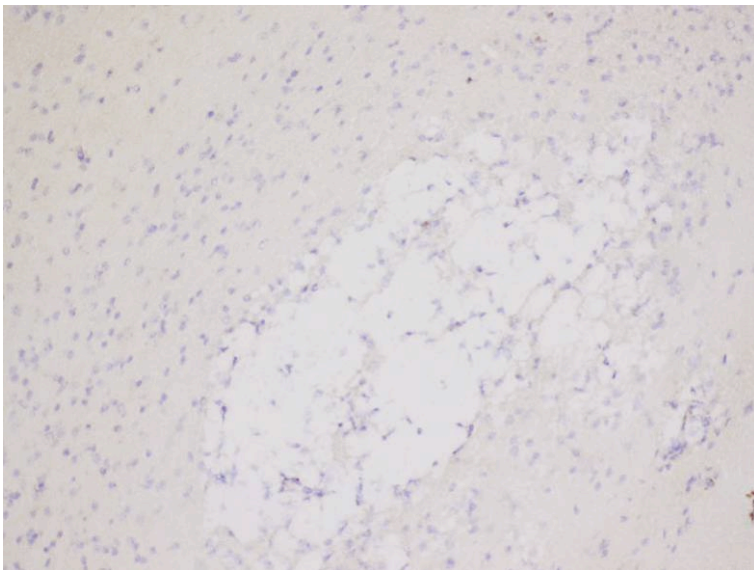


Abbildung 107:  
Intraparenchymatöse fokale Läsion  
eines Gehirns, 60dpi, Arg-1 Färbung.  
200x Vergrößerung

Die lediglich schwach aktivierten und  
spärlich vorhandenen Makrophagen  
der fokale intraparenchymatösen  
Läsion zeigten keine  
Immunreaktivität für Arg-1.

In geringer Entfernung zu den meningealen Läsionen gab es eine Aktivierung residenter Zellen des Hirnparenchyms. So fanden sich knotenartige Ansammlungen von Mikrogliazellen mit ihren charakteristischen Zellfortsätzen, die aufgrund ihrer vermehrten MHC class II Expression einen aktivierten Phänotyp zeigten (sog. Mikrogliaknötchen, Abbildung 108).

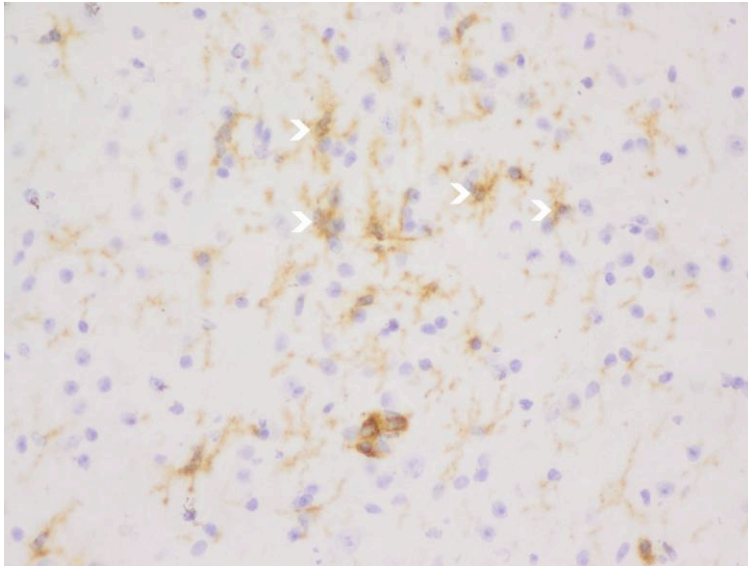



Abbildung 108:  
 Großhirnparenchym in der Nähe  
 einer meningealen Läsion, 60dpi,  
 MHC class II Färbung.  
 400x Vergrößerung

Im Parenchym in der Nähe  
 meningealer Läsionen ließ sich eine  
 Aktivierung residenter  
 Mikrogliazellen beobachten, die sich  
 zu knotenartigen Ansammlungen  
 formierten. Ihre kräftige MHC class II  
 Expression wies auf einen aktivierten  
 Phänotyp hin.

Weißer Pfeilspitzen  =  
 Mikrogliazellen

In der Zusammenschau der dargestellten Ergebnisse, lässt sich festhalten, dass die Läsionen sich nicht nur hinsichtlich ihrer Morphologie und topographischen Verteilung, sondern auch hinsichtlich ihrer Entzündungsreaktion deutlich voneinander unterscheiden. So traten bei den meningealen Läsionen, als auch bei den ausgedehnten granulomatösen intraparenchymatösen Läsionen, Makrophagen mit großem Zellvolumen und schaumigem Zytoplasma auf. Diese Makrophagenpopulation zeigte bei beiden Läsionstypen eine starke Aktivierung in Form von kräftiger MHC class II Expression. Weiterhin zeigten sie eine klare alternative M2-Polarisierung aufgrund ihrer kräftigen Färbereaktion mit Antikörpern gegen CD206.

Dahingegen traten im Bereich der fokalen intraparenchymatösen Läsion lediglich vereinzelt kleine Makrophagen auf. Diese zeigten nur einen schwach aktivierten Phänotyp in der MHC class II Färbung. Weiterhin zeigten sie keine CD206 Expression und somit keine M2-Polarisierung, sondern einen eher „attenuierten“ bzw. nicht aktivierten Phänotyp.

Insgesamt zeigte keine der untersuchten Makrophagenpopulationen eine M1-Polarisierung in Form von iNOS Produktion, wie dies die pulmonalen großvolumigen Makrophagen zu diesem Zeitpunkt taten.

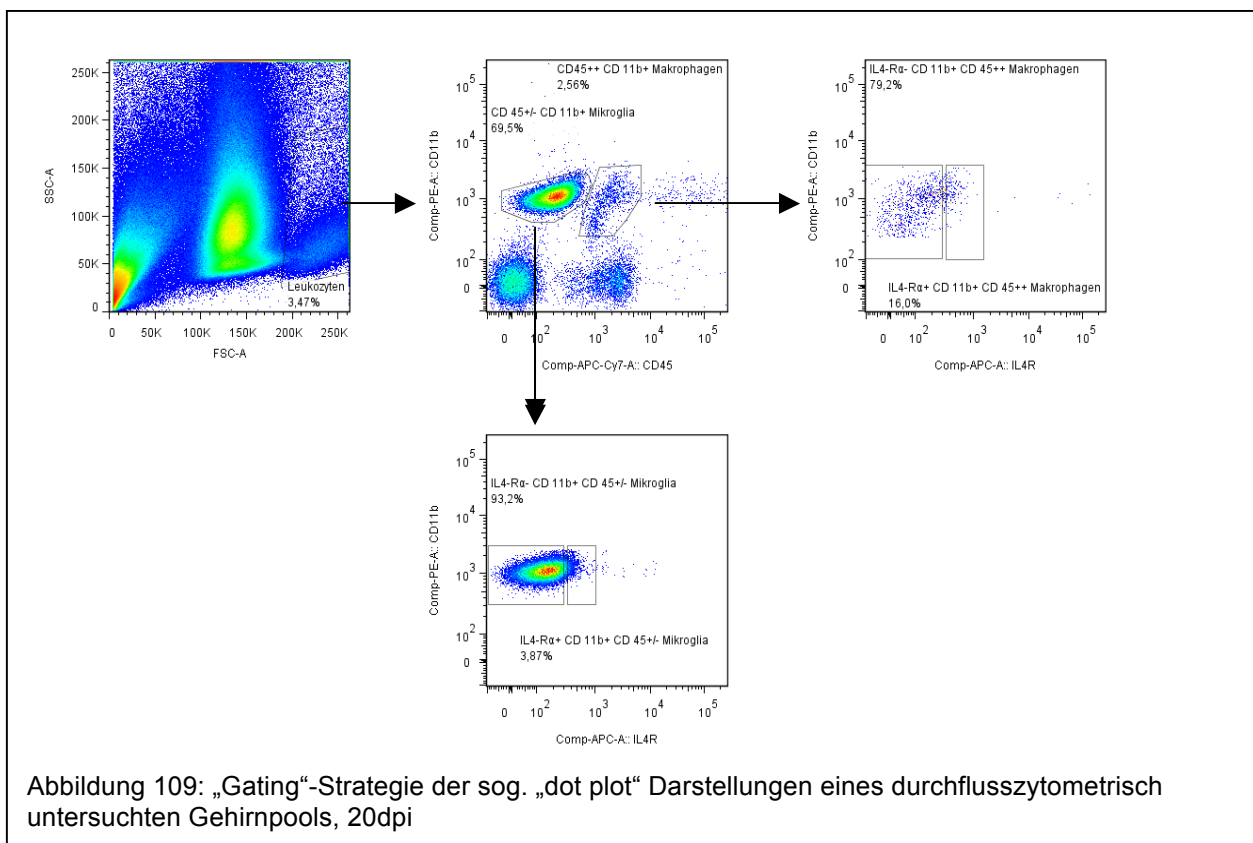
Im Verlauf der Infektion präsentierten sich lediglich extraparenchymatös liegende Plexusmakrophagen Arg-1<sup>+</sup>. Keine der intraparenchymatös vorkommenden Makrophagenpopulationen des ZNS zeigte sich Arg-1<sup>+</sup>, unabhängig von ihrer Polarisation und ihrem Aktivierungszustand. Riesenzellen traten im ZNS und den untersuchten Meningen nicht auf.

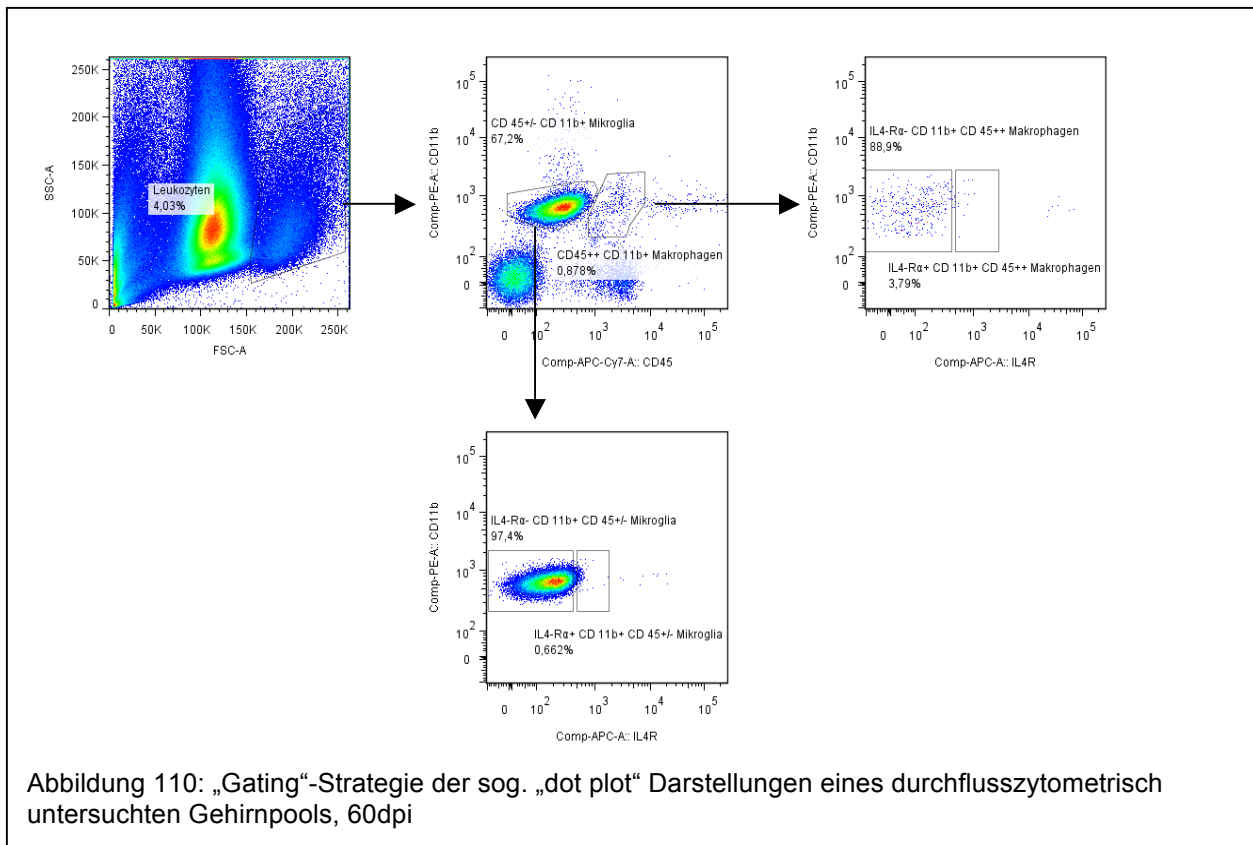


#### 4.10 Durchflusszytometrische Untersuchung zerebraler Leukozyten

Es wurden mehrere Gehirne homogenisiert und zur weiteren Analyse zu sogenannten „Pools“ von drei bis sieben Gehirnen zusammengefügt. Diese wurden naiv und zu den Zeitpunkten 20dpi und 60dpi mittels Durchflusszytometrie analysiert. Hierbei wurde die Gesamtheit der zerebralen Leukozyten anhand ihrer charakteristischen Größe und Granularität identifiziert und anhand eines sogenannten „gates“ selektiert. Insgesamt wurden zwei Leukozytensubpopulationen anhand von Oberflächenmarkern analysiert. Die CD11b<sup>+</sup> Makrophagen wurden anhand von intermediärer oder starker Expression von CD45 als Mikrogliazellen oder zerebrale Makrophagen identifiziert und differenziert [101]. Weiterhin wurden diese beiden Populationen bezüglich ihrer Expression des IL-4R $\alpha$  analysiert.

Die Abbildungen 109 und 110 zeigen repräsentative Übersichten der durchflusszytometrischen Untersuchungen zu den Zeitpunkten 20dpi und 60dpi.



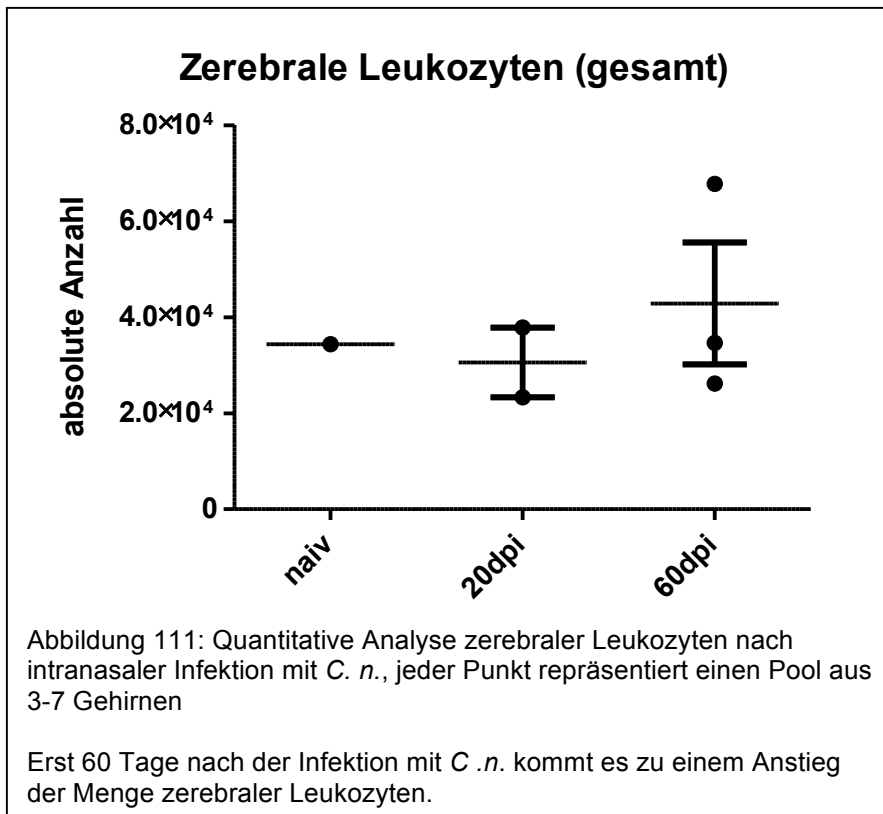


#### 4.10.1 Bestimmung zerebraler Leukozyten

Wie aus Abbildung 111 ersichtlich wird, befanden sich im naiven Zustand  $\sim 3,4 \times 10^4$  (34.390) Leukozyten in den untersuchten Gehirnen. Auch 20 Tage nach der Infektion mit *C. n.* änderte sich diese Menge kaum. Zum Zeitpunkt 20dpi befanden sich im Mittel  $\sim 3,1 \times 10^4$  (30.569) Leukozyten in den untersuchten Gehirnen. Der SEM betrug  $\sim 7,3 \times 10^3$  (7.251).

Zum Zeitpunkt 60dpi zeigten sich in mikrobiologischen Untersuchungen alle Gehirne mit *C. n.* infiziert. Dies bewirkte eine Rekrutierung von Leukozyten ins zentrale Nervensystem und führte somit zu einem Anstieg der Menge zerebraler Leukozyten. Im Mittel befanden sich zu diesem Zeitpunkt  $\sim 4,3 \times 10^4$  (42.838) Leukozyten in den untersuchten Gehirnen, wobei der SEM  $\sim 1,3 \times 10^4$  (12.701) betrug.

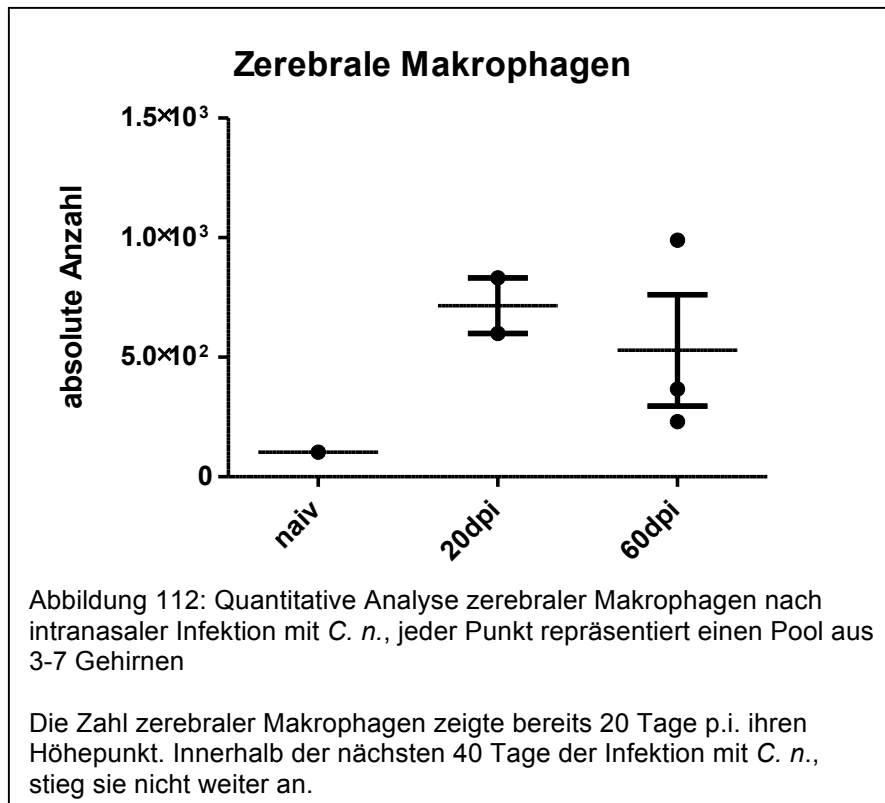
Zusammenfassend ist also festzuhalten, dass erst 60 Tage nach der Infektion mit *C. n.*, als *de facto* auch histologisch zentralnervöse Läsionen gefunden werden konnten, eine Rekrutierung zerebraler Leukozyten stattfand, sofern die Gesamtleukozytenpopulation betrachtet wird.



