

2. Patienten, Material und Methoden

2.1 Patienten und Kontrollpersonen

Im Zeitraum von August 1988 bis Dezember 1989 wurden im Klinikum Steglitz der FU Berlin Morbus Crohn-Patienten untersucht, die entweder stationär in der Abteilung für Innere Medizin oder ambulant in der M.Crohn-Sondersprechstunde betreut wurden. Die Arbeit stand im Kontext eines DFG Projektes zur Erforschung der T-Zellfunktion der intestinalen Lamina propria bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (Ze 188/3-1 und war von der Ethikkommission bewilligt worden.

Es wurden Lymphozyten aus dem peripheren Blut von 23 MC Patienten, 14 mit aktiver und 9 mit inaktiver Erkrankung, mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert und phänotypisch und funktionell charakterisiert. Aus dem Plasma dieser und weiterer 19 Patienten (9 mit aktiver und 10 mit inaktiver Erkrankung) wurde die Konzentration des sIL-2R bestimmt. Die mittlere Erkrankungsdauer der Patienten lag bei 7 (0-16) Jahren. Bei vier Patienten war nur das Ileum befallen, bei sechs Patienten nur das Colon und bei 12 Patienten Ileum und Colon. Insgesamt traten bei sieben Patienten aktuell extraintestinale Manifestationen wie Arthritis, Erythema nodosum, Iritis, Konjunktivitis und Acrodermatitis enteropathica auf. Intestinale Resektionen waren bei 11 Patienten im Krankheitsverlauf durchgeführt worden, unter Fistelungen litten sechs Patienten. Etwa die Hälfte der Patienten (11 bzw. 23) stand unter Therapie von 5-ASA, drei (bzw. sieben beim Plasma sIL-2R) unter Steroidtherapie (>15mg/ Tag).

Tabelle 2.1: Patientenübersicht

Patienten		FACS-Analysen/ Zellkulturen (PBL)	sIL2R-ELISA (Plasma)
Gesamtzahl		23	42
Aktivität	MC inaktiv	9	19
	MC aktiv	14	23
Medikation	5-ASA	11	23
	Steroide	3	7
Erkrankungsdauer (Jahre)		8 (0-16)	7 (0-16)
Alter (Jahre)		30 (18-58)	30 (18-60)
Geschlecht		15w 6m	25w 17m

Die Diagnosen des Morbus Crohn waren anhand klinischer, radiologischer, endoskopischer und histologischer Kriterien gestellt worden. Die Beurteilung der Aktivität erfolgte über den Crohn's Disease Activity Index CDAI, bei Werten über 150 wurde die Erkrankung als aktiv eingestuft, bei Werten darunter als inaktiv. Das Alter der Patienten reichte von 18 bis 60 Jahren mit einem Median von 30 Jahren, die Kontrollwerte wurden von 22 gesunden Mitarbeitern der Klinik, 12 Frauen und 11 Männern, mit einem mittleren Alter von 31 Jahren (22-51) gewonnen.

2.2 Experimentelles Vorgehen

2.2.1 Probengewinnung, PBL-Isolierung und Aufbewahrung

Material

Plasmagewinnung für den sIL-2R-ELISA:

Heparinsiertes Venenblut

Zentrifuge (Heraeus Minifuge T)

PBL-Isolation und Aufbewahrung:

Heparin (Braun, 25000 IE/ 5 ml)

Laminar flow Arbeitsbank

Hank`s balanced salt solution HBSS
(Gibco)

Ficoll-Paque (Pharmacia)

Zentrifuge (Heraeus Minifuge T)

Wasch-Medium: bestehend aus RPMI-

Medium mit 20% hitzeinaktiviertem
fetalem Kälber-Serum (FKS) (beides Fa. Gibco)

Coulter-Counter (Zellzählung),

Isoton (Fa. Coulter Electronics)

Trypanblau, ultrafiltriert

Mikroskop (Olympus), Neubauer Zählkammer

Einfriermedium, bestehend aus einem Teil

Waschmedium, zwei Teilen FKS und einem Teil Dimethylsulfoxid (DMSO) (Sigma)

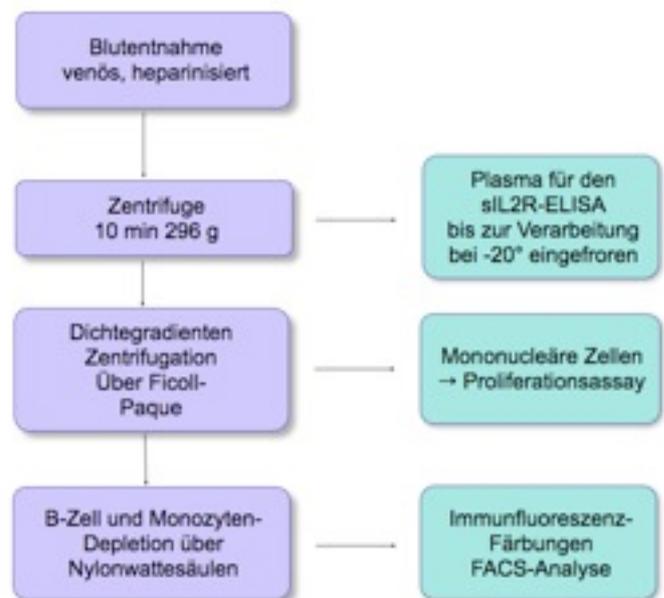


Bild 2.1 Probenverarbeitung

Nach der ersten Zentrifugation wurde das Plasma für den sIL2R-ELISA abgetrennt, nach der darauffolgenden Dichtegradientenzentrifugation wurden die Zellen für die Kulturen entnommen. Als letzter Aufbereitungsschritt folgte die B-Zell und Monozytendepletion für die Immunfluoreszenzfärbungen und FACS-Analysen.

Durchführung

Unter sterilen Bedingungen wurde den Patienten und Probanden 20 ml Venenblut in einer heparinisierten Spritze abgenommen. Nach Zentrifugation (10 min bei 296 g) erfolgte die Abtrennung des Plasma und das Einfrieren bis zur weiteren Verwendung für den ELISA bei -20 °C. Das Pellet mit den korpuskulären Bestandteilen wurde mit HBSS auf das Doppelte des ursprünglichen Volumens aufgefüllt, in zwei Portionen über je 15 ml Ficoll-Paque geschichtet und 30 min bei 1200 g zentrifugiert. Die die Lymphozyten enthaltende Zwischenschicht wurde vorsichtig abgehoben, zweimal in kaltem (4 °C) Medium gewaschen und dekantiert. Nach Auffüllen des Pellets auf 1 ml wurden daraus 20 µl entnommen, in 10 ml Isoton verdünnt und im Coulter-Counter die Zellzahl bestimmt. Weitere 5 µl wurden auf einem Objektträger 1:1 mit Trypanblau vermischt und unter dem Mikroskop die Anzahl blaugefärbter (toter) Zellen auf 100 Zellen ausgezählt (Trypanblauexklusionstest). Die Ausbeute belief sich auf 20-60 × 10⁶ Zellen pro 20 ml Venenblut, davon waren über 95% lebend. Aus dieser Zellsuspension wurde das 6 × 10⁶ Zellen entsprechende Volumen für die Zellkulturen entnommen. Die restliche Zellsuspension wurde in gefrierfeste Röhrchen gefüllt, 10 min auf Eis gestellt und dann 1:1 mit eisgekühltem, DMSO (Dimethylsulfoxid)-haltigem Einfriermedium gemischt. Die Zellen wurden in einer Isolierbox über Nacht bei -80 °C eingefroren und am nächsten Tag bis zur weiteren Verarbeitung in ein Stickstoffgefriergefäß überführt. Die gesamte Verarbeitung erfolgte unter sterilen Bedingungen an einer laminar-flow-Arbeitsbank (134, 135, 136).

2.2.2 Enzyme-linked Immunoassay des im Plasma gelösten Interleukin-2 Rezeptors

Material

96-Loch-Mikrotiterplatten (Fa. Flow)

AHT-107- α -Tac (CD25)-IgG1-Antikörper (Ak)

AHT-45- α -Tac (CD25)-Ak-biotinyliert, beide freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. O. Josimovic-Alasevic, Institut für Immunologie der FU Berlin

Irrelevantes Maus IgG1

Streptavidin-Alkalische-Phosphatase (AP)-Konjugat, 1:2000 verdünnt

P-Nitrophenylphosphat-Dinatrium (Sigma) in 1M Diethanolamin-HCl Puffer pH 9,8 mit 0,04 mM MgCl₂

PBS (phosphate buffered saline) mit 0,01% NaN₃

PBS mit 0,01% NaN₃ und 3% BSA (Bovines Serum Albumin)

PBS mit 0,01% NaN₃ und 1% BSA

PBS mit 0,1% Tween 20

0,1M Tris-HCl (pH 7,5) mit 0,1M NaCl (Puffer 1)

0,1M Tris-HCl (pH 9,5) mit 0,1M NaCl und 50 mM MgCl₂ (Puffer 2)

0,6M NaOH

Titertek ELISA-Reader (Fa. Flow)

Durchführung:

Die Bestimmung des sIL-2R erfolgte über einen etablierten "sandwich" enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) des Institutes für Immunologie der FU Berlin (135). Dafür wurden Mikrotiterplatten über Nacht mit dem ersten anti-Tac(CD25)-Antikörper, 100 µl AHT-107 (10 mg/ml in PBS/0,01% NaN₃), bei

4 °C inkubiert. Nach Entfernung der restlichen Antikörperlösung wurden die Platten 1h bei 37 °C mit

PBS/NaN₃ mit 3% BSA zur Blockade unspezifischer Bindungsstellen inkubiert, dann zweimal mit 0,1%igem

PBS/Tween gewaschen. Das Plasma wurde im 37

°C-Wasserbad aufgetaut, dann 30 min mit einem irrelevanten Maus IgG1

Antikörper zur Abdeckung unspezifischer Bindungsstellen präinkubiert (ebenfalls bei 37 °C). Jeweils 100 µl wurden auf die beschichtete Platte gegeben, diese

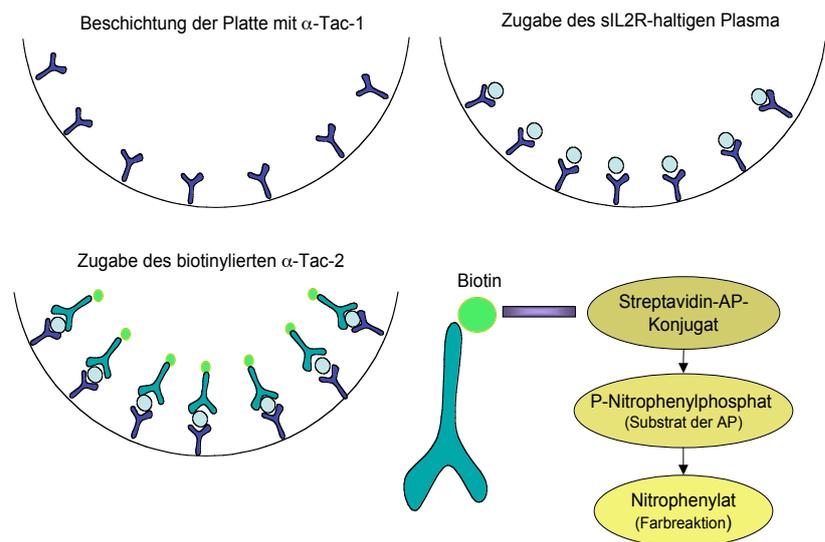


Bild 2.2 sIL2R-ELISA

Beschichtung der Platte mit dem ersten Antikörper (Ak), Zugabe des Antigens (Ag), Inkubation mit den zweiten, biotinylierten, Ak, Zugabe des Streptavidin-AP-Konjugates (Streptavidin bindet an Biotin), die AP katalysiert die Farbreaktion, die im Photometer gemessen wird.

Antikörper zur Abdeckung unspezifischer Bindungsstellen präinkubiert (ebenfalls bei 37 °C). Jeweils 100 µl wurden auf die beschichtete Platte gegeben, diese

1h bei 37 °C inkubiert und dann dreimal mit PBS/Tween gewaschen. Der zweite, biotinylierte, AHT-45-Antikörper wurde zugegeben (100 µl, 1 µg/ml in PBS/NaN₃ mit 1% BSA), wiederum 1h bei 37 °C inkubiert, dann zweimal mit PBS/Tween gewaschen. 100 µl des Streptavidin-AP (alkalische Phosphatase)-Konjugates wurde für 10 min bei Raumtemperatur zugegeben und danach dreimal mit dem Tris-HCl pH 7,5 und einmal mit dem Tris-HCl pH 9,5 ausgewaschen. Es folgte die Inkubation mit dem Substrat der AP, p-Nitrophenylphosphat in Diethanolamin-HCl, für 1h bei 37°C. Die Reaktion (die Umwandlung in das gelbe Nitrophenolat) wurde durch Zugabe von 50 µl 0,6 M NaOH gestoppt, die Intensität der Farbreaktion anhand der Extinktion bei 405 nm im Photometer gemessen (134, 134, 137, 138).

Auswertung

Definition der sIL2R-Einheiten (Units): der zellfreie Kulturüberstand aus 3 Tage mit Concanavalin A (ConA, 10 µg/ml) stimulierten 2×10⁶/ml humanen PBLs wurde als 1000 U/ml festgesetzt. Als Standardreferenz diente eine Verdünnungsreihe. Leerwerte wurden durch die alleinige Messung von PBS-BSA und den verschiedenen Puffern erhalten. Standardreferenz sowie Positiv- und Negativkontrollen wurden für jede Platte bestimmt.

2.2.3 Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen und Zytofluorometrie

Material

Nylonwattensäulen

1,4 g Nylon-Watte (Fa. Travenol), vorbehandelt durch Kochen in Natriumbicarbonat (8,4 g/l Aqua dest.) und EDTA (3,8 g), auf 7 ml Säulenvolumen, autoklaviert

PBS (phosphate buffered saline) mit 5% hitzeinaktiviertem FKS (fetales Kälber Serum) (beides Fa.Gibco)

Brutschrank 37 °C, 5% CO₂ (Fa. Flow)

PBS mit 1% FKS und 0,1% NaN₃ (Fa. Merck)

1%ige Paraformaldehydlösung: 10 g Paraformaldehyd wurde in 100 ml PBS erhitzt und mit einigen Tropfen 1N NaOH geklärt, vor Gebrauch entsprechende Verdünnung dieser 10%igen Stammlösung Mäuse-γ-Globulin (Fa. Dianova) 1:40 verdünnt

FACScan Zytometer, FACScan-Software, Fa. Becton&Dickinson (B&D)

Antikörper:

α -CD25 1:10 verdünnt, unkonjugiert (Fa. B&D)

α -CD49a, 1:10 verdünnt, unkonjugiert (Fa. Coulter)

α -CD103, 1:100 verdünnt, unkonjugiert (Fa. Dianova)

α -CD71, 1:10 verdünnt (Fa. B&D)

α -C 8, 1:3 verd., Phycoerythrin (PE)-konjugiert (Fa. B&D)

α -CD4, 1:4 verd., PE-konjugiert (Fa. B&D)

α -CD3, 1:2 verd., PE-konjugiert (Fa. B&D)

α -Maus-Ig, unspezifisch, 1:40 verd., Fluorescein (FITC)-konjugiert (Fa. Tago)

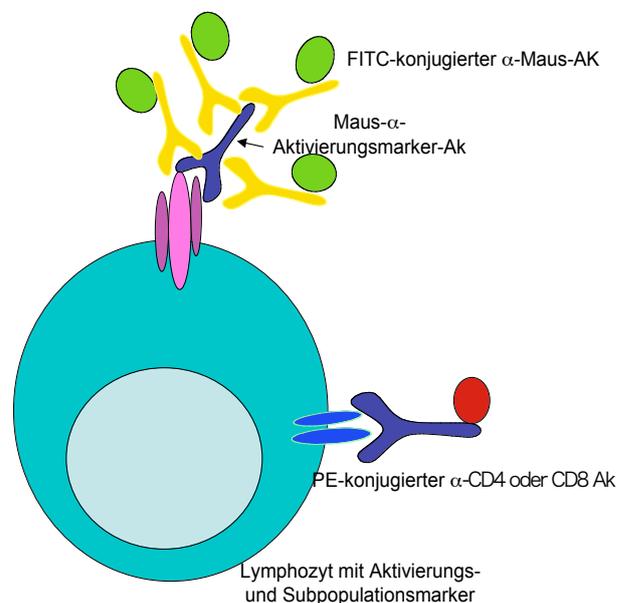
α -Maus-Ig, unspezifisch, 1:20 verd., PE-konjugiert (Fa. Dianova)

Durchführung**Probenvorbereitung, B-Zell und Monozytendepletion**

Die in flüssigem Stickstoff gefrorenen Zellen wurden im 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut. Nach Auflösung aller Eiskristalle erfolgte eine 10-minütige tropfenweise Zugabe von warmem Medium zu der Zellsuspension, sodass das DMSO langsam und kontinuierlich aus den Zellen herausdiffundieren konnte. Nach Zugabe von weiteren 15 ml Medium wurden die Zellen zweimal je 10 min bei 296 g gewaschen. Der Trypanblauexklusionstest bestimmte die Überlebensrate, sie lag bei $\geq 85\%$. Es folgte die Inkubation der Zellsuspension auf Nylonwattensäulen, an deren Fasern die Monozyten und B-Zellen adhären. Dazu

Bild 2.3 Direkte und indirekte**Immunfluoreszenzfärbung**

Bei der direkten Immunfluoreszenzfärbung ist der spezifische Antikörper direkt mit dem Farbstoff gekoppelt. Bei der indirekten Färbung bindet zuerst ein epitopspezifischer unkonjugierter (z.B. Maus- α -Mensch) Antikörper an das zu untersuchende Antigen. Erst durch die Bindung eines zweiten Farbstoff-gekoppelten Antikörpers (z.B. Ziege- α -Maus-Ig) an den ersten Antikörper wird die Zelle angefärbt.



wurden die Säulen mit je 50 ml PBS-5% FKS durchgespült, 30 Minuten im Brutschrank inkubiert und nochmal mit 50 ml PBS-FKS durchspült. Die Zellen wurden in Volumina von 0,5-1 ml, die je nach Ausbeute etwa $15-30 \times 10^6$ Zellen enthielten, auf die Säulen gegeben. Es folgte eine einstündige Inkubation im Brutschrank (37 °C, 5% CO₂), danach wurden die Zellen mit 50 ml PBS-FKS heruntergewaschen und abzentrifugiert (15 min bei 296 g). Die Kontrolle der T-Zell-Separation erfolgte über die Anfärbung mit dem T-Zell-Marker α -CD3. Die resultierende Zellsuspension bestand zu >93% aus CD3+ T-Zellen (139, 140).

Immunfluoreszenzfärbung

Die Immunfluoreszenzfärbung erfolgt über die Bindung fluoreszenzmarkierter epitopspezifischer Antikörper an die zu untersuchenden Oberflächenmoleküle. Bei Doppelfärbungen werden zwei verschiedene Oberflächenmoleküle pro Zelle angefärbt.

In diesen Experimenten waren dies jeweils ein Aktivierungsmarker und ein Subpopulationsmarker. Die Aktivierungsmarker wurden mit der indirekten Methode angefärbt, um durch den damit verbundenen Verstärkungsschritt die Nachweisgrenze der oft nur gering exprimierten Moleküle zu verfeinern. Die CD4- und CD8-

T-Zell-Subpopulationen wurden direkt gefärbt (der Antikörper ist gleich mit dem Farbstoff verbunden).

Pro Proband wurde in 10 Reaktionsgefäße je 1×10^6 Zellen in 50 μ l PBS-FKS-NaN₃ (NaN₃ verhindert die Internalisation der Oberflächenmoleküle) gegeben und der erste (unkonjugierte) Antikörper in gleichem

Volumen zugefügt. Nach Inkubation

und Waschen wurde das FITC-gekoppelte Ziege- α -Maus-Ig zugegeben. Danach folgte die

Tabelle 2.2 Schema der immunfluoreszenz-Doppelfärbungen

Probe	1. Ak	Färbung	Blockade	2. Ak	Fixierung
1	Mäuse-Ig (irrelevant)	FITC- α -Maus	Maus-Ig	PE	PF 1%ig
2	α -CD25	FITC- α -Maus	Maus-Ig	α -CD4-PE	PF 1%ig
3	α -CD25	FITC- α -Maus	Maus-Ig	α -CD8-PE	PF 1%ig
4	α -CD71	FITC- α -Maus	Maus-Ig	α -CD4-PE	PF 1%ig
5	α -CD71	FITC- α -Maus	Maus-Ig	α -CD8-PE	PF 1%ig
6	α -CD49a	FITC- α -Maus	Maus-Ig	α -CD4-PE	PF 1%ig
7	α -CD49a	FITC- α -Maus	Maus-Ig	α -CD8-PE	PF 1%ig
8	α -CD103	FITC- α -Maus	Maus-Ig	α -CD4-PE	PF 1%ig
9	α -CD103	FITC- α -Maus	Maus-Ig	α -CD8-PE	PF 1%ig

PF: Paraformaldehyd, PE: Phycoerythrin, FITC: Fluorescein

Blockade weiterer Bindungsstellen an diesem Ag-Ak-Ak-Komplex durch unspezifisches Mäuse-Ig. Als Nächstes wurde der zweite, PE-konjugierte Antikörper mit der Zellsuspension inkubiert. Zuletzt wurden die gefärbten Zellen in 1%iger Paraformaldehydlösung fixiert. Die Proben wurden während des gesamten Arbeitsvorganges im Eisbad gekühlt. Die Inkubationszeiten, auch die der Fixierung, betragen jeweils 30 Minuten. Nach jedem Arbeitsschritt wurde die Zellsuspension mit kaltem Medium aufgefüllt und in der auf 4 °C gekühlten Zentrifuge 5 min bei 296 g abzentrifugiert. Um ein Ausbleichen der Fluoreszenzen zu verhindern, wurden die Proben im Dunkeln gehalten. Die Messung erfolgte innerhalb von 48 h nach Fixierung (134, 135, 141).

Zytofluorometrie

Die Messungen der Fluoreszenz der markierten T-Lymphozyten wurden an dem Durchflusszytometer (FACScan) durchgeführt. Dabei werden die Zellen mittels Ansaugung durch eine Kapillare vereinzelt, dann von einem Argon-Laser bestrahlt und anhand verschiedener Detektorsysteme bezüglich ihrer optischen Eigenschaften charakterisiert. Über den Vorwärtstreulicht-Detektor werden der Durchmesser, über den Seitwärtsstreulicht-Detektor die Dichte und über Fluoreszenzdetektoren die Fluoreszenzen der Zellen analysiert. Bei der Messung muss berücksichtigt werden, dass sich die Emissionsspektren der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe teilweise überschneiden. Daher wurde bei Doppelmarkierungen die registrierte Fluoreszenz um den Teil der Fluoreszenz, die von dem anderen Farbstoff stammt, korrigiert (Kompensation) (134, 135, 142, 143).

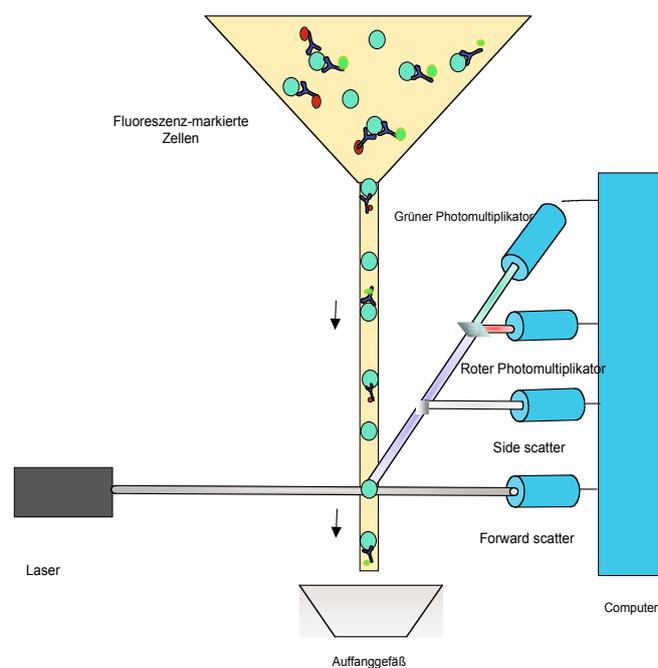


Bild 2.4 FACS-Analyzer

Auswertung

Die Kompensation wurde anhand von rein grün- bzw. rot- fluoreszierenden Proben eingestellt. Die Auswahl der zu charakterisierenden Zellpopulation erfolgte über das Streulichtdiagramm. Dazu wurde ein Rahmen (Gate) auf die betreffende Population gesetzt, wodurch vor allem tote Zellen und Debris von der Analyse ausgeschlossen werden. Der Schwellenwert der als positiv zu bewertenden Fluoreszenz wurde mit Hilfe der negativ-Kontrollproben bestimmt, die Werte der Negativkontrollen von den Messergebnissen der Proben subtrahiert. Die Verrechnung und Auswertung der registrierten Parameter erfolgte mit Hilfe der FACS-Scan-Research-Software Version A 12/86. Die graphische Darstellung erfolgte als Punktediagramm, wobei die x-Achse die Grünfluoreszenz, die y-Achse die Rotfluoreszenz darstellt. Es wurden jeweils 10.000 Zellen pro Probe analysiert.

Zellkulturen und Proliferationsassays

Material

sterile 96-Loch-Kulturplatten (Linbro, Fa. Flow)

Kulturmedium, bestehend aus RPMI (Gibco), 10% FKS (Gibco), 1% Penicillin (10.000 U/ml) Streptomycin (10.000 mg/ml) (Fa. Biochrom), 2,5% 1M HEPES-Puffer (Biochrom) (alles v/v)

Phytohämagglutinin (PHA) 5 mg/ml (Sigma), 1:30 verdünnt

Concanavalin A (Con A) 5 mg/ml (Sigma), 1:50 verdünnt

Tuberkulin-PPD 1 mg/ml (Statens Serum Inst. Copenhagen), 1:9 verd.

Tetanustoxoid 17,7 mg (4,74 LF)/ml (Fa. Behring), 1:40 verdünnt

rIL-2 10.000 U/ml (Sigma), 1:7 bzw. 1:140 verdünnt

³H-Thymidin 37 MBq/ml (Fa. NEN) 1:100 verdünnt

PHD-cell-harvester, Filterpapier, Aqua bidest.

Szintillationsflüssigkeit Ready Protein (Fa. Beckmann)

Szintillationsröhrchen (Fa. Dunn)

Szintillations-Counter (Fa. Beckmann)

Kultivierung

Die über Dichtegradientenzentrifugation gewonnene Zellsuspension wurde auf eine Zellzahl von 1×10^6 / ml in Kulturmedium eingestellt, davon wurden jeweils 200 μ l (200.000 Zellen) in ein Loch

der Kulturplatte pipettiert. Dazu wurden jeweils 20 µl der entsprechend verdünnten stimulatorischen Substanzen gegeben. Die optimalen Stimulationskonzentrationen und Kulturzeiträume unter den gegebenen Bedingungen waren in Vorversuchen ausgetestet worden. Sie betragen für ConA 15 µg/ml, für PHA 9 µg/ml, für Tuberkulin 10 µg/ml, für Tetanustoxoid 40 µg/ml.

Die Proben wurden jeweils dreifach angesetzt. Die Platten wurden im Brutschrank bei 37 °C, 5% CO₂ und Feuchtigkeitssättigung inkubiert, die Platte mit den Mitogenen PHA und ConA vier Tage, die Platte mit den Antigenen Tuberkulin und Tetanus sowie dem rIL-2 fünf Tage. 19 Stunden vor Kulturende wurden 10 µl ³H-Thymidin (Aktivität 1µCi = 3,7 kBq) zugegeben, dessen Einbau in die zelluläre DNA als Maß für die proliferative Aktivität genommen wurde. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Platten bei -80 °C eingefroren (133, 134, 135, 144).

Proliferationsassay

Die radioaktiv markierte DNA wurde über die Filtermethode gewonnen. Dabei wurden die Kulturbestandteile über feinporiges Filterpapier gesaugt, welches die radioaktive DNA nicht passieren ließ. Nach dem Trocknen des Papiers wurde es in Szintillationsflüssigkeit aufgelöst.

Die Bestimmung der Radioaktivität erfolgte anhand der Flüssigkeitsszintillationsmethode. Dabei wird die Anregungsenergie der Elektronen der β-Strahlung auf den im Cocktail enthaltenen Szintillator übertragen, dieser strahlt sie wiederum in Form von Lichtquanten ab, die im Szintillationszähler gemessen werden (133, 134, 135).

Auswertung

Von den drei Werten pro Probe wurde der Median ausgewählt. Die Zahlenangaben erfolgen unter Abzug der Spontanproliferationswerte als Δ-counts per minute (Δcpm).

2.3 Statistische Methoden

Zur Auswertung der Daten wurden verteilungsfreie Tests ausgewählt. Zum Vergleich zweier unabhängiger Gruppen wurde der Mann-Whitney-U-Test (M-W-U), mehrerer Gruppen der Kruskal-Wallis-Test (K-W) angewandt. Die Korrelationen wurden mit dem Spearman-Rank-Test beschrieben. Das Signifikanzniveau wurde auf $p \leq 0,05$ festgelegt.