

Aus dem Institut für Infektionsmedizin der Freien Universität Berlin , Abt.  
Medizinische Mikrobiologie und Infektionsimmunologie, Geschäftsführender Direktor  
und Abteilungsleiter: Prof. Dr. med. H. Hahn

Mechanismen der Granulomentstehung im Modell der  
murinen Infektion mit zwei unterschiedlich virulenten  
Stämmen von *Mycobacterium avium*

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde  
des Fachbereich Humanmedizin der Freien Universität Berlin  
vorgelegt von: Holger Hänsch  
aus  
Bremen  
2000

Referent: Prof. Dr. med. H. Hahn

Korreferent: Prof. Dr. med. R. Burger

Gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereichs Humanmedizin der Freien  
Universität Berlin

Promoviert am 06.04.2001

Zur Zeit versterben 20-50% der AIDS-Patienten mit Infektionen mit Mycobacterium .avium. Eine konventionelle Therapie mit Antituberkulotika ist aufgrund natürlicher Resistenzen von M. avium schwierig. Eine genaue Kenntnis der immunologischen Grundlagen der Infektion ist daher nötig um neue Therapieansätze entwickeln zu können.

Granulome sind das histopathologische Korrelat einer Infektion mit M. avium. Bisher war jedoch nur wenig über die Granulomentstehung und Unterhaltung im Gewebe bekannt. In der vorliegenden Arbeit sollte daher ein Modell zur Beobachtung des histopathologischen Verlaufs geschaffen werden. Im weiteren sollte durch gezieltes Ausschalten von einzelnen T-Zellsubpopulationen deren Funktion in der Granulomentstehung untersucht werden. Abschließend sollte unterhalb der zellulären Ebene durch die Neutralisation von Zytokinen der Einfluß auf Granulome untersucht werden.

Es wurden C57bl-Mäuse über die Schwanzvene mit  $1 \times 10^5$  M. avium infiziert und der Infektionsverlauf beobachtet. Während ein hoch-virulenter Stamm (TMC 724) ein kontinuierliches Wachstum im Gewebe zeigt und zum Tod der Versuchstiere nach etwa 13 Wochen führt, stagniert das Wachstum eines niedrig-virulenten Stammes (SE 01) nach etwa vier Wochen, eine Keimüberwindung findet jedoch nicht statt.

In der immunkompetenten C57bl-Maus wird die Granulommorphologie durch die unterschiedliche Virulenz von verschiedenen M.-avium-Stämmen beeinflusst. Nach Infektion mit TMC 724 nimmt die Granulomgröße kontinuierlich bis zum Tode der Tiere zu. Nach Infektion mit SE 01 stagniert das Granulomwachstum parallel zum Keimwachstum nach vier Wochen, danach nimmt jedoch der Organisationsgrad der Granulome zu.

Die Depletion von CD4+-T-Zellen führt nach der Infektion mit M. avium in den ersten vier Wochen nach Infektion zur Unterdrückung der Granulomentstehung, die Depletion von CD8+-T-Zellen bleibt ohne Einfluß.

In der immuninkompetenten Scid-Maus kommt es nach Neutralisation von  $\text{TNF}\alpha$  oder  $\text{IFN}\gamma$  in den ersten vier Wochen nach Infektion ebenfalls zu einer Verhinderung der Granulomentstehung.

Das von CD4+-T-Zellen produzierte IFN $\gamma$  ist für die Granulomentstehung unverzichtbar. Da sich bei AIDS funktionsfähige CD4+-T-Zellen nicht von Mensch zu Mensch übertragen lassen, die Therapie mit IFN $\gamma$  aber prinzipiell möglich ist, könnte hier ein möglicher Ansatz für eine Immuntherapie sein. In weiteren Experimenten wäre eine genaue Untersuchung der Rolle der an der Granulomentstehung beteiligten Zytokine wünschenswert, um diese These zu überprüfen.

Das Granulom scheint eine wichtige Rolle in der Überwindung bzw. Kontrolle der Infektion mit *M. avium* zu bilden. Diese Arbeit kann als Basis für weitere Experimente genutzt werden, um den Zusammenhang zwischen immunologischem Schutz und Granulom weiter zu untersuchen.

1.	Einleitung.....	6
1.1	Allgemeines.....	6
1.2	Problemstellung.....	7
1.3	Stand der Forschung.....	8
1.3.1	Charakteristik von MAC.....	8
1.3.2	Pathogenese der MAC-Infektion im Menschen.....	9
1.3.3	Klinisches Bild der MAC-Infektion im Menschen.....	9
1.3.3.1	Bei immunkompetenten Erwachsenen.....	9
1.3.3.2	Bei immunkompetenten Kindern.....	10
1.3.3.3	Bei Patienten mit AIDS.....	10
1.3.3.4	Bei immunsupprimierten Nicht-AIDS-Patienten.....	11
1.3.4	Die Abwehrreaktion gegen MAC.....	11
1.3.4.1	Phagozytose.....	11
1.3.4.2	Interaktion von T-Zellen und antigenpräsentierenden Zellen.....	11
1.3.4.3	Granulombildung.....	12
1.3.4.3.1	Granulombildung bei MAC-infizierten immunkompetenten Patienten.....	13
1.3.4.3.2	Granulombildung bei MAC-infizierten AIDS-Patienten.....	13
1.3.5	Das murine Modell der MAC-Infektion.....	14
1.3.5.1	Zytokine.....	15
1.3.5.1.1	TNF $\alpha$ .....	15
1.3.5.1.2	IFN $\gamma$ .....	16
1.4	Zielstellung.....	17
1.5	Arbeitsplan.....	18
2	Materialien und Methoden.....	19
2.1	Materialien.....	19
2.1.1	Geräte.....	19
2.1.2	Chemikalien.....	19
2.1.3	Versuchsmaterialien und Instrumente.....	20
2.1.4	Materialien für die Bakterienkultur.....	21
2.1.5	Antikörper.....	21

2.1.6	Lösungen für die Immunhistologie.....	22
2.1.6.1.1	Verdünnungsmedium für Antikörper .....	22
2.1.6.1.2	Spülpuffer .....	22
2.1.6.1.3	Entwicklungspuffer .....	22
2.1.6.1.4	Neufuchsin-Lösung.....	22
2.1.6.1.5	Entwickler-Lösung .....	22
2.1.6.1.6	Primärantikörper-Lösung .....	23
2.1.7	Versuchstiere.....	23
2.1.8	Genehmigung der Tierversuche .....	24
2.1.9	Bakterien .....	24
2.2	Methoden.....	25
2.2.1	Infektion der Versuchstiere .....	25
2.2.2	Organentnahme.....	25
2.2.3	In-vivo-T-Zelldepletion .....	25
2.2.4	In-vivo-Neutralisation von Zytokinen.....	26
2.2.5	Histologie.....	26
2.2.5.1	Präparation der Schnitte .....	26
2.2.5.2	Hämalaun-Eosin-Färbung.....	26
2.2.5.3	Modifizierte Ziehl-Neelsen Färbung für Gewebe .....	27
2.2.6	Immunhistologie .....	27
2.2.6.1	Herstellung der Präparate.....	27
2.2.6.2	Färbung .....	27
2.2.6.2.1	Primärantikörper .....	27
2.2.6.2.2	Blockierung des freien Biotins .....	28
2.2.6.2.3	Blockierung des freien Avidins.....	28
2.2.6.2.4	Sekundärantikörper .....	28
2.2.6.2.5	Streptavidin-alkalische-Phosphatase-Komplex.....	28
2.2.6.2.6	Entwicklung der alkalischen Phosphatase und Gegenfärbung.....	28
2.2.7	Bestimmung der Splenomegalie.....	29
2.2.8	Statistik.....	29

3	Ergebnisse.....	30
3.1	Verlauf der intravenösen Infektion mit <i>M.avium</i> in immunkompetenten Mäusen.....	30
3.1.1	Entwicklung der Keimzahlen (Abb. 1).....	30
3.1.2	Entwicklung des Körpergewichts (Abb. 2) .....	31
3.1.3	Entwicklung des Milzgewichts (Abb. 3).....	32
3.1.4	Histologie.....	32
3.1.4.1	Kinetik der Granulomentwicklung .....	32
3.1.4.2	Morphologie der Granulome (Abb. 4) .....	35
3.1.4.3	Identifikation der im Granulom befindlichen Zellen (Abb. 6) .....	36
3.2	Einfluß von T-Zell-Subpopulationen auf die Vorgänge bei der Granulomentwicklung .....	37
3.2.1	Einfluß von T-Zell-Subpopulationen auf den Infektionsverlauf.....	37
3.2.2	Einfluß der Depletion von T-Zellsubpopulationen auf das Milzgewicht (Abb. 7) .....	37
3.2.3	Einfluß der Depletion von T-Zellsubpopulationen auf das histologische Erscheinungsbild .....	38
3.3	Verlauf der intravenösen Infektion mit in SCID-Mäusen .....	39
3.3.1	Infektionsverlauf nach Infektion mit SE 01 in SCID- und BALB/c-Mäusen.....	40
3.3.2	Besonderheiten in der Histologie von SCID-Mäusen nach Infektion mit <i>M.avium</i> .....	43
3.3.2.1	Morphologie der Granulome .....	43
3.3.2.2	Kinetik der Granulomentwicklung (Abb.13).....	43
3.4	Neutralisation von IFN $\gamma$ bzw. TNF $\alpha$ in SCID-Mäusen.....	45
3.4.1	Infektionsverlauf nach Neutralisation von IFN $\gamma$ bzw. TNF $\alpha$ .....	46
3.4.2	Einfluß der Neutralisation von IFN $\gamma$ bzw. TNF $\alpha$ auf das Milzgewicht von SCID-Mäusen .....	46
3.4.3	Histologie nach Neutralisation von TNF $\alpha$ und IFN $\gamma$ (Abb. 15) .....	46

4	Diskussion .....	49
4.1	Infektionsverlauf in immunkompetenten Mäusen.....	49
4.2	Histopathologie und Milzgewicht in immunkompetenten Mäusen.....	49
4.3	Infektionsverlauf in SCID-Mäusen .....	50
4.4	Histopathologie in SCID-Mäusen.....	51
4.5	Untersuchung der Rolle der an der Granulombildung beteiligten Zellen ..	51
4.5.1	Makrophagen.....	51
4.5.2	CD4+-T-Zellen.....	51
4.5.3	CD8+-T-Zellen.....	52
4.5	Untersuchung der Rolle der Zytokine bei der Granulombildung .....	52
4.6.1	TNF $\alpha$ .....	52
4.6.2	IFN $\gamma$ .....	53
4.7	Die Mechanismen der Granulombildung .....	53
4.8	Aussichten.....	54
4.9	Zusammenfassung .....	55
5	Literaturverzeichnis .....	57
6.	Danksagung .....	66

## 6. Danksagung

Eine Arbeit wie diese macht man natürlich nie allein, es gehören viele Menschen im Vorder- und Hintergrund dazu, ohne deren Beitrag es nicht möglich gewesen wäre diese wissenschaftliche Arbeit zu beenden.

An erster Stelle sind hier meine Eltern Anneliese und Carl-Heinz Hänsch zu nennen, die nicht nur per se am Anfang standen, sondern mir auch mir mein Studium ermöglichten.

Meinen „wissenschaftlichen Vätern“ Prof. Dr. med Helmut Hahn und PD Dr. med Stefan Ehlers gebührt ein besonderer Dank dafür, daß sie mich nicht nur alle Grundlagen lehrten, sondern immer geduldig für mich da waren und mich mit mehr oder weniger sanftem Druck auch in schweren Zeiten bei der Stange hielten.

Auch beim Laborteam des Instituts für Infektionsmedizin, Abt. Medizinische Mikrobiologie und Infektionsimmunologie, der Freien Universität möchte ich mich bedanken. Dieser Dank gilt vor allem Fr. U. Rüschenhof, die mich in die Laborarbeit einführte.

Gleichfalls bedanke ich mich beim Laborteam der Abteilung für molekulare Medizin des Forschungszentrums Borstel, das mich während meiner Zeit dort weiterbildete und mir die Zeit gab, mich auch dort um meine Promotion zu kümmern.

An Dr. Greg Bancroft an der London School for Hygiene and Tropical Medicine und an alle Mitarbeiter dort geht mein Dank dafür, daß sie mir die Experimente mit SCID-Mäusen ermöglicht haben und mir bei der Durchführung hilfreich zur Seite standen.

Außerdem bedanke ich mich bei Tamara Shochetmann und ganz besonders bei meiner Frau, Chantel Spencer-Hänsch.

## Curriculum vitae

Name: Hänsch

Vornamen: Holger, Carl-Heinz, Ralf

Wohnort: Reuterstr. 14  
12053 Berlin

Geburtsdatum und Ort: 27.05.67 in Bremen

Familienstand: verheiratet

Schulabschluß: Am 01.06.87; Gym. am Barkhof in Bremen, mit der Erlangung der allgemeinen Hochschulreife

Wehrersatzdienst: Vom 01.07.87 bis zum 28.02.89 beim DRK Bremen im Rettungsdienst

Beginn des Studiums: April 1989 an der FU Berlin

Physikum: Am 15.03.91 vor dem LPA Berlin

1. Staatsexamen: Am 26.03.92 vor dem LPA Berlin

Famulaturen: Vom 31.07.92 bis zum 31.08.92 in der Inneren Abteilung des Diakonissen Krankenhauses Bremen

Vom 01.08.93 bis zum 31.08.93 in der Neurologischen Klinik der Uni. Marburg

Vom 01.03.94 bis zum 31.03.94 in der Dermatologischen Facharztpraxis des Hr. Frahm

Vom 01.09.94 bis zum 01.10.94 in der Tropenmedizinischen Klinik der Uni. London

2. Staatsexamen: Am 14.09.95 vor dem LPA Berlin

Praktisches Jahr: 1. Trimester  
Vom 23.10.95 bis zum 09.02.96 in der 1. Pneumologischen Abteilung, Krankenhaus Zehlendorf, Örtl. Bereich Heckeshorn

2. Trimester  
Vom 12.02.96 bis zum 31.05.96  
Abt. für Allgemein Chirurgie im Krkhs. Neukölln

3. Trimester  
Vom 03.06.96 bis zum 20.09.96  
Dermatologie im Krkhs. Neukölln

3. Staatsexamen: Am 12.12.96 vor dem LPA Berlin  
Note: -sehr gut-

Gesamtnote der Ärztlichen Prüfung: -gut-

Arzt im Praktikum:	1.1.97 bis zum 30.6.98 in der I. Pneumologischen Abt. des Krkhs. Zehlendorf in Heckeshorn, unter der Leitung von Prof. Dr. Lode
Arzt in Weiterbildung:	1.7.98 bis 15.01.99 im Forschungszentrum Borstel, Arbeitsgruppe Molekulare Infektiologie, unter der Leitung von PD Dr. S. Ehlers  Seit dem 16.1.99 in der inneren Abteilung des Fachkrankenhauses für Lungenheilkunde und Thoraxchirurgie (FLT) Berlin Buch, unter der Leitung von Prof. Dr. Lichey
Stipendium/Auslandsaufenthalt:	Vom 15.08.94 bis zum 15.11.94 an der "London School for Hygiene and Tropical Medicine" für wissenschaftliche Arbeiten im Rahmen des mit Stipendium der Boehringer-Ingelheim Fonds
Studiums	
Kongreßteilnahmen: Chemotherapy" in Berlin	23. bis 28. Juni 1991 "17th International Congress of  6. bis 11. Juni 1993 "IXth International Conference on AIDS / IVth STD World Congress" in Berlin  12. bis 15. September 1993 "Robert-Koch-Symposium" in Berlin  14. bis 17. Juni 1994 "12th European Immunology Meeting" in Barcelona, Spanien  3. bis 7. Oktober 1995 "47. Kongreß der deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie" in Würzburg  30. Nov. bis 2. Dezember 1995 "5. Klinisch-Mikrobiologisch-Infektiologisches Symposium" in Berlin
Kurse neben dem Studium:	20. bis 25. Mai 1995 "Advanced International Course: Immunity to Intracellular Bacteria & Parasites" in Positano, Italien
Tätigkeiten neben dem Studium:	31. März 1992 bis 31. Oktober 1995 Studentische Hilfskraft mit Unterrichtsaufgaben (Tutor) im Inst. für Med. Mikrobiologie und Infektionsimmunologie, Berlin.
Promotion:	am 06.04.2001 an der FU-Berlin im Fachbereich Humanmedizin

Berlin, den 28.03.01

Holger Hänsch