#### 4.10.2 Bestimmung zerebraler Makrophagen

Die CD11b<sup>+</sup> Population zerebraler Makrophagen wurde anhand ihrer vergleichsweise hohen CD45 Expression von CD45-intermediär exprimierenden Mikrogliazellen differenziert. In der naiven Situation fanden sich lediglich 103 Makrophagen in den untersuchten Gehirnen. Dies änderte sich 20 Tage nach der Infektion mit *C. n.* Zum Zeitpunkt 20dpi betrug die Zahl zerebraler Makrophagen 716 bei einem SEM von 116. Nach weiteren 40 Tagen p.i. zeigte sich kein weiterer Anstieg der Zahl zerebraler Makrophagen. So betrug ihre Anzahl zum Zeitpunkt 60dpi 529, wobei der SEM 234 betrug (Abbildung 112).

Zusammenfassend ist also festzuhalten, dass die Anzahl zerebraler Makrophagen bereits 20 Tage nach der Infektion mit *C. n.* ihren Höhepunkt erreichte und innerhalb der nächsten 40 Tage p.i. lediglich leicht (nicht signifikant) abnahm.



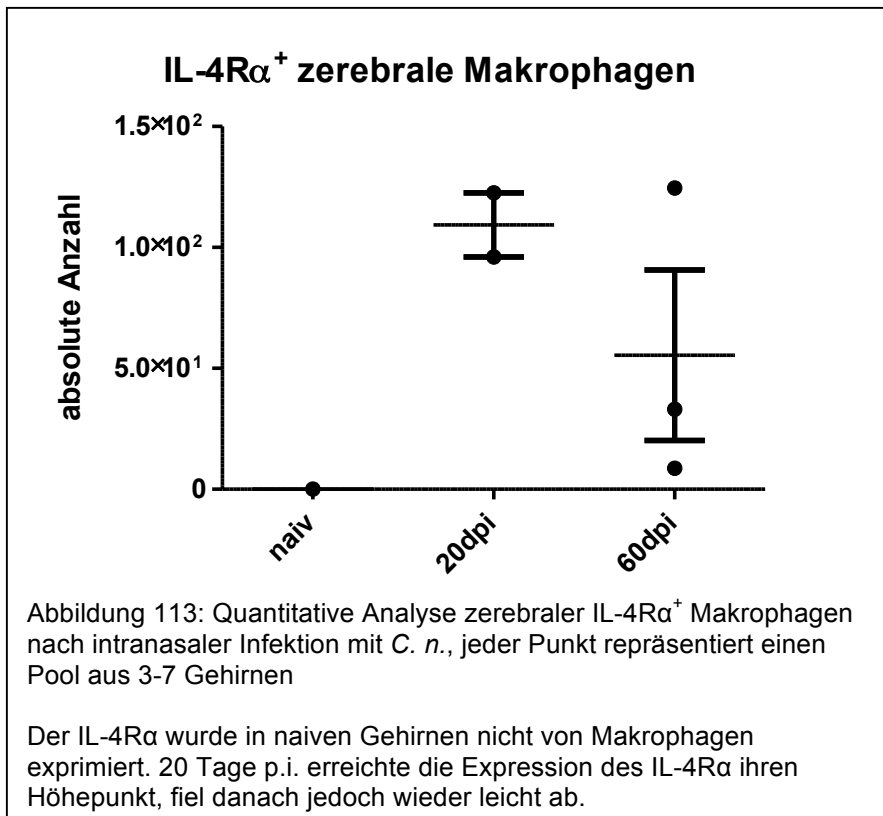
#### 4.10.3 Analyse der IL-4R $\alpha$ Expression auf pulmonalen Makrophagen bei *C. n.* Infektion

Neben der quantitativen Analyse, wurden zerebrale Makrophagen auch qualitativ, hinsichtlich ihrer IL-4R $\alpha$  Expression, untersucht.

Wie aus Abbildung 113 ersichtlich wird, ließen sich in den nicht infizierten Gehirnen keine IL-4R $\alpha$ <sup>+</sup> Makrophagen finden. Somit fehlte den Makrophagen der nicht infizierten Tiere die Möglichkeit der alternativen Aktivierung bzw. M2-Polarisierung via IL-4R $\alpha$ .

Die änderte sich bereits 20 Tage nach der Infektion mit *C. n.*. Es fanden sich zum Zeitpunkt 20dpi im Mittel ~109 Makrophagen, die den IL-4R $\alpha$  trugen. Der SEM betrug 13. Dies stellte den Höhepunkt der IL-4R $\alpha$  Expression dar, denn innerhalb der nächsten 40 Tage p.i. kam es zu einem Rückgang der IL-4R $\alpha$ <sup>+</sup> Makrophagen.

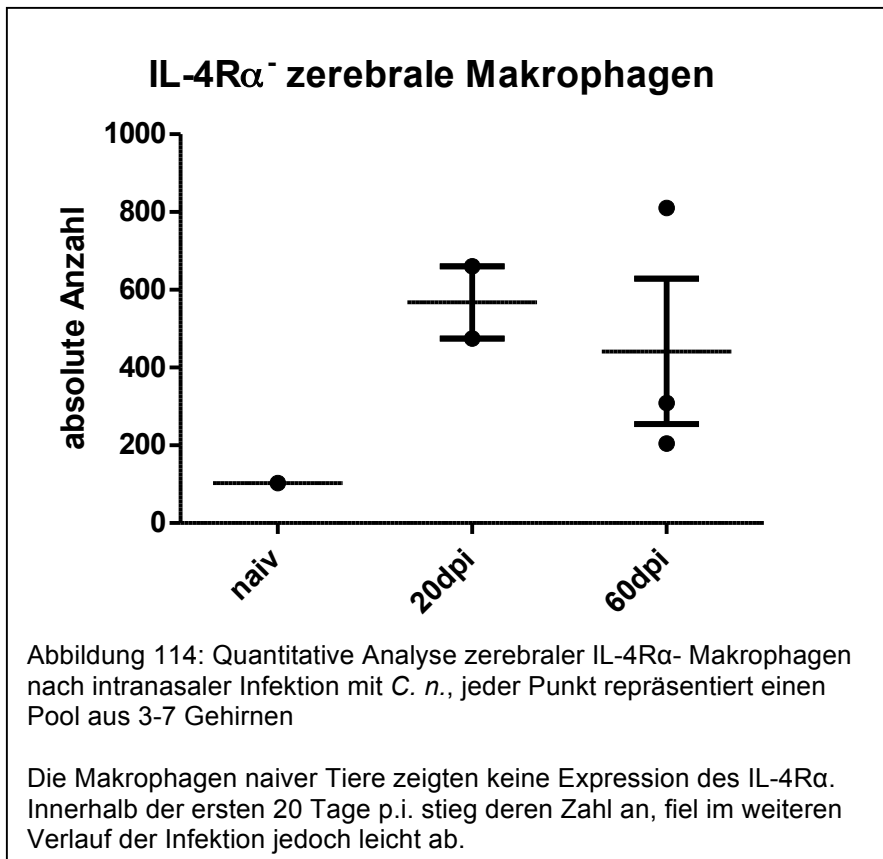
Zum Zeitpunkt 60dpi trugen im Mittel ~55 Makrophagen den IL-4R $\alpha$ , wobei der SEM 35 betrug (Abbildung 113).



Betrachtete man die komplementäre Population der Makrophagen, die den IL-4R $\alpha$  nicht trugen, stellte sich das folgende Bild dar.

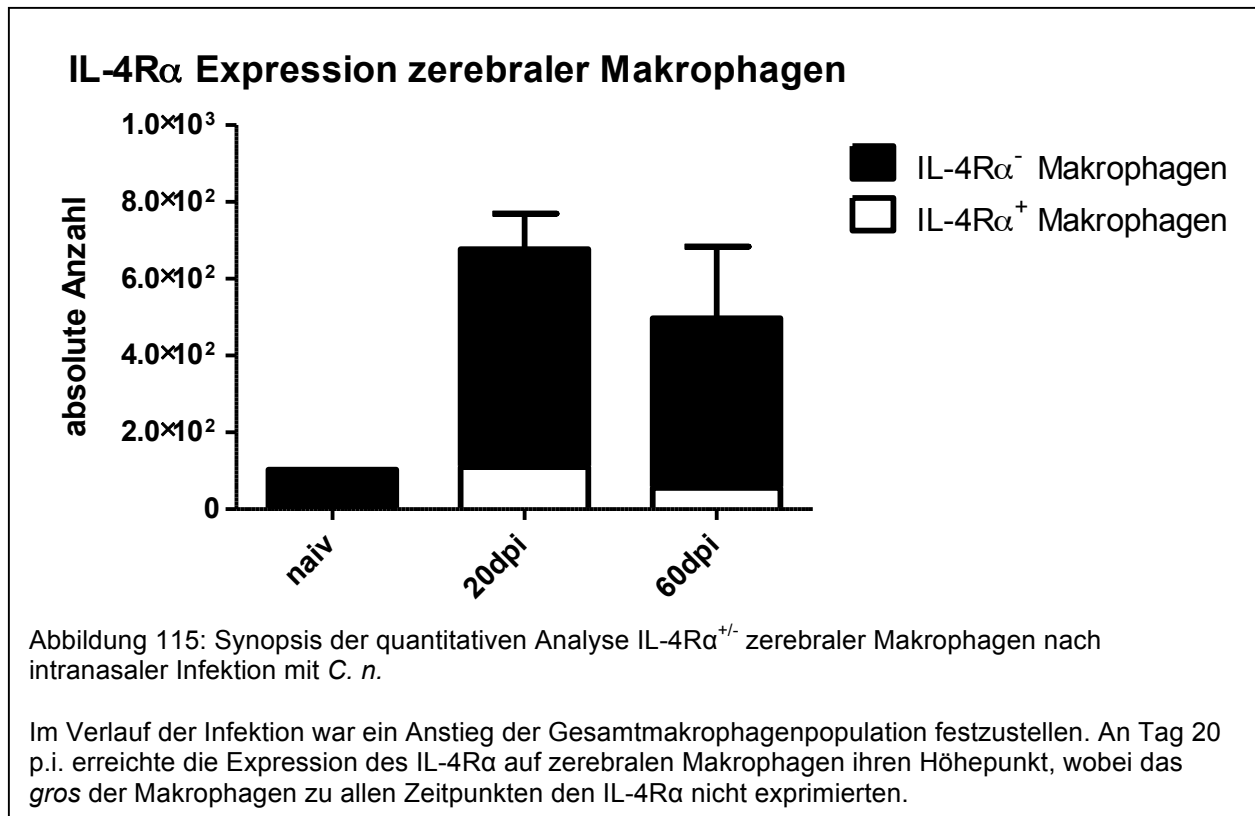
Wie in Abbildung 114 zu sehen ist, fanden sich in den Gehirnen nicht infizierter Tiere 103 IL-4R $\alpha$ <sup>-</sup> Makrophagen. Innerhalb der ersten 20 Tage p.i. erreichte die Menge der IL-4R $\alpha$ <sup>-</sup> Makrophagen ihren Höhepunkt. Es befanden sich zu diesem Zeitpunkt im Mittel ~577 IL-4R $\alpha$ <sup>-</sup> Makrophagen in den untersuchten Gehirnen. Der SEM betrug ~93.

Im Zeitraum zwischen 20dpi und 60dpi kam es zu einem leichten Abfall der Menge IL-4R $\alpha$ <sup>-</sup> Makrophagen, sodass sich zum Zeitpunkt 60dpi im Mittel nur noch 441 Makrophagen in den untersuchten Gehirnen befanden, die den IL-4R $\alpha$  nicht exprimierten. Der SEM betrug hierbei ~187.



Die in Abbildung 115 dargestellte Synopsis zeigt zum einen den Trend zur Rekrutierung zerebraler Makrophagen im Verlauf der Infektion. Zum anderen zeigt sie die Zusammensetzung der Gesamtmakrophagenpopulation zu jedem untersuchten Zeitpunkt.

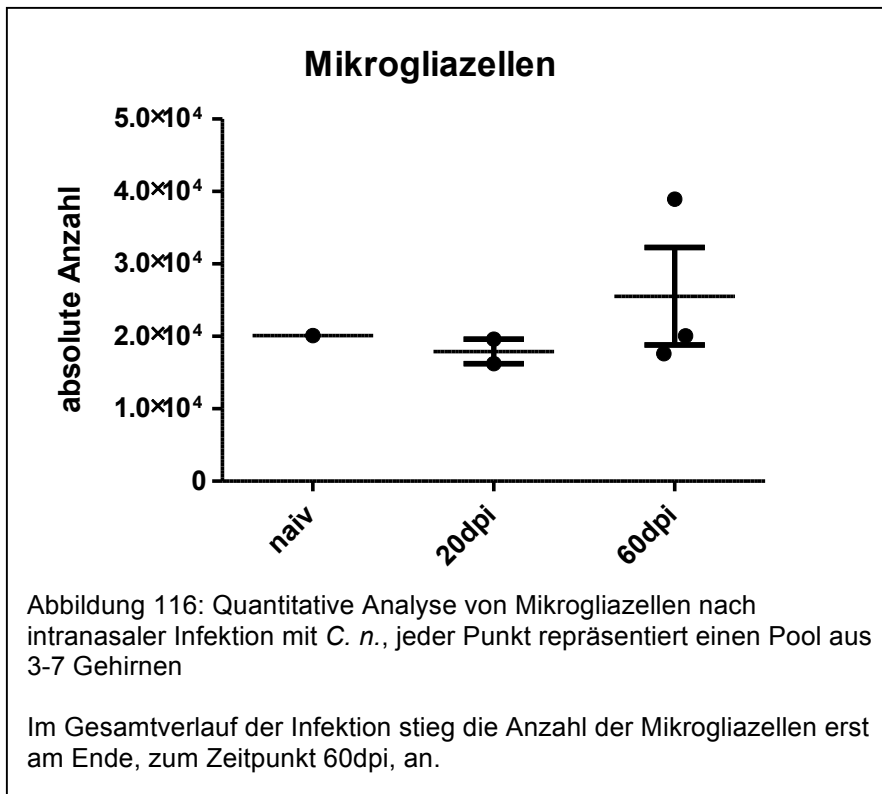
Hierbei wird ersichtlich, dass zu jedem Zeitpunkt das *gros* der Makrophagen den IL-4R $\alpha$  nicht exprimierten und somit nicht in der Lage war, alternativ aktiviert bzw. M2-polarisiert zu werden. Jedoch gab es 20 Tage nach der Infektion eine kleine Gruppe von Makrophagen, die den IL-4R $\alpha$  exprimierten. Diese Menge nahm im Verlauf der Infektion jedoch wieder ab.



#### 4.10.4 Bestimmung von Mikrogliazellen

Aus Abbildung 116 wird ersichtlich, dass sich in den Gehirnen von nicht infizierten Tieren  $\sim 2 \times 10^4$  (20.111) Mikrogliazellen befanden. Diese Zahl änderte sich auch 20 Tage nach der Infektion mit *C. n.* kaum. Es befanden sich zum Zeitpunkt 20dpi  $\sim 1,8 \times 10^4$  (17.906) Mikrogliazellen in den untersuchten Gehirnen, wobei der SEM  $\sim 1,7 \times 10^3$  (1693) betrug.

Erst nach weiteren 40 Tagen p.i., als auch histologisch Pilzläsionen im ZNS zu finden waren, stieg die Zahl der Mikrogliazellen an. So befanden sich zum Zeitpunkt 60dpi im Mittel  $\sim 2,6 \times 10^4$  (25.534) Mikrogliazellen in den untersuchten Gehirnen.

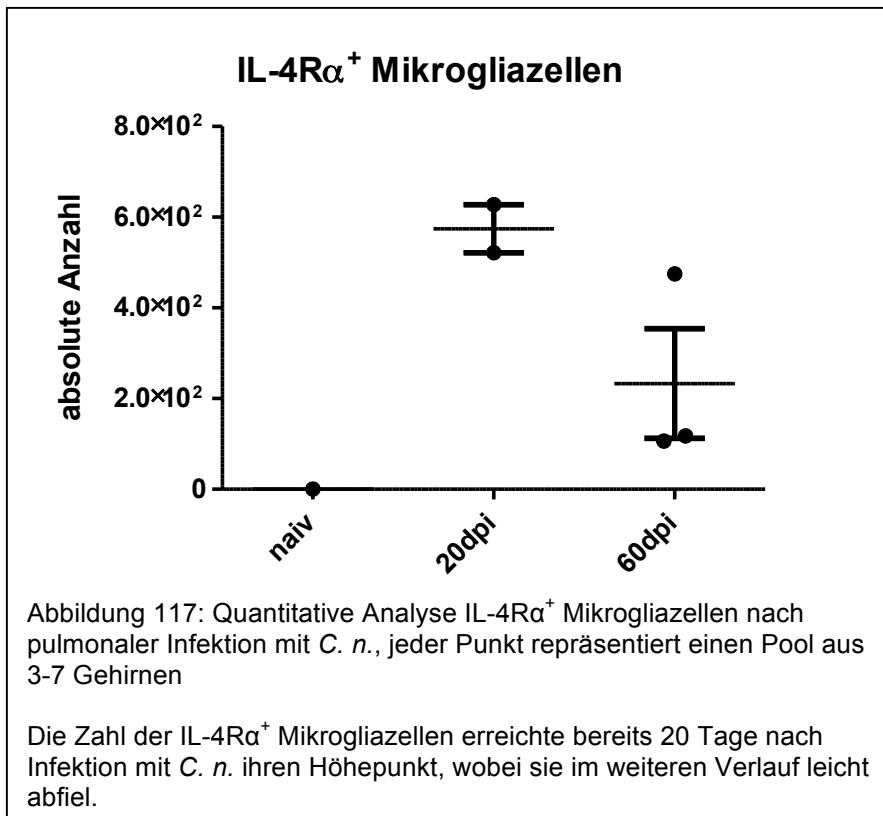


#### 4.10.5 Analyse der IL-4R $\alpha$ Expression auf Mikrogliazellen bei *C. n.* Infektion

Analog zu den zerebralen Makrophagen wurde auch die Population der Mikrogliazellen hinsichtlich ihrer IL-4R $\alpha$  Expression analysiert.

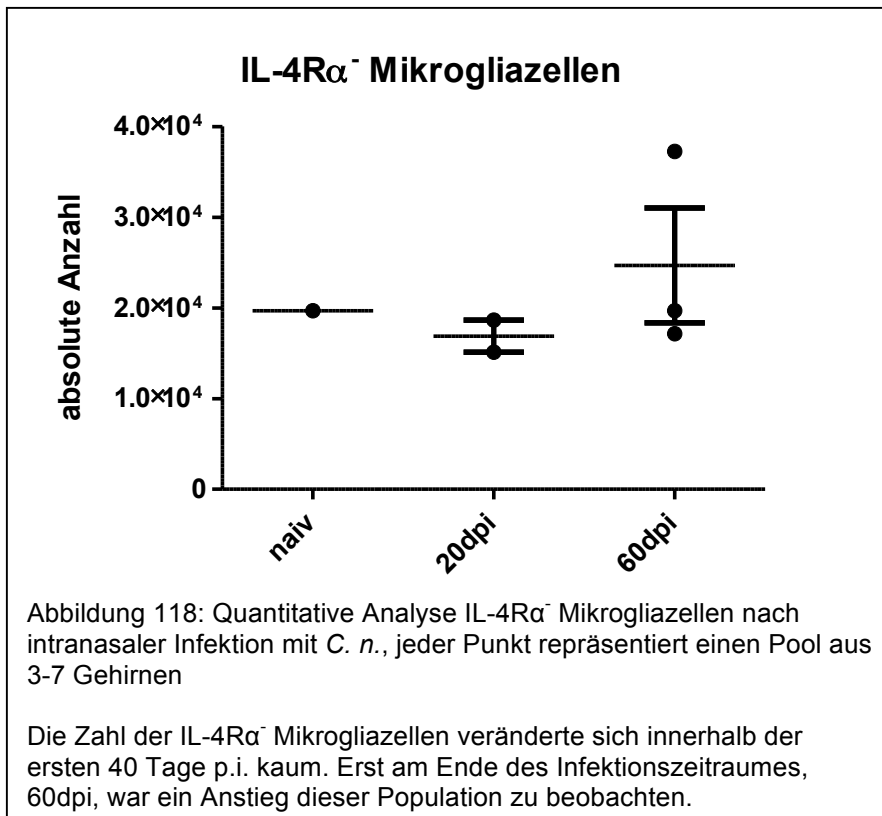
Aus der Abbildung 117 ist zu entnehmen, dass die Mikrogliazellen der nicht infizierten Gehirne den IL-4R $\alpha$  nicht exprimierten. 20 Tage p.i. änderte sich diese Situation deutlich. Die Zahl der IL-4R $\alpha$ <sup>+</sup> Mikrogliazellen erreichte ihren Höhepunkt. Es befanden sich zum Zeitpunkt 20dpi im Mittel ~574 IL-4R $\alpha$ <sup>+</sup> Mikrogliazellen in den untersuchten Gehirnen, wobei der SEM 53 betrug. Im Verlauf der weiteren 40 Tage kam es zu einem leichten Abfall der Menge IL-4R $\alpha$ <sup>+</sup> Mikrogliazellen. Zum Zeitpunkt 60dpi befanden sich in den untersuchten Gehirnen im Mittel ~233 Mikrogliazellen die den IL-4R $\alpha$  trugen. Der SEM betrug ~121.



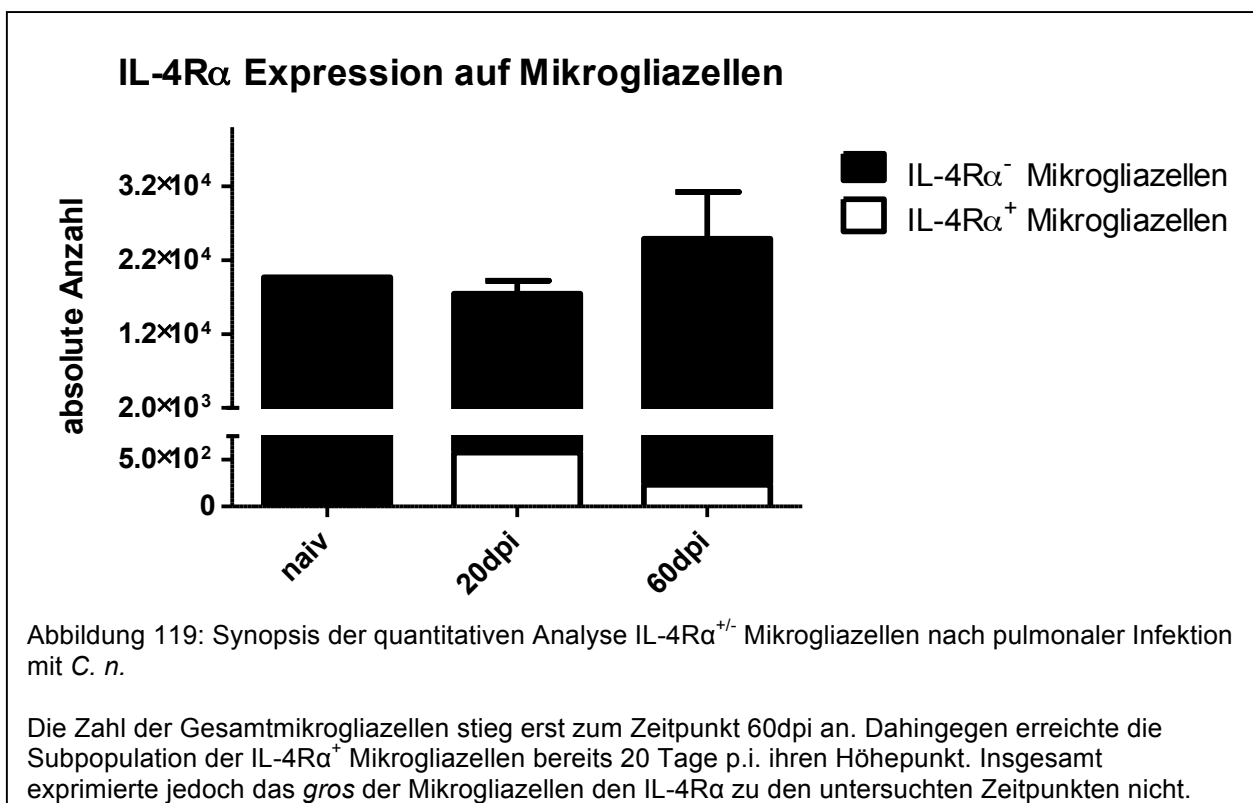


Die komplementäre Population der IL-4R $\alpha$ <sup>-</sup> Mikrogliazellen verhielt sich gänzlich anders. So stellten sich alle der  $\sim 2 \times 10^4$  (19.695) vorhandenen Mikrogliazellen der nicht infizierten Gehirne als IL-4R $\alpha$ <sup>-</sup> dar (Abbildung 118).

Auch 20 Tage p.i. änderte sich die Zahl der Mikrogliazellen, die den IL-4R $\alpha$  nicht exprimierten kaum. In den untersuchten Gehirnen befanden sich zum Zeitpunkt 20dpi im Mittel  $\sim 1,7 \times 10^4$  (16.885) IL-4R $\alpha$ <sup>-</sup> Mikrogliazellen. Der SEM betrug hierbei  $\sim 1,8 \times 10^3$  (1.781). Innerhalb der letzten 40 Tage der Infektion stieg die Zahl der IL-4R $\alpha$ <sup>-</sup> Mikrogliazellen leicht an. So befanden sich zum Zeitpunkt 60dpi im Mittel  $\sim 2,5 \times 10^4$  (24.687) IL-4R $\alpha$ <sup>-</sup> Mikrogliazellen in den untersuchten Gehirnen. Der SEM betrug hierbei  $\sim 6,3 \times 10^3$  (6.324).



Die Abbildung 119 zeigt eine Synopsis der IL-4R $\alpha$  Expression der Mikrogliazellen. Daraus wird ersichtlich, dass es insgesamt einen Trend zur Zunahme der Mikrogliazellen gab. Weiterhin ist festzustellen, dass bereits 20 Tage p.i. quantitativ das Maximum der IL-4R $\alpha$ <sup>+</sup> Mikrogliazellen erreicht war.



Betrachtet man die durchflusszytometrische Charakterisierung zerebraler Leukozyten *in toto*, so ist festzustellen, dass diese sich qualitativ und quantitativ deutlich unterscheiden.

So zeigten die zerebralen Makrophagen bereits nach 20 Tagen p.i. einen Anstieg ihrer Zellzahl, wohingegen die Menge der Mikrogliazellen nahezu unverändert war.

Betrachtete man die Expression des IL-4R $\alpha$ , so verhielten sich beide Leukozytenpopulationen dahingehend insofern ähnlich, dass sie bereits nach 20 Tagen den Höhepunkt ihrer IL-4R $\alpha$  Expression erreicht hatten. Dies galt auch für die Mikrogliazellen, obwohl deren Zellzahl insgesamt zum Zeitpunkt 20 dpi nicht zunahm.

Dies bedeutet, dass zerebrale Makrophagen und Mikrogliazellen bereits 20 Tage nach der Infektion mit *C. n.* prinzipiell die immunologischen Voraussetzungen erfüllten, um alternativ aktiviert bzw. M2-polarisiert zu werden. Ruft man sich die mikrobiologischen Untersuchungen des Pilzbefalles des Gehirns ins Gedächtnis, so zeigte sich zu diesem Zeitpunkt in nahezu keinem Gehirn ein Befall durch Kryptokokken. Dies lässt darauf schließen, dass obwohl zu diesem Zeitpunkt *de facto* kein Pilz im Gehirn zu finden war, die zerebralen Makrophagen und Mikroglia in der Lage waren, die pulmonale bzw. systemische Infektion mit *C. n.* zu detektieren und ihren Phänotyp entsprechend anzupassen.

#### **4.11 Charakterisierung der zerebralen Entzündungsreaktion auf molekularer Ebene**

Mittels quantitativer *realtime* PCR wurden molekulare Marker / Zytokine der TH1/TH2 Antwort, Marker der M1/M2-Polarisierung und Marker der Makrophagenfusion bei naiven Tieren und infizierten Tieren zu den Zeitpunkten 20dpi, 40dpi und 60dpi im ZNS untersucht. Es wurden die gleichen Marker und Zytokine wie in der Lunge analysiert (s.o.).

##### **4.11.1 Quantifizierung molekularer Marker der zerebralen TH1/M1-Polarisierung**

Bereits in Gehirnen von nicht infizierten Tieren wurde IFN- $\gamma$  basal exprimiert. Jedoch wurde diese IFN- $\gamma$  Expression im Verlauf der Infektion eingestellt. Die einzige Ausnahme bildeten hierbei je zwei Gehirne zu den Zeitpunkten 20dpi und 60dpi. Bei den zwei Gehirnen zum Zeitpunkt 60dpi, die kräftig IFN- $\gamma$  exprimierten, handelte es sich um die zwei einzigen der untersuchten Gehirne, die deutliche histomorphologische

Kryptokokkenläsionen im ZNS zeigten. Die genauen Werte können den Tabellen 18 und 19 und den Abbildungen 120 und 121 entnommen werden.

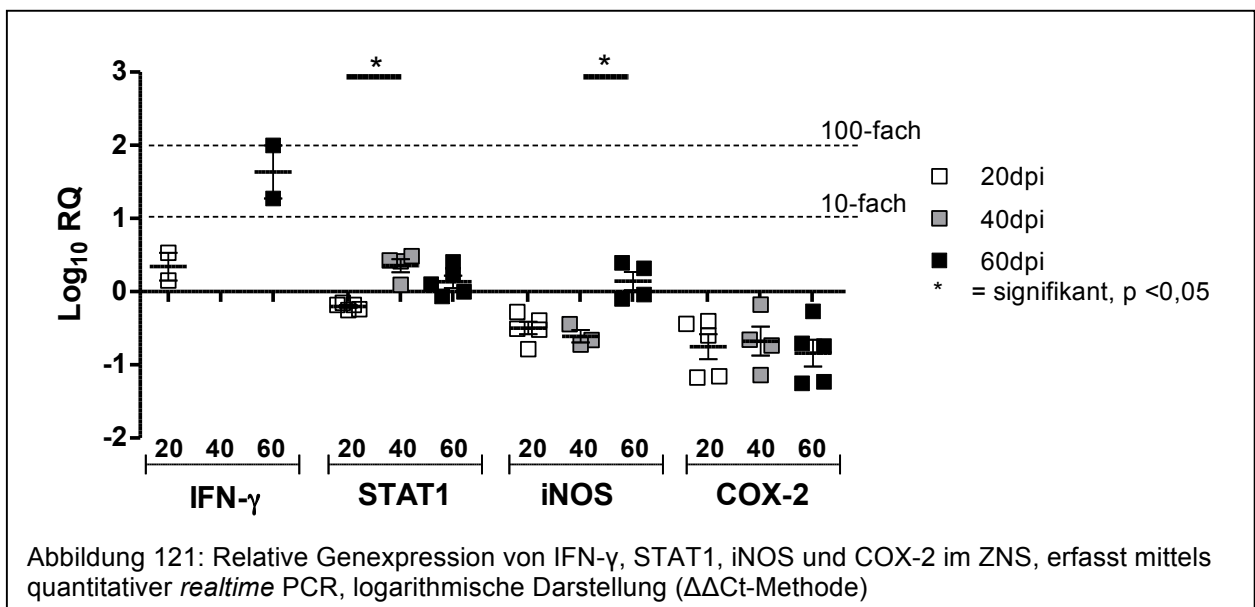
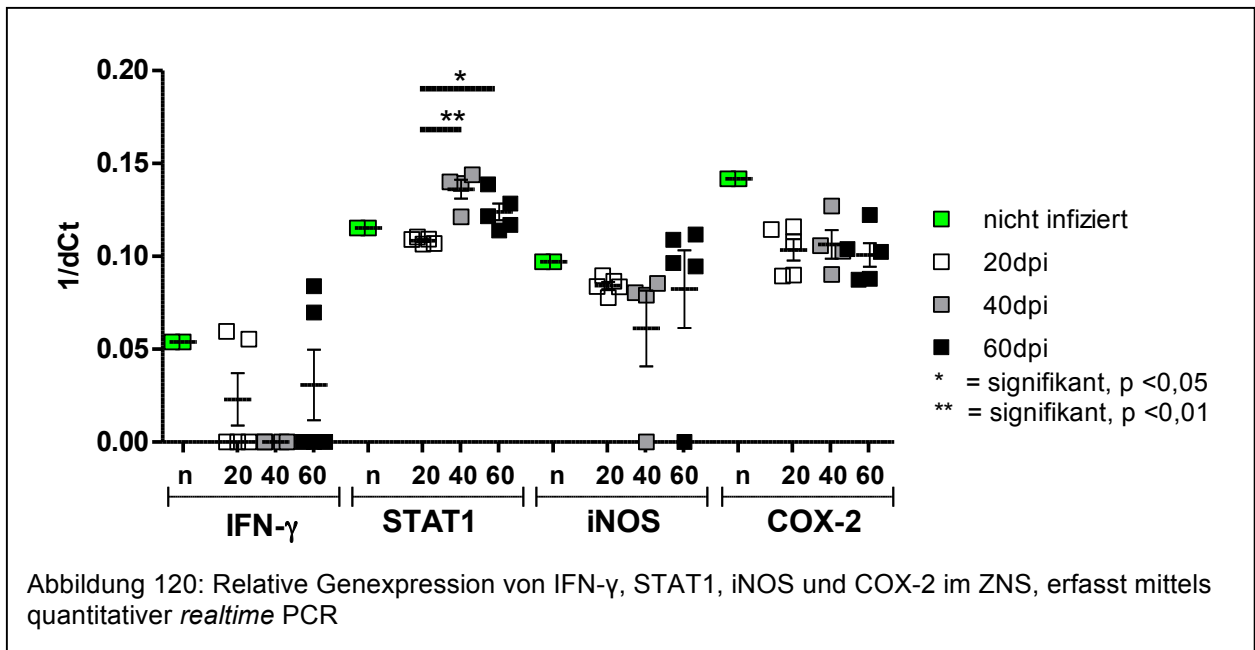
Der Signaltransduktor STAT1 wurde ebenfalls basal bereits kräftig in den Gehirnen nicht infizierter Tiere exprimiert. In den ersten 20 Tage p.i. kam es zu einem leichten Abfall der Expression unter das „naive Niveau“. Darauf folgte ein schwacher Anstieg der STAT1 Expression, jedoch undulierten auch hier die  $\log_{10}$  RQ Werte um die Nulllinie. Als statistisch signifikant ließ sich der Anstieg der Expression vom Zeitpunkt 20dpi zum Zeitpunkt 60dpi berechnen. Sogar als statistisch hochsignifikant stellte sich die Expressionssteigerung vom Zeitpunkt 20dpi zum Zeitpunkt 40dpi dar.

Analog zur Lunge antagonisierten sich STAT1 und STAT6 (siehe unten) auch im ZNS, sodass ihre jeweiligen Expressionsveränderungen spiegelbildliche Veränderungen des jeweiligen Gegenspielers bewirkten. Die genauen Werte können den Tabellen 18 und 19 und den Abbildungen 120 und 121 entnommen werden.

Die iNOS wurde ebenfalls bereits in den Gehirnen von nicht infizierten Mäusen exprimiert. Im Verlaufe der Infektion sank die Expression leicht ab und stieg anschließend wieder an. Es zeigte sich eine statistische Signifikanz ( $p < 0,05$ ) der Expressionssteigerung vom Zeitpunkt 40dpi zum Zeitpunkt 60dpi. Die genauen Werte können den Tabellen 18 und 19 und den Abbildungen 120 und 121 entnommen werden.

COX-2 wurde in den Gehirnen nicht infizierter Tiere bereits basal kräftig exprimiert. Im Verlauf der ersten 20 Tage der Infektion wurde die Expression der COX-2 unter das „naive Niveau“ reguliert. Auf diesem Niveau sistierte die Expression im weiteren Infektionsverlauf bis zum Zeitpunkt 60dpi. Die genauen Werte können den Tabellen 18 und 19 und den Abbildungen 120 und 121 entnommen werden.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass IFN- $\gamma$  in den histomorphologisch kräftig infizierten Gehirnen exprimiert wurde. In der Mehrzahl der Gehirne wurde die Expression von einem naiven, basalen Level herunterreguliert. Dies galt auch für andere Marker der M1-Polarisation (iNOS < COX-2). STAT1 wurde zwar nur gering, dennoch stärker als andere M1-Marker, reguliert. Diese Expression ist wahrscheinlich im Kontext der oben genannten STAT6 Expression zu werten.



TH1/M1-Marker	1/dCt Werte			
	naiv	20dpi	40dpi	60dpi
IFN- $\gamma$	0,054	0,055	0	0
	0,054	0,06	/	0
		0	0	0,07
		0	0	0,084
		0	0	0
MW ~	0,054	0,023	0	0,031
iNOS	0,097	0,084	0,080	0,096
	0,097	0,087	/	0,095

TH1/M1-Marker	1/dCt Werte			
		0,09	0,079	0,109
		0,078	0,085	0,112
		0,084	0	0
MW ~	0,097	0,084	0,061	0,082
<b>COX-2</b>	0,142	0,116	0,103	0,087
	0,142	0,09	/	0,088
		0,114	0,106	0,102
		0,108	0,090	0,122
		0,089	0,127	0,104
MW ~	0,142	0,104	0,106	0,101
<b>STAT1</b>	0,115	0,110	0,139	0,122
	0,115	0,109	/	0,117
		0,109	0,121	0,128
		0,107	0,144	0,139
		0,107	0,140	0,114
MW ~	0,115	0,108	0,136	0,124

Tabelle 18: 1/dCT Werte der TH1/M1-Marker bzw. Zytokine im Verlauf der zerebralen Infektion

TH1/M1-Marker	Log <sub>10</sub> RQ Werte		
	20dpi	40dpi	60dpi
<b>INF-γ</b>	0,154	n.b.	n.b.
	0,533	n.b.	n.b.
		n.b.	1,274
		n.b.	1,997
		n.b.	n.b.
MW ~	0,344	n.b.	1,635
<b>iNOS</b>	-0,508	-0,659	-0,038
	-0,393	n.b.	-0,097
	-0,278	-0,724	0,319
	-0,784	-0,443	0,392
	-0,52	n.b.	n.b.
MW ~	-0,497	-0,609	0,144
<b>COX-2</b>	-0,401	-0,736	-1,252
	-1,155	n.b.	-1,233
	-0,439	-0,655	-0,744

TH1/M1-Marker	Log <sub>10</sub> RQ Werte		
		-0,599	-1,141
	-1,172	-0,175	-0,704
MW ~	-0,753	-0,677	-0,84
<b>STAT1</b>	-0,151	0,414	0,100
	-0,181	n.b.	-0,001
	-0,183	0,093	0,231
	-0,251	0,485	0,407
	-0,242	0,426	-0,066
MW ~	-0,201	0,354	0,134

Tabelle 19: Log<sub>10</sub> RQ Werte der TH1/M1-Marker bzw. Zytokine im Verlauf der zerebralen Infektion ( $\Delta\Delta C_t$ -Methode) (n.b. = nicht berechenbar)

#### 4.11.2 Quantifizierung molekularer Marker der zerebralen TH2/M2-Polarisierung

IL-4 wurde weder im Gehirn von nicht infizierten Tieren, noch in einem der untersuchten infizierten Gehirne detektiert. Dies galt für alle untersuchten Zeitpunkte. Aus früheren Experimenten ist bekannt, dass die zerebrale Messung von IL-4 technisch schwierig ist, sodass dieses Ergebnis unter Vorbehalt gewertet werden musste.

Das Signaltransduktionsmolekül STAT6 wurde bereits in den Gehirnen nicht infizierter Tiere basal kräftig exprimiert. Jedoch kam es innerhalb von 40 Tagen p.i. zu einem statistisch signifikanten Abfall der Expression. Im weiteren Verlauf der Infektion erreichte die STAT6 Expression lediglich das „naive Niveau“, wobei die Expression sich spiegelbildlich zu STAT1 verhielt. Dieser Anstieg stellte sich als statistisch signifikant (20dpi zu 60dpi) bzw. als statistisch hochsignifikant zwischen den Zeitpunkten 40dpi und 60dpi dar. Die genauen Werte können den Tabellen 20 und 21 und den Abbildungen 122 und 123 entnommen werden.

Auch Arg-1 wurde in den Gehirnen nicht infizierter Tiere exprimiert. Im Verlauf der Infektion war ein deutlicher und steter, wenn auch statistisch nicht signifikanter Anstieg der Expression von Arg-1 festzustellen. Lediglich ein Gehirn zeigte zum Zeitpunkt 40dpi keine Expression von Arg-1. Auch bezüglich der Arg-1 Expression bildeten die beiden histomorphologisch läsionstragenden Gehirne eine Ausnahme, da sie zum Zeitpunkt 60dpi eine deutlich kräftigere Arg-1 Expression zeigten. Die exakten Daten können den Tabellen 20 und 21 und den Abbildungen 122 und 123 entnommen werden.

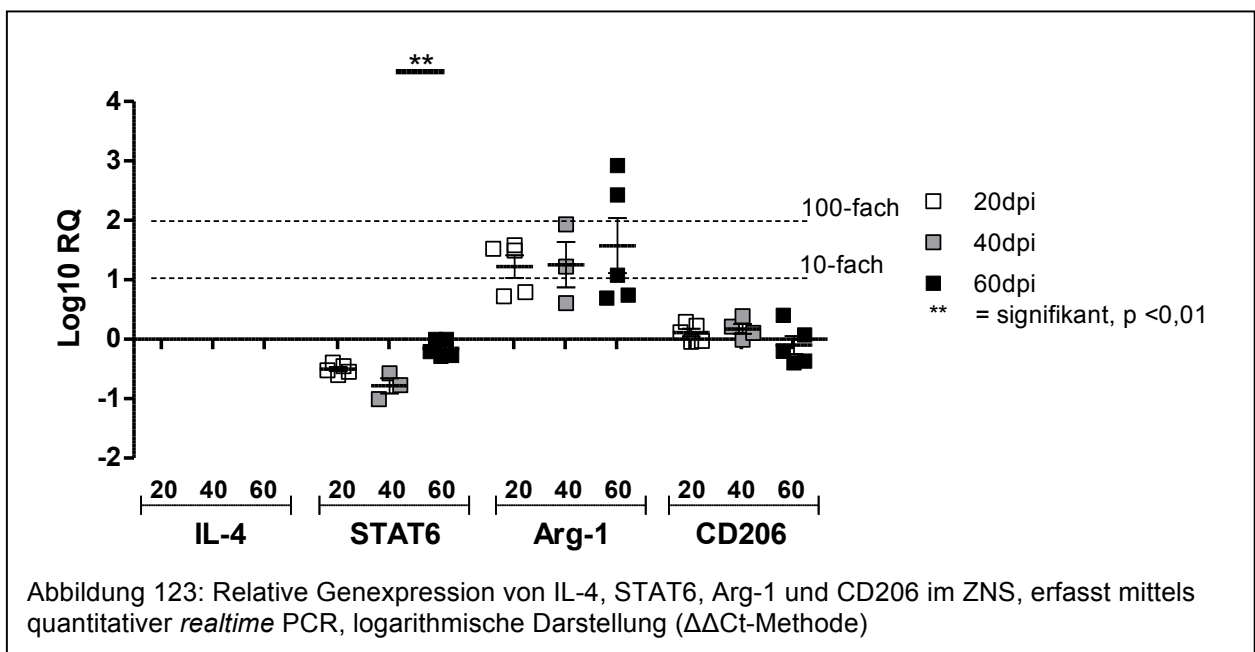
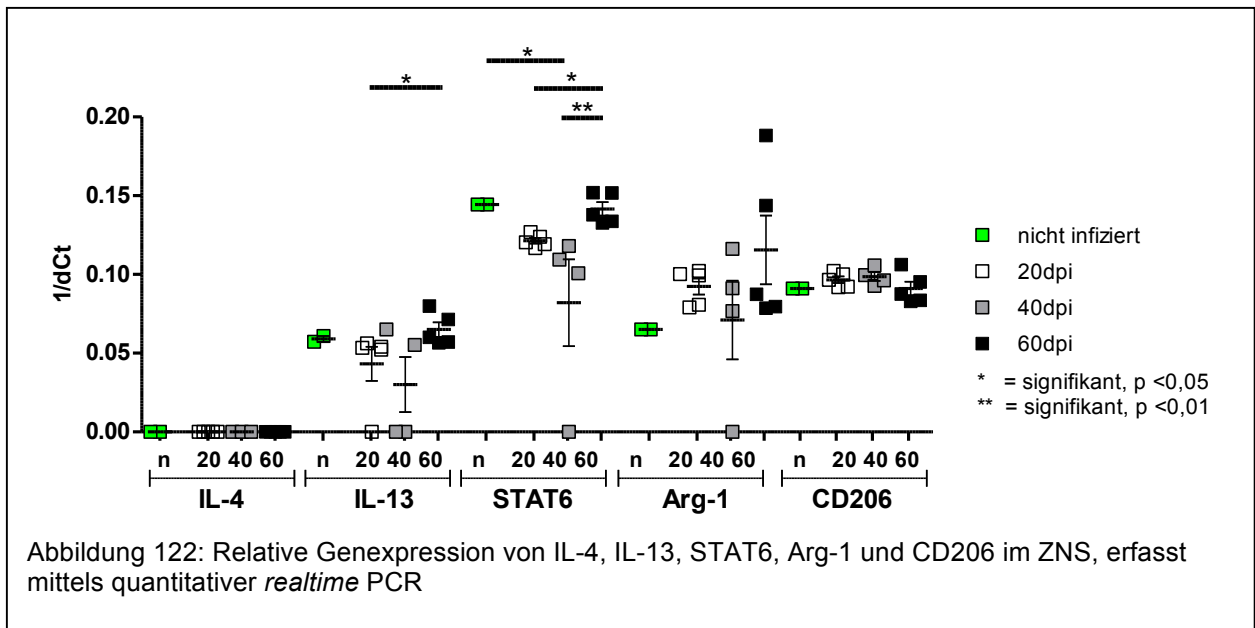
CD206 zeigte sich ebenfalls in den Gehirnen von nicht infizierten Tieren exprimiert. Jedoch wurde CD206 im Verlauf der Infektion kaum reguliert, sodass sich die  $\log_{10}$  RQ Werte um die Nulllinie befanden.

IL-13 wurde bereits in den Gehirnen von nicht infizierten Tieren exprimiert. Jedoch sank diese Expression im Verlauf der ersten 40 Tage p.i. stetig ab. Zum Zeitpunkt 60dpi nahm die Expression von IL-13 jedoch kräftig und in statistisch signifikantem Maße zu. Zu diesem Zeitpunkt war die IL-13 Expression höher als bei nicht infizierten Tieren. Die genauen Werte können den Tabellen 20 und 21 und der Abbildung 122 entnommen werden. Es wurde darauf verzichtet eine logarithmische Darstellung von RQ Werten zu berechnen bzw. darzustellen, da sich aufgrund der geringen Ausgangsexpression keine mathematisch logischen RQ Werte ergaben (Division von Werten  $\sim 0$ ).

Insgesamt ist festzuhalten, dass IL-4 zu keinem Zeitpunkt exprimiert wurde. IL-13 dahingegen zeigte nach initialer Herunterregulierung einen kräftigen Anstieg. Im Verlauf der Infektion wurde STAT6 lediglich leicht und CD206 nahezu nicht reguliert. Die Trends der Veränderungen von STAT6 korrelieren mit der Expressionsänderung von IL-13. Dies unterstreicht erneut die Rolle von IL-13 als Aktivator von STAT6. Interessant erscheint, dass das Molekül Arg-1 offenbar im ZNS als Reaktion auf die pulmonale Infektion bereits zu sehr frühen Zeitpunkten im Sinne eines „sensings“ reguliert wurde.

Zusammenfassend ist also festzuhalten, dass das ZNS auf mRNA Ebene lediglich einen milden TH2- (charakterisiert durch IL-13), als auch einen milden M2-Phänotyp (charakterisiert durch STAT6) ausbildete.





TH2/M2-Marker	1/dCt Werte			
	naiv	20dpi	40dpi	60dpi
IL-4	0	0	/	0
	0	0	/	0
		0	0	0
		0	0	0
		0	0	0
MW ~	0	0	0	0
STAT6	0,144	0,124	0,101	0,138
	0,144	0,119	/	0,134

TH2/M2-Marker	1/dCt Werte			
		0,127	0,118	0,152
		0,120	0,109	0,152
		0,117	0	0,133
MW ~	0,144	0,122	0,082	0,142
<b>Arg-1</b>	0,065	0,102	0,077	0,08
	0,065	0,099	/	0,079
		0,079	0,116	0,144
		0,081	0,091	0,188
		0,1	0	0,087
MW ~	0,065	0,092	0,071	0,116
<b>CD206</b>	0,091	0,092	0,1	0,084
	0,091	0,097	/	0,088
		0,1	0,106	0,095
		0,102	0,096	0,106
		0,092	0,096	0,083
MW ~	0,091	0,097	0,099	0,091
<b>IL-13</b>	0,057	0,053	0	0,057
	0,061	0,054	0,065	0,06
		0,056	0,055	0,071
		0	0	0,08
		0,052		0,057
MW ~	0,059	0,043	0,03	0,065

Tabelle 20: 1/dCT Werte der TH2/M2-Marker bzw. Zytokine im Verlauf der zerebralen Infektion

TH2/M2-Marker	Log <sub>10</sub> RQ Werte		
	20dpi	40dpi	60dpi
<b>IL-4</b>	n.b.	/	n.b.
	n.b.	/	n.b.
		n.b.	n.b.
		n.b.	n.b.
		n.b.	n.b.
MW ~	n.b.	n.b.	n.b.
<b>STAT6</b>	-0,451	-1,008	-0,205
	-0,545	/	-0,271
	-0,393	-0,570	-0,002
	-0,522	-0,774	-0,005

TH2/M2-Marker	Log <sub>10</sub> RQ Werte		
	-0,6	n.b.	-0,289
MW ~	-0,502	-0,784	-0,154
<b>Arg-1</b>	1,581	0,605	0,741
	1,495	/	0,692
	0,720	1,933	2,43
	0,792	1,223	2,925
	1,521	n.b.	1,08
MW ~	1,22	1,25	1,57
<b>CD206</b>	-0,027	0,213	-0,369
	0,116	/	-0,201
	0,226	0,387	0,072
	0,290	-0,009	0,4
	-0,042	0,107	-0,396
MW ~	0,113	0,175	-0,099

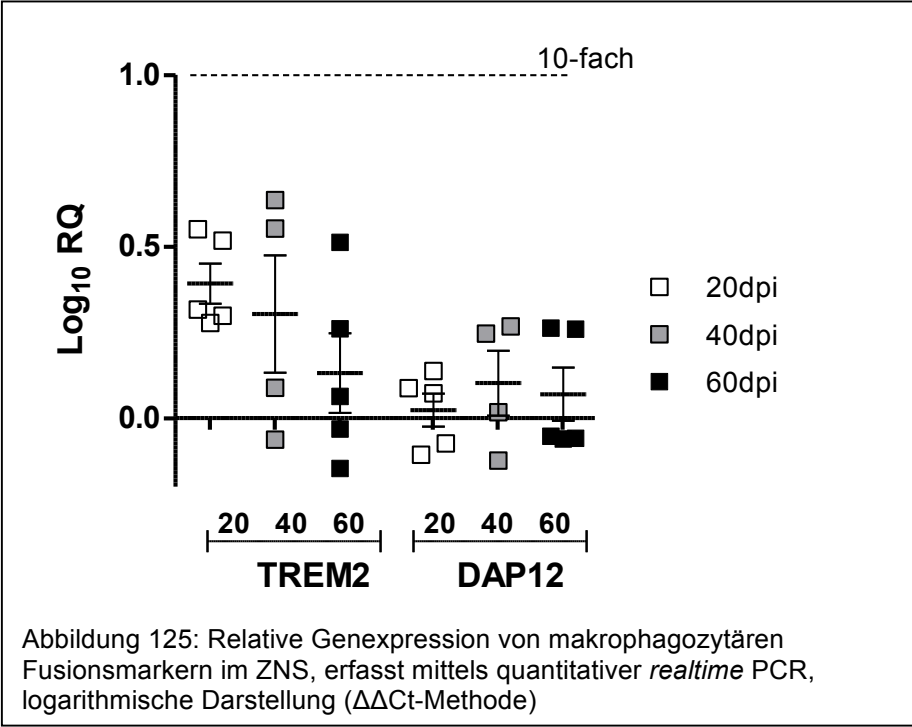
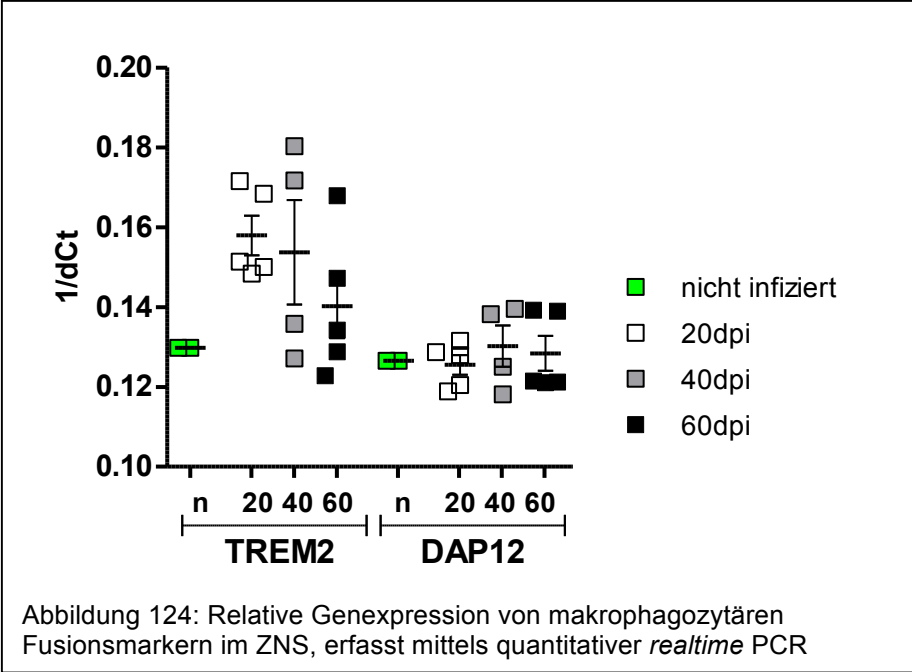
Tabelle 21: Log<sub>10</sub> RQ Werte der TH2/M2-Marker bzw. Zytokine im Verlauf der zerebralen Infektion ( $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode) (n.b. = nicht berechenbar)

#### 4.11.3 Quantifizierung molekularer Marker der zerebralen Makrophagenfusion

TREM2 zeigte sich bereits in den Gehirnen von nicht infizierten Tieren exprimiert. Zwar stieg die Expression initial zum Zeitpunkt 20dpi leicht an, sank im Verlauf der Infektion jedoch interessanterweise stets ab. Die exakten Werte sind den Tabellen 22 und 23, deren Beziehung zueinander den Abbildungen 124 und 125 zu entnehmen.

Ähnlich verhielt sich auch DAP12, welches ebenfalls bereits basal bei nicht infizierten Tieren exprimiert wurde. Im Verlauf der Infektion undulierten die log<sub>10</sub> RQ Werte jedoch um die Nulllinie, sodass insgesamt nahezu keine Regulation stattfand. Die genauen Werte können den Tabellen 22 und 23 entnommen werden. Ihr Verhältnis zueinander ist in den Abbildungen 124 und 125 dargestellt.

Zusammenfassend ist also festzustellen, dass die beiden untersuchten Marker der Makrophagenfusion im Verlauf der Infektion im ZNS kaum reguliert wurden. Dies deckt sich mit den weiter oben beschriebenen histologischen Ergebnissen, im Sinne eines gänzlichen Ausbleibens der Riesenzellbildung im ZNS im Verlauf der Infektion.



Makrophagenfusionsmarker	1/dCt Werte			
	naiv	20dpi	40dpi	60dpi
TREM2	0,13	0,148	0,136	0,123
	0,13	0,15	/	0,129
		0,168	0,18	0,147
		0,172	0,127	0,168
		0,151	0,172	0,134
MW ~	0,13	0,158	0,154	0,14

Makrophagenfusionsmarker	1/dCt Werte			
<b>DAP12</b>	0,127	0,132	0,125	0,121
	0,127	0,119	/	0,121
		0,129	0,14	0,139
		0,128	0,118	0,139
		0,12	0,138	0,121
MW ~	0,127	0,126	0,13	0,128

Tabelle 22: 1/dCT Werte der Makrophagenfusionsmarker im Verlauf der zerebralen Infektion

Makrophagenfusionsmarker	Log <sub>10</sub> RQ Werte		
	20dpi	40dpi	60dpi
<b>TREM2</b>	0,277	0,089	-0,146
	0,299	/	-0,031
	0,517	0,636	0,26
	0,550	-0,062	0,513
	0,317	0,552	0,063
MW ~	0,392	0,304	0,132
<b>DAP12</b>	0,137	0,018	-0,061
	-0,106	/	-0,058
	0,087	0,268	0,263
	0,072	-0,124	0,259
	-0,074	0,247	-0,053
MW ~	0,023	0,102	0,07

Tabelle 23: Log<sub>10</sub> RQ Werte der Makrophagenfusionsmarker im Verlauf der zerebralen Infektion (ΔΔCt-Methode) (n.b. = nicht berechenbar)

## 5. Diskussion

### 5.1 Gibt es eine zeitabhängige und organspezifische TH1/M1- und TH2/M2-Antwort im Kontext der Kryptokokkose?

Die erste Hypothese, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde, lautet: Gibt es eine organspezifische TH1/M1- & TH2/M2-Antwort bei der murinen Kryptokokkose in Abhängigkeit vom Untersuchungszeitpunkt? Mit anderen Worten, unterscheidet sich die Zusammensetzung der entzündlichen Infiltrate und der entsprechenden Zytokine und Mediatoren in den untersuchten Organen zu den drei Untersuchungszeitpunkten 20dpi, 40dpi und 60dpi voneinander?

Diese Frage wurde vor dem Hintergrund gestellt, dass aus Ergebnissen Anderer und der eigenen Arbeitsgruppe bekannt ist, dass im Verlauf der Kryptokokkeninfektion die TH1/M1- & TH2/M2-Antwort strikt reguliert wird. Dies ist jedoch stark davon abhängig, welches Tiermodell gewählt wird, welcher Kryptokokkenstamm verwendet wird und wie die Erreger administriert werden (intravenös, intranasal etc.) [58-60, 63-65].

In verschiedenen Arbeiten von Wissenschaftlern wie Arora, Shibuya und Zhang et al. [59, 66, 73] konnte gezeigt werden, dass für die Kontrolle, als auch die Bekämpfung von *C. n.* eine intakte TH1 Antwort mit kräftiger IFN- $\gamma$  Produktion wichtig ist und dass diese meist mit der Bildung von Granulomen in der Lunge assoziiert ist [37]. Decken et al. konnten unter Verwendung von IL-12 knock-out Mäusen (IL-12p35<sup>(-/-)</sup> und IL-12p40<sup>(-/-)</sup>) auf dem Balb/c Hintergrund zeigen, dass das TH1 Zytokin IL-12 in der pulmonalen *C. n.* Infektion protektiv wirkt [67]. Später zeigte sich, dass Mäuse, denen das TH2 Zytokin IL-4, oder IL-13 fehlte (IL-4<sup>(-/-)</sup> & IL13<sup>(-/-)</sup> knock-out Mäuse), von der Infektion protegirt waren [74, 76]. Müller et al. zeigten zusätzlich, dass man einen Gendosiseffekt bei homo- und heterozygoten IL-4R $\alpha$  knock-out Mäusen erhält, die mit *C. n.* infiziert wurden. Dies bedeutet, dass heterozygote IL-4R $\alpha$ <sup>(+/-)</sup> knock-out Mäuse bezüglich der Reaktion auf die Infektion mit *C. n.* einen intermediären Phänotyp bezüglich des Überlebens und der Organpathologie zeigten [77].

Insgesamt zeichnet sich daher in verschiedenen Modellen und Arbeitsgruppen ein uniformes Bild ab, bei dem die TH2 Antwort als nicht protektiv und die TH1 Antwort als protektiv bezüglich der pulmonalen, als auch zerebralen Kryptokokkose gilt [76].

In diesem Zusammenhang wurde in der vorliegenden Arbeit der Frage nachgegangen, wie sich die TH1 Antwort auf mRNA Ebene in Form von IFN- $\gamma$ -Expression und der Expression des TH1-assoziierten M1-Transkriptionsmoleküls STAT1 verhält. Hier zeigte sich in der Lunge ein deutlicher Anstieg der Expressionen dieser Moleküle im Verlauf der Infektion. Überraschenderweise konnte keine wesentliche Regulation des TH2 Zytokins IL-4 beobachtet werden, wobei IL-13, als auch der TH2-assoziierte M2-Transkriptionsfaktor STAT6 effektiv reguliert wurden. Dies ist jedoch vor dem Hintergrund zu beurteilen, dass bereits aus früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe bekannt ist, dass die Messung der IL-4 Expression technisch schwierig ist und mitunter nicht gelingt. Somit muss in Betracht gezogen werden, dass obwohl keine IL-4 Expression gemessen werden konnte, dennoch möglicherweise eine geringe nicht suffizient messbare Expression von IL-4 vorhanden war.

Zhang et al. zeigten unter Verwendung des hochvirulenten *C. n.* Stammes H99, welcher intratracheal appliziert wurde, innerhalb eines dreiwöchigen Beobachtungszeitraumes, dass die Zytokine IL-4 und IL-13 im Verlauf der Infektion kräftig reguliert wurden (mittels PCR und ELISA). Interessanterweise wurde IFN- $\gamma$  dahingegen auf mRNA Ebene nicht reguliert, jedoch auf Proteinebene (ELISA) [73].

Diese Unterschiede im Vergleich zu der vorliegenden Arbeit könnten zum einen an der Verwendung eines anderen *C. n.* Stammes liegen und zum anderen an der von Zhang et al. verwendeten, deutlich höheren, Infektionsdosis und damit verbundenen stärkeren Erkrankungsmanifestation und kürzeren Beobachtungszeit.

Als weiterem wichtigen Bestandteil der Immunantwort, galt das Interesse in dieser Arbeit auch der Rekrutierung von Leukozyten in die untersuchten Organe, als Reaktion auf eine Infektion mit *C. n.*. Hierbei zeigte sich eine frühzeitig beginnende und stetig anhaltende Rekrutierung von CD4<sup>+</sup> Lymphozyten und Makrophagen in die infizierten Lungen.

Anders stellte sich dies in den Gehirnen der infizierten Tiere dar. Hier wurden Makrophagen bereits 20 Tage p.i. ins ZNS rekrutiert, wohingegen die Anzahl der Mikrogliazellen erst am Ende des Beobachtungszeitraumes (60dpi) anstieg.

Zwar bezeichnen wir den Anstieg der Leukozyten in den untersuchten Organen als Rekrutierung, jedoch lässt sich deren exakte Herkunft (lokale Proliferation und Transformation *versus* Rekrutierung aus der Peripherie / dem Knochenmark) ohne den Einsatz von gentechnisch veränderten Chimären formal nicht sicher bestimmen.

CD4<sup>+</sup> Lymphozyten fungieren als zentrale Schaltstelle der TH1/TH2 Antwort. Die Notwendigkeit von CD4<sup>+</sup> Lymphozyten im Kampf gegen Erreger lässt sich nicht zuletzt aus der stark erhöhten Suszeptibilität von AIDS Patienten gegenüber Infektionen mit opportunistischen Erregern wie *C. n.* ableiten. Diesbezüglich konnten Buchanan et al. zeigen, dass die Depletion von CD4<sup>+</sup> Lymphozyten mittels monoklonalem Antikörper gegen CD4<sup>+</sup> zu einer deutlich höheren zerebralen Pilzlast nach *C. n.* Infektion führte. Somit unterstrichen sie, wie essentiell wichtig CD4<sup>+</sup> Lymphozyten für die Bekämpfung von *C. n.* sind [102].

Daher widmete ich mich in dieser Arbeit auch der Frage, ob die CD4<sup>+</sup> Lymphozyten quantitative oder qualitative Veränderungen im Verlauf der Infektion in den untersuchten Lungen und Gehirnen zeigen.

Es zeigte sich histomorphologisch, dass die initial spärlich in der Lunge vorhandenen CD4<sup>+</sup> Lymphozyten im Verlauf der Infektion deutlich in ihrer Zahl zunahmten. Weiterhin änderte sich ihr Verteilungsmuster von initial eher diffus verteilt, zu fokal akzentuiert auftretenden CD4<sup>+</sup> Lymphozytenansammlungen. Im Gehirn zeigte sich ein ähnliches, wenn auch weitaus schwächer ausgeprägtes Bild. Insgesamt waren erwartungsgemäß im nicht infizierten Zustand kaum CD4<sup>+</sup> Lymphozyten im ZNS vorhanden. Im Laufe der Infektion nahm ihre Zahl minimal zu, wobei sie in auffälliger Form lediglich zum Zeitpunkt 60dpi und in Assoziation zu den gefundenen ZNS Läsionen auftraten.

Um auf die Ausgangsfrage zurückzukommen, lässt sich somit resümieren, dass es ein organspezifisches Verhalten der CD4<sup>+</sup> Lymphozyten im Kontext der murinen Kryptokokkose gibt.

Die Expression des IL-4R $\alpha$  ist eine essentielle Voraussetzung für die IL-4 und IL-13 vermittelte alternative M2-Polarisierung von Makrophagen [23].

Neben dem von Müller et al. gezeigten Gendosiseffekt bei homo- und heterozygoten IL-4R $\alpha$ <sup>(+/-)</sup> knock-out Mäusen, unterstreichen neueste Arbeiten von Grahnert et al. die zentrale Rolle des IL-4R $\alpha$  in der Bekämpfung von *C. n.* [103]. Unter Verwendung von Mäusen deren T Lymphozyten IL-4R $\alpha$ <sup>(-/-)</sup> waren, konnten sie zeigen, dass die IL-4R $\alpha$ <sup>(-/-)</sup> knock-out Mäuse zu Beginn des Untersuchungszeitraumes (7dpi) geringere Pilzlasten in den Lunge zeigten, als die mit ihnen verglichenen Wildtyp Mäuse [104]. Diese vom Untersuchungszeitpunkt und den jeweils involvierten Zellen abhängigen Unterschiede in der IL-4R $\alpha$  Wirkung im Kontext einer *C. n.* Infektion ergab eine spannende und hier



bearbeitete Fragestellung. Wird, und wenn ja wie, die Expression des IL-4R $\alpha$  auf den IL-4R $\alpha$  tragenden Zellen (Mikrogliazellen, Makrophagen und T Lymphozyten) im Verlauf der Erkrankung reguliert?

Es zeigte sich, dass pulmonale Makrophagen im naiven Zustand den IL-4R $\alpha$  exprimierten und dessen Expression im Verlauf der Infektion stetig zunahm.

Bei den pulmonalen CD4<sup>+</sup> Lymphozyten zeigte sich ebenfalls eine IL-4R $\alpha$  Expression im nicht infizierten Zustand, die jedoch im Gegensatz zu den pulmonalen Makrophagen bereits 20 Tage p.i. ihren Höhepunkt fand. Diese frühe Expression kann im Sinne einer frühen Interaktion von CD4<sup>+</sup> Lymphozyten und Makrophagen interpretiert werden, die die darauffolgende alternative Aktivierung von Makrophagen bahnt. Diese frühe Expression des IL-4R $\alpha$  auf pulmonalen Lymphozyten und Makrophagen stellt eine *bis dato* nicht beschriebene Beobachtung dar.

Die zentralnervösen Mikrogliazellen und Makrophagen zeigten in ihrer Expression des IL-4R $\alpha$  ein analoges Verhalten zu den pulmonalen CD4<sup>+</sup> Lymphozyten. Dies kann möglicherweise als eine organübergreifende Interaktion interpretiert werden, was die Idee des sogenannten „sensings“ nahelegt. Der „sensing“-Theorie zufolge spüren zentralnervöse Makrophagen die systemische Anwesenheit eines Erregers und reagieren auf diesen, ohne, dass *bis dato* eine Infektion des zentralen Nervensystems stattgefunden hat. Im Kapitel 5.6 der Diskussion wird die Theorie des zerebralen „sensings“ als auch die involvierten Zellen weiter beleuchtet.

Wenngleich in der vorliegenden Arbeit nicht der Einfluss eines einzelnen Faktors im Rahmen der Kryptokokkose anhand von knock-out Mäusen untersucht wurde, so wurde der gesamte Infektionsverlauf im Hinblick auf den Immunphänotyp im Sinne einer TH1 und TH2 Antwort beleuchtet. Diesbezüglich kann zusammenfassend festgehalten werden, dass es im Rahmen der Kryptokokkose interessanterweise zur Ausbildung einer pulmonalen TH1, als auch einer TH2 Antwort kommt.

Was die Organspezifität angeht, kann festgehalten werden, dass auch im ZNS sowohl eine TH1 als auch eine TH2 Antwort angestoßen wird. Diese ist jedoch quantitativ deutlich geringer ausgeprägt und verhält sich auch qualitativ different zur Lunge.

Mit anderen Worten stellt sich die Frage, ob ein gleichzeitiges Ausbilden einer TH1 und TH2 Antwort zur spezifischen Pathogenese des verwendeten Modells beiträgt. Möglicherweise ist die kräftige Ausbildung einer TH1 Antwort in den Modellen anderer

Wissenschaftler nicht als Teil des Abwehrmechanismus des Immunsystems, sondern als modellimmanente Eigenschaft und als Folge des differenten Stammes, der Applikationsform und der administrierten Kryptokokkendosis zu werten. Interessant wäre es daher diese Aspekte in zukünftigen Arbeiten zu untersuchen, indem beispielsweise mit mehreren, verschiedenen Kryptokokkenstämmen infiziert und anschließend verglichen wird.

## **5.2 Morphologische, funktionelle und molekulare Charakteristika von Makrophagen des ZNS im Vergleich zu pulmonalen Makrophagen in Abhängigkeit vom Untersuchungszeitpunkt**

Hier stellte sich die Frage, ob Makrophagen, die im Kontext der Infektion mit *C. n.* ins ZNS eingewandert sind, grundsätzlich andere Eigenschaften aufweisen, als Makrophagen die in die Lunge rekrutiert werden.

Bekanntermaßen haben einige Organe ein organspezifisches („innate“) Immunsystem. Hierzu zählen Alveolarmakrophagen in der Lunge, Mikrogliazellen und Plexusmakrophagen im ZNS, aber beispielsweise auch Kupffer-Sternzellen der Leber.

Aufgrund der Sonderstellung des ZNS als „immunprivilegiertes“ Organ mit anatomisch besonders dichten Grenzen (Blut-Hirn-Schranke), lag der Vergleich mit der Lunge, einem immunologisch betrachtet „offenen“ Organ nahe.

Anhand meiner Ergebnisse konnten ich zeigen, dass die residenten Makrophagen der Lunge (Alveolarmakrophagen) bereits in nicht infizierten Lungen einen leichten M2-Phänotyp in Form einer Immunreaktivität für CD206 und Arg-1, als auch einer basalen Expression entsprechender Moleküle auf mRNA Ebene zeigten.

Andererseits wiesen die Alveolarmakrophagen auf immunhistochemischer Ebene keine Immunreaktivität für iNOS auf, jedoch zeigte sich auf mRNA Ebene eine gewisse iNOS Expression, dessen genaue zelluläre Herkunft noch unklar ist. Erwartungsgemäß anders stellten sich die residenten Mikrogliazellen des ZNS in nicht infizierten Gehirnen dar. Sie zeigten keinerlei Immunreaktivität für Marker der Makrophagenpolarisierung. Dies ist im Einklang mit früheren Arbeiten aus der eigenen Arbeitsgruppe [76], wobei in diesen Arbeiten nur der Zeitpunkt 60dpi untersucht wurde. Auf mRNA Ebene zeigte sich jedoch eine basale Produktion des M1-Enzyms iNOS in nicht infizierten Gehirnen.

Interessant erscheint in diesem Kontext, dass die residenten Plexusmakrophagen bereits in nicht infizierten Gehirnen eine Immunreaktivität für den M2-Marker Arg-1 zeigten. Sie zeigten weder in der naiven Situation, noch im Verlauf der Infektion eine

Immunreaktivität für andere Marker der Makrophagenpolarisierung. Alveolarmakrophagen zeigten im Verlauf der Infektion ebenfalls vor allem eine steigende Immunreaktivität für Arg-1. Für andere Marker der Makrophagenpolarisierung waren sie kaum immunreaktiv.

Somit zeigten die residenten Plexusmakrophagen des ZNS einen ähnlichen Immunphänotyp wie die residenten Alveolarmakrophagen der Lunge, der vor allem durch ihre Immunreaktivität für Arg-1 charakterisiert war.

Anders verhielten sich dahingegen die bereits rein morphologisch deutlich größeren schaumzelligen Makrophagen in der Lunge. Sie zeigten vor allem eine bis zum Tag 60 p.i. ansteigende Immunreaktivität für CD206, jedoch nicht für Arg-1. Interessanterweise zeigten sie zusätzlich eine steigende Immunreaktivität für das M1-Enzym iNOS beginnend ab dem Zeitpunkt 40dpi.

Kritisch angemerkt sei an dieser Stelle, dass in dieser Arbeit formal nicht bewiesen wurde, dass es sich bei den schaumzellig imponierenden Makrophagen tatsächlich um aus dem peripheren Blut bzw. dem Knochenmark rekrutierte Zellen handelt. Theoretisch könnte es sich auch um transformierte Alveolarmakrophagen handeln.

Die Reaktion der zerebralen Makrophagen und Mikrogliazellen auf die Infektion mit *C. n.* unterschied sich deutlich von der beschriebenen Reaktion der pulmonalen Makrophagen.

Mikrogliazellen zeigten im gesamten Verlauf der Infektion keine Immunreaktivität für den M1-Marker iNOS und die M2-Marker CD206 oder Arg-1. Dies bestätigt frühere Experimente aus der eigenen Arbeitsgruppe, welche ebenfalls unter Verwendung des gleichen murinen Infektionsmodells immunhistochemisch keine alternative M2-Aktivierung von Mikrogliazellen an Tag 60 p.i. zeigen konnten [76]. Nichtsdestotrotz zeigten die Mikrogliazellen in der unmittelbaren Umgebung der zerebralen Kryptokokkenläsionen einen aktivierten Phänotyp in Form einer vermehrten Immunreaktivität für MHC class II. Auf mRNA Ebene zeigte sich interessanterweise sowohl für iNOS, COX-2 auf der einen und CD206 und Arg-1 auf der anderen Seite eine schwache basale Expression.

Interessant erscheinen in diesem Zusammenhang, Experimente von Colton et al. die eine etablierte Mikrogliazellkultur (BV2) mit Mediatoren der TH1/TH2 Immunantwort,

respektive IFN- $\gamma$ , IL-4 und IL-13 stimulierten. Anschließend maßen sie die Expression von Genen der M1- (*Tnfa* und *Nos2*) und M2-Polarisierung (*Arg1*, *Mrc1*, *Fizz* und *Ym1*) mittels qPCR. Sie konnten zeigen, dass die jeweilige Expression der Gene, die einer M1-Polarisation zugeschrieben werden, durch Stimulation mit IFN- $\gamma$  und die Expression der Gene, die einer M2-Polarisation zugeschrieben werden, durch die separate Stimulation mit IL-4 und IL-13 gesteigert wurde. Daraus schlossen sie, dass Mikrogliazellen im Prinzip in der Lage sind einen alternativ aktivierten M2-Phänotyp *in vitro* anzunehmen [105]. Dies steht auf den ersten Blick nicht im Einklang mit den hier präsentierten Ergebnissen. Jedoch muss dabei bedacht werden, dass die Experimente von Colton et al. lediglich auf Analyse von Mikrogliazellen in Kultur (*in vitro*) beruhen. Da in der vorliegenden Arbeit ein murines *in vivo* Infektionsmodell verwendet wurde, könnten die Unterschiede zu den von Colton et al. als prinzipiell alternativ aktivierbar eingestuft Mikrogliazellen und den in dieser Arbeit *de facto* nicht alternativ aktivierten Mikrogliazellen mehrere Ursachen haben. Einerseits unterscheidet sich das lokale Milieu der von Colton et al. eingesetzten Mikrogliazellkultur deutlich vom komplexen Immunsystem eines murinen *in vivo* Modells. Lokale und systemische Faktoren des murinen Immunsystems, welchen in einer Zellkultur nicht Rechnung getragen werden kann, beeinflussen das zerebrale Milieu der hier untersuchten Gehirne. Andererseits könnte das Ausbleiben einer alternativen M2-Polarisierung von Mikrogliazellen auch eine spezifische Eigenschaft des *C. n.* Infektionsmodells bzw. der speziellen Pathologie der Kryptokokkose sein. Eine prinzipielle Aktivierbarkeit konnte jedoch ebenfalls in dieser Arbeit gezeigt werden: Post-isolations FACS Analysen zeigten einen Anstieg der IL-4R $\alpha$  Expression auf Mikrogliazellen, als Voraussetzung für die alternative M2-Aktivierung via IL-4, bereits ab Tag 20 p.i. (siehe Ergebnisse 4.10.5).

Betrachtet man jedoch die eigentlichen Läsionen, so sind Mikrogliazellen kaum direkt involviert. In Anlehnung an die bereits bekannten Läsionsformen in der humanen Situation finden sich in der Maus ähnliche Läsionsformen (attenuierte intraparenchymatöse-, granulomatöse intraparenchymatöse- und inflammatorische meningeale Läsionen). Lediglich die granulomatösen intraparenchymatösen und die meningealen Läsionen imponierten mit, morphologisch von den Mikrogliazellen deutlich differierenden, rekrutierten schaumzelligen Makrophagen.

Diese schaumzelligen Makrophagen des ZNS traten im Zusammenhang mit den Läsionen erst zum Zeitpunkt 60dpi auf und zeigten eine kräftige Immunreaktivität für

den M2-Marker CD206. Anders als die ihnen morphologisch sehr ähnlichen pulmonalen schaumzelligen Makrophagen zeigten die Makrophagen des ZNS keine Immunreaktivität für den M1-Marker iNOS. Dies deckt sich mit früheren Arbeiten der eigenen Arbeitsgruppe, die histomorphologisch unter der Verwendung des gleichen murinen Infektionsmodells ebenfalls keine klassische (M1-), sondern lediglich eine alternative (M2-)Aktivierung zerebraler Makrophagen im ZNS zum Zeitpunkt 60dpi zeigen konnten [76].

An dieser Stelle möchte ich kurz auf die Relevanz der, mittels eines prinzipiell Vor- und Nachteils behafteten murinen Modells, erhobenen Ergebnisse hinweisen. Bekannt ist aus der humanen Situation, dass insbesondere bei HIV<sup>+</sup> Patienten die erwähnten Immunreaktionen verschiedener Aktivität, mit den entsprechenden morphologisch differenteren Läsionen stattfinden.

Die von mir erhobenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Immunphänotyp im Parenchym durch eine stark attenuierte Immunantwort charakterisiert ist. Dies ermöglicht dem Erreger *C. n.* ein nahezu ungehindertes Wachstum im Parenchym und führt zu konfluierenden attenuierten Läsionen, in welchen der Erreger nicht effektiv bekämpft wird (siehe Abbildung 81).

Dieses Phänomen, dass ein Erreger das Immunsystem zu seinem Vorteil moduliert, ist bereits von anderen Erregern wie *Leishmania major*, *Toxoplasma gondii*, *Yersinia spp.* und Mykobakterien bekannt [106-108]. Das Phänomen der potentiellen Immunmodulation durch *C. n.* eröffnet interessante Aspekte für weitere Experimente. Es könnten Kryptokokkenläsionen aus den infizierten Gehirnen und Lungen entnommen werden und in einer *in vitro* Kultur, mit peripheren Blutmakrophagen, kombiniert mit jeweils Alveolarmakrophagen oder Mikrogliazellen, kultiviert werden. Analysiert man die Immunsignatur der jeweiligen Kultur, könnte eine Aussage über die organspezifische Manipulation des lokalen Milieus oder gar des Immunsystems durch *C. n.* getroffen werden. Ein tieferes Verständnis dieser Mechanismen würde interessante Ziele zukünftiger Therapien bieten. Im besten Falle würde ein therapeutisches Eingreifen, beispielsweise medikamentöser Natur, das Immunsystem dazu befähigen die, *bis dato* unbehandelt meist letal verlaufende, zerebrale Kryptokokkose effektiver zu bekämpfen.

Betrachtet man weiterhin die residenten Monozyten der infizierten Organe genauer, so konnte wie weiter oben bereits erwähnt, in dieser Arbeit auf histomorphologischer

Ebene nachgewiesen werden, dass in den untersuchten Gehirnen lediglich die residenten Plexusmakrophagen Arg-1<sup>+</sup> waren. Intraparenchymatös zeigten sich weder residente Mikrogliazellen noch aktivierte schaumzellige Makrophagen immunreaktiv für Arg-1. Auch die residenten Alveolarmakrophagen der Lunge stellten sich lediglich immunreaktiv für Arg-1 dar.

Es kann somit davon ausgegangen werden, dass die Arg-1 als Teil des Repertoires zur Charakterisierung von M2-polarisierten Makrophagen eine Sonderstellung einnimmt.

Es scheint, als ob lediglich residente Makrophagen der Lunge und des Gehirns eine Immunreaktivität für Arg-1 zeigen. Dies stellt eine *bis dato* nicht bekannte Beobachtung im Kontext der murinen Kryptokokkose dar.

Munder et al. untersuchten 1998 erstmalig die Rolle der Arg-1 im Kontext der Konkurrenz mit iNOS um das gemeinsame Substrat L-Arginin in Makrophagen, unter Nutzung eines *in vitro* Makrophagenkulturmodells. Sie beschrieben die Verschiebung des Gleichgewichts dieser Reaktion anhand eines iNOS/Arg-1 Quotienten, dessen Höhe vom jeweils vorherrschenden TH1/TH2 Immunphänotyp und dessen Mediatoren und Zytokinen abhing [109]. Huffnagle und Arora et al. griffen den iNOS/Arg-1 Quotienten auf und setzten ihn in den Kontext des murinen chronischen Infektionsmodells der Kryptokokkose [43, 59]. Im Detail untersuchten sie murines mit *C. n.* infiziertes Lungengewebe und ermittelten den iNOS/Arg-1 Quotient auf mRNA Ebene mittels qPCR. Da iNOS und Arg-1 als Markerenzyme der M1/M2-Makrophagenpolarisation gelten, leiteten sie aus der Höhe des Quotienten eine Information über den allgemein vorherrschenden Polarisierungszustand von pulmonalen Makrophagen ab. Dies korrelierten sie mit der histologisch mittels einer H&E Färbung analysierten Lungenpathologie. Insbesondere betonten sie hierbei, dass bei höherem iNOS/Arg-1 Quotient die Pilzlast in der Lunge sank und eine mildere Pathologie beobachtet werden konnte. Im Gegensatz zu unseren immunhistologischen Beobachtungen lässt sich anhand dieser auf mRNA Daten beruhenden Quotientenbildung nicht zuordnen, welche Zellen die eigentliche zelluläre Quelle des gemessenen Arg-1 sind. Zwar ist bekannt, dass Makrophagen Arg-1 produzieren, jedoch waren sie nicht in der Lage in ihrem Modell zwischen aktivierten, polarisierten schaumzelligen Makrophagen und residenten Alveolarmakrophagen zu unterscheiden. Dies unterstreicht die Wichtigkeit der hier präsentierten differenzierteren immunhistologischen Ergebnisse, die eindeutig Alveolarmakrophagen als Quelle der

Arg-1 Expression ausmachen. Diese ließen sich nicht nur morphologisch, sondern auch immunhistochemisch klar von den großvolumigen schaumzelligen Makrophagen differenzieren. Somit kann betont werden, dass es schwierig ist allgemeine Aussagen über pulmonale Makrophagen bzw. Makrophagen eines gesamten Organs zu treffen. Gerade im Kontext von Infektionen sind eine Vielzahl verschiedener makrophagozytärer Subpopulationen, mit distinkt unterschiedlichen morphologischen, molekularen und funktionellen Phänotypen, präsent. Diesem Zustand kann nur mit einer differenzierten Charakterisierung einer jeden Subpopulation im Kontext der jeweiligen Pathologie Rechnung getragen werden.

In dieser Arbeit zeigte sich auf mRNA Ebene im ZNS lediglich eine gering ausgeprägte Regulation des M2-Markers Arg-1. STAT6 wurde, komplementär zu IL-13, im Vergleich zur naiven Situation auf etwa das Doppelte reguliert, während CD206 überraschenderweise nicht wesentlich reguliert wurde. Dies steht im Einklang mit bereits durchgeführten früheren Experimenten der eigenen Arbeitsgruppe [76], wo ebenfalls auf mRNA Ebene bei Wildtyp Balb/c Mäusen gezeigt werden konnte, dass es im Kontext der ZNS-Kryptokokkose zu einer lediglich gering ausgeprägten Expressionsregulation von Arg-1 kam. Die Expression von IL-13 wurde ebenfalls untersucht, jedoch zeigte sich bei Stenzel et al. im Gegensatz zu den in dieser Arbeit gemessenen Werten eine geringfügige Senkung der IL-13 Expression. Zu beachten ist jedoch, dass die IL-13 Expression bei Stenzel et al. einer gewissen Streuung unterlag, was möglicherweise auf die bekanntermaßen interindividuell unterschiedliche Schwere der zerebralen Kryptokokkose bei den erkrankten Mäusen zurückzuführen ist.

Zusammenfassend ist also festzuhalten, dass sich die Makrophagen der Lunge und die Makrophagen des ZNS im Kontext der *C. n.* Infektion in morphologischer Hinsicht ähnlich verhielten. Beide Organe rekrutierten als Reaktion auf die Infektion mit *C. n.* Makrophagen, die wahrscheinlich lokal (nach Phagozytose) schaumzellig und großvolumig wurden (u.a. wegen der lipidhaltigen Schleimkapsel der phagozytierten Erreger).

Funktionell unterschieden sich diese großvolumigen Makrophagen des Gehirns jedoch sehr von denen der Lunge. Das ZNS zeigte insgesamt einen immunologisch eher „attenuierten“ Phänotyp, welcher in den „areaktiv“ erscheinenden intraparenchymatösen Läsionen stark attenuiert und in den granulomatösen und meningealen Läsionen

lediglich leicht attenuiert war. Die großvolumigen Makrophagen der meningealen und granulomatösen Läsion zeigten eine kräftige M2-, jedoch keine M1-Polarisierung. Die großvolumigen Makrophagenpopulationen der Lunge zeigten dahingegen je einen immunologisch kräftig ausgebildeten M1- oder M2-Phänotyp.

Ruft man sich die Fähigkeiten von M1- und M2-polarisierten Makrophagen ins Gedächtnis, so ist zu beachten, dass lediglich M1-polarisierte Makrophagen in der Lage sind, substantielle Mengen ROS zu bilden. Da M1-polarisierte Makrophagen in den durch *C. n.* infizierten Gehirnen nicht vorhanden waren, fehlte dem ZNS dieser höchst effektive Abwehrmechanismus. Da *C. n.* des Weiteren in der Lage ist intrazellulär in Makrophagen zu überleben, ist auch die Phagozytose als weitere Waffe aus dem Arsenal der makrophagozytären Abwehr im Kontext der ZNS-Kryptokokkose erfolglos.

Interessant erscheinen in diesem Zusammenhang, die Experimente von Herbert et al.. Hierbei wurden knock-out Mäuse auf dem Balb/c Hintergrund verwendet, bei denen selektiv auf Makrophagen und Neutrophilen der IL-4R $\alpha$  ausgeschaltet wurde (konditionaler knock-out). Im Kontext der ebenfalls granulomatös verlaufenden Schistosomiasis wurde der Krankheitsverlauf, als auch die makrophagozytäre Polarisation untersucht. Aufgrund des Fehlens des IL-4R $\alpha$  auf Makrophagen, kam es nicht zur Ausbildung von alternativ aktivierten M2-Makrophagen, sondern lediglich zur Ausbildung von iNOS<sup>+</sup> M1-Makrophagen. Im Gegensatz zur Kryptokokkose, wo ein Ausschalten des IL-4R $\alpha$  protektiv wirkte, war dies im Kontext der akuten Schistosomiasis mit einer deutlich schwereren Pathologie und einer signifikant erhöhten Sterberate assoziiert. In diesem Kontext scheinen M2-polarisierte Makrophagen eine protektive immunregulierende Funktion innezuhaben, die notwendig ist um die akute Schistosomiasis zu überleben [85].

Hölscher et al. verwendeten ebenfalls das Modell von Herbert et al. bei welchem der IL-4R $\alpha$  selektiv auf Makrophagen und Neutrophilen ausgeschaltet wurde, jedoch im Kontext der kutanen Leishmaniose. In diesem Zusammenhang zeigte sich wiederum eine vorteilhafte Rolle von M1-polarisierten Makrophagen im Sinne einer verzögerten Krankheitsprogression. Weiterhin zeigte sich eine negative Rolle von M2-polarisierten Makrophagen im Sinne einer verringerten NO Produktion mit konsekutiv verringerter „leishmanizider“ Potenz dieser M2-polarisierten Makrophagen [110].

Insgesamt zeigt dies, dass den M1/M2-Makrophagen nicht *per se* eine günstige oder ungünstige Rolle im Kontext von Erkrankungen zugeschrieben werden kann. Vielmehr müssen die distinkten Fähigkeiten dieser Makrophagen im Kontext der jeweils höchst



unterschiedlichen Pathophysiologie einer Erkrankung betrachtet werden. Nur so ist es möglich, mittels potentieller Beeinflussung der Makrophagenpolarisation den Krankheitsverlauf wirklich günstig zu beeinflussen.

Alles in Allem konnten alle drei Teilaspekte der aufgestellten Hypothese beleuchtet werden. Morphologisch ähneln zentralnervöse und pulmonale schaumzellige Makrophagen sich stark. Auf funktioneller und molekularer Ebene unterscheiden sich pulmonale schaumzellige Makrophagen jedoch deutlich von den zerebralen schaumzelligen Makrophagen, Mikroglia und Plexusmakrophagen. Diese Unterschiede waren weiterhin eindeutig abhängig vom beobachteten Zeitpunkt.

### **5.3 Bilden Makrophagen im Kontext der pulmonalen Kryptokokkose in Abhängigkeit zum Zeitpunkt der Infektion polyfunktionale Phänotypen aus?**

Seit einigen Jahren ist durch Arbeiten von verschiedenen Wissenschaftlern wie Martinez, Gordon, Helming und Mantovani et al. [23, 44, 111, 112] bekannt, dass es sich bei der Makrophagenpolarisierung und der Ausbildung ihrer verschiedenen Phänotypen nicht um statische Zustände, sondern um hochdynamische Prozesse handelt [43, 113]. Diesbezüglich konnten die Wissenschaftler um Arora et al. [43] anhand von Makrophagenkulturen *in vitro* zeigen, dass es bei simultaner Stimulation mittels IFN- $\gamma$  und IL-4 (also Stimuli der M1- und M2-Polarisation) zur Ausbildung von polyfunktionalen Makrophagen kam. Diese Makrophagen stellten sich als Arg-1<sup>+</sup> und iNOS<sup>+</sup> dar und wiesen somit gleichzeitig Eigenschaften der M1- und M2-Polarisation auf.

In der vorliegenden Arbeit wurden die gewonnenen Erkenntnisse auf ein *in vivo* Infektionsmodell übertragen. Es stellte sich die Frage, ob es im Kontext der pulmonalen Kryptokokkose Phasen im Verlauf der Infektion gibt, in welchen die Makrophagen einen polyfunktionalen Phänotyp annehmen.

Mittels Immunhistochemie konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sich pulmonale schaumzellige Makrophagen 20 Tage p.i. positiv für Marker der M2-Polarisierung (hier CD206) zeigten. Beginnend an Tag 40 p.i. stellten sich ebenfalls schaumzellige Makrophagen als iNOS<sup>+</sup> und somit M1-polarisiert dar. Morphologisch ließen sich die iNOS<sup>+</sup> Zellen jedoch nicht eindeutig von den CD206<sup>+</sup> Zellen differenzieren. Um eine Aussage treffen zu können, ob es sich hierbei um zwei morphologisch ähnliche Subpopulationen dieser schaumzelligen Makrophagen oder gar um eine einzige

polyfunktionale Population handelt, wurden Doppelimmunfluoreszenzfärbungen von konsekutiven Schnitten infizierter Lungen angefertigt. Hierbei wurden je ein Marker der Makrophagenpolarisierung (iNOS für M1 und CD206 für M2) co-lokalisiert.

Es zeigte sich, dass zwar Marker beider Polarisierungen (M1 und M2) von schaumzelligen Makrophagen exprimiert wurden, jedoch handelte es sich hierbei nicht um eine einzige polyfunktionelle Population, sondern um funktionell distinkte Subpopulationen dieser morphologisch ähnlichen Makrophagen.

Um diese Aussage jedoch absolut zweifelsfrei beantworten zu können, wurden zusätzliche Experimente mit Dreifachimmunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Es wurde versucht einen Makrophagenmarker (hier CD11b) gleichzeitig mit einem Marker der M1- (hier iNOS) und der M2-Polarisierung (hier CD206) zu co-lokalisieren. Leider stellte sich dies als technisch äußerst schwierig dar aufgrund der Tatsache, dass die verwendeten Antikörper zum Teil aus der selben Tierspezies gewonnen wurden und andere Alternativen nicht das gewünschte Färbeergebnis lieferten. Daher konnten diese Färbungen nicht im Rahmen dieser Arbeit realisiert werden.

Nachdem in dieser Arbeit *in vivo* keine polyfunktionalen schaumzelligen Makrophagen, sondern distinkte, wahrscheinlich monofunktionelle Subpopulationen im Kontext der Kryptokokkose beobachtet werden konnten, stellte sich natürlich die Frage nach den genauen Mechanismen ihrer Phänotypveränderung, ihrer Herkunft sowie nach ihrer konkreten biologischen Funktion.

Im Hinblick auf die dynamischen Veränderung des Phänotyps von Makrophagen im Verlauf einer Infektion, dem Ausbilden eines polyfunktionalen Phänotyps oder mehrerer wahrscheinlich monofunktionaler Subpopulationen sind mehrere Möglichkeiten denkbar. Einerseits könnte in den vorhandenen und bereits polarisierten Makrophagen eine Umprogrammierung stattfinden, die zur Ausbildung eines anderen Phänotyps führt. Andererseits wäre es denkbar, dass die vorhandene, bereits polarisierte Makrophagenpopulation, untergeht und durch eine neue Makrophagenpopulation mit entsprechend veränderter Polarisierung ersetzt wird [114].

Bezüglich der Herkunft dieser Makrophagen ist *bis dato* unklar, ob es sich dabei um residente Makrophagen oder um rekrutierte Makrophagen handelt.

Dieser Frage ließe sich mit Mausmodellen unter der Verwendung von Knochenmarkschimären nachgehen, um die genaue zelluläre Herkunft dieser Makrophagen zu beleuchten.

Nicht zuletzt stellt sich die Frage nach der Funktion dieser Phänotypveränderungen im Verlauf der Kryptokokkose. Da den jeweiligen Polarisierungen der Makrophagen distinkte Funktionen zugeschrieben werden [29, 43, 56, 59, 74, 76, 84, 113], wäre es denkbar, dass die frühe Lungenkryptokokkose mit einer noch sehr geringen Erregerlast lediglich M2-polarisierte Makrophagen benötigt, um die *bis dato* geringen strukturellen Schäden zu reparieren. Nimmt die Erregerlast im Verlauf der Infektion zu, kommt es einerseits zu schweren strukturellen pulmonalen Schäden mit großen Gewebnekrosen und andererseits zu einer Dissemination in eine Vielzahl von Organen. So wäre es möglich, dass erst diese schweren lokalen, als auch systemischen Schäden auftreten müssen, damit das Immunsystem die Notwendigkeit sieht, M1-polarisierte Makrophagen auszubilden. Hierbei ist zu bedenken, dass M1-polarisierte Makrophagen durch ihre charakteristischen reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zwar stark mikrobizide Eigenschaften haben, jedoch auch das gesunde umliegende Gewebe schädigen können. Somit muss höchstwahrscheinlich der durch diese Zellen verursachte Schaden gegen ihren Nutzen abgewogen werden.

Insgesamt ergeben sich eine Vielzahl neuer Fragen bezüglich der genauen Herkunft der polarisierten Makrophagen, als auch bezüglich der genauen Mechanismen der Veränderung ihres Phänotyps und nichtzuletzt bezüglich der biologischen Funktion ihrer Phänotypveränderungen. Dies eröffnet eine Reihe von Perspektiven für zukünftige Experimente, um die biologische Funktion von Makrophagen besser verstehen zu können und sie basierend darauf sogar als Ziel zukünftiger Therapien zu verwenden. Dies erscheint äußerst attraktiv, da bereits aus verschiedenen Arbeiten bekannt ist, dass eine M2-Polarisierung einen schwereren Verlauf der Kryptokokkose begünstigt [74, 76]. Eine Verhinderung dieser Polarisierung könnte somit den Verlauf der humanen Kryptokokkose günstig beeinflussen.

#### **5.4 Findet eine Riesenzellformation im Kontext des murinen Kryptokokkose Modells in Abhängigkeit zum Zeitpunkt der Infektion und zum infizierten Organ statt?**

Mittels muriner Modelle der Kryptokokkose konnte von Wissenschaftlern um Schneerson-Porat et al. [115] aus den 1960er und Hill et al. [37] aus den 1990er Jahren gezeigt werden, dass es im Kontext einer chronischen pulmonalen Infektion mit *C. n.* zu einer Granulomformation mit der Ausbildung von Riesenzellen kommt. Hill et al.

verwendete hierzu Balb/c, C.B-17/Smn und C.B-17-*scid/scid* Mäuse und infizierte diese intratracheal mit *C. n.*. Mittels bronchoalveolärer Lavage wurden im Verlauf der Infektion Lungenzellen gewonnen und analysiert. Weiterhin wurden immunhistochemische Färbungen der entnommenen Lungen angefertigt und analysiert. Hierbei konnten mehrkernige Riesenzellen in der Lavage, als auch histomorphologisch in Assoziation zu Granulomen bei Balb/c, nicht jedoch bei C.B-17-*scid/scid* und CD4<sup>+</sup> Lymphozyten defizienten Mäusen beobachtet werden [37]. Dies zeigte, dass die Ausbildung mehrkernigen Riesenzellen abhängig von CD4<sup>+</sup> Lymphozyten war.

Hieraus erwuchs die Frage, ob es in dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Modell, welches hinsichtlich des Applikationsweges, des speziellen Pilzstammes und des Beobachtungszeitraums vom Experiment von Hill et al. differiert, ebenfalls zur Ausbildung pulmonaler oder gar zerebraler Riesenzellen kommt. Weiterhin stellte sich die Frage nach den funktionellen Eigenschaften dieser Riesenzellen, den molekularen Mechanismen ihrer Fusion, als auch ihrer biologischen Funktion.

Hierzu wurden immunhistologische Färbungen der mit *C. n.* infizierten Gehirne und Lungen im Verlauf der Infektion angefertigt und analysiert.

Hierbei zeigte sich interessanterweise, dass die Granulomformation in den infizierten Lungen bereits 40 Tage p.i. auftrat, jedoch waren mehrkernige Riesenzellen erst 60 Tage p.i. zu identifizieren.

Gänzlich anders stellte sich die Situation in den untersuchten Gehirnen dar. Sogar die Gehirne die eine morphologisch eindeutig granulomatöse Läsion aufwiesen, zeigten zu keinem Zeitpunkt eine Riesenzellformation.

In zukünftigen Experimenten bleibt zu klären, ob im Kontext der *C. n.* Infektion im zentralen Nervensystem generell lediglich eine Granulomformation und keine Makrophagenfusion stattfindet, wie dies in dieser Arbeit der Fall war. Denkbar wäre auch, dass die der Granulomformation folgende Makrophagenfusion analog zur Lunge einige Wochen in Anspruch nimmt und somit außerhalb des Beobachtungszeitraums lag. Um dies zu eruieren, könnte das gleiche Infektionsmodell wie in dieser Arbeit verwendet werden, jedoch mit einer Verlängerung des Beobachtungszeitraums über 60 Tage hinaus. Da die Tiere im verwendeten Modell der vorliegenden Arbeit beginnend ab Tag 60 p.i. schwer asphyktisch werden und ihre Mortalität ab diesem Zeitpunkt deutlich steigt, wurde aus ethischen und tierschutzrechtlichen Gründen davon

abgesehen, den Beobachtungszeitraum zu elongieren. In der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Alber (Institut für Immunologie, Leipzig, Deutschland) der seit Jahren ein Kooperationspartner unserer Arbeitsgruppe ist, wurden in ca. 10 Jahren intensiver Kryptokokkusforschung nie Riesenzellen in den zerebralen Granulomen infizierter Mäuse gefunden. Dies war insbesondere auch nicht der Fall, wenn ein deutlich späterer Zeitpunkt des Infektionsmodells analysiert wurde (bis zu 120 Tage p.i.). Kritisch anzumerken sei hierbei jedoch, dass in der humanen zerebralen Kryptokokkose durchaus Riesenzellen in den Meningen beschrieben wurden und dass die Pathologie somit nicht nur abhängig von dem infizierenden Pilzstamm, sondern auch der infizierten Spezies ist.

Über die morphologische Beobachtung des Auftretens von Riesenzellen hinaus, konnten Wissenschaftler wie Gordon und Helming et al. [39] wichtige molekulare Mechanismen, die dem Prozess der Makrophagenfusionskompetenz, Zell-Zelladhäsion und der eigentlichen Makrophagenfusion zu Grunde liegen, identifizieren. Hierbei zeigte sich, dass IL-4 und IL-13 [41] als Initiatoren des mehrstufigen Prozesses unerlässlich sind. Diese stoßen eine durch STAT6 [116] vermittelte intrazelluläre Signalkaskade an, die zur Präsentation von DAP12 [117] und des Adaptermoleküls von DAP12, TREM2 [118, 119], auf der Oberfläche von Makrophagen und letztlich zu ihrer Fusion führt. Der Prozess der Makrophagenfusion, als auch der Prozess der M2-Makrophagenpolarisation haben gemeinsame molekulare Mechanismen, wie die Initiation durch IL-4 und IL-13, als auch die intrazelluläre Vermittlung durch STAT6.

Die Ausbildung eines fusionskompetenten Zustandes mit subsequenter Fusion in Form von mehrkernigen Riesenzellen ist ein Vorgang, der physiologisch, aber auch im Kontext verschiedenster Pathologien, auftritt.

Erstmalig wurden mehrkernige Riesenzellen vom Langhanstyp im Kontext der Granulomformation bei pulmonaler Tuberkulose beschrieben [120, 121]. Auch im Kontext vieler parasitärer Erkrankungen, wie beispielsweise der Schistosomiasis, konnten Riesenzellen beschrieben werden [120]. Interessant ist hierbei, dass beide genannten infektiösen Erkrankungen, wie auch die Kryptokokkose, das ZNS betreffen können.

Weiterhin konnten Riesenzellen auch im Kontext nicht-infektiöser Erkrankungen wie der Histiozytose X [122, 123], der Sarkoidose [120], als auch der Fremdkörpergranulomreaktion [120, 124, 125], identifiziert werden.

Ein Beispiel für die physiologischerweise notwendige Fusion von Makrophagen sind Osteoklasten. Diese stellen einen essentiellen Bestandteil des kontinuierlich stattfindenden und dynamischen Knochenauf- und -abbaus dar. Eine Unterfunktion dieser Osteoklasten kann einerseits zu Osteopetrose und eine Überfunktion zu Osteoporose führen [39].

Insgesamt erwuchs hieraus einerseits die Frage nach dem funktionellen und molekularen Phänotyp, der im Kontext der *C. n.* Infektion beobachteten mehrkernigen Riesenzellen. Andererseits stellt sich die Frage, welche Mechanismen entscheiden, ob es nach Stimulation via IL-4 bzw. IL-13 entweder zur Ausbildung einer Fusionskompetenz des Makrophagen mit konsekutiver Riesenzellformation oder zur M2-Polarisierung des Makrophagen kommt.

Zur Beantwortung des funktionellen Teilaspektes wurden neben konventioneller Immunhistologie auch Doppelimmunfluoreszenzfärbungen von infizierten murinen Lungen angefertigt.

Es zeigte sich, dass die pulmonalen Riesenzellen trotz der mittels IL-4 und IL-13 gesteuerten Fusion nicht nur immunreaktiv für Marker der M2-Polarisierung wie CD206 waren, sondern auch für Marker der M1-Polarisierung wie iNOS. Um zu klären, ob es sich hierbei um verschiedene Subpopulationen von Riesenzellen handelt, wurden Doppelimmunfluoreszenzfärbungen von konsekutiven Gewebeschnitten angefertigt, bei denen je DAP12 als ein Marker der makrophagozytären Fusionskompetenz mit einem Marker der M1- (hier iNOS) und M2-Polarisierung (hier CD206) co-lokalisiert wurde.

Es konnte erstmalig gezeigt werden, dass die untersuchten pulmonalen Riesenzellen polyfunktional waren, da sie gleichzeitig Marker der M1-, als auch der M2-Polarisierung exprimierten. Dass diese Polyfunktionalität lediglich bei Riesenzellen, nicht jedoch bei mononukleären, schaumzelligen Makrophagen auftrat, unterstreicht noch einmal die Sonderstellung, die mehrkernige Riesenzellen im Kontext der Kryptokokkose einnehmen.

Um die molekularen Mechanismen der Riesenzellformation zu analysieren, wurde eine q-PCR eingesetzt und DAP12 und TREM2 als Marker der makrophagozytären Fusionskompetenz in infizierten Lungen und Gehirnen untersucht.

Es zeigte sich, dass es bereits in nicht infizierten Lungen eine basale Expression von DAP12 und TREM2 gab. Diese nahm im Verlauf deutlich zu und war besonders kräftig zum Zeitpunkt 60dpi. Die Makrophagen wiesen somit alle Voraussetzungen zur Erlangung einer Fusionskompetenz auf. Dies korrelierte mit dem erstmaligen histologischen Auftreten von pulmonalen Riesenzellen zum Zeitpunkt 60dpi.

In den untersuchten Gehirnen zeigte sich ebenfalls eine basale Expression von TREM2 und DAP12. Initial (20dpi) stieg die Expression von TREM2 leicht an, sank jedoch im Verlauf der Infektion wieder ab. DAP12 wurde nahezu nicht reguliert. Dies bedeutet, dass die zerebralen Makrophagen auf mRNA Ebene keine Fusionskompetenz erlangten und somit auch nicht in der Lage waren, Riesenzellen zu bilden. Dies deckte sich mit dem histologisch zu beobachtenden Ausbleiben einer Riesenzellformation im ZNS.

Interessant wäre es hierbei zu eruieren, ob weitere Marker der Makrophagenfusion die für die Zell-Zell-Adhäsion (wie beispielsweise E-Cadherin und  $\beta$ 1-Integrin) [41, 116, 126] und die Reorganisation des Zytoskeletts (wie beispielsweise RAC1) [39, 127] verantwortlich sind, im ZNS ebenfalls nicht oder nur kaum reguliert werden.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass es im Kontext der *C. n.* Infektion zur Ausbildung von pulmonalen, nicht jedoch zerebralen Riesenzellen kam. Dies spiegelte sich auch in der lediglich pulmonal regulierten Expression von molekularen makrophagozytären Fusionskompetenzmarkern wieder. Funktionell wiesen diese pulmonalen Riesenzellen eine Polyfunktionalität im Sinne einer gleichzeitigen Expression von Markern der M1- und M2-Makrophagenpolarisierung auf.

Interessant erscheint hierbei, dass zwar IL-4 zerebral nicht gemessen werden konnte, es jedoch eine signifikante IL-13-, als auch STAT6-Regulation stattfand. Diese beiden Moleküle sind sowohl Teil der Signalkaskade der M2-Makrophagenpolarisierung, als auch Teil des Prozesses der Ausbildung einer makrophagozytären Fusionskompetenz [39, 41, 116].

Daraus lässt sich schließen, dass es *bis dato* unbekannte molekulare Faktoren geben muss, die darüber entscheiden welche Gene von STAT6 transkribiert werden und somit darüber entscheiden, ob ein Makrophag als singuläre Zelle einen M2-Phänotyp ausbildet oder Teil einer mehrkernigen Riesenzelle wird.

In diesem Zusammenhang kam es zwar in den infizierten Gehirnen durch STAT6 zu einer frühzeitigen leichten Regulation von TREM2, dennoch reichte dies offensichtlich zeitlich und/oder bezüglich seiner Konzentration nicht aus, um Makrophagen fusionskompetent werden zu lassen. Die Tatsache, dass diese zerebrale TREM2 Regulation jedoch zu einem Zeitpunkt (20dpi) stattfand, zu welchem mikrobiologisch noch kein Befall des ZNS gemessen werden konnte, untermauert die weiter oben bereits erwähnte Theorie des zerebralen „sensings“. Mit anderen Worten, die zerebralen Makrophagen zeigten molekulare Veränderungen ohne *de facto* mit dem Erreger in Kontakt gekommen zu sein. Sie müssen diesen somit registriert bzw. „gesensed“ haben.

Ob dies eine Fähigkeit einer spezialisierten Subgruppe von zerebralen Makrophagen oder der Gesamtheit der zerebralen Makrophagen ist, ließe sich anhand von weiterführenden Experimenten mit Methoden wie dem FACS-Sorting eruieren. Hierbei könnte die „sensende“ Population von zerebralen Makrophagen mittels ihrer frühzeitig alterierten TREM2 Expression identifiziert und anschließend isoliert werden. Dies würde nicht nur zur Identifikation einer eventuell vorhandenen Subgruppe führen, sondern ließe nach der erfolgten Aussortierung auch eine umfangreiche molekulare Charakterisierung dieser Population zu.

Äußerst interessant wäre es ebenfalls diese „sensende“ zerebrale Makrophagenpopulation den ebenfalls TREM2 exprimierenden, jedoch erfolgreich fusionierten pulmonalen Riesenzellen gegenüberstellen zu können. Da die pulmonalen Riesenzellen anhand ihrer Morphologie identifiziert werden können, wäre es denkbar, diese mittels eines sogenannten Laser-Capture-Mikrodissektionsmikroskops selektiv aus dem zu untersuchenden infizierten Lungengewebe mit einem Laser herauszuschneiden. Man erhielte somit höchst selektiv pulmonale Riesenzellen, die nun extensiv charakterisiert werden könnten.



## **5.5 Ausblick zur Theorie des zerebralen „sensings“ – dendritische Zellen als Schaltstellen der zerebralen Immunantwort**

Um der komplexen Regulation der Mechanismen des immunologisch privilegierten ZNS Rechenschaft zu tragen, muss der Blick auf die involvierten Zellen erweitert werden.

In den letzten Jahren zeigte sich vermehrt, dass es eine Vielzahl von Mechanismen gibt, um das lokale immunologische Milieu des zentralen Nervensystems aufrecht zu halten. So werden nicht nur im Falle eines Angriffes in Form einer Infektion Immunzellen in das Gehirn rekrutiert, sondern Immunzellen patrouillieren stetig durch das nicht infizierte ZNS und überwachen dieses [128]. Wie wichtig diese Prozesse sind, zeigten Patientenfälle, bei denen eine Unterbrechung der Zelladhäsion an zerebralen Gefäßen, welche den Beginn eines „Patrouillenganges“ im ZNS darstellt, durch das Medikament Natalizumab, in vermehrten Infektionen mit chronischen ZNS Viren wie dem JC-Virus resultierte [129].

Nicht nur die oben erwähnten Makrophagen, sondern insbesondere auch T Lymphozyten spielen hierbei eine entscheidende Rolle und regulieren mit speziellen Sensoren maßgeblich das Mikromilieu des ZNS [130].

Diesem Prozess vorgeschaltet ist jedoch die Aktivierung der naiven T Lymphozyten, als auch die Ausbildung ihrer hoch spezialisierten Phänotypen. Dieser Prozess ist entscheidend an die Interaktion mit APCs (also vor allem die hier untersuchten Populationen der Makrophagen, sowie auch dendritische Zellen) geknüpft. Hier zeigte sich eine Vorreiterrolle der enorm vielseitigen Population von dendritischen Zellen [131-135]. Die dendritischen Zellen als residente APCs des ZNS werden in den perivaskulären Bereichen des ZNS, insbesondere den sog. Virchow-Robin Räumen, vermutet und stellen eine unverzichtbare Schaltstelle in der Regulation von Neuroinflammation dar [128]. Dies zeigt sich u.a. auch durch ihre unmittelbare und starke Zunahme im ZNS im Kontext von Autoimmunität, Infektion und Trauma [136-138].

Weiterhin wird immer klarer, dass eine Vielzahl von bereits eingesetzten Therapien bei Erkrankungen des ZNS dendritische Zellen oder deren Funktion beeinflussen [128]. Ein sehr prominentes Beispiel ist der Einsatz von Kortikosteroiden, aber auch das, erst seit wenigen Jahren im Kontext der multiplen Sklerose eingesetzte, Glatirameracetat. Die Wirkung dieser beiden Medikamente beruht maßgeblich auf der Alteration einer Vielzahl von Ebenen in der Differenzierung, Funktion und Interaktion von dendritischen Zellen [139-143].

Um die Mechanismen des zentralnervösen „sensings“ im Kontext der Kryptokokkose besser zu verstehen, wäre es äußerst interessant basierend auf der vorliegenden Arbeit, auch die Rolle von dendritischen Zellen, deren Funktion und deren Interaktion mit anderen APCs, insbesondere Makrophagen, weiter zu beleuchten. Basierend darauf wäre es denkbar, in Zukunft gezielte und hoch spezifische, medikamentöse Therapien zu entwickeln, um den Verlauf der Kryptokokkose und vor allem deren tödliche Manifestation im ZNS günstig zu beeinflussen. Hiervon könnten die, wie bereits in der Einleitung erwähnt, jährlich 1.000.000 Patienten, die an Kryptokokkenmeningoenzephalitiden erkranken, profitieren und eventuell ein Teil der daraus resultierenden über 600.000 jährlichen Todesfälle verhindert werden [10].

## 6. Literaturverzeichnis

1. Sica, A. and A. Mantovani, *Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas*. J Clin Invest, 2012. **122**(3): p. 787-95.
2. Casadevall, A.P., John R, *Cryptococcus neoformans*. 1998: ASM Press. 542.
3. Garcia-Hermoso, D., et al., *DNA typing suggests pigeon droppings as a source of pathogenic Cryptococcus neoformans serotype D*. J Clin Microbiol, 1997. **35**(10): p. 2683-5.
4. Garcia-Hermoso, D., G. Janbon, and F. Dromer, *Epidemiological evidence for dormant Cryptococcus neoformans infection*. J Clin Microbiol, 1999. **37**(10): p. 3204-9.
5. Dromer, F., O. Ronin, and B. Dupont, *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): p. 395-7.
6. Kidd, S.E., et al., *A rare genotype of Cryptococcus gattii caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada)*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(49): p. 17258-63.
7. Byrnes, E.J., 3rd, et al., *Molecular evidence that the range of the Vancouver Island outbreak of Cryptococcus gattii infection has expanded into the Pacific Northwest in the United States*. J Infect Dis, 2009. **199**(7): p. 1081-6.
8. David Ellison , S.L., Leila Maria Cardao Chimelli , Brian Harding , James S. Lowe , Harry V. Vinters , Sebastian Brandner , William H. Yong, *A Reference Text of CNS Pathology*. 3rd Edition ed. 2012. 879.
9. America, U.S.A., *Revision of the Centers for Disease Control (CDC) Surveillance Case Definition for Acquired Immunodeficiency Syndrome*. morbidity and Mortality Weekly Report, 14.8.1987. **36**(1S): p. 3S-15S.
10. Park, B.J., et al., *Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS*. AIDS, 2009. **23**(4): p. 525-30.
11. WHO, *Revised Global Burden of Disease (GBD) 2002 Estimates*. 2004.
12. Janeway, C.A., Jr. and R. Medzhitov, *Innate immune recognition*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 197-216.
13. Mosmann, T.R., et al., *Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins*. J Immunol, 1986. **136**(7): p. 2348-57.
14. Nakayamada, S., et al., *Helper T cell diversity and plasticity*. Curr Opin Immunol, 2012. **24**(3): p. 297-302.
15. Lichtman, A.H., E.A. Kurt-Jones, and A.K. Abbas, *B-cell stimulatory factor 1 and not interleukin 2 is the autocrine growth factor for some helper T lymphocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(3): p. 824-7.
16. Fitch, F.W., et al., *Differential regulation of murine T lymphocyte subsets*. Annu Rev Immunol, 1993. **11**: p. 29-48.
17. London, C.A., A.K. Abbas, and A. Kelso, *Helper T cell subsets: heterogeneity, functions and development*. Vet Immunol Immunopathol, 1998. **63**(1-2): p. 37-44.
18. Holscher, C., *The power of combinatorial immunology: IL-12 and IL-12-related dimeric cytokines in infectious diseases*. Med Microbiol Immunol, 2004. **193**(1): p. 1-17.
19. Beadling, C. and M.K. Slifka, *Regulation of innate and adaptive immune responses by the related cytokines IL-12, IL-23, and IL-27*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2006. **54**(1): p. 15-24.

20. Ashman, R.B., D. Vijayan, and C.A. Wells, *IL-12 and related cytokines: function and regulatory implications in Candida albicans infection*. Clin Dev Immunol. **2011**: p. 686597.
21. Abul K. Abbas, K.M.M.A.S., *Functional diversity of helper T lymphocytes*. 1996.
22. Kaiko, G.E., et al., *Immunological decision-making: how does the immune system decide to mount a helper T-cell response?* Immunology, 2008. **123**(3): p. 326-38.
23. Stein, M., et al., *Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation*. J Exp Med, 1992. **176**(1): p. 287-92.
24. Anthony, R.M., et al., *Protective immune mechanisms in helminth infection*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(12): p. 975-87.
25. Rausch, S., et al., *A matter of timing: early, not chronic phase intestinal nematode infection restrains control of a concurrent enteric protozoan infection*. Eur J Immunol, 2010. **40**(10): p. 2804-15.
26. Nelms, K., et al., *The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions*. Annu Rev Immunol, 1999. **17**: p. 701-38.
27. Ryan, J.J., et al., *Growth and gene expression are predominantly controlled by distinct regions of the human IL-4 receptor*. Immunity, 1996. **4**(2): p. 123-32.
28. Metchnikoff, I.E., *Immunity in Infective Diseases*. 1905: University Press. 591.
29. Gordon, S. and F.O. Martinez, *Alternative activation of macrophages: mechanism and functions*. Immunity, 2010. **32**(5): p. 593-604.
30. Biswas, S.K. and A. Mantovani, *Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm*. Nat Immunol, 2010. **11**(10): p. 889-96.
31. Sica, A. and V. Bronte, *Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development*. J Clin Invest, 2007. **117**(5): p. 1155-66.
32. Mantovani, A., et al., *Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes*. Trends Immunol, 2002. **23**(11): p. 549-55.
33. Satoh, T., et al., *Critical role of Trib1 in differentiation of tissue-resident M2-like macrophages*, 2013. Nature. **495**(7442): p. 524-8.
34. Qian, B.Z. and J.W. Pollard, *Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis*. Cell, 2010. **141**(1): p. 39-51.
35. Condeelis, J. and J.W. Pollard, *Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis*. Cell, 2006. **124**(2): p. 263-6.
36. Olszewski, M.A., Y. Zhang, and G.B. Huffnagle, *Mechanisms of cryptococcal virulence and persistence*. Future Microbiol, 2010. **5**(8): p. 1269-88.
37. Hill, J.O., *CD4+ T cells cause multinucleated giant cells to form around Cryptococcus neoformans and confine the yeast within the primary site of infection in the respiratory tract*. J Exp Med, 1992. **175**(6): p. 1685-95.
38. Chensue, S.W., et al., *Role of IL-4 and IFN-gamma in Schistosoma mansoni egg-induced hypersensitivity granuloma formation. Orchestration, relative contribution, and relationship to macrophage function*. J Immunol, 1992. **148**(3): p. 900-6.
39. Helming, L. and S. Gordon, *Molecular mediators of macrophage fusion*. Trends Cell Biol, 2009. **19**(10): p. 514-22.
40. Kao, W.J., et al., *Role for interleukin-4 in foreign-body giant cell formation on a poly(etherurethane urea) in vivo*. J Biomed Mater Res, 1995. **29**(10): p. 1267-75.

41. Helming, L. and S. Gordon, *Macrophage fusion induced by IL-4 alternative activation is a multistage process involving multiple target molecules*. Eur J Immunol, 2007. **37**(1): p. 33-42.
42. Helming, L., et al., *Essential role of DAP12 signaling in macrophage programming into a fusion-competent state*. Sci Signal, 2008. **1**(43): p. ra11.
43. Arora, S., et al., *Effect of cytokine interplay on macrophage polarization during chronic pulmonary infection with Cryptococcus neoformans*. Infect Immun, 2011. **79**(5): p. 1915-26.
44. Martinez, F.O., L. Helming, and S. Gordon, *Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 451-83.
45. O'Shea, J.J. and W.E. Paul, *Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells*. Science, 2010. **327**(5969): p. 1098-102.
46. Qian, B.Z., et al., *CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis*. Nature, 2011. **475**(7355): p. 222-5.
47. Loberg, R.D., et al., *Targeting CCL2 with systemic delivery of neutralizing antibodies induces prostate cancer tumor regression in vivo*. Cancer Res, 2007. **67**(19): p. 9417-24.
48. Lu, M., et al., *Brain PPAR-gamma promotes obesity and is required for the insulin-sensitizing effect of thiazolidinediones*. Nat Med, 2011. **17**(5): p. 618-22.
49. Stienstra, R., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation promotes infiltration of alternatively activated macrophages into adipose tissue*. J Biol Chem, 2008. **283**(33): p. 22620-7.
50. Charo, I.F., *Macrophage polarization and insulin resistance: PPARgamma in control*. Cell Metab, 2007. **6**(2): p. 96-8.
51. Krausgruber, T., et al., *IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses*. Nat Immunol, 2011. **12**(3): p. 231-8.
52. Junttila, I.S., et al., *Tuning sensitivity to IL-4 and IL-13: differential expression of IL-4Ralpha, IL-13Ralpha1, and gammac regulates relative cytokine sensitivity*. J Exp Med, 2008. **205**(11): p. 2595-608.
53. Pauleau, A.L., et al., *Enhancer-mediated control of macrophage-specific arginase I expression*. J Immunol, 2004. **172**(12): p. 7565-73.
54. Lang, R., et al., *Shaping gene expression in activated and resting primary macrophages by IL-10*. J Immunol, 2002. **169**(5): p. 2253-63.
55. Liu, Y., et al., *Unique expression of suppressor of cytokine signaling 3 is essential for classical macrophage activation in rodents in vitro and in vivo*. J Immunol, 2008. **180**(9): p. 6270-8.
56. Whyte, C.S., et al., *Suppressor of cytokine signaling (SOCS)1 is a key determinant of differential macrophage activation and function*. J Leukoc Biol, 2011. **90**(5): p. 845-54.
57. Voelz, K., D.A. Lammas, and R.C. May, *Cytokine signaling regulates the outcome of intracellular macrophage parasitism by Cryptococcus neoformans*. Infect Immun, 2009. **77**(8): p. 3450-7.
58. Abe, K., et al., *Th1-Th2 cytokine kinetics in the bronchoalveolar lavage fluid of mice infected with Cryptococcus neoformans of different virulences*. Microbiol Immunol, 2000. **44**(10): p. 849-55.
59. Arora, S., et al., *Role of IFN-gamma in regulating T2 immunity and the development of alternatively activated macrophages during allergic bronchopulmonary mycosis*. J Immunol, 2005. **174**(10): p. 6346-56.

60. Olszewski, M.A., et al., *Regulatory effects of macrophage inflammatory protein 1alpha/CCL3 on the development of immunity to Cryptococcus neoformans depend on expression of early inflammatory cytokines*. Infect Immun, 2001. **69**(10): p. 6256-63.
61. Okano, M., et al., *Interleukin-4-independent production of Th2 cytokines by nasal lymphocytes and nasal eosinophilia in murine allergic rhinitis*. Allergy, 2000. **55**(8): p. 723-31.
62. Huffnagle, G.B., et al., *The role of CD4+ and CD8+ T cells in the protective inflammatory response to a pulmonary cryptococcal infection*. J Leukoc Biol, 1994. **55**(1): p. 35-42.
63. Herring, A.C., et al., *Induction of interleukin-12 and gamma interferon requires tumor necrosis factor alpha for protective T1-cell-mediated immunity to pulmonary Cryptococcus neoformans infection*. Infect Immun, 2002. **70**(6): p. 2959-64.
64. Hernandez, Y., et al., *Distinct roles for IL-4 and IL-10 in regulating T2 immunity during allergic bronchopulmonary mycosis*. J Immunol, 2005. **174**(2): p. 1027-36.
65. Snelgrove, R.J., et al., *In the absence of reactive oxygen species, T cells default to a Th1 phenotype and mediate protection against pulmonary Cryptococcus neoformans infection*. J Immunol, 2006. **177**(8): p. 5509-16.
66. Shibuya, K., et al., *Granuloma and cryptococcosis*. J Infect Chemother, 2005. **11**(3): p. 115-22.
67. Decken, K., et al., *Interleukin-12 is essential for a protective Th1 response in mice infected with Cryptococcus neoformans*. Infect Immun, 1998. **66**(10): p. 4994-5000.
68. Kawakami, K., et al., *IL-12 protects mice against pulmonary and disseminated infection caused by Cryptococcus neoformans*. Clin Exp Immunol, 1996. **104**(2): p. 208-14.
69. Hoag, K.A., et al., *IL-12 and IFN-gamma are required for initiating the protective Th1 response to pulmonary cryptococcosis in resistant C.B-17 mice*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1997. **17**(6): p. 733-9.
70. Hoag, K.A., et al., *Early cytokine production in pulmonary Cryptococcus neoformans infections distinguishes susceptible and resistant mice*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1995. **13**(4): p. 487-95.
71. Kleinschek, M.A., 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): p. 1098-106.
72. Guerrero, A., et al., *Cryptococcus neoformans variants generated by phenotypic switching differ in virulence through effects on macrophage activation*. Infect Immun, 2010. **78**(3): p. 1049-57.
73. Zhang, Y., et al., *Robust Th1 and Th17 immunity supports pulmonary clearance but cannot prevent systemic dissemination of highly virulent Cryptococcus neoformans H99*. Am J Pathol, 2009. **175**(6): p. 2489-500.
74. Muller, U., 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): p. 5367-77.
75. Wormley, F.L., Jr., et al., *Protection against cryptococcosis by using a murine gamma interferon-producing Cryptococcus neoformans strain*. Infect Immun, 2007. **75**(3): p. 1453-62.

76. Stenzel, W., 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): p. 486-96.
77. Muller, U., 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): p. 1714-21.
78. Voelz, K. and R.C. May, *Cryptococcal interactions with the host immune system*. Eukaryot Cell, 2010. **9**(6): p. 835-46.
79. Piehler, D., 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): p. 733-44.
80. Osterholzer, J.J., et al., *Chemokine receptor 2-mediated accumulation of fungicidal exudate macrophages in mice that clear cryptococcal lung infection*. Am J Pathol, 2011. **178**(1): p. 198-211.
81. Hardison, S.E., et al., *Pulmonary infection with an interferon-gamma-producing Cryptococcus neoformans strain results in classical macrophage activation and protection*. Am J Pathol, 2010. **176**(2): p. 774-85.
82. He, X., et al., *Virulence factors identified by Cryptococcus neoformans mutant screen differentially modulate lung immune responses and brain dissemination*. Am J Pathol, 2012. **181**(4): p. 1356-66.
83. Alspaugh, J.A. and D.L. Granger, *Inhibition of Cryptococcus neoformans replication by nitrogen oxides supports the role of these molecules as effectors of macrophage-mediated cytostasis*. Infect Immun, 1991. **59**(7): p. 2291-6.
84. Anthony, R.M., et al., *Memory T(H)2 cells induce alternatively activated macrophages to mediate protection against nematode parasites*. Nat Med, 2006. **12**(8): p. 955-60.
85. Herbert, D.R., et al., *Alternative macrophage activation is essential for survival during schistosomiasis and downmodulates T helper 1 responses and immunopathology*. Immunity, 2004. **20**(5): p. 623-35.
86. Osterholzer, J.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): p. 932-43.
87. Nicola, A.M., et al., *Nonlytic exocytosis of Cryptococcus neoformans from macrophages occurs in vivo and is influenced by phagosomal pH*. MBio, 2011. **2**(4).
88. Charlier, C., et al., *Evidence of a role for monocytes in dissemination and brain invasion by Cryptococcus neoformans*. Infect Immun, 2009. **77**(1): p. 120-7.
89. Chretien, F., et al., *Pathogenesis of cerebral Cryptococcus neoformans infection after fungemia*. J Infect Dis, 2002. **186**(4): p. 522-30.
90. Shea, J.M., et al., *The cryptococcal enzyme inositol phosphosphingolipid-phospholipase C confers resistance to the antifungal effects of macrophages and promotes fungal dissemination to the central nervous system*. Infect Immun, 2006. **74**(10): p. 5977-88.
91. Feldmesser, M., S. Tucker, and A. Casadevall, *Intracellular parasitism of macrophages by Cryptococcus neoformans*. Trends Microbiol, 2001. **9**(6): p. 273-8.
92. Feldmesser, M., et al., *Cryptococcus neoformans is a facultative intracellular pathogen in murine pulmonary infection*. Infect Immun, 2000. **68**(7): p. 4225-37.
93. Kechichian, T.B., J. Shea, and M. Del Poeta, *Depletion of alveolar macrophages decreases the dissemination of a glucosylceramide-deficient mutant of*

- Cryptococcus neoformans* in immunodeficient mice. *Infect Immun*, 2007. **75**(10): p. 4792-8.
94. Shi, M., et al., *Real-time imaging of trapping and urease-dependent transmigration of Cryptococcus neoformans in mouse brain*. *J Clin Invest*, 2010. **120**(5): p. 1683-93.
  95. Chang, Y.C., et al., *Cryptococcal yeast cells invade the central nervous system via transcellular penetration of the blood-brain barrier*. *Infect Immun*, 2004. **72**(9): p. 4985-95.
  96. Chen, S.H., et al., *Cryptococcus neoformans induces alterations in the cytoskeleton of human brain microvascular endothelial cells*. *J Med Microbiol*, 2003. **52**(Pt 11): p. 961-70.
  97. Vu, K., et al., *Immortalized human brain endothelial cell line HCMEC/D3 as a model of the blood-brain barrier facilitates in vitro studies of central nervous system infection by Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell*, 2009. **8**(11): p. 1803-7.
  98. Olszewski, M.A., et al., *Urease expression by Cryptococcus neoformans promotes microvascular sequestration, thereby enhancing central nervous system invasion*. *Am J Pathol*, 2004. **164**(5): p. 1761-71.
  99. Sachs, G., et al., *The gastric biology of Helicobacter pylori*. *Annu Rev Physiol*, 2003. **65**: p. 349-69.
  100. Zhao, H., et al., *Use of green fluorescent protein to assess urease gene expression by uropathogenic Proteus mirabilis during experimental ascending urinary tract infection*. *Infect Immun*, 1998. **66**(1): p. 330-5.
  101. Ford, A.L., et al., *Normal adult ramified microglia separated from other central nervous system macrophages by flow cytometric sorting. Phenotypic differences defined and direct ex vivo antigen presentation to myelin basic protein-reactive CD4+ T cells compared*. *J Immunol*, 1995. **154**(9): p. 4309-21.
  102. Buchanan, K.L. and H.A. Doyle, *Requirement for CD4(+) T lymphocytes in host resistance against Cryptococcus neoformans in the central nervous system of immunized mice*. *Infect Immun*, 2000. **68**(2): p. 456-62.
  103. Grahert, A., et al., *IL-4 receptor-alpha-dependent control of Cryptococcus neoformans in the early phase of pulmonary infection*. *PLoS One*, 2014. **9**(1): p. e87341.
  104. Muller, U., et al., *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): p. 299-310.
  105. Colton, C.A., et al., *Expression profiles for macrophage alternative activation genes in AD and in mouse models of AD*. *J Neuroinflammation*, 2006. **3**: p. 27.
  106. Khan, I.A., T. Matsuura, and L.H. Kasper, *IL-10 mediates immunosuppression following primary infection with Toxoplasma gondii in mice*. *Parasite Immunol*, 1995. **17**(4): p. 185-95.
  107. Kane, M.M. and D.M. Mosser, *The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis*. *J Immunol*, 2001. **166**(2): p. 1141-7.
  108. Sing, A., et al., *Yersinia enterocolitica evasion of the host innate immune response by V antigen-induced IL-10 production of macrophages is abrogated in IL-10-deficient mice*. *J Immunol*, 2002. **168**(3): p. 1315-21.
  109. Munder, M., K. Eichmann, and M. Modolell, *Alternative metabolic states in murine macrophages reflected by the nitric oxide synthase/arginase balance: competitive regulation by CD4+ T cells correlates with Th1/Th2 phenotype*. *J Immunol*, 1998. **160**(11): p. 5347-54.



110. Holscher, C., et al., *Impairment of alternative macrophage activation delays cutaneous leishmaniasis in nonhealing BALB/c mice*. J Immunol, 2006. **176**(2): p. 1115-21.
111. Mantovani, A., A. Sica, and M. Locati, *Macrophage polarization comes of age*. Immunity, 2005. **23**(4): p. 344-6.
112. Martinez, F.O., et al., *Macrophage activation and polarization*. Front Biosci, 2008. **13**: p. 453-61.
113. Mylonas, K.J., et al., *Alternatively activated macrophages elicited by helminth infection can be reprogrammed to enable microbial killing*. J Immunol, 2009. **182**(5): p. 3084-94.
114. Mantovani, A., et al., *Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling*. J Pathol, 2012. **229**(2): p. 176-85.
115. Schneerson-Porat, S., A. Shahrar, and M. Aronson, *Formation of histiocyte rings in response to Cryptococcus neoformans infection*. J Reticuloendothel Soc, 1965. **2**(3): p. 249-55.
116. Moreno, J.L., et al., *IL-4 promotes the formation of multinucleated giant cells from macrophage precursors by a STAT6-dependent, homotypic mechanism: contribution of E-cadherin*. J Leukoc Biol, 2007. **82**(6): p. 1542-53.
117. Turnbull, I.R. and M. Colonna, *Activating and inhibitory functions of DAP12*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(2): p. 155-61.
118. Turnbull, I.R., et al., *Cutting edge: TREM-2 attenuates macrophage activation*. J Immunol, 2006. **177**(6): p. 3520-4.
119. Hamerman, J.A., et al., *Cutting edge: inhibition of TLR and FcR responses in macrophages by triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM)-2 and DAP12*. J Immunol, 2006. **177**(4): p. 2051-5.
120. Helming, L. and S. Gordon, *The molecular basis of macrophage fusion*. Immunobiology, 2007. **212**(9-10): p. 785-93.
121. Zhu, X.W., et al., *Multinucleate giant cells release functionally unopposed matrix metalloproteinase-9 in vitro and in vivo*. J Infect Dis, 2007. **196**(7): p. 1076-9.
122. da Costa, C.E., et al., *Presence of osteoclast-like multinucleated giant cells in the bone and nonostotic lesions of Langerhans cell histiocytosis*. J Exp Med, 2005. **201**(5): p. 687-93.
123. Coury, F., et al., *Langerhans cell histiocytosis reveals a new IL-17A-dependent pathway of dendritic cell fusion*. Nat Med, 2008. **14**(1): p. 81-7.
124. Buhling, F., et al., *Cathepsin K--a marker of macrophage differentiation?* J Pathol, 2001. **195**(3): p. 375-82.
125. Shen, Z., et al., *The role played by cell-substrate interactions in the pathogenesis of osteoclast-mediated peri-implant osteolysis*. Arthritis Res Ther, 2006. **8**(3): p. R70.
126. Puissegur, M.P., et al., *Mycobacterial lipomannan induces granuloma macrophage fusion via a TLR2-dependent, ADAM9- and beta1 integrin-mediated pathway*. J Immunol, 2007. **178**(5): p. 3161-9.
127. Jay, S.M., et al., *Foreign body giant cell formation is preceded by lamellipodia formation and can be attenuated by inhibition of Rac1 activation*. Am J Pathol, 2007. **171**(2): p. 632-40.
128. Fabry, Z., et al., *Sensing the microenvironment of the central nervous system: immune cells in the central nervous system and their pharmacological manipulation*. Curr Opin Pharmacol, 2008. **8**(4): p. 496-507.
129. Langer-Gould, A., et al., *Progressive multifocal leukoencephalopathy in a patient treated with natalizumab*. N Engl J Med, 2005. **353**(4): p. 375-81.

130. Matarese, G., V. De Rosa, and A. La Cava, *Regulatory CD4 T cells: sensing the environment*. Trends Immunol, 2008. **29**(1): p. 12-7.
131. Janeway, C.A., Jr., *Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1989. **54 Pt 1**: p. 1-13.
132. Matzinger, P., *Tolerance, danger, and the extended family*. Annu Rev Immunol, 1994. **12**: p. 991-1045.
133. Steinman, R.M., *The dendritic cell system and its role in immunogenicity*. Annu Rev Immunol, 1991. **9**: p. 271-96.
134. Suter, T., et al., *The brain as an immune privileged site: dendritic cells of the central nervous system inhibit T cell activation*. Eur J Immunol, 2003. **33**(11): p. 2998-3006.
135. Kleindienst, P., et al., *Simultaneous induction of CD4 T cell tolerance and CD8 T cell immunity by semimature dendritic cells*. J Immunol, 2005. **174**(7): p. 3941-7.
136. Bailey, S.L., et al., *CNS myeloid DCs presenting endogenous myelin peptides 'preferentially' polarize CD4+ T(H)-17 cells in relapsing EAE*. Nat Immunol, 2007. **8**(2): p. 172-80.
137. McMahon, E.J., et al., *Epitope spreading initiates in the CNS in two mouse models of multiple sclerosis*. Nat Med, 2005. **11**(3): p. 335-9.
138. Newman, T.A., et al., *Blood-derived dendritic cells in an acute brain injury*. J Neuroimmunol, 2005. **166**(1-2): p. 167-72.
139. Ziemssen, T. and W. Schrempf, *Glatiramer acetate: mechanisms of action in multiple sclerosis*. Int Rev Neurobiol, 2007. **79**: p. 537-70.
140. Sanna, A., et al., *Glatiramer acetate reduces lymphocyte proliferation and enhances IL-5 and IL-13 production through modulation of monocyte-derived dendritic cells in multiple sclerosis*. Clin Exp Immunol, 2006. **143**(2): p. 357-62.
141. Duddy, M.E., et al., *Monocyte-derived dendritic cells: a potential target for therapy in multiple sclerosis (MS)*. Clin Exp Immunol, 2001. **123**(2): p. 280-7.
142. Xing, N., et al., *Distinctive dendritic cell modulation by vitamin D(3) and glucocorticoid pathways*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **297**(3): p. 645-52.
143. Moser, M., et al., *Glucocorticoids down-regulate dendritic cell function in vitro and in vivo*. Eur J Immunol, 1995. **25**(10): p. 2818-24.

## 7. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Michael Meisen, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: "Die Rolle von Makrophagen und Mikroglia im Kontext der murinen Kryptokokkose" selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

## **Lebenslauf**

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird mein Lebenslauf in der elektronischen Version nicht veröffentlicht.

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern Wolfgang und Annette, meinem Bruder Daniel und meinem Doktorvater und Betreuer Prof. Dr. Werner Stenzel.

Ich danke auch den anderen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe und meinen Freunden.

Ohne eure Unterstützung hätte ich dieses Projekt nie bewältigen können.