

Aus der Klinik für Pädiatrie m.S. Pneumologie und Immunologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

*Ex vivo* Inflammasomaktivität in Leukozyten von Patienten mit  
homozygoter MEFV – Gen Mutation

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Banu Orak

aus Kartal / Istanbul

Datum der Promotion: 09.09.2016

**Für meine Eltern**

## Inhaltsverzeichnis

<b>I. Abstrakt</b>	<b>5</b>
<b>II. Abstract</b>	<b>7</b>
<b>III. Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>9</b>
<b>IV. Abbildungsverzeichnis</b>	<b>11</b>
<b>V. Tabellenverzeichnis</b>	<b>11</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>12</b>
1.1 Familiäres Mittelmeerfieber	12
1.1.1 Genetik und Pathogenese	13
1.1.2 Klinische Symptome	14
1.1.3 Klinische Einteilungen	17
1.1.4 Diagnostik	19
1.1.5 Therapie	19
1.2 Pyrin und die Rolle des Inflammasoms beim FMF	21
1.3 S100 Proteine	24
1.4 Fragestellung	26
<b>2. Materialien und Methoden</b>	<b>28</b>
2.1. Materialien	28
2.1.1 Geräte	28
2.1.2. Gefäße, Verbrauchsmaterialien	28
2.1.3 Lösungen für Zelltrennung, Zellkulturmedien,	29
2.1.4 Stimulanzen	29
2.1.5 Reagenzien und Lösungen für ELISA	29
2.1.6 Antikörper für ELISA	30
2.1.7 RNA-Isolation	30
2.1.8 cDNA-Umschreibung	30
2.1.9 Reagenzien für RT-PCR	31
2.1.10 Primer für RT-PCR	31
2.2 Verwendete Computerprogramme	31
2.3 Methoden	32
2.3.1 Patienten	32

2.3.2 Probengewinnung .....	33
2.3.3 Zellauftrennung .....	33
2.3.4 Stimulation .....	35
2.4.4 Enzyme-linked Immunosorbent Assay, ELISA .....	36
2.4.5 RNA-Präparation.....	39
2.4.6 cDNA Umschreibung .....	40
2.4.7 Real Time PCR .....	41
2.4.8 CrP-Messung.....	44
2.4.9 Statistische Auswertung.....	44
<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>45</b>
3.1 Patienten und Kontrollen .....	45
3.2 Blutbild und CrP .....	47
3.2.1 Blutbild.....	47
3.2.2 C-reaktives Protein (CrP).....	50
3.3 ELISA-Messungen .....	50
3.3.1 S100A8/9 .....	51
3.3.2 S100 A12.....	53
3.3.3 Interleukin-1 $\beta$ .....	55
3.3.4 Interleukin-18 .....	57
3.3.5 Caspase-1 .....	59
3.4 Ergebnisse der RT-PCR .....	60
3.4.1 Messungen in Granulozyten .....	60
3.4.2 Messungen in PBMC's.....	62
<b>4. Diskussion</b> .....	<b>64</b>
4.1 Patienten .....	64
4.2 Blutbild und CrP .....	65
4.3 Hypersekretion von S100A8/9, S100A12, Il-18 und Caspase-1 .....	66
4.4 Effekt von Colchizin in-vitro .....	67
4.5 Ergebnisse für Interleukin-1 $\beta$ .....	68
4.6 Transkription.....	69
4.7 Schwächen der Arbeit .....	70
4.8 Schlussfolgerung und Aussicht .....	71

<b>5. Literaturverzeichnis</b>	<b>74</b>
<b>6. Eidesstattliche Versicherung</b>	<b>83</b>
<b>7. Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen</b>	<b>84</b>
<b>8. Publikationen</b>	<b>85</b>
<b>9. Lebenslauf</b>	<b>86</b>
<b>10. Danksagung</b>	<b>87</b>

## I. Abstrakt

Das Familiäre Mittelmeerfieber (FMF) ist das häufigste autoinflammatorische Fiebersyndrom. Pathophysiologisch liegt der Erkrankung eine "gain-of-function" Mutation im MEFV-Gen zu Grunde. Durch die Aktivierung eines ASC-abhängigen und NLRP3-unabhängigen Inflammasoms kommt es zu unregelmäßigen Schüben mit Fieber und Serositis. Histopathologisch führen diese molekulargenetischen Veränderungen zu einem Neutrophileneinstrom in die betroffenen Organe. S100 Proteine und pro-inflammatorische Zytokine werden bei unbehandelten Patienten und Patienten mit einem instabilen Krankheitsverlauf vermehrt sezerniert. Diese scheinen für den Nachweis einer Inflammation sensibler als klassische Inflammationsmarker.

Ziel dieser Arbeit war es die *ex-vivo* Inflammasomaktivität und S100 Proteine in Granulozyten und PBMCs nach Stimulation bei Patienten mit einem instabilem FMF zu untersuchen. Zusätzlich wurde auf mRNA Ebene die Transkription dieser Proteine gemessen.

Sechs Patienten mit der gesicherten Diagnose eines FMF und nachgewiesener Mutation, entweder homozygot oder compound-heterozygot für M694V, wurden in die Arbeit eingeschlossen. Trotz Colchizintherapie hatten die Patienten weiterhin Schübe und erhöhte Inflammationsmarker ("instabiler Krankheitsverlauf"). Vier gesunde Probanden dienten als Kontrollen. Mit Hilfe eines Fragebogens wurde ihr Gesundheitszustand erfragt. Von allen Teilnehmern lag ein schriftliches Einverständnis vor.

Jedem Probanden wurde 25-30 ml Blut abgenommen und Granulozyten und PBMCs durch eine Zweidichte-zentrifugation getrennt. Für jeden Ansatz wurden  $5 \times 10^6$  Zellen stimuliert: (i) ohne Zusatz von Stimulanzen, (ii) PMA (10 nM), (iii) LPS (10 ng/ml) und (iv) LPS (10 ng/ml) + ATP (1 mM) (letztere Substanz am Ende für 30 Minuten). Gleichzeitig wurden dieselben Ansätze parallel mit Colchizin (5 mg/ml) inkubiert. Die Überschüsse wurden eingefroren und daraus später ELISAs für S100A8/9, S100A12, IL-1 $\beta$ , IL-18 und Caspase-1 durchgeführt. Aus den Zellpellets erfolgten RT-PCRs für obige Proteine. Ein Blutbild und das CrP wurden aus den anfangs abgenommenen Blutproben bestimmt.

Es zeigte sich eine gesteigerte Sekretion für S100A12, S100A8/9, IL-18 und Caspase-1 in den Neutrophilen von instabilen FMF Patienten, die im Vergleich zu gesunden Kontrollen signifikant war. Durch die Stimulation kam es zu keiner Zunahme der Sekretion. Die Zugabe von Colchizin führte zu einer starken Abnahme der Hypersekretion von S100A12, S100A8/9, IL-18 und Caspase-1. Die Messungen in PBMCs zeigten keine hohen Sekretionswerte. Beim Vergleich der Transkription der oben genannten Zytokine ergaben sich keine Unterschiede zwischen den beiden Vergleichsgruppen.

Zusammengefasst tragen eine spontane Inflammassomaktivierung und S100 Proteine gleichermaßen zur Inflammation beim FMF bei. Es konnte bestätigt werden, dass Patienten mit einem instabilen Krankheitsverlauf und der "high-risk" Mutation M694V trotz Colchizintherapie weiterhin eine Krankheitsaktivität aufweisen.

## II. Abstract

Familial Mediterranean fever (FMF) is the most common autoinflammatory fever syndrome. Pathophysiologically gain-of-function pyrin mutations cause unprovoked attacks by altering an ASC-dependent NLRP3-independent inflammasome leading to fever and serositis. Histopathologically, these molecular genetic changes lead to a predominant neutrophilic infiltration at the affected sites. S100 proteins and other inflammatory cytokines are highly secreted in untreated and unstable FMF. Furthermore, these molecules might detect inflammation more sensitive than the classical biomarkers.

The objective of this study was to assess the *ex vivo* inflammasome activity and S100 protein secretion in granulocytes and PBMC's after various kinds of cell stimulation from patients with unstable FMF. Furthermore, mRNA levels for all cytokines were measured.

Six Turkish patients with the clinical diagnosis of FMF, homozygous or combined heterozygous for the high-risk mutation M694V, were included. Patients still exhibited attacks and elevated inflammation markers despite sufficient colchicine therapy ("instable disease"). Healthy probands served as controls. Their health status was assessed by a standardized questionnaire. All patients and controls gave written consent.

From each participant 25-30 ml blood was drawn and PBMC's and granulocytes separated by a two density gradient centrifugation.  $5 \times 10^6$  cells were stimulated with (i) mock, (ii) PMA (10 nM), (iii) LPS (10 ng/ml) and (iv) LPS (10 ng/ml) + ATP (1 mM) (latter substance for the last 30 minutes). Simultaneously in another approach cells were treated with additional colchicine (5 mg/ml) for the whole incubation time. Supernatant was gained and frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$ . ELISA for S100A8/9, S100A12, IL-1 $\beta$ , IL-18 and Caspase-1 was performed. Cell pellets were used for RT-PCR to quantify mRNA levels. At the time of blood drawing high sensitivity CRP and blood counts were measured.

Compared to controls even unstimulated granulocytes from FMF patients with instable disease secreted significantly more S100A12, S100 A8/9, Interleukin-18 and Caspase-1. Stimulation did not increase secretion. Supplementary colchicine significantly suppressed the hypersecretion of S100A12, S100 A8/9, IL-18 and Caspase-1. In PBMCs, the result

showed no increase of secretion. There were no differences when transcriptional levels of these cytokines were compared between both groups.

Taken together, spontaneous inflammasome-activation and S100 proteins contribute equally to inflammation in FMF. These data confirm that unstable patients with the high-risk mutation M694V still exhibit inflammatory activity despite colchicine treatment.

### III. Abkürzungsverzeichnis

ASC	Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD
ATP	Adenosintriphosphat
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
CAPS	Cryopirin - assoziierte periodische Syndrome
CARD	Caspase-recruitment domain
CrP	C-reaktives Protein
DAMP	Danger-associated molecular pattern
DNA	Deoxyribonucleic acid
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FCAS	Familial cold autoinflammatory syndrome
FCS	Fetales Kälberserum
FMF	Familiäres Mittelmeerfieber
IL-18	Interleukin-18
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	Leucin rich repeats
MEFV	Mediterranean Fever
mRNA	Messenger ribonucleic acid
MWS	Muckle-Wells-Syndrom
MyD88	Myeloid differentiation primary response gene 88
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor 'k-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NOMID	Neonatal-onset multisystem inflammatory disease
NSAR	Nichtsteroidale Antirheumatika
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern molecules
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase chain reaction
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
PRR	Pattern recognition receptor

PYD	Pyrin Domäne
RAGE	Receptor for advanced glycation endproducts
RNA	Ribonucleic acid
sJIA	Systemische juvenile idiopathische Arthritis
SAA1	Serumprotein Amyloid A1
TLR-4	Toll-like-receptor 4

#### IV. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung von Pyrin/Marenostrin .....	13
Abbildung 2: Das NLRP3- Inflammasom. ....	22
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Pyrins.....	23
Abbildung 4: Das Pyrin-Inflammasom. ....	24
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Zelltrennung mit Percoll. ....	34
Abbildung 6: Schematische Darstellung eines Sandwich-ELISAs. ....	38
Abbildung 7: Vergleich der drei Zellreihen bei Patienten und Kontrollen.....	48
Abbildung 8: Ergebnisse der CrP-Messung bei Patienten und Kontrollen.....	50
Abbildung 9: Sekretion von S100A8/9. ....	52
Abbildung 10: Sekretion von S100A12. ....	54
Abbildung 11: Sekretion von IL-1 $\beta$ . ....	55
Abbildung 12: Sekretion von IL-18.....	57
Abbildung 13: Sekretion von Capase-1. ....	59
Abbildung 14: RNA Messwerte in Granulozyten A-F. ....	61
Abbildung 15: RNA Messwerte in PBMC´s für Interleukin-1 $\beta$ . ....	63

#### V. Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Pras Score. ....</i>	<i>18</i>
<i>Tabelle 2: Mor Score. ....</i>	<i>18</i>
<i>Tabelle 3: Kulturmedium für Granulozyten und PBMCs.....</i>	<i>34</i>
<i>Tabelle 4: Endkonzentration der Stimulanzen in 1 ml Zellsuspension.....</i>	<i>35</i>
<i>Tabelle 5: Stimulationsschema für Granulozyten.....</i>	<i>36</i>
<i>Tabelle 6: Stimulationsschema für PBMC's. ....</i>	<i>36</i>
<i>Tabelle 7: Zusammensetzung der ELISA-Puffer.....</i>	<i>37</i>
<i>Tabelle 8: Temperaturprotokoll für Real-Time PCR.....</i>	<i>42</i>
<i>Tabelle 9: Zusammensetzung der PCR-Lösungen .....</i>	<i>43</i>
<i>Tabelle 10: Charakterisierung der Patienten. ....</i>	<i>46</i>
<i>Tabelle 11: Hauptmerkmale von Patienten und Kontrollen .....</i>	<i>47</i>
<i>Tabelle 12: Differentialblutbild aller Patienten .....</i>	<i>49</i>
<i>Tabelle 13: Differentialblutbild aller Kontrollen.....</i>	<i>49</i>
<i>Tabelle 14: Stimulationsansätze für Granulozyten und PBMCs nach der Zelltrennung.....</i>	<i>51</i>

## 1. Einleitung

### 1.1 Familiäres Mittelmeerfieber

Familiäres Mittelmeerfieber (FMF, OMIM ID: 249100) ist eine autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung und stellt die häufigste Erkrankung aus der Gruppe der hereditär bedingten Fiebersyndrome dar, die auch als periodische Fiebersyndrome bezeichnet werden. Das Hauptsymptom ist rezidivierendes Fieber begleitet von Beschwerden einer Serositis und Synovialitis. Bei einem Schub kommt es zum Einstrom von neutrophilen Granulozyten in die betroffenen Gewebe wie z.B. in die Synovia oder das Peritoneum.<sup>1</sup> FMF tritt am häufigsten bei Menschen aus der Mittelmeerregion, wie der Türkei, Israel oder Armenien auf.<sup>2</sup> Aber auch Berichte von Betroffenen aus Mittel- und Nordeuropa und Japan sind in der Literatur beschrieben.<sup>3,4</sup> In Deutschland beträgt die Prävalenz von FMF bei Kindern unter 16 Jahren  $48/10^6$ , bei Kindern mit türkischem Migrationshintergrund  $880/10^6$ .<sup>5</sup> Die Prävalenz des FMF in der israelischen Bevölkerung liegt bei  $1/500$  und bei  $1/1000$  in der Türkei mit einer Heterozygotenrate von 1:5 bis 1:7 in beiden Ländern.<sup>6</sup> Ähnlich hohe Heterozygotenraten findet man bei der jüdischen Bevölkerung Nordafrikas und Armeniern.<sup>2,7</sup> Die Manifestation ist bei 90% der Patienten vor dem 20. Lebensjahr und selten nach dem 40. Lebensjahr.<sup>1</sup> Die Erkrankung verläuft in der Regel chronisch und führt unbehandelt zu einer Typ A Amyloidose (AA). Dabei wird vor allem die Nierenamyloidose gefürchtet, die konsekutiv zu einer Niereninsuffizienz führt.

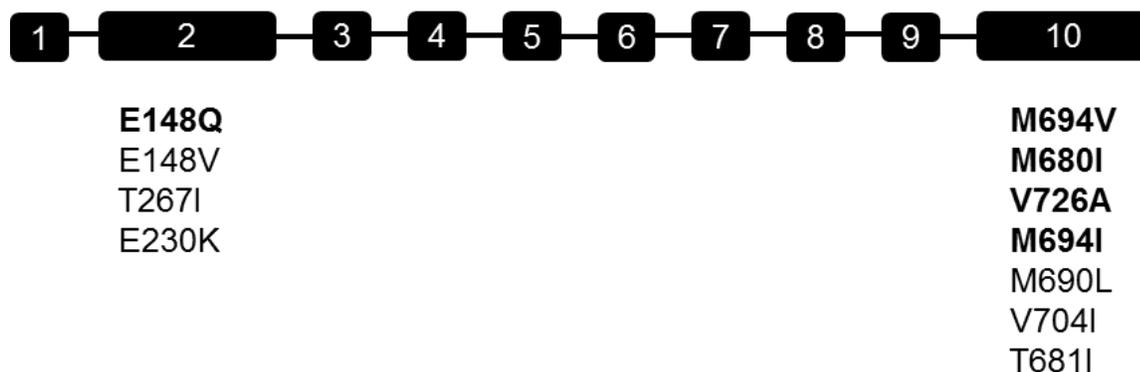
Die zu Grunde liegende Mutation ist im Mediterranean fever Gen (MEFV-Gen) auf dem kurzen Arm des Chromosoms 16 gelegen und codiert für das Protein Pyrin.<sup>8,9</sup> Pyrin ist ein wichtiger Teil des Inflammasoms, eines intrazellulären Multiproteinkomplexes, welches die Inflammation steuert. Bei den unkontrolliert auftretenden Attacken werden inflammatorische Zytokine wie Interleukin-1, Interleukin-18 und Inflammasom-unabhängige S100 Proteine freigesetzt. Es resultierte eine selbstlimitierende Entzündungsreaktion.

Therapeutisch wird in erster Linie Colchizin eingesetzt.<sup>10</sup> Durch das Verstehen der Pathogenese kommen aber auch neuere Therapieansätze zum Einsatz.

### 1.1.1 Genetik und Pathogenese

Das familiäre Mittelmeer ist das häufigste hereditäre Fiebersyndrom, dessen Vererbung lange als autosomal-rezessiv vermutet wurde.<sup>8</sup> Allerdings kann man bei bis zu 25% der klinisch gesicherten FMF Patienten nur eine Mutation nachweisen und trotz intensiver Suche ist keine zweite Mutation auffindbar.<sup>11</sup> Daher wird diskutiert, ob nicht mehr von einem rein autosomal-rezessiven Erbgang ausgegangen werden sollte, sondern einer Manifestation, bei der epigenetische oder auch Umweltfaktoren eine wichtige Rolle spielen.<sup>7,12</sup> Dass Umweltfaktoren auf die Ausprägung der Erkrankung und den Schweregrad Einfluss nehmen, konnte im Vergleich zwischen Patienten in der Türkei und türkischstämmigen Patienten in Deutschland gezeigt werden. Letztere zeigten einen im Durchschnitt mildereren Phänotyp, als Patienten, die in der Türkei lebten.<sup>13</sup>

Die Mutation beim FMF liegt auf dem kurzen Arm des Chromosoms 16 (16p13). Das MEFV-Gen umfasst 781 Codons und 10 Exons, dessen Genprodukt Pyrin oder auch Marenostrin genannt wird. Dieses wurde erstmals 1997 durch zwei unabhängige Gruppen mit dem Nachweis von drei bzw. vier Mutationen beschrieben.<sup>8,9</sup> Inzwischen sind über 300 Sequenzvarianten bekannt.<sup>14</sup> Die häufigsten Mutationen betreffen das Exon 10, wo auch vier der fünf häufigsten Mutationen liegen. Diese fünf Mutationen decken ca. 74% aller FMF Patienten ab und sind in Abbildung 1 dargestellt.<sup>15</sup>



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung von Pyrin/Marenostrin bestehend aus 10 Exonen. Vor allem im Exon 2 und 10 befinden sich die am häufigsten vorkommenden Mutationen. Die fünf dick geschriebenen Mutationen decken 74% aller FMF Patienten ab. Adaptiert nach Touitou.<sup>15</sup>

Besonders Mutationen im Exon 10 sind mit einem schweren Krankheitsverlauf verbunden. Für die Mutation M694V konnte eine frühere Manifestation der Erkrankung, ein schwerer Verlauf und das häufigere Auftreten einer Arthritis nachgewiesen werden.<sup>6</sup> Auch das Risiko einer Amyloidose ist bei Trägern von M694V erhöht. M694V ist die häufigste Mutation bei Israelis, Türken und Armeniern, die Mutation V726A findet man sehr häufig in der arabischen Bevölkerung.<sup>3</sup> Die Relevanz der Mutation E148Q ist umstritten, da hierfür eine hohe Trägerrate sowohl unter Erkrankten als auch unter Gesunden vorliegt. Homozygote sind selten symptomatisch, doch Compound-Heterozygote mit der Mutation E148Q auf einem der beiden Allele können erkranken, zeigen aber oft einen milden Verlauf.<sup>16</sup>

Die Funktion des Pyrins erlaubt wichtige Einblicke in die Pathogenese des FMF. Pyrin wird insbesondere in neutrophilen Granulozyten und Monozyten exprimiert, allerdings nicht in Lymphozyten.<sup>8,17</sup> Auch in Fibroblasten aus der Serosa konnte MEFV nachgewiesen werden. Die Expression in diesen Zellen war durch Interleukin-1 und Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) steigerbar.<sup>18</sup> Pyrin besteht aus verschiedenen Untereinheiten, von denen vor allem die PYD- und B30.2-Domäne wichtige Funktionen haben und unter anderem bei der Formierung des Inflammasoms beteiligt sind.

### 1.1.2 Klinische Symptome

Die Patienten sind während der Attacken krank, zwischen diesen sind sie symptomfrei und haben meist keinerlei Beschwerden. Die Attacken treten rezidivierend, aber unregelmäßig auf. Daher ist der Begriff periodisch eigentlich irreführend. Bei fast allen Patienten besteht während einer solchen Attacke Fieber, welches 12 Stunden bis 3 Tage andauern und Temperaturen zwischen 38°C und 40°C erreichen kann.<sup>2</sup>

Durch die Entzündung der serösen Häute kommt es zu den Hauptbeschwerden des FMF. Die Peritonitis macht sich als Bauchschmerzen, die Pleuritis als Brustschmerzen und die Synovialitis als Gelenkschmerzen bemerkbar. Sehr selten kann auch eine Perikarditis vorliegen. Bauchschmerzen sind bei zu 95% der Patienten vorhanden und können nach Abfall des Fiebers weiterhin bestehen.<sup>19</sup> Sie präsentieren sich oft in Form eines akuten

Abdomens und führen bei den Patienten nicht selten zur Fehldiagnose einer Appendizitis. Laparoskopien und Appendektomien sind häufig die Folge.

Brustschmerzen bestehen bei ca. 45% der Patienten.<sup>7</sup> Es kann gelegentlich zu kleineren Pleuraergüssen kommen. Eine Perikarditis kann in seltenen Fällen auftreten.<sup>2</sup> Patienten geben dann oft atemabhängige Schmerzen im Brustraum an.

Gelenkschmerzen können rein durch Arthralgien ausgelöst sein oder auch durch eine manifeste Arthritis und treten bei ca. 75% der Patienten auf. Meist ist diese akut und kann mehrere Tage andauern. Vor allem bei der jüdischen Bevölkerung Nordafrikas werden hohe Raten der akuten Arthritis beobachtet.<sup>7</sup> Oftmals liegt eine Monoarthritis der großen Gelenke, wie der Knie oder der Hüfte, vor. Sonographisch kann ein Gelenkerguss nachgewiesen werden. Untersuchungen des Punktats zeigen ein steriles Exsudat, welches reich an neutrophilen Granulozyten ist. Eine protrahierte Arthritis kann in bis zu 5% der Fälle vorliegen, die dann über mehrere Wochen persistiert und zu Gelenkdestruktionen und Langzeitschäden führen kann.<sup>7</sup>

An der Haut von FMF Patienten können erysipelartige Effloreszenzen auftreten.<sup>2</sup> Hier variieren die Zahlen zwischen 20-50%.<sup>2,6</sup> Dabei handelt es sich um scharf begrenzte, erythematöse Hauterscheinungen, die in der Regel schmerzhaft sind und vor allem an der unteren Extremität auftreten. Seltener kann es auch zu einer Vaskulitis kommen. Hier ist die häufigste Form die Purpura-Schönlein-Henoch gefolgt von der Polyarteritis nodosa.<sup>7,20</sup>

Seltenere Manifestationen des FMF können zentrale Beteiligungen wie Kopfschmerzen oder noch seltener eine Meningitis sein.<sup>21</sup> Protrahierte febrile Myalgien haben einen hohen Krankheitswert und sprechen oft auf Glukokortikoide an.<sup>7</sup> Innere Organe können z.B. in Form einer Splenomegalie affektiert sein. Fälle von schmerzhaften Orchitiden sind ebenfalls beschrieben.<sup>22</sup>

Die Attacken entstehen unregelmäßig und können von Patient zu Patient und von Attacke zu Attacke variieren. Als Triggerfaktoren kommen emotionale und physische Belastungen und bei Frauen vor allem die Menses in Betracht.<sup>23</sup> Die genauere Pathophysiologie, die

hinter den unregelmäßigen, rezidivierenden Krankheitsattacken steht, ist bisher nicht bekannt.

Die gefährlichste Komplikation des FMF ist die Amyloidose. Es konnte gezeigt werden, dass die Amyloidose die Mortalität bei an FMF erkrankten Patienten am stärksten beeinflusst.<sup>24</sup> In einer internationalen Multicenter Studie mit 2.277 FMF Patienten wurde eine Rate von 11,4% renaler Amyloidosen festgestellt.<sup>25</sup> Unbehandelt entwickelten bis zum 40. Lebensjahr 60% der Patienten in der Türkei eine Amyloidose.<sup>26</sup> Unter allen FMF-Patienten in der Türkei, behandelt und unbehandelt, bestand eine Amyloidose bei bis zu 12,9%.<sup>27</sup> Bei in Deutschland lebenden Patienten unter 16 Jahren konnte in einer Arbeit, die 122 FMF Patienten einschloss, bei keinem eine Amyloidose nachgewiesen werden.<sup>5</sup>

Die Amyloidose ist vom Typ AA, bei der es zu Ablagerungen von Amyloid prinzipiell in allen Organen kommen kann. Dennoch ist die Ablagerung vor allem in der Niere am meisten gefürchtet. Dies führt über Jahre zu einer progressiven Nephropathie und letztendlich zur terminalen Niereninsuffizienz. Fälle, in denen eine Nierenamyloidose ohne bzw. vor der Manifestation von krankheitstypischen Symptomen auftritt und nur durch eine Proteinurie auffällt, werden als Phänotyp II bezeichnet.<sup>1</sup>

Durch die Akute-Phase-Reaktion kommt es zur vermehrten Bildung von Proteinen bei deren Abbau Amyloid A in Form von  $\beta$ -Fibrillen vor allem im Interstitium abgelagert wird. Das Serumprotein Amyloid A1 (SAA-1) gehört zu diesen Akute-Phase-Proteinen. Für dieses konnte ein Polymorphismus im SAA1-Gen nachgewiesen werden, bei dem die homozygote Isoform SAA1- $\alpha$  einen Risikofaktor für die Entwicklung einer Amyloidose darstellt.<sup>28,29</sup> Auch die Genetik des MEFV-Gens scheint für das Auftreten einer Amyloidose eine Rolle zu spielen. Trotz teilweise diskrepanter Daten, scheint die Mutation M694V nicht nur eine insgesamt höhere Krankheitsaktivität des FMF auszulösen, sondern auch häufiger zu einer Amyloidose zu führen.<sup>28,29</sup>

Nicht zuletzt ist zu erwähnen, dass das Risiko an einer Amyloidose zu erkranken am stärksten mit dem Land, in dem die Patienten leben, korreliert und möglicherweise bislang unbekannte Umweltfaktoren auf die Entwicklung einer Amyloidose Einfluss nehmen.<sup>25</sup>

Die Diagnose einer systemischen Amyloidose erfolgt z.B. durch eine Rektumbiopsie, der Befall der Nieren durch eine Nierenbiopsie mit Nachweis von Amyloid durch Kongorot-Färbung im polarisierten Licht. In der Prophylaxe der Amyloidose spielt Colchizin eine große Rolle und senkt das Erkrankungsrisiko maßgeblich.

### 1.1.3 Klinische Einteilungen

In älteren Arbeiten wird meist zwischen zwei Phänotypen unterschieden, dem Phänotyp I mit rekurrendem Fieber, Bauch-, Brust- und Gelenkschmerzen und dem Phänotyp II, dessen Erkrankung vorerst nur mit einer Proteinurie im Sinne einer fortgeschrittenen Nierenamyloidose auffällt und eine positive Familienanamnese bezüglich des FMF besteht.<sup>1,2,7</sup> Der Phänotyp II scheint jedoch seltener zu sein als vorerst angenommen und ist zu hinterfragen, weil typische Symptome in geringer Ausprägung oder aber eine andere Erkrankung vorliegen können.<sup>6</sup>

Eine weitere Einteilung der Erkrankung kann anhand ihres Ansprechens auf Colchizin erfolgen.<sup>30</sup> Dabei werden die Patienten, die unter Colchizintherapie keine Symptome entwickeln als "stabile Patienten" bezeichnet im Gegensatz zu "instabilen Patienten", die trotz Colchizineinnahme weiterhin Schübe und erhöhte Inflammationswerte zeigen.

Zur Einteilung des Schweregrades können zwei Scores herangezogen werden. Bei dem Score nach Pras et al. gehen das Manifestationsalter, die Anzahl der Attacken pro Jahr, die Form der Arthritis, akut versus protrahiert, das Bestehen eines erysipelartigen Exanthems, einer Amyloidose und die Colchizindosis ein, siehe Tabelle 1.<sup>31</sup> Je nach zutreffenden Punkten werden die Patienten in drei Schweregrade eingestuft.

Pras Score		
Alter bei Erkrankung		Punkte
	- > 31	0
	- 21 - 31	1
	- 11 - 20	2
	- 6 - 10	3
	- < 6	4
Attacken im Monat	- < 1	1
	- 1 - 2	2
	- > 2	3
Arthritis	- Akute	2
	- Protrahierte	3
Erysipelartiges Erythem		2
Amyloidose		3
Colchizin Dosis (mg/d)	- 1	1
	- 1,5	2
	- 2	3
	- > 2	4

**Tabelle 1:** Pras Score.

Einteilung der Schweregrade des FMF. 3 - 5 Punkte: milde Erkrankung, 6 - 8 Punkte: moderate Erkrankung, > 9 Punkte: schwere Erkrankung, adaptiert nach Pras et al. <sup>31</sup>

Bei dem Score nach Mor et al. wird unterschieden wie viele Bereiche während einer Attacke und ob mehr als 2 Bereiche im Verlauf der Erkrankung betroffen waren, ob mehr als insgesamt zweimal eine Pleuritis oder ein erysipelartiges Exanthem vorlag, ob der Erkrankungsbeginn vor dem zehnten Lebensjahr war und die Colchizindosis. <sup>11,32</sup> Auch hier werden drei Stufen mit leichter, mittlerer und schwerer Krankheitsaktivität unterschieden, siehe Tabelle 2.

Mor Score
1. > 1 betroffenes Gebiet während eines Schubes**
2. >2 betroffene Gebiete im Laufe der Erkrankung
3. >2 mg/d Colchizin zum Erreichen der Remission
4. >2 Attacken mit pleuritischen Beschwerden im Laufe der Erkrankung
5. >2 Erysipelartige Erytheme im Laufe der Erkrankung
6. Manifestation der Erkrankung <10 Jahren

**Tabelle 2:** Mor Score.

Schwere Erkrankung  $\geq 3$  zutreffende Kriterien, intermediäre Erkrankung 2 zutreffende Kriterien, milde Erkrankung  $\leq 1$  zutreffendes Kriterium. \*\* in mindestens 25% der Attacken, adaptiert nach Mor et al. <sup>32</sup>

### 1.1.4 Diagnostik

Für Erwachsene mit FMF wurden die "Tel Hashomer Kriterien" entwickelt, bei denen sogenannte Minor- und Majorkriterien eingehen und für die eine hohe Sensitivität und Spezifität (beides > 95%) gezeigt werden konnte.<sup>33</sup> Diese Kriterien wurden für die Anwendung an Kindern überarbeitet und bestehen aus den fünf Kriterien Fieber, Bauchschmerzen, Brustschmerzen, Arthritis, positive Familienanamnese und zeigen beim Vorliegen von mindestens zwei dieser Symptome eine Sensitivität von 84% und eine Spezifität von 94%.<sup>34</sup>

Eine weitere Säule in der Diagnostik stellt die genetische Untersuchung dar. Hierbei können homozygote, compound-heterozygote oder komplex Allel Mutationen im MEFV-Gen nachgewiesen werden. Zu beachten ist, dass auch beim Vorliegen nur einer Mutation die Diagnose FMF bestehen kann, da bei ca. 25% der Patienten nur eine Mutation nachweisbar ist.<sup>11,35</sup> Die Diagnose des FMF bleibt daher eine klinische und kann auch bei fehlendem Nachweis einer Mutation im MEFV-Gen gestellt und eine Therapie eingeleitet werden.<sup>36</sup>

Laborchemisch können vor allem während eines Schubes die klassischen Akute-Phase-Proteine erhöht sein. Die Messung des C-reaktiven Proteins (CrP), der Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG), des Serumamyloids A und eines Blutbildes sind zwar unspezifisch, aber einfach zu bestimmen und wichtige Parameter bei Kindern mit Fieber unklarer Genese. Differentialdiagnostisch eignen sich die S100 Proteine A8/A9 und S100A12, da diese außer beim FMF nur noch bei der systemischen juvenilen idiopathischen Arthritis (SJIA) sehr stark sezerniert werden.<sup>30</sup>

### 1.1.5 Therapie

Das wichtigste Therapeutikum in der Behandlung des FMF stellt bis heute das Colchizin dar. Es wurde 1972 zufällig entdeckt, als ein an FMF erkrankter Patient, der zusätzlich an Gicht litt, eine Verbesserung der Symptome des FMFs bemerkte.<sup>10</sup> Bereits 1974 konnte in doppelblinden Placebo-kontrollierten Studien gezeigt werden, dass Colchizin das Auftreten von FMF Schüben reduziert.<sup>37-39</sup> Darüber hinaus vermindert Colchizin das Risiko

einer Amyloidose und kann die Nierenfunktion nach Auftreten einer Nierenamyloidose verbessern.<sup>40</sup> Somit ist es sowohl zur Prophylaxe als auch zur Therapie der Amyloidose geeignet. Vor der Einführung von Colchizin waren 90% der an einer Amyloidose verstorbenen Patienten unter 40 Jahre.<sup>41</sup> Die orale Applikation kann man bei Kindern je nach Alter mit einer Dosis von 0,5-1,5 mg beginnen und nach Bedarf schrittweise bis max. 2,0 mg/Tag steigern.<sup>42</sup> Am häufigsten treten gastrointestinale Nebenwirkungen wie Übelkeit und Diarrhoe auf, die meist durch eine Reduktion der Dosis reversibel sind.<sup>43</sup> Durch Enzyminhibition kann eine Laktoseintoleranz bestehen. Sehr viel seltener Nebenwirkungen sind Myopathien oder eine Knochenmarksdepression. Auch die parenterale Verabreichung ist prinzipiell möglich, doch durch die vermehrten Nebenwirkungen kaum noch üblich. In der Langzeitanwendung konnte gezeigt werden, dass Colchizin keine negativen Auswirkungen auf das Längenwachstum und die Entwicklung bei Kindern hat.<sup>41</sup>

Colchizin gehört zur Gruppe der Alkaloide und übt seine antiinflammatorische Wirkung durch die Hemmung der Funktionen des Zytoskelett aus, insbesondere durch Inhibition der Polymerisierung der Mikrotubuli. Es kommt zu einer Veränderung der Selektine auf der Zelloberfläche auf neutrophilen Granulozyten und dem Endothel, sodass die Zelladhäsion gestört wird.<sup>44</sup> Zudem wird die Chemotaxis vermindert, was zum Teil der Veränderung der Zellelastizität zugeschrieben wird.<sup>45,46</sup> Außerdem beeinflusst Colchizin die Formierung des Inflammasoms und die Prozessierung von Interleukin-1, indem es dessen Aktivierung durch die Caspase-1 verhindert.<sup>47,48</sup>

Ungefähr 10 % der Patienten zeigen trotz regelmäßiger Einnahme von Colchizin kein Ansprechen auf die Therapie und haben weiterhin Beschwerden oder erhöhte Inflammationswerte.<sup>49,50</sup> In diesen Fällen wird von einer Colchizinresistenz gesprochen.

Ein weiterer Therapieansatz ist die Interleukin-1 $\beta$  Blockade zusätzlich zum Colchizin. Seit dem besseren Verständnis der Pathogenese, bei der eine erhöhte Interleukin-1 $\beta$ -Aktivität die Krankheitsschübe auslöst, wurde der erfolgreiche Einsatz der Interleukin-1 $\beta$  Blockade beschrieben. Fallbeispiele konnten zeigen, dass bei Patienten, die unter Colchizin keine

zufriedenstellende Kontrolle der Schubfrequenzen oder der inflammatorischen Aktivität verzeichneten, von der Therapie mit Interleukin-1-Blockern profitierten.<sup>51-54</sup> Aktuell werden drei verschiedene Interleukin-1 $\beta$  Blocker bei Autoinflammation eingesetzt. Erste randomisierte doppelblind-placebokontrollierte Studien liegen bereits vor. Für Rilonacept, konnte bei 14 Patienten gezeigt werden, dass es die Schubfrequenz im Vergleich zu Placebo signifikant senkt.<sup>55</sup> In zwei Pilotstudien mit dem monoklonalen IL-1 $\beta$ -Antikörper Canakinumab wurde bei jeweils sieben und 13 colchizinresistenten Patienten ebenfalls eine Abnahme der Schubfrequenz beobachtet.<sup>56,57</sup>

Zur Therapie der akuten Attacken werden symptomatisch nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR) oder in schweren Fällen Opiate empfohlen.<sup>42</sup>

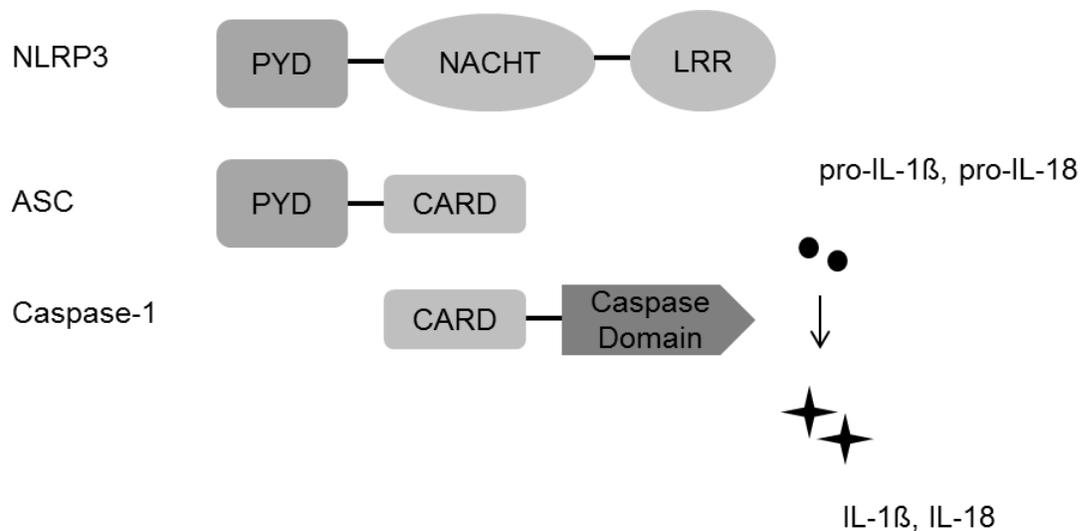
## 1.2 Pyrin und die Rolle des Inflammasoms beim FMF

Das Inflammasom ist ein zytosolischer Multiproteinkomplex, der intrazellulär als „pattern recognition receptor“ (PRR) verschiedene Gefahrensignale wie Erregerbestandteile („Pathogen-associated molecular patterns“, PAMPs) oder endogene Produkte wie Zytokine und Harnstoffkristalle („danger-associated molecular patterns“ DAMPs) erkennt. Daraufhin werden durch die Untereinheiten des Inflammasoms verschiedene Caspasen aktiviert, die wiederum als Serinproteasen Zytokine und intrazelluläre Prozesse in Gang setzen.<sup>58</sup> Es sind verschiedene Inflammasome abhängig von ihren Untereinheiten und Funktionen beschrieben worden. Insbesondere das NLRP3 Inflammasom ist sehr genau untersucht. Es hat eine wichtige Funktion bei der Erkennung von Gefahrensignalen, wie pathogenen Erregern, Sauerstoffradikalen, Veränderungen der intrazellulären Kaliumkonzentration oder von extrazellulärem Adenosintriphosphat (ATP).<sup>59</sup> Das NLRP3 Inflammasom führt zur Aktivierung der inflammatorischen Caspase-1 und diese wiederum spaltet pro-Interleukin-1 $\beta$  und pro-Interleukin-18 zu den aktiven Formen Interleukin-1 $\beta$  und Interleukin-18.

Erkrankungen mit Mutationen im NLRP3-Gen, auch Cryoporin genannt, werden als Cryoporin - assoziierte periodische Syndrome (CAPS) bezeichnet und gehören wie das FMF zur Gruppe der hereditären periodischen Fiebersyndrome. Zu den CAPS werden das Muckle-Wells-Syndrom (MWS), das „neonatal-onset multisystem inflammatory disease“

(NOMID) und das „familial cold autoinflammatory syndrome“ (FCAS) gezählt, bei denen allen es zu einer unkontrollierten Sekretion von Interleukin-1 $\beta$  kommt.<sup>60</sup>

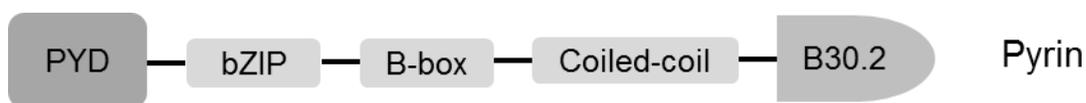
NLRP3 ist aus drei Untereinheiten aufgebaut, einer PYRIN-Domäne (PYD), einer nukleosid-bindenden-Domäne, in diesem Falle NACHT genannt, und einer Einheit mit repetitivem Leucin („leucin rich repeats“, LRR). Durch Anlagerung von Pro-Caspase-1 und dem Adapterprotein „apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD“ (ASC) an NLRP3 wird der Inflammasom-Komplex gebildet und die aktive Form der Caspase-1 entsteht.<sup>61</sup> Die Caspase-1 kann dann als Protease pro-IL-1 $\beta$  und pro-IL-18 in die biologisch aktiven Formen spalten, siehe Abbildung 2.



**Abbildung 2:** Das NLRP3- Inflammasom.

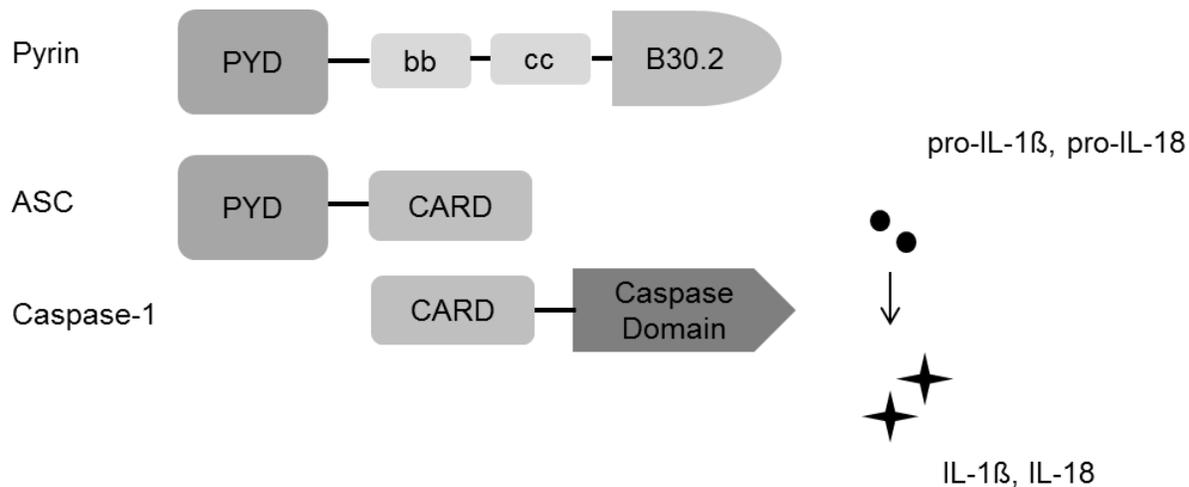
NLRP3 kann durch seine PYD-Untereinheit mit der PYD-Untereinheit des Adaptorproteins ASC interagieren. Durch Annäherung der CARD-Untereinheiten des ASC und der Caspase-1 wird diese aktiviert und kann nun pro-Interleukin-1 $\beta$  und pro-Interleukin-18 in ihre aktiven Formen spalten. PYD: Pysin-Domäne, LRR: Leucin rich repeats, ASC: apoptosis-associated speck-like protein, CARD: caspase-recruitment domain. Adaptiert nach Martinon et. al.<sup>59</sup>

Das MEFV Genprodukt Pypin besteht aus fünf Komponenten; N-terminal die PYRIN-Domäne (PYD), gefolgt von einer bZIP-Domäne, einer B-box Zink-Finger-Domäne, einer  $\alpha$ -helikalen coiled-coil-Domäne und am C-terminalen Ende einer B30.2-Domäne (Abbildung 3).<sup>62</sup> Vor allem die PYRIN- und die B30.2-Domäne haben wichtige Funktionen. Im Bereich der B30.2-Domäne liegt das Exon 10, wo sich unter anderem die Mutation M694V befindet, die mit einem schweren Phänotyp assoziiert ist. Mehrere Arbeiten konnten zeigen, dass die B30.2-Domäne bei der Interaktion zwischen Pypin und der Caspase-1 beteiligt ist und auch mit pro-IL-1 $\beta$  eine Verbindung eingeht und womöglich dessen Aktivierung hemmt.<sup>63,64</sup> Durch die PYRIN-Domäne kann Pypin mit der PYRIN-Domäne des Adaptorprotein ASC interagieren.<sup>60</sup>



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung des Pypins. Aufgebaut aus fünf Einheiten. PYD: Pypin-Domäne. Adaptiert nach Chae et. al.<sup>62</sup>

Ob und inwieweit Pypin bei der Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms beteiligt ist, war lange nicht klar. Eine Arbeit von Chae et.al. konnte erstmals in “knock-in“ Mäusen mit mutiertem Pypin zeigen, dass Pypin zusammen mit ASC ein NLRP3-unabhängiges Inflammasom bildet und durch Caspase-1 Aktivierung die IL-1 $\beta$  Sekretion zunimmt. Außerdem wurde gezeigt, dass die FMF-typischen Mutationen im Pypin-Gen zu einer Funktionszunahme (“gain-of-function“) mit unkontrollierter IL-1 $\beta$  Synthese führen.<sup>65</sup> Hieraus wurde das Pypin-Inflammasom abgeleitet, siehe Abbildung 4.



#### Abbildung 4: Das Pyrin-Inflammasom.

Pyrin kann durch seine PYD-Untereinheit mit der PYD-Untereinheit des ASC interagieren. Das Adaptorprotein ASC kann über eine CARD-Untereinheit mit der CARD-Einheit der Caspase-1 diese aktivieren. Dadurch spaltet die Caspase-1 pro-Interleukin-1 und pro-Interleukin-18 in ihre aktiven Formen. PYD: Pyrin-Domäne, bb: b-ZIP, B-box, cc: coiled-coil, ASC: apoptosis-associated speck-like protein with a CARD, CARD: caspase-recruitment-domain. Adaptiert nach Chae et.al.<sup>65</sup>

Eine weitere Funktion hat Pyrin auf den NFκB -Signalweg. Die Caspase-1 schneidet Pyrin bei Asp330 zwischen der PYD und B-box-Domäne.<sup>66</sup> Das N-terminale Spaltprodukt, das bei mutiertem Pyrin vermehrt diese Abspaltung begünstigt, führt intranukleär zu einer verstärkten Aktivierung von NFκB, welches als Transkriptionsfaktor die Expression proinflammatorische Zytokine steigert.

### 1.3 S100 Proteine

S100 Proteine gehören zu der Gruppe calciumbindender Proteine, von denen inzwischen über 20 bekannt sind. Sie liegen meist als Dimere vor und kommen intra- und auch extrazellulär vor.<sup>67,68</sup> Sie sind an vielen Signalwegen beteiligt wie z.B. der Regulierung des Zellzyklus, der Zellmotilität, der Zelldifferenzierung und auch der Apoptose.<sup>68</sup> S100A8, S100A9 und S100A12 werden auch als Calgranuline bezeichnet und haben eine besondere Funktion im angeborenen Immunsystem.<sup>69</sup> Sie aktivieren als "damage-associated molecular pattern" (DAMP) Proteine Signalwege und haben hierüber eine

proinflammatorische Wirkung.<sup>70</sup> Es konnte bei verschiedenen autoimmunen und autoinflammatorischen Erkrankungen wie Rheumatoider Arthritis, Morbus Crohn, Dermatomyositis, systemischer juveniler idiopathischer Arthritis und dem FMF gezeigt werden, dass diese vermehrt sezerniert werden und mit der Krankheitsaktivität korrelieren.<sup>30,70-72</sup> Ihre Prozessierung erfolgt unabhängig vom Inflammasom.

S100A8 und S100A9 liegen als Heterodimere vor und haben eine durch Calciumbindung getriggerte Funktion. Sie werden vor allem in neutrophilen Granulozyten und Monozyten exprimiert, machen den größten Anteil intrazellulärer Proteine in neutrophilen Granulozyten aus und werden bei Aktivierung dieser ausgeschüttet.<sup>69</sup> Intrazellulär interagieren S100A8/9 nach Aktivierung der Neutrophilen durch Calciumeinstrom mit dem Zytoskelett, vor allem mit den Mikrotubuli.<sup>73</sup> Hierdurch werden die Mikrotubuli stabilisiert und die Polymerisierung des Tubulins begünstigt. Die Zellmigration in Neutrophilen ist von S100A8/9 abhängig.<sup>73</sup> Der Komplex S100A8/9 wird über einen alternativen Sekretionsweg sezerniert. Hierbei erfolgt die Sekretion nicht wie üblich über das endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat, sondern über einen Signalweg, bei dem die Mikrotubuli involviert sind.<sup>74</sup> Extrazellulär bindet S100A8/9 an den Toll-like-receptor 4 (TLR-4) Komplex und aktiviert hierdurch dieselbe Signalkaskade, die auch Lipopolysaccharid (LPS) über den TLR-4 aktiviert.<sup>75</sup> Es kommt über den Myd88/IRAK-Signalweg zu einer Aktivierung von NFκB und hierdurch zur Steigerung der Transkription von proinflammatorischen Zytokinen, wie Interleukin-1β, Interleukin-18 und TNF-α.<sup>76</sup> Außerdem hat S100A8/9 extrazellulär eine chemotaktische Wirkung auf Neutrophile.<sup>77</sup>

S100A12 wird vornehmlich von neutrophilen Granulozyten exprimiert und bildet Mono- oder Homodimere.<sup>78</sup> Intrazellulär konnte durch erhöhte Calciumkonzentrationen bei Aktivierung der Neutrophilen auch für S100A12 eine Assoziation mit dem Zytoskelett gezeigt werden.<sup>78</sup> Die genaue Art der Sekretion ist noch nicht geklärt, es wird aber ähnlich wie bei S100A8/9, ein durch Mikrotubuli vermittelter Weg vermutet. S100A12 bindet extrazellulär an den "receptor for advanced glycation endproducts" (RAGE) auf endothelialen Zellen, Monozyten und auch Lymphozyten.<sup>67</sup> Hierdurch wird ein NF-κB abhängiger Signalweg aktiviert, der zur vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen

wie VCAM-1 in Endothelzellen und ICAM-1 in Zellen des Immunsystems führt.<sup>79</sup> Ein weiterer Signalweg scheint auch über die Bindung von S100A12 an den TLR-4 Rezeptor zu bestehen.<sup>80</sup> Die verstärkte Freisetzung von Interleukin-1 $\beta$  durch S100A12 ist womöglich auch einer gesteigerten NF- $\kappa$ B-abhängigen Transkription zuzuschreiben.<sup>79</sup> Extrazellulär hat S100A12 zudem eine chemotaktische Wirkung auf Monozyten und Mastzellen.<sup>77</sup>

Die besondere Rolle von S100A12 als Biomarker für Inflammation beim FMF konnte bereits gezeigt werden. Es eignet sich bei Patienten mit FMF als diagnostischer Biomarker für eine entzündliche Aktivität besser als andere Parameter wie z.B. das CrP oder die BSG.<sup>30</sup> Abgesehen vom FMF sind die Werte für S100A12 nur noch bei der systemischen juvenilen idiopathischen Arthritis (sJIA) so stark erhöht und können bei Patienten mit Fieber unklarer Genese zum differentialdiagnostischen Ausschluss anderer Erkrankungen herangezogen werden.<sup>71</sup> Bei der rheumatoiden Arthritis konnten zusätzlich zum Serum auch in der Synovialflüssigkeit hohe Werte für S100A12 gemessen werden.<sup>69</sup>

#### **1.4 Fragestellung**

Das Ziel dieser Arbeit war es bei einem kleinen Kollektiv an FMF erkrankten Patienten inflammatorische Prozesse genauer zu untersuchen. Durch die zugrundeliegende Pyrinmutation kommt es beim FMF zu wiederkehrenden Schüben, die mit einer gesteigerten Sekretion inflammatorischer Zytokine einhergehen, die Beschwerden in den betroffenen Arealen auslösen und langfristig die Entwicklung einer Amyloidose begünstigen. Vor allem Patienten mit der "high-risk" Mutation M694V haben einen schweren Krankheitsverlauf und ein höheres Risiko eine Amyloidose zu entwickeln. Daher ist es wichtig möglichst sensible Marker zu finden, die die Inflammation beim FMF anzeigen und ein besseres Verständnis der Pathogenese schaffen.

S100 Proteine scheinen gut zur Abbildung der Inflammation beim FMF geeignet zu sein. Sie werden inflammasom-unabhängig prozessiert. Gleichzeitig spielen inflammasom-abhängige Zytokine wie IL-1 $\beta$ , IL-18 und die Caspase-1 als Bestandteil des Inflammasoms eine wichtige Rolle bei der Inflammationsreaktion. Der therapeutische Nutzen von

Colchizin beim FMF steht außer Frage. Doch ist der genaue Wirkmechanismus dessen in der Therapie nicht geklärt.

Folgende Fragen sind zu klären:

- i) Wie ist die Inflammation in Neutrophilen und PBMCs von FMF Patienten? Besonders Neutrophile und Monozyten haben eine wichtige Funktion in der Pathogenese der Erkrankung.
- ii) In welchem Zusammenhang stehen die S100-Proteine zu inflammations-abhängigen Zytokinen beim FMF?
- iii) Lässt sich die Aktivität des Inflammation durch den Einsatz von Stimulanzen wie LPS oder PMA steigern?
- iv) Wie ist der Effekt von Colchizin *in vitro* auf die Inflammation und die Zytokinsekretion?
- v) Findet die gesteigerte Inflammation auf der Ebene der Transkription von Zytokinen oder der Ebene der Proteinsynthese bzw. der Proteinsekretion statt?

## 2. Materialien und Methoden

### 2.1. Materialien

#### 2.1.1 Geräte

Brutschrank, Heraeus B 6220	Thermo Scientific, Wilmington, USA
ELISA-Reader DSX-System	Dynex Technologies, Denkendorf
Mikrozentrifuge, Heraeus Pico 17	Thermo Scientific, Wilmington, USA
Minishaker MS1	IKA-Werke, Staufen
Nano-Drop Spectrophotometer	Thermo Scientific, Wilmington, USA
Photometer Dynatech MRX	Dynatech ,Chantilly USA
Pipettierhelfer, Pipetus	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Pipetten, Eppendorf Research	Eppendorf, Hamburg
Real Time PCR, ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System	Applied Biosystem, Foster City, USA
Standzentrifuge für PCR Platten, Sigma 6-16K	Sartorius, Göttingen
Standzentrifuge, Multifuge 1-L Heraeus	Thermo Scientific, Wilmington, USA
Sterilbank Laminar Flow, LaminAir Hbb 2448	Heraeus Instruments, Hanau
Thermoshaker TS1	Biometra, Göttingen
Zellzahlmessung, Sysmex XE-5000	Sysmex, Norderstedt

#### 2.1.2. Gefäße, Verbrauchsmaterialien

24-Well Platten	Greiner Bio-One, Frickenhausen
384-Well PCR-Platten	Greiner Bio-One, Frickenhausen
96-Well ELISA-Platten, Nunc MaxiSorp	eBioscience, Frankfurt am Main
Blutentnahme-System, BD Vacutainer	Becton Dickinson, Heidelberg
DNase/RNase freie Tubes, Eppendorf LoBind	Eppendorf, Hamburg
Einmalhandschuhe	wechselnde Hersteller
Einmalkanülen, 0,80x120mm Sterican	Braun, Melsungen
Einmalpipetten, Transferpipette 3,5ml	Sarstedt, Nümbrecht

Microvette, EDTA 500ul	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen 1000µl/200µl	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen 5ml/20ml Sterilin	Barloworld Scientific, Staffordshire, UK
Pipettenspitzen gestopft 10µl/1000µl	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Plastikgefäße 15ml/50ml, BD Falcon™	Becton Dickinson, Heidelberg
Spritze 10ml, Discardit II	Becton Dickinson, Heidelberg
Tubes 1,5 ml, Eppendorf Safe Lock	Eppendorf, Hamburg

### 2.1.3 Lösungen für Zelltrennung, Zellkulturmedien,

DMEM, F0435	Biochrom, Berlin
Fetales Kälberserum, FCS	Biochrom, Berlin
L-Glutamin	Biochrom, Berlin
Pen/Strep, Penicillin 10.000U/ml, Streptomycin 10.000µg/ml, Gibco	Invitrogen, Karlsruhe
Percoll 1,130g/ml	GE Healthcare, Freiburg
Phosphate Buffered Saline (PBS) ohne Ca & Mg	PAA Laboratories, Pasching
RPMI 1640, w 2,0 g/l NaHCO <sub>3</sub> , w/o L-Glutamin	Biochrom, Berlin

### 2.1.4 Stimulanzen

ATP	Sigma Aldrich, Taufkirchen
LPS von Escherichia coli 055:B5	Sigma Aldrich, Taufkirchen
PMA, Phorbol 12-myristate 13-acetate	Sigma Aldrich, Taufkirchen

### 2.1.5 Reagenzien und Lösungen für ELISA

ABTS, 2,2'-Azino-di-3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonat	Sigma Aldrich, Taufkirchen
BSA, Bovines Serum Albumin	Thermo Scientific, Rockford, USA
Carbonatpuffer, pH 9,5	Eigene Herstellung, Labor Münster

Citratpuffer, pH 4,0	Eigene Herstellung, Labor Münster
Colchizin	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Natriumcarbonat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Natriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Sigma Aldrich, Taufkirchen
PBS, Phosphate Buffered Saline ohne Ca & Mg	PAA Laboratories, Pasching
Schwefelsäure, H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
Streptavidin-Peroxidase	Dianova, Hamburg
Tween 20	Merck, Darmstadt
Wasserstoffperoxid, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Merck, Darmstadt

### 2.1.6 Antikörper für ELISA

Alpha-Caspase-1	R&D Systems, Minneapolis
Interleukin-1 $\beta$	R&D Systems, Minneapolis
Interleukin-18	MBL International, Woburn
S100A12	Eigene Herstellung, Labor Münster
S100A8/9	Eigene Herstellung, Labor Münster

### 2.1.7 RNA-Isolation

2-Mercaptoethanol	Carl Roth, Karlsruhe
Macherey-Nagel Kit, Total-RNA-Isolierung	Macherey-Nagel, Düren

### 2.1.8 cDNA-Umschreibung

5xfach Reaktionspuffer	Fermentas, St. Leon-Rot
dNTP-Mix	Fermentas, St. Leon-Rot
Nukleasefreies Wasser	Macherey-Nagel, Düren
Oligo dt18 Primer	Fermentas, St. Leon-Rot
RevertAid™ H Minus Reverse Transcriptase	Fermentas, St. Leon-Rot

**2.1.9 Reagenzien für RT-PCR**

Mastermix, KAPA SYBR FAST qPCR	KAPA Biosystems, Woburn, USA
Nukleasefreies Wasser	Macherey-Nagel, Düren
SYBR-Green	KAPA Biosystems, Woburn, USA

**2.1.10 Primer für RT-PCR**

GAPDH 236F	GCA AAT TCC ATG GCA CCG T
GAPDH 339R	GCC CCA CTT GAT TTT GGA GG
RPL 13A 277F	AGG TAT GCT GCC CCA CAA AAC
RPL 13A 418R	TGT AGG CTT CAG ACG CAC GAC
IL 1 beta vers 2 F	GCG GCC AGG ATA TAA CTG ACT TC
IL 1 beta vers 2 R	TCC ACA TTC AGC ACA GGA CTC TC
IL 18 F	TTC AAC TCT CTC CTG TGA GAA CA
IL 18 R	ATG TCC TGG GAC ACT TCT CTG
S100A12 198 R	TGT TTG CAA GCT CCT TTG TAA GC
S100A12 73 F	CAA AAC TTG AAG AGC ATC TGG AGG
S100 A8 165 F	TGC TAG AGA CCG AGT GTC CTC AG
S100 A8 290 R	CCA TCT TTA TCA CCA GAA TGA GGA AC
S100 A9 154 F	TTC AAA GAG CTG GTG CGA AAA G
S100 A9 R	GCA TTT GTG TCC AGG TCC TCC

**2.2 Verwendete Computerprogramme**

Excel, Microsoft Office 2010

Nanodrop Software, Thermo Scientific

Prism 5.0, GraphPad

Revelation DSX 6.08, Dynex Technologies

SDS 2.2.2, ABI

## 2.3 Methoden

### 2.3.1 Patienten

Insgesamt wurden zehn Personen als Probanden eingeschlossen, davon sechs Patienten mit der Diagnose FMF aus der rheumatologischen Sprechstunde des sozialpädiatrischen Zentrums (SPZ) der Charité Berlin. Es wurden Patienten mit der "high-risk" Mutation M694V und einem instabilen Krankheitsverlauf ausgewählt, die zum Zeitpunkt der Untersuchung mit Colchizin therapiert wurden. Alle Patienten gaben ihr schriftliches Einverständnis. Die Genehmigung der Ethikkommission wurde eingeholt (EA2/033/09). Bei minderjährigen Patienten wurde die Zustimmung beider Eltern und des Jugendlichen eingeholt. Vier gesunde Personen dienten als Kontrollen.

Die zu untersuchenden Personen wurden anhand eines Fragebogens zu ihrem Alter, ihrer Ethnizität und ihrem Geschlecht befragt. Weiterhin wurden nach immer wieder auftretenden Fieberschüben, Bauchschmerzen, Brustschmerzen, Gelenkentzündungen und entzündlichen Hautveränderungen gefragt. Sie sollten angeben, ob bei ihnen in der Vorgeschichte der Blinddarm operativ entfernt wurde, ob eine Nierenfunktionsveränderung, eine Herzerkrankung, immer wiederkehrende Infektionen, eine Nervenerkrankung oder weitere Erkrankungen vorliegen. Die Personen sollten angeben, ob sie regelmäßig Medikamente einnehmen und wenn ja, in welcher Dosierung. Es wurde nach der Erkrankung von Familienangehörigen an FMF oder unklarer Nierenfunktionsstörung gefragt. Als letztes sollten die Teilnehmer beantworten, ob bei ihnen in den letzten 14 Tagen Fieber oder ein Infekt bestand.

Zusätzlich zum Fragebogen wurde ein klinischer Status der Patienten erhoben und eine kurze Anamnese durchgeführt. Die zugrunde liegende Mutation und die Schubfrequenz wurden aus den alten Arztbriefen entnommen, die Schwere des Krankheitsverlaufs mithilfe des Pras- bzw. Mor-Scores ermittelt.

Die Kontrollen waren alle deutscher Herkunft. Alle Kontrollen waren gesunde Erwachsene und für die Teilnahme an der Studie wurde ihr Einverständnis erfragt.

### 2.3.2 Probengewinnung

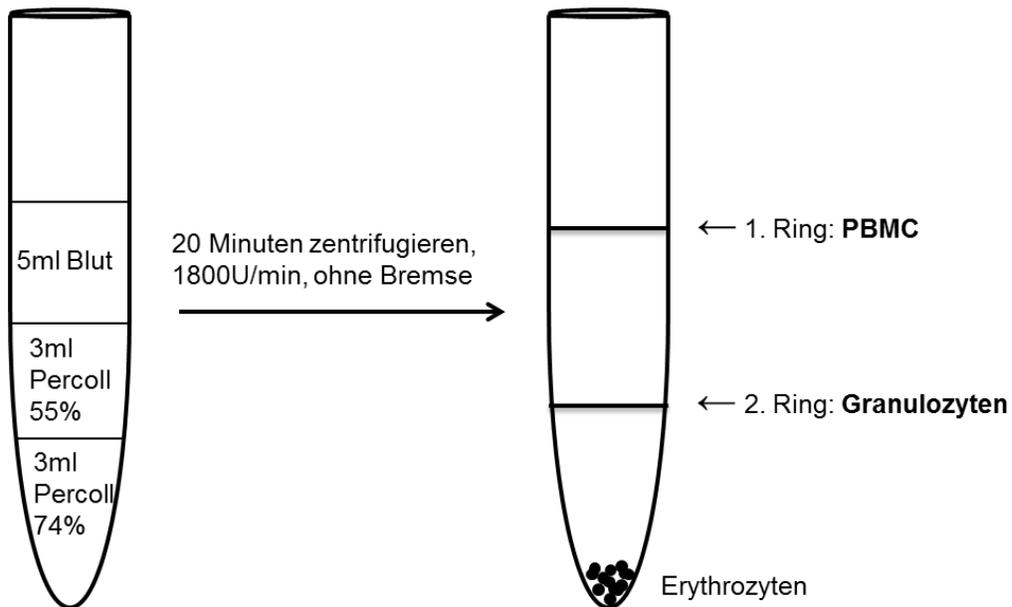
Es wurde bei allen zehn Personen mit dem Vacutainer Entnahmesystem von Becton Dickinson jeweils 25 - 30 ml Blut in Heparinröhrchen abgenommen und möglichst zügig, ohne starke Abkühlung ins Labor transportiert. Dabei wurden die Patienten für die Blutentnahme entweder in die Klinik gebeten oder zu Hause aufgesucht. An jedem Tag wurde zusätzlich eine Kontrollperson analysiert.

### 2.3.3 Zellauftrennung

Vor dem Beginn der Zellauftrennung wurde bei jeder Probe 1 ml Plasma gewonnen und für eine spätere CrP Messung weggefroren. Es wurden 500 µl des Vollblutes in eine kleine EDTA-Microvette überführt und die Bestimmung eines Differentialblutbildes vorgenommen. Diese erfolgte am Zählautomaten Sysmex XE-5000.

Das Ziel der Zelltrennung war es Granulozyten und mononukleäre Zellen, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), möglichst genau mit einem Zweidichtgradienten voneinander zu trennen und steril zu arbeiten, um für die späteren Messungen keine Verunreinigungen zu erzeugen. Daher wurden bei allen Versuchen Handschuhe getragen, immer unter der Sterilbank gearbeitet und die Arbeitsfläche zwischen den einzelnen Schritten mit Alkohol gereinigt.

Als erstes wurde das Blut 1:2 mit Phosphate Buffered Saline (PBS) verdünnt – so entstand eine Zellsuspension von 50-60ml. Durch den Einsatz von Percoll in zwei verschiedenen Dichten (D 1,076, 55%; D 1,095, 74%) wurde ein Dichtegradient hergestellt und auf diese Säulen 5 ml der Zellsuspension gegeben. Es wurde anschließend 20 Minuten bei 1800 U/min ohne Bremse und bei Raumtemperatur zentrifugiert. Es bildeten sich in dem Gefäß verschiedene Banden und Ringe (Abbildung 5). Der erste Ring entsprach den getrennten PBMC's, der zweite den Granulozyten. Das abgesunkene Sediment entsprach den Erythrozyten.



**Abbildung 5:** Schematische Darstellung der Zelltrennung mit Percoll. Granulozyten und PBMC's mit Percoll in zwei Dichten aufgetrennt.

Die so getrennten Granulozyten und PBMCs wurden vorsichtig entnommen und in ein neues Gefäß überführt. Es wurde zweimal mit PBS gewaschen und jedes Mal bei 1800 U/min für 10 Minuten zentrifugiert, bis dann die endgültigen Zellpellets zur Messung und Stimulation in 1 ml RPMI aufgenommen wurden. Vor den weiteren Schritten wurden die nun getrennten Zellen erneut differenziert. Somit konnte einerseits die Güte der Zelltrennung festgestellt werden und andererseits erhielt man die genauen Zellzahlen für Granulozyten und PBMC's. Es wurde wieder am Zählautomaten Sysmex XE-5000 gemessen. Nach der Messung wurden die Zellen auf eine Konzentration von  $5 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Um alle geplanten Stimulationsansätze durchzuführen, wurden mindestens  $8 \times (5 \times 10^6)$  Zellen pro Zellreihe benötigt. Dies gelang nur bei zwei Ansätzen nicht. Die Zellen wurden bei der Verdünnung in die jeweiligen Kulturmedien aufgenommen.

Kulturmedien	Zusammensetzung
Granulozyten	RPMI 1640 + 5% FCS
PBMC	DMEM + 10% FCS + 1% Pen/Strep + 1% L-Glutamin

**Tabelle 3:** Kulturmedium für Granulozyten und PBMCs

### 2.3.4 Stimulation

Anschließend erfolgte die Stimulation der Zellen mit verschiedenen Substanzen. Es wurde mit PMA, LPS, LPS+ ATP stimuliert und jeder Ansatz noch einmal unter Zugabe von Colchizin durchgeführt. Die Endkonzentrationen der Stimulanzen in 1 ml sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Stimulanz	Endkonzentration
PMA	10 nM
LPS	10 ng/ml
ATP	1 mM
Colchizin	5 µg/ml

**Tabelle 4:** Endkonzentration der Stimulanzen in 1 ml Zellsuspension

Die Stimulation erfolgte in 24-Well-Platten. In jede Vertiefung wurde 1 ml Zellsuspension pipettiert. Es wurden jeweils 8 Ansätze mit PBMC's und 8 Ansätze mit Granulozyten bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Inkubator stimuliert. Das genaue Stimulationsschema bzw. Pipettierschema für beide Zellreihen ist in der Tabelle 5 und Tabelle 6 dargestellt. Die Stimulation der Granulozyten dauerte insgesamt vier Stunden, die der PBMC's 16 Stunden. Dabei wurde die gesamte Zeit immer ein Ansatz ohne Zugabe von Stimulanzen mitgeführt.

Nach der Stimulation wurde nur noch mit gestopften Pipettenspitzen gearbeitet, um Verunreinigungen weiter zu verringern. Der Inhalt einer Vertiefung wurde in ein RNase-freies Tube aufgenommen und fünf Minuten bei 8000 U/min zentrifugiert. Es bildete sich ein Pellet mit Überstand. Der Überstand der stimulierten Zellen wurde in ein neues RNase-freies Tubes aufgenommen und bei -80°C eingefroren. Die Zellpellets wurden mit 350 µl RA1- Lysepuffer aus dem Macherey-Nagel Kit für "Total RNA Isolation" lysiert und jeweils 3,5 µl 2-Mercaptoethanol hinzugefügt. Dieses diente zur Reduktion von Disulfidbrücken und somit der Deaktivierung von vorhandenen RNasen in der Probe. Das Gemisch wurde

gründlich vermischt. Die lysierten Zellen wurden bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren und an das Immunologie Labor der Universität Münster verschickt. Alle folgenden Messungen und Versuche wurden in dem Labor für Immunologie der Universität Münster durchgeführt.

Granulozyten	Stunde -1	Stunde 0	Stunde 3,5	Stunde 4
1.	-	-	-	Ernte
2.	-	PMA	-	Ernte
3.	-	LPS	-	Ernte
4.	-	LPS	ATP	Ernte
5.	Colchizin	-	-	Ernte
6.	Colchizin	PMA	-	Ernte
7.	Colchizin	LPS	-	Ernte
8.	Colchizin	LPS	ATP	Ernte

**Tabelle 5:** Stimulationsschema für Granulozyten.

Es wurde mit PMA, LPS und ATP bzw. alle Ansätze wiederholt mit Colchizin 4h stimuliert.

PBMCs	Stunde -1	Stunde 0	Stunde 15,5	Stunde 16
1.	-	-	-	Ernte
2.	-	PMA	-	Ernte
3.	-	LPS	-	Ernte
4.	-	LPS	ATP	Ernte
5.	Colchizin	-	-	Ernte
6.	Colchizin	PMA	-	Ernte
7.	Colchizin	LPS	-	Ernte
8.	Colchizin	LPS	ATP	Ernte

**Tabelle 6:** Stimulationsschema für PBMC's.

Es wurde mit PMA, LPS und ATP bzw. alle Ansätze wiederholt mit Colchizin 16h stimuliert.

#### 2.4.4 Enzyme-linked Immunosorbent Assay, ELISA

Um die Sekretion von S100A8/9, S100A12, IL-1, IL-18 und Caspase-1 zu bestimmen, wurde ein Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) durchgeführt. Die Messungen erfolgten aus den Überständen der Granulozyten und der PBMC's, die nach Zellstimulation gewonnen wurden.

Es wurde ein Sandwich-ELISA durchgeführt, bei dem die Quantifizierung des gesuchten Proteins am Ende durch eine Farbreaktion photometrisch erfolgt. Zuerst werden die Platten mit einem ersten Antikörper beschichtet, der das gesuchte Antigen spezifisch bindet. Durch die Zugabe des Antigens in jedes Well, wird dieses durch den Primärantikörper gebunden. Als nächstes wird ein zweiter Antikörper zugeführt, der ebenfalls das Antigen spezifisch bindet und einen biotinylierten Abschnitt besitzt. Das Enzym Streptavidin-Peroxidase kann nun nach Zugabe des Substrats 2,2'-Azino-di-3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure (ABTS) unter Anwesenheit des Koenzyms Biotin die ABTS in ein farbiges Produkt umwandeln. Hierbei ist die gemessene Extinktion proportional zur eingesetzten Antigenmenge und kann somit berechnet werden. Parallel wird ein Proteinstandard so verdünnt, dass die zu erwartenden Antigenkonzentrationen im linearen Bereich der Standardkurve liegen und man diese Konzentration des gesuchten Antigens an der Kurve ablesen kann. Die Darstellung eines Sandwich-ELISA ist in Abbildung 6 zu sehen.

<b>ELISA Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Waschpuffer	PBS+0,02% Tween
Blockpuffer	Waschpuffer+0,25% BSA
Carbonatpuffer	0,1 M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> +0,1 M NaHCO <sub>3</sub> (pH 9,5)
Citratpuffer	0,05 M Citrat+0,1M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (pH 4,0)

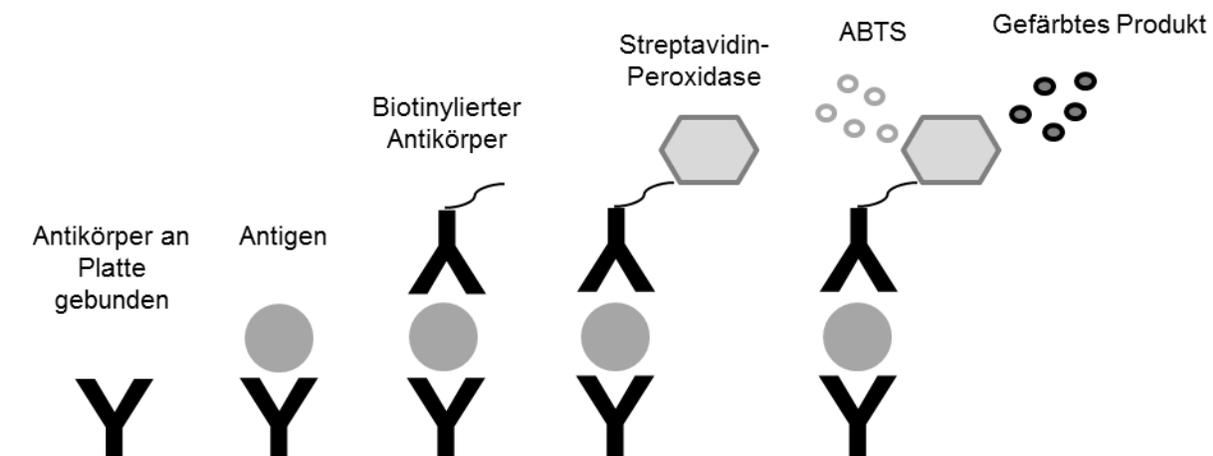
**Tabelle 7:** Zusammensetzung der ELISA-Puffer

Im ersten Schritt wurden 9,1µl des Primärantikörpers mit 5ml Carbonatpuffer vermischt und hiervon 50µl in jede Vertiefung der Mikropipettierplatte (96 Well) pipettiert und somit mit dem Antikörper beschichtet. Das Ganze wurde über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Vertiefungen mit je 200µl Waschpuffer gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu eliminieren. Freie Bindungsstellen wurden im nächsten Schritt mit 100µl Blockpuffer pro Vertiefung blockiert und erneut mit 200 µl Waschpuffer gespült. Aus den Antigenlösungen und dem Blockpuffer wurde eine Verdünnungsreihe mit 1:100, 1:200 und 1:400 hergestellt und jede Verdünnung doppelt pipettiert. Mit dem

Proteinstandard wurde ebenfalls eine Verdünnungsreihe mit dem Blockpuffer hergestellt und doppelt aufgetragen. Auf jeder Platte wurde eine Reihe ohne Antigen mitgeführt, um einen Leerwert zu erhalten.

Nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden bei 20°C wurden die Wells mit 200µl Waschpuffer gewaschen. Nun wurde der zweite biotinylierte Antikörper mit Blockpuffer verdünnt, 50µl in jede Vertiefung gegeben und bei 37°C 30 Minuten inkubiert. Es folgte eine dreimalige Waschung mit 200µl Waschpuffer. Die Streptavidinperoxidase wurde mit Waschpuffer verdünnt und 50µl pro Vertiefung hinzugefügt. Es wurde bei 37°C 30 Minuten inkubiert. Von dem Substrat ABTS wurde 0,01 g mit 25 ml Citratpuffer und 10µl Wasserstoffperoxid vermischt und von dieser Lösung 200 µl pro Vertiefung pipettiert. Nach 20 Minuten Inkubation erfolgte die Messung am Photometer Dynatech MRX bei 405 nm.

Bei den Messungen für Interleukin-1 $\beta$ , Interleukin-18 und Capase-1 kam es bei den Messungen indem Stimulationsansatz mit PMA sowohl in den Überständen der Granulozyten als auch PBMCs zu einem Fehler, sodass die Werte nicht gemessen werden konnten.



**Abbildung 6:** Schematische Darstellung eines Sandwich-ELISAs.  
2,2'-Azino-di-3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure (ABTS)

### 2.4.5 RNA-Präparation

Um auch eine Aussage über die Transkription der Proteine zu machen, musste zuerst die mRNA aus den lysierten Zellen nach der Zellstimulation isoliert werden.

Die RNA-Präparation wurde mit dem Macherey-Nagel Kit für "Total RNA Isolation" gemäß dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Hierbei wurden im ersten Schritt die Zellen mit einem Lysepuffer zerstört und durch die Zugabe von 2-Mercaptoethanol vorhandene RNasen denaturiert. In weiteren Schritten wurde die RNA an eine Membran in den speziellen Tubes, die im Kit enthalten sind, gebunden und noch vorhandene DNA durch Zugabe von DNasen zerstört. Nach Waschungen mit verschiedenen Lösungen, wurde die RNA am Ende durch Zugabe von 40 µl RNasefreiem Wasser eluiert.

Der Lysepuffer RA1 und 2-Mercaptoethanol wurden in Berlin zu den Zellpellets hinzugefügt und die Zellen lysiert. Die weiteren Schritte wurden durch meine Person im Labor für Immunologie in Münster durchgeführt. Die Proben wurden zunächst aufgetaut, resuspendiert und gut vermischt. Die Zellsuspension wurde dann auf die Filtersäulen aus dem Kit gegeben und 1 min bei 11.000\*g zentrifugiert. Danach wurde die Säule entfernt und zu dem Durchfluss 350 µl 70% Ethanol hinzugefügt. Das Lysat wurde gut vermischt und auf RNAlI-Columns des Kits gegeben. Es folgte eine erneute Zentrifugation bei 11.000\*g für 30 Sekunden. Im nächsten Schritt wurden die Säulen auf neue 2 ml Tubes überführt und auf jede Säule 350µl MDB-Puffer gegeben. Diese wurde bei 11.000\*g für eine Minute zentrifugiert. Für den DNase-Verdau musste die Lösung mit dem Reaktionspuffer und der rDNase aus dem Kit angesetzt werden. 90 µl Reaktionspuffer und 10 µl rDnase wurden vermischt und auf jede Säule 95 µl pipettiert. Das ganze wurde 15 Minuten inkubiert. Als nächstes wurden 200 µl des RA2 Puffers auf die Säulen gegeben, bei 11.000\*g 30 Sekunden zentrifugiert und der Durchfluss weggekippt. Danach wurden 600ml des RA3 Puffers auf die Säule pipettiert, erneut bei 11.000\*g geschleudert und im letzten Waschschrift 250 µl des RA3 Puffer auf die Säulen gegeben und bei 11.000\*g für 2 Minuten zentrifugiert. Die Durchflüsse wurden wieder verworfen. Der letzte Schritt bestand daraus, die RNA aus der Membran der speziellen Tubes zu eluieren. Hierzu wurde 40 µl

RNasefreies Wasser auf die Säulen gegeben, 30 Minuten inkubiert und dann bei 11.000\*g zwei Minuten zentrifugiert und die so erhaltenen 40 µl RNA sofort auf Eis gekühlt.

Die isolierte RNA wurde am NanoDrop®-ND-1000-Spektrophotometer gemessen. Hierbei wurde jeweils 1 µl RNA zur Messung benötigt und bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen, da das Absorptionsmaximum von RNA bei 260nm liegt. Durch die Bildung eines Quotienten zwischen 260 nm und 280 nm konnte man den Verunreinigungsgrad feststellen, da Proteine ein Absorptionsmaximum bei 280 nm haben. Der Wert dieses Quotienten sollte zwischen 1,6 und 2,0 liegen. Es erfolgte auch eine graphische Darstellung der RNA-Werte mit der Nanodrop Software, bei der das Maximum des Graphen und der Absorption bei 260 nm liegen sollten. Hierdurch konnte man Verunreinigungen der RNA ebenfalls beurteilen.

#### **2.4.6 cDNA Umschreibung**

Die mRNA wurde im nächsten Schritt für die spätere Real Time PCR in cDNA umgeschrieben, da das Enzym bei der Polymerasekettenreaktion nur DNA als Matrize verwenden kann.

Für die cDNA Umschreibung wurden Produkte aus dem "RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit" von der Firma Fermentas benutzt. Es wurde weiterhin in sterilen, nukleasefreien Tubes gearbeitet.

Bei der cDNA-Synthese stellt die Reverse Transkriptase RNA-abhängig DNA her. Diese Reverse Transkriptase benötigt Primer, in diesem Fall Oligo dt18 Primer, um mit der Synthese der komplementären DNA zu beginnen. Es werden weiterhin die Bausteine der DNA, Nukleotide, Puffer und eine Temperatur von 42°C benötigt, damit das Enzym optimal arbeitet.

Als erstes wurde die RNA für die cDNA-Umschreibung auf eine Konzentration von 1 µg/µl verdünnt. Zu der RNA wurde jeweils 1 µl Oligo dt18 Primer (100 µM 5'-TTT TTT TTT TTT TTT TTT 3') gegeben, und bei 70°C fünf Minuten inkubiert. Zwischen den Inkubationen wurden die Proben immer auf Eis gestellt. Es wurde auf jede Probe 11,2 µl

Praemix gegeben, bestehend aus 10 µl 5xBuffer, 1 µl dNTP 10mM und 0,2 µl Reverse Transkriptase. Es folgte eine Inkubationszeit von 60 Minuten bei 42°C für die Synthese der cDNA und eine weitere bei 70°C für zehn Minuten, um die Reaktion zu beenden und die Reverse Transkriptase zu denaturieren. Die gewonnene cDNA wurde bei -80°C aufbewahrt.

#### **2.4.7 Real Time PCR**

Zur Bestimmung der ursprünglichen mRNA Menge wurde eine Real Time PCR (RT-PCR) durchgeführt. Hierbei kommt es zu einer quantitativen Bestimmung der Nukleinsäuren nach jeder Sequenz während der Reaktion, daher der Name „Real-Time“.

Bei der RT-PCR synthetisiert eine thermostabile Taq-Polymerase DNA. Im ersten Schritt wird die DNA durch Erhitzen auf ca. 95°C in zwei Einzelstränge aufgetrennt (Denaturierung) und gleichzeitig die Taq-Polymerase aktiviert. Durch Zugabe der Primer, spezifischer Oligonukleotide und Senkung der Temperatur auf ca. 60°C können diese sich nun der DNA im gewünschten Bereich anlagern (Annealing) und die Polymerase kann die DNA-Synthese unter Einbau der komplementären Nukleotide (dNTP's) beginnen (Elongation). Dieser Zyklus wird bei der Polymerasekettenreaktion 20-40-mal wiederholt, sodass am Ende tausende Kopien des gewünschten Gens vorliegen. SYBR-Green ist ein interkalierender Farbstoff, der sich unspezifisch doppelsträngiger DNA anlagert und nach Bindung Fluoreszenzsignale freisetzt. Dieses emittierte Licht kann dann durch einen Detektor gemessen werden und nimmt mit der Anzahl an amplifiziertem Produkt proportional zu. Da der Farbstoff allerdings unspezifisch alle PCR Produkte bindet, werden am Ende der Reaktion sogenannte Schmelzpunktanalysen angefertigt. Hierbei wird die Temperatur im *Cycler* langsam erhöht, sodass es zur Denaturierung von Doppelstrang-DNA kommt. Je nach Länge und Basenbeschaffenheit denaturieren die einzelnen Produkte der PCR bei unterschiedlichen Temperaturen und die Fluoreszenz nimmt hierdurch ab. Da der gesuchte Genabschnitt länger als sich bildende Artefakte ist, denaturiert dieser bei den höchsten Temperaturen und der PCR-Detektor bestimmt dessen Schmelzpunkttemperatur und Fluoreszenz. Das RT-PCR Temperaturprotokoll ist in Tabelle 8 abgebildet.

Bei der RT-PCR wird zwischen jedem neuen Zyklus eine Fluoreszenz-Messung durchgeführt. Dies hat den Grund, dass bei den ersten Zyklen noch zu wenige Matrizen vorhanden sind, damit eine exponentielle Zunahme des gewünschten Gens zustande kommt. In den letzten Zyklen dagegen sind die Substrate teilweise verbraucht und das Gen wird immer weniger amplifiziert. Der Cycle threshold - Wert (Ct-Wert) wird während der mittleren exponentiellen Zyklen bestimmt und ist der Zeitpunkt an dem die Fluoreszenz des zu bestimmenden DNA-Abschnitts die Hintergrundfluoreszenz zum ersten Mal übersteigt. Die Schwelle wird auch als Baseline bezeichnet und von dem Programm zur PCR-Auswertung automatisch bestimmt.

Zur relativen Quantifizierung der eingesetzten mRNA-Menge werden parallel sogenannte "house-keeping" Gene amplifiziert, welche ubiquitär exprimiert werden und deren Konzentration durch die Zellstimulation nicht beeinflusst wird. Die erhaltenen Ct-Werte der gesuchten Gene werden zu diesen "house-keeping" Genen in Bezug gesetzt und durch Bildung eines  $\Delta Ct$  relativ quantifiziert.

<b>Temperaturprotokoll für ABI Prism</b>	
Stage 0: 50°C 2min	Ausgangstemperatur
Stage 1: 95°C 15min	Aktivierung der Taq Polymerase, Denaturierung
Stage 2: 60°C 60sec 95°C 15sec.	Annealing und Elongation, 40 Zyklen
Stage 3: 95°C 15sec. 60°C 15 sec. 95°C 15sec.	Schmelzkurvenanalyse

**Tabelle 8:** Temperaturprotokoll für Real-Time PCR

Im ersten Schritt wurden Verdünnungen aller cDNA-Proben über eine Verdünnungsreihe hergestellt. Die Verdünnung von 1:100 wurde für die "house-keeping" Gene Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und Ribosomal Protein L (RPL) eingesetzt, die Verdünnung 1:10 für alle anderen Gene. Es wurde ein Primermix mit dem jeweiligen Primern für S100A8, S100A9, S100A12, IL-1 und IL-18 angesetzt.

PCR Lösungen	Zusammensetzung
Primermix	10µl FW Primer + 10µl RV Primer + 80µl H <sub>2</sub> O
Mastermix für je eine Probe	0,4µl Primermix + 5µl 2*SYBR Mastermix + 2,3µl H <sub>2</sub> O

**Tabelle 9:** Zusammensetzung der PCR-Lösungen

Zum Mastermix KAPA SYBR FAST qPCR der Firma KAPA Biosystems wurden der Primermix und Wasser hinzugefügt. Der Mastermix KAPA SYBR FAST qPCR enthält außer einer Taq-Polymerase die dNTP's, MgCl und den Fluoreszenz-Farbstoff SYBR® Green I. In jede Vertiefung der Platte wurde 2,5µl der cDNA pipettiert, hierbei wurde jede Probe doppelt pipettiert und dann jeweils 7,5µl des selbst angesetzten Mastermixes hinzugefügt. Somit belief sich der Inhalt jeder Vertiefung auf 10µl. Die Platten wurden mit einer Folie dicht versiegelt und für eine Minute zentrifugiert, bevor sie zur Messung in das *ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System* gegeben wurden.

Mit Hilfe der Software SDS 2.2.2 der Firma Applied Biosystems wurden die Daten ausgewertet und in Microsoft Excel übertragen.

Zunächst wurde die RT-PCR für die Proben der Granulozyten durchgeführt, um Veränderungen der Transkription durch die Stimulation zu messen. Es wurden Messungen für S100A8, S100A9, S100A12, Interleukin-1 und Interleukin-18 durchgeführt. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde entschieden bei den PBMC's die RT-PCR nur für Interleukin-1 durchzuführen.

### **2.4.8 CrP-Messung**

Das C-reaktive-Protein (CrP) gehört zu den klassischen Akute-Phase-Proteinen und wird während entzündlicher Reaktionen unspezifisch freigesetzt. Durch die Bestimmung des CrP bei Patienten und Kontrollen erhielt man einen weiteren Entzündungsparameter, der auch routinemäßig in der Klinik bestimmt wird. Die Messung erfolgte aus den anfänglich eingefrorenen Plasma-Aliquots im Labor in Berlin. Dabei wurde nephelometrisch das high sensitivity- CrP (hs-CrP) mit einer Nachweisgrenze ab 0,005 mg/dl gemessen. Ab 0,5mg/dl spricht man von einem erhöhten Wert.

### **2.4.9 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung und die Darstellung der Graphen erfolgten mit Hilfe des Programms „Graph Pad Prism 5.0“. Für die Überprüfung der Signifikanz wurde bei Vergleichen zwischen Patienten und Kontrolle der Mann-Whitney-Test angewandt, bei Vergleichen innerhalb der Patientengruppe unter verschiedenen Ansätzen der Wilcoxon-Test. Ein p-Wert  $<0,05$  wurde als signifikant gewertet. Ein p-Wert  $<0,05$  wurde mit „\*“ und ein p-Wert  $<0,01$  mit „\*\*“ dargestellt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Patienten und Kontrollen

Es wurden insgesamt zehn Personen untersucht, hiervon sechs Patienten mit der Diagnose FMF und vier gesunde Personen. Es wurde von allen Personen Blut abgenommen und zusätzlich wurde Ihnen ein Fragebogen ausgehändigt. Der ausgefüllte Fragebogen lieferte folgende Ergebnisse:

Die ausgewählten sechs Patienten gaben alle als Herkunftsland die Türkei an. Das durchschnittliche Alter der Patienten lag zwischen 16 und 28 Jahren (Mittelwert 20,2 J). Drei der Patienten waren männlich. Alle sechs Patienten gaben an, dass in der Vergangenheit die typischen Symptome eines FMF, wie immer wieder auftretendes Fieber, Bauchschmerzen oder Brustschmerzen bestanden hatten. Drei von sechs Patienten (50%) waren appendektomiert. Ob eine Blinddarmentzündung wirklich vorlag, war nicht zu eruieren. Einer der Patienten teilte mit, an einer Nierenfunktionsstörung zu leiden, die nicht genauer angegeben werden konnte und einer gab an zusätzlich an Asthma bronchiale erkrankt zu sein. Alle Patienten nahmen Colchizin in einer Dosis zwischen 1,5 - 2,5 mg pro Tag ein. Der an Asthma bronchiale erkrankte Patient nahm zusätzlich ein Kombinationspräparat aus Fluticason und Salmeterol ein, ein weiterer Patient nahm Eisen ein.

Bei fünf von sechs Patienten bestand eine positive Familienanamnese bezüglich des FMF. Der einzige Patient, bei dem die Familienanamnese negativ war, gab an, dass in der Familie ein Fall einer unklaren Nierenfunktionsstörung bestehe.

Ein Patient hatte in den letzten 14 Tagen Fieber bzw. einen Infekt, bei der Blutentnahme bestanden jedoch über sieben Tage keine Symptome mehr.

Bei der anschließend durchgeführten "Jetzt- Anamnese" gab keiner der Patienten Beschwerden wie Fieber, Bauchschmerzen oder Brustschmerzen an. Es bestanden bei keinem der Patienten Gelenksbeschwerden oder Hauterscheinungen. Auch andere Beschwerden wurden von allen verneint. Die körperliche Untersuchung lieferte ebenfalls

keine pathologischen Befunde. Somit befand sich keiner der Patienten in einem akuten Schub der Krankheit.

Aus den Akten der Patienten wurde die der Krankheit zugrunde liegende Mutation entnommen. Bei fünf der Patienten lag eine homozygote Mutation im Bereich M694V vor. Ein Patient hatte die kombiniert heterozygote Mutation E230K/M694V. Alle Patienten entwickelten trotz Colchizinterapie Schübe. Die Schubfrequenz lag von 1/Jahr bis 10-15/Jahr. Die ermittelten Mutationen, Schubfrequenzen und Score-Werte nach Pras und Mor sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Patient	Mutation	Pras-Score	Mor-Score	Schubfrequenz
1	M694V/M694V	moderat	schwer	3-4/Jahr
2	M694V/M694V	moderat	schwer	2-3/Jahr
3	M694V/M694V	moderat	schwer	5/Jahr
4	M694V/M694V	mild	schwer	4-5/Jahr
5	E230K/M694V	mild	schwer	1/Jahr
6	M694V/M694V	mild	schwer	10-15/Jahr

**Tabelle 10:** Charakterisierung der Patienten.

Auflistung der Mutationen, Einteilung der Phänotypen nach Pras und Mor und der Schubfrequenzen.

Die vier Personen der Kontrollgruppe waren deutschstämmig. Dies wurde bewusst so ausgewählt, damit die Wahrscheinlichkeit, dass einer der Kontrollen heterozygoter Träger einer Mutation auf dem MEFV-Gen ist, minimiert wird. Das Alter lag zwischen 25 und 42 Jahren (Mittelwert 32,5 J.). Zwei der Kontrollen waren männlich. Keiner von ihnen gab an jemals an FMF typischen Symptomen wie rekurrendem Fieber, Bauchschmerzen, Brustschmerzen oder Gelenkbeschwerden gelitten zu haben. Niemand war am Blinddarm operiert worden. Außer bei einer Kontrolle waren bei allen anderen keine chronischen Erkrankungen bekannt. Diese Kontrollperson gab an, an Erkrankungen des atopischen Formenkreises zu leiden (Asthma bronchiale, Atopische Dermatitis, Rhinitis allergica,

Nahrungsmittelallergie). An Medikamenten nahm sie Salbutamol und Budesonid. Alle anderen Probanden nahmen keine Medikamente ein.

Bei keiner Kontrollperson gab es in der Familie an FMF erkrankte Personen und auch keine Fälle einer unklaren Nierenfunktionsstörung. Keine der Kontrollpersonen hatte eine infektiöse Erkrankung in den letzten 14 Tagen vor der Blutentnahme oder am Tag der Blutabnahme.

Eine Zusammenfassung der Hauptmerkmale der Patienten und Kontrollen ist in Tabelle 11 zu sehen. Somit erbrachte die präanalytische Untersuchung keine Hinweise, dass bei den Kontrollen eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für FMF oder eine infektiöse Erkrankung vorliegt, die einen Vergleich zwischen beiden Gruppen verfälschen würde.

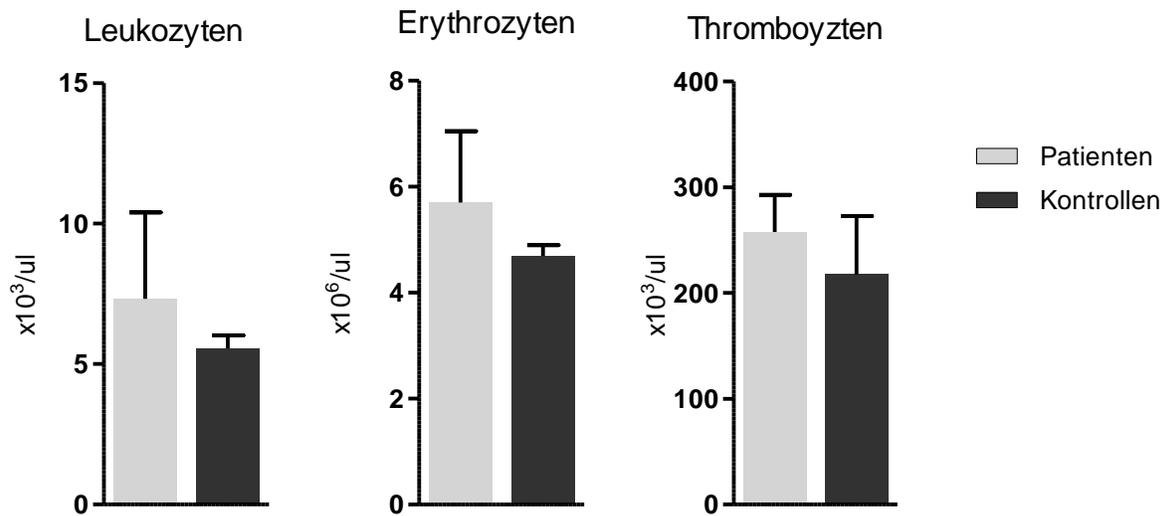
	<b>Patienten</b>	<b>Kontrollen</b>
Anzahl	6	4
Alter	16-28 Jahre	25-42 Jahre
Geschlecht	weiblich (3), männlich (3)	weiblich (2), männlich (2)
Herkunftsland	Türkei	Deutschland
FMF Medikation	Colchizin 1,5-2,5mg/d	-

**Tabelle 11:** Hauptmerkmale von Patienten und Kontrollen

## 3.2 Blutbild und CrP

### 3.2.1 Blutbild

Die Zellzählung erfolgte aus EDTA-Röhrchen am Zählautomaten Sysmex XE-5000. Es wurde das Differentialblutbild bestimmt, bei dem neben der Angabe der Zellzahlen für Erythrozyten, Thrombozyten und Leukozyten auch eine Differenzierung letzterer in neutrophile, basophile und eosinophile Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten erfolgte.



**Abbildung 7:** Vergleich der drei Zellreihen bei Patienten und Kontrollen. Dargestellt sind Leukozyten, Erythrozyten und Thrombozyten. Abgebildet sind der Mittelwert und die Standardabweichung.

Die Messungen der drei Hauptzellreihen zeigten, dass zwischen den beiden Vergleichsgruppen keine signifikanten Unterschiede bestanden. Bei den Leukozyten konnte man sehen, dass Patienten im Durchschnitt höhere Leukozytenwerte aufwiesen, bei einem Patienten war die Leukozytenzahl leicht über dem Normwert auf  $12,21 \times 10^3/\mu\text{l}$  erhöht. Die Erythrozyten waren ebenfalls bei den Patienten im Durchschnitt höher. Drei der sechs Patienten zeigten eine leichte Erhöhung der Erythrozytenzahl auf  $6,32 \times 10^6/\mu\text{l}$ ,  $6,81 \times 10^6/\mu\text{l}$  und  $7,48 \times 10^6/\mu\text{l}$ . Die Thrombozyten differierten nur gering.

Das Differentialblutbild der weißen Zellreihe wies keine auffälligen Veränderungen auf. Die komplette Ausführung des Blutbildes inklusive der Subgruppen der weißen Zellreihe ist in Tabelle 12 und Tabelle 13 aufgelistet.

	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4	Patient 5	Patient 6
Erythrozyten [ $10^6/\mu\text{l}$ ]	6,32	4,62	6,81	7,48	4,79	4,19
Thrombozyten [ $10^3/\mu\text{l}$ ]	269	257	312	259	246	204
Leukozyten [ $10^3/\mu\text{l}$ ]	8,53	3,75	8,41	12,21	6,36	4,66

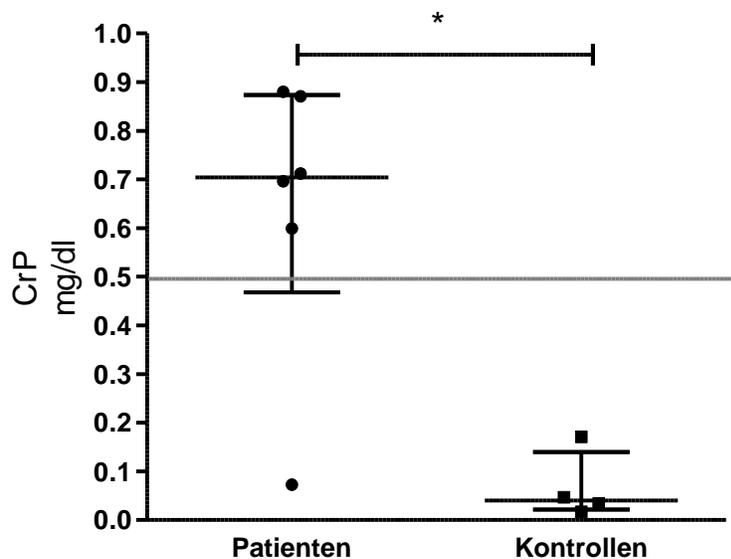
Neutrophile [ $10^3/\mu\text{l}$ ]	5,35 (62,7%)	1,75 (46,7%)	4,21 (50,1%)	7,98 (65,3%)	3,61 (56,8%)	1,85 (39,8%)
Lymphozyten [ $10^3/\mu\text{l}$ ]	2,17 (25,4%)	1,61 (42,9%)	3,67 (43,9%)	2,94 (24,1%)	2,11 (33,2%)	2,35 (50,4%)
Monozyten [ $10^3/\mu\text{l}$ ]	0,76 (8,9%)	0,26 (6,9%)	0,37 (4,4%)	0,91 (7,5%)	0,53 (8,0%)	0,36 (7,7%)
Eosinophile [ $10^3/\mu\text{l}$ ]	0,22 (2,6%)	0,12 (3,2%)	0,12 (1,4%)	0,34 (2,8%)	0,11 (1,7%)	0,07 (1,5%)
Basophile [ $10^3/\mu\text{l}$ ]	0,03 (0,4%)	0,01 (0,3%)	0,04 (0,5%)	0,04 (0,03%)	0,02 (0,3%)	0,03 (0,6%)

**Tabelle 12:** Differentialblutbild aller Patienten

	Kontrolle 1	Kontrolle 2	Kontrolle 3	Kontrolle 4
Erythrozyten [ $10^6/\mu\text{l}$ ]	4,79	4,39	4,85	4,74
Thrombozyten [ $10^3/\mu\text{l}$ ]	237	156	194	284
Leukozyten [ $10^3/\mu\text{l}$ ]	5,71	5,05	5,33	6,13
Neutrophile [ $10^3/\mu\text{l}$ ]	3,40 (59,6%)	1,86 (36,8%)	3,05 (57,1%)	3,30 (53,8%)
Lymphozyten [ $10^3/\mu\text{l}$ ]	1,75 (30,6%)	2,58 (51,1%)	1,49 (28,0%)	2,31 (37,7%)
Monozyten [ $10^3/\mu\text{l}$ ]	0,49 (8,6%)	0,50 (9,9%)	0,50 (9,4%)	0,38 (6,2%)
Eosinophile [ $10^3/\mu\text{l}$ ]	0,04 (0,7%)	0,07 (1,4%)	0,27 (5,1%)	0,11 (1,8%)
Basophile [ $10^3/\mu\text{l}$ ]	0,03 (0,5%)	0,04 (0,8%)	0,02 (0,4%)	0,03 (0,5%)

**Tabelle 13:** Differentialblutbild aller Kontrollen

### 3.2.2 C-reaktives Protein (CrP)



**Abbildung 8:** Ergebnisse der CrP-Messung bei Patienten und Kontrollen. Abgebildet sind alle Werte mit dazugehörigem Median und Interquartilenabstand.

Das CrP wurde aus dem Serum vor der Stimulation bestimmt. Dabei lagen bei fünf von sechs Patienten die gemessenen Werte über dem Normwert (0,5mg/dl), obgleich es keine starke Erhöhung war (Median 0,70 mg/dl). Lediglich ein Patient hatte einen Wert unter dem Normwert (CrP 0,073mg/dl). Bei den Kontrollen lagen alle gemessenen Werte im Normbereich mit einer geringen Streuung (Median 0,04 mg/dl). Im Vergleich beider Gruppen sah man, dass die Erhöhung des CrP's bei den Patienten signifikant im Vergleich zu den Kontrollen war ( $p = 0,019$ ).

### 3.3 ELISA-Messungen

Für die Darstellung der Proteinexpression nach der Zellstimulation wurden mit einem ELISA die Konzentrationen für S100A8/9, S100A12, IL-1, IL-18 und die Caspase-1 in Granulozyten und PBMCs bestimmt. Durch die Stimulation erhielt man für jedes Protein acht Werte pro Zellreihe. Der erste Wert entsprach der Sekretion ohne Zusatz von Stimulanzien, der zweite unter Zusatz von PMA, der dritte von LPS und der vierte von

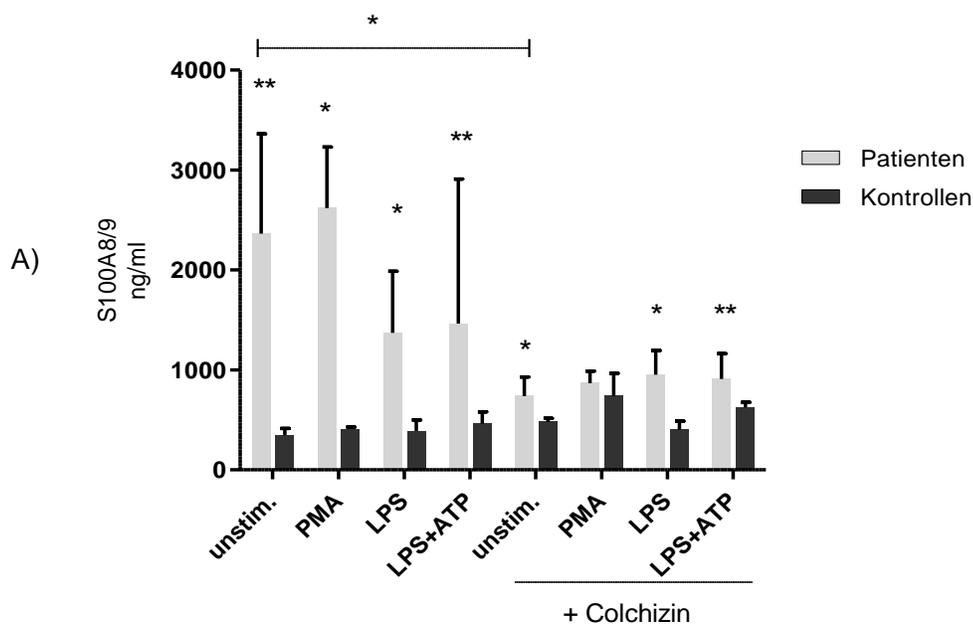
LPS+ATP. Parallel wurden diese vier Ansätze noch einmal unter vorheriger *in vitro* Zugabe von Colchizin stimuliert, dargestellt in Tabelle 14.

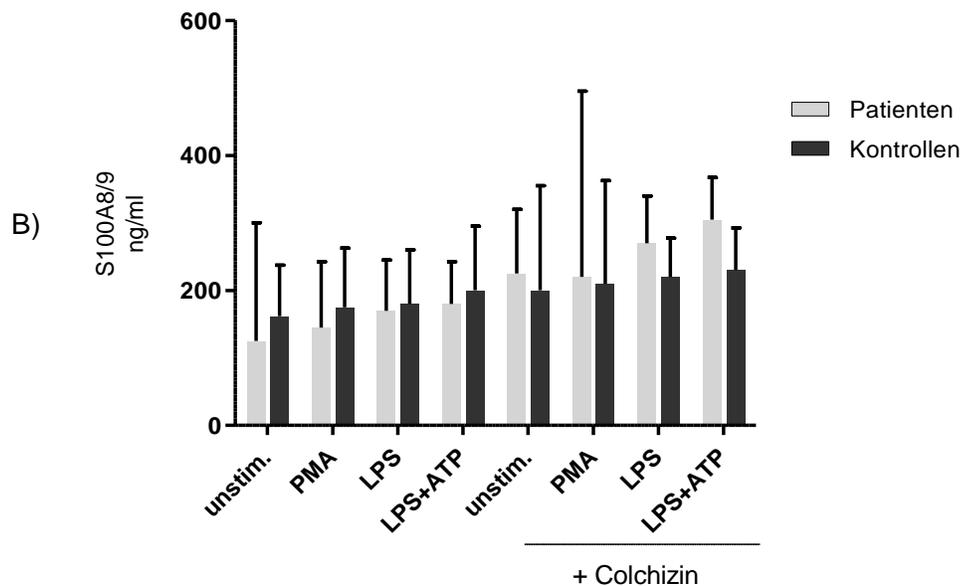
Stimulationsansätze für Granulozyten und PBMCs	
unstimuliert	Colchizin
PMA	Colchizin+PMA
LPS	Colchizin+LPS
LPS+ATP	Colchizin+LPS+ATP

**Tabelle 14:** Stimulationsansätze für Granulozyten und PBMCs nach der Zelltrennung

Die Ergebnisse für Patienten und gesunde Kontrollen wurden miteinander verglichen und durch den Mann-Whitney-Test auf signifikante Unterschiede untersucht. Vergleiche zwischen verschiedenen Ansätzen innerhalb der Patienten- oder Kontrollgruppe wurden mit dem Wilcoxon-Test berechnet.

### 3.3.1 S100A8/9





**Abbildung 9:** Sekretion von S100A8/9.

Ohne und nach Stimulation mit PMA, LPS, LPS+ATP und Zugabe von Colchizin.

Abgebildet ist der Median mit Interquartilenabstand A) Granulozyten, Stimulationsdauer vier Stunden. B) PBMC, Stimulationsdauer 16 Stunden

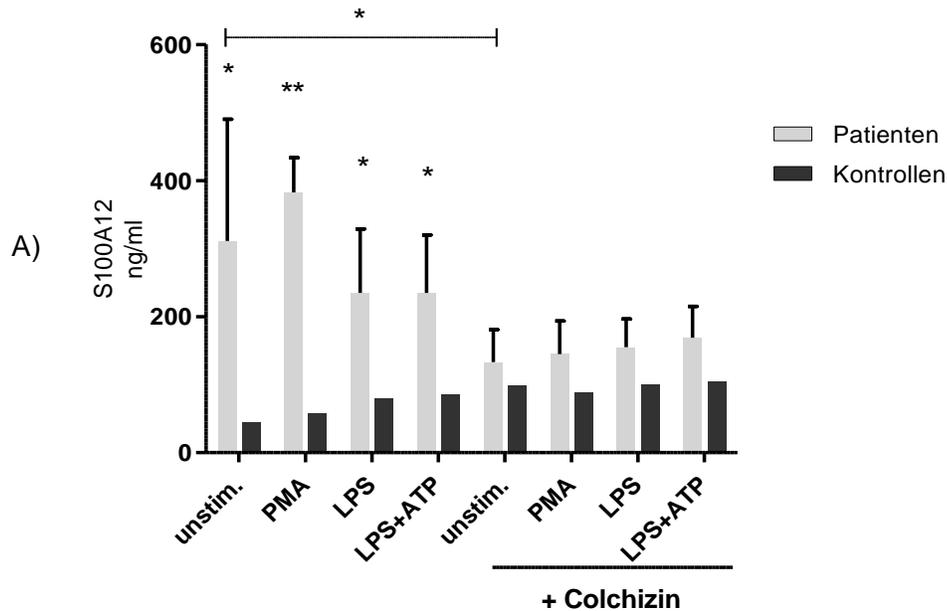
Da S100A8/9 als Heterodimer vorliegt, erfolgte die Messung beider Proteine zusammen in einem ELISA.

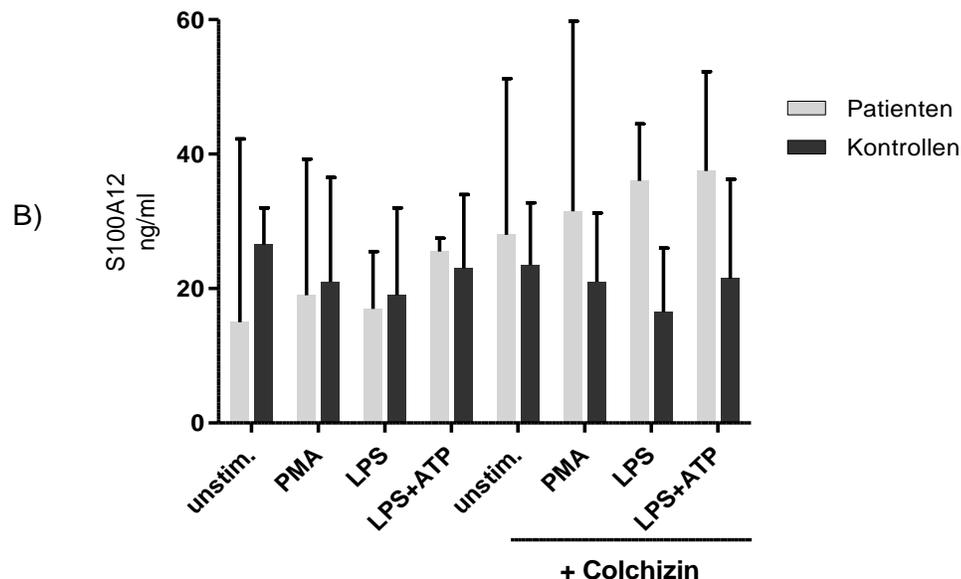
Die ELISA-Messung für S100A8/9 zeigte für die Granulozyten bereits sehr hohe Werte ohne Stimulation. Diese waren gegenüber den Kontrollen signifikant erhöht ( $p = 0,0095$ ). Durch die Stimulation mit PMA, LPS und LPS+ATP konnte die Proteinsekretion bei den Patienten nicht weiter gesteigert werden. Durch die Stimulation wurde die Sekretion von S100A8/9 bei den Kontrollen nur leicht gesteigert. Es zeigte sich für alle mit PMA, LPS und LPS+ATP ohne Colchizin stimulierten Ansätze ein signifikanter Unterschied zwischen den Patienten und Kontrollen. Die Ansätze unter Colchizinzugabe zeigten eine starke Verminderung der Sekretion von S100A8/9 bei den bereits mit Colchizin vorbehandelten Patienten. Es zeigte sich eine signifikante Abnahme der Sekretion bei den Patienten, wenn man den unstimulierten Wert mit dem unter Zugabe von Colchizin verglich ( $p = 0,0313$ ).

Bei den gesunden Kontrollen war nach Zugabe von Colchizin keine starke Reduktion der Proteinsekretion zu verzeichnen.

Die Sekretion von S100A8/9 in den PBMC's lieferte keine eindeutigen Unterschiede zwischen den Patienten und Kontrollen. Durch Stimulation konnte keine Änderung der Sekretion festgestellt werden. Durch die Zugabe von Colchizin war keine Verminderung der Sekretion messbar, wie sie sich bei den Granulozyten zeigte. Es zeigte sich eine leichte Erhöhung, die aber statistisch nicht relevant war.

### 3.3.2 S100 A12





**Abbildung 10:** Sekretion von S100A12.

Ohne und nach Stimulation mit PMA, LPS, LPS+ATP und Zugabe von Colchizin.

Abgebildet ist der Median mit Interquartilenabstand A) Granulozyten, Stimulationsdauer vier Stunden B) PBMC, Stimulationsdauer 16 Stunden

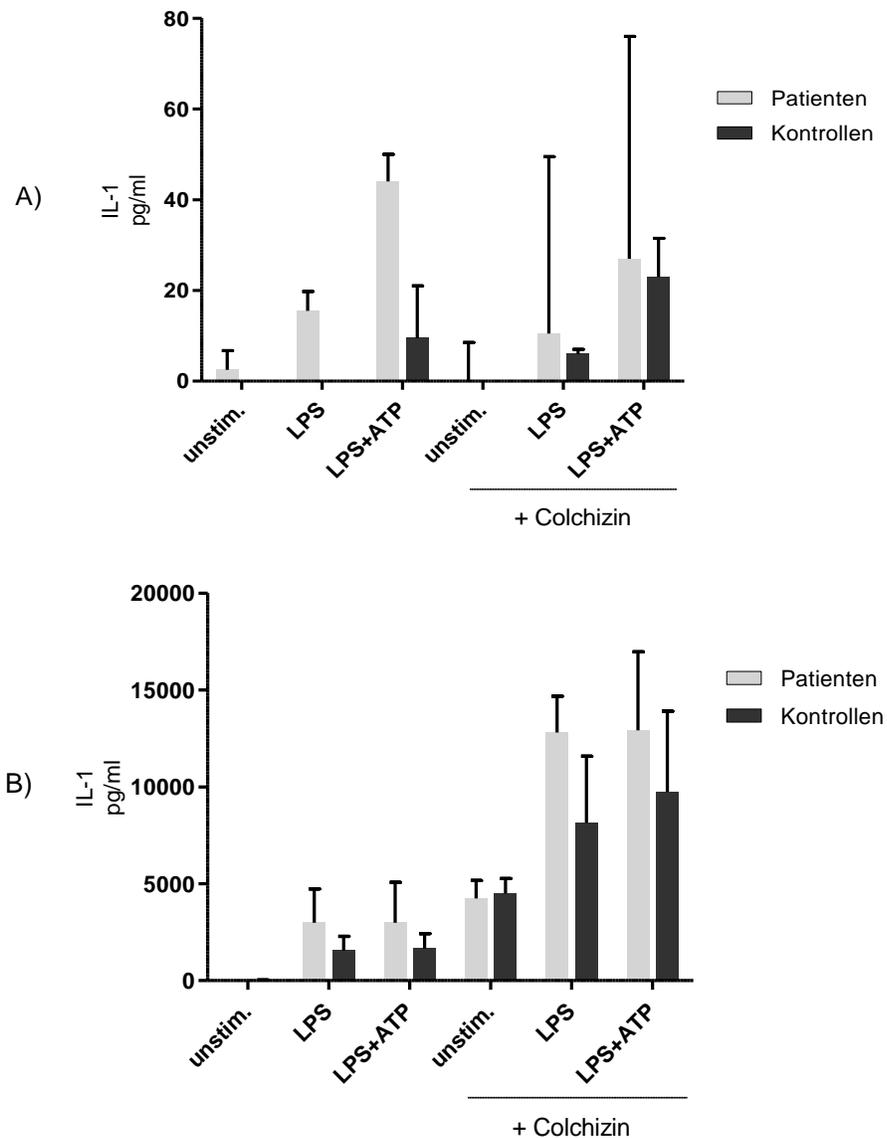
Bei der ELISA-Messung für S100 A12 für die Granulozyten wurde eine hohe Sekretionsrate für S100A12 ohne Stimulation gemessen, die gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöht war ( $p = 0,0139$ ). Durch Zugabe der Stimulanzen konnte die Sekretion nicht weiter gesteigert werden. Der Unterschied zwischen Patienten und Kontrollen blieb aber signifikant.

Die Zugabe von Colchizin führte zu einer Erniedrigung der Proteinkonzentration bei den Patienten. Es zeigte sich auch hier ein signifikanter Rückgang der Sekretion innerhalb der Patienten im Ansatz ohne Stimulation und nach Zugabe von Colchizin ( $p = 0,0313$ ). Bei der Kontrollgruppe zeigte sich keine starke Veränderung der Proteinexpression.

Die Messungen für die PBMC's zeigten keine Unterschiede der Sekretion zwischen Patienten und Kontrollen. Durch die Stimulation kam es zu keiner starken Steigerung der

Sekretion und es zeigte sich keine Veränderung durch Hinzugabe von Colchizin. Die Werte für S100A12 waren insgesamt sehr niedrig.

### 3.3.3 Interleukin-1 $\beta$



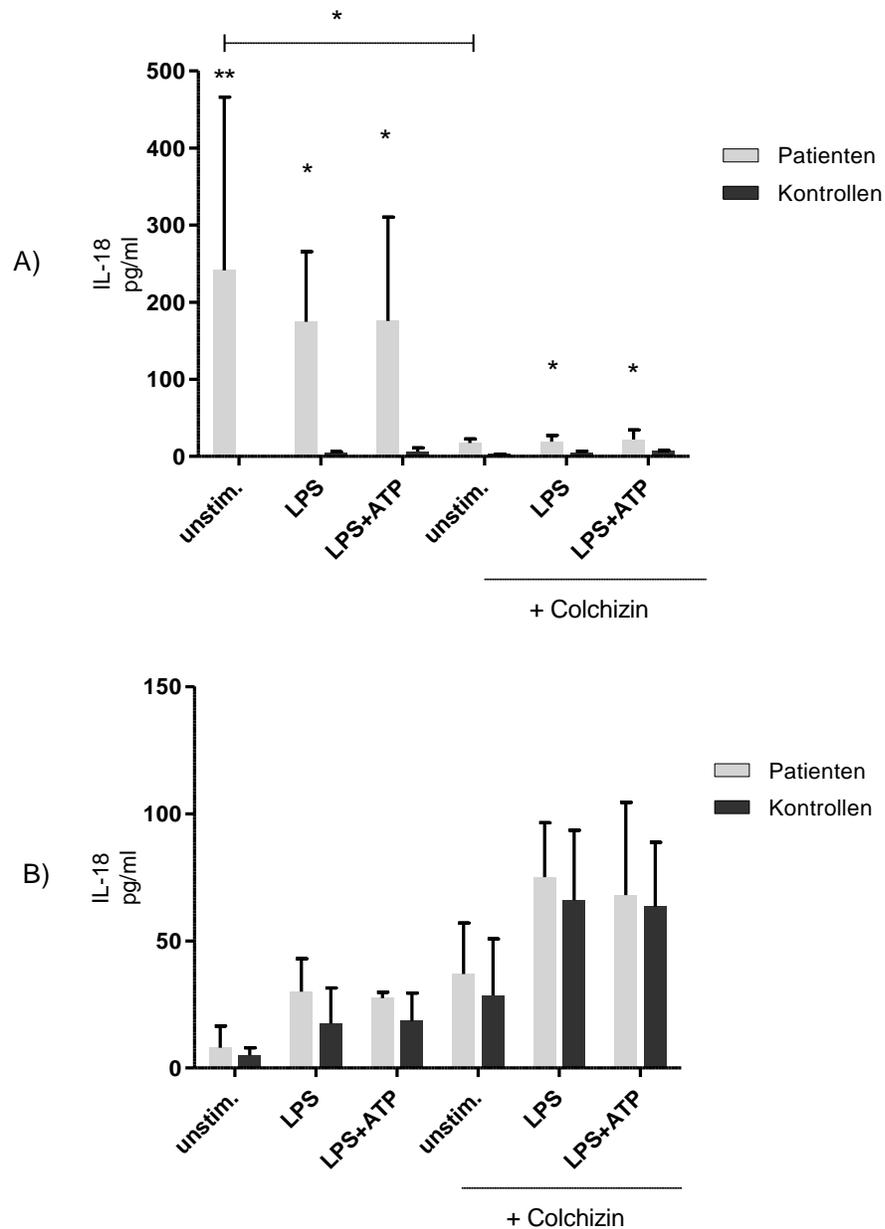
**Abbildung 11:** Sekretion von IL-1 $\beta$ .

Ohne und nach Stimulation mit LPS, LPS+ATP und Zugabe von Colchizin. Abgebildet ist der Median mit Interquartilenabstand A) Granulozyten, Stimulationsdauer vier Stunden B) PBMC, Stimulationsdauer 16 Stunden

Die Messwerte im Überstand der Granulozyten für Interleukin-1 $\beta$  waren bei Patienten und Kontrollen insgesamt sehr niedrig. Durch die Stimulation wurde die Sekretion nur gering gesteigert und war nicht sehr hoch. Patienten zeigten zwar prinzipiell höhere Werte als Kontrollen, aber es lagen keine signifikanten Unterschiede vor. Durch die Zugabe von Colchizin änderte sich die Sekretion ebenfalls nicht stark.

Bei der Messung für die PBMC's konnten wir sehr viel höhere Werte für Interleukin-1 $\beta$  messen. Die unstimulierten Zellen sezernierten äußerst geringe Mengen des Zytokins, durch die Stimulation kam zu einer starken Zunahme der Sekretion. Die alleinige Zugabe von Colchizin stimulierte die Sekretion sehr stark und unter Zugabe von LPS und LPS+ATP kam es zu einem zusätzlichen Zuwachs in beiden Gruppen ohne signifikante Unterschiede. In diesen Ansätzen wurden die höchsten Sekretionswerte für Interleukin-1 $\beta$  gemessen.

## 3.3.4 Interleukin-18

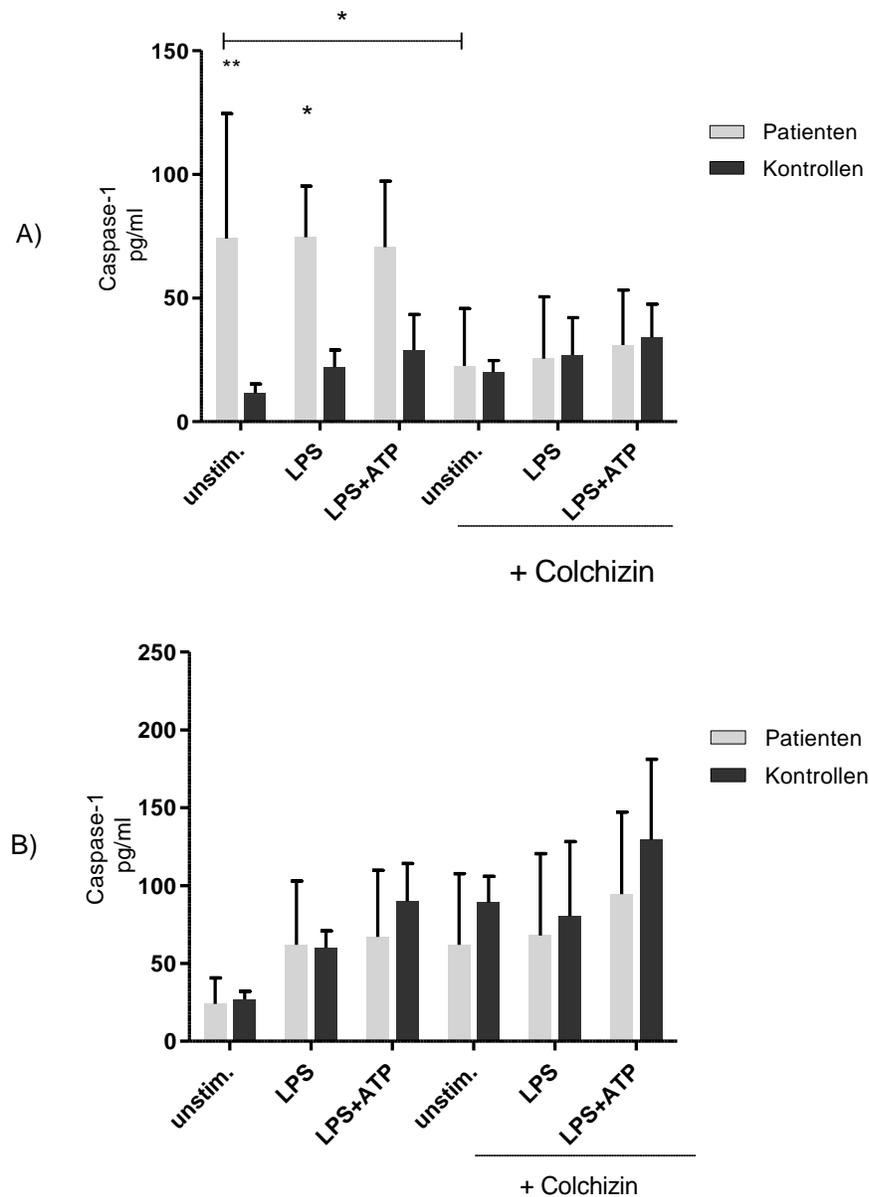
**Abbildung 12:** Sekretion von IL-18.

Ohne und nach Stimulation mit LPS, LPS+ATP und Zugabe von Colchizin. Abgebildet ist der Median mit Interquartilenabstand A) Granulozyten, Stimulationsdauer vier Stunden B) PBMC, Stimulationsdauer 16 Stunden

Für Interleukin-18 zeigten die ELISA-Messungen in Granulozyten bei den Patienten eine hohe Spontansekretion ohne Stimulation, die gegenüber den Kontrollen signifikant erhöht war ( $p = 0,0095$ ). Durch Stimulation mit LPS oder LPS+ATP nahm die Sekretion nicht zu, blieb aber deutlich höher als in der gesunden Kontrollgruppe. Die Ansätze mit Colchizin zeigten eine starke Erniedrigung sowohl bei Patienten als auch bei Kontrollen. Der Unterschied zwischen den unstimulierten Zellen von Patienten und denen unter Zugabe von Colchizin zeigte eine signifikante Abnahme der Sekretion ( $p = 0,0238$ ).

In den PBMC's war die Sekretion generell niedriger als bei den Granulozyten. Es waren keine deutlichen Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen ersichtlich. Durch die Zugabe von Colchizin kam es zu einer leichten Steigerung der Sekretion.

### 3.3.5 Caspase-1



#### Abbildung 13: Sekretion von Caspase-1.

Ohne und nach Stimulation mit LPS, LPS+ATP und Zugabe von Colchizin. Abgebildet ist der Median mit Interquartilenabstand A) Granulozyten, Stimulationsdauer vier Stunden B) PBMC, Stimulationsdauer 16 Stunden

Die Sekretion der Caspase-1 in Granulozyten zeigte ein ähnliches Muster wie Interleukin-18, S100A12 und S100A8/9. Es waren hohe Sekretionswerte ohne jegliche Stimulation zu

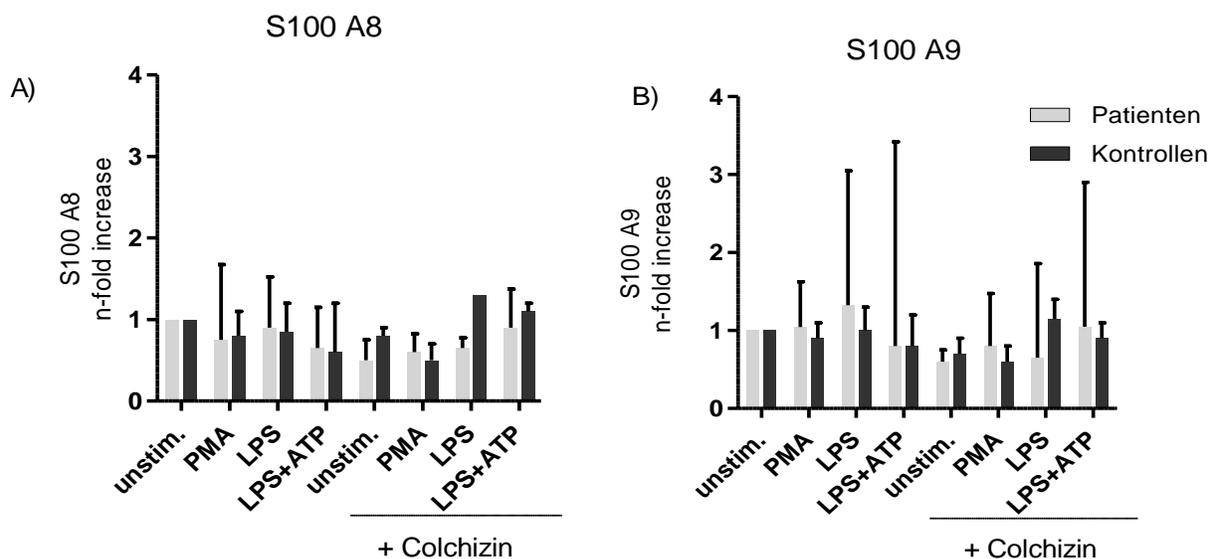
sehen. Der Unterschied zur Kontrollgruppe war hier ebenfalls signifikant ( $p = 0,0095$ ). Die Zugabe der Stimulanzen führte zu keiner weiteren Steigerung der Capase-1-Konzentration, doch die Sekretion blieb im Vergleich zu den Kontrollen erhöht.

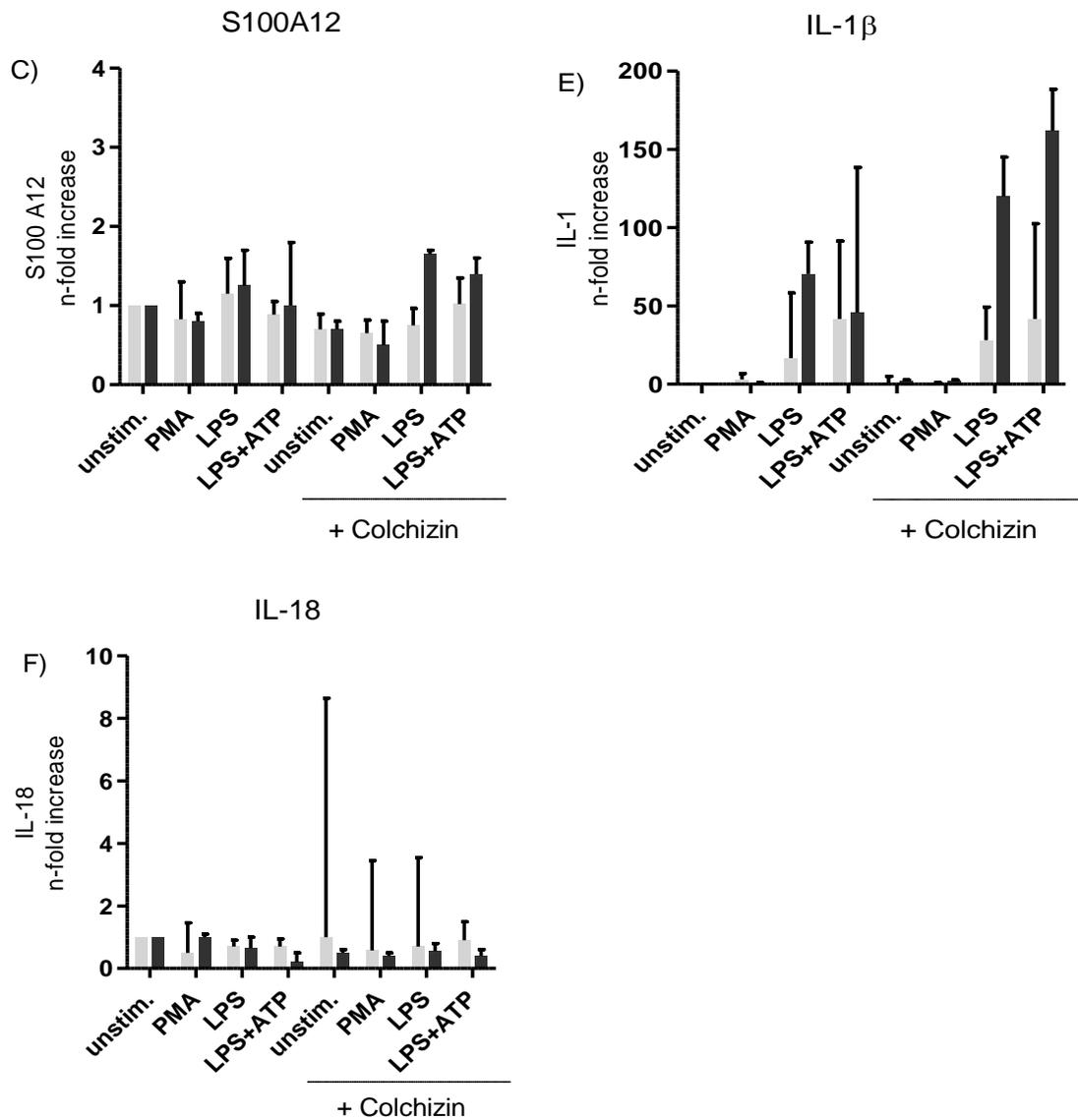
Unter Colchizinzugabe waren die gemessenen Werte bei den Patienten stark rückläufig und es zeigte sich eine signifikante Abnahme der Sekretionswerte bei dem Vergleich innerhalb der Patienten zwischen dem Ansatz ohne Stimulation und dem mit Colchizin ( $p = 0,0313$ ).

### 3.4 Ergebnisse der RT-PCR

Die RT-PCR wurde in den Granulozyten für S100A8, S100A9, S100A12, Interleukin-1 und Interleukin-18 durchgeführt. In den PBMC's wurde die RT-PCR nur für Interleukin-1 durchgeführt.

#### 3.4.1 Messungen in Granulozyten





**Abbildung 14:** RNA Messwerte in Granulozyten A-F.

Aufgetragen ist die n-fache Erhöhung, dabei wurde der unstimulierte Ansatz „unstimuliert“ als Bezugswert zu den Stimulationen mit PMA, LPS und LPS+ATP genommen. Abgebildet ist der Median mit Interquartilenabstand.

Für S100A8 und S100A9 waren sehr niedrige Transkriptionsraten sowohl bei Patienten als auch bei den Kontrollen zu messen. Durch die Stimulation kam es zu keiner wesentlichen Steigerung der Transkription. Es waren keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen feststellbar.

Für S100A12 konnte man insgesamt bei allen Stimulationsansätzen nur eine geringe RNA-Menge messen. Durch die Stimulation konnte man keine Steigerung der Transkription verzeichnen. Auch hier waren keine Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen zu sehen.

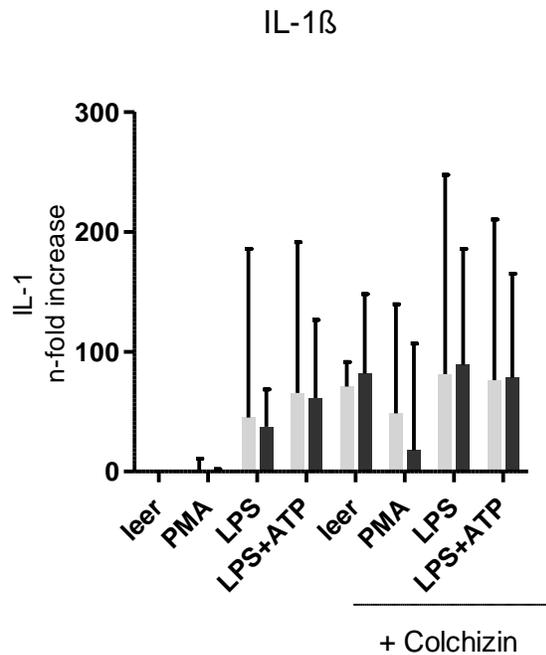
Die Messungen für IL-1 $\beta$  zeigten, dass die Stimulation mit LPS und LPS+ATP zu einer Steigerung der Transkriptionsrate in beiden Gruppen führte. Durch Colchizin wurden diese Werte weiter gesteigert. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen, wobei die Zellen der Patienten stärker auf Colchizin reagierten.

Für IL-18 konnten insgesamt nur sehr niedrige Transkriptionswerte gemessen werden. Dies ließ sich durch die Stimulation kaum beeinflussen. Eine geringe Steigerung zeigte nur der Patientenansatz unter Colchizin allein.

Insgesamt kann man sagen, dass die RT-PCR-Messungen in Granulozyten nur für IL-1 $\beta$  eine Steigerung der Transkription durch die Stimulation zeigten. Eine Steigerung der Transkription wurde nach Zugabe von Colchizin bei IL-1 $\beta$  und IL-18 ohne signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen gesehen.

#### **3.4.2 Messungen in PBMC's**

Bei der RT-PCR Messung in den PBMC's wurde die Messung für IL-1 $\beta$  durchgeführt, da für die anderen Zytokine bereits in den Granulozyten keine hohen Werte gemessen wurden und die ELISA Ergebnisse für die PBMCs keine erhöhte Sekretion zeigten.



**Abbildung 15:** RNA Messwerte in PBMC's für Interleukin-1 $\beta$ .

Aufgetragen ist die n-fache Erhöhung, dabei wurde der unstimulierte Ansatz „unstimuliert“ als Bezugswert zu den Stimulationen mit PMA, LPS und LPS+ATP genommen. Abgebildet ist der Median mit Interquantilenabstand.

Die RNA Messung des IL-1 $\beta$  zeigte, dass es unter der Stimulation zu einer starken Zunahme der Transkription kommt, wobei PMA die geringste Steigerung bewirkte. Die Zugabe von Colchizin erhöhte sogar die Transkription leicht. Zwischen den beiden Versuchsgruppen waren keine eindeutigen Unterschiede sichtbar.

## 4. Diskussion

FMF ist die häufigste hereditäre autoinflammatorische Erkrankung, bei der es zur gesteigerten Aktivierung des Inflammasoms und dadurch zur vermehrten Sekretion von IL-1 $\beta$  und IL-18 kommt. Gleichzeitig werden S100 Proteine, insbesondere S100A12 und S100A8/9 vermehrt sezerniert. Besonders Patienten mit der "high-risk" Mutation M694V zeigen einen schweren Verlauf und haben serologisch erhöht messbare Inflammationswerte. Eines der Ziele dieser Arbeit war es die S100 Proteinsekretion und die gesteigerte Inflammasomaktivität bei Patienten mit dieser "high-risk" Mutation in einem kleinen Patientenkollektiv zu untersuchen. Da bisher keine andere Arbeit die Inflammasomaktivität in Neutrophilen von FMF-Patienten untersucht hat, lag unser besonderes Interesse in der getrennten Untersuchung von Neutrophilen und PBMCs.

### 4.1 Patienten

Es wurden sechs Patienten mit der Diagnose FMF in die Arbeit eingeschlossen, von denen fünf homozygot für die Mutation M694V waren. Die in dem Exon 10 gelegene Mutation M694V ist die häufigste Mutation beim FMF und mit einem schweren Phänotyp und höherem Risiko für eine Amyloidose vergesellschaftet.<sup>81,82</sup> Einer der Patienten war compound - heterozygot mit den Mutationen E230K / M694V. E230K ist eine seltene Mutation, die sich auf dem Exon 2 des MEFV-Gens befindet. In einer griechischen Arbeit mit insgesamt 152 untersuchten Patienten, wiesen ca. 6 % diese Mutation auf, bei einem Patienten wurde der Phänotyp mit der Mutation E230K/0 mit dem Pras-Score als schwerer Krankheitsverlauf eingeordnet.<sup>83</sup> In einer weiteren türkischen Studie, die 1000 Patienten aus dem südöstlichen Teil der Türkei untersuchte, war die Mutation bei 0,15% der Patienten nachweisbar ohne genauere Angaben zum Phänotypen.<sup>84</sup> Von den sechs hier untersuchten Patienten hatten dem Pras-Score entsprechend jeweils drei einen milden Phänotypen und drei einen moderaten Phänotypen. Eingeteilt nach dem Mor-Score hatten alle sechs Patienten einen schweren Krankheitsverlauf.

Alle Patienten waren zum Zeitpunkt der Untersuchung unter Colchizintherapie, hatten keine aktuellen Beschwerden und waren somit nicht in einem Krankheitsschub. Die

Schubfrequenz zeigte allerdings, dass alle Patienten einen instabilen Krankheitsverlauf hatten mit dem Auftreten von Schüben trotz Colchizintherapie.

Ethnisch waren die Patienten alle aus der Türkei bzw. türkischstämmig, wo eine hohe Prävalenz für FMF besteht und die Heterozygotenwahrscheinlichkeit zwischen 1:5 bis 1:10 liegt.<sup>85</sup> Aus diesem Grund wurde bei den Kontrollpersonen darauf geachtet, dass diese aus Mitteleuropa stammen und somit eine äußerst geringe Wahrscheinlichkeit für Heterozygotie und damit verbundener Inflammation aufweisen.

Bei der Befragung stellte sich heraus, dass 50% der Patienten aus diesem kleinen Kollektiv in der Vorgeschichte aufgrund von akuten Bauchschmerzen appendektomiert worden waren. Die Fehldiagnose Appendizitis wird bei Patienten mit FMF häufig gestellt. In einer israelischen Studie konnte an einem Kollektiv von 182 Patienten mit FMF gezeigt werden, dass ca. 40 % bereits appendektomiert worden waren, wobei die Rate an Appendektomien unter gesunden als 20% angegeben wurde.<sup>86</sup> Eine elektive Appendektomie wurde bei FMF Patienten diskutiert, um Notfalllaparoskopien zu vermeiden.<sup>87</sup>

#### **4.2 Blutbild und CrP**

Die Untersuchung des Blutbilds zeigte keine erhöhten Entzündungsreaktion im Sinne einer Leukozytose oder eine Veränderung der roten Zellreihe. Dies stimmt mit den Beobachtungen anderer Arbeiten überein, dass während der schubfreien Zeit das Blutbild unverändert ist.<sup>2</sup> Die Messung des unspezifischen Akute-Phase-Proteins CrP, zeigte bei den Patienten eine signifikante Erhöhung der Werte und spricht bereits für eine geringe unspezifische inflammatorische Aktivität. Bayram et al. konnten zeigen, dass Patienten mit der Mutation M694V sowohl in homozygoter als auch in compound-heterozygoter Ausprägung häufiger eine subklinische Inflammation mit erhöhten Akute-Phase-Proteinen haben.<sup>88</sup> Bei ca. 34% der Patienten bleibt das CrP auch in schubfreien Perioden erhöht.<sup>89</sup> Auch im Vergleich zu heterozygoten Trägern einer FMF-Mutation und zu gesunden Kontrollen konnte gezeigt werden, dass die Akute-Phase-Proteine, insbesondere das SAA, bei FMF Patienten auch in symptomfreien Intervallen erhöht sein können.<sup>90</sup>

### 4.3 Hypersekretion von S100A8/9, S100A12, IL-18 und Caspase-1

Neutrophile Granulozyten und Monozyten sind die prädominanten Zellen in der Pathogenese des FMF, in denen auch vornehmlich Pyrin exprimiert wird.<sup>17</sup> In dieser Arbeit konnten gesteigerte Sekretionen für inflammatorische Zytokine und Marker vor allem in den Neutrophilen der FMF Patienten gemessen werden. In PBMC waren entweder geringere Sekretionsraten (S100A8/9, S100A12, IL-18) oder keine Unterschiede in der Sekretion (Caspase-1 und IL-1 $\beta$ ) zwischen Patienten und gesunden Kontrollen messbar.

Die Messungen in den Neutrophilen zeigten für S100A8/9, S100A12, IL-18 und die Caspase-1 ein homogenes Ergebnis. Anzumerken ist, dass alle Patienten zum Zeitpunkt der Untersuchung unter Colchizintherapie waren.

Für S100A8/9 und S100A12 waren hohe Spontansekretionsraten in Granulozyten messbar, die im Vergleich zu den gesunden Kontrollen signifikant erhöht waren. Die Sekretion in den Granulozyten ließ sich durch die Stimulation nicht weiter steigern. Für S100A12 konnte gezeigt werden, dass es bei FMF Patienten mit instabilem Krankheitsverlauf sehr hohe Werte erreichen kann und besser zur Diskriminierung einer inflammatorischen Aktivität dient als unspezifische Marker wie das CrP oder die Blutsenkungsgeschwindigkeit.<sup>30</sup> Eine erhöhte Sekretion von S100A12 wurde in einer Arbeit mit 17 FMF Patienten unter Colchizintherapie festgestellt.<sup>71</sup> Erhöhte Sekretionswerte für S100A8/9 wurden bei Patienten mit einer sJIA in Monozyten gemessen, diese waren signifikant erhöht im Vergleich zu gesunden Kontrollen, Patienten mit einer infektiösen Erkrankung, einer malignen Erkrankung oder Patienten mit NOMID.<sup>91</sup>

Die Caspase-1 ist eine der Untereinheiten des Inflammasoms und als Protease für die Prozessierung von pro-IL-1 $\beta$  und pro-IL-18 zu den biologisch aktiven Formen verantwortlich.<sup>58</sup> Sie kann als Messwert für die Inflammasomaktivität betrachtet werden und zeigte bei den Patienten eine sehr hohe Aktivität ohne Zugabe der Stimulanzen. Chae et al. konnten in CD11b+ Knochenmarkszellen der Pyrin “knock-in“ Maus mit Mutationen im Exon 10 zeigen, dass diese ohne jegliche Stimulation erhöhte Sekretionswerte für Caspase-1 hatte.<sup>65</sup>

Interleukin-18 zählt zu den proinflammatorischen Zytokinen und gehört zu der Interleukin-1-Familie. Seine inflammatorische Aktivität übt es über den Interleukin-18-Rezeptor aus und führt ähnlich wie IL-1 $\beta$  zu einer Aktivierung von Nf $\kappa$ B und weiterer inflammatorischer Zytokine.<sup>92,93</sup> Die Spontansekretion für IL-18 war in dieser Arbeit ebenso ohne Stimulation, wie bei der Caspase-1, stark erhöht. Dass IL-18 im Serum von Patienten mit FMF im akuten Schub und in schubfreien Intervall im Vergleich zu gesunden Kontrollen signifikant erhöht ist, konnte in einer weiteren Studie gezeigt werden.<sup>94</sup>

Durch die Zugabe der Stimulanzien konnte keine Steigerung der Sekretion für S100A8/9, S100A12, IL-18 oder Caspase-1 beobachtet werden, was einerseits ein Zeichen der Erschöpfung der Neutrophilen durch Daueraktivität sein kann oder aber auch als Schutz vor übermäßiger Inflammation gewertet werden kann.<sup>95,96</sup> Eine Arbeit aus 2014 konnte zeigen, dass Pyrin eine Rolle bei der Abwehr von toxinvermittelten Infektionen wie bei *Clostridium difficile* und *Burkholderia cepacia* spielt.<sup>97</sup> Eine Hypothese ist, dass Mutationen im MEFV-Gen möglicherweise einen Schutz vor diesen Infektionen darstellen.

#### **4.4 Effekt von Colchizin *in-vitro***

Bei den Messungen nach Zugabe von Colchizin war eine signifikante Abnahme der Sekretion für S100A8/9, S100A12, IL-18 und Caspase-1 in Granulozyten messbar, obwohl alle Patienten *in vivo* mit Colchizin behandelt wurden. Dass die S100A12-Sekretion bei Patienten nach Initiierung einer Colchizintherapie rückläufig ist, wurde bereits gezeigt.<sup>30</sup> S100A8/9 und wahrscheinlich S100A12 werden durch einen alternativen Sekretionsweg sezerniert, in dem Mikrotubuli involviert sind.<sup>74</sup> Colchizin als Hemmer der Mikrotubuli spielt hier eine wichtige Rolle, hemmt diesen alternativen Sekretionsweg und führt somit zur Reduktion der Sekretion von S100A12 und S100A8/9. Für S100A8/9 konnten Rammes et. al. zeigen, dass diese im Zytosol an Mikrotubuli lokalisiert sind und dass es nach Zugabe von Colchizin zu einer signifikanten Abnahme der Sekretion bei zuvor mit PMA stimulierten Zellen kommt.<sup>74</sup> Auch IL-1 $\beta$  und womöglich IL-18 werden durch einen alternativen Sekretionsweg sezerniert.<sup>98</sup> Insbesondere Mikrotubuli scheinen bei deren Sekretion bzw. Exozytose beteiligt zu sein, die durch spezifische Inhibitoren reduziert wird.<sup>99</sup> Auch hier

würde der Effekt von Colchizin als Inhibitor der Mikrotubuli die Sekretion dieser Zytokine reduzieren.

Die Zusammenkunft der Untereinheiten des Inflammasoms wird durch das Zytoskelett gesteuert und ist mikrotubuliabhängig.<sup>100</sup> Für ASC konnte gezeigt werden, dass Colchizin dessen Formierung und den Aufbau des Inflammasoms hemmt.<sup>48</sup> Auch konkret für Pyrin wurde durch Immunfluoreszenz beobachtet, dass es im Zytosol an Mikrotubuli und Aktin-Filamenten lokalisiert ist und somit in Abhängigkeit zum Zytoskelett steht.<sup>101</sup> Insgesamt scheint das Zytoskelett bei wichtigen Schritten der Pathogenese des FMF involviert zu sein. Dies erklärt den therapeutischen Einsatz von Colchizin.

Da die hier untersuchten Patienten bereits Colchizin einnahmen, scheint die Dosis des Colchizins nicht auszureichen, um die Krankheitsaktivität komplett einzudämmen. Colchizin in einer Dosis von 5 µg/ml, wie hier eingesetzt, ist allerdings toxisch und könnte *in vivo* nicht verabreicht werden.<sup>102</sup> Die Patienten in dieser Arbeit nahmen Colchizin in einer hohen Dosierung von 1,5 mg – 2,5 mg/Tag ein. Somit ist bei einer Dosissteigerung eher mit verstärkten Nebenwirkungen zu rechnen und alternative bzw. additive Therapien müssten erwogen werden.

Hieraus kann man schlussfolgern, dass Colchizin die Sekretion von S100 Proteinen und Inflammasom-abhängigen Zytokinen reduziert. Die hier untersuchten Patienten wiesen trotz Colchizintherapie eine erhöhte Inflammasomaktivierung auf, sodass von einer „instabilen Erkrankung“ gesprochen werden kann. Das Risiko der Entwicklung einer Amyloidose ist weiterhin gegeben.

#### **4.5 Ergebnisse für Interleukin-1 $\beta$**

IL-1 $\beta$  trägt wesentlich zur Pathogenese des FMF bei.<sup>64</sup> Bei den Messungen für IL-1 $\beta$  in Granulozyten konnten hier insgesamt nur geringe Sekretionsraten gemessen werden, die jedoch im Vergleich zu IL-18, Caspase-1 und den S100 Proteinen durch die Stimulation anstieg. Ebenso konnte durch die Colchizinzugabe kein Rückgang der Werte beobachtet werden. Unklar ist, ob diese Ergebnisse auf der Tatsache beruhen, dass die Messung von

IL-1 $\beta$  oft schwierig ist oder ob Neutrophile von FMF Patienten in Ruhe keine großen Mengen an IL-1 $\beta$  sezernieren. In der Literatur findet sich wenig hierzu.

In den PBMCs konnte man ohne Stimulation keine gesteigerte Sekretion für IL-1 $\beta$  feststellen. Durch die Zugabe von LPS sezernierten Patienten mehr IL-1 $\beta$  als die gesunden Kontrollen, jedoch ohne statistische Signifikanz. Die Zugabe von Colchizin führte zu einem weiteren Anstieg der Sekretion von IL-1 $\beta$ . Dass Colchizin zusammen mit LPS in Monozyten zu einer verstärkte Sekretion von IL-1 $\beta$  führt, konnten auch Allen et al. zeigen.<sup>103</sup>

Ähnliche Ergebnisse sahen auch Omenetti et al. in PBMCs von FMF Patienten.<sup>104</sup> In dieser Arbeit wurde ein signifikanter Anstieg der IL-1 $\beta$  Sekretion in Monozyten nach Zugabe von LPS im Vergleich zu gesunden Kontrollen beobachtet ohne relevante Unterschiede der Sekretion in unstimulierten Zellen.

Einige Arbeiten beschrieben, dass IL-1 $\beta$  weder während eines Schubes und noch im schubfreien Intervall erhöht messbar war.<sup>105,106</sup> Andererseits konnten Yildirim et al. an Patienten im schubfreien Zeitraum erhöhte IL-1 $\beta$  Werte messen.<sup>107</sup> Zuletzt zeigten Migita et al., dass IL-1 $\beta$  im akuten Schub, aber nicht in den schubfreien Intervallen in hoher Rate sezerniert wird.<sup>108</sup> Alle vier Arbeiten führten die Messungen allerdings im Serum von Patienten durch. Aufgrund dieser teils kontroversen Datenlage und der geringen Vergleichbarkeit sind auch die hier ermittelten Ergebnisse in Frage zu stellen und sollten mit einer größeren Fallzahl kontrolliert werden.

#### **4.6 Transkription**

Auf der Ebene Transkription konnte man für S100A8/9, S100A12 und Interleukin-18 keine wesentlichen Veränderungen nach Stimulation sehen. Es waren keine Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen sichtbar. Da allerdings in den ELISA-Messungen hohe Sekretionsraten für diese Proteine messbar waren, könnte dies für eine Regulation auf Proteinebene sprechen. Die Transkription von Interleukin-1 $\beta$  in Neutrophilen war sowohl bei Patienten als auch bei gesunden Kontrollen durch die Stimulation deutlich gesteigert und nahm durch die Zugabe von Colchizin noch weiter zu. Ähnliche Ergebnisse für IL-1 $\beta$

konnten auch Manukyan et al. in Neutrophilen nach der Zugabe von Colchizin beobachten.<sup>109</sup>

In den PBMCs wurde gesehen, dass durch die Stimulation mehr IL-1 $\beta$  - mRNA gebildet wird und Colchizin die Transkription weiter steigert. Auch bei Allen et al führte die Zugabe von Colchizin zu einer Zunahme der Transkription von IL-1 $\beta$  in PBMCs.<sup>103</sup> Ohne Stimulation waren zwischen Patienten und Kontrollen keine Unterschiede sichtbar. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass bei FMF Patienten im schubfreien Zeitraum im Vergleich zu gesunden Kontrollen vermehrt IL-1 $\beta$  transkribiert wird.<sup>110</sup>

#### 4.7 Schwächen der Arbeit

In erster Linie ist die Aussagekraft der Arbeit durch die geringe Fallzahl limitiert. Sie war als Pilotstudie angelegt und lieferte erste Ergebnisse, die es in einer größeren Studie zu bestätigen gilt.

Weitere Marker, wie die Bestimmung der BSG und des SAA wären wichtig und fehlen hier, da vor allem SAA beim FMF im Schub, aber auch in schubfreien Perioden ebenso erhöht sein kann. Hier wäre ein Vergleich zu den S100 Proteinen interessant. Zusätzlich wäre die Bestimmung der S100 Proteine, des IL-18, des IL-1 $\beta$  und der Caspase-1 aus dem Serum dieser Patient gleich nach der Blutabnahme ein wichtiger Parameter.

Es wurden hier nur Patienten mit der Mutation M694V untersucht. Dieselben Untersuchungen bei anderen Mutationen bzw. bei unbehandelten Patienten könnten zeigen, ob die hier erfasste subklinische Inflammation unter Colchizintherapie ohne Colchizin in gleