

2. Materialien und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Geräte

Abzugskabinett (Heraeus, Hanau, D)

Bakterienrüttler (Braun, Melsungen, D)

Brutschrank (Heraeus, Hanau, D)

Eppendorfszentrifuge (Eppendorf, Hamburg, D)

FACS-Scan, Durchflußzytometer (Becton Dickinson, Heidelberg, D)

Feinwaage (Sartorius, Göttingen, D)

Gewebehomogenisator (Braun, Melsungen, D)

Kryotom (Leitz, Wetzlar, D)

Mikrotom (Leitz, Wetzlar, D)

Mikroskop (Leitz, Wetzlar, D)

Sterile Werkbank, Gelaire Laminar Air Flow Class 100 (Flow, Meckenheim, D)

Trockenschrank (Heraeus, Hanau, D)

Trockenschrank (Memmert, Schwabach, D)

Vortex -Mixer (Jahnke und Kunkel, Staufen, D)

Zentrifuge, Varifuge RF (Heraeus, Hanau, D)

2.1.2. Chemikalien

Aqua destillata

Biotin (Sigma, Deisenhofen, D)

Egg-White-Avidin (Dianova, Hamburg, D)

Entellan (Merck, Darmstadt, D)

Eosin (Sigma, Deisenhofen, D)

Ethanol 96% (Sigma, Deisenhofen, D)

Fötiales Kälberserum (FCS)

Hämalaun (Sigma, Deisenhofen, D)
HCl, 2n Lösung
HCl-Alkohol, 3% HCl
Isopropanol 70%
Kaisers Glyzeringelatine (Merck, Darmstadt, D)
Karbolfuchsin (Sigma, Deisenhofen, D)
Levamisol (Sigma, Deisenhofen, D)
Malachitgrün (Sigma, Deisenhofen, D)
N,N-Dimethylformamid (Sigma, Deisenhofen, D)
N-Naphtol-AS-Bi-Phosphat (Sigma, Deisenhofen, D)
NaOH, 2n Lösung
Natriumazid (Sigma, Deisenhofen, D)
Natriumnitrit (Sigma, Deisenhofen, D)
Neufuchsinfarbstoff (Sigma, Deisenhofen, D)
OCT-Compound (Lab-Tek Products, Naperville, USA)
PBS, Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
Propandiol (Merck, Darmstadt, D)
RPMI 1640 Lösung.
Streptavidin (Dianova, Hamburg, D)
Tris-Base (Sigma, Deisenhofen, D)
Tris-HCl (Sigma, Deisenhofen, D)
Trypanblau (Merck, Darmstadt, D)
Xylol (Merck, Darmstadt, D)

2.1.3. Versuchsmaterialien und Instrumente

Bechergläser
Bluecaps (Becton-Dickinson, Heidelberg, D)
Chirurgische Instrumente, Scheren und Pinzetten
Einmalkanülen
Einmalspritzen

Eppendorf-Caps (Eppendorf, Hamburg, D)
Eppendorf-Pipetten (Eppendorf, Hamburg, D)
Färbeküvetten
Filterpapier
Glaskolben
Glasobjektträger und Deckgläser
Glaspipetten
Kunststoffpipetten
Kryotubes 1,8ml (Nunc, Roskilde, DK)
Petrischalen aus Kunststoff (Greiner, Frickenhausen, D)
Feuchte Kammer
Zählkammer nach Neubauer (Schmidt, Berlin, D)
Homogenisierpistillen (Braun, Melsungen, D)

2.1.4. Materialien für die Bakterienkultur

Middlebrook 7H9 Flüssigmedium (Becton Dickinson, Heidelberg, D)
Middlebrook 7H10 Festmedium (Becton Dickinson, Heidelberg, D)
OADC (Becton Dickinson, Heidelberg, D)

2.1.5. Antikörper

anti-CD4: Klon GK 1.5 (ATCC TIB 207); Isotyp Ratte IgG2b V von Dr. Rui Appelberg (Porto, P) zur Verfügung gestellt.

anti-CD8: Klon 2.43 (ATCC TIB 210); Isotyp Ratte IgG2b von Dr. Rui Appelberg (Porto, P) zur Verfügung gestellt.

anti-Thy 1.2: Klon 30-H12 (ATCC TIB 107; Isotyp Ratte IgG2b von Dr. Rui Appelberg (Porto, P) zur Verfügung gestellt.

Kontrollantikörper: Klon 23/7; Isotyp Ratte IgG2a von Dr. Rui Appelberg (Porto, P) zur Verfügung gestellt.

Anti-Maus-IFN γ : Klon1222-00; Isotyp Hamster IgG (Genzyme, Rüsselsheim)

AntiTNF α : Klon 1221-00 Isotyp Hamster IgG (Genzyme, Rüsselsheim)
Biotinisierter Kaninchen-anti-Ratte-AK : IgG 2b H+L Spacearm Biotin (Dianova, Hamburg, D)
FITC-konjugierter Antikörper Ziege-anti-Ratte IgG (Medac, Hamburg, D)
Hochgereinigtes Hamster-IgG, lyophilisiert (Sigma, Deisenhofen, D);
Rattenserum (Paesel und Lorei, München, D),
Kaninchenserum (Sigma, Hamburg, D)

2.1.6. Lösungen für die Immunhistologie

2.1.6.1.1. Verdünnungsmedium für Antikörper

500ml RPMI Medium wurden mit 50ml FCS und 500mg Natriumacid gemischt und auf einen pH von 7,4 bis 7,6 eingestellt.

2.1.6.1.2. Spülpuffer

4,5g Tris-Base, 34,25g Tris-HCl und 43,9g NaCl wurden in 5000ml Aqua dest. gelöst.

2.1.6.1.3. Entwicklungspuffer

8,7g NaCl, 1,5g Tris-HCl, und 4,9g Tris-Base wurden in 1000ml Aqua dest. gelöst.

Propandiol-Lösung

21g 2-Amino-2-methylpropan-1.3diol wurde in 1000ml Aqua dest. gelöst.

2.1.6.1.4. Neufuchsin-Lösung

5g Neufuchsin wurden in 100ml HCl gelöst und bis zur Verwendung kühl und dunkel gelagert.

2.1.6.1.5. Entwickler-Lösung

Die Entwickler-Lösung wurde aus drei verschiedenen Lösungen jeweils frisch am Verwendungstag hergestellt. Lösung A wurde durch Mischen von 175ml

Entwicklungspuffer, 62,5ml Propandiollösung und 100mg Levamisol hergestellt. Lösung B wurde durch Lösen von 50mg Natriumnitrit in 1,25ml Aqua dest. und nachfolgender einminütiger Reaktion mit 0,5ml Neufuchsin hergestellt. Lösung C wurde durch Lösen von 125mg Naphtol in 1,5ml Dimethylformamid hergestellt. Um zu der gebrauchsfertigen Entwicklerlösung zu gelangen, wurde in Lösung A erst Lösung B und danach Lösung C gegeben. Die Entwicklerlösung wurde auf pH 8,8 eingestellt, filtriert und sofort verwendet.

2.1.6.1.6. Primärantikörper-Lösung

Die Primärantikörper wurden nach dem Schema in Tab. 1 in Antikörperverdünnungsmedium zur Gebrauchslösung verdünnt.

Tab.1: Verdünnungsschema für Antikörper zur Verwendung in der Immunhistologie.

Oberflächen-antigen	Verdünnung	Konzentration
CD8+	1:15	1,3µg/ml
CD4+	1:100	0,2µg/ml
Thy 1.2	1:50	0,4µg/ml

2.1.7. Versuchstiere

Es wurden pathogenfreie C57BL/6 *b6g*^s Mäuse (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, USA) im Alter von 10-16 Wochen verwendet. Die Mäuse wurden in den Tierställen des Inst. für Med. Mikrobiologie gezüchtet. Routinemäßig wurden Versuchstiere virusserologischen Kontrolluntersuchungen am Institut für Versuchstierzucht (Hannover, D) unterzogen. An der London School for Hygiene and Tropical Medicine (LSHTM, London, UK) wurden Versuche mit 8-10 Wochen alten SCID-Mäusen und coisogenen Balb/c (Charles River Laboratories, UK) durchgeführt. Diese Tiere wurden in den Tierställen der LSHTM unter sterilen

Bedingungen gezüchtet und gehalten. SCID-Mäuse besitzen durch eine Mutation auf dem Chromosom 16 keine B- und T-Lymphozyten. Obwohl es sich bei den SCID-Mäusen um einen Inzuchtstamm handelt, gibt es ca 15% sogenannte "leaky" Mäuse. Diese besitzen eine geringe Anzahl von Lymphozyten, welche jedoch meist funktionslos sind. Die im Rahmen dieser Versuche verwendeten Tiere wurden stichprobenartig auf das Vorhandensein von "leaky" Mäusen untersucht. Es ließen sich keine T-zellrezeptortragenden Zellen nachweisen (persönliche Mitteilung Dr. Gregory Bancroft, London, GB). Alle verwendeten Versuchstiere erhielten Wasser und Futter ad libitum.

2.1.8. Genehmigung der Tierversuche

Die Tierversuchsvorhaben an der Freien Universität Berlin wurden unter den Nummern 0003/92 und 0031/92 genehmigt. Die Tierversuche an der LSHTM wurden unter den Nummern 70/03357 und 70/03359 von den dortigen Tierschutzbehörden genehmigt.

2.1.9. Bakterien

Es wurden die beiden verschiedenen Stämme von *M. avium* TMC 724 (Serovar 2) und SE 01 (Serovar 4) verwendet. TMC 724 wurde freundlicherweise von Dr. Frank Collins (Trudeau Institute, Saranac Lake, NY, USA) zur Verfügung gestellt. SE 01 wurde am Inst. für Infektionsmedizin, Abt. Medizinische Mikrobiologie und Infektionsimmunologie, aus dem Blut eines AIDS-Patienten isoliert und angezüchtet. Beide Stämme wurden nach zweimaliger Mauspassage in Middlebrook 7H9 Medium mit OADC Anreicherung angezüchtet und in der logarithmischen Phase ihrer Vermehrung in Kryotubes aliquotiert. Die Bakterienzahl pro Aliquot wurde durch Anzucht auf Middlebrook 7H10 Festmedium mit OADC Anreicherung bestimmt. Dafür wurden jeweils 100µl pro Verdünnungsstufe auf eine 7H10 (Middlebrook + OADC)-Agar-Platte aufgebracht und bei 37°C und 90% Luftfeuchtigkeit 14 Tage lang bebrütet. Die Anzahl der gewachsenen Kolonien pro 100µl wurde ausgezählt und

hieraus die Gesamtzahl der Bakterien in der Ursprungslösung berechnet und als koloniebildende Einheiten (KBE) pro ml angegeben.

2.2. Methoden

2.2.1. Infektion der Versuchstiere

Zur Infektion wurde eine entsprechende Menge *M. avium* aufgetaut und in PBS auf Suspensionen von 5×10^5 - 1×10^6 /ml verdünnt. Von dieser Suspension wurde den Mäusen jeweils 200 μ l durch eine Schwanzvene injiziert. Die Keimzahl wurde durch Ausplattierung auf Middlebrook 7H10 Agar und Auszählung der gewachsenen Kolonien überprüft.

2.2.2. Organentnahme

Entsprechend dem jeweiligen Versuchsprotokoll wurden 3-5 Mäuse zu den angegebenen Zeitpunkten durch zervikale Dislokation getötet, mit 70% Ethanol äußerlich desinfiziert und gewogen. Nach der Eröffnung von Bauch- und Brusthöhle wurden Leber, Milz und Lungen unter aseptischen Bedingungen entnommen und die Milz gewogen. Wenn nicht anders angegeben, wurden der linke obere Leberlappen, das laterale Drittel der Milz und der linke Lungenunterlappen in 5% Formalin-PBS fixiert und in dieser Lösung bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt. Der rechte obere Leberlappen wurde sofort nach der Entnahme in OCT-Compound eingebettet, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Weiterverarbeitung bei -70°C gelagert. Die verbliebenen Anteile von Leber, Lungen und Milz wurden in jeweils 10ml steriler 0,9% Kochsalzlösung mechanisch homogenisiert.

2.2.3. In-vivo-T-Zelldepletion

Zur Depletion von T-Zell-Subpopulationen wurden zum angegebenen Zeitpunkt 500 μ g des entsprechenden Antikörpers in PBS gelöst und intraperitoneal injiziert.

Die Injektion wurde wöchentlich mit 300µg bis zum angegebenen Ende wiederholt. Die Effektivität der Depletion wurde durchflußzytometrisch bestimmt.

2.2.4. In-vivo-Neutralisation von Zytokinen

Zur Neutralisation von Zytokinen wurde der entsprechende Antikörper in PBS gelöst. Den Mäusen wurde initial 300µg, danach wöchentlich 200µg des angegebenen Antikörpers gegen das jeweilige Zytokin in 200µl PBS-Lösung intraperitoneal injiziert. In der Kontrollgruppe wurde an gleichen Tagen 200µl PBS-Lösung i.p. injiziert.

2.2.5. Histologie

2.2.5.1. Präparation der Schnitte

Die in Formalin fixierten Organe wurden in hitzeverflüssigtem Paraffin eingebettet und nach Abkühlung und Verfestigung auf eine Schichtdicke von 2-3µm geschnitten. Auf Glasobjektträgern wurden die Präparate 5 min im Trockenschrank bei 60°C und anschließend 24 Stunden an der Luft bei Raumtemperatur getrocknet.

2.2.5.2. Hämalaun-Eosin-Färbung

Die vorbereiteten Schnitte wurden zweimal für je 5 min in Xylol entparaffiniert, anschließend je 5 min in Isopropanol und einer absteigenden Ethanolreihe (90%, 80%, 70%) an die wäßrige Phase angeglichen. Die Färbung erfolgte für 6 min in Hämalaun (nach Mayer) und nach einer fünfminütigen Spülung in Leitungswasser für 2 min in Eosin. Nach einer Spülung für 5 min in Aqua. dest. folgte eine Inkubation von je 5 min in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70%, 80%, 90%) und in Isopropanol zur Dehydrierung. Anschließend wurden die Schnitte zweimal 5 min lang in Xylol inkubiert und danach sofort mit Eindeckmedium (Entellan) eingedeckt.

Modifizierte Ziehl-Neelsen Färbung für Gewebe

Die vorbereiteten Schnitte wurden zweimal für je 5 min in Xylol entparaffiniert und für 5 min in Isopropanol gespült. In auf 60⁰C erwärmter Karbolfuchsin-Lösung wurden die Präparate 30 min gefärbt. Nach einer Spülung in Aqua dest. wurden die Präparate

mit 3% HCl-Alkohol entfärbt und anschließend mit Hämalaun oder Malachitgrün gegengefärbt. Nach fünfminütiger Spülung in Xylol wurde mit Entellan eingedeckt.

2.2.6. Immunhistologie

2.2.6.1. Herstellung der Präparate

Die tiefgefrorenen Organe wurden aufgetaut, auf dem Objekteller des Kryotoms plaziert, mit OCT-Compound überschichtet und sofort bei -20⁰C schnellgefroren. Bei dieser Temperatur wurden die Organe im Kryotom auf eine Schichtdicke von 5-6µm geschnitten, auf Glasobjektträger gezogen und 24 Std. luftgetrocknet. Zur sofortigen Weiterverarbeitung wurden die Schnitte für 30 min in Aceton und für 30 min in Chloroform fixiert.

Wenn nicht sofort weiterverarbeitet, wurden die Schnitte nur für 10 min in Aceton fixiert und für 24 Std. bei -70⁰C eingefroren, danach bei -20⁰C gelagert. Zur Weiterverarbeitung wurden sie 20 min in Aceton und 30 min in Chloroform inkubiert.

2.2.6.2. Färbung

2.2.6.2.1. Primärantikörper

Die Schnitte wurden mit je 200µl der Primärantikörper-Lösung überschichtet und für 30 min in einer feuchten Kammer inkubiert, anschließend gespült und luftgetrocknet.

Blockierung des freien Biotins

Zur Blockierung des gewebeeigenen Biotins wurden die Schnitte mit je 200µl einer 0,01% Avidinlösung (Egg-White-Avidin) überschichtet und für 20 min in der feuchten Kammer bei Zimmertemperatur inkubiert und anschließend mit Spülpuffer gespült und getrocknet.

2.2.6.2.2. Blockierung des freien Avidins

Zur Blockierung der verbliebenen freien Bindungsstellen des Avidins für Biotin wurden die Schnitte mit je 200µl einer 0,001 prozentigen Biotinlösung überschichtet und für 20 min in der feuchten Kammer inkubiert, anschließend mit Spülpuffer gespült und getrocknet.

2.2.6.2.3. Sekundärantikörper

Der biotinierte Sekundärantikörper wurde im Verhältnis 1:300 in Antikörperverdünnungslösung verdünnt, mit 5% Mausserum und 5% Kaninchenserum versetzt. Die Schnitte wurden mit je 200µl dieser Lösung überschichtet und für 30 min in der feuchten Kammer inkubiert, anschließend mit Spülpuffer gespült und getrocknet.

2.2.6.2.4. Streptavidin-alkalische-Phosphatase-Komplex

Mit alkalischer Phosphatase konjugiertes Streptavidin wurde im Verhältnis 1:200 in Spülpuffer verdünnt. Die Schnitte wurden mit je 200µl überschichtet, für 30min in der feuchten Kammer inkubiert und danach mit Spülpuffer gespült.

2.2.6.2.5. Entwicklung der alkalischen Phosphatase und Gegenfärbung

Die Objektträger wurden für 30min in Färbeküvetten mit Entwicklerlösung inkubiert, anschließend gespült und für 6min mit Hämalaun (nach Mayer) gegengefärbt. Die Präparate wurden mit Kaisers Glyceringelatine eingedeckt.

2.2.7. Bestimmung der Splenomegalie

Die entnommenen Milzen wurden gewogen, das Milzgewicht wurde durch das Gewicht der jeweiligen Maus geteilt, mit dem Faktor 100 multipliziert und als relatives Milzgewicht in Prozent angegeben.

2.2.8. Statistik

Quantifizierbare Daten wurden mittels Whitney-Mann-U-Test miteinander verglichen. Als Nullhypothese wurde hierbei angenommen, daß zwischen den zu vergleichenden Daten kein über den Zufall hinausgehender Unterschied besteht. Die Nullhypothese wurde verworfen, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit hierfür kleiner oder gleich 5% war.

Die Datenpunkte in der beschreibenden Statistik sind als Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben.