

3. Methoden und Materialien

3.1. Untersuchungsgruppen

Für die Untersuchung wurden 13 Patienten (8 Jungen, 5 Mädchen, im Alter von 1-14 Jahren) mit der systemischen Form der juvenilen idiopathischen Arthritis (Morbus Still) ausgewählt. Alle Patienten erfüllten die Kriterien der International League of Association for Rheumatology (ILAR) für die Diagnosestellung eines Morbus Still.

Die Aktivität der Erkrankung wurde einerseits laborchemisch, andererseits klinisch eingeschätzt. Zur klinischen Einschätzung zählte: Vorhandensein von Fieber bzw. subfebrilen Temperaturen, Anzahl und Ausmaß der von Arthritis betroffenen Gelenke, Auftreten eines typischen Exanthems und sonstige Besonderheiten wie beispielsweise die Manifestation von einem MAS. Zur Beurteilung des Gelenkstatus diente die funktionelle Einteilung nach der Steinbrocker-Klassifikation (1949). Diese teilt die Funktionskapazität im Alltag in vier Klassen ein. Klasse 1 beinhaltet eine vollständige Fähigkeit alle üblichen Verrichtungen im Tagesablauf ohne Behinderung auszuführen, während bei Klasse 4 eine weitgehende oder völlige Behinderung vorliegt. Bei den untersuchten Still Patienten lag die Funktionskapazität bei Klasse 1. Zusätzlich wurde die unterschiedliche Medikation registriert.

Als Vergleich zu diesen Patienten wurden 11 Kinder (3 Jungen, 8 Mädchen, im Alter von 1-11 Jahren) mit atopischer Dermatitis ausgesucht. Zur Beurteilung der Krankheitsaktivität wurde der Scord Score verwandt. Dieser wird durch folgende Parameter ermittelt: A: Ausmaß der betroffenen Hautareale in Prozent; B: Intensität der atopischen Dermatitis (Bemessungswerte: 0 = keine, 1 = leicht, 2 = mäßig, 3 = stark), dabei werden Erythem, Ödem/Papelbildung, Nasen/Krustenbildung, Exkoration, Lichenifikation und Trockenheit berücksichtigt; C: subjektive Symptome wie Pruritus und Schlaflosigkeit (ermittelt durch visuelle Analog-Skala 0-10). Die so ermittelten Punktwerte werden in die Formel $A / 5 + 7 B / 2 + C$ eingesetzt und damit der Scord bestimmt. Der maximale Wert liegt bei 103 Punkten. Er lag bei den untersuchten Kindern zwischen 11 und 80 Punkten. Auch in dieser Gruppe wurde die unterschiedliche Medikation registriert.

Als Kontrollgruppe dienten 18 immunologisch gesunde Kinder (5 Jungen, 13 Mädchen, im Alter

von 1-16 Jahren). Diese wurden einerseits aus verschiedenen Sprechstunden des Virchow Klinikums (Adipositas, Kinderchirurgie) und andererseits im Rahmen der Multizentrischen Atopie Studie rekrutiert.

Zur Ermittlung der Absolutzahl der Monozyten wurde bei jedem Kind ein Blutbild bzw. Differentialblutbild bestimmt. Zur laborchemischen Einschätzung der Patienten hinsichtlich der Aktivität der Erkrankung dienten das CRP bzw. die BSG. Wurden bei der geplanten Blutuntersuchung zusätzlich für die Krankheitsaktivität relevante Parameter ermittelt, wurden diese ebenfalls für die Auswertung berücksichtigt.

Die geplante Untersuchung der Kinder wurde durch die Ethikkommission der Charité bewilligt. Die Sorge- und Erziehungsberechtigten wurden vor der Materialgewinnung mündlich und schriftlich über den Inhalt der Studie informiert und gaben ihre schriftliche Einwilligung. Im Rahmen einer geplanten Blutuntersuchung wurden zusätzlich maximal 5 ml Blut für die Untersuchung entnommen.

3.2. Materialgewinnung

Es wurden 5 ml Vollblut in eine mit Heparin beschichtete Einmalspritze aufgenommen. Danach erfolgte die Untersuchung des Blutes.

3.3. Verwendete Materialien

Es werden hier die Lösungen und Geräte aufgelistet, die in der Untersuchung benutzt wurden. Materialien, die nur für bestimmte Methoden gebraucht wurden, werden bei der jeweiligen Beschreibung der Methode mit aufgeführt.

Der Lysepuffer wurde zur Lyse der Erythrozyten verwendet und im Verhältnis von 1:10 mit destilliertem Aqua von Braun verdünnt.

Beriglobin® von Aventis Behring

Heparin - Natrium 25.000 IE / 5ml von Braun

3.3.3. Monoklonale Antikörper

In der Tabelle 1 sind die in dieser Arbeit verwendeten monoklonalen Antikörper gegen humane Zelloberflächenproteine, ihre eingesetzten Verdünnungen und ihre Hersteller aufgelistet. Antikörper, die als selbstgekoppelt bezeichnet werden, wurden im Deutschen Rheumaforschungszentrum (DRFZ) mit dem entsprechenden Fluoreszenzfarbstoff markiert.

Tab. 1: Verwendete monoklonale Antikörper gegen humane Zelloberflächenproteine

Spezifität	Markierung	Verdünnung	Hersteller
CD14	FITC	1:50	Selbstgekoppelt
CD16	PE	1:20	Becton Dickenson
CD13	PC 5	1:10	Beckmann Coulter
CD15	CY 5	1:400	Selbstgekoppelt
CD3	CY 5	1:400 / 800	Selbstgekoppelt
BDCA1	BIOTIN	1:10	Miltenyi
BDCA2	APC	1:10	Miltenyi
Streptavidin	APC	1:20	Becton Dickenson
CD19	APC	1:10	Becton Dickenson
CD56	APC	1:5	Becton Dickenson
CD64	FITC	1:5	Becton Dickenson
CD32	FITC	1:50	Becton Dickenson
CD11b	FITC	1:50	Selbstgekoppelt
CD33	FITC	1:5	Becton Dickenson
HLA-DR	FITC	1:100	Selbstgekoppelt
CD11a	FITC	1:10	Becton Dickenson

3.4. Zellpräparation und Färbung

3.4.1. Zellpräparation

Zu je 100 µl Vollblut in 23 Polystyrene Round Bottom Tubes wurden 4 ml Lysepuffer in 1 ml Schritten gegeben, diese Lösung inkubierte zehn Minuten bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurden die Tubes bei 2100 rpm und 4°C zehn Minuten zentrifugiert. Daraufhin wurde der Überstand dekantiert und das Zellpellet auf dem Vortexer resuspendiert. Danach wurde das Zellpellet mit 4 ml PBS gewaschen. Die Zellsuspension wurde wie im ersten Schritt beschrieben wieder zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Zellpellet auf dem Vortexer resuspendiert. Nun wurden jeweils drei Tubes ineinander überführt und dem oben beschriebenen Waschvorgang unterzogen. Die verbliebenen zwei Tubes (vorgesehen für die Kontrollfärbung und CD16 PE Einzelfärbung) und die erneut gewaschenen Tubes wurden auf Eis gestellt.

3.4.2. Herstellung der Färbelösung

Parallel zu der Zellpräparation wurden die Färbelösungen hergestellt. Pro Proband wurden sieben Farbgemische, eine Kontrollfärbung und eine CD16 PE Einzelfärbung vorbereitet. Die Zellen wurden jeweils in 100 µl Färbelösung gefärbt. Die Kontrollfärbung setzte sich aus 2 µl Beriglobin® und 98 µl PBS, die CD16 PE Einzelfärbung aus 5 µl CD16 PE, 2 µl Beriglobin® und 93 µl PBS zusammen. Der Tabelle 2 ist die Zusammensetzung der Farbgemische zu entnehmen. In jedes Farbgemisch wurde Beriglobin® gegeben, das ein Protein ist, welches die Fc-Rezeptoren der Zellen blockiert. Dies verhindert eine unspezifische Antikörperbindung, die zu einer unspezifischen Färbung der Zellen führen würde.

Tab. 2: Zusammensetzung der Farbgemische

Monoklonale Antikörper	Menge des Antikörpers in μl	B in μl	Beriglobin® in μl
CD14 FITC	2		2
CD16 PE	5		
CD13 PC5	10		
CD3 CY5	-	31	
CD15 CY5	-		
CD19 APC	10		
CD56 APC	20		
BDCA1 BIOTIN	10		
BDCA2 APC	10		

A: 1 μl CD3 CY 5 + 399/799 μl PBS

B: 1 μl CD15 CY 5 + 399 μl aus A

In den Farbgemischen wurden die FITC markierten Antikörper variiert, die anderen Antikörper wurden in der gleichen Verdünnung eingesetzt. Anstelle von CD14 FITC wurden folgende Antikörper verwendet: CD64 FITC 20 μl ; CD32 FITC 2 μl ; CD11b FITC 2 μl ; CD33 FITC 20 μl ; HLA-DR FITC 1 μl ; CD11a FITC 10 μl und die Menge von B so angepasst, dass 100 μl Färbelösung zur Verfügung stand.

3.4.3. Färbung

Die Färbelösungen wurden in das auf Eis stehende Zellpellet gegeben und das Pellet resuspendiert. Danach wurden die Zellen für fünfzehn Minuten in Dunkelheit und auf Eis gefärbt. Die Färbung wurde mit 1 ml PBS gestoppt und die Tubes zentrifugiert, danach wurde der Überstand dekantiert und das Zellpellet auf dem Vortexer resuspendiert. Die Kontrollfärbung und CD16 PE Einzelfärbung wurden mit 400 μl PBS verdünnt und auf Eis gestellt. Die Farbgemische wurden dem oben beschriebenen Waschvorgang erneut unterzogen. Dann wurden die Zellen mit einer Färbelösung, bestehend aus 5 μl Streptavidin APC, 2 μl Beriglobin® und 93 μl PBS, fünfzehn Minuten in Dunkelheit auf Eis gefärbt, um die mit Biotin markierten Antikörper nachzuweisen. Die Färbung wurde wie oben beschrieben gestoppt, die Zellen einmal gewaschen, mit 500 μl PBS verdünnt und auf Eis gestellt. Die Untersuchung der gefärbten Zellen und ihrer Oberflä-

chenproteine erfolgte mit Hilfe der Durchflusszytometrie am FACS Calibur (Becton Dickenson, San Jose, USA).

3.5. Kopplung von Fluorochromen an Proteine

Da bei der Untersuchung humaner Zelloberflächenproteine selbstgekoppelte Antikörper eingesetzt wurden, ist im Folgenden die Kopplung von FITC an Proteine exemplarisch erläutert. Das Protein wurde in Boratpuffer (0,1 M Borsäure; 0,025 M Natriumtetraborat; 0,075 M Natriumchlorid mit 4 N Natriumhydroxidlösung auf pH 9,5 eingestellt) überführt und auf eine Konzentration von 1 mg/ml verdünnt. FITC (Fluorescein-Isothiocyanat, Isomer1/Sigma) wurde in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst, in 50-molaren Überschuß zur Proteinlösung gegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubiert. Danach wurde das Konjugat mittels PD 10 Säule (Pharmacia, Uppsala, Schweden) in PBS – BSA - Azid (5 g/l Rinderserumalbumin (BSA) in PBS und 10 % Natriumazid (NaH₃) überführt. Die Proteinkonzentration und das Kopplungsverhältnis wurden anhand der photometrisch bestimmten optischen Dichte (OD) bei 280 nm und bei 495 nm (Absorptionsmaximum von FITC) bestimmt.

Formel für Kopplung von IgG (Molekulargewicht 150000 Da):

$$\text{Proteinkonzentration [mg/ml]} = (\text{OD}_{280} - 0,35 \cdot \text{OD}_{495}) / 1,4$$

Kopplungsverhältnis (Fluorochrom/Protein)

$$\text{FITC/Antikörper} = 2,87 \cdot \text{OD}_{495} / (\text{OD}_{280} - (0,35 \cdot \text{OD}_{495}))$$

3.6. Immunfluoreszenz

Fluoreszenz bezeichnet das Leuchten eines Stoffes nach Anregung. Dabei wird dem Stoff Energie zugeführt und seine Elektronen gehen auf ein höheres Energieniveau (Absorption). Wenn die Elektronen auf ihr ursprüngliches Energieniveau zurückkehren, senden sie Lichtquanten aus (Emission). Fluorochrome oder Fluoreszenzfarbstoffe besitzen diese Eigenschaft. Aus diesem Grund ist es möglich, Proteine nachzuweisen an denen Fluorochrome gekoppelt sind. In dieser Arbeit wurden 5 Fluorochrome verwendet, diese sind in Tabelle 3 mit ihren Absorptions- und Emissionsmaxima dargestellt.

Tab. 3: Verwendete Fluorochrome mit ihren Absorptions- und Emissionsmaxima

Fluorochrome	Absorptionsmaximum in nm	Emissionsmaximum in nm
Fluoresceinisothiocyanat (FITC)	495	519
Phycoerythrin (PE)	480; 545; 565	575
Allophycocyanin (APC)	650	660
Carboxymethylindocyanin 5 (CY5)	650	666
R-phycoerythrin, Cyanin 5.1 (PC5)	488	670

Die Immunfluoreszenz wurde eingesetzt, um mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper Zelloberflächenproteine auf Monozyten darzustellen. Die Fluoreszenzmessung kann mit dem Durchflussszytometer oder mit einem Fluoreszenzmikroskop erfolgen. Es wurde die direkte Immunfluoreszenz eingesetzt, bei der der Antikörper, spezifisch für das nachzuweisende Antigen (hier Zelloberflächenprotein), direkt an einen fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt ist. Zum Nachweis von BDCA1 wurde die indirekte Immunfluoreszenz genutzt, bei der der antigenspezifische Antikörper (in diesem Fall BDCA1 BIOTIN) durch einen zweiten Antikörper (Streptavidin APC), der fluoreszenzmarkiert ist, sichtbar wird.

3.7. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein optisches Messverfahren, das Streulicht und Fluoreszenzsignale von Partikeln analysiert.

Das Durchflusszytometer verwendet eine „Strom in Strom Methode“, um einzelne Zellen zu analysieren. Ein größerer äußerer Strom, die Träger - bzw. Mantelflüssigkeit, wird zur Bewegung des kleineren inneren Stroms, der die Probe enthält, genutzt. Die Probeflüssigkeit wird unter Druck durch eine Düse gepresst und durch die unter geringerem Druck stehende Mantelflüssigkeit beschleunigt. Dadurch entsteht eine lamelläre Strömung, die jede einzelne Zelle zum Messpunkt bringt (Abb. 3). Diese sogenannte hydrodynamische Fokussierung ist essentiell für den Erfolg der Durchflusszytometrie, (Radbruch A et al., 2000), bei der die Zellen einzeln und auf den Beobachtungspunkt mit einer Genauigkeit von ca. $1\mu\text{m}$ positioniert sind.

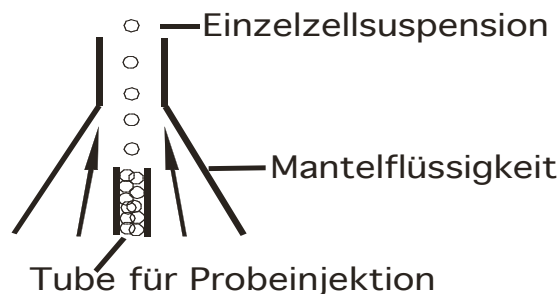


Abb. 3: Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung

Auf dem Messpunkt ist ein Laserstrahl gerichtet. Entsprechend der physikalischen Eigenschaften der Zellen und ihrer Fluoreszenzmarkierung wird das Licht gestreut bzw. durch Fluorochrome absorbiert und nachfolgend emittiert. Dieses Licht wird mittels Photodetektoren registriert und

die Signale computergestützt weiterverarbeitet und ausgewertet.

Anhand des Streulichts können Eigenschaften der untersuchten Zellen ermittelt werden. Dabei wird das in einem geringen Winkel (2-20°) streuende Vorwärtstreulicht (forward scatter - FSC), dessen Intensität von der Größe der Zelle abhängt, und das in einem rechten Winkel streuende Seitwärtsstreulicht (side scatter - SSC), als Maß für die Granularität der Zellen, analysiert. Das Fluoreszenzlicht wird durch optische Filter und dichronische Spiegel in verschiedene Fluoreszenzspektren aufgetrennt und nach deren Passage durch Photomultiplieren verstärkt, in elektrische Ströme und anschließend in digitale Signale umgewandelt. Es kann logarithmisch oder linear verstärkt werden.

In dieser Arbeit erfolgten die Messungen am FACS Calibur von Becton Dickenson, einem 4-Farben FACS Calibur. In Abbildung 4 ist der Aufbau eines 4 - Farben FACS Calibur dargestellt.

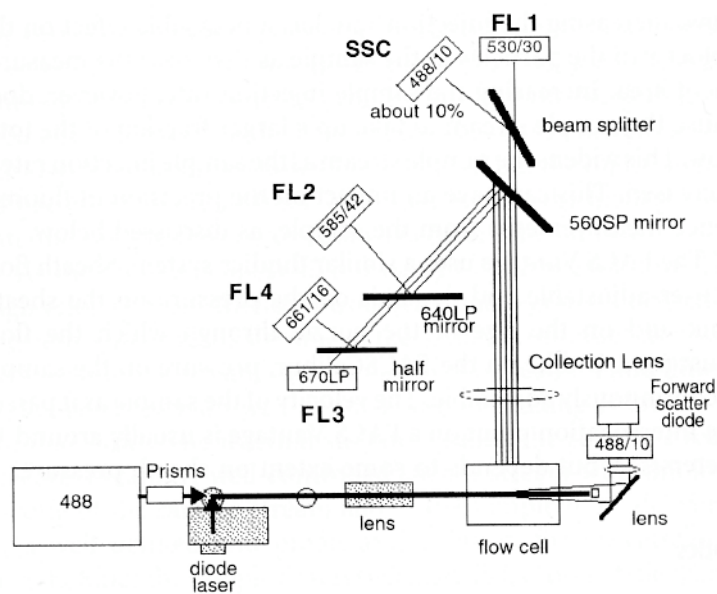


Abb. 4: Aufbau eines 4 – Farben FACS Calibur (nach Diamond RA, De Maggio S et al.: In Living Color, Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York, 2000)

Hier werden die zu untersuchenden Zellen durch zwei Laser verschiedener Wellenlängen ange- regt. Die erste Anregungsquelle ist ein luftgekühlter Argonionenlaser, der 15 mW von 488 nm

Licht (blaues Licht) aussendet. Die zweite Quelle ist ein Diodenlaser, der rotes Licht von 635 nm emittiert. Dies bedeutet, dass Fluorochrome, deren Absorptionsmaxima zwischen 488 nm und 635 nm liegen, durch die Laser angeregt werden können. Das Fluoreszenzlicht wird in vier unterschiedliche Spektren aufgeteilt, dadurch ergeben sich vier Fluoreszenzkanäle. Die Tabelle 4 zeigt eine Charakterisierung dieser Kanäle.

Tab. 4: Charakterisierung der 4 Fluoreszenzkanäle

Fluoreszenzkanal	Anregung durch	Absorptionsmaximum in nm	Emissionsmaximum in nm	Verwendete Fluorochrome
FL1	Argonionenlaser	488	530	FITC
FL2	Argonionenlaser	488	575	PE
FL3	Argonionenlaser	488	650	PC5
FL4	Diodenlaser	635	670	APC; CY5

3.8. Auswertung der durchflusszytometrisch ermittelten Daten

Die Datenauswertung erfolgte mit dem Programm Cell Quest von Becton Dickenson, welches ermöglicht, bestimmte Regionen von Zellpopulationen zu definieren und diese hinsichtlich ihrer Zelloberflächenproteine zu untersuchen.

In dieser Arbeit wurden Regionen so gewählt, dass hauptsächlich Monozyten darin lagen und anderen Zellen nicht einbezogen wurden. Aus diesem Grund wurden solche Antikörper gegen humane Zelloberflächenproteine eingesetzt, die an Zelloberflächenproteine binden, die für andere Leukozyten typisch sind. So war es möglich, die für diese Antikörper positiven Zellen, nicht in die Monozytenregion einzubeziehen. Im Einzelnen zählten zu diesen Zelloberflächenprotein-Antikörpern: CD19 APC für B-Lymphozyten, CD56 APC für natürliche Killerzellen, CD3 CY5 für T-Lymphozyten, CD15 CY5 für Granulozyten und BDCA1 BIOTIN bzw. BDCA2 APC für dendritische Zellen. Andererseits wurde die Monozytenregion so gewählt, dass die zu untersuchenden Zellen CD13 PC5 positiv waren. CD13 ist auf myelomonozytären Zellen zu finden, dazu gehören unter anderem Monozyten, basophile, eosinophile und neutrophile Granulozyten.

Periphere Lymphozyten im Blut oder den Tonsillen sind negativ für CD13. Es ist eine Zinkmetallproteinase, die auch als Aminopeptidase N bezeichnet wird. Diese definierte Zellpopulation wurde hinsichtlich der Expression der Zelloberflächenproteine CD14, CD64, CD32, CD11b, CD33, HLA-DR bzw. CD11a und CD16 analysiert.

3.9. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit dem Statistikprogramm Statistical Package for Social Sciences (SPSS) von Microsoft durchgeführt.

Um die prozentualen Anteile der Zelloberflächenproteine (Oberflächenmarkerfrequenzen) auf Monozyten zwischen Gesunden, Still Patienten und AD Patienten zu vergleichen, wurde zuerst der Kruskal–Wallis–Test angewandt. Dies ist ein nichtparametrischer Test, der mehrere unabhängige Stichproben vergleicht. p -Werte kleiner als 0,05 wurden als Tendenzen, p -Werte kleiner als 0,01 als statistisch signifikant angesehen. Zum Vergleich der Oberflächenmarkerfrequenzen zwischen Gesunden und Still Patienten, Gesunden und AD Patienten bzw. Still und AD Patienten diente der U–Test nach Mann Whitney, dieser ist ebenfalls ein nichtparametrischer Test, welcher zwei unabhängige Stichproben vergleicht. Die ermittelten p -Werte wurden in der gleichen Weise gedeutet ($p < 0,05$ = Tendenzen, $p < 0,01$ = Signifikanzen).