

Aus der Klinik für Pädiatrie  
mit Schwerpunkt Pneumologie, Immunologie und Intensivmedizin  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

## DISSERTATION

Gendosis-Wirkungs-Beziehung von *MEFV*-Mutationen auf  
die Funktion neutrophiler Granulozyten

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von  
Judith Freytag  
aus Köthen

Datum der Promotion: 06.09.2019

## Vorwort

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden 2016 bereits im Rahmen einer Abstract-Veröffentlichung auf dem 44. Kongress der DGRH veröffentlicht:

Stoler I, Freytag J, Orak B, Seib C, Esmann L, Seipelt E, Gohar F, Foell D, Wittkowski H, Kallinich T. Comparison of Neutrophilic Activation and Secretion of Cytokines derived from Patients with Familial Mediterranean Fever and other Acute and Chronic Inflammatory Diseases. 44. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie, 30. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Orthopädische Rheumatologie, 26. Jahrestagung der Gesellschaft für Kinder- und Jugendrheumatologie, Frankfurt am Main, 2016.

Des Weiteren stehen Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit in der Vorbereitung zur Veröffentlichung in einem Paper:

Freytag J\*, Stoler I\*, Seib C, Orak B, Foell D, Wittkowski H, Kessel C, Kallinich T. Spontaneous cell activation and cytokine release is restricted to neutrophils derived from patients with familial mediterranean fever. Zur Einreichung bei Arthritis and Rheumatism, 2018.

\* Die so gekennzeichneten Autoren haben zu gleichen Anteilen an der Entstehung der Arbeit beigetragen.

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abbildungsverzeichnis .....	5
Tabellenverzeichnis .....	6
Abkürzungsverzeichnis .....	7
<b>Zusammenfassung – deutsch</b> .....	8
<b>Abstract – englisch</b> .....	9
<b>A. Einleitung</b> .....	10
1. Einführung zum Familiären Mittelmeerfieber .....	10
1.a. Epidemiologie .....	10
1.b. Klinisches Erscheinungsbild .....	11
1.c. Diagnostik .....	13
1.d. Therapie .....	14
2. Genetische Aspekte in der Pathogenese des FMF .....	15
2.a. Mutationen im <i>MEFV</i> -Gen .....	15
2.b. Vererbungsmuster .....	16
2.c. Heterozygotie und die Theorie des Gendosis-Wirkungsprinzips beim FMF .....	16
3. Molekulare Pathophysiologie des FMF .....	17
3.a. Pyrin, das Genprodukt des <i>MEFV</i> -Gens .....	17
3.b. Inflammasome und die Entstehung der autoinflammatorischen Reaktion beim FMF .....	18
4. Laborchemische Biomarker des FMF in Klinik und Forschung .....	19
4.a. Klassische Entzündungsmarker – SAA, CrP und BSG .....	19
4.b. S100A12 .....	20
4.c. Interleukin-18 und Caspase-1 .....	21
4.d. Die Suche nach spezifischen und sensitiven Biomarkern: CD64, CD62L und CD11b .....	22
5. Die Wirkweise von Colchizin und die Rolle des Zytoskeletts beim FMF .....	23
6. Fragestellung .....	25

<b>B. Material und Methoden</b> .....	27
1. Materialien.....	27
1.a. Materialien zur Blutentnahme .....	27
1.b. Im Labor verwendete Materialien.....	27
1.b.i. Verbrauchsmaterialien.....	27
1.b.ii. Chemikalien.....	28
1.b.ii.1. Medien.....	28
1.b.ii.2. Stimulantien.....	29
1.b.ii.3. Antikörper und Kits für die Durchflusszytometrie .....	29
1.b.iii. ELISA-Kits.....	29
1.b.vi. Geräte .....	30
1.c. Computerprogramme .....	31
2. Patienten und Kontrollen.....	31
2.a. Ein- und Ausschlusskriterien.....	31
2.b. Rekrutierung.....	32
2.c. Befragung und Untersuchung .....	32
3. Laborarbeit.....	33
3.a. Standardprotokoll zur Probengewinnung.....	33
3.a.i. Blutentnahme .....	33
3.a.ii. Zellaufreinigung und Zellzählung.....	33
3.a.iii. Stimulation.....	35
3.a.iv. Vorbereitungen zur Messung.....	36
3.a.iv.1. Vorbereitung zur Messung am Durchflusszytometer.....	36
3.a.iv.2. Vorbereitung und Asservierung für ELISAs .....	37
3.a.iv.3. Asservierung für PCRs .....	37
3.a.v. Zusammenfassung über die gewonnenen Proben .....	38
3.b. Messungen am Durchflusszytometer.....	38
3.c. Enzyme-linked Immunosorbent Assay – ELISAs .....	41
3.c.i. Durchführung des Human IL-18 ELISA Kits.....	42
3.c.ii. Durchführung des CircuLex S100A12/EN-RAGE ELISA Kits...	43
3.c.iii. Durchführung des Human Caspase-1/ICE Immunoassays.....	44

3.d. Bestimmung der Zellvitalität.....	45
3.d.i. Trypanblaufärbung zur Vitalitätsbestimmung.....	45
3.d.ii. Annexin-Färbung und Messung im Durchflusszytometer.....	46
3.e. Messung von CrP im Serum.....	46
3.f. Messung der Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit.....	47
4. Statistische Methoden.....	47
<b>C. Ergebnisse.....</b>	<b>48</b>
1. Probanden.....	48
1.a. Alter, Geschlecht, Herkunft.....	48
1.b. Anamnese.....	49
2. Probenqualität: Zelltrennung und Vitalität.....	51
2.a. Reinheit nach Zelltrennung.....	51
2.b. Zellvitalität.....	51
2.b.i. Mikroskopische Bestimmung mit Trypanblaufärbung.....	51
2.b.ii. Bestimmung am Durchflusszytometer per Annexinfärbung.....	52
3. Entzündungsparameter im Serum.....	52
3.a. C-reaktives Protein.....	52
3.b. Interleukin-18.....	53
3.c. S100A12.....	54
3.d. Caspase-1.....	55
4. Ergebnisse der Durchflusszytometrie.....	56
4.a. CD62L im Zeitverlauf.....	59
4.b. Stimulation.....	60
4.b.i. CD62L.....	60
4.b.ii. CD11b.....	62
5. Ergebnisse der ELISAs.....	64
5.a. Interleukin-18.....	64
5.a.i. Kinetik.....	64
5.a.ii. Stimulation.....	66
5.b. S100A12.....	68
5.b.i. Kinetik.....	68
5.b.ii. Stimulation.....	69

5.c. Caspase-1 .....	71
5.c.i. Kinetik .....	71
5.c.ii. Stimulation.....	73
6. Einzeldarstellung: Patient mit heterozygotem Genotyp .....	75
7. Relevante Unterschiede zwischen Homozygoten und kombiniert heterozygoten Patienten .....	79
<b>D. Diskussion</b> .....	81
1. Erhöhte Entzündungsmarker beim FMF durch Aktivierung der Neutrophilen Granulozyten.....	81
2. CD62L im Zeitverlauf und sein Potential als neuer Biomarker für das FMF .....	85
3. Hemmung der inflammatorischen Reaktion durch Colchizin <i>in vitro</i> .....	88
4. Gendosis-Wirkungsprinzip beim FMF .....	90
5. Stärken und Schwächen dieser Arbeit.....	94
6. Schlussfolgerung und Ausblick .....	96
<b>Literaturverzeichnis</b> .....	98
<b>Versicherung an Eides statt</b> .....	107
<b>Anteilerklärung</b> .....	108
<b>Publikationsliste</b> .....	109
<b>Lebenslauf</b> .....	110
<b>Danksagung</b> .....	112

# Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1 Trennung der Blutprobe durch Dichtegradientenzentrifugation.  
a) Aufschichtung der Medien vor Zentrifugation.  
b) Gelungene Trennung ohne Verunreinigungen.  
c) Ergebnis der Zelltrennung bei Verunreinigung der Neutrophilen mit Erythrozyten.
- Abbildung 2 Beispiel für ein Histogramm mit zwei Populationen.
- Abbildung 3 C-reaktives Protein im Serum. Kastendiagramm mit logarithmischer Skalierung.
- Abbildung 4 Interleukin-18 im Serum. Kastendiagramm mit logarithmischer Skala.
- Abbildung 5 S100A12 im Serum. Kastendiagramm mit logarithmischer Skala.
- Abbildung 6 Caspase-1 im Serum. Kastendiagramm mit logarithmischer Skala.
- Abbildung 7 Exemplarischer Ablauf beim Auswerten der Messergebnisse der Durchflusszytometrie.  
1. Gaten in zwei Schritten.  
2. Isotypen-Messung.  
3. Kinetik-Ansätze.  
4. Stimulationsansätze.
- Abbildung 8 Zeitverlauf von CD62L.
- Abbildung 9 CD62L in den Stimulationsansätzen. Kastendiagramm.
- Abbildung 10 CD11b in den Stimulationsansätzen. Kastendiagramm.
- Abbildung 11 Zeitverlauf von Interleukin-18.
- Abbildung 12 Interleukin-18 in den Stimulationsansätzen. Kastendiagramm mit logarithmischer Skala.
- Abbildung 13 Zeitverlauf von S100A12.
- Abbildung 14 S100A12 in den Stimulationsansätzen. Kastendiagramm mit logarithmischer Skala.
- Abbildung 15 Zeitverlauf von Caspase-1.
- Abbildung 16 Caspase-1 in den Stimulationsansätzen. Kastendiagramm mit logarithmischer Skala.
- Abbildung 17 Durchflusszytometrie des heterozygot kranken Patienten.  
a) Zeitkinetik des Oberflächenmarkers CD62L.  
b) Stimulation.
- Abbildung 18 ELISAs des heterozygot kranken Patienten.  
a) Zeitkinetik von Il-18, S100A12 und Caspase-1.  
b) Stimulation.

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Tel-Hashomer-Kriterien zur Diagnose des Familiären Mittelmeerfiebers.
Tabelle 2	Stimulations- und Ernteschema.
Tabelle 3	Zusammensetzung der Antikörpermischungen und Fluorochrome für die Färbung der Antigene und der Isotypen.
Tabelle 4	Verwendete Farbstoffe und Detektionskanäle.
Tabelle 5	Standardreihe für das Human IL-18 ELISA Kit.
Tabelle 6	Verdünnungsreihe für die ELISA von S100A12.
Tabelle 7	Verdünnungsreihe für die ELISA von Caspase-1.
Tabelle 8	Bewertungsskala des Signifikanzniveaus
Tabelle 9	Zusammenfassung der Probandendaten.
Tabelle 10	Anteile der Zellpopulationen in den Proben nach Trennung und Aufreinigung des Vollblutes.
Tabelle 11	Anteil der durch Trypanblaufärbung bestimmten vitalen Zellen.
Tabelle 12	Anteile der Zellen in den verschiedenen Vitalitätsstadien.
Tabelle 13	CrP im Serum.
Tabelle 14	Interleukin-18 im Serum.
Tabelle 15	S100A12 im Serum.
Tabelle 16	Caspase-1 im Serum.
Tabelle 17	Zeitverlauf von CD62L.
Tabelle 18	CD62L in den Stimulationsansätzen.
Tabelle 19	CD11b in den Stimulationsansätzen.
Tabelle 20	Zeitverlauf von Interleukin-18.
Tabelle 21	Interleukin-18 in den Stimulationsansätzen.
Tabelle 22	Zeitverlauf von S100A12.
Tabelle 23	S100A12 in den Stimulationsansätzen.
Tabelle 24	Zeitverlauf von Caspase-1.
Tabelle 25	Caspase-1 in den Stimulationsansätzen.
Tabelle 26	Ergebnisse der Durchflusszytometrie beim heterozygot kranken Patienten im Vergleich zum Median der Gruppe der FMF-Patienten.
Tabelle 27	Ergebnisse der ELISA beim heterozygot kranken Patienten im Vergleich zum Median der Gruppe der FMF-Patienten. Zeitverlauf und Stimulationsansätze.
Tabelle 28	Genotyp und Mutationen der 11 eingeschlossenen FMF-Patienten.

## Abkürzungsverzeichnis

ADAM17	A Disintegrin and Metalloproteinase Domain 17	MAC-1	Makrophagen-1 Antigen
APC	Allophycocyanin	<i>MEFV</i>	Mediterranean Fever
ASC	Apoptose-assoziiertes Speck-ähnliches Protein mit einer Caspase-Rekrutierungsdomäne	mm n.W.	Millimeter nach Westergren
ATP	Adenosintriphosphat	MW	Mittelwert
<i>B. cenocepacia</i>	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	NLR	NOD-like-Rezeptor
BMDM	bone marrow-derived macrophages	NOD	nucleotide binding oligomerization domain
BSG	Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit	PAMP	Pathogen-associated molecular patterns
bZIP	Basic Leucine Zipper	PBMCs	peripheral blood mononuclear cells
CARD	caspase activation and recruitment domain	PBS	Phosphate Buffered Saline
CD	Cluster of Differentiation	PC7	Phycoerythrin Cyanin 7
Col	Colchizin	PCR	Polymerase chain reaction
CR3	Complement-Rezeptor 3	PE	Phycoerythrin
CrP	C-reaktives Protein	PerCP	Perinidin Chlorophyll Protein
DAMP	Damage-associated molecule patterns	PFAPA	Periodisches Fieber, Aphten, Pharyngitis, Adenopathie, Syndrom
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	PI	Propidiumjodid
ELISA	Enzyme linked Immunosorbent Assay	PYD	PYRIN-Domäne
FACS	Fluorescence-activated Cell Sorting	RA	Rheumatische Arthritis
FCS	Fetal Calf Serum	RAGE	receptor for advanced glycation end products
FI	Fluorescence Intensity	RFU	relative fluorescence units
FITC	Fluorescein Isothiocyanate	ROS	Reactive Oxygen Species
FMF	Familiäres Mittelmeerfieber	rpm	rounds per minute
FSC	Forward Scatter	RPMI	Zellkulturmedium, entwickelt durch das Roswell Park Memorial Institute
G-CSF	Granulocyte Colony-Stimulating Factor	SAA	Serumamyloid AA
GEF-H1	guanine nucleotide exchange factor H1	SD	Standard Deviation
gMFI	geo Mean Fluorescence Intensity	sJIA	systemische juvenile idiopathische Arthritis
Het. Gesunde	Heterozygot Gesunde	SPZ	Sozialpädiatrisches Zentrum
HIDS	Hyper-IgD-Syndrom	SSC	Side Scatter
HRP	Horseradish Peroxidase	TLR4	Toll-like-Rezeptor 4
ICAM-1	Intracellular Adhesion Molecule 1	TNF- $\alpha$	Tumornekrose-Faktor $\alpha$
IgG	Immunglobulin G	TRAPS	TNF-Rezeptor-assoziiertes Syndrom
IL	Interleukin	unst. nach Stim.	unstimuliert nach Stimulation
LPS	Lipopolysaccharid		

## Zusammenfassung

Das Familiäre Mittelmeerfieber (FMF) ist eine durch Mutationen im *MEFV*-Gen ausgelöste autoinflammatorische Erkrankung. Während die Krankheit lange als rezessiv vererbt galt, sieht man die Form des Erbganges heute differenzierter und geht eher von einem Gendosis-Wirkungseffekt aus. Betroffene erleiden unregelmäßig auftretende Episoden von Fieber und Serositis, typischerweise mit Bauchschmerz. Pathophysiologisch liegt ein mutiertes Pyrin-Molekül zugrunde, wodurch es zellulär zu dysregulierten inflammatorischen Reaktionen, beispielsweise einer gesteigerten Aktivität des Inflammasoms mit Sekretion von Interleukin-18, kommt. Weiterhin reagieren die Granulozyten mit einer vermehrten Freisetzung von S100A12. Diagnostisch werden vor allem das klinische Bild sowie die laborchemisch beobachtbare Entzündungsreaktion herangezogen. Zumeist sprechen die Patienten auf eine Therapie mit Colchizin an, wobei der molekulare Wirkmechanismus noch Teil der Forschung ist.

Ziel dieser Arbeit war es, die inflammatorische Reaktion der neutrophilen Granulozyten von FMF-Patienten *in vitro* zu quantifizieren und dabei mögliche neue diagnostische Biomarker zu identifizieren. Außerdem sollte die Reaktion der Zellen auf Colchizin untersucht werden. Bei diesen Versuchen war der Unterschied zwischen den einzelnen Genotypen von besonderem Interesse.

Hierfür wurden Blutproben der Probanden, eingeteilt in die drei Gruppen „FMF-Patienten mit zwei Mutationen im *MEFV*-Gen“, „heterozygot Gesunde mit nur einer Mutation“ und „gesunde Kontrollen ohne FMF-Mutation“ untersucht. Mittels biochemischer sowie molekularbiologischer Methoden wurden die verschiedenen Probenmaterialien auf die Inflammationsmarker CrP, Interleukin-18, S100A12 und Caspase-1, sowie die Oberflächenmarker CD11b und CD62L untersucht. Ein Teil der neutrophilen Granulozyten wurde mit LPS und ATP stimuliert. Außerdem wurde bestimmten Proben Colchizin zugesetzt, um dessen Wirkung auf die Zellen *in vitro* zu beobachten.

Es konnte gezeigt werden, dass die Zellen der FMF-Patienten auch unstimuliert bereits eine hohe inflammatorische Aktivität aufweisen, was sich beispielsweise in einer statistisch signifikant erhöhten spontanen Sekretion von IL-18 oder S100A12 zeigt, die auch durch Stimulation nicht zu steigern war. Des Weiteren zeichnete sich ein deutlicher Gendosis-Wirkungseffekt ab, der zumeist auch statistisch signifikant nachzuweisen war. Interessanterweise verhielt sich der Oberflächenmarker CD62L im Zeitverlauf der Inkubation der Zellen je nach Genotyp anders. Wir beobachteten eine verschieden starke Abspaltung des Markers von der Zelloberfläche, was auf eine unterschiedlich starke Aktivierung hinweist. Zuletzt bestätigte sich der die Inflammationsreaktionen unterdrückende Effekt des Colchizins auch *in vitro*.

Die erhobenen Ergebnisse lassen darauf schließen, dass beim FMF zwar nur ein einzelnes Protein, das Pyrin, mutiert ist. Allerdings sind die zur dysregulierten Entzündungsreaktion führenden Vorgänge vielschichtig und lassen sich einerseits durch ein aktiviertes Inflammasom erklären, andererseits scheint es aber weitere Mechanismen zu geben, die die massive Entzündungsreaktion vermitteln. Diese Prozesse laufen wahrscheinlich teilweise in Rückkopplung, teilweise aber auch unabhängig voneinander ab.

## Abstract

Familial Mediterranean Fever (FMF) is an autoinflammatory disease, caused by mutations in the *MEFV*-gene. While its inheritance was considered as recessive for long times, there are some newer approaches assuming a gene-dose-effect. Patients suffer from attacks of fever and serositis with, typically, abdominal pain in irregular intervals. The pathophysiology of FMF is determined by the mutation of pyrin, causing distinct dysregulated inflammatory reactions, such as an increased activity of the inflammasome with secretion of interleukin-18. Moreover, the neutrophils release a great amount of S100A12. The disease is diagnosed based on clinical evaluation and laboratory investigation, especially inflammatory markers. Most patients benefit from colchicine treatment, whereas its mechanisms of action have not been completely understood yet.

The aim of this work was to quantify inflammatory reaction of neutrophils of FMF-patients *in vitro* and thereby to identify possibly new biomarkers for diagnosis. Furthermore, cellular reaction to colchicine was investigated. In these studies we determined the differences between the genotypes in detail.

We took blood of three groups of participants: “FMF-patients with two mutations in the *MEFV*-gene”, “healthy persons, heterozygous with only one mutation” and “healthy controls without mutation”. The probes were processed and examined by biochemical and molecular biological methods and we quantified inflammation markers such as CrP, IL-18, S100A12 and Caspase-1 as well as the surface markers CD11b and CD62L. Some cells were stimulated by LPS and ATP and some were further treated with colchicine to investigate its effect on the cells *in vitro*.

We found an increased inflammatory activity in cells of FMF-patients, even if they were not stimulated *in vitro*. For example, the spontaneous secretion of IL-18 and S100A12 was significantly higher and could not be enhanced by stimulation. In addition, a notable gene-dose-effect emerged and was shown to be statistically significant in most cases. Interestingly, there was a gene-dose-effect concerning the kinetics of CD62L in the time of incubation of the cells. We observed varying grades of shedding, leading to a distinct level of activation in each group. Finally, we validated the inhibiting effect of colchicine *in vitro*, too.

All together, these findings suggest that while there is a single protein, pyrin, mutated in FMF, there are more complex processes that lead to a dysregulated inflammatory reaction. Firstly, the activity of the inflammasome is enhanced. Additionally, there seem to be more mechanisms mediating massive inflammation. Probably these processes affect and depend on each other, whereas others seem to take place independently.

## A. Einleitung

### A. 1. Einführung zum Familiären Mittelmeerfieber

Das Familiäre Mittelmeerfieber (FMF) ist eine autoinflammatorische hereditäre Erkrankung, die durch Mutationen im so genannten *MEFV*-Gen zu Krankheitsschüben mit selbstlimitierendem Fieber und Serositis führt. Letztere kann in den Gelenken, der Haut, der Pleura, meist jedoch im Peritoneum lokalisiert sein und führt zu Schmerzen und entzündlichen Prozessen in der betroffenen Region. Der Name „Familiäres Mittelmeerfieber“ geht auf Heller et al.<sup>[1]</sup> zurück, der damit die drei augenscheinlichsten Merkmale der Erkrankung – ein autosomal-rezessiver Erbgang, die hohe Prävalenz der Erkrankung bei Menschen aus dem Mittelmeerraum und die wiederkehrenden Fieberschübe – zusammenfasste.<sup>[2]</sup>

#### A. 1.a. Epidemiologie

Die Verbreitung des Familiären Mittelmeerfiebers unterscheidet sich stark in den verschiedenen Regionen weltweit. Im Gebiet des östlichen Mittelmeerraums weist die Erkrankung eine hohe Prävalenz auf und ist vor allem unter Armeniern, Türken, sephardischen Juden und Arabern eine häufige Krankheit. Obwohl es Berichte von Fällen auch außerhalb dieser Regionen gibt, wie zum Beispiel aus Japan, den USA, Italien und Deutschland, bleibt das FMF hier weiterhin eine eher seltene Erkrankung.<sup>[3, 4]</sup>

Epidemiologische Studien beziehen sich meist auf konkrete Bevölkerungsgruppen, weswegen es schwer ist, eine allgemeine Aussage zur Prävalenz des FMF zu treffen. In der Türkei gibt es weltweit wahrscheinlich die meisten erkrankten Menschen. Die Prävalenz liegt hier zwischen 1:400 bis 1:1000, was zu einer geschätzten Patientenzahl von 100.000 Menschen führt.<sup>[5, 6]</sup> Im Vergleich dazu liegt die Rate in Deutschland wesentlich darunter. Lainka et al. analysierten 2012 das Vorkommen des FMF in Deutschland und gaben die Prävalenz in der gesamten pädiatrischen Bevölkerung bis 16 Jahren mit ca. 48:1.000.000 an, wobei die Rate der Erkrankten unter den Kindern mit türkischem Migrationshintergrund bei etwa 880:1.000.000 liegen soll.<sup>[7]</sup>

Da es sich beim FMF um einen rezessiven Erbgang handelt, liegen in den Populationen unterschiedlich hohe Raten an heterozygoten Mutationsträgern vor, bei denen es nicht zum Ausbruch der Krankheit kommt. In Regionen mit hohen Patientenzahlen wie der Türkei, in Israel oder Armenien liegt die Frequenz der Heterozygoten bei 1:5 bis 1:7.<sup>[8, 9]</sup>

### **A. 1.b. Klinisches Erscheinungsbild**

Das klinische Bild beim Familiären Mittelmeerfieber ist charakterisiert durch die wiederkehrenden Krankheitsschübe mit Fieber und Zeichen eines entzündlichen Prozesses in den serösen Häuten des Körpers. Die konkreten Symptome und Charakteristika variieren stark zwischen den einzelnen Betroffenen.

Fast immer manifestiert sich die Erkrankung vor dem 20. Lebensjahr (90%) und zu einem Großteil – in etwa drei Vierteln der Fälle – vor dem 10. Lebensjahr, somit ist das Familiäre Mittelmeerfieber auch ein pädiatrisches Krankheitsbild.<sup>[10]</sup>

Die Schübe dauern in der Regel zwischen 12 und 72 Stunden und klingen von selbst wieder ab. Die Abstände zwischen den Schüben sind unregelmäßig und weisen starke Unterschiede – von einer Woche bis mehrere Jahre – auf, was die Episoden schwer vorhersehbar macht.<sup>[10, 11]</sup> Sowohl die Dauer der Schübe und ihre Auftrettsfrequenz als auch die Schwere der begleitenden Symptome nehmen mit ansteigendem Alter der Patienten für gewöhnlich ab. Zwischen den Schüben sind die Patienten in der Regel beschwerdefrei.<sup>[12]</sup>

Das Fieber, welches kennzeichnend für die Krankheitsschübe beim Familiären Mittelmeerfieber ist, steigt schnell auf 38 °C bis 40 °C und kann vor allem bei jüngeren Kindern das einzige Symptom im Schub sein.<sup>[12, 13]</sup>

Neben dem Fieber sind Bauchschmerz und abdominelle Beschwerden die typischsten Symptome des FMF und treten bei 95 % der Patienten auf.<sup>[2]</sup> Sowohl die genaue Charakterisierung der Beschwerden als auch die Schwere sind auch hier sehr variabel. So kann es sich um milden diffusen Bauchschmerz handeln, um lokalisierbare Schmerzen und auch um schwere Peritonitis mit Abwehrspannung und Ausstrahlung in den Thorax. Es kann eine Obstipation mit abgeschwächten Darmgeräuschen vorliegen, in selteneren Fällen kommt es aber auch zu einer Diarrhoe.<sup>[11]</sup> Die große Bandbreite der abdominellen Symptome und klinischen Zeichen, gepaart mit Fieber, führt häufig zu initialen Fehldiagnosen mit konsekutiven Appendektomien und Laparoskopien.<sup>[2, 14]</sup>

Die Entzündung der serösen Häute kann sich auch durch viele weitere Symptome präsentieren. Pleuritis (in ca. 50 % der Fälle<sup>[11]</sup>) und selten auch Perikarditis (in ca. 0,5 % der Fälle<sup>[2, 15]</sup>, wobei es hier auch eine Arbeit gibt, die zeigt, dass die Inzidenz der Perikarditis nicht erhöht ist<sup>[10]</sup>) können sich als atemabhängiger Brustschmerz und Dyspnoe äußern. Es kann zu Ergüssen und EKG-Veränderungen kommen. Ein weiterhin geläufiges Symptom bei Patienten mit einem Schub des FMF, vor allem bei sephardischen Juden, sind Gelenkbeschwerden.<sup>[3]</sup> Diese manifestieren sich in 75 % der Fälle als akute asymmetrische und nicht-destruktive Arthritis, meist in der unteren Extremität, insbesondere im Knie- oder Sprunggelenk. Das betroffene Gelenk imponiert

geschwollen und gerötet und es kann sich ein steriler Erguss mit polymorphkernigen Zellen zeigen<sup>[10, 16]</sup>. Seltener kommt es zu chronischen und zum Teil auch destruktiven Verläufen.<sup>[2]</sup> Ein weiteres spezifisches Zeichen des Familiären Mittelmeerfiebers, dessen Angaben zur Prävalenz jedoch sehr schwanken (zwischen weniger als 2 bis 30 %<sup>[17]</sup>), ist das erysipelartige Exanthem. Dabei handelt es sich um eine scharf abgegrenzte, gerötete, überwärmte und schmerzhaft Hauterscheinung, die typischerweise am Schienbein oder Fuß auftritt.<sup>[18]</sup>

Das Familiäre Mittelmeerfieber kann noch einige weitere Symptome auslösen, wie zum Beispiel Myalgien, Vaskulitiden (vor allem Purpura Schönlein-Henoch und Polyarteritis nodosa haben bei FMF-Patienten eine höhere Inzidenz als in der Gesamtbevölkerung), Kopfschmerzen bis hin zu aseptischer Meningitis, aber auch ein akutes Skrotum kommt bei männlichen Patienten vor.<sup>[11]</sup>

Wie oben erwähnt, treten die Episoden unregelmäßig und unvorhersehbar auf. Allerdings haben bis zu 50 % der Betroffenen prodromale Beschwerden wie ein vorangestelltes Unwohlsein im während der eigentlichen Episode betroffenen Organsystem oder unspezifische physische, emotionale oder neuropsychologische Empfindungen. Diese Prodromi dauern im Mittel etwa 20 Stunden.<sup>[19]</sup> Außerdem geben viele Patienten Faktoren an, die einen Krankheitsschub auslösen oder das Risiko erhöhen können. Die wichtigsten Triggerfaktoren sind Kälteexposition, emotionaler Stress, Müdigkeit und die Menstruation bei Patientinnen.<sup>[20-22]</sup>

Neben der Belastung durch das akute Krankheitsgeschehen sind Patienten mit Familiärem Mittelmeerfieber vor allem durch drohende Langzeitschäden und Komplikationen gefährdet. Hier ist vor allem die AA-Amyloidose zu nennen, die sich zumeist als Nierenamyloidose manifestiert und die Mortalität von FMF-Patienten stark beeinflusst. Vor allem unbehandelte oder nicht adäquat behandelte Betroffene entwickeln mit hoher Wahrscheinlichkeit (in der Türkei beispielsweise ca. 60 %<sup>[18]</sup>) diese Komplikation, die über konsekutives Nierenversagen zum Tod führen kann. Die Wahrscheinlichkeit des Auftretens hängt jedoch nicht nur vom Therapiebeginn des FMF und deren Effektivität ab, sondern auch von der Ethnizität und der zugrunde liegenden Mutation.<sup>[23, 24]</sup>

Tritt die Amyloidose ohne vorherige typische FMF-Symptome auf beziehungsweise macht sich das FMF erst durch die Amyloidose bemerkbar, spricht man vom „Typ-II-Phänotyp“. Dabei steht dieser im Gegensatz zum „Typ-I-Phänotyp“, bei dem die akuten Schübe mit Fieber und Serositis im Vordergrund stehen.<sup>[10, 25]</sup> Neben dieser älteren Einteilung existieren weitere Versuche, die Erkrankung je nach Ausprägungsgrad zu unterteilen. Es existiert zum einen der Score nach Pras et al., der unter Einbeziehung von Manifestationsalter, Häufigkeit der Krankheitsschübe, der Dosis des Medikaments Colchizin und bestimmter Symptome (Arthritis, erysipelartiges Exanthem, Amyloidose) eine Unterteilung in verschiedene Schweregrade vornimmt.<sup>[26]</sup> Daneben gibt es auch

noch den Score nach Mor et al., welcher mehrere Schweregrade nach dem Vorliegen bestimmter Kriterien (Anzahl betroffener Organsysteme während des Schubs und im Gesamtverlauf, Auftreten von Pleuritis und erysipelartigem Exanthem, Colchizindosis, Manifestationsalter) unterscheidet.<sup>[27]</sup>

Weitere Langzeitfolgen des Familiären Mittelmeerfiebers können neben der Nierenamyloidose ein vermindertes Längenwachstum<sup>[28]</sup>, reduzierte Fertilität<sup>[29]</sup> oder psychische Erkrankungen (Angststörungen, Depressionen)<sup>[30, 31]</sup> sein.

### **A. 1.c. Diagnostik**

Die Verdachtsdiagnose „Familiäres Mittelmeerfieber“ erfolgt in erster Linie klinisch durch die Präsentation typischer Symptome bei positiver Familienanamnese oder Herkunft aus Ländern mit hoher Prävalenz. Als typische und wegweisende Symptome sind hier vor allem, wie oben beschrieben, das rekurrende und selbstlimitierende Fieber mit Bauchschmerzen, Arthralgien oder atemabhängige Brustschmerzen zu nennen.

Für die Diagnosestellung wurden die Tel-Hashomer-Kriterien etabliert (siehe Tabelle 1)<sup>[32]</sup>. Diese wurden in einer Population mit hoher Prävalenz des Familiären Mittelmeerfiebers für Erwachsene entwickelt. Unter diesen Umständen beträgt die Spezifität 98 % und die Sensitivität 99 %. In Populationen mit geringerer Prävalenz oder für pädiatrische Patienten sind die Tel-Hashomer-Kriterien weniger aussagekräftig anwendbar. Es gibt Anpassungen und weitere Kriterien für diese Fälle, welche jedoch alle eine geringere diagnostische Sicherheit erreichen.<sup>[33, 34]</sup>

Unterstützend zum klinischen Bild können – wie in den Tel-Hashomer-Kriterien als Zusatzkriterium aufgeführt – laborchemische Untersuchungen auf klassische Entzündungsmarker im Blut, wie das C-reaktive Protein, die Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit oder Serumamyloid AA durchgeführt werden und einen Beitrag zu differentialdiagnostischen Überlegungen beitragen.<sup>[35]</sup> Neuere Biomarker sind Gegenstand aktueller Forschung, vor allem für das Protein S100A12 konnten bisher vielversprechende Ergebnisse gefunden werden.<sup>[36, 37]</sup>

Nicht zuletzt kann die Diagnosestellung bei der durch Genmutation verursachten Erkrankung natürlich auch durch molekulargenetische Analysen erfolgen. Meist wird zunächst das am häufigsten von der Mutation betroffene Exon 10 sequenziert. Kann hier keine relevante Veränderung gefunden werden, werden die Exone 2, 3 und 5 untersucht.<sup>[38]</sup> Am Ende der Analysen steht jedoch nicht immer das Ergebnis einer homozygoten oder kombiniert heterozygoten Mutation mit klar pathogenem Charakter. Die Penetranz einiger Mutationen ist bisher unklar und auch Individuen mit nur einer Mutation können von der Erkrankung betroffen sein. Somit ist die

molekulargenetische Untersuchung nur eine Säule in der Diagnostik des FMF und nicht zwingend notwendig für die Entscheidung zur Einleitung einer Therapie.<sup>[39, 40]</sup>

Differentialdiagnostisch sollten neben infektiösen Ursachen für Fieber und Entzündung auch andere autoinflammatorische Syndrome mit rekurrendem Fieber, wie das TNF-Rezeptor-assoziierte Syndrom (TRAPS), das Hyper-IgD-Syndrom (HIDS) oder PFAPA (Periodisches Fieber, Aphten, Pharyngitis, Adenopathie-Syndrom) bedacht werden.<sup>[41, 42]</sup> Natürlich müssen bei akutem Bauchschmerz, Arthralgien oder Brustschmerz auch Differentialdiagnosen wie Appendizitis, Arthritiden anderer Genese (reaktive Arthritis, juvenile idiopathische Arthritis) und Pneumonie oder ähnliches in Betracht gezogen und ausgeschlossen werden.<sup>[18]</sup>

Hauptkriterien	Nebenkriterien	Zusatzkriterien
$\geq 3$ typische Schübe (Fieber $\geq 38^\circ\text{C}$ , Dauer 12-72 Std.) mit <ol style="list-style-type: none"> <li>1. (generalisierter) Peritonitis</li> <li>2. (unilateraler) Pleuritis od. Perikarditis</li> <li>3. Monoarthritis im Sprung-, Knie- od. Hüftgelenk</li> <li>4. alleinigem Fieber</li> </ol>	Untypische Schübe (schmerzhafte, wiederkehrende Schübe, die sich in mind. 1 Kriterium von typischen Schüben unterscheiden) mit Schmerzen in <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Abdomen (ohne Peritonitis), lokalisiert</li> <li>2. Brust</li> <li>3. Gelenken (abweichend von typischen Schüben)</li> <li>4. Beinen (belastungsabh.)</li> <li>5. Besserung durch Colchizin</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. positive Familienanamnese</li> <li>2. entsprechende Ethnizität</li> <li>3. Manifestationsalter <math>\leq 20</math> Jahre</li> <li>4.-7. Charakteristik der Schübe:               <ol style="list-style-type: none"> <li>4. schwer, Bettlägerigkeit</li> <li>5. selbstlimitierend</li> <li>6. Symptommfreiheit zw. Schüben</li> <li>7. laborchemische Parameter für Entzündungsreaktion</li> </ol> </li> <li>8. episodische Hämaturie / Proteinurie</li> <li>9. Laparotomie ohne pathologischen Befund</li> <li>10. Konsanguinität der Eltern</li> </ol>
Für die Diagnose „FMF“ sind erforderlich: $\geq 1$ Hauptkriterium oder $\geq 2$ Nebenkriterien oder 1 Nebenkriterium plus $\geq 5$ Zusatzkriterien oder 1 Nebenkriterium plus $\geq 4$ der Zusatzkriterien 1.-5.		

Tabelle 1. Tel-Hashomer-Kriterien zur Diagnose des Familiären Mittelmeerfiebers, überarbeitet nach Kallinich et al. (2014).<sup>[32, 43]</sup>

### A. 1.d. Therapie

Die Therapie des Familiären Mittelmeerfiebers erfolgt in allererster Linie mit Colchizin. Bereits 1972 wurde es erstmals als Therapeutikum für die Erkrankung erwähnt<sup>[44]</sup> und in den folgenden Jahren konnte seine Wirksamkeit in vielen Studien unter Beweis gestellt werden.<sup>[45-47]</sup> Das Medikament reduziert sowohl die Häufigkeit und Schwere der Krankheitsschübe als auch das Auftreten der Langzeitfolgen wie Amyloidose.<sup>[48]</sup>

Das Medikament sollte angesetzt werden, sobald die klinische Diagnose gestellt wurde, wobei die Dosis jeweils an Alter, Krankheitsverlauf und individuelle Faktoren (wie Compliance und

Verträglichkeit) angepasst werden muss. Die tägliche Gabe sollte zwischen 0,5 mg bei kleinen Kindern und 3 mg bei Erwachsenen liegen und oral verabreicht werden. In diesen Dosen wird das Colchizin in der Regel gut vertragen.<sup>[49]</sup>

Eine kontinuierliche Colchizin-Therapie kann bei 60-65 % aller Patienten den Krankheitsschüben komplett vorbeugen und bei weiteren 30-35 % die Häufigkeit und Schwere reduzieren.<sup>[50]</sup> Bei 5-15 % der FMF-Patienten jedoch kommt es durch das Colchizin nicht zu einer Verbesserung des Krankheitszustands. Diese Patienten werden „non-responder“ genannt, wobei der Begriff nicht eindeutig definiert ist und teilweise auch mangelnden Therapieerfolg aufgrund fehlender Compliance mit einschließt.<sup>[51]</sup> Seit einigen Jahren versucht man, solche Patienten durch die Behandlung mit Biologika wie Anakinra (rekombinanter Interleukin-1-Rezeptor Antagonist)<sup>[52]</sup>, Canakinumab (humaner monoklonaler anti-IL-1beta Antikörper)<sup>[53]</sup>, Rilonacept (IL-1-Decoy-Rezeptor)<sup>[54]</sup> oder anderen Medikamenten, die an der Zytokinsekretion und damit der Pathogenese der Erkrankung angreifen, zu behandeln. Für diese Substanzen existieren erste Ergebnisse zu ihrer Wirkung aus randomisierten Studien.

Die symptomatische Therapie während eines Krankheitsschubes kann unabhängig von Colchizin oder einer anderen Dauermedikation durch nichtsteroidale Antirheumatika und bei starken Beschwerden durch Opiate erfolgen.<sup>[55]</sup>

## **A. 2. Genetische Aspekte in der Pathogenese des FMF**

### **A. 2.a. Mutationen im *MEFV*-Gen**

Seit 1997 weiß man, dass das Krankheitsbild des Familiären Mittelmeerfiebers durch Mutationen im nach der Krankheit benannten *MEFV*-Gen ausgelöst wird. Dieses Gen befindet sich auf dem kurzen Arm des Chromosom 16 (Genlokus 16p13.3). Es besteht aus 10 Exons in 781 Aminosäuren, die das Protein Pyrin (auch Marenosttrin genannt) kodieren.<sup>[56, 57]</sup> Bis heute sind mehr als 330 Sequenzvarianten des Gens beschrieben, sie können in der Infevers Datenbank unter <https://infevers.umai-montpellier.fr/web/search.php?n=1> eingesehen werden.<sup>[58]</sup> Allerdings sind nicht alle Varianten krankheitsverursachend und nur für einen kleineren Teil gibt es Nachweise für ihre Pathogenität.<sup>[58, 59]</sup> Shinar et. al empfehlen bei der Diagnostik das Testen auf insgesamt 14 Varianten, wobei neun nachgewiesen pathogen sind und fünf von unklarer Signifikanz. Sieben dieser neun pathogenen Varianten liegen auf Exon 10. Die häufigsten pathogenen Mutationen sind M694V, V726A, M680I und M694I, welche alle auf Exon 10 lokalisiert sind. Ebenfalls häufig, jedoch von unklarer Signifikanz ist E148Q auf Exon 2.<sup>[38, 60]</sup> Von den fünf genannten Mutationen sind etwa 74 % aller FMF-Patienten betroffen.<sup>[61]</sup> Die Häufigkeit der einzelnen Mutationsvarianten

ist wiederum unterschiedlich in den verschiedenen Bevölkerungsgruppen. Bei Türken, Armeniern, Arabern und Juden ist M694V die häufigste Mutation. Gleichzeitig wird diese Variante auch allgemein mit einem schwerer betroffenen Phänotyp assoziiert. In Populationen, in denen das FMF insgesamt seltener ist, sind jedoch meist andere Mutationen am stärksten vertreten. So ist beispielsweise in Japan die Mutation E148Q die häufigste.<sup>[39, 62]</sup>

### **A. 2.b. Vererbungsmuster**

Lange galt das Familiäre Mittelmeerfieber als klassischer Vertreter eines autosomal rezessiven Erbganges im Sinne der Mendelschen Vererbungslehre.<sup>[56]</sup>

Die Betroffenen weisen in der Mehrzahl der Fälle je eine pathogene Mutation auf jedem Allel auf. So spricht man beispielsweise von M694V-Homozygoten. Unterscheiden sich die beiden Mutationen voneinander, sind die Patienten kombiniert (oder „compound“) heterozygot – es liegt dann auf einem Allel beispielsweise die Mutation M694V und auf dem anderen V726A vor. Es kommt dann ebenso zum klinischen Bild des Familiären Mittelmeerfiebers.

Mit der ansteigenden Zahl der entdeckten Sequenzvarianten und der dazu beschriebenen Phänotypen und Fälle wird jedoch klar, dass der Zusammenhang zwischen Genotyp und Phänotyp und die Penetranz der einzelnen Mutationen komplexer ist und nicht zuletzt auch von weiteren genetischen oder epigenetischen Faktoren und Umweltfaktoren abzuhängen scheint.<sup>[18, 63-65]</sup>

So wird bei etwa einem Viertel der Patienten nur ein betroffenes Allel gefunden. Es kann also scheinbar auch bei heterozygoten Merkmalsträgern zum Ausbruch der Krankheit kommen.<sup>[8]</sup>

Andererseits gibt es Personen, bei denen die Mutation E148Q homozygot vorliegt, die keine klinischen Symptome aufweisen. Bei kombiniert Heterozygoten hingegen, die auf einem Allel diese Variante aufweisen, kommt es zu einem meist milden Krankheitsverlauf.<sup>[66]</sup>

Heute geht man vorrangig davon aus, dass es einen Gendosis-Wirkungseffekt gibt und auch die einzelnen Mutationen unterschiedlich schwer betroffene Phänotypen auslösen.

### **A. 2.c. Heterozygotie und die Theorie des Gendosis-Wirkungsprinzips beim FMF**

Ginge man davon aus, dass der Erbgang des Familiären Mittelmeerfiebers rein autosomal-rezessiv ist, würde gelten, dass alle heterozygoten Merkmalsträger die Krankheit zwar übertragen, aber selbst keinerlei Krankheitszeichen aufweisen.

Dass dies nicht so ist, zeigten 2009 Marek-Yagel et al.<sup>[8]</sup> wie auch eine weitere Studie<sup>[67]</sup>, die das gesamte *MEFV*-Gen bei einigen Betroffenen auf Mutationen durchsuchten und nur eine Veränderung auf einem Allel fanden. Weitere Studien an heterozygoten Merkmalsträgern konnten – auch bei asymptomatischen Personen – eine erhöhte inflammatorische Aktivität (beispielsweise

eine erhöhte Akute-Phase-Reaktion) – nachweisen. Lachmann et al. sprechen in Folge von einem „pro-inflammatory phenotype“ bei Mutationsträgern.<sup>[68-72]</sup>

Darüber hinaus können, wie oben beschrieben, die einzelnen Sequenzvarianten und Genotypen verschiedenen Schweregraden der Erkrankung zugeordnet werden. Man unterscheidet weiterhin Mutationen mit niedriger genetischer Penetranz (z.B. E148Q und K695R) und hoher genetischer Penetranz (M694V und M680I).<sup>[61, 62]</sup>

In der Zusammenschau dieser Erkenntnisse wird von der Ansicht, das Familiäre Mittelmeerfieber wäre eine autosomal-rezessive Erkrankung, die je nach Genotyp zum vollen Ausbruch kommt oder gar nicht, immer mehr abgerückt.<sup>[62]</sup> Der Genotyp scheint also, neben anderen Faktoren, zu einer Graduierung der Phänotypen zu führen. Die oben genannten Korrelationen und Trends, die auch in der Diagnostik und Therapie der Erkrankung herangezogen werden könnten, unterstützen die Hypothese des Gendosis-Wirkungseffektes beim FMF.

### **A. 3. Molekulare Pathophysiologie des FMF**

#### **A. 3.a. Pyrin, das Genprodukt des *MEFV*-Gens**

Die 781 Aminosäuren des *MEFV*-Gens kodieren Pyrin, ein Proteinmolekül, welches in fünf Domänen unterteilt wird.

Beginnend von N-terminal findet man die PYRIN-Domäne (PYD) (1), gefolgt von der basischen bZIP-Transkriptionsfaktor-Domäne (2), einer B-Box-Zinkfinger-Domäne (3), einer alpha-Helix-Domäne (4) und der C-terminalen B30.2-Domäne (5). Vor allem letztere – ihrerseits wiederum bestehend aus der N-terminalen SPRY- und der C-terminalen PRY-Domäne – ist von den krankheitsauslösenden Mutationen in Exon 10 betroffen.<sup>[73]</sup>

Das Pyrin-Molekül hat vielfältige Funktionen, da jeder dieser fünf Proteinabschnitte seine eigenen Merkmale aufweist und mit verschiedenen weiteren Molekülen interagiert. Alle Zellfunktionen, an denen Pyrin beteiligt ist, stehen in Zusammenhang mit Inflammationsreaktionen beziehungsweise ihrer Regulation. Beispiele sind entzündlicher induzierter Zelltod (Pyroptose) durch Interaktion von PYD mit ASC (Apoptose-assoziiertes Speck-ähnliches Protein mit einer Caspase-Rekrutierungsdomäne)<sup>[74]</sup>, Zytokinsekretion durch Interaktion von B30.2 mit Caspase-1<sup>[75, 76]</sup>, Regulation von Transkription, unter anderem durch den bZIP-Transkriptionsfaktor<sup>[77]</sup>, sowie Umbau- oder Transportfunktionen des Zytoskelletts bei der Interaktion mit den Mikrotubuli<sup>[78, 79]</sup>.

Pyrin wird hauptsächlich von neutrophilen Granulozyten, eosinophilen Granulozyten und Monozyten exprimiert.<sup>[80]</sup> Außerdem gibt es Nachweise für eine geringe Expression von Pyrin in Dendritischen Zellen, Synovial- und Peritonealfibroblasten und auch Hautzellen.<sup>[81, 82]</sup>

Die Bedeutung der Mutation im *MEFV*-Gen für die Funktion des Pyrin war lange unklar und ist auch heute noch Gegenstand der Forschung. Lange ging man davon aus, es handle sich um eine „Loss of function“-Mutation, die die natürliche Wirkungsweise des Pyrins behindert und auf diesem Weg zu Inflammation mit vermehrter Sekretion von Zytokinen führt.<sup>[76, 83]</sup> Dagegen sprach jedoch, dass Mäuse, die von Natur aus ein verkürztes Pyrin – nämlich ohne die beim FMF oft mutierte B30.2-Domäne – besitzen, keine Symptome zeigten.<sup>[84]</sup> Chae et al. zeigten 2011 schließlich, dass Mäuse, denen durch Knock-in-Technik zwei mutierte humane *MEFV*-Gene eingesetzt wurden, typische klinische Merkmale der Erkrankung entwickeln.<sup>[85]</sup> Diese Entdeckungen waren ein entscheidender Hinweis darauf, dass eine Mutation im *MEFV*-Gen zu einer verstärkten Funktion von Pyrin führt, also einem „Gain-of-function“. Diese Vermutung könnte auch erklären, warum es bei heterozygoten Merkmalsträgern zu klinischen Erscheinungen kommen kann und dass es sich durchaus um einen Gendosis-Effekt handeln könnte.<sup>[73]</sup>

Demnach trägt Pyrin physiologisch als auch in seiner mutierten Form zu einer immunologischen Zellaktion mit Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine bei.

### **A. 3.b. Inflammasome und die Entstehung der autoinflammatorischen Reaktion beim Familiären Mittelmeerfieber**

Inflammasome sind zytosolische Multiproteinkomplexe, die aus mehreren Untereinheiten bestehen und durch die Aktivierung der Caspase-1 für die Prozessierung pro-inflammatorischer Zytokine – vor allem IL-1 $\beta$  und IL-18 – aber auch für die Induktion von Apoptose verantwortlich sind. Es wurden bislang mehrere Inflammasome beschrieben, zum Beispiel das NLRP3-, NLRP1b- und das NLRC4-Inflammasom als solche, die einen NOD-like-Rezeptor (NLR; NOD für „nucleotide binding oligomerization domain“) als Untereinheit besitzen und andererseits das AIM2-, RIG1- oder Pyrin-Inflammasom, welche keinen NOD-like-Rezeptor beinhalten.

Inflammasome bilden sich im Inneren der Zelle, wenn bestimmte Gefahrensignale (DAMPs [Damage-associated molecule patterns] oder PAMPs [Pathogen-associated molecular patterns]) erkannt werden. Diese Registrierung geschieht entweder durch die NLR oder andere Proteine, welche als Sensoren für die Inflammasome dienen. So erkennen unterschiedliche Inflammasome durch ihre jeweiligen Sensoren verschiedene für die Zelle bedrohliche Signale. Den Sensor-Molekülen ist strukturell gemeinsam, dass sie alle eine Pyrin-Domäne (PYD) oder eine Caspase-Rekrutierungsdomäne (caspase activation and recruitment domain [CARD]) enthalten.<sup>[86]</sup> Somit

qualifiziert sich das Pyrin-Molekül ebenfalls als Sensor-Protein für ein Inflammasom, da es eine PYD enthält. Nachdem Chae et al. die bis 2011 entdeckten Inflammasome (NLRP1, NLRP3, NLRC4 und AIM2) als verantwortlich für die inflammatorische Pathogenese beim FMF ausschließen konnten und damit ein bis dahin unentdecktes ASC-abhängiges Inflammasom vermuteten<sup>[85]</sup>, stellten Gavrilin et al. die Hypothese eines Pyrin-Inflammasoms auf. Sie wiesen nach, dass mit *Burkholderia cenocepacia* infizierte Monozyten mit einer Pyrin-abhängigen Aktivierung von Caspase-1 und damit einem Anstieg von IL-1 $\beta$  und IL-18 reagieren und postulierten damit die Existenz eines Pyrin-Inflammasoms mit Pyrin als Gefahrensensor.<sup>[87]</sup> Xu et al. konnten diese Hypothese kräftigen und bestätigen, indem sie *in vitro* nachwiesen: Pyrin ist ein Sensor für bakteriell verursachte Veränderungen der Rho-GTPase, z.B. durch *B. cenocepacia* oder das Toxin TcdB von *Clostridium difficile*. Auf dieses Signal hin interagiert die Pyrin-Domäne des Pyrin-Moleküls mit der CARD-Domäne des Adaptorproteins ASC und bildet so das Pyrin-Inflammasom, welches die Caspase-1 aktiviert und damit zur Sekretion von IL-1 $\beta$  und IL-18 führt.<sup>[88]</sup>

Da die meisten pathogenen Mutationen beim FMF nicht in der für die Funktion des Inflammasoms wichtigen Pyrin-Domäne, sondern in der C-terminalen B30.2-Domäne liegen, scheint der krankheitsverursachende Mechanismus nicht direkt im Zusammenhang mit der Formation und Funktion des Pyrin-Inflammasoms zu stehen. Van Gorp et al. konnten hingegen zeigen, dass eine pathogene Mutation im *MEFV*-Gen dazu führt, dass die Funktion des Pyrin-Inflammasoms unabhängig von Mikrotubuli wird. Während die Inflammasom-Formation beim Wildtyp-Pyrin von zytosolischen Mikrotubuli abhängig ist, führt die Mutation dazu, dass sich das Pyrin-Inflammasom unabhängig davon zusammensetzen kann.<sup>[79]</sup>

Zusammenfassend kann man also sagen, dass es beim FMF durch die Mutation des Pyrins zu einer durch entfallende Regulationsmechanismen vermehrten Aktivierung des Pyrin-Inflammasoms mit konsekutiv erhöhten pro-inflammatorischen Zytokinen kommt.

## **A. 4. Laborchemische Biomarker des FMF in Klinik und Forschung**

### **A. 4.a. Klassische Entzündungsmarker – SAA, CrP und BSG**

Da das Familiäre Mittelmeerfieber vor allem durch seine klinische und subklinische Entzündungsreaktion gekennzeichnet ist, liegt es nahe, dass sich dies auch in den Laborparametern für Inflammation zeigt.

Die klassischen Entzündungsmarker sind in erster Linie die so genannten Akute-Phase-Proteine. Hierzu zählen unter anderem das C-reaktive Protein (CrP) und das Serumamyloid-A (SAA).

Letzteres hat besondere Relevanz, da es durch Organablagerungen verantwortlich für die schwerwiegendste Langzeitfolge des FMF – die Nierenamyloidose – ist. Es konnte nachgewiesen werden, dass Patienten erhöhte Serumwerte des SAA haben, auch in symptomfreien Intervallen.<sup>[89]</sup>

Das C-reaktive Protein hingegen ist der im klinischen Alltag geläufigste Marker zur schnellen und aussagekräftigen Einschätzung, ob eine Entzündung vorliegt. Ein Wert von über 5 mg/l wird als pathologische Erhöhung angesehen. Bei Patienten mit FMF ist das CrP vor allem während eines Schubs, aber auch in den symptomfreien Intervallen, signifikant erhöht.<sup>[35]</sup>

Weiterhin labortechnisch leicht und schnell zu bestimmen ist die Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit (BSG). Sie ist ein wichtiger Teil der rheumatischen Diagnostik. Manche Autoren berichten von einer Erhöhung der BSG bei FMF-Patienten während der Krankheitsschübe und auch zwischen ihnen.<sup>[35]</sup>

#### **A. 4.b. S100A12**

Bei der Gruppe der S100-Moleküle handelt es sich um kalziumbindende Proteine, von denen 25 bekannt sind. Ihre einzelnen Funktionen reichen von der Regulation des Kalziumhaushaltes über Proliferation, Zellmigration, Apoptose und nicht zuletzt Inflammation, wobei ihre zellspezifischen Expressionsmuster teilweise sehr verschieden sind. Sie wirken intrazellulär als Liganden für Rezeptoren und einige von ihnen können, zum Beispiel bei Zellschädigung, auch extrazellulär verschiedenste Signalkaskaden zur Gefahrenbekämpfung induzieren.<sup>[90]</sup>

Gemeinsam ist den S100-Molekülen, dass sie in ihrer funktionalen Form intra- und extrazellulär als Polymere vorliegen. S100A8/A9 beispielsweise liegen als Heterodimer vor, S100A12 als Homodimer. Die drei letztgenannten S100-Moleküle werden auch als Calgranuline bezeichnet.<sup>[91]</sup>

Das S100A12-Protein gehört funktionell zu der Familie der DAMPs und wird als proinflammatorisches Protein von aktivierten neutrophilen Granulozyten exprimiert.<sup>[92]</sup> Intrazellulär

hat das Protein Einfluss auf die Kalzium- und Zinkionen-Homöostase und wird durch Veränderungen der Konzentration dieser Ionen intrazellulär reguliert.<sup>[93]</sup> Die genauen Vorgänge

der Sekretion des S100A12-Proteins aus den aktivierten Zellen nach extrazellulär sind noch nicht abschließend geklärt. Da den S100-Proteinen bestimmte Peptide zur Interaktion mit dem Golgi-

Apparat und dem endoplasmatischen Retikulum fehlen, wird ein alternativer Sekretionsweg vermutet.<sup>[94]</sup> Tardif et al. konnten außerdem eine Sekretion ausschließlich durch Degranulation

von Neutrophilen oder vesikuläre Sekretionsmechanismen widerlegen. Ihre Experimente gaben jedoch Hinweise darauf, dass der Weg der Calgranuline nach extrazellulär abhängig vom

Zytoskelett der Zellen und den Mikrotubuli ist, indem gezeigt wurde, dass die Proteine sich an das Zytoskelett und an die Membran anlagerten, nachdem die Zellen aktiviert waren. In der gleichen

Arbeit fanden sie auch heraus, dass die Sekretion von Calgranulinen durch den Anstieg von ROS (Reactive Oxygen Species, Reaktive Sauerstoffspezies) und Kaliumionenströmen aktiviert wird.<sup>[95]</sup> Diese Stimuli werden ebenfalls mit der Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms und der folgenden IL-1 $\beta$ -Sekretion in Verbindung gebracht.<sup>[96]</sup>

Extrazellulär agiert S100A12 als klassisches DAMP und bindet nach seiner Sekretion an die membranständigen Rezeptoren TLR4<sup>[97]</sup> und RAGE (receptor for advanced glycation end products)<sup>[98]</sup> auf Immun- und Endothelzellen. Dieser Prozess induziert wiederum eine NF $\kappa$ B-abhängige Expression pro-inflammatorischer Zytokine. Es scheinen noch weitere Interaktionsmuster und Signalkaskaden durch S100A12 zu existieren – wie beispielsweise eine von beiden Rezeptoren unabhängige Mastzell-Aktivierung –, die jedoch noch nicht vollständig verstanden und untersucht sind.<sup>[94]</sup>

Eine erhöhte Konzentration von S100A12 im Blut spricht also für eine Aktivierung von Granulozyten und anderen Zellen des angeborenen Immunsystems und damit für Inflammation. Die Funktion des Proteins als Biomarker konnte für zahlreiche Erkrankungen belegt werden. Darunter finden sich nicht nur klassische (auto-)inflammatorische Erkrankungen wie die systemische juvenile idiopathische Arthritis (sJIA)<sup>[99]</sup> oder rheumatoide Arthritis<sup>[100]</sup>, sondern auch Arteriosklerose oder Diabetes<sup>[101]</sup>. Es konnte gezeigt werden, dass S100A12 ein zuverlässiger Marker für entzündliche Prozesse beim FMF ist und sich hier besser zur Diagnostik eignet, als beispielsweise das CrP oder die BSG.<sup>[37]</sup>

#### **A. 4.c. Interleukin-18 und Caspase-1**

Interleukin-18 (IL-18) ist ein pro-inflammatorisches Zytokin aus der Gruppe der Interleukin-1-Familie. Sein inaktives Vorläuferprotein pro-IL-18 liegt in fast allen Zellen regelmäßig vor. Eine Erhöhung des freien IL-18 im Serum führt über den Interleukin-18-Rezeptor und einer konsekutiven Aktivierung von NF $\kappa$ B zu einer Produktion von Interferon- $\gamma$  durch T-Zellen und Natürliche Killerzellen und wurde bei vielen Krankheiten beobachtet, wie zum Beispiel bei autoimmunen Erkrankungen (Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen, Rheumatoide Arthritis, Systemischer Lupus Erythematoses, Systemische Juvenile Idiopathische Arthritis, u.a.), Sepsis, Myokardialen Dysfunktionen oder Akutem Nierenversagen.<sup>[102]</sup>

Als sensitiver und spezifischer Biomarker für eine einzelne Erkrankung ist Interleukin-18 nicht geeignet, da es nachgewiesenermaßen an sehr vielen inflammatorischen Prozessen beteiligt ist. Auch beim Familiären Mittelmeerfieber wird durch die Aktivierung des Pyrin-Inflammasoms wie oben beschrieben Interleukin-18 sezerniert. Durch seine Beteiligung an der Pathophysiologie der Erkrankung kann IL-18 jedoch experimentell mit dem Zweck der Quantifizierung und

Relativierung der Entzündungsreaktion bestimmt werden.<sup>[36, 79]</sup> Ähnlich verhält es sich mit der Messung der Caspase-1. Die zytosolische Cysteinprotease wird durch Inflammasome, genauer durch die Interaktion mit ASC als Adapterprotein für Inflammasome, aktiviert. So bildet sie IL-1 $\beta$  und IL-18 aus den jeweiligen Vorläufermolekülen. Durch die quantitative Bestimmung der Caspase-1 im Serum oder Zellüberstand können Rückschlüsse auf die Aktivität des Inflammasoms – und somit auf das Maß des inflammatorischen Prozesses – gezogen werden.<sup>[103]</sup>

#### **A. 4.d. Die Suche nach spezifischen und sensitiven Biomarkern:**

##### **CD64, CD62L und CD11b**

Da die Pathophysiologie des Familiären Mittelmeerfiebers bisher nicht gänzlich verstanden ist, versucht man in der experimentellen Forschung immer wieder, Proteine oder andere Moleküle zu finden, die spezifisch beim FMF auftreten oder seinen Verlauf leichter prognostizierbar machen. Dafür eignen sich beispielsweise bestimmte „Cluster of Differentiation“-Moleküle (CD-Moleküle). Diese Moleküle sind meist membrangebundene Glykoproteine, durch die man Zellen immunphänotypisch gruppieren kann.

CD64 (Fc $\gamma$ RI) ist ein membranständiger hochaffiner Fc-Rezeptor für IgG und wird durch Monozyten, Makrophagen und aktivierte Neutrophile exprimiert. Die Expression auf diesen Zellen wird durch Signale wie Interferon- $\gamma$  oder G-CSF (Granulocyte Colony-Stimulating Factor) angeregt und führt letztlich zu einer inflammatorischen Immunantwort, zum Beispiel durch vermehrte Bildung und Freisetzung von TNF- $\alpha$  oder IL-6.<sup>[104]</sup> Eine Studie fand heraus, dass CD64 auf Neutrophilen in höherer Anzahl bei Schüben einer Rheumatoider Arthritis (RA) nachgewiesen werden kann.<sup>[105]</sup> Migita et al. konnten zeigen, dass Granulozyten von unbehandelten FMF-Patienten signifikant mehr CD64 auf ihrer Oberfläche exprimieren als die Zellen sowohl von gesunden Kontrollen als auch von Patienten mit RA und Systemischem Lupus Erythematoses.<sup>[106]</sup> CD64 wird außerdem als Biomarker für Infektion und Sepsis, insbesondere Neonatale Sepsis diskutiert.<sup>[107, 108]</sup>

Der Oberflächenmarker CD62L (oder auch L-Selektin) ist ein Leukozyten-Adhäsionsmolekül. Das Transmembranprotein wird auf Leukozyten exprimiert und vermittelt einen wichtigen Schritt in der Adhäsionskaskade, indem es mit für die Anheftung und Migration der Leukozyten am Endothel und zum entzündlichen Gewebe hin verantwortlich ist.<sup>[109]</sup> Nach Aktivierung wird CD62L proteolytisch von der Zelloberfläche abgespalten, der lösliche Teil des Proteins kann im Serum nachgewiesen werden.<sup>[110]</sup> CD62L wird als Biomarker für verschiedene Erkrankungen in Betracht gezogen, wie zum Beispiel das Chronische Lymphatische Lymphom<sup>[111]</sup> und HIV<sup>[112]</sup>, aber auch Neonatale Infektionen<sup>[113]</sup>, Asthma Bronchiale<sup>[114]</sup> oder Metastasen des Urothelzell-

Karzinoms<sup>[115]</sup>. 2004 veröffentlichten Molad et al. eine Arbeit zur Expression von CD62L und CD11b auf Neutrophilen von FMF-Patienten, in der sie keinen Unterschied in der Anzahl von CD62L auf den Neutrophilen der Patienten im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe fanden.<sup>[116]</sup>

Auch das Oberflächenprotein CD11b ist ein Teil der Integrine, also der Adhäsionsmoleküle. Zusammen mit CD18 bildet es das  $\alpha$ M $\beta$ 2-Integrin, auch MAC-1 (Makrophagen-1 Antigen) oder Complement-Rezeptor 3 (CR3) genannt. Der MAC-1-Komplex wird vornehmlich auf neutrophilen Granulozyten und Monozyten exprimiert. Er interagiert während Entzündungsprozessen mit etlichen weiteren Mediatoren, Zytokinen und Enzymen und unterstützt damit den leukozytären Adhäsionsprozess, die Leukozyten-Rekrutierung und die Inflammation.<sup>[117]</sup> Ein hoher Anteil von CD11b auf den Neutrophilen spricht also für eine inflammatorische Reaktion. Wie oben erwähnt, untersuchten Molad et al. bereits 2004 die Expression von CD11b bei Patienten mit Familiärem Mittelmeerfieber. Sie fanden eine signifikant erhöhte Menge des Oberflächenproteins während des akuten Krankheitsschubs im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen.<sup>[116]</sup>

Die beim FMF nachweislich erhöhten S100-Proteine S100A8/A9 und womöglich auch S100A12 fördern die Expression von ICAM-1 auf Endothelzellen. MAC-1, also der Komplex aus CD11b und CD18, auf den Immunzellen im Blut bindet an ICAM-1 (Intracellular Adhesion Molecule 1) auf Endothelzellen.<sup>[91]</sup>

## **A. 5. Die Wirkweise von Colchizin und die Rolle des Zytoskeletts beim FMF**

Nach wie vor ist Colchizin das Mittel der Wahl zur Therapie des Familiären Mittelmeerfiebers und ein Großteil der Patienten profitiert davon. Derzeit ist jedoch nicht geklärt, an welchem Punkt in der Pathophysiologie des FMF das Medikament ansetzt und welche zellulären und molekularen Prozesse es blockieren kann, um seine Wirkung zu entfalten.

Colchizin gehört zu der Gruppe der Alkaloide und kann rein pflanzlich aus Teilen der Herbstzeitlosen (*Colchicum autumnale*) gewonnen werden. Seine Wirkung ist anti-inflammatorisch, wobei die genauen Mechanismen sehr vielfältig zu sein scheinen und noch immer Teil der modernen Forschung sind.

Die wohl bekannteste zelluläre Wirkung des Colchizins ist seine Rolle als sogenanntes Spindelgift. Es ist bewiesen, dass Colchizin intrazellulär an Tubulin-Dimere bindet, was eine weitere Polymerisierung des Mikrotubuli-Zytoskeletts verhindert.<sup>[118]</sup> Durch diesen Mechanismus werden für eine Inflammation wichtige Zellfunktionen wie Migration, Sekretion von Zytokinen oder intrazelluläre Transportmechanismen inhibiert. Inwieweit diese *in vitro* beobachteten Vorgänge *in*

*in vivo* bei therapeutischem Wirkspiegel geschehen können, ist noch unklar. Neben seinem Effekt auf die Mikrotubuli hat Colchizin aber auch Einfluss auf die Expression von CD62L auf den Neutrophilen, auf die Freisetzung von chemotaktisch wirksamen Leukotrienen und die Verformbarkeit der neutrophilen Granulozyten, was in der Summe zur Blockade von Adhäsion, Extravasation und Rekrutierung der Immunzellen führt.<sup>[119]</sup> Martinon et al. konnten außerdem zeigen, dass bei Anwesenheit von Colchizin die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms durch bestimmte Kristalle, wie sie bei Gicht vorkommen, gehemmt wird.<sup>[120]</sup> Wie bei der Wirkung des Colchizins auf die Mikrotubuli, ist es auch hier möglich, dass die erforderlichen Wirkspiegel nur *in vitro* erreicht werden und die klinisch-therapeutischen Dosen hierfür nicht ausreichend sind. Es gibt jedoch Hinweise, dass Colchizin in Leukozyten akkumuliert und die intrazellulären Konzentrationen so wesentlich höher sind als die beim Patienten gemessenen Plasmaspiegel.<sup>[119]</sup> Die Wirkung des Colchizins speziell beim FMF könnte also – wie bereits lange angenommen – in einer Destabilisierung des Zytoskeletts begründet sein, ebenso aber auch auf einer Inhibierung des an der Entzündungsreaktion beteiligten NLRP3-Inflammasoms und einer generellen Hemmung der Granulozytenfunktion beruhen.

Die Rolle des Zytoskeletts bei der Pathophysiologie des FMF ist ein weiterer Punkt, der in der Forschung diskutiert wird. Wie oben bereits erwähnt, konnten Van Gorp et al. zeigen, dass für die Aktivierung des Pyrin-Inflammasoms physiologisch ein intaktes Mikrotubuliskelett nötig ist, dass diese Notwendigkeit aber durch eine Mutation im *MEFV*-Gen aufgehoben wird.<sup>[79]</sup> Das könnte darauf hinweisen, dass die Wirkweise des Colchizins beim FMF nicht – oder zumindest nicht ausschließlich – darin begründet ist, dass Colchizin die Polymerisierung der Mikrotubuli hemmt. Andererseits zeigte eine Studie, dass Colchizin RhoA aktiviert, indem es durch seine depolymerisierende Wirkung zu einer Freisetzung des RhoA-Aktivators GEF-H1 führt.<sup>[121]</sup> Eine aktivierte Rho-GTPase wiederum führt dazu, dass das Pyrin-Inflammasom, sowohl im Wildtyp als auch mit *MEFV*-Mutation, nicht aktiviert wird, wie die Ergebnisse von Xu et al. suggerieren.<sup>[88]</sup>

Die aufgeführten vielfältigen Mechanismen zeigen die komplexe Wirkweise des Colchizins auf. Ein Zusammenspiel dieser Funktionen führt wahrscheinlich zur Unterdrückung der Inflammation beim FMF.

## A. 6. Fragestellung

Wenngleich das Familiäre Mittelmeerfieber eine immunologische systemische Erkrankung ist, gibt es doch bis jetzt keine Möglichkeit, die Erkrankung durch immunologische Diagnostik, wie zum Beispiel sensitive und spezifische Biomarker, zu erkennen. Die genetische Diagnostik ist aufwendig und führt nicht immer eindeutig zum Ziel. So bleibt die Diagnose „Familiäres Mittelmeerfieber“ doch meist eine klinische und wird über die Heranziehung der oben erwähnten Scores gestellt. Wünschenswert ist jedoch die weitere Objektivierung der Diagnostik. Zum Teil gelingt dies bereits über die Bestimmung der oben genannten Biomarker, welche jedoch weder besonders sensitiv oder spezifisch sind, noch einen prognostischen Wert zur Etablierung einer individuell angepassten Therapie haben. Daher war es ein Ziel dieser Arbeit, die Aussagekraft von bereits zur Diagnostik angewandten Biomarkern, wie S100A12, weiter zu differenzieren und neue Biomarker, wie CD62L, in Erwägung zu ziehen.

Die Folge einer genaueren und objektiveren Diagnostik wäre der frühere Einsatz einer Therapie, um mögliche Spätfolgen zu vermeiden. Eventuell könnten in bestimmten Bevölkerungsgruppen sogar Screening-Tests durchgeführt werden, um so auch subklinische Krankheitsverläufe zu detektieren. Im Folgenden soll daher gezeigt werden, dass auch bei heterozygoten Mutationsträgern ohne klinische Symptome eines Familiären Mittelmeerfiebers erhöhte Werte bestimmter Biomarker gemessen werden können und dass nicht nur der klinische Phänotyp, sondern auch das laborchemische Erscheinungsbild beim FMF mit dem Genotyp korreliert.

Die Pathophysiologie, insbesondere die konkreten Vorgänge auf molekularer Ebene, sind beim FMF noch nicht bis zuletzt verstanden. Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war demnach, diese Mechanismen genauer zu ergründen und bestehende Hypothesen zu überprüfen. Dabei war es von besonderem Interesse, die zentrale Rolle der neutrophilen Granulozyten in der Pathophysiologie des FMF zu belegen und die in diesen Zellen bestehende Sekretion von Zytokinen wie S100A12, IL-18 und Caspase-1 nachzuweisen und zu quantifizieren. Daraus sollten gegebenenfalls Schlüsse über Signalkaskaden gezogen werden.

Außerdem sollte untersucht werden, inwieweit sich diese Prozesse durch *in vitro* Zugabe von Colchizin hemmen lassen. Ziel dieser Versuche war es, ein tieferes Verständnis über die Wirkweise des Colchizins bei der Behandlung des FMF zu erlangen.

Die vorliegende Arbeit versucht folgende Fragen zu beantworten:

1. Welche Aussagekraft haben bereits etablierte Biomarker des Familiären Mittelmeerfiebers im Hinblick auf die Unterscheidung verschiedener Genotypen und gibt es weitere Marker, die für die Diagnostik der Erkrankung hilfreich sein können?

2. Gilt beim FMF das Gendosis-Wirkungsprinzip und welche Rolle spielt subklinische Inflammation bei heterozygoten Merkmalsträgern?
3. In welchem Maße besteht beim FMF eine Übersekretion der Zytokine durch die neutrophilen Granulozyten und kann die Kinetik der einzelnen Biomarker Aufschlüsse über die Signalkaskaden der Inflammationsreaktion geben?
4. Kommt es durch *in vitro* Zugabe von Colchizin zur Unterdrückung der Zytokinsekretion und wie entfaltet das Medikament seine klinische Wirkung?

## B. Material und Methoden

### B. 1. Materialien

#### B. 1.a. Materialien zur Blutentnahme

Produkt	Firma
BD Vacutainer® System zur venösen Blutentnahme	Becton Dickinson, Heidelberg
<ul style="list-style-type: none"> <li>- BD Vacutainer® Kanülenhalter</li> <li>- BD Vacutainer® Luer Adapter, steril</li> <li>- BD Vacutainer® Röhrchen:               <ul style="list-style-type: none"> <li>o EDTA-Röhrchen</li> <li>o Plasmaröhrchen mit Lithium-Heparin (17 IU/mL)</li> <li>o Serumröhrchen mit Trenngel und Gerinnungsaktivator</li> <li>o Röhrchen zur Blutkörperchen-senkungsgeschwindigkeitsanalyse</li> </ul> </li> </ul>	
Blutentnahmesystem	Sarstedt, Nümbrecht
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Safety-Multifly®-Kanüle 21G, 200 mm lang</li> <li>- Multi-Adapter kurz für S-Monovette®</li> <li>- Membrane Adapter für Luersysteme, steril</li> <li>- S-Monovette® 2 ml, BSG/Citrat-Puffer (1:5)</li> </ul>	
Einmalhandschuhe	wechselnde Hersteller
Hände- und Hautdesinfektionsmittel	

#### B. 1.b. Im Labor verwendete Materialien

##### B. 1.b.i. Verbrauchsmaterialien

Produkt	Firma
DNase/RNase-freie Tubes, Eppendorf LoBind	Eppendorf, Hamburg
Einmalhandschuhe	wechselnde Hersteller
Einmalkanülen, 0,8 x 120 mm, Sterican	B-Braun, Melsungen
Einmalpipetten, Transferpipette 3,5ml	Sarstedt, Nümbrecht

FACS-Tubes, 5 ml Polystyren, BD Falcon™	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS-Tubes, 5 ml Polystyren	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen, verschiedene Größen	Verschiedene Hersteller
Pipettenspitzen, PCR clean Tip EP Dualfilter 0,1-1 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen, PCR barrier Filter Tips 100 µl und 1000 µl	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Plastik-Tubes 15 ml und 50 ml, BD Falcon™	Becton Dickinson, Heidelberg
Spritzen 10 ml, Discardit II	Becton Dickinson, Heidelberg
Tubes 1,5 ml, Eppendorf Safe Lock	Eppendorf, Hamburg

### **B. 1.b.ii. Chemikalien**

#### *B. 1.b.ii.1. Medien*

Produkt	Firma
2-Mercaptoethanol	Carl Roth, Karlsruhe
DMEM Flüssigmedium ohne Na-Pyruvat, mit 3,7 g/l NaHCO <sub>3</sub> , mit 4,5 g/l D-Glukose, ohne L-Glutamin	Biochrom, Berlin
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin
Natriumazid	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Percoll 1,130g/ml	GE Healthcare, Freiburg
Phosphate Buffered Saline (PBS) ohne Ca & Mg	PAA Laboratories, Pasching
RA1 Lyse-Puffer	Macherey Nagel, Düren
RPMI 1640 Flüssigmedium mit stabilem Glutamin	Biochrom, Berlin
Sheath Fluid, BD FACSFlo™	Becton Dickinson, Heidelberg
Shutdown Solution, BD FACST™	Becton Dickinson, Heidelberg

*B. 1.b.ii.2. Stimulantien*

Produkt	Firma
ATP (Adenosine 5'-triphosphate disodium salt hydrate)	Sigma-Aldrich, München
Colchizin	Sigma-Aldrich, München
LPS (Lipopolysaccharid)	Sigma-Aldrich, München

*B. 1.b.ii.3. Antikörper und Kits für die Durchflusszytometrie*

Produkt	Firma
CD11b-APC	Beckman Coulter, Brea, USA
CD16-PC7	Beckman Coulter, Brea, USA
CD45-PE-Cy5	Beckman Coulter, Brea, USA
CD62L-FITC	Becton Dickinson, Heidelberg
CD64-PE	Beckman Coulter, Brea, USA
FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I	Becton Dickinson, Heidelberg
Mouse IgG1-APC, Isotyp Kontrolle	Beckman Coulter, Brea, USA
Mouse IgG1-FITC, Isotyp Kontrolle	Becton Dickinson, Heidelberg
Mouse IgG1-PE, Isotyp Kontrolle	Beckman Coulter, Brea, USA

*B. 1.b.iii. ELISA-Kits*

Produkt	Firma
Quantikine® ELISA Human Caspase-1/ICE Immunoassay, 96 Wells, Cat# DCA100	R&D Systems Europe, Ltd., Abingdon, UK
Human IL-18 ELISA Kit, 96 Wells, Code Nr. 7620	MBL International Corporation, Woburn, USA
S100A12/EN-RAGE ELISA Kit, 96 Wells, Cat# CY-8058	CircuLex™, Nagano, Japan

**B. 1.b.iv. Geräte**

Gerät	Firma
BD Sedi-40 Blutsenkungsgerät	Becton Dickinson, Heidelberg
BD Seditainer Ständer	Becton Dickinson, Heidelberg
Brutschrank, Heraeus B 6220	Thermo Scientific, Wilmington, USA
Durchflusszytometer, BD FACSCanto II	Becton Dickinson, Heidelberg
Mikrotiterplatten Photometer, VersaMax ELISA Microplate Reader	Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, USA
Mikrotiterplatten Wascher, Thermo Wellwash 4 MK 2	Thermo Scientific, Wilmington, USA
Mikrozentrifuge, Heraeus Pico 17	Thermo Scientific, Wilmington, USA
Neubauer Zählkammer	LO - Labor Optik Ltd, Lancing, England
Orbitalschüttler, Minishaker MS1	IKA-Werke, Staufen
Orbitalschüttler, Titramax 101	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Pipettierhelfer, Pipetus	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Pipetten, Eppendorf Research	Eppendorf, Hamburg
Serum-Arbeitsplatz, cobas 8000 modular analyzer series, Modul c701	Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen
Standzentrifuge, Megafuge 1.0R	Heraeus Instruments, Hanau
Standzentrifuge, Sorvall RT 6000 D	Thermo Scientific, Wilmington, USA
Sterilbank Laminar Flow, LaminAir Hbb 2448	Heraeus Instruments, Hanau
Zellzahlmessung, Sysmex XE-5000	Sysmex, Norderstedt

### B. 1.c. Computerprogramme

Software	Version	Firma
FACSDiva	6.1.3.	Becton Dickinson, Heidelberg
Microsoft Word für Mac	15	Microsoft, Redmond, USA
Microsoft Excel für Mac	15	Microsoft, Redmond, USA
Prism	6.0e und 7.0a	GraphPad Software, Inc, San Diego, USA
SoftMax Pro	6.2.2.	Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, USA

## B. 2. Patienten und Kontrollen

### B. 2.a. Ein- und Ausschlusskriterien

Die zu untersuchenden Proben stammen aus vier Versuchsgruppen:

1. Bekannte FMF-Patienten mit homozygoter Mutation M694V,
2. bekannte FMF-Patienten mit kombiniert heterozygotem, das heißt klar pathogenem und krankheitsassoziiertem Genotyp ohne Polymorphismen (vor allem Kombinationen der Mutationen M680I, M694V, V726A),
3. heterozygote Träger von nur einer der als krankheitsassoziiert beschriebenen Mutationen im *MEFV*-Gen ohne FMF-spezifische Symptome,
4. gesunde Kontrollgruppe.

Alle Probanden mussten älter als 13 Jahre sein beziehungsweise ein Körpergewicht von mehr als 38 kg haben. Krankheitssymptome wie Fieber bis 14 Tage vor dem Tag der Blutentnahme führten zum Ausschluss. Dabei war es nicht von Bedeutung, welcher Genese die Symptome entstammten (Infekt, chronisch-entzündlich).

Die Patientengruppen mit bekanntem FMF waren mit Colchizin behandelt und befanden sich in einem guten und stabilen Allgemeinzustand.

Der Genotyp aller Mutationsträger war in der Vergangenheit bestimmt worden und eindeutig bekannt.

Die gesunden Kontrollen durften in ihrem Stammbaum keine Personen aus einem Land, in dem das Familiäre Mittelmeerfieber verbreitet ist, haben. Daher ist die Möglichkeit, dass ein heterozygoter Trägerstatus vorliegt als extrem gering einzustufen.

Alle Probanden mussten ihr Einverständnis mit der Probenentnahme und Verarbeitung schriftlich bestätigen. Bei minderjährigen Patienten mussten zusätzlich die Erziehungsberechtigten ihre Zustimmung geben.

Die Genehmigung der Ethikkommission wurde eingeholt (EA2/125/12).

### **B. 2.b. Rekrutierung**

Alle Patienten mit Familiärem Mittelmeerfieber waren in der Kinderklinik der Charité Berlin bekannt.

Die heterozygoten, klinisch gesunden Mutationsträger waren Eltern von bekannten FMF-Patienten, deren Genotyp in einer früheren Studie<sup>[69]</sup> bereits bestimmt wurde.

Durch die rheumatologische Sprechstunde wurden mögliche Probanden angesprochen, über das Wesen der Studie informiert und die Teilnahme wurde ihnen angeboten. Bei Interesse wurden die Teilnehmer persönlich über das Ziel und den Nutzen der Studie sowie über die möglichen Risiken der Blutentnahme und ihre Rechte als Teilnehmer aufgeklärt. Der Aufklärungsbogen wurde ihnen ausgehändigt. Durch ihre Unterschrift auf einer Einverständniserklärung stimmten die Probanden der Teilnahme zu. Minderjährige Probanden mussten in Begleitung von einem Erziehungsberechtigten sein, welcher ebenfalls schriftlich zustimmen musste.

### **B. 2.c. Befragung und Untersuchung**

Die Patienten und Kontrollpersonen wurden am Versuchstag in die Kinderklinik einbestellt. In Ausnahmefällen konnte das Prozedere auch bei den Teilnehmern zuhause erfolgen.

Alle Teilnehmer füllten einen Fragebogen aus, in dem sie zu Alter, Geschlecht und Ethnizität befragt wurden. Zudem erfasste der Bogen Angaben zum Krankheitsverlauf, sofern es sich beim Probanden um einen Patienten mit FMF handelte. So wurden das Alter bei Krankheitsbeginn und bei Beginn der Colchizinthherapie, die aktuelle Dosis des Colchizins sowie die Qualität (Bettlägerigkeit) und Quantität (Schübe pro Monat und Dauer eines Schubs) erfragt. Die Patienten sollten dann ihre jeweiligen Symptome im Schub charakterisieren. Es wurde nach Fieber, Bauchschmerzen, Brustschmerzen, Gelenkentzündungen und entzündlichen Hautveränderungen gefragt. Außerdem sollten auch chronische Beschwerden (chronische Gelenkentzündungen, Nierenfunktionsstörungen/ Amyloidose, Myalgien oder andere) angegeben werden. Zudem wurden die Patienten gefragt, ob bei ihnen eine Operation zur Entfernung des Appendix vermiformis durchgeführt wurde. Zur Familienanamnese wurde erhoben, ob es weitere Verwandte gibt, die am Familiären Mittelmeerfieber erkrankt sind und ob es Familienmitglieder mit einer Nierenfunktionsstörung gibt oder gab.

Zuletzt sollten die Teilnehmer angeben, ob in den letzten 14 Tagen bei ihnen ein Infekt und / oder Fieber bestand.

Nachdem die Probanden den Fragebogen ausgefüllt hatten, wurde durch eine orientierende Untersuchung von Herz und Lunge ihr Allgemeinzustand kurz überprüft.

### **B. 3. Laborarbeit**

#### **B. 3.a. Standardprotokoll zur Probengewinnung**

##### ***B. 3.a.i. Blutentnahme***

Nachdem die Probanden aufgeklärt, befragt und untersucht waren und mögliche Fragen ihrerseits gestellt werden konnten, erfolgte die Blutentnahme. Nach gründlicher Desinfektion wurde mit dem BD-Vacutainer®-System eine venöse Blutentnahme, für gewöhnlich in der Ellenbeuge, durchgeführt. Es wurden bei jedem Probanden drei Plasmaröhrchen mit Li-Heparin, ein EDTA-Röhrchen, ein Serum-Röhrchen und ein Röhrchen zur Bestimmung der Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit (BSG) abgenommen. Insgesamt wurden maximal 30 ml Blut gewonnen.

Im SPZ wurde innerhalb weniger Stunden die BSG gemessen. Die übrigen Probenröhrchen wurden unverzüglich für die Weiterverarbeitung ins Labor transportiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Röhrchen in etwa bei Körpertemperatur gehalten wurden. Die Zeit bis zum nächsten Bearbeitungsschritt im Labor betrug maximal eine Stunde.

##### ***B. 3.a.ii. Zellaufreinigung und Zellzählung***

Um die Aktivität der Neutrophilen Granulozyten genauer untersuchen zu können, mussten diese zunächst aus dem Vollblut isoliert werden. Dazu wurden die Blutzellen mit einer Zweidichtegradientenzentrifugation voneinander getrennt.

Die Trennung der Blutzellen und ihre Aufreinigung und Stimulation erfolgten unter sterilen Arbeitsbedingungen. Daher wurden während der Experimente Einmalhandschuhe getragen und unter der sterilen Werkbank gearbeitet. Diese wurde zwischen den Arbeitsschritten mit Desinfektionslösung gereinigt.

Von jedem Probanden wurden wie oben beschrieben drei Plasmaröhrchen mit Lithium-Heparin von jeweils etwa 7,5 ml venösem Blut entnommen. Die insgesamt etwa 22,5 ml Blut wurden innerhalb einer Stunde nach Blutentnahme in einen 50 ml Falcon Tube gegeben und im Verhältnis 1:1 mit PBS verdünnt.

Zur Zelltrennung wurden für jeden Probanden acht 15ml-Falcon-Tubes mit Percoll vorbereitet. In jedes Röhrchen wurden 3 ml 55 % Percoll pipettiert. Mit einer 0,8 mm x 120 mm Kanüle und einer

10 ml Spritze wurden dann jeweils 3 ml 74 % Percoll unterschichtet, sodass sich zwei Phasen ergaben. Als dritte Phase wurde dann das verdünnte Blut vorsichtig mit einer 3ml-Transferpipette überschichtet. Die ca. 45 ml des verdünnten Blutes wurden gleichmäßig auf die acht Röhrchen verteilt (Abbildung 1a).

Die so vorbereiteten Proben wurden dann bei 560 g und Raumtemperatur 20 Minuten zentrifugiert. Die Bremse wurde dabei ausgeschaltet, sodass sich eine komplette Zentrifugationsdauer von ca. 40 Minuten ergab.

Durch diese Dichtegradientenzentrifugation konnte das Blut in drei zelluläre Teile getrennt werden, die sich in zwei Ringen und einem Pellet im Röhrchen verteilten. Der oberste Zellring, der dem gesamten Inhalt auflag, bestand aus den peripheren mononukleären Zellen (PBMCs), also den Lymphozyten, Natürlichen-Killer-Zellen (NK-Zellen), Dendritischen Zellen und Monozyten. Den zweiten Ring bildeten die neutrophilen Granulozyten. Unten im Röhrchen bildeten die komplett sedimentierten Erythrozyten ein Pellet (Abbildung 1b).

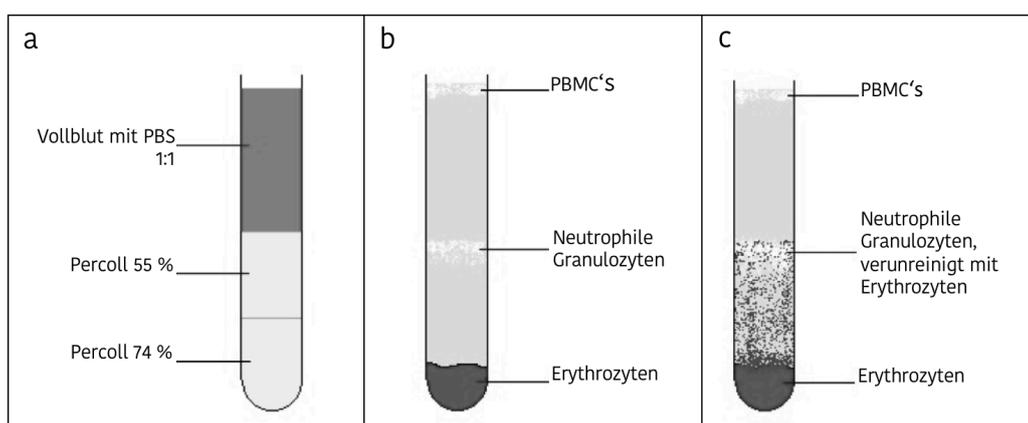


Abbildung 1. Trennung der Blutprobe durch Dichtegradientenzentrifugation. a) Aufsichtung der Medien vor Zentrifugation. b) Gelungene Trennung ohne Verunreinigungen. c) Ergebnis der Zelltrennung bei Verunreinigung der Neutrophilen mit Erythrozyten.

Die Trennungen waren meist von guter bis sehr guter Qualität. Das heißt, im Granulozytenring befanden sich keine Erythrozyten. Falls dies der Fall war (Abbildung 1c), musste abgewägt werden, ob für die Messung am Durchflusszytometer eine Erythrozytenlyse durchgeführt werden sollte.

Der Granulozytenring wurde vorsichtig mit einer Transferpipette abgenommen, wobei darauf zu achten war, dass beim Pipettieren keine PBMC's mit aufgenommen wurden. Die Granulozyten wurden dann in einen 50 ml Falcon Tube gegeben, welcher mit PBS aufgefüllt wurde. Nun wurden die Zellen zur Waschung bei 560 g und Raumtemperatur 10 Minuten mit Bremse zentrifugiert. Nach der ersten Waschung wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet mit PBS resuspendiert.

Die zweite Waschung erfolgte analog zur ersten. Nachdem auch hier die Flüssigkeit abgesaugt worden war, wurde das Pellet in 1 ml RPMI (5 % FCS) aufgenommen.

50 µl Zellsuspension wurden mit weiteren 200 µl RPMI verdünnt (Verhältnis 1:5). Aus diesen 250 µl Zellsuspension wurde dann am Sysmex® Zählautomaten die Anzahl der Granulozyten pro Milliliter bestimmt. Zudem wurde die Reinheit ermittelt, die bei der Trennung der Granulozyten erreicht wurde.

Nach der Ermittlung der Zellzahl wurde durch Zugabe der entsprechenden Menge RPMI für die gesamte Zellsuspension eine Konzentration von 5 Mio. Zellen pro Milliliter eingestellt.

Am Sysmex® Zählautomaten wurde außerdem ein Blutbild aus dem abgenommenen EDTA-Röhrchen erstellt, in welchem die Anteile der Zellfraktionen (Monozyten, Neutrophile, Eosinophile, Basophile Granulozyten) gemessen wurden. Hierdurch war es möglich einzuschätzen, wie die Ausbeute der Trennung war, also ob die Zahl der gereinigten Granulozyten mit der allgemeinen Anzahl der Granulozyten im Vollblut korrelierte. Dieser Schritt diente als Kontrolle der Qualität der Zelltrennung und -aufreinigung.

### ***B. 3.a.iii. Stimulation***

Folgende Proben wurden aus der Zellsuspension abgenommen:

1. Für die erste Messung am Durchflusszytometer wurden je 50 µl Zellen in zwei Polystyren-FACS-Röhrchen pipettiert. Ein Röhrchen diente für eine Isotypkontrolle, ein zweites zur Messung der Oberflächenmarker CD11b, CD62L und CD64. Dieser Ansatz wurde „unstimuliert vor Stimulation“ genannt und diente dazu, die Veränderung der Oberflächenmarker während der fünfstündigen Stimulation zu beobachten.

Für alle weiteren Stimulationsansätze wurden je 1000 µl in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße pipettiert (siehe auch Tabelle 2):

2. Im Ansatz „unstimuliert“ wurde die Zellsuspension ohne weitere Zusätze für eine Dauer von fünf Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.
3. Im Ansatz „LPS + ATP“ wurden die Zellen nach einer Stunde im Inkubator mit LPS und eine halbe Stunde vor der Ernte nach insgesamt 4,5 Stunden mit ATP stimuliert.
4. Im Ansatz „Colchizin“ wurden die Zellen 5 Stunden mit Colchizin stimuliert.
5. Im Ansatz „Colchizin + LPS + ATP“ wurden die Zellen wie in Ansatz „LPS + ATP“ mit LPS und ATP stimuliert, jedoch initial mit Colchizin vorstimuliert.
6. Für die Bestimmung der Messparameter über die Stimulationszeit wurden 5 weitere Eppendorf-Gefäße mit unstimulierten Zellen angesetzt. Diese verblieben eine halbe, eine, zwei, drei und vier Stunden im Inkubator, bevor sie zur Messung weiterverarbeitet wurden.

Es wurden insgesamt also pro Proband 9 Eppendorf-Gefäße mit jeweils 1000 µl Zellsuspension in einer Konzentration von 5 Millionen Zellen pro Milliliter angesetzt. Die Endkonzentrationen der verschiedenen Stimulanzien in 1000 µl Zellsuspension betragen 10 ng/ml LPS, 1mM ATP und 5 µg/ml Colchizin.

Die Ansätze wurden insgesamt maximal 5 Stunden bei 37°C mit 5% CO<sub>2</sub> im Inkubator belassen. Bei jeder Zugabe einer Stimulanz wurde durch sanftes Pipettieren darauf geachtet, dass die Zellen sich nicht am Boden des Röhrchens ablagerten. Tabelle 2 zeigt den zeitlichen Ablauf.

		Beginn	0,5 h	1 h	2 h	3 h	4 h	4,5 h	5 h
Stimulations-Ansätze	unstimuliert								Ernte
	LPS + ATP			LPS				ATP	
	Colchizin	Colchizin							
	Colchizin + LPS + ATP	Colchizin		LPS				ATP	
Kinetik-Ansätze (unstimuliert)	½ Std.		Ernte						
	1 Std.			Ernte					
	2 Std.				Ernte				
	3 Std.					Ernte			
	4 Std.						Ernte		

Tabelle 2. Stimulations- und Ernteschema.

### ***B. 3.a.iv. Vorbereitungen zur Messung***

Nach der Ernte des jeweiligen Ansatzes wurden die Proben sowohl für die Messung am Durchflusszytometer vorbereitet als auch für die Asservierung von Überstand und Zellpellet weiter verarbeitet. Ab diesem Zeitpunkt wurde nur noch mit gestopften Pipettenspitzen gearbeitet, um die Wahrscheinlichkeit für Verunreinigungen noch weiter zu reduzieren.

#### ***B. 3.a.iv.1. Vorbereitung zur Messung am Durchflusszytometer***

Für die Durchflusszytometrie wurden von jedem Ansatz, wie auch schon vor der Stimulation, zweimal 50 µl Zellsuspension in FACS-Röhrchen aus Polystyren pipettiert. Zusätzlich zum Isotypen-Panel und zum Panel zur Messung der Oberflächenmarker wurde für die Ansätze „unstimuliert“, „Colchizin“ und „Colchizin + LPS + ATP“ eine Annexin-Messung durchgeführt. Für diese wurden in ein zusätzliches FACS-Röhrchen 25 µl Zellsuspension pro Probe gegeben. Nach Abnahme der entsprechenden Menge Zellsuspension wurden die Proben mit fluorchromgekoppelten Antikörpern gefärbt. Für die Färbung der Oberflächenmarker CD11b, CD16, CD45, CD62L und CD64 sowie deren Isotypen mussten als erstes die Antikörpermischungen hergestellt werden. Tabelle 3 zeigt, welcher Antikörper mit welchem Fluorchrom konjugiert war und wie sich die Antikörper-Mischung pro Röhrchen zusammensetzte.

Fluorchrom	FITC	PE	PE-Cy5	PC7	APC	PBS (Medium)	Antikörper- Mischung
Panel 1 – Isotypen	mIgG1-Iso 5 µl	mIgG1-Iso 5 µl	CD45 3 µl	CD16 0,5 µl	IgG1-Iso 1 µl	5,5 µl	20 µl / Röhrchen
Panel 2 – Antigene	CD62L 10 µl	CD64 10 µl	CD45 3 µl	CD16 0,5 µl	CD11b 2,5 µl	4 µl	30 µl / Röhrchen

Tabelle 3. Zusammensetzung der Antikörpermischungen und Fluorochrome für die Färbung der Antigene und der Isotypen.

Jeweils 50 µl – entsprechend 250 000 Zellen – der zu färbenden Proben mussten nun zunächst in 1 ml kaltem PBS durch Zentrifugation bei 390 g zehn Minuten gewaschen werden. Danach wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen wurden wieder in 100 µl kaltes PBS aufgenommen. Dazu wurde die vorbereitete Antikörpermischung gegeben. Die Probe wurde resuspendiert, bevor sie 20 Minuten im Dunklen auf Eis inkubiert wurde. Nach der Inkubation wurde die Waschung in kaltem PBS wiederholt und wiederum der Überstand abgesaugt. Zum Schluss mussten 200 µl PBS, für die Durchflusszytometrie versetzt mit 2 % Fetalem Kälberserum und 0,1 % Natriumazid, zugegeben werden.

Da für die Vitalitätsbestimmung im Durchflusszytometer das FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I der Firma BD verwendet wurde, erfolgte die Färbung hier nach Anweisung des Herstellers auf leicht modifizierte Weise. Diese wird im Abschnitt „B. 3.d.ii. Annexin-Färbung und Messung im Durchflusszytometer“ erläutert.

#### *B. 3.a.iv.2. Vorbereitung und Asservierung für ELISAs*

Nach Abnahme der Zellen für die Durchflusszytometrie wurden die Proben in den Eppendorf-Gefäßen in einer Mikrozentrifuge für Eppendorf-Gefäße bei 6150 g bei Raumtemperatur für 5 min behandelt. Bei allen Proben wurde der Überstand abpipettiert und in drei Aliquoten (für die Stimulationsansätze) bzw. im Ganzen (für die Kinetikansätze) jeweils in neuen Eppendorf-Gefäßen bei -80°C eingefroren, um diese später ELISA-Messungen zuzuführen.

#### *B. 3.a.iv.3. Asservierung für PCRs*

Das bei der Zentrifugation entstandene Zellpellet wurde nur bei den Stimulationsansätzen („unstimuliert“, „LPS + ATP“, „Colchizin“, „Colchizin + LPS + ATP“) für die PCR weiterverarbeitet. Für die Kinetik-Ansätze wurde das Pellet verworfen. Die Pellets der Stimulationsansätze wurden mit dem Lysepuffer RA1 der Firma Machery Nagel behandelt. Jedem Pellet wurden 350 µl Lysepuffer, der die Zellen zerstört, und 3,5 µl 2-Mercaptoethanol, zur Inaktivierung von RNasen, zugeführt. Die Lysate wurden für die PCR bei -80°C eingefroren.

### **B. 3.a.v. Zusammenfassung über die gewonnenen Proben**

Am Ende der Probenaufbereitung standen folgende Proben zur Untersuchung bereit:

1. Zellsuspension zur Messung von CD11b, CD62L, CD64 per Durchflusszytometrie:
  - a. Probe, die direkt nach Aufbereitung gemessen wurde („unstimuliert vor Stimulation“)
  - b. Unstimulierte Probe
  - c. 3 Stimulationsansätze (LPS + ATP, Colchizin, Colchizin + LPS + ATP)
  - d. Unstimulierte Proben im Zeitverlauf (Kinetik)
2. Zellsuspension zur Messung von Apoptose und Nekrose per Durchflusszytometrie (Annexinfärbung):
  - a. Unstimulierte Probe
  - b. 2 Stimulationsansätze (Colchizin, Colchizin + LPS + ATP)
3. Zellüberstände zur Messung von S100A12, IL18, Caspase-1 per ELISA
  - a. Unstimulierte Probe
  - b. 3 Stimulationsansätze (LPS + ATP, Colchizin, Colchizin + LPS + ATP)
  - c. Unstimulierte Proben im Zeitverlauf (Kinetik)
4. Serum zur Messung von S100A12, IL18, Caspase-1 per ELISA
5. Serum zur Messung von CrP
6. Vollblut zur Messung der Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit
7. Asservierte Zellpellets zur Messung per PCR
  - a. Unstimulierte Probe
  - b. 3 Stimulationsansätze (LPS + ATP, Colchizin, Colchizin + LPS + ATP)

### **B. 3.b. Messungen am Durchflusszytometer**

Die stimulierten und unstimulierten Zellproben wurden im Anschluss an einem Durchflusszytometer untersucht und so die Oberflächenmarker CD11b, CD62L und CD64 quantitativ bestimmt. Außerdem wurde die Vitalität der Zellen durch die Annexin-Färbung ermittelt. Für diese Messungen sind sowohl am Gerät FACSCanto als auch durch die FACSDiva-Software einige Voreinstellungen einzurichten.

Das Ziel der Durchflusszytometrie ist es, Informationen über Zellpopulationen und über physische und chemische Unterschiede zwischen ihnen zu gewinnen. Dazu werden durch Zugabe von Fluoreszenzfarbstoffen optische Merkmale der Zellen betrachtet und so Zellformen und -Funktionen bestimmt. Lichtpulse werden in elektrische Signale übertragen und elektronisch ausgewertet.<sup>[122]</sup>

Die Interaktion des ausgesendeten Lichtpulses mit der Zelle lässt dabei folgende einfache Schlussfolgerungen zu. Die Menge des Lichtes, dessen Streuung kleine Winkel von  $0,5^\circ$ - $5^\circ$  aufweist, gibt Aufschluss über die Größe der Zelle. Dieses Streulicht nennt man Vorwärtsstreulicht oder englisch Forward Light Scatter (FSC). Die Menge des Lichtes, dessen Streuung größere Winkel aufweist ( $5^\circ$ - $150^\circ$ ), lässt Aussagen über die Granularität der Zelle zu und wird Seitwärtsstreulicht (englisch Side Scatter, SSC) genannt. Und schließlich ist die Emission der Fluoreszenz proportional zur Menge des fluoreszierenden Materials auf oder in der Zelle. Die Extinktion, also die gesamte Abschwächung der Strahlung, ergibt sich aus der Absorption und der Streuung durch die Zelle.<sup>[122]</sup>

In einem Durchflusszytometer strömt die Probe in hohem Tempo durch eine Mikroküvette aus Quarz, deren Kanal so schmal ist, dass jede Zelle einzeln an einem Laserstrahl vorbei geleitet wird. Dabei verursacht sie sowohl eine Streuung des Lichts in unterschiedlichen Winkeln als auch ein Fluoreszenzsignal, je nach gebundenen farbstoffgekoppelten Antikörpern. Diese Effekte werden durch einen Detektor gemessen und die Ergebnisse durch eine spezielle Software grafisch am Rechner dargestellt und ausgewertet.

Der verwendete Durchflusszytometer FACSCanto II der Firma BD sendet Lichtpulse aus zwei verschiedenen Lasern: einem blauen Laser mit der Wellenlänge 488 nm und einem roten Laser mit der Wellenlänge 633 nm. Durch verschiedene Linsen- und Filtersysteme können so bis zu sechs Farben detektiert werden.<sup>[123]</sup> Im vorliegenden Versuchsprotokoll war es ausreichend, fünf Farbstoffe zu messen. Die gewählten Kanäle sind in Tabelle 4 dargestellt.

Laser – Farbe – Wellenlänge der Exzitation	Fluorchrom	Gekoppelter Antikörper	Emissionsmaxima und Sichtbarkeit	Detektionskanal
L1 – blau – 488 nm	FITC	CD62L	525 nm – grün	1 – FITC
	PE	CD64	575 nm – gelb	2 – PE
	PE-Cy5.5	CD45	695 nm – dunkelrot	3 – PE/PerCP-Cy5.5
	PC7	CD16	785 nm – infrarot	4 – PE-Cy7
L2 – rot – 633 nm	APC	CD11b	660 nm – rot	5 – APC

Tabelle 4. Verwendete Farbstoffe und Detektionskanäle.

Da die einzelnen Fluoreszenzfarbstoffe zwar ihre Emissionsmaxima jeweils bei einer bestimmten Wellenlänge haben, jedoch auch in andere Wellenlängen, also in ein Farbspektrum, ausstrahlen, verursacht das Signal eines Farbstoffes auch in den anderen Detektoren entsprechende Impulse. Um zu vermeiden, dass diese Impulse als falsch positive Ereignisse in die Zählung der Zellen eingehen, muss am Durchflusszytometer ermittelt werden, wie stark ein gewählter Farbstoff in einen anderen Kanal streut. Danach kann das Ergebnis dann rechnerisch korrigiert werden. Diesen Arbeitsschritt nennt man Kompensation. Die Kompensation wird durch die FACSDiva-Software

automatisch bei der Einrichtung des Versuchs durchgeführt und wurde dann manuell weiter verfeinert.

Bevor die Frage geklärt werden konnte, mit welcher Quantität die neutrophilen Granulozyten der Probanden die Oberflächenmarker CD11b, CD62L und CD64 exprimierten, musste nach der Einrichtung des Versuchs die entsprechende Zellpopulation identifiziert und eingegrenzt werden. Diesen Vorgang nennt man in der Durchflusszytometrie „Gaten“. Man bedient sich hierzu der Prinzipien der Streuung und Absorption, um Zellgrößen und Granularität zu unterscheiden. Zur Identifikation der neutrophilen Granulozyten wurden deshalb nicht nur die oben genannten Proteine durch Fluoreszenzfarbstoffe gefärbt, sondern auch CD45 und CD16. Dabei ist CD45 ein allgemeiner Leukozyten-Marker und CD16 wird verwendet, um neutrophile Granulozyten zu detektieren.<sup>[124]</sup> Wie beim Gaten vorgegangen wurde, zeigt auch Abbildung 7 in Kapitel „C.4. Ergebnisse der Durchflusszytometrie“.

Um die Einstellungen nicht vor jedem Messvorgang vornehmen zu müssen und da sich die Proben hinsichtlich der enthaltenen Zellarten nicht unterscheiden, konnten das Gaten und die Kompensation in einer Sitzung vor den eigentlichen Messungen geschehen und die Vorlagen gespeichert und wiederverwendet werden. Lediglich die genaue Anpassung musste dann noch erfolgen.

Die FACSDiva-Software stellt die Messungen in unterschiedlichen Formen dar. Zum einen gibt es den so genannten Dotplot – ein zweiparametrisches Streudiagramm, welches pro detektiertem Ereignis einen Punkt im Diagramm verzeichnet. Diese Darstellung wird beim Gaten verwendet. Zudem können auch Histogramme erstellt werden, die eine einparametrische Darstellung der zu messenden Eigenschaft gegen die Anzahl der Ereignisse aufzeichnen. Hierbei wird auf der horizontalen Achse die Intensität des gemessenen Signals, zumeist in logarithmischer Skalierung, aufgetragen und auf der vertikalen Achse die Anzahl der mit der bestimmten Intensität gemessenen Ereignisse. Diese Form der Ergebnisdarstellung wurde für die Auswertung der gemessenen Oberflächenmarker auf den Neutrophilen verwendet. Durch diese Betrachtungsweise konnte auch erkannt werden, wenn in einer Probe verschiedene Populationen vorhanden waren, die das zu messende Protein verschieden intensiv exprimierten. Ein Beispiel für ein Histogramm mit zwei Populationen findet sich in Abbildung 2.

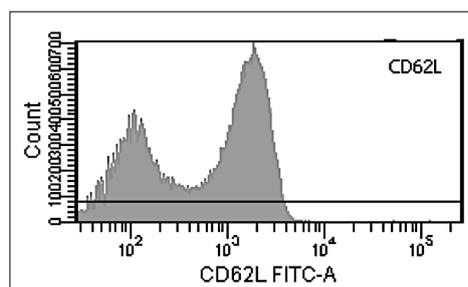


Abbildung 2. Beispiel für ein Histogramm mit zwei Populationen. Es zeigt das Ergebnis der Messung von CD62L im Kanal FITC-A. Eine kleinere Population hat eine mittlere Fluoreszenzintensität von etwa 100 RFU und eine zweite größere Population von etwa 1100 RFU.

Ein weiterer Schritt, der zur genauen quantitativen Bestimmung der Oberflächenmarker notwendig ist, ist bei der Durchflusszytometrie die Messung von Isotypen in der gleichen Probe. Dazu werden alle verwendeten Farbstoffe mit einem Antikörper gekoppelt, der in der Probe in keinem Fall zu erwarten ist, also nicht an ein Antigen binden sollte. Die nun dennoch gemessene Fluoreszenz durch unspezifisch gebundene Antikörper und auch Eigenfluoreszenz der Zellen stellt gewissermaßen einen Leerwert dar, durch dessen Berücksichtigung falsch positive Messungen vermieden werden. Nach jeder Messung von Isotypen wurde der Bereich der zu messenden Ereignisse in der gefärbten Probe so eingegrenzt, dass nur 1 % der in der Isotypen-Probe gemessenen Ereignisse darin lagen. So konnte ausgeschlossen werden, dass die unspezifische Fluoreszenz das Messergebnis verfälscht. Abbildung 7 im Kapitel „C.4. Ergebnisse der Durchflusszytometrie“ gibt auch über dieses Vorgehen Aufschluss.

### B. 3.c. Enzyme-linked Immunosorbent Assay – ELISAs

In den Überständen der Stimulationsansätze sowie der Kinetik-Proben wurde die Menge der Moleküle IL-18, S100A12 und Caspase-1 per ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) bestimmt. Damit kann eine Aussage über die Sekretion dieser Moleküle aus den neutrophilen Granulozyten getroffen werden.

Für die Messungen wurden spezielle Kits zur Bestimmung der einzelnen Moleküle genutzt. Es wurde nach Firmenprotokoll gehandelt.

Alle drei Assays nutzten das Prinzip des Sandwich-ELISA. Dabei wird eine Mikroplatte mit 96 Wells mit spezifischen monoklonalen Antikörpern für das entsprechend zu detektierende Molekül vorinkubiert. Hierauf wird die zu messende Probe, beziehungsweise eine Standardreihe, pipettiert. Die vorhandenen Antigene binden an die Antikörper auf der Platte. Nicht gebundene Substanzen werden abgewaschen. Dann wird ein zweiter spezifischer Antikörper hinzugegeben. Dieser ist jeweils mit dem Reporter-Enzym Meerrettich-Peroxidase (engl. Horseradish Peroxidase, HRP) konjugiert. Bei Zugabe der Substratlösung (Wasserstoffperoxid-Tetramethylbenzidin) oxidiert die

HRP das Wasserstoffperoxid zu Wasser und freien Protonen. Diese verändern das Chromogen so, dass sich zunächst ein blaues Produkt bildet. Bei Zugabe einer Säure zum Stoppen der Reaktion entsteht zuletzt ein stabiles gelbes Endprodukt.

Die Absorption wird von einem Fotodetektor gemessen. Dabei verhält sich die Absorption proportional zu der Konzentration des detektierten Antigens. Durch Erstellen einer Verdünnungsreihe mit vordefinierten Proteinkonzentrationen können die gemessenen Proben quantitativ eingeordnet werden.

Der Assay zur Messung der Caspase-1 nutzte zudem zur Signalverstärkung einen sekundären Antikörper (Anti-rabbit-IgG). Statt eines monoklonalen Antikörpers wird hier im zweiten Schritt zunächst ein polyklonaler Antikörper ohne gekoppeltes Enzym auf das Antigen gegeben. Erst dann gibt man den Enzym-gekoppelten monoklonalen Antikörper hinzu. Dieser richtet sich gegen den zweiten Antikörper. Der Vorteil dieses zusätzlichen Schritts besteht in einer Signalverstärkung, da der polyklonale Antikörper an mehreren Epitopen des Antigens binden kann.

### ***B. 3.c.i. Durchführung des Human IL-18 ELISA Kits***

Im ersten Schritt wurden die verschiedenen Reagenzien vorbereitet. Ein Waschpuffer lag dem Kit in konzentrierter Form bei und musste im Verhältnis 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt werden. Der enzymgekoppelte IL-18-Antikörper (Konjugat) musste mit der Konjugatverdünnung gemischt werden. Dabei war ein Verhältnis von 1:100 einzuhalten. Auf 110 µl Konjugat wurden 11 ml Verdünnung gegeben. Schließlich musste zur Vorbereitung eine Standardreihe angefertigt werden. In diesem Kit lag IL-18 in konzentrierter Form vor und musste mit der beigelegten Lösung verdünnt werden. Der fertige Master Standard hatte eine Konzentration von 2500 pg/ml. Die Standardreihe ist in Tabelle 5 aufgezeigt.

	Standard Volumen	Verdünnungsmittel	Konzentration
Standard 1	200 µl des Master Standards (2500pg/ml)	300 µl	1000 pg/ml
Standard 2	200 µl von Standard 1 (1000 pg/ml)	300 µl	400 pg/ml
Standard 3	200 µl von Standard 2 (400 pg/ml)	300 µl	160 pg/ml
Standard 4	200 µl von Standard 3 (160 pg/ml)	300 µl	64 pg/ml
Standard 5	200 µl von Standard 4 (64 pg/ml)	300 µl	25,6 pg/ml
Leer	-	300 µl	0 pg/ml

Tabelle 5. Standardreihe für das Human IL-18 ELISA Kit.

Die Proben wurden vor der Behandlung entsprechend Herstellervorgabe mit Verdünnungspuffer verdünnt. Die Serumproben wurden im Verhältnis 1:10, die Kulturüberstände im Verhältnis 1:2 verdünnt.

Das Kit beinhaltete bereits mit Antikörper beschichtete Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen (12 Reihen mit je 8 Vertiefungen). In die erste Reihe wurde die Standardreihe inklusive Leerprobe zu

je 100 µl pipettiert. In jede Vertiefung kamen 100 µl Probe beziehungsweise die Proteinstandards. Dann wurde bei Raumtemperatur für 60 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Platte viermal mit der im Kit enthaltenen Waschlösung gewaschen. Danach wurden 100 µl der vorbereiteten Konjugatlösung zupipettiert, wieder für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und abschließend viermal gewaschen. Nach Abnahme des Waschpuffers wurden zum Start der Farbreaktion 100 µl der Substratlösung aus dem Chromogen Tetramethylbenzidin sowie 100 µl Wasserstoffperoxid zugegeben. Die Reaktion lief für 30 Minuten bei Raumtemperatur, bevor sie durch Zugabe von 100 µl der Stopplösung abgebrochen wurde. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Absorption am Photometer bei dualer Wellenlänge von 450/540 nm mit automatischer Wellenlängenkorrektur.

### ***B. 3.c.ii. Durchführung des CircuLex S100A12/EN-RAGE ELISA Kits***

Als erstes mussten auch beim CircuLex S100A12/EN-RAGE ELISA Kit verschiedene Reagenzien vorbereitet werden. So musste das im Kit gelieferte Waschpuffer-Konzentrat im Verhältnis von 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt werden. Ebenso musste der HRP-gekoppelte Antikörper 20mal mit einem mitgelieferten Dilutionpuffer verdünnt werden. Schließlich musste zur Vorbereitung auch hier die Standardreihe hergestellt werden. Dazu wurde das gefriergetrocknete S100A12 in 2 ml destilliertem Wasser gelöst und dieser Master Standard dann in einer Verdünnungsreihe mit dem Dilutionpuffer angesetzt (Tabelle 6).

	Standard Volumen	Dilutionpuffer	Konzentration
Standard 1	10 µl des Master Standards (340 ng/ml)	670 µl	5000 pg/ml
Standard 2	300 µl von Standard 1 (5000 pg/ml)	300 µl	2500 pg/ml
Standard 3	300 µl von Standard 2 (2500 pg/ml)	300 µl	1250 pg/ml
Standard 4	300 µl von Standard 3 (1250 pg/ml)	300 µl	625 pg/ml
Standard 5	300 µl von Standard 4 (625 pg/ml)	300 µl	313 pg/ml
Standard 6	300 µl von Standard 5 (313 pg/ml)	300 µl	156 pg/ml
Standard 7	300 µl von Standard 6 (156 pg/ml)	300 µl	78 pg/ml
Leer	-	300 µl	0 pg/ml

Tabelle 6. Verdünnungsreihe für die ELISA von S100A12.

Die Proben mussten ebenfalls verdünnt werden. Es wurde für die Überstände eine Verdünnung von 1:1000 und für die Seren von 1:2000 gewählt.

In jede der 96 Vertiefungen der mit monoklonalem Antikörper vorbeschichteten Mikrotiterplatte wurden 100 µl der Proben beziehungsweise Standardreihe pipettiert. Jede Probe wurde doppelt pipettiert.

Die Platte wurde dann eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Orbital-Schüttler mit 300 rpm inkubiert. Danach folgte eine viermalige Waschung mit 350 µl des mitgelieferten Waschpuffers

pro Vertiefung. Nach Abnahme des Waschpuffers wurden je 100 µl des Enzym-konjugierten Antikörpers zugegeben und die Platte nochmals bei Raumtemperatur eine Stunde auf einem Orbital-Schüttler inkubiert. Wieder folgte eine viermalige Waschung. Als nächstes wurden jeweils 100 µl der Substratlösung zugegeben und die Platte unter Abschirmung von Licht ca. 15 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Als letztes wurde die Reaktion durch Zugabe von je 100 µl der Stopplösung beendet. Innerhalb 30 Minuten nach Durchführung des Assays wurde die Absorption im Mikrotiterplatten-Photometer bei dualer Wellenlänge von 450/540 nm mit automatischer Wellenlängenkorrektur gemessen.

### ***B. 3.c.ii. Durchführung des Human Caspase-1/ICE Immunoassays***

Die Durchführung des Human Caspase-1/ICE Immunoassays war der der anderen beiden Assays sehr ähnlich.

Vor Beginn mussten auch hier Reagenzien gemäß Herstellervorgabe vorbereitet werden. Dazu wurden 20 ml des konzentrierten Waschpuffers mit 480 ml destilliertem Wasser zur gebrauchsfertigen Lösung aufgefüllt.

Dann wurde wieder die Standardreihe erstellt. Die im Kit enthaltene Caspase-1 lag als lyophilisiertes Pulver vor und musste durch Zugabe von destilliertem Wasser gelöst werden. Die Menge des Wassers war individuell auf dem Fläschchen angegeben. Die fertige Stocklösung hatte eine Konzentration von 4000 pg/ml. Dieser Master Standard wurde mit der mitgelieferten Kalibrierlösung RD5-5 wie in Tabelle 7 angegeben verdünnt.

	Standard Volumen	Kalibrierlösung	Konzentration
Standard 1	100 µl des Master Standards (4000 pg/ml)	900 µl	400 pg/ml
Standard 2	500 µl von Standard 1 (400 pg/ml)	500 µl	200 pg/ml
Standard 3	500 µl von Standard 2 (200 pg/ml)	500 µl	100 pg/ml
Standard 4	500 µl von Standard 3 (100 pg/ml)	500 µl	50 pg/ml
Standard 5	500 µl von Standard 4 (50 pg/ml)	500 µl	25 pg/ml
Standard 6	500 µl von Standard 5 (25 pg/ml)	500 µl	12,5 pg/ml
Standard 7	500 µl von Standard 6 (12,5 pg/ml)	500 µl	6,25 pg/ml
Leer	-	500 µl	0 pg/ml

Tabelle 7. Verdünnungsreihe für die ELISA von Caspase-1.

Sowohl die Proben der Kulturüberstände als auch die Seren wurden im Verhältnis von 1:2 verdünnt.

Auch dieser ELISA Kit enthielt eine mit, monoklonalen Antikörper gegen humane Caspase-1 vorbeschichtete 96-Well Mikrotiterplatte. Zunächst wurden in die entsprechenden Wells je 50 µl Pufferlösung „RDW1“ des Kits pipettiert, bevor darauf 100 µl Probe oder Standardlösung zugegeben wurden. Der Pipettiervorgang wurde nicht unterbrochen und fand möglichst schnell

innerhalb von 15 Minuten statt, um der sofort einsetzenden Caspase-1 Reaktion Rechnung zu tragen und die Vergleichbarkeit der Proben hinreichend sicher zu stellen. Anschließend wurde für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dieser Zeit folgten drei Wasch- und Trocknungsvorgänge mit jeweils 400 µl des Waschpuffers. Als nächstes wurden 100 µl Caspase-1 Antiserum (polyklonaler rabbit-Antikörper gegen humane Caspase-1) zupipettiert und erneut bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert. Auch hiernach wurde die Platte dreimal gewaschen und getrocknet. Dann wurden 100 µl des Enzym-gekoppelten Antikörpers aufgetragen und wiederum 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert sowie abschließend dreimal gewaschen. Die Substratlösung, bestehend aus Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid, zur Färbung der Proben wurde 15 Minuten vor Verwendung hergestellt. Durch Zugabe von 200 µl der Substratlösung wurde die Färbungsreaktion gestartet. Nach 20 Minuten Inkubation abgedunkelt bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch 50 µl Stopplösung pro Vertiefung beendet. Die Absorption wurde innerhalb der folgenden 30 Minuten am Photometer mit dualer Wellenlänge von 450/540 nm mit automatischer Wellenlängenkorrektur gemessen.

### **B. 3.d. Bestimmung der Zellvitalität**

Neben der Reinheit diene auch die Vitalität der Zellen als Gütekriterium für das Prozedere der Zelltrennung. Es wurden zwei Verfahren angewandt, um die Zellvitalität zu verschiedenen Zeitpunkten des Experiments zu bestimmen.

#### ***B. 3.d.i. Trypanblaufärbung zur Vitalitätsbestimmung***

Um die Vitalität der Granulozyten zum Zeitpunkt nach der Zelltrennung festzustellen, wurde eine Trypanblaufärbung durchgeführt. Dazu wurden 10 µl Zellsuspension (in einer Konzentration von 5 Mio. Zellen pro Milliliter) in 90 µl Trypanblau pipettiert. 10 µl dieser Mischung wurden auf eine Neubauer-Zählkammer gegeben und unter dem Mikroskop beurteilt. Das Trypanblau dringt in nekrotische Zellen ein, sodass diese unter dem Mikroskop blau erscheinen, im Unterschied zu vitalen Zellen, die sich transparent darstellen. Zudem kann man unter dem Mikroskop auch die Granularität, Form und Größe der Zellen beurteilen. Dieser Arbeitsschritt konnte somit auch Aufschluss darüber geben, in wie weit die Probe nach der Trennung noch mit Erythrozyten verunreinigt war.

Die Bestimmung der Zellvitalität mit der Trypanblaufärbung wurde direkt nach der Zelltrennung, also noch vor der Stimulation der Zellen, und auch direkt nach der Ernte der stimulierten Zellen durchgeführt.

### ***B. 3.d.ii. Annexin-Färbung und Messung im Durchflusszytometer***

Die Vitalität der Zellen wurde außerdem durch eine Messung von Annexin und Propidiumjodid im Durchflusszytometer bestimmt.

Beim programmierten Zelltod, der sogenannten Apoptose, wird das membranständige Phospholipid Phosphatidylserin aus dem Inneren der Zelle nach außen transloziert. Annexin V ist ein Kalzium-abhängiges Protein (35-36 kDa), das eine hohe Affinität zu Phosphatidylserin aufweist und somit an apoptotische Zellen bindet. Annexin V kann mit verschiedenen Fluorochromen, zum Beispiel mit FITC (Fluoresceinisothiocyanat), konjugiert werden.

Um bei nicht vitalen Zellen zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen zu unterscheiden, wird die Färbung mit FITC Annexin V häufig mit dem Farbstoff Propidiumjodid (PI) kombiniert. Die Membran toter oder zerstörter Zellen ist permeabel für diesen Farbstoff, der in deren DNA interkaliert und so rot färbt.

Somit kann bei der Kombination der beiden am Ende der Messung unterschieden werden zwischen vitalen Zellen (Annexin und PI negativ), apoptotischen Zellen (Annexin positiv, PI negativ) und Zellen, die sich in einer späten Phase der Apoptose oder in der Nekrose befinden (Annexin und PI positiv).

Für die Färbung der Proben mit Annexin und PI wurde das FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I der Firma BD angewandt, welches die beiden Farbstoffe sowie einen Bindepuffer enthält. Zunächst musste der Bindepuffer im Verhältnis 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt werden. 25 µl – entsprechend 125 000 Zellen – wurden in 1 ml kaltem PBS gewaschen, analog zur Färbung der Oberflächenmarker CD62L, CD64 und CD11b. Nach Absaugen des Überstands wurden die Zellen in 100 µl des Bindepuffers aufgenommen und jeweils 2,5 µl Annexin V und Propidiumjodid zugegeben. Der Ansatz wurde 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert. Danach wurden 400 µl des Bindepuffers zugegeben und innerhalb einer Stunde am Durchflusszytometer gemessen.

### **B. 3.e. Messung von CrP im Serum**

Das C-reaktive Protein (CrP) wird als Akute-Phase-Protein in der Leber gebildet und aktiviert das Komplementsystem. Ein erhöhtes CrP (> 5 mg/l) zeigt eine akute Entzündungsreaktion an. Das CrP der Probanden wurde aus dem Serum am Gerät cobas8000 mit dem Modul C701 der Firma Roche ermittelt.

### B. 3.f. Messung der Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit

Eine erhöhte Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit ist ein weiterer Indikator für eine eventuell stattfindende Entzündungsreaktion. Für deren Bestimmung wurde das Blut der Probanden in ein dafür bestimmtes Röhrchen entnommen. Diese Röhrchen enthalten gerinnungshemmendes Zitrat und sind in ihrer Länge genau auf das Gerät abgestimmt, an dem dann die Senkung pro Zeiteinheit abgelesen wird. Im Sozialpädiatrischen Zentrum wurde die Analyse von den dafür geschulten Schwestern durchgeführt. Für einige Probanden wurde die BSG manuell mithilfe des BD Seditainer Ständers abgelesen, für andere erfolgte die Messung automatisch am BD Sedi-40 Blutsenkungsgerät. Die Ergebnisse unterscheiden sich jedoch nicht in ihrer Qualität.

Die Angabe der BSG erfolgt in mm n.W. (nach Westergren). Die Angabe von Normalwerten schwankt je nach Autor. Nach G. Herold: Innere Medizin, 2016 betrachtet man nach einer Stunde bei Männern Werte bis 15 mm n.W., bei Frauen bis 20 mm n.W. als normal. Mit zunehmendem Alter steigt die BSG physiologischerweise leicht an.

### B. 4. Statistische Methoden

Für die statistische Auswertung der Messergebnisse sowie für die Darstellung in Graphen wurde das Programm Prism 6.0e und 7.0a für Mac OS X der Firma GraphPad verwendet.

Zur Prüfung der Signifikanz wurde bei Vergleichen zwischen den Probandengruppen der Mann-Whitney-U-Test angewandt. Bei Vergleichen verbundener Stichproben, also der Stimulationsansätze innerhalb einer Gruppe, kam der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test für gepaarte Stichproben zur Anwendung.

Zur Bewertung des errechneten p-Wertes wurde die in Tabelle 8 angegebene Formatierung verwendet:

p-Wert	In Worten	Darstellung
< 0,0001	Hoch signifikant	****
0,0001 bis unter 0,001		***
0,001 bis unter 0,01	Signifikant	**
0,01 bis unter 0,05		*
≥ 0,05	Nicht signifikant	ns

Tabelle 8. Bewertungsskala des Signifikanzniveaus

Auf eine Anpassung des p-Wertes an eine mögliche Kumulation des alpha-Fehlers, beispielsweise mittels Bonferroni-Korrektur, wurde aufgrund des explorativen Studiendesigns verzichtet.

## C. Ergebnisse

### C. 1. Probanden

Insgesamt nahmen 25 Personen an den Untersuchungen teil. Diese wurden zunächst in 4 Gruppen unterteilt: homozygote FMF-Patienten mit der Mutation M694V (n=5), kombiniert heterozygote FMF-Patienten (n=6), heterozygote Träger einer Mutation im *MEFV*-Gen – im folgenden „heterozygot Gesunde“ – (n=6), gesunde Kontrollen (n=7). Die beiden Gruppen mit den an FMF erkrankten Patienten wurden zur Auswertung der Ergebnisse zunächst zusammengezogen betrachtet. Ein Proband hatte einen heterozygoten Genotyp M694V, wobei er jedoch klinisch diagnostiziert an FMF litt. Dieser Patient wurde nicht in die Gruppen eingeteilt, dieser Einzelfall ist in Kapitel C.6. beschrieben. In allen anderen folgenden Kapiteln sind die Werte dieses Probanden nicht eingeschlossen.

Allen Probanden wurde vor der Blutentnahme ein Fragebogen ausgehändigt, der allgemeine und – für die Patienten – auch krankheitsspezifische Angaben erfasste. Dieser Fragebogen ergab die folgenden Ergebnisse, die auch in Tabelle 8 zusammengefasst sind.

#### C. 1.a. Alter, Geschlecht, Herkunft

Das mittlere Alter aller Probanden war 32,7 Jahre bei einer Spannweite von 15 bis 61 Jahren (Median 29,5 Jahre). Das mittlere Alter in den einzelnen Probandengruppen war 19,2 Jahre (Spannweite 15 bis 25 Jahre; Median 19 Jahre) bei den Homozygoten, 19,8 Jahre (Spannweite 15 bis 29 Jahre; Median 18,5 Jahre) bei den kombiniert Heterozygoten, 45,3 Jahre (Spannweite 40 bis 51 Jahre; Median 45,5 Jahre) bei den heterozygot Gesunden und 42,4 Jahre (Spannweite 27 bis 61 Jahre; Median 43 Jahre) bei den gesunden Kontrollen.

58 % der gesamten Probanden waren männlich. Bei den homozygoten FMF-Patienten betrug der Anteil männlicher Probanden 80 %, bei den kombiniert Heterozygoten waren es zwei Drittel. Die heterozygot Gesunden Teilnehmer waren zur Hälfte männlich und bei den Kontrollen betrug der Anteil der Männer 42,9 %.

Alle gesunden Kontrollen gaben als Herkunftsland der Familie „Deutschland“ an. Von allen Trägern einer oder mehrerer Mutationen im *MEFV*-Gen kamen 58,8 % ursprünglich aus der Türkei, 23,5 % aus Armenien, 11,8 % aus dem Iran und 6 % aus dem Libanon. In der Gruppe der homozygoten Patienten kamen 60 % aus der Türkei und 40 % aus Armenien. Bei den Patienten mit kombinierter Heterozygotie kam die Hälfte aus der Türkei, zwei Drittel aus dem Iran und einer von sechs aus dem Libanon. Die gesunden Träger einer Mutation kamen zu zwei Dritteln aus der Türkei und zu einem Drittel aus Armenien.

### C. 1.b. Anamnese

Die Patienten waren bei Krankheitsbeginn zwischen 2 und 12 Jahren alt. Die homozygoten Patienten hatten bei ihrem ersten Krankheitsschub mit FMF-Symptomatik im Mittel ein Alter von 5,2 Jahren (SD 2,49; Median 5 Jahre), die Patienten mit einer kombiniert heterozygoten Mutation waren im Mittel 6,8 Jahre alt (SD 2,79; Median 5,5 Jahre).

Bei Beginn der Therapie mit Colchizin waren alle Patienten zwischen 5 und 26 Jahren. Die Homozygoten Patienten waren im Mittel 8,6 Jahre (SD 3,58; Median 9 Jahre) bei Beginn der Medikation. Die kombiniert heterozygoten Patienten waren im Mittel 11,3 Jahre (SD 7,53; Median 9 Jahre), als sie auf Colchizin medikamentös eingestellt wurden.

Alle Patienten nahmen täglich Colchizin zur Behandlung des Familiären Mittelmeerfiebers. Die Dosis betrug 1 mg, 1,5 mg oder 2 mg täglich. Die Patienten mit homozygoter Mutation nahmen zu 60 % 1,5 mg täglich und zu jeweils 20 % 1 mg und 2 mg. Die kombiniert heterozygoten nahmen jeweils zur Hälfte 1 mg und 1,5 mg Colchizin pro Tag.

Keiner der Probanden nahm weitere Medikamente, die die Versuchsergebnisse, das Krankheitsbild oder den Krankheitsverlauf beeinflussen, ein.

Alle Patienten bis auf einen Homozygoten gaben an, unter der Colchizin-Therapie weniger als einen Schub pro Monat zu haben. Ein Homozygoter Patient gab an, unter 1-2 Schüben im Monat zu leiden, trotz Colchizin-Therapie.

Bei 45,5 % aller Patienten dauert ein Schub im Schnitt zwei Tage, bei 36,4 % ist der bereits nach einem Tag vorbei und 18,2 % der Befragten leiden drei Tage an den Symptomen. Dabei gaben drei der homozygoten Patienten eine Dauer von zwei Tagen und zwei Patienten eine kürzere Schubdauer von einem Tag an. Bei den kombiniert heterozygoten Patienten verteilten sich die Angaben zu je einem Drittel auf die Dauer von einem, zwei und drei Tagen. Zwei von fünf homozygoten Patienten (40 %) und drei von sechs (50 %) der kombiniert heterozygoten Patienten sind während eines Schubs bettlägerig.

Alle Patienten gaben an, während eines Schubs an Fieber zu leiden. Alle homozygoten Patienten und zwei Drittel der kombiniert heterozygoten Patienten leiden außerdem ihren Angaben zufolge an Bauchschmerzen, wenn sie einen Schub haben. Zwei der sechs kombiniert heterozygoten Patienten bemerken dann Brustschmerzen und jeweils zwei Patienten aus jeder Gruppe haben Gelenkentzündungen. In der Gruppe der Patienten mit homozygoter Mutation leidet ein Patient von fünf an mehr als zwei Symptomen während eines Schubs und in der Gruppe der kombiniert Heterozygoten betrifft das zwei von sechs Patienten.

Eine Patientin aus der Gruppe der kombiniert Heterozygoten gab an, abgesehen vom FMF noch an einer chronischen Vaskulitis zu leiden. Keiner der Patienten hat eine beeinträchtigte Nierenfunktion oder Amyloidose.

Insgesamt war in der Vergangenheit bei 21 % der Probanden eine Appendektomie durchgeführt worden. Dabei lag der Anteil bei den Patienten bei 20 % (Homozygote) beziehungsweise 33,3 % (kombiniert Heterozygote). Bei den Probanden, die nicht am Familiären Mittelmeerfieber leiden, waren 16,7 % (heterozygot Gesunde) bzw. 14,3 % (Kontrollen) appendektomiert worden.

	Patienten		Heterozygot Gesunde	Kontrollen
	Homozygote (M694V)	Kombiniert Heterozygote		
Anzahl (männlich/weiblich)	5 (4/1)	6 (4/2)	6 (3/3)	7 (3/4)
	11 (8/3)			
Alter in Jahren, Median (Spannweite)	19 (15-25)	18,5 (15-29)	45,5 (40-51)	43 (27-61)
	19 (15-29)			
Herkunft, Anzahl Probanden				
- Türkei	3	3	4	0
- Armenien	2	0	2	0
- Iran	0	2	0	0
- Libanon	0	1	0	0
- Deutschland	0	0	0	7
Alter bei Krankheitsbeginn in Jahren, Median (Spannweite)	5 (2-9)	5,5 (5-12)	–	–
	5 (2-12)			
Alter bei Therapiebeginn in Jahren, Median (Spannweite)	9 (5-13)	9 (6-26)	–	–
	9 (5-26)			
Colchizin-Dosis pro Tag				
- 1 mg	1	3	–	–
- 1,5 mg	3	3		
- 2 mg	1	0		
Schubdauer, Anzahl Probanden				
- 1 Tag	2	2	–	–
- 2 Tage	3	2		
- 3 Tage	0	2		
Bettlägerigkeit während eines Schubs, Anzahl Probanden	2	3	–	–
Appendektomie, Anzahl Probanden	1	2	1	1

Tabelle 9. Zusammenfassung der Probandendaten.

## C. 2. Probenqualität: Zelltrennung und Vitalität

### C. 2.a. Reinheit nach Zelltrennung

Um die Wahrscheinlichkeit ungenauer oder verfälschter Messergebnisse zu minimieren, wurde nach jeder Zelltrennung und Aufreinigung der Neutrophilen Granulozyten überprüft, wie rein die Probe war. Durchschnittlich wurde eine Reinheit von 90,9 % erreicht. Dabei setzte sich der restliche Anteil aus 5,7 % Lymphozyten, 2,6 % Eosinophilen Granulozyten und 0,6 % Monozyten zusammen. Die Reinheit der Neutrophilen Granulozyten und die Anteile der sonstigen Zellen unterschied sich unterhalb der Probandengruppen nicht statistisch signifikant. Die einzelnen Mittelwerte und Standardabweichungen der Gruppen sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

	Patienten (n=11)		Heterozygot Gesunde (n=6)		Kontrollen (n=7)	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD
Neutrophile	92,8	7,1	89,0	6,9	91,0	6,2
Lymphozyten	4,8	6,5	7,0	6,3	5,2	4,5
Monozyten	0,3	0,2	0,8	0,6	0,8	1,1
Eosinophile	2,0	1,0	2,9	1,7	2,8	2,3

Tabelle 10. Anteile der Zellpopulationen in den Proben nach Trennung und Aufreinigung des Vollblutes. Angaben in Prozent, Mittelwerte mit Standardabweichung.

### C. 2.b. Zellvitalität

#### C. 2.b.i. Mikroskopische Bestimmung mit Trypanblaufärbung

Bei der Mikroskopischen Untersuchung der Zellen vor der Stimulation und nach der Stimulation in den verschiedenen Ansätzen ergab sich insgesamt eine sehr hohe Vitalität in allen Probandengruppen. Sowohl beim Vergleich der Gruppen untereinander als auch beim Vergleich der verschiedenen Ansätze ergaben sich keine relevanten Unterschiede. Die Mittelwerte mit Standardabweichung sind für die Gruppen in Tabelle 11 gezeigt.

Ansatz	Patienten			Heterozygot Gesunde			Kontrollen		
	MW	SD	n	MW	SD	n	MW	SD	n
vor Stimulation	97,0	3,4	11	98,8	0,4	6	98,4	1,5	7
unstimuliert nach Stimulation	93,1	7,1	7	99,0	0,0	2	89,6	21,0	5
LPS +ATP	96,4	3,5	7	99,0	0,0	2	88,0	25,2	5
Colchizin	98,3	1,5	7	99,0	0,0	2	88,2	23,6	5
Colchizin + LPS + ATP	96,6	4,5	7	99,0	0,0	2	99,0	0,7	5

Tabelle 11. Anteil der durch Trypanblaufärbung bestimmten vitalen Zellen vor der Stimulation und in den jeweiligen Stimulationsansätzen nach 5 Stunden Inkubation. Mittelwert und Standardabweichung in Prozent, sowie Anzahl der untersuchten Proben.

### C. 2.b.ii. Bestimmung am Durchflusszytometer per Annexinfärbung

Auch die Annexinfärbung und die Untersuchung der Zellen am Durchflusszytometer ergab, dass die Proben zum größten Teil vitale Zellen enthielten (91,06 %, SD 3,52 im unstimulierten Ansatz; 94,5 %, SD 1,22 im Ansatz mit Colchizin; 93,82 %, SD 1,95 im Ansatz mit Colchizin + LPS + ATP). Die meisten der nicht-vitalen Zellen waren dabei in die Apoptose übergegangen (6,25 %, SD 1,72 im unstimulierten Ansatz; 4,79 %, SD 1,29 im Ansatz mit Colchizin; 4,71 %, SD 1,35 im Ansatz mit Colchizin + LPS + ATP). Nur sehr geringe Anteile waren durch Nekrose zerstört worden (0,28 %, SD 0,21 im unstimulierten Ansatz; 0,09 %, SD 0,04 im Ansatz mit Colchizin; 0,6 %, SD 0,5 im Ansatz mit Colchizin + LPS + ATP). Auch hier unterschieden sich weder die Probandengruppen noch die jeweiligen Ansätze statistisch signifikant voneinander. Die einzelnen Messwerte der Gruppen zeigt Tabelle 12.

	Patienten (n=11)		Heterozygot Gesunde (n=6)		Kontrollen (n=7)	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD
unstimuliert nach Stimulation						
Nekrose	0,4	0,4	0,1	0,1	0,1	0,1
späte Apoptose/Nekrose	4,0	4,6	0,6	0,5	0,6	0,2
Apoptose	5,6	5,1	5,2	6,4	8,4	5,9
Vital	90,0	9,6	94,1	6,8	90,9	5,9
Colchizin						
Nekrose	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
späte Apoptose/Nekrose	0,6	0,5	0,6	0,5	0,7	0,2
Apoptose	4,3	4,8	5,0	5,3	5,8	3,3
Vital	95,0	5,2	94,4	5,7	93,4	3,4
Colchizin + LPS + ATP						
Nekrose	0,3	0,7	0,6	0,9	1,3	2,8
späte Apoptose/Nekrose	0,6	0,5	1,0	1,4	1,1	0,5
Apoptose	4,2	4,9	4,7	6,4	6,0	4,9
Vital	94,9	5,1	93,7	7,8	91,5	4,9

Tabelle 12. Anteile der Zellen in den verschiedenen Vitalitätsstadien, gemessen in der unstimulierten Probe und in zwei verschiedenen Stimulationsansätzen nach 5 Stunden Inkubation. Angaben des Mittelwertes und der Standardabweichung in Prozent.

## C. 3. Entzündungsparameter im Serum

### C. 3.a. C-reaktives Protein

Bei den elf untersuchten FMF-Patienten lag das CrP siebenfach über dem Normwert von <5mg/l. In den beiden anderen Probandengruppen war dies jeweils einmal der Fall. Der Median des CrP der Patienten lag somit auch über 5 mg/l (5,9 mg/l, Spannweite 1-60,1 mg/l). Die heterozygot

gesunden Probanden hatten einen medianen CrP von 3,4 mg/l, welcher zwischen 0,8 bis 5,8 mg/l lag. Die gesunden Kontroll-Probanden lagen zwischen 0,3 bis 6 mg/l im Median bei 0,7 mg/l. Damit zeigt sich eine Abstufung zwischen den drei Gruppen, wobei der Unterschied zwischen den Patienten und den gesunden Kontrollen mit  $p=0,0040$  statistisch signifikant ist.

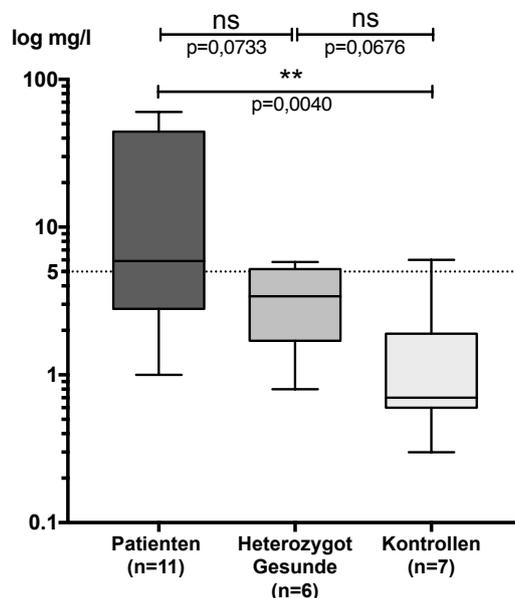


Abbildung 3. C-reaktives Protein im Serum. Kastendiagramm mit logarithmischer Skalierung. Median mit Interquartilsabstand, die Antennen zeigen die 5. und 95. Perzentile. Der Median liegt bei den Patienten über dem Normwert von 5 mg/l.

		Anzahl	Median		Spannweite	
Patienten	Homozygote	5	5,9	44,3	1-60,1	7,5-60,1
	Kombiniert Heterozygote	6		3,65		1-5,9
Heterozygot Gesunde		6	3,4		0,8-5,8	
Kontrollen		7	0,7		0,3-6	

Tabelle 13. CrP im Serum, Median und Spannweite in mg/l.

### C. 3.b. Interleukin-18

Bei der Messung des IL-18 im Serum zeichnet sich eine deutliche Abstufung zwischen den Probandengruppen ab. Während der Wert in der Gruppe der Patienten im Median bei 4054 pg/ml lag, war er schon bei den heterozygot Gesunden mit einer Signifikanz von  $p=0,0006$  deutlich niedriger (Median 441 pg/ml). Die Kontrollgruppe hatte mit 189 pg/ml im Median den niedrigsten IL-18-Serum-Wert. Alle Gruppenunterschiede waren untereinander signifikant, der Vergleich der Patientengruppe mit den Kontrollen ergab einen hochsignifikanten Unterschied mit  $p<0,0001$  (siehe Abbildung 4 sowie Tabelle 14).

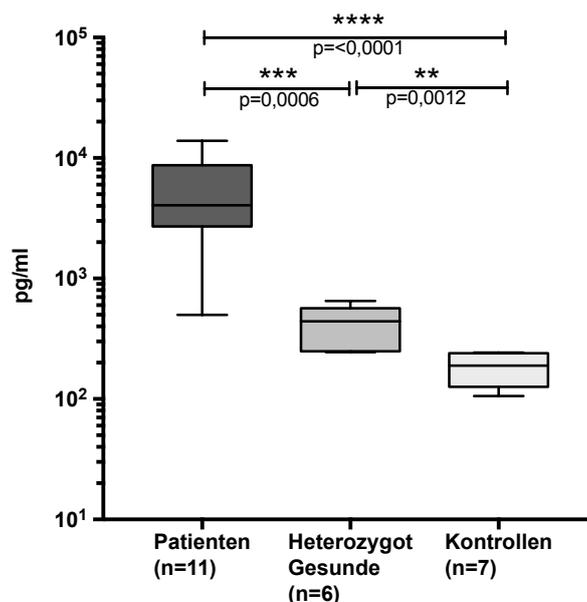


Abbildung 4. Interleukin-18 im Serum. Kastendiagramm mit logarithmischer Skala. Median mit Interquartilsabstand, die Antennen zeigen die 5. und 95. Perzentile.

		Anzahl	Median		Spannweite	
Patienten	Homozygote	5	4054	8709	499-13897	4054-13897
	Kombiniert Heterozygote	6		2757		499-7322
Heterozygot Gesunde		6	441		245-651	
Kontrollen		7	189		106-243	

Tabelle 14. Interleukin-18 im Serum, Median und Spannweite in pg/ml.

### C. 3.c. S100A12

Vor allem die Patienten zeigen beim S100A12 einen erhöhten Serum-Wert gegenüber den beiden anderen Probandengruppen. Mit fast 1700 ng/ml im Median unterschied sich das S100A12 im Serum der FMF-Patienten statistisch signifikant ( $p=0,0059$ ) von dem der gesunden Kontrollen und auch von dem der gesunden Probanden mit FMF-Mutation ( $p=0,0145$ ), bei denen der mediane Serumwert bei beiden Gruppen nicht einmal 500 ng/ml erreichte.

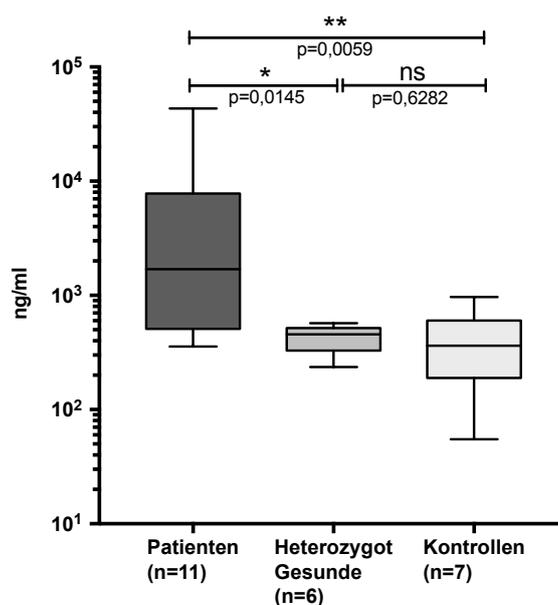


Abbildung 5. S100A12 im Serum. Kastendiagramm mit logarithmischer Skala. Median mit Interquartilsabstand, die Antennen zeigen die 5. und 95. Perzentile.

		Anzahl	Median		Spannweite	
Patienten	Homozygote	5	1690	5964	355-43154	1268-24782
	Kombiniert Heterozygote	6		639		355-43154
Heterozygot Gesunde		6	456		236-571	
Kontrollen		7	363		55-966	

Tabelle 15. S100A12 im Serum, Median und Spannweite in ng/ml.

### C. 3.d. Caspase-1

Bei der Messung der Caspase-1 im Serum ergaben sich die geringsten Unterschiede zwischen den Gruppen. Dennoch ist der Median der Patienten mit 336 pg/ml gegenüber dem der Kontrollen mit 197 pg/ml statistisch signifikant erhöht ( $p=0,0441$ ). Trotz fehlender statistischer Signifikanz lässt sich in einer grafischen Darstellung (Abbildung 6) aber auch hier eine Abstufung zwischen den drei Gruppen erkennen.

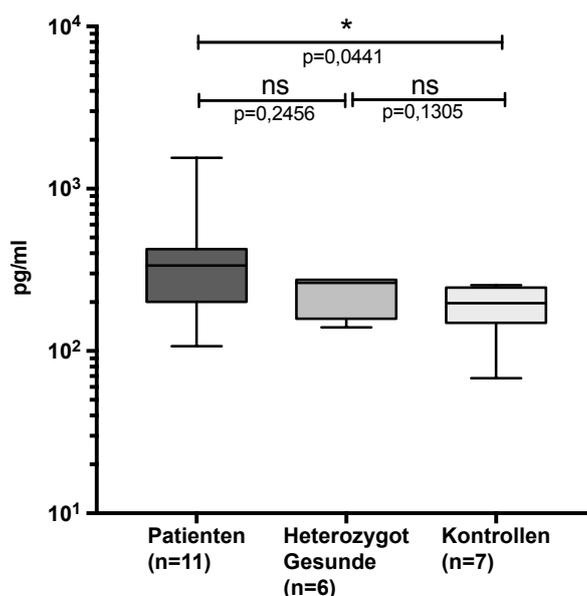


Abbildung 6. Caspase-1 im Serum. Kastendiagramm mit logarithmischer Skala. Median mit Interquartilsabstand, die Antennen zeigen die 5. und 95. Perzentile.

		Anzahl	Median		Spannweite	
Patienten	Homozygote	5	336	380	107-1552	265-1552
	Kombiniert Heterozygote	6		204		107-424
Heterozygot Gesunde		6	263		140-275	
Kontrollen		7	197		68-254	

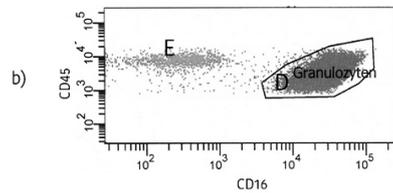
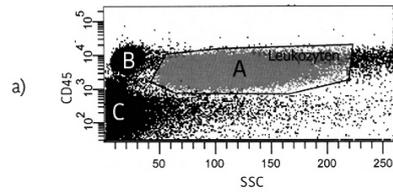
Tabelle 16. Caspase-1 im Serum, Median und Spannweite in pg/ml.

#### C. 4. Ergebnisse der Durchflusszytometrie

Zur Auswertung der Messungen am Durchflusszytometer war es sowohl von Interesse, wie viele positive Ereignisse gemessen werden konnten, das heißt wie viele Zellen den entsprechenden Oberflächenmarker exprimierten (Count), als auch, wie intensiv das jeweilige Fluoreszenzsignal war, also in welchem Maß jede einzelne Zelle den Marker exprimiert hat (Fluorescence Intensity, FI in relative fluorescence units, RFU). Da die Fluoreszenzintensität auf einer logarithmischen Skala abgetragen wird, wurde durch die FACS Diva Software für jede Messung das geometrische Mittel errechnet (gMFI, geo Mean Fluorescence Intensity). Abbildung 7 zeigt die einzelnen Schritte des Gatings, das Verfahren mit den Isotypen bei der Auswertung der Ergebnisse sowie einen typischen Verlauf.

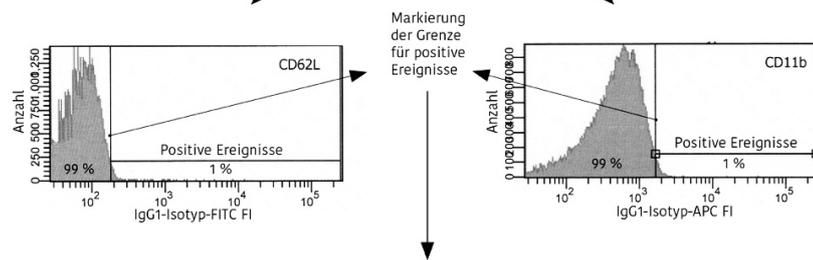
Da bei der Durchflusszytometrie die Zahlenwerte der einzelnen Messungen, vor allem wenn sie an verschiedenen Versuchstagen durchgeführt wurden, nur bedingt vergleichbar sind, wurde zur Auswertung der Werte jeweils die Ratio aus stimulierter Messung beziehungsweise jeweiligem Messzeitpunkt zum unstimulierten Beginn berechnet und in Prozent angegeben (Messwert „Ansatz“ / Messwert „unstimuliert vor Stimulation“ x 100).

1. Gating



2. Isotypen-Messung

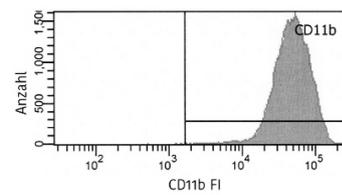
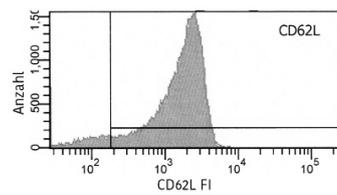
vor Stimulation



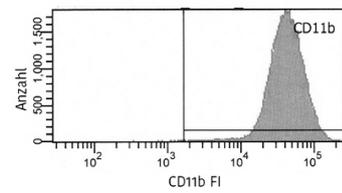
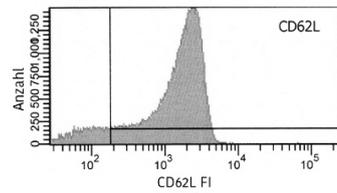
3. Kinetik-Messung

unstimuliert  
vor Stimulation

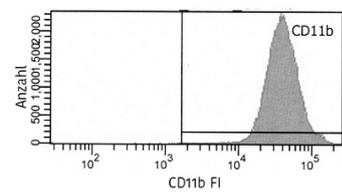
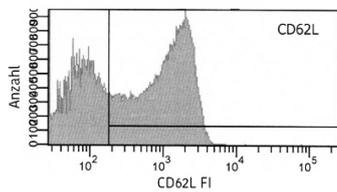
Übernahme der Markierung für die weiteren Messungen



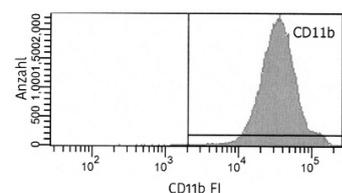
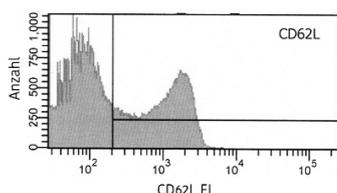
1 Stunde



2 Stunden



3 Stunden



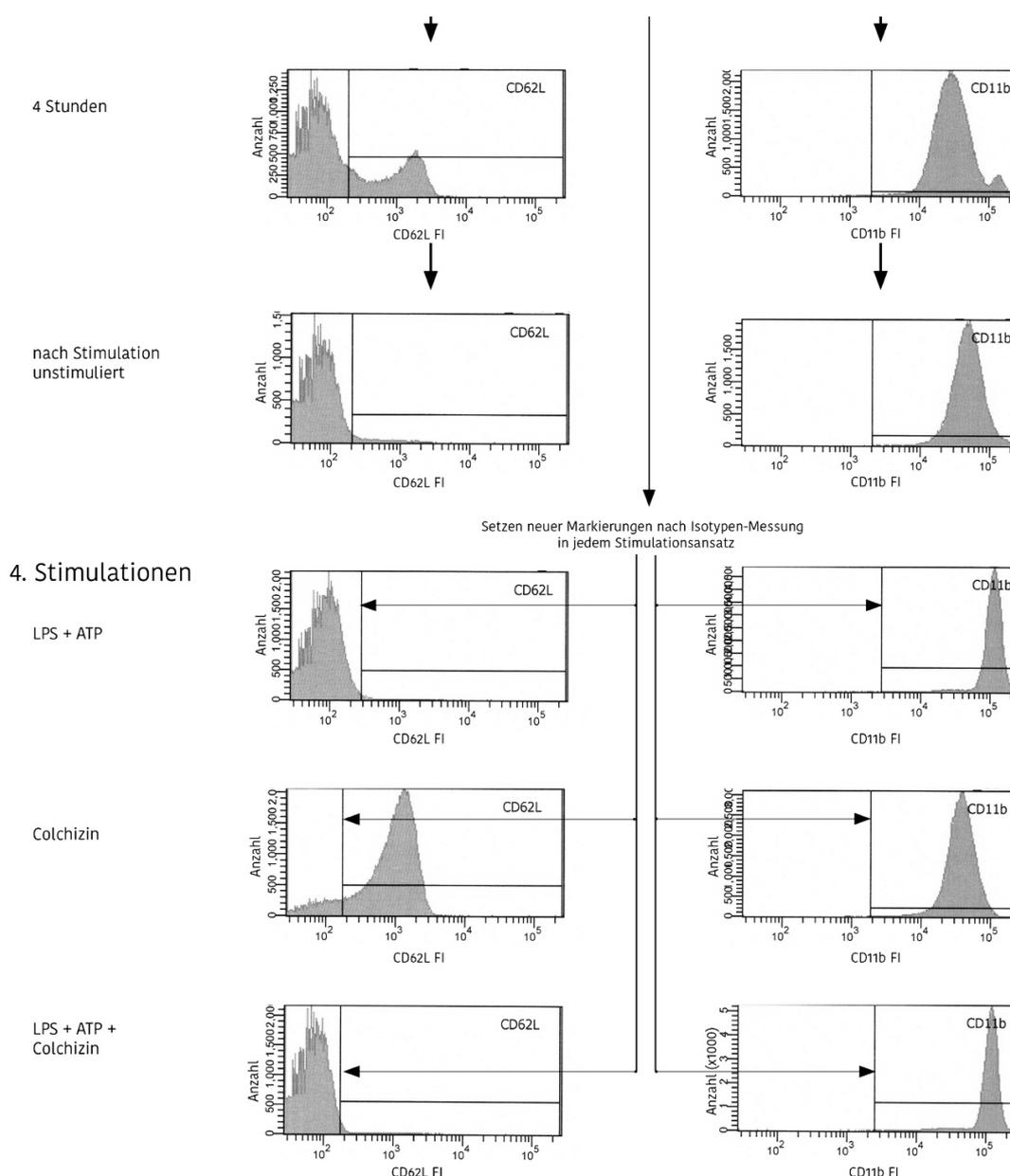


Abbildung 7. Exemplarischer Ablauf beim Auswerten der Messergebnisse der Durchflusszytometrie.

1. Gaten in zwei Schritten: a) Im ersten Schritt wurden Seitwärtsstreulicht und CD45-bindende Zellen zueinander dargestellt. Die drei Anhäufungen von Ereignissen mit jeweils gleichen Eigenschaften waren Leukozyten (A), Lymphozyten (B) und Zelltrümmer (evtl. mit einigen Erythrozyten) (C). b) Im zweiten Gating-Schritt wurden die als Leukozyten identifizierten Zellen hinsichtlich ihrer Expression von CD16 und CD45 dargestellt. So konnten die neutrophilen Granulozyten (D), von den eosinophilen Granulozyten (E) unterschieden werden. Die Population der Granulozyten wurde dann auf die Expression von CD11b und CD62L untersucht.

2. Isotypen-Messung: Messung von unspezifischer Fluoreszenz durch Färbung von IgG1 der Maus, gekoppelt an FITC (für CD62L) und APC (für CD11b). Festgelegt wurde, dass in dieser Messung 1% der Ereignisse als tatsächlich positiv gewertet werden konnte. An dieser Stelle wurde im Histogramm eine Markierung gespeichert, welche dann auf die Messungen von CD62L und CD11b übernommen wurde. FI – Fluoreszenz-Intensität.

3. Kinetik-Ansätze: Die Markierung der Grenze für als positiv zu wertende Ereignisse wurde für alle Kinetik-Ansätze übernommen. Nur die rechts der Markierung detektierten Ereignisse wurden als positiv gewertet und in die Berechnung mit einbezogen.

4. Stimulationsansätze: Für jeden Stimulationsansatz wurde eine eigene Isotypen-Messung mit Setzung einer entsprechenden Markierung durchgeführt (in der Abbildung nicht gezeigt).

### C. 4.a. CD62L im Zeitverlauf

Bei der Durchflusszytometrie zeigt eine Abnahme des CD62L-Signals auf den neutrophilen Granulozyten – im Vergleich zu einer vorherigen Messung desselben Materials – eine Aktivierung der Granulozyten in dieser Zeit oder durch die stattgefundenene Stimulation an, da das Protein von der Zelloberfläche abgespalten worden sein muss.<sup>[110]</sup>

Bei der Messung des Oberflächenmarkers CD62L auf den Granulozyten zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen den Gruppen, vor allem in der Kinetik des Markers. Während der fünf Stunden Inkubation fiel der Wert bei den Patienten deutlich ab, bis auf 26,6 % des Ausgangswertes. Bei den heterozygot Gesunden wurde nur ein Teil des L-Selektin abgespalten (66,8% des Ausgangswertes) und bei den Kontrollen blieb die Fluoreszenzintensität fast so hoch wie zu Beginn der Stimulation (86,2 %). Der Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und den beiden anderen Gruppen zeigte sich ab Stunde 2 signifikant ( $p=0,001$  bei Vergleich der Patienten mit den Kontrollen;  $p=0,0411$  bei Vergleich der Kontrollen mit den heterozygot Gesunden). Ab Stunde 3 waren die Unterschiede zwischen allen Gruppen signifikant bis hoch signifikant. Ab Stunde 5 jedoch beginnt auch bei den Kontrollen eine Abspaltung des CD62L von den Neutrophilen, sodass dann der Unterschied zwischen den gesunden Heterozygoten und den gesunden Kontrollen nicht mehr statistisch signifikant ist (66,8% zu 86,2% verbleibender Oberflächenproteine im Median,  $p=0649$ ).

Eine genaue Auflistung der errechneten Verhältnisse und der Signifikanzen zeigt Tabelle 17.

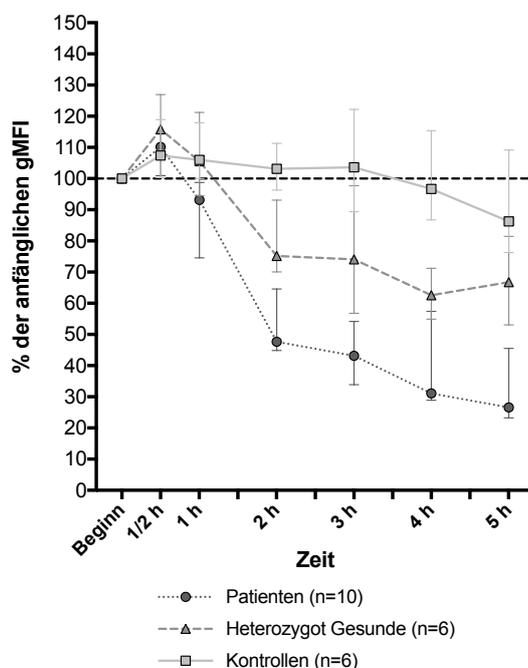


Abbildung 8. Zeitverlauf von CD62L. Abgetragen sind Median und Interquartilsabstand. Werte in Prozent.

versus		Ratio, prozentual zu „unstimuliert vor Stimulation“, Median (Spannweite)		p-Wert	Signifikanzniveau
1 Stunde					
Patienten	Kontrollen	93,2 (50-115,5)	106 (92,9-120,6)	0,0293	*
2 Stunden					
Patienten	Het. Gesunde	47,7 (18,8-77,3)	75,2 (56,3-108,5)	0,011	*
	Kontrollen		103,2 (88,9-112,2)	0,0002	***
Het. Gesunde	Kontrollen	75,2 (56,3-108,5)	103,2 (88,9-112,2)	0,026	*
3 Stunden					
Patienten	Het. Gesunde	43,1 (16,6-60,8)	74,1 (50,9-122,3)	0,003	**
	Kontrollen		103,6 (83,7-124,1)	0,0002	***
4 Stunden					
Patienten	Het. Gesunde	31,1 (12,8-63,2)	62,6 (45,5-79,7)	0,016	*
Kontrollen	Patienten	96,7 (82,5-119,6)	31,1 (12,8-63,2)	0,0002	***
	Het. Gesunde		62,6 (45,5-79,7)	0,0022	**
5 Stunden					
Patienten	Het. Gesunde	26,6 (14,3-65,4)	66,8 (45,7-94,6)	0,0028	**
	Kontrollen		86,2 (73,9-112,6)	0,0004	***

Tabelle 17. Zeitverlauf von CD62L. Median und Spannweite in Prozent sowie Signifikanzniveau der Vergleiche zwischen den Gruppen (ausgenommen nicht signifikante Vergleiche).

## C. 4.b. Stimulation

### C. 4.b.i. CD62L

Bei der Messung des L-Selektin auf der Oberfläche der Neutrophilen nach deren Stimulation zeigten sich vor allem signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppen, also zwischen den verschiedenen Stimulationsansätzen.

In der Kontrollgruppe ist gut erkennbar, dass eine Stimulation der Zellen mit LPS und ATP zu einer beinahe kompletten Abspaltung des CD62L von der Zelloberfläche und somit zu einer Aktivierung der Granulozyten führt. Die mit LPS und ATP stimulierten Zellen senken den Anteil von CD62L auf 32,3 % im Median, bei Zugabe von Colchizin, LPS und ATP verbleiben 28,6 %. Setzt man den Neutrophilen ausschließlich Colchizin zu, scheint auch eine Aktivierung zu geschehen, allerdings werden nur etwa ein Drittel der Proteinmoleküle abgespalten (67,4 % verbleibend).

Diesem allgemeinen Muster folgen auch die Proben der anderen beiden Gruppen. Der Unterschied liegt hier allerdings darin, dass vor allem bei den FMF-Patienten bereits unstimuliert schon ein großer Teil des L-Selektin abgespalten wurde. Somit sinkt der Anteil in den anderen Stimulationsansätzen im Vergleich zum unstimulierten, aber inkubierten Ansatz nicht.

So ergibt sich, dass bei den Kontrollen auch im Ansatz „unstimuliert nach Stimulation“ noch signifikant mehr CD62L gemessen wird, als in den drei mit Stimulantien versetzten Proben (jeweils  $p=0,0156$ ).

Bei den gesund heterozygoten Probanden konnten im Vergleich zum Ansatz „unstimuliert nach Stimulation“ nur durch die Stimulation mit LPS + ATP und auch Colchizin + LPS + ATP signifikant mehr aktivierte Granulozyten (also weniger CD62L) gemessen werden ( $p=0,0312$ ), nicht jedoch in dem Ansatz mit Colchizin allein.

Die Gruppe der FMF-Patienten weist im Ansatz mit Colchizin den höchsten Anteil an CD62L auf den Granulozyten auf, hier sind im Vergleich zum Ansatz vor der Stimulation noch 54,5 % CD62L gebunden. Ohne Colchizin beträgt der Anteil nur 31,4 %. Durch Zugabe von LPS + ATP, aber auch LPS + ATP + Colchizin werden die Granulozyten maximal aktiviert und es verbleiben nur 27 % beziehungsweise 16,9 % des Oberflächenmarkers auf den Zellen. Insgesamt spalten die Granulozyten der Patienten jedoch in jedem Stimulationsansatz im Vergleich zum unstimulierten Ansatz vor der Inkubation in signifikantem Ausmaß CD62L ab (mit  $p=0,002$  für alle Ansätze).

Über alle signifikanten Unterschiede innerhalb der Probandengruppen gibt Tabelle 18 Aufschluss.

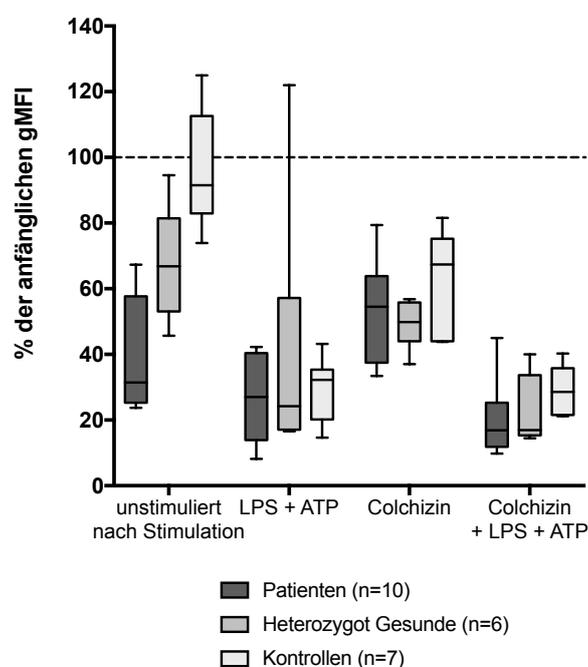


Abbildung 9. CD62L in den Stimulationsansätzen. Kastendiagramm. Median mit Interquartilsabstand, die Antennen zeigen die 5. und 95. Perzentile. Werte in Prozent.

versus		Ratio, prozentual zu „unstimuliert vor Stimulation“, Median (Spannweite)	p-Wert	Signifikanzniveau	
Patienten					
vor Stimulation	unst. nach Stim.	100	31,4 (23,7-67,4)	0,002	**
	LPS + ATP		27,0 (8,2-42,3)	0,002	**
	Colchizin		54,5 (33,4-79,4)	0,002	**
	Col + LPS + ATP		16,9 (9,8-45,0)	0,002	**
unst. nach Stim.	Col + LPS + ATP	31,4 (23,7-67,4)	16,9 (9,8-45,0)	0,002	**
Colchizin	LPS + ATP	54,5 (33,4-79,4)	27,0 (8,2-42,3)	0,0039	**
	Col + LPS + ATP		16,9 (9,8-45,0)	0,002	**

Heterozygot Gesunde					
vor Stimulation	unst. nach Stim.	100	66,8 (45,7-94,6)	0,0312	*
	Colchizin		49,9 (37,0-56,8)	0,0312	*
	Col + LPS + ATP		16,9 (14,4-40,0)	0,0312	*
unst. nach Stim.	Colchizin	66,8 (45,7-94,6)	49,9 (37,0-56,8)	0,0312	*
	Col + LPS + ATP		16,9 (14,4-40,0)	0,0312	*
Colchizin + LPS + ATP	LPS + ATP	16,9 (14,4-40,0)	24,2 (16,6-122,0)	0,0312	*
	Colchizin		49,9 (37,0-56,8)	0,0312	*
Kontrollen					
vor Stimulation	LPS + ATP	100	32,3 (14,7-43,2)	0,0156	*
	Colchizin		67,4 (43,8-81,5)	0,0156	*
	Col + LPS + ATP		28,6 (21,2-40,3)	0,0156	*
unst. nach Stim.	LPS + ATP	91,5 (73,9-125,0)	32,3 (14,7-43,2)	0,0156	*
	Colchizin		67,4 (43,8-81,5)	0,0156	*
	Col + LPS + ATP		28,6 (21,2-40,3)	0,0156	*
Colchizin	LPS + ATP	67,4 (43,8-81,5)	32,3 (14,7-43,2)	0,0156	*
	Col + LPS + ATP		28,6 (21,2-40,3)	0,0156	*
unstimuliert nach Stimulation					
Patienten	Het. Gesunde	31,4 (23,7-67,4)	66,8 (45,7-94,6)	0,011	*
	Kontrollen		91,5 (73,9-125,0)	0,0001	***
Kontrollen	Het. Gesunde	91,5 (73,9-125,0)	66,8 (45,7-94,6)	0,0221	*

Tabelle 18. CD62L in den Stimulationsansätzen. Median und Spannweite in Prozent sowie Signifikanzniveau der Vergleiche zwischen den Gruppen und zwischen den Ansätzen in den Gruppen (ausgenommen nicht signifikante Vergleiche).

### C. 4.b.ii. CD11b

Der Zusammenhang zwischen Aktivierung der neutrophilen Granulozyten und signifikanter Erhöhung des Signals von CD11b im Durchflusszytometer zeigte sich auch hier. Dabei scheint es sich allerdings um eine Genotyp-unabhängige Reaktion zu handeln. Bei allen drei Probandengruppen lässt sich so nachweisen, dass die Zellen durch LPS+ATP zu einer entzündlichen Reaktion stimuliert werden. Auch zusätzliches Colchizin kann diese Erhöhung von CD11b auf der Zelloberfläche nicht vermindern. Im Gegensatz dazu löst Colchizin allein bei allen Gruppen keine solche Aktivierung aus.

In der Kontrollgruppe kommt es zu einem – im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen signifikanten – Abfall von CD11b innerhalb der Inkubationszeit. Während der prozentuale Abfall (nach Inkubation/vor Inkubation) bei beiden Gruppen mit *MEFV*-Mutation nur jeweils 10,8 % beträgt, liegt er bei den Kontrollen mit 38,1 % signifikant darüber ( $p=0,0012$ ).

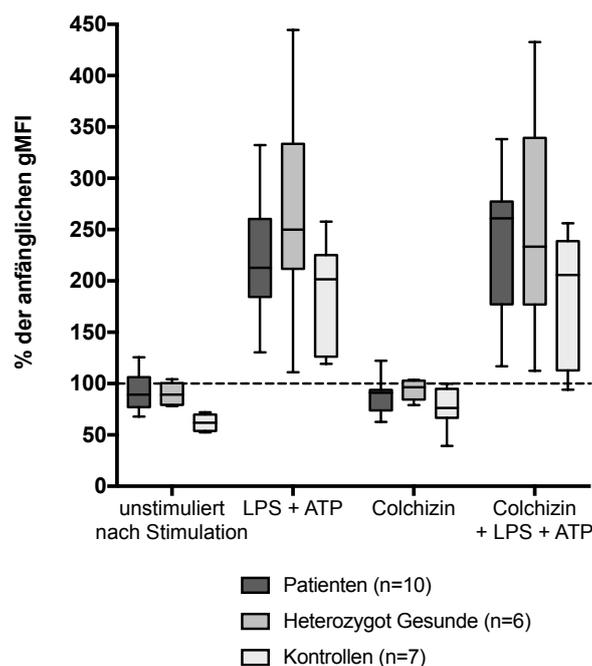


Abbildung 10. CD11b in den Stimulationsansätzen. Kastendiagramm. Median mit Interquartilsabstand, die Antennen zeigen die 5. und 95. Perzentile. Werte in Prozent.

versus		Ratio, prozentual zu „unstimuliert vor Stimulation“, Median (Spannweite)	p-Wert	Signifikanzniveau
<b>Patienten</b>				
vor Stimulation	LPS + ATP	100	212,8 (130,5-332,3)	0,002 **
	Colchizin		91,0 (62,6-122,3)	0,0371 *
	Col + LPS + ATP		261,0 (116,8-338,2)	0,002 **
unst. nach Stim.	LPS + ATP	89,2 (67,8-125,6)	212,8 (130,5-332,3)	0,002 **
	Col + LPS + ATP		261,0 (116,8-338,2)	0,002 **
Colchizin	LPS + ATP	91,0 (62,6-122,3)	212,8 (130,5-332,3)	0,002 **
	Col + LPS + ATP		261,0 (116,8-338,2)	0,002 **
<b>Heterozygot Gesunde</b>				
vor Stimulation	LPS + ATP	100	249,9 (111,0-444,5)	0,0312 *
	Col + LPS + ATP		233,4 (112,4-432,8)	0,0312 *
unst. nach Stim.	LPS + ATP	89,2 (78,1-104,3)	249,9 (111,0-444,5)	0,0312 *
	Col + LPS + ATP		233,4 (112,4-432,8)	0,0312 *
Colchizin	LPS + ATP	96,5 (79,2-103,6)	249,9 (111,0-444,5)	0,0312 *
	Col + LPS + ATP		233,4 (112,4-432,8)	0,0312 *
<b>Kontrollen</b>				
vor Stimulation	unstim. nach St.	100	61,9 (52,4-72,0)	0,0156 *
	LPS + ATP		201,5 (119,3-257,8)	0,0156 *
	Colchizin		76,3 (39,2-99,8)	0,0156 *
	Col + LPS + ATP		205,9 (94,1-256,1)	0,0312 *
unst. nach Stim.	LPS + ATP	61,9 (52,4-72,0)	201,5 (119,3-257,8)	0,0156 *
	Col + LPS + ATP		205,9 (94,1-256,1)	0,0156 *
Colchizin	LPS + ATP	76,3 (39,2-99,8)	201,5 (119,3-257,8)	0,0156 *
	Col + LPS + ATP		205,9 (94,1-256,1)	0,0156 *

unstimuliert nach Stimulation					
Kontrollen	Patienten	61,9 (52,4-72,0)	89,2 (67,8-125,6)	0,0012	**
	Het. Gesunde		89,2 (78,1-104,3)	0,0012	**

Tabelle 19. CD11b in den Stimulationsansätzen. Median und Spannweite in Prozent sowie Signifikanzniveau der Vergleiche zwischen den Gruppen und zwischen den Ansätzen in den Gruppen (ausgenommen nicht signifikante Vergleiche).

## C. 5. Ergebnisse der ELISAs

Die Entzündungsmarker Interleukin-18, S100A12 und Caspase-1 wurden nicht nur im Serum der Probanden gemessen, sondern auch in den jeweiligen Überständen der stimulierten bzw. inkubierten Granulozyten.

Alle verwendeten ELISA-Kits konnten nur in einer definierten Spannweite messen. Die Verdünnung der Proben musste so gewählt werden, dass nur in den wenigsten Fällen ein Ergebnis außerhalb dieser Spannweiten lag. Dennoch konnte es nicht ganz vermieden werden, dass vereinzelte Ergebnisse aus diesem Rahmen herausfielen. Bei sehr niedrigen oder sehr hohen Konzentrationen musste daher akzeptiert werden, dass solche Ergebnisse nicht genauer als folgt angegeben werden konnten: Die unterste Messschwelle beim Interleukin-18-Kit lag bei 2 pg/ml und bei S100A12 bei 78000 pg/ml. Werte von über 5000000 pg/ml konnten beim S100A12-Kit nicht genau angegeben werden und bei Caspase-1 von über 400 pg/ml.

### C. 5.a. Interleukin-18

#### C. 5.a.i. Kinetik

Der Interleukin-18-Wert der Patienten befand sich in allen Probenmessungen während der 5 Stunden Inkubationszeit auf einem hohen Niveau (minimal 90 pg/ml im Median (nach ½ Stunde), maximal 397 pg/ml (nach 1 Stunde), im Mittel über die 5 Stunden  $253 \pm 121$  pg/ml).

Im Gegensatz dazu waren die Werte bei den gesunden Kontrollpersonen durchgehend an der unteren Grenze der Nachweisbarkeit von 2 pg/ml. Während es sowohl in der Patientengruppe als auch bei den heterozygot Gesunden Schwankungen nach oben und unten gibt, bleibt der Wert bei allen Kontrollen sehr niedrig.

Die Werte der heterozygot Gesunden starten zu Beginn der Inkubationszeit auf dem gleichen niedrigen Niveau wie die der Kontrollen, steigen dann jedoch vor allem innerhalb der ersten beiden Stunden deutlich an (48 pg/ml im Median nach 2 Stunden). Dabei bewegen sich die Werte über die gesamte Zeit zwischen den beiden anderen Probandengruppen. Das heißt, nach 5 Stunden ist ein deutlicher Anstieg von 2 pg/ml auf 72 pg/ml zu verzeichnen, allerdings steigt die

Konzentration des IL-18 auch bei den heterozygot Gesunden nicht auf das Level der FMF-Patienten.

Der Gruppe der heterozygot Gesunden und der Patientengruppe ist gemein, dass ihre Werte zu Beginn der Inkubation den niedrigsten Wert aufweisen (90 pg/ml bei den Patienten und 2pg/ml bei den heterozygot Gesunden). Der stärkste Anstieg geschieht bei beiden Gruppen innerhalb der ersten halben Stunde nach Messbeginn (zwischen ½ Stunde und 1 Stunde).

Zu fast allen Zeitpunkten sind die Unterschiede zwischen den Gruppen signifikant, vor allem beim Vergleich der Kontrollen mit den beiden anderen Gruppen. Details dazu finden sich in Tabelle 20.

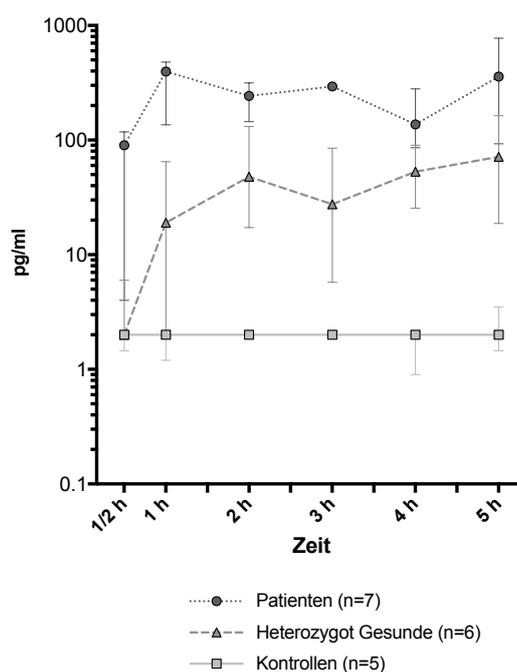


Abbildung 11. Zeitverlauf von Interleukin-18. Abgetragen sind Median und Interquartilsabstand auf logarithmischer Skala.

versus		Median (Spannweite) in pg/ml		p-Wert	Signifikanzniveau
1/2 Stunde					
Patienten	Het. Gesunde	90 (2-359)	2 (1,8-6)	0,0227	*
	Kontrollen		2 (0,9-2)	0,0088	**
1 Stunde					
Patienten	Het. Gesunde	397 (2-730)	19 (2-133)	0,0216	*
	Kontrollen		2 (0,4-2)	0,0101	*
Het. Gesunde	Kontrollen	19 (2-133)	2 (0,4-2)	0,0455	*
2 Stunden					
Kontrollen	Patienten	2 (2-2)	243 (2-393)	0,0114	*
	Het. Gesunde		48 (9-242)	0,0043	**
3 Stunden					
Kontrollen	Patienten	2 (2-2)	294 (2-369)	0,0114	*
	Het. Gesunde		28 (2-148)	0,0152	*

4 Stunden					
Kontrollen	Patienten	2 (0,7-2)	137 (2-390)	0,0076	**
	Het. Gesunde		53 (9-130)	0,0043	**
5 Stunden					
Kontrollen	Patienten	2 (0,9-4)	358 (6-785)	0,0025	**
	Het. Gesunde		72 (15-180)	0,0043	**

Tabelle 20. Zeitverlauf von Interleukin-18. Median und Spannweite in pg/ml sowie Signifikanzniveau der Vergleiche zwischen den Gruppen (ausgenommen nicht signifikante Vergleiche).

### ***C. 5.a.ii. Stimulation***

Wie es schon in der Kinetik angedeutet wurde, waren die IL-18-Konzentrationen im Zellüberstand der Patienten unstimuliert schon sehr hoch (455 pg/ml im Median) und unterschieden sich somit statistisch signifikant von denen der heterozygot Gesunden ( $p=0,0103$ ) und hochsignifikant von denen der Kontrollen ( $p<0,0001$ ). Jedoch ist auch der mediane IL-18-Wert der heterozygot Gesunden mit 71,5 pg/ml unstimuliert signifikant höher als der der Kontrollen mit nur 2 pg/ml ( $p=0,0035$ ).

Interessanterweise führt eine Stimulation mit LPS und ATP in keiner der drei Gruppen zu einer Erhöhung der IL-18-Konzentration, wohingegen Colchizin bei den Patienten und den heterozygot Gesunden zu einer Senkung der Werte im Median führt – bei den Patienten hochsignifikant von 455 pg/ml unbehandelt auf 2 pg/ml im Colchizin-Ansatz ( $p=0,001$ ) und bei den heterozygot Gesunden von 71,5 auf 2,5 pg/ml (nicht signifikant,  $p=0,0938$ ). Colchizin senkt somit die IL-18-Konzentration auf das gleiche niedrige Niveau wie bei den Kontrollen.

Die Behandlung der Zellen mit Colchizin allein und Colchizin plus LPS plus ATP ergab keine Unterschiede zwischen den Gruppen, bis auf dass die Streuung der Werte bei den Patienten wesentlich breiter ist als in den beiden anderen Gruppen. Dennoch sind bei den Patienten alle Ansätze zueinander signifikant verschieden. Details dazu finden sich in Tabelle 21.

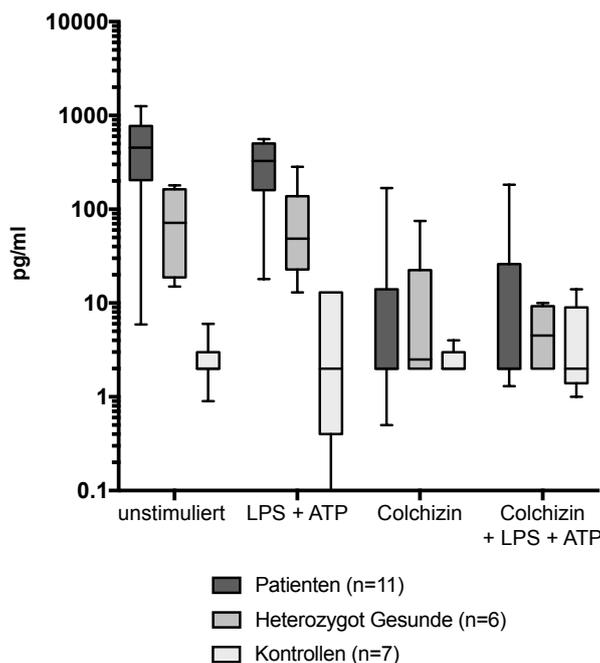


Abbildung 12. Interleukin-18 in den Stimulationsansätzen. Kastendiagramm mit logarithmischer Skala. Median mit Interquartilsabstand, die Antennen zeigen die 5. und 95. Perzentile.

versus		Median (Spannweite) in pg/ml		p-Wert	Signifikanzniveau
<b>Patienten</b>					
unstimuliert	LPS + ATP	455 (5,9-1256)	327 (18-559)	0,0322	*
	Colchizin		2 (0,5-168)	0,001	***
	Col + LPS + ATP		2 (1,3-183)	0,001	***
LPS + ATP	Col + LPS + ATP	327 (18-559)	2 (1,3-183)	0,001	***
Colchizin	LPS + ATP	2 (0,5-168)	327 (18-559)	0,001	***
	Col + LPS + ATP		2 (1,3-183)	0,0312	*
<b>Heterozygot Gesunde</b>					
Col + LPS + ATP	unstimuliert	4,5 (2-10)	71,5 (15-180)	0,0312	*
	LPS + ATP		48,5 (13-284)	0,0312	*
<b>unstimuliert</b>					
Patienten	Het. Gesunde	455 (5,9-1256)	71,5 (15-180)	0,0103	*
	Kontrollen		2 (0,9-6)	<0,0001	****
Kontrollen	Het. Gesunde	2 (0,9-6)	71,5 (15-180)	0,0012	**
<b>LPS + ATP</b>					
Patienten	Het. Gesunde	327 (18-559)	48,5 (13-284)	0,0145	*
	Kontrollen		2 (0,1-13)	<0,0001	****
Kontrollen	Het. Gesunde	2 (0,1-13)	48,5 (13-284)	0,0035	**

Tabelle 21. Interleukin-18 in den Stimulationsansätzen. Median und Spannweite in pg/ml sowie Signifikanzniveau der Vergleiche zwischen den Gruppen und zwischen den Ansätzen in den Gruppen (ausgenommen nicht signifikante Vergleiche).

## **C. 5.b. S100A12**

### ***C. 5.b.i. Kinetik***

Das Bild der Kinetik des S100A12-Proteins im Zellüberstand ist ein ganz ähnliches wie das des Interleukin-18.

Wie auch bei der Messung von IL-18 weisen die Patienten insgesamt deutlich höhere Werte auf (Mittelwert über 5 Stunden  $1127 \pm 491$  ng/ml) als die Kontrollen und die heterozygot gesunden Probanden. Zu Beginn – nach einer halben Stunde Inkubation gemessen – ist dieser Unterschied noch nicht statistisch signifikant, ab der ersten Stunde jedoch unterscheidet sich die mediane Konzentration von S100A12 im Überstand der Patienten aber signifikant mit  $p=0,048$  (nach 1 Stunde) beziehungsweise  $p=0,0303$  (weitere Messzeitpunkte) von der der gesunden Kontrollen. Aufgrund einer hohen Streuung ist der Unterschied zu den heterozygot Gesunden nicht statistisch signifikant, obwohl grafisch eine deutliche Differenz zu erkennen ist (Abb. 13).

Die Werte der heterozygot Gesunden (Mittelwert über 5 Stunden  $142 \pm 40$  ng/ml) sind beim S100A12 in etwa auf dem Niveau der Kontrollen (Mittelwert über 5 Stunden  $107 \pm 207$  ng/ml).

Alle Gruppen zeigen im Zeitverlauf einen relativen Anstieg der medianen Konzentration des S100A12. Am steilsten ist dieser Anstieg bei den Patienten, vor allem – wie auch schon beim IL-18 zu beobachten war – innerhalb der ersten halben Stunde nach der ersten Messung (von 288 ng/ml auf 989 ng/ml). Nach 5 Stunden erreicht die Konzentration des S100A12 – nach einem leichten Abfall in den Stunden 3 und 4 – ihren höchsten Wert mit 1622 ng/ml und hat sich damit beinahe ver Hundertfacht.

Bei den heterozygot Gesunden zeigt der Anstieg einen ähnlichen Verlauf, wenn auch wesentlich flacher. Die Konzentration steigt hier innerhalb der ersten beiden Stunden Inkubation von 77 ng/ml auf 178 ng/ml und fällt dann innerhalb der nächsten 3 Stunden leicht um etwa 15 ng/ml ab auf einen Wert von 164 ng/ml nach 5 Stunden.

Die relativ niedrigen Werte der Kontrollen zeigen über die Zeit der Inkubation einen geringen, aber kontinuierlichen Anstieg von 81 ng/ml auf 132 ng/ml.

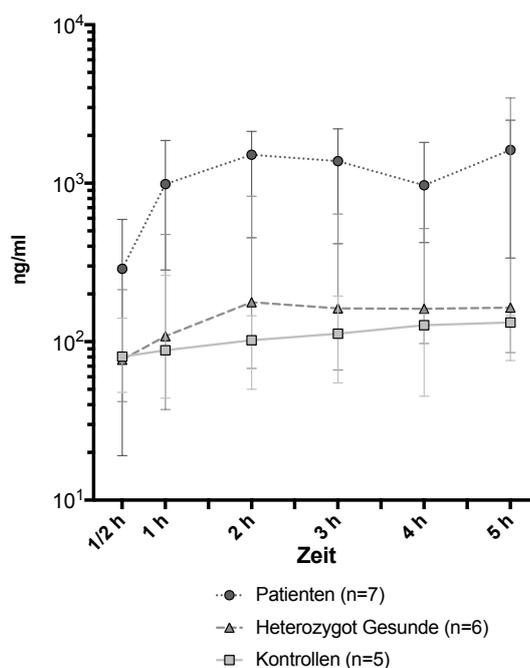


Abbildung 13. Zeitverlauf von S100A12. Abgetragen sind Median und Interquartilsabstand auf logarithmischer Skala.

versus		Median (Spannweite) in ng/ml		p-Wert	Signifikanzniveau
1 Stunde					
Patienten	Kontrollen	989 (41-2304)	88 (27-311)	0,048	*
2 Stunden					
Patienten	Kontrollen	1513 (60-2520)	102 (35-184)	0,0303	*
3 Stunden					
Patienten	Kontrollen	1380 (35-2438)	112 (24-271)	0,0303	*
4 Stunden					
Patienten	Kontrollen	972 (55-1880)	127 (24-160)	0,0303	*
5 Stunden					
Patienten	Kontrollen	1622 (79-4096)	132 (64-159)	0,0303	*

Tabelle 22. Zeitverlauf von S100A12. Median und Spannweite in ng/ml sowie Signifikanzniveau der Vergleiche zwischen den Gruppen (ausgenommen nicht signifikante Vergleiche).

### C. 5.b.ii. Stimulation

Auch bei der Stimulation zeigen sich im Prinzip sehr ähnliche Ergebnisse beim S100A12 wie beim Interleukin-18.

Die Patienten weisen wieder unstimuliert sehr hohe Werte auf (Median 2974 ng/ml), wobei hier eine sehr hohe Spanne zu beachten ist (79-6669 ng/ml). Die Stimulation der Granulozyten mit LPS und ATP führt nicht zu einer Erhöhung des S100A12 – der Wert ist sogar statistisch signifikant geringer (2236 ng/ml,  $p=0,0137$ ).

Den niedrigsten Wert unstimuliert weist auch hier die Kontrollgruppe auf (127 ng/ml), zwischen diesen beiden Extremen ordnen sich die Messwerte der heterozygot Gesunden ein, die im Median

bei 164 ng/ml lagen, jedoch ebenso wie die Patienten eine sehr hohe Spannweite aufweisen (45-9421 ng/ml). Im Gegensatz zu den Ergebnissen der FMF-Patienten führt jedoch bei diesen beiden Gruppen eine Stimulation mit LPS und ATP zu einer Erhöhung der S100A12-Konzentration.

Eine Behandlung der Zellen mit Colchizin hemmt signifikant die Sekretion von S100A12 bei den Patienten (bei Colchizin-Zugabe 170 ng/ml,  $p=0,002$ ) und auch bei den heterozygot Gesunden (164 ng/ml unstimuliert zu 57 ng/ml,  $p=0,0312$ ). Auch bei den Kontrollen ist durch Colchizin eine geringere Konzentration des Proteins im Zellüberstand zu messen, wobei der Unterschied nicht signifikant ist (unstimuliert 127 ng/ml zu 87 ng/ml mit Colchizin,  $p=0,4688$ ).

Innerhalb der Gruppe der Kontrollen wurde die höchste Konzentration an S100A12 im Stimulationsansatz mit Colchizin plus LPS und ATP gemessen (355 ng/ml im Median). In den beiden anderen Gruppen mit Mutation im *MEFV*-Gen scheint das Colchizin die proinflammatorische Wirkung von LPS und ATP zu hemmen, denn die Konzentrationen an S100A12 sind hier geringer als in den Ansätzen mit LPS und ATP allein. In der Gruppe der FMF-Patienten ist die Konzentration an S100A12 in dem Ansatz mit LPS und ATP und Colchizin sogar deutlich niedriger als im unstimulierten Ansatz (2974 ng/ml unstimuliert zu 394 ng/ml mit LPS + ATP + Colchizin,  $p=0,002$ ).

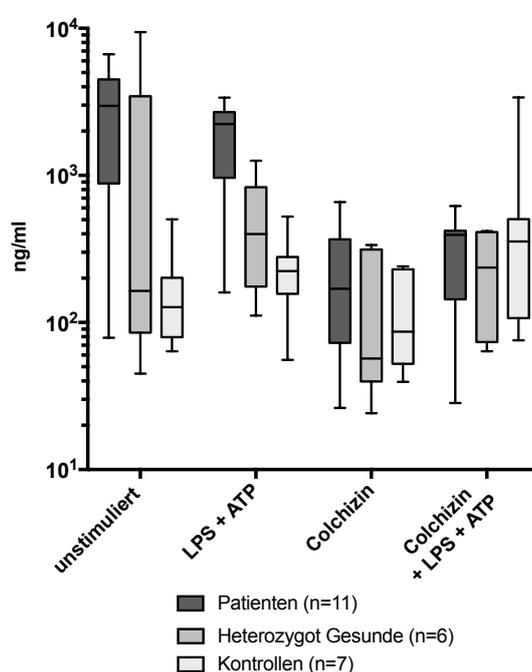


Abbildung 14. S100A12 in den Stimulationsansätzen. Kastendiagramm mit logarithmischer Skala. Median mit Interquartilsabstand, die Antennen zeigen die 5. und 95. Perzentile.

versus		Median (Spannweite) in ng/ml	p-Wert	Signifikanzniveau
<b>Patienten</b>				
unstimuliert	LPS + ATP	2974 (79-6669)	2236 (160-3375)	0,0137 *
	Colchizin		170 (26-658)	0,002 **
	Col + LPS + ATP		394 (28-619)	0,002 **
LPS + ATP	Colchizin	2236 (160-3375)	170 (26-658)	0,001 ***
	Col + LPS + ATP		394 (28-619)	0,002 **
<b>Heterozygot Gesunde</b>				
Colchizin	unstimuliert	57 (24-336)	164 (45-9421)	0,0312 *
	LPS + ATP		400 (111-1259)	0,0312 *
	Col + LPS + ATP		236 (64-419)	0,0312 *
LPS + ATP	Col + LPS + ATP	400 (111-1259)	236 (64-419)	0,0312 *
<b>Kontrollen</b>				
unstimuliert	LPS + ATP	127 (64-503)	224 (56-525)	0,0312 *
	Col + LPS + ATP		355 (76-3390)	0,0156 *
Colchizin	LPS + ATP	87 (39-240)	224 (56-525)	0,0156 *
	Col + LPS + ATP		355 (76-3390)	0,0156 *
<b>unstimuliert</b>				
Patienten	Kontrollen	2974 (788-6669)	127 (64-503)	0,0028 **
<b>LPS + ATP</b>				
Patienten	Het. Gesunde	2236 (160-3375)	400 (111-1259)	0,0103 *
	Kontrollen		224 (56-525)	0,0008 ***

Tabelle 23. S100A12 in den Stimulationsansätzen. Median und Spannweite in ng/ml sowie Signifikanzniveau der Vergleiche zwischen den Gruppen und zwischen den Ansätzen in den Gruppen (ausgenommen nicht signifikante Vergleiche).

## C. 5.c. Caspase-1

### C. 5.c.i. Kinetik

Die grafische Darstellung der Kinetik der Caspase-1 (Abb. 15) in den Proben aller drei Gruppen ist der der anderen beiden gemessenen Marker auffallend ähnlich.

Es ergeben sich folgende Gemeinsamkeiten: Die Konzentration der Caspase-1 ist bei den Patienten insgesamt – also zu Beginn (61 pg/ml), zum Ende (275 pg/ml) und auch im Mittelwert ( $210,5 \pm 120,5$  pg/ml) – am höchsten. Die insgesamt niedrigsten Werte weist die Kontrollgruppe auf mit einem Mittelwert von  $29,2 \pm 6,8$  pg/ml. Wie auch beim Interleukin-18 und beim S100A12 ist der erste gemessene Wert (nach ½ Stunde Inkubation) bei den heterozygot Gesunden auf dem gleichen Level wie bei den Kontrollen (32,5 pg/ml im Median), steigt dann aber an und kommt im Mittel auf eine Konzentration von  $49,6 \pm 9,0$  pg/ml.

Eine weitere Parallele ist, dass bei allen drei Entzündungsmarkern ein starker Anstieg innerhalb der ersten Stunde – beziehungsweise bei der Caspase-1 innerhalb der ersten zwei Stunden – in den

Werten der Patienten gemessen wurde. Nach einer halben Stunde Inkubation liegt die Konzentration in den Patientenproben im Median bei 61 pg/ml und steigt dann bis Stunde 2 auf 411 pg/ml an. Nach einem ersten Anstieg in Stunde 1 auf 203 pg/ml ist der Unterschied zu den Kontrollen statistisch signifikant. Die Messwerte und p-Werte sind in Tabelle 24 dargestellt.

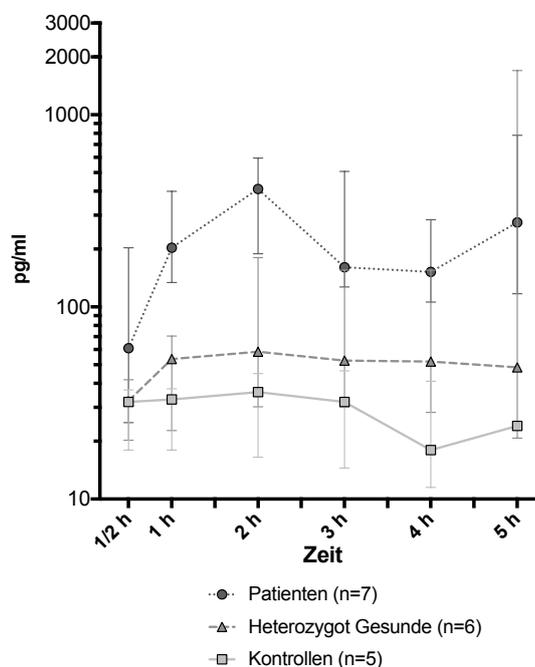


Abbildung 15. Zeitverlauf von Caspase-1. Abgetragen sind Median und Interquartilsabstand auf logarithmischer Skala.

versus		Median (Spannweite) in pg/ml		p-Wert	Signifikanzniveau
1 Stunde					
Patienten	Het. Gesunde	203 (35-506)	54 (16-111)	0,0122	*
	Kontrollen		33 (14-41)	0,0051	**
2 Stunden					
Patienten	Kontrollen	411 (35-611)	36 (13-53)	0,0177	*
3 Stunden					
Patienten	Kontrollen	161 (28-558)	32 (11-48)	0,0177	*
4 Stunden					
Patienten	Kontrollen	152 (29-377)	18 (10-42)	0,0101	*
5 Stunden					
Patienten	Kontrollen	275 (37-930)	24 (23-41)	0,0051	**

Tabelle 24. Zeitverlauf von Caspase-1. Median und Spannweite in pg/ml sowie Signifikanzniveau der Vergleiche zwischen den Gruppen (ausgenommen nicht signifikante Vergleiche).

### ***C. 5.c.ii. Stimulation***

Letztlich sind auch die Ergebnisse der Caspase-1-Messungen in den Stimulationsansätzen kongruent zu denen der anderen beiden gemessenen Moleküle.

Der Überstand der Patienten weist schon in der unstimulierten Probe höchste Konzentrationen der Caspase-1 auf (556 pg/ml im Median). Das ist hochsignifikant mehr als bei den Kontrollen (24 pg/ml,  $p=0,0006$ ). Die heterozygot Gesunden liegen mit einem Median von 48 pg/ml und einer sehr hohen Spannweite (20 – 6191 pg/ml) zwischen den beiden Vergleichsgruppen.

Durch Stimulation mit LPS und ATP lässt sich die Konzentration in der Probe der Patienten nicht erhöhen, der Median liegt hier nur bei 278 pg/ml. Anders ist dies bei den beiden anderen Probandengruppen. Hier lässt sich durch Zugabe von LPS und ATP zu den Zellen ein Anstieg der Caspase-1-Werte nachweisen (heterozygot Gesunde: 98 pg/ml, Kontrollen: 91 pg/ml). Bei den Kontrollen erweist sich der Unterschied zwischen dem unstimulierten und dem LPS-ATP-Ansatz mit  $p=0,0312$  als statistisch signifikant.

Bei allen drei Gruppen sind die Messwerte im Colchizin-Ansatz sehr niedrig (Patienten: 29 pg/ml, heterozygot Gesunde: 14 pg/ml, Kontrollen: 25 pg/ml). Während also bei den Patienten die Differenz zum unstimulierten Ansatz am größten ist (signifikant mit  $p=0,002$ ), kann hier bei den heterozygot Gesunden mit einem weniger starken Abfall dennoch der insgesamt geringste Caspase-1-Wert gemessen werden. Bei den Kontrollen hingegen ist die Konzentration in beiden Ansätzen etwa gleich gering.

Die zusätzliche Stimulation mit LPS und ATP im Colchizin-Ansatz führt bei den Kontrollen zu einer Erhöhung der Werte auf etwa das gleiche Niveau wie bei der Stimulation mit LPS und ATP allein (93 pg/ml). Bei den heterozygot Gesunden führt die Stimulation mit Colchizin zusätzlich zu geringeren Werten als im Ansatz mit nur LPS und ATP (57 pg/ml zu 98 pg/ml, signifikant mit  $p=0,0312$ ). So ist es auch bei den Patienten, wobei die Differenz hier wesentlich größer ist (63 pg/ml zu 278 pg/ml, signifikant mit  $p=0,002$ ).

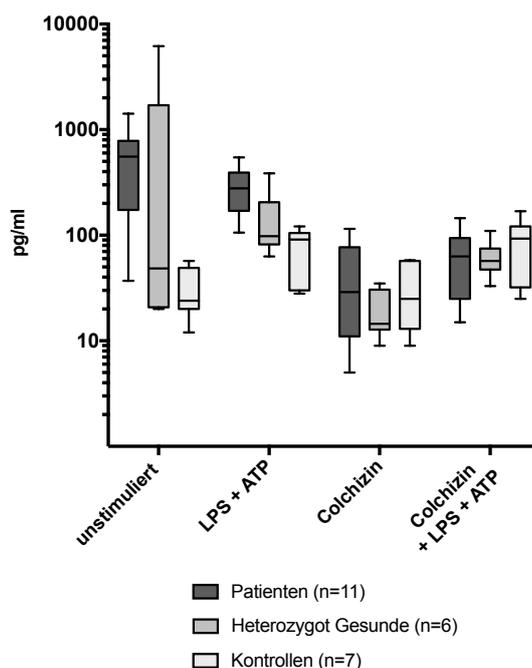


Abbildung 16. Caspase-1 in den Stimulationsansätzen. Kastendiagramm mit logarithmischer Skala. Median mit Interquartilsabstand, die Antennen zeigen die 5. und 95. Perzentile.

versus		Median (Spannweite) in pg/ml		p-Wert	Signifikanzniveau
<b>Patienten</b>					
unstimuliert	Colchizin	556 (37-1417)	29 (5-115)	0,002	**
	Col + LPS + ATP		63 (15-145)	0,0049	**
LPS + ATP	Colchizin	278 (106-547)	29 (5-115)	0,002	**
	Col + LPS + ATP		63 (15-145)	0,002	**
Colchizin	Col + LPS + ATP	29 (5-115)	63 (15-145)	0,04	*
<b>Heterozygot Gesunde</b>					
Colchizin	unstimuliert	14 (9-35)	48 (20-6191)	0,0312	*
	LPS + ATP		98 (63-386)	0,0312	*
Col + LPS + ATP	LPS + ATP	57 (33-110)	98 (63-386)	0,0312	*
	Colchizin		14 (9-35)	0,0312	*
<b>Kontrollen</b>					
unstimuliert	LPS + ATP	24 (12-57)	91 (28-121)	0,0312	*
	Col + LPS + ATP		93 (25-169)	0,0312	*
Colchizin	LPS + ATP	25 (9-58)	91 (28-121)	0,0312	*
	Col + LPS + ATP		93 (25-169)	0,0312	*
<b>unstimuliert</b>					
Patienten	Kontrollen	556 (37-1417)	24 (12-57)	0,0006	***
<b>LPS + ATP</b>					
Patienten	Het. Gesunde	278 (106-547)	98 (63-386)	0,0262	*
	Kontrollen		91 (28-121)	0,0003	***

Tabelle 25. Caspase-1 in den Stimulationsansätzen. Median und Spannweite in pg/ml sowie Signifikanzniveau der Vergleiche zwischen den Gruppen und zwischen den Ansätzen in den Gruppen (ausgenommen nicht signifikante Vergleiche).

## C. 6. Einzeldarstellung: Patient mit heterozygotem Genotyp

Ein Proband mit heterozygotem Genotyp wurde eingeschlossen und seine Blutzellen nach dem gleichen Prozedere untersucht. Die Ergebnisse sollen hier kurz dargestellt werden.

Der Patient ist dem Sozialpädiatrischen Zentrum bekannt und hier regelmäßig zur Betreuung.

Es handelt sich um einen zum Untersuchungszeitpunkt 24 Jahre alten männlichen Patienten, der eine M694V-Mutation in einem Allel des *MEFV*-Gens hat – genau wie die Probanden, die als „heterozygot Gesunde“ untersucht wurden. Seine Familie stammt aus der Türkei.

Bei Krankheitsbeginn war dieser Patient 6 Jahre alt und 10 Jahre, als die Therapie mit Colchizin begonnen wurde. Seine aktuelle Colchizindosis lag bei 1 mg pro Tag. Andere Medikamente nahm er nicht ein. Er gab an, im Monat etwa ein bis zwei Schübe mit FMF-Symptomatik zu haben. Ein Schub dauert seinen Angaben zufolge im Durchschnitt drei Tage. Während eines Schubs ist er bettlägerig und leidet unter Bauchschmerzen, Brustschmerzen und Gelenkentzündung, allerdings nicht unter Fieber. An chronischen Beschwerden leidet er nicht. Die Frage nach einer stattgefundenen Appendektomie verneinte er.

Der Patient gab an, in den letzten 14 Tagen unter einem leichten Infekt der oberen Atemwege gelitten zu haben, die Frage nach Fieber in den letzten 14 Tagen verneinte er jedoch.

Die Zelltrennung verlief bei diesem Probanden gut, es konnte eine Reinheit von 99,7 % neutrophiler Granulozyten erreicht werden. Es fanden sich lediglich 0,3 % Lymphozyten und weder Monozyten noch eosinophile Granulozyten in der aufgereinigten Probe. Eine Vitalitätsprüfung mit Trypanblaufärbung wurde nicht durchgeführt. Die Annexinfärbung und Messung am Durchflusszytometer ergab bei allen Ansätzen eine Vitalität von mindestens 96 % und eine maximale Apoptoserate von 2,5 %. Die Nekrose oder späte Apoptose waren mit maximal einem Prozent sehr gering.

Die Messung der Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit ergab einen Wert von 22 mm n.W. nach einer Stunde und lag damit im Normbereich. Das CrP des Patienten lag allerdings mit 81,3 mg/l deutlich über der Normwertgrenze von 5 mg/l.

Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie zeigt Abbildung 17. Der heterozygot kranke Patient zeigt in allen Messungen (CD62L-Kinetik und -Stimulation, CD11b-Stimulation) Werte, die denen der FMF-Patienten mit zwei krankheitsauslösenden Mutationen sehr ähneln. Die genauen Werte im Vergleich zu den Medianen der Patienten sind in Tabelle 26 zu lesen.

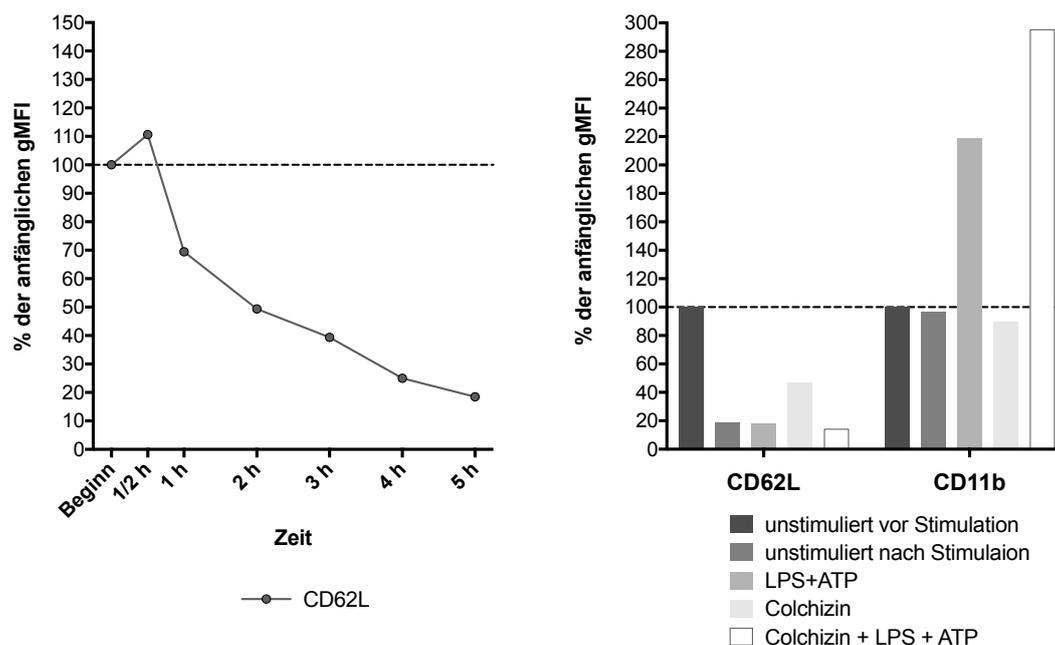


Abbildung 17. Ergebnisse der Durchflusszytometrie des heterozygot kranken Patienten. Abbildung 17a. zeigt die Zeitkinetik des Oberflächenmarkers CD62L über 5 Stunden bei unstimulierten Zellen. In Abbildung 17b. ist die Stimulation der Zellen nach Standardprotokoll zu sehen.

	Heterozygot Kranker	Median der FMF-Patienten
<b>CD62L – Kinetik</b>		
½ Stunde	110,6	110,1
1 Stunde	69,4	93,8
2 Stunden	49,3	47,7
3 Stunden	39,4	43,1
4 Stunden	25,0	31,1
5 Stunden	18,5	26,6
<b>CD62L – Stimulation</b>		
Unstimuliert nach Stimulation	18,5	31,4
LPS + ATP	17,7	27,0
Colchizin	46,4	54,5
Colchizin + LPS + ATP	14,1	16,9
<b>CD11b – Stimulation</b>		
Unstimuliert nach Stimulation	96,8	89,2
LPS + ATP	218,3	212,8
Colchizin	89,2	91,0
Colchizin + LPS + ATP	295,2	261,0

Tabelle 26. Ergebnisse der Durchflusszytometrie beim heterozygot kranken Patienten im Vergleich zum Median der Gruppe der FMF-Patienten. Ratio des jeweilig angegebenen Ansatzes zum Ansatz „unstimuliert vor Stimulation“ in Prozent.

Die Ergebnisse der ELISAs sind in Abbildung 18 dargestellt. Auch hier unterscheiden sich die Werte dieses Patienten mit nur einer Mutation zumindest in den Trends nicht von denen der Patientengruppe. Die Konzentrationen der Entzündungsmarker sind tendenziell sogar höher als in der Patientengruppe. Die Werte sind zum Vergleich in Tabelle 27 wiedergegeben.

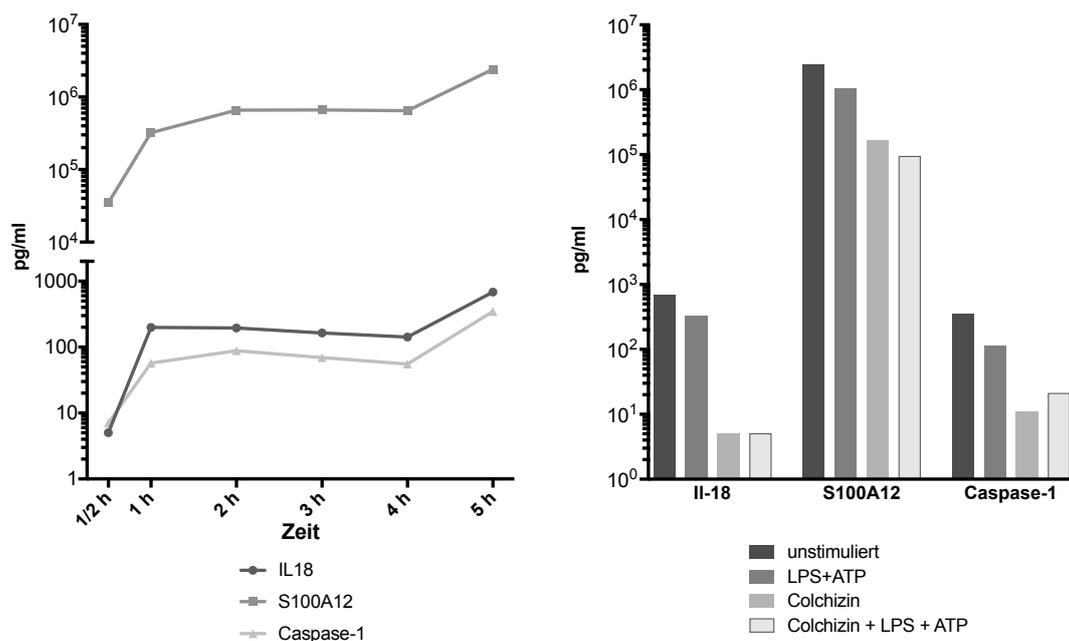


Abbildung 18. Messergebnisse der ELISAs des heterozygot kranken Patienten. In Abbildung 18a ist die Zeitkinetik der Zytokine IL-18, S100A12 und Caspase-1 über 5 Stunden dargestellt. Abbildung 18b zeigt die Messung dieser Zytokine nach Stimulation der Zellen nach Standardprotokoll.

	Heterozygot Kranker	Median der FMF-Patienten
IL18 – Kinetik, pg/ml		
½ Stunde	5	90
1 Stunde	199	397
2 Stunden	194	243
3 Stunden	163	294
4 Stunden	142	137
5 Stunden	682	358
IL18 – Stimulation, pg/ml		
Unstimuliert nach Stimulation	682	455
LPS + ATP	322	327
Colchizin	5	2
Colchizin + LPS + ATP	5	2
S100A12 – Kinetik, ng/ml		
½ Stunde	35	77
1 Stunde	320	108
2 Stunden	658	178
3 Stunden	660	162
4 Stunden	647	161
5 Stunden	2402	164
S100A12 – Stimulation, ng/ml		
Unstimuliert nach Stimulation	2402	2974
LPS + ATP	1024	2236
Colchizin	162	170
Colchizin + LPS + ATP	94	394
Caspase-1 – Kinetik, pg/ml		
½ Stunde	7	61
1 Stunde	57	203
2 Stunden	88	411
3 Stunden	69	161
4 Stunden	55	152
5 Stunden	347	275
Caspase-1 – Stimulation, pg/ml		
Unstimuliert nach Stimulation	347	556
LPS + ATP	111	278
Colchizin	11	29
Colchizin + LPS + ATP	21	63

Tabelle 27. Ergebnisse der ELISA beim heterozygot kranken Patienten im Vergleich zum Median der Gruppe der FMF-Patienten. Zeitverlauf und Stimulationsansätze. Angaben in pg/ml (IL-18 und Caspase-1) bzw. ng/ml (S100A12).

## C. 7. Relevante Unterschiede zwischen Homozygoten und kombiniert heterozygoten Patienten

In diesem Kapitel soll die Gruppe der FMF-Patienten differenziert nach dem speziellen Genotyp betrachtet werden. Es wird unterschieden zwischen den Patienten, die zwei gleiche Mutationen im *MEFV*-Gen tragen (M694V auf beiden Allelen, Homozygote), und denen, deren Mutationen sich auf den beiden Allelen an unterschiedlichen Stellen der DNA befinden (kombiniert Heterozygote). Tabelle 28 zeigt die Genotypen der eingeschlossenen Patienten.

Homozygote Patienten		Kombiniert Heterozygote Patienten	
M694V	n=5	M684V / V726A	n=2
		M694V / M680I	n=2
		M694V / A744S	n=1
		M694V, E148Q / V726A	n=1

Tabelle 28. Genotyp und Mutationen der 11 eingeschlossenen FMF-Patienten.

Beim CrP zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen den Homozygoten und allen weiteren Gruppen. Während der Median bei den kombiniert heterozygoten Patienten (3,65 mg/l), bei den gesund Heterozygoten (3,4 mg/l) und bei den Kontrollpersonen (0,7 mg/l) unter dem Normwert von 5 mg/l lag, hatten die Homozygoten einen deutlich erhöhten durchschnittlichen CrP-Wert von 35,4 mg/l im Median. Gegenüber den anderen Gruppen ergab sich somit eine statistisch signifikante Erhöhung des CrP der homozygoten FMF-Patienten gegenüber den heterozygot Gesunden und den kombiniert Heterozygoten ( $p=0,0043$ ) und zwischen Homozygoten und Kontrollen ( $p=0,0025$ ).

Einen ähnlichen Sachverhalt ergeben auch die Messungen des IL-18 im Serum. Die Konzentration des Zytokins ist bei den Homozygoten mit 8709 pg/ml im Median knapp signifikant ( $p=0,0173$ ) höher als bei den kombiniert Heterozygoten (2757 pg/ml), welche wiederum signifikant ( $p=0,0087$ ) höhere Werte aufweisen als die heterozygot Gesunden (Median 442 pg/ml). Wie oben beschrieben, weisen die Kontrollen mit einer medianen Konzentration von nur 189 pg/ml IL-18 im Serum mit statistischer Signifikanz die geringsten Werte auf.

Ebenso wurden auch in den Zellüberständen der Stimulationsansätze bei den homozygoten Patienten jeweils höhere IL-18-Konzentrationen gemessen als bei den kombiniert Heterozygoten. Dieser Unterschied ist sowohl im unstimulierten Ansatz (775 pg/ml zu 291 pg/ml,  $p=0,0303$ ) als auch bei Zugabe von Colchizin (14 pg/ml zu 2 pg/ml,  $p=0,0325$ ) knapp signifikant. Der Median der Homozygoten liegt aber in allen Ansätzen über dem der kombiniert Heterozygoten.

Dieses Muster ist – bei entsprechender grafischer Darstellung – bei nahezu allen gemessenen Parametern mehr oder weniger zu finden.

Eine Ausnahme stellt die Messung der Caspase-1 im Serum dar. Hier liegt der mediane gemessene Wert der kombiniert Heterozygoten nicht zwischen dem der Homozygoten (380 pg/ml) und der heterozygot Gesunden (263 pg/ml), sondern mit 204 pg/ml fast genauso niedrig wie der der Kontrollen (197 pg/ml). In den Stimulationsansätzen und bei der Kinetik sind die Abstufungen zwischen den vier verschiedenen Genotypen jedoch auch bei der Caspase-1 so, wie bei den anderen Parametern.

## D. Diskussion

### **D. 1. Erhöhte Entzündungsmarker beim FMF durch Aktivierung der Neutrophilen Granulozyten**

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Patienten mit Familiärem Mittelmeerfieber erhöhte Konzentrationen sowohl des klassischen Entzündungsmarkers CrP als auch weiterer inflammatorischer Zytokine und Biomarker wie S100A12 und IL-18 aufweisen und bestätigen damit einige vorangegangene Studien.

An dieser Stelle soll darauf hingewiesen werden, dass es sich bei den in dieser Arbeit untersuchten Patienten um solche handelt, die sich in einem stabilen Zustand der Erkrankung befinden. Das heißt, sie litten zum Zeitpunkt der Probenentnahme unter keinen Symptomen des FMF, insbesondere nicht unter Fieber oder Schmerzattacken, und waren mit Colchizin behandelt. Die *in vitro* an den Zellen der Probanden ermittelten Parameter spiegeln also eine subklinische Inflammation ohne akute klinische Krankheitszeichen wider.

Konkret konnte gezeigt werden, dass das C-reaktive Protein im Serum bei FMF-Patienten im Median über dem als Grenzwert zum Normalen angesehenen 5 mg/l liegt, was die Ergebnisse vorheriger Studien unterstützt.<sup>[35]</sup> Auch die weiteren im Serum gemessenen Proteine S100A12, IL-18 und Caspase-1 waren im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen signifikant erhöht. Insbesondere IL-18 wies im Serum der Patienten stark erhöhte Konzentrationen auf, die im Median mehr als das zwanzigfache des Medians der Kontrollen ausmachten. Dieses Ergebnis spricht eindeutig für inflammatorische Prozesse, die bei den FMF-Patienten – auch im symptomfreien Intervall – stattfinden.

Die Messung der drei inflammatorischen Mediatoren S100A12, IL-18 und Caspase-1 in den Überständen der unstimulierten neutrophilen Granulozyten zeigt ein sehr ähnliches Bild wie die Messung der jeweiligen Moleküle im Serum: die Konzentration bei den Patienten mit Familiärem Mittelmeerfieber liegt im Median bei allen Markern signifikant über der der Kontrollen. Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass die erhöhten Serumwerte nicht zuletzt auch durch eine unphysiologische Aktivierung der neutrophilen Granulozyten bedingt werden. Dass die neutrophilen Granulozyten als Teil des angeborenen Immunsystems die zellulären Mechanismen in der Pathophysiologie des Familiären Mittelmeerfiebers dominieren, weiß man bereits seit weit über 50 Jahren aus histologischen Untersuchungen.<sup>[10]</sup> Die neueren Erkenntnisse zur molekularen

Entstehung der Krankheitszeichen bestätigen dies kontinuierlich.<sup>[37, 116, 125]</sup> Ein Fokus dieser Arbeit lag daher unter anderem auf der Untersuchung der Inflammasomaktivität in den neutrophilen Granulozyten.

Die Stimulation der Zellen mit Lipopolysaccharid (LPS) und Adenosintriphosphat (ATP) führte bei den Zellen der gesunden Kontrollen zur Aktivierung der Granulozyten, also zu einer gesteigerten Sekretion von S100A12 und Caspase-1 sowie einem Anstieg von CD11b und einem Abfall von CD62L auf der Zelloberfläche. Lediglich die Sekretion von Interleukin-18 war bei den Zellen der gesunden Kontrollpersonen nicht erhöht. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Ergebnissen von Gohar et al.<sup>[36]</sup> und bestätigt eine allgemeine Annahme, dass Interleukin-18 physiologisch nicht von Granulozyten, sondern von Monozyten und Makrophagen freigesetzt wird.<sup>[126]</sup> Bei den Probanden mit Mutation im *MEFV*-Gen fand sich allerdings auch im Überstand der Granulozyten eine erhöhte Konzentration von Interleukin-18, und zwar sowohl nach Stimulation durch LPS und ATP, als auch ohne künstlich zugeführte Stimulation *in vitro*. Diese Beobachtung kann ein Hinweis darauf sein, dass Granulozyten von FMF-Patienten – und auch von heterozygoten Merkmalsträgern – IL-18 sezernieren, obwohl das ihrer normalen, physiologischen Funktion widerspricht. Diese vermehrte und unkontrollierte Zytokinfreisetzung führt dann zu einer weiteren inflammatorischen Kaskadierung.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass auch bei rheumatoider Arthritis (RA) Interleukin-18 von Neutrophilen freigesetzt wird. Die gleiche Arbeit fand auch heraus, dass diese vermehrte Sekretion von IL-18 zwar mit einer erhöhten Expression von Caspase-1 in den Granulozyten korreliert, dass diese Aktivierung jedoch unabhängig vom NLRP3-Inflammasom ist.<sup>[127]</sup> Mankan et al. wiesen 2012 nach, dass die NLRP3/ASC/Caspase-1-Achse in murinen Neutrophilen ablaufen kann.<sup>[128]</sup> Folglich stellt sich die Frage, ob es ein krankheitsverursachender Faktor bei der RA – und vielleicht auch beim FMF – ist, dass die Aktivierung der Caspase-1 und die konsekutive Sekretion von pro-inflammatorischem IL-18 unabhängig von den Regulationsmechanismen des NLRP3-Inflammasoms ablaufen kann. Eventuell ist beim FMF das dysregulierte Pyrin-Inflammasom für die die Aktivierung der Caspase-1 bei diesen Prozessen mit verantwortlich.

Eine in 2018 veröffentlichte Arbeit von Jamilloux et al. untersuchte die Konsequenzen der Mutation im *MEFV*-Gen auf das Pyrin-Inflammasom genauer und verglich die Reaktionen verschiedener Inflammasome auf relevante Stimuli – beispielsweise TcdB beim Pyrin-Inflammasom – zwischen Zellen mit mutiertem Pyrin und Pyrin vom Wildtyp. Das Pyrin-Inflammasom der genveränderten Zellen reagierte bereits auf geringere Konzentrationen TcdB mit einer gesteigerten Aktivität. Die Versuche wurden an Monozyten von FMF-Patienten und

gesunden Kontrollen durchgeführt und es wurde die Sekretion von IL-1 $\beta$  als Maß für die Inflammasomaktivität bestimmt. Das NLRP3- und NLRC4-Inflammasom reagierten auf ihre entsprechenden Stimuli beider Gruppen im gleichen Ausmaß. Schlussfolgernd sprechen die Autoren nicht von einer „Gain-of-Function“-Mutation beim FMF, bei der das mutierte Genprodukt ständig aktiv wäre. Stattdessen definieren sie die FMF-Mutationen eher als hypermorphe Mutationen, da sie die Schwelle für die Aktivierung des Pyrin-Inflammasoms senken und so zu einer vermehrten Entzündungsreaktion bereits auf geringere Stimuli führen.<sup>[129]</sup> Obwohl diese Versuche an Monozyten und nicht an den für die Pathogenese des FMF mindestens ebenso wichtigen Zellen, den neutrophilen Granulozyten, durchgeführt wurden, ist davon auszugehen, dass die Ergebnisse und Überlegungen das Pyrin-Inflammasom betreffend auch auf die Aktivität der Granulozyten übertragen werden können.

Neben der Sekretion von IL-18 durch Monozyten können auch sterbende Zellen das Vorläufermolekül pro-IL-18 freisetzen. Es wird dann extrazellulär in seine aktive Form umgewandelt. Diese Aufgabe übernehmen Proteasen, beispielsweise Proteinase 3, die von neutrophilen Granulozyten sezerniert werden.<sup>[126, 130]</sup> Dieser Weg der IL-18-Freisetzung erscheint hier jedoch unwahrscheinlich, da die Zellüberstände auf Apoptose und Nekrose untersucht wurden und nur sehr geringe Raten an toten Zellen gefunden wurden. Zudem hätten, wenn es zu einer Aktivierung von IL-18 auf diesem Wege gekommen wäre, auch die Konzentrationen von IL-18 in den Proben der gesunden Kontrollen erhöht sein müssen, denn die Raten an Zelltod unterschieden sich zwischen den Gruppen nicht signifikant.

Es wäre jedoch auch denkbar, dass die pathologische inflammatorische Aktivität der Granulozyten beim FMF auch zu einer vermehrten spontanen Degranulation und damit zur Freisetzung von Mediatoren aus Vesikeln – gewissermaßen auf einem alternativen Sekretionsweg, wie für das S100A12 postuliert wird – führt. So könnte auch pro-IL-18 freigesetzt werden, unabhängig von der Vitalität der Zellen und auch unabhängig vom Inflammasom. Dass Zellen von FMF-Patienten spontan eine große Menge verschiedener Mediatoren durch Degranulation freisetzen, konnten wir an weiterführenden Untersuchungen, deren Ergebnisse noch nicht publiziert sind, sehen. Unter anderem kam es auch zu einer signifikant vermehrten Sekretion von Proteinase 3. Ebenso wie es zur Degranulation von Vesikeln aus den Neutrophilen und damit zur Freisetzung von Mediatoren nach extrazellulär kommt, könnte es auch zum Einbau von Vesikeln in die Zellmembran kommen. Die in den Vesikelmembranen enthaltenen Proteine können so an die Zelloberfläche gelangen. Dieser Vorgang könnte die verstärkte Abspaltung von CD62L bei Aktivierung der Zellen erklären: Die sogenannte „Sheddase“ (von englisch „to shed“ – ablegen, abwerfen) ADAM17 (A Disintegrin and Metalloproteinase Domain 17) liegt in inaktiven Leukozyten vesikulär gespeichert

oder auf der Zelloberfläche in inaktiver Form vor. Bei Aktivierung wird, vermittelt unter anderem über Proteinkinase C, ADAM17 aus den Vesikeln in die Zellmembran eingebaut und aktiviert, woraufhin es zu dem von uns beobachteten starken Abfall von CD62L auf der Zelloberfläche kommen kann.<sup>[131, 132]</sup>

S100A12 und Caspase-1 werden im Gegensatz zu Interleukin-18 regelhaft von Granulozyten sezerniert. Dies zeigen die oben beschriebenen Ergebnisse der Stimulation der Zellen mit LPS und ATP in der Kontrollgruppe, indem es bei Stimulation auch bei den gesunden Probanden zur gesteigerten Sekretion kommt. LPS wird demnach als PAMP erkannt und der darauffolgende Zusammenbau eines Inflammasoms führt zur Aktivierung der Caspase-1. Die gezielte Aktivierung der Granulozyten durch die pro-inflammatorische Stimulation mit LPS und ATP führt auch zur erhöhten Expression und Freisetzung von S100A12 aus den Granulozyten.

In der Patientengruppe konnte eine Stimulation durch LPS und ATP nicht zu einer noch stärkeren Aktivierung der Granulozyten mit Erhöhung der Sekretion der gemessenen Biomarker führen. Auch diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen von Gohar et al.<sup>[36]</sup>

Die Messung der Oberflächenmarker auf den Granulozyten weist ebenso auf eine Aktivierung der Zellen durch LPS und ATP hin. Während die Messung von CD64 – sowohl mit als auch ohne Stimulation – zu keinen plausiblen Ergebnissen führte (die Daten werden hier nicht eigens gezeigt) und diese damit im Kontrast zu den Ergebnissen von Migita et al.<sup>[106]</sup> stehen, konnten bei der Messung von CD11b und CD62L signifikante Unterschiede zwischen den Werten mit und ohne Stimulation gemessen werden.

Dabei zeigte sich in der Expression von CD11b kein Unterschied zwischen den verschiedenen Probandengruppen. Die Zellen aller Gruppen reagierten im gleichen Maß mit einem Anstieg von CD11b auf Stimulation und unterschieden sich auch unstimuliert nicht voneinander. Dieses Ergebnis deckt sich mit der Beobachtung von Molad et al., wobei damals darüber hinaus gezeigt wurde, dass FMF-Patienten im akuten Krankheitsschub vermehrt CD11b auf den Neutrophilen aufweisen.<sup>[116]</sup>

Bei der Messung von L-Selektin fanden wir ebenso deutliche Hinweise auf eine Aktivierung der Granulozyten durch LPS und ATP. Bei allen Versuchsgruppen fand sich eine fast vollständige Abspaltung des Proteins von der Zelloberfläche. Molad et al. untersuchten in der oben genannten Arbeit das Blut von FMF-Patienten nicht nur auf das Vorkommen von CD11b, sondern auch von L-Selektin. Sie fanden dabei keine Unterschiede zwischen den Patienten und Kontrollpersonen.<sup>[116]</sup> Die in der hier vorliegenden Arbeit durchgeführten Messungen konnten in der Messung direkt nach Probenentnahme auch keinen signifikanten Unterschied an CD62L auf

den Granulozyten feststellen. Bei der Auswertung der Proben nach fünf Stunden Inkubation hingegen fiel ein deutlicher Abfall des Oberflächenproteins auf den Granulozyten der FMF-Patienten auf. Das heißt, nach der Inkubation waren die Patientenzellen maximal aktiviert, die Zellen der Kontrollen jedoch zeigten eine unveränderte Anzahl des Oberflächenproteins auf ihrer Zellmembran.

Betrachtet man zusammenfassend die Menge und Vielfalt der verschiedenen Mediatoren, die im Inflammationsprozess des Familiären Mittelmeerfiebers von den neutrophilen Granulozyten exprimiert und sezerniert werden, lässt sich schlussfolgern, dass die Zellen in ihrer pathologischen Aktivierung auf vielen Wegen zur entzündlichen Reaktion beitragen. Über eine wahrscheinliche Aktivierung des dysregulierten Pyrin-Inflammasoms kommt es über die Aktivierung der Caspase-1 zur Übersekretion von IL-18. Weiterhin sezernieren die Granulozyten massiv S100A12, was wahrscheinlich über einen alternativen, vom Golgi-Apparat unabhängigen, Sekretionsweg geschieht. Über diesen Weg, beziehungsweise durch eine spontane Degranulation der Zellen kommt es allem Anschein nach auch zur Freisetzung weiterer Mediatoren aus den Zellen. Nicht zuletzt kommt es *in vitro* ohne zusätzliche Stimulation zu einer erheblichen Abspaltung von L-Selektin von der Oberfläche der Zellen der FMF-Patienten, wofür die spontane Aktivierung der Sheddase ADAM17 verantwortlich sein könnte.

Wie die vorangegangenen Ausführungen zeigen, ist es noch Gegenstand der Forschung, wie genau die vielen einzelnen pro-inflammatorischen Prozesse ineinandergreifen und dann durch Dysregulation zur überschießenden Entzündungsreaktion führen.

## **D. 2. CD62L im Zeitverlauf und sein Potential als neuer Biomarker für das Familiäre Mittelmeerfieber**

Die oben beschriebene Beobachtung, dass CD62L auf den Zellen der FMF-Patienten direkt nach Probenentnahme wesentlich stärker vorhanden ist als nach fünf Stunden Inkubation, wurde durch gezielte Messungen im Zeitverlauf der Inkubation genauer untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass initial die reale Anzahl an CD62L auf den Granulozyten bei den Patienten etwas höher lag als in den anderen beiden Gruppen (mediane gMFI: Patienten 2036, heterozygot Gesunde 1776, Kontrollen 1808 – der Unterschied ist statistisch nicht signifikant). L-Selektin auf den Granulozyten der FMF-Patienten wird dann allerdings abgespalten und die gMFI beginnt zu sinken. Nach circa zwei Stunden Inkubation sieht man bereits einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen, der sich im Verlauf noch intensiviert. Nach vier Stunden ist der Unterschied zwischen allen Gruppen signifikant bis hochsignifikant. Dabei ist auf den Zellen der

FMF-Patienten kaum noch CD62L zu messen, bei den gesunden Probanden mit einer Mutation im *MEFV*-Gen ist der Wert abgefallen, jedoch nicht so stark, und bei den Kontrollpersonen fand keine Abspaltung während der Inkubation ohne Stimulation statt. Nach vier Stunden etwa beginnt auch bei den Kontrollen ein leichter Abfall durch Abspaltung des Oberflächenmarkers von den Granulozyten.

Dieses Phänomen wird hier erstmals beschrieben und zeigt, dass die Beobachtungen von Molad et al. aus dem Jahr 2004<sup>[116]</sup> gewissermaßen unvollständig waren und lässt andere Schlussfolgerungen zur Expression von CD62L auf den Neutrophilen beim FMF zu. Tatsächlich zeigen die Zellen hier ein ähnliches Muster wie bei der Sekretion der Zytokine IL-18, S100A12 und Caspase-1: bereits ohne Anregung von extern sind die Zellen der Patienten auf einem hohen Aktivitätsniveau, welches durch Stimulation durch LPS und ATP kaum noch erhöht werden kann.

Wie oben bereits erwähnt, ist CD62L – oder L-Selektin – ein Transmembranprotein auf Leukozyten. Seine Expression erfolgt konstitutiv, sodass für die Regulation Prozesse auf post-translationaler Ebene vermutet werden.<sup>[109]</sup> Diese die Aktivität des Rezeptors auf der Zelloberfläche regulierenden Abläufe sind noch nicht vollständig erforscht. Zum einen kann die Konfiguration und damit die Aktivität des Rezeptors von intrazellulär durch zytosolische Moleküle beeinflusst werden, wobei beispielsweise Calmodulin hemmend, verschiedene Proteinkinase-C-Isoenzyme aktivierend wirken. Zum anderen führt vor allem eine Abspaltung des extrazellulären Teils von L-Selektin durch ADAM17 zur Regulation der Aktivität. Der abgespaltene Teil – sL-Selektin – kann im Serum gemessen werden. Bei Gesunden beträgt die Konzentration des löslichen L-Selektins im Serum etwa 0,7 bis 1,5 µg/ml, bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen wie Lupus Erythematoses oder dem Primären Sjögren-Syndrom wurden hingegen Konzentrationen von 2 bis 3 µg/ml gemessen.<sup>[133]</sup> Die Messung von sL-Selektin im Serum von FMF-Patientin wurde in der Literatur bisher noch nicht beschrieben. Eine Aktivierung von Neutrophilen durch einen pro-inflammatorischen Stimulus, zum Beispiel durch TNF $\alpha$  oder die Erkennung von PAMPs durch Toll-like Rezeptoren, führt physiologisch zu einer Abspaltung des extrazellulären Teils von CD62L innerhalb von Minuten.<sup>[131]</sup> *In vivo* kann die Abspaltung auch durch das Binden der Leukozyten an endotheliale Liganden während des Adhäsions- und Transmigrationsprozesses erfolgen.<sup>[133]</sup>

Da die hier beobachtete Reaktion *in vitro* stattfand, kann der Abspaltungsprozess nicht durch Adhäsion, also Bindung an das Endothel erklärt werden. Es ist wahrscheinlich, dass bei den Granulozyten der FMF-Patienten durch eine allgemeine Aktivierung und Degranulation, wie oben

beschrieben, auch ADAM17 aus intrazellulären Vesikeln in die Zellmembran eingebaut und aktiviert wird und es dadurch zur Abspaltung von CD62L auf der Oberfläche der Zellen kommt. Hierdurch wird in der Zelle eine weitere Aktivierung angeregt, was wiederum zu neuerlichen proinflammatorischen Prozessen führt. Über die genauen Signalkaskaden, die durch die Abspaltung von L-Selektin intrazellulär angeregt werden, ist noch wenig bekannt. Wahrscheinlich kommt es zu einer Interaktion des membranständigen Teils mit einer Proteinkinase C und der Auslösung der Ras-Signalkaskade.<sup>[109]</sup>

Es ist weiterhin bekannt, dass eine Abnahme von CD62L auf den Zellen mit einer Zunahme von MAC-1 (CD18/CD11b) korreliert.<sup>[134]</sup> Wie oben beschrieben, bindet MAC-1 an ICAM-1 auf Endothelzellen, dessen Expression wiederum durch die Sekretion von S100A8/A9 und wahrscheinlich auch S100A12 angeregt wird.

Obwohl die Kenntnisse über viele der komplexen Vorgänge um das Oberflächenprotein CD62L noch lückenhaft sind, wird dennoch klar, dass eine Aktivierung der Neutrophilen mit einer Abspaltung des extrazellulären Teils dieses Proteins einhergeht und dass darauf weitere proinflammatorische Signalkaskaden initiiert werden.

Auch wenn die genauen Ursachen und Folgen des beobachteten Phänomens noch nicht bekannt sind, könnten die in dieser Arbeit erstmals festgestellten Zusammenhänge zwischen dem Abspalten von CD62L von der Oberfläche der Granulozyten innerhalb einiger Stunden Inkubation *in vitro* und dem Genotyp des *MEFV*-Gen betreffend eine neue Möglichkeit für ein einfaches und schnelles Screening auf das Familiäre Mittelmeerfieber bieten. Natürlich bedarf es noch weiterer Forschung und Validierung, bis eine solche Methode in der klinischen Praxis umgesetzt werden kann. Es sollte aber geprüft werden, ob dieses Phänomen tatsächlich isoliert und spezifisch beim Familiären Mittelmeerfieber auftritt, oder ob die neutrophilen Granulozyten dieses Verhalten auch bei anderen Erkrankungen aus dem autoinflammatorischen Formenkreis zeigen. Die Sensitivität und Spezifität von CD62L als Biomarker für das FMF und den *MEFV*-Genotyp sollten ermittelt werden.

Auf das oben beschriebene Phänomen aufmerksam geworden, wurde auch die Sekretion der anderen gemessenen Biomarker im Zeitverlauf betrachtet. Hier traten allerdings keine statistisch relevanten oder nennenswerten Beobachtungen zu Tage, weder im Vergleich der Probandengruppen untereinander noch die einzelnen Messzeitpunkte betreffend. Somit könnte das unterschiedliche Verhalten von CD62L auf Granulozyten von Personen mit und ohne Mutation im *MEFV*-Gen im Zeitverlauf von fünf Stunden nach Inkubation als Unterscheidungsmerkmal in der Differentialdiagnostik des Familiären Mittelmeerfiebers dienen.

### **D. 3. Hemmung der inflammatorischen Reaktion durch Colchizin *in vitro***

Colchizin ist das Mittel der Wahl zur Behandlung der Symptome und Vorbeugung der Langzeitfolgen des Familiären Mittelmeerfiebers. In den für diese Arbeit durchgeführten Versuchen wurde es auf sein Potenzial, die inflammatorische Reaktion *in vitro* zu hemmen, getestet.

Tatsächlich ließ sich beobachten, dass die Zugabe von Colchizin zu den Stimulationsansätzen die Sekretion der gemessenen Zytokine und inflammatorischen Mediatoren wirksam unterdrücken konnte. Konkret ergaben die Versuche, dass die Sekretion von Interleukin-18 und S100A12 durch die Behandlung der Zellen mit Colchizin komplett blockiert werden konnte. Sowohl die spontane, unstimulierte Übersekretion dieser Zytokine durch die Granulozyten der FMF-Patienten, als auch die reaktive Sekretion der mit LPS und ATP stimulierten Zellen aller Versuchsgruppen konnte nicht beobachtet werden, wenn dem Ansatz zuvor Colchizin zugegeben wurde. Die Messung von Caspase-1 ergab zwar auch die niedrigsten Sekretionswerte in dem Ansatz, der mit Colchizin allein behandelt wurde, jedoch konnte das Medikament hier nicht die Aktivierung der Zellen durch LPS und ATP unterdrücken. Vor allem in der Kontrollgruppe ist hier die Caspase-1-Sekretion ebenso hoch wie durch die alleinige Stimulation mit LPS und ATP. Bei den Patienten jedoch bleibt der Grad der Aktivierung durch LPS und ATP bei Zugabe von Colchizin hinter der spontanen Übersekretion von Caspase-1 durch die unstimulierten, unbehandelten Zellen zurück.

Die Expression der Oberflächenmarker konnte durch Colchizin *in vitro* nicht so stark beeinflusst werden wie die Sekretion der Zytokine. Das Abspalten von CD62L von der Zelloberfläche konnte Colchizin in keinem Ansatz und in keiner der drei Versuchsgruppen verhindern. In der Gruppe der Kontrollen und der heterozygot Gesunden führt sogar die Behandlung der Zellen mit Colchizin allein zu einer Verminderung von messbarem L-Selektin im Vergleich zur unbehandelten Probe. Die Zellen der FMF-Patienten profitieren zwar von einer Behandlung mit Colchizin allein im Sinne einer verminderten Abspaltung von CD62L im Vergleich zur unbehandelten Probe, diese protektive Wirkung kann jedoch bei einer zusätzlich zugefügten Stimulation mit LPS und ATP nicht beibehalten werden.

Auf die Expression von CD11b auf der Zelloberfläche hatte Colchizin in keiner Versuchsgruppe eine Wirkung. Das heißt, Colchizin allein führt zu keiner gesteigerten Expression des Oberflächenmarkers und andererseits konnte es einen Anstieg durch LPS und ATP nicht verhindern.

Die vorliegende Arbeit bestätigt und bekräftigt damit die Ergebnisse von Gohar et al. zur Wirksamkeit von Colchizin auf die Sekretion von IL-18, S100A12 und Caspase-1 *in vitro*.<sup>[36]</sup> Van

Gorp et al. und auch Park et al. führten ebenso ähnliche Versuche durch, allerdings nicht an neutrophilen Granulozyten, sondern an humanen Monozyten (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) und murinen Makrophagen (BMDM, bone marrow-derived macrophages).<sup>[79, 135]</sup> So konnte gleichfalls festgestellt werden, dass die Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-1 $\beta$  und IL-18 durch die Zugabe von Colchizin gehemmt werden kann.

Es gibt viele Ansatzpunkte für die Erklärung der Wirksamkeit von Colchizin beim Familiären Mittelmeerfieber. Für den Zusammenhang des Zytoskeletts und insbesondere der Mikrotubuli mit der Pathophysiologie der Erkrankung gibt es bereits einige Hinweise und Ergebnisse. Nachdem beispielsweise schon lange bekannt ist, dass Wildtyp-Pyrin in den Leukozyten an Tubulin- und Aktinfilamente bindet<sup>[78]</sup>, ist in der letzten Zeit durch neuere Studien das Interesse an diesem Thema wieder verstärkt. Van Gorp et al. konnten in der bereits erwähnten Arbeit feststellen, dass der Zusammenbau des Pyrin-Inflammasoms in Zellen mit mutiertem Pyrin zwar unabhängig vom Zytoskelett ablaufen kann, dass jedoch Colchizin dennoch eine hemmende Wirkung auf die Zytokin-Sekretion hat. Schlussfolgernd muss Colchizin noch eine weitere Wirkung, die diese Vorgänge blockieren kann, besitzen. Diese Wirkung scheint außerdem spezifisch für Colchizin zu sein, denn andere Substanzen mit Wirkung auf das Zytoskelett – beispielsweise Inhibitoren der Aktinpolymerisierung oder des Mikrotubulin-abbaus (wie Paclitaxel) – hemmten die gemessene IL-1 $\beta$ -Sekretion nicht.<sup>[79]</sup> Eine mögliche Antwort könnte die zur etwa gleichen Zeit veröffentlichte Arbeit von Park et al. geben. Auch hier wird der Effekt des Colchizins auf die IL-1 $\beta$ -Produktion von humanen und murinen Zellen mit und ohne *MEFV*-Mutation mit dem gleichen Ergebnis getestet. Die weiteren Versuche der Arbeit konzentrieren sich auf die Rolle der RhoA-Modulation bei der Aktivierung des Pyrin-Inflammasoms und welche molekularen Folgen diese hat.<sup>[135]</sup> Colchizin kann durch Destabilisierung der Mikrotubuli die Rho-GTPase aktivieren, was eine Aktivierung des Pyrin-Inflammasoms unmöglich macht. Im Umkehrschluss führt eine Inaktivierung von RhoA, zum Beispiel durch verschiedene Bakterientoxine, zu einer Aktivierung des Pyrin-Inflammasoms und so zu einer Abwehrreaktion. Beim FMF könnten durch Mutationen am Pyrinmolekül Bindungsstellen für Proteinkinasen blockiert sein, wodurch es nicht zur Phosphorylierung kommen kann. Dadurch ist die Aktivierungsschwelle für das Pyrin-Inflammasom herabgesetzt, was zu einer überschießenden inflammatorischen Reaktion führt.<sup>[135]</sup>

Die Wirkung des Colchizins beim FMF könnte also dadurch begründet sein, dass durch die Destabilisierung des Zytoskeletts RhoA aktiviert und damit Pyrin inaktiviert wird und nicht darin, dass – später in der Signalkaskade – der Zusammenbau des Pyrin-Inflammasoms gestört wird. Dieser ist beim mutiertem Pyrin tatsächlich unabhängig von den Mikrotubuli. Die bei der

Erkrankung ebenso nachgewiesen stark erhöhte Sekretion von S100A12 erfolgt primär unabhängig vom Inflammasom auf einem alternativen Sekretionsweg. Dieser ist jedoch ebenso abhängig vom Zytoskelett – es wurde gezeigt, dass sich das Protein nach Aktivierung der Zellen an den Mikrotubuli und an der Zellmembran anlagert.<sup>[95]</sup>

Die Abspaltung von CD62L durch Colchizin konnte in den in dieser Arbeit geschilderten Versuchen nicht verhindert werden. Ein möglicher Erklärungsansatz hierfür wäre, dass dieser inflammatorische Prozess unabhängig vom Zytoskelett stattfindet und damit durch Colchizin nicht zu beeinflussen ist. Die Expression von CD62L erfolgt konstitutiv, also ohne Beeinflussung durch pro-inflammatorische Prozesse. Zur Abspaltung kommt es bei Aktivierung der Zelle, nachdem die Sheddase ADAM17 aus Vesikeln in die Zellmembran eingebaut und aktiviert wurde.

Es ist wichtig herauszustellen, dass die in den Versuchen verwendeten Konzentrationen von 5 µl Colchizin auf 1 ml Zellsuspension mit jeweils 5 Millionen Zellen deutlich über den *in vivo* im Serum herrschenden Verhältnissen bei Einnahme einer für die Therapie des FMF üblichen Dosis liegen. Bei einer Einnahme von Colchizin in so hohen Dosen ist von einer toxischen Reaktion mit verschiedenen Schädigungen des Organismus auszugehen.<sup>[136]</sup> Es konnte jedoch beobachtet werden, dass sich Colchizin *in vivo* in den Leukozyten anreichert, sodass dies eine Erklärung dafür sein könnte, dass die orale Therapie auch schon mit wesentlich geringeren Dosen wirksam sein kann.<sup>[137]</sup> Des Weiteren ist bei der Interpretation der Ergebnisse zu beachten, dass die Patienten alle stabil mit Colchizin vorbehandelt waren, die Zellen also womöglich schon angereichert hatten.

#### **D. 4. Gendosis-Wirkungsprinzip beim FMF**

In nahezu allen in dieser Arbeit vorgenommenen Messungen zeigt sich eine mehr oder weniger deutliche Graduierung der Messwerte nach Genotypen: die Proben der FMF-Patienten weisen jeweils die deutlichsten Inflammationswerte – wie Erhöhung des CrP, vermehrte Sekretion von Zytokinen in Serum und Zellüberständen und erhöhte Anzahl an inflammatorischen Oberflächenproteinen auf den Granulozyten – auf. Die gesunden Kontrollen liegen mit allen gemessenen Werten im Normbereich beziehungsweise am niedrigsten. Die Gruppe der klinisch gesunden Träger einer *MEFV*-Mutation befindet sich mit ihren Werten zwischen diesen beiden Fraktionen.

Dieses Phänomen wird in dieser Arbeit nicht zum ersten Mal beobachtet und ein Zusammenhang zwischen Genotyp und Phänotyp wird schon lange vermutet, obwohl eine solche Vermutung auch im Konflikt mit der traditionellen Ansicht stand, das Familiäre Mittelmeerfieber sei eine autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung.

Bereits 1999 stellten Tunca et al. eine solche Abstufung mit der gleichen Einteilung der Probanden wie in dieser Arbeit bei der Messung des CrP und SAA fest. Schon damals wurde postuliert, dass klinisch gesunde Träger einer *MEFV*-Mutation scheinbar eine subklinische Inflammation oder höhere Anfälligkeit für entzündliche Reaktionen aufweisen könnten. Außerdem konnte gezeigt werden, dass auch FMF-Patienten mit gutem Ansprechen auf die Colchizin-Therapie und ohne aktive Krankheitszeichen erhöhte Entzündungswerte aufwiesen, also zwar klinisch beschwerdefrei waren, aber laborchemisch dennoch Hinweise auf eine weiterhin bestehende Inflammation zeigten.<sup>[138]</sup> Eine ähnliche Untersuchung mit zusätzlicher Gensequenzierung nahmen 2006 Lachmann et al. vor. Sie kamen zu dem gleichen Ergebnis.<sup>[70]</sup>

Es gibt auch Autoren, die sich dem Thema weniger durch Bestimmung von Laborparametern, sondern mehr durch genaue Beobachtung und Evaluation des klinischen Phänotyps genähert haben. Die Arbeiten von Ozen et al., Kalyoncu et al. oder Federici et al. etwa untersuchten Probanden mit einer einzelnen Mutation im *MEFV*-Gen auf das Vorhandensein klinischer Symptome von FMF oder anderen Erkrankungen. Jede dieser Arbeiten findet klinische oder subklinische Auffälligkeiten in diesem Kollektiv an Probanden, insbesondere eine scheinbare Prädisposition zu inflammatorischen Reaktionen im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen. Außerdem sehen Kalyoncu et al. und Federici et al. einen Gendosiseffekt im Vergleich zu FMF-Patienten mit zwei mutierten Allelen im *MEFV*-Gen.<sup>[71, 72, 139]</sup>

Neuere Arbeiten untersuchen genauer die Zytokinsekretion in Abhängigkeit vom Genotyp und eventuelle Mechanismen der zugrunde liegenden Pathophysiologie. So konnte gezeigt werden, dass Monozyten von gesunden Probanden mit einer einzelnen Mutation im *MEFV*-Gen bei Stimulation mit LPS weniger Interleukin-1 $\beta$  produzieren als die Zellen von (zum Abnahmezeitpunkt symptomfreien) FMF-Patienten, jedoch mehr als solche von gesunden Kontrollpersonen ohne Mutation. Eine genauere Aufschlüsselung der Genotypen der Probanden entsprechend der einzelnen Mutationen mit unterschiedlicher Penetranz gab sogar Hinweise auf noch differenziertere Korrelationen.<sup>[68]</sup> Lieber et al. analysierten S100A12-Serumwerte von klinisch gesunden Heterozygoten und wiesen signifikant erhöhte Konzentrationen des Biomarkers gegenüber gesunden Kontrollen nach.<sup>[69]</sup> In der oben erwähnten Arbeit von Gohar et al. konnte schließlich in einem größeren Kollektiv für die Entzündungsmarker S100A12 und Interleukin-18

im Serum und für weniger Probanden auch aus den Zellüberständen von Granulozyten das gleiche Kontinuums-Phänomen festgestellt werden, wie schon bei Omenetti et al. für IL-1 $\beta$  aus Monozyten.<sup>[36]</sup>

Die für die vorliegende Arbeit erhobenen Ergebnisse reihen sich in die bisherigen Entdeckungen ein und unterstützen damit schlussfolgernd weiterhin die Hypothese des Gendosis-Wirkungseffektes beim Familiären Mittelmeerfieber. Es wurde hier – nicht zuletzt aufgrund der geringeren Fallzahl – eine nicht ganz so differenzierte Gruppierung der Probanden vorgenommen, sondern unterschieden zwischen „FMF-Patienten mit 2 Mutationen im *MEFV*-Gen“, „Gesunde mit einer Mutation im *MEFV*-Gen“ und „Gesunde Kontrollen ohne Mutation“. Die Lokalisation der Mutationen spielte in dieser Aufteilung keine Rolle. Die untersuchten Patienten glichen sich jedoch in ihrer Krankheitsaktivität und ihrem Therapiestatus: alle eingeschlossenen Patienten waren stabil unter Colchizinthherapie.

Am stärksten ist der Gendosiseffekt in den Konzentrationen im Serum und etwas abgeschwächer auch in den Granulozytenüberständen von IL-18 zu erkennen, wo die Unterschiede zwischen den Gruppen alle signifikant bis hochsignifikant sind und eine klare Abstufung abhängig vom Genotyp zeigen. Selbst wenn man hier die Gruppe der Patienten nochmals in Homozygote und kombiniert Heterozygote unterteilt, bleiben die Unterschiede zwischen den vier Gruppen signifikant zueinander: die höchsten Werte weisen die M694V-Homozygoten auf, darauf folgen die kombiniert Heterozygoten, darauf die heterozygot Gesunden (alle M694V) und die niedrigsten Werte haben die gesunden Kontrollen. Bei den Messungen der anderen Biomarker (CrP, S100A12, Caspase-1) im Serum und in den Überständen der Zellen sind vergleichbare Trends zu erkennen, auch wenn die Unterschiede sich nur teilweise signifikant darstellen.

In dieser Arbeit konnte außerdem erstmals gezeigt werden, dass der Oberflächenmarker CD62L während der Inkubation der Granulozyten bei FMF-Patienten signifikant abfällt. Auch diese Beobachtung unterstreicht deutlich den Gendosiseffekt. Während die Zellen der gesunden Kontrollen unter den gleichen Umständen in nur sehr geringem Maße einer Abspaltung von CD62L unterliegen, geschieht der Prozess bei den heterozygot Gesunden in einem stärkeren Maß, jedoch nicht so sehr wie bei den Patienten, wobei alle Unterschiede signifikant bis hochsignifikant zueinander sind.

Als Beispiel dafür, dass diese Beobachtungen zwar einen gewissen Durchschnitt aufzeigen, es jedoch durchaus Abweichungen davon gibt, ist hier der von uns untersuchte heterozygot kranke Patient anzumerken. Genau wie die Probanden in der Gruppe „heterozygot Gesunde“ ist bei ihm

die Mutation M694V auf einem Allel im *MEFV*-Gen festgestellt worden. Dennoch zeigt er einen Phänotyp, der dem der erkrankten homozygoten FMF-Patienten entspricht – sowohl klinisch als auch laborchemisch.

Es gibt verschiedene Überlegungen zu den Mechanismen, die den Gendosis-Wirkungseffekt erklären könnten, sowie Theorien zu den Gründen hierfür. Wie oben bereits mehrfach beschrieben, rückt man bei der Einordnung des Erbganges des Familiären Mittelmeerfiebers immer mehr von der Bezeichnung „rezessiv“ ab und spricht vielmehr vom Vorliegen einer Gain-of-Function-Mutation oder, wie erst kürzlich von Jamilloux et al. diskutiert, von einer hypermorphen Mutation.<sup>[129]</sup> In jedem Fall führt eine entsprechende Mutation im *MEFV*-Gen zu einer vermehrten Aktivität des Pyrin-Inflammasoms. Dabei scheint eine einzelne Mutation in den meisten Fällen lediglich subklinische Inflamationsreaktionen auszulösen, wohingegen es bei Betroffenen mit zwei mutierten Allelen dann mit hoher Wahrscheinlichkeit auch klinisch zur vollen Ausprägung des Krankheitsbildes kommt. Die zugrundeliegenden pathophysiologischen Mechanismen für die verschiedenen Ausprägungsvarianten können bisher nur vermutet werden. Möglicherweise existieren weitere Gene, die modifizierend auf die Pathophysiologie und somit auf den klinischen Phänotyp wirken. Auch Umweltfaktoren können einen Einfluss haben.

Betroffene des Familiären Mittelmeerfiebers haben ohne Behandlung eine deutlich eingeschränkte Lebenserwartung. Dennoch kann die Erkrankung seit mehreren tausend Jahren fortbestehen und die Überträgerrate ist in den entsprechenden Verbreitungsregionen hoch.<sup>[12]</sup> Diese Tatsache führte zu der Überlegung, dass zumindest heterozygote Mutationsträger von einem Selektionsvorteil profitieren könnten. Es gibt Studien, die bei Heterozygoten beispielsweise eine geringere Prävalenz von Asthma oder anderen atopischen Erkrankungen nachweisen konnten.<sup>[140, 141]</sup> Die Erkenntnisse zur Funktion des Pyrins in seiner Rolle als Inflammasom und zur pathophysiologischen Entstehung der dysregulierten Inflammation beim FMF konnten die Hypothese zum Selektionsvorteil stützen und weiter konkretisieren. Die ständige inflammatorische Aktivität in den Zellen der Träger einer Mutation im *MEFV*-Gen könnte demnach zum Einen Schutz vor stärkerer Aktivierung des Inflammasoms durch krankheitsverursachende Toxine von Erregern wie *Clostridium difficile*, *Clostridium botulinum*, *Burkholderia cenocepacia* oder *Yersinia pestis* – also Rho-GTPase-verändernden Bakterien – bieten. Andererseits könnte die höhere Sensibilität des mutierten Pyrins zu einer schnelleren und stärkeren Reaktion auf diese Erreger und damit zu einer besseren Abwehr führen.<sup>[62, 129]</sup> Somit könnte der Heterozygotenstatus in diesem Zusammenhang tatsächlich einen Vorteil bieten.

Unabhängig vom tieferen Verständnis der einzelnen zellulären oder molekularen Vorgänge, die zum Gendosis-Wirkungseffekt beim Familiären Mittelmeerfieber führen, können die Kenntnisse über seine Existenz bereits jetzt in den klinischen Alltag und das Management der Erkrankung implementiert werden. Die bei den heterozygoten Mutationsträgern offenbar bestehende permanente subklinische Inflammation ist ein Risikofaktor für verschiedene Erkrankungen und Beschwerden, wie zum Beispiel rheumatische Beschwerden<sup>[139]</sup> oder auch neoplastische Erkrankungen<sup>[142]</sup> und kardiovaskuläre Erkrankungen<sup>[143]</sup>. Daher ist es wichtig, auch bei klinisch gesunden Mutationsträgern die Entzündungsreaktion zu kontrollieren und gegebenenfalls, nach Abwägung der individuellen Risikokonstellation, auch medikamentös zu beschränken. Um die genauen Zusammenhänge und Korrelationen abzuschätzen bedarf es jedoch weiterer prospektiver Studien mit größeren Kohorten.

## **D. 5. Stärken und Schwächen dieser Arbeit**

Die Aussagekraft der Ergebnisse dieser Arbeit ist limitiert durch die geringe Fallzahl. Da es sich beim Familiären Mittelmeerfieber um eine – in unseren Breiten – seltene Erkrankung handelt, erschien das Ziel von mindestens sechs Probanden je Gruppe realistisch. Die Rekrutierung gestaltete sich nicht zuletzt aufgrund des jugendlichen Alters der Patienten aus unterschiedlichen Gründen nicht leicht.

Daher schien es sinnvoll, an den gewonnenen Proben ein umfangreiches Protokoll durchzuführen und viele verschiedene Werte zu bestimmen. Dabei umfasste die Arbeit im Labor einige unterschiedliche Methoden. Da die Studie eher explorativen Charakter hatte, wurde in der statistischen Auswertung dennoch darauf verzichtet, bei der Berechnung der Signifikanz eine mögliche Kumulation des alpha-Fehlers zu berücksichtigen.

Aufgrund der geringen Probandenzahl war es nicht möglich, die Genotypen und vorhandenen Mutationen der Patienten und heterozygot gesunden Probanden weiter und differenzierter zu unterteilen. In einer größeren Kohorte müsste man unterscheiden zwischen Homozygoten und kombiniert Heterozygoten – so wie es hier nur zum Teil erfolgen konnte – und auch die vorhandenen Mutationen sollten in verschiedene Schweregrade unterteilt werden.

Zwei der gemessenen Marker lieferten nicht aussagekräftige Ergebnisse. Bei der Messung von CD64 durch Durchflusszytometrie streuten die Werte in relativ hohem Maße und ohne erkennbare Regelmäßigkeit, sodass eine statistische Auswertung keine plausiblen Aussagen ergab. Ob dieses Resultat durch einen methodischen Fehler, zum Beispiel unkorrekte Färbeschemata, begründet war oder die Expression von CD64 auf neutrophilen Granulozyten tatsächlich solchen Schwankungen unterliegen kann, sollte an einer größeren Kohorte mit überarbeiteter Methodik

überprüft werden. Außerdem wurde entschieden, die Ergebnisse der Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit nicht weiter auszuwerten. Die statistische Auswertung ergab keine klaren Trends. Da die Messung der BSG einige logistische Schwierigkeiten brachte, konnte zuletzt nicht ausgeschlossen werden, dass das unklare Ergebnis nicht darauf zurückzuführen war. Daher wurde die Messung aus der Auswertung ausgeschlossen.

Aufgrund der Ergebnisse aus vorangegangenen Untersuchungen entschieden wir uns bei einem ohnehin schon aufwendigen Studiendesign gegen die Messung von IL-1 $\beta$ . Es gibt Hinweise darauf, beispielsweise in der Arbeit von Gohar et al., dass dieser Entzündungsmarker in den Granulozyten der Patienten mit Familiärem Mittelmeerfieber nur in geringem Maß sezerniert wird und sich die Mechanismen seiner Freisetzung und Aktivierung eventuell von denjenigen des IL-18 unterscheiden.<sup>[36]</sup>

Zu Beginn der Planung und Durchführung der hier beschriebenen Versuche waren die Erkenntnisse zur Rolle des *Clostridium difficile*-Toxins als Inhibitor der Rho-GTPase für die molekulare Pathogenese des FMF und Funktionsweise seines Schlüssel-Moleküls, des Pyrins, noch nicht bekannt. Daher entschieden wir uns für eine zweizeitige Stimulation der Zellen mit Lipopolysaccharid und Adenosintriphosphat. Diese Stimulantien sind geeignet, um das NLRP3-Inflammasom zu aktivieren. LPS als Signal 1 führt über eine Bindung an TLR4 zu einer Aktivierung des NF $\kappa$ B-Weges und damit zur Expression von NLRP3 als wichtigem Bestandteil des gleichnamigen Inflammasoms. ATP als Signal 2 führt dann zum Zusammenbau des NLRP3-Inflammasoms.<sup>[144]</sup> Aus heutiger Sicht wäre es sinnvoll, die Zellen gezielt mit dem Toxin zu stimulieren, welches wie oben beschrieben selektiv das Pyrin-Inflammasom aktiviert. Der Effekt der spontanen Aktivierung, wie wir ihn beobachten konnten, ist jedoch ohnehin unbeeinflusst von einer Stimulation der Zellen.

Die Ergebnisse der Arbeit können natürlich noch nicht ohne weiteres in die Praxis übertragen werden. Es bedarf nicht nur der Bestätigung an einer größeren Kohorte. Auch eine Validierung sollte zur Prüfung verschiedenster Parameter (Linearität, Spezifität, Robustheit, etc.) – am sinnvollsten entsprechend der international anerkannten Richtlinie ICH Q2(R1) („Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology“ der Internationalen Konferenz zur Harmonisierung der technischen Anforderungen für die Registrierung von Humanarzneimitteln (ICH)) – durchgeführt werden.

Des Weiteren steht eine mechanistische Untersuchung zu den genauen Abläufen auf zellulärer oder molekularer Ebene noch aus, um Schlussfolgerungen zur Pathophysiologie ziehen zu können. Diese Abläufe können hier nur spekuliert werden.

## D. 6. Schlussfolgerung und Ausblick

Ziel dieser Arbeit war es, die inflammatorische Reaktion, insbesondere die Zytokinsekretion durch die neutrophilen Granulozyten, beim Familiären Mittelmeerfieber, sowie die Reaktion der Zellen *in vitro* auf Colchizin zu beobachten und diese Beobachtungen in Zusammenhang zu bringen mit dem jeweiligen Genotyp der Probanden.

Bezugnehmend auf die zu Anfang gestellten Fragen lassen sich folgende Schlussfolgerungen ziehen:

1. Alle gemessenen Biomarker – mit der Ausnahme von CD11b – deuteten bei den untersuchten FMF-Patienten auf eine inflammatorische Reaktion hin. Sie wiesen erhöhte Werte von CrP, Interleukin-18, S100A12 und auch von Caspase-1 auf. Das bei Aktivierung von Neutrophilen sinkende CD62L auf der Zelloberfläche war bei den Patienten im Unterschied zu den Kontrollpersonen nach Inkubation der Zellen deutlich reduziert. Besonders aussagekräftig waren hierbei der bereits in vorherigen Studien etablierte Marker S100A12 und auch Interleukin-18 als Nachweis einer Inflammation. Das CrP hat eine Berechtigung als leicht und schnell zu bestimmender Wert im klinischen Alltag, dient aber nicht für die Differentialdiagnostik. Ein neuer, spezifischer Biomarker könnte CD62L in seinem Verhalten während der Inkubation sein. Der hier beschriebene Abfall innerhalb weniger Stunden ist so erstmals beobachtet worden und könnte sich, nach entsprechender Validierung, in der klinischen Praxis für eine weiterführende Differentialdiagnostik eignen.
2. Das Gendosis-Wirkungsprinzip konnte in der vorliegenden Arbeit in nahezu allen Ergebnissen nachgewiesen werden. Die Unterscheidung in drei Gruppen nach Genotyp – klinisch kranke, aber stabil eingestellte FMF-Patienten mit zwei Mutationen im *MEFV*-Gen, klinisch gesunde Träger einer Mutation sowie gesunde Kontrollpersonen ohne Mutation – konnte auch laborchemisch durch die Messwerte der verschiedenen Biomarker bestätigt werden. Damit kann gezeigt werden, dass es nicht nur klinisch kontinuierliche Abstufungen in der Ausprägung der Erkrankung in Abhängigkeit vom Genotyp gibt, sondern dass dieser auch in der Pathophysiologie die Mechanismen in ihrem Ausprägungsgrad beeinflusst. In der Folge konnte nachgewiesen werden, dass bei klinisch gesunden heterozygoten Mutationsträgern subklinisch eine Inflammationsreaktion abläuft, deren Langzeitfolgen beobachtet und genauer untersucht werden sollten.
3. Die Übersekretion der Zytokine S100A12, Interleukin-18 und Caspase-1 konnte bei den untersuchten FMF-Patienten in den Überständen der neutrophilen Granulozyten ebenso gemessen werden wie im Serum. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass es die Neutrophilen

sind, die vor allem für die Entzündungsreaktion beim Familiären Mittelmeerfieber verantwortlich sind. Die Biomarker wurden von den Betroffenen in einem Ausmaß sezerniert, das durch Stimulation nicht zu steigern war. Die Untersuchung der Sekretion im Zeitverlauf über fünf Stunden Inkubation zeigte nur für das Oberflächenprotein CD62L relevante Ergebnisse im Sinne von einem Unterschied zwischen den einzelnen Genotypen. Aus diesen Ergebnissen kann der Schluss gezogen werden, dass es bei der genetischen Erkrankung scheinbar trotz der Mutation nur eines einzelnen Proteins, des Pyrin, verschiedene Mechanismen gibt, die zur Inflammation und zum klinischen Bild führen. Zum einen führt die Veränderung im Pyrin zu einer Dysregulation des Pyrin-Inflammasoms, andererseits sind aber auch Vorgänge des alternativen Sekretionswegs des S100A12 betroffen – was auf eine Beteiligung des Zytoskeletts an der Pathophysiologie hinweist –, und zuletzt gibt es auch Veränderungen in der Abspaltung des Oberflächenproteins CD62L, wobei der Pathomechanismus hier nur spekuliert werden kann und ebenso auf einem der beiden vorgenannten Prinzipien beruhen könnte.

4. Colchizin kann *in vitro* nahezu alle diese Vorgänge hemmen oder zumindest stark reduzieren. Es blockiert nicht nur die spontane Übersekretion der Biomarker in den Zellen der FMF-Patienten, sondern auch die durch LPS und ATP induzierte Aktivierung in den Zellen aller Probanden. Über die Mechanismen, die zu dieser Wirkung führen, konnten die hier durchgeführten Versuche keinen Aufschluss geben. Jedoch bestätigen die Ergebnisse vorherige Studien.

Alle in dieser Arbeit beobachteten Ergebnisse und ihre Schlussfolgerungen daraus sind natürlich gekennzeichnet durch den explorativen, Hypothesen getriebenen und innovativen Charakter der Studie und der daraus resultierenden geringen Anzahl der Probanden. Sie bietet Ansätze für weitere Untersuchungen und Überlegungen. Fortführende Arbeiten können zum einen darauf ausgerichtet sein, den Ergebnissen einen Weg in den klinischen Alltag zu bereiten. So kann aus den Beobachtungen zu CD62L eventuell eine neue diagnostische Methode etabliert werden. Oder die Erkenntnisse über das Gendosis-Wirkungsprinzip beim Familiären Mittelmeerfieber können angewandt werden, um in Zukunft auch klinisch gesunde Heterozygote anti-inflammatorisch zu behandeln und so Spätfolgen zu verhindern. Zum anderen bietet die vorliegende Arbeit Ansatzpunkte für weitere Hypothesen und Forschungsfragen, wie etwa die Rolle des Zytoskeletts bei der Sekretion von S100A12, die Mechanismen der CD62L-Abspaltung oder die Auswirkungen der Mutation im *MEFV*-Gen auf diejenigen inflammatorischen Vorgänge, die nicht direkt vom Pyrin-Inflammasom abhängig sind.

## Literaturverzeichnis

1. Heller H, Sohar E, Sherf L. Familial Mediterranean fever. *AMA Arch Intern Med* 1958; 102(1):50-71.
2. Kucuk A, Gezer IA, Ucar R, Karahan AY. Familial Mediterranean Fever. *Acta medica (Hradec Kralove)* 2014;57(3):97-104.
3. Ben-Chetrit E, Touitou I. Familial mediterranean Fever in the world. *Arthritis Rheum* 2009;61(10):1447-1453.
4. Sugiura T, Kawaguchi Y, Fujikawa S, Hirano Y, Igarashi T, Kawamoto M, Takagi K, Hara M, Kamatani N. Familial Mediterranean fever in three Japanese patients, and a comparison of the frequency of *MEFV* gene mutations in Japanese and Mediterranean populations. *Mod Rheumatol* 2008;18(1):57-59.
5. Tunca M, Akar S, Onen F, Ozdogan H, Kasapcopur O, Yalcinkaya F, Tutar E, Ozen S, Topaloglu R, Yilmaz E, Arici M, Bakkaloglu A, Besbas N, Akpolat T, Dinc A, Erken E, Turkish FMFSG. Familial Mediterranean fever (FMF) in Turkey: results of a nationwide multicenter study. *Medicine (Baltimore)* 2005;84(1):1-11.
6. Ozen S, Karaaslan Y, Ozdemir O, Saatci U, Bakkaloglu A, Koroglu E, Tezcan S. Prevalence of juvenile chronic arthritis and familial Mediterranean fever in Turkey: a field study. *J Rheumatol* 1998;25(12):2445-2449.
7. Lainka E, Bielak M, Lohse P, Timmann C, Stojanov S, Von Kries R, Niehues T, Neudorf U. Familial Mediterranean fever in Germany: epidemiological, clinical, and genetic characteristics of a pediatric population. *Eur J Pediatr* 2012;171(12):1775-1785.
8. Marek-Yagel D, Berkun Y, Padeh S, Abu A, Reznik-Wolf H, Livneh A, Pras M, Pras E. Clinical disease among patients heterozygous for familial Mediterranean fever. *Arthritis Rheum* 2009;60(6):1862-1866.
9. Jeru I, Hentgen V, Cochet E, Duquesnoy P, Le Borgne G, Grimprel E, Stojanovic KS, Karabina S, Gateau G, Amselem S. The risk of familial Mediterranean fever in *MEFV* heterozygotes: a statistical approach. *PLoS One* 2013;8(7):e68431.
10. Sohar E, Gafni J, Pras M, Heller H. Familial Mediterranean fever. A survey of 470 cases and review of the literature. *Am J Med* 1967;43(2):227-253.
11. Samuels J, Aksentjevich I, Torosyan Y, Centola M, Deng Z, Sood R, Kastner DL. Familial Mediterranean fever at the millennium. Clinical spectrum, ancient mutations, and a survey of 100 American referrals to the National Institutes of Health. *Medicine (Baltimore)* 1998;77(4):268-297.
12. Ben-Chetrit E, Levy M. Familial Mediterranean fever. *THE LANCET* 1998;351:659-664.
13. Padeh S, Livneh A, Pras E, Shinar Y, Lidar M, Feld O, Berkun Y. Familial Mediterranean fever in children presenting with attacks of fever alone. *J Rheumatol* 2010;37(4):865-869.
14. Reissman P, Durst AL, Rivkind A, Szold A, Ben-Chetrit E. Elective laparoscopic appendectomy in patients with familial Mediterranean fever. *World J Surg* 1994;18(1):139-141; discussion 141-132.
15. Kees S, Langevitz P, Zemer D, Padeh S, Pras M, Livneh A. Attacks of pericarditis as a manifestation of familial Mediterranean fever (FMF). *QJM* 1997;90(10):643-647.
16. Garcia-Gonzalez A, Weisman MH. The arthritis of familial Mediterranean fever. *Semin Arthritis Rheum* 1992;22(3):139-150.

17. Lidar M, Doron A, Barzilai A, Feld O, Zaks N, Livneh A, Langevitz P. Erysipelas-like erythema as the presenting feature of familial Mediterranean fever. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2013;27(7):912-915.
18. Shohat M, Halpern GJ. Familial Mediterranean fever--a review. *Genet Med* 2011;13(6):487-498.
19. Lidar M, Yaqubov M, Zaks N, Ben-Horin S, Langevitz P, Livneh A. The prodrome: a prominent yet overlooked pre-attack manifestation of familial Mediterranean fever. *J Rheumatol* 2006;33(6):1089-1092.
20. Karadag O, Tufan A, Yazisiz V, Ureten K, Yilmaz S, Cinar M, Akdogan A, Erdem H, Ozturk MA, Pay S, Dinc A. The factors considered as trigger for the attacks in patients with familial Mediterranean fever. *Rheumatol Int* 2013;33(4):893-897.
21. Gidron Y, Berkovitch M, Press J. Psychosocial correlates of incidence of attacks in children with Familial Mediterranean Fever. *J Behav Med* 2003;26(2):95-104.
22. Ben-Chetrit E, Ben-Chetrit A. Familial Mediterranean fever and menstruation. *BJOG* 2001;108(4):403-407.
23. Pras M, Bronshpigel N, Zemer D, Gafni J. Variable incidence of amyloidosis in familial Mediterranean fever among different ethnic groups. *Johns Hopkins Med J* 1982;150(1):22-26.
24. Livneh A, Langevitz P, Shinar Y, Zaks N, Kastner DL, Pras M, Pras E. *MEFV* mutation analysis in patients suffering from amyloidosis of familial Mediterranean fever. *Amyloid* 1999;6(1):1-6.
25. Blum A, Gafni J, Sohar E, Shibolet S, Heller H. Amyloidosis as the sole manifestation of familial Mediterranean fever (FMF). Further evidence of its genetic nature. *Ann Intern Med* 1962;57:795-799.
26. Pras E, Livneh A, Balow JE, Jr., Pras E, Kastner DL, Pras M, Langevitz P. Clinical differences between North African and Iraqi Jews with familial Mediterranean fever. *Am J Med Genet* 1998;75(2):216-219.
27. Mor A, Shinar Y, Zaks N, Langevitz P, Chetrit A, Shtrasburg S, Rabinovitz E, Livneh A. Evaluation of disease severity in familial Mediterranean fever. *Semin Arthritis Rheum* 2005;35(1):57-64.
28. Zemer D, Livneh A, Danon YL, Pras M, Sohar E. Long-term colchicine treatment in children with familial Mediterranean fever. *Arthritis Rheum* 1991;34(8):973-977.
29. Ben-Chetrit E, Levy M. Reproductive system in familial Mediterranean fever: an overview. *Ann Rheum Dis* 2003;62(10):916-919.
30. Deger SM, Ozturk MA, Demirag MD, Aslan S, Goker B, Haznedaroglu S, Onat AM. Health-related quality of life and its associations with mood condition in familial Mediterranean fever patients. *Rheumatol Int* 2011;31(5):623-628.
31. Giese A, Ornek A, Kilic L, Kurucay M, Sendur SN, Lainka E, Henning BF. Anxiety and depression in adult patients with familial Mediterranean fever: a study comparing patients living in Germany and Turkey. *Int J Rheum Dis* 2017;20(12):2093-2100.
32. Livneh A, Langevitz P, Zemer D, Zaks N, Kees S, Lidar T, Migdal A, Padeh S, Pras M. Criteria for the diagnosis of familial Mediterranean fever. *Arthritis & Rheumatism* 1997;40(10):1879-1885.
33. Yalcinkaya F, Ozen S, Ozcakar ZB, Aktay N, Cakar N, Duzova A, Kasapcopur O, Elhan AH, Doganay B, Ekim M, Kara N, Uncu N, Bakkaloglu A. A new set of criteria for the diagnosis of familial Mediterranean fever in childhood. *Rheumatology* 2009;48(4):395-398.

34. Kondi A, Hentgen V, Piram M, Letierce A, Guillaume-Czitrom S, Kone-Paut I. Validation of the new paediatric criteria for the diagnosis of familial Mediterranean fever: data from a mixed population of 100 children from the French reference centre for auto-inflammatory disorders. *Rheumatology* 2010;49(11):2200-2203.
35. Korkmaz C, Ozdogan H, Kasapcopur O, Yazici H. Acute phase response in familial Mediterranean fever. *Ann Rheum Dis* 2002;61(1):79-81.
36. Gohar F, Orak B, Kallinich T, Jeske M, Lieber M, Von Bernuth H, Giese A, Weissbarth-Riedel E, Haas JP, Dressler F, Holzinger D, Lohse P, Neudorf U, Lainka E, Hinze C, Masjosthusmann K, Kessel C, Weinlage T, Foell D, Wittkowski H. Correlation of Secretory Activity of Neutrophils With Genotype in Patients With Familial Mediterranean Fever. *Arthritis Rheumatol* 2016;68(12):3010-3022.
37. Kallinich T, Wittkowski H, Keitzer R, Roth J, Foell D. Neutrophil-derived S100A12 as novel biomarker of inflammation in familial Mediterranean fever. *Ann Rheum Dis* 2010;69(4):677-682.
38. Shinar Y, Obici L, Aksentijevich I, Bennetts B, Austrup F, Ceccherini I, Costa JM, De Leener A, Gattorno M, Kania U, Kone-Paut I, Lezer S, Livneh A, Moix I, Nishikomori R, Ozen S, Phylactou L, Risom L, Rowczenio D, Sarkisian T, Van Gijn ME, Witsch-Baumgartner M, Morris M, Hoffman HM, Touitou I, European Molecular Genetics Quality N. Guidelines for the genetic diagnosis of hereditary recurrent fevers. *Ann Rheum Dis* 2012;71(10):1599-1605.
39. Giancane G, Ter Haar NM, Wulfraat N, Vastert SJ, Barron K, Hentgen V, Kallinich T, Ozdogan H, Anton J, Brogan P, Cantarini L, Frenkel J, Galeotti C, Gattorno M, Grateau G, Hofer M, Kone-Paut I, Kuemmerle-Deschner J, Lachmann HJ, Simon A, Demirkaya E, Feldman B, Uziel Y, Ozen S. Evidence-based recommendations for genetic diagnosis of familial Mediterranean fever. *Ann Rheum Dis* 2015;74(4):635-641.
40. Ozen S, Bilginer Y. A clinical guide to autoinflammatory diseases: familial Mediterranean fever and next-of-kin. *Nat Rev Rheumatol* 2014;10(3):135-147.
41. Padeh S. Periodic fever syndromes. *Pediatr Clin North Am* 2005;52(2):577-609, vii.
42. Kallinich T, Gattorno M, Grattan CE, De Koning HD, Traidl-Hoffmann C, Feist E, Krause K, Lipsker D, Navarini AA, Maurer M, Lachmann HJ, Simon A. Unexplained recurrent fever: when is autoinflammation the explanation? *Allergy* 2013;68(3):285-296.
43. Kallinich T, Wittkowski H. Familiäres Mittelmeerfieber. 1st ed. Bremen: UNI-MED, 2014:142 p.
44. Goldfinger SE. Colchicine for familial Mediterranean fever. *N Engl J Med* 1972;287(25):1302.
45. Dinarello CA, Wolff SM, Goldfinger SE, Dale DC, Alling DW. Colchicine therapy for familial mediterranean fever. A double-blind trial. *N Engl J Med* 1974;291(18):934-937.
46. Zemer D, Revach M, Pras M, Modan B, Schor S, Sohar E, Gafni J. A controlled trial of colchicine in preventing attacks of familial mediterranean fever. *N Engl J Med* 1974;291(18):932-934.
47. Goldstein RC, Schwabe AD. Prophylactic colchicine therapy in familial Mediterranean fever. A controlled, double-blind study. *Ann Intern Med* 1974;81(6):792-794.
48. Unverdi S, Inal S, Ceri M, Unverdi H, Batgi H, Tuna R, Ozturk MA, Guz G, Duranay M. Is colchicine therapy effective in all patients with secondary amyloidosis? *Ren Fail* 2013;35(8):1071-1074.
49. Ozen S, Demirkaya E, Erer B, Livneh A, Ben-Chetrit E, Giancane G, Ozdogan H, Abu I, Gattorno M, Hawkins PN, Yuce S, Kallinich T, Bilginer Y, Kastner D, Carmona L. EULAR recommendations for the management of familial Mediterranean fever. *Ann Rheum Dis* 2016;75(4):644-651.
50. Padeh S, Berkun Y. Familial Mediterranean fever. *Curr Opin Rheumatol* 2016;28(5):523-529.

51. Ben-Chetrit E, Ozdogan H. Non-response to colchicine in FMF--definition, causes and suggested solutions. *Clin Exp Rheumatol* 2008;26(4 Suppl 50):S49-51.
52. Ben-Zvi I, Kukuy O, Giat E, Pras E, Feld O, Kivity S, Perski O, Bornstein G, Grossman C, Harari G, Lidar M, Livneh A. Anakinra for Colchicine-Resistant Familial Mediterranean Fever: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Arthritis Rheumatol* 2017;69(4):854-862.
53. Gul A, Ozdogan H, Erer B, Ugurlu S, Kasapcopur O, Davis N, Sevgi S. Efficacy and safety of canakinumab in adolescents and adults with colchicine-resistant familial Mediterranean fever. *Arthritis Res Ther* 2015;17:243.
54. Hashkes PJ, Huang B. The familial Mediterranean fever (FMF) 50 score: does it work in a controlled clinical trial? Re-analysis of the trial of rilonacept for patients with colchicine-resistant or intolerant FMF. *Isr Med Assoc J* 2015;17(3):137-140.
55. Kallinich T, Haffner D, Niehues T, Huss K, Lainka E, Neudorf U, Schaefer C, Stojanov S, Timmann C, Keitzer R, Ozdogan H, Ozen S. Colchicine use in children and adolescents with familial Mediterranean fever: literature review and consensus statement. *Pediatrics* 2007;119(2):e474-483.
56. Ancient missense mutations in a new member of the RoRet gene family are likely to cause familial Mediterranean fever. The International FMF Consortium. *Cell* 1997;90(4):797-807.
57. A candidate gene for familial Mediterranean fever. French FMF Consortium. *Nature genetics* 1997;17(1):25.
58. Van Gijn ME, Ceccherini I, Shinar Y, Carbo EC, Slofstra M, Arostegui JI, Sarrabay G, Rowczenio D, Omoyimni E, Balci-Peynircioglu B, Hoffman HM, Milhavet F, Swertz MA, Touitou I. New workflow for classification of genetic variants' pathogenicity applied to hereditary recurrent fevers by the International Study Group for Systemic Autoinflammatory Diseases (INSAID). *J Med Genet* 2018.
59. Sarrauste De Menthiere C, Terriere S, Pugnere D, Ruiz M, Demaille J, Touitou I. INFEVERS: the Registry for FMF and hereditary inflammatory disorders mutations. *Nucleic Acids Res* 2003;31(1):282-285.
60. Alghamdi M. Familial Mediterranean fever, review of the literature. *Clin Rheumatol* 2017;36(8):1707-1713.
61. Touitou I. The spectrum of Familial Mediterranean Fever (FMF) mutations. *Eur J Hum Genet* 2001;9(7):473-483.
62. Ozen S, Batu ED, Demir S. Familial Mediterranean Fever: Recent Developments in Pathogenesis and New Recommendations for Management. *Front Immunol* 2017;8:253.
63. Ben-Zvi I, Brandt B, Berkun Y, Lidar M, Livneh A. The relative contribution of environmental and genetic factors to phenotypic variation in familial Mediterranean fever (FMF). *Gene* 2012;491(2):260-263.
64. Ozen S, Demirkaya E, Amaryan G, Kone-Paut I, Polat A, Woo P, Uziel Y, Modesto C, Finetti M, Quartier P, Papadopoulou-Alataki E, Al-Mayouf SM, Fabio G, Gallizzi R, Cantarini L, Frenkel J, Nielsen S, Hofer M, Insalaco A, Acikel C, Ozdogan H, Martini A, Ruperto N, Gattorno M, Paediatric Rheumatology International Trials O, Eurofever P. Results from a multicentre international registry of familial Mediterranean fever: impact of environment on the expression of a monogenic disease in children. *Ann Rheum Dis* 2014;73(4):662-667.
65. Akkaya-Ulum YZ, Balci-Peynircioglu B, Karadag O, Eroglu FK, Kalyoncu U, Kiraz S, Ertenli AI, Ozen S, Yilmaz E. Alteration of the microRNA expression profile in familial Mediterranean fever patients. *Clin Exp Rheumatol* 2017;35 Suppl 108(6):90-94.

66. Topaloglu R, Batu ED, Yildiz C, Korkmaz E, Ozen S, Besbas N, Ozaltin F. Familial Mediterranean fever patients homozygous for E148Q variant. *Int J Rheum Dis* 2016.
67. Booty MG, Chae JJ, Masters SL, Remmers EF, Barham B, Le JM, Barron KS, Holland SM, Kastner DL, Aksentijevich I. Familial Mediterranean fever with a single *MEFV* mutation: where is the second hit? *Arthritis Rheum* 2009;60(6):1851-1861.
68. Omenetti A, Carta S, Delfino L, Martini A, Gattorno M, Rubartelli A. Increased NLRP3-dependent interleukin 1beta secretion in patients with familial Mediterranean fever: correlation with *MEFV* genotype. *Ann Rheum Dis* 2014;73(2):462-469.
69. Lieber M, Kallinich T, Lohse P, Klotsche J, Holzinger D, Foell D, Wittkowski H. Increased serum concentrations of neutrophil-derived protein S100A12 in heterozygous carriers of *MEFV* mutations. *Clin Exp Rheumatol* 2015;33(6 Suppl 94):S113-116.
70. Lachmann HJ, Sengul B, Yavuzsen TU, Booth DR, Booth SE, Bybee A, Gallimore JR, Soyuturk M, Akar S, Tunca M, Hawkins PN. Clinical and subclinical inflammation in patients with familial Mediterranean fever and in heterozygous carriers of *MEFV* mutations. *Rheumatology* 2006;45(6):746-750.
71. Federici S, Calcagno G, Finetti M, Gallizzi R, Meini A, Vitale A, Caroli F, Cattalini M, Caorsi R, Zulian F, Tommasini A, Insalaco A, Sormani MP, Baldi M, Ceccherini I, Martini A, Gattorno M. Clinical impact of *MEFV* mutations in children with periodic fever in a prevalent western European Caucasian population. *Ann Rheum Dis* 2012;71(12):1961-1965.
72. Kalyoncu M, Acar BC, Cakar N, Bakkaloglu A, Ozturk S, Dereli E, Tunca M, Kasapcopur O, Yalcinkaya F, Ozen S. Are carriers for *MEFV* mutations "healthy"? *Clin Exp Rheumatol* 2006;24(5 Suppl 42):S120-122.
73. Chae JJ, Aksentijevich I, Kastner DL. Advances in the understanding of familial Mediterranean fever and possibilities for targeted therapy. *British journal of haematology* 2009;146(5):467-478.
74. Richards N, Schaner P, Diaz A, Stuckey J, Shelden E, Wadhwa A, Gumucio DL. Interaction between pyrin and the apoptotic speck protein (ASC) modulates ASC-induced apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 2001;276(42):39320-39329.
75. Chae JJ, Wood G, Masters SL, Richard K, Park G, Smith BJ, Kastner DL. The B30.2 domain of pyrin, the familial Mediterranean fever protein, interacts directly with caspase-1 to modulate IL-1beta production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(26):9982-9987.
76. Papin S, Cuenin S, Agostini L, Martinon F, Werner S, Beer HD, Grutter C, Grutter M, Tschopp J. The SPRY domain of Pyrin, mutated in familial Mediterranean fever patients, interacts with inflammasome components and inhibits proIL-1beta processing. *Cell Death Differ* 2007;14(8):1457-1466.
77. Chae JJ, Wood G, Richard K, Jaffe H, Colburn NT, Masters SL, Gumucio DL, Shoham NG, Kastner DL. The familial Mediterranean fever protein, pyrin, is cleaved by caspase-1 and activates NF-kappaB through its N-terminal fragment. *Blood* 2008;112(5):1794-1803.
78. Mansfield E, Chae JJ, Komarow HD, Brotz TM, Frucht DM, Aksentijevich I, Kastner DL. The familial Mediterranean fever protein, pyrin, associates with microtubules and colocalizes with actin filaments. *Blood* 2001;98(3):851-859.
79. Van Gorp H, Saavedra PH, De Vasconcelos NM, Van Opendenbosch N, Vande Walle L, Matusiak M, Prencipe G, Insalaco A, Van Hauwermeiren F, Demon D, Bogaert DJ, Dullaers M, De Baere E, Hochepeid T, Dehoorne J, Vermaelen KY, Haerynck F, De Benedetti F, Lamkanfi M. Familial Mediterranean fever mutations lift the obligatory requirement for microtubules in Pyrin inflammasome activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016;113(50):14384-14389.

80. Centola M, Wood G, Frucht DM, Galon J, Aringer M, Farrell C, Kingma DW, Horwitz ME, Mansfield E, Holland SM, O'shea JJ, Rosenberg HF, Malech HL, Kastner DL. The gene for familial Mediterranean fever, *MEFV*, is expressed in early leukocyte development and is regulated in response to inflammatory mediators. *Blood* 2000;95(10):3223-3231.
81. Matzner Y, Abedat S, Shapiro E, Eisenberg S, Bar-Gil-Shitrit A, Stepensky P, Calco S, Azar Y, Urieli-Shoval S. Expression of the familial Mediterranean fever gene and activity of the C5a inhibitor in human primary fibroblast cultures. *Blood* 2000;96(2):727-731.
82. Diaz A, Hu C, Kastner DL, Schaner P, Reginato AM, Richards N, Gumucio DL. Lipopolysaccharide-induced expression of multiple alternatively spliced *MEFV* transcripts in human synovial fibroblasts: a prominent splice isoform lacks the C-terminal domain that is highly mutated in familial Mediterranean fever. *Arthritis Rheum* 2004;50(11):3679-3689.
83. Hesker PR, Nguyen M, Kovarova M, Ting JP, Koller BH. Genetic loss of murine pyrin, the Familial Mediterranean Fever protein, increases interleukin-1beta levels. *PLoS One* 2012;7(11):e51105.
84. Chae JJ, Centola M, Aksentijevich I, Dutra A, Tran M, Wood G, Nagaraju K, Kingma DW, Liu PP, Kastner DL. Isolation, genomic organization, and expression analysis of the mouse and rat homologs of *MEFV*, the gene for familial mediterranean fever. *Mamm Genome* 2000;11(6):428-435.
85. Chae Jae j, Cho Y-H, Lee G-S, Cheng J, Liu PP, Feigenbaum L, Katz Stephen i, Kastner Daniel I. Gain-of-Function Pyrin Mutations Induce NLRP3 Protein-Independent Interleukin-1 $\beta$  Activation and Severe Autoinflammation in Mice. *Immunity* 2011;34(5):755-768.
86. Martinon F, Mayor A, Tschopp J. The inflammasomes: guardians of the body. *Annu Rev Immunol* 2009;27:229-265.
87. Gavrilin MA, Abdelaziz DH, Mostafa M, Abdulrahman BA, Grandhi J, Akhter A, Abu Khweek A, Aubert DF, Valvano MA, Wewers MD, Amer AO. Activation of the pyrin inflammasome by intracellular *Burkholderia cenocepacia*. *J Immunol* 2012;188(7):3469-3477.
88. Xu H, Yang J, Gao W, Li L, Li P, Zhang L, Gong YN, Peng X, Xi JJ, Chen S, Wang F, Shao F. Innate immune sensing of bacterial modifications of Rho GTPases by the Pyrin inflammasome. *Nature* 2014;513(7517):237-241.
89. Duzova A, Bakkaloglu A, Besbas N, Topaloglu R, Ozen S, Ozaltin F, Bassoy Y, Yilmaz E. Role of A-SAA in monitoring subclinical inflammation and in colchicine dosage in familial Mediterranean fever. *Clin Exp Rheumatol* 2003;21(4):509-514.
90. Xia C, Braunstein Z, Toomey AC, Zhong J, Rao X. S100 Proteins As an Important Regulator of Macrophage Inflammation. *Front Immunol* 2017;8:1908.
91. Kessel C, Holzinger D, Foell D. Phagocyte-derived S100 proteins in autoinflammation: putative role in pathogenesis and usefulness as biomarkers. *Clin Immunol* 2013;147(3):229-241.
92. Foell D, Wittkowski H, Vogl T, Roth J. S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules. *J Leukoc Biol* 2007;81(1):28-37.
93. Moroz OV, Burkitt W, Wittkowski H, He W, Ianoul A, Novitskaya V, Xie J, Polyakova O, Lednev IK, Shekhtman A, Derrick PJ, Bjoerk P, Foell D, Bronstein IB. Both Ca<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> are essential for S100A12 protein oligomerization and function. *BMC Biochem* 2009;10:11.
94. Hsu K, Champaiboon C, Guenther BD, Sorenson BS, Khammanivong A, Ross KF, Geczy CL, Herzberg MC. Anti-Infective Protective Properties of S100 Calgranulins. *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem* 2009;8(4):290-305.

95. Tardif MR, Chapeton-Montes JA, Posvanzdic A, Page N, Gilbert C, Tessier PA. Secretion of S100A8, S100A9, and S100A12 by Neutrophils Involves Reactive Oxygen Species and Potassium Efflux. *J Immunol Res* 2015;2015:296149.
96. Rubartelli A, Gattorno M, Netea MG, Dinarello CA. Interplay between redox status and inflammasome activation. *Trends Immunol* 2011;32(12):559-566.
97. Foell D, Wittkowski H, Kessel C, Luken A, Weinhage T, Varga G, Vogl T, Wirth T, Viemann D, Bjork P, Van Zoelen MA, Gohar F, Srikrishna G, Kraft M, Roth J. Proinflammatory S100A12 can activate human monocytes via Toll-like receptor 4. *Am J Respir Crit Care Med* 2013;187(12):1324-1334.
98. Hofmann MA, Drury S, Fu C, Qu W, Taguchi A, Lu Y, Avila C, Kambham N, Bierhaus A, Nawroth P, Neurath MF, Slattery T, Beach D, McClary J, Nagashima M, Morser J, Stern D, Schmidt AM. RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell* 1999;97(7):889-901.
99. Wittkowski H, Frosch M, Wulffraat N, Goldbach-Mansky R, Kallinich T, Kuemmerle-Deschner J, Fruhwald MC, Dassmann S, Pham TH, Roth J, Foell D. S100A12 is a novel molecular marker differentiating systemic-onset juvenile idiopathic arthritis from other causes of fever of unknown origin. *Arthritis Rheum* 2008;58(12):3924-3931.
100. Foell D, Roth J. Proinflammatory S100 proteins in arthritis and autoimmune disease. *Arthritis Rheum* 2004;50(12):3762-3771.
101. Oesterle A, Bowman MA. S100A12 and the S100/Calgranulins: Emerging Biomarkers for Atherosclerosis and Possibly Therapeutic Targets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2015;35(12):2496-2507.
102. Dinarello CA, Novick D, Kim S, Kaplanski G. Interleukin-18 and IL-18 binding protein. *Front Immunol* 2013;4:289.
103. Winkler S, Rosen-Wolff A. Caspase-1: an integral regulator of innate immunity. *Semin Immunopathol* 2015;37(4):419-427.
104. Akinrinmade OA, Chetty S, Daramola AK, Islam MU, Thepen T, Barth S. CD64: An Attractive Immunotherapeutic Target for M1-type Macrophage Mediated Chronic Inflammatory Diseases. *Biomedicines* 2017;5(3).
105. Matsui T, Ohsumi K, Ozawa N, Shimada K, Sumitomo S, Shimane K, Kawakami M, Nakayama H, Sugii S, Ozawa Y, Tohma S. CD64 on neutrophils is a sensitive and specific marker for detection of infection in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2006;33(12):2416-2424.
106. Migita K, Agematsu K, Yamazaki K, Suzuki A, Yazaki M, Jiuchi Y, Miyashita T, Izumi Y, Koga T, Kawakami A, Eguchi K. Expression of CD64 on polymorphonuclear neutrophils in patients with familial Mediterranean fever. *Clin Exp Immunol* 2011;164(3):365-372.
107. Hoffmann JJ. Neutrophil CD64: a diagnostic marker for infection and sepsis. *Clin Chem Lab Med* 2009;47(8):903-916.
108. Dai J, Jiang W, Min Z, Yang J, Tan Y, Ma T, Ge Z. Neutrophil CD64 as a diagnostic marker for neonatal sepsis: Meta-analysis. *Adv Clin Exp Med* 2017;26(2):327-332.
109. Wedepohl S, Beceren-Braun F, Riese S, Buscher K, Enders S, Bernhard G, Kilian K, Blanchard V, Dernedde J, Tauber R. I-Selectin – A dynamic regulator of leukocyte migration. *European Journal of Cell Biology* 2012;91(4):257-264.
110. Smalley DM, Ley K. L-selectin: mechanisms and physiological significance of ectodomain cleavage. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 2005;9(2):255-266.

111. Burgess M, Gill D, Singhanian R, Cheung C, Chambers L, Renyolds BA, Smith L, Mollee P, Saunders N, Mcmillan NA. CD62L as a therapeutic target in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res* 2013;19(20):5675-5685.
112. Vassena L, Giuliani E, Buonomini AR, Malagnino V, Andreoni M, Doria M. Brief Report: L-Selectin (CD62L) Is Downregulated on CD4+ and CD8+ T Lymphocytes of HIV-1-Infected Individuals Naive for ART. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2016;72(5):492-497.
113. Genel F, Atlihan F, Gulez N, Kazanci E, Vergin C, Terek DT, Yurdun OC. Evaluation of adhesion molecules CD64, CD11b and CD62L in neutrophils and monocytes of peripheral blood for early diagnosis of neonatal infection. *World J Pediatr* 2012;8(1):72-75.
114. Nadi E, Hajilooi M, Pajouhan S, Haidari M. Soluble L-Selectin as an Independent Biomarker of Bronchial Asthma. *Journal of clinical laboratory analysis* 2015;29(3):191-197.
115. Choudhary D, Hegde P, Voznesensky O, Choudhary S, Kopsiaftis S, Claffey KP, Pilbeam CC, Taylor JA, 3rd. Increased expression of L-selectin (CD62L) in high-grade urothelial carcinoma: A potential marker for metastatic disease. *Urol Oncol* 2015;33(9):387 e317-327.
116. Molad Y, Fridenberg A, Bloch K, Langevitz P, Mukamel M, Sulkes J, Pras M, Livneh A. Neutrophil adhesion molecule expression in familial Mediterranean fever: discordance between the intravascular regulation of beta2 integrin and L-selectin expression in acute attack. *J Investig Med* 2004;52(1):58-61.
117. Mitroulis I, Alexaki VI, Kourtzelis I, Ziogas A, Hajishengallis G, Chavakis T. Leukocyte integrins: Role in leukocyte recruitment and as therapeutic targets in inflammatory disease. *Pharmacology & therapeutics* 2015;0:123-135.
118. Andreu JM, Timasheff SN. Tubulin bound to colchicine forms polymers different from microtubules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982;79(22):6753-6756.
119. Slobodnick A, Shah B, Krasnokutsky S, Pillinger MH. Update on colchicine, 2017. *Rheumatology* 2018;57(suppl\_1):i4-i11.
120. Martinon F, Petrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* 2006;440(7081):237-241.
121. Krendel M, Zenke FT, Bokoch GM. Nucleotide exchange factor GEF-H1 mediates cross-talk between microtubules and the actin cytoskeleton. *Nat Cell Biol* 2002;4(4):294-301.
122. Shapiro HM. *Practical Flow Cytometry*. 4 ed. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc., 2003.
123. [https://static.bdbiosciences.com/eu/documents/FACSCanto\\_techspecsEU.pdf?\\_ga=2.182934816.705015671.1534231913-1369979110.1533284727](https://static.bdbiosciences.com/eu/documents/FACSCanto_techspecsEU.pdf?_ga=2.182934816.705015671.1534231913-1369979110.1533284727), (letzter Zugriff: 15.05.2018, 10:23 Uhr)
124. Bocsi J, Melzer S, Dahnert I, Tarnok A. OMIP-023: 10-color, 13 antibody panel for in-depth phenotyping of human peripheral blood leukocytes. *Cytometry A* 2014;85(9):781-784.
125. Apostolidou E, Skendros P, Kambas K, Mitroulis I, Konstantinidis T, Chrysanthopoulou A, Nakos K, Tsironidou V, Koffa M, Boumpas DT, Ritis K. Neutrophil extracellular traps regulate IL-1beta-mediated inflammation in familial Mediterranean fever. *Ann Rheum Dis* 2016;75(1):269-277.
126. Kaplanski G. Interleukin-18: Biological properties and role in disease pathogenesis. *Immunol Rev* 2018;281(1):138-153.
127. Yang Z, Cao J, Yu C, Yang Q, Zhang Y, Han L. Caspase-1 mediated interleukin-18 activation in neutrophils promotes the activity of rheumatoid arthritis in a NLRP3 inflammasome independent manner. *Joint Bone Spine* 2016;83(3):282-289.
128. Mankan AK, Dau T, Jenne D, Hornung V. The NLRP3/ASC/Caspase-1 axis regulates IL-1beta processing in neutrophils. *Eur J Immunol* 2012;42(3):710-715.

129. Jamilloux Y, Lefeuvre L, Magnotti F, Martin A, Benezech S, Allatif O, Penel-Page M, Hentgen V, Seve P, Gerfaud-Valentin M, Duquesne A, Desjonqueres M, Laurent A, Remy-Piccolo V, Cimaz R, Cantarini L, Bourdonnay E, Walzer T, Py BF, Belot A, Henry T. Familial Mediterranean fever mutations are hypermorphic mutations that specifically decrease the activation threshold of the Pyrin inflammasome. *Rheumatology* 2018;57(1):100-111.
130. Sugawara S, Uehara A, Nochi T, Yamaguchi T, Ueda H, Sugiyama A, Hanzawa K, Kumagai K, Okamura H, Takada H. Neutrophil proteinase 3-mediated induction of bioactive IL-18 secretion by human oral epithelial cells. *J Immunol* 2001;167(11):6568-6575.
131. Killock DJ, Ivetic A. The cytoplasmic domains of TNFalpha-converting enzyme (TACE/ADAM17) and L-selectin are regulated differently by p38 MAPK and PKC to promote ectodomain shedding. *Biochem J* 2010;428(2):293-304.
132. Lambrecht BN, Vanderkerken M, Hammad H. The emerging role of ADAM metalloproteinases in immunity. *Nat Rev Immunol* 2018.
133. Ivetic A. A head-to-tail view of L-selectin and its impact on neutrophil behaviour. *Cell Tissue Res* 2018;371(3):437-453.
134. Kishimoto TK, Jutila MA, Berg EL, Butcher EC. Neutrophil Mac-1 and MEL-14 adhesion proteins inversely regulated by chemotactic factors. *Science* 1989;245(4923):1238-1241.
135. Park YH, Wood G, Kastner DL, Chae JJ. Pyrin inflammasome activation and RhoA signaling in the autoinflammatory diseases FMF and HIDS. *Nat Immunol* 2016;17(8):914-921.
136. Van Der Naalt J, Haaxma-Reiche H, Van Den Berg AP, Hazenberg BP, Molenaar WM. Acute neuromyopathy after colchicine treatment. *Ann Rheum Dis* 1992;51(11):1267-1268.
137. Fordham JN, Kirwan J, Cason J, Currey HL. Prolonged reduction in polymorphonuclear adhesion following oral colchicine. *Ann Rheum Dis* 1981;40(6):605-608.
138. Tunca M, Kirkali G, Soyuturk M, Akar S, Pepys MB, Hawkins PN. Acute phase response and evolution of familial Mediterranean fever. *Lancet* 1999;353(9162):1415.
139. Ozen S, Bakkaloglu A, Yilmaz E, Duzova A, Balci B, Topaloglu R, Besbas N. Mutations in the gene for familial Mediterranean fever: do they predispose to inflammation? *J Rheumatol* 2003;30(9):2014-2018.
140. Brenner-Ullman A, Melzer-Ofir H, Daniels M, Shohat M. Possible protection against asthma in heterozygotes for familial Mediterranean fever. *Am J Med Genet* 1994;53(2):172-175.
141. Sackesen C, Bakkaloglu A, Sekerel BE, Ozaltin F, Besbas N, Yilmaz E, Adalioglu G, Ozen S. Decreased prevalence of atopy in paediatric patients with familial Mediterranean fever. *Ann Rheum Dis* 2004;63(2):187-190.
142. Cutolo M, Paolino S, Pizzorni C. Possible contribution of chronic inflammation in the induction of cancer in rheumatic diseases. *Clin Exp Rheumatol* 2014;32(6):839-847.
143. Wright K, Crowson CS, Gabriel SE. Cardiovascular comorbidity in rheumatic diseases: a focus on heart failure. *Heart Fail Clin* 2014;10(2):339-352.
144. Lamkanfi M, Dixit VM. Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell* 2014;157(5):1013-1022.

## Versicherung an Eides statt

Ich, Judith Freytag, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „Gendosis-Wirkungs-Beziehung von *MEFV*-Mutationen auf die Funktion neutrophiler Granulozyten“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

---

Datum

---

Unterschrift

## Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Judith Freytag hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Stoler I, Freytag J, Orak B, Seib C, Esmann L, Seipelt E, Gohar F, Foell D, Wittkowski H, Kallinich T. Comparison of Neutrophilic Activation and Secretion of Cytokines derived from Patients with Familial Mediterranean Fever and other Acute and Chronic Inflammatory Diseases. 44. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie, 30. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Orthopädische Rheumatologie, 26. Jahrestagung der Gesellschaft für Kinder- und Jugendrheumatologie, Frankfurt am Main, 2016.

Durchführung der Versuche, statistische Auswertung und Interpretation der gezeigten Ergebnisse an FMF-Patienten und gesunden Kontrollpersonen.

---

Unterschrift der Doktorandin

## Publikationsliste

### **Abstract-Veröffentlichung:**

Stoler I, **Freytag J**, Orak B, Seib C, Esmann L, Seipelt E, Gohar F, Foell D, Wittkowski H, Kallinich T. Comparison of Neutrophilic Activation and Secretion of Cytokines derived from Patients with Familial Mediterranean Fever and other Acute and Chronic Inflammatory Diseases. 44. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie, 30. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Orthopädische Rheumatologie, 26. Jahrestagung der Gesellschaft für Kinder- und Jugendrheumatologie, Frankfurt am Main, 2016.

### **Noch nicht publizierter Artikel in Vorbereitung:**

**Freytag J\***, Stoler I\*, Seib C, Orak B, Foell D, Wittkowski H, Kessel C, Kallinich T. Spontaneous cell activation and cytokine release is restricted to neutrophils derived from patients with familial mediterranean fever. Zur Einreichung bei Arthritis and Rheumatism, 2018.

\* Die so gekennzeichneten Autoren haben zu gleichen Anteilen an der Entstehung der Arbeit beigetragen.

## Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.



## Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle herzlich bei all den Personen bedanken, die an der Entstehung dieser Promotionsschrift beteiligt waren.

Zuerst gilt mein größter Dank meinem Doktorvater, Betreuer und Mentor, PD Dr. med. Tilmann Kallinich, der mich während der gesamten Zeit sowohl fachlich als auch menschlich großartig unterstützt hat. Ich danke ihm für die Erarbeitung des Themas und wertvolle wissenschaftliche Hilfestellung ebenso wie für die Geduld und Motivation in jeder Phase der Entstehung dieser Arbeit.

Weiterhin möchte ich mich bei den Personen bedanken, die mir durch ihre Arbeit geholfen haben, die Ergebnisse zu erheben und zusammenzutragen. Hier möchte ich vor allem Christine Seib nennen, die mich bei der gesamten Laborarbeit mit großem Einsatz und Engagement und durch ihre Erfahrung, Ruhe und Freundlichkeit unglaublich unterstützt hat. Dr. med. Banu Orak danke ich für die hervorragende Vorarbeit im Labor und für die Unterstützung bei der Rekrutierung der Probanden. Mein Dank gilt auch vielen weiteren Mitarbeitern im Labor Berlin und der Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Pneumologie und Immunologie mit Intensivmedizin, insbesondere den Mitarbeitern der kinderrheumatologischen Ambulanz des Sozialpädiatrischen Zentrums.

Ich danke natürlich auch den Studienteilnehmern – den Patienten, Eltern und Kontrollpersonen – ohne deren Zustimmung die Arbeit nicht hätte entstehen können.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden, die mich in der Verwirklichung dieser Herausforderung stets geduldig unterstützt und motiviert haben. Vor allem mein Ehemann, Tim Freytag, hat mir über die gesamte Zeit immer wieder den Rücken gestärkt und freigehalten. Ihm möchte ich auch für das uneingeschränkte Vertrauen in meine Fähigkeiten, welches mir während der Arbeit an der Promotion manches Mal selbst nicht so stark gegeben war, danken.

Meinen Eltern möchte ich dafür danken, dass sie mir den langen Weg zum akademischen Titel des Doctor medicinae ermöglicht haben.