

Aus der Klinik für Kinder-Onkologie, -Hämatologie und -Immunologie der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Prof. Dr. med Göbel

**T-Zell Apoptose bei Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises im
Kindes- und Jugendalter**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität

Düsseldorf

vorgelegt von

Sabine Knipp

2004

„ Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Wolfgang H.-M. Raab

Dekan

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. T. Niehues

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. med. U. Germing

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGEN

1. EINLEITUNG

- 1.1 Geschichtlicher Überblick
- 1.2 Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises im Kindesalter
 - 1.2.1 Juvenile idiopathische Arthritis (JIA)
 - 1.2.2 Kollagenosen
 - 1.2.3 Reaktive Arthritis
- 1.3 Apoptose
 - 1.3.1 Definition der Apoptose
 - 1.3.2 Physiologische Bedeutung von Apoptose
 - 1.3.3 Induktion von Apoptose am Beispiel der Fas-FasLigand Interaktion
 - 1.3.4 Inhibition von Apoptose am Beispiel der Stimulation von CD28
 - 1.3.5 Apoptose bei rheumatischen Erkrankungen
 - 1.3.6 Möglichkeiten der Apoptose-Messung
- 1.4 Fragestellung der Dissertation

2. PATIENTEN UND METHODEN

- 2.1 Patienten
- 2.2 Immunphänotypisierung von T-Zellen/ Lymphozyten
 - 2.2.1 Blutproben und Gewinnung peripherer mononukleärer Zellen (PBMC)
 - 2.2.2 Synovialflüssigkeitsproben und Gewinnung der mononukleären Zellen
 - 2.2.3 Durchflußzytometrie
 - 2.2.3.1 Prinzip der Durchflußzytometrie- Vorteile gegenüber der Fluoreszenzmikroskopie

- 2.2.3.2 Antikörperfärbung für die Durchflußzytometrie
- 2.2.3.3 Durchflußzytometrische Analyse
- 2.3 Nachweis apoptotischer Zellen (Exposition von Phosphatidylserin auf der Membranaußenseite) mittels Annexin-V
 - 2.3.1 Testprinzip
 - 2.3.2 Unterscheiden zwischen Apoptose und Nekrose
 - 2.3.3 Färbeprozedur für die Durchflußzytometrie
 - 2.3.4 Durchflußzytometrische Analyse
- 2.4 Nachweis apoptotischer Zellen mittels TUNEL-Assay
 - 2.4.1 Testprinzip
 - 2.4.2 Färbeprozedur für die Durchflußzytometrie
 - 2.4.3 Durchflußzytometrische Analyse

3. RESULTATE

- 3.1 Peripheres Blut
 - 3.1.1 Juvenile idiopathische Arthritis
 - 3.1.1.1 Fas Expression auf der CD4+ Population
 - 3.1.1.2 Fas Expression auf der CD8+ Population
 - 3.1.1.3 CD28 Expression auf der CD4+ Population
 - 3.1.1.4 CD28 Expression auf der CD8+ Population
 - 3.1.1.5 Phosphatidylserinexposition auf der CD4+ Population
 - 3.1.1.6 Phosphatidylserinexposition auf der CD8+ Population
 - 3.1.1.7 TUNEL-Assay auf der CD4+ und CD8+ Population
 - 3.1.2 Kollagenosen
 - 3.1.2.1 Fas Expression auf der CD4+ Population
 - 3.1.2.2 Fas Expression auf der CD8+ Population

- 3.1.2.3 CD28 Expression auf der CD4+ Population
- 3.1.2.4 CD28 Expression auf der CD8+ Population
- 3.1.2.5 Phosphatidylserinexposition auf der CD4+ Population
- 3.1.2.6 Phosphatidylserinexposition auf der CD8+ Population
- 3.1.2.7 TUNEL-Assay auf der CD4+ und CD8+ Population
- 3.1.3 Reaktive Arthritis
 - 3.1.3.1 Fas Expression auf der CD4+ Population
 - 3.1.3.2 Fas Expression auf der CD8+ Population
 - 3.1.3.3 CD28 Expression auf der CD4+ Population
 - 3.1.3.4 CD28 Expression auf der CD8+ Population
 - 3.1.3.5 Phosphatidylserinexposition auf der CD4+ Population
 - 3.1.3.6 Phosphatidylserinexposition auf der CD8+ Population
 - 3.1.3.7 TUNEL-Assay auf der CD4+ und CD8+ Population
- 3.2 Kniegelenkpunktate
 - 3.2.1 Fas Expression auf der CD4+ Population
 - 3.2.2 Fas Expression auf der CD8+ Population
 - 3.2.3 CD28 Expression auf der CD4+ und CD8+ Population
 - 3.2.4 Phosphatidylserinexposition auf CD4+ und CD8+ Lymphozyten

4. DISKUSSION

5. LITERATUR

6. ZUSAMMENFASSUNG

ABKÜRZUNGEN

ANA	Antinukleäre Antikörper
CD	Cluster of Differentiation
CK	Creatininkinase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FS	Forward Scatter
JIA	Juvenile Idiopathische Arthritis
Lpr	Lymphoproliferation
PBMC	Periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	Phosphat Buffered Saline
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
PI	Propidiumiodid
PS	Phosphatidylserin
SLE	Systemischer Lupus Erythematosus
SMA	Smooth Muscle Antikörper
SS	Sideward Scatter
TCR	T Zell Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TUNEL	TdT-mediated dUTP Nick End Labeling

1. EINLEITUNG

1.1 Geschichtlicher Überblick

Die erste Beschreibung eines Falls mit juveniler Arthritis wird von Cornil 1864 veröffentlicht, gefolgt von Lewis-Smith im Jahre 1871. Einige französische Autoren haben ebenfalls Fälle beschrieben, doch die erste ausführliche Beschreibung der Erkrankung wird von Frederic Still im Jahre 1896 erarbeitet, die erstmalig eine Klassifikation der juvenilen Arthritis, basierend auf 22 Fällen enthielt.

Im frühen 20. Jahrhundert bestand der Hauptanteil der pädiatrischen rheumatologischen Fälle aus Kindern mit rheumatischem Fieber. Der hohe Anteil an Kindern mit dieser Erkrankung nahm in den Fünfziger Jahren nach Einführung der antibiotischen Therapie rapide ab. Mit Abnahme des rheumatischen Fiebers sind die verschiedenen Formen der juvenilen rheumatoiden Arthritis in den Vordergrund getreten. Nach neuer Klassifikation wird die juvenile rheumatoide Arthritis jetzt als Juvenile Idiopathische Arthritis (JIA) bezeichnet (Petty et al., 2001), um die Beteiligung der Erkrankung von der rheumatoiden Arthritis des Erwachsenen zu unterscheiden, die sich in Bezug auf Pathogenese, Diagnostik, Therapie und Prognose wesentlich von der JIA unterscheidet.

1.2 Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises im Kindesalter

1.2.1 Juvenile idiopathische Arthritis (JIA)

Die JIA ist definiert als eine Arthritis bei einem Kind beziehungsweise einem Jugendlichen unter 16 Jahren, welche einen Verlauf über mindestens 3 Monate zeigt (Petty et al., 2001, Cassidy et al., 1986) und bei denen eine andere Ursache (z.B. Infektion, Tumor, etc.) der Arthritis ausgeschlossen ist. Die Einteilung in eine der sieben Subtypen erfolgt in Abhängigkeit von dem Muster und der Anzahl der befallenen Gelenke und der Art der Begleitsymptome wie z.B. Fieber oder Mitbefall

weiterer Organe. Vor Klassifikation in einen der Subtypen sind 6 Monate abzuwarten.

Desweiteren spielen Alter, Geschlecht und Laborbefunde für die Einteilung eine wesentliche Rolle. Im Folgenden werden die Subtypen der JIA in einer Tabelle aufgeführt.

Tabelle 1, Subtypen der JIA

Subtyp	Geschlecht	Symptome	Labor
systemische Arthritis (Still-Syndrom)	keine Präferenz	Arthritis mit Fieber über mindestens 2 Wochen Dauer, zusätzlich mindestens 1 der folgenden Symptome: Nicht fixes erythematöses Exanthem, generalisierte Lymphknotenvergrößerung, Hepato- oder Splenomegalie, Serositis	
seronegative Polyarthritis	keine Präferenz	Arthritis von 5 oder mehr Gelenken in den ersten 6 Monaten nach Krankheitsbeginn, symmetrischer Gelenkbefall, Uveitis	Negativer Rheumafaktor, ggf. positive antinukleäre Antikörper
seropositive Polyarthritis	keine Präferenz	Arthritis von 5 oder mehr Gelenken in den ersten 6 Monaten nach Krankheitsbeginn	Positiver Rheumafaktor, häufig positive antinukleäre Antikörper
Oligoarthritis Typ I	weibliches Geschlecht	Alter 1-6 Jahre, asymmetrischer Gelenkbefall, Iridozyklitis	
Oligoarthritis Typ II	männliches Geschlecht	Schulalter, Befall der unteren Extremitäten, Rückenschmerzen, Enthesiopathien, Sakroileitis	HLA B27 oft positiv

1.2.2 Kollagenosen

Kollagenosen sind im Kindesalter extrem seltene Erkrankungen. Sie sind definiert als systemisch-entzündliche Erkrankungen des Bindegewebes und werden den Autoimmunerkrankungen zugeordnet. Unter dem Begriff der Kollagenose werden eine ganze Reihe von Erkrankungen zusammengefaßt, darunter der Systemische Lupus Erythematoses (SLE), die Dermatomyositis, die Sklerodermie und das Sharp-Syndrom.

Die Diagnose eines Systemischen Lupus Erythematoses (SLE) wird im Kindesalter analog zu den Kriterien im Erwachsenenalter gestellt. Es gelten die Kriterien der American Rheumatism Association. Es müssen 4 von 11 Kriterien des American College of Rheumatology vorliegen (Tan et al., 1982)

- Haut: Gesichtserythem (z.B. Schmetterlingserythem), Lupus discoïdes, Photosensibilität
- Schleimhaut: orale Ulzera
- Gelenke: Arthralgien
- Nieren: Proteinurie
- ZNS: Krampfanfälle
- Seröse Häute: a) Pleuritis oder b) Perikarditis
- Hämatopoiese: a) hämolytische Anämie, oder b) Leuko- oder c) Thrombozytopenie
- Labor: DNA-Antikörper, SMA, LE-Zellen, ANA

Eine juvenile Dermatomyositis liegt vor, wenn man eine symmetrische Muskelschwäche mit gleichzeitigem Vorliegen typischer Hautbefunde wie Violettverfärbung und erythematöse Schwellung der Lider oder Gottronsche Papeln feststellen kann. Die Muskelenzyme, v.a. CK können erhöht sein.

Die Sklerodermie ist im Kindesalter eine extrem seltene Erkrankung. Man unterscheidet eine lokalisierte von einer systemischen Sklerodermie. Die lokalisierte Form manifestiert sich an Haut und Subkutangewebe (Uziel et al., 1994). Die systemische Sklerodermie wird in zwei Subtypen unterteilt: die diffus systemische und die limitiert systemische Sklerodermie (LeRoy et al., 1988). Zu der limitiert systemischen Sklerodermie wird auch das sogenannte CREST-Syndrom gezählt (Calcinosis cutae, Raynaud-Phänomen, Ösophagusbeteiligung, Sklerodaktylie, Teleangiektasien).

Ein Sharp-Syndrom macht sich durch das Vorliegen verschiedener Symptome des SLE, der Dermatomyositis und der chronisch juvenilen Arthritis bemerkbar, weshalb das Synonym Mischkollagenose besteht.

1.2.3 Reaktive Arthritis

Die Krankheitsentität der reaktiven Arthritis wird im Jahr 1969 von Ahvonen erstmals benutzt (Ahvonen et al., 1969). Unter reaktiven Arthritiden werden Gelenkentzündungen zusammengefasst, die zum Teil mit Infektionen assoziiert sind. Die auf die infektiöse Erkrankung folgende Gelenkentzündung zeigt sich meist erst Wochen bis Monate nach dem Infekt. In der Synovialflüssigkeit lassen sich keine Erreger mehr anzüchten (Zeidler et al., 1996). Der genaue Mechanismus der reaktiven Gelenkentzündung ist bisher noch nicht hinreichend geklärt. Wahrscheinlich handelt es sich um eine Kreuzreaktion der Immunantwort gegen das infektiöse Agens und molekulär ähnlich erscheinenden Gelenkstrukturen.

1.3 Apoptose

Es ist weithin unklar, welcher Pathomechanismus rheumatischen Erkrankungen zugrunde liegt. Ein gestörter Ablauf der Apoptose von Zellen des Immunsystems könnte die Entstehung von rheumatischen Erkrankungen im Kindesalter begünstigen (Sioud et al., 1998, Grom et al., 2000, Pignata et al., 2000, Pignatti et al., 2001). Im Folgenden wird auf die Apoptose, deren physiologische und pathophysiologische Bedeutung bei rheumatischen Erkrankungen eingegangen.

1.3.1 Definition der Apoptose

Die Apoptose ist ein spezifischer, aktiver, energieverbrauchender Vorgang, der von der Zelle selbst durchgeführt wird und im Zelltod endet. Die Nekrose dagegen ist ein unspezifischer Prozeß, der durch physikalischen oder chemischen Einfluß eingeleitet wird, wie z.B. Sauerstoffmangel oder Hitze. Die Apoptose ist ein in jeder Zelle genetisch verankerter Weg zu sterben, ohne daß die umgebenen Zellen in Mitleidenschaft gezogen werden. Sie wird als programmierte kontrollierte Selbstzerstörung der Zelle bezeichnet. Der Begriff der Apoptose wird erstmals von Wyllie und Kerr benutzt, um die Morphologie des programmierten Zelltods zu beschreiben (Wyllie et al., 1980). Apoptotische Zellen werden in vivo phagozytiert, bevor es zur Zellyse kommt. Einen Überblick über die wesentlichen Unterschiede der Apoptose zur Nekrose gibt Tabelle 2.

Tabelle 2, Unterschiede zwischen Nekrose und Apoptose modifiziert nach S. Hetts (1998)

Merkmale	Nekrose	Apoptose
Energiebedarf	kein Energiebedarf	ATP-abhängig
Histologie	zelluläre Schwellung, Disruption von Organellen, Absterben von Gewebeteilen	Chromatinkondensation, apoptotische Körperchen, Tod von einzelnen isolierten Zellen
DNS Muster	Unterschiedlich und zufällig große Fragmente	durch gezielte enzymatische Fragmentation Basenpaare bestimmter Länge
Plasmamembran	Lysiert	weitgehend intakt, molekulare Alterationen, teilweise Blasen vorhanden
Gewebereaktion	Entzündung	Keine Entzündung

1.3.2 Physiologische Bedeutung von Apoptose

Apoptose ist ein physiologischer und häufig für den Organismus sinnvoller Prozeß zur Erhaltung der Zell- und Gewebemhomöostase. Eine Imbalance zwischen Zellproliferation und Apoptose spielt möglicherweise bei der Entstehung von neoplastischen Erkrankungen eine wichtige Rolle (Greene and Martin, 1995). Bei der Entwicklung des Immunsystems, insbesondere der T-Zellen besteht im Thymus der Mechanismus der zentralen Toleranzinduktion. Thymozyten sterben einen apoptotischen Tod, wenn sie die positive Selektion nicht bestehen oder als Folge der Autoantigenerkennung negativ selektioniert werden (Blackman et al., 1990, Jenkinson et al., 1989). Andere Arbeiten zeigen, dass neben der zentralen Toleranzinduktion im Thymus auch ein Mechanismus der peripheren Toleranzinduktion außerhalb des Thymus existiert. Reife T-Lymphozyten sterben in der Peripherie durch Apoptose, wenn diese über den T-Zell-Rezeptor (TCR) aktiviert werden, die sogenannte periphere Toleranzinduktion (Wesselborg et al., 1993).

Zytotoxische T-Lymphozyten und NK-Zellen induzieren Apoptose virusinfizierter Zellen und tragen damit zur Beseitigung dieser Zellen bei (Lowin et al., 1994). Ein gestörter Ablauf der Toleranzinduktion beziehungsweise der Beseitigung virusinfizierter Zellen könnte zur Entstehung von Autoimmunerkrankungen beitragen.

1.3.3 Induktion von Apoptose am Beispiel der Fas-FasLigand Interaktion

Der Mechanismus der Apoptose auf molekularer Ebene wird zunehmend entschlüsselt. Neben unspezifischen Signalen (z B. Entzug von Wachstumsfaktoren, DNA-Schädigung) kann Apoptose spezifisch durch Zytokine oder Interaktion mit zellmembranständigen Liganden induziert werden. Einer von vielen Mechanismen der Apoptoseinduktion ist die Interaktion von Fas (Fas) und Fas Ligand (Fas Ligand) (Nagata et al., 1995).

Fas findet man auf T- und B-Zellen, nicht aber auf NK-Zellen. Es handelt sich um ein 36-45 kDa Membranprotein. Es gehört zu der nerve growth factor (NGF)/ tumor necrosis factor (TNF)-Rezeptor Superfamilie. Der Fas-Ligand gehört zur TNF-Familie. Man findet ihn sowohl auf aktivierten T-Lymphozyten als auch auf NK-Zellen, darüber hinaus wird Fas-Ligand in den sogenannten immunpriviligierten Orten (Gehirn, Hoden, Ovar und Auge) exprimiert.

Fas ist ein Rezeptor, den viele Zellen tragen, er ist aber vor allem auf aktivierten Lymphozyten zu finden. Die Rolle des Fas-Rezeptors bei der Entstehung von Autoimmunität wird bei der Lpr (Lymphoproliferation)-Mutation bei Mäusen bestätigt. Bei Lpr-Mäusen ist die Fas-Expression als Folge einer Mutation im Fas-Gen defekt und es kommt zur Akkumulation von abnormalen T-Lymphozyten und zur Autoimmunität (Cohen, 1991). Die Bedeutung des Fas-Rezeptors bei Menschen wird bei der Entdeckung der Pathogenese des autoimmunen lymphoproliferativen Syndroms bestätigt (Rieux-Laucat et al., 1995, Sneller et al., 1997). Diese Patienten

haben eine Mutation des Fas-Gens. Das Syndrom geht einher mit Lymphadenopathie, Hepatosplenomegalie, hämolytischer Anämie und Thrombozytopenie.

Bei Stimulation des Fas-Moleküls kommt es anschließend intrazellulär zur Aktivierung von Proteinkinasen und Cysteinproteasen (z.B. Interleukin-1 converting enzyme, ICE) im Zytosol und Endonukleasen im Zellkern, die dann zu der für die Apoptose charakteristischen Fragmentierung der DNA führen. An der Zellmembran kommt es zur Exposition von Phosphatidylserin, welches sich normalerweise ausschließlich auf der Membraninnenseite befindet, an die Außenseite der Zellmembran. Es wird postuliert, daß phagozytierende Zellen die apoptotischen Zellen anhand des Phosphatidylserins erkennen (van Engeland et al., 1998) und aufnehmen ohne eine Entzündungsreaktion hervorzurufen.

1.3.4 Inhibition von Apoptose am Beispiel der Stimulation von CD28

Eine Inhibition der Apoptose kann mittels Aktivierung des Oberflächen-Proteins CD28 erreicht werden. CD28 ist ein 44 kDa Glykoprotein. Man findet es auf T-Lymphozyten. Es ist für die Aktivierung von T-Lymphozyten unabdingbar. Die Aktivierung von CD28 führt zur Hochregulation des intrazellulären Proteins Bcl-xl aus der Bcl-2 Proteinfamilie, das die Aktivität der Cysteinproteasen und damit die Apoptose hemmt (Boise et al., 1995). In jüngster Zeit wird ein weiteres Charakteristikum der CD28-Expression auf T-Lymphozyten entdeckt. Die CD28-Expression korreliert negativ mit der Anzahl der Zellteilungen, die eine T-Lymphozyten-Population bereits durchlaufen hat. Schliesslich korreliert die Expression von CD28 mit dem Alter, je höher das Alter der Person, desto weniger T-Lymphozyten tragen das CD28-Molekül. In sehr hohem Alter können bis zu 95% der T-Lymphozyten CD28-negativ sein. Man nennt diesen Umstand Alterung der

Replikationsfähigkeit ("replicative senescence") oder klonale Erschöpfung ("clonal exhaustion") (Effros et al., 1996), da aus der Zellbiologie bekannt ist, daß Zellen nur eine limitierte, maximale Anzahl an Zellteilungen (sog. Hayflick Limit) durchlaufen können.

1.3.5 Apoptose bei rheumatischen Erkrankungen

Bei verschiedensten Erkrankungen werden sowohl erhöhte wie auch erniedrigte Apoptoseraten der beteiligten Zellen entdeckt (Thompson, 1995). Auch bei rheumatischen Erkrankungen werden Veränderungen des Apoptoseverhaltens untersucht. Durch eine Veränderung der Selbsttoleranz kann es zu einer vermehrten Apoptoseinduktion kommen. Ein Hinweis für die Beteiligung eines gestörten Apoptoseablaufes an der Entstehung von rheumatischen Erkrankungen ist der Phänotyp der Lpr-Maus (s.o.), bei der unter anderem die Symptome einer rheumatoiden Arthritis hervorgerufen werden (Cohen et al. 1991). Rheumatische Symptome treten ebenso bei der gld-Maus auf, bei der die Fas-Ligand Expression induzierte Apoptose gestört ist (Mituko et al. 1997).

Bei der Untersuchung von T-Zellen wird festgestellt, dass CD4-Zellen, welche nicht das CD28 Molekül tragen (CD4+CD28-) bei Patienten mit rheumatoider Arthritis vermehrt sind, und zwar besonders bei denjenigen mit extraartikulärem Befall (Martens et al. 1997). Bei Kindern mit rheumatischen Erkrankungen gibt es bisher keine systematische Veröffentlichung zur CD28 Expression auf T-Zellen.

1.3.6 Möglichkeiten der Apoptose-Messung

Bei dem chronologischen Ablauf der Apoptose erkennt man zunächst eine Exposition der Phospholipide, die sich normalerweise auf der Innenseite der Zellmembran befinden, nach außen. Dies trifft z. B. für Phosphatidylserin zu, das man mittels Annexin-V in einem frühen Apoptosestadium auf der Außenseite der Zellmembran finden kann. Kurz darauf läßt sich eine DNA-Fragmentierung in Fragmente von ca. 200 Basenpaaren nachweisen, was durch endogene Nucleasen ausgeführt wird, die die DNA jeweils zwischen den Nucleosomen schneidet. Dieses Stadium läßt sich mittels TUNEL-Assay erkennen. Dies geschieht gefolgt von der Auflösung des Zellkerns.

Diese Stadien sind begleitet von einer zunehmenden Veränderung der Zellmorphologie. Darauf folgend werden von der Zelle membranumgebene Vesikel abgestoßen, die Teile der Zelle beinhalten.

Es gibt eine Vielzahl von Möglichkeiten Apoptose zu messen. Sämtliche dieser Methoden beruhen auf den charakteristischen, morphologischen und biochemischen Veränderungen, welche die Zelle während der Apoptose durchläuft (Zellschrumpfung, Chromatinkondensation, Endonukleaseaktivität und die typische DNA-Fragmentation). Das Testprinzip wird im Methodenteil vor der jeweiligen Methode erklärt.

1.4 Fragestellung der Dissertation

Folgende Fragestellungen werden bearbeitet, um nähere Kenntnisse zur Immunpathogenese und insbesondere zur Rolle der Apoptose zu gewinnen:

- A) Ist die Apoptosebereitschaft bzw. das Apoptoseverhalten der T-Lymphozyten des peripheren Blutes von Kindern mit Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises gegenüber gesunden Normalpersonen gleichen Alters verändert?
- B) Unterscheiden sich JIA, Kollagenosen und Reaktive Arthritiden im Kindesalter in Bezug auf die Apoptosebereitschaft und das Apoptoseverhalten von T-Lymphozyten im peripheren Blut?
- C) Gibt es einen Unterschied des Anteils apoptotischer Lymphozyten eines erkrankten Kindes im peripheren Blut gegenüber dem Anteil apoptotischer Lymphozyten im Gelenkpunktat?

Um diese Fragen zu beantworten, wird der Anteil der T-Zellen aus peripherem Blut und aus Gelenkpunktat bestimmt, der sich in Apoptosebereitschaft befindet oder bereits apoptotisch ist. Bei CD4- und CD8-positiven T-Zellen wird der prozentuale Anteil an CD28-positiven, Fas-positiven, Annexin-positiven und Tunel-positiven Zellen untersucht. CD28 ist ein Oberflächenprotein, dessen Aktivierung vor der Initialisierung der Apoptose schützen kann, Fas zeigt den Bereitschaftsgrad einer Zelle zur Apoptose an, Annexin-V erfaßt eine frühe Phase der Apoptose und der TUNEL-Assay eine spätere.

2. PATIENTEN UND METHODEN

2.1 Patienten

42 Kinder mit Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises (29 Kinder mit JIA, 7 Kinder mit Kollagenosen und 6 Kinder mit einer Reaktiven Arthritis) und 9 heparinisierte Synovialflüssigkeitsproben werden untersucht. Für genauere Angaben siehe auch Tabelle 3-6. Als Kontrollgruppe dienen insgesamt 23 gesunde Kinder aus der chirurgischen Abteilung der Universitätsklinik Düsseldorf, jeweils altersangepasst zur Gruppe der Patienten mit JIA, Kollagenosen und reaktiver Arthritis. In diese Kontrollgruppe werden ausschließlich Kinder einbezogen, die sich dort einem Elektiveingriff unterziehen, und die zur Zeit des Eingriffes weder Entzündungen noch Zeichen allergischer Reaktionen vorweisen, und die keine chronischen Erkrankungen haben.

Die Kontrollwerte für die Kniegelenkspunktate bestehen aus 4 Proben von Synovialflüssigkeit nicht-entzündlicher, degenerativer oder traumatischer Gelenksergüsse von erwachsenen Patienten der orthopädischen Klinik der Universität Düsseldorf, von denen 3 bei elektiven prothetischen Eingriffen bei Arthrose und 1 bei einem traumatischen Reizerguss gewonnen wird .

Insgesamt werden 9 Kniegelenkspunktionen bei 7 Kindern mit Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises durchgeführt. Für genauere Angaben siehe Tabelle 7.

Tabelle 3, Patientencharakteristik Oligoarthritis

Erkrankung	Initialen/ Geschlecht	Subtyp	Alter in Jahren	BSG mm/h	CR P mg/ dl	Therapie
JIA Oligoarthritis N=17	BL/w	HLAB27+	10,6	7/22	Neg	Naproxen 500mg/d
	BE/w	Typ I	4,2	9/21	0,2	Naproxen 150mg/d
	BC/w	Typ I	2,3	6/12	0,4	Keine
	HC/w	Typ I	11,4	7/20	0,4	Naproxen 500mg/d
	JD/w	Typ I	4,6	25/60	1,1	Naproxen 200mg/d
	KI/w	HLA B27+	10,6	5/14	0,1	Methotrexat 10 mg/Woche Diclofenac 75mg/d
	LD/m	Typ I	8,4	13/32	0,3	Naproxen 500mg/d
	NN/w	Typ I	5,5	11/28	0,5	Methotrexat 10 mg/Woche Naproxen 500mg/d
	NT/m	HLAB27+	12,8	6/25	Neg	Diclofenac 150mg/d
	PR/m	Typ I	7,6	5/15	0,1	Methotrexat 7,5mg/Woche Naproxen Saft 50mg/d
	RI/w	Typ I	9,2	8/20	Neg	Diclofenac 75mg/d Methotrexat 12,5mg/Woche
	RP/w	Typ I	4,5	13/36	2,6	Methotrexat 7,5mg/Woche Diclofenac 25mg/d
	SN/w	Typ I	8,7	10/26	Neg	Ibuprofen 75mg/d Hydrochloroquin 4mg/Woche
	SS/w	Typ I	1,8	39/87	0,5	Indomethacin 37,5mg/d
	SR/w	Typ I	13,5	10/27	0,1	Diclofenac 100mg/d MTX 12,5mg/Woche Indomethacin 25mg/d
	YS/m	HLAB27+	12,1	12/28	0,3	Hydrochloroquin 2mg/d Naproxen 2mg/d Sulfasalazin 2mg/d
	ZA/w	Typ I	17,5	16/32	0,7	Sulfasalazin 3mg/d Naproxen 1000mg/d

Tabelle 4, Patientencharakteristik JIA

Erkrankung	Name/ Geschlecht	Subtyp	Alter	BSG	CRP	Therapie
JIA Polyarthritis N=9	AE/w	RF-	13,7	70/10	2	Methotrexat 20 mg /Woche 0
	CM/w	RF-	5,4	30/70	0,4	Naproxen 250mg Sulfasalazin 1mg
	CG/w	RF-	4,4	5/11	0,3	Keine
	CM/w	RF-	10	30/65	1,3	Prednison 8mg/48h
	EM/w	RF-	8	9/20	Neg	Keine
	EA/w	RF-	12,8	3/6	Neg	Ibuprofen 50mg/d
	KY/w	RF-	4,2	46/97	Neg	Methotrexat 7,5mg/Woche Naproxen 150mg/d Prednison 4mg/48h
	MT/w	RF-	11,9	20/55	Neg	Methylprednisolon 4mg/48h Naproxen 250mg Azathioprin 75mg/d
	RS/w	RF-	9,9	5/11	0,4	Naproxen 300mg
Morbus Still N=3	BK/m		9,2	40/75	1,6	Decortin 40mg/d Naproxen 300mg/d
	BA/w		10,8	11/38	0,5	Decortin 90mg Diclofenac 75mg
	MN/m		5,7	2/5	Neg	Prednison 2mg/48h Methotrexat 7,5mg/Woche Indomethacin 45mg/d

Tabelle 5, Patientencharakteristik Kollagenosen

Erkrankung	Name/ Geschlecht	Subtyp	Alter	BSG	CRP	Therapie
Kollagenosen	BT/w	Polymyositis	18,2	37/65	1,2	Prednison 30mg/d
N=7	HS/w	Sharp-Syndrom	18,3	11/25	Neg	Prednison 4mg/48h Hydrochloroquin 250mg/d Azathioprin 100mg/d
	JT/m	Lupus profundus	18,3	44/80	0,5	Cyclosporin 200mg/d Azathioprin 150mg/d Enalapril 20mg/d Prednison 5mg/d
	LS/w	SLE	10,1	17/40	0,1	Hydrochloroquin 250mg/d Diclofenac 160mg
	MC/w	lokalisierte Sklerodermie	14,1	16/35	0,4	Diclofenac 75mg
	PN/w	SLE	16,7	8/22	Neg	Diclofenac 100mg Prednison 8mg/d
	SM/m	Panniculitis	4,8	5/10	0,4	Cyclosporin A 0,9mg Prednison 2mg/48h

Tabelle 6, Patientencharakteristik reaktive Arthritis

Erkrankung	Name/ Geschlecht	Subtyp	Alter	BSG	CRP	Therapie
Reaktive Arthritis	KH/m	Post Yersinien	11,4	10/20	0,1	Sulfasalazin 300mg/d Naproxen 200mg/d
N=6	KJ/m	Post GI-Infektion	11,1	5/15	0,3	Keine
	MS/m	HLA B27+ Post GIInfekt	15,5	50/85	0,9	Diclofenac 2mg/d Sulfasalazin 300mg
	SJ/m	Post Yersinien	10,5	10/19	0,4	Naproxen 200mg/d
	TA/m	Post GIInfekt	11,9	110/1 30	7,7	Diclofenac 150mg/d
	ZO/w	Colitis ulcerosa	12,10	20/50	2,9	Prednison 2mg/d Naproxen 500mg/d Mesalazin 750mg/d

Tabelle 7, Patientencharakteristik Synovialflüssigkeitsproben

Patient	Geschlecht	Alter	Erkrankung	Therapie
AE Knie links und rechts	w	13,7	Juvenile Polyarthritis	MTX 20 mg /Woche
JD	w	4,9	Juvenile Oligoarthritis	Naproxen 2x2ml/d
KI	w	10,8	Juvenile Oligoarthritis	MTX 10 mg/Woche Diclofenac 3x25mg/d
LD	m	9,4	Juvenile Oligoarthritis	Naproxen 2x250mg/d
TA	m	11,9	Reaktive Arthritis	Voltaren 3x50mg/d
YS	w	12,10	Juvenile Oligoarthritis	Hydrochloroquin 2x1mg/d Naproxol 2x1mg/d Azulfidin 2x1mg/d
PR Knie links und rechts	m	7,11	Juvenile Oligoarthritis	MTX 7,5mg/Woche Naproxen Saft 1x1ml/d

2.2 Immunphänotypisierung von T-Zellen/ Lymphozyten

Die Analyse der membranständigen Antigene CD28, Fas, CD4, CD8 und die Apoptoseuntersuchungen werden an heparinisierten Blutproben des oben genannten Patientenkollektivs und an peripherem Blut der oben beschriebenen Kontrollpersonen durchgeführt.

2.2.1 Blutproben und Gewinnung peripherer mononukleärer Zellen (PBMC)

Lymphozyten (heparinisiert, Vacutainersystem) werden aus dem Blut einer peripheren Venenpunktion mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Alle Proben werden sofort, jedoch maximal innerhalb von 6 Stunden nach Gewinnung verarbeitet. 5 ml heparinisiertes Blut werden 1:1 mit Phosphatpuffer PBS (pH 7,3, NaCl 8,0g, KCl 0,2g, KH₂PO₄ 0,25g, Na₂HPO₄ 1,35g, Aq.dest. ad 1000ml) verdünnt. Das Gemisch wird sehr langsam über 25ml Ficoll (Pharmacia, Uppsala, Schweden) geschichtet. Das mit verdünntem Blut überschichtete Ficollröhrchen wird bei 20°C und 2500Upm 15 min ohne Bremse zentrifugiert. Nach dem Zentrifugationsschritt wird die deutlich abgesetzte weiße Leukozyteninterphase, die sich über dem Ficoll befindet, mit einer 10ml Pipette abgenommen und in ein 50ml Falcon Tube (Becton Dickinson) überpipettiert, in dem sich bereits 20 ml PBS befanden. Dieses Gemisch wird erneut bei 20°C, 2000 Upm und höchster Bremse 10 min zentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wird erneut mit 10ml PBS und danach mit 10ml RPMI1640 bei 1800 Upm, 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Durch Zugabe von RPMI und mithilfe eines Zellzählgerätes (Mölab, Hilden) wird eine Endkonzentration von 2×10^6 Zellen/ml Lösung hergestellt.

2.2.2 Synovialflüssigkeitsproben und Gewinnung der mononukleären Zellen

Lymphozyten (heparinisiert, Vacutainersystem) werden aus Kniegelenkspunktionen isoliert. Die Synovialflüssigkeit wird zunächst bei 2000 U für 10 Minuten bei 20° C und höchster Bremse zentrifugiert und der Überstand entfernt. Daraufhin wird das Zellpellett mit 10ml Phosphatpuffer PBS (pH 7,3, NaCl 8,0g, KCl 0,2g, KH₂PO₄ 0,25g, Na₂HPO₄ 1,35g, Aq.dest. ad 1000ml) verdünnt. Das Gemisch wird sehr langsam über 25ml Ficoll (Pharmacia, Uppsala, Schweden) geschichtet. Das überschichtete Ficollröhrchen wird bei 20°C und 2500Upm 15 min ohne Bremse zentrifugiert. Die weitere Zellisolierung verläuft analog zu der bereits in Punkt 2.1.2 dargelegten Methodik.

2.2.3 Durchflußzytometrie

2.2.3.1 Prinzip der Durchflußzytometrie:

Vorteile gegenüber der Fluoreszenzmikroskopie

Die analytische Durchflußzytometrie ermöglicht, Zellen zu identifizieren, die mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern angefärbt sind. Das Prinzip der Durchflußzytometrie ist die simultane Messung verschiedener physikalischer Eigenschaften einzelner Zellen oder Partikel (Events), wobei sie einzeln hintereinander in einem Flüssigkeitsstrom untersucht und ausgewertet werden. Die Analyse der Zellen wird anhand von Bestimmung von Fluoreszenzintensität und Streulicht durchgeführt. Nach dem Prinzip der Dunkelfeldmikroskopie wird die Sichtbarmachung der Lichtstreuung dazu genutzt, sowohl die Größe als auch die Granularität der Zellen zu bestimmen. Gleichzeitig werden nach dem Prinzip der Fluoreszenzmikroskopie Zellen, die mit einem Bestimmten fluoreszierenden Farbstoff markiert sind, identifiziert. Dieses Verfahren hat gegenüber der Ermittlung dieser

Zellen mit dem Fluoreszenzmikroskop den Vorteil, das in einer Messung nicht nur 100-300 Zellen ausgezählt werden, wie dies bei der Fluoreszenzmikroskopie üblich ist, sondern es wird eine viel größere Anzahl von Events ausgewertet. Diese Events entsprechen zum überwiegenden Teil Zellen. In der vorliegenden Arbeit werden pro Messung jeweils 10000 Events untersucht, was ermöglicht, wesentlich genauere Angaben über prozentuale Aufteilung der Zellpopulation zu verschiedenen Unterpopulationen machen zu können.

Die Durchflußzytometrie erlaubt die gleichzeitige Messung von Fluoreszenz- und Streulichtsignalen an einzelnen Zellen. Relative Zellgröße, Granularität und drei verschiedene Fluoreszenzintensitäten können für mehrere tausend Zellen in sehr kurzer Zeit bestimmt werden. Über eine angeschlossene Datenauswertung werden die erhobenen Daten verarbeitet und die Ergebnisse in einer einfachen und klaren Form ausgegeben. Verschiedene Zellarten innerhalb einer Probe sind getrennt analysierbar, die Ergebnisse sind zuverlässig und objektiv quantifiziert.

Die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe sind FITC (Fluorescein-Isothiocyanat), PE (Phycoerythrin) und PerCP (Peridinin Chlorophyll Protein).

Es werden also zu jeder Zelle fünf Informationen gespeichert, und zwar Größe, Granularität und drei verschiedene Fluoreszenzen.

2.2.3.2 Antikörperfärbung für die Durchflußzytometrie

Es werden direkte Färbungen durchgeführt, bei denen die Antigene mit Fluorochrom-konjugiertem Primärantikörper nachgewiesen werden. Pro Färbung werden 4×10^5 hoch 5 frisch isolierte Zellen (200 μ l der Zellsuspension) eingesetzt. Nach Zugabe von 3 ml PBS werden die Zellen bei 1500 Upm und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wird der Überstand mit einer Vakuumpumpe abgesaugt und das

Zellpellet gefärbt. Die Färbung erfolgt in Polystyrolröhrchen (Becton Dickinson, Heidelberg).

Für die Färbung werden 20 μ l des jeweiligen Antikörpers auf das Zellpellet pipettiert und für 10 Minuten inkubiert. Nach Ablauf der 10 Minuten wird das Röhrchen mit 3ml PBS aufgefüllt und für 5 Minuten bei 1500Upm und 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wird dann für die durchflußzytometrische Analyse in 200 μ l PBS und 200 μ l Fixationspuffer (PBS mit 1% Formaldehyd) resuspendiert.

Die Färbungen erfolgen mit monoklonalen Antikörpern von Becton Dickinson (BD) und Immunotech (Imm) in folgenden Kombinationen:

- anti-CD4 PE (BD) / anti-Fas FITC (Imm)
- anti-CD8 PERCP (BD)/ anti-Fas FITC (Imm)
- anti-CD4 PE (BD) / anti-CD28 FITC (Imm)
- anti-CD8 PERCP (BD)/ anti-CD28 FITC (Imm)

Als Negativkontrolle wird zusätzlich eine Färbung mit Maus-IgG (IgG1 FITC/ IgG2a PE) von BD durchgeführt.

Um die Bereitschaft zur Induktion von Apoptose im jeweiligen Individuum zu messen, wird in der vorliegenden Arbeit die Expression von Fas auf T-Lymphozyten ermittelt. Dazu werden anti-Fas (Fas) mononukleäre Antikörper benutzt.

Um die Bereitschaft zur Inhibition von Apoptose auf den T-Lymphozyten zu ermitteln, wird der Anteil CD28-positiver Zellen gemessen.

2.2.3.3 Durchflußzytometrische Analyse

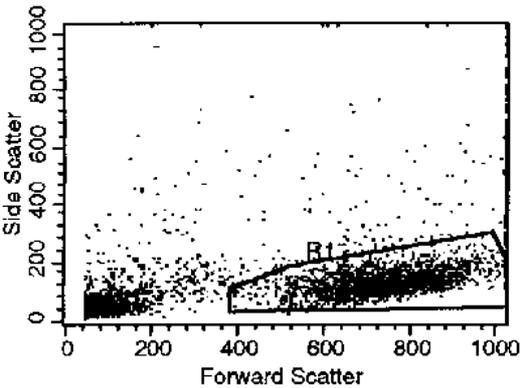
Die Fluoreszenzanalyse wird mit einem FACScan Durchflußzytometer der Firma Becton Dickinson mit einem Argon-Laser durchgeführt. Bei einigen Messungen wird eine sogenannte Kompensation durchgeführt.

Überlappt das Emissionsspektrum eines Farbstoffes leicht mit dem eines anderen, wie in dieser Arbeit z.B. das von PE mit dem von Propidiumiodid, so wird diese Überlappung durch einen Farbfilter nicht beseitigt. Wird diese überlappende Emission nicht kompensiert, dann erscheinen bei der Darstellung manche Zellen als doppelt gefärbt. Bei einer tatsächlich doppelt gefärbten Zelle addieren sich die beiden Fluoreszenzen auf. Die Fluoreszenz-Kompensations-Elektronik ist so konzipiert, den Anteil der einen Emission, die im zweiten Emissionsbereich erscheint, zu subtrahieren.

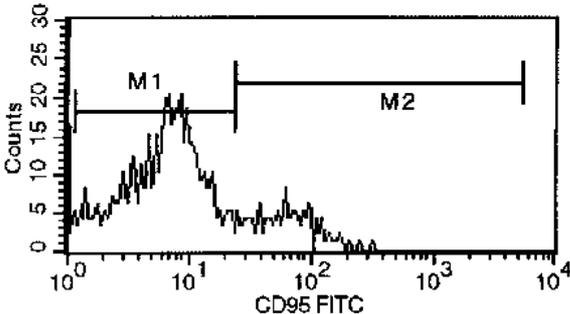
Abbildung 1

Fas-Expression (CD95 FITC) auf CD4-Lymphozyten aus dem peripheren Blut einer Kontrollperson mittels FACS

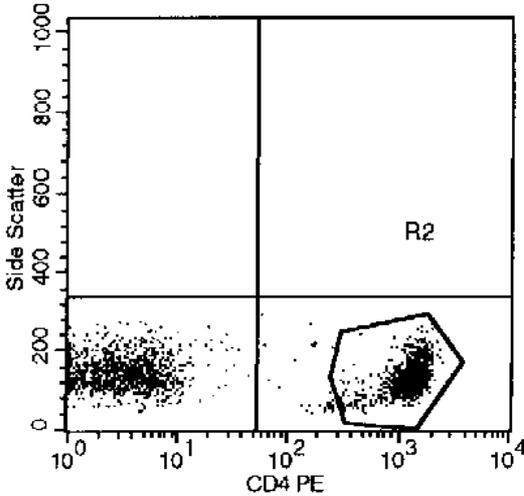
a)



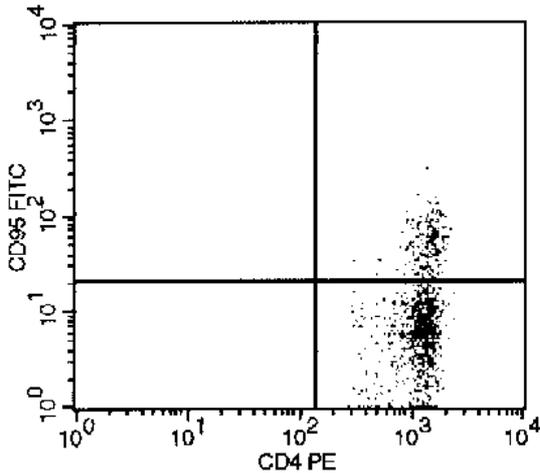
b)



c)



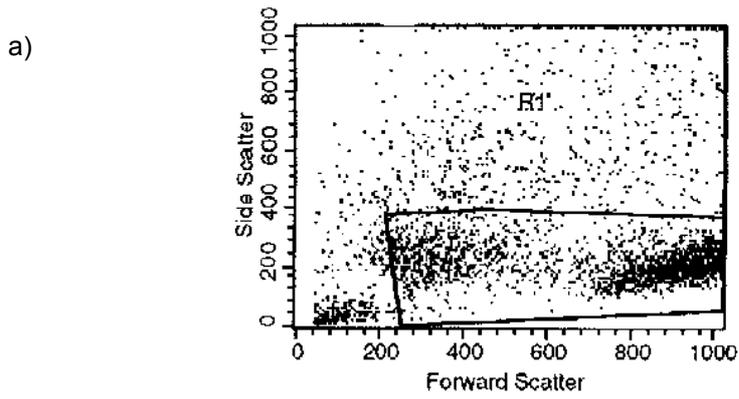
d)



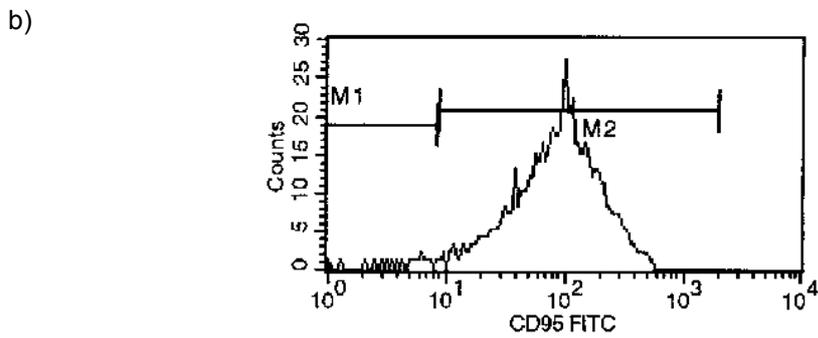
- a) Darstellung isolierter PBMC in Forward/Sideward Scatter mit Lymphozytengate (R1)
- b) Histogrammdarstellung der PBMC aus dem Gate R1
- c) Gating der CD4-Population (R2)
- d) Doppelfärbung CD4/Fas der gegateten CD4-Population (R2)

Abbildung 2

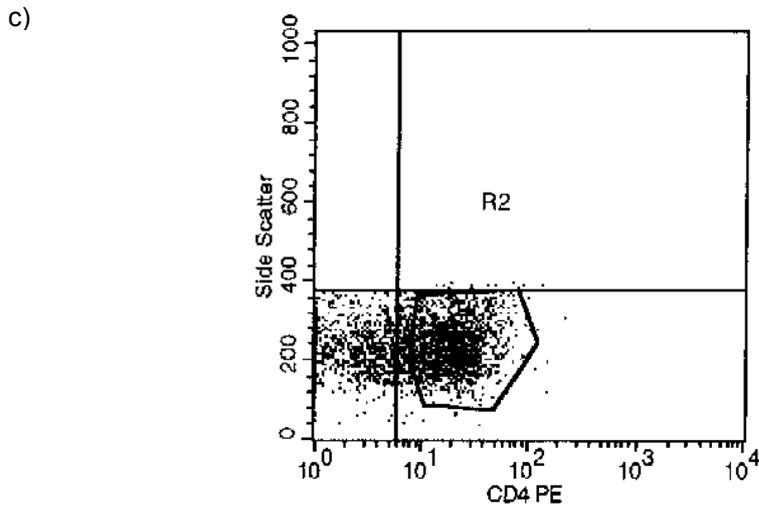
Fas-Expression (CD95 FITC) auf CD4-Lymphozyten aus dem Kniegelenkspunktat eines Kindes mit juveniler Oligoarthritis



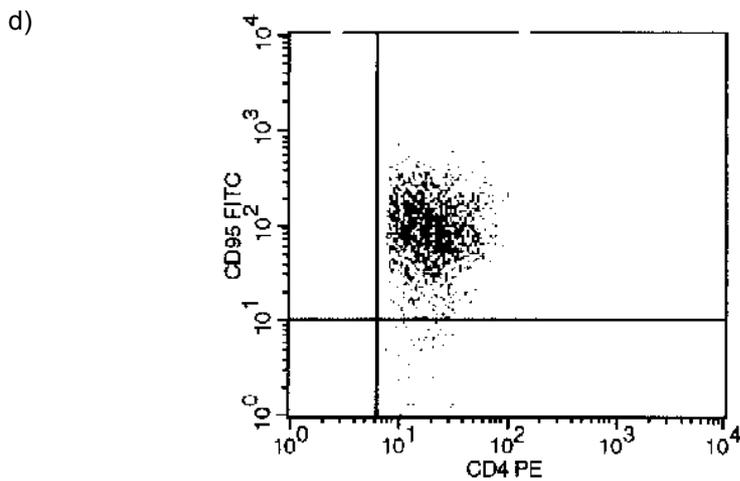
a) Darstellung isolierter PBMC in Forward/Sideward Scatter (R1)



b) Histogrammdarstellung der PBMC aus dem Gate R1



c) Gating der CD4-Population (R2)

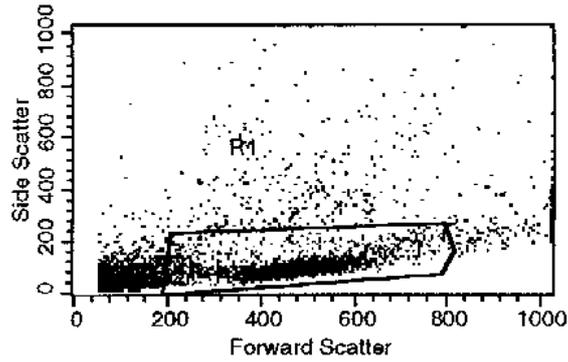


d) Doppelfärbung CD4/Fas der gegateten CD4-Population (R2)

Abbildung 3

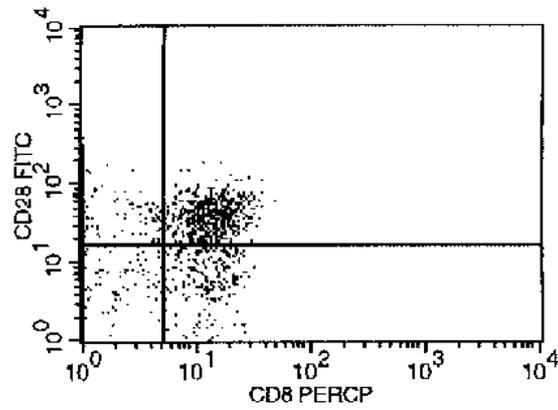
CD28-Expression auf CD4- und auf CD8-Lymphozyten aus dem peripheren Blut einer Kontrollperson

a)



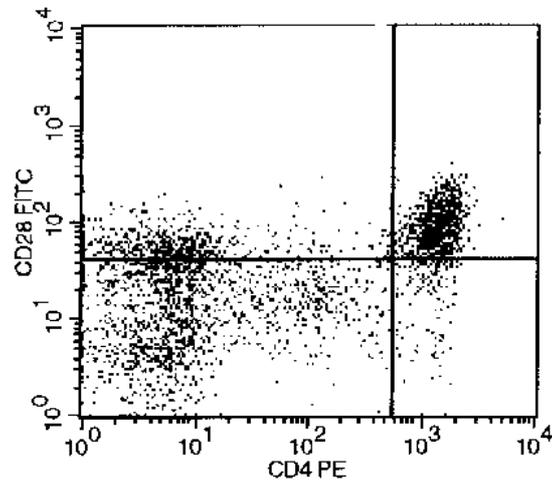
a) Darstellung isolierter PBMC in Forward/Sideward Scatter (R1)

b)



b) Doppelfärbung CD8/CD28 der Lymphozyten im Gate R1

c)



c) Doppelfärbung CD4/CD28 der Lymphozyten im Gate R1

2.3 Nachweis apoptotischer Zellen (Exposition von Phosphatidylserin auf der Membranaußenseite) mittels Annexin-V

2.3.1 Testprinzip

Der Annexin-Assay basiert auf der Tatsache, daß in der Frühphase der Apoptose Phosphatidylserin von der Membranınnen- auf die Membranaußenseite verlagert wird (Fadok et al., 1992). Das Phosphatidylserin kann durch Annexin, ein Phospholipid-bindendes Protein, identifiziert werden (v. Engeland et al., 1996).

Vergleichsuntersuchungen zwischen dem Annexin-Assay und dem TUNEL-Assay konnten zeigen, daß die Phosphatidylserinexpression zeitlich vor den DNA-Strangbrüchen stattfindet (O'Brian et al., 1997). Da die Membranintegrität nicht wiederhergestellt wird, wenn sie einmal gestört ist, werden Zellen, die durch den TUNEL-Assay erfasst werden, auch durch den Annexin-Assay erfasst. Zusätzlich werden alle apoptotischen Zellen, die sich noch in Frühstadien der Apoptose befinden, ebenfalls erfasst. Annexin V ist ein 35-36 kD Ca^{2+} -abhängiges Protein, welches an Phospholipide bindet. Annexin ist an den Farbstoff PE gebunden. Es wird das Membranphospholipid Phosphatidylserin, das sich unter normalen Umständen an der inneren Zellmembranseite befindet, gebunden, wenn es sich als ein früher apoptotischer Schritt an die Außenseite der Zellmembran wendet. Die Annexin V Färbung ist ein sehr sensitiver Test um Zellen zu identifizieren, die sich in einem frühen Stadium der Apoptose befinden.

Zur Identifikation, welche Lymphozytenpopulationen apoptotisch sind, wird die Zelloberfläche mit FITC markierten monoklonalen Antikörpern (anti-CD4 bzw. anti-CD8) gefärbt.

2.3.2 Unterscheiden zwischen Apoptose und Nekrose

Da nekrotische Zellen durch den Verlust der Membranintegrität ebenfalls Annexin-V binden, wird zur Differenzierung apoptotischer und nekrotischer Zellen Propidiumiodid (PI), ein DNA-Farbstoff angewandt, der nur die permeabilisierte Membran nekrotischer Zellen passieren kann. Die simultane Anwendung von Annexin-V und Propidiumiodid gestattet also die Diskriminierung nekrotischer Zellen im Annexin-V-positiv gefärbtem Zellcluster.

2.3.3 Färbeprozedur für die Durchflußzytometrie

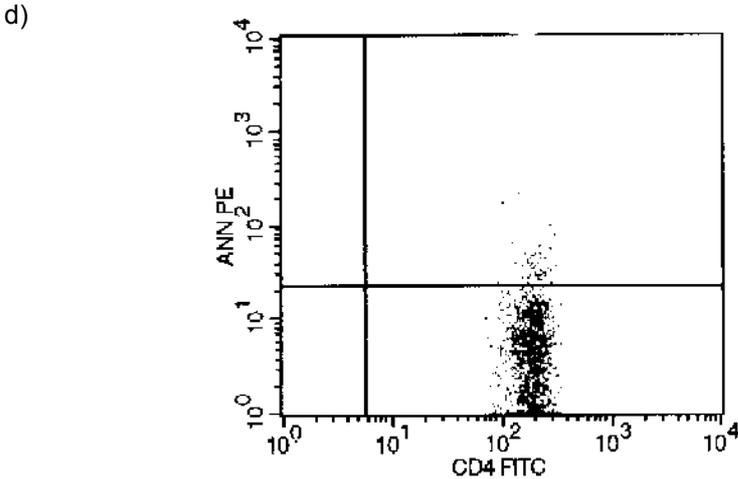
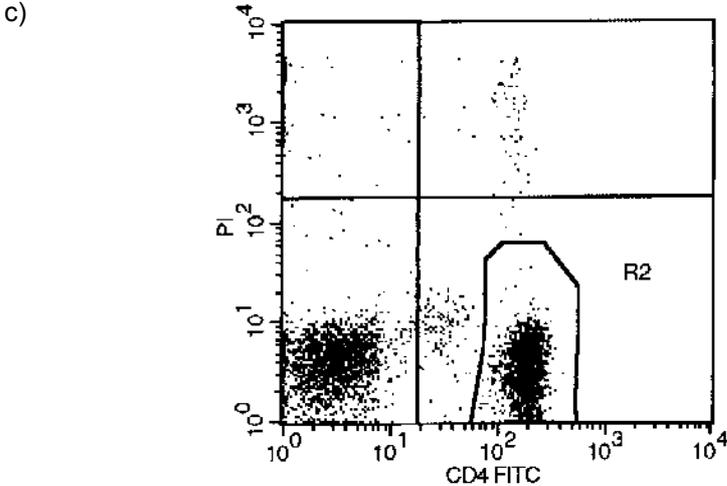
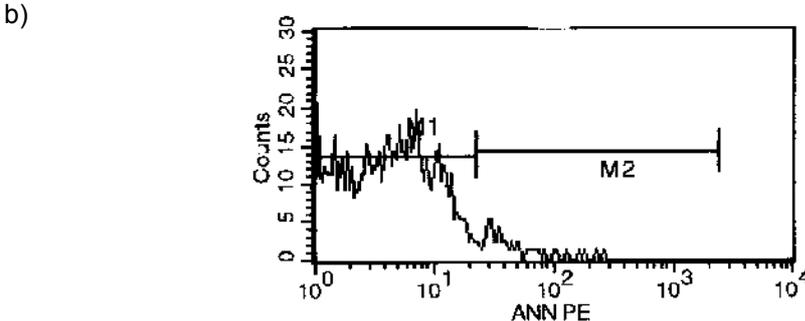
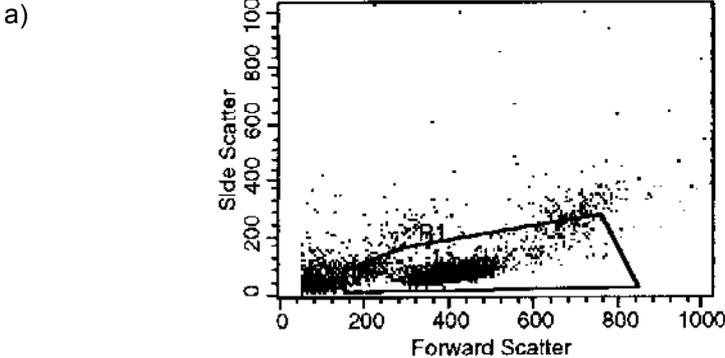
Nachdem die Zellen mit anti-CD4 oder anti-CD8 gefärbt werden, werden sie 15 min mit 5µl Annexin V im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Dann werden sie in 400µl Annexin binding buffer der Firma PharMingen (0,1 M HEPES/ NaOH, pH 7,4, 1,4 M NaCl, 25 mM CaCl₂, 0,2µm sterilfiltriert 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt, Arbeitspuffer: 10 mM HEPES/NaOH, pH 7,4, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl₂) gelöst. Die Gegenfärbung der annexingefärbten Zellen erfolgt direkt vor der Messung mit Propidiumiodid.

2.3.4 Durchflußzytometrische Analyse

Eine elektronische Kompensation war erforderlich, um ein Überlappen der Emissionsspektren auszuschließen. Der Anteil der apoptotischen Zellen wird in der CD4⁺- bzw. CD8⁺-positiven Population erfaßt. Um die nekrotischen Zellen von den apoptotischen Zellen zu unterscheiden, werden nur die CD4⁺Annexin⁺- T-Lymphozyten bzw. CD8⁺Annexin⁺-T-Lymphozyten gezählt, die gleichzeitig Propidiumiodid-negativ sind.

Abbildung 4

Phosphatidylserinexposition auf CD4-Zellen einer Kontrollperson

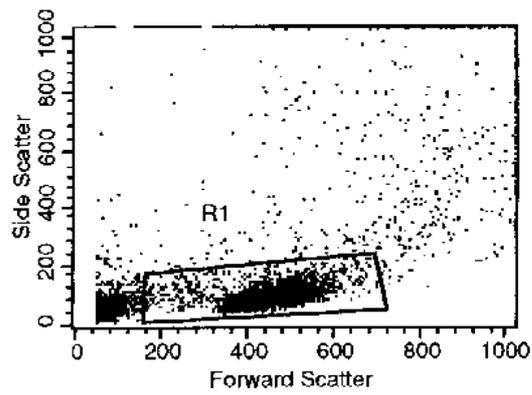


- a) Darstellung isolierter PBMC in Forward/Sideward Scatter (R1)
- b) Histogrammdarstellung der PBMC aus dem Gate R1
- c) Doppelfärbung CD4/PI und Gating der PI-negativen CD4-Zellen (R2)
- d) Doppelfärbung CD4/Annexin aus dem Gate R2

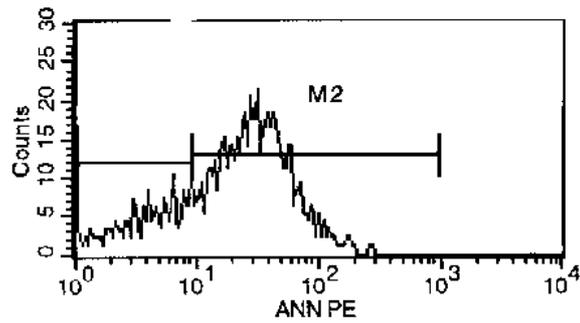
Abbildung 5

Phosphatidylserinexposition auf CD4-Zellen eines Kindes mit SLE

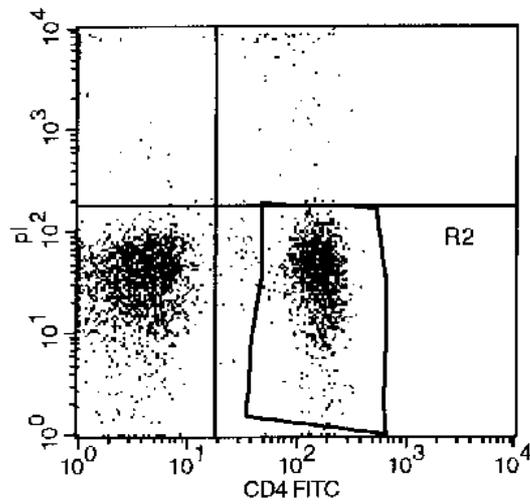
a)



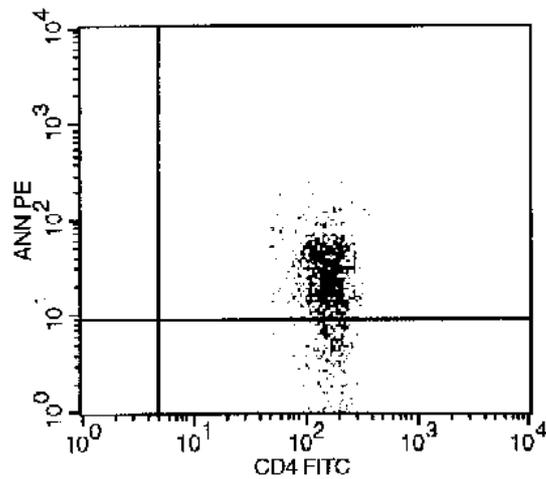
b)



c)



d)



- a) Darstellung isolierter PBMC in Forward/Sideward Scatter (R1)
- b) Histogrammdarstellung der PBMC aus dem Gate R1
- c) Doppelfärbung CD4/PI und Gating der PI-negativen CD4-Zellen (R2)
- d) Doppelfärbung CD4/Annexin aus dem Gate R2

2.4 Nachweis apoptotischer Zellen mittels TUNEL-Assay

2.4.1 Testprinzip

Die DNA-Fragmentation kann mit der DNA-Gel-Elektrophorese dargestellt, aber nicht quantifiziert werden. Eine der neueren Methoden, um Apoptose zu messen und zu quantifizieren, ist der TUNEL-Assay. Bei dem TUNEL-Assay werden die freien 3-Hydroxy-DNA-Endstücke mit der terminalen Desoxynucleotidyl-Transferase (TdT) durch Addition von markierten Nucleotiden identifiziert. Der Assay ist spezifisch für die Identifizierung der DNA-Strangbrüche, die bei der Apoptose entstehen (Chapman et al., 1995). Diese Methode unterscheidet nicht zwischen der Früh- und der Spätphase der Apoptose und gibt keine Information über die Membranintegrität der Zelle (v.Engeland et al., 1996). Es wird das APO-DIRECT™ Kit der Firma PharMingen verwendet. Dieses Kit ermöglicht es, Apoptose zu messen, indem freiliegende DNA-Nukleotide mit FITC-markiertem dUTP gebunden werden, so daß es möglich ist, eine Aussage darüber zu treffen, ob freie DNA-Fragmente vorliegen. Dieses Assay verlangt, zuvor die Zellen zu permeabilisieren und zu fixieren. Dieser Schritt wird mit Ortho-Permeafix der Firma Ortho Diagnostic Systems, Inc, Raritan, NJ durchgeführt (s.u.). In dem TUNEL-Kit werden positive und negative Kontrollzellen mitgeliefert, die bereits permeabilisiert und fixiert sind.

2.4.2 Färbeprozedur für die Durchflußzytometrie

Nachdem die Lymphozyten Ficoll-isoliert und mit entsprechenden monoklonalen Oberflächenantikörpern (z.B. CD4) gefärbt worden sind, werden sie 5 Minuten bei 1800 Upm und 10°C zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Pallet 40 Minuten bei Raumtemperatur mit zwei ml Ortho-PermeaFix inkubiert. Ortho-PermeaFix ist ein Reagenz, das dazu dient, in einem Schritt eine Permeabilisierung und gleichzeitig eine Fixierung einer Suspension von Zellen vorzunehmen. Nach diesem

Inkubationsschritt werden die Zellen bei 400 x g und Raumtemperatur 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand entfernt und dann mit der Pufferlösung des TUNEL-Assays weiterverarbeitet. Aus den gelieferten Einzelbestandteilen wird direkt vor dem Inkubationsschritt die Inkubationslösung hergestellt. Sie beinhaltet pro Assay 10,00 µl TdT Reaction Buffer, 0,75µl TdT Enzym, 8,00 µl FITC-dUTP und 32,00 µl Aqua dest. Bevor die Zellen bei 37°C 60 Minuten in dieser Lösung inkubiert werden, werden sie in einer Pufferlösung zwei Mal bei 300 x g 5 min bei 10°C zentrifugiert. Der Inkubationsschritt fand in einem 37°C-Wasserbad statt, in dem die Zellen gleichzeitig geschüttelt werden. Nach Beendigung des Inkubationsschrittes werden die Zellen zweimal mit jeweils 1 ml Rinse Buffer bei 300 x g 5 min bei 10°C zentrifugiert. Daraufhin wird jede Probe in 400 ml PBS gelöst und sofort mit Multicolour-Flowzytometrie gemessen.

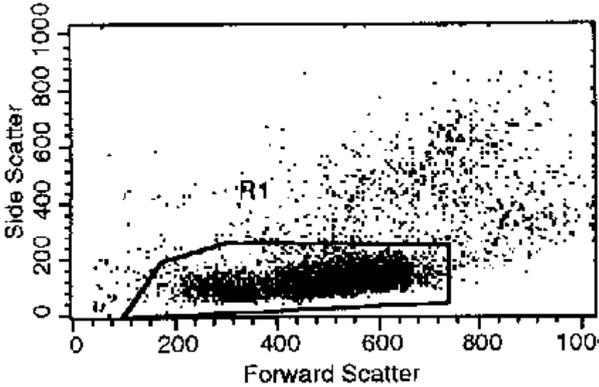
2.4.3 Durchflußzytometrische Analyse

Aus der Lymphozytenpopulation werden die CD4-bzw. CD8-positiven Lymphozyten bestimmt. Aus dieser Unterpopulation wird mithilfe eines Histogramms der Anteil TUNEL-positiver, FITC-markierter Lymphozyten bestimmt.

Abbildung 6

TUNEL-Assay auf Lymphozyten aus dem peripheren Blut einer Kontrollperson

a)



a) Darstellung isolierter PBMC in Forward/Sideward Scatter (R1)

b) Histogrammdarstellung der PBMC aus dem Gate R1

b)

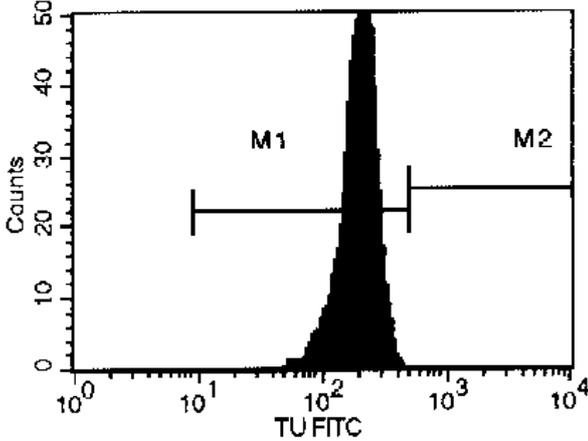
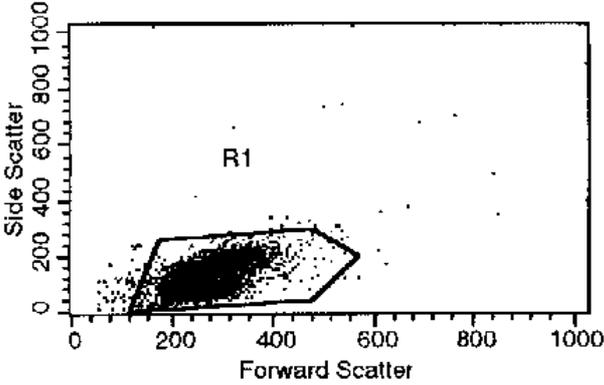


Abbildung 7

TUNEL-Assay auf Lymphozyten aus dem peripheren Blut eines Kindes mit juveniler Polyarthritis

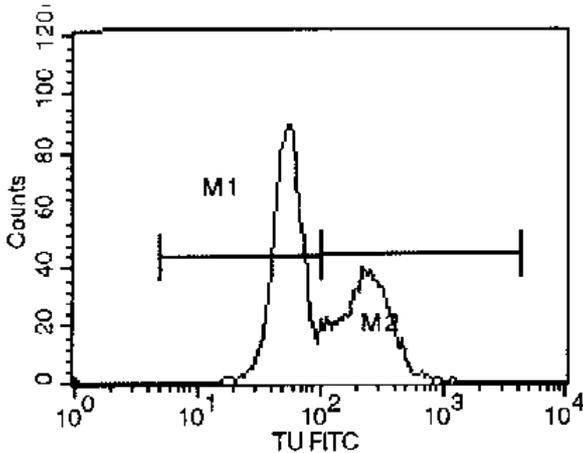
a)



a) Darstellung isolierter PBMC in Forward/Sideward Scatter (R1)

b) Histogrammdarstellung der PBMC aus dem Gate R1

b)



3. RESULTATE

3.1 Peripheres Blut

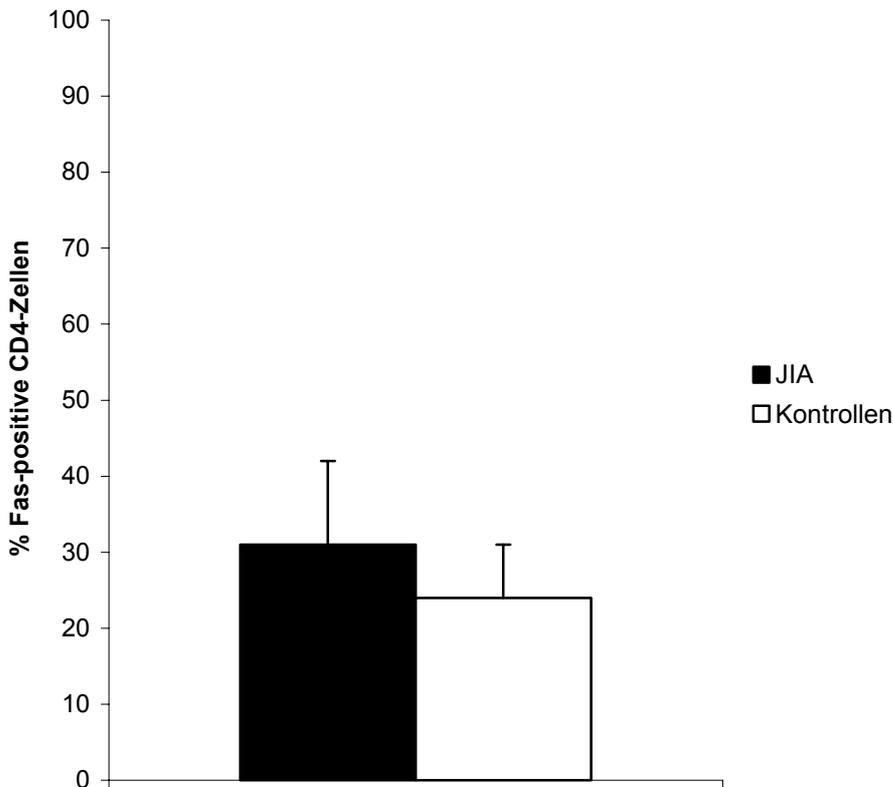
Um einen Eindruck zur Apoptosebereitschaft von T-Zellen bei Kindern mit JIA (3.1), Kollagenosen (3.2) und reaktiver Arthritis (3.3) zu gewinnen, wird die Fas-Expression auf CD4 und CD8-Zellen des peripheren Blutes gemessen und mit der Fas-Expression auf CD4- und CD8-Zellen gesunder Kinder verglichen.

3.1.1 Juvenile idiopathische Arthritis

3.1.1.1 Fas Expression auf der CD4+ Population

In der Gruppe der Kinder mit JIA beträgt der Anteil Fas-positiver CD4-Zellen $31\pm 11\%$ (Abb. 8) (absolut: 404 ± 138 Zellen/ μ l). Die Fas-Expression auf CD4+ Lymphozyten beträgt in der altersentsprechenden Kontrollgruppe im Mittelwert $23\pm 6\%$ (absolut: 322 ± 138 Zellen/ μ l). Damit findet sich bei Kindern mit JIA eine erhöhte Fas-Expression auf CD4-Zellen, und zwar sowohl prozentual als auch auf die absoluten CD4+-Lymphozytenzahlen bezogen. Die statistischen Unterschiede zwischen beiden Gruppen sind sowohl für die prozentualen Werte ($p=0,002$) als auch für die Absolutzahlen ($p=0,03$) signifikant.

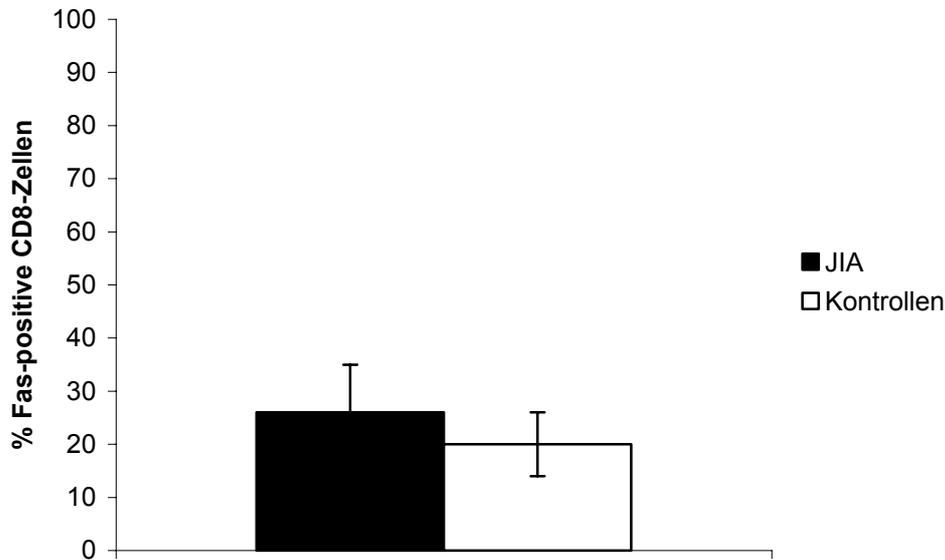
Abbildung 8
Fas-Expression auf CD4-Zellen



3.1.1.2 Fas Expression auf der CD8+ Population

Es findet sich ein signifikanter Unterschied der prozentualen Fas-Expression auf CD8+ Lymphozyten bei der Gruppe der juvenilen idiopatischen Arthritis im Vergleich zur Kontrollpopulation mit vergleichbarem Alter ($p=0,002$) (Abb. 9). Auf die absoluten CD8+ Lymphozytenzahlen bezogen findet sich kein signifikanter Unterschied ($p=0,2$). Die Fas-Expression auf CD8+ Lymphozyten beträgt in der Kontrollgruppe im Mittelwert $20\pm 6\%$ (absolut: 169 ± 88 Zellen/ μl). In der Gruppe der Kinder mit JIA beträgt der Anteil Fas-positiver CD8 Zellen $26\pm 8\%$ (absolut: 193 ± 116 Zellen/ μl).

Abbildung 9
Fas-Expression auf CD8-Zellen



3.1.1.3 CD28 Expression auf der CD4+ Population

In der Gruppe der Kinder mit JIA ist der Anteil CD28+ Lymphozyten mit $89\pm 10\%$ (absolut: 1291 ± 634 Zellen/ μ l) deutlich erniedrigt. Die CD28-Expression auf CD4+ Lymphozyten beträgt in der Kontrollgruppe im Mittelwert $98\pm 1\%$ (absolut: 1374 ± 455 Zellen/ μ l).

Es findet sich ein signifikanter Unterschied der prozentualen CD28+ Expression auf CD4+ Lymphozyten bei der Gruppe der JIA im Vergleich zur Kontrollpopulation mit vergleichbarem Alter ($p=0,0001$) (Abb.10). Auf die absoluten CD4+

Lymphozytenzahlen bezogen findet sich kein signifikanter Unterschied ($p=0,3$).

CD4+CD28- Zellen sind im Vergleich zu Kontrollen ($1\pm 1\%$, 20 ± 15 Zellen/ μ l) bei Kinder mit JIA ($10\pm 10\%$, 137 ± 143 Zellen/ μ l) signifikant erhöhet ($p=0,0001$, $p=0,0001$) (Abb. 11).

Abbildung 10
CD28 Expression auf CD4 Zellen

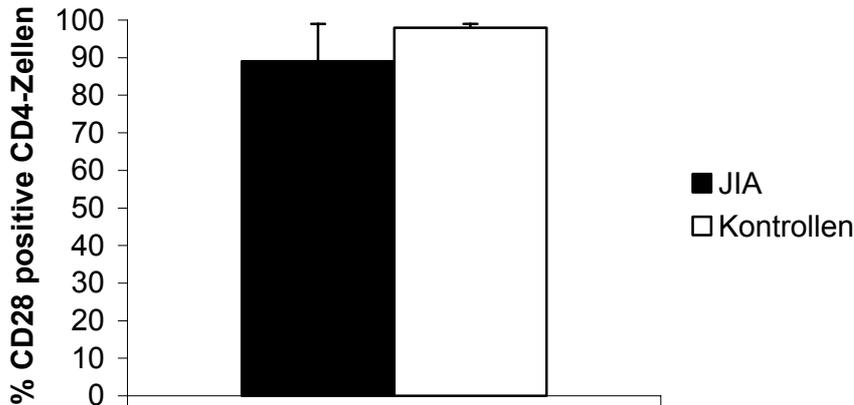
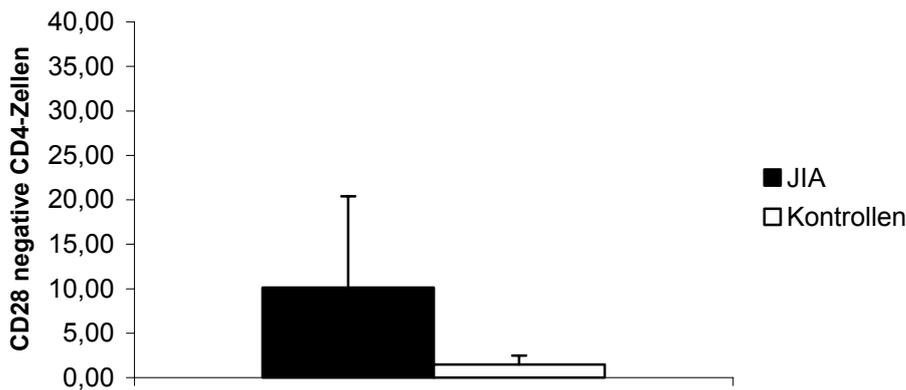


Abbildung 11
CD28 negative CD4-Zellen



3.1.1.4 CD28 Expression auf der CD8+ Population

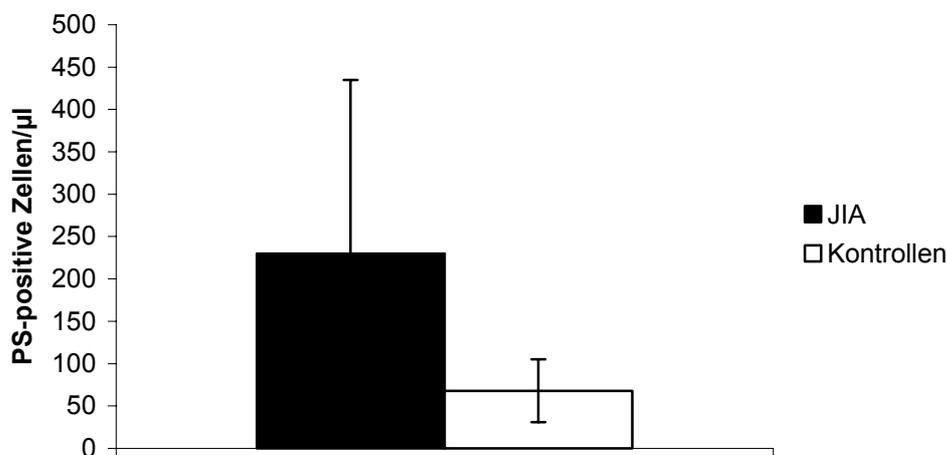
In der Gruppe der Kinder mit JIA beträgt der Anteil CD28-positiver Lymphozyten $86 \pm 9\%$ (absolut: 658 ± 335 Zellen/ μl). Die CD28 Expression auf CD8+ Lymphozyten beträgt in der Kontrollgruppe im Mittelwert $85 \pm 5\%$ (absolut: 743 ± 308 Zellen/ μl). Damit findet sich kein signifikanter Unterschied zur Kontrollpopulation mit vergleichbarem Alter, und zwar weder prozentual noch auf die absoluten CD8+ Lymphozytenzahlen bezogen. Die statistischen Unterschiede zwischen beiden

Gruppen sind weder für die prozentualen Werte ($p=0,3$) noch für die Absolutzahlen ($p=0,1$) signifikant. Es fand sich kein signifikanter Unterschied bei der prozentualen oder Absolutzahl von CD8+CD28- Zellen bei Kindern mit JIA ($13\pm 10\%$, 99 ± 97 Zellen/ μ l) und Kontrollen ($14\pm 5\%$, 114 ± 46 Zellen/ μ l) ($p=0,3$, $p=0,2$).

3.1.1.5 Phosphatidylserinexposition auf der CD4+ Population

In der Gruppe der Kinder mit JIA ist der Anteil Annexin-positiver Lymphozyten mit $19\pm 19\%$ deutlich erhöht (absolut: 229 ± 205 Zellen/ μ l) (Abb. 12). Die Annexin-Expression auf CD4+ Lymphozyten beträgt in der Kontrollgruppe im Mittelwert $4\pm 2\%$ (absolut: 68 ± 36 Zellen/ μ l). Damit findet sich ein signifikanter Unterschied zur Kontrollpopulation mit vergleichbarem Alter, und zwar sowohl prozentual als auch auf die absoluten CD4+ Lymphozytenzahlen bezogen. Die statistischen Unterschiede zwischen beiden Gruppen sind sowohl für die prozentualen Werte ($p=0,0001$) als auch für die Absolutzahlen ($p=0,0001$) signifikant.

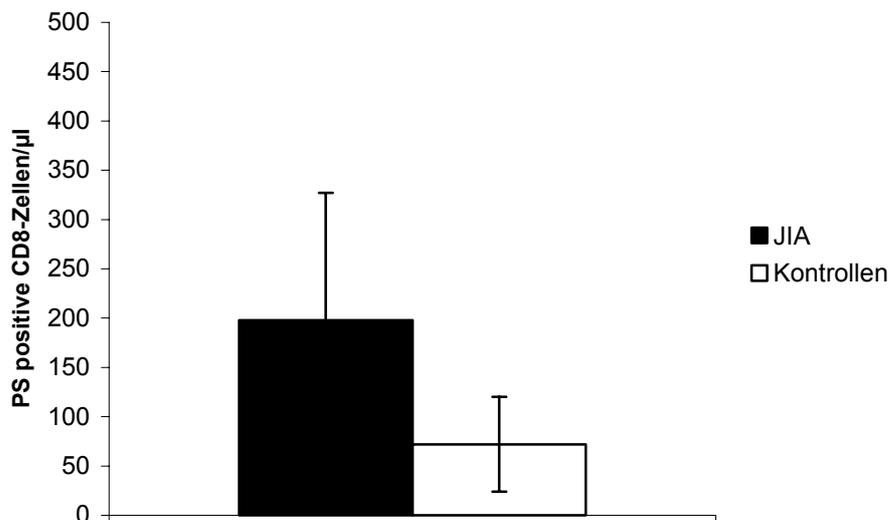
Abbildung12
Phosphatidylserinexposition auf CD4-Zellen



3.1.1.6 Phosphatidylserinexposition auf der CD8+ Population

In der Gruppe der Kinder mit JIA beträgt der Anteil Annexin-positiver CD8 Zellen $28\pm 13\%$ (absolut: 198 ± 128 Zellen/ μ l) (Abb 13). Annexin-Expression auf CD8+ Lymphozyten beträgt in der Kontrollgruppe im Mittelwert $8\pm 6\%$ (absolut: 72 ± 48 Zellen/ μ l). Damit findet sich ein signifikanter Unterschied zur Kontrollpopulation mit vergleichbarem Alter, und zwar sowohl prozentual als auch auf die absoluten CD8+ Lymphozytenzahlen bezogen. Die statistischen Unterschiede zwischen beiden Gruppen sind sowohl für die prozentualen Werte ($p < 0.0001$) als auch für die Absolutzahlen ($p < 0.0001$) signifikant.

Abbildung 13
Phosphatidylserinexposition auf CD8-Zellen



3.1.1.7 TUNEL-Assay der CD4+ und CD8+ Population

In der Gruppe der Kinder mit JIA beträgt der Anteil TUNEL-positiver Lymphozyten $2\pm 2\%$ (absolut: 28 ± 20 Zellen/ μ l). CD4+ Lymphozyten sind im Mittelwert zu $1\pm 1\%$ TUNEL-positiv (absolut: 22 ± 23 Zellen/ μ l). Es findet sich kein signifikanter Unterschied zur Kontrollpopulation mit vergleichbarem Alter, und zwar weder prozentual ($p = 0.1$) noch auf die absoluten ($p = 0.2$) CD4+ Lymphozytenzahlen

bezogen. In der Gruppe der Kinder mit JIA beträgt der Anteil TUNEL-positiver CD8+ Zellen $3\pm 3\%$ (absolut: 26 ± 32 Zellen/ μ l), in der Kontrollgruppe im Mittelwert $1\pm 1\%$ (absolut: 14 ± 9 Zellen/ μ l) ($p=0,03$, $p=0.07$).

3.1.2 Kollagenosen

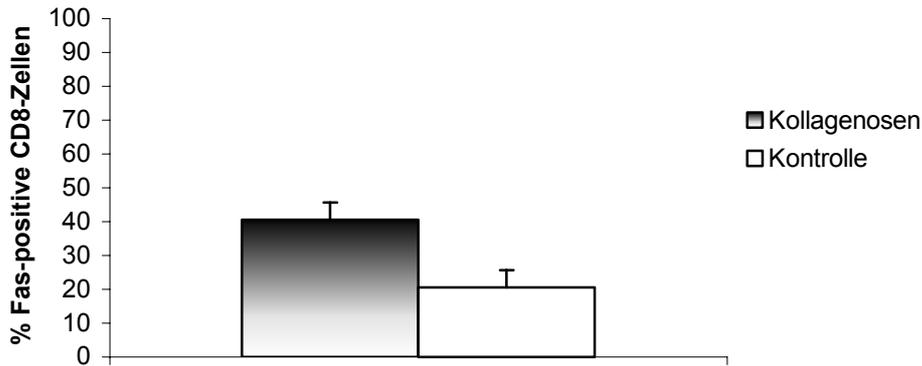
3.1.2.1 Fas Expression auf der CD4+ Population

In der Gruppe der Kinder mit Kollagenosen beträgt der Anteil Fas-positiver Lymphozyten $37\pm 17\%$ (absolut: 295 ± 102 Zellen/ μ l). Die Fas-Expression auf CD4+ Lymphozyten beträgt in der altersentsprechenden Kontrollgruppe im Mittelwert $26\pm 8\%$ (absolut: 354 ± 48 Zellen/ μ l). Es findet sich kein signifikanter Unterschied, und zwar weder prozentual noch auf die absoluten CD4+ Lymphozytenzahlen bezogen. Die statistischen Unterschiede zwischen beiden Gruppen sind weder für die prozentualen Werte ($p=0,09$) noch für die Absolutzahlen ($p=0,2$) signifikant.

3.1.2.2 Fas Expression auf der CD8+ Population

Hier beträgt der Anteil Fas-positiver Lymphozyten $40\pm 17\%$ (absolut: 245 ± 108 Zellen/ μ l). Die Fas-Expression auf CD8+ Lymphozyten beträgt in der Kontrollgruppe im Mittelwert $20\pm 5\%$ (absolut: 162 ± 88 Zellen/ μ l) (Abb.14). Es findet sich ein signifikanter Unterschied der prozentualen Fas-Expression auf CD8+ Lymphozyten bei der Gruppe der Kinder mit Kollagenosen im Vergleich zur Kontrollpopulation mit vergleichbarem Alter ($p=0,01$). Auf die absoluten CD8+ Lymphozytenzahlen bezogen finden sich auch erhöhte Anzahlen Fas-positiver CD8 Zellen, jedoch kein signifikanter Unterschied ($p=0,05$) zur Kontrollgruppe.

Abbildung 14
Fas-Expression auf CD8-Zellen



3.1.2.3 CD28 Expression auf der CD4+ Population

Der Anteil CD28+ CD4+ Zellen ist mit $75\pm 18\%$ deutlich erniedrigt (absolut: 777 ± 588 Zellen/ μ l) (Abb. 15 und 16). Die CD28 Expression auf CD4+ Lymphozyten beträgt in der Kontrollgruppe im Mittelwert $99\pm 1\%$ (absolut: 1276 ± 338 Zellen/ μ l). Es findet sich ein signifikanter Unterschied zur Kontrollpopulation mit vergleichbarem Alter, und zwar sowohl prozentual ($p=0,009$) als auch auf die absoluten CD4+ Lymphozytenzahlen ($p=0,04$) bezogen. Es besteht ein signifikanter Unterschied ($p=0,009$) zwischen dem prozentualen Anteil der CD4+CD28- Zellen bei Kindern mit Kollagenosen ($25\pm 19\%$) und der Kontrollgruppe ($1\pm 1\%$). Die CD4+CD28- Zellen unterscheiden sich auch absolut (Kollagenosen: 218 ± 139 Zellen/ μ l, Kontrollen: 15 ± 15 Zellen/ μ l) ($p=0.005$). Die Expansion der CD4+CD28- Zellen ist bei Kindern mit Kollagenosen noch stärker ausgeprägt als bei Kindern mit JIA.

Abbildung 15
CD28-Expression auf CD4-Zellen

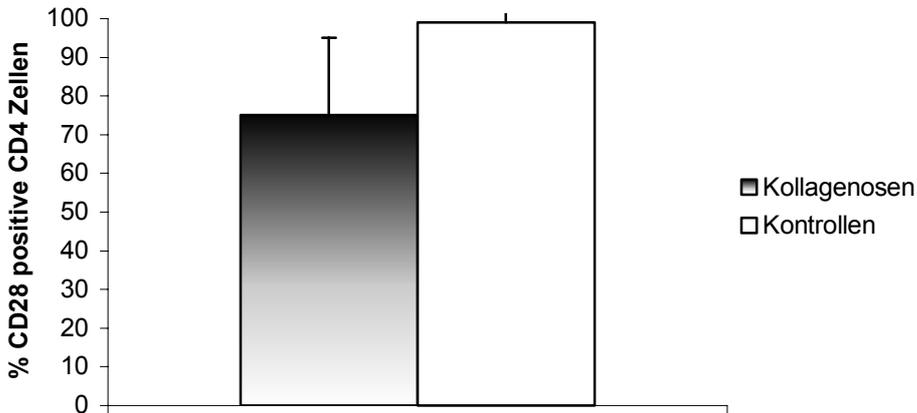
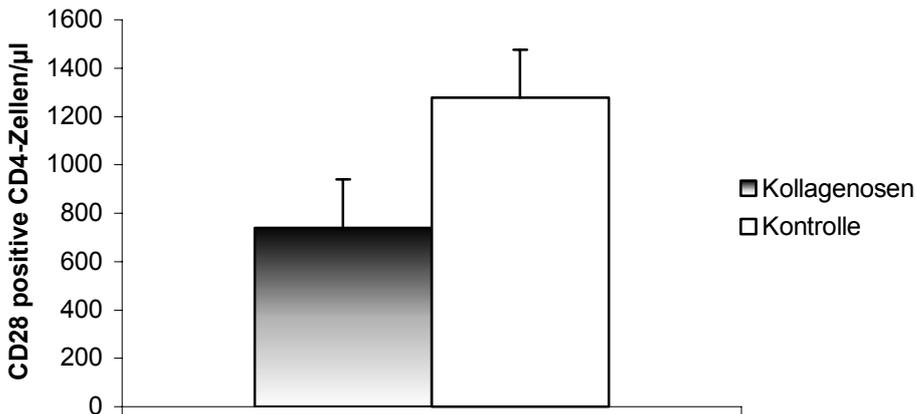


Abbildung 16
CD28-Expression auf CD4-Zellen



3.1.2.4 CD28 Expression auf der CD8+ Population

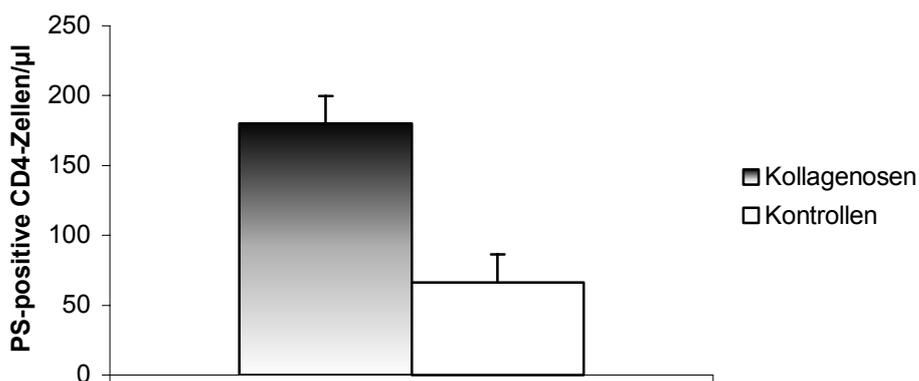
Der Anteil CD28+ Lymphozyten beträgt $90\pm 11\%$ (absolut: 711 ± 596 Zellen/ μ l). Die CD28 Expression auf CD8+ Lymphozyten beträgt in der Kontrollgruppe im Mittelwert $89\pm 4\%$ (absolut: 783 ± 412 Zellen/ μ l). Während bei den CD4+ Zellen signifikante Unterschiede in Bezug auf die CD28 Expression zu beobachten sind, findet sich bei den CD8+ Zellen kein signifikanter Unterschied zur Kontrollpopulation mit vergleichbarem Alter, und zwar weder prozentual ($p=0.4$) noch auf die absoluten CD8+ Lymphozytenzahlen ($p=0.4$) bezogen.

Die Werte für CD8+CD28- Zellen unterscheiden sich bei Kindern mit Kollagenosen im Vergleich zur Kontrollgruppe weder prozentual ($10\pm 11\%$, $10\pm 4\%$) ($p=0,4$) noch absolut (74 ± 87 Zellen/ μ l, 78 ± 28 Zellen/ μ l) ($p=0,4$).

3.1.2.5 Phosphatidylserinexposition auf der CD4+ Population

Hier beträgt der Anteil Annexin-positiver Lymphozyten $16\pm 7\%$ (absolut: 163 ± 114 Zellen/ μ l) (Abb.17). Die Phosphatidylserinexposition auf CD4+ Lymphozyten beträgt in der Kontrollgruppe im Mittelwert $5\pm 1\%$ (absolut: 66 ± 30 Zellen/ μ l). Die statistischen Unterschiede zwischen beiden Gruppen sind sowohl für die prozentualen Werte ($p=0,004$) als auch für die Absolutzahlen ($p=0,04$) signifikant, die Zahl der annexinpositiven Zellen ist vergleichbar mit der Zahl annexinpositiver CD4-Zellen bei der JIA (229 ± 205).

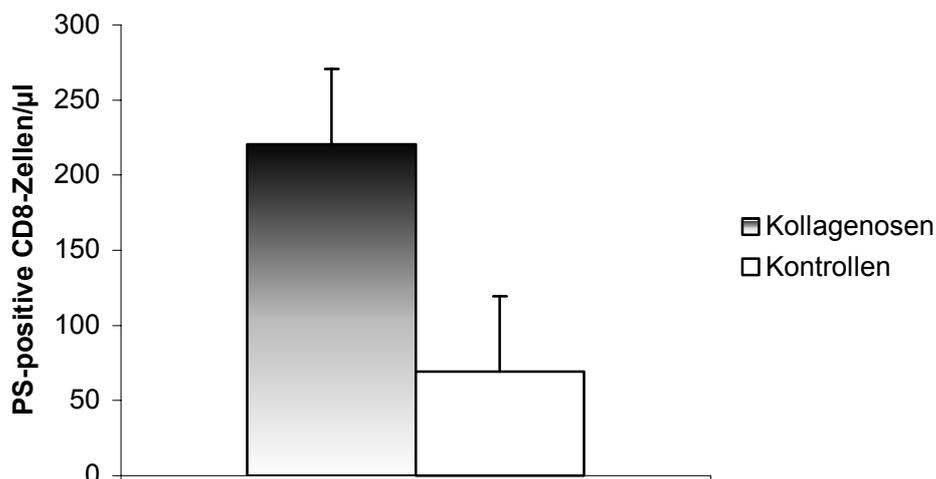
Abbildung 17
Phosphatidylserinexposition auf CD4-Zellen



3.1.2.6 Phosphatidylserinexposition auf der CD8+ Population

Der Anteil Annexin-positiver Lymphozyten beträgt $29\pm 20\%$ (absolut: 220 ± 165 Zellen/ μl) (Abb. 18). Die Annexin-Expression auf CD8+ Lymphozyten beträgt in der Kontrollgruppe im Mittelwert $7\pm 2\%$ (absolut: 69 ± 50 Zellen/ μl). Die statistischen Unterschiede zwischen beiden Gruppen sind sowohl für die prozentualen Werte ($p=0.002$) als auch für die Absolutzahlen ($p=0.003$) signifikant.

Abbildung 18
Phosphatidylserinexposition auf CD8-Zellen



3.1.2.7 TUNEL-Assay der CD4+ und CD8+ Population

Es sind $8\pm 13\%$ (absolut: 48 ± 55 Zellen/ μl) der CD4+ Zellen TUNEL-positiv. Die TUNEL-positiven CD4+ Lymphozyten betragen in der Kontrollgruppe im Mittelwert $1\pm 1\%$ (absolut: 22 ± 23 Zellen/ μl). Die statistischen Unterschiede zwischen beiden Gruppen sind weder für die prozentualen Werte ($p=0,1$) noch für die Absolutzahlen ($p=0,2$) signifikant. Der Anteil TUNEL-positiver CD8+ Lymphozyten beträgt $8\pm 10\%$ (absolut: 41 ± 28 Zellen/ μl). Die TUNEL-Positivität auf CD8+ Lymphozyten beträgt in der Kontrollgruppe im Mittelwert $1\pm 1\%$ (absolut: 14 ± 9 Zellen/ μl). Die statistischen

Unterschiede zwischen beiden Gruppen sind weder für die prozentualen Werte ($p=0,1$) noch für die Absolutzahlen ($p=0,06$) signifikant. Interessanterweise findet sich ein eindeutiger Trend einer etwas höheren Anzahl TUNEL positiver CD4 und CD8 Zellen bei Kindern mit Kollagenosen im Vergleich zu Kindern mit JIA (CD4+ Zellen: 28 ± 20 Zellen/ μ l, CD8+ Zellen: 26 ± 32 Zellen/ μ l)

3.1.3 Reaktive Arthritis

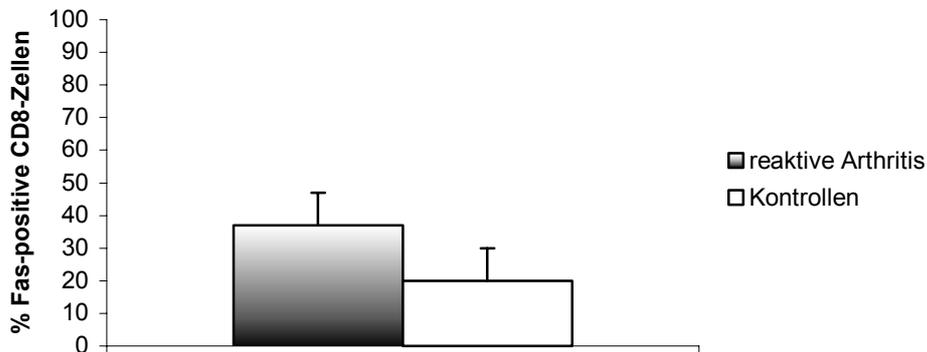
3.1.3.1 Fas Expression auf der CD4+ Population

In der Gruppe der Kinder mit reaktiver Arthritis beträgt der Anteil Fas-positiver Lymphozyten $28\pm 6\%$ (absolut: 364 ± 161 Zellen/ μ l). Die Fas-Expression auf CD4+ Lymphozyten beträgt in der Kontrollgruppe im Mittelwert $25\pm 7\%$ (absolut: 326 ± 157 Zellen/ μ l). Die statistischen Unterschiede zwischen beiden Gruppen sind weder für die prozentualen Werte ($p=0,2$) noch für die Absolutzahlen ($p=0,3$) signifikant.

3.1.3.2 Fas Expression auf der CD8+ Population

Der Anteil Fas-positiver Lymphozyten beträgt $37\pm 6\%$ (absolut: 258 ± 128 Zellen/ μ l) (Abb. 19), die Fas-Expression auf CD8+ Lymphozyten der Kontrollgruppe im Mittelwert $20\pm 6\%$ (absolut: 171 ± 83 Zellen/ μ l). Wie bei den Kindern mit JIA und Kollagenosen findet sich ein signifikanter Unterschied der prozentualen Fas-Expression auf CD8+ Lymphozyten bei der Gruppe der reaktiven Arthritis im Vergleich zur Kontrollpopulation ($p=0,002$). Auf die absoluten CD8+ Lymphozytenzahlen bezogen findet sich kein signifikanter Unterschied ($p=0,1$).

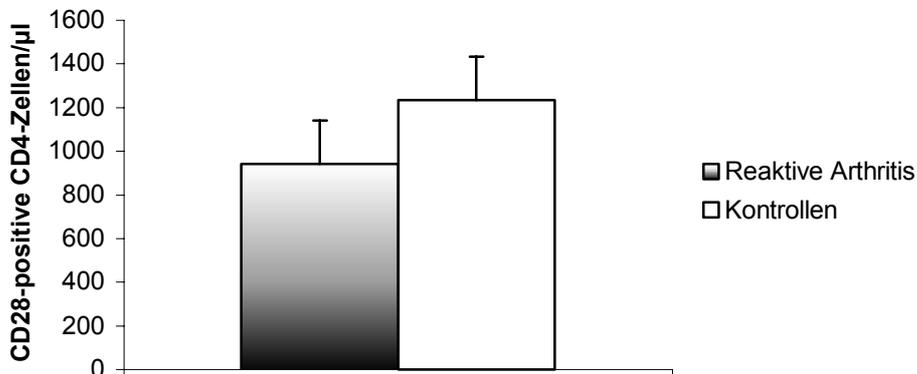
Abbildung 19
Fas-Expression auf CD8-Zellen



3.1.3.3 CD28 Expression auf der CD4+ Population

Der Anteil CD28-positiver Lymphozyten beträgt $80 \pm 21\%$ (absolut: 942 ± 212 Zellen/ μl) (Abbildung 20). Die CD28 Expression auf CD4+ Lymphozyten beträgt in der Kontrollgruppe im Mittelwert $98 \pm 1\%$ (absolut: 1234 ± 357 Zellen/ μl). Es findet sich auf die Absolutzahlen bezogen ein signifikanter Unterschied zur Kontrollpopulation mit vergleichbarem Alter ($p=0,03$). Prozentual findet sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen ($p=0,08$). Während sich bei der JIA und bei Kollagenosen eine signifikante Expansion der CD4+CD28- Zellen findet, sind diese Zellen bei reaktiver Arthritis interessanterweise nicht expandiert (reaktive Arthritis $19 \pm 21\%$, 348 ± 508 Zellen/ μl , Kontrollen $1 \pm 1\%$, 22 ± 16 Zellen/ μl ; $p=0,08$, $p=0,1$).

Abbildung 20
CD28-Expression auf CD4-Zellen



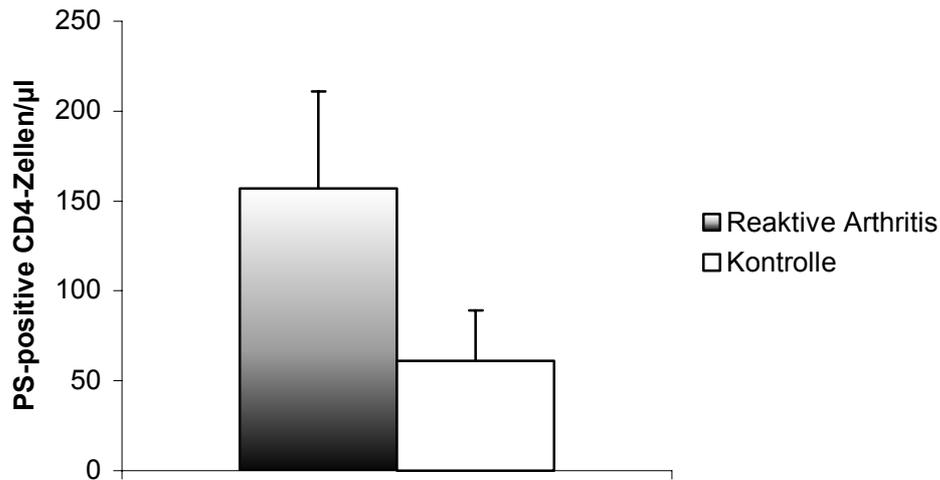
3.1.3.4 CD28 Expression auf der CD8+ Population

Hier beträgt der Anteil CD28-positiver Lymphozyten $80\pm 11\%$ (absolut: 526 ± 211 Zellen/ μl). Die CD28 Expression auf CD8+ Lymphozyten liegt in der Kontrollgruppe im Mittelwert bei $87\pm 5\%$ (absolut: 758 ± 344 Zellen/ μl). Die statistischen Unterschiede zwischen beiden Gruppen sind weder für die prozentualen Werte ($p=0,1$) noch für die Absolutzahlen ($p=0,05$) signifikant.

3.1.3.5 Phosphatidylserinexposition auf der CD4+-Population

In der Gruppe der Kinder mit reaktiver Arthritis beträgt der Anteil Annexin-positiver Lymphozyten $15\pm 6\%$ (absolut: 157 ± 54 Zellen/ μl) (Abb. 21). Die Annexin-Expression auf CD4+ Lymphozyten liegt in der Kontrollgruppe im Mittelwert bei $4\pm 2\%$ (absolut: 61 ± 28 Zellen/ μl). Wie bei Kindern mit JIA und Kollagenosen sind die statistischen Unterschiede zwischen Kindern mit Arthritis und Kontrollkindern sowohl für die prozentualen Werte ($p=0,007$) als auch für die Absolutzahlen ($p=0,004$) signifikant.

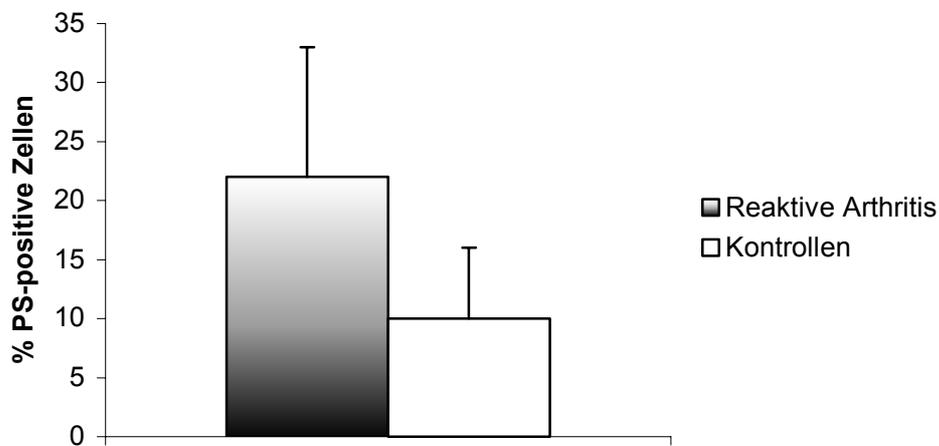
Abbildung 21
Phosphatidylserinexposition auf CD4-Zellen



3.1.3.6 Phosphatidylserinexposition auf der CD8+ Population

Der Anteil Annexin-positiver Lymphozyten beträgt $22 \pm 11\%$ (absolut: 129 ± 72 Zellen/ μl) (Abb. 22). Die Annexin-Expression auf CD8+ Lymphozyten beträgt in der Kontrollgruppe im Mittelwert $10 \pm 6\%$ (absolut: 83 ± 52 Zellen/ μl). Es findet sich auf die prozentualen Zahlen bezogen ein signifikanter Unterschied zur Kontrollpopulation mit vergleichbarem Alter ($p=0.03$). Absolut findet sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen ($p=0.1$).

Abbildung 22
Phosphatidylserinexposition auf CD8-Zellen



3.1.3.7 TUNEL-Assay auf der CD4+ und der CD8+ Population

Hier beträgt der Anteil TUNEL-positiver CD4+ Lymphozyten $1 \pm 0,1\%$ (absolut: 14 ± 1 Zellen/ μl), der Anteil der CD8+ Lymphozyten $3 \pm 1\%$ (absolut: 32 ± 21 Zellen/ μl). Die TUNEL-Positivität auf CD4+ Lymphozyten beträgt in der Kontrollgruppe im Mittelwert $1 \pm 1\%$ (absolut: 22 ± 23 Zellen/ μl) und auf CD8+ Lymphozyten beträgt in der Kontrollgruppe im Mittelwert $1 \pm 1\%$ (absolut: 14 ± 9 Zellen/ μl).

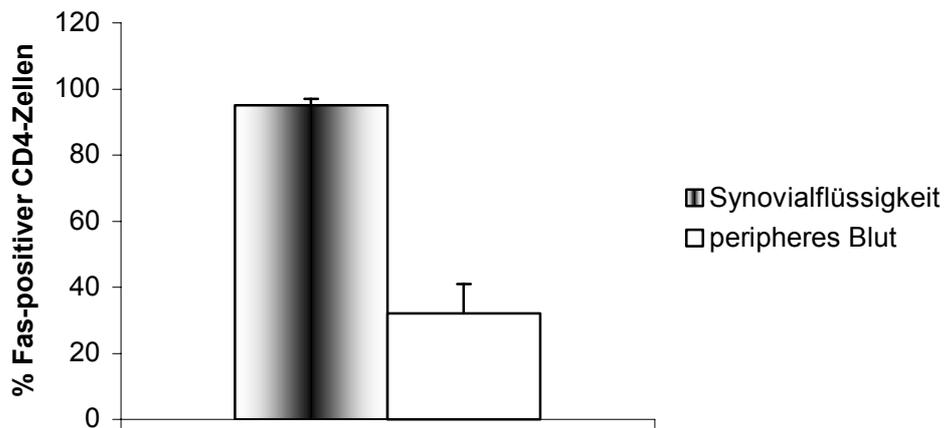
3.2 Kniegelenkpunktate

Der Vergleich der Fas und der CD28 Expression auf T-Zellen und der Vergleich der ex vivo Apoptose von T-Zellen im Gelenk mit T-Zellen im peripheren Blut erlaubt eine Aussage zur Apoptosebereitschaft und zum Apoptoseverhalten von T-Zellen im entzündliche veränderten Gelenk eines erkrankten Kindes.

3.2.1 Fas Expression auf der CD4+ Population

CD4 Zellen in der Gelenkflüssigkeit sind zum größten Teil Fas positiv ($95\pm 2\%$). Im peripheren Blut findet sich im paarweisen Vergleich ein signifikant niedriger Anteil an Fas positiven CD4 Zellen ($32\pm 9\%$) ($p < 0.00001$) (Abb. 23).

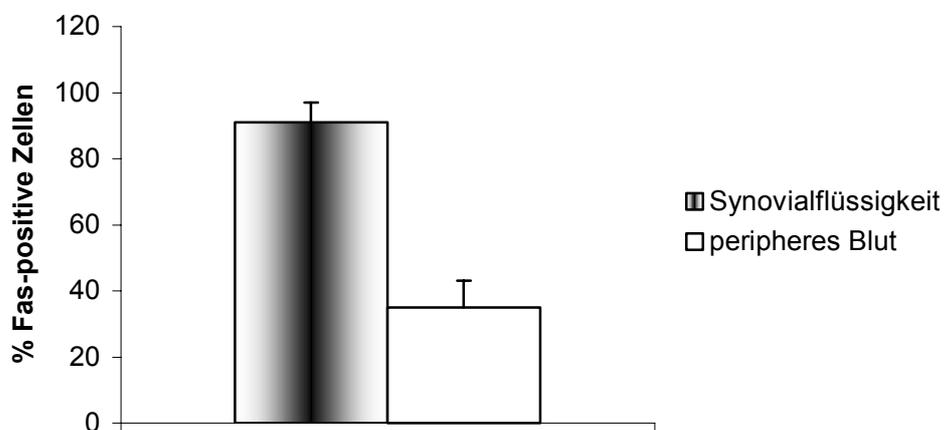
Abbildung 23
Fas-Expression auf CD4-Zellen



3.2.2 Fas Expression auf der CD8+ Population

Die Fas-Werte der CD8 Zellen im Blut ($35\pm 8\%$) und die der CD8 Zellen im Kniegelenkpunktat ($91\pm 6\%$) unterscheiden sich signifikant voneinander ($p < 0.00001$)

Abbildung 24
Fas-Expression auf CD8-Zellen



3.2.3 CD28 Expression auf der CD4+ und der CD8+ Population

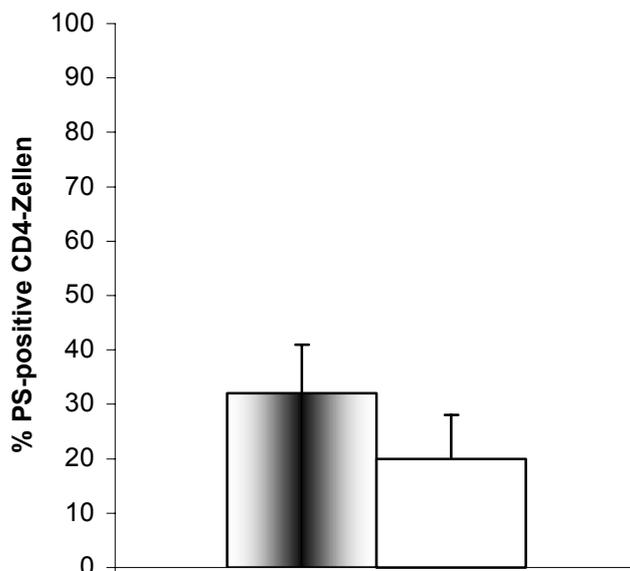
Die CD28 Expression der CD4+ und CD8+ Lymphozyten im Blut ($87\pm 9\%$, $81\pm 11\%$) und die der Lymphozyten im Kniegelenkpunktat ($81\pm 14\%$, 76 ± 8) unterscheiden sich nicht signifikant voneinander ($p=0,2$).

3.2.4 Phosphatidylserinexposition auf CD4+ und CD8+ Lymphozyten

Die Annexinwerte der CD4+ Lymphozyten im Kniegelenkpunktat ($32\pm 9\%$) sind signifikant höher als die Annexinwerte der CD4+ Lymphozyten im Blut ($20\pm 8\%$) ($p=0,004$) (Abb. 25).

Die Annexin-Werte der CD8+Lymphozyten im Blut ($41\pm 18\%$) und die der Lymphozyten im Kniegelenkpunktat ($39\pm 13\%$) unterscheiden sich nicht signifikant voneinander ($p=0,3$). Interessanterweise unterscheiden sich damit CD28-Expression bzw. Phosphatidylserinexposition nicht zwischen Gelenk und Blut, während die Fas-Expression im Gelenk signifikant gesteigert ist.

Abbildung 25:
Phosphatidylserinexposition auf CD4-Zellen



4. DISKUSSION

Bisher gibt es nur vereinzelte Studien, die die Apoptose oder Apoptose-assoziierte Moleküle bei JIA untersucht haben. In diesen Studien wird gezeigt, dass sich die Fas-vermittelte Apoptose auf aktivierten T-Zellen im peripheren Blut oder auf mononukleären Zellen von Kindern mit JIA nicht signifikant unterscheidet (Pignata et al., 2000, Pignatti et al., 2001). Die Aussagefähigkeit dieser Arbeiten wird dadurch eingeschränkt, dass die Zellen über Tage bis Wochen *in vitro* aktiviert und kultiviert werden. Es werden in diesen Untersuchungen keine Daten über T-Zellen in der Synovialflüssigkeit erhoben. Sioud et al. untersuchten bei Patienten mit JIA in Zellen aus der Synovialflüssigkeit und aus der Synovia mit Propidiumiodid und TUNEL die T-Zell-Apoptose und konnten zeigen, dass intrazelluläre antiapoptotische Proteine wie Bcl-X_L in T-Zellen bei Patienten mit JIA hochreguliert sein können (Sioud et al., 1998). Die exakte Quantifizierung von Apoptose in dieser Arbeit ist problematisch, es existiert in der oben genannten Studie keine Kontrollgruppe und die Patientenpopulation unterscheidet sich von der unseren, das mittlere Alter betrug 18 Jahre, ein Großteil benötigte eine Synovektomie.

In dieser Studie führen wir eine quantitative Bestimmung der *ex vivo* T-Zell-Apoptose aus frisch isolierten peripheren Blut- und Synovialflüssigkeit-Lymphozyten durch. Folgende Einschränkungen sind bei der Interpretation der Daten zu bedenken: durch die Messung der Phosphatidylserinexposition wird nur eine Phase der Apoptose erkannt. Daher wird eine zweite Methode zur *ex vivo*-Messung eingesetzt. Im TUNEL-Assay zeigen aber lediglich ca. 2% der frisch isolierten und analysierten Zellen DNA-Strangbrüche, so dass sich diese Methode zur Quantifizierung der *ex vivo* Apoptose und Detektion gruppenspezifischer Unterschiede als wenig geeignet erweist. Weiter handelt es sich bei den von uns untersuchten Patienten um eine

durch akute Schübe selektierte Gruppe, deren Gemeinsamkeit massive Schwellungen des Knies sind. Diese Gruppe ist nicht homogen und umfasst Patienten verschiedenen Alters und Geschlechtes, die Kinder erhielten zum Teil eine sehr unterschiedliche medikamentöse Therapie. Die Anzahl der Patienten ist nicht groß genug, um die Effekte zum Beispiel des Alters oder der Medikation auf die Apoptose einzeln untersuchen zu können. Dennoch finden sich innerhalb der Gruppen weder große Unterschiede an T-Zellen, welche CD28 oder Fas exprimieren, noch an ex vivo T-Zell-Apoptose.

Zuerst wird bearbeitet, ob die Apoptosebereitschaft bzw. das Apoptoseverhalten der T-Lymphozyten des peripheren Blutes von Kindern mit Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises gegenüber gesunden Normalpersonen gleichen Alters verändert ist. Mit dieser Studie belegen wir die Hypothese, dass T-Zell-Apoptose bei Patienten mit JIA verändert ist. Allerdings findet sich kein Apoptosedefekt, sondern bezogen auf die Gesamt-T-Zell-Population wird eine erhöhte Rate an Apoptose in peripheren T-Zellen im Vergleich zur altersentsprechenden Kontrolle beobachtet. Diese erhöhte Apoptoserate weist wahrscheinlich auf die generelle Aktivierung des T-Zell-Systems bei Kindern mit JIA hin (Grom et al., 2000). Dies schließt nicht aus, dass zum Beispiel die Subpopulation autoreaktiver T-Zellen doch einen Apoptosedefekt aufweisen. In dieser Studie findet sich ein deutlicher Unterschied zwischen Fas-exprimierenden T-Zellen in peripherem Blut und der Synovialflüssigkeit. Fast alle T-Zellen im entzündeten Gelenk exprimieren Fas. Dies spiegelt vermutlich den hochaktivierten Status der T-Zellen im Gelenk bei Patienten mit JIA wider, als Folge kommt es zu einer erhöhten Expressionsrate von Fas und löslichem Fas in der Synovialflüssigkeit (Knipping et al., 1995, Wedderburn et al., 2000). Ähnlich wie die ex vivo Apoptose ist die Veränderung des Phänotyps der

T-Zellen nicht nur am Ort der Entzündung verändert, sondern auch T-Zellen im peripheren Blut zeigen einen höheren Prozentsatz an Fas-Expression.

Die CD4+CD28- Population ist möglicherweise eine Subpopulation autoreaktiver T-Zellen. Unsere Daten zeigen eine Expansion an CD28 negativen CD4-Zellen bei Kindern mit JIA gegenüber der Kontrollgruppe. Bei Erwachsenen mit rheumatoider Arthritis wird sogar eine CD4 positive CD28^{null} Subpopulation mit nicht messbarer CD28-messenger-RNA nachgewiesen, was durch einen Transkriptionsblock erklärt wird (Vallejo et al., 2000). Die CD4+CD28- Zellen zirkulieren zum Teil jahrelang im Kreislauf (Waase et al., 1996). Diese Langlebigkeit scheint an einer Resistenz gegenüber Apoptose zu liegen (Schirmer et al., 1998). Es wird gezeigt, dass diese Resistenz zumindest zum Teil dadurch zustande kommt, dass die CD28- Zellen resistent gegen die Fas-induzierte Apoptose sind (Vallejo et al., 2000). Bei der Untersuchung dieser Zellsubpopulation fällt auf, dass viele dieser Zellen körpereigene Zellen angreifen (Schmidt et al., 1996). Im Gegensatz zu CD4+CD28+ Zellen produzieren die CD4+CD28- Zellen mehr Interferon γ , wodurch sie möglicherweise als proinflammatorische Zellen fungieren (Park et al., 1997). Außerdem exprimieren sie das Perforin-Protein und wirken dadurch zytotoxisch auf die umgebenden Zellen (Namekawa et al., 1998). Wir finden zwar eine Expansion von CD4+CD28- Zellen, es ist aber bisher nicht untersucht, ob eine CD4 positive CD28^{null} Subpopulation bei Kindern mit einer Autoimmunerkrankung existiert und welche Funktion ihr zukommt.

Desweiteren untersuchten wir, ob sich JIA, Kollagenosen und Reaktive Arthritiden untereinander im Kindesalter in Bezug auf die Apoptosebereitschaft und das Apoptoseverhalten von T-Lymphozyten im peripheren Blut unterscheiden. Unsere Untersuchungen zeigen, dass die Apoptoserate der CD4+ und auch der CD8+ Zellen in allen Gruppen von Kindern mit rheumatischen Erkrankungen (JIA, Kollagenosen,

Reaktive Arthritis) im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe erhöht ist. Unsere Ergebnisse legen jedoch nahe, dass dieses Phänomen nicht einfach ein Effekt von aktivierten Zellen ist, denn die Untersuchungen der Fas-Expression zeigen, dass die Fas-Expression bei Kindern mit JIA sowohl auf CD4+, als auch auf CD8+ Zellen erhöht ist, bei Kindern mit Kollagenosen und mit Reaktiver Arthritis jedoch nur auf CD8+ Zellen. Alle Krankheitsentitäten zeigen eine Expansion an CD4+CD28- Zellen, dieses Phänomen ließ sich auf CD8+ Zellen nicht nachweisen.

Schließlich wird untersucht, ob es einen Unterschied des Anteils apoptotischer Lymphozyten eines erkrankten Kindes im peripheren Blut gegenüber dem Anteil apoptotischer Lymphozyten im Gelenkpunktat gibt. Es besteht eine massive Akkumulation an T-Zellen im entzündeten Gelenk bei Kindern mit JIA. Eine unbeantwortete Frage ist, warum diese Zellen überleben, obwohl sie fast alle Fas-positiv sind. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte das Fehlen eines biologisch aktiven membrangebundenen Fas-Liganden oder von löslichem Fas-Ligand im Synovium bei JIA sein. Die Daten über Fas-Ligand Expression auf Synovialzellen und T-Zellen widersprechen sich zum Teil. Der lösliche Fas-Ligand ist in Synovialflüssigkeit bei erwachsenen Rheumapatienten gemessen worden, die Konzentration ist sehr viel höher bei Patienten mit schwerer rheumatoider Arthritis als bei Patienten mit mildem Krankheitsverlauf oder Arthrose (Hashimoto H et al., 1998). Andererseits zeigen andere Untersuchungen nur geringe oder gar keine Expression von Fas-Ligand auf Synovialzellen von Patienten mit rheumatoider Arthritis (Cantwell et al., 1997). Wir können mittels ELISA keinen löslichen Fas-Liganden und ebenso wenig Fas-Ligand auf T-Zellen aus der Synovialflüssigkeit messen (Daten nicht gezeigt). Wir können nicht ausschließen, dass eine Bindung zwischen löslichem Fas und löslichem Fas-Liganden entsteht und so die Aktivität des Fas-Liganden blockiert.

In der Synovialflüssigkeit von Patienten mit rheumatoider Arthritis und auch JIA konnte wiederholt ein erhöhter Spiegel von löslichem Fas beobachtet werden (Tokano Y et al., 1996, Thiesen HJ et al., 1997, Hasunuma T, 1997). Bei rheumatoider Arthritis wird gezeigt, dass die Synovialzellen eine hohe Fasexpression aufweisen, ebenso die Leukozyten, die das entzündete Gelenk infiltrieren (Fujisawa K et al., 1996).

Zusammenfassend zeigen wir, dass die T-Zell-Apoptose bei Kindern mit Erkrankungen der rheumatischen Formenkreise verändert ist. Es wird gezeigt, dass in sämtlichen untersuchten Subpopulationen die Apoptoserate auf CD4+ und auch auf CD8+ Zellen im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe erhöht ist. Im Unterschied zu den Kontrollgruppen lässt sich dies insbesondere bei der Fas-Expression nachweisen, die bei Kindern mit JIA auf CD4+ und CD8+ Zellen, bei Kindern mit Kollagenosen und Reaktiver Arthritis nur auf CD8+ Zellen erhöht ist. Ebenso wird ein deutlicher Unterschied zwischen Fas-exprimierenden T-Zellen im peripheren Blut und der Synovialflüssigkeit nachgewiesen, die Fas-Expression auf T-Zellen im Gelenk von Kindern mit JIA beträgt nahezu 100%, es besteht eine massive Akkumulation an T-Zellen im Gelenk der erkrankten Kinder. In zukünftigen Untersuchungen muß geklärt werden, ob die Ursache für die Akkumulation der T-Zellen im Gelenk in einem gestörten Ablauf der von Fas intrazellulär vermittelten Signalübermittlung begründet liegt.

5. Literatur

Ahvonon PK, Sievers K, Aho K. Arthritis associated with *Yersinia enterocolica* infection. *Acta Rheum Scand* 1969; 15: 232-253.

Akbar AN, Borthwick N, Salmon M, et al. 1993. The significance of low bcl-2 expression by CD45RO T-cells in normal individuals and patients with acute viral infections; the role of apoptosis in T-cell memory. *J.Exp. Med.* 178:427.

Alderson MR, Armitage RJ, Maraskovsky E, et al. 1993. Fas transduces activation signals in normal human T-lymphocytes. *J. Exp. Med.* 178: 2231-2235.

American Rheumatism Association. Guidelines for rheumatic disease management. From the Committee on Rheumatologic Practice of the American Rheumatism Association. *Orthop Nurs* 1982; 1: 26-28

Blackman M, Kappler J, Marrack P 1990. The role of TCR in positive and negative selection of developing T-cells. *Science.* 284:1335.

Boise LH, Minn AJ, Noel PJ, et al. 1995. CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of bcl-xl. *Immunity* 3:87-98.

Cantwell MJ, Hua T, Zvaifler NJ, et al. 1997. Deficient Fas ligand expression by synovial lymphocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*; 40:1644-52

Cassidy JT, Levison JE, Bass JC et al. 1986. A study of classification criteria for a diagnosis of juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*; 29; 174

Chapman RS, Chresta CM, Herberg AA, et al. 1995. Further characterisation of the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) assay for the flow cytometric analysis of apoptosis in drug resistant and drug sensitive leukaemic cells. *Cytometry* 20: 245-256.

Cohen PL, Eisenberg RA 1991. Lpr and gld; single gene models of systematic autoimmunity and lymphoproliferative disease. *Annu. Rev. Immunol.* 9: 243-269.

Duval E, Wyllie AH 1986. Death and the cell. *Immunol today.* 4:102.

Effros RB, Allsopp R, Chiu CP, et al. 1996. Shortened telomeres in the expanded CD28⁻CD8⁺ cell subset in HIV disease implicate replicative senescence in HIV pathogenesis. *AIDS* 10: F17

Fadok VA, Savill JS, Haslett C, et al. 1992. Different populations of macrophages use either the vitronectin receptor or the phosphatidylserine receptor to recognise and remove apoptotic cells. *J Immunol* 149:4029.

Fujisawa K, Asahara H, Okamoto K et al. 1996. Therapeutic effect of the anti-Fas antibody on arthritis in HTLV-1 tax transgenic mice. *J Clin Invest* 98: 271-8

Greene DR, Martin SJ 1995. The killer and the executioner: how apoptosis controls malignancy. *Current Opinion in Immunology* 7:694-703.

Grom AA, Hirsch R. 2000. T-cell and T-cell receptor abnormalities in the immunopathogenesis of juvenile rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol*; 12: 420-424

Hashimoto H, Tanaka M, Suda T, et al. 1998. Soluble Fas ligand in the joints of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Rheum*; 41: 657-62

Hasunuma T, Kayagaki N, Asahara H, et al. 1997. Accumulation of soluble Fas in inflamed joints of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*; 40:80-6

Hetts SW (1998). To die or not to die. An overview of apoptosis and its role in disease. *JAMA* 279:300-306

Jenkinson EJ, Kingston R, Smith CA, et al. 1989. Antigen induced apoptosis in developing T-cells, a mechanism for negative selection of the TCR repertoire. *Eur. J. Immunol.* 19: 2175.

Knipping E, Krammer PH, Onel KB, et al. 1995. Levels of soluble Fas/APO-1/Fas in systemic lupus erythematosus and juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*; 38: 1734-1737

LeRoy EC, Black C, Fleischmajer R et al. 1988. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *J Rheumatol*; 15: 202-205.

Lowin B, Hahne M, Mattmann C, et al. 1994. Cytolytic T cell activity is mediated through perforin and Fas lytic pathways. *Nature* 370: 650-652.

Martens PB, Goronzy JJ, Schaid D et al. 1997. Expansion of unusual CD4+ T cells in severe rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*; 40:1106-14

Mituko RI, Shizuko T, Junpei I et al. 1997. Rheumatic diseases in an Mrl strain of mice with a deficit in the functional Fas ligand. *Arthritis Rheum* 40: 1054-1063

Nagata S 1994. Fas and Fas ligand: a death factor and its receptor. *Adv. Immunol.* 57:129-144.

Nagata S, Golstein P 1995. The Fas death factor. *Science* 267:1449-1456.

Namekawa T, Wagner UG, Goronzy JJ et al. 1998. Functional subsets of CD4 T cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*; 41:2108-16

O'Brien IE, Reutlingsperger CP, Holdaway KM 1997. Annexin-V and TUNEL use in monitoring the progression of apoptosis in plants. *Cytometry* 29(1):28-33.

Park W, Weyand CM, Schmid D et al. Co-stimulatory pathways controlling activation and peripheral tolerance of human CD4+CD28- T cells. *Eur J Immunol* 1997; 27: 1082-90

Petty RE, Southwood TR, Manners P et al. 2001. International League of Associations for Rheumatology Classification of juvenile idiopathic arthritis: second revision, Edmonton.

Pignata C, Alessio M, Ramenghi U, et al. 2000. Clustering of distinct autoimmune diseases associated with functional abnormalities of T cell survival in children. *Clin Exp Immunol*; 121: 53-58.

Pignatti P, Massa M, Travaglino P et al. 2001. Activation-induced cell death and Fas-induced apoptosis in patients with systemic or pauciarticular juvenile idiopathic arthritis. *Clin Exp Rheumatol*; 19: 339-344.

Raff MC 1992. Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 356: 397-400.
Rieux-Laucat F, Le Deist F, Hivroz C, Roberts IAG, Debatin KM, Fischer A, de Villartay JP 1995. Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science* 268:1347-1349.

Schirmer M, Vallejo AN, Weyand CM et al. 1998. Resistance to apoptosis and elevated expression of Bcl-2 in clonally expanded CD4⁺ CD28⁻ T cells from rheumatoid arthritis patients. *J Immunol*; 161: 1018

Schmidt D, Goronzy JJ, Weyand CM. 1996. CD4⁺ CD7⁻ CD28⁻ T cells are expanded in rheumatoid arthritis and are characterized by autoreactivity. *J Clin Invest*; 97: 2027-37

Sioud M, Mellbye O, Forre O. 1998. Analysis of the NF-kappa B p65 subunit, Fas antigen, Fas ligand and Bcl-2-related proteins in the synovium of RA and polyarticular JRA. *Clin Exp Rheumatol*; 16: 125-134

Smith CA, Williams GT, Kingston R, et al. 1989. Antibodies to CD3/TCR complex induce death by apoptosis in immature T-cells in thymic culture. *Nature* 337:181

Sneller MC, Wang J, Dale KD, et al. 1997. Clinical immunologic and genetic features of an autoimmune lymphoproliferative syndrome associated with abnormal lymphocyte apoptosis. *Blood* 89:1341-1348.

Tan EM, Cohen AS, Fries JF, et al. 1982. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*; 25: 1271-7

Thiesen HJ, Koczan D, Ibrahim SM. 1997. The role of apoptosis in autoimmune disease with special reference to juvenile chronic arthritis. *Rev Rhum*, 64 :140-143

Thompson CB 1995. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267 (5203): 1456-62

Tokano Y, Miyake S, Kayagaki N, et al. 1996. Soluble Fas molecules in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Immunol*; 16: 261-4

Uziel Y, Krafchik BR, Silverman ED et al. Localized scleroderma in childhood: a report of 30 cases. *Semin Arthritis Rheum* 1994; 23: 328-340.

Vallejo AN, Schirmer M, Weyand CM et al. 2000. Clonality and Longevity of CD4+CD28null T cells are associated with defects in apoptotic pathways. *J Immunol*; 165: 6301-7

Vallejo AN, Weyand CM, Goronzy JJ. 2001. Functional disruption of the CD28 gene transcriptional initiator in senescent T cells. *J Biol Chem*; 276: 2565-2570

van Engeland M, Nieland LJ, Ramaekers FC, et al. 1998. Annexin-V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry* 31:1.

Van Engeland M, Ramaekers FC, Schutte B et al. 1996. A novel assay to measure loss of plasma membrane asymmetry during apoptosis of adherent cells in culture. *Cytometry* 24: 131-9

Waase I, Kayser C, Carlson PJ et al. 1996. Oligoclonal T cell proliferation in patients with rheumatoid arthritis and their unaffected siblings. *Arthritis Rheum*; 39: 904

Wedderburn LR, Robinson N, Patel A, et al. 2000. Selected recruitment of polarised T cells expressing CCR5 and CXCR3 to the inflamed joints of children with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum*; 43: 765-774

Wesselborg S, Janssen O, Kabelitz D 1993. Induction of activation-driven death (apoptosis) in activated but not resting peripheral blood T-cells. *J. Immunol* 150:4338-4345.

Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR 1980. Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* 68:251-306.

Zeidler H, 1996. Reaktive Arthritiden. In: Peter HH, Pichler WJ, Hrsg. *Klinische Immunologie*. 2. Aufl. München-Wien-Baltimore: Urban-Schwarzenberg; S. 289-291.

6. Zusammenfassung

Hintergrund: Apoptose bezeichnet den programmierten, kontrollierten Zelltod. Ein Rezeptor für eines der Signale, die zur Apoptose führen ist das Fas-Molekül. Stimulation des CD28-Rezeptors hingegen kann den Ablauf der Apoptose inhibieren. Ein gestörter Ablauf der Apoptose könnte die Entstehung von Autoimmunerkrankungen begünstigen. Die häufigste Autoimmunerkrankung im Kindes- und Jugendalter ist die Juvenile Idiopathische Arthritis (JIA). Ob bei der Pathogenese der JIA ein gestörter Ablauf der Apoptose vorliegt, ist unklar.

Hypothese: In dieser Arbeit wird folgende Hypothese untersucht: Die Apoptoserate und Expression der apoptoseassoziierten Moleküle CD28 und Fas von Lymphozyten des peripheren Blutes und der Synovialflüssigkeit unterscheidet sich bei Kindern mit rheumatologischen Erkrankungen von der gesunder Kinder.

Methode: Die Expression von Fas und CD28 und die Apoptose von CD4+ und CD8+ Lymphozyten von Kindern mit verschiedenen rheumatischen Erkrankungen werden direkt nach Zellisolierung aus peripherem Blut und Synovialflüssigkeit mittels Annexin-Assay und TUNEL-Assay gemessen. Die Ergebnisse werden mit Werten von altersangepassten Kontrollpersonen verglichen, die sich elektiven Operationen unterziehen.

Resultate: Im peripheren Blut wird bei JIA eine erhöhte Apoptoserate sowohl der CD4+ als auch der CD8+ Lymphozyten im Vergleich zur Kontrollpopulation gezeigt (19 ± 19 vs $4 \pm 2\%$, 28 ± 13 vs $8 \pm 6\%$). Die Fas-Expression ist bei Patienten mit JIA sowohl auf CD4+ (31 ± 11 vs $23 \pm 6\%$), als auch auf CD8+ Zellen (26 ± 8 vs $20 \pm 6\%$) im Vergleich zu Normalpersonen erhöht, bei Patienten mit Kollagenosen und Reaktiver Arthritis jedoch nur auf CD8+ Zellen (40 ± 17 vs $20 \pm 5\%$, bzw. 37 ± 6 vs $20 \pm 6\%$). Es wird eine Expansion von CD4+CD28- Zellen bei Kindern mit JIA im Vergleich zur Kontrollgruppe gezeigt (10 ± 10 vs $1 \pm 1\%$). Interessanterweise findet sich in der Synovialflüssigkeit im Gegensatz zum peripheren Blut eine nahezu 100%ige Expression von Fas (95 ± 2 vs $32 \pm 9\%$), ohne dass die Apoptoserate wesentlich erhöht ist (32 ± 9 vs $20 \pm 8\%$).

Schlussfolgerung: Die vorliegenden Ergebnisse belegen die Hypothese, dass die Apoptoserate der Lymphozyten von Kindern mit rheumatischen Erkrankungen verändert ist. Im peripheren Blut ist die erhöhte Apoptoserate Ausdruck der generalisierten Aktivierung des Immunsystems bei Kindern mit rheumatischen Erkrankungen. In den Zellen der Synovialflüssigkeit ist die Apoptose möglicherweise reduziert, so dass sich vermehrt Lymphozyten im Gelenkraum der erkrankten Kinder ansammeln. Dies könnte zur Pathogenese der Synovitis bei Kindern mit JIA beitragen.

LEBENS LAUF

SABINE KNIPP

PERSÖNLICHE DATEN

Sabine Knipp
geboren am 14.11.1975 in Duisburg
Staatsangehörigkeit: Deutsch
ledig

AUSBILDUNG

1981-1985	Gemeinschaftsgrundschule Humboldtstraße Duisburg
1985-1994	Abtei-Gymnasium Duisburg-Hamborn
Juni 1994	Allgemeine Hochschulreife
1994-2001	Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Medizinische Fakultät
Herbst 1996	Ärztliche Vorprüfung
Herbst 1997	Erstes Staatsexamen
Frühjahr 2000	Zweites Staatsexamen
Frühjahr 2001	Drittes Staatsexamen

ASSISTENZARZTTÄTIGKEIT

2001-2002	Medizinische Klinik, Regionales Spitalzentrum Aare-Kiesental, Münsingen, Schweiz
2002-2003	Medizinische Klinik, Spital der Stadt Bern, Tiefenau, Schweiz
2003- aktuell	Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf