

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

15 ml Röhren	Nunc; TPP
50 ml Röhren	Sarstedt
Brutschrank	Heraeus
ELISA-Reader	Tecan
Histologiekassetten	Simport
Kanülen Sterican Größe 12	Braun
Kühlplatte CP60	Microm
Microslide Objektträger	Corning
Microtiterplatten-Module	Nunc-Immuno Modules
Mikrotiterplattenzentrifuge	Heraeus Labofuge II
Mikroskop	Zeiss 473011-9901
Mikroskop mit Digitalkamera	Axiostar von Zeiss
Rotationsmikrotom HM355	Microm
Multichannelpipette	Costar
Objektträger	DAKO
Pipetten	Eppendorf
	Pipetus-akku, Hirschmann
Pipetten 5 ml/ 10 ml/ 25 ml	Falcon
Präparierbesteck	Aesculap
Reaktionsgefäße 0,5 ml	PCR Softtubes, Biozym
	Safe-Lock, Eppendorf
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Brand
Spritzen 1 ml	Omnifix-F 1 ml, Braun
Sterile Arbeitsbank	Lamina Air Flow Class 100, Gelman Instrument
Zählkammer	Neubauer
Zentrifugen	Heraeus

**2.1.2 Chemikalien**

2M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Abt. Med. Mikrobiologie
Aqua dest.	Abt. Med. Mikrobiologie
BSA	Sigma, #A7030
Chloralhydrat	Merck, #1024250500
Con-A	Sigma, #C-5275
CuSO <sub>4</sub>	Merck, #2791
DAB-Tabletten	Sigma, # D-4293
Eisessig	Sigma, #33209
Entellan	Merck, #107960
Eosin	Merck, #1345
Ethanol	Merck, #818760
FCS 2%	Biochrom KG, #S0115
Formalin 37% Lsg.	Sigma, #F-1635
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30% Lsg. in Wasser)	Aldrich, #21,676-3
Hämatoxylin	Merck, #4305
Hepes Puffer	Sigma, #H0887
Iso-Propanol	Sigma, #I0398
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 3H <sub>2</sub> O	Merck, #105099
Kalialaun (KAl(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> · 12H <sub>2</sub> O)	Merck, #1010471000
L-Glutamin (200mM)	Biochrom KG, #K0282
MEM-Medium	Sigma, #M0268
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	Merck, #6345
NaCl	Merck, #1064041000
NaHCO <sub>3</sub>	Merck, #6329
Natriumjodat	Riedel-De Haën AG, #B888/8349
NH <sub>3</sub>	Sigma, #422975
PAP	Dako, # ZO113
PBS	Bio Whittaker, #15513D

---

Penicillin/Streptomycin	Biochrom KG, #A2212 Konz.: 10000 µg/ml
RPMI-Medium	Cell Concepts, #M-L4101-I
Streptavidin-Peroxidase	Amersham, #RPN1051
TLA	Lysat aus ME49-Zysten, AG Liesenfeld
TMB-Tabletten	Sigma, #64285-73-0
Trypanblau 0,5% in physiologischer NaCl-Lösung	Biochrom KG, #L6323
Tween 20	Sigma, #P7949
Xylol	J.T.Baker, #UN1307
Zitronensäure	Sigma, #C8532

### 2.1.3 Antikörper und Zytokine

#### Antikörper zur Behandlung der Mäuse

Mouse-anti-mouse-IL-18	SK113AE4, Konz.: 3,5 mg/ml AG Prof. I. Förster, München
Anti-mouse-IL-12	C17.8 Aszites, Konz.: 10 mg/ml, C.A. Hunter, Univ. of Pennsylvania, USA
Kontroll-IgG	Anti- <i>E. coli</i> -β-Galaktosidase, Klon GL113, Konz.: 3.8 mg/ml Prof. J. Remington, Stanford University, USA

#### Coating-Antikörper für ELISA

Purified rat anti-mouse-IL-12p40p70	Pharmingen, #18491D Konz.: 2 mg/ml
Purified rat anti-mouse-IFN- $\gamma$	Pharmingen, #18181D Konz.: 1 mg/ml
Purified rat anti-mouse-TNF- $\alpha$	Pharmingen, #554641 Konz.: 2 mg/ml



## 2.1.4 Puffer und Lösungen

### Coating Puffer für ELISA

0,1M NaHCO<sub>3</sub> in PBS

M=84,01 g/mol ⇒ 0,8401 g in 100 ml PBS lösen

### Blockingpuffer für ELISA

1% BSA in PBS, evtl. mit 0,02% NaN<sub>3</sub> konservieren

### Waschpuffer für ELISA

0,05% Tween/PBS (1 ml Tween 20 in 2 l PBS lösen)

### Substratpuffer für ELISA

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2M

Zitronensäure 0,1M

in Aqua dest.

für 500 ml: 128,5 ml Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

121,5 ml Zitronensäure

250 ml Aqua dest.

### Streptavidin-Peroxidase für ELISA

1:1000 verdünnt in Blockingpuffer

### TMB-Substrat-Lösung für ELISA

Eine TMB-Tablette in 10 ml Substratpuffer lösen, kurz vor dem Auftragen 2 µl 30%iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zugeben.

### Waschpuffer des IL-18-ELISA kits

Ein Päckchen des Pulvers in 1000 ml Aqua dest. lösen bzw. das flüssige Pufferkonzentrat 1:10 mit Aqua dest. verdünnen.

### Konjugatlösung des IL-18-ELISA kits (anti-mouse-IL-18 mit Peroxidase)

Verdünnung 1:101 ⇒ 99 µl Konjugatreagenz in 10 ml Conjugate diluent lösen

Formalin-Lösung 5%ig

Formalin-Stammlösung (37%ig) 1:20 mit Aqua dest. verdünnen.

Hämatoxylin

1 g Hämatoxylin  
0,2 g Natriumjodat  
50 g Kalialaun  
50 g Chloralhydrat  
1 g kristalline Zitronensäure  
ad 1000 ml Aqua dest.

Eosin

1 g Eosin  
3 Tropfen Eisessig  
ad 100 ml Aqua dest.

mPBS-Stammlösung

150,4 g  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$   
26 g  $Na_2HPO_4 \cdot H_2O$   
800 ml Aqua dest.

mPBS-Gebrauchslösung

20 ml der mPBS-Stammlösung  
480 ml Aqua dest., den pH (mit NaOH bzw. HCl) auf 7,4 einstellen

DAB-Lösung

DAB-Tablette in 5 ml PBS lösen, abgedunkelt lagern

DAB-Arbeitslösung

2 ml des bräunlichen Überstandes der DAB-Lösung  
10  $\mu$ l 30%iges  $H_2O_2$

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung für PAP-Färbung4 ml 30%iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

36 ml Aqua dest.

CuSO<sub>4</sub>-Lösung

100 ml 0,85%ige NaCl-Lösung

0,5 g CuSO<sub>4</sub>Lysepuffer

Aqua dest. + MEM- Medium im Verhältnis 2:1

**2.1.5 Mäuse**

Es wurden weibliche Mäuse verwendet, die in den Tierställen der Abteilung für Medizinische Mikrobiologie der Charité CBF in Käfigen zu bis zu 12 Tieren gehalten wurden. Die Tiere hatten sterilisiertes Trockenfutter sowie eine Wasserflasche zur Verfügung. Die verwendeten Knockout-Mäuse hatten alle einen C57BL/6-Hintergrund. Genehmigung der Tierversuchsvorhaben durch das Landesamt für Gesundheit und technische Sicherheit (Genehmigungsnummern: 0035/98 und 0046/00).

C57BL/6-Mäuse	Zucht der Abt. Med. Mikrobiologie der Charité CBF
NMRI-Mäuse	Zucht der Abt. Med. Mikrobiologie der Charité CBF
ICSBP-KO-Mäuse	Prof. I. Horak, Experimentelle Genetik, Charité CBF
IL-18-KO-Mäuse	K. Takeda, Department of Host Defense, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Japan
TNF- $\alpha$ -Rp55-KO-Mäuse	Prof. K. Pfeffer, Abt. für Mikrobiologie, TU München

**2.1.6 *Toxoplasma gondii***

Stamm ME49 (Prof. J. Remington, Stanford University, USA), zystenbildend und Maus-avirulent (Typ-II-Stamm).

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Orale Infektion mit *T. gondii*

Die Mäuse wurden unter speziellen keimfreien Bedingungen in den Tierlaboren der Abteilung für Medizinische Mikrobiologie der Charité CBF geboren und gehalten. Alle verwendeten Mäuse waren zu Versuchsbeginn 6-12 Wochen alt. Die orale Infektion der Mäuse erfolgte mit 100 bzw. 10 Zysten *T. gondii* (ME49-Stamm), die aus Gehirnen von infizierten NMRI-Mäusen am gleichen Tag gewonnen wurden. Die NMRI-Mäuse waren 2-3 Monate vorher mit 10 Zysten i.p. infiziert worden. Ein Gehirn wurde in 1 ml PBS in einem Mörser zerrieben, in ein 15 ml-Röhrchen überführt und auf Eis gelagert. Die Anzahl der Zysten wurde in 20 µl Gehirnsuspension unter dem Mikroskop bestimmt. Die Suspension wurde für die erforderliche Zystenkonzentration ggf. mit PBS verdünnt und den Mäusen mit jeweils 0,2 – 0,4 ml Volumen mithilfe einer gebogenen Knopfkanüle oral verabreicht.

### 2.2.2 Antikörperbehandlung der Mäuse

Die Injektion der Antikörper erfolgte bei zweimaliger Injektion an Tag 2 und 5 und bei einmaliger Injektion an Tag 2. Nach Desinfektion wurde intraperitoneal in den rechten Unterbauch der Maus injiziert.

Zweimalige Injektion: jeweils 500 µg anti-IL-18 (in 0,14 ml)  
jeweils 2000 µg anti-IL-12 (in 0,2 ml)  
Kontrollgruppe: 500 µg anti-*E. coli*-β-Galaktosidase- AK bzw.  
100 µg anti-*E. coli*-β-Galaktosidase- AK im Versuch  
anti-IL-18 versus anti-IL12

Einmalige Injektion: 600 µg anti-IL-18 (in 0,17 ml)  
Kontrollgruppe: 0,2 ml steriles PBS

### 2.2.3 Organentnahme

Die Mäuse wurden am 7. oder 8. Tag nach der Infektion durch CO<sub>2</sub>-Inhalation und zervikale Dislokation getötet. Wurde zusätzlich zur Organentnahme eine Blutentnahme mittels Herzpunktion zur Gewinnung von Serum durchgeführt, so wurden die Mäuse mit Halothan anstelle von CO<sub>2</sub> betäubt. An Organen wurden ein Leberlappen,



ein Lungenflügel, die Hälfte der Milz, das Herz, ein Teil der mesenterialen Lymphknoten sowie 10 cm Dünndarm (v.a. Ileum) entnommen und in 5%-Formalin-Lösung fixiert. Der Darmabschnitt wurde dazu mit dem distalen Ende nach außen in der Histologiekassette zu einer sog. „Schweizer Rolle“ aufgerollt.

#### **2.2.4 Histologische Methoden**

Die Organe wurden nach Entfernung des Formalin im Institut für Pathologie der Charité CBF in Paraffin eingebettet, in 5 µm dünne Schichten geschnitten und über Nacht bei 37°C auf dem Objektträger fixiert. Die Schnitte wurden mit Hämatoxylin/Eosin bzw. mit der Immunoperoxidase-Färbung gefärbt.

##### **2.2.4.1 Färbung mit Hämatoxylin und Eosin**

Die Objektträger wurden nacheinander für die angegebene Zeit in Glasküvetten in folgende Lösungen getaucht:

2 x Xylol	je 5 min
Iso-Propanol	5 min
abs. Ethanol	5 min
80%-Ethanol	5 min
70%-Ethanol	5 min
Hämatoxylin	5 min
Abspülen und Bläuen in Leitungswasser	10 min
Eosin (Inkubationszeit je nach Frische des Eosin)	0,5-2,5 min
Abspülen in Aqua dest.	
70%-Ethanol	5 min
80%-Ethanol	5 min
abs. Ethanol	5 min
Iso-Propanol	5 min
2 x Xylol	je 5 min

Die Schnitte wurden mit Entellan eingedeckt.

#### 2.2.4.2 Polyklonale Immunoperoxidase-Färbung am Paraffinschnitt

Diese Färbung diente dem histologischen Nachweis von *T. gondii* in Gewebeschnitten. Es wurde immer ein positiver Kontrollschnitt mitgeführt.

Antikörper, Serum und Reagenzien wurden in mPBS-Gebrauchslösung verdünnt.

Entparaffinieren der Schnitte:	3 x Xylol	je 5 min
	Isopropanol	5 min
	abs. Ethanol	5 min
	80% Ethanol	5 min
	70% Ethanol	5 min
	Aqua dest.	

Zur Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität im Gewebe wurden die Schnitte in einer Küvette in einer 3%igen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung (4 ml 30%iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 36 ml Aqua dest.) für 15 min inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte mehrmals mit Aqua dest. gespült und für 5 min in mPBS inkubiert. Es wurde nun Schweineserum, das 1:10 in mPBS verdünnt wurde, mit einer Pipette auf die liegenden Schnitte aufgetragen und vorsichtig auf ihnen verteilt, so dass die Schnitte vollständig bedeckt waren. Nach einer Inkubationszeit von 30 min wurden die Objektträger um die Schnitte herum abgewischt. Der nun aufzubringende polyklonale Primärantikörper gegen *T. gondii* aus dem Serum eines mit *T. gondii* infizierten Kaninchens wurde 1:70 (bzw. 1:250) in mPBS verdünnt und mit der Pipette auf die Schnitte aufgetragen. Die Schnitte inkubierten über Nacht bei 4° C in einer feuchten Kammer. Die Schnitte wurden mit mPBS abgespült und für 5 min in mPBS in der Küvette inkubiert. Der Sekundärantikörper (Schwein-anti-rabbit-Ig) wurde 1:100 in mPBS verdünnt und nach Auftragen auf die Schnitte mit der Pipette für 30 min abgedeckt bei RT inkubiert. Die Schnitte wurden wieder mit mPBS gespült und 5 min darin inkubiert. Die PAP wurde in einer 1:100-Verdünnung in mPBS auf die Schnitte aufpipettiert und für 30 min bei RT inkubiert. Die Schnitte wurden in mPBS gespült und 5 min darin inkubiert. Zu 2 ml des bräunlichen Überstandes der DAB-Lösung wurden 10 µl 30%iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hinzugefügt. Diese DAB-Arbeitslösung wurde mit der Pipette auf die Schnitte aufgebracht und 5 min inkubiert. Die Intensität der entstehenden Braunfärbung wurde am Kon-

trollschnitt unter dem Mikroskop beobachtet und die Inkubationszeit ggf. angepasst. Die Objektträger wurden 5 min in mPBS abgespült, dann 5 min in Aqua dest. inkubiert bevor sie in einer Küvette für 5 min in CuSO<sub>4</sub>-Lösung standen.

Anschließend spülte man die Schnitte unter Leitungswasser ab.

Zum Gegenfärben der Schnitte wurden sie für jeweils 15 Sekunden nacheinander in Hämatoxylin, Leitungswasser und 1%ige Ammoniaklösung getaucht.

Es folgte eine aufsteigende Alkoholreihe:	80% Ethanol	5 min
	abs. Ethanol	5 min
	Isopropanol	5 min
	2 x Xylol	je 5 min

Die histologischen Schnitte wurden mit Entellan eingedeckt.

#### **2.2.4.3 Auswertung der histologischen Schnitte und Aufnahme der Fotos**

In den HE-gefärbten Darmschnitten wurde bei 200facher Vergrößerung die Länge der nekrotischen Bereiche ausgemessen, in den Leberschnitten die nekrotischen Bereiche in einem zufällig gewählten Gesichtsfeld bei 100facher Vergrößerung ausgezählt. In Darmschnitten, die mit der Immunoperoxidase-Färbung gefärbt wurden, wurden die *T. gondii*-Vakuolen jeweils in einem zufällig ausgewählten 1 cm langen Stück distal und proximal bei 200facher Vergrößerung gezählt. Außerdem wurden besonders parasitenreiche Bereiche (sog. fokale Areale) im gesamten Darmabschnitt gezählt. In Immunoperoxidase-gefärbten Leberschnitten wurden die Parasiten im zufällig gewählten Gesichtsfeld bei 400facher Vergrößerung gezählt. Repräsentative Ausschnitte der histologischen Schnitte wurden bei der jeweiligen Vergrößerung digital fotografiert und mit der EasyBase<sup>®</sup>-Software der Mikroskopanlage (Axiostar, Zeiss) ggf. etwas aufgehellt oder abgedunkelt.

### 2.2.5 Lymphozytenisolation aus der Milz und den mesenterialen Lymphknoten

<u>Material:</u>	steriles und unsteriles Präparierbesteck (Pinzette + Schere) 2 mit 10 ml MEM-Medium gefüllte Petrischalen pro Tier Microslides (Objekträger mit rauher Oberfläche) 15 ml- und 50 ml-Zentrifugenröhrchen Eis Zählkammer
<u>Lösungen:</u>	MEM-Medium mit 10% FCS, 5 mM HEPES, Pen.+ Strep. RPMI-Medium mit Glutamin., Pen.+ Strep., 10% FCS FCS (2%) Lysepuffer Trypanblau

#### Durchführung:

Die Tiere wurden durch CO<sub>2</sub>-Inhalation betäubt und durch zervikale Dislokation getötet. Die Maus wurde auf dem Rücken liegend mit den vier Pfoten vom Körper weggestreckt auf einer Korkunterlage mit Nadeln festgesteckt. Die Bauchhaut wurde nach Besprühen mit Ethanol mit zwei Pinzetten von der Mitte aus nach oben und unten auseinandergezogen. Anschließend wurde das Peritoneum mit einer sterilen Schere erst von oben nach unten, dann zu beiden Seiten aufgetrennt. Die MLN sowie die Hälfte der Milz wurden in jeweils eine mit 10 ml MEM-Medium gefüllte Petrischale gelegt und auf Eis gelagert.

Die folgenden Schritte wurden unter der sterilen Arbeitsbank durchgeführt:

Die Milz bzw. die MLN wurden mit den aufgerauten Enden zweier Microslide-Objekträger zerrieben und die Zellen im Medium der Petrischale gelöst. Die Zellsuspension wurde mit einer 10 ml Pipette zehnmal auf- und abpipettiert, um Zellklumpen zu lösen. Die Suspension wurde in 15 ml-Röhrchen für 5 min auf Eis gestellt. Der entstehende Überstand wurde in ein mit 20 ml MEM-Medium gefülltes 50 ml-Röhrchen pipettiert und darin mit Hilfe der Pipette gemischt. Das 50 ml-Röhrchen wurde für 10 min und 4°C bei 1200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die abgesetzten Zellen (v.a. Leukozyten und Erythrozyten) mit 3 ml Lysepuffer gemischt, um Erythrozyten zu zerstören.

Ein 15 ml-Röhrchen wurde mit 2 ml FCS (2%) gefüllt und die Zellsuspension langsam oben auf das FCS pipettiert. Das Röhrchen wurde für 10 min und 4° C bei 1200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum verworfen und die Zellen in 7 ml MEM-Medium aufgenommen. Es erfolgte wieder eine Zentrifugation für 10 min und 4° C bei 1200 rpm. Nachdem der Überstand verworfen wurde, wurden die Milzzellen in 2 ml, die MLN-Zellen in 1 ml RPMI-Medium aufgenommen und auf Eis gestellt.

Um die Zellen zu zählen, wurde eine 1:10-Verdünnung hergestellt, indem 90 µl RPMI-Medium mit 10 µl Zellsuspension gemischt wurden. Mit dem Farbstoff Trypanblau wurde nochmals eine 1:2-Verdünnung hergestellt, indem 10 µl der vorangegangenen Verdünnung mit 10 µl Trypanblau vermischt wurden.

Es wurden 10 µl entnommen und in eine Zählkammer gegeben, in der zwei Quadrate à 16 Kästchen ausgezählt wurden.

Berechnung der Zellzahl:            Durchschnitt beider Quadrate •  $10^4$  • 20 • 2 ml  
(bzw. 1 ml wenn MLN-Zellen)

Die Zellsuspensionen wurden jeweils auf  $4 \cdot 10^6$  Zellen/ml verdünnt.

Die Zellen wurden in der folgenden Zellkultur entweder mit Con-A oder mit TLA stimuliert.

Con-A-Stimulation:            Das Con-A wurde mit RPMI-Medium auf eine Konzentration von 10 µg/ml verdünnt. Jedes well wurde mit 100 µl beschickt.

TLA-Stimulation:            Das TLA wurde mit RPMI-Medium auf eine Konzentration von 10 µg/ml verdünnt. Jedes well wurde mit 100 µl beschickt.

#### Ausplattieren der Zellen

Pro Tier und Zellart wurden in sterilen Mikrotiterplatten je sechs wells mit 100 µl RPMI-Medium, sechs mit 100 µl Con-A und sechs mit 100 µl TLA beschickt.

In alle 18 wells wurden anschließend 100 µl der entsprechenden Zellsuspension pipettiert. Die Außenreihen der Mikrotiterplatten wurden mit je 200 µl RPMI-Medium beschickt.

Die Zellen wurden nun für 48 Stunden bei 37° C in 5%-CO<sub>2</sub>-Atmosphäre inkubiert.

### Abnehmen der Zellüberstände

Die Mikrotiterplatten wurden nach 48 Stunden für 10 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden 180 µl Überstand vorsichtig entnommen, in ein 0,5 ml- Röhrchen pipettiert und bei  $-70^{\circ}$  C eingefroren.

## **2.2.6 ELISA für Zytokine im Serum und in Zellüberständen**

### **2.2.6.1 ELISA für IFN- $\gamma$ , IL-12 und TNF- $\alpha$**

Ein ELISA dient dem quantitativen Nachweis von Proteinen. Hierzu wird ein gegen das zu bestimmende Protein gerichteter Antikörper auf einem Kunststoffträger fixiert. Anschließend wird darauf die Probe inkubiert, wonach ein gegen das Protein gerichteter biotinylierter Antikörper aufgebracht wird. Das mit dem Enzym Peroxidase gekoppelte Streptavidin bindet an diesen Komplex, woraufhin die Peroxidase unter Zugabe des Substrates TMB +  $H_2O_2$  einen Farbstoff bildet, der photometrisch quantifiziert wird. Die Proteinkonzentration in der Probe wird mittels Vergleich der Farbreaktionen in Standards bekannter Konzentration anhand einer Standardkurve ermittelt.

In dieser Arbeit wurden mittels ELISA die Zytokinkonzentrationen in Serum und Zellüberständen bestimmt. Hierfür wurden Mikrotiterplatten à 96 wells mit je 50 µl des entsprechenden Antikörpers beschichtet (Coating) und über Nacht bei  $4^{\circ}$  C in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach wurden die Platten mit Waschpuffer zweimal gespült, mit 200 µl/well Blockingpuffer beschickt und 30 min bei  $37^{\circ}$  C in der feuchten Kammer inkubiert. Nach zweimaligem Waschen der Platten wurden je 50 µl/well der Proben und der Standards (mit der höchsten Konzentration eine 1:2-Verdünnungsreihe mit 9 Verdünnungsstufen herstellen) sowie ein Leerwert aufgetragen, wonach über Nacht bei  $4^{\circ}$  C in der feuchten Kammer inkubiert wurde. Die Platten wurden viermal gewaschen und mit dem biotinylierten Antikörper zu je 50 µl/well versehen. Nach 45 min Inkubation bei RT in der feuchten Kammer wurde viermal gewaschen, die Streptavidin-Peroxidase-Lösung mit 75 µl/well aufpipettiert und für 30 min bei RT in der feuchten Kammer inkubiert. Die Platten wurden viermal gewaschen, mit 75 µl/well der TMB-Lösung versehen und 15 min abgedunkelt bei RT inkubiert. Die entstehende Farbreaktion wurde mit 50 µl/well 2M  $H_2SO_4$  gestoppt und die Extinktion bei 405/620 nm im Tecan<sup>®</sup>-Reader gemessen.

Mit dem Programm Microsoft Excel<sup>®</sup> wurde anhand der Extinktionen der Standards bekannter Konzentration eine Standardkurve erstellt, mittels der die Zytokinkonzentrationen der Proben errechnet wurden. Die Serumproben waren im ELISA 3-5fach mit PBS verdünnt, was in der Berechnung der Zytokinkonzentrationen wieder berücksichtigt wurde. Die errechneten Konzentrationen der verdünnten Proben, deren Extinktion der des Leerwertes entsprach, wurden nicht mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert.

#### Verwendete Verdünnungen:

Coating-Antikörper:	rat anti-mouse-IFN- $\gamma$	1:250 in Coating-Puffer
	rat anti-mouse-IL-12p40p70	1:1000 in Coating-Puffer
	rat anti-mouse-TNF- $\alpha$	1:500 in Coating-Puffer
Standards:	IFN- $\gamma$	1:1000 auf 10 ng/ml
	IL-12	1:100 auf 20 ng/ml
	TNF- $\alpha$	1:5 auf 20 ng/ml

Die Standards wurden im ELISA der Zellüberständen mit RPMI-Medium verdünnt, bei Serumproben mit PBS.

Biotinylierte Antikörper:	Biotin anti-IFN- $\gamma$	1:1000 in Blockingpuffer
	Biotin anti-IL-12	1:250 in Blockingpuffer
	Biotin anti-TNF- $\alpha$	1:125 in Blockingpuffer
Sensitivitätsgrenzen:	IFN- $\gamma$ -ELISA:	ca. 100 pg/ml
	IL-12-ELISA:	ca. 100 pg/ml
	TNF- $\alpha$ -ELISA:	ca. 150 pg/ml

### 2.2.6.2 ELISA für IL-18

Für die Bestimmung der IL-18-Konzentrationen wurde das Mouse IL-18 ELISA Kit von MBL<sup>®</sup>, Japan verwendet.

Ansetzen des IL-18-Standards: Das Standard-Pulver wurde in 1 ml Assay diluent gelöst (2500 pg/ml) und daraus eine 1:2,5- Verdünnungsreihe mit 5 Stufen hergestellt, d.h. die höchste Standardkonzentration betrug 1000 pg/ml. Die Serumproben wurden mit dem Assay diluent des Kits 1:4 oder 1:5 verdünnt. Auf die bereits gecoatete (d. h. mit dem Primär-AK versehene) Platte wurden 100 µl/well der Proben und der Standards aufgebracht, für 60 min bei RT inkubiert und anschließend viermal mit Waschpuffer gewaschen. Pro well wurden 100 µl der Konjugatlösung pipettiert und 60 min bei RT inkubiert. Nach viermaligem Waschen wurden 100 µl/well Substratreagenz aufgetragen und 30 min bei RT inkubiert. Die Farbreaktion wurde mit 100 µl 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gestoppt. Die Extinktionsmessung erfolgte bei 450/620 nm.

Sensitivitätsgrenze des IL-18-ELISA: 25 pg/ml

### 2.2.6.3 Zytokinkonzentrationen nichtinfizierter Mäuse

**Tab. 1: Zytokinkonzentrationen im Serum nichtinfizierter Mäuse. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert zweier Tiere mit Standardabweichung.**

	MW in ng/ml	Stabw.	MW in ng/ml	Stabw.
	<b>IFN-<math>\gamma</math></b>		<b>IL-12</b>	
C57BL/6	1,55	0,31	5,09	0,09
ICSBP-KO	1,55	0	n. d.	
IL-18-KO	1,11	0	3,55	0,51
TNF- $\alpha$ R- KO	0,78	1,09	4,24	0,09

	MW in ng/ml	Stabw.	MW in ng/ml	Stabw.
	<b>IL-18</b>		<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	
C57BL/6	0,31	0,02	n. d.	
ICSBP-KO	0,29	0,01	7,26	4,77
IL-18-KO	n. d.		2,15	0,38
TNF- $\alpha$ R- KO	0,24	0,14	2,56	0,95

n. d.: nicht detektierbar



**Tab. 2: IFN- $\gamma$ -Konzentrationen in Zellüberständen von Zellen aus MLN und Milz nichtinfizierter Mäuse nach 48 h TLA-Stimulation. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert zweier Tiere mit Standardabweichung.**

	MLN		Milz	
	MW in ng/ml	Stabw.	MW in ng/ml	Stabw.
C57BL/6	0,15	0,01	n. d.	
ICSBP-KO	0,14	0,02	0,13	0,03
IL-18-KO	n. d.		0,15	0,01
TNF- $\alpha$ R- KO	n. d.		0,17	0,02

n. d.: nicht detektierbar

### 2.2.7 Statistische Analyse

Für alle statistischen Auswertungen wurde ein einheitliches Signifikanzniveau von  $\alpha \leq 0,05$  festgelegt. Bei Durchführung eines statistischen Tests mit signifikantem Ergebnis ist die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  angegeben. Es wurde der *Mann-Whitney-Test* durchgeführt, da eine Normalverteilung aufgrund der geringen Stichprobengrößen nicht gesichert werden konnte. Der Test wurde mit der Software GraphPad In-Stat 3<sup>®</sup> durchgeführt.