

DISSERTATION

Aktivierungsmuster von Neutrophilen beim Familiären Mittelmeerfieber im Vergleich zu
anderen akuten und chronischen inflammatorischen Erkrankungen
Activation Patterns of Neutrophils in Familial Mediterranean Fever in Comparison to other
acute and chronic inflammatory Diseases

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Stoler, Iris

Erstbetreuung: Prof. Dr. med. Tilmann Kallinich

Datum der Promotion: 30.06.2024

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	4-5
Tabellenverzeichnis.....	6
Abkürzungsverzeichnis.....	7-9
Zusammenfassung (deutsch).....	10
Abstract (english).....	10-11
1 Einleitung	
1.1 Klinik des Familiären Mittelmeerfiebers.....	S.12
1.2 Vererbungsmodus des Familiären Mittelmeerfiebers.....	S.12-13
1.3 Pathogenese des Familiären Mittelmeerfiebers – Phänomen der Autoinflammation.....	S.13-15
1.4 Molekulare Pathogenese des Familiären Mittelmeerfiebers.....	S.15-16
1.5 Genotyp-Phänotyp Korrelation.....	S.16-17
1.6 Diagnostik des FMF anhand klinischer Kriterien.....	S.17
1.7 Klassifikation und Schweregradeinteilung des FMF.....	S.17-18
1.8 Rolle von Biomarkern für Diagnostik und Therapieverlauf des FMF.....	S.19
1.9 Therapie des Familiären Mittelmeerfiebers.....	S.19-22
1.10 FMF eine Erkrankung der Neutrophilen.....	S.22
1.11 Rolle des L-Selektins (CD62L) in der Aktivierung der Neutrophilen.....	S.23
1.12 Bedeutung des Integrins CD11b für multiple Funktionen der Neutrophilen.....	S.23
1.13 Neutrophile als treibende Kraft inflammatorischer Erkrankungen.....	S.23-25
1.14 Ziele der vorliegenden Arbeit.....	S.25
2 Material und Methoden	
2.1 Patienten.....	S.26
2.2 gesunde Kontrollgruppe.....	S.26-27
2.3 Materialien.....	S.29-30
2.4.1 Gewinnung des Probenmaterials.....	S.31
2.4.2 Aufreinigung der Neutrophilen und Zellzählung.....	S.31
2.5 Vitalitätsmessung der Neutrophilen durch Trypanblaufärbung.....	S.32
2.6 Kurzzeitkultur der Neutrophilen.....	S.32-33
2.7.1 Messung der Oberflächenmarker - Prinzip der Durchflusszytometrie.....	S.33-35
2.7.2 Messung der Oberflächenmarker - Aufbereitung der Ansätze für die Durchflusszytometrie.....	S.35-36
2.7.3 Messung der Oberflächenmarker - Durchführung der Durchflusszytometrie.....	S.36-37
2.8 Vitalitätsmessung der Neutrophilen - Annexin V Assay.....	S.37
2.9.1 Messung der Inflamationsparameter - Prinzip des Enzyme-linked Immunosorbent Assays.....	S.37-38
2.9.2 Messung der Inflamationsparameter - Durchführung der ELISAs.....	S.38-39
2.9.3 Messung der Inflamationsparameter mittels Multiplexed Bead Array.....	S.40-41
2.10 Asservierung für Polymerase Chain Reactions (PCR).....	S.41
2.11 Messung des C-reaktiven Proteins.....	S.41
2.12 Statistische Methoden.....	S.42
3 Ergebnisse	
3.1 Probanden.....	S.43-46
3.2 Inflamationsparameter im Serum.....	S.46
3.2.1 C-reaktives Protein im Serum.....	S.46-47
3.2.2 S100A12 Proteine im Serum.....	S.47-48
3.2.3 Interleukin-18 im Serum.....	S.48-49
3.2.4 Cysteine-dependent Aspartate specific Protease (Caspase-1) im Serum.....	S.49-50
3.3 Bestimmung der Zellreinheit und -vitalität mittels Sysmex und	

Trypanblau Färbung.....	S.50
3.4 Bestimmung der Zellvitalität mittels Durchflußzytometrie.....	S.50-51
3.5 Zeitlicher Verlauf der Expression von Oberflächenmarkern.....	S.51
3.5.1 Zeitlicher Verlauf der L-Selektin (CD62L)-Expression.....	S.51-53
3.5.2 Zeitlicher Verlauf der CD11b-Expression.....	S.53-54
3.5.3 CD62L-Expression nach Zellstimulation.....	S.54-56
3.5.4 CD11b nach Zellstimulation.....	S.57-59
3.6 <i>Ex vivo</i> -Sekretion von Inflammationsparametern.....	S.59
3.6.1 Zeitlicher Verlauf der IL-18-Sekretion.....	S.59-61
3.6.2 Zeitlicher Verlauf der Caspase-1-Sekretion.....	S.61-62
3.6.3 Zeitlicher Verlauf der S100A12-Sekretion.....	S.62-63
3.6.4 IL-18-Sekretion nach Zellstimulation.....	S.64-65
3.6.5 Caspase-1-Sekretion nach Zellstimulation.....	S.66-67
3.6.6 S100A12-Sekretion nach Zellstimulation.....	S.67-68
3.7 Analyse von weiteren Zytokinen, Chemokinen und granulären Proteinen im Multiplex Assay.....	S.69-70
3.8 Spezifische IL-1 und NLRP3-Inhibition durch Anakinra und MCC950.....	S.70-72
4 Diskussion	
4.1 Stellenwert von Inflammationsparametern und Neutrophilen-Aktivierung beim FMF in Abgrenzung zu anderen inflammatorischen Erkrankungen.....	S.73
4.2 Rolle und Funktion von Caspase-1, IL-18 und S100A12 in Inflammationsprozessen von Neutrophilen.....	S.73-76
4.3 Das CD62L-Shedding in Neutrophilen beim FMF und anderen inflammatorischen Erkrankungen.....	S.76-78
4.4 Die Regulation der Integrin α -Subunit CD11b im FMF und anderen Inflamationen.....	S.78-80
4.5 Vitalität und Reinheit der Neutrophilen.....	S.80
4.6 Abhängigkeit der Caspase-1-, IL-18- und S100A12 Sekretion und des CD62L-Sheddings von IL-1 und dem NLRP3-Inflammasom.....	S.80-81
4.7 Aktivierungsmuster der Neutrophilen durch weitere Chemokine, Zytokine, Zytokin-Rezeptor-Antagonisten und Proteine und Analyse der Spezifität für das FMF.....	S.81-83
4.8 Heterozygotie.....	S.83
4.9 Limitationen dieser Arbeit.....	S.83-84
4.10 Schlussfolgerung und Ausblick.....	S.84-85
5 Literaturverzeichnis.....	S.86-99
Versicherung an Eides statt.....	S.100
Anteilsklärung.....	S.101
Lebenslauf.....	S.102
Publikationsliste.....	S.103
Danksagung.....	S.104
Bescheinigung des akkreditierten Statistikers.....	S.105

I Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1	NLRP3 und Pyrin Inflammasom
Abbildung 1-2	NLRP3 Inflammasom
Abbildung 1-3	Pathogenese des FMF
Abbildung 2-1	Gating
Abbildung 2-2	Übersicht der Versuchsmethoden
Abbildung 3-1	Darstellung des CRP in mg/l als Box Plot
Abbildung 3-2	Darstellung des CRP in mg/l als Box Plot mit FMF Patienten aus Vorarbeiten
Abbildung 3-3	S100A12 Proteine in ng/l als Box Plot
Abbildung 3-4	S100A12 Proteine in ng/l als Box Plot mit FMF Patienten aus Vorarbeiten
Abbildung 3-5	Darstellung des IL-18 in pg/l als Box Plot
Abbildung 3-6	Darstellung des IL-18 in pg/l als Box Plot mit FMF Patienten aus Vorarbeiten
Abbildung 3-7	Darstellung der Caspase-1 in pg/l als Box Plot
Abbildung 3-8	Darstellung der Caspase-1 in pg/l als Box Plot mit FMF Patienten aus Vorarbeiten
Abbildung 3-9	Zeitlicher Verlauf der CD62L-Expression
Abbildung 3-10	Zeitlicher Verlauf der CD62L-Expression mit FMF Patienten aus Vorarbeiten
Abbildung 3-11	Zeitlicher Verlauf der CD11b-Expression
Abbildung 3-12	Zeitlicher Verlauf der CD11b-Expression mit FMF Patienten aus Vorarbeiten
Abbildung 3-13	CD62L-Expression nach Zellstimulation
Abbildung 3-14	CD62L-Expression nach Zellstimulation mit FMF Patienten aus Vorarbeiten
Abbildung 3-15	CD11b-Expression nach Zellstimulation
Abbildung 3-16	CD11b-Expression nach Zellstimulation mit FMF Patienten aus Vorarbeiten
Abbildung 3-17	Zeitlicher Verlauf der spontanen IL-18-Sekretion
Abbildung 3-18	Zeitlicher Verlauf der spontanen IL-18-Sekretion mit FMF Patienten aus Vorarbeiten
Abbildung 3-19	Zeitlicher Verlauf der spontanen Caspase-1 Sekretion
Abbildung 3-20	Zeitlicher Verlauf der spontanen Caspase-1 Sekretion mit FMF Patienten aus Vorarbeiten
Abbildung 3-21	Zeitlicher Verlauf der spontanen S100A12 -Sekretion
Abbildung 3-22	Zeitlicher Verlauf der spontanen S100A12 -Sekretion mit FMF Patienten aus Vorarbeiten
Abbildung 3-23	IL-18 Sekretion nach Zellstimulation
Abbildung 3-24	IL-18 Sekretion nach Zellstimulation mit FMF Patienten aus Vorarbeiten
Abbildung 3-25	Caspase-1-Sekretion nach Zellstimulation
Abbildung 3-26	Caspase-1-Sekretion nach Zellstimulation mit FMF Patienten aus Vorarbeiten
Abbildung 3-27	S100A12-Sekretion nach Zellstimulation
Abbildung 3-28	S100A12-Sekretion nach Zellstimulation mit FMF Patienten aus Vorarbeiten

Abbildung 3-29	Expression von weiteren Zytokinen, Chemokinen und granulären Proteinen im Multiplex Assay nach Zellstimulation
Abbildung 3-30	Korrelation der sezernierten Proteinsekretionen
Abbildung 3-31	CD62L- Expression spontan und nach Co-Inkubation mit Anakinra
Abbildung 3-32	CD62L- Expression spontan und nach Co-Inkubation mit LPS+ATP / MCC950
Abbildung 3-33	IL-18 Sekretion spontan und nach Co-Inkubation mit LPS+ATP / Anakinra und mit LPS+ATP / MCC950
Abbildung 3-34	Caspase-1-Sekretion spontan und nach Co-Inkubation mit LPS+ATP / Anakinra und mit LPS+ATP / MCC950
Abbildung 4-1	L-Selektin (CD62L)

II Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1	Patientencharakteristika
Tabelle 2-2	Geräte
Tabelle 2-3	Software
Tabelle 2-4	Blutentnahmematerialien
Tabelle 2-5	Labormaterialien
Tabelle 2-6	Laborreagenzien
Tabelle 2-7	Fluorochrome
Tabelle 2-8	ELISA Kits
Tabelle 2-9	Multiplexed Bead Array Assays
Tabelle 2-10	Übersicht der verschiedenen Ansätze aus der Zell-Medium-Suspension
Tabelle 2-11	Absorptionsspektren
Tabelle 2-12	Färbeschema
Tabelle 2-13	ELISA IL-18 Standardreihe
Tabelle 2-14	ELISA Caspase-1 Standardreihe
Tabelle 2-15	ELISA S100A12 Standardreihe
Tabelle 3-1	Probandencharakteristika und Darstellung der Inflamationsparameter für die einzelnen Kohorten zusammengefasst
Tabelle 3-2	Probandencharakteristika und Darstellung der Inflamationsparameter für die individuellen Probanden
Tabelle 3.3	Zellverteilung nach Dichte-Gradienten-Zentrifugation
Tabelle 3-4	Anteil vitaler Zellen bestimmt durch Trypanblau Färbung nach Zelltrennung und nach 5 Stunden Stimulation. Bestimmung Vitalität durch Durchflusszytometrie nach Propidiumbromid- und Annexin-Färbung
Tabelle 3-5	Signifikanzen der CD62L-Expression im zeitlichen Verlauf
Tabelle 3-6	Signifikanzen der CD11b-Expression im zeitlichen Verlauf
Tabelle 3-7	Signifikanzen der CD62L-Expression nach Zellstimulation
Tabelle 3-8	Signifikanzen der CD11b-Expression nach Zellstimulation
Tabelle 3-9	Signifikanzen der IL-18-Sekretion im zeitlichen Verlauf
Tabelle 3-10	Signifikanzen der Caspase-1-Sekretion im zeitlichen Verlauf
Tabelle 3-11	Signifikanzen der S100A12-Sekretion im zeitlichen Verlauf
Tabelle 3-12	Signifikanzen der IL-18-Sekretion nach Zellstimulation
Tabelle 3-13	Signifikanzen der Caspase-1 nach Zellstimulation
Tabelle 3-14	Signifikanzen der S100A12-Sekretion nach Zellstimulation
Tabelle 4-1	Untersuchte Inflamationsparameter im Multiplex Bead Array

III Abkürzungsverzeichnis

Acidic transactivation domain	A-Domäne
Adenosindiphosphat	ADP
Adenosintriphosphat	ATP
Allophycocyanin	APC
Amyloid A	AA
Antigen präsentierende Zelle	APC
Apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain	ASC
Baculovirus inhibitor of apoptosis repeat domain	BIR-
Domäne	
Blutsenkungsgeschwindigkeit	BSG
Caspase recruitment domain	CARD
CC-Chemokin-Ligand-2	CCL2
C-C Chemokin receptor type 2	CCR2
Charge Coupled Device	CCD
Chemokine (C-C motif) ligand 3	CCL3
Cluster of Differentiation	CD
Common variable immunodeficiency	CVID
Complement Receptor 3	CR3
C-reaktives Protein	CRP
Cryoporin assoziierten periodischen Syndroms	CAPS
C-type Lectin Domäne	CTLD
C-X-C motif chemokine 6	CXCL6
CXC-Motif-Chemokinreceptor 1	CXCR1
CXC-Motif-Chemokinreceptor 2	CXCR2
Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator	CFTR
Cystische Fibrose	CF
Cytochrom P3A4	CYP3A4
Damage-associated molecular pattern	DAMP
Diacylglycerol	DAG
Disease activity score 28	DAS28
Desoxyribonukleinsäure	DNA
Enzyme-linked Immunosorbent Assay	ELISA
Epidermal Growth Factor	EGF
Erythrozytensedimentationsrate	ESR
Ethylendiamintetraacetat	EDTA
European League Against Rheumatism	EULAR
Extracellular newly identified receptor for Advanced Glycation endproducts binding protein	EN-RAGE
Familiäres Mittelmeerfieber	FMF
Familial Mediterranean Fever Gen	MEFV Gen
FMF-Severity Score	F-SS
FMF Arthritis Vasculitis and Orphan disease Research in paediatric rheumatology	FAVOR
Fluorescence-activated cell sorting	FACS
Fluorescein-5-isothiocyanat	FITC
Formylmethionyl-Leucylphenylalanin	FMLP
Forward Scatter	FSC
Gamma-tubulin complex component	GCP2
Gasdermin-D	GSDMD

Geometric Mean Fluorescence Intensity	gMFI
Granulocyte chemotactic protein-2	GCP-2
Guanin-exchange Faktor	GEF
Guanosintriphosphat	GTP
Horseradish Peroxidase	HRP
Immunglobulin	Ig
Immunomodulatory Drugs	IMiDs
Inflammatory Bowel Disease	IBD
Integrin Alpha M	ITGAM
Intercellular adhesion molecule	ICAM
Interferon	IFN
Interleukin	IL
Interleukin-18-binding protein	IL-18BP
Interleukin-1 receptor antagonist	IL-1RA
Juvenile idiopathische Arthritis	JIA
Kilodalton	kDa
Licht emittierende Dioden	LED
Lipopolysaccharid	LPS
Low Density Lipoprotein	LDL
Lymphocyte function-associated antigen 1	LFA-1
Macrophage inflammatory protein 1- α	MIP-1- α
Makrophagen-1 Antigen	Mac-1
Matrixmetalloprotease	MMP
Methotrexat	MTX
MicroRNAs	miRNAs
Mitochondrial antiviral signaling protein	MAVS
Mittelwert	MW
Monocyte chemotactic protein 1	MCP-1
Morbus Crohn	M.Crohn
Myeloid differentiation primary response 88	MYD88
Myeloperoxidase	MPO
Neutrophil extracellular traps	NETs
Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat	NADP
NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3	NLRP3
NOD like Rezeptoren	NLR
Nucleotide-binding oligomerization domain, leucine rich repeat containing X1	NLRX1
Nucleotide-binding oligomerization domain	NOD
Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells	NF- κ B
Pathogen-associated molecular pattern	PAMP
Pattern Recognition Receptor	PRR
Peridinin-chlorophyll Protein	PerCP
Peripheral Blood Mononuclear Cell	PBMC
periodisches Fieber, aphthöse Stomatitis, Pharyngitis, zervikale Adenitis	PFAPA Syndrom
P-glycoprotein 1	P-gp
Phorbol myristate acetate	PMA
Phosphate buffered saline	PBS
Phosphatidylserin	PS
Photomultiplier	PMT
Phycoerythrin	PE

Platelet endothelial cell adhesion molecule-1	PECAM-1
Polymerase Chain Reactions	PCR
Propidiumiodid	PI
Proteinkinase	PKN
Pyrin-Domäne	PYD
Receptor Activator of NF- κ B Ligand	RANKL
Ras homolog family member A	RhoA
S100 calcium-binding protein	S100
Serum-Amyloid-A-Protein	SAA
Short Complement-like Repeat	SCR
Standard Deviation	SD
Side Scatter	SSC
Tetrasaccharid Sialyl LewisX	sLeX
T-Helferzellen	Th
TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β	TRIF
Toll-like receptor	TLR
Transendotheliale Migration	TEM
Transmembran Protein A disintegrin and metalloproteinase 17	ADAM17
Tumornekrose-faktor-Rezeptor-assoziiertes periodisches Syndrom	TRAPS
Tumornekrosefaktor α	TNF α
Visuelle Analogskala	VAS
Vascular cell adhesion molecule	VCAM

IV Zusammenfassung (deutsch)

Das Familiäre Mittelmeerfieber (FMF) zählt zu den häufigsten monogenen, autoinflammatorischen Erkrankungen und wird durch Gain-of-Function Mutationen im Familial Mediterranean Fever (*MEFV*)-Gen vererbt. Das *MEFV* Gen kodiert für das Protein Pyrin, das als Bestandteil des Inflammasoms in autoinflammatorischen Prozessen und in der Produktion von Interleukin-1 β (IL-1 β) involviert ist. Bislang galten autosomal rezessive Erbgänge als Auslöser der Erkrankung, mittlerweile gibt es Daten zu Krankheitssymptomen bei heterozygoten Mutationsträgern. Die Klinik der Erkrankung besteht in rezidivierenden Schüben, die in der Regel 24 - 72 Stunden anhalten und meist mit Fieberschüben einhergehen, häufig mit Peritonitis. Oft treten weitere Symptome wie akuter pleuritischer Schmerz, Arthritis im Bereich der Knie, Knöchel und Hüfte und erysipelähnliche Hautrötungen im Bereich des Unterschenkels auf.

Die Diagnose wird häufig nach längerer, diagnostischer Vorgeschichte anhand der Klinik und des genetischen Screenings von Exon 1-10 des *MEFV* Gens gestellt. Allerdings ist das genetische Screening aufwändig und teuer und repräsentiert nicht die klinische Aktivität der Erkrankung.

Ziel dieser Arbeit war es, ein spezifisches Aktivierungsmuster für das Familiäre Mittelmeerfieber zu beschreiben, welches sich auch für eine quantitative Evaluierung der Krankheitsaktivität des Patienten eignet. Ein weiteres Ziel war es zu zeigen, dass der Pathomechanismus im neutrophilen Granulozyten stattfindet, und dass es spezifische Aktivierungsmuster von Neutrophilen beim FMF in Abgrenzung zu anderen inflammatorischen Erkrankungen gibt. Zudem sollte untersucht werden, ob der dem Familiären Mittelmeerfieber zugrunde liegende Pathomechanismus durch Interleukin-1 gesteuert wird und vom NLRP3 Inflammasom abhängig ist.

Aufbauend auf Vorarbeiten der Arbeitsgruppe PD Dr. Kallinich wurde hierzu die Sekretion von S100A12 Proteinen, Interleukin-18 und Caspase-1 in den aufgereinigten Neutrophilen von Patienten mit akuten und chronischen inflammatorischen Erkrankungen im zeitlichen Verlauf mit und ohne Stimulation sowie die Expression der Oberflächenmarker CD62L und CD11b untersucht. Die Ergebnisse wurden mit denen eines homozygoten und mit denen von heterozygot gesunden Mutationsträgern des Familiären Mittelmeerfiebers sowie mit Patienten mit anderen akuten und chronischen inflammatorischen Erkrankungen verglichen. Es zeigte sich ein krankheitsspezifisches Aktivierungsmuster.

Mit den hier dargestellten Daten könnte zukünftig ein für die klinische Anwendung verfügbares diagnostisches Tool entwickelt werden. Darüber hinaus charakterisiert die vorliegende Arbeit die Rolle des angeborenen Immunsystems bei akuten und chronischen inflammatorischen Erkrankungen und beschreibt die phänotypischen Veränderungen von neutrophilen Granulozyten in sterilen und erregerbedingten Entzündungsprozessen.

V Abstract (English)

Familial Mediterranean Fever is one of the most common monogenic autoinflammatory diseases and is inherited by a gain of function mutation in the Familial Mediterranean Fever *MEFV* gene. The *MEFV* gene codes for the protein pyrin, which is a component of the inflammasome and is involved in autoinflammatory processes and in the production of interleukin-1 β (IL-1 β). Until recently, autosomal recessive findings were considered to be the trigger of the disease, but in the meantime data on disease symptoms in heterozygous mutation carriers are available. The clinical signs of the disease consist of recurrent attacks, which usually last 24-72 hours and are usually accompanied by fever attacks, often with peritonitis. Other symptoms often occur, such as acute pleuritic pain, arthritis in the knee, ankle and hip area, erysipelas-like reddening of the skin in the lower leg area.

The diagnosis is often made after a long diagnostic history based on clinical and genetic screening of exons 1-10 of the *MEFV* gene. However, genetic screening is complex and expensive and does not represent the clinical activity of the disease.

The aim of this work was to describe a specific activation pattern for Familial Mediterranean Fever which is also suitable for a quantitative evaluation of the disease activity of the patient. A further aim

was to show that the pathomechanism takes place in neutrophil granulocytes, to present specific activation patterns of neutrophils in distinction to other inflammatory diseases and to investigate whether the pathomechanism underlying Familial Mediterranean Fever is controlled by interleukin-1 and is dependent on the NLRP3 inflammasome.

Based on preliminary work of the research group PD Dr. Kallinich, the secretion of S100A12 proteins, interleukin-18 and caspase-1 in the purified neutrophils of patients with acute and chronic inflammatory diseases was investigated over time with and without stimulation as well as the shedding of the surface markers CD62L and CD11b. The results were compared with those of homozygous and heterozygous healthy mutation carriers of Familial Mediterranean Fever and with patients with other acute and chronic inflammatory diseases. A disease-specific activation pattern was found.

With the data presented here, a diagnostic tool available for clinical application could be developed in the future. Furthermore, the present work characterizes the role of the innate immune system in acute and chronic inflammatory diseases and describes the phenotypic changes of neutrophil granulocytes in sterile and pathogen-induced inflammatory processes.

1 Einleitung

1.1 Klinik des Familiären Mittelmeerfiebers

Beim Familiären Mittelmeerfieber (FMF) handelt es sich um die häufigste monogene autoinflammatorische Erkrankung, jahrelang ging man von einem autosomal-rezessiven Erbgang aus.¹ Die höchste Inzidenz an Mutationsträgern findet sich in Populationen, die aus dem Mittleren Osten stammen. Mutationen, die das Krankheitsbild des Familiären Mittelmeerfiebers verursachen, betreffen das **M**editerranean **F**e**V**er (*MEFV*) Gen, welches das Proteinprodukt Pyrin, auch genannt Marenostrin, kodiert.¹

Die Klinik des Familiären Mittelmeerfiebers zeichnet sich durch selbstlimitierende Fieberschübe aus, die etwa 24 bis 72 Stunden anhalten und in unregelmäßigen Intervallen wiederkehren. Die Fieberattacken sind häufig begleitet von Zeichen einer Peritonitis, Pleuritis, Synovitis oder Erysipel-ähnlichen Erythemen.²⁻⁴ Abdominelle Schmerzen, welche die Fieberschübe häufig begleiten, können sich sehr unterschiedlich präsentieren: Die klinische Bandbreite reicht von Schmerzen bis zum Vollbild einer Peritonitis. In der Bildgebung lassen sich unter Umständen verdickte Mesenterialwände, eine Lymphadenopathie oder ein leichter Aszites nachweisen.^{2,3} Mitunter wird aufgrund der erschwerten Diagnosestellung bei den Patienten eine Laparoskopie durchgeführt, hier kann sich ein Neutrophilenreiches Exsudat zeigen.² Die Pleuritis kann allein mit den Fieberschüben auftreten oder sich in Kombination mit einer Peritonitis zu den Fieberschüben präsentieren.⁴ Charakteristisch ist ein einseitig auftretender Schmerz. Es können sich Pleuraergüsse darstellen, infolge der Minderbelüftung können Atelektasen in der Bildgebung imponieren.^{2,3} Im Rahmen von Pleuritiden und Peritonitiden sind auch pleurale und peritoneale Adhäsionen berichtet worden.³ Die Synovitischübe zeichnen sich in der Regel durch Monarthritiden aus, die häufig innerhalb von ein bis sieben Tagen abklingen. Sie betreffen insbesondere Knie, Fußknöchel oder Hüfte und gehen nicht selten mit starken Schmerzen und ausgeprägten Ergüssen einher. Die Synovialflüssigkeit imponiert mit zahlreichen polymorphnukleären Leukozyten, aber die Kulturen sind steril.²⁻⁴ Erosive Gelenkveränderungen treten in der Regel nicht auf.

Die häufigste kutane Manifestation der Erkrankung besteht in Erysipel-artigen Erythemen, die sich als scharf begrenzte, überwärmte und geschwollene Läsionen manifestieren, im Durchmesser ca. 10 -15 cm messend, und uni- oder bilateral meist am Fußrücken, -knöchel oder Unterschenkel auftreten. In der Biopsie zeigt sich ein gemischtes perivaskuläres Infiltrat von polymorphonukleären Leukozyten, Makrophagen und Lymphozyten.^{2,3}

Bei präpubertalen Jungen sind auch vereinzelte Fälle eines unilateralen akuten Skrotums beschrieben worden. Diese beruhen auf einer Entzündung der Tunica vaginalis.^{2,5}

Als gefürchtete Langzeitkomplikation gilt eine Amyloidose und damit einhergehend eine Nephropathie, die schleichend voranschreitet. Die Proteinurie ist das früheste Zeichen und dient als Indikator der Amyloidose, bestätigt wird die Amyloidose durch eine Biopsie. Ohne suffiziente Therapie kann sich ein nephrotisches Syndrom sowie eine Urämie mit infauster Prognose entwickeln.^{2,6}

Eine Reihe von chronischen inflammatorischen Erkrankungen sind mit dem Familiären Mittelmeerfieber assoziiert: bei Patienten mit IgA-assoziiierter Vaskulitis (IgAV, auch bekannt als Purpura Schönlein Henoch) lässt sich im Vergleich zur übrigen Bevölkerung eine erhöhte Anzahl an *MEFV*-Mutationsträgern beobachten.⁷ Bei FMF-Patienten nimmt die IgAV einen etwas anderen Verlauf als ohne FMF Mutation: sie tritt bei jüngeren Kindern und an ungewöhnlichen Lokalisationen, wie dem Gesicht und dem Körperstamm, auf. Bei 1% der FMF-Patienten wird eine Panarteriitis nodosa beobachtet.^{2,7}

1.2 Vererbungsmodus des Familiären Mittelmeerfiebers

Fallberichte von Patienten, die phänotypisch Symptome des Familiären Mittelmeerfiebers zeigen, obwohl sie heterozygote Mutationsträger sind, veranschaulichten, dass es sich nicht um einen klassischen autosomal-rezessiven Erbgang handeln kann.^{8,9} Für Mutationsträger wurden erhöhte

akute Phaseproteine, Fieberepisoden und im Verhältnis zur gesunden Bevölkerung eine erhöhte Inzidenz von rheumatischen Erkrankungen nachgewiesen.^{9,10} Studien, die Mutationen bei FMF-Patienten untersuchen, gehen von 20-25% an FMF-Erkrankten aus, bei denen keine Mutation im 2. Allel nachgewiesen werden kann. Dennoch zeigen diese Patienten FMF-typische Symptome, die auf die Therapie mit Colchizin ansprechen.¹¹ Als Erklärung für dieses Phänomen wurden unterschiedliche Hypothesen vorgeschlagen. Eine der Studien untersuchte eine unzureichende Sensitivität der genetischen Screening-Methode. Allerdings gelang in den untersuchten Fällen auch kein Nachweis einer 2. Mutation, selbst wenn das Gen und die Promoterregion vollständig sequenziert wurden.^{8,9,22} In den letzten Jahren ist die Epigenetik auch im Bereich der autoinflammatorischen Erkrankungen untersucht worden. Es gibt Arbeiten, die den Einfluss von microRNAs (miRNAs) auf die phänotypische Heterogenität von heterozygoten FMF-Mutationsträgern darlegen.

Auch unter homozygoten Mutationsträgern zeigt sich eine unterschiedliche klinische Penetranz. Somit scheint die Fülle an bislang nachgewiesenen Mutationen unterschiedliche klinische Relevanz zu haben.^{12,13} Umwelteinflüsse, modifizierende Gene und Epigenetik sind Faktoren, die auch als Einflussfaktoren auf die Genotyp-Phenotyp Relation in der Literatur diskutiert werden.^{33,34}

Die Diagnostik des FMF basierend allein auf der Genetik ist somit als problematisch zu werten. Inwiefern die Mutation Rückschlüsse auf den Phänotyp erlaubt, stellt eine zentrale Frage in der Erforschung des Familiären Mittelmeerfiebers dar.¹⁴⁻¹⁸ In diesem Kontext könnte auch die Stellung, in der die Mutationen vorliegen, cis oder trans, einen Einfluss auf die Klinik des Patienten haben und wertvolle Aspekte hinsichtlich der Therapieentscheidungen beinhalten.²

Seitdem Mutationen des *MEFV* Gens als Ursache des FMF identifiziert worden sind, werden zunehmend neue Mutationen beschrieben, welche zur Erkrankung führen können. Recherchiert man über die Infevers Plattform - ein Online Register für Mutationen bei hereditären autoinflammatorischen Erkrankungen - Mutationen des *MEFV* Gens als Ursache für das FMF, wird eine Absolutzahl von aktuell 365 Sequenzvarianten aufgezeigt. Unklar ist, welche klinische Relevanz diese Mutationen im Einzelnen haben.¹⁹

1.3 Pathogenese des Familiären Mittelmeerfiebers - Phänomen der Autoinflammation

Das FMF ist die häufigste monogene autoinflammatorische Erkrankung. Autoinflammation ist ein Phänomen des angeborenen Immunsystems.¹⁻³ Das angeborene Immunsystem zeichnet sich im Gegensatz zum adaptiven Immunsystem durch eine nicht an Antigen-spezifische Immunität gebundene Antwort aus. Während im Rahmen einer Antwort des adaptiven Immunsystems auf Pathogene, Fremdartigene und Gewebeschaden antigenspezifische Antikörper und Lymphozyten Hauptakteure sind, die einen anhaltenden Schutz bieten, ist die Reaktion des angeborenen Immunsystems unmittelbar, unspezifisch und liefert keinen bleibenden Schutz. Sie basiert auf den Leukozyten, insbesondere auf der myeloischen Zellreihe, auf dem Komplementsystem und auf dem Zusammenspiel von Zytokinen und Chemokinen.⁵⁹

Bausteine für das Verständnis der Autoinflammation liefert Charles Janeway Junior, der erstmals 1989 die Aktivierung des angeborenen Immunsystems beschreibt: Pattern Recognition Receptors (PRR) erkennen Pathogene anhand von pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) bzw. einen Gewebeschaden mittels damage-associated molecular patterns (DAMP's) und induzieren in der Folge eine Immunantwort.⁵⁹ Die PRRs teilen sich nach Vorkommen in drei Gruppen: lösliche, membrangebundene und intrazelluläre Rezeptoren. Gut charakterisierte Rezeptoren der angeborenen Immunsystems stellen die transmembranösen Toll-ähnlichen Rezeptoren (toll-like receptors, TLRs) dar.^{60,61} Als erster TLR wurde der Lipopolysaccharid (LPS)-erkennende TLR4 identifiziert. Nach Bindung eines Liganden an die TIR-Domäne eines TLR wird über die Adapterproteine Myeloid differentiation primary response 88 (MYD88) und/oder TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β (TRIF) der Transkriptionsfaktor nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (NF- κ B) aktiviert. Nach Translokation von NF- κ B in den Zellkern reguliert dieser dort die Transkription von proinflammatorischen Zytokinen.

Eine weitere Familie von Rezeptoren der angeborenen Immunität sind die nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptors (NLR), die sich im Zytosol der Wirtszelle befinden.^{60,61}

Mit der Identifikation von Inflammasomen gelang ein detaillierteres Verständnis von entzündlichen Prozessen des angeborenen Immunsystems auf molekularer Ebene und damit einhergehend von autoinflammatorischen Erkrankungen. Inflammasome sind große Multiproteinkomplexe in der Größe von mehreren kDa, die bei Aktivierung an Größe zunehmen. Charakterisiert sind mittlerweile verschiedene Inflammasomgruppen, die sich in ihrem Grundaufbau ähneln: sie weisen alle einen Sensorkomplex, der inflammatorische Trigger erkennen kann, ein Adapterprotein sowie Caspasen, deren Vorstufe im Rahmen der Inflammasomaktivierung gebunden und aktiviert wird, auf.

Für die Aktivierung von reifem IL-1 β und reifem IL-18 ist zunächst die Aktivierung von TLRs oder anderer Zytokinrezeptoren notwendig, was das Priming bewirkt, also die gesteigerte Expression von proinflammatorischen Zytokinen und Inflammasombestandteilen. Diese werden schließlich durch die Spaltung durch Caspase-1 in die aktive Form gebracht.⁶⁴⁻⁶⁸

Bislang wurde die klassische Inflammasomsaktivierung beschrieben.

Die Aktivierung von Inflammasomen initiiert zudem den Prozess der Pyroptose. Der Vorgang der Pyroptose wird durch das Gasdermin-D (GSDMD) Protein ausgelöst, das nach Spaltung durch die Caspase-1 Permeabilitätsporen in der Zellmembran formt. Es kommt zum Untergang von Zellen, die durch Pathogene geschädigt wurden. In der Folge wird die geschädigte Zelle lysiert und der Inhalt des Zytosols in den Extrazellularraum freigegeben. Neuere Veröffentlichungen gehen zudem davon aus, dass über humane Caspasen 4/5 bzw. murine Caspase 11 eine alternative Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms stattfinden kann und hierüber die Aktivierung von Caspase-1 mit Triggerung der inflammatorischen Zytokine IL-1 β und IL-18. Auch GSDMD scheint in der nicht-kanonischen Inflammasomsaktivierung eine zentrale Rolle zu spielen: Caspase-4/5/11 spaltet die N-terminalen Fragmente des Gasdermins, die sich in der Zellmembran als Oligomere zusammensetzen und Poren formen, ungeklärt ist, wie IL-1 β und IL-18 in den extrazellulären Raum freigesetzt werden.^{70,73} Kanneganti et al. heben in einer Publikation von 2018 die Rolle der GSDMD vermittelten Pyroptose in Bezug auf die extrazelluläre Freisetzung von IL-1 β und IL-18 hervor.⁷⁴

Der Prozess der Pyroptose wurde bislang in Zusammenhang mit Makrophagen und dendritischen Zellen beschrieben, in denen sich Pathogene replizieren können. Diese können von Inflammasomen erkannt werden, aktivieren Caspase-1 und initiieren den Prozess der Pyroptose. Die auf diese Weise freigesetzten Zytosolbestandteile werden von Neutrophilen beseitigt. Aufgrund ihrer Kurzlebigkeit und ihrer mikrobioziden Aktivität scheinen neutrophile Granulozyten vor dem unmittelbaren Eindringen von Pathogenen geschützt zu sein, man ging bislang davon aus, dass der Prozess der Pyroptose nicht unmittelbar in Neutrophilen stattfindet.^{65,66}

Neben diesen physiologisch erwünschten Entzündungsprozessen als Antwort unseres Immunsystems auf Pathogene, belegen Daten aus neueren Veröffentlichungen jedoch auch einen Zusammenhang zwischen Proteinbestandteilen von Inflammasomen und einem weiten Spektrum von Erkrankungen des menschlichen Organismus. Darunter fallen verschiedene entzündliche Erkrankungen, die unter den autoinflammatorischen Krankheiten zusammengefasst werden⁶⁸.

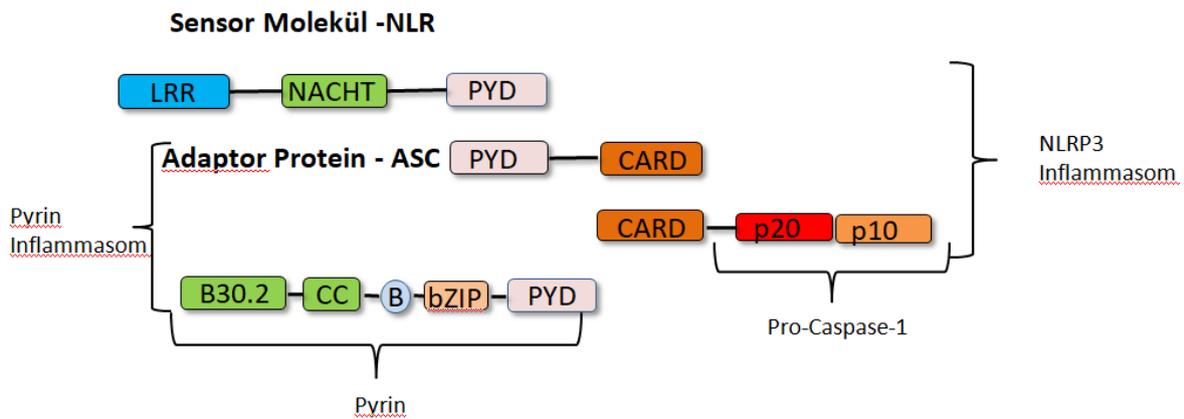


Abb 1-1: NLRP3 und Pypin Inflammasom
 LRR=Leucine reach repeats; ASC= apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain; CC= coiled-coil domain; B30.2=B30.2/SPRY domain; B= B Box; PYD=Pyrin domain; bZIP= Basic Leucine Zipper Domain transcription factor
 Pathogene werden durch die Sensor Moleküle (PRRs) erkannt, die eine Konformationsänderung durchlaufen. In der nun aktivierten Form werden die Adaptor Proteine gebunden und die Verbindung von Sensor Molekül, Adaptor Protein und Pro-Caspase (bestehend aus 20 kDa (p20) and 10 kDa (p10) subunits) zum Inflammasom getriggert. Abbildung inhaltlich adaptiert nach ⁶⁰⁻⁶⁸

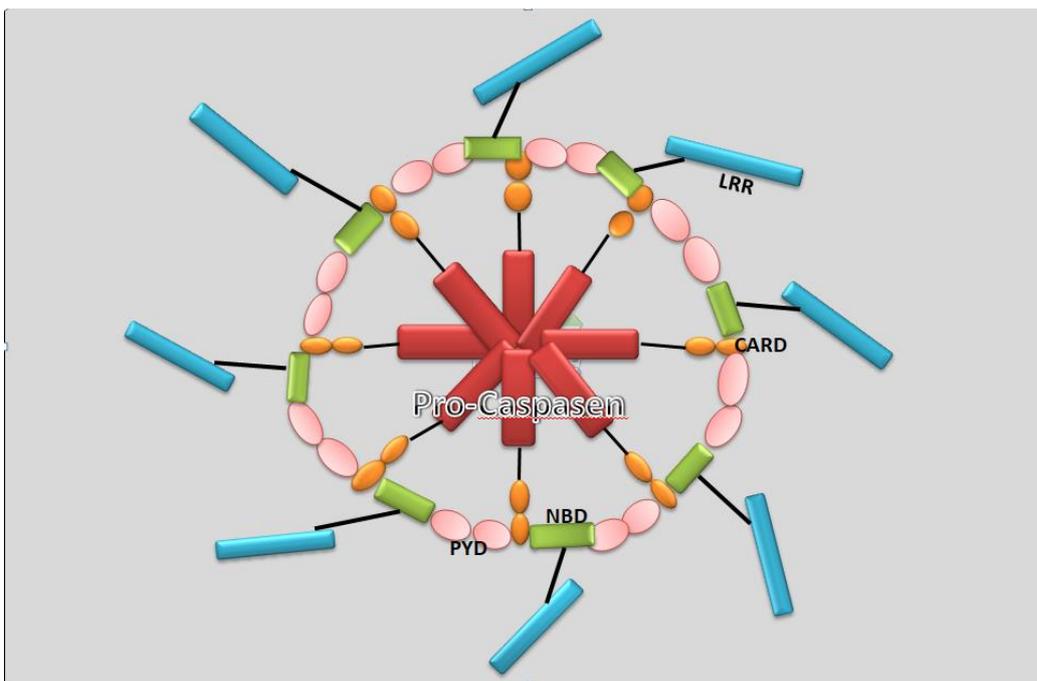


Abb 1-2: NLRP3 Inflammasom
 LRR=Leucine reach repeats; NBD=nucleotid binding domain ; CARD= caspase recruitment domain; PYD=Pyrin domain
 aktivierter Multiproteinkomplex Inflammasom Abbildung inhaltlich adaptiert nach ^{60-68, 74}

1.4 Molekulare Pathogenese des Familiären Mittelmeerfiebers

Wie bereits beschrieben, zeigen molekulare Analysen der Pathogenese, dass FMF-Mutationen des *MEFV* Gens die FMF-Krankheit verursachen. Das *MEFV* Gen kodiert für das Protein Pypin auf dem Chromosom 16, ein großes Protein (86 kDa), das sich hauptsächlich in Neutrophilen, Monozyten und dendritischen Zellen findet. Physiologisch wird nicht mutiertes Pypin durch die Serin-Threonin Kinasen

PKN1 and PKN2 phosphoryliert und gebunden. Phosphoryliertes Pyrin wiederum wird durch 14-3-3 Proteine gebunden und das Inflammasom damit blockiert.^{76,77}

Bakterielle Toxine können Pyrin-Inflammasome aktivieren, indem sie GTPasen der Wirtszelle inaktivieren. Durch Glucosylierung, Adenylierung, ADP-Ribosylierung oder Desaminierung in der Switch-I Region von RhoA, wird die Guanin Nucleotid Bindungs- und GTPase Aktivität inhibiert, das Aktin-Zytoskelett der Wirtszelle wird zerstört. Im Rahmen dieser Signalkaskade wird die Phosphorylierung von Pyrin blockiert und das Pyrin-Inflammasom aktiviert. Dieser reziproke Zusammenhang findet sich auch bei den gain-of-function Mutationen beim FMF, auch hier kommt es zu einer Inflammasoms-Aktivierung und in der Folge dessen zu einer Aktivierung von Caspase-1 sowie einer vermehrten IL-1 β - und IL-18-Sekretion. Knock-in Mäuse, die eine Mutation tragen, die in Zusammenhang mit dem FMF beschrieben wurde, entwickeln Symptome ähnlich denen der FMF-Patienten.^{76,77}

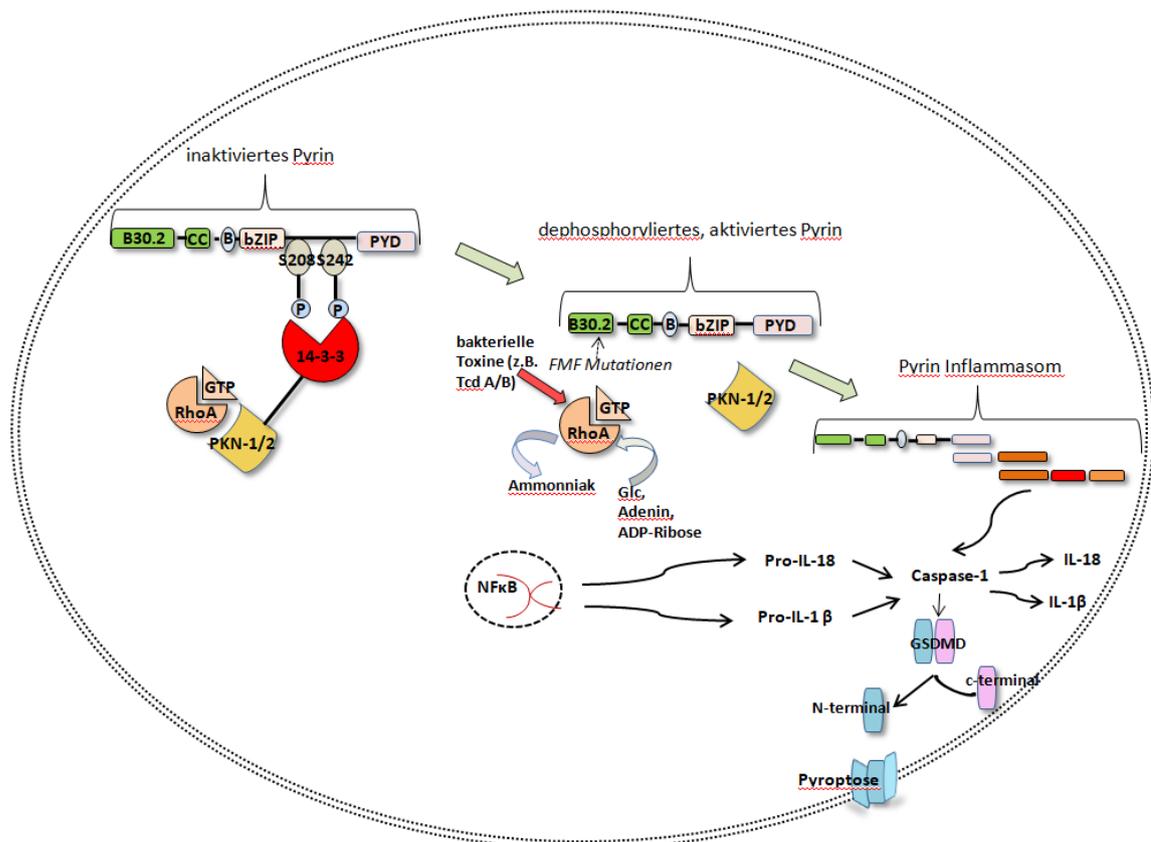


Abb. 1-3: Pathogenese des FMF

RhoA GTPasen aktivieren PKN-1/2, die Pyrin an 2 Serin Residuen (S208 und S242) phosphorylieren. Phosphoryliertes Pyrin interagiert mit 14-3-3 Chaperon Proteinen, die das Pyrin Inflammasom inaktivieren. Durch bakterielle Toxine inaktivierte Rho GTPasen dephosphorylieren Pyrin, und das Pyrin-Inflammasom wird aktiviert. Die inaktiven Vorstufen von IL-18 und IL-1 β werden im Zellkern mit Hilfe des Transkriptionsfaktors NF- κ B produziert und durch die aktivierte Caspase-1 proteolytisch in die aktiven Zytokine gespalten. Caspase-1 bewirkt die Abspaltung des c-terminalen Teils von GSDMD, und der n-terminale Teil initiiert die Pyroptose und die Porenbildung in der Zellmembran.

1.5 Genotyp-Phänotyp Korrelation

Das INFEVERS Register gibt einen systematischen Überblick über die beim FMF bislang bekannten Mutationen und fasst die häufigsten Mutationen bei FMF-Patienten zusammen: darunter befinden sich vier im Exon 10 (M694V, M694I, V726A, M680I), sowie die E148Q Mutation im Exon zwei. Zusammengenommen sollen nach aktuellem Stand 80% der Patienten eine dieser Mutationen

tragen.¹⁹ Klinische Relevanz liegt in der Identifikation von Mutationen, die assoziiert sind mit besonders ausgeprägten oder besonders milden Phänotypen des FMF, mit seltenen Symptomen und mit bestimmten Symptommustern. So ist die M694V Mutation in den meisten Populationen mit der

klassischen Symptomatik des FMF assoziiert, wie den charakteristischen Fieberschüben und dem gehäuften Auftreten von Arthritiden. Mildere Phänotypen werden häufig der E148Q Mutation zugeschrieben. Unklar ist allerdings, ob es sich hierbei um einen Polymorphismus, und nicht um eine krankheitsverursachende Mutation handelt.^{19,20}

Auch bestimmte heterozygote Genotypen sollen gehäuft mit typischer Klinik einhergehen. Eine häufige Korrelation von Fieber, Brustschmerz und abdominellen Schmerzen stellen Cekin et.al. für den P369S heterozygoten Genotypen dar, eine hohe Frequenz von Arthritiden sahen die Autoren in Zusammenhang mit dem K695R heterozygoten Genotypen.¹⁷

In der Literatur beschrieben sind darüber hinaus Patienten mit klinischen FMF-Phänotypen, für die eine Identifikation eines entsprechenden Genotyps nicht gelingt. Umgekehrt demonstriert das INFEVER Register, dass für 41 *MEFV* Mutationen nach aktuellem Stand kein Phänotyp korreliert werden kann, für 99 Mutationen kann der Phänotyp nicht eindeutig charakterisiert werden.

Hinsichtlich der heterogenen FMF-Phänotypen könnten miRNAs, die als epigenetische Regulatoren von Inflammationsparametern beim FMF untersucht wurden, zukünftig einen Stellenwert einnehmen. Verschiedene Expressionsmuster von miRNAs wurden als Erklärung für die unterschiedliche phänotypische Ausprägung bei FMF-Patienten herangezogen.^{33,34} In einer Arbeit von Akkaya-Ulum et al. wird die miRNA miR-197-3p als Modulator für die Genexpression von IL-1 β , *MEFV*, IL-18 und TNF- α vorgestellt.³³ Weitere Untersuchungen werden hilfreich sein, den Nutzen von miRNAs für das Verständnis der unterschiedlichen FMF-Klinik präziser zu evaluieren.

1.6 Diagnostik des FMF anhand klinischer Kriterien

Eine zuverlässige Diagnostik und Evaluation der Schwere der Erkrankung wird somit nur in Zusammenschau mit der Klinik möglich, was auch entscheidend für die Planung der Therapie ist.²²⁻²⁸ Als etabliertes diagnostisches Testsystem gelten die Tel Hashomer-Kriterien: siebenundzwanzig Merkmale und Manifestationen wurden untersucht, um ihre Prävalenz bei 105 Patienten mit FMF und 106 Kontrollen zu bestimmen. Manifestationen, die bei FMF-Patienten signifikant häufiger auftraten als bei den Kontrollen, wurden in das vorgeschlagene Testsystem zur Diagnose von FMF, basierend auf einem Modell von major, minor und unterstützenden Kriterien, aufgenommen. Die klinische Diagnose wird nach den Tel Hashomer Kriterien je nach Zutreffen der Kriterien gestellt und gilt als gesichert bei Vorliegen von zwei major Kriterien oder einem major und zwei minor Kriterien.^{22,23} Obwohl die Tel Hashomer-Kriterien bei der Diagnose erwachsener Patienten sehr erfolgreich waren, war die Spezifität bei Kindern gering (54,6%). Um eine klinische Diagnostik zu entwickeln, die sich besser für die pädiatrische Diagnostik eignet, definierten Yalcinkaya et al. weitere Kriterien. Die Studiengruppe bestand aus 170 kurz vor Analysebeginn genetisch diagnostizierten FMF-Patienten, die Mutationen in beiden Allelen aufwiesen. Sie wurden über Zutreffen von 35 Merkmalen und Manifestationen des FMF zum Zeitpunkt der Diagnose befragt. Bei den Kontrollen handelte es sich um Patienten ohne FMF (n = 141), die Fieberepisoden und klinische Merkmale aufwiesen, die denen des FMF ähnelten. Die diagnostische Leistung der Kandidatenmerkmale wurde durch eine multiple logistische Regressionsanalyse bewertet. Anhand der statistischen Analyse wurden von 35 neuen Kriterien fünf identifiziert, die eine hohe Sensivität und Spezifität für die FMF Diagnose bei Kindern aufwiesen. Die höchste Sensivität (86,5%) und Spezifität (93,6%) lag bei Vorkommen von zwei dieser Kriterien vor.²⁴

1.7 Klassifikation und Schweregradeinteilung des FMF

Die Begriffe Klassifikation und diagnostische Kriterien werden nicht immer korrekt angewendet und nicht immer deutlich voneinander getrennt. Klassifikationskriterien dienen der Identifikation von Erkrankungen. Im Kontext von autoinflammatorischen Erkrankungen werden sie herangezogen, um

die Erkrankungen voneinander abzugrenzen, nicht zu diagnostizieren. In einer Arbeit von 2019 wurden Daten von Patienten mit angeborenen periodischen Fiebersyndromen, die im Eurofever Register erfasst wurden, evaluiert, mit dem Ziel, Klassifikationskriterien zu identifizieren. In einem ersten Schritt

wurden klinische, Labor- und genetische Variablen definiert. In einem zweiten Schritt wurden 360 Patienten aus dem Eurofever Register durch Kliniker und Genetiker, die gegenüber der Diagnose verblindet waren, klassifiziert. In einem weiteren Schritt wurden die Klassifikationskriterien selektiert. Anschliessend wurde die endgültige Entscheidung für die Klassifikationskriterien anhand von statistischen Methoden und einer Konsensbildung vorgenommen. Diese Klassifikationskriterien wurden im letzten Schritt getestet, indem sie zur Unterscheidung zwischen zwei exemplarischen autoinflammatorischen Fiebersyndromen herangezogen wurden, wobei die ursprüngliche Diagnose des behandelnden Arztes herangezogen wurde. Es gelang, Klassifikationskriterien zu definieren, die eine hohe Sensitivität und Spezifität aufwiesen (z. B. für das PFAPA, Sensitivität und Spezifität waren 0,97 bzw. 0,93)²⁵

Im Hinblick auf eine Schweregradeinteilung des FMF, führten Pras et al. 1998 den Pras-Score ein, der die Ausprägung des klinischen Phänotyps beim FMF zwischen zwei Populationen vergleicht. Zur Evaluation der Krankheitsschwere werden verschiedene Scores jeweils für Alter der Erstmanifestation der Erkrankung, Frequenz der Schübe, Schwere der Arthritis, erysipelartige Erytheme und Höhe der erforderlichen Colchizin Dosis vergeben. Juden aus Nordafrika und Juden aus dem Iraq, die die Populationen in Israel mit der häufigsten FMF-Inzidenz darstellen, wurden anhand verschiedener Kriterien hinsichtlich der Schwere des Krankheitsbilds miteinander verglichen. Innerhalb der nordafrikanisch-stämmigen Populationen manifestierte sich eine ausgeprägtere Klinik in Bezug auf Alter der Ersterkrankung, Häufigkeit und Schwere von Gelenkbeteiligungen, eine höhere Inzidenz von Erysipel-ähnlichen Erythemen und eine höhere Dosierung von Colchizin zur Kontrolle der Symptomatik.²⁶

Für die Evaluation der Erkrankungsschwere mit möglichst hoher Sensitivität und Spezifität entwickelten Mor et al. 2005 ein neues Scoringsystem. 100 FMF Patienten wurden durch Kliniker drei verschiedenen Gruppen, basierend auf der Ausprägung des klinischen Phänotyps, zugeordnet: "mild", "intermediate", "severe". Für die Zuordnung wurden neun Kriterien herangezogen, als besonders valide rückten die Autoren die Kriterien Frequenz der Schübe, Anzahl der Lokalisationen, die während eines Schubs betroffen sind und Dauer der Schübe in den Vordergrund. Die Zuordnung der Kriterien in ein Klassifikationsmodell führte zum FMF-severity score (F-SS). Durch die Integration von klinischen Parametern erfolgte schließlich die Erstellung eines vereinfachten Scores (F-SS-2).²⁷

Kriterien, die das Ansprechen auf die Therapie definieren sollen, werden im FMF 50 erfasst. Zunächst wurden Kriterien definiert, die auf Daten von Therapie-responsiven und -resistenten FMF-Patienten aus der FMF Arthritis Vasculitis and Orphan disease Research in paediatric rheumatology (FAVOR) Website basierten. Es erfolgte eine Validierung und Analyse dieser Kriterien hinsichtlich ihrer Fähigkeit, über den besten Cut-off-Score zwischen Patienten mit aktiver und inaktiver Erkrankung zu unterscheiden. Der FMF 50 umfasste:

1. Prozentuale Veränderung der Häufigkeit der Anfälle unter der Behandlung.
2. Prozentuale Veränderung der Dauer der Attacken unter der Behandlung.
3. Globale Bewertung des Schweregrads der Erkrankung durch die Patienten/Eltern (10 cm visuelle Analogskala (VAS)).
4. Globale Einschätzung des Schweregrads der Erkrankung durch die Ärzte (10 cm VAS).
5. Prozentuale Veränderung der Arthritisfälle unter der Behandlung.
6. Prozentuale Veränderung des C-reaktiven Proteins, der Erythrozytensedimentationsrate oder des Serum-Amyloid-A-Spiegels mit der Behandlung. Ein Ansprechen auf die Behandlung mit einer sehr hohen Sensitivität und Spezifität wurde definiert als eine 50% ige Verbesserung in mindestens fünf von sechs Kriterien ohne eine Verschlechterung in einem der Kriterien. Insgesamt wurde der FMF 50 durch die Autoren der Publikation als ein benutzerfreundliches Instrument für Kliniker bewertet.²⁸

1.8 Rolle von Biomarkern für Diagnostik und Therapieverlauf des FMF

Nicht nur für eine verbesserte Diagnostik des FMF, sondern auch für ein mögliches Therapiemonitoring im Hinblick auf therapeutische Entscheidungen, ist die Identifikation von Biomarkern wichtig.

Gohar et al. setzten die sekretorische Aktivität von Neutrophilen bei Patienten, deren FMF-Erkrankung nach den Tel Hashomer-Kriterien und genetisch als gesichert gilt, in Korrelation zum Genotypus und der Krankheitsaktivität. In diesem Kontext zeigten sie eine erhöhte sekretorische Aktivität von IL-18- und S100A12- Proteinen beim homozygoten M694V Genotyp abnehmend im Vergleich zum heterozygoten Mutationsträger, wiederum abnehmend im Vergleich zum gesunden Probanden. Diese erhöhte Aktivität homozygoter vs. heterozygoter Genotyp vs. gesunder Proband konnte auch in aktivitätsfreien Krankheitsintervallen gezeigt werden, so dass sich hier eine Option zum Monitoring der Erkrankung auch im Hinblick auf Prognose (insbesondere von Langzeitfolgen) und Therapieplanung ergeben könnte. Eine erhöhte Aktivität konventioneller Biomarker wie CRP und Erythrozytensedimentationsrate (ESR) konnte beobachtet werden, allerdings zeigte sich keine eindeutige Korrelation zum Genotypen.³¹

Knieper et al. untersuchten die Biomarker ESR, Serum-Amyloid-A-Protein (SAA) und CRP, welche die inflammatorische Aktivität bei FMF Patienten widerspiegeln sollen. Die Biomarker könnten hilfreich in der Identifikation der Patienten sein, die von einer frühzeitigen Erhöhung der Colchizin Dosierung profitieren würden und ein zielgerichtetes, individuelles Therapieregimen unterstützen.³²

Çakan M. et al. untersuchten die Inflammationsparameter CRP, ESR und SAA während der FMF-Schübe als auch im schubfreien Intervall und fanden eine Korrelation zwischen erhöhten CRP- (Median 56.7 mg/l) und SAA- (Median 433.5 mg/l) Werten während einer FMF-Attacke. Das CRP war bei 13,6 %, und das SAA bei 28,5 % der Patienten während der anfallsfreien Zeit erhöht.²⁹

Eine prospektive Beobachtung der Entzündungsaktivität über einen längeren Zeitraum in einer Kohorte von türkischen Patienten mit FMF und ihren gesunden Verwandten im Vergleich zu gesunden Kontrollen wurde von Lachmann et al. 2006 durchgeführt. Dabei wurden auch die Inflammationsparameter CRP und SAA in Zusammenhang mit den *MEFV*-Genotypen gebracht. Bei den Patienten mit FMF wurde während der Attacken eine erhebliche Reaktivität der Akute-Phase-Proteine beobachtet (Median SAA 693 mg/l, CRP 115 mg/l). Zwischen den Attacken gab es ebenfalls eine gewisse Entzündungsaktivität (Median SAA 6 mg/l, CRP 4 mg/l). Bei asymptomatischen *MEFV*-Heterozygoten zeigten sich im Vergleich zu Wildtyp-Probanden auch erhöhte Akute-Phase-Proteine.¹⁰ Die Antwort der Akute-Phase-Proteine im Rahmen von FMF-Attacken sowie im schubfreien Intervall untersuchten Korkmaz A. et al. mit der Hypothese, dass diese sich zwischen den einzelnen Proteinen unterscheiden. Gemessen wurden die Parameter ESR, CRP, Fibrinogen, Leukozytenzahl, Thrombozytenzahl, Faktor VIII assoziiertes Antigen, Haptoglobin, Protein Elektrophorese, Ferritin, Proteinurie und Hämaturie. Sie sahen nur ein erhöhtes CRP während der Schübe bei allen FMF-Patienten.³⁰

1.9 Therapie des Familiären Mittelmeerfiebers

Oral appliziertes Colchizin gilt seit der Erstbeschreibung bei FMF-Patienten in einer Veröffentlichung im NEJM durch S.E. Goldfinger 1972 und seit den Publikationen von Zemer et al. sowie von Dinarello et al. 1974 als Goldstandard in der Therapie des FMF.³⁵⁻³⁷ Es handelt sich um ein tricyclisches, lipidlösliches Alkaloid mit einer langen Halbwertszeit (20-40 Stunden) und einer Bioverfügbarkeit zwischen 24 - 88%, dessen therapeutische Wirkung beim FMF noch nicht vollständig verstanden ist.³⁸ Colchizin reichert sich vermehrt in Leukozyten im Vergleich zum Plasma an und verbleibt dort für mehrere Tage. Es bindet insbesondere an drei Proteine: Tubulin, Cytochrom P3A4 (CYP3A4) und P-Glycoprotein.³⁹⁻⁴¹ Gebunden an Tubulin, wird die Polymerisation des Mikrotubulussystems zerstört, in niedrigen Konzentrationen wird das Wachstum der Mikrotubuli angehalten, in höherer Dosierung wird die Depolymerisation der Mikrotubuli gefördert. Die Pharmakodynamik des Colchizins bedingt eine Reihe von Wirkungen im menschlichen Organismus, es soll sich hier auf die Wirkungen im

Zusammenhang mit inflammatorischen Erkrankungen beschränkt werden: die Zytokinsekretion, die Migration von Leukozyten und die Phagozytose von neutrophilen Granulozyten werden inhibiert. In Neutrophilen unterdrückt Colchizin die intrazellulären Signalmoleküle, inklusive Tyrosinkinasen und Phospholipasen. Chemotaxis und die Sekretion von lysosomalen Enzymen während der Phagozytose werden gestört. Zudem scheint die Funktionalität von Neutrophilen durch Störung der Verformbarkeit supprimiert zu werden.^{38-41,43}

Es gibt Hinweise darauf, dass Adhäsionspartner für Migration und Diapedese unterdrückt werden: In niedrigeren Konzentrationen (3nM) soll die Verteilung von E-Selektin Molekülen auf Endothelzellen gestört werden. In höheren Konzentrationen (300 nM), soll die L-Selektin Expression an Neutrophilen gehemmt werden.³⁸⁻⁴³

Publizierte Daten weisen auf einen Effekt auf die Aktivierung von Caspase-1 im Rahmen der NLRP3-Aktivierung durch Colchizin hin.⁴⁴ Von Park et al. 2016 publizierte Analysen demonstrieren eine Interaktion von Colchizin mit dem Guanin-Exchange-Faktor. Die Regulation des Aktin-Zytoskeletts durch Mikrotubuli wird durch GTPasen der Rho-Familie vermittelt. Die publizierten Daten deuten auf eine Unterdrückung der Inflammation durch Colchizin bei FMF durch den folgenden Mechanismus hin: Colchizin bindet an Tubulin und depolymerisiert Mikrotubuli, was zur Freisetzung des RhoA-Aktivators, des Guanin-Nukleotid-Exchangefaktors (GEF)-H1, führt, der inaktiv ist, wenn er an Mikrotubuli gebunden ist. Somit aktiviert Colchizin indirekt RhoA. Die Aktivierung dieses Proteins führt zu einer verstärkten Phosphorylierung von Pylrin und damit zu einer höheren Bindung durch die 14-3-3 Peptide, so dass weniger freies Pylrin für den Aufbau des Inflammasoms zur Verfügung steht. So demonstrierten Park et al. eine Inhibition der IL-1 β -Sekretion aus PBMCs von FMF-Patienten nach Zugabe von Colchizin. Dieser Effekt konnte bei CAPS-Patienten in den Experimenten nicht gezeigt werden. Insofern stellt dieser Ansatz eine Erklärung für die spezifische therapeutische Wirkung bei FMF-Patienten im Vergleich zu anderen monogenen autoinflammatorischen Erkrankungen dar.⁴²

Der klinische Benefit von Colchizin beim FMF ist durch zahlreiche Untersuchungen belegt. Zemer et al. berichteten im New England Journal of Medicine über signifikant erniedrigte Frequenzen von akuten Schüben bei Patienten mit FMF, die regelmäßig Colchizin einnehmen und über einen positiven Benefit auf die Prävalenz einer AA-Amyloidose.³⁷ Die Therapieempfehlungen für FMF Patienten sehen eine lebenslange Einnahme vor. Zu berücksichtigen ist die geringe therapeutische Breite, in der jeweils empfohlenen Dosierung wird Colchizin von FMF-Patienten allerdings gut vertragen. Die häufigsten Nebenwirkungen während einer täglichen Einnahme bestehen in abdominellen Schmerzen, Übelkeit, Erbrechen und Diarrhoen. Colchizin wird hauptsächlich hepatobiliär über P450-3A4 (CYP3A4) verstoffwechselt, sowie über den P-Glycoprotein 1 (P-gp) Transporter. Zu berücksichtigen ist, dass 10-20% des Colchizins bei Patienten mit intakter Nierenfunktion renal ausgeschieden werden.³⁸

Trotz des guten klinischen Ansprechens vieler FMF-Patienten auf eine Therapie mit Colchizin bedarf ein Teil der Patienten einer individuellen Therapie abweichend von den First-Line-Empfehlungen.⁴⁵

Als Colchizinresistenz definiert die EULAR (European League Against Rheumatism) mehr als einen Schub innerhalb eines Monats bei Patienten, die compliant sind und die die maximal zu tolerierende Colchizindosis für mindestens 6 Monate einnehmen. Auch für Patienten mit FMF und AA-Amyloidose wird ein intensiviertes Therapieregime bestehend aus einer maximal tolerablen Colchizin-Dosierung in Kombination mit einem Biologicum empfohlen.⁴⁶

Die Gründe für eine Colchizin-Resistenz sind bislang unklar, zielgerichtete Therapien, die an den Pathomechanismen ansetzen, an denen Colchizin versagt, sind daher nicht verfügbar. Als Alternativtherapien wurden verschiedene Wirkstoffe eingesetzt: Thalidomid, Interferon- α (IFN- α), intravenöses Colchizin und Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) Blocker. Schwierigkeiten bei diesen alternativen Therapieregimen bestehen in einer nicht vorhandenen Zulassung und einem fraglichem Kosten-Nutzen-Aspekt. Demgegenüber steht ein zum Teil breites Nebenwirkungsspektrum.

IL-1-Inhibitoren sind in klinischen Studien mehrfach als alternative Therapieoption bei FMF untersucht worden.⁴⁹⁻⁵¹ Ben Zvi et al. berichteten 2016 über die Therapieerfolge von Anakinra im Rahmen einer kontrollierten, doppelt-verblindeten klinischen Studie. Anakinra wird als humaner IL-1

Rezeptorantagonist bereits in der Therapie der rheumatoiden Arthritis, des Cryoporin-assoziierten-periodischen Syndroms (CAPS) und der adulten sowie juvenilen Form des Morbus Still eingesetzt. Das Nebenwirkungsspektrum umfasst Reaktionen an der Einstichstelle, Kopfschmerzen, Neutropenien und Infektionen. Die Auswertung der Studie ergab eine reduzierte Anfallsfrequenz der FMF-Patienten, die Anakinra erhielten. Die erniedrigte Anfallsfrequenz zeigte sich aber insbesondere in den Gelenkbeteiligungen. In Bezug auf alle Anfallslokalisationen insgesamt ergab sich ein geringerer Unterschied zwischen den beiden Gruppen.⁴⁹ Riloncept und Canakinumab sind weitere IL-1 Antagonisten, für die Ergebnisse randomisierter, klinischer Studien publiziert sind. De Benedetti et al. untersuchten Wirkung und Sicherheitsprofil von Canakinumab bei Patienten mit Colchizin-resistentem FMF, Mevalotkinasedefizienz und TRAPS in einer (in den ersten 16 Wochen doppelt-blinden), randomisierten, Plazebo-kontrollierten Studie. Jede Kohorte wurde im gleichen Studiendesign untersucht, im Folgenden soll sich auf die Kohorte der Colchizin-resistenten FMF-Patienten beschränkt werden: Patienten im akuten Schub, definiert als Baselineschub, wurden eingeschlossen und 1:1 randomisiert, entweder in die Behandlung mit Canakinumab (150 mg subkutan oder 2 mg / kg Körpergewicht bei Patienten unter ≤ 40 kg) oder in die Plazebo-Gruppe. Ein akuter Schub lag gemäß Studiendesign vor bei einem CRP von > 10 mg/l und einem Score von mindestens 2 gemäß evaluierendem Arzt in einem klinischen Bewertungssystem von 0 - 5. Primärer Endpunkt der Studie war eine komplette Response, definiert als Sistieren des Schubs und schubfreies Intervall bis Woche 16. Der primäre Endpunkt wurde bei signifikant mehr Patienten, die Canakinumab erhielten als die, die Plazebo erhielten, erreicht: 61% vs. 6% ($P < 0.001$). Im Hinblick auf das Sicherheitsprofil traten keine opportunistischen Infektionen, Tuberkulosen und keine Todesfälle auf. Die Rate an ernsthaften Nebenwirkungen bezogen auf hundert Patientenjahre war 97,4 (Canakinumab) vs. 42,7 (Plazebo).⁴⁸ 2012 wurden die Ergebnisse einer Studie, die Wirksamkeit und Sicherheitsprofil von Riloncept in einer kleinen Kohorte von 14 Patienten mit Colchizin resistentem oder intolerantem FMF untersuchte, publiziert. In der randomisierten, doppelblinden Studie wurden FMF-Patienten eingeschlossen, die mindestens vier Jahre alt waren und mindestens einen Schub pro Monat aufwiesen. Bezüglich der Effektivität zeigte sich in der Gruppe, die Riloncept erhalten hatte, eine durchschnittliche Schubfrequenz von 0,77 pro Monat vs. 2 in der Plazebo-Gruppe. Limitationen der Studie bestanden in der kleinen Patientenkohorte, der unterschiedlichen Zusammensetzung hinsichtlich Alter, Mutationen und Indikation zur Teilnahme.⁵²

Untersucht wurden auch Biologika, die IL-6 blockieren. In der Behandlung von rheumatoider Arthritis und juveniler idiopathischer Arthritis (JIA) sind ermutigende Daten in Bezug auf eine sekundäre AA-Amyloidose publiziert worden. Auch bei FMF zeigte Yilmaz et al. einen positiven Effekt auf eine Amyloidose bei FMF nach Einsatz von Tocilizumab als second line Therapie. Unklar ist, über welchen Zeitraum Tocilizumab gegeben werden sollte, und ob die günstigen Effekte nach Beendigung der Therapie mit IL-6-Inhibitor weiterbestehen bleiben.⁵³

Den Effekt von Interferon- α bei Colchizin resistenten FMF-Patienten, welche eine intensivierete- orale und intravenöse – Colchizin-Therapie erhalten hatten, untersuchten Tweezer-Zaaks et.al. 2008 in einer offenen Studie: die Anwendung von IFN- α führte zu einer Reduktion der Anfallsdauer und der Schmerzintensität im Vergleich zu unbehandelten FMF-Patienten. Demgegenüber standen Schüttelfrost und Fatigue als häufigste Nebenwirkungen.⁵⁴

Ein potentieller Nutzen von TNF- α Inhibitoren bei FMF Patienten beschrieben Seyahi et al. in einer kleinen Kohorte von fünf Patienten. Es zeigte sich ein Rückgang der abdominellen Schübe bei einer täglichen Dosierung von 100mg/d, insbesondere ab dem 4. Monat der Anwendung. Bei einem der fünf Patienten zeigte sich kein therapeutisches Ansprechen, bei diesem erfolgte eine Dosissteigerung auf 200mg/d, worauf sich Schmerzen und eine Polyneuropathie in den unteren Extremitäten zeigten. Bei einem anderen Patienten musste die Anwendung aufgrund einer schweren lokalen Reaktion an der Injektionsstelle gestoppt werden.⁵⁵ In der klinischen Anwendung sind TNF- α Inhibitoren nur bei der protrahiert verlaufenden Arthritis bzw bei einer assoziierten Sarkoiliitis von Bedeutung und sind

entsprechend in den Empfehlungen der EULAR bzw. der American College of Rheumatology (ACR) implementiert.^{56,57}

Thalidomid soll u.a. die übermäßige TNF- α -Produktion unterdrücken und wird zu den Immunomodulatory Drugs, kurz IMiDs, gezählt. In einer kleinen Kohorte wurden 2005-2006 Daten zur Effektivität und zum Sicherheitsprofil bei fünf FMF-Patienten erhoben, die als Colchizin-resistent eingestuft worden waren. Bei einer initialen Dosis von 100mg/d zeigte sich bei zwei von vier Patienten ein Rückgang der abdominalen Attacken. Je nach Dosierung kann es zu unterschiedlichen, teilweise schwerwiegenden Nebenwirkungen, wie Teratogenität und Polyneuropathie führen.⁵⁸

Zusammenfassend fehlen Langzeitdaten zum Einsatz von Therapiealternativen zu Colchizin. Daher kann keine Aussage zu einem längerfristigen Therapieeffekt bei unter Umständen schweren Nebenwirkungen getroffen werden. Bislang sind umfangreiche Daten zur Effektivität und Sicherheit einer Langzeittherapie beim FMF nur in Bezug auf die Standardtherapie mit Colchizin verfügbar. Eine gemeinsame Stellungnahme der Gesellschaft für Kinder- und Jugendrheumatologie und der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie, publiziert im Januar 2019, empfiehlt nach sorgfältiger Abwägung den Einsatz von IL-1 blockierenden Wirkstoffen bei Colchizin Resistenz bzw. bei schwerwiegenden Nebenwirkungen von Colchizin.⁴⁷

1.10 FMF eine Erkrankung der Neutrophilen

Wie diagnostische Untersuchungen bei FMF-Patienten zeigen, finden sich häufig zahlreiche Neutrophilen in den Manifestationsstellen der Erkrankung. Nach aktuellem Kenntnisstand sind an der Pathogenese des FMF somit Neutrophile als wesentliche zelluläre Komponente beteiligt.¹⁻³

Die Neutrophilen spielen nicht nur beim FMF eine tragende Rolle. Um im Allgemeinen ihre Wirkung in physiologischen und pathologischen Prozessen zu verstehen, muss man sich ihre Stellung im angeborenen Immunsystem vergegenwärtigen und das aufeinander abgestimmte Netzwerk, mit dem sie an ihren Wirkungsort gelangen. Die neutrophilen Granulozyten sind die erste zelluläre Komponente des Immunsystems am Ort einer Entzündung. Hierzu wird der Einsatz der neutrophilen Granulozyten durch ein Zusammenspiel von Cytokinen und Chemokinen gesteuert.⁵⁹ Neuere Publikationen zeigen, dass Neutrophile auch über autoregulierende Eigenschaften durch Sekretion von Chemokinen und Zytokinen verfügen und Zellen des adaptiven Immunsystems beeinflussen können. Um an den Entzündungsort zu gelangen, müssen die Neutrophilen die vaskuläre Endothelzellschicht durchqueren, dieser Vorgang wird als transendotheliale Migration (TEM) bezeichnet.⁷⁸ Zunächst erfolgt eine schwache Bindung der Neutrophilen an das Gefäßendothel, hieran sind Selektine beteiligt, die innerhalb von Minuten nach Kontakt mit Leukotrien B₄, TNF- α oder Lipopolysacchariden an der Endotheloberfläche induziert werden. Durch die schwache Bindung können die Neutrophilen am Endothel entlangrollen und immer wieder neue Bindungen eingehen. Bindet ein Chemokin an seinen spezifischen Rezeptor auf der neutrophilen Zelle, kommt es zu einer stärkeren Adhäsionskapazität und die Integrine LFA-1 (CD11a/CD18) und CR3 (Mac-1; CD11b/CD18) auf den Neutrophilen werden exprimiert.

Durch entzündungsspezifische Zytokine wie TNF- α und IL-1 werden die Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und ICAM-2 auf den Endothelzellen exprimiert bzw. ICAM-1 hochreguliert. Eine entscheidende Rolle in der transendothelialen Migration scheint auch das Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1/CD31) zu spielen, das sowohl auf Endothelzellen als auch auf Leukozyten und Thrombozyten exprimiert wird. Interessanterweise scheint es hier zwei verschiedene Wege zu geben, welche die Diapedese der Neutrophilen steuern. Einer der Wege erfolgt durch direkte Neutrophilen-Aktivierung. Dieser Weg erfolgt abhängig von IL-8 und Leukotrien B₄. Ein weiterer Weg scheint endothelabhängig zu erfolgen: das Endothel wird u.a. durch IL-1 β stimuliert, das in der Folge endotheliale Oberflächenproteine exprimiert und Faktoren sezerniert, welche die Neutrophilen aktivieren und die Transmigration fördern. Mit Hilfe der Matrixmetalloproteinase 9 (MMP 9), die an der Oberfläche der neutrophilen Granulozyten exprimiert wird, durchqueren die Neutrophilen die Basalmembran und wandern entlang eines Chemokingradienten Richtung Entzündungsort.⁷⁹⁻⁸³

1.11 Rolle des L-Selektins (CD62L) in der Aktivierung der Neutrophilen

Als wesentlich für die Adhäsion der Neutrophilen wird das L-Selektin (CD62L) beschrieben.⁸⁴ Es gehört zu der Familie der Typ I Transmembran Glykoproteine, das sich aus verschiedenen regulatorischen und funktionellen Domänen zusammensetzt. Jedes Selektin verfügt über eine N-terminale, Calcium-abhängige (C-type) Lectin-Domäne (CTLD), eine Epidermal Growth Factor (EGF)-like Domäne, eine variierende Anzahl von Short Complement-like Repeat (SCR) Domänen, eine Transmembran Domäne und einen kurzen zytoplasmischen Anteil.^{85,86} Abhängig vom Zelltyp bewegt sich die Molekularmasse zwischen 70 and 100 kDa. Man nimmt an, dass unterschiedliche Glykolysierungen die Form und Funktion von L-Selektin je nach Zelltyp verändern kann. Die Form des Isomeren variiert je nach Art der Zellinteraktion: es gibt Hinweise darauf, dass L-Selektin in der Interaktion an derselben Zellmembran in der cis Isomerie vorliegt, zwischen verschiedenen Zellen in der trans Form.⁸⁴⁻⁸⁶

Der erste Kontakt während einer Scherbewegung findet zwischen Ligand und CTLD des L-Selektins statt. Abhängig von der Scherspannung kann sich die Zugkraft steigern und eine größere Bindungsfläche an der CTLD freigeben. Der Leukozyt rollt über die Oberfläche, bis die Bindung zwischen Ligand und CTLD schließlich freigegeben wird und der Leukozyt eine neue Bindung eingeht. Im Gegensatz zu den anderen Selektinen verfügt L-Selektin über eine membrannahe Spaltungsstelle. Als Antwort auf zahlreiche Trigger, wie Exposition mit oxidiertem LDL, osmotischem Stress, pro-inflammatorischen Signalen, erfolgt ein L-Selektin Shedding von der Ectodomäne von Neutrophilen; L-Selektin vermittelte Adhäsion der Neutrophilen und Signalgebung wird eingestellt. Regulation des Oberflächenmarkers L-Selektins erfolgt u.a. durch die Metalloproteinase ADAM 17. Bei Aktivierung der Neutrophilen spaltet die Sheddase L-Selektin und vermittelt so das Shedding von CD62L.^{84,85}

1.12 Bedeutung des Integrins CD11b für multiple Funktionen der Neutrophilen

Damit neutrophile Granulozyten als erste zelluläre Komponente des angeborenen Immunsystems an ihren Wirkungsort im Rahmen einer entzündlichen Reaktion gelangen können, sind mehrere Schritte notwendig. Entlangrollen des Neutrophilen am Gefäßendothel ("rolling"), lose Bindung mit dem Endothel ("tethering"), schließlich feste Zelladhäsion und Durchdringen des Endothels sowie Auswandern in das Gewebe hin zum Entzündungsort.⁷⁸ Wichtige Partner für die Zelladhäsion sind die Integrine β_2 , $\alpha\text{L}\beta_2$ und $\alpha\text{M}\beta_2$ (Mac-1; CD11b/CD18), die an der Oberfläche der Neutrophilen exprimiert werden und in Wechselwirkung mit den Endothelrezeptoren ICAM-1 and ICAM-2 treten.⁸⁶ $\alpha\text{M}\beta_2$ kann an verschiedene Protein- und nicht Protein-Liganden binden und wird von Neutrophilen, Monozyten und NK-Zellen exprimiert. Die Liganden umfassen u.a. Extrazellulärmatrixproteine, die Rezeptoren der Immunoglobulin-Superfamilie wie ICAM-1 und ICAM-2, Proteine der Blutgerinnung, Komplementfaktoren und Nicht-Protein Liganden wie LPS, Zymosan, β -Glycane, Heparin und Oligodeoxynucleotid. Anhand dieser variablen Bindungspartner von CD11b/CD18 werden Neutrophile mit einer Reihe von Fähigkeiten in der Verteidigung des Organismus gegen Pathogene gewappnet.⁸⁶ Studien mit CD11b/CD18 knockout Mäusen und CD11b/CD18 blockierenden Antikörpern illustrierten eine Reihe von weiteren Funktionen. Auch nach Blockade von CD11b/CD18 funktionierte die TEM der Neutrophilen, auf weitere zentrale Partner für diesen Vorgang wurde bereits eingegangen.⁸⁷ Interessant ist die Rolle von $\alpha\text{M}\beta_2$ in der Apoptose von Neutrophilen.

Coxon et. al. stellen anhand von CD11b/CD18 defizienten Mäusen die These auf, dass CD11b/CD18 an der Apoptose von aktivierten Neutrophilen beteiligt ist und somit eine wichtige Stellung in der Beendigung von Immunantworten bei Entzündungen einnimmt.⁸⁷

1.13 Neutrophile als treibende Kraft inflammatorischer Erkrankungen

Neutrophile Granulozyten werden häufig als erste Waffe des Immunsystems gegen Pathogene bezeichnet. Ihre Rolle in akuten und chronischen entzündlichen Prozessen ist häufig untersucht worden. Nach TEM und Ankunft am Wirkungsort der Pathogene, wird der Prozess der Phagozytose initiiert. Nach der Phagozytose von Mikroben können Neutrophile die Phagosomen mit freien Sauerstoffradikalen überfluten.⁸⁸ Eine Fähigkeit, die bei der chronischen septischen Granulomatose,

gestört ist. Ein Defekt des NADPH Oxidase Systems führt bei diesem primären Immundefekt zu einer zunehmenden Unfähigkeit, Superoxide zu bilden, was zu einer gestörten Phagozytose führt. Folglich kommt es zu schweren rezidivierenden Infektionen.⁸⁹ Bei intakter Phagozytose verschmilzt das Phagosom mit Lysosomen der Zelle, antimikrobielle Granula werden in das Phagolysosom abgegeben. Zytokine, die aus den Granula freigesetzt werden, umfassen u.a. Serinproteasen, darunter Elastase, Proteinase 3 und Cathepsin G. Die Effektivität von freien Sauerstoffradikalen kann durch Myeloperoxidase zusätzlich verstärkt werden.⁸⁸

Neutrophile Granulozyten sind in der Immunantwort mit einem weiteren Mechanismus ausgestattet: sie bilden neutrophil extracellular traps (NETs). Hiermit senden Neutrophile DNA in Form von großen, kondensierten Chromatinfasern aus, die eine Vielzahl von Proteinen enthalten, darunter Histone, Elastase, MPO, Pentraxin, MMP9 und IL1 β . Dieser Prozess, als NETosis bezeichnet, kann durch LPS, IL-8 oder PMA getriggert werden. Mithilfe von NETs wird die Verbreitung der Pathogene in anderes Gewebe verhindert bzw. erschwert und die antimikrobiellen Substanzen der Neutrophilen können in direkten Kontakt mit den Pathogenen treten.⁹⁰

Neutrophile Granulozyten besitzen nicht nur eine Schlüsselposition in angeborenen Immunantworten als Reaktion auf mikrobielle Substanzen, sie triggern auch die angeborene Immunantwort und steuern sie maßgeblich mit. Durch Zytokine, wie IFN- γ , TNF- α , IL-1, IL-17, and IL-12 werden weitere Neutrophile rekrutiert, weiterhin werden antigen präsentierende Zellen (APCs) angelockt und der Weg von T-Zellen zum Ort des Geschehens kann durch Neutrophile begünstigt werden.^{59,88}

Bei entzündlichen Prozessen können aber auch schädliche Effekte auf den menschlichen Organismus durch Neutrophile hervorgerufen werden. Eine prolongierte Immunantwort im Rahmen einer Pneumonie beispielsweise kann zur Schädigung der Lunge und einem schlechten Outcome führen. Ursachen hierfür werden in einer Dysregulation von Chemotaxis der Neutrophilen und Freisetzung der antimikrobiellen Substanzen gesehen, sowie in einer gestörten Apoptose der neutrophilen Granulozyten.

Eine ambivalente Rolle spielen neutrophile Granulozyten auch in der Cystischen Fibrose (CF): Die angeborene Stoffwechselerkrankung führt aufgrund eines Defekts am cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) zu einem viskösen Sekret in den betroffenen Organen. Insbesondere in der Lunge kommt es durch die gestörte mukoziliäre Clearance zu einer chronischen Inflammation und Infektion mit rezidivierenden pulmonalen Exazerbationen. Die Folge ist eine Fibrosierung der Lunge. Das Paradoxon besteht in der Fülle der im Atemwegslumen vorhandenen Neutrophilen und der Unfähigkeit dieser, bakterielle Infektionen bei CF-Patienten effektiv zu kontrollieren. Diese Dysfunktion wird verschieden erklärt. Einige Publikationen gehen von einer mechanischen Barriere durch das visköse Sekret aus, das die neutrophilen Granulozyten daran hindert, die Mikroben zu erreichen. Andere Publikationen erklären die Dysfunktion insbesondere durch eine gestörte CFTR Expression auf den neutrophilen Granulozyten. Folgen sind eine chronische Inflammation, die einen Circulus vitiosus einer massiven weiteren Rekrutierung von Neutrophilen, Infiltration und gesteigerter NETosis hervorruft. Es kommt zur vermehrten Freisetzung von cytotoxischen, granulären Bestandteilen und zu einem zunehmenden Lungenschaden. Apoptotische Neutrophile können aufgrund des zähen pulmonalen Sekrets zudem schlechter abgebaut werden.⁹¹

Auch zur Funktion von Neutrophilen in der Inflammation bei der rheumatoiden Arthritis sind eine Reihe von Daten publiziert: die Erkrankung ist durch Autoantikörper gegen citrullinierte Antigene gekennzeichnet und proinflammatorische Zytokine, die eine chronische Synovitis mit Knochenerosion hervorrufen, die langfristig zu Deformitäten der Extremitäten führen kann. Neutrophile sind an der chronischen Inflammation maßgeblich durch Ausschüttung von cytotoxischen und immunmodulatorischen Zytokinen beteiligt. Die Literatur deutet darauf hin, dass Neutrophile bei Patienten mit rheumatoider Arthritis u.a. eine verspätete Apoptose eingehen und eine erhöhte Kapazität besitzen freie Sauerstoffradikale auszuschütten. Darüber weisen Daten darauf hin, dass NETs eine Quelle von citrullierten Autoantigenen darstellen.⁹²

Neutrophile Granulozyten haben auch bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen eine ambivalente Rolle: Kennzeichen ist eine chronische, unkontrollierte Entzündung im Gastrointestinaltrakt, die zu einer Reihe von Symptomen, wie Gewichtsverlust, abdominalen Schmerzen, rezidivierenden Diarrhoen und Blutungen führt. Die bekanntesten chronisch entzündlichen Darmerkrankungen sind die Colitis ulcerosa und der Morbus Crohn, die sich klinisch, histopathologisch, endoskopisch und radiologisch unterscheiden.⁹³ Der Einfluss der neutrophilen Granulozyten auf die inflammatorischen Prozesse dieser Darmerkrankungen ist bislang nicht eindeutig geklärt. Eine ungebremsste Rekrutierung von Neutrophilen steht Untersuchungen gemäß in Zusammenhang mit der Krankheitsaktivität und -schwere bei der Colitis ulcerosa. Beim Morbus Crohn könnte eine gestörte Neutrophilenfunktion im Vordergrund stehen, die zu einer unzureichenden Abwehr von schädlichen Mikroorganismen führt. In der Folge werden immer mehr Neutrophile angelockt, die zur Pathogenese des Morbus Crohn beitragen.⁹³

1.14 Ziele der vorliegenden Arbeit

Aufbauend auf Arbeiten aus der Arbeitsgruppe von PD Dr. Kallinich soll die vorliegende Arbeit eine Gen-Dosis-Wirkungs-Beziehung in den Neutrophilen beim FMF demonstrieren, was durch Frau Dr. med. Banu Orak und Frau Dr. med. Judith Freytag bereits gezeigt werden konnte. Darauf aufbauend sollen für das FMF spezifische Aktivierungsmuster in Neutrophilen gezeigt werden. Diese spezifischen Aktivierungsmuster lassen sich von anderen inflammatorischen Erkrankungen, an deren Pathomechanismus ebenfalls neutrophile Granulozyten maßgeblich beteiligt sind, abgrenzen. Dazu wurden Zytokine und S100A12-Proteine in den Überständen von aufgereinigten Neutrophilen bestimmt und die Oberflächenmarker CD62L und CD11b in der Durchflusszytometrie gemessen. In einer Kooperation mit der Universität Münster wurden die Interleukine/Interleukin Rezeptor Antagonisten -1 β , - 6, - 8, -10, - 18, - 1RA, TNF α , S100A12 und die Granulaproteine Proteinase 3 und Myeloperoxidase (MPO) im Multiplex-Assay gemessen, um weitere mögliche spezifische Aktivierungsmuster von anderen inflammatorischen Erkrankungen abzugrenzen. Mittels Inhibition von IL-1 und des NLRP3 Inflammasoms sollen die Kontinua der Inflammationskaskaden beim FMF weiter beleuchtet werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sollen zum Verständnis der Pathogenese des FMF beitragen. Darauf basierend könnten sie die Diagnostik und Therapieentscheidungen erleichtern und innovative Therapien unterstützen.

2 Patienten, Material und Methoden

2.1 Patienten

In dieser Arbeit wurden aufgereinigte neutrophile Granulozyten aus Blutproben von insgesamt 25 Patienten mit akuten und chronischen inflammatorischen Erkrankungen und von zwei gesunden Probanden analysiert. Zudem wurden gemeinsam mit Frau Dr. Judith Freytag neutrophile Granulozyten aus Blutproben von sechs homozygoten FMF Patienten, einem an FMF erkrankten heterozygoten Patienten und vier heterozygoten Mutationsträgern sowie von fünf gesunden Probanden aufbereitet. Die Daten der FMF-Patienten und der FMF-Mutationsträger wurden in der Arbeit von Frau Dr. Freytag beschrieben. Das für die Aufreinigung der Neutrophilen entnommene Heparinblut stammt von FMF Patienten, die in der Klinik für Pädiatrie m.S. Pneumologie, Immunologie und Intensivmedizin, Sektion Rheumatologie der Charité Universitätsmedizin Berlin behandelt und betreut werden. Die FMF-Mutationsträger sind erwachsene Familienangehörige der FMF-Patienten. Die anderen akuten und chronischen inflammatorischen Erkrankungen umfassen:

- sechs Patienten mit akuten Infektionen
- sechs Patienten mit Cystischer Fibrose mit pulmonaler Exazerbation, wobei ein Proband bei der abschließenden Patientencharakterisierung nicht die Kriterien der pulmonalen Exazerbation erfüllte und ausgeschlossen wurde
- vier Patienten mit Morbus Crohn
- fünf Patienten mit rheumatoiden Erkrankungen, auch in dieser Gruppe musste eine Probandin ausgeschlossen werden, da die Aufreinigung der Neutrophilen nicht gelang
- zwei Patienten mit TRAPS (Tumornekrose-faktor-Rezeptor-assoziiertes periodisches Syndrom)
- zwei Patienten mit Immundefekt und Autoinflammation, also jeweils ein Patient mit septischer Granulomatose und CVID (Common Variable Immunodeficiency)

Die Patienten mit anderen akuten und chronischen Erkrankungen wurden über die Kinderkliniken der Charité Berlin, der Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie der Charité Berlin und der Klinik für Rheumatologie und Klinische Immunologie der Immanuel Klinik Berlin Buch eingeschlossen. Der klinische Status der Probanden wurde mittels eines standardisierten Fragebogens erfasst sowie den ärztlichen Epikrisen zum Zeitpunkt der Blutentnahme entnommen. Die Krankheitsschwere der FMF Patienten wurde anhand der Schübe im letzten Jahr evaluiert. Zur Ermittlung der Krankheitsschwere der Cystischen Fibrose wurde der Bilton Score, der sich zusammensetzt aus Veränderungen im Volumen oder Farbe des Sputums, Husten, Unwohlsein und / oder Fatigue, Gewichtsverlust, Abnahme in FEV1 \geq 10% oder radiographische Veränderungen und Dyspnoe, verwandt.⁹⁴ Beim Morbus Crohn wurde der Harvey-Bradshaw Index bestimmt, der den Allgemeinzustand, abdominelle Schmerzen, Anzahl der flüssigen Stühle / Tag und abdominelle Komplikationen einbezieht.⁹⁵ Bei den rheumatologischen Erkrankungen wurde der DAS 28 (disease activity score 28) zur Evaluation der Krankheitsschwere dokumentiert: Anzahl der schmerzempfindlichen Gelenke (0-28), Anzahl der geschwollenen Gelenke (0-28), C-reaktives Protein (mg/l (CRP)), subjektive Evaluation der Krankheitsaktivität durch den Patienten (0-100 auf der visuellen Analogskala).⁹⁶ Zudem wurde bei allen Probanden der CRP-Wert im Serum gemessen. Ausschlusskriterien waren bei den FMF Patienten andere inflammatorische Erkrankungen bis zu 14 Tagen vor Blutentnahme und eine Einnahme von $>$ 5mg/d Prednisolon in allen Probandengruppen.

2.2 gesunde Kontrollgruppe

Als gesunde Kontrollgruppe dienten sieben gesunde Probanden, bei denen weder ein FMF beschrieben war, noch war eine andere akute oder chronische Erkrankung bekannt. Fünf der

gesunden Probanden wurden zusammen mit Judith Freytag gemessen und in ihrer Arbeit beschrieben, zwei weitere gesunde Probanden wurden ausschließlich für diese Arbeit gemessen.

	Alter (Jahre)	Geschlecht (m/w)	Genotyp	Lokalisation	immunmodulatorische und/oder antibiotische Medikation	Symptome Entnahmetag	Krankheitsschwere
1 FMF				unzutreffend			Schübe letztes Jahr
1.1	17	M	M694V/A744S		1.0 mg/Tag Colchizin	keine	0
1.2	21	W	M680I/M680I		1,5 mg/Tag Colchizin	keine	0
1.3	21	M	M694V/ M694 V		1.0 mg/Tag Colchizin	keine	0
1.4	18	M	M694V/V726A		1,5 mg/Tag Colchizin	keine	nicht verfügbar
1.6	20	M	M680I/M694V		1,5 mg/Tag Colchizin	keine	nicht verfügbar
2 heterozygot krank				unzutreffend			
2.1	24	M	M694V		1.0 mg/Tag Colchizin	keine	12
3 heterozygot gesund				unzutreffend			
3.1	51	W	M694V			keine	
3.2	50	M	M694V			keine	
3.3	40	W	M694V			keine	
3.4	50	M	M694V			keine	
4 Infektionen				unzutreffend			unzutreffend
4.1	82	M		Lunge	Prednisolon 5 mg Tazobactam/ Piperacillin	Pneumonie	
4.2	52	M		Lunge	Abacavir Hemisulfat Lamivudin Doletugravir	Pneumonie (HIV (38 cop/ml))	
4.3	60	M		Blutkreislauf	Ceftriaxon	Sepsis (Staphylococcus haemolyticus)	
4.4	37	M		Perikard/ Pleura	Colchizin	Perikarditis, Pleuritis bakterielle Infektion	
4.5	64	M		Lunge	Prednisolon 40mg Ampicillin/Sulbactam	Pneumonie	
4.6	59	M		Lunge	Ampicillin/Sulbactam	Pneumonie	
5 Cystische Fibrose							Bilton Score
5.1	31	M	3846 G>A 4197- 4198delCT	Lunge	Adalimumab		4
5.2	29	M	F508del/ 1771-1G>A	Lunge	Cefuroxim, Itraconazol	pulmonale Exazerbation	4

5.3	47	M	F508del/ F508del	Lunge	Meropenem, Tobramycin	pulmonale Exazerbation	4
5.4	19	M	F508del/ F508del	Lunge	Aztreonam	pulmonale Exazerbation	3
5.5	36	M	F508del/ F508del	Lunge	Ipratropium, Bromide/ Fenoterol, Azithromycin	pulmonale Exazerbation	4
5.6	29	W	F508del/ F508del	Lunge	Fosfomycin, Vancomycin	pulmonale Exazerbation	5
6 Morbus Crohn			unzutreffend				Harvey-Bradshaw Index
6.1	19	M		Darm	Adalimumab Azathioprin	Diarrhoen	5
6.2	16	M		Darm	Adalimumab	Diarrhoen	6
6.3	17	M		Darm	Eisensaccharose vor Basistherapie	Diarrhoen, Anämie	8
6.4	41	M		Darm	Vedolizumab	Diarrhoen	8
7 Rheumatolo- gische Erkrankungen			unzutreffend	Subtyp			DAS 28
7.1	74	M		RA	Risedronat Natrium Methotrexat Leflunomid	Lumbales Radikulär- syndrom	3,58
7.2	58	W		RA	Certolizumab	Fatigue, Arthritis	4,45
7.3	34	W		V.a. Psoriasis Arthritis	Certolizumab	Arthritis	
7.4	19	W		RA	Certolizumab Prednisolon 5mg	Arthritis	4,4
7.5	63	M		Morbus Still	Urodesoxycholsäure	Fieber, Arthritis, Erythem	4,75
8 TRAPS							unzutreffend
8.1	41	M	T50M		Canakinumab	keine	
8.2	10	W	T50M		Canakinumab	keine	
9 Immun- defekte							unzutreffend
9.1	24	M	gp91phox	Septische Granuloma- tose	Cotrimoxazol Itraconazol	keine	
9.2	53	M		CVID	Immunglobuline Ceftazidim Latanoprost	Glaukom respirat. Infektionen	
10 gesunde Kontrollen							
10.1	34	W					
10.2	47	M					

10.3	27	W					
10.4	55	W					
10.5	43	M					
10.6	40	M					
10.7	35	W					

Tabelle 2-1: Patientencharakteristika. Probanden, die ausgeschlossen werden mussten, wurden grau hinterlegt (5.1 und 7.3)

2.3 Materialien

Geräte

Hersteller

Brutschrank, Heraeus B 6220	Thermo Scientific, Wilmington, USA
Durchflussszytometer, BD FACSCanto II	Becton Dickinson, Heidelberg
MagPix Systems	Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, USA
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
Multiplexunit, MagPix instrument	Merck Millipore
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

Tabelle 2-2: Geräte

Software

Software

Version

Anbieter

FACSDiva	6.1.3	Becton Dickinson, Heidelberg
Microsoft Office Word für Windows	2007	Microsoft, Redmond, USA
Microsoft Office Excel für Windows	2007	Microsoft, Redmond, USA
Prism für Windows	7.0	Graphpad Software, Inc., La Jolla, Kalifornien, USA
ProcartaPlex Analyst software	1.0	eBioscience, San Diego, Kalifornien, USA
SoftMax Pro	6.2.2	Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, USA
xPONENT	4.2	Luminex Corporation, Austin, Texas, USA

Tabelle 2-3: Software

Verbrauchsmaterialien

Blutentnahmematerialien

Produkt

Hersteller

BD Vacutainer® System zur venösen Blutentnahme, steril	Becton Dickinson, Heidelberg
BD Vacutainer® Tubes: EDTA Tubes Plasma Tubes mit Lithium-Heparin (17 IU/mL) Serum Tubes mit Trenngel und Gerinnungsaktivator	Becton Dickinson, Heidelberg
Blutentnahmesystem	Sarstedt, Nümbrecht

Safety-Multifly® Kanüle 21G, 200 mm lang, steril Multi-Adapter kurz für S-Monovette®, steril Membrane Adapter für Luersysteme, steril	
S-Monovetten® Lithium Heparin EDTA Serum mit Gel und Gerinnungsaktivator	Sarstedt, Nümbrecht
Einweg Handschuhe Latex	verschiedene Hersteller
Desinfektionsmittel	verschiedene Hersteller

Tabelle 2-4: Blutentnahmematerialien

Labormaterialien

Produkt Hersteller

DNase/RNase-freie Tubes, Eppendorf LoBind	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Einmalhandschuhe	verschiedene Hersteller
Einmalpipetten, Transferringpipette 3,5ml	Sarstedt, Nümbrecht
Einmalspritzen, 10 ml Discardit II	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS-Tubes, 5 ml Polystyren, BD Falcon™	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS-Tubes, 5 ml Polystyren	Sarstedt, Nümbrecht
Falcon Tubes, 15 ml und 50 ml, BD Falcon™	Becton Dickinson, Heidelberg
Pipettenspitzen	verschiedene Hersteller
Pipettenspitzen, PCR clean, epT.I.P.S. Dualfilter 0,1-1 µl	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Pipettenspitzen, Barrier (Filter) Tips, 100 µL und 1000 µL	Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA
Safe Lock Tubes, 1,5 ml	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf

Tabelle 2-5: Labormaterialien

Laborreagenzien

Produkt Hersteller

2-Mercaptoethanol	Carl Roth, Karlsruhe
Adenosine 5'-triphosphate (ATP) disodium salt hydrate	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Anakinra	Sobi, Stockholm
Colchizin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DMEM Flüssigmedium ohne Na-Pyruvat, mit 3,7 g/l NaHCO ₃ , mit 4,5 g/l D-Glukose, ohne L-Glutamin	Biochrom, Berlin
FACSFlow™ Sheath Fluid	Becton Dickinson, Heidelberg
FACSFlow™ Shutdown Solution	Becton Dickinson, Heidelberg
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin
Lipopolysaccharides (LPS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
MCC950	Inflazome Ltd., Dublin
Natriumazid	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Percoll™, Dichte 1,135 g/ml	GE Healthcare, Chicago, Illinois, USA
Phosphate Buffered Saline (PBS) ohne Ca & Mg	PAA Laboratories, Pasching
RA1 Lyse-Puffer	Macherey Nagel, Düren
RPMI 1640 Flüssigmedium mit stabilem Glutamin	Biochrom, Berlin
Trypanblau	Carl Roth, Karlsruhe

Tabelle 2-6: Laborreagenzien

Antikörper - Flurochrome

Produkt Hersteller

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

Tabelle 2-7: Fluorochrome

ELISA Assays

Kit	Hersteller
-----	------------

Human Caspase-1/ICE Quantikine ELISA Kit	R&D Systems Europe, Ltd., Abingdon, UK
Human IL-18 ELISA Kit, Nr. 7620	MBL International Corporation, Woburn, USA
S100A12/EN-RAGE ELISA Kit, Cat# CY-8058	CircuLex™, MBL Life Science, Nagano, Japan

Tabelle 2-8: ELISA Kits

Multiplexed Bead Array Assays

Kit	Hersteller
-----	------------

Invitrogen ProcartaPlex immunoassay	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Human Magnetic Luminex Assay	R&D systems, Minneapolis, Minneapolis, USA
S100A12 MagPlex® Microspheres	Luminex, Hertogenbosch, The Netherlands

Tabelle 2-9: Multiplexed Bead Array Assays

2.4.1 Gewinnung des Probenmaterials

Die zugrunde liegende Studie wurde durch die Ethikkommission der Charité Berlin geprüft und bewilligt (Ref: EA2/033/09). Das Einverständnis wurde von allen teilnehmenden Patienten und / oder deren Eltern, allen gesunden Kontrollprobanden und allen gesunden FMF Mutationsträgern nach ausführlicher Aufklärung über die Studie eingeholt. Es erfolgte die venöse Blutentnahme nach geltenden klinischen Standards. Von jedem Studienteilnehmer wurden drei Lithium-Heparin-, ein EDTA - und ein Serum-Röhrchen sowie ein Röhrchen zur Bestimmung der Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG) entnommen, mit Ausnahme der Probandin 8.2. Von dieser Probandin wurden lediglich zwei Heparin-, ein EDTA- und ein Serum-Röhrchen aufgrund des geringen Alters entnommen. Insgesamt betrug das maximal entnommene Blutvolumen 30 ml. Die weitere Aufbereitung der Heparin-, EDTA- und Serum-Röhrchen Tubes wurde 30 - 60 Minuten nach Probengewinnung im Labor der AG PD Dr. Kallinich und / oder im Labor Berlin durchgeführt.

2.4.2 Aufreinigung der Neutrophilen und Zellzählung

Die folgenden Schritte wurden auf einer sterilen Werkbank durchgeführt: für die Gewinnung der neutrophilen Granulozyten wurden jeweils die Heparin-Röhrchen eines Probanden (also ca. 7,5 ml Vollblut) in ein 50 ml Falcon Tube überführt und mit PBS im Verhältnis 1:1 verdünnt. Zur Vorbereitung einer Dichte-Gradienten-Zentrifugation wurden für jeden Probanden jeweils 8 Falcon Röhrchen á 15 ml zunächst mit 3 ml Percoll 55% befüllt. Daraufhin wurden jeweils 3 ml Percoll 74% unterschichtet, so dass sich 2 Phasen bildeten. Schließlich wurde das mit PBS verdünnte Vollblut eines Probanden auf die 8 Röhrchen verteilt. Die Proben wurden dann bei Raumtemperatur, 560 g, für 20 Minuten zentrifugiert. Aufgrund der ausgeschalteten Bremse ergab sich somit eine Gesamtzeit von 40 Minuten in der Zentrifuge. Nach der Zentrifugation ließen sich bei gelungenem Versuch 3 Schichten abgrenzen: im obersten Zellring befanden sich die peripheren, mononukleären Zellen (PBMCs), im Pellet darunter sammelten sich die neutrophilen Granulozyten, und im unteren Sediment setzten sich bei erfolgreicher Trennung die Erythrozyten ab. Bei unzureichender Trennung ließen sich Erythrozyten nicht genügend von den neutrophilen Granulozyten abgrenzen, dies führte wie im Vorfeld beschrieben zum Ausschluß des Probanden 7.3.

Die neutrophilen Granulozyten wurden mit einer Pipette in ein 50 ml Falcon Röhrchen überführt und mit PBS aufgefüllt. Die 1. Waschung wurde mittels Zentrifugation bei 560 g bei Raumtemperatur mit Bremse durchgeführt. Nach Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt und das verbleibende Pellet mit PBS resuspendiert. Im Anschluss wurde die Zellsuspension identisch zur 1. Waschung zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet nun in 1 ml RPMI (5% FCS)

aufgenommen. Davon wurden 50 µl Zellsuspension mit weiteren 200 µl RPMI, also im Verhältnis 1:5, verdünnt. Aus diesen 250 µl Zellsuspension wurden am Sysmex Gerät die neutrophilen Granulozyten / ml sowie die Reinheit bestimmt. Als Qualitätsindikator für die Trennung der Zellen wurde am Sysmex zudem aus dem Vollblut der Anteil der neutrophilen, der eosinophilen, der basophilen Granulozyten und der Monozyten bestimmt.

2.5 Vitalitätsmessung der Neutrophilen durch Trypanblaufärbung

Um die Vitalität der aufgereinigten neutrophilen Granulozyten zu bestimmen wurden zwei Methoden verwendet. Eine der beiden Methoden basiert auf einer Trypanblaufärbung, einem anionischen Bisazofarbstoff, der von nekrotischen und perforierten, aber nicht von vitalen Zellen aufgenommen wird und diese Zellen blau färbt. Diese Methode wurde unmittelbar nach Aufreinigung der Neutrophilen durchgeführt. Hierfür wurden 10 µl Zellsuspension in einer Konzentration von 5 Mio. Zellen pro ml in ein Eppendorf Gefäß mit 90 µl Trypanblau pipettiert und vorsichtig mit der Pipette durchmischt. 10 µl dieser Mischung wurden auf eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Diese Methode wurde für alle eingeschlossenen Probanden verwendet. Zudem wurde für die Messung der Neutrophilenvitalität der Annexin V-Assay in der Durchflusszytometrie angewandt. Der Annexin V-Assay lässt nicht nur Rückschlüsse über den Anteil vitaler Zellen zu, sondern kann noch weiter zwischen vitalen, nekrotischen Zellen und Zellen, die sich in der Apoptose befinden, differenzieren. Dieser Assay wurde lediglich für die FMF-Patienten, heterozygoten Mutationsträger und gesunden Probanden verwendet und erlaubte detailliertere Aussagen über die Vitalität der Neutrophilen. Die untersuchten Neutrophilen waren somit zu einem überwiegenden Anteil vital. Eine Verfälschung der hier als für das FMF spezifisch dargestellten Inflammationsparameter durch nekrotische und / oder apoptotische neutrophile Zellen kann daher ausgeschlossen werden. Diese Methode wird im Abschnitt 2.8 beschrieben.

2.6 Kurzzeitkultur der Neutrophilen

Die Zellmedium-Suspension wurde in Kurzzeitkultur genommen, wobei verschiedene Ansätze hergestellt wurden.

50 µl der Suspension wurden jeweils vor Beginn der Kultur abgenommen und mit den Antikörpern für CD11b und CD62L gefärbt, ein weiterer Ansatz wurde als Isotypkontrolle genutzt. Diese "**unstimuliert vor Stimulation**" Ansätze wurden gleich nach Färbung an der Durchflusszytometrie gemessen.

Für alle übrigen Ansätze wurden jeweils 1 ml der Suspension in Eppendorf Gefäße von 1,5 ml Volumen gegeben und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert:

- 1) "**unstimuliert**": Die Kultur erfolgte ohne weitere Zusätze für 5 Stunden
- 2) "**LPS+ATP**": Eine Stunde nach Inkubation wurde dem Ansatz 10 ng/ml LPS und 4,5 Stunden nach Inkubation 1 mM ATP hinzugegeben
- 3) "**Colchizin**": Kultivierung der Neutrophilen mit 5 µg/ml Colchizin für 5 Stunden
- 4) "**Colchizin + LPS + ATP**": Stimulation mit LPS + ATP wie im 2. Ansatz, zusätzlich Hinzugabe von Colchizin für 5 Stunden
- 5) "**Kinetik**": Kultur der Neutrophilen ohne Zusätze für jeweils 0,5, 1, 2, 3, 4 und 5 Stunden

In einer weiteren Versuchsreihe wurden die Neutrophilen mit dem Compound MCC950 und dem IL-1 Inhibitor Anakinra in jeweils 3 verschiedenen Titrationsstufen 1 µg/ml, 10 µg/ml und 100 µg/ml Anakinra oder 0,1 µM, 1 µM und 10 µM MCC950 für 5 Stunden kultiviert. Auch hier erfolgte die Inkubation bei 37°C und 5% CO₂. Nach einer Stunde wurden 10 ng/ml LPS und nach 4,5 Stunden 1 mM ATP zu jeweils allen Titrationsstufen hinzugegeben. Tabelle 2-10 gibt eine Übersicht über die verschiedenen Ansätze, basierend auf der Zellmedium-Suspension.

Inkubationszeit										
Ohne Stimulation										
vor Stimulation unstimuliert	0,5 Stunden	1 Stunde	2 Stunden	3 Stunden	4 Stunden	5 Stunden				
						Mit Stimulation (und Co-Kultivierung mit Inhibitoren) für 5 Stunden				
						unstim.	LPS+ATP	Colchizin	Colchizin+LPS+ATP	
						unstim.	LPS+ATP	1 µg/ml Anakinra +LPS+ATP	10 µg/ml Anakinra +LPS+ATP	100 µg/ml Anakinra +LPS+ATP
						unstim.	LPS+ATP	0,1 µM MCC950 +LPS+ATP	1 µM MCC950 +LPS+ATP	10 µM MCC950 +LPS+ATP

Tab. 2.10: Übersicht der verschiedenen Ansätze aus der Zell-Medium-Suspension

2.7.1 Messung der Oberflächenmarker - Prinzip der Durchflusszytometrie

Mittels Durchflusszytometrie lassen sich verschiedene Parameter einzelner gelöster Zellen in kurzer Zeit analysieren. Aufgrund dessen wird die Durchflusszytometrie in vielen biomedizinischen Bereichen genutzt und bietet viele Anwendungsmöglichkeiten, wie das Zellsortieren, die Analyse der Analyse oder die quantitative Messung von Antigenen. Für die vorliegende Arbeit wurde die Durchflusszytometrie genutzt, um die Oberflächenmarker der neutrophilen Granulozyten quantitativ zu messen. Die Analyse der gelösten Partikel basiert auf der Erfassung durch Laser. Die Partikel werden auf Basis ihrer Lichtstreuung und Fluoreszenzparameter analysiert. Die Fluoreszenz ist unabhängig von der Lichtstreuung. Herkömmliche Durchflusszytometer bestehen aus drei Systemen: Fluidik, Optik und Elektronik. Mithilfe der Mantelflüssigkeit - sheath fluid - wird die Probe zentriert und zum Laserspot transportiert, wo die Analyse der Probe erfolgt. Die Optik setzt sich zusammen aus Exzitationsoptik (Laser) und Sammeloptik (Photomultiplier und Photodioden). Am Kreuzungspunkt eines Laserstrahls mit dem Probenstrom wird während der Passage einzelner Zellen Licht gestreut und es werden Fluoreszenzen angeregt. Wird der Laser passiert, wird die Lichtstreuung der Zellen in einem engen Winkel zum Laserlicht als Vorwärtsstreulicht (forward scatter; FSC) und die Lichtstreuung im Winkel von 90° als Seitwärtsstreulicht (side scatter; SSC) detektiert. Das FSC wird als Maß der Zellgröße gemessen, das SSC als Maß der Granularität. Die Filter lenken das fluoreszierende Licht anhand ihrer Wellenlänge zu ihren spezifischen Sensoren, wo Bandpassfilter die Emissionsspektren der Farbstoffe erfassen und zu Detektoren durchlassen. Auf diese Art wird jedes Fluorochrom erkannt und gemessen. Gemäß der geltenden Nomenklatur werden die Detektoren mit zunehmendem spektralen Abstand vom Anregungslicht aufsteigend nummeriert (FL1, FL2, FL3...). Die Detektoren lesen die Wellenlänge, und die spektral unterschiedenen Lichtsignale werden über Photomultiplier (PMT) detektiert, die das Licht in elektrische Signale umwandeln. Durch die Elektronik werden diese in digitale Signale konvertiert, welche vom Computer gelesen werden können. Zusammenfassend basiert die durchflusszytometrische Analyse auf der Messung von Lichtstreuung und Fluoreszenzen in dem Moment, in dem die Zellen einen rechtwinklig zum Probenfluss angeordneten Laser-Strahl passieren. Eine Reihe von Faktoren können die **Qualität der Datenaufnahme und -auswertung** beeinflussen: Während der Datenaufnahme herrscht ein ständiges Hintergrundrauschen, das es erforderlich macht, die den einzelnen Zellen zuzuordnenden Signale herauszufiltern. Hierfür wird ein Schwellenwert - threshold - auf einen bestimmten Triggerparameter definiert, bei dessen Überschreitung die Datenaufnahme und -abspeicherung erfolgt. Wird beispielsweise auf FSC getriggert, erfolgt die Datenaufnahme/-speicherung ab einer bestimmten Zellgröße. Als weiterer Einflussfaktor auf die Qualität der Datenaufnahme ist die Wahl der Pulsverarbeitung zu nennen. Oft wird das höchste Lichtsignal, die Pulshöhe, abgespeichert, diese ist zur Fluoreszenz jedoch nur proportional, wenn die passierende Zelle durch den Laser vollständig ausgeleuchtet wird. Bei größeren Zellen muss daher das Integral des Lichtsignals, also die Pulsfläche verwendet werden.

Unterschiedliche Optionen gibt es für die Korrektur der spektralen Überlappung von Farbstoffen: häufig kommt es im Rahmen der Färbungen zu 100- oder 1000-fachen Unterschieden zwischen stark positiven und stark negativen Zellen. Um die Detektion von schwachen Signalen zu ermöglichen, ist daher eine logarithmische Darstellung der gemessenen Daten erforderlich. Ein weiteres Problem bei fehlender Korrektur sich spektral überlappender Fluoreszenzen ist, dass auch Mischungen von verschiedenen Farbstoffen detektiert werden, auch wenn eine Zelle mit nur einem Farbstoff markiert wurde. Analog lässt sich die Datenmenge vor Digitalisierung und Speicherung um den prozentualen Anteil benachbarter Farbstoffe korrigieren. Alternativ erfolgt die unkompenzierte Speicherung der Messdaten und Digitalisierung sowie die anschließende Kompensation offline über die Software während der Re-Analyse. Der Vorteil hierbei liegt in der Möglichkeit von Korrekturen bei fehlerhafter Kompensation.

Im Anschluss an die Datenanalyse erfolgt die **Datenauswertung** zur Identifikation und Darstellung der Populationen, also Zellen und Gruppen mit ähnlichen Charakteristika. Für die Darstellung gibt es verschiedene Möglichkeiten. Innerhalb von Histogrammen, in denen auf der x-Achse die eindimensionale Darstellung einer bestimmten Intensität (z.B. Fluoreszenz) erfolgt, und auf der y-Achse die Anzahl der Zellen, die mit einer bestimmten Intensität gemessen wurden. Histogramme ermöglichen auch die zusammenführende Darstellung von Populationen aus verschiedenen Messungen. Zwei- oder dreidimensionale Darstellungen können mithilfe von Contour oder Dot Plots umgesetzt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde auf Dot Plots zurückgegriffen: jedes einzelne Event wird als Punkt in einem Streudiagramm dargestellt. Diese Darstellung erlaubt die Erfassung von mehreren Parametern und zeigt die Korrelationsverteilung. Events mit ähnlicher Intensität verteilen sich im Diagramm um dieselbe Region und geben Einblick in Subpopulationen. Für die Interpretation von Dot Plots ist es wichtig, die Einführung eines sogenannten "baseline offset" zu verstehen: aufgrund der hohen Qualität der Detektion von Events, werden auch große Populationen erfasst, die für einen Parameter negativ sind. Diese Zellen würden auf einer jeweils einzigen Linie entlang der x- oder der y-Achse dargestellt werden und einen verzerrten Eindruck von positiven und negativen Populationen geben. Daher wird mittels Wahl eines "baseline offset" ein elektronisches Hintergrundrauschen zu jedem Parameter hinzugefügt. Dadurch werden negative Events in der logarithmischen Intensitätsskala sichtbar. Zwar wird die Qualität der Datenanalyse dadurch minimal schlechter, aber die Sichtbarkeit wird verbessert. Für die Vermessung der Zellen innerhalb einer Population gibt es verschiedene Herangehensweisen, so können Regionen mittels Quadrantenanalyse definiert werden. Hierbei wird der prozentuale Anteil der Populationen ermittelt, der für die analysierten Parameter jeweils positiv oder negativ ist, nachdem auf der x- und y-Achse jeweils eine Schwelle oberhalb der negativen Population gesetzt wurde. Mehr Spielraum entsteht durch das Gating, das für die vorliegende Arbeit angewendet wurde. Die Auswahl der Subpopulationen mittels Gating stellt einen entscheidenden Schritt in der Datenauswertung dar. Häufig wird zunächst der FSC gegen den SSC aufgetragen, um bestimmte Zellpopulationen rauszugaten. Das kann z.B. bei whole blood Assays hilfreich sein, um einzelne Zellsubtypen herauszufiltern.^{97,98} In den hier dargestellten Versuchen wurden die neutrophilen Granulozyten basierend auf ihrer CD45 Positivität und ihres hohen SSCs von den anderen Blut Subtypen und Debris abgegrenzt, eosinophile Granulozyten wurden durch CD16 Färbung ausgeschlossen. Das Gate für die Isotypen-Kontrolle wurde so gesetzt, dass 99% der gesamten Population eingeschlossen wurden.

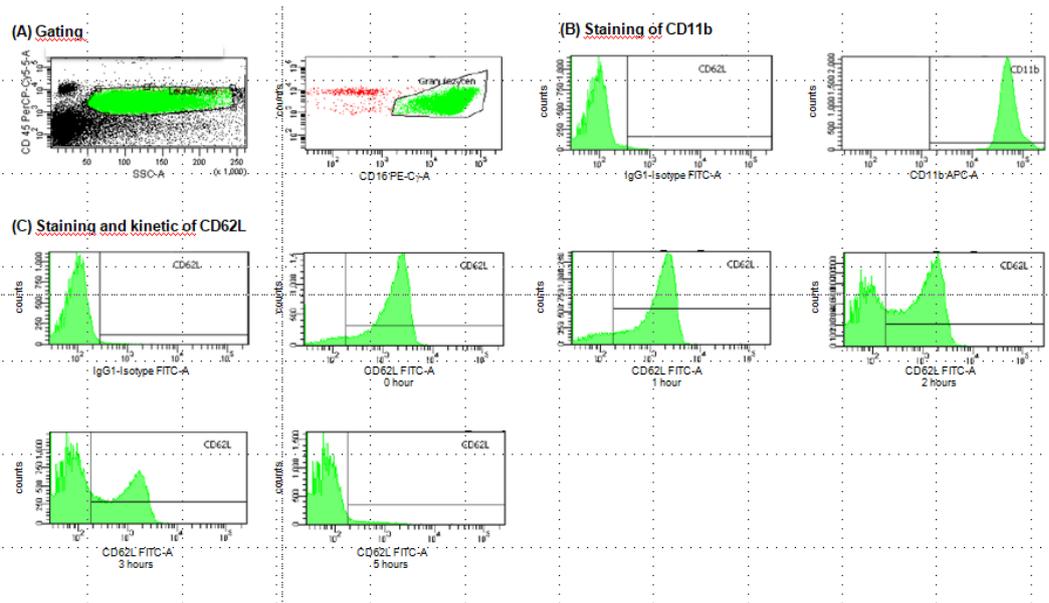


Abbildung 2-1: Gating: in der mit Neutrophilen angereicherten Zellpopulation wurden Granulozyten durch hohe Seitenstreuung und CD45-Positivität identifiziert (A). Eosinophile wurden durch positive CD16-Färbung ausgeschlossen. Das Gate für die Isotypkontrolle wurde so eingestellt, dass 99 % der Gesamtpopulation eingeschlossen wurden. Die Färbung von CD11b (B) und CD62L (C) wurde zum Nachweis des Aktivierungsstatus der Neutrophilen durchgeführt. Die Kinetik zeigt das Shedding von CD62L.

2.7.2 Messung der Oberflächenmarker - Aufbereitung der Ansätze für die Durchflusszytometrie

Aus der Zellmedium-Suspension wurden für den Ansatz „unstimuliert vor Stimulation“ je einmal 50 µl, die jeweils 250.000 Zellen enthielten, in ein FACS-Röhrchen aus Polystyren pipettiert. Für die Ansätze "unstimuliert nach Stimulation", "LPS+ATP(+Anakinra/MCC950)", "Colchizin" und "Colchizin+LPS+ATP" sowie für die Kinetikansätze wurden jeweils 1000 µl der Zellmedium-Suspension in einer Konzentration von fünf Millionen Zellen pro Milliliter entnommen. Um eine mögliche Kontamination zu minimieren, wurden hierfür sterile Pipettenspitzen verwendet. Zusätzlich hierzu wurden für die Ansätze „unstimuliert“, „Colchizin“ und „Colchizin + LPS + ATP“ bei den FMF-Patienten, den heterozygoten Mutationsträgern und den gesunden Kontrollprobanden 25 µl für eine Annexin-Messung in ein FACS-Röhrchen überführt.

Für die Stimulationsansätze wurden nun jeweils 50 µl der Zellmedium-Suspension für die Antigen- und Isotypen-Färbung und Messung, für die Kinetikansätze jeweils 50 µl der Zellmedium-Suspension für die Antigen-Färbung und -Messung in ein FACS Röhrchen überführt. Die Ansätze wurden jeweils mit 1 ml kaltem PBS versetzt und bei 390 g für 10 Minuten zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen jeweils in 100 µl kaltem PBS aufgenommen.

Für die Messung der Oberflächenmarker CD62L und CD11b wurden die an die Antikörper gekoppelten Farbstoffe in festgelegtem Mischungsverhältnis pipettiert. Es wurden vier verschiedene Fluorochrome verwendet: Für die Färbung von CD62L wurde Fluorescein-5-isothiocyanat (FITC) verwendet, CD11b wurde mit Allophycocyanin (APC) konjugiert, für die CD45 Färbung wurde das Peridinin-chlorophyll Protein (PerCP) Cy5.5 verwendet, die CD16 Färbung erfolgte mittels Phycoerythrin/Cy7. Die Absorptions- und Emissionsmaxima der Fluorochrome sind in Tabelle 2-11 dargestellt. In der Auswahl der Antikörperkonjugate gibt es einige Fallstricke, welche die Sensitivität der Antikörper negativ beeinflussen können. Dazu zählen Färbungsintensität des jeweiligen Antikörpers und spektrale Überlappungen – z.B. des FITC-Farbstoffs mit PE - und damit einhergehend übergreifende Erfassung des FITC-Farbstoffes im PE-Detektor.⁹⁹

Farbstoff	Absorptionsmaximum	Emissionsmaximum
FITC	490 nm	525 nm
APC	650 nm	660 nm
PerCP-Cy5.5	490 nm	695 nm
PE-Cy7	488 nm	767 nm

Tabelle 2-11: Absorptionsspektren

Panel	Fluorochrom / Kanal						
	FITC/FITC	PerCP-Cy5.5 /PE-Cy5	PE-Cy7/PC7	APC/APC	PBS	Ak Mischung	Röhrchen / Panel
Isotyp Panel	mlgG1-Iso 5 µl	CD45 3 µl	CD16 0,5 µl	IgG1-Iso 1 µl	10,5 µl /Röhrchen	20 µl /Röhrchen	7 Röhrchen / Panel
CD62L/CD11b Antigen Panel	CD62L 10 µl	CD45 3 µl	CD16 0,5 µl	CD11b 2,5 µl	14 µl Röhrchen	30 µl /Röhrchen	13 Röhrchen / Panel

Tabelle 2-12: Färbeschema

Dem wurde bei der Auswahl der Farbstoffe versucht, Rechnung zu tragen. CD11b gilt in der Literatur als "schwacher" Antikörper, er wurde mit einem hellen Farbstoff konjugiert. Zudem wurde kein reiner PE-Farbstoff verwendet (Gefahr der falsch positiven Ergebnisse bei spektraler Überlappung mit FITC). Empfehlungen der Fluorochrom-Hersteller wurden auch hinsichtlich der Probengewinnung berücksichtigt: die Bindung des Antikörpers CD11b benötigt Ca^{++} , daher wurde für die Probenentnahme Heparin und nicht EDTA-Röhrchen verwendet.

Neben einer Maximierung der Sensitivität wurde auch der Signalanteil, der nicht durch Reaktion von Antigen und Antikörper, sondern z.B. durch Bindung an Fc-Rezeptoren oder Interaktion des Fluorochroms erfolgt, für die Auswertung analysiert. Zur Messung der Spezifität wurden Isotypkontrollen eingesetzt: dabei handelt es sich um Antikörper des gleichen Isotyps (z.B. IgG1, IgG2a, IgG2b), die damit in identischer Konzentration die gleiche Affinität zu Fc-Rezeptoren aufweisen.

Von der Antikörper-Mischung wurden jeweils 30 µl zum Antigen FACS-Röhrchen hinzugegeben, für die Isotyp-Messungen wurde eine entsprechende Isotypen-Farbstoff-Mischung hergestellt und hiervon jeweils 20 µl in jedes Isotyp-Röhrchen gegeben. Tabelle 2-12 gibt eine Übersicht über das Färbeschema. Bei der Herstellung der Farbstoffmischung und beim Hinzufügen zu den FACS-Röhrchen wurde auf ausreichende Durchmischung mittels Vortex geachtet. Nach Zugabe der Antikörper-Mischung wurden die FACS-Röhrchen für 20 Minuten im Dunklen auf Eis inkubiert. Im Anschluss erfolgte die 2. Waschung analog zu der 1. Waschung. Nach Absaugen des Überstandes wurden PBS mit 2 % fetalem Kälberserum und 0,1 % Natriumazid hinzugegeben.

Für die FACS-Messung der apoptotischen Zellen erfolgte die Färbung mit dem FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I der Firma BD nach Angaben des Herstellers in leicht abgewandelter Form bei den FMF-Patienten, den heterozygoten Mutationsträgern und den gesunden Probanden.

2.7.3 Messung der Oberflächenmarker - Durchführung der Durchflusszytometrie

Die quantitative Messung der Oberflächenmarker auf den neutrophilen Granulozyten erfolgte am FACS-Gerät. Als Durchflusszytometer wurde der FACS Canto II der Firma BD verwendet, der eine räumlich getrennte Doppel-Laser-Anregung und die Aufnahme von bis zu sechs Fluoreszenzsignalen ermöglicht. Die Optik des BD FACSCanto™ II Systems besteht aus einer Exzitationsquelle mit bis zu drei Lasern: blau (488-nm), rot (633-nm) und violett (405-nm). Das Prinzip und die einzelnen Schritte der Datenerfassung und -auswertung sind bereits beschrieben worden. Mit der FACSDiva-Software wurde der Schritt der Kompensation automatisch durchgeführt, im Anschluss erfolgte eine manuelle Modifikation. Nach erfolgter Messung wurden die neutrophilen Granulozyten mittels Gating in der Dot Plot Darstellung lokalisiert. Zur Erfassung dieser Population diente ein hohes SSC sowie eine Positivität für den Panleukozytenparameter CD45. Zur Abgrenzung reifer Neutrophiler von eosinophilen Granulozyten und Monozyten diente zudem eine ausgeprägte CD16-Positivität. Eine veränderte Expression der Oberflächenmarker CD62L und CD11b wurde in Histogrammen dargestellt.

Eine stark unterschiedliche Expression der Oberflächenmarker innerhalb einer Messung, also innerhalb eines Histogramms, wies auf unterschiedliche Populationen innerhalb eines Samples hin. Indikation und Durchführung von Isotypen-Färbungen und -Messungen wurde bereits ausgeführt. Im Anschluss an die Messungen wurde für die Auswertung der Bereich der gemessenen Ereignisse so eingegrenzt, dass sich darin nur 1% der Isotyp-gefärbten Ereignisse befanden.

2.8 Vitalitätsmessung der Neutrophilen - Annexin V Assay

Neben der Messung der Oberflächenmarker CD62L und CD11b wurde die Durchflusszytometrie auch genutzt, um die Apoptose der Zellen zu messen. Eine erste Evaluation der Vitalität erfolgte bereits unmittelbar nach Zelltrennung mittels Trypanblaufärbung. Anhand des **FITC Annexin V Apoptosis Assays** wurden die apoptotischen Zellen im FACS-Gerät gemessen. Im Rahmen der Apoptose ist der Verlust der Plasmamembran eines der ersten Merkmale. Dabei wird das Phospholipid Phosphatidylserin (PS) von der inneren Plasmamembran an das Äußere der Membran verlagert und damit in der externalen Zellumgebung freigesetzt. Annexin V ist ein 35-36 kDa Ca^{2+} -abhängiges Phospholipid-bindendes Protein, das eine hohe Affinität für PS hat und somit an Zellen mit exponiertem PS bindet. Zudem detektiert Annexin V Zellen in einem frühen Apoptose-Stadium, da die Freisetzung von PS wie erwähnt zu den frühen Merkmalen der Apoptose gehört. Für die Apoptose-Messung wurde ein an FITC-konjugiertes Annexin V verwendet. Zellen, die sich in einem (frühen) Stadium der Apoptose befinden, lassen sich von nekrotischen Zellen noch besser abgrenzen, wenn Annexin V mit dem Farbstoff Propidiumiodid (PI) kombiniert wird. PI fungiert als Nukleinsäureinterkalator und kann die perforierte Membran von nekrotischen Zellen, aber nicht durch die intakte Zellmembran von vitalen Zellen, durchdringen. Das FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I der Firma BD kombiniert beide Farbstoffe, somit können bei der Auswertung Aussagen getroffen werden über vitale Zellen (Annexin V und PI negativ), apoptotische Zellen (Annexin positiv und PI negativ) und Zellen im späten Stadium der Apoptose oder in der Nekrose (Annexin positiv und PI positiv). Beide Farbstoffe und der Bindepuffer wurden im Kit mitgeliefert. Der Bindepuffer wurde im Verhältnis 1:10 verdünnt. Angewendet wurde dieser Assay für die FMF-Patienten, die heterozygoten Mutationsträger und die gesunden Kontrollprobanden. Dazu wurden 25 μl der Zell-Medium-Suspension, entsprechend 125.000 Zellen, entnommen und in 1 ml PBS, wie zur Messung der Oberflächenmarker CD62L und CD11b gewaschen. Nach Absaugen des Überstands wurden die Zellen in 100 μl des Bindepuffers aufgenommen und jeweils 2,5 μl des Annexin V und des PI hinzugefügt. Nach vorsichtigem Vortexen wurde die Zell-Farbstoff-Suspension für 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen in 400 μl des Bindepuffers aufgenommen und innerhalb der nächsten 60 Minuten am FACS-Gerät gemessen.

2.9.1 Messung der Inflammationsparameter - Prinzip des Enzyme-linked Immunosorbent Assays

Für die quantitative Messung des Zytokins IL-18, des Enzyms Caspase-1 und des S100A12 wurde die Methode Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) verwendet. Das Verfahren basiert auf einer indirekten Messung der Bindung eines Antikörpers an sein Antigen. Aufgrund seiner Fähigkeit, eine Vielzahl von Antigenen spezifisch und sensitiv nachzuweisen, hat sich der ELISA in der Diagnostik und Forschung fest etabliert. Es sind verschiedene Arten von ELISA-Verfahren verfügbar, für diese Arbeit wurde der Sandwich-ELISA verwendet: ein Antikörper wird an den Boden einer Mikrotiterplatte gebunden, in die Vertiefungen wird die Probe mit dem nachzuweisenden Antigen gegeben und inkubiert. In der Inkubationszeit bindet der Antikörper an das Antigen. Nach der Inkubationszeit wird die Platte gewaschen, zurück bleibt nur das am Antikörper gebundene Antigen. Dann wird ein zweiter, nicht markierter Detektionsantikörper hinzugefügt. Es erfolgt eine erneute Waschung, um alle nicht gebundenen Bestandteile zu entfernen. Zur Quantifizierung des Ergebnisses wird ein mit dem Reporter-Enzym Meerrettich-Peroxidase (Horseradish Peroxidase, HRP) markierter sekundärer Antikörper hinzugefügt, der an den zweiten unmarkierten Antikörper bindet und eine enzymatische Farbreaktion katalysiert. Durch Zugabe einer Substratlösung (Wasserstoffperoxid-Tetramethylbenzidin) wird das Wasserstoffperoxid schließlich zu Wasser und freien Protonen oxidiert,

was sich in einer Blaufärbung der Lösung widerspiegelt. Die Reaktion wird durch Hinzugabe einer Säure gestoppt und eine gelbe Farbe entsteht. Die Absorption verhält sich proportional zur Konzentration des detektierten Antigens. Für den quantitativen Nachweis kann eine Serie mit bekannten Antigenkonzentrationen (Standardreihe) durchgeführt werden, um eine Kalibrierungskurve für das gemessene Signal (optische Extinktion, emittierte Intensität) zu erhalten. Im Caspase-1 Kit wurde für den sekundären Antikörper ein polyklonaler Antikörper verwendet (Anti-rabbit-IgG), der eine Bindung an mehreren Epitopen des Antigens erlaubte und eine Signalverstärkung ermöglichte.

2.9.2 Messung der Inflammationsparameter - Durchführung der ELISAs

Für die ELISAs wurden am Tag der Blutentnahme, nachdem die Samples für die Durchflusszytometrie entnommen worden waren, der Rest der jeweiligen Zellmedium-Suspension im Eppendorf Gefäß in einer Mikrozentrifuge bei 6150 g bei Raumtemperatur für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und auf jeweils drei Aliquots (Stimulationsansätze) bzw. jeweils ein Aliquot (Kinetik) aufgeteilt und bei -80°C bis zu den ELISA Messungen eingefroren. Zusätzlich wurde eine Serumprobe aliquotiert, sofort eingefroren und bei -80 °C für die spätere Analyse der Entzündungsmediatoren aufbewahrt.

Das verwendete **Human IL-18 ELISA** Kit nutzt zwei monoklonale IL-18-Antikörper, die an zwei verschiedenen Epitopen von humanem IL-18 binden. Für den humanen IL-18 ELISA Assay wurden zunächst alle Reagenzien vorbereitet, die dem Kit in konzentrierter Form beiliegen: verdünnt werden mussten der Waschpuffer mit destilliertem Wasser im Verhältnis 1:10; der Peroxidase-konjugierte monoklonale anti-human IL-18 Antikörper musste mit der Konjugatlösung im Verhältnis 1:100 verdünnt werden (110 µl Konjugat plus 11 ml Verdünnung). Die Proben wurden den Herstellerangaben gemäß mit dem Verdünnungspuffer verdünnt: die Serumproben wurden im Verhältnis 1:10, die Kulturüberstände im Verhältnis 1:2 verdünnt. Wie in der Beschreibung Grundprinzipien des ELISA bereits erläutert, wurde auch hier auf eine Standardreihe zurückgegriffen. Der fertige Master-Standard lag in einer Konzentration von 2500 pg/ml. Für die Standardreihe wurden 200 µl vom Master-Standard entnommen und mit 300 µl der Verdünnungslösung aufgefüllt, so dass die neue Konzentration 1000 pg/ml enthielt. Dies wurde bis zu einer Konzentration von 25,6 pg/ml wiederholt. Tabelle 2-13 zeigt die Standardreihe.

	Standardvolumen	Verdünnungslösung	Endkonzentration
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
Leerprobe		300 µl	0 pg/ml

Tabelle 2-13: ELISA IL-18 Standardreihe

Ebenfalls im Kit enthalten war eine Mikrotiterplatte, in der die 96 Vertiefungen mit dem monoklonalen anti-human IL-18 Antikörper beschichtet waren. In diese Vertiefungen wurden je 100 µl der Standardreihe, inklusive Leerprobe (1. Reihe) bzw. der Proben pipettiert. Es folgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für 60 Minuten und eine viermalige Waschung mit dem im Kit enthaltenen Waschpuffer. Im Anschluss erfolgte die Pipettierung von 100 µl der vorbereiteten Konjugatlösung, die den enzymgekoppelten IL-18-Antikörper enthielt. Dann wurde eine erneute Inkubation für 60 Minuten bei Raumtemperatur und eine abschließende viermalige Waschung durchgeführt. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von 100 µl der Substratlösung, bestehend aus dem Chromogen Tetramethylbenzidin sowie 100 µl Wasserstoffperoxid und einem Phosphat-Citrat-Puffer, bei Raumtemperatur gestartet. Nach 30 Minuten wurde die Enzymreaktion nach Hinzufügen von 100 µl der Säurelösung gestoppt und die entwickelte Farbe damit stabilisiert.

Die optische Dichte der Probe in jeder Vertiefung wurde dann bei einer dualen Wellenlänge von 450/540 nm mittels Mikrotiterplatten-Photometer gemessen. Die Konzentration des IL-18 wurde anhand einer Dosis-Wirkungs-Kurve, basierend auf Referenzstandards, kalibriert.

Für die Durchführung des **human Caspase-1/ICE Immunoassays** wurden alle Proben und Reagenzien ebenfalls auf Raumtemperatur gebracht und der Assay gemäß Vorgaben des Herstellers durchgeführt: zur Herstellung der gebrauchsfertigen Lösung wurden 20 ml des konzentrierten Waschpuffers mit 480 ml Aqua dest. vermischt. Für die Standardreihe wurde zunächst die im Kit als lyophilisiertes Pulver vorliegende Caspase-1 durch Hinzugabe von Aqua dest. gelöst. Der fertige Master Standard hatte schließlich eine Konzentration von 4000 pg/ml und wurde mit der beigefügten Kalibrierlösung RD5-5 wie angegeben immer weiter verdünnt. Tabelle 2-14 demonstriert die Standardreihe.

	Standardvolumen	Verdünnungslösung	Endkonzentration
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
Leerprobe		500 µl	0 pg/ml

Tabelle 2-14: ELISA Caspase-1 Standardreihe

Für die ELISA Messung wurden die Kulturüberstände und Proben im Verhältnis 1:2 verdünnt. Zunächst wurden 50 µl der Verdünnungslösung „RDW1“ in jedes der Antikörper beschichteten 96 Vertiefungen pipettiert. Im Anschluss wurden 100 µl der Standardreihe bzw. der Probe hinzugegeben und die Mikrotiterplatte bei Raumtemperatur für 1,5 Stunden inkubiert. Nach Aspiration der Lösungen wurde die Platte gewaschen. Der Vorgang wurde insgesamt dreimal wiederholt. Danach wurden 100 µl des Antiserums (polyklonaler rabbit-Antikörper gegen humane Caspase-1) in die Vertiefungen hinzugefügt und bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert. Es erfolgten erneut drei Waschvorgänge. Schließlich wurde die Lösung mit dem enzymgekoppelten Antikörper in einer Menge von jeweils 100 µl in jede Vertiefung hinzupipettiert und eine erneute Inkubation bei Raumtemperatur für 30 Minuten und dreimalige Waschvorgänge vorgenommen. Dann wurde die enzymatische Farbreaktion durch Zugabe von 200 µl der Substratlösung, bestehend aus Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid, gestartet. Nach 20 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur unter Lichtschutz, wurden jeweils 50 µl der Stopplösung in jede Vertiefung hinzugefügt. Die Absorption wurde innerhalb von 30 Minuten bei 450 nm gemessen, die Wellenlängenkorrektur wurde auf 540 nm eingestellt.

Der **S100A12 CircuLex S100A12/EN-RAGE ELISA** Kit basiert auf dem monoklonalen Antikörper spezifisch für S100A12/EN-RAGE, mit dem jedes der 96 Vertiefungen der im Kit enthaltenen Mikrotiterplatte beschichtet worden ist. Alle Reagenzien wurden auf Raumtemperatur gebracht und waren bis auf den Waschpuffer und die S100A12 Standardreihe zur unmittelbaren Nutzung bereit. Der Waschpuffer wurde im Verhältnis 1:10, also 900 ml destilliertes Wasser auf 100 ml Puffer, verdünnt. Der HRP-gekoppelte Antikörper wurde 20-mal mit einem mitgelieferten Dilutionspuffer verdünnt. Der humane S100A12 Standard wurde in 1,3 ml destilliertem Wasser gelöst, so dass die Konzentration dann 25,6 ng/ml betrug und den Master Standard bildete. Der Standard 1 mit einer Konzentration von 1,28 pg/ml fungierte als höchster Standard, der Verdünnungspuffer fungierte als Nullstandard. Auch hier wurde auf einen Wechsel der Pipettenspitze bei jeder Verdünnung geachtet. Tabelle 2-15 zeigt die Standardreihe.

	Standardvolumen	Verdünnungslösung	Endkonzentration
Standard 1	50 µl des Master Standard (25,6 ng/ml)	950 µl	1,280 pg/ml
Standard 2	300 µl Standard 1 (1,280 pg/ml)	300 µl	640 pg/ml
Standard 3	300 µl Standard 2 (640 pg/ml)	300 µl	320 pg/ml
Standard 4	300 µl Standard 3 (320 pg/ml)	300 µl	160 pg/ml
Standard 5	300 µl Standard 4 (160 pg/ml)	300 µl	80 pg/ml
Standard 6	300 µl Standard 5 (80 pg/ml)	300 µl	40 pg/ml
Standard 7	300 µl Standard 6 (40 pg/ml)	300 µl	20 pg/ml
Leerprobe		300 µl	0 pg/ml

Tabelle 2-15: ELISA S100A12 Standardreihe

Die Überstände wurden im Verhältnis 1:1000 und die Seren im Verhältnis 1:2000 verdünnt. In die 96 Vertiefungen wurden nun jeweils 100 µl der Standardreihe (Standard 1-7, Leerprobe) und die Proben pipettiert, wobei die Proben jeweils zweifach pipettiert wurden. Es folgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für 60 Minuten auf einem Orbitalschüttler bei 300 rpm. In jede Vertiefung wurden 350 µl des mitgelieferten Waschpuffers für die Waschung pipettiert, dieser Vorgang wurde insgesamt viermal wiederholt. Danach wurden 100 µl des HPR konjugierten Antikörpers in jede Vertiefung pipettiert. Wieder wurde die Mikrotiterplatte bei Raumtemperatur auf dem Orbitalschüttler für 60 Minuten bei 300 rpm inkubiert. Dann erfolgte eine erneute viermalige Waschung analog zu den ersten Waschvorgängen und die Hinzugabe von 100 µl der Substratlösung in jede Vertiefung unter Vermeidung von Licht. Bei Raumtemperatur auf dem Orbitalschüttler bei 300 rpm für 20 Minuten wurde erneut inkubiert. Dann wurden jeweils 100 µl von der Stopplösung in der Reihenfolge, in der die Substratlösung hinzupipettiert wurde, hinzugefügt. Die Absorption wurde bei einer dualen Wellenlänge von 450/550 nm im Spektrophotometer innerhalb von 30 Minuten nach Zugabe der Stopplösung gemessen.

2.9.3 Messung der Inflammationsparameter mittels Multiplexed Bead Array

Für die Messung von weiteren Inflammationsparametern - Zytokine oder Zytokinrezeptor-Antagonisten, neutrophilen Granula-Proteinen und Chemokinen - in den Zellkultur-Überständen wurden multiplexed Bead Arrays verschiedener Hersteller in einer Kooperation mit der Pädiatrischen Rheumatologie der Uniklinik Münster genutzt. Diese Methode eines Immunoassays verwendet magnetische oder Polystyrol-Beads für die Detektion des Zielantigens und ermöglicht so die gleichzeitige zytometrische Quantifizierung multipler Analysate in einem Versuch. Diese Methode erlaubt eine zeitsparende Analyse und benötigt relativ geringe Probenvolumina.

Die Beads sind entweder superparamagnetische Mikrosphären mit einem magnetischen Kern und einer Polystyroloberfläche oder Polystyrol-Beads, die vollständig aus Polystyrol bestehen. Die Beads sind mit monoklonalen Antikörpern beschichtet. Jeder Bead ist gefärbt mit Fluorochromen unterschiedlicher Fluoreszenzintensität, die somit eine Vielzahl von spektral unterschiedlichen Signaturmikrosphären ermöglichen. Die Luminex xMAP Technologie verwendet für die Färbung der Beads rote und infrarote Fluorosphäre. Es wurden multiplexed bead arrays verschiedener Hersteller verwendet (ThermoFisher, Waltham, MA, USA; R&D systems, Minneapolis, MN, USA). Exemplarisch wird das Verfahren von R&D hier vorgestellt. Die Proben werden zu der Mischung der Beads auf einer Filterplatte gegeben. Die Antikörper binden an die Analysate. Spezifische an Biotin gebundene Detektionsantikörper werden nun hinzugefügt, so dass ein Gefüge von Antikörper Bead - Zielanalysat - Detektionsantikörper entsteht, ähnlich wie in einem Sandwich ELISA. Im Anschluss wird Phycoerythrin (PE)-konjugiertes Streptavidin hinzugefügt, das an die biotinylierten Detektionsantikörper bindet. Die Messung der Analysate erfolgt in einem Detektionsgerät, das vergleichbar der Durchflusszytometrie auf Fluidik, Optik und Elektronik basiert: in Analysegeräten wie Luminex 200™ oder FlexMap® passieren die an den Beads gebundenen Analysate in einer Lösung einen dualen Laser. Einer der beiden Laser identifiziert die Beads und bestimmt die Analysate. Der

zweite Laser bestimmt das Ausmaß des PE-Signals, das direkt proportional zur Menge des gebundenen Analysats ist.¹⁰⁰

Die multiplexed bead arrays wurden für die Messung von Zytokinen und Zytokinrezeptor-Antagonisten (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-18, IL-1Ra, TNF α), neutrophilen Granula Proteinen (Proteinase 3, MPO) und Chemokinen (MCP-1, MIP-1 α (CCL-3), MIP-1 β (CCL-4), MIP-3 α (CCL-20)) angewendet. Die Assays stammten von verschiedenen Herstellern (Procartaplex, Thermofisher, Waltham, MA, USA; R&D systems, Minneapolis, MN, USA). Die Proben der Zellkulturüberstände wurden den Herstellerangaben gemäß in den Kits verwendet. Die S100A12 Proteine wurden zum Teil in domo mit ELISA Kits gemessen, zum Teil durch unsere Kooperationspartner in der Uniklinik Münster. Hierfür wurden die S100A12 Proteine durch intern übliche Antikörper detektiert und durch unsere Kooperationspartner auf die MagPlex Mikrosphären Plattform (Luminex, Hertogenbosch, The Netherlands) übertragen. Die Datenakquise wurde auf dem MagPix Instrument (Merck Millipore) durchgeführt. Als Software diente xPONENT v4.2 (Luminex). Die Daten wurden mit ProcartaPlex Analyst software (v1.0; eBioscience) ausgewertet.

2.10 Asservierung für Polymerase Chain Reactions (PCR)

Bei der Vorbereitung der Proben für die ELISAs entstanden durch die Zentrifugation Zellpellets. Diese wurden für eine spätere PCR asserviert, wobei lediglich die Zellpellets der Stimulationsansätze verwendet wurden ("unstimuliert", "LPS+ATP", "Colchizin", "Colchizin+LPS+ATP"). Zu jedem Pellet wurden 350 μ l des Lysepuffers RA1 der Firma Machery Nagel hinzugegeben, um die Zellmembranen aufzubrechen. Um die freigewordenen RNAsen zu inaktivieren, wurden dann 3,5 μ l 2-Mercaptoethanol hinzugegeben. Die Lysate wurden für spätere PCRs bei -80°C asserviert.

2.11 Messung des C-reaktiven Proteins

Als zusätzlicher Indikator für die Entzündungsaktivität wurde für jeden Probanden das CRP im Serum gemessen. Dieses wurde am cobas8000 mit dem Modul C701 der Firma Roche gemessen analog zu dem etablierten Verfahren in der Routinediagnostik.

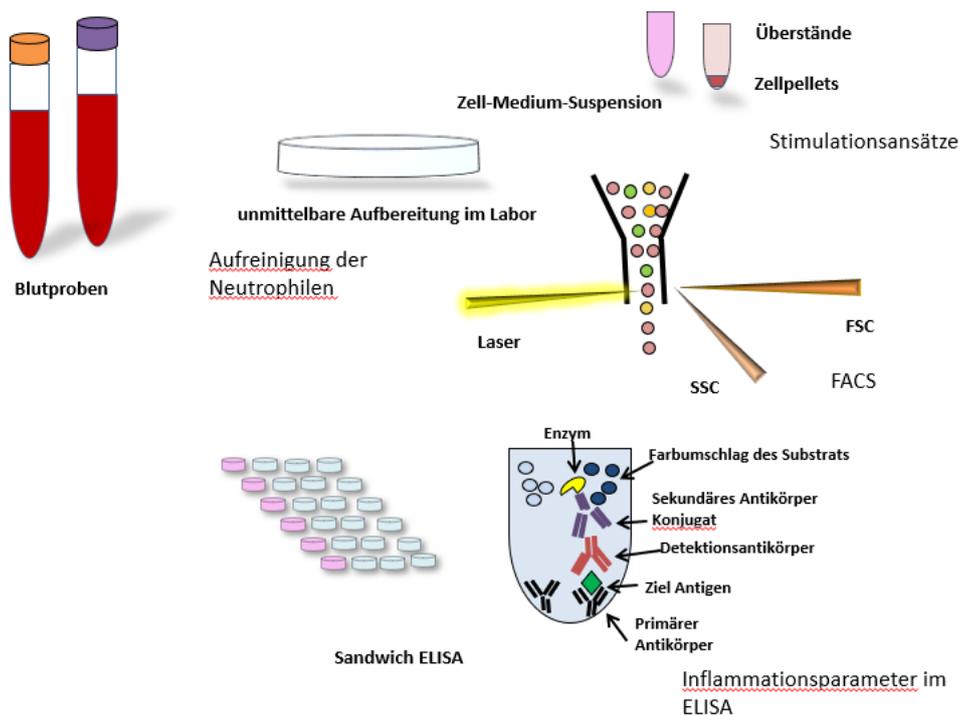


Abb 2-2: Übersicht der Versuchsmethoden: Unmittelbare Aufbereitung der Neutrophilen aus dem EDTA Blut und Herstellung einer Suspension aus Neutrophilen und Medium. Aus dieser wurden Kinetikansätze, sowie Stimulationsansätze mit LPS+ATP, Ansätze mit Inhibition durch Colchizin bzw. Anakinra und MCC950 und Ansätze mit LPS+ATP+Colchizin hergestellt. Die Zellpellets und Überstände wurden asserviert. In den Serumproben wurde das CRP gemessen. Im ELISA wurden die Inflammationsparameter IL-18, IL-1 β und S100A12 in den asservierten Überständen und Serumproben gemessen. Zudem wurden weitere Zytokine und Zytokinrezeptor-Antagonisten in den asservierten Überständen mittels Multiplexed-Bead-Array bestimmt.

2.12 Statistische Methoden

Die erhobenen Daten wurden mit Graph Pad Prism Software (Version 7.0, für Windows GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) ausgewertet. Die Ermittlung der Signifikanz erfolgte zwischen unterschiedlichen Gruppen mit dem Mann-Whitney-U-Test, zwischen Ansätzen innerhalb von identischen Gruppen mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test. Statistische Signifikanzen wurden mit * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$ gekennzeichnet. Die Darstellung in Graphen wurde ebenfalls mit der Graph Pad Prism Software umgesetzt. Die statistische Analyse des Multiplex Assays erfolgte mit dem Kruskal-Wallis Test mit anschließendem Dunn's Test für multiple Vergleiche. Die Signifikanzen wurden folgendermaßen dargestellt: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Die Berechnung des Spearman'sche Rangkorrelationskoeffizienten erfolgte zur Darstellung der Korrelation einzelner Proteine im Multiplex Assay.

3 Ergebnisse

3.1 Probanden

In der vorliegenden Arbeit wurden die Ergebnisse von 43 Probanden herangezogen, ein Proband wurde aufgrund unzureichender Zelltrennung ausgeschlossen, ein weiterer Proband nach den Messungen aufgrund unzureichender Einschlusskriterien. Die FMF-Gruppen verteilten sich auf fünf homozygote und compound heterozygote FMF-Patienten, einen heterozygot kranken Patienten und vier heterozygot gesunde FMF-Mutationsträger. Diese Probanden wurden gemeinsam mit Frau Dr. Judith Freytag gemessen und wurden in ihrer Arbeit von ihr bereits beschrieben. Aufbauend auf Vorarbeiten von Dr. Banu Orak und Dr. Judith Freytag sollten die Inflammationsparameter in Neutrophilen von FMF-Patienten und heterozygoten FMF-Mutationsträgern mit Patienten, die unter anderen akuten oder chronischen Erkrankungen leiden, verglichen werden. Die hier dargestellte FMF-Kohorte ist als exemplarisch für eine größere FMF-Kohorte, die in der AG PD Dr. Kallinich bereits untersucht wurde, zu sehen. Die Kohorte der Probanden, die mit Frau Dr. Freytag gemessen wurden und in ihrer Arbeit beschrieben wurden, umfassen:

- jeweils einen Patienten mit den Genotypen M694V/M694V, M694V/A744S, M694V/V726A und M680I/M694V und eine Patientin mit M680I/M680I (Alter 19,4, Median 20 Jahre). Alle FMF-Patienten nahmen Colchizin in der üblichen Dosierung von 1 -1,5mg/d p.o. ein und zeigten in den letzten 12 Monaten keine Schübe, wenn eruierbar.
- Vier heterozygot gesunde Mutationsträger (M694V) wurden eingeschlossen (Geschlecht: 2 w, 2m; Alter Mittelwert 47,8, Median 50 Jahre), zudem wurde ein heterozygot kranker Patient (M694V, Alter 24 Jahre), der 12 Schübe in den letzten 12 Monaten mit Therapie Colchizin 1,0mg/d p.o. aufwies, gemessen. Leider konnten keine weiteren heterozygot kranken Patienten rekrutiert werden, so dass dieser getrennt deskriptiv mitaufgenommen wurde, allerdings keine eigenständige Gruppe gebildet werden konnte.

Insgesamt schloss Dr. Freytag in ihrer Arbeit u.a. insgesamt 12 FMF-Patienten ein, hierunter auch einen Patienten mit compound heterozygotem Genotypen E148Q, M694V, V726A, ebenfalls asymptomatisch unter Basistherapie und einen M694V/M694V Patienten, der in den vergangenen 12 Monaten zum Zeitpunkt der Messungen unter 12 Schüben unter Colchizinthherapie litt; und sechs heterozygot gesunde Mutationsträger (M694V). Sie stellt in ihrer Dissertation Inflammationsprozesse für das Krankheitsbild FMF in Abhängigkeit ihrer Gen-Dosis-Wirkungs-Beziehung dar. Da meine Dissertation auf diese Ergebnisse aufbaut, wurden diese hier teilweise auch in die Statistiken miteinbezogen, um die Aussagen unserer Arbeiten durch die Analyse einer größeren Kohorte besser zu verdeutlichen.

Für die Untersuchung weiterer inflammatorischer Krankheitsbilder wurden von mir Patienten, die sechs Hauptgruppen zugeordnet wurden, rekrutiert: die Gruppe der akuten Infektionen, der Cystischen Fibrose, des Morbus Crohn, der rheumatologischen Erkrankungen, des Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Assoziierten Periodischen Syndroms (TRAPS) und der Immundefekte mit Autoinflammation. Die Gruppe der Infektionen wurde gebildet durch drei Patienten mit einer Pneumonie, einem Patienten mit Pneumonie und vorbekannter HIV-Infektion (38 cop/ml), einem Patienten mit Sepsis (*Staphylococcus haemolyticus*) und einem Patienten mit Perikarditis und Pleuritis bei bakterieller Infektion (Alter Mittelwert 59, Median 59,5). Die Gruppe der Cystischen Fibrose setzt sich aus vier Patienten mit dem Genotypen F508del/F508del und einem Patienten mit dem Genotypen F508del/1771-1G>A zusammen, alle erhielten zum Zeitpunkt der Blutentnahme mindestens eine Antibiose und erfüllten die Kriterien einer pulmonalen Exazerbation (Bilton Score Mittelwert 4, Median 4; Alter Mittelwert 32, Median 29). Die Morbus Crohn Gruppe wurde gebildet von einem Patienten, der den TNF- α Blocker Adalimumab und den Immunmodulator Azathioprin, der v.a. B- und T-Zellen inhibiert, einnahm, einem Patienten mit chronischer Einnahme von Adalimumab, einem Patienten mit Medikation durch den $\alpha 4\beta 7$ Integrin (Adhäsionsmolekül von aktivierten Lymphozyten) Inhibitor Vedolimumab und einem Patienten mit Eisensubstitution vor Basistherapie. Die

Krankheitsschwere wurde anhand des Harvey-Bradshaw Index eingeschätzt (Mittelwert 6,8, Median 7), (Alter Mittelwert 23,3, Median 18). Die Gruppe der rheumatologischen Erkrankungen besteht aus einem Patienten mit rheumatoider Arthritis therapiert mit dem Basismedikament Leflunomid (Inhibition von aktivierten Lymphozyten durch Hemmung des Enzyms Dihydrorotat-Dehydrogenase) und Methotrexat (Inhibition des Folsäure-Antagonisten und Dihydrofolat-Reduktase), zwei Patientinnen mit rheumatoider Arthritis und Medikation mit Certolizumab (TNF- α Blocker) und einem Patienten mit Morbus Still ohne Basistherapie zum Zeitpunkt der Blutentnahme. Die Evaluation der Krankheitsaktivität erfolgte durch Anwendung des DAS28 (Mittelwert 4,3, Median 4,439; Alter Mittelwert 49,6, Median 58 Jahre). Die TRAPS-Patienten, Vater und Tochter, sind beide jeweils heterozygote T50M-Mutationsträger und unter Canakinumab symptomfrei (Alter Mittelwert 25,5 Jahre). Die Gruppe der Immundefekte umfasst einen Patienten mit Septischer Granulomatose (Genotyp gp91phox), behandelt mit Itraconazol und Cotrimoxazol zum Zeitpunkt der Blutentnahme und einen Patienten mit Common Variable Immunodeficiency (CVID) mit respiratorischen Infektionen, behandelt u.a. mit Ceftazidim und Immunglobulinen (Alter Mittelwert 38,5 Jahre). In der Gruppe der gesunden Kontrollen wurden sieben Probanden gemessen (Geschlecht: 4 w, 3 m; (Alter 40,1, Median 40 Jahre). Die Tabellen 3-1 und 3-2 zeigen die Patientencharakteristika und die Inflammationsparameter der einzelnen Kohorten. Für die MCC950/Anakinra-Experimente wurden gesondert FMF-Patienten und gesunde Probanden rekrutiert.

	Kon-trollen	heterozygote M694V Mutations-träger	FMF-Patienten	andere inflammato-rische Erkran-kungen (gesamt)	Infek-tionen	CF	M. Crohn	rheumatische Erkrankungen	TRAPS	Immun-defekte
m/w	3/4	2/2	4/1	19/4	6/0	4/1	4/0	2/2	1/1	2/0
Alter Mittelwert (Bereich)	40 (27-55)	48 (40-51)	19 (17-21)	41 (10-82)	59 (37-82)	32 (19-47)	23 (16-41)	54 (19-74)	26 (10-41)	41 (24-53)
Mittelwert Krank-heits-schwere (SD)	-----	-----	Schübe in letzten 12 Monaten: 0	-----	-----	Bilton score: 4 (0.71)	Harvey-Bradshaw-Score: 6,75 (1.50)	DAS28: 4.3 (0.50)	-----	-----
Genotyp		heterozygot M694V	M694V/V726A, M694V/M680I, 2 M694V/A744S, M680I/M680I, M694V/M694V	-----	-----	1 F508del & 1717-1 G>A, 4 F508del/F508del	-----	-----	2 hetero-zygot T50M	gp91phox
CRP Median (Bereich) mg/l	0,7 (0,3-6)	3,5 (0,8-5,8)	4,5 (0,3-51,7)	18,4 (0,3-182,8)	85 (39,6-182,8)	18 (8,2-66,1)	15 (2,9-55,5)	9 (3-50,7)	1 (0,3-1,9)	5,2 (1,5-8,9)
Caspase-1 Median (Bereich) pg/ml	149 (53-214)	270,5 (260-275)	257 (105-330)	157 (59-800)	154 (75-800)	157 (103-302)	119 (64-257)	251 (165-317)	62 (59-64)	155 (65-161)
S100A12 Median (Bereich) ng/ml	277 (54-363)	456 (236-570)	629 (355-6587)	437,5 (73,6-1189,9)	nicht verfü-gar	568 (375-761)	236,2 (nicht verfü-gar)	645,9 (276,1-1189,8)	95,1 (73,6-116,5)	nicht verfügbar
IL-18 Median (Bereich) pg/ml	145 (106-240)	369,5 (250-538)	830 (571-4941)	370 (138-15221)	397 (139-1350)	261 (138-398)	209 (192-493)	3005 (758-15221)	338 (306-370)	1396 (535-2257)

Tabelle 3-1: Probandencharakteristika und Darstellung der Inflammationsparameter für die einzelnen Kohorten zusammengefasst

	Krankheitsschwere	CRP mg/l	Caspase-1 pg/ml	S100A12 ng/ml	IL-18 pg/ml
1 FMF	Schübe/letzte 12 Monate				
1.1	0	8	330	548	612
1.2	0	0,3	257	711	571
1.3	0	51,7	265	6587	4941
1.4	nicht verfügbar	4,5	201	354	830
1.6	nicht verfügbar	2,6	105	nicht verfügbar	4316
2 heterozygot krank					
2.1	12	23,4	209	nicht verfügbar	6890
3 heterozygot gesund					
3.1		5,8	266	571	538
3.2		2	260	236	245
3.3		0,8	275	445	489
3.4		5	275	467	250
4 Infektionen					
4.1		103,1	151	nicht verfügbar	139
4.2		73,2	295	nicht verfügbar	536
4.3		78,1	136	nicht verfügbar	1350
4.4		182,8	157	nicht verfügbar	283
4.5		91,6	>800	nicht verfügbar	510
4.6		39,6	75	nicht verfügbar	155
5 Cystische Fibrose	Bilton Score				
5.2	4	8,6	302	761	398
5.3	4	18,4	155	375	309
5.4	3	66,1	103	nicht verfügbar	261
5.5	4	8,2	157	nicht verfügbar	138
5.6	5	35,6	207	nicht verfügbar	142
6 Morbus Crohn	Harvey-Bradshaw Index				
6.1	5	2,9	142	236	207
6.2	6	22,5	96	nicht verfügbar	493
6.3	8	7,2	64	nicht verfügbar	211
6.4	8	55,5	257	nicht verfügbar	192
7 Rheumatologische Erkrankungen	DAS 28				
7.1	3,58	3	165	276	758
7.2	4,45	12,1	254	1190	15221
7.4	4,4	6,8	317	472	1009

7.5	4,75	50,7	247	nicht verfügbar	9317
8 TRAPS					
8.1		1,9	59	117	370
8.2		0,3	64	74	306
9 Immundefekte					
9.1		8,9	161	nicht verfügbar	227
9.2		1,5	65	nicht verfügbar	535
10 gesunde Kontrollen					
10.1		0,7	197	362	106
10.2		0,7	214	364	240
10.3		1,9	68	545	126
10.4		6	149	277	220
10.5		<0,3	158	189	134
10.6		0,4	84	nicht verfügbar	234
10.7		0,9	53	nicht verfügbar	145

Tabelle 3-2: Probandencharakteristika und Darstellung der Inflammationsparameter für die individuellen Probanden

3.2 Inflammationsparameter im Serum

In den Sera wurde die spontane Sekretion der Inflammationsparameter CRP, IL-18, Caspase-1 und der S100A12-Proteine in den einzelnen Gruppen untersucht und die Ergebnisse der einzelnen Gruppen miteinander verglichen.

3.2.1 C-reaktives Protein im Serum

Das CRP in der Gruppe der homozygoten bzw. compound heterozygoten FMF-Patienten war im Vergleich zu den gesunden Kontrollen signifikant erhöht. Wenn man die erweiterte FMF-Patientenkohorte aus den Vorarbeiten in die Rechnung miteinbezieht (n=12), ergeben sich folgende Werte: FMF-Patienten: Mittelwert 20,7 mg/l, Median 4,9 mg/l, Range 0,3-112,5mg/l, p 0,0137, Kontrollen: n = 7, Mittelwert 13,4 mg/l, Median 4,5 mg/l, Range 0,3-51,7 mg/l, p =0,1604. Im Vergleich zwischen den FMF-Patienten und den heterozygoten Mutationsträgern zeigte sich kein signifikanter Unterschied (n=4, Mittelwert 1,6 mg/l, Median 0,7 mg/l, Range 0,7-6 mg/l), auch nicht bei Hinzunahme der anderen zwei heterozygoten Mutationsträger aus Vorarbeiten. Innerhalb der Gruppe der anderen inflammatorischen Erkrankungen ergab sich im Vergleich zu den heterozygoten Mutationsträgern ein signifikant erhöhtes CRP, wenn man die anderen inflammatorischen Erkrankungen zusammenfasst (n=23, Mittelwert 38,2 mg/l, Median 18,4 mg/l, Range 0,3-182,8 mg/l, p 0,0275) und im Vergleich zu den gesunden Kontrollen (n=7, MW 1,6 mg/l, Median 0,7 mg/l, Range 0,3-6 mg/l, p=0,0002). Besonders erhöht war das CRP innerhalb der akuten Infektionen (n=23, MW 38,2 mg/l, Median 85 mg/l, Range 0,3-182,8 mg/l). Im Vergleich zu den anderen inflammatorischen Erkrankungen mit FMF-Patienten zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Das CRP in den einzelnen Gruppen ist in der Abbildung 3-1 und für die gesamte Kohorte mit den Vorarbeiten in der Abbildung 3-2 dargestellt.

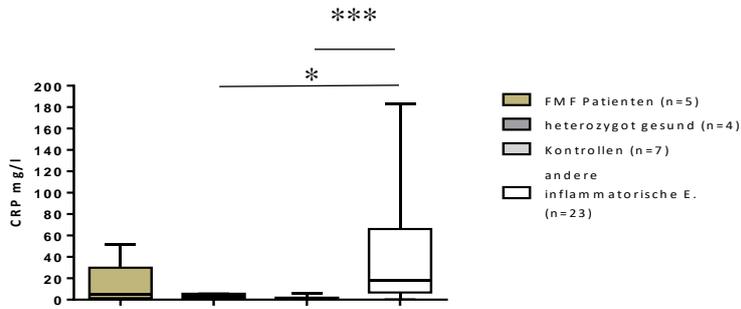


Abb 3-1: Darstellung des CRP in mg/l als Box Plot, Whisker entsprechen Min. und Max. Signifikanzen dargestellt mit * bis ****. $p < 0,05 \triangleq *$, $p < 0,01 \triangleq **$, $p < 0,001 \triangleq ***$, $p < 0,0001 \triangleq ****$.

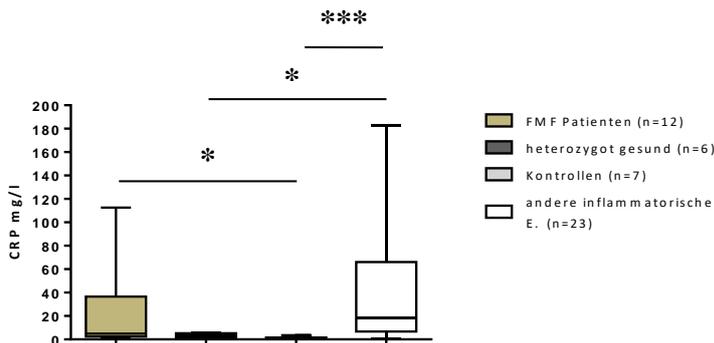


Abb 3-2: Darstellung des CRP in mg/l als Box Plot mit den FMF-Patienten aus erweiterter Gesamtkohorte, Whisker entsprechen Min. und Max. Signifikanzen dargestellt mit * bis ****. $p < 0,05 \triangleq *$, $p < 0,01 \triangleq **$, $p < 0,001 \triangleq ***$, $p < 0,0001 \triangleq ****$.

3.2.2 S100A12-Proteine im Serum

Berechnet man die Signifikanzen für die FMF-Patienten aus der erweiterter Gesamtkohorte, zeigen sich die S100A12-Proteine für die FMF-Patienten ($n=11$, Mittelwert 6843,9 ng/ml, Median 1478,5 ng/ml, Range 354-43154 ng/ml), bzw. für die FMF-Patienten ohne Patienten aus Vorarbeiten ($n=4$, Mittelwert 2049,8 ng/ml, Median 629 ng/ml, Range 355-6587 ng/ml) signifikant erhöht im Vergleich zu allen anderen drei Gruppen: Im Vergleich zu den heterozygoten Mutationsträgern ($n=6$, Mittelwert 429,7 ng/ml, Median 456 ng/ml, Range 236-571 ng/ml, $p=0,0097$), Heterozygote ohne Vorarbeiten ($n=4$, Mittelwert 429,5 ng/ml, Median 456 ng/ml, Range 236-570 ng/ml), bzw. zu den gesunden Kontrollen ($n=5$, Mittelwert 248,8 ng/ml, Median 277 ng/ml, Range 54-363 ng/ml, $p=0,0013$), und den anderen inflammatorischen Erkrankungen ($n=8$, Mittelwert 437,6 ng/ml, Median 437,5 ng/ml, Range 73,6-1189,9 ng/ml, $p=0,0041$). Im Vergleich der anderen Gruppen untereinander ergaben sich keine Signifikanzen im Bezug auf die S100A12-Proteine. Die Abbildungen 3-3 und 3-4 zeigen die S100A12-Proteine in den einzelnen Gruppen.

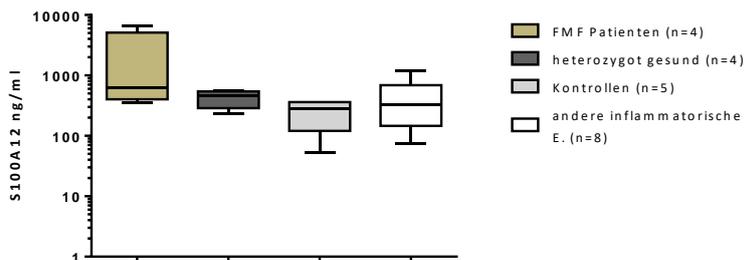


Abb.: 3-3 S100A12-Proteine in ng/l als Box Plot, Whisker entsprechen Min. und Max Signifikanzen

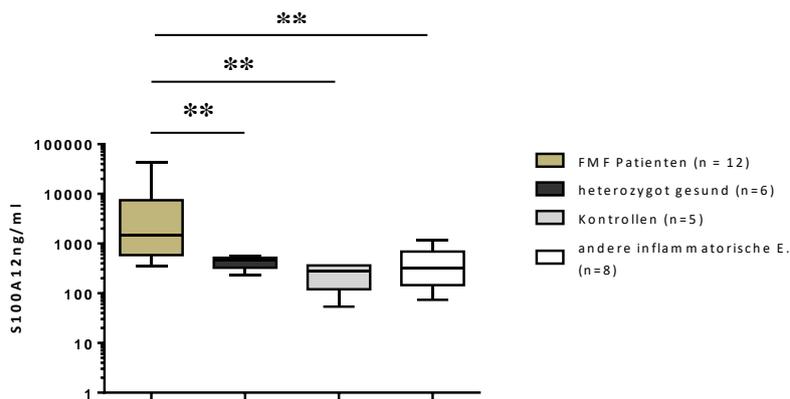


Abb 3-4: Darstellung der S100A12-Proteine in ng/l als Box Plot mit FMF-Patienten der erweiterten Gesamtkohorte, Whisker entsprechen Min. und Max. Signifikanzen dargestellt mit * bis ****. $p < 0,05$ \triangle *, $p < 0,01$ \triangle **, $p < 0,001$ \triangle ***, $p < 0,0001$ \triangle ****.

3.2.3 Interleukin-18 im Serum

Für die gemessenen Probanden zeigt sich ein erhöhtes Interleukin-18 (IL-18) für die FMF-Patienten (n=5, Mittelwert 2254 pg/ml, Median 830 pg/ml, Range 571-4941 pg/ml) im Vergleich zu allen anderen Gruppen: Zu heterozygoten Mutationsträgern (n=4, Mittelwert 380,5 pg/ml, Median 369,5 pg/ml, Range 245-538 pg/ml, $p=0,0159$), zu gesunden Kontrollen (n=7, Mittelwert 172,1 pg/ml, Median 145 pg/ml, Range 106-240 pg/ml, $p=0,0025$) und zu den anderen inflammatorischen Erkrankungen (n=23, Mittelwert 1338,3 pg/ml, 370 pg/ml, Range 138-15221 pg/ml, $p=0,0274$). Eine signifikante Erhöhung des IL-18 stellt sich auch für die heterozygoten Merkmalsträger ($p=0,0061$) bzw. für die anderen inflammatorischen Erkrankungen ($p=0,0041$) im Vergleich zu den gesunden Kontrollen dar.

Die Signifikanzen werden noch deutlicher, wenn man in die Berechnungen die FMF-Patienten (n=12, Mittelwert 5306,4 pg/ml, Median 4185 pg/ml, Range 571-18028 pg/ml) und heterozygoten Merkmalsträger (n=6, Mittelwert 427,8 pg/ml, Median 441,5 pg/ml, Range 245-651 pg/ml) aus der erweiterten Gesamtkohorte mit den Vorarbeiten von Frau Dr. Freytag einschließt: Die IL-18 Expression bei den FMF-Patienten war signifikant erhöht im Vergleich zu den gesunden Kontrollen $p=0,0001$, und auch signifikant erhöht im Vergleich zu den anderen inflammatorischen Erkrankungen $p=0,0001$. Bei den heterozygoten Mutationsträgern war die IL-18-Expression ebenfalls im Vergleich zu den gesunden Kontrollen erhöht ($p=0,0012$). Die Abbildungen 3-5 und 3-6 stellen die IL-18-Expression in den einzelnen Gruppen dar.

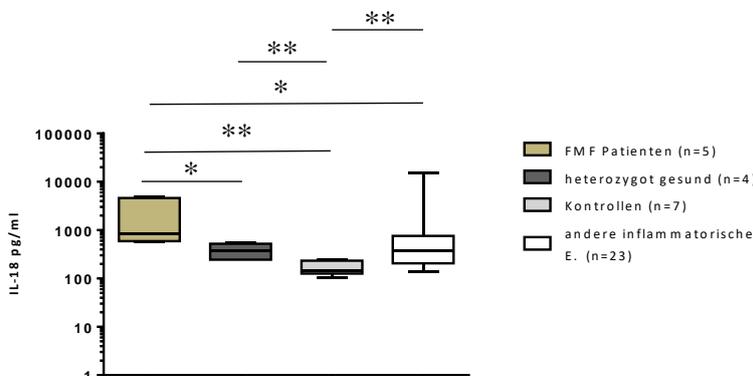


Abb 3-5: Darstellung des IL-18 in pg/l als Box Plot, Whisker entsprechen Min. und Max. Signifikanzen dargestellt mit * bis ****. $p < 0,05$ \triangle *, $p < 0,01$ \triangle **, $p < 0,001$ \triangle ***, $p < 0,0001$ \triangle ****.

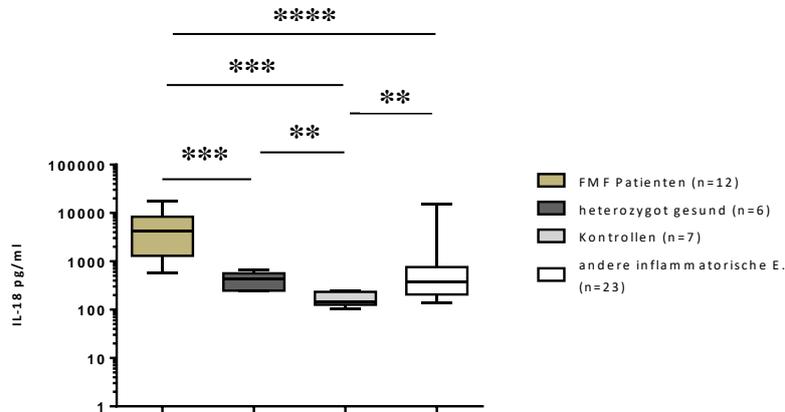


Abb. 3-6: IL-18 in pg/l als Box Plot mit FMF-Patienten aus der erweiterten Gesamtkohorte, Whisker entsprechen Min. und Max. Signifikanzen dargestellt mit * bis ****. $p < 0,05 \triangleq *$, $p < 0,01 \triangleq **$, $p < 0,001 \triangleq ***$, $p < 0,0001 \triangleq ****$.

3.2.4 Cysteine-dependent Aspartate specific Protease (Caspase-1) im Serum

Caspase-1 vermittelt inflammatorische Prozesse durch Spaltung von Interleukinen, wie IL-18, in ihre reife Form. Im Serum lag das Enzym bei den FMF-Patienten ($n=5$, Mittelwert 231,6 pg/ml, Median 257 pg/ml, Range 105-330 pg/ml) im Vergleich zu den gesunden Kontrollen ($n=7$, Mittelwert 131,9 pg/ml, Median 149 pg/ml, Range 53-214 pg/ml), $p=0,0480$) erhöht vor. Auch bei den heterozygoten Mutationsträgern ($n=4$, Mittelwert 269 pg/ml, Median 270,5 pg/ml, Range 260-275 pg/ml) zeigte sich Caspase-1 im Vergleich zu gesunden Kontrollen signifikant erhöht ($p=0,0061$).

Um eine größere FMF-Kohorte miteinbeziehen zu können, wurde zum Vergleich wieder die Statistik mit der erweiterten FMF-Gesamtkohorte aus Vorarbeiten miteinbezogen: Unter den-FMF Patienten ($n=12$, Mittelwert 395,4 pg/ml, Median 297,5 pg/ml, Range 105-1552 pg/ml) lag Caspase-1 signifikant erhöht im Vergleich zu gesunden Kontrollen ($p=0,0026$) und zu den anderen inflammatorischen Erkrankungen ($n=23$, Mittelwert 192,6 pg/ml, Median 157 pg/ml, Range 59-800 pg/ml, $p=0,0025$) vor. Zwischen heterozygot gesunden Mutationsträgern ergab sich eine signifikante Erhöhung von Caspase-1 im Vergleich zu den gesunden Kontrollen ($p=0,0038$). Die Caspase-1-Expression in den einzelnen Gruppen ist in den Abbildungen 3-7 und 3-8 dargestellt.

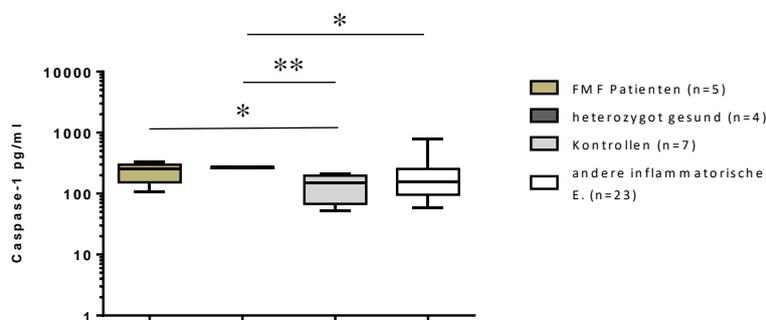


Abb. 3-7: Darstellung der Caspase-1 in pg/l als Box Plot, Whisker entsprechen Min. und Max. Signifikanzen dargestellt mit * bis ****. $p < 0,05 \triangleq *$, $p < 0,01 \triangleq **$, $p < 0,001 \triangleq ***$, $p < 0,0001 \triangleq ****$.

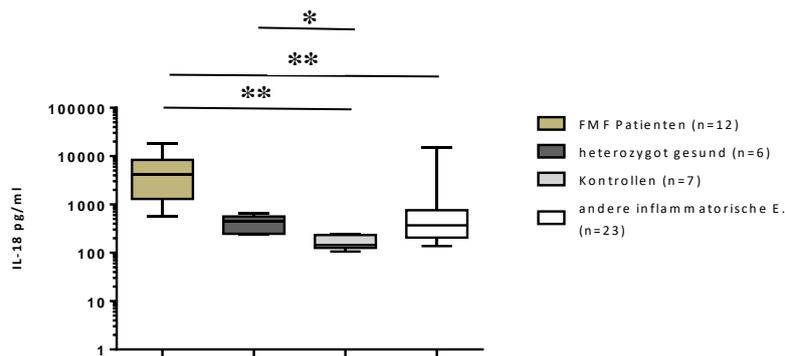


Abb. 3-8: Darstellung der Caspase-1 in pg/l als Box Plot mit FMF-Patienten aus der erweiterten Gesamtkohorte, Whisker entsprechen Min. und Max. Signifikanzen dargestellt mit * bis ****. $p < = 0,05 \triangleq *$, $p < = 0,01 \triangleq **$, $p < = 0,001 \triangleq ***$, $p < = 0,0001 \triangleq ****$.

3.3 Bestimmung der Zellreinheit und -vitalität mittels Sysmex und Trypanblau Färbung

Die unter 3.2 dargestellte Erhöhung von S100A12-Proteinen, Caspase-1 und IL-18 im Serum von FMF-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen und anderen inflammatorischen Erkrankungen sollte nun hinsichtlich ihres Sekretionsmusters in *ex vivo* aufgereinigten Neutrophilen untersucht werden. Wie in der Tabelle 3-3 gezeigt, war der Anteil der Neutrophilen nach der Zelltrennung bei den FMF-Patienten im Mittelwert bei 94,6%, bei den anderen inflammatorischen Erkrankungen 91,1%, bei den heterozygoten Mutationsträgern 92,2% und bei den gesunden Kontrollen 94,2%. Die Vitalitätsmessung mittels Trypanblaufärbung zeigte für alle Gruppen vergleichbare Prozentzahlen: Im Mittelwert 96,9% für die FMF-Patienten, 98,3% für die anderen inflammatorischen Erkrankungen, 96,1% für die heterozygoten Mutationsträger und 93% für die Kontrollen. In der Tabelle 3-3 ist die Zellverteilung zusammengefasst.

	n	Neutrophile (MW/SD)	Lymphozyten (MW/SD)	Monozyten (MW/SD)	Eosinophile (MW/SD)	Vitalität (MW/SD)
FMF	5	94,6/2,3	2,8/1,8	0,3/0,4	2,1/0,7	96,9/3,4
heterozygot	4	92,2/4,4	4,4/3	0,8/0,7	2,5/1,5	96,1/1,0
Kontrollen	7	94,2/0,0	2,8/2,1	0,3/0,3	2,3/2,5	93/0,1
Cystische Fibrose	5	91/4	4,1/2,3	0,8/0,6	3,7/1,8	98/1
rheumatische Erkrankungen	4	93,2/4,2	4,1/2,3	0,8/0,6	3,7/1,8	99/1
Morbus Crohn	4	95,9/2,3	5,2/6,4	2,2/3,4	1,6/1	98/0
Infektionen	6	91,2/8,3	2,7/3,1	1,8/1,8	4,1/5,8	98/2
TRAPS	2	82,4/16,4	13,1/13,01	0,4/0,1	3,8/3,3	99/1
Immundefekte	2	92,7/1,3	3,2/0,4	0,4/0	3,7/1,6	98/0
total	39	91,2/3,5	5,3/3,0	0,9/0,7	2,7/1,3	96,3/3,0

Tabelle 3.3: Zellverteilung nach Dichte-Gradienten-Zentrifugation. Angabe der Werte in %. Bestimmung der Vitalität durch Trypanblaufärbung. Angabe der Werte in %

3.4 Bestimmung der Zellvitalität mittels Durchflußzytometrie

Um den Einfluss der Kultur und der Stimulantien auf die Zellvitalität einschätzen zu können, wurden für die ersten Probanden eine Propidiumbromid- und Annexin-Färbung und eine Trypanblaufärbung nach Stimulation von 5h Stunden durchgeführt. Tabelle 3-4 zeigt die Ergebnisse: Die Vitalität lag in der Gruppe der FMF-Patienten im Mittelwert bei 83,3% ohne Stimulation, bei 88,2% bei Hinzugabe von Colchizin und bei 89,2% nach Stimulation mit Colchizin+LPS+ATP. Für heterozygot Gesunde (unstimuliert 96,1%, Colchizin 95,9%, Colchizin+LPS+ATP 89,4%) und gesunde Kontrollen (unstimuliert 89,5%, Colchizin 92,8%, Colchizin+LPS+ATP 89,9%) zeigten sich vergleichbare Werte. Die Tabelle 3-4 gibt einen Überblick über die Zellvitalität bestimmt in der Durchflusszytometrie.

	FMF-Patienten (n=5)		heterozygot gesund (n=4)		Kontrollen (n=5)	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD
nach Stimulation unstimuliert 5h						
Nekrose	0,42	0,41	0,13	0,05	0,14	0,09
späte Apoptose/Nekrose	5,46	4,94	0,63	0,24	0,58	0,22
Apoptose	10,9	5,0	3,2	1,10	9,74	6,64
vital	83,26	7,93	96,08	1,02	89,54	6,66
Colchizin 5h						
Nekrose	0,12	0,11	0,13	0,05	0,1	0,07
späte Apoptose/Nekrose	1,2	0,52	0,53	0,22	0,64	0,25
Apoptose	10,48	6,56	3,60	1,32	6,4	3,78
vital	88,18	6,65	95,85	1,18	92,84	3,89
Colchizin+LPS+ATP						
Nekrose	0,1	0,00	0,75	1,05	1,7	3,30
späte Apoptose/Nekrose	0,92	0,35	0,60	0,29	1,04	0,65
Apoptose	9,84	5,87	2,53	0,86	7,22	5,42
vital	89,02	6,12	89,38	13,45	89,92	5,04

Tabelle 3-4: Anteil vitaler Zellen bestimmt durch Trypanblau Färbung nach Zelltrennung und nach 5 Stunden Stimulation. Bestimmung Vitalität durch Durchflusszytometrie nach Propidiumbromid- und Annexin-Färbung. Angabe von Mittelwert und Standardabweichung in %.

3.5 Zeitlicher Verlauf der Expression von Oberflächenmarkern

Die aufgereinigten Neutrophilen wurden nun hinsichtlich der Expression von Oberflächenmarkern nach Kurzzeitkultur zwischen den einzelnen Gruppen miteinander verglichen, sowohl dass spontane Shedding, als auch nach Stimulation mit LPS+ATP und nach Zugabe von Colchizin.

3.5.1 Zeitlicher Verlauf der L-Selektin (CD62L)-Expression

Die spontane Aktivierung von Neutrophilen wurde anhand der Expression von Oberflächenmarkern in der Durchflusszytometrie untersucht. CD62L kommt u.a. eine Rolle in der Adhäsion / Homing in der neutrophilen Zell-Endothell Interaktion zu. Ein rasches CD62L-Shedding von der Oberfläche der Neutrophilen von den FMF Patienten wurde insbesondere innerhalb der ersten zwei Stunden als Abfall der "geometric mean fluorescence intensity (gMFI)" gemessen. Im Folgenden sind die Werte aus den einzelnen Gruppen der erweiterten Gesamtkohorte einschließlich der Vorarbeiten von Frau Dr. Freytag zusammengefasst: Der gMFI fiel bei den FMF-Patienten nach zwei Stunden auf 48% (Range 19-77%) des ursprünglichen gMFI. Dieser Abfall war im Vergleich zu den gesunden Kontrollen (gMFI 103%, Range 89-112%, $p=0,0002$) und zu den anderen inflammatorischen Erkrankungen (gMFI 111%, Range 74-337%, $p < 0,0001$) signifikant stärker. Ein signifikant stärkerer Abfall des gMFI zeigte sich auch im Vergleich zwischen heterozygot gesunden Personen (gMFI 75%, Range 56-109%) und gesunden Kontrollen ohne Mutation ($p=0,026$), respektive anderen inflammatorische Erkrankungen ($p=0,0156$) nach zwei Stunden. In den folgenden drei Stunden sank der gMFI weiter, wenn auch in einem verringerten Ausmaß im Vergleich zu den ersten beiden Stunden. Auch in dieser Zeitspanne bestand ein signifikanter Unterschied zwischen FMF-Patienten (gMFI 43%, Range 16-61%) und gesunden Kontrollen (gMFI 104%, Range 84-124%, $p= 0,0002$), und zwischen FMF-Patienten und anderen inflammatorischen Erkrankungen (gMFI 96%, Range 75-132%), $p < 0,0001$). Vergleicht man die heterozygot gesunden Merkmalsträger (gMFI 74%, (Range 51-122%) mit den anderen Gruppen, besteht auch in dieser Gruppe ein signifikant stärkerer Abfall im Vergleich zu den anderen inflammatorischen Erkrankungen ($p=0,0344$). Zwischen den gesunden Kontrollen und den anderen inflammatorischen Erkrankungen bestand kein Unterschied im CD62L-Shedding. Die Abbildung 3-9 zeigt die CD62L-Expression für die einzelnen Gruppen, in der Abbildung 3-10 ist die CD62L-Expression für die einzelnen Gruppen der erweiterten Gesamtkohorte mit Vorarbeiten dargestellt.

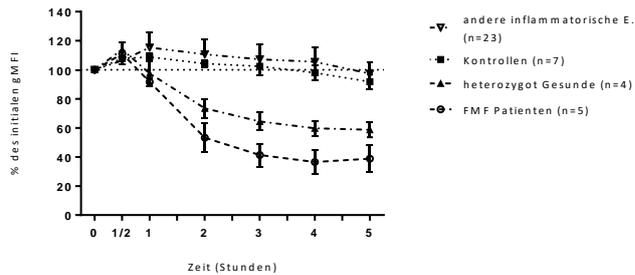


Abb. 3-9: Zeitlicher Verlauf der CD62L-Expression

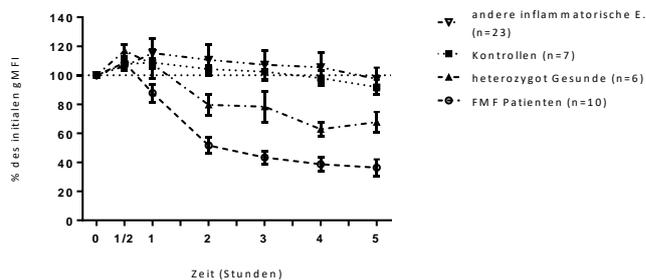


Abb. 3-10: Zeitlicher Verlauf der CD62L-Expression mit FMF-Patienten aus der erweiterten Gesamtkohorte

In Tabelle 3-5 sind alle Signifikanzen zwischen den Gruppen sowie innerhalb der Gruppen zwischen den verschiedenen Zeitpunkten dargestellt, gerechnet wurde der größeren Aussagekraft halber hier mit der erweiterten FMF-Gesamtkohorte mit Vorarbeiten.

versus		% „unstimuliert vor Stimulation“, Median (Bereich)	p-Wert	Signifikanz
1/2 Stunde				
heterozygot gesund	andere inflammatorische Erkrankungen	115 (102-131)	105 (89-128)	0,0195 *
1 Stunde				
FMF-Patienten	gesunde Kontrollen	91 (50-115)	106 (93-121)	0,0176 *
	andere inflammatorische Erkrankungen		105 (79 - 130)	0,0163 *
2 Stunden				
FMF-Patienten	heterozygot gesund	48 (19-77)	75 (56-109)	0,011 *
	gesunde Kontrollen		103 (89-112)	0,0002 ***
	andere inflammatorische Erkrankungen		111 (74-137)	<0,0001 ****
heterozygot gesund	gesunde Kontrollen	75 (56-109)	103 (89-112)	0,026 *
	andere inflammatorische Erkrankungen		97 (74-128)	0,0156 *
3 Stunden				
FMF-Patienten	heterozygot gesund	43 (16-61)	74 (51-122)	0,003 **
	gesunde Kontrollen		104 (84-124)	0,0002 ***
	andere inflammatorische Erkrankungen		96 (75 - 132)	<0,0001 ****
heterozygot gesund	andere inflammatorische Erkrankungen	74 (51 - 122)	96 (75 - 132)	0,0344 *

4 Stunden					
FMF-Patienten	heterozygot gesund	31 (13-63)	63 (46-80)	0,016	*
	gesunde Kontrollen		97 (83-120)	0,0002	***
	andere inflammatorische Erkrankungen		94 (70-126)	<0,0001	****
heterozygot gesund	gesunde Kontrollen	63 (46-80)	97 (83-120)	0,0022	**
	andere inflammatorische Erkrankungen		94 (70-126)	<0,0001	****
5 Stunden					
FMF-Patienten	heterozygot gesund	27 (14-65)	67 (46-95)	0,0028	**
	gesunde Kontrollen		86 (74-113)	0,0004	***
	andere inflammatorische Erkrankungen		88 (61 - 136)	<0,0001	****
heterozygot gesund	andere inflammatorische Erkrankungen	67 (46-95)	88 (61 - 136)	0,0091	**

Tabelle 3-5: CD62L-Expression im zeitlichen Verlauf. Median und Bereich in %. Das Signifikanz-Level ist dargestellt als Vergleich zwischen den verschiedenen Gruppen und evaluiert mit * bis ****. $p < 0,05 \triangleq *$, $p < 0,01 \triangleq **$, $p < 0,001 \triangleq ***$, $p < 0,0001 \triangleq ****$ (Vergleiche ohne statistische Signifikanz sind ausgeschlossen).

3.5.2 Zeitlicher Verlauf der CD11b-Expression

Integrin Alpha M (ITGAM) ist ein Bestandteil des Makrophagen-1 Antigens (Mac-1), auch als CD11b bezeichnet, das beteiligt ist an der Neutrophilen-Adhäsion und Migration und in dieser Funktion als Marker für die Aktivierung von Neutrophilen gesehen werden kann. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der CD11b-Expression zwischen FMF-Patienten und anderen inflammatorischen Erkrankungen. Allerdings fiel die CD11b-Expression bezogen auf den ursprünglichen Wert in der Gruppe der gesunden Kontrollen im Verlauf signifikant stärker ab als bei den anderen Gruppen: Nach fünf Stunden fiel die CD11b-Expression bei den FMF-Patienten auf gMFI 82% (Range 69-119%), bei den heterozygot gesunden Mutationsträgern auf gMFI 90% (Range 78-104%) und bei den anderen inflammatorischen Erkrankungen auf gMFI 85% (Range 59-328%). Innerhalb der Gruppe der gesunden Kontrollen lag der gMFI nach fünf Stunden nur noch bei 70% (54-76%). Die Abbildungen 3-11 und 3-12 zeigen den zeitlichen Verlauf der CD11b-Expression, Tabelle 3-6 fasst die Signifikanzen zusammen.

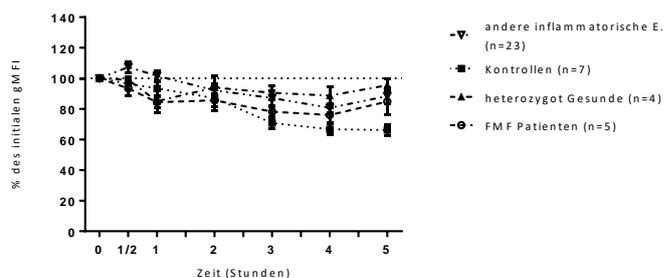


Abb. 3-11: Zeitlicher Verlauf der CD11b-Expression

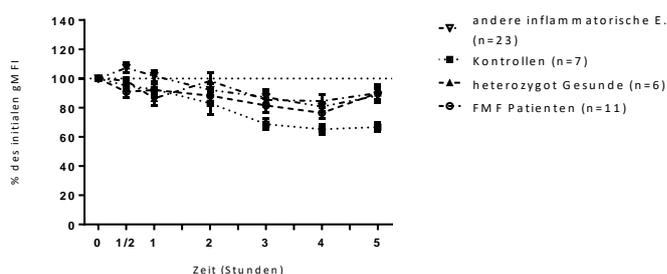


Abb. 3-12: Zeitlicher Verlauf der CD11b-Expression unter Einschluss von FMF-Patienten aus der erweiterten Gesamtkohorte

versus		% „unstimuliert vor Stimulation“, Median (Bereich)		p-Wert	Signifikanz
3 Stunden					
heterozygot gesund	gesunde Kontrollen	85 (68 - 102)	68 (54-81)	0,0127	*
andere inflammatorische Erkrankungen	gesunde Kontrollen	82 (58-336)	68 (54-81)	0,0033	**
4 Stunden					
heterozygot gesund	gesunde Kontrollen	82 (73-102)	64,5 (51-77)	0,0093	**
andere inflammatorische Erkrankungen	gesunde Kontrollen	85 (56-325)	64,5 (51-77)	0,0019	**
5 Stunden					
FMF-Patienten	gesunde Kontrollen	82 (69-119)	70 (54-76)	0,0014	**
heterozygot gesund	gesunde Kontrollen	90 (78-104)	70 (54-76)	0,0007	***
andere inflammatorische Erkrankungen	gesunde Kontrollen	85 (59-328)	70 (54-76)	0,0014	**

Tabelle 3-6: Zeitlicher Verlauf der CD11b-Expression. Median und Bereich in %. Das Signifikanz-Level ist dargestellt als Vergleich zwischen den verschiedenen Gruppen und evaluiert mit * bis ****. $p < 0,05 \triangleq *$, $p < 0,01 \triangleq **$, $p < 0,001 \triangleq ***$, $p < 0,0001 \triangleq ****$ (Vergleiche ohne statistische Signifikanz sind ausgeschlossen).

3.5.3 CD62L-Expression nach Zellstimulation

Die Zugabe von LPS + ATP 1mM nach 4,5h Kurzzeitkultur als Aktivator von IL-1 β and IL-18 und die Co-Inkubation mit Colchizin 5 μ g/ml für fünf Stunden mit LPS+ATP führte zu einem raschen CD62L-Shedding in allen Gruppen: FMF-Patienten (n=5, gMFI 31,2%, Range 16-41%), heterozygote Mutationsträger (n=4, gMFI 22,8%, (Range 17-36%), gesunde Kontrollen (n=7, gMFI 16,4%, Range 4-32%) und andere inflammatorische Erkrankungen (n=11, gMFI 15,1%, Range 8-20%). Durch die Stimulation ließ sich das CD62L-Shedding bei den FMF-Patienten nicht wesentlich verstärken (gMFI 38,9% nach fünf Stunden unstimuliert), bei den anderen inflammatorischen Erkrankungen führte die Stimulation zu einem wesentlich stärkeren CD62L-Shedding als ohne Stimulation (gMFI 97,4%). Die Co-Inkubation allein mit Colchizin führte zu einem verminderten CD62L-Shedding bei den FMF-Patienten (gMFI 55,6% vs gMFI 38,9% unstimuliert), in den anderen Gruppen trat dieser Effekt nicht ein: Bei den heterozygoten Mutationsträgern sank die CD62L-Expression nach Inhibition mit Colchizin auf gMFI 46,5%, bei den gesunden Kontrollen auf gMFI 64,1% und bei den inflammatorischen Erkrankungen auf gMFI 63%. Die Abbildungen 3-13 und 3-14 zeigen den prozentualen Abfall von CD62L in den einzelnen Gruppen nativ, sowie nach Zugabe der Stimulanzen bzw. nach Inhibition mit Colchizin.

In Tabelle 3-7 sind alle Signifikanzen zwischen den Gruppen sowie innerhalb der Gruppen zwischen den verschiedenen Stimulationen dargestellt, gerechnet wurde der Aussagekraft halber hier mit der erweiterten FMF-Gesamtkohorte mit Vorarbeiten.

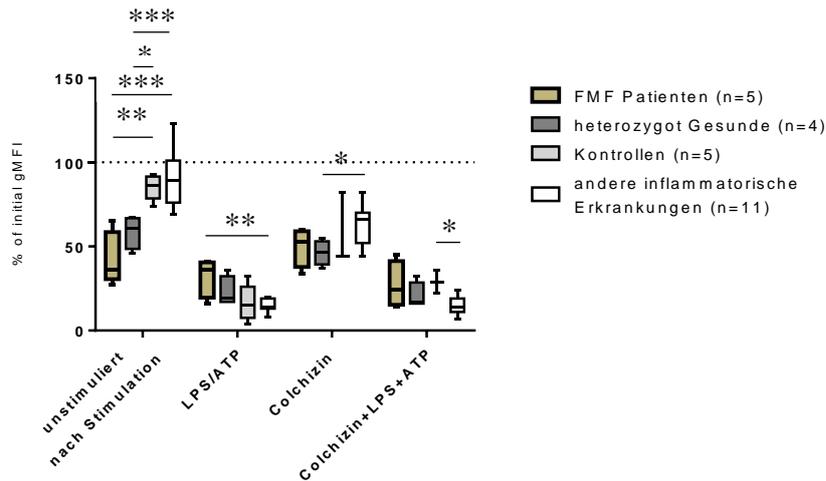


Abb. 3-13: CD62L-Expression nach Zellstimulation. Signifikanzen dargestellt mit * bis ****. $p < 0,05 \triangleq *$, $p < 0,01 \triangleq **$, $p < 0,001 \triangleq ***$, $p < 0,0001 \triangleq ****$.

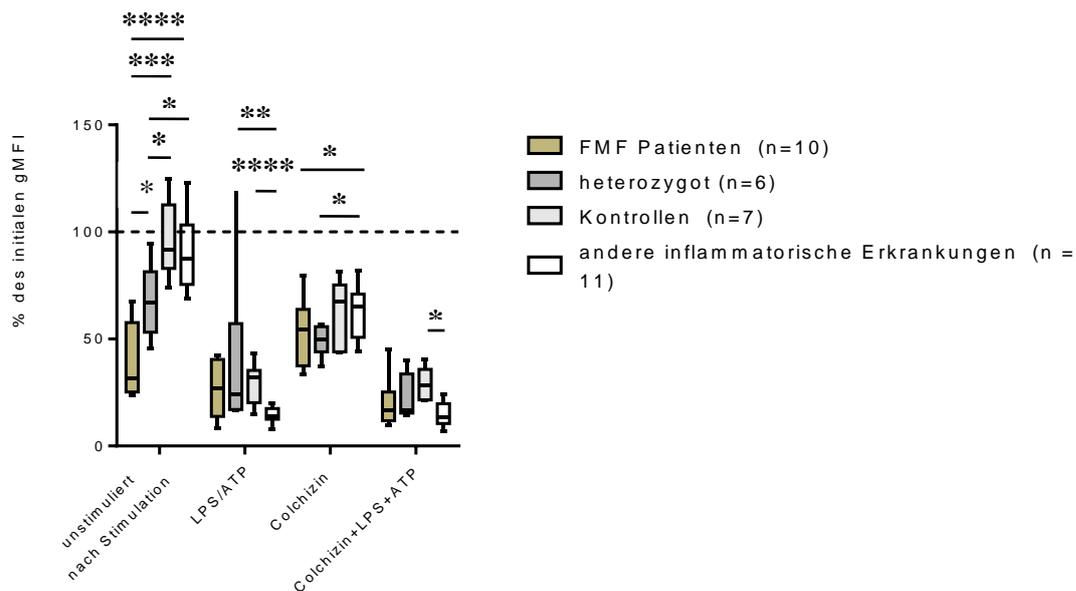


Abb. 3-14: CD62L-Expression nach Zellstimulation mit FMF-Patienten aus Vorarbeiten. Signifikanzen dargestellt mit * bis ****. $p < 0,05 \triangleq *$, $p < 0,01 \triangleq **$, $p < 0,001 \triangleq ***$, $p < 0,0001 \triangleq ****$.

versus		% „unstimuliert vor Stimulation“, Median (Bereich)	p-Wert	Signifikanz	
FMF-Patienten					
vor Stimulation	unst. nach Stim.	100	31 (24-67)	0,002	**
	LPS + ATP		27 (8-42)	0,002	**
	Colchizin		55 (33-79)	0,002	**
	Col + LPS + ATP		17 (10-45)	0,002	**
unst. nach Stim.	Col + LPS + ATP	31 (24-67)	17 (10-45)	0,002	**

Colchizin	LPS + ATP	55 (33-79)	27 (8-42)	0,0039	**
	Col + LPS + ATP		17 (10-45)	0,002	**
heterozygot gesund					
vor Stimulation	unst. nach Stim.	100	67 (46-95)	0,0312	*
	Colchizin		50 (37-57)	0,0312	*
	Col + LPS + ATP		17 (14-40)	0,0312	*
unst. nach Stim.	Colchizin	67 (46-95)	50 (37-57)	0,0312	*
	Col + LPS + ATP		17 (14-40)	0,0312	*
Colchizin + LPS + ATP	LPS + ATP	17 (14-40)	24 (17-122)	0,0312	*
	Colchizin		50 (37-57)	0,0312	*
gesunde Kontrollen					
vor Stimulation	LPS + ATP	100	32 (15-43)	0,0156	*
	Colchizin		67 (44-82)	0,0156	*
	Col + LPS + ATP		29 (21-40)	0,0156	*
unst. nach Stim.	LPS + ATP	92 (74-125)	32 (15-43)	0,0156	*
	Colchizin		67 (44-82)	0,0156	*
	Col + LPS + ATP		29 (21-40)	0,0156	*
Colchizin	LPS + ATP	67 (44-82)	32 (15-43)	0,0156	*
	Col + LPS + ATP		29 (21-40)	0,0156	*
andere inflammatorische Erkrankungen					
vor Stimulation	LPS+ATP	100	14 (8-20)	0,002	**
	Colchizin		65 (44-74)	0,002	**
	Col + LPS + ATP		13,5 (7-24)	0,002	**
unst. nach Stim.	LPS+ATP	88 (69-123)	14 (8-20)	0,002	**
	Colchizin		65 (44-74)	0,002	**
	Col + LPS + ATP		14 (7-24)	0,002	**
LPS+ATP	Colchizin	14 (8-20)	65 (44-74)	0,002	**
Colchizin	Col + LPS + ATP	65 (44-74)	14 (7-24)	0,002	**
unstimuliert nach Stimulation					
FMF-Patienten	heterozygot gesund	31 (24-67)	67 (46-95)	0,0110	*
	gesunde Kontrollen		92 (74-125)	0,0001	***
	andere inflammatorische Erkrankungen		88 (69-123)	<0,0001	****
heterozygot gesund	gesunde Kontrollen	67 (46-95)	92 (74-125)	0,0221	*
	andere inflammatorische Erkrankungen		88 (69-123)	0,0225	*
LPS + ATP					
heterozygot gesund	andere inflammatorische Erkrankungen	24 (17-122)	14 (8-20)	0,0061	**
gesunde Kontrollen	andere inflammatorische Erkrankungen	32 (15-43)	14 (8-20)	0,0010	***
Colchizin					
FMF-Patienten	andere inflammatorische Erkrankungen	55 (33-79)	65 (44-74)	0,0488	*
heterozygot gesund	andere inflammatorische Erkrankungen	50 (37-57)	65 (44-74)	0,0313	*
Colchizin + LPS + ATP					
gesunde Kontrollen	andere inflammatorische Erkrankungen	29 (21-40)	14 (7-24)	0,0020	**

Tabelle 3-7: CD62L-Expression nach Zellstimulation. Median und Bereich in %. Signifikanz Level mittels Vergleich zwischen den einzelnen Gruppen angegeben mit * bis ****. $p < 0,05 \triangleq *$, $p < 0,01 \triangleq **$, $p < 0,001 \triangleq ***$, $p < 0,0001 \triangleq ****$ (Vergleiche zwischen Gruppen ohne statistische Signifikanz sind ausgenommen).

3.5.4 CD11b-Expression nach Zellstimulation

Die Stimulation mit LPS+ATP führte gleichermaßen zu einer gesteigerten Expression von CD11b in allen untersuchten Gruppen, wobei zwischen den Gruppen kein signifikanter Unterschied deutlich wurde: In der Gruppe der FMF-Patienten (n=5) zeigte sich ein gMFI von 196,6% des initialen Werts (Range 130,5-267,3%), in der Gruppe der heterozygoten Mutationsträger (n=6) ein gMFI von 310,3%, (Range 245,5-444,5%), in der der gesunden Kontrollen (n=7) ein gMFI von 192,3%, (Range 119,3-257,8%) und in der Gruppe der anderen inflammatorischen Erkrankungen (n=13) lag der gMFI bei 324,7% (Range 39,9-512,9%) des ursprünglichen Werts. Auf die CD11b-Expression hatte Colchizin keinen bemerkenswerten Einfluss, die Co-Inkubation mit Colchizin änderte die CD11b-Expression nicht; nach Co-Inkubation wurde ein gMFI ähnlich zu unstimuliert nach fünf Stunden Kurzzeitkultur gemessen: bei den FMF-Patienten 82,6% (Range 62,7-93,4%), bei den heterozygoten Mutationsträgern 310,3%, (Range 245,5-444,5%), bei den gesunden Kontrollen 76,8%, (Range 39,2-99,8%), bei den anderen inflammatorischen Erkrankungen 119,2%, (Range 73,6-164,2%). In den Abbildungen 3-15 und 3-16 ist die CD11b-Expression im Vergleich zum initialen gMFI prozentual für die einzelnen Gruppen dargestellt. Tabelle 3-8 zeigt die Signifikanzen innerhalb der einzelnen Gruppen sowie im Vergleich zwischen den verschiedenen Gruppen.

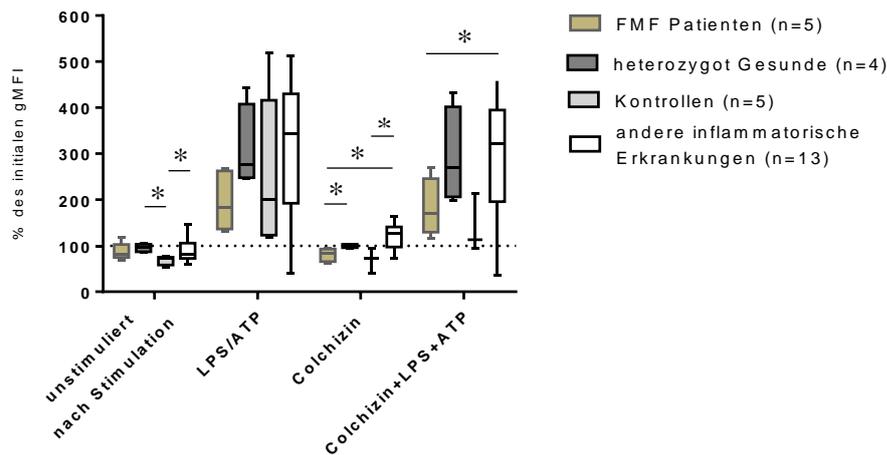


Abb. 3-15: CD11b-Expression nach Zellstimulation. Signifikanzen dargestellt mit * bis ****. $p < 0,05 \triangleq *$, $p < 0,01 \triangleq **$, $p < 0,001 \triangleq ***$, $p < 0,0001 \triangleq ****$.

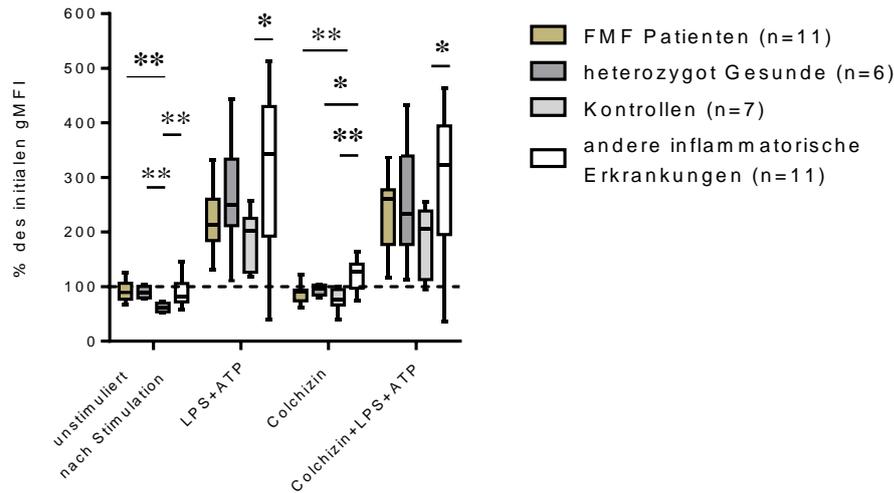


Abb. 3-16: CD11b-Expression nach Zellstimulation mit FMF-Patienten aus der erweiterten Gesamtkohorte spontan und nach Stimulation. Signifikanzen dargestellt mit * bis ****. $p < 0,05 \triangleq *$, $p < 0,01 \triangleq **$, $p < 0,001 \triangleq ***$, $p < 0,0001 \triangleq ****$.

versus		% „unstimuliert vor Stimulation“, Median (Bereich)	p-Wert	Signifikanz	
FMFPatienten					
vor Stimulation	LPS + ATP	100	212,8 (130,4-332,2)	0,002	**
	Colchizin		90,9 (62,6-122,2)	0,0371	*
	Col + LPS + ATP		260,9 (116,7-338,2)	0,002	**
unst. nach Stim.	LPS + ATP	89,2 (67,8-125,5)	212,8 (130,4-332,2)	0,002	**
	Col + LPS + ATP		260,9 (116,7-338,2)	0,002	**
LPS + ATP	Colchizin	212,8 (130,4-332,2)	90,9 (62,6-122,2)	0,002	**
Colchizin	Col + LPS + ATP	90,9 (62,6-122,2)	260,9 (116,7-338,2)	0,002	**
heterozygot gesund					
vor Stimulation	LPS+ATP	100	249,9 (111-444,5)	0,0313	*
	Col + LPS + ATP		233,4 (112,4-432,8)	0,0313	*
unst. nach Stim.	LPS+ATP	89,2 (78,1-104,3)	249,9 (111-444,5)	0,0313	*
	Col + LPS + ATP		233,4 (112,4-432,8)	0,0313	*
LPS + ATP	Colchizin	249,9 (111-444,5)	96,5 (79,2-103,6)	0,0313	*
Colchizin	Col + LPS + ATP	249,9 (111-444,5)	233,4 (112,4-432,8)	0,0313	*
gesunde Kontrollen					
vor Stimulation	unstimuliert	100	62 (52,4-72,0)	0,0156	*
	LPS + ATP		201,6 (119,3-257,8)	0,0156	*
	Colchizin		76,3 (39,2-99,8)	0,0156	*
	Col + LPS + ATP		205,9 (94,1-256,1)	0,0313	*
unst. nach Stim.	LPS + ATP	62 (52,4-72,0)	201,6 (119,3-257,8)	0,0156	*
	Col + LPS + ATP		205,9 (94,1-256,1)	0,0156	*
LPS + ATP	Colchizin	201,6 (119,3-257,8)	76,3 (39,2-99,8)	0,0156	*
Colchizin	Colchizin+LPS+ATP	76,3 (39,2-99,8)	205,9 (94,1-256,1)	0,0156	*
andere inflammatorische Erkrankungen					
vor Stimulation	LPS+ATP	100	343,5 (39,9-512,9)	0,0007	***
	Colchizin		127,2 (73,6-164,2)	0,0266	*
	Col + LPS + ATP		322,1 (36,6-464,1)	0,0005	***
unst. nach Stim.	LPS+ATP	82,1 (58,7-146,1)	343,5 (39,9-512,9)	0,0005	***
	Colchizin		127,2 (73,6-164,2)	0,0002	***
	Col + LPS + ATP		322,1 (36,6-464,1)	0,0005	***
LPS + ATP	colchicine	343,5 (39,9-512,9)	127,2 (73,6-164,2)	0,0007	***
Colchizin	Col + LPS + ATP	127,2 (73,6-164,2)	322,1 (36,6-464,1)	0,0007	***
unstimuliert nach Stimulation					

FMF-Patienten	gesunde Kontrollen	89 (68-126)	62 (52-72)	0,0012	**
	heterozygot	89 (78-104)	62 (52-72)	0,0012	**
gesunde Kontrollen	andere inflammatorische Erkrankungen	62 (52-72)	82 (59-146)	0,0017	**
LPS+ATP					
gesunde Kontrollen	andere inflammatorische Erkrankungen	201 (119-257)	344 (39-512)	0,0456	*
Colchizin					
FMF-Patienten	andere inflammatorische Erkrankungen	91 (63-122)	127 (74-164)	0,0032	**
heterozygot	andere inflammatorische Erkrankungen	97 (79-103)	127 (74-164)	0,0462	*
gesunde Kontrollen	andere inflammatorische Erkrankungen	76 (39-100)	127 (74-164)	0,0024	**
Colchizin+LPS+ATP					
gesunde Kontrollen	andere inflammatorische Erkrankungen	206 (94-256)	322 (36-464)	0,0297	*

Tabelle 3-8: CD11b-Expression nach Zellstimulation. Median und Bereich in %. Signifikanz Level mittels Vergleich zwischen den einzelnen Gruppen angegeben mit * bis ****. $p < 0,05 \triangleq *$, $p < 0,01 \triangleq **$, $p < 0,001 \triangleq ***$, $p < 0,0001 \triangleq ****$ (Vergleiche zwischen Gruppen ohne statistische Signifikanz sind ausgenommen).

3.6 Ex vivo-Sekretion von Inflammationsparametern

Im Serum stellten sich die Inflammationsparameter S100A12-Proteine und IL-18 in der Gruppe der FMF-Patienten erhöht dar im Vergleich zu den gesunden Kontrollen und den anderen inflammatorischen Erkrankungen, IL-18 war zudem unter den heterozygoten Mutationsträgern im Vergleich zu den gesunden Kontrollen und den anderen inflammatorischen Erkrankungen signifikant erhöht. Es sollten nun diese Inflammationsparameter hinsichtlich ihrer Sensivität *ex vivo* in den Neutrophilen untersucht werden. Analysiert wurden die Inflammationsparameter in den Zellkulturüberständen mittels ELISA.

3.6.1 Zeitlicher Verlauf der IL-18-Sekretion

Für die FMF-Patienten konnte eine spontane, rasche Sekretion von IL-18 innerhalb der ersten Stunde gemessen werden, die gegenüber den anderen Gruppen über den gemessenen Zeitraum von fünf Stunden kontinuierlich erhöht war. Die IL-18 Sekretion gemessen nach der ersten Stunde lag bei den FMF-Patienten (n=4, Mittelwert 225,3 pg/ml, Median 86 pg/ml, Range 0-730 pg/ml), bzw. (n=9, Mittelwert 293 pg/ml, Median 202 pg/ml, Range 0-730) signifikant höher vor als bei den gesunden Kontrollen (n=7, Mittelwert 0,3 pg/ml, Median 0 pg/ml, Range 0-2 pg/ml, $p=0,0333$, respektive $p=0,0015$) und als bei den anderen inflammatorischen Erkrankungen (n=22, Mittelwert 0,3 pg/ml, Median 0 pg/ml, Range 0-5 pg/ml, $p=0,0017$, respektive $p<0,0001$). Vergleicht man die Gruppe der heterozygoten Mutationsträger (n=4, Mittelwert 20 pg/ml, Median 19 pg/ml, Range 0-42 pg/ml), bzw. (n=6, Mittelwert 35,5 pg, Range 0-133 pg/ml) mit den Kontrollgruppen, so ist der IL-18 Wert nach der ersten Stunde signifikant erhöht gegenüber den gesunden Kontrollen ($p=0,0333$) und gegenüber den anderen inflammatorischen Erkrankungen ($p=0,0017$). Die Abbildungen 3-17 und 3-18 zeigen den spontanen zeitlichen Verlauf der IL-18 Sekretion in den einzelnen Gruppen. Tabelle 3-9 zeigt die Signifikanzen innerhalb der einzelnen Gruppen sowie im Vergleich zwischen den Gruppen. Um die Signifikanzen besser darzustellen, wurden in der tabellarischen Übersicht die Probanden aus der erweiterten Gesamtkohorte miteinbezogen.

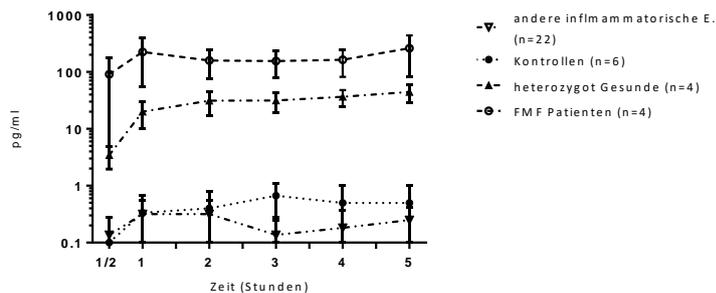


Abb. 3-17: Zeitlicher Verlauf der spontanen IL-18-Sekretion

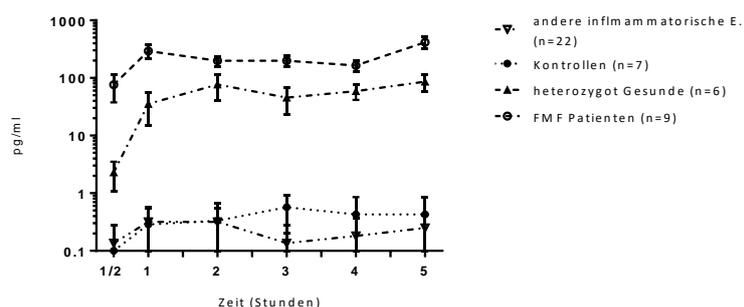


Abb. 3-18: Zeitlicher Verlauf der spontanen IL-18-Sekretion unter Einschluss von Patienten aus der erweiterten Gesamtkohorte

versus		Median (Bereich)		p-Wert	Signifi- kanz
1/2 Stunde					
FMF-Patienten	Kontrollen	24	0	0,0086	**
	andere inflammatorische Erkrankungen	(0-359)	0	<0,0001	****
heterozygot gesund	andere inflammatorische Erkrankungen	1 (0-6)	0	0,0115	*
1 Stunde					
FMF-Patienten	heterozygot gesund	202 (0-730)	19 (0-133)	0,0172	*
	Kontrollen		0 (0-2)	0,0015	**
	andere inflammatorische Erkrankungen		0 (0-5)	<0,0001	****
heterozygot gesund	Kontrollen	19 (0-133)	0 (0-2)	0,0373	*
	andere inflammatorische Erkrankungen		0 (0-5)	0,0010	***
2 Stunden					
FMF-Patienten	heterozygot gesund	194 (0-393)	48 (9-242)	0,0496	*
	Kontrollen		0 (0-2)	0,0028	**
	andere inflammatorische Erkrankungen		0 (0-4)	<0,0001	****
heterozygot gesund	Kontrollen	48 (9-242)	0 (0-2)	0,0022	**
	andere inflammatorische Erkrankungen		0 (0-4)	<0,0001	****
3 Stunden					
FMF-Patienten	heterozygot gesund	163 (0-369)	28 (0-148)	0,0264	*
	Kontrollen		0 (0-2)	0,0021	**
	andere inflammatorische Erkrankungen		0 (0-3)	<0,0001	****
	Kontrollen	28	0 (0-2)	0,0140	*

heterozygot gesund	andere inflammatorische Erkrankungen	(0-148)	0 (0-3)	<0,0001	****
4 Stunden					
FMF-Patienten	heterozygot gesund	137 (0-390)	53 (9-130)	0,0256	*
	gesunde Kontrollen		0 (0-3)	0,0015	**
	andere inflammatorische Erkrankungen		0 (0-4)	<0,0001	****
heterozygot gesund	gesunde Kontrollen	53 (9-130)	0 (0-3)	0,0012	**
	andere inflammatorische Erkrankungen		0 (0-4)	<0,0001	****
5 Stunden					
FMF-Patienten	heterozygot gesund	358 (59-785)	72 (15- 180)	0,0192	*
	Kontrollen		0 (0-3)	0,0002	***
	andere inflammatorische Erkrankungen		0 (0-3)	<0,0001	****
heterozygot gesund	Kontrollen	72 (15-180)	0 (0-3)	0,0012	**
	andere inflammatorische Erkrankungen		0 (0-3)	<0,0001	****

Tabelle 3-9: IL-18 Sekretion im zeitlichen Verlauf. Median und Bereich in pg/ml. Der Signifikanz Level ist dargestellt als Vergleich zwischen den verschiedenen Gruppen und evaluiert mit * bis ****. $p < 0,05 \triangleq *$, $p < 0,01 \triangleq **$, $p < 0,001 \triangleq ***$, $p < 0,0001 \triangleq ****$ (Vergleiche ohne statistische Signifikanz sind ausgeschlossen).

3.6.2 Zeitlicher Verlauf der Caspase-1-Sekretion

Für Caspase-1 zeigte sich eine rasche Sekretion in den ersten beiden Stunden, die unter den FMF-Patienten auf kontinuierlich erhöhtem Niveau im Vergleich zu den Kontrollgruppen lag. Berechnet man die Statistik mit einer erweiterten FMF-Gesamtkohorte, indem man die FMF-Patienten meiner Vorgängerin miteinfließen lässt, war die Caspase-1 Sekretion bei den FMF-Patienten (n=9, Mittelwert 294 pg/ml, Median 232 pg/ml, Range 35-611 pg/ml) bzw. in der nicht erweiterten Gesamtkohorte (n=4, Mittelwert 176,5 pg/ml, Median 130 pg/ml, Range 35-411 pg/ml) signifikant höher als bei den gesunden Kontrollen (n=6, Mittelwert 44,6 pg/ml, Median 37 pg/ml, Range 13-84 pg/ml, $p=0,0076 **$) und bei den anderen inflammatorischen Erkrankungen (n=22, Mittelwert 56 pg/ml, Median 47 pg/ml, Range 7-159 pg/ml, $p=0,0008 ***$). Zwischen den gesunden Kontrollen und den anderen inflammatorischen Erkrankungen zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Caspase-1 Sekretion, auch war im Vergleich heterozygote Mutationsträger vs. Kontrollgruppen zu verschiedenen Zeitpunkten kein signifikanter Unterschied festzustellen.

Tabelle 3-10 zeigt die Signifikanzen zwischen FMF-Patienten (erweiterte FMF-Gesamtkohorte) vs. Kontrollgruppen zu den unterschiedlichen Zeitpunkten der Inkubation. In den Abbildungen 3-19 und 3-20 ist die spontane Caspase-1-Sekretion durch Neutrophile in den einzelnen Gruppen dargestellt.

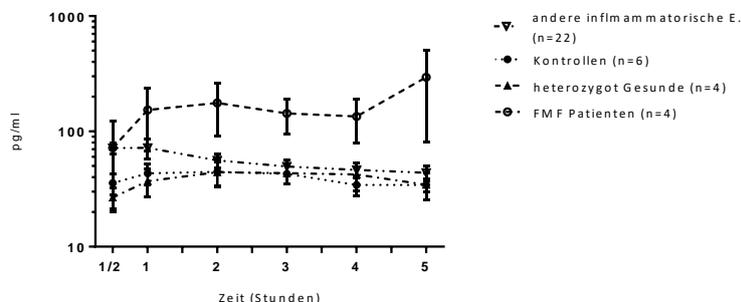


Abb. 3-19: Zeitlicher Verlauf der spontanen Caspase-1-Sekretion

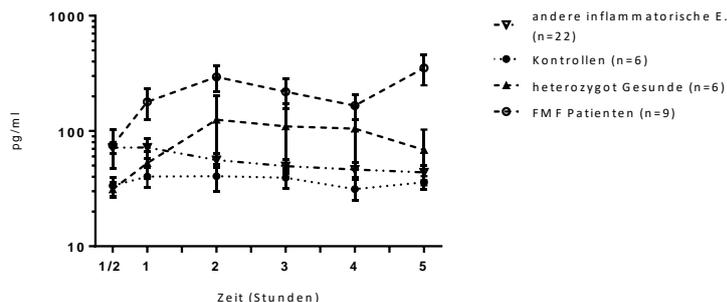


Abb. 3-20: Zeitlicher Verlauf der spontanen Caspase-1-Sekretion mit FMF-Patienten aus der erweiterten Gesamtkohorte

versus		Median (Bereich)		p-Wert	Signifi- kanz
1/2 Stunde					
heterozygot gesund	andere inflammatorische Erkrankungen	33 (15-44)	68 (8-145)	0,0095	**
andere inflammatorische Erkrankungen	Kontrollen	68 (8-145)	34 (13-59)	0,0230	*
1 Stunde					
FMF-Patienten	Kontrollen	165 (35-506)	34 (14-72)	0,0140	*
2 Stunden					
FMF-Patienten	Kontrollen	232 (35-611)	37 (13-84)	0,0076	**
	andere inflammatorische Erkrankungen		47 (7-159)	0,0008	***
3 Stunden					
FMF-Patienten	Kontrollen	143 (28-558)	45 (11-71)	0,0052	**
	andere inflammatorische Erkrankungen		46 (6-112)	0,0002	****
4 Stunden					
FMF-Patienten	Kontrollen	132 (29-377)	40 (10-50)	0,0021	**
	andere inflammatorische Erkrankungen		41 (6-132)	0,0010	***
5 Stunden					
FMF-Patienten	heterozygot gesund	275 (37-930)	38 (15-158)	0,0256	*
	Kontrollen		34 (23-57)	0,0010	***
	andere inflammatorische Erkrankungen		35 (7-112)	<0,0001	****

Tabelle 3-10: Caspase-1-Sekretion im zeitlichen Verlauf. Median und Bereich in pg/ml. Der Signifikanz Level ist dargestellt als Vergleich zwischen den verschiedenen Gruppen und evaluiert mit * bis ****. $p < 0,05 \triangleq *$, $p < 0,01 \triangleq **$, $p < 0,001 \triangleq ***$, $p < 0,0001 \triangleq ****$ (Vergleiche ohne statistische Signifikanz sind ausgeschlossen).

3.6.3 Zeitlicher Verlauf der S100A12-Sekretion

Ähnlich wie die IL-18-Sekretion findet bei FMF-Patienten auch eine rasche S100A12-Proteinsekretion in der ersten Stunde statt, die in dem gemessenen Zeitraum von fünf Stunden im Vergleich zu den anderen Gruppen kontinuierlich erhöht ist. Berechnet man die Statistik wieder mit einer erweiterten FMF-Gesamtkohorte der AG Kallinich, zeigen sich in Bezug auf die S100A12-Sekretion in der ersten Stunde folgende Signifikanzen: Die S100A12-Sekretion ist bei den FMF-Patienten (n=9, Mittelwert 932695,9 pg/ml, Median 670613 pg/ml, Range 40674-2303527 pg/ml), bzw. den Werten der nicht erweiterten Gesamtkohorte (n=4, Mittelwert 577952,5 pg/ml, Median 204629 pg/ml, Range 40674-1861879 pg/ml) signifikant höher als bei den gesunden Kontrollen (n=5, Mittelwert 140121,2 pg/ml, Median 88201 pg/ml, Range 26590-310863 pg/ml), $p=0,0420$, bzw. (n=4, Mittelwert 121801 pg/ml, Median 74876 pg/ml, Range 26590-310863 pg/ml). Eine statistisch signifikant erhöhte S100A12-Sekretion ergibt sich bei den FMF-Patienten auch im Vergleich zu der Gruppe der anderen inflammatorischen Erkrankungen (n=6, Mittelwert 133645,3 pg/ml, Median 110831 pg/ml, Range 44614-290728 pg/ml), $p=0,0360$).

Tabelle 3-11 zeigt die Signifikanzen zwischen FMF-Patienten (erweiterte FMF-Gesamtkohorte) vs. Kontrollgruppen zu den unterschiedlichen Zeitpunkten der Inkubation, die Darstellung in der Tabelle

erfolgte in der Einheit pg/ml. Die Abbildungen 3-21 und 3-22 zeigen die spontane S100A12-Sekretion in den einzelnen Gruppen.

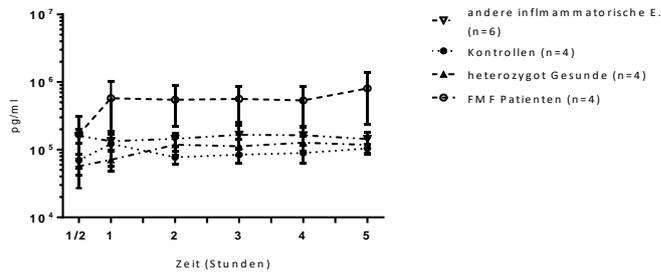


Abb. 3-21: Zeitlicher Verlauf der spontanen S100A12 -Sekretion

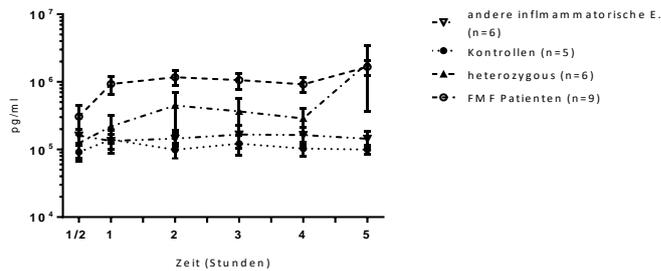


Abb. 3-22: Zeitlicher Verlauf der spontanen S100A12-Sekretion mit FMF-Patienten aus der erweiterten Gesamtkohorte

versus		Median (Bereich)	p-Wert	Signifikanz
1 Stunde				
FMF-Patienten	Kontrollen	670613 (40674-2303527)	88201 (26590-310863)	0,0420 *
	andere inflammatorische Erkrankungen		110831 (44614-290728)	0,0360 *
2 Stunden				
FMF-Patienten	Kontrollen	1406427 (60053-2520810)	102200 (34925-183972)	0,0190 *
	andere inflammatorische Erkrankungen		137176 (29945-272045)	0,0120 *
3 Stunden				
FMF-Patienten	Kontrollen	660085 (34801-2438278)	112204 (23808-271275)	0,0120 *
	andere inflammatorische Erkrankungen		126021 (23808-271275)	0,0176 *
4 Stunden				
FMF-Patienten	Kontrollen	850016 (55045-1880446)	127160 (23808-159736)	0,0120 *
	andere inflammatorische Erkrankungen		140431 (26569-379094)	0,0120 *
5 Stunden				
FMF-Patienten	Kontrollen	1622127 (78783-4095719)	88666 (63657-134185)	0,0120 *
	andere inflammatorische Erkrankungen		123487 (32854-322202)	0,0120 *

Tabelle 3-11: S100A12-Sekretion im zeitlichen Verlauf. Median und Bereich in pg/ml. Der Signifikanz Level ist dargestellt als Vergleich zwischen den verschiedenen Gruppen und evaluiert mit * bis ****. $p < = 0,05 \triangleq *$, $p < = 0,01 \triangleq **$, $p < = 0,001 \triangleq ***$, $p < = 0,0001 \triangleq ****$ (Vergleiche ohne statistische Signifikanz sind ausgeschlossen).

3.6.4 IL-18-Sekretion nach Zellstimulation

Zusätzlich zur spontanen Sekretion der oben beschriebenen Inflammationsparameter sollte der Effekt der Stimulantien LPS+ATP und von Colchizin analysiert werden. Es zeigte sich, dass die IL-18-Sekretion von Neutrophilen bei FMF-Patienten und heterozygoten Mutationsträgern nicht weiter gesteigert werden konnte, die Sekretion war nach Stimulation von LPS+ATP weiterhin signifikant erhöht gegenüber den gesunden Kontrollen und den anderen inflammatorischen Erkrankungen: Erweiterte FMF-Gesamtkohorte (n=12, Mittelwert 299,8 pg/ml, Median 295 pg/ml, Range 18-559), bzw. FMF-Patienten der nicht erweiterten Gesamtkohorte (n=4, Mittelwert 188,8, Median 117 pg/ml, Range 18-504 pg/ml) vs. gesunde Kontrollen gesamt (n=9, Mittelwert 4,1pg/ml, Median 0 pg/ml, Range 0-13 pg/ml, p <0,0001), gesunde Kontrollen der nicht erweiterten Gesamtkohorte (n=7, Mittelwert 5,2 pg/ml, Median 4 pg/ml, Range 0-13 pg/ml) und andere inflammatorische Erkrankungen (n=6, Mittelwert 1,9 pg/ml, Median 0 pg/ml, Range 0-9,3 pg/ml, p<0,0001). Die Gabe von Colchizin in der Neutrophilenkultur verminderte die IL-18-Sekretion bei den FMF-Patienten signifikant im Vergleich zur Kultur ohne Stimulation (erweiterte Gesamtkohorte nach Stimulation mit Colchizin: n=12, Mittelwert 23,8 pg, Median 0 pg/ml, Range 0-168 pg/ml, p=0,0005, bzw. nicht erweiterte Gesamtkohorte: n=4, Mittelwert 55,5 pg/ml, Median 27 pg/ml, Range 0-168 pg/ml, p=0,1250). Bei den gesunden Kontrollen und den anderen inflammatorischen Erkrankungen trat dieser Effekt nicht signifikant auf.

In Tabelle 3-12 sind alle Signifikanzen zwischen den Gruppen sowie innerhalb der Gruppen zwischen den verschiedenen Stimulationen dargestellt, gerechnet wurde der Übersicht halber hier mit der erweiterten FMF-Gesamtkohorte aus Vorarbeiten. Die Abbildungen 3-23 und 3-24 zeigen die IL-18-Sekretion in den einzelnen Gruppen, die Signifikanzen sind in Abbildung 3-24 nur für die Vergleiche zwischen den einzelnen Gruppen eingezeichnet.

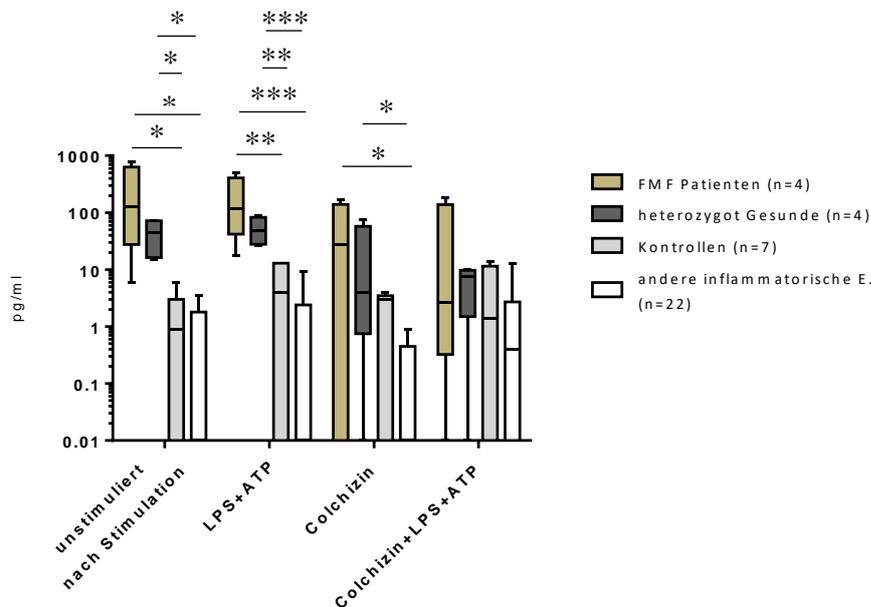


Abb. 3-23: IL-18-Sekretion nach Zellstimulation. Signifikanzen dargestellt mit * bis ****. p <= 0,05 \triangle *, p <= 0,01 \triangle **, p <= 0,001 \triangle ***, p <= 0,0001 \triangle ****.

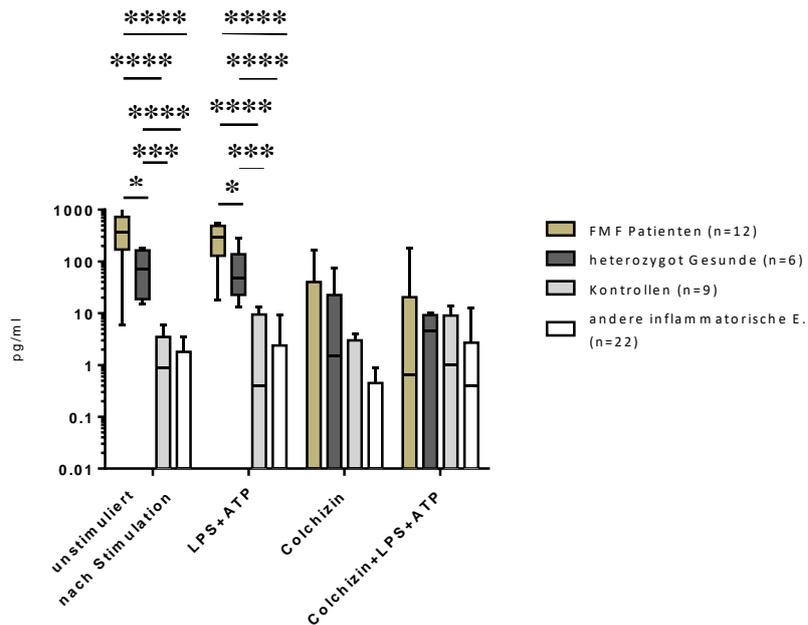


Abb. 3-24: IL-18-Sekretion nach Zellstimulation mit FMF-Patienten aus der erweiterten Gesamtkohorte. Signifikanzen dargestellt mit * bis ****. $p < 0,05 \triangleq *$, $p < 0,01 \triangleq **$, $p < 0,001 \triangleq ***$, $p < 0,0001 \triangleq ****$.

versus		Median (Bereich)	p-Wert	Signifikanz	
FMF-Patienten					
unstimuliert	Colchizin	367 (6-1256)	0 (0-168)	0,0005	***
	Col + LPS + ATP		1 (0-183)	0,0005	***
Colchizin	LPS + ATP	0 (0-168)	295 (18-559)	0,0005	***
LPS+ATP	Col + LPS + ATP	295 (18-559)	1 (0-183)	0,0005	***
heterozygot gesund					
unstimuliert	Col + LPS + ATP	72 (15-180)	5 (0-10)	0,0313	*
Colchizin + LPS + ATP	LPS + ATP	5 (0-10)	49 (13-284)	0,0313	*
andere inflammatorische Erkrankungen					
Colchizin	Col + LPS + ATP	0 (0-1)	0 (0-13)	0,0156	*
unstimuliert nach Stimulation					
FMF-Patienten	heterozygot gesund	367 (6-1256)	72 (15-180)	0,0105	*
	Kontrollen		1 (0-6)	<0,0001	****
	andere inflammatorische Erkrankungen		0 (0-4)	<0,0001	****
heterozygot gesund	Kontrollen	72 (15-180)	1 (0-6)	0,0004	***
	andere inflammatorische Erkrankungen		0 (0-4)	<0,0001	****
LPS + ATP					
FMF-Patienten	heterozygot gesund	295 (18-559)	49 (13-284)	0,0135	*
	Kontrollen		0 (0-13)	<0,0001	****
	andere inflammatorische Erkrankungen		0 (0-9)	<0,0001	****
heterozygot gesund	Kontrollen	49 (13-284)	0 (0-13)	0,0010	***
	andere inflammatorische Erkrankungen		0 (0-9)	<0,0001	****

Tabelle 3-12: IL-18-Sekretion nach Zellstimulation. Median und Bereich in pg/ml. Signifikanz Level mittels Vergleich zwischen den einzelnen Gruppen angegeben mit * bis ****. $p \leq 0,05 \triangleq *$, $p \leq 0,01 \triangleq **$, $p \leq 0,001 \triangleq ***$, $p \leq 0,0001 \triangleq ****$ (Vergleiche zwischen Gruppen ohne statistische Signifikanz sind ausgenommen).

3.6.5 Caspase-1-Sekretion nach Zellstimulation

Die Caspase-1-Sekretion von Neutrophilen ließ sich innerhalb der Gruppe der FMF-Patienten nicht weiter steigern, währenddessen die Gabe von LPS+ATP die Caspase-1-Sekretion bei den anderen inflammatorischen Erkrankungen erhöhte. Die Co-Inkubation mit Colchizin verringerte die Caspase-1-Sekretion bei den FMF-Patienten, im Gegensatz dazu hatte Colchizin bei den gesunden Kontrollen und den anderen inflammatorischen Erkrankungen keine vergleichbare Wirkung.

In Tabelle 3-13 sind alle Signifikanzen zwischen den Gruppen sowie innerhalb der Gruppen zwischen den verschiedenen Stimulationen dargestellt, gerechnet wurde der Übersicht halber hier mit der erweiterten FMF-Gesamtkohorte aus Vorarbeiten. Die Abbildungen 3-25 und 3-26 zeigen die Caspase-1-Sekretion in den einzelnen Gruppen, in der Abbildung 3-26 sind nur die Signifikanzen für den Vergleich der einzelnen Gruppen dargestellt.

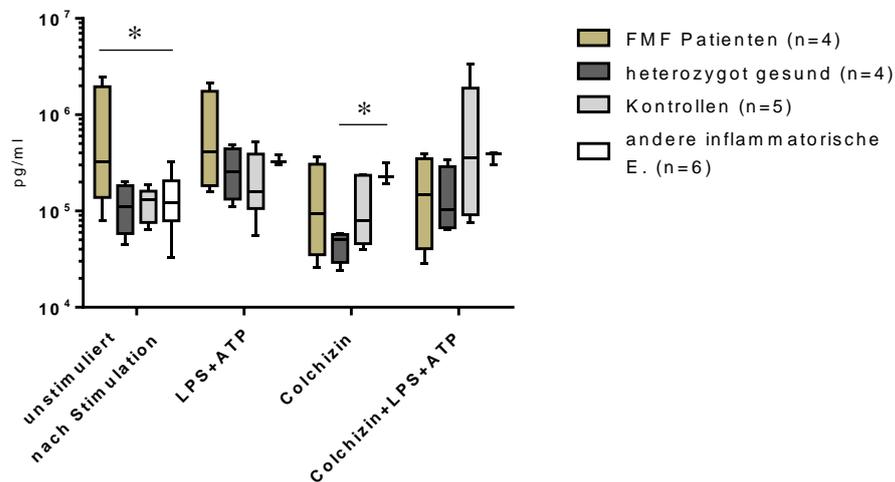


Abb. 3-25: Caspase-1-Sekretion nach Zellstimulation. Signifikanzen dargestellt mit * bis ****. $p \leq 0,05 \triangleq *$, $p \leq 0,01 \triangleq **$, $p \leq 0,001 \triangleq ***$, $p \leq 0,0001 \triangleq ****$.

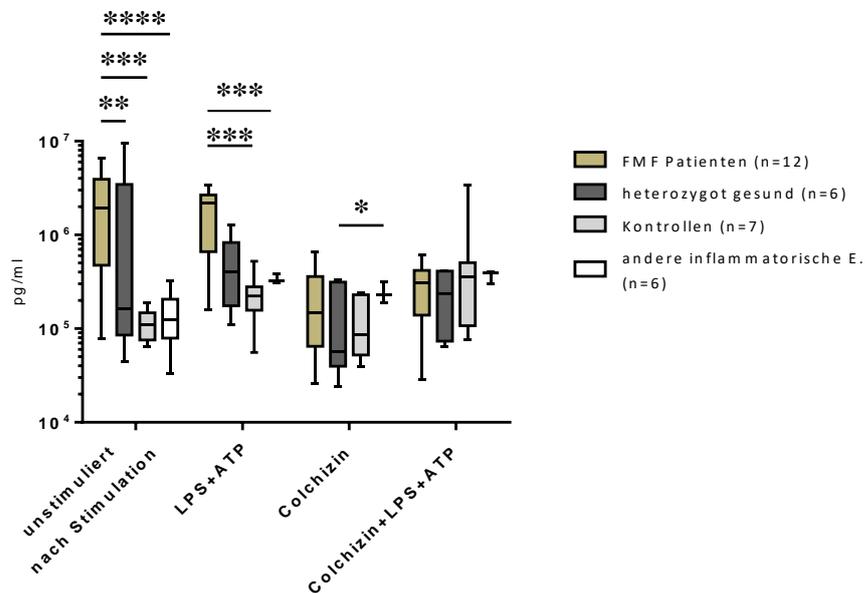


Abb. 3-26: Caspase-1-Sekretion nach Zellstimulation mit FMF-Patienten aus der erweiterten Gesamtkohorte. Signifikanzen dargestellt mit * bis ****. $p < 0,05 \triangleq *$, $p < 0,01 \triangleq **$, $p < 0,001 \triangleq ***$, $p < 0,0001 \triangleq ****$.

versus		median (range)		p-Wert	Signifikanz
FMF-Patienten					
unstimuliert	Colchizin	328 (37-1417)	28 (5-115)	0,0010	***
	Col + LPS + ATP		62 (15-145)	0,0034	**
Colchizin	LPS + ATP	28 (5-115)	259 (94-547)	0,0010	***
LPS+ATP	Col + LPS + ATP	259 (94-547)	62 (15-145)	0,0010	***
andere inflammatorische Erkrankungen					
unstimuliert	LPS + ATP	34,5 (8-112)	77 (23-218)	0,0002	***
	Col + LPS + ATP		75 (23-238)	0,0002	***
unstimuliert nach Stimulation					
FMF-Patienten	heterozygot gesund	328 (37-1417)	38 (20-204)	0,0094	**
	Kontrollen		41 (23-57)	0,0001	***
	andere inflammatorische Erkrankungen		34,5 (8-112)	<0,0001	****
LPS + ATP					
FMF-Patienten	Kontrollen	259 (94-547)	93 (28-121)	0,0001	***
	andere inflammatorische Erkrankungen		77 (23-218)	0,0002	***
Colchizin					
heterozygot gesund	andere inflammatorische Erkrankungen	14 (9-29)	34 (12-78)	0,0323	*

Tabelle 3-13: Caspase-1-Sekretion nach Zellstimulation. Median und range in pg/ml. Signifikanz Level mittels Vergleich zwischen den einzelnen Gruppen angegeben mit * bis ****. $p < 0,05 \triangleq *$, $p < 0,01 \triangleq **$, $p < 0,001 \triangleq ***$, $p < 0,0001 \triangleq ****$ (Vergleiche zwischen Gruppen ohne statistische Signifikanz sind ausgenommen).

3.6.6 S100A12-Sekretion nach Zellstimulation

Auch in Bezug auf die S100A12-Sekretion von Neutrophilen bewirkte die Stimulation mit LPS+ATP keine weitere Steigerung im Vergleich zur Spontansekretion bei den FMF-Patienten, in den anderen Gruppen hatte die LPS+ATP-Stimulation ebenfalls keinen signifikanten Effekt. Colchizin verringerte die

Sekretion sowohl bei den FMF-Patienten als auch bei den heterozygoten Mutationsträgern signifikant, diese Verminderung der Sekretion trat bei den gesunden Kontrollen und den anderen inflammatorischen Erkrankungen nicht signifikant auf.

In Tabelle 3-14 sind alle Signifikanzen zwischen den Gruppen sowie innerhalb der Gruppen zwischen den verschiedenen Stimulationen dargestellt, gerechnet wurde der Übersicht halber hier mit der erweiterten FMF-Gesamtkohorte mit Vorarbeiten. Die Abbildungen 3-27 und 3-28 zeigen die S100A12-Expression in den einzelnen Gruppen, in der Abbildung 3-28 sind die Signifikanzen im Vergleich der einzelnen Gruppen dargestellt.

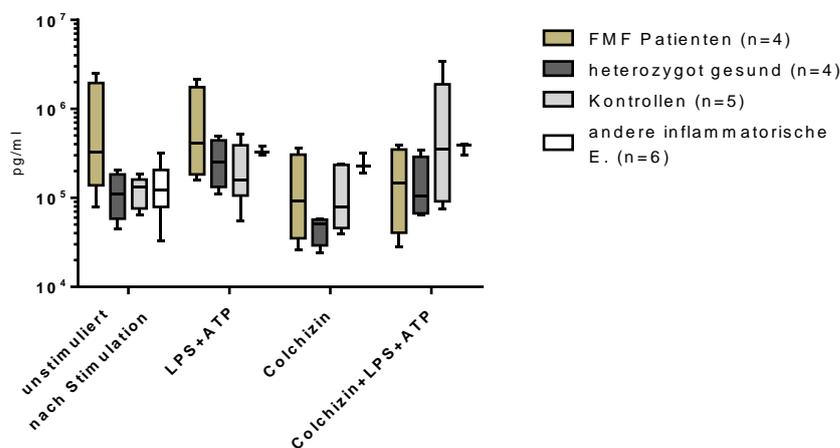


Abb. 3-27: S100A12-Sekretion nach Zellstimulation

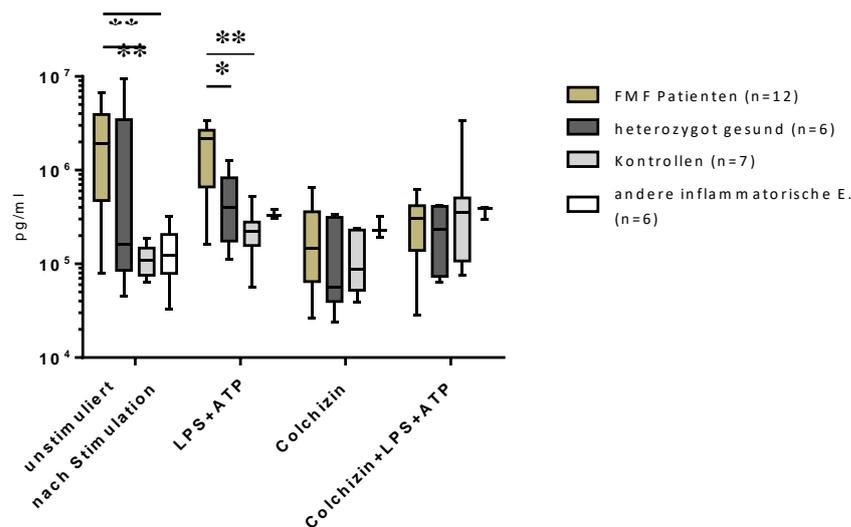


Abb. 3-28: S100A12-Sekretion nach Zellstimulation mit FMF-Patienten aus der erweiterten Gesamtkohorte. Signifikanzen dargestellt mit * bis ***. $p < 0,05 \triangleq *$, $p < 0,01 \triangleq **$, $p < 0,001 \triangleq ***$, $p < 0,0001 \triangleq ****$.

versus		Median (Bereich)		p-Wert	Signifikanz
FMF-Patienten					
unstimuliert	Colchizin	1926751 (78783- 6668749)	146802 (26239-657604)	0,0010	***
	Col + LPS + ATP		306761 (28361-619003)	0,0010	***
Colchizin	LPS + ATP	146802 (26239-657604)	2194763 (160048-3374551)	0,0005	***
	Col + LPS + ATP		306761 (28361-619003)	0,0342	*
LPS+ATP	Col + LPS + ATP	2194763 (160048-3374551)	306761 (28361-619003)	0,0010	***
heterozygot gesund					
unstimuliert	Colchizin	164020 (44878-9420807)	56846 (24152-336274)	0,0313	*
LPS+ATP	Colchizin	399854 (111437-1259018)	56846 (24152-336274)	0,0313	*
	Col + LPS + ATP		236376,5 (63657-418547)	0,0313	*
Colchizin	Col + LPS + ATP	56846 (24152-336274)	236376,5 (63657-418547)	0,0313	*
Kontrollen					
unstimuliert	Col + LPS + ATP	110342 (110342-187988)	354890 (75722-3389509)	0,0313	*
Colchizin	LPS+ATP	86633 (39454-240473)	223578 (55733-524506)	0,0156	*
	Col + LPS + ATP		354890 (75722-3389509)	0,0156	*
unstimuliert nach Stimulation					
FMF-Patienten	Kontrollen	1926751 (78783- 6668749)	110342 (110342-187988)	0,0020	**
	andere inflammatorische Erkrankungen		123487 (32854-322202)	0,0032	**
LPS + ATP					
FMF-Patienten	heterozygot gesund	2194763 (160048-3374551)	399854 (111437-1259018)	0,0245	*
	Kontrollen		223578 (55733-524506)	0,0012	**

Tabelle 3-14: Entwicklung von S100A12 Sekretion nach Stimulation oder Inhibition. Median und range in pg/ml. Signifikanz Level mittels Vergleich zwischen den einzelnen Gruppen angegeben mit * bis ****. $p < 0,05 \triangleq *$, $p < 0,01 \triangleq **$, $p < 0,001 \triangleq ***$, $p < 0,0001 \triangleq ****$ (Vergleiche zwischen Gruppen ohne statistische Signifikanz sind ausgenommen).

3.7 Analyse von weiteren Zytokinen, Chemokinen und granulären Proteinen im Multiplex Assay

Untersucht werden sollte die Spezifität der bislang analysierten Inflammationsparameter, und ob ein Zusammenhang zwischen den beschriebenen Inflammationsparametern und dem Sekretionsmuster anderer Moleküle besteht. Gemessen wurden Zytokine oder Zytokin-Rezeptor-Antagonisten (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-18, IL-1Ra, TNF α), neutrophile Granula-proteine (Proteinase 3, MPO) und Chemokine (MCP-1, MIP-1 α (CCL-3), MIP-1 β (CCL-4), MIP-3 α (CCL-20)) in den Zellkulturüberständen mittels Multiplex Bead Array Assays. IL18, S100A12-Proteine, Proteinase-3 und MPO sind die einzigen Proteine, die von Neutrophilen der FMF-Patienten spontan in hohen Mengen sezerniert wurden. Diese erhöhten Proteinkonzentrationen in den Überständen ließen sich durch Stimulation nicht weiter steigern. Interessanterweise korrelierte die spontane S100A12-Sekretion mit der Menge der gemessenen Proteinase 3 ($r_s = 0,85$, $p < 0,0001$) und MPO ($r_s = 0,48$, $p = 0,0008$) in den Kulturüberständen in der Gruppe der FMF-Patienten. Diese spontane Freisetzung von S100A12, IL-18, MPO und Proteinase 3 war auf Neutrophile beschränkt, die von FMF-Patienten stammen. Die Zugabe von Colchizin führte zu einer verminderten IL-18-, S100A12- und Proteinase-3-Sekretion in den

Kulturüberständen. Keiner der anderen untersuchten Parameter stellte sich in einer der Gruppen als signifikant erhöht oder erniedrigt dar, weder in der Gruppe der FMF-Patienten noch in der Gruppe der anderen inflammatorischen Erkrankungen. In der graphischen Darstellung zeigte sich IL-6 und Lactoferrin für die anderen inflammatorischen Erkrankungen bei Stimulation mit LPS+ATP etwas erhöht gegenüber den anderen Gruppen. In der Darstellung der einzelnen Krankheitsentitäten ergab sich jedoch keine signifikante Erhöhung von IL-6 oder Lactoferrin für eine bestimmte inflammatorische Erkrankung. Die Abbildung 3-29 stellt die Inflammationsparameter für die einzelnen Gruppen unstimuliert, nach Stimulation mit LPS+ATP und nach Co-Inkubation mit Colchizin+LPS+ATP dar. Die Abbildung 3-30 zeigt die Korrelationen von Proteinase 3 und MPO, S100A12 und Proteinase 3 und S100A12 und MPO im Überstand von unstimulierten Neutrophilen, die von FMF-Patienten stammen.

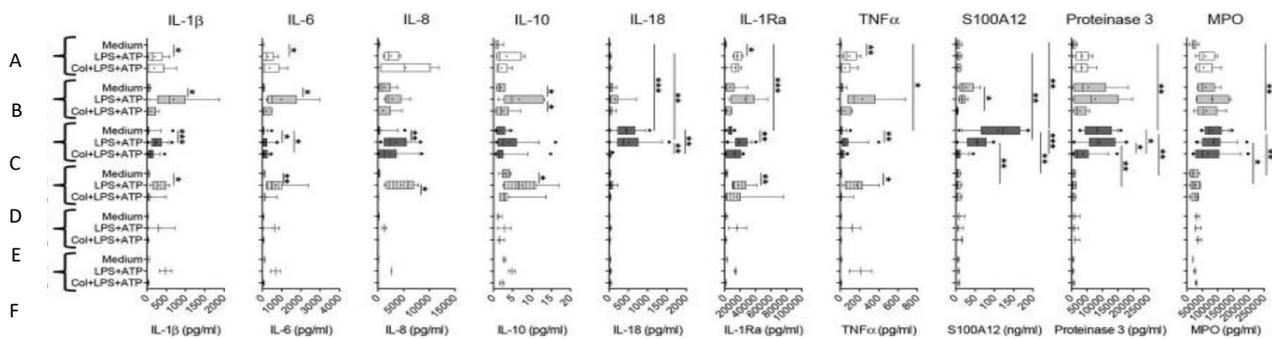


Abb. 3-29: Expression von weiteren Zytokinen, Chemokinen und granulären Proteinen im Multiplex Assay nach Zellstimulation A=gesunde Kontrollen (n=5-10), B= FMF (heterozygot) (n=5), C=FMF (homozygot) (n=14-16), D= Infektionen (n=7), E= rheumatische Erkrankungen (n=3), F= Immundefekte (n=2)

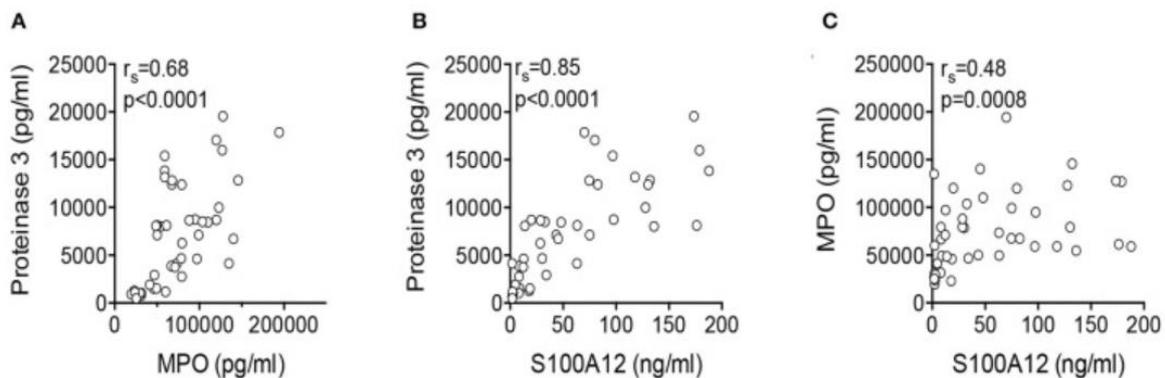


Abb. 3-30: Korrelation der sezernierten Proteinkonzentrationen. Korrelationen von Proteinase 3 und MPO (A), S100A12 und Proteinase 3 (B) und S100A12 und MPO (C) im Überstand von unstimulierten Neutrophilen, die von FMF-Patienten stammen, wurden mittels Spearman'sche Rangkorrelationskoeffizienten analysiert.

3.8 Spezifische IL-1 und NLRP3-Inhibition durch Anakinra und MCC950

Die Co-Inkubation mit dem humanen IL-1 Rezeptorantagonisten Anakinra und dem spezifischen NLRP3-Blocker sollte zeigen, inwiefern die Sekretion der Inflammationsparameter und das CD62L-

Shedding in Neutrophilen von FMF-Patienten IL-1- bzw. NLRP3- abhängig ist. Anakinra und das MCC950 Compound wurden für fünf Stunden in jeweils drei verschiedenen Titrationsstufen (1 µg/ml, 10 µg/ml und 100 µg/ml Anakinra oder 0,1 µM, 1 µM und 10 µM MCC950) co-kultiviert. Es zeigte sich weder eine Veränderung in der CD62L- und CD11b-Expression noch in der Sekretion der Inflammationsparameter IL-18, Caspase-1 und der S100A12-Proteine. Die Abbildungen 3-30 - 3-33 zeigen die CD6L-Expression, die IL-18- und Caspase-1-Sekretion nach Inhibition mit Anakinra und MCC950 in verschiedenen Titrationsstufen mit und ohne LPS+ATP.

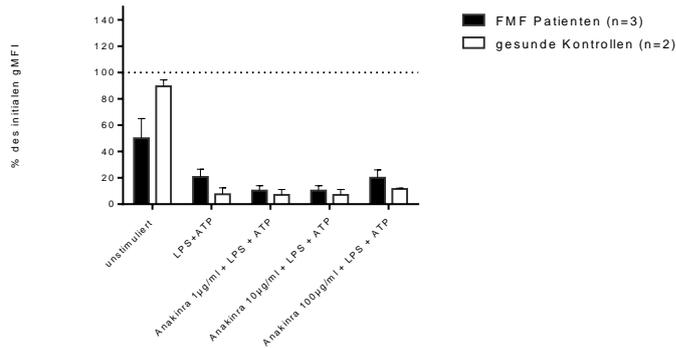


Abb. 3-31: CD62L- Expression spontan und nach Co-Inkubation mit Anakinra

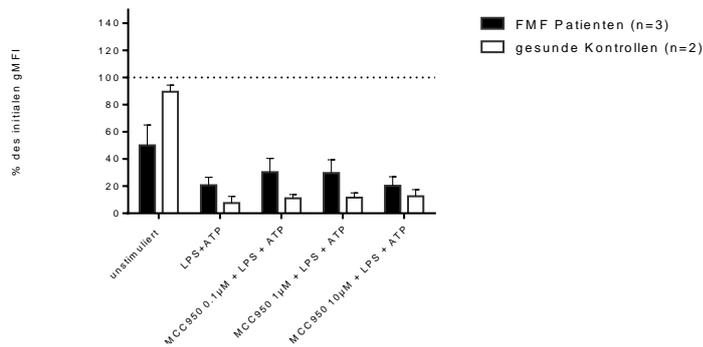


Abb. 3-32: CD62L- Expression spontan und nach Co-Inkubation mit LPS+ATP / MCC950

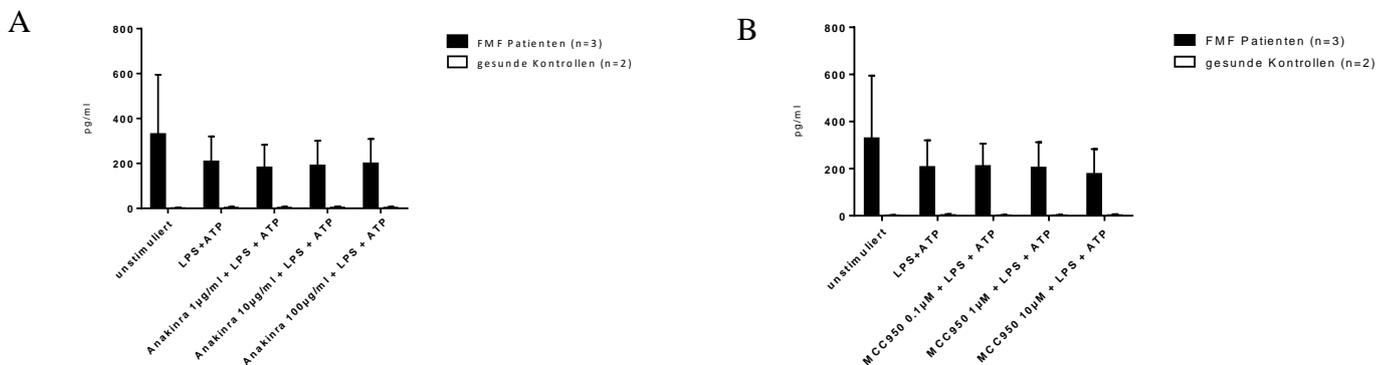
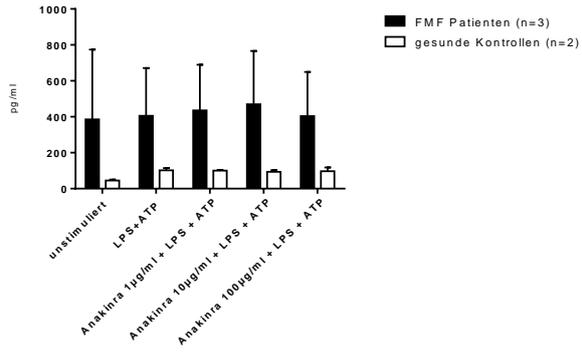


Abb. 3-33: IL-18 Sekretion spontan und nach Co-Inkubation mit LPS+ATP / Anakinra (A) und mit LPS+ATP / MCC950 (B)

A



B

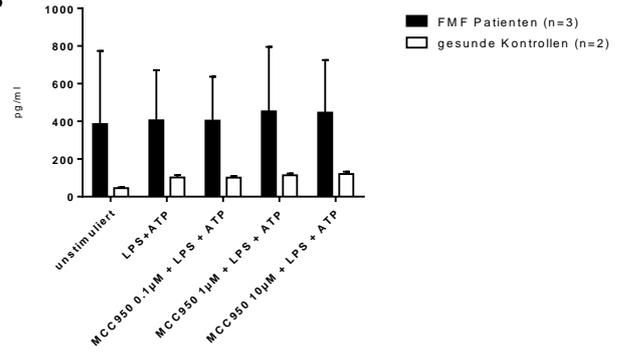


Abb. 3-34: Caspase-1-Sekretion spontan und nach Co-Inkubation mit LPS+ATP / Anakinra (A) und mit LPS+ATP / MCC950 (B)

4 Diskussion

4.1 Stellenwert von Inflammationsparametern und Neutrophilen-Aktivierung beim FMF in Abgrenzung zu anderen inflammatorischen Erkrankungen

Beim FMF handelt es sich um die häufigste monogene, autoinflammatorische Erkrankung, verursacht durch Mutationen im Mittelmeerfieber (*MEFV*)-Gen. Wenngleich die Erkrankung klinische Charakteristika (z.B. rezidivierende Fieberschübe, Gelenkbeteiligung, Peritonitiden) beinhaltet, kann die Abgrenzung von anderen inflammatorischen Erkrankungen phänotypisch eine Herausforderung sein. Zudem kann die Interpretation der genetischen Testung schwierig sein, da die klinische Relevanz nicht für alle Mutationen im *MEFV*-Gen klar ist.⁷⁻²²

Neutrophile Granulozyten scheinen eine Rolle für inflammatorische Prozesse auch beim FMF zu spielen, sind bislang aber wenig verstanden.^{31,41}

Untersucht wurden in dieser Arbeit Inflammationsparameter und die Rolle von Neutrophilen in inflammatorischen Prozessen beim FMF in Abgrenzung zu anderen inflammatorischen Erkrankungen. Das CRP, das in der unspezifischen Immunabwehr eine tragende Rolle hat und als Antwort auf einen inflammatorischen Stimulus beim Menschen rasch bis zum 1000 fachen des physiologischen Wertes oder höher ansteigen kann,¹⁰¹ zeigte sich bei den untersuchten FMF-Patienten im Vergleich zu Patienten mit anderen inflammatorischen Erkrankungen als nicht signifikant erhöht.

Weiterhin wurden die Zytokine in Sera und deren Sekretion durch aufgereinigte Neutrophile untersucht. IL-18, S100A12 und Caspase-1 waren bei den FMF-Patienten im Vergleich zu Patienten mit anderen inflammatorischen Erkrankungen signifikant erhöht.

Für Träger von zwei pathogenen *MEFV*-Mutationen wurde eine Erhöhung von spontan freigesetztem S100A12, Caspase-1, Proteinase 3 und Myeloperoxidase (MPO) in aufgereinigten Neutrophilen gezeigt. Die IL-18-Sekretion war bei Trägern von zwei pathogenen Mutationen am höchsten, stellte sich aber auch bei heterozygoten Mutationsträgern als erhöht dar im Sinne einer *ex vivo* Gen-Dosis-Wirkung. CD62L wurde signifikant stärker bei homozygoten FMF-Patienten als auch bei heterozygoten Mutationsträgern im Vergleich zu Patienten mit anderen inflammatorischen Erkrankungen abgedregdet. Dieser Effekt konnte durch eine Blockade von IL-1 oder des NLRP3-Inflammasoms nicht unterdrückt werden.

4.2 Rolle und Funktion von Caspase-1, IL-18 und S100A12 in Inflammationsprozessen von Neutrophilen

Untersucht werden sollte die Bedeutung von Caspase-1, IL-18 und von S100A12 in Serum und Neutrophilen für das FMF (Erkrankte und heterozygote Mutationsträger) als auch für die anderen inflammatorischen Erkrankungen. Es zeigte sich eine erhöhte Spontansekretion im Serum für IL-18 und die S100A12-Proteine in der Gruppe der FMF-Patienten im Vergleich zu allen anderen Gruppen. Im Serum stellte sich im Vergleich zu den gesunden Kontrollprobanden auch für die Gruppe der heterozygoten Mutationsträger und der anderen inflammatorischen Erkrankungen eine signifikant erhöhte IL-18 Sekretion dar, für die heterozygoten Mutationsträger zeigte sich diese Erhöhung auch für Caspase-1.

In der Einleitung dieser Arbeit wurde der Stellenwert der neutrophilen Granulozyten im Prozess der Inflammation beschrieben. Als erste zelluläre "Mitspieler" eines Inflammationsprozesses gelangen sie zum Ort der Entzündung. In ihrer physiologischen Funktion unterstützen sie die Abwehr von Pathogenen, im pathologischen Kontext können sie an der Förderung und dem Erhalt überschießender Inflammationsprozesse beteiligt sein. Caspase-1-Aktivierung und die folgende Sekretion von IL-18 und IL-1 β gelten als wichtige Proteine in inflammatorischen Prozessen. Auch der Stellenwert von S100A12-Proteinen im Entzündungsgeschehen ist mittlerweile in der Literatur etabliert. Folglich wurde die Sekretion von Caspase-1, IL-18 und S100A12-Proteinen in aufgereinigten Neutrophilen in den verschiedenen Gruppen untersucht.

S100A12, auch bekannt unter Calgranulin C, MRP6 oder EN-RAGE (extracellular newly identified receptor for Advanced glycation endproducts binding protein) bildet mit den S100A8- und S100A9-Proteinen die größte Gruppe der Calgranuline. Diese Calcium bindenden proinflammatorischen Proteine werden von Monozyten in frühen Differenzierungsstadien und von aktivierten Granulozyten freigesetzt.^{102,103} Als bislang jüngstes von den S100-Proteinen wurde S100A12 beim Menschen erstmals 1995 von Guignard et al. charakterisiert und hat seitdem das Interesse als Marker für inflammatorische Prozesse geweckt.¹⁰⁴ Es besteht aus 91 Aminosäuren mit einer Molekularmasse von 10.4 kd. S100-Proteine stehen mit Adhäsion und transendothelialer Migration von Leukozyten in Zusammenhang.¹⁰⁵ S100A12 bindet in dieser Funktion an RAGE, einem Multiligand Rezeptor der Immunoglobulin Superfamilie, der auf Endothelzellen und verschiedenen Zellen des Immunsystems exprimiert wird. Die Bindung von S100A12 stößt verschiedene intrazelluläre Signalwege an: Die Oberflächenexpression von vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) auf Endothelzellen nimmt zu, die Expression des intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) wird gesteigert. Zudem wird die Bindung von S100A12 an RAGE in Zusammenhang mit einer gesteigerten Expression von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF und IL-1 β gebracht. Es ist nicht vollkommen geklärt, ob S100A12 Proteine nur von neutrophilen Granulozyten oder auch von Monozyten freigesetzt werden.^{106,107}

Eine Erhöhung der S100A12 Proteine wird mit verschiedenen inflammatorischen Erkrankungen, wie Atemwegserkrankungen, Cystischer Fibrose, rheumatoider Arthritis oder FMF in Zusammenhang gebracht:

Rouleau et al. fanden erhöhte S100A12-Spiegel im Plasma (im Mittel 4.443 +/- 1.501 μ g/ml) und Synovia (im Mittel 63.3 +/- 13.3 μ g/ml) von Patienten mit rheumatoider Arthritis.¹⁰⁸ Foell et al. untersuchten S100A12 als Parameter für die inflammatorische Aktivität bei rheumatoiden Erkrankungen in Serum und Synovia. Sie fanden bei Patienten erhöhte S100A12-Spiegel im Serum (im Mittel 340 \pm 90 ng/ml) im Vergleich zu den gesunden Kontrollprobanden (60 \pm 20 ng/ml). In der Synovia waren die S100A12-Spiegel 5-10 mal so hoch im Vergleich zu den Sera bei allen Patienten. Foell et al. untersuchten die S100A12-Spiegel in Serum und Synovia vor und nach erfolgreicher Behandlung mit MTX bei Patienten mit Psoriasis Arthritis und sahen hier deutliche erniedrigte S100A12-Spiegel nach MTX Behandlung.¹⁰⁹

Migration von Neutrophilen in die entzündete Mucosa und in das intestinale Lumen ist charakteristisch für chronisch entzündliche Darmerkrankungen. TNF- α triggert die Inflammation abhängig von NF κ B. Die Gruppe um Foell D. fand erhöhte S100A12-Spiegel im Serum bei Patienten mit aktiver M. Crohn Erkrankung im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden (470 (125) ng/ml vs. 75 (15) ng/ml). Darüber hinaus waren die S100A12-Spiegel auch bei inaktiver Erkrankung signifikant erhöht im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden (215 (95) ng/ml versus 75 (15) ng/ml).¹¹⁰

Die Art der Freisetzung der S100A12-Proteine ist bislang ungeklärt, da S100A12 nicht über eine Sequenz verfügt, die einen Sekretionsweg über das endoplasmatische Retikulum und den Golgi Apparat ermöglicht, wie es sonst in der konventionellen Proteinsekretion der Fall ist.^{102,106}

Detailliert untersucht sind Funktion von **Caspase-1** und konsekutive Reifung und Freisetzung von **IL-18** in inflammatorischen Prozessen: IL-18 gehört zu der IL-1 Zytokin Superfamilie und ist ein wichtiger Regulator von angeborenen und erworbenen Immunantworten. IL-18mRNA und das pro-IL-18 werden in entzündlichen Geweben gefunden.¹¹¹ IL-18 besitzt einen stimulierenden Einfluss auf Neutrophile, ebenso wie auf eine Vielzahl weiterer Zellreihen, in denen IL-18-Rezeptoren nachgewiesen wurden.¹¹²

Eine Inhibition von IL-18 ist experimentell bei rheumatoider Arthritis durchgeführt worden mit einer Reihe von non-Respondern. In der Synovialflüssigkeit von Patienten mit rheumatoider Arthritis gelingt während akuten Entzündungsprozessen in den Gelenken der Nachweis von reichlich IL-18, das in Verbindung mit einer verstärkten Neutrophilen-Antwort (Migration, Adhaesion) gesehen wird.¹¹³ IL-18 triggert zusammen mit IL-12 die Produktion von IFN γ , die proinflammatorische Th1-Immunantworten fördert. Somit trägt IL-18 zu IFN γ gesteuerten Erkrankungen wie dem systemischen Lupus erythematosus, rheumatoider Arthritis oder Morbus Crohn bei.¹¹⁴

Robertson et al. beschreiben, dass pro-IL-18 und reifes IL-18 nicht nur durch Makrophagen exprimiert wird, sondern auch durch Neutrophile selbst. Darüberhinaus sehen sie einen autokrinen Loop für IL-18: IL-18 fördere die Invasion von Neutrophilen in entzündetes Gewebe und könnte selbst nach Aktivierung von Neutrophilen vermehrt durch diese exprimiert werden. Die Prozessierung von pro-IL-18 in ihre biologisch aktiven Komponenten über Caspase-1 gilt als etabliert. Robertson et al. stellen in ihrer Arbeit die Hypothese auf, dass Neutrophile für den autokrinen Weg auf die Serin-Proteasen Elastase und Cathepsin G zur Freisetzung zurückgreifen.¹¹¹

Auch die Freisetzung von IL-18 (und IL-1 β) ist wie von S100A12-Proteinen komplex, da sie wie die meisten Zytokine der IL-1-Zytokin-Familie nicht über das endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat in den Extrazellularraum gelangen. Die meisten anderen Zytokine, wie TNF oder IL-10, enthalten eine Signalsequenz, über die sie in das endoplasmatische Retikulum gelangen, von dort weiter in den Golgi-Apparat und schließlich sezerniert werden. Über welchen Weg die unkonventionelle Sekretion von IL-1 β und IL-18 stattfindet, ist nicht vollständig geklärt. Zahlreiche Arbeiten widmen sich der Frage, wie IL-1 β freigesetzt wird.^{115,116} Einige Publikationen stellen dar, dass pro-IL-1 β und Caspase-1 im endolysosomalen System oder in Mikrovesikeln von der Oberfläche stimulierter Zellen gesheddet werden und nach Aktivierung von Caspase-1 und Reifung von IL-1 β freigesetzt werden.^{117,118} Dagegen spricht, dass man nach aktuellem Stand davon ausgeht, dass Caspase-1 im Zytosol durch Inflammasome aktiviert wird, und die Reifung von pro-IL-1 β zu IL-1 β auch im Zytosol stattfindet. Interessant ist die Diskussion, inwieweit der Prozess der Pyroptose in der unkonventionellen Sekretion eine Rolle spielt.¹¹⁹ Auf den Caspase-1 getriggerten pyroptotischen Zelltod bzw. die nicht kanonische Inflammasomsaktivierung über die Caspasen 4/5 und pyroptotischer Zelltod über Spaltung von Gasdermin-D wurde in der Einleitung bereits eingegangen. Infolge der Zellyse könnten IL-1 β und IL-18 freigesetzt werden. Monteleone et al. kritisieren, dass Neutrophile keine Caspase-1 abhängige Pyroptose unterlaufen würden. Alternativ könnten IL-1 β und IL-18 passiv über die Poren, die in der Plasmamembran während der Pyroptose entstehen, in den Extrazellularraum gelangen. Monteleone et al. verwiesen jedoch auf die unzureichende Größe der in der Pyroptose entstehenden Membranporen. IL-1 β (17 kDa) und IL-18 (18 kDa) seien für eine passive Passage durch die Membranporen im Rahmen der Pyroptose zu groß.¹¹⁶

Caspase-1 selbst ist, wie die anderen Caspasen, eine Cystein-Protease, die an zellulären Kaskaden beteiligt ist, die zu Inflammation oder Zelltod führen. Sie liegt als inaktives Zymogen vor und wird proteolytisch aktiviert. Caspase-1, auch genannt Interleukin-1 β -converting Enzym, wird im Rahmen von Inflammasomen autoaktiviert: Pro-Caspase-1 Monomere werden in räumliche Nähe gebracht und die eigene Spaltung in die aktive Caspase-1 Form initiiert. Die aktivierte Caspase-1 wiederum aktiviert proteolytisch eine Reihe von Proteinen, wie pro-IL-1 β and pro-IL-18.¹²⁰

In den Überständen der Neutrophilen Kurzzeitkultur war die spontane Sekretion von IL-18, S100A12 und Caspase-1 bei den FMF-Patienten signifikant erhöht über den gesamten Zeitraum von fünf Stunden nach rascher Sekretion in den ersten beiden Stunden. Für die heterozygoten Mutationsträger lag IL-18 über den gesamten Zeitraum von fünf Stunden ebenfalls signifikant erhöht vor im Vergleich zu den gesunden Kontrollen und anderen inflammatorischen Erkrankungen.

Die hier dargestellte signifikante Erhöhung von Caspase-1, IL-18 und S100A12 in Neutrophilen FMF-Erkrankter im Vergleich zu gesunden Kontrollen schließt sich der Arbeit von Gohar et al. an, welche die Sekretion dieser Inflammationsparameter 2016 in Korrelation zu Gendosis und Krankheitsaktivität beim FMF setzten und diese als potentielle Parameter zum Monitoring der Krankheitsaktivität anführten.²⁸ Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit zeigen den kinetischen Verlauf dieser Inflammationsparameter und differenzieren die Sekretion in Neutrophilen von FMF-Erkrankten und heterozygoten Mutationsträgern zu anderen inflammatorischen Erkrankungen.

Interessanterweise bestand in den Ergebnissen dieser Arbeit zwischen den anderen inflammatorischen Erkrankungen und den gesunden Kontrollprobanden kein signifikanter Unterschied, obwohl in der Literatur auf den Stellenwert dieser Inflammationsparameter auch für andere entzündliche Erkrankungen, wie rheumatoider Arthritis, akute Infektionen oder Morbus Crohn

hingewiesen wird.^{97,98,104,05,108} Allerdings befanden sich die Serumspiegel der gemessenen Inflammationsparameter in den einzelnen Gruppen der anderen inflammatorischen Erkrankungen in einem Bereich vergleichbar mit dem in der hier zitierten Literatur, die einen signifikanten Unterschied zwischen diesen Krankheitsentitäten und gesunden Kontrollprobanden sah. Somit hätte sich bei höherer Probandenzahl auch in dem hier verwendeten Protokoll ein signifikanter Unterschied darstellen können. Der Bereich der in der Gruppe der FMF-Patienten gemessenen Inflammationsparameter war allerdings um eine Zehnerpotenz erhöht im Vergleich zu den anderen inflammatorischen Erkrankungen.

Die Sekretion dieser Inflammationsparameter ließ sich bei den FMF-Patienten nicht weiter steigern, in der Gruppe der anderen inflammatorischen Erkrankungen führte die Inkubation mit LPS+ATP zu einer gesteigerten Sekretion von Caspase-1, die sich bei den gesunden Kontrollen nicht zeigte. Dies weist darauf hin, dass die Sekretion dieser Inflammationsparameter in Neutrophilen von FMF-Erkrankten bereits ohne pathogene Trigger auf ein Maximum gesteigert ist. Die Sekretion von Caspase-1 durch Neutrophile von Patienten mit anderen inflammatorischen Erkrankungen kann im Gegensatz zu gesunden Kontrollen durch Stimuli gesteigert werden.

Durch Colchizin kann die spontane Sekretion aller drei Inflammationsparameter bei FMF-Patienten unterdrückt werden, dieser Effekt tritt bei den heterozygoten gesunden Mutationsträgern bei den S100A12-Proteinen ein.

Die Vitalität der Neutrophilen, deren Aktivierungsmuster in dieser Arbeit untersucht wurden, war stets über 90%, was gegen eine Freisetzung von IL-18 und S100A12 nach Zelltod spricht. So sprechen die Daten dafür, dass eine unkonventionelle Freisetzung von Proteinen nicht nur über Pyroptose erfolgt, die vorrangig in Makrophagen stattfindet: Neutrophil extracellular traps (NETs) sind Strukturen von Chromatin mit Histonen, Proteasen und granulären und zytosolischen Proteinen. Die Freisetzung von NETs ("NETosis") unterstützen die Neutrophilen in der Abwehr von Pathogenen. Nach mehrstündiger Stimulation und Produktion von Sauerstoffradikalen, kommt es zur Chromatin-Dekondensation. Neutrophile Elastase und Myeloperoxidase gelangen in den Zellkern und fördern die Entfaltung des Chromatins mit konsekutivem Aufbrechen der Zellkernmembran. Das Chromatin gelangt so ins Zytosol und gelangt dort in Kontakt mit granulären und zytosolischen Proteinen. Schließlich verlassen die NETs die Zelle nach Aufreißen der Zellmembran, und der Neutrophile geht in den Zelltod.¹²¹⁻¹²⁴ Neueren Untersuchungen zufolge bilden Neutrophile aber auch bereits nach kurzer Zeit, innerhalb von Minuten, nach Stimulation NETs, ohne in den Zelltod zu gehen. Vermutlich geschieht dies unabhängig von Oxidantien über Komplementrezeptoren und TLR2 und TLR4 Liganden. Die NETs verlassen die Zelle schließlich über Vesikel, und der Neutrophile bleibt für Stunden weiter vital.¹²⁵

Zusammenfassend wird durch die Überaktivierung der Neutrophilen eine Reihe von verschiedenen inflammatorischen Wegen angeregt, die sich bei Patienten mit FMF in den durchgeführten Experimenten als statistisch signifikant erhöht zeigten im Vergleich zu den anderen untersuchten inflammatorischen Erkrankungen.

4.3 Das CD62L-Shedding in Neutrophilen beim FMF und anderen inflammatorischen Erkrankungen

CD62L, L-Selektin, bildet mit zwei anderen Selektinen eine Gruppe von membrangebundenen Glykoproteinen, die jeweils nach den Zelltypen, in denen sie zuerst charakterisiert worden sind, benannt sind: L-Selektin in Leukozyten, E-Selektin in Endothelzellen und P-Selektin in Thrombozyten (platelet cells). Alle Selektine haben einen gleichen Aufbau: Ein C-terminaler zytoplasmatischer Rest, auf den eine transmembranäre Domäne folgt. Der extrazelluläre Teil wird durch eine, bei den einzelnen Selektinen unterschiedliche Anzahl von „short consensus repeats“ charakterisiert. Nach einer dem epidermalen Wachstumsfaktor ähnlichen Domäne (EGF) folgt die Kohlenhydrat-Bindungsstelle (Lektindomäne) am N-Terminus.^{84,127} L-Selektine haben einen maßgeblichen Anteil in der Adhäsionskaskade von Leukozyten im Rahmen der Immunantwort. Sie befinden sich auf den Mikrovilli fast aller Leukozyten-Subtypen. Kommt es zu einer Aktivierung der Leukozyten, wird L-Selektin proteolytisch von der Zelloberfläche abgespalten, die Flußgeschwindigkeit der Leukozyten im

Blut verlangsamt sich unter inflammatorischen Bedingungen, es kommt zum Rollen und Tethering der Leukozyten am Endothel entlang zum Entzündungsgewebe. In der Literatur wurde das Transmembran Protein A disintegrin and metalloproteinase 17 (ADAM17) charakterisiert, auf die proteolytische Spaltung von L-Selektin spezialisiert zu sein. Zunächst werden durch Selektin vermittelt schwach affine Bindungen zwischen Leukozyt und Endothel eingegangen.^{84,126,127}

P-Selektin ist in intrazellulären Granula von Endothelzellen und Thrombozyten gespeichert und wird nach Stimulation an der Zelloberfläche exprimiert und außerdem neu synthetisiert. Zusammen mit L-Selektin ist E-Selektin mitbeteiligt am Rollen der Leukozyten entlang des Endothels.

E-Selektin wird nach Stimulation von Endothelzellen durch Zytokine, wie IL-1, TNF- α oder LPS neu synthetisiert und erreicht nach Stunden seine Maximalkonzentration.^{84,126,127}

Selektine binden an hoch affine Liganden. Beschrieben sind lang gestreckte Glykoproteine, an deren Serin- oder Threonin-reichem Proteingrundgerüst viele Kohlenhydrat-Seitenketten als Bindungsepitope glykosidisch geknüpft sind. Als wichtiges Bindungsepitop für alle drei Selektine wurde das Tetrasaccharid Sialyl LewisX (sLeX) identifiziert. Die Bindungsstärke zwischen Leukozyt und Endothel, die Voraussetzung der hochkomplexen Leukozytenmigration ist, wird durch ein kompliziertes Wechselspiel von Zytokinen, Chemokinen, Selektinen mit Integrinen gesteuert. Für die Bindung zwischen Leukozyt und Endothel sind Konformationsänderung der Selektine und die Scherkräfte im Blutstrom mitentscheidend. Für alle drei Selektine wurden catch-bonds beschrieben, für L-Selektin erstmals durch Finger et al. 1996: Die während einer Inflammation bestehende Scherspannung beeinflusst die Leukozyten ab einer bestimmten Stärke, an der endothelialen Gefäßwand zu binden, unter dieser Schwelle fließen die Leukozyten frei im Blut. Wird diese Schwelle überschritten, akkumulieren die Leukozyten an der Endothelgefäßwand über schwach affine Selektin-Bindungen. Die Leukozyten binden und lösen sich und rollen an der Endothelwand entlang. Mit zunehmender Scherkraft werden die Bindungen stärker, die Leukozytenbewegung nimmt ab, hier scheinen insbesondere E- und L-Selektin beteiligt zu sein, und es erfolgen Selektin Bindungen mit Integrinen (LFA-1 - CD11a/CD18 - und MAC-1 - CD11b/CD18), die zu einer starken Bindung von Leukozyt und Endothel führt. Dies ist die Voraussetzung für die Extravasation der neutrophilen Granulozyten über Bindung von endothelialen Strukturen der Immunglobulin-Superfamilie, zum Beispiel ICAM-1 oder PECAM.^{126,127} Die Rolle von CD62L und der anderen beiden Selektine wurde in verschiedenen inflammatorischen Erkrankungen untersucht. In der Literatur finden sich Publikationen über eine Erhöhung von gelöstem L-Selektin im Serum bzw. in Neutrophilen der Synovia von inflammatorischen Gelenken von Patienten mit rheumatoider Arthritis. Cappenberg et al. beschrieben, dass L-Selektin in der Abwehr von *Klebsiella pneumoniae* nicht nur für die Rekrutierung von Neutrophilen in das inflammatorische Gewebe wesentlich sein soll, sondern darüberhinaus auch unterstützend für die Neutrophilen für die Ausübung ihrer Abwehr von Bakterien durch reaktive Sauerstoffspezies sein sollen.^{128,129} Daten sprechen dafür, dass im Pathomechanismus des Morbus Crohn CD4⁺ Lymphozyten, die L-Selektin exprimieren, am meisten TNF- α produzieren und die dominierende Ileitis induzierende Subpopulation sind.¹³⁰ Im Kontext von exazerbierten Patienten mit Cystischer Fibrose untersuchten Russell et al. Neutrophile aus peripherem Blut ex vivo hinsichtlich ihres L-Selektin Sheddings im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden und nicht CF-Patienten mit Bronchiektasen nach Stimulation mit IL-8 und fMLP. Im Vergleich zu den gesunden Kontrollprobanden und nicht CF-Patienten zeigte sich ein vermindertes CD62L-Shedding. Russell et al. interpretierten das verminderte CD62L-Shedding als herabgesetzte Neutrophilen Responsivität.¹³¹

Die wichtige Rolle von L-Selektin und den Selektinen insgesamt macht sie zu einem attraktiven Target für Therapien zur Inhibition von überschießenden Inflammationen. Eine Reihe von small molecule Inhibitors wurden entwickelt, die mittlerweile in klinischen Studien untersucht wurden, darunter Pan-Selektin (sLeX) Inhibitoren.¹³²

Die in dieser Arbeit untersuchten aufgereinigten Neutrophilen zeigten ein signifikant erhöhtes CD62L-Shedding in der Gruppe der FMF-Patienten im Vergleich zu den gesunden Kontrollprobanden aber auch im Vergleich zu anderen inflammatorischen Erkrankungen über einen Zeitraum von fünf

Stunden. Der gMFI fiel innerhalb der ersten zwei Stunden bei den FMF-Patienten auf 53,2% des initialen gMFI, bei den anderen inflammatorischen Gruppen lag er bei 110,6% und bei den gesunden Kontrollen bei 104,2% des ursprünglichen gMFI. Dieser Unterschied war nach fünf Stunden weiterhin signifikant. Ein signifikant stärkeres Shedding trat auch bei den heterozygot gesunden Mutationsträgern im Vergleich zu anderen inflammatorischen Erkrankungen und gesunden Kontrollen auf. In der Analyse der einzelnen Entitäten innerhalb der Gruppe der anderen inflammatorischen Erkrankungen lag kein signifikanter Unterschied vor, so dass hier keine bestimmte akute oder chronische inflammatorische Erkrankung zu identifizieren war, die ein den FMF-Patienten oder heterozygoten Mutationsträgern ähnlich erhöhtes CD62L Shedding in den aufgereinigten Neutrophilen zeigten. Das CD62L-Shedding war weder signifikant erniedrigt oder erhöht im Vergleich zu den gesunden Kontrollen. Zu erwähnen bleibt, dass das CD62L-Shedding innerhalb der exazerbierten CF-Patienten über den gesamten Zeitraum von fünf Stunden über 100% des initialen gMFI lag. Die Abbildung 4-1 stellt den Aufbau von CD62L schematisch dar.

Das CD62L-Shedding wurde in den hier durchgeführten Versuchen *ex vivo* untersucht, somit kann die über ADAM 17 vermittelte Abspaltung des CD62L nicht durch Bindung von Leukozyten an das Endothel erklärt werden. Die Degranulation von Neutrophilen ist mit einer erhöhten Proteinkinase-C-abhängigen Integration und Aktivierung von ADAM17 in die Zelloberflächenmembran verbunden. Wahrscheinlich führt intravesikuläres ADAM17, das durch die Exozytose von Granula aktivierter Neutrophiler freigesetzt wird, zum Abfall von CD62L auf Neutrophilen, was weitere inflammatorische Aktivierungswege induziert. Der signifikante Unterschied zwischen dem CD62L-Shedding auch zwischen den untersuchten FMF-Patienten und den Patienten mit anderen inflammatorischen Erkrankungen unterstreicht die Rolle des CD62L als Biomarker für das Familiäre Mittelmeerfieber.

Beim Vergleich zwischen FMF-Patienten mit erhöhtem CRP und solchen mit CRP im Normbereich konnte kein Unterschied im Ausmaß des CD62L-Sheddings festgestellt werden (Daten hier nicht gezeigt).

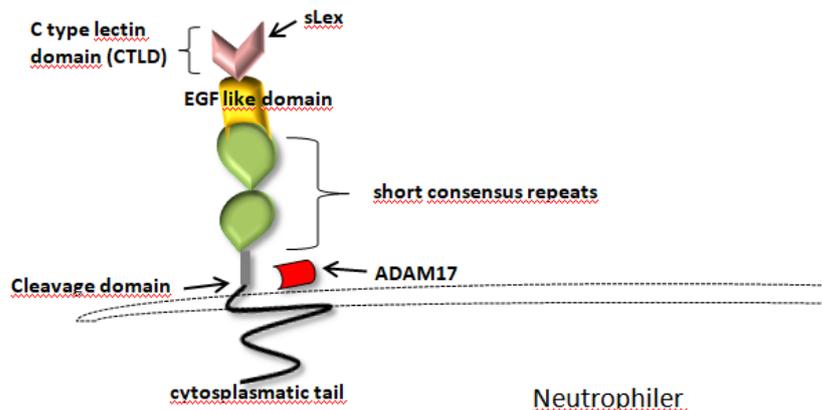


Abb 4-1: L-Selektin (CD62L)

ADAM17 vermittelt im Rahmen einer Inflammation die Spaltung des extrazellulären Teils von CD62L, der aus einer Lektindomäne, gefolgt von einer epidermal growth factor (*EGF*)-like Domäne und den short consensus repeats besteht. Mittels der Lektindomäne wird das Tetrasaccharid Sialyl LewisX (sLeX), bestehend aus einer Neuraminsäure (Neu5Ac), einer Galaktose (Gal) und einem N-Acetylglucosamin (GlcNAc), an welchem noch eine Fucose (Fuc) verknüpft ist, als Ligand erkannt, und CD62L wird von der Zelle abgesheddet. Abbildung inhaltlich adaptiert nach ^{84,127}

4.4 Die Regulation der Integrin α -Subunit CD11b beim FMF und anderen inflammatorischen Erkrankungen

Das Selektin-Shedding ist eine wichtige Voraussetzung für die Leukozyten Migration, weiterhin ist für die Leukozytenadhäsion die Hochregulation von Integrinen bedeutsam. Die β 2-Integrin Familie besteht aus einer konstanten β -subunit und jeweils vier unterschiedlichen α -subunits (CD11).

Gemeinsamer Aufbau der Adhäsionsmolekül Subunits ist jeweils eine große extrazelluläre Domäne und eine Transmembrandomäne. Mit dem kurzen zytoplasmatischen Anteil sind sie mit dem Zytoskelett verkettet und steuern über intrazelluläre Signale die Aktivierung der Integrine.¹³³ Unter physiologischen Umständen liegen die β 2-Integrine inaktiviert in einer gekrümmten "not extended" E(-) und "not high affinity" H(-) Konformation vor und sind nur gering affin für Bindung von Liganden. Kommt es zu einer Inflammation, ändern die β 2-Integrine ihre Konformation mittels "inside-out" signalling. Durch intrazelluläre Signale vermittelt über Chemokine und Selektin Liganden infolge des Neutrophilen Rollens am Endothel entlang kommt es zur erweiterten "extended" E(+) "not high affinity" H(-)-Konformation. Die Neutrophilen sind Chemokinen durch das langsame Rollen und die schwache Bindung nun länger ausgesetzt, wodurch zu einer weiteren Konformationsänderung der Integrine in den "extended" E(+) "high affinity" H(+) Zustand kommt. In dieser hoch affinen Konformation triggern nun die β 2-Integrine über Bindung mit ihren extrazellulären Liganden auf aktivierten Endothelzellen intrazelluläre Signale über "outside-in" signalling. Die Aktivierung der β 2-Integrine führt zur festen Adhäsion des Neutrophilen an das Endothel, die Voraussetzung für die transendotheliale Migration ist.¹³³⁻¹³⁶ Die Aktivierung der Integrine und ihre Auswirkung auf die Neutrophilen werden durch verschiedene Proteine gesteuert. Eine tragende Rolle in der Aktivierung von Integrinen spielt der Literatur zufolge die GTPase Rap1, für deren Aktivierung Zelltyp spezifische Wege mit unterschiedlicher Geschwindigkeit verantwortlich sein sollen. Im Prozess der Aktivierung wird der GDP-GTP Austausch durch Guanin-exchange Faktoren (GEF) geregelt, die zum großen Teil wiederum durch die second messenger Ca^{2+} und Diacylglycerol (DAG) aktiviert werden.¹³⁷ In der differenzierten Betrachtung der β 2-Integrine legen die verfügbaren Daten in der Literatur nahe, dass Neutrophile LFA-1(CD11a/CD18) nutzen, um sich an die Gefäßwand anzuheften und MAC-1 (CD11b/CD18) für Neutrophile ein wichtiger Baustein für die transendotheliale Migration darstellt, um das vaskuläre Endothel zum Ort der Entzündung zu verlassen. Die Wichtigkeit der genau aufeinander abgestimmten Integrin Aktivierung für die inflammatorische Antwort wird deutlich, wenn man sich mit den Leukozyten Adhäsions Defekten beschäftigt. Die dadurch bedingte gestörte Leukozytenmigration führt zu akkumulierten Infekten.¹³³⁻¹³⁷

Molad et al. untersuchten 2004, ob sich ein Unterschied in der CD11b-Sekretion und einem konkomitanten CD62L-Shedding in Neutrophilen von FMF-Patienten mit akutem Schub im Vergleich zu FMF-Patienten im akutfreien Intervall und gesunden Kontrollprobanden zeigt. Die Neutrophilen wurden in ihrer Arbeit im Vollblut im FACS Sorting identifiziert, die Stimulation erfolgte mit FMLP. In der gesamten FMF-Gruppe war die CD11b-Expression vergleichbar mit der der gesunden Kontrollprobanden, ein ähnliches Ergebnis zeigte sich in der CD62L-Expression. Die Analyse der FMF-Patienten im akuten Schub zeigte jedoch eine signifikant erhöhte CD11b-Expression im Vergleich zu den gesunden Kontrollprobanden, währenddessen die CD62L-Expression in allen untersuchten Gruppen ähnlich war. Stimulation mit FMLP erhöhte die CD11b-Expression in gleichem Maße wie bei den gesunden Kontrollprobanden, interessanterweise ohne ein gleichzeitiges CD62L-Shedding in keiner der untersuchten Gruppen. Molad et al. argumentierten, dass vorangegangene Publikationen zwar eine erhöhte CD11b-Expression mit konkomitantem CD62L-Shedding in aktivierten Neutrophilen gezeigt hätten. Die Gruppe um Molad et al. beschrieb allerdings in einer Publikation von 1994, dass eine Stimulation von Neutrophilen mit den G-Protein-gebundenen Chemoattractant-Rezeptoren C5a, Interleukin-8 (IL-8), Formylmethionyl-Leucylphenylalanin (FMLP) und Substanz P zu einer erhöhten CD11b-Expression mit konkomitantem CD62L-Shedding führte, eine Stimulation über Bindung von Fc gamma Rezeptoren durch Immunkomplexe zwar zu einer erhöhten CD11b/CD18-Expression führte, jedoch nicht zu einem gleichzeitigen CD62L-Shedding. Molad et al. schlussfolgerten, dass unterschiedliche Rezeptoren für Chemoattractanten und Immunkomplexe auf den Neutrophilen mit unterschiedlichen Signalwegen verbunden seien. Beim FMF sahen sie eine Upregulation des β 2-Integrin Adhäsionsmoleküls ohne CD62L-Shedding und diskutierten, dass alternative Aktivierungswege beim FMF als klassische G-Protein gebundene Wege über Chemoattractanten genutzt werden.¹³⁸

Im Gegensatz zu der Publikation von Molad konnte in den hier dargestellten Ergebnissen keine konstant erhöhte CD11b-Expression für FMF Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden gesehen werden. Allerdings fiel die spontane CD11b-Expression in den Gruppen der FMF-Patienten, den heterozygoten Mutationsträgern und den anderen inflammatorischen Erkrankungen im Verlauf signifikant weniger ab als in der Gruppe der gesunden Kontrollprobanden. Bei den FMF-Patienten war dieser Effekt wie weiter oben beschrieben verbunden mit einem spontanen konkomitanten CD62L-Shedding über den Verlauf von fünf Stunden.

Das spontane CD62L-Shedding in aus peripherem Blut aufgereinigten Neutrophilen stellt sich in den Daten dieser Arbeit somit als spezifisch für die FMF-Erkrankung dar, währenddessen eine im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden im Verlauf erhöhte CD11b-Expression in dieser Arbeit nicht als spezifisch für das FMF ausgewertet werden konnte, aber bei inflammatorischen Prozessen im allgemeinen beobachtet werden kann.

4.5 Vitalität und Reinheit der Neutrophilen

Die dargestellten Aktivierungsmuster könnten durch apoptotische bzw. nekrotische Zellen verfälscht worden sein. Zu diesem Zweck wurde eine Vitalitätsprüfung für alle Neutrophilen nach der Zelltrennung mittels Trypanblaufärbung durchgeführt, diese lag in allen Gruppen bei über 90%: Im Mittelwert 96,9% für die FMF-Patienten, 98,3% für die anderen inflammatorischen Erkrankungen, 96,1% für die heterozygoten Mutationsträger, 93% für die Kontrollen. Zudem wurde in den ersten Versuchsreihen zur Evaluation der Vitalität nach Stimulation von fünf Stunden in dem verwendeten Protokoll eine Propidiumbromid- und Annexin-Färbung durchgeführt. Die Vitalität lag in der Gruppe der FMF-Patienten im Mittelwert bei 83,3% ohne Stimulation, 88,2% bei Hinzugabe von Colchizin und 89,2% nach Stimulation mit Colchizin+LPS+ATP. Für heterozygote Gesunde (unstimuliert 96,1%, Colchizin 95,9%, Colchizin+LPS+ATP 89,4%) und gesunde Kontrollen (unstimuliert 89,5%, Colchizin 92,8%, Colchizin+LPS+ATP 89,9%) zeigten sich vergleichbare Werte. Die heterogene Freisetzung der Inflammasomparameter zwischen den einzelnen Gruppen kann somit nicht auf unterschiedlicher bzw. erhöhter Vitalität der Zellen beruhen.

Wie unter 4.4. erläutert ist der MAC-1 Komplex (CD11b/CD18) wichtig für die transendotheliale Migration von Neutrophilen und kann somit als Marker für die Aktivierung von Neutrophilen gesehen werden. Die Stimulation führte zu einer CD11b-Erhöhung in allen Gruppen und spricht ebenfalls gegen Zellnekrose.¹³³⁻¹³⁷

Um zu überprüfen, dass die freigesetzten Proteine und das Shedding der Oberflächenmarker durch Neutrophile erfolgte, wurde der Anteil der Neutrophilen und die Kontamination durch andere Zellen in der Zellmedium-Suspension geprüft. Der Anteil der Neutrophilen lag, außer in der TRAPS-Gruppe (n=2, 82,4%) in allen Gruppen bei über 90%. Somit ist davon auszugehen, dass die hier dargestellten Effekte auf den neutrophilen Granulozyten beruhen.

4.6 Abhängigkeit der Caspase-1-, IL-18- und S100A12-Sekretion und des CD62L-Sheddings von IL-1 und dem NLRP3-Inflammasom

Die erhöhte Caspase-1 Freisetzung in der Gruppe der FMF-Patienten spricht für eine Inflammasomaktivierung. Es sollte untersucht werden, inwieweit die Sekretion von Caspase-1, IL-18 und S100A12-Proteinen sowie das verstärkte CD62L Shedding innerhalb der FMF-Gruppe von der Aktivierung speziell des NLRP3-Inflammasoms abhängig sind, und ob diese Aktivierungsmuster über IL-1 getriggert werden. Hierzu wurden die Neutrophilen von einer kleinen Kohorte von zwei homozygoten FMF-Patienten und einem heterozygoten Mutationsträger mit ausgeprägter FMF-Klinik sowie von drei gesunden Kontrollprobanden mit einem selektiven Inhibitor des NLRP3-Inflammasoms, MCC950, in drei verschiedenen Zehnerpotenzen stimuliert. MCC950 interagiert mit dem Walker B motif innerhalb der NLRP3 NACHT Domäne und blockiert so die ATP Hydrolyse und inhibiert die NLRP3-Aktivierung und die Inflammasombildung.¹³⁹ Es zeigten sich nach Stimulation für alle drei Titrationsstufen des MCC950 Werte vergleichbar mit der Spontansekretion von Caspase-1, IL-18 und

S100A12, ebenso wie für das spontane CD62L-Shedding in der Gruppe der an FMF-Erkrankten, in der Gruppe der gesunden Kontrollen zeigte sich ebenfalls kein Unterschied zwischen unstimuliert vs. stimuliert mit MCC950. Ferner sollte untersucht werden, ob die beschriebenen Effekte über Triggerung durch IL-1 stattfinden. In der Einleitung wurde erwähnt, dass IL-1 Inhibition, z.B. durch Anakinra in der 2nd line Therapie des FMF Anwendung findet.^{47,49,50} Überprüft wurde nun, ob IL-1 in Neutrophilen das Sekretions-/Sheddingmuster beeinflusst. Hierzu wurde Anakinra ebenfalls in drei verschiedenen Zehnerpotenzen in derselben Kohorte eingesetzt, auch hier zeigte sich keine Änderung der Aktivierungsmuster. Somit weisen die hier vorgestellten Daten daraufhin, dass das NLRP3-Inflammasom für die gesteigerte Zytokin- bzw. S100A12 Proteinfreisetzung in Neutrophilen von FMF-Patienten und für die gesteigerte Neutrophilen Migration gemessen an einem raschen CD62L-Shedding neben dem Pyrin-Inflammasom keine Rolle spielt. IL-1 fördert durch Upregulation von Selektinen die Neutrophilen Migration, ein Einfluss auf das gesteigerte L-Selektin-Shedding der Neutrophilen von FMF-Patienten wurde in dieser Arbeit ausgeschlossen.

4.7 Aktivierungsmuster der Neutrophilen durch weitere Chemokine, Zytokine, Zytokin-Rezeptor-Antagonisten und Proteine und Analyse der Spezifität für das FMF

In Kooperation mit der Klinik für Pädiatrische Immunologie Münster wurden weitere Inflammationsparameter der angeborenen Immunität untersucht mit dem Ziel, zusätzliche spezifische Aktivierungsmuster zu detektieren und unter Umständen ein besseres Verständnis der Sekretionsmuster von oben dargestellten Parametern zu gewinnen. Tabelle 4-1 gibt einen Überblick über die Funktionen anhand der verfügbaren Literatur (Auswahl der am besten charakterisierten Funktionen).

Die einzigen Proteine, die ohne Stimulation in hohen Konzentrationen vorlagen, umfassten IL-18, S100A12-Proteine, Proteinase-3 und MPO. Dieses Phänomen war nur in den Neutrophilen-Überständen von FMF-Patienten zu beobachten. Es liegt daher nahe, dass die Sekretion dieser Proteine in *ex vivo* kultivierten Neutrophilen von Mutationen im *MEFV*-Gen abhängt. Eine Steigerung dieser Proteinkonzentrationen in den Überständen ließ sich durch Stimulation nicht hervorrufen. Die Korrelation von spontan sezernierten S100A12-Proteinen mit den erhöhten Proteinase-3 und MPO-Konzentrationen in den Neutrophilen-Überständen von FMF-Patienten kann nicht auf gemeinsame, zeitgleiche Sekretionswege zurückzuführen sein. Denn im Gegensatz zur Proteinase 3 und MPO, werden S100A12-Proteine nicht durch Degranulation freigesetzt.^{102,106}

IL-1 β lag in den Kulturüberständen von neutrophilen Granulozyten aus FMF-Patienten nur geringfügig erhöht vor. Dies deutet darauf hin, dass Monozyten und nicht Neutrophile die Hauptquelle für lösliches IL-1 β bei Patienten mit FMF sind.¹³⁵ Dennoch tragen Neutrophile über Freisetzung von NET-assoziiertem IL-1 β zur IL-1 β -vermittelten Entzündung während akuter FMF-Anfälle bei.^{90, 141}

2020 veröffentlichte Daten demonstrieren einen positiven Selektionsdruck für Träger von FMF verursachenden Mutationen im Zusammenhang mit *Yersinia pestis*. In 2313 türkischen Probanden fanden die Wissenschaftlicher *MEFV*-Mutationen und sehen einen Zusammenhang zwischen mutiertem Pyrin und verminderter Interaktion mit dem Virulenzfaktor YopM. Das mutierte Pyrin schütze den Mutationsträger vor einer durch YopM verursachten IL-1 β -Suppression. In der Untersuchung setzten Leukozyten von Patienten mit FMF, die homozygote oder compound heterozygote Mutationen aufweisen, sowie von asymptomatischen heterozygoten Trägern im Vergleich zu gesunden Kontrollen als Reaktion auf *Yersinia pestis* spezifisch erhöhtes IL-1 β frei. *Yersinia pestis*-infizierte *MEFV*^{M680I/M680I}-FMF-Knock-in-Mäuse zeigten ein IL-1-abhängig erhöhtes Überleben im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen. Diese Daten korrelieren nicht mit den hier gezeigten IL-1 β -Werten in den Überständen der stimulierten Neutrophilen von FMF-Patienten. Eine Erklärung könnte sein, dass Neutrophile nicht die Hauptquelle für IL-1 β zu sein scheinen. Ein weiterer Grund könnte in den unterschiedlichen Stimuli liegen.¹⁴²

Das aktuell etablierte Modell besagt, dass nicht mutiertes Pyrin durch die Serin-Threonin Kinasen PKN1 and PKN2 phosphoryliert und gebunden wird. Phosphoryliertes Pyrin wiederum wird durch

14-3-3 Proteine gebunden und das Inflammasom damit blockiert.^{75,76} Eine Aktivierung des Inflammasoms kann durch bakterielle Toxine getriggert werden: Die Switch-I Region von RhoA wird modifiziert, in der Folge wird die Guanin Nucleotid Bindungs- und GTPase Aktivität inhibiert. Dies führt weiterhin zur Zerstörung des Aktin-Zytoskeletts der Wirtszelle. Im Rahmen dieser Signalkaskade wird die Phosphorylierung von Pyrin blockiert und das Pyrin-Inflammasom aktiviert.

Magnotti et al. zeigen eine Aktivierung des Pyrin-Inflammasoms getriggert durch Kinase-Inhibitoren in Monozyten von FMF-Patienten. Diese Aktivierung zeigt sich im Prozess des Pyroptose und einer erhöhten Sekretion von IL-1 β . Im Gegensatz dazu führt eine Stimulation durch PKC-Inhibitoren nicht zu diesem Phänomen in Monozyten von gesunden Kontrollen, sondern zu einer verzögerten Apoptose. Diese Daten unterstützen die genannte Hypothese, dass Neutrophile nicht die Hauptquelle für IL-1 β zu sein scheinen. IL-1 β scheint hauptsächlich durch Monozyten von FMF-Patienten freigesetzt zu werden.

In der Gruppe der anderen inflammatorischen Erkrankungen zeigte sich keine erhöhte Konzentration der untersuchten Proteine. Dies mag einerseits daran liegen, dass diese Parameter vorwiegend von anderen Zellen freigesetzt werden, aber auch, dass die untersuchte Patientenzahl in einzelnen Gruppen der anderen inflammatorischen Erkrankungen sehr niedrig war (aufgrund der teilweise geringen Volumina der Überstände, die noch vorhanden waren). So wird für IL-7 z.B. in der Literatur beschrieben, an der T-Zell Migration in das Colon von Patienten mit chronisch inflammatorischer Darmerkrankung beteiligt zu sein und im Rahmen des Pathomechanismus von M. Crohn und Colitis ulcerosa von intestinalen Epithelzellen freigesetzt zu werden. Ferner zeigen Untersuchungen, dass IL-7 auch das Ansprechen von TNF-Antagonisten beeinflusst. Der Einsatz von TNF-Antagonisten bei chronisch inflammatorischen Darmerkrankungen wiederum unterstreicht den Einfluss von TNF- α in der Pathogenese des M. Crohn.^{144,145} IL-6 beispielsweise übt im Pathomechanismus der rheumatoiden Arthritis vielfältige Funktionen aus. Das Interesse an IL-6 hat mit der Anwendung des IL-6 Inhibitors Tozilizumab bei rheumatischen und anderen Autoimmunerkrankungen weiter zugenommen. Neben den in der Tabelle umrissenen Funktionen bei Patienten mit rheumatoider Arthritis stellt IL-6 einen Multifunktionsspieler in der rheumatoiden Arthritis dar: Aktivierte Neutrophile setzen lösliche IL-6 Rezeptoren frei, die mit dem IL-6 (sIL-6R) IL-6/sIL-6R Komplexe eingehen und Endothelzellen stimulieren, CCL3 freizusetzen, das Monozyten anlockt. Zudem regt IL-6 Endothelzellen zur weiteren Freisetzung von IL-6, IL-8 und CCL3 an. Lokal induziert IL-6 den vascular endothelial growth factor (VEGF) in synovialen Fibroblasten.¹⁴⁶ IL-8 wiederum stimuliert ADAM10, den P-Selektin Glycoprotein Liganden 1 (PSGL-1/CD162) auf der Neutrophilenoberfläche zu shedden und erhöht somit die Neutrophilenzahl im zirkulierenden Blut. IL-8 spielt in der Cystischen Fibrose neben Complement C5a und Leukotrien B4 (LTB4) eine wichtige Rolle in der Anlockung von Neutrophilen an bronchiale Epithelzellen. Neutrophile elastase (NE) kann die IL-8 Produktion von bronchialen Epithelialzellen dabei noch weiter hochregulieren.¹⁴⁷

Die analysierten Proben sind somit im Kontext der Identifikation von FMF spezifischen Inflammationsparametern in Abgrenzung zu anderen inflammatorischen Erkrankungen zu sehen. Ziel der Luminex Untersuchungen war es weniger, die anderen inflammatorischen Erkrankungen im genau aufeinander abgestimmten Netzwerk von Zytokinen, Chemokinen und anderen Inflammationsproteinen genau zu beleuchten.

Inflammationsparameter	Funktion
MIP-1 α (CCL3)	Mitglied der CC Chemokin Familie: Induktion der chemotaktische Mobilisierung von Monozyten-Linien und Lymphozyten zum Ort der Entzündung; Regulation der Proliferation von hämatopoetischen Stamm/Progenitor Zellen (HSPCs) ^{148,149,150}
IL-1 β	Induktion von Cyclooxygenase Typ 2, erhöhte Oberflächenexpression zellulärer Adhäsionsmoleküle und erhöhte Genexpression einer breiten Anzahl von Entzündungsmolekülen ¹⁵¹
IL-6	Stimulation von Akute-Phase Proteinen, Induktion von aktivierten B Zellen in Antikörper produzierende Zellen und von der Differenzierung von CD8-positiven T Zellen in zytotoxische T-Zellen ¹⁴⁶

IL-7	Regulation von naiver und Gedächtnis- CD4 und CD8 T Zell Homeostasis und ihrer Lymphopenie induzierten Proliferation ^{144,145}
IL-8	Chemoattraktion von Neutrophilen ¹⁴⁷
IL-10	antiinflammatorisches Zytokin mit wichtiger Rolle in der Prävention von exzessiven Immunantworten und Autoimmunpathologien ¹⁵²
IL-1Ra	antiinflammatorischer Antagonist des IL-1 Rezeptors ^{151,153}
TNF- α	Induktion der Expression von RANKL und Förderung der Osteoklasten Differenzierung, Stimulation von Knochenabbau, Induktion der Produktion von inflammatorischen Chemokinen mit resultierender Akkumulation von proinflammatorischen Leukozyten, wie Neutrophile, Monozyten und aktivierte T Zellen ¹⁵⁴
MCP1 (CCL2)	Förderung der Chemotaxis von myeloischen und lymphatischen Zellen im Rahmen von physiologischen Immunantworten als auch im pathologischen Kontext über Bindung an G-Protein gekoppelten CCR2 Rezeptor ¹⁵⁵
MIP-3 α (CCL20)	Förderung der Chemotaxis von dendritischen Zellen in Lymphknoten für Antigen Präsentation und T-Zell Priming und von CD45RO+ (Gedächtnis) T-Zellen über Bindung an G-Protein gekoppelten CCR Rezeptor ¹⁵⁶
IL-12p40	Chemoattraktant für Makrophagen und Förderung der Migration von bakteriell stimulierten dendritischen Zellen. Vermutlich auch negatives Feedback Loop durch kompetitive Bindung an den IL-12 Rezeptor ¹⁵⁷
IL-18bp	Inhibitor der IL-18 Aktivität. IL18BP bindet IL-18 mit hoher Affinität ¹⁵⁸
CXCL6 (GCP-2)	Eines der sieben Neutrophilen aktivierenden Chemokine, die über Aktivierung der CXCR1 und CXCR2 Rezeptoren G-gekoppelte und β -arrestin vermittelte Signalkaskaden initiieren. ¹⁵⁹
Lactoferrin	Zwei primäre Formen: Einmal durch exokrine Sekretion, die 2. Form in sekundären Granula von Neutrophilen. Die durch Sekretion freigesetzte Form fungiert als Schutz gegen mikrobielle Infektionen, neutrophile Form zusätzlich immunmodulatorische Funktion (Regulation der ROS Produktion) ¹⁶⁰
MPO	Hauptsächlich in primären Neutrophilen Granula, Freisetzung durch Degranulation und Zelltod, NETosis und evtl. auch über Golgi Apparat. Katalysierung reaktiver Sauerstoffspezies ¹⁶¹

Tabelle 4-1: Untersuchte Inflammationsparameter im Multiplex Bead Array

4.8 Heterozygotie

In den Ergebnissen dieser Arbeit wird deutlich, dass nicht nur homozygote Mutationsträger erhöhte Sekretion von Caspase-1 und IL-18 sowie S100A12-Proteine durch Neutrophile und ein beschleunigtes und erhöhtes CD62L-Shedding durch Neutrophile im Vergleich zu anderen inflammatorischen Erkrankungen und gesunden Kontrollen zeigen. Diese subklinische Inflammation zeigte sich im Verhältnis zu den homozygoten / compound heterozygoten FMF-Patienten abgeschwächt auch bei den heterozygoten Mutationsträgern. IL-18 und Caspase-1 waren im Serum der heterozygoten Mutationsträger signifikant erhöht im Vergleich zu den gesunden Kontrollprobanden. Zudem fand sich eine signifikant erhöhte Spontansekretion von IL-18 in den aufgereinigten Neutrophilen und ein signifikant erhöhtes CD62L-Shedding bei den heterozygoten Mutationsträgern im Vergleich zu den gesunden Kontrollprobanden und den anderen inflammatorischen Erkrankungen. Nicht gezeigt wurden die Ergebnisse der Analyse eines heterozygoten Mutationsträgers, der klinisch das Krankheitsbild des FMF zeigte. Auch bei diesem Patienten fand ein rasches und erhöhtes CD62L-Shedding vergleichbar den homozygoten/compound heterozygoten FMF-Patienten statt (gMFI nach 1h 69,44%, nach 2h 49,34%, nach 3h 39,40%, nach 4h 24,99%, nach 5h 25,30% des initialen Wertes).

4.9 Limitationen dieser Arbeit

In dieser Arbeit wurden nur FMF-Patienten im schubfreien Intervall untersucht. Einerseits ermöglicht dies Aussagen über die subklinische Inflammation von FMF Patienten, auch unter Colchizin Therapie, andererseits lässt dies keinen Vergleich zu FMF-Patienten im akuten Schub zu. Diese Patienten waren schwer zu rekrutieren, außerdem wurde ein zeitlich umfangreiches Protokoll angewendet, was eine spontane Rekrutierung von Patienten erschwerte.

Lamkanfi et al. beschreiben anhand eines *ex vivo* Colchizin-Assays eine funktionelle IL-1 β und IL-18-Analyse, die sie in Relation zu stärker pathogenen Mutationen setzen: PBMCs und Vollblutproben wurden entweder nur mit Clostridium difficile-Toxin A (TcdA) oder mit TcdA in Kombination mit Colchizin behandelt und die IL-1 β - und IL-18-Spiegel im Anschluss in den Kulturüberständen gemessen. Die IL-1 β - und IL-18-Ratio wurde berechnet, indem der Zytokinspiegel der kombinierten Colchicin-

TcdA-Behandlung durch den Zytokinspiegel der Behandlung mit TcdA allein dividiert wurde. Schließlich definierten sie Cut-off Werte, welche FMF-Erkrankungen klar von anderen

inflammatorischen Erkrankungen bzw. gesunden Kontrollen unterscheiden und somit als diagnostisches Instrument angewandt werden können.¹⁶²

In der hier vorliegenden Arbeit konnte zwar eine Gen-Dosis-Beziehung für Caspase-1, IL-18 und von S100A12 sowie von CD62L gezeigt und bestätigt werden³¹, jedoch keine Cut-off-Werte definiert und keine Korrelation zur Krankheitsaktivität hergestellt werden. Aussagen zu Sensivität und Speziifität der untersuchten Parameter können somit nicht klar getroffen werden. Somit werden hier laborchemische Prozesse dargestellt, die statistisch signifikant für das FMF und dessen Genotypen im Sinne einer Gen-Dosis-Beziehung sind und sich von anderen (akuten und chronischen) inflammatorischen Erkrankungen abgrenzen lassen.

Wünschenswert wäre auch eine größere Zahl von Patienten aus den Gruppen der anderen inflammatorischen Erkrankungen gewesen. Allerdings war es schwierig, Patienten zu rekrutieren, die noch nicht mit Steroiden über der vorgegebenen Grenze von 5mg/d behandelt worden waren.

Untersuchungen zur Ätiologie des FMF sind nicht experimenteller Gegenstand dieser Arbeit. Hierzu wären molekularbiologische Analysen einer größeren Patientenkohorte notwendig gewesen. Die Durchführung von molekulargenetischen Tests zur Identifikation von Mutationen im *MEFV*-Gen in einer großen Kohorte von FMF-Patienten (homozygoten sowie compound heterozygoten) und einer großen Kohorte von heterozygoten Mutationsträgern kann bei ausreichend hoher Ableseinformation („sequence reads“) eine Zuordnung der Mutation zur phänotypischen Ausprägung und begleitenden Laborphänomenen ermöglichen. Die Anwendung neuerer Sequenzierungsmethoden liefert mittlerweile eine hohe technische Sensitivität, also eine hohe Sequenziertiefe bei, im Fall des FMF, Beschränkung auf ein krankheitsrelevantes Gen. Um die so generierten Daten aber in Kontext zum Phänotyp zu stellen, also Aussagen zur Krankheitsursache zu liefern, bedarf es u.a. einer hohen Probandenzahl.

Die Erstellung eines Genexpressionsprofils würde weitere Informationen über die Ursachen der Erkrankung liefern. Die Sequenzierung des Gens gibt Informationen über die beteiligte Mutation beim FMF-Patienten, bzw. heterozygoten Mutationsträger. Die Genexpressionsanalyse würde Informationen über das Transkriptom bei FMF-Patienten bzw. FMF-Mutationsträger geben, also die Genaktivität näher beleuchten und Rückschlüsse zur phänotypischen Ausprägung des jeweiligen Probanden erlauben.

Im Gegensatz zum funktionellen Colchizin-Assay von Lamkanfi et al.¹⁶² erfolgten hier keine Vollblut-Analysen, somit setzen die hier verwendeten Verfahren zeitlichen und technischen Aufwand voraus.

4.10 Schlussfolgerung und Ausblick

Das Familiäre Mittelmeerfieber ist eine Erkrankung der Neutrophilen, die sich durch ein spezifisches Aktivierungsmuster von anderen inflammatorischen - akuten wie z.B. Infektionen, als auch chronischen wie z.B. der rheumatoiden Arthritis - abgrenzen lässt. Dieses spezifische Aktivierungsmuster ist gekennzeichnet durch eine erhöhte Spontansekretion von S100A12-Proteinen als auch Caspase-1 und damit einhergehend IL-18 durch Neutrophile und ein rasches erhöhtes CD62L-Shedding von Neutrophilen. Auch wenn bei vielen der hier untersuchten Erkrankungen der Pathomechanismus auch oder überwiegend durch adaptive Immunantworten gesteuert ist, wie TH1- and TH17- vermittelte Prozesse beim M. Crohn¹⁶³, spielen in allen der hier untersuchten Erkrankungen akkumulierte und aktivierte Neutrophile eine wichtige Rolle in Aufrechterhaltung und Eskalation der jeweiligen Krankheitsentität. Auch wenn in der Literatur erhöhte S100A12- und IL-18 Werte z.B. für die rheumatoide Arthritis oder akute Infektionen beschrieben sind^{102,103}, zeigt die vorliegende Arbeit, dass diese Inflammationsparameter beim FMF noch stärker erhöht sind als bei den anderen inflammatorischen Erkrankungen. Bemerkenswert ist hierbei, dass sich alle der hier untersuchten homozygoten / compound heterozygoten FMF-Patienten in einem schubfreien Intervall unter der etablierten oralen Medikation mit Colchizin befanden, währenddessen ein großer Teil der anderen

Patientenpopulationen, wie der mit akuten Infektionen, mit exazerbierter Cystischer Fibrose oder auch zum Teil Patienten mit M. Crohn- oder rheumatischer Erkrankung unter einem akuten

inflammatorischen Prozess zum Zeitpunkt der Blutentnahme litten. Die Medikation könnte als Inhibitor der untersuchten Inflammationsparameter für die Gruppen der anderen inflammatorischen Erkrankungen angeführt werden. Allerdings besteht bei keiner der in diesen Gruppen applizierten, zielgerichteten Therapien ein Target in den hier beim FMF als spezifisch angeführten Inflammationsparameter (auch IL-1 Inhibition wurde als ursächlich für die dargestellten Phänomene beim FMF ausgeschlossen). Und die mit Antibiose behandelten Patienten mit akuter Infektion wiesen zum Zeitpunkt der Blutentnahme alle noch erhöhte CRP-Werte auf, befanden sich also in einem floriden inflammatorischen Prozess. Inwiefern die untersuchten Zytokine / S100A12-Proteine bei anderen Erkrankungen durch andere Zellen sezerniert werden, kann nicht eindeutig ausgeschlossen werden. Interessant ist, dass das rasche und erhöhte CD62L-Shedding als Aktivierungsparameter der Neutrophilen nur bei den FMF-Patienten und im Vergleich zu diesen etwas reduziert bei den heterozygoten FMF-Mutationsträgern gefunden werden konnte. Eventuell spielen in den untersuchten Stadien in den Gruppen der anderen inflammatorischen Erkrankungen die anderen Selektine eine größere Rolle, oder die Stimulation findet bei anderen Erkrankungen nicht über G-Protein-gebundene Chemoattractant-Rezeptoren statt, sondern beispielsweise über Immunkomplexe (zumindest in den untersuchten Krankheitsstadien).

Bemerkenswert ist die Gen-Dosis-Wirkungs-Beziehung, die durch Frau Dr. Freytag bereits untersucht wurde, die sich auch in dieser Arbeit in einer Erhöhung der untersuchten Inflammationsparameter bei den heterozygoten FMF-Mutationsträgern widerspiegelte. Diese Erhöhung lag unter derjenigen der homozygot/compound heterozygoten FMF-Patienten und erreichte bei einem heterozygot kranken Patienten (Daten nicht gezeigt) Werte, den homozygot/compound heterozygot gesunden FMF-Patienten vergleichbar.

Die exakte Kenntnis des differenzierten Wechselspiels von Immunzellen, Zytokinen, Chemokinen, aktivierenden Enzymen, Rezeptoren und Interleukin-Rezeptor-Antagonisten ist nicht nur wichtig im Hinblick auf die komplexe Diagnose des FMF sondern auch im Hinblick auf eventuelle therapeutische Optionen, auch bei anderen inflammatorischen Erkrankungen. Die Entwicklung beispielsweise von Sheddase-Inhibitoren oder IL-18-Inhibitoren bergen therapeutisches Potential, aber auch das Risiko von gravierenden Nebenwirkungen oder frustrierten Therapieversuchen, weitere Kenntnisse von Sekretionswegen und Wirkungen der Inflammationsparameter sind entscheidend.^{164,165}

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche tragen zum Verständnis der am FMF beteiligten Inflammationswege bei. Die Ergebnisse dieser Arbeit stützen die Hypothese, dass neutrophile Granulozyten eine wichtige Rolle in der Pathogenese des FMF spielen und liefern weitere Bausteine, die für das Verstehen dieses Krankheitsbildes wichtig sind.

5 Literaturverzeichnis

1 Chae JJ, Aksentijevich I and Kastner DL. Advances in the understanding of familial Mediterranean fever and possibilities for targeted therapy. *Br J Haematol*. 2009 Sep;146(5):467-78. doi: 10.1111/j.1365-2141.2009.07733.x. Epub 2009 May 14.

2 Ochs HD, Smith CIE and Puck JM. *Primary Immunodeficiency Diseases: A Molecular & Cellular Approach*. 2nd Edition. Oxford University Press.

3 Gattorno M et al. *Familial Mediterranean Fever*. Springer International Publishing Switzerland 2015. doi.org/10.1007/978-3-319-14615-7

4 Kallinich T and Wittkowski H. *Familiäres Mittelmeerfieber*. UNI-MED. 1. Auflage 2014

5 Lachmann HJ. Periodic Fever Syndromes. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2017 Aug;31(4):596-609. doi: 10.1016/j.berh.2017.12.001. Epub 2018 Jan 11

6 Romano M, Piskin D, Berard RA, Jackson BC, Acikel C, Carrero JJ, Lachmann HL, Yilmaz MI and Demirkaya E. Cardiovascular disease risk assessment in patients with familial Mediterranean fever related renal amyloidosis. *Sci Rep*. 2020 Oct 27;10(1):18374. doi: 10.1038/s41598-020-75433-7.

7 Balci-Peynircioğlu B, Kaya-Akça Ü, Serap Arıcı Z, Avcı E, Akkaya-Ulum ZY, Karadağ Ö, Kalyoncu U, Bilginer Y, Yılmaz E, Özen S. Comorbidities in familial Mediterranean fever: analysis of 2000 genetically confirmed patients. *Rheumatology (Oxford)*. 2020 Jun 1;59(6):1372-1380. doi: 10.1093/rheumatology/kez410.

8 Hoang TK., Albert DA. Novel presentations of periodic fever syndromes: Discrepancies between genetic and clinical diagnoses. *European Journal of Rheumatology*. 2018 6 (1), 12-18. doi: 10.5152/eurjrheum.2018.18023

9 Booty MG, Chae JJ, Masters SL, Remmers EF, Barham B, Lee JM, Barron KS, Holland S, Kastner DL and Aksentijevich I. Familial Mediterranean fever with a single MEFV mutation: Where is the second hit? *Arthritis Rheum*. 2009 Jun; 60(6): 1851–1861. doi: 10.1002/art.24569

10 Lachmann HJ, Sengül B, Yavuzşen TU, Booth DR, Booth SE, Bybee A, Gallimore JR, Soytürk 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 (Oxford)*. 2006 Jun;45(6):746-50. doi: 10.1093/rheumatology/kei279. Epub 2006 Jan 10.

11 Koné-Paut I, Hentgen V, Guillaume-Czitrom S, Compeyrot-Lacassagne S, Tran T-A, Touitou I. The clinical spectrum of 94 patients carrying a single mutated MEFV allele. *Rheumatology (Oxford)*. 2009 Jul;48(7):840-2. doi: 10.1093/rheumatology/kep121. Epub 2009 May 22.

12 Marek-Yagel D, Berkun Y, Padeh S, Abu A, Reznik-Wolf H, Livneh A, Pras M and Pras E. Clinical disease among patients heterozygous for familial mediterranean fever. *Arthritis Rheum*. 2009 Jun;60(6):1862-6. doi: 10.1002/art.24570.

13 Booth DR, Gillmore JD, Lachmann HJ, Booth SE, Bybee A, Soytürk M, Akar S, Pepys MB, Tunca M, Hawkins PN. The genetic basis of autosomal dominant familial Mediterranean fever. *QJM*. 2000 Apr;93(4):217-21. doi: 10.1093/qjmed/93.4.217.

- 14 Procopio V, Manti S, Bianco G, Conti G, Romeo A, Maimone F, Arrigo T, Cutrupi MC, Salpietro C and Cuppari C. Genotype-phenotype correlation in FMF patients: A “non classic” recessive autosomal or “atypical” dominant autosomal inheritance? *Gene*. 2018 Jan 30;641:279-286. doi: 10.1016/j.gene.2017.10.068. Epub 2017 Nov 6.
- 15 Soriano A, Manna R. Familial Mediterranean fever: New phenotypes. *Autoimmun Rev*. 2012 Nov;12(1):31-7. doi: 10.1016/j.autrev.2012.07.019.
- 16 Grossman C, Kassel Y, Livneh A, Ben-Zvi I. Familial Mediterranean fever (FMF) phenotype in patients homozygous to the MEFV M694V mutation. *Eur J Med Genet*. 2019 Jun;62(6):103532. doi: 10.1016/j.ejmg.2018.08.013. Epub 2018 Aug 29.
- 17 Cekin N, Akyurek ME, Pinarbasi E and Ozen F. MEFV mutations and their relation to major clinical symptoms of Familial Mediterranean Fever. *Gene*. 2017 Aug 30;626:9-13. doi: 10.1016/j.gene.2017.05.013. Epub 2017 May 5.
- 18 Sing S, Chaudhary J and Meyerhoff J. A rare complex mutation in FMF gene; genetics and treatment decisions in Familial Mediterranean Fever patients. *International Journal of Clinical Rheumatology*. 2018; 13(3). doi: 10.4172/1758-4272.1000186
- 19 INFEVERS Register, Link: <https://infevers.umai-montpellier.fr/web/>
- 20 Padeh S, Shinar Y, Pras E, Zemer D, Langevitz P, Pras M, Livneh A. Clinical and diagnostic value of genetic testing in 216 Israeli children with Familial Mediterranean fever. *J Rheumatol*. 2003 Jan;30(1):185-90.
- 21 Shinar Y, Livneh A, Langevitz P, Zaks N, Aksentijevich I, Koziol DE, Kastner DL, Pras M and Pras E. Genotype-phenotype assessment of common genotypes among patients with familial Mediterranean fever. *J Rheumatol*. 2000 Jul;27(7):1703-7.
- 22 Sohar E, Gafni J, Pras M and Heller H. Familial Mediterranean fever. A survey of 470 cases and review of the literature. *Am J Med*. 1967 Aug;43(2):227-53. doi: 10.1016/0002-9343(67)90167-2.
- 23 Livneh A, [Langevitz P](#), Zemer D, Zaks N, Kees S, Lidar T, Migdal A, Padeh S, and Pras M. Criteria for the diagnosis of familial mediterranean fever. *Arthritis Rheum*. 1997 Oct;40(10):1879-85. doi: 10.1002/art.1780401023
- 24 Yalçinkaya F, Ozen S, Ozçakar ZB, Aktay N, Cakar N, Düzova A, Kasapçopur O, Elhan AH, Doganay B, Ekim M, Kara N, Uncu N and Bakkaloglu A. A new set of criteria for the diagnosis of familial Mediterranean fever in childhood. *Rheumatology (Oxford)*. 2009 Apr;48(4):395-8. doi: 10.1093/rheumatology/ken509. Epub 2009 Feb
- 25 Gattorno M, Hofer M, Federici S, Vanoni F, Bovis F, Aksentijevich I, Anton J, Arostegui JI, Barron K, Ben-Cherit E, Brogan PA, Cantarini L, Ceccherini I, De Benedetti F, Dedeoglu F, Demirkaya E, Frenkel J, Goldbach-Mansky R, Gul A, Hentgen V, Hoffman H, Kallinich T, Kone-Paut I, Kuemmerle-Deschner J, Lachmann HJ, Laxer RM, Livneh A, Obici L, Ozen S, Rowczenio D, Russo R, Shinar Y, Simon A, Toplak N, Touitou I, Uziel Y, van Gijn M, Foell D, Garassino C, Kastner D, Martini A, Sormani MP, Ruperto N. . Eurofever Registry and the Paediatric Rheumatology International Trials Organisation (PRINTO). *Ann Rheum Dis*. 2019 Aug;78(8):1025-1032. doi: 10.1136/annrheumdis-2019-215048. Epub 2019 Apr 24.

- 26 Pras E, Livneh A, Balow Jr JE, Pras E, Kastner DL, Pras M and Langevitz P. Clinical differences between North African and Iraqi Jews with familial Mediterranean fever. *Am J Med Genet.* 1998 Jan 13;75(2):216-9. doi: 10.1002/(sici)1096-8628(19980113)75:2<216::aid-ajmg20>3.0.co;2-r.
- 27 Mor A, Shinar Y, Zaks N, Langevitz P, Chetrit A, Shtrasburg S, Rabinovitz E and Livneh A. Evaluation of Disease Severity in Familial Mediterranean Fever. *Semin Arthritis Rheum.* 2005 Aug;35(1):57-64. doi: 10.1016/j.semarthrit.2005.02.002.
- 28 Ozen S, Demirkaya E, Duzova A, Erdogan O, Erken E, Gul A, Kasapcopur O, Kasifoglu T, Kisacik B, Ozdogan H, Tunca M, Acikel C. FMF50: a score for assessing outcome in familial Mediterranean fever. *Ann Rheum Dis.* 2014 May;73(5):897-901. doi: 10.1136/annrheumdis-2013-204719. Epub 2014 Feb 25. doi: 10.1136/annrheumdis-2013-204719.
- 29 Çakan M, Karadağ ŞG, Tanatar A, Sönmez HE and Ayaz NA. The Value of Serum Amyloid A Levels in Familial Mediterranean Fever to Identify Occult Inflammation During Asymptomatic Periods. *J Clin Rheumatol.* 2021 Jan 1;27(1):1-4. doi: 10.1097/RHU.0000000000001134.
- 30 Korkmaz C, Özdoğan H, Kasapçopur Ö and Yazici H. Acute phase response in familial Mediterranean fever. *Ann Rheum Dis.* 2002 Jan;61(1):79-81. doi: 10.1136/ard.61.1.79.
- 31 Gohar F, Orak B, Kallinich T, Jeske M, Lieber M, von Bernuth H, Giese A, Weissbarth-Riedel E, Haas J-P, Dressler F, Holzinger D, Lohse P, Neudorf U, Lainka E, Hinze C, Masjosthusmann K, Kessel C, Weinhage T, Foell D and Wittkowski H. Correlation of Secretory Activity of Neutrophils With Genotype in Patients With Familial Mediterranean Fever. *Arthritis Rheumatol.* 2016 Dec;68(12):3010-3022. doi: 10.1002/art.39784.
- 32 Knieper AM, Klotsche J, Lainka E, Berger T, Dressler F, Jansson AF, Rietschel C, Oommen PT, Berendes R, Niehues T, Neudorf U, Foell D, Wittkowski H and Kallinich T. Familial Mediterranean fever in children and adolescents: factors for colchicine dosage and predicting parameters for dose increase. *Rheumatology (Oxford).* 2017 Sep 1;56(9):1597-1606. doi: 10.1093/rheumatology/kex222.
- 33 Akkaya-Ulum YZ, Akbaba TH, Tavukcuoglu , Chae JJ, Yilmaz E, Ozen S, Balci-Peynircioglu B. Familial Mediterranean fever-related miR-197-3p targets IL1R1 gene and modulates inflammation in monocytes and synovial fibroblasts. *Sci Rep* 11, 685 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80097-4>
- 34 Wada T, Toma T, Matsuda Y, Yachie A, Itami S, Taguchi Y-h and Murakami Y. Microarray analysis of circulating microRNAs in familial Mediterranean fever. *Modern Rheumatology.* 2017, 27:6, 1040-1046, doi: 10.1080/14397595.2017.1285845
- 35 Goldfinger SE. Colchicine for familial Mediterranean fever. *N Engl J Med.* 1972 Dec 21;287(25):1302. doi: 10.1056/NEJM197212212872514.
- 36 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 Oct 31;291(18):934-7. doi: 10.1056/NEJM197410312911804.
- 37 Zemer D, Pras M, Sohar E and Gafni J. Letter: Colchicine in familial Mediterranean fever. *N Engl J Med.* 1976 Jan 15;294(3):170-1. doi: 10.1056/NEJM197601152940327.

- 38 Leung YY, Hui LLY and Kraus VB. Colchicine-Update on mechanisms of action and therapeutic uses. *Semin Arthritis Rheum.* 2015 Dec;45(3):341-50. doi: 10.1016/j.semarthrit.2015.06.013. Epub 2015 Jun 26.
- 39 Slobodnick A, Shah B, Pillinger MH and Krasnokutsky S. Colchicine: old and new. *Am J Med.* 2015 May;128(5):461-70. doi: 10.1016/j.amjmed.2014.12.010. Epub 2014 Dec 30.
- 40 Terkeltaub RA. Colchicine update: 2008. *Semin Arthritis Rheum.* 2009 Jun;38(6):411-9. doi: 10.1016/j.semarthrit.2008.08.006. Epub 2008 Oct 29.
- 41 Paschke S, Weidner AF, Paust T, Marti O, Beil M and Ben-Chetrit E. Technical advance: Inhibition of neutrophil chemotaxis by colchicine is modulated through viscoelastic properties of subcellular compartments. *J Leukoc Biol.* 2013 Nov;94(5):1091-6. doi: 10.1189/jlb.1012510. Epub 2013 Jul 30.
- 42 Park YH, Wood G, Kastner DL and Chae JJ. Pypin inflammasome activation and RhoA signaling in the autoinflammatory diseases FMF and HIDS. *Nat Immunol.* 2016 Aug;17(8):914-21. doi: 10.1038/ni.3457. Epub 2016 Jun 6.
- 43 Ben-Chetrit E. (2019) Colchicine. In: Hashkes P., Laxer R., Simon A. (eds) *Textbook of Autoinflammation.* Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-98605-0_40
- 44 Misawa T, Takahama M, Kozaki T, Lee H, Zou J, Saitoh T and Akira S. Microtubule-driven spatial arrangement of mitochondria promotes activation of the NLRP3 inflammasome. *Nat Immunol.* 2013 May;14(5):454-60. doi: 10.1038/ni.2550. Epub 2013 Mar 17.
- 45 Özen S, Batu ED and Demir S. Familial Mediterranean Fever: Recent Developments in Pathogenesis and New Recommendations for Management. *Front Immunol.* 2017 Mar 23;8:253. doi: 10.3389/fimmu.2017.00253. eCollection 2017.
- 46 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, Daniel Kastner D and Carmona L. EULAR recommendations for the management of familial Mediterranean fever. *Ann Rheum Dis.* 2016 Apr;75(4):644-51. doi: 10.1136/annrheumdis-2015-208690. Epub 2016 Jan 22.
- 47 Kallinich T, Blank N, Braun T, Feist E, Kiltz U, Neudorf U, Oommen PT, Weseloh C, Wittkowski H, Braun J. Evidence-based treatment recommendations for familial Mediterranean fever : A joint statement by the Society for Pediatric and Adolescent Rheumatology and the German Society for Rheumatology. *Z Rheumatol.* 2019 Feb;78(1):91-101. doi: 10.1007/s00393-018-0588-1.
- 48 Ozen S., Kone-Paut I., Gül A. Colchicine resistance and intolerance in familial mediterranean fever: Definition, causes, and alternative treatments. *Semin Arthritis Rheum.* 2017 Aug;47(1):115-120. doi: 10.1016/j.semarthrit.2017.03.006. Epub 2017 Mar 20.
- 49 Ben-Zvi I, Kukuy O, Giat E, Pras E, Feld O, Kivity S, Perski O, Bornstein G, Grossman C, Harari G, Lidar M and Livneh A. Anakinra for Colchicine-Resistant Familial Mediterranean Fever: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Arthritis Rheumatol.* 2017 Apr;69(4):854-862. doi: 10.1002/art.39995.
- 50 Köhler BM, Lorenz HM and Blank N. IL1-blocking therapy in colchicine-resistant familial Mediterranean fever. *Eur J Rheumatol.* 2018 Dec;5(4):230-234. doi: 10.5152/eurjrheum.2018.18036. Epub 2018 Oct 12.

51 De Benedetti F, Gattorno M, Anton J, Ben-Chetrit E, Frenkel J, Hoffman HM, Koné-Paut I, Lachmann HJ, Ozen S, Simon A, Zeft A, Penades IC et al. Canakinumab for the Treatment of Autoinflammatory Recurrent Fever Syndromes. *N Engl J Med*. 2018 May 17;378(20):1908-1919. doi: 10.1056/NEJMoa1706314.

52 Hashkes PJ, Spalding SJ, Giannini EH, Huang B, Johnson A, Park G, Barron KS, Weisman MH, Pashinian N, Reiff AO, Samuels J, Wright DA, Kastner DL and Lovell DJ. Riloncept for Colchicine-Resistant or -Intolerant Familial Mediterranean Fever A Randomized Trial. *Ann Intern Med*. 2012 Oct 16;157(8):533-41. doi: 10.7326/0003-4819-157-8-201210160-00003.

53 Yılmaz S, Tekgöz E and Çınar M. Recurrence of proteinuria after cessation of tocilizumab in patients with AA amyloidosis secondary to FMF. *Eur J Rheumatol*. 2018 Dec; 5(4): 278–280. Published online 2018 Jul 20. doi: 10.5152/eurjrheum.2018.17183

54 Tweezer-Zaks N, Rabinovich E, Lidar M and Livneh A. Interferon-alpha as a treatment modality for colchicine-resistant familial Mediterranean fever. *J Rheumatol*. 2008 Jul;35(7):1362-5. Epub 2008 Jun 1.

55 Seyahi E, Ozdogan H, Masatlioglu S and Yazici H. Successful treatment of familial Mediterranean fever attacks with thalidomide in a colchicine resistant patient. *Clin Exp Rheumatol*. Jul-Aug 2002;20(4 Suppl 26):S43-4.

56 Smolen JS, Landewé RBM, Bijlsma JWJ, Burmester GR, Dougados M, Kerschbaumer A, McInnes IB, Sepriano A, van Vollenhoven RF, de Wit M, Aletaha D, Aringer M, Askling J, Balsa A, Boers M, den Broeder AA, Buch MH, Buttgerit F, Caporali R, Cardiel MH, De Cock D, Codreanu C, Cutolo M, Edwards CJ, van Eijk-Hustings Y, Emery P, Finckh A, Gossec L, Jacques-Eric Gottenberg JE, Hetland ML, Huizinga TWJ, Koloumas M, Li Z, Mariette X, Müller-Ladner U, Mysler EF, da Silva JAP, Poór G, Pope JE, Rubbert-Roth A, Ruysen-Witrand A, Saag KG, Strangfeld A, Takeuchi T, Voshaar M, Westhovens R and van der Heijde D. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2019 update. *Ann Rheum Dis*. 2020 Jun;79(6):685-699. doi: 10.1136/annrheumdis-2019-216655. Epub 2020 Jan 22.

57 Singh JA, Saag KG, Bridges Jr SL, Akl EA, Bannuru RR, Sullivan MC, Vaysbrot E, McNaughton C, Osani M, Shmerling RH, Curtis JR, Furst DE, Parks D, Kavanaugh A, O'Dell J, King C, Leong A, Matteson EL, Schousboe JT, Drevlow B, Ginsberg S, Grober J, St.Clair EW, Tindall E, Miller AS and McAlindon T. 2015 American College of Rheumatology Guideline for the Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol*. 2016 Jan;68(1):1-26. doi: 10.1002/art.39480. Epub 2015 Nov 6.

58 Seyahi E, Ozdogan H, Celik S, Ugurlu H and Yazici H. Treatment options in colchicine resistant familial Mediterranean fever patients: thalidomide and etanercept as adjunctive agents. *Clin Exp Rheumatol*. Sep-Oct 2006;24(5 Suppl 42):S99-103.

59 Murphy, KM. et. al. *Janeway Immunology*. SpringerSpektrum. 9th edition. 29th of June 2018.

60 Petin EC, Thompson A, Orr SJ. Pattern recognition receptors in fungal immunity. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. *Semin Cell Dev Biol*. 2019 May;89:24-33. doi: 10.1016/j.semcdb.2018.03.003. Epub 2018 Mar 9.3

61 Takeuchi O, Shizuo A. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell*. 2010 Mar 19;140(6):805-20. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.022.

- 62 Arnould D, Soares F, Tattoli I, Castanier C, Philipott D, und Girardin S. An N-terminal addressing sequence targets NLRX1 to the mitochondrial matrix. *J Biol Chem*. 2014 Jul 11; 289(28): 19317–19330. Published online 2014 May 27. doi: 10.1074/jbc.M114.550111
- 63 Bauernfeind FG, Horvath G, Stutz A, Alnemri ES, MacDonald K, Speert D, Fernandes-Alnemri T, Wu J, Monks BG, Fitzgerald KA, Hornung V and Latz E. Cutting Edge: NF- κ B Activating Pattern Recognition and Cytokine Receptors License NLRP3 Inflammasome Activation by Regulating NLRP3 Expression. *J Immunol* July 15, 2009, 183 (2) 787-791; doi: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901363>
- 64 Lamkanfi M and Dixit VM. Inflammasomes and their roles in health and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2012;28:137-61. doi: 10.1146/annurev-cellbio-101011-155745. Epub 2012 Sep 10.
- 65 Latz E, Xiao TS and Stutz A. Activation and regulation of the inflammasomes. *Nat Rev Immunol*. 2013 Jun;13(6):397-411. doi: 10.1038/nri3452.5
- 66 Cassel SL and Sutterwala FS. Sterile inflammatory responses mediated by the NLRP3 inflammasome. *Eur J Immunol*. 2010 Mar;40(3):607-11. doi: 10.1002/eji.200940207.
- 67 Martinon F, Burns K and Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell*. 2002 Aug;10(2):417-26. doi: 10.1016/s1097-2765(02)00599-3.
- 68 Guo H, Callaway JB, Ting J PY. Inflammasomes: Mechanism of Action, Role in Disease, and Therapeutics. *Nat Med*. 2015 Jul;21(7):677-87. doi: 10.1038/nm.3893. Epub 2015 Jun 29.
- 69 Van Opdenbosch N., Lamkanfi M. Caspases in Cell Death, Inflammation, and Disease. *Immunity*. 2019 Jun 18;50(6):1352-1364. doi:10.1016/j.immuni.2019.05.020.
- 66 Lamkanfi M and Dixit VM. Mechanisms and Functions of Inflammasomes. *Cell*. 2014 May 22;157(5):1013-22. doi: 10.1016/j.cell.2014.04.007.
- 70 Kayagaki N, Warming S, Lamkanfi M, Vande Walle L, Louie S, Dong J, Newton K, Qu Y, Liu J, Heldens S, Zhang J, Lee WP, Roose-Girma M, Dixit VM. Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. *Nature*. 2011 Oct 16;479(7371):117-21. doi: 10.1038/nature10558.
- 71 Yi YS. Caspase-11 non-canonical inflammasome: a critical sensor of intracellular lipopolysaccharide in macrophage-mediated inflammatory responses. *Immunology* **152** (2), 207-217. doi: 10.1111/imm.12787 (2017)
- 72 Yi Y-S. Functional crosstalk between non-canonical caspase-11 and canonical NLRP3 inflammasomes during infection-mediated inflammation. *Immunology*. 2017 Oct;152(2):207-217. doi: 10.1111/imm.12787. Epub 2017 Jul 31.
- 73 Kayagaki N, Stowe IB, Lee BL, O'Rourke K, Anderson K, Warming S, Cuellar T, Haley B, Girma MR, Phung QT, Liu PS, Lill JR, Li H, Wu J, Kummerfeld S, Zhang J, Lee WP, Snipas SJ, Salvesen GS, Morris LX, Fitzgerald L, Zhang Y, Bertram EM, Goodnow CC, Dixit VM. Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling. *Nature*. 2015 Oct 29;526(7575):666-71. doi: 10.1038/nature15541. Epub 2015 Sep 16.
- 74 Kanneganti A, Malireddi RK, Saavedra PHV, Vande Walle L, Van Gorp H, Kambara H, Tillman H, Vogel P, Luo HR, Xavier RJ, Chi H, Lamkanfi M. GSDMD is critical for autoinflammatory pathology in a mouse

model of Familial Mediterranean Fever. *J Exp Med*. 2018 Jun 4;215(6):1519-1529. doi: 10.1084/jem.20172060. Epub 2018 May 23.

75 Schnappauf O, Chae JJ, Kastner DL, Aksentijevich I. The Pyrin Inflammasome in Health and Disease. *Frontiers in Immunology* **10**. doi: 10.3389/fimmu.2019.01745 (2019)

76 Park YH, Wood G, Kastner DL, Chae JJ. Pyrin inflammasome activation and RhoA signaling in the autoinflammatory diseases FMF and HIDS. *Nat Immunol*. 2016 Aug;17(8):914-21. doi: 10.1038/ni.3457. Epub 2016 Jun 6.

77 Just I, Selzer J, Wilm M, von Eichel-Streiber C, Mann M, Aktories K. Glucosylation of Rho proteins by Clostridium difficile toxin B. *Nature*. 1995 Jun 8;375(6531):500-3. doi: 10.1038/375500a0.

78 Phillipson M, Heit B, Colarusso P, Liu L, Ballantyne CM and Kubes P. Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. *J Exp Med*. 2006 Nov 27;203(12):2569-75. doi: 10.1084/jem.20060925. Epub 2006 Nov 20.

79 O'Brien CD, Lim P, Sun J and Steven M Albelda. PECAM-1-dependent neutrophil transmigration is independent of monolayer PECAM-1 signaling or localization. *Blood*. 2003 Apr 1;101(7):2816-25. doi: 10.1182/blood-2002-08-2396. Epub 2002 Dec 5.

80 Xia Y, Borland G, Huang J, Mizukami IF, Petty HR, Todd 3rd RF and Ross GD. Function of the lectin domain of Mac-1/complement receptor type 3 (CD11b/CD18) in regulating neutrophil adhesion. *J Immunol*. 2002 Dec 1;169(11):6417-26. doi: 10.4049/jimmunol.169.11.6417.

81 Newman PJ, Berndt MC, Gorski J, White 2nd GC, Lyman S, Paddock C and Muller WA. PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. *Science*. 1990 Mar 9;247(4947):1219-22. doi: 10.1126/science.1690453.

82 Nourshargh S and Alon R. Leukocyte migration into inflamed tissues. *Immunity*. 2014 Nov 20;41(5):694-707. doi: 10.1016/j.immuni.2014.10.008.

83 Heit B, Colarusso P and Kubes P. Fundamentally different roles for LFA-1, Mac-1 and alpha4-integrin in neutrophil chemotaxis. *J Cell Sci*. 2005 Nov 15;118(Pt 22):5205-20. doi: 10.1242/jcs.02632. Epub 2005 Oct 25.

84 Ivetic A. A head-to-tail view of L-selectin and its impact on neutrophil behaviour. *Cell Tissue Res*. 2018 Mar;371(3):437-453. doi: 10.1007/s00441-017-2774-x. Epub 2018 Jan 20.

85 Deng W, Srinivasan S, Zheng X, Putkey JA and Li R. Interaction of calmodulin with L-selectin at the membrane interface: implication on the regulation of L-selectin shedding. *J Mol Biol*. 2011 Aug 5;411(1):220-33. doi: 10.1016/j.jmb.2011.05.041. Epub 2011 Jun 2.

86 Zhang L. The α M β 2 integrin and its role in neutrophil function. *Cell Res*. 1999 Sep;9(3):171-8. doi: 10.1038/sj.cr.7290015.

87 Coxon A, Rieu P, Barkalow FJ, Askari S, Sharpe AH, von Andrian UH, Arnaout MA and Mayadas TN. A novel role for the beta 2 integrin CD11b/CD18 in neutrophil apoptosis: a homeostatic mechanism in inflammation. *Immunity*. 1996 Dec;5(6):653-66. doi: 10.1016/s1074-7613(00)80278-2.

- 88 Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P and Halbwachs-Mecarelli L. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest.* 2000 May;80(5):617-53. doi: 10.1038/labinvest.3780067.
- 89 Kuhns DB, Alvord WG, Heller T, Feld JJ, Pike KM, Marciano BE, Uzel G, DeRavin SS, Long Priel DA, Soule BP, Zarembek KA, Malech HL, Holland SM, Gallin JI. Residual NADPH oxidase and survival in chronic granulomatous disease. *N Engl J Med.* 2010 Dec 30;363(27):2600-10. doi: 10.1056/NEJMoa1007097.
- 90 Brinkmann V and Zychlinsky A. Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nat. Rev. Microbiol.* 2007 Aug; 5, 577–582. doi: 10.1038/nrmicro1710
- 91 Khan MA, Ali ZS, Swezey N, Grasemann H and Palaniyar N. Progression of Cystic Fibrosis Lung Disease from Childhood to Adulthood: Neutrophils, Neutrophil Extracellular Trap (NET) Formation, and NET Degradation. *Genes (Basel).* 2019 Mar; 10(3): 183. Published online 2019 Feb 26. doi: 10.3390/genes10030183
- 92 Wright HL, Moots RJ and Edwards SW. The multifactorial role of neutrophils in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2014 Oct;10(10):593-601. doi: 10.1038/nrrheum.2014.80. Epub 2014 Jun 10.
- 93 Fournier BM and Parkos CA. The role of neutrophils during intestinal inflammation. *Mucosal Immunol.* 2012 Jul;5(4):354-66. doi: 10.1038/mi.2012.24. Epub 2012 Apr 11.
- 74 Tillet WS and Francis TJ. Serological reactions in pneumonia with a non-protein somatic fraction of pneumococcus. *J Exp Med.* 1930 Sep 30; 52(4): 561–571. doi: 10.1084/jem.52.4.561
- 94 Bilton D, Canny G, Conway S, Dumcius S, Hjelte L, Proesmans M, Tummeler B, Vavrova V and DE Boeck K. Pulmonary exacerbation: towards a definition for use in clinical trials. Report from the EuroCareCF Working Group on outcome parameters in clinical trials. *J Cyst Fibros.* 2011 Jun;10 Suppl 2:S79-81. doi: 10.1016/S1569-1993(11)60012-X.
- 95 Harvey RF and Bradshaw JM. A simple index of Crohn's-disease activity. *Lancet.* 1980 Mar 8;1(8167):514. doi: 10.1016/s0140-6736(80)92767-1.
- 96 Fransen J, van Riel PLCM. The Disease Activity Score and the EULAR response criteria. *Clin Exp Rheumatol.* Sep-Oct 2005;23(5 Suppl 39):S93-9.
- 97 Janossy G. Clinical flow cytometry, a hypothesis-driven discipline of modern cytomics. *Cytometry A.* 2004 Mar;58(1):87-97. doi: 10.1002/cyto.a.20011.
- 98 Shapiro HM. *Practical Flow Cytometry.* 2003 4th ed. New York, Wiley-Liss
- 99 Maecker HT, Frey T, Nomura LE and Trotter J. Selecting fluorochrome conjugates for maximum sensitivity. *Cytometry A.* 2004 Dec;62(2):169-73. doi: 10.1002/cyto.a.20092.
- 100 Khan SS, Smith MS, Reda D, Suffredini AF, McCoy Jr JP. Multiplex bead array assays for detection of soluble cytokines: comparisons of sensitivity and quantitative values among kits from multiple manufacturers. *Cytometry B Clin Cytom.* 2004 Sep;61(1):35-9. doi: 10.1002/cyto.b.20021.
- 101 Tillet WS and Francis TJ. Serological reactions in pneumonia with a non-protein somatic fraction of pneumococcus. *J Exp Med.* 1930 Sep 30; 52(4): 561–571. doi: 10.1084/jem.52.4.561

- 102 Holzinger D, Foell D and Christoph Kessel C. The role of S100 proteins in the pathogenesis and monitoring of autoinflammatory diseases. *Molecular and Cellular Pediatrics*. 2018 Sep; 5(1):7. doi: 10.1186/s40348-018-0085-2.
- 103 Foell D, Roth J. Proinflammatory S100 proteins in arthritis and autoimmune disease. *Arthritis Rheum*. 2004 Dec;50(12):3762-71. doi: 10.1002/art.20631.
- 104 Guignard F, Mauel J and Markert M. Identification and characterization of a novel human neutrophil protein related to the S100 family. *Biochem J*. 1995 Jul; 309(Pt 2): 395–401. doi: 10.1042/bj3090395
- 105 Ilg EC, Troxler H, Bürgisser DM, Kuster T, Markert M, Guignard F, Hunziker P, Birchler N, Heizmann CW. Amino acid sequence determination of human S100A12 (P6, calgranulin C, CGRP, CAAF1) by tandem mass spectrometry. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996 Aug 5;225(1):146-50. doi: 10.1006/bbrc.1996.1144.
- 106 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 Jun 25;97(7):889-901. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80801-6.
- 107 Yang Z, Tao T, Raftery MJ, Youssef P, Di Girolamo N, Geczy CL. Proinflammatory properties of the human S100 protein S100A12. *Journal J Leukoc Biol*. 2001 Jun;69(6):986-94.
- 108 Rouleau P, Vandal K, Ryckman C, Poubelle PE, Boivin A, Talbot M, Tessier PA. The calcium-binding protein S100A12 induces neutrophil adhesion, migration, and release from bone marrow in mouse at concentrations similar to those found in human inflammatory arthritis. *Clin Immunol*. 2003 Apr;107(1):46-54. doi: 10.1016/s1521-6616(02)00043-8.
- 109 Foell D, Kane D, Bresnihan B, Vogl T, Nacken W, Sorg C, Fitzgerald O and Roth J. Expression of the pro-inflammatory protein S100A12 (EN-RAGE) in rheumatoid and psoriatic arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2003 Nov;42(11):1383-9. doi: 10.1093/rheumatology/keg385. Epub 2003 Jun 27.
- 110 Foell D, Wittkowski H, Ren Z, Turton J, Pang G, Daebritz J, Ehrchen J, Heidemann J, Borody T, Roth J and Clancy R. Phagocyte-specific S100 proteins are released from affected mucosa and promote immune responses during inflammatory bowel disease. *J Pathol*. 2008 Oct;216(2):183-92. doi: 10.1002/path.2394.
- 111 Robertson SE, Young JD, Kitson S, Pitt A, Evans J, Roes J. Expression and alternative processing of IL-18 in human neutrophils. *Innate Immunity. European Journal of Immunology*. 2006. 36: 722-731. doi.org/10.1002/eji.200535402.
- 112 Nakamura S., Otani T., Okura R, Ijiri Y, Motoda R, Kurimoto M & Orita K. Expression and responsiveness of human interleukin-18 receptor (IL-18R) on hematopoietic cell lines. *Leukemia* 14, 1052–1059 (2000). <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2401789>
- 113 McInnes IB, Liew FY, Gracie JA. Interleukin-18: a therapeutic target in rheumatoid arthritis? *Arthritis Res Ther*. 2005;7(1):38-41. doi: 10.1186/ar1497. Epub 2004 Dec 17.

- 114 Leung BP, Culshaw S, Gracie JA, Hunter D, Canetti CA, Campbell C et al., *J Immunol*. A Role for IL-18 in Neutrophil Activation. 2001; 167 (5) 2879-2886; doi: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.5.2879>
- 115 Rubartelli, A, Cozzolino, F, Talio, M & Sitia, R. A novel secretory pathway for interleukin-1 beta, a protein lacking a signal sequence. *EMBO J* 1990; 9: 1503-1510.
- 116 Monteleone, M, Stow, JL & Schroder, K. Mechanisms of unconventional secretion of IL-1 family cytokines. *Cytokine*. 2015 Aug;74(2):213-8. doi: 10.1016/j.cyto.2015.03.022. Epub 2015 Apr 25.
- 117 MacKenzie A, Wilson HL, Kiss-Toth E, Dower SK, North RA, Surprenant A. Rapid Secretion of Interleukin-1 β by Microvesicle Shedding. *Immunity*. 2001 Nov; 15 (5): 825-835. doi.org/10.1016/S1074-7613(01)00229-1
- 118 Andrei C, Dazzi C, Lotti L, Torrisi MR, Chimini G, and Rubartelli A. The Secretory Route of the Leaderless Protein Interleukin 1 β Involves Exocytosis of Endolysosome-related Vesicles. *Molecular Biology of the Cell*. 2017 Oct; 10 (5). doi.org/10.1091/mbc.10.5.1463
- 119 Heilig R, Dick MS, Sborgi L, Meunier E, Hiller S, Broz P. The Gasdermin-D pore acts as a conduit for IL-1 β secretion in mice. *Eur J Immunol*. 2018 Apr; 48(4):584-592. doi: 10.1002/eji.201747404. Epub 2018 Jan 15.
- 120 Ghayur, T., Banerjee, S., Hugunin, M., Butler, D., Herzog, L., Carter, A., Quintal, L. et al., Caspase-1 processes IFN-gamma-inducing factor and regulates LPS-induced IFN-gamma production. *Nature* 1997. 386: 619–623.
- 121 Sollberger G, Choidas A, Burn GL, Habenberger P, Di Lucrezia R, Kordes S, Menninger S, Eickhoff J, Nussbaumer P, Klebl B, Krüger R, Herzig A, Zychlinsky A. Gasdermin D plays a vital role in the generation of neutrophil extracellular traps. *Sci Immunol*. 2018 Aug 24;3(26):eaar6689. doi: 10.1126/sciimmunol.aar6689.
- 122 Jorch SK, Kubes P. An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease. *Nature Medicine*. 2017 Mar; 23(3):279-287. doi: 10.1038/nm.4294.
- 123 Chen KW, Groß CJ, Sotomayor FV, Stacey KJ, Tschopp J, Sweet MJ, Schroder K. The Neutrophil NLRC4 Inflammasome Selectively Promotes IL-1 β Maturation without Pyroptosis during Acute Salmonella Challenge. *Cell Reports*. 2014 Jul; 8 (2): 570-582. doi.org/10.1016/j.celrep.2014.06.028.
- 124 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-1 β -mediated inflammation in familial Mediterranean fever. *Ann Rheum Dis*. 2016 Jan; 75(1):269-77. doi: 10.1136/annrheumdis-2014-205958. Epub 2014 Sep 26.
- 125 Yipp BG, Petri B, Salina D, Jenne CN, Scott BNV, Zbytnuik LD, Pittman K, Asaduzzaman M, Wu K, Meijndert HC, Malawista SE, de Boisfleury Chevance A, Zhang K, Conly J and Kubes P. Dynamic NETosis is Carried Out by Live Neutrophils in Human and Mouse Bacterial Abscesses and During Severe Gram-Positive Infection. *Nature Medicine*. 2012 Sep; 18(9): 1386–1393. doi: 10.1038/nm.2847
- 126 Finger EB, Puri KD, Alon R, Lawrence MB, von Andrian UH, Springer TA. Adhesion Through L-selectin Requires a Threshold Hydrodynamic Shear. *Nature*. 1996 Jan 18;379(6562):266-9. doi: 10.1038/379266a0

- 127 Littler AJ, Buckley CD, Wordsworth P, Collins I, Martinsons J and Simmons DL. A Distinct Profile of Six Soluble Adhesion Molecules (ICAM-1, ICAM-3, VCAM-1, E-selectin, L-selectin and P-selectin) in Rheumatoid Arthritis. *Br J Rheumatol*. 1997 Feb;36(2):164-9. doi: 10.1093/rheumatology/36.2.164.
- 128 Cappenberg A, Margraf A, Thomas K, Bardel B, McCreedy DA, Van Marck V, Mellmann A, Lowell CA, Zarbock A. L-selectin Shedding Affects Bacterial Clearance in the Lung: A New Regulatory Pathway for Integrin Outside-In Signaling. *Blood*. 2019 Oct 24;134(17):1445-1457. doi: 10.1182/blood.2019000685.
- 129 Humbría A, Díaz-González F, Campanero MR et al. Expression of L-selectin, CD43, and CD44 in synovial fluid neutrophils from patients with inflammatory joint diseases. Evidence for a soluble form of L-selectin in synovial fluid. *Arthritis Rheum* 1994;37:342–8. doi: 10.1002/art.1780370307.
- 130 Rivera-Nieves J, Olson T, Bamias G, Bruce A, Solga M, Knight RF, Hoang S, Cominelli F and Ley K. L-Selectin, $\alpha 4\beta 1$, and $\alpha 4\beta 7$ Integrins Participate in CD4+ T Cell Recruitment to Chronically Inflamed Small Intestine. *J Immunol* February 15, 2005, 174 (4) 2343-2352; DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.4.2343>
- 131 Russell KJ, McRedmond J, Mukherji N, Costello C, Keatings V, Linnane S, Henry M, Fitzgerald MX, O'Connor CM. Neutrophil adhesion molecule surface expression and responsiveness in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998 Mar;157(3 Pt 1):756-61. doi: 10.1164/ajrccm.157.3.9704008.
- 132 Ulbrich HK, Luxenburger A, Prech AP, Eriksson EE, Soehnlein O, Rotzius P, Lindbom L and Gerd Dannhardt G. A novel class of potent nonglycosidic and nonpeptidic pan-selectin inhibitors. *J Med Chem*. 2006 Oct 5;49(20):5988-99. doi: 10.1021/jm060468y.
- 133 Thome S, Begandt D, Pick R, Salvermoser M, Walzog B. Intracellular $\beta 2$ integrin (CD11/CD18) interacting partners in neutrophil trafficking. *Eur J Clin Invest*. 2018 Nov;48 Suppl 2:e12966. doi: 10.1111/eci.12966. Epub 2018 Jun 29.
- 134 Evans R, Patzak I, Svensson L, De Filippo K, Jones K, McDowall A, Hogg N. Integrins in immunity. *J Cell Sci*. 2009 Jan 15;122(Pt 2):215-25. doi: 10.1242/jcs.019117.
- 135 Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol*. 2007 Sep;7(9):678-89. doi: 10.1038/nri2156.
- 136 Phillipson M, Heit B, Colarusso P, Liu L, Ballantyne CM, Kubes P. Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. *J. Exp Med*. 2006 November 20; 203 (12): 2569–2575. doi.org/10.1084/jem.20060925
- 137 Molad Y, Haines KA, Anderson DC, Buyon JP, Cronstein BN. Immunocomplexes stimulate different signalling events to chemoattractants in the neutrophil and regulate L-selectin and beta 2-integrin expression differently. *Biochem J*. 1994 May 1;299 (Pt 3)(Pt 3):881-7. doi: 10.1042/bj2990881.
- 138 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 Jan;52(1):58-61. doi: 10.1136/jim-52-01-28.
- 139 Coll RC, Hill JR, Day CJ, Zamoshnikova A, Boucher D, Massey NL, Chitty JL, Fraser JA, Jennings MP, Robertson AAB and Schroder K. MCC950 directly targets the NLRP3 ATP-hydrolysis motif for

inflammasome inhibition. *Nat Chem Biol*. 2019 Jun;15(6):556-559. doi: 10.1038/s41589-019-0277-7. Epub 2019 May 13.

140 Omenetti A, Carta S, Delfino L, Martini A, Gattorno M, Rubartelli A. Increased NLRP3-dependent interleukin 1 β secretion in patients with familial Mediterranean fever: correlation with MEFV genotype. *Ann Rheum Dis*. 2014 Feb;73(2):462-9. doi: 10.1136/annrheumdis-2012-202774. Epub 2013 Mar 16.

141 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-1 β -mediated inflammation in familial Mediterranean fever. *Ann Rheum Dis*. 2016 Jan;75(1):269-77. doi: 10.1136/annrheumdis-2014-205958. Epub 2014 Sep 26.

142 Park YH, Remmers EF, Lee W, Ombrello AK, Chung LK, Shilei Z, Stone DL, Ivanov MI, Loeven NA, Barron KS, Hoffmann P, Nehrebecky M, Akkaya-Ulum YZ, Sag E, Balci-Peynircioglu B, Aksentijevich I, Gül A, Rotimi CN, Chen H, Bliska JB, Ozen S, Kastner DL, Shriner D and Chae JJ. Ancient familial Mediterranean fever mutations in human pyrin and resistance to *Yersinia pestis*. *Nat Immunol*. 2020 Aug;21(8):857-867. doi: 10.1038/s41590-020-0705-6. Epub 2020 Jun 29.

143 Magnotti F, Lefeuvre L, Benezech S, Malsot T, Waeckel L, Martin A, Kerever S, Chirita D, Desjonqueres M, Duquesne A, Gerfaud-Valentin M, Laurent A, Sève P, Popoff M-R, Walzer T, Belot A, Jamilloux Y, Henry T. Pyrin dephosphorylation is sufficient to trigger inflammasome activation in familial Mediterranean fever patients. *EMBO Mol Med*. 2019 Nov 7;11(11):e10547. doi: 10.15252/emmm.201910547. Epub 2019 Oct 7.

144 Carrette F and Surh CD. IL-7 signaling and CD127 receptor regulation in the control of T cell homeostasis. *Semin Immunol*. 2012 Jun; 24(3): 209–217. Published online 2012 May 1. doi: 10.1016/j.smim.2012.04.010

145 Belarif L, Danger R, Kermarrec L, Nerrière-Daguin V, Pengam S, Durand T. IL-7 receptor influences anti-TNF responsiveness and T cell gut homing in inflammatory bowel disease. *J Clin Invest*. 2019 Apr 2;129(5):1910-1925. doi: 10.1172/JCI121668.

146 Hashizume M, Higuchi Y, Uchiyama Y, Mihara M. IL-6 plays an essential role in neutrophilia under inflammation. *Cytokine*. 2011 Apr;54(1):92-9. doi: 10.1016/j.cyto.2011.01.007. Epub 2011 Feb 2.

147 Rimessi A, Bezzerri V, Salvatori F, Tamanini A, Nigro F, Dehecchi MC, Santangelo A, Prandini P, Silvia Munari S, Provezza L, de Loubresse NG, Muller J, Ribeiro CMP, Lippi G, Gambari R, Pinton P and Cabrini G. PLCB3 Loss of Function Reduces *Pseudomonas aeruginosa*-Dependent IL-8 Release in Cystic Fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2018 Oct;59(4):428-436. doi: 10.1165/rcmb.2017-0267OC.

148 Davatelis G, Tekamp-Olson P, Wolpe SD, Hermsen K, Luedke C, Gallegos C, Coit D, Merryweather J, Cerami A. . Cloning and characterization of a cDNA for murine macrophage inflammatory protein (MIP), a novel monokine with inflammatory and chemokinetic properties. *J Exp Med* 1988; 167:1939 - 44; <http://dx.doi.org/10.1084/jem.167.6.1939>

149 Cook DN. The role of MIP-1 alpha in inflammation and hematopoiesis. *J Leukoc Biol*. 1996 Jan;59(1):61-6. doi: 10.1002/jlb.59.1.61.

- 150 Toksöz D, Dexter TM, Lord BI, Wright EG, Lajtha LG. . The regulation of hemopoiesis in long-term bone marrow cultures. II. Stimulation and inhibition of stem cell proliferation. *Blood* 1980; 55:931 - 6; doi.org/10.1182/blood.V55.6.931.931
- 151 Dinarello CA. An Expanding Role for Interleukin-1 Blockade from Gout to Cancer. *Mol Med*. 2014; 20(Suppl 1): S43–S58. Published online 2014 Dec 16. doi: 10.2119/molmed.2014.00232
- 152 Saraiva M, O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol*. 2010 Mar;10(3):170-81. doi: 10.1038/nri2711. Epub 2010 Feb 15.
- 153 Arend WP, Malyak M, Guthridge CJ and Gabay C. Interleukin-1 receptor antagonist: role in biology. *Annu Rev Immunol*. 1998;16:27-55. doi: 10.1146/annurev.immunol.16.1.27.
- 154 Moelants EAV, Mortier A, Van Damme J and Paul Proost. Regulation of TNF- α with a focus on rheumatoid arthritis. *Immunol Cell Biol*. 2013 Jul;91(6):393-401. doi: 10.1038/icb.2013.15. Epub 2013 Apr 30.
- 155 Gschwandtner M, Derler R, Midwood KS. More Than Just Attractive: How CCL2 Influences Myeloid Cell Behavior Beyond Chemotaxis. *Front Immunol*. 2019 Dec 13;10:2759. doi: 10.3389/fimmu.2019.02759. eCollection 2019.
- 156 Ruth JH, Shahrara S, Park CC, Morel JCM, Kumar P, Qin S and Koch AE. Role of Macrophage Inflammatory Protein-3 α and Its Ligand CCR6 in Rheumatoid Arthritis. *Lab Invest*. 2003 Apr;83(4):579-88. doi: 10.1097/01.lab.0000062854.30195.52.
- 157 Cooper AM and Khader SA. IL-12p40: an inherently agonistic cytokine. *Trends Immunol*. 2007 Jan;28(1):33-8. doi: 10.1016/j.it.2006.11.002. Epub 2006 Nov 28.
- 158 Dinarello CA. Novel targets for interleukin 18 binding protein. *Ann Rheum Dis*. 2001 Nov;60 Suppl 3(Suppl 3):iii18-24. doi: 10.1136/ard.60.90003.iii18.
- 159 Rajarathnam K, Schnoor M, Richardson RM and Rajagopald S. How do chemokines navigate neutrophils to the target site: Dissecting the structural mechanisms and signaling pathways. *Cell Signal*. 2019 Feb; 54: 69–80. Published online 2018 Nov 19. doi: 10.1016/j.cellsig.2018.11.004
- 160 Kruzel ML, Zimecki M and Actor JK. Lactoferrin in a Context of Inflammation-Induced Pathology. *Front Immunol*. 2017; 8: 1438. Published online 2017 Nov 6. doi: 10.3389/fimmu.2017.01438
- 161 Odobasic D, Kitching AR and Holdsworth SR. Neutrophil-Mediated Regulation of Innate and Adaptive Immunity: The Role of Myeloperoxidase. *J Immunol Res*. 2016;: 2349817. Published online 2016 Jan 20. doi: 10.1155/2016/2349817
- 162 Van Gorp H, Huang L, Saavedra P, Vuylsteke M, Asaoka T, Prencipe G, Insalaco A, Ogunjimi B, Jeyaratnam J, Cataldo I, Jacques P, Vermaelen K, Dullaers M, Joos R, Sabato V, Stella A, Frenkel J, De Benedetti F, Dehoorne J, Haerynck F, Calamita G, Portincasa P, Lamkanfi M. Blood-based test for diagnosis and functional subtyping of familial Mediterranean fever. *Ann Rheum Dis*. 2020 Jul;79(7):960-968. doi: 10.1136/annrheumdis-2019-216701. Epub 2020 Apr 20.
- 163 Sartor RB. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*. 2006 Jul;3(7):390-407. doi: 10.1038/ncpgasthep0528.

164 Moss ML and Minond D. Recent Advances in ADAM17 Research: A Promising Target for Cancer and Inflammation. *Mediators Inflamm.* 2017;2017:9673537. doi: 10.1155/2017/9673537. Epub 2017 Nov 2.

165 Krumm B, Meng X, Xiang Y and Deng J. Identification of small molecule inhibitors of Interleukin-18. *Sci Rep.* 2017 Mar 28;7(1):483. doi: 10.1038/s41598-017-00532-x.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Iris Stoler, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Aktivierungsmuster von Neutrophilen beim Familiären Mittelmeerfieber im Vergleich zu anderen akuten und chronischen inflammatorischen Erkrankungen. Activation Patterns of Neutrophils in Familial Mediterranean Fever in Comparison to other acute and chronic inflammatory Diseases. 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/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

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

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Iris Stoler 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.

†These authors have contributed equally to this work

Durchführung der Versuche, statistische Auswertung und Interpretation der gezeigten Ergebnisse an FMF-Patienten, gesunden Kontrollpersonen und Personen mit anderen akuten und chronischen inflammatorischen Erkrankungen.

Stoler I†, Freytag J†, Orak B, Unterwalder N, Henning S, Heim K, von Bernuth H, Krüger R, Winkler S, Eschenhagen P, Seipelt E, Mall MA, Foell D, Kessel C, Wittkowski H, Kallinich T. Gene-Dose Effect of MEFV Gain-of-Function Mutations Determines ex vivo Neutrophil Activation in Familial Mediterranean Fever.

Front Immunol. 2020 Jun 11;11:716. doi: 10.3389/fimmu.2020.00716. eCollection 2020.

PMID: 32655537

†These authors have contributed equally to this work

Durchführung der Versuche, statistische Auswertung und Interpretation der gezeigten Ergebnisse an FMF-Patienten, gesunden Kontrollpersonen und Personen mit anderen akuten und chronischen inflammatorischen Erkrankungen.

Unterschrift, Datum und Stempel des/der erstbetreuenden Hochschullehrers/in

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Lebenslauf

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

Publikationsliste

Stoler I1†, 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.

†These authors have contributed equally to this work

Deng MY, Sill M, Chiang J, Schittenhelm J, Ebinger M, Schuhmann MU, Monoranu CM, Milde T, Wittmann A, Hartmann C, Sommer C, Paulus W, Gärtner J, Brück W, Rüdiger T, Leipold A, Jaunmuktane Z, Brandner S, Giangaspero F, Nozza P, Mora J, Morales la Madrid A, Cruz Martinez O, Hansford JR, Pietsch T, Tietze A, Hernáiz-Driever P, **Stoler I**, Capper D, Korshunov A, Ellison DW, von Deimling A, Pfister SM, Sahm F, Jones DTW.

Molecularly defined diffuse leptomeningeal glioneuronal tumor (DLGNT) comprises two subgroups with distinct clinical and genetic features.

Acta Neuropathol. 2018 Aug;136(2):239-253. doi: 10.1007/s00401-018-1865-4. Epub 2018 May 15. PMID: 29766299

Stoler I†, Freytag J†, Orak B, Unterwalder N, Henning S, Heim K, von Bernuth H, Krüger R, Winkler S, Eschenhagen P, Seipelt E, Mall MA, Foell D, Kessel C, Wittkowski H, Kallinich T.

Gene–Dose Effect of MEFV Gain-of-Function Mutations Determines ex vivo Neutrophil Activation in Familial Mediterranean Fever.

Front Immunol. 2020 Jun 11;11:716. doi: 10.3389/fimmu.2020.00716. eCollection 2020.

PMID: 32655537

†These authors have contributed equally to this work

Clarke M, Mackay A, Ismer B, Pickles JC, Tatevossian RG, Newman S, Bale TA, **Stoler I**, Izquierdo E, Temelso S, Carvalho DM, Molinari V, Burford A, Howell L, Virasami A, Fairchild AR, Avery A, Chalker J, Kristiansen M, Hauptfear K, Dalton JD, Orisme W, Wen J, Hubank M, Kurian KM, Rowe C, Maybury M, Crosier S, Knipstein J, Schüller U, Kordes U, Kram DE, Snuderl M, Bridges L, Martin AJ, Doey LJ, Al-Sarraj S, Chandler C, Zebian B, Cairns C, Natrajan R, Boulton JKR, Robinson SP, Sill M, Dunkel IJ, Gilheeny SW, Rosenblum MK, Hughes D, Proszek PZ, Macdonald TJ, Preusser M, Haberler C, Slavc I, Packer R, Ng HK, Caspi S, Popović M, Faganel Kotnik B, Wood MD, Baird L, Davare MA, Solomon DA, Olsen TK, Brandal P, Farrell M, Cryan JB, Capra M, Karremann M, Schittenhelm J, Schuhmann MU, Ebinger M, Dinjens WNM, Kerl K, Hettmer S, Pietsch T, Andreiuolo F, Driever PH, Korshunov A, Hiddingh L, Worst BC, Sturm D, Zuckermann M, Witt O, Bloom T, Mitchell C, Miele E, Colafati GS, Diomedi-Camassei F, Bailey S, Moore AS, Hassall TEG, Lewis SP, Tsoli M, Cowley MJ, Ziegler DS, Karajannis MA, Aquilina K, Hargrave DR, Carceller F, Marshall LV, von Deimling A, Kramm CM, Pfister SM, Sahm F, Baker SJ et al.

Infant High-Grade Gliomas Comprise Multiple Subgroups Characterized by Novel Targetable Gene Fusions and Favorable Outcomes.

Cancer Discov. 2020 Jul;10(7):942-963. doi: 10.1158/2159-8290.CD-19-1030. Epub 2020 Apr 1.

PMID: 32238360

Danksagung

Mein Dank gilt allen, die mich auf dem Weg zum Dokortitel unterstützt haben:

Meinem Doktorvater Prof Dr. Tilmann Kallinich, der mich mit seiner Expertise, seiner Präzision und seinem Wissensdurst (heraus)gefordert, manchmal in positivstem Sinne zur Verzweiflung gebracht und wissenschaftlich vorgebracht hat.

Christine Seib und Dr. rer. nat. Stephanie Heller, die mich in der Laborarbeit und zwischenmenschlich in frühen und späten Laborstunden unterstützt haben. Dr. med. Judith Freytag für die kollegiale Zusammenarbeit.

Allen Patient*innen, ohne die die zugrunde liegenden Versuche nicht möglich gewesen wären.

Den Ärzt*innen für die Auswahl der Proband*innen, allen voran Dr. med. Juliane Wauer.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden, insbesondere meiner Mutter Petra für ihre Kraft, ihre grenzenlose Unterstützung und ihren Optimismus und meinem Onkel Mikel für seine Neugierde auf das Leben.



CharitéCentrum für Human- und Gesundheitswissenschaften

Charité | Campus Charité Mitte | 10117 Berlin

Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie (iBikE)

Direktor: Prof. Dr. Geraldine Rauch

Postanschrift:
Charitéplatz 1 | 10117 Berlin
Besucheranschrift:
Reinhardtstr. 58 | 10117 Berlin

Tel. +49 (0)30 450 562171
geraldine.rauch@charite.de
<https://biometrie.charite.de/>



Name, Vorname: Stoler, Iris
Emailadresse: iris.stoler@charite.de
Matrikelnummer: 3620070
PromotionsbetreuerIn: Kallinich, Tilmann
Promotionsinstitution/ Klinik: Pädiatrie

Bescheinigung

Hiermit bescheinige ich, dass Frau *Iris Stoler* innerhalb der Service Unit Biometrie des Instituts für Biometrie und klinische Epidemiologie (iBikE) bei mir eine statistische Beratung zu einem Promotionsvorhaben wahrgenommen hat. Folgende Beratungstermine wurden wahrgenommen:

- Termin 1: 27.11.2018
- Termin 2: 20.11.2019

Folgende wesentliche Ratschläge hinsichtlich einer sinnvolle Auswertung und Interpretation der Daten wurden während der Beratung erteilt:

- *Multiples Testen berücksichtigen*

Diese Bescheinigung garantiert nicht die richtige Umsetzung der in der Beratung gemachten Vorschläge, die korrekte Durchführung der empfohlenen statistischen Verfahren und die richtige Darstellung und Interpretation der Ergebnisse. Die Verantwortung hierfür obliegt allein dem Promovierenden. Das Institut für Biometrie und Klinische Epidemiologie übernimmt hierfür keine Haftung.

Datum: 29.04.2020

Name des Beraters

Unterschrift Berater, Institutsstempel




UNIVERSITÄTSMEDIZIN BERLIN
Institut für Biometrie und
Klinische Epidemiologie
Campus Charité Mitte
Charitéplatz 1 | D-10117 Berlin
Sitz: Reinhardtstr. 58