

2 Material und Methoden

2.1 Tiere und Tierhaltung

Die untersuchten Marmosets (*Callithrix jacchus*) entstammen der hauseigenen Marmosetkolonie der Abteilung Toxikologie im Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, welche seit 1978 existiert. Seit 1983 wird dort konstant eine Anzahl von circa 100 Zuchtpaaren gehalten.

Neugeborene Tiere bleiben bis zum dritten Monat bei den Eltern und werden danach in großen Gruppenkäfigen gehalten, in denen sie gemeinsam mit einer Gruppe von Jungtieren leben. Mit dem Eintreten der Geschlechtsreife im Alter von 18 Monaten bringt man sie mit einem geeigneten Partner paarweise in einem Käfig unter. Diese Käfige aus rostfreiem Stahl (50 x 50 x 70 cm) sind mit einer Kletterstange aus Holz und einer Schlafnische ausgestattet.

Einen Hauptnahrungsbestandteil der Tiere stellt die Altromin[®]-Marmoset-Standarddiät sowie Leitungswasser ad libitum dar. Des weiteren erhalten die Marmosets dreimal wöchentlich zusätzlich 30 g frisches Obst und Gemüse (Bananen, Äpfel, Karotten) und 5 g gekochtes Ei. Alle zwei Wochen werden eine Multivitaminlösung und Kalzium gereicht und das Körpergewicht bestimmt (Neubert et al. 1988b).

Die Raumtemperatur im Tierstall beträgt konstant $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ und die relative Luftfeuchtigkeit liegt bei $55\% \pm 5\%$. Tages- und Nachtzyklen wechseln im 12-Stunden-Rhythmus (Licht von 6 bis 18 Uhr).

2.2 Behandlung der Tiere mit 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin (TCDD)

Die Ziele dieser Versuche waren vielfältig: zum Einen sollten die Effekte auf das Immunsystem untersucht werden, darüber hinaus waren aber auch Veränderungen im

Myokard (Riecke et al. 2002) sowie anderen Organen von Interesse. Die Bearbeitungsnummer der Behörde lautet G 0016/96.

Die Versuchsreihe war insgesamt in drei Serien unterteilt, wobei jede Serie aus zwei Behandlungsgruppen und einer Kontrollgruppe bestand. Juvenile Marmosets (*Callithrix jacchus*) aus unserer Kolonie wurden im Alter von 51 bis 81 Wochen einmalig mit einer subkutanen Dosis von 1, 10 oder 100 ng/kg Körpergewicht 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-para-dioxin (TCDD) behandelt. Die Kontrollen wurden mit dem Vehikel DMSO allein behandelt. Es wurden nur männliche Tiere im Rahmen dieser Versuche untersucht. Das Dioxin TCDD wurde in einem Gemisch von 2 Volumenteilen Dimethylsulfoxid (DMSO, Merck, Darmstadt) und einem Volumenteil Toluol (Merck, Darmstadt) in einer Konzentration von 0,01 ng/μl, 0,1 ng/μl bzw. 1 ng/μl gelöst. Nach Rasur in der rechten Axillarlinie unterhalb des Rippenbogens wurde allen Versuchstieren die Dosis von 100 μl/kg KG der TCDD-Lösungen subkutan appliziert. Anschließend wurden die behandelten Marmosets jeweils über einen Zeitraum von zwei oder vier Wochen beobachtet. Tabelle 2.1 gibt einen Überblick über die Anzahl der behandelten Tiere, das mittlere Alter sowie die TCDD-Dosis und Beobachtungsdauer.

Serie	1			2			3		
Beobachtungsdauer [Wo]	2	4		2	4		4		
Dosis [ng/kg KG]	100	V*	100	10	V*	10	V*	1	10
Anzahl	5	5	5	5	5	5	3	4	3
Mittleres Alter [Wo]	57	59	60	73	70	68	39	41	42

Tabelle 2.1: Übersicht über die Protokolle der durchgeführten Versuche, * V= Vehikel

2.3 Probengewinnung

2.3.1 Thymusgewebe vom Marmoset

Die untersuchten Marmosets wurden durch eine intraperitoneale Injektion von 100 mg Thiopental (Trapanal, Byk Gulden Konstanz), gelöst in 1 ml aqua ad inject. (B. Braun, Melsungen) getötet. Sofort nach Tötung der Tiere wurden die zu untersuchenden Thymuspräparate mit Hilfe geeigneter chirurgischer Instrumente entnommen, gewogen und in Tissue TEK (Miles Diagnostics, Elkhard, IN, USA) eingebettet sowie mit Hilfe flüssigen Stickstoffs eingefroren.

Die Lagerung erfolgte in geschlossenen Kästen bei einer Temperatur von -25°C . Alle Gewebeproben wurden innerhalb von drei Monaten verarbeitet.

2.3.2 Thymusgewebe vom Menschen

Menschliches Thymusgewebe wurde von Patienten erhalten, die sich im Deutschen Herzzentrum Berlin einem kardiokorrektiven chirurgischen Eingriff unterziehen mussten. Bei diesen Eingriffen muss vor allem bei Kindern und jugendlichen Patienten aus operationstechnischen Gründen ein Teil des Thymusgewebes entfernt werden, um Zugang zum Herzen zu erhalten.

Das Gewebe wurde in gekühlten Behältern mit steriler phosphatgepuffert Kochsalzlösung (PBS; Biochrom, Berlin, Deutschland) ins Labor transportiert und circa 2 Stunden nach Operation in gleicher Weise wie das Marmosetgewebe in Tissue-TEK eingebettet, mittels flüssigen Stickstoffes eingefroren und bei -25°C im Kühlschrank gelagert. Die Verarbeitung der Proben erfolgte innerhalb von drei Monaten.

2.4 Immunhistochemische Untersuchung von Gefrierschnitten

2.4.1 Allgemeine Angaben zur Vorgehensweise und zum Verfahren

Es wurden die Thymi von Mensch und Marmosets (*Callithrix jacchus*) verschiedener Altersstufen vom Neugeborenen bis hin zum Erwachsenen (siehe Tabelle 3.1 Seite 30 und Tabelle 3.5 Seite 48) sowie das Thymusgewebe mit TCCD behandelter Marmosets der 1. Behandlungsserie im Alter von 55 bis 63 Wochen (siehe Tabelle 3.9 Seite 67) untersucht.

Die immunhistochemische Untersuchung ist ein geeignetes Verfahren zum Nachweis sowie zur Lokalisation von Gewebsstrukturen durch spezifische Immunreaktionen mit mono- und polyklonalen Antikörpern. In den nachfolgend beschriebenen Versuchen kommt die indirekte Immunfluoreszenz-Technik zur Anwendung.

Nach Inkubation der Gefrierschnitte mit einem antigenspezifischen primären Antikörper (Immunmarkierung) erfolgt in einem zweiten Schritt die Kopplung dieses Antikörpers mit einem fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper. Der Fluoreszenzfarbstoff lässt die markierten Gewebsstrukturen sichtbar werden (Visualisierung).

2.4.2 Herstellung der Gefrierschnitte

Die in Tissue-TEK® eingebetteten Thymuspräparate wurden in einem Kryostaten (Jung Frigocut 2800 N, Leica, Nussloch, Deutschland) bei einer Temperatur von circa -25°C geschnitten (Spezialmesser Typ C, 12 cm) und auf chemisch gereinigte Objektträger gezogen. Die Schnittdicke beträgt $5\ \mu\text{m}$. Anschließend wurden die Gewebsschnitte bis zur Untersuchung in geschlossenen Kästen bei -25°C gelagert.

2.4.3 Vorbereitung der Gefrierschnitte

Vor der Immunmarkierung inkubierten die Präparate in einer Lösung von 0,5% BSA (Bovine Serum Albumin Fraction V, Sigma, St. Louis, MO, USA) in PBS mit dem Ziel, unspezifische Bindungsstellen im Gewebe zu blockieren. Die Inkubationszeit betrug 15 Minuten. Die BSA-Lösung wurde durch kurzes Eintauchen der Präparate in PBS ab gespült. Die Objektträger wurden anschließend in einer Färbekammer (2 x 10 Minuten bei Raumtemperatur in PBS) unter vorsichtigem Rühren (Magnetrührer) gewaschen und anschließend luftgetrocknet.

2.4.4 Inkubation mit dem primären Antikörper (Immunmarkierung)

Auf die luftgetrockneten Schnitte wurden je nach Größe des Präparates 5 bis 10 µl eines primären Antikörpers pipettiert. Danach wurden die Schnitte für 30 Minuten in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Um unspezifische Reaktionen des sekundären Antikörpers mit dem Gewebe auszuschließen, wurden Negativkontrollen angefertigt. Hierbei wurden einige Schnitte nicht mit einem primären Antikörper, sondern nur mit PBS inkubiert.

2.4.5 Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Visualisierung)

Es erfolgte ein zweiter Waschvorgang (2 x 10 Minuten in PBS, Raumtemperatur) und anschließend das Auftragen des sekundären Antikörpers auf die getrockneten Schnitte. Auch dieser Antikörper inkubierte 30 Minuten in einer feuchten Kammer, allerdings lichtgeschützt, um ein Abblassen des Fluoreszenzfarbstoffes zu verhindern.

Wieder wurden die Objektträger wie oben beschrieben in PBS gewaschen, wobei der Schnitt nicht getrocknet werden durfte, da das Auskristallisieren des sekundären Antikörpers verhindert werden sollte. Bevor der feuchte Schnitt mit einem Deckglas bedeckt wurde, pipettierte man einen Tropfen einer Lösung von 0,1% p-Phenylendiamin (Sigma, St.Louis, MO,

USA) in Glycerin/PBS (Mischverhältnis 9:1) auf das Präparat. Durch Zugabe des p-Phenylen-diamins wurde der Fluoreszenzfarbstoff FITC, mit dem der sekundäre Antikörper gekoppelt ist, stabilisiert und somit ein schnelles Verblässen unter dem Mikroskop verhindert, ohne einen nachweislichen Effekt auf die Antikörperbindung auszuüben (Platt et al. 1983).

Aufgrund des schnellen Verblässens des Fluoreszenzfarbstoffes wurden die Gewebsschnitte innerhalb einer Woche mit Hilfe eines Zeiss Photomikroskopes Typ III (Zeiss, Jena, Deutschland) untersucht und fotografiert (Agfachrom RSX 100 professional, Agfa, Deutschland).

2.5 Antikörper

2.5.1 Auflistung der verwendeten Antikörper

Bei der immunhistochemischen Untersuchung der Marmosetthymi bzw. des humanen Thymusgewebes wurden Antikörper dreier unterschiedlicher Klassen verwendet: Antikörper, die gegen Thymusepithelzellen gerichtet sind (TE-3, TE-4, TE-7, TE-8, TE-15, TE-16, TE-19), die an Integrinrezeptoren binden (CD29, CD49a, CD49b, CD49c, CD49e, CD61) und die mit anderen Adhäsionsmolekülen reagieren (CD54, CD58).

Die primären Antikörper wurden mit den sekundären Antikörpern Gam-FITC (Goat Anti-Mouse Fluorescein Isothiocyanat, Immunotech, Marseille, Frankreich) vom IgM-Typ (TE-4, TE-15, TE-19) sowie vom IgG-Typ (alle übrigen Antikörper) gekoppelt.

2.5.2 Herstellung von TE-Antikörpern

Die zuvor bei einer Temperatur von -80°C gelagerten Hybridomzellklone (ATCC, Manassas, VA) wurden aufgetaut und in RPMI 1640 Medium (Biochrom, Berlin) unter Zusatz von 10% fetalem Kälberserum (FCS) und 2mM L-Glutamin angezüchtet. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und einem Anteil von 5% CO_2 in der Raumluft, ein Mediumwechsel fand alle zwei Tage

statt. Nach Erreichen einer hohen Zellzahl wurden die Zellen in ein serumfreies Kulturmedium (Hybridomed 2000, Biochrom Berlin) überführt. Wiederum erfolgte in zweitägigem Abstand ein Mediumwechsel, wobei der antikörperhaltige Kulturüberstand entnommen und bei -80°C eingefroren wurde. Die so gewonnenen Antikörper wurden ohne weitere Bearbeitung direkt zur immunhistochemischen Untersuchung von Thymusgewebe verwendet.

Tabelle 2.2 auf Seite 28 fasst die Durchführung der Arbeitsschritte für die immunhistochemische Anfärbung der Gefrierschnitte zusammen. Tabelle 2.3 auf Seite 29 gibt einen Überblick über die verwendeten primären Antikörper mit den dazu gehörenden sekundären Antikörpern. Sie informiert über die jeweiligen Verdünnungen der Antikörper in PBS und liefert einen Herstellernachweis.

Arbeitsschritt	Durchführung
1) Vorbereitung	- Inkubation mit 0,5% BSA/PBS in einer Färbekammer bei Raumtemp.
2) Waschvorgang	- Abspülen durch Eintauchen in PBS - 2 x 10 Minuten in einer Färbekammer unter vorsichtigem Rühren (Magnetrührer) in PBS waschen - Schnitt lufttrocknen
3) Immunmarkierung	- je nach Größe des Präparates 5 bis 10 µl des primären Antikörpers auf den Schnitt geben - in der feuchten Kammer 30 Minuten bei Raumtemp. reagieren lassen
4) Waschvorgang	- siehe 2)
5) Visualisierung	- 5 bis 10 µl des sekundären Antikörpers auf den luftgetrockneten Schnitt geben - in der feuchten Kammer lichtgeschützt 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
6) Waschvorgang	- siehe 2), Schnitt darf jedoch nicht trocknen
7) Haltbarmachen der Fluoreszenz	- auf den feuchten Schnitt einen Tropfen einer Lösung von 0,1 % p-Phenylendiamin in Glycerin/PBS (9:1) geben und mit einem Deckglas versehen - Lagerung der Schnitte im Kühlschrank und fotografieren innerhalb einer Woche

Tabelle 2.2: Arbeitsanleitung zur immunhistochemischen Untersuchung von Gefrierschnitten

PBS=phosphatgepufferte Kochsalzlösung, BSA=bovines Serumalbumin

Tabelle 2.3: Auflistung der verwendeten Antikörper

Antikörper	gebräuchliche Bezeichnung, Rezeptor oder spezifischer Bindungsort: Ligand	Ig-Subklasse	Spezies	Klon	Hersteller	Verdünnung
<i>a) nichtkommerziell erhältliche primäre Antikörper</i>						
TE 3	kortikales Thymusepithel, intrazellulär	IgG	Maus	TE-3	ATCC	keine
TE 4	Medulla, endokrine Thymusepithelzellen	IgM	Maus	TE-4	ATCC	keine
TE 7	Thymuskapsel, Septen und Fibroblasten	IgG	Maus	TE-7	ATCC	keine
TE 8	differenzierte Thymusepithelzellen: Hassall'sche Körperchen	IgG	Maus	TE-8	ATCC	keine
TE 15	differenzierte Thymusepithelzellen: Hassall'sche Körperchen	IgM	Maus	TE-15	ATCC	keine
TE 16	differenzierte Thymusepithelzellen: Hassall'sche Körperchen	IgG	Maus	TE-16	ATCC	keine
TE 19	differenzierte Thymusepithelzellen: Hassall'sche Körperchen	IgM	Maus	TE-19	ATCC	keine
<i>b) kommerziell erhältliche primäre Antikörper</i>						
CD 29	Integrin β 1	IgG	Maus	4B4	Immunotech	keine
CD 49a	VLA1, Integrin α 1: Kollagenrezeptor, Lamininrezeptor	IgG	Maus	HP2B6	Immunotech	keine
CD 49b	VLA2, Integrin α 2: Kollagenrezeptor, Lamininrezeptor	IgG	Maus	Gi9	Immunotech	keine
CD 49c	VLA3, Integrin α 3: Lamininrezeptor	IgG	Maus	C3VLA3	Immunotech	keine
CD 49e	VLA5, Integrin α 5: Fibronektinrezeptor	IgG	Maus	SAM1	Immunotech	keine
CD 54	ICAM1	IgG	Maus	84H10	Immunotech	keine
CD 58	LFA3, bindet LFA2 (CD 2)	IgG	Maus	AICD58	Immunotech	keine
CD 61	Integrin β 3, gpIIIa	IgG	Maus	SZ21	Immunotech	keine
<i>c) sekundäre Antikörper</i>						
Gam-FITC	schwere Ketten von Maus-IgG	IgG	Ziege		Immunotech	1:25
Gam-FITC	schwere Ketten von Maus-IgM	IgM	Ziege		Immunotech	1:25