

## 4. Diskussion

Ausgangspunkt für die vorliegende Arbeit war die Frage nach Schutzmechanismen in der murinen Infektion mit *M. avium*. Einmal wurden die Kinetik der Keimzahlentwicklung in infizierten Organen und die Gewebepathologie parallel untersucht. Zum anderen wurden die an der histologischen Reaktion beteiligten Zellen identifiziert und ihre Bedeutung bei der histologischen Reaktion überprüft. Darüber hinaus wurden die wichtigsten Zytokine dieser Zellen und weitere Faktoren hinsichtlich ihrer Bedeutung bei der Granulombildung untersucht, um ein Verständnis für die histopathologischen Verläufe in der murinen Infektion mit *M. avium* zu entwickeln.

### 4.1. Infektionsverlauf in immunkompetenten Mäusen

Zum Einsatz kamen zwei *M. avium*-Stämme unterschiedlicher Virulenz. *M. avium* TMC 724 ist als mauspathogen beschrieben (25). Der zweite Stamm, SE01, wurde aus einem AIDS-Patienten isoliert und ist insoweit auch als virulent anzusehen. Beiden Stämmen gemeinsam war, daß sie eine chronisch persistierende Infektion ohne Erregerelimination in Mäusen verursachten.

Das Wachstum von TMC 724 in der immunkompetenten Maus verlief ungebremst, während das Wachstum von SE01 auf einem hohen Niveau stagnierte, ohne daß es im folgenden zu einer merklichen Keimzahlreduktion kam. Dieser Infektionsverlauf wurde bereits für andere *M. avium*-Stämme in der Maus beobachtet, obwohl die Auslösung einer chronischen Infektion mit vielen anderen Mykobakterienspezies nicht erfolgt (25).

### 4.2. Histopathologie und Milzgewicht in immunkompetenten Mäusen

Nach Infektion mit TMC 724 nahm die Zahl der Granulome in der Leber der immunkompetenten Maus kontinuierlich bis zur vierten Woche zu. Danach war eine genaue Auszählung der Granulome nicht mehr möglich, da die Granulome

miteinander verschmolzen. Die Größe der Granulome nahm während des Infektionsverlaufs so weit zu, daß das Lebergewebe zunehmend verdrängt wurde. Das Milzgewicht stieg über den gesamten Untersuchungszeitraum hinweg an. Besonders deutlich ist dies zu erkennen gewesen, wenn das Milzgewicht in Relation zum Mausgewicht beobachtet wurde. Hier bestand auch eine Korrelation zur Granulomentwicklung. Nach Infektion mit TMC 724 nahmen die Zahl und die Größe der Granulome bis zum Versuchsende zu. Das Milzgewicht kann also als Korrelat für den Einstrom von Entzündungszellen gelten.

Innerhalb der ersten drei bis vier Wochen nach Infektion mit SE01 bildeten sich Granulome. Danach, bis zum Ende des Beobachtungszeitraums, sechs Monate nach Infektion, ließen sich keine neuen mononukleären Foci mehr finden. Die Granulome nahmen nach der 4. Woche p.i. nicht mehr wesentlich an Größe zu; vielmehr kam es zu einer weiteren Differenzierung der Granulome: Die Makrophagen transformierten sich zu Epitheloidzellen.

Das Milzgewicht nahm während der Infektion mit SE 01 in den ersten vier Wochen nach Infektion zu und blieb dann bis zum Ende des Beobachtungszeitraums konstant. Auch in der Infektion mit SE01 korrelierte das Milzgewicht gut mit der Granulomausbildung.

#### 4.3. Infektionsverlauf in SCID-Mäusen

In SCID-Mäusen kam es nach Infektion mit TMC 724 und SE01 zu einer persistierenden chronischen Infektion.

Nach der Infektion mit SE01 bestand bei SCID-Mäusen, im Unterschied zu den immunkompetenten Mäusen, in denen die Keimzahlentwicklung nach vier Wochen stagnierte, ein ungebremstes Keimwachstum über die vierte Woche hinaus. Die Kinetik der Erregerzahlentwicklung von TMC724 und SE01 unterschied sich in SCID-Mäusen nicht.

## Histopathologie in SCID-Mäusen

Sowohl nach der Infektion mit TMC 724 als auch SE01 bildeten sich auch in SCID-Mäusen Granulome. Sie entstanden jedoch zwei Wochen später als in immunkompetenten Tieren. Auffälligerweise fanden sich in SCID-Mäusen während des gesamten Beobachtungszeitraums auch mit Mykobakterien gefüllte Makrophagen ohne weitere mononukleäre Reaktion im Gewebe. Nur in SCID-Mäusen verschmolzen Epitheloidzellen 12 Wochen nach Infektion zu Riesenzellen. Im späteren Verlauf zeigten die Granulome auch in SCID-Mäusen eine zunehmende Differenzierung.

### 4.4. Untersuchung der Rolle der an der Granulombildung beteiligten Zellen

#### 4.4.1. Makrophagen

Bei *M.avium* handelt es sich um ein fakultativ intrazelluläres Bakterium. In den durchgeführten Experimenten ließen sich säurefeste Stäbchen färberisch nur in Makrophagen darstellen.

Es ist davon auszugehen, daß die intrazelluläre Vermehrung von *M.avium* die Makrophagen veranlaßt, vermehrt Entzündungsmediatoren zu bilden, und daß sie auf diese Weise die Granulombildung initialisiert wird (77, 82). Die Makrophagen spielen somit eine entscheidende Rolle bei der Granulominduktion.

#### 4.4.2. CD4+-T-Zellen

In den hier dargestellten Versuchen wurde die durch *M.avium* induzierte Granulombildung in zeitlicher Relation zur In-vivo-Depletion von CD4+-T-Zellen gesetzt. Eine frühe CD4-Depletion verhinderte die Granulombildung nahezu völlig, während eine späte CD4-Depletion ohne Einfluß auf die Granulomentwicklung blieb. Auch in den Versuchen mit SCID-Mäusen, die über keine T-Zellen verfügen, war die Granulombildung verzögert. Auch eine CD4+-Zellen-Depletion führte, wie gezeigt, zu einer verspäteten Granulomentstehung.

Es konnte hier erstmals gezeigt werden, daß CD4<sup>+</sup>-T-Zellen eine beschleunigte Makrophagenakkumulation und somit eine früher einsetzende Granulombildung in der experimentellen Infektion mit *M. avium* bewirken.

Diese Erkenntnis steht in Einklang mit Experimenten, die im murinen Modell mit *L. monocytogenes* durchgeführt wurden (53, 70, 72).

#### 4.4.3. CD8<sup>+</sup>-T-Zellen

In den hier vorgestellten Experimenten war kein signifikanter Einfluß von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in der Keimzahlentwicklung zu beobachten; eine Bedeutung der CD8<sup>+</sup>-T-Zelle für die Granulomentwicklung in der Infektion mit *M. avium* ebenfalls nicht erkennbar geworden.

Die Experimente mit *M. avium* in  $\beta$ 2-m-gene-knock-out-Mäusen wie in Kapitel 1.3.5. aufgeführt, zeigen in Bezug auf die CD8<sup>+</sup>-T-Zelle andere Ergebnisse. Ein Grund für diesen Unterschied mag in dem wesentlich längeren Beobachtungszeitraum liegen, der bei Experimenten mit  $\beta$ 2-m-gene-knock-out-Mäusen möglich ist.

### 4.5. Untersuchung der Rolle der Zytokine bei der Granulombildung

#### 4.5.1. TNF $\alpha$

In den hier dargestellten Experimenten mit SCID-Mäusen bestand in den ersten vier Wochen kein Einfluß auf die Keimzahlentwicklung. Dies deckt sich mit Ergebnissen aus Versuchen mit TNF-Rezeptor-p55-knock-out-Mäusen. Auch bei Beobachtung über 5 Wochen nach Infektion mit TMC 724 und SE01 war kein Anstieg des Keimwachstums im Vergleich mit syngenen immunkompetenten Mäusen zu beobachten (36).

Der Beobachtungszeitraum in unseren hier vorgetragenen Experimenten war kürzer und eine Granulombildung blieb aus. Es kam zu einer vollständigen Unterdrückung der Entzündungsreaktion nach Neutralisation von TNF $\alpha$  in den ersten vier Wochen nach Infektion.

Die vorliegenden Experimente ergeben also, daß  $\text{TNF}\alpha$  unverzichtbar für die beschleunigte Granulomentstehung ist.

#### 4.5.2. $\text{IFN}\gamma$

In den hier vorgestellten Ergebnissen wurde durch die Neutralisation von  $\text{IFN}\gamma$  in der Infektion mit TMC724 die Monozytenakkumulation in den ersten vier Wochen nach Infektion vollständig verhindert, während die Granulominitialisierung nahezu vollständig unterblieb.

Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, führte auch die Infektion mit *M. avium* in SCID-Mäusen verzögert zur Granulombildung. Die Behandlung mit Anti-asialo-GM-1-Antikörpern, welche NK-Zellen eliminieren, vermindert initial die Monozytenakkumulation (44). NK-Zellen sind die einzige bekannte Quelle für  $\text{IFN}\gamma$  in der SCID-Maus (9, 58). Mit neutralisierenden Antikörpern gegen  $\text{IFN}\gamma$  behandelte SCID-Mäuse waren dann auch nicht mehr in der Lage, Monozytenakkumulationen um infizierte Makrophagen herum zu bilden. Die NK-zell-abhängige  $\text{IFN}\gamma$ -Produktion spielt somit eine essentielle Rolle in der T-zell-unabhängigen Granulombildung.

#### 4.6. Die Mechanismen der Granulombildung

In den eigenen Untersuchungen konnte die Granulomentwicklung durch  $\text{IFN}\gamma$  neutralisierende Antikörper in den ersten drei Wochen komplett unterdrückt werden. Nach drei Wochen entstanden jedoch mononukleäre Foci. Wie andere Untersucher gezeigt haben, kommt es bei der experimentellen *M. avium*-Infektion in der Maus zu einem Anstieg der  $\text{IFN}\gamma$ -Produktion. Es ist daher möglich, daß nach drei Wochen die eingesetzte Menge an Antikörpern nicht mehr ausreichte, um  $\text{IFN}\gamma$  komplett zu neutralisieren.

Auch die Neutralisation von  $\text{TNF}\alpha$  führte in den gezeigten Experimenten zu einer Unterdrückung der initialen Granulombildung. In Experimenten mit TNF-Rezeptor-

p55-knock-out-Mäusen wurde andererseits gezeigt, daß bei Abwesenheit der  $\text{TNF}\alpha$ -Wirkung verzögert Granulome entstehen können (36). In den hier vorgestellten Versuchen war der Beobachtungszeitraum kürzer. Es ist zudem möglich, daß in TNF-Rezeptor-p55-knock-out-Mäusen eine  $\text{TNF}\alpha$ -Wirkung über den TNF-Rezeptor-p75 vermittelt wird.

Es wurde in den vorliegenden Versuchen gezeigt, daß neben  $\text{TNF}\alpha$  auch  $\text{IFN}\gamma$  für die beschleunigte Granulombildung notwendig ist. Die Ausschaltung von nur einem der beiden Zytokine verzögert die Granulombildung deutlich.

#### 4.7. Aussichten

Das von  $\text{CD4}^+$ -T-Zellen produzierte  $\text{IFN}\gamma$  ist für die Granulomentstehung unverzichtbar. Da sich bei AIDS funktionsfähige  $\text{CD4}^+$ -T-Zellen nicht von Mensch zu Mensch übertragen lassen, die Therapie mit  $\text{IFN}\gamma$  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.

#### 4.8. Zusammenfassung

Das bedeutendste histopathologische Korrelat einer *M. avium*-Infektion, sowohl bei Patienten wie auch im Mausmodell, ist das Granulom. Die Morphologie des Granuloms ist im Patienten abhängig vom Immunstatus.

Ausgehend von der Vorstellung, daß ein Verständnis der Immunvorgänge, speziell der Granulombildung, bei der *M. avium* Infektion der Maus einen theoretischen zur Entwicklung neuer immuntherapeutischer Möglichkeiten bei der *M. avium*-Infektion des Menschen, speziell AIDS-Patienten eröffnen könnte, wurden die Mechanismen der Granulombildung in der experimentellen Infektion mit *M. avium* bei immunkompetenten und immundefizienten Mäusen untersucht.

In den verwendeten Mäusestämmen löste eine Infektion mit dem hochvirulentem *M. avium*-Stamm TMC 724 regelmäßig eine progressive chronische Infektion mit letalem Ende aus. Die Granulomentwicklung war ebenfalls kontinuierlich progredient und ging mit zunehmender Gewebeverdrängung durch Granulome einher. Die Infektion mit dem niedrigvirulenten *M. avium*-Stamm SE01 verlief ebenfalls chronisch, die Keimzahl erhöhte sich aber nach etwa vier Wochen nicht mehr. Die Zahl der Granulome nahm ebenfalls bis zur vierten Woche zu und stagnierte im weiteren Verlauf. Bei stagnierender Keimzahlen entwickelten sich Epitheloidzellgranulome. Die Aufrechterhaltung einmal gebildeter Granulome war T-zell-unabhängig.

Die Ursache des unterschiedlichen Verlaufs liegt in der Virulenz des jeweiligen Erregers. Auffällig ist jedoch, daß auch der niedrig virulente *M. avium*-Stamm im Wirt persistiert, das Granulom jedoch nicht verläßt. Es herrscht offenbar eine Patt-Situation; der Wirt ist vor einer weiteren Ausbreitung des Erregers geschützt.

Um die These zu untersuchen, ob die T-Zelle hierbei eine Rolle spielt, wurde in weiteren Experimenten die Granulomentwicklung in der Abwesenheit von T-Zellen untersucht.

Die Keimzahlentwicklung in SCID-Mäusen war mit dem hochvirulenten *M. avium*-Stamm gleich wie mit dem niedrigvirulentem *M. avium*-Stamm.

Granulome bildeten sich auch in T-zell-unabhängiger Weise, dann jedoch verzögert. In Abwesenheit von CD4+-T-Zellen verlief die Fokussierung von infizierten Makrophagen durch zuströmende mononukleäre Zellen in SCID- und CD4+-T-Zell depletierten Mäusen verzögert.

Da die Granulombildung nicht völlig unterblieb, kann die Rolle von T-Zellen offenbar teilweise von anderen Zellen übernommen werden. Durch die Depletion von CD8+-T-Zellen konnte gezeigt werden, daß diesen Zellen im Verlauf der Granulombildung keine Bedeutung zukommt.

Von dieser Beobachtung wurde die Annahme abgeleitet, daß möglicherweise ein von T-Zellen produzierter Botenstoff, welcher auch von anderen Zellen produziert werden kann, für die Granulombildung von Bedeutung ist.

Die Neutralisation von  $IFN\gamma$  und  $TNF\alpha$  störte die T-zell-unabhängige Granulombildung.

CD4+-Zellen, bzw. das von diesen Zellen produzierte Zytokin  $IFN\gamma$  und das überwiegend aus Makrophagen stammende  $TNF\alpha$ , sind daher von unverzichtbarer Bedeutung bei den frühen Stadien der Granulombildung.

Aufgrund der Ähnlichkeit der Histomorphologie in der Maus und im Menschen besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit, daß die gefundenen Mechanismen der Granulombildung im murinen Infektionsmodell mit *M.avium* in ähnlicher Weise auch beim Menschen ablaufen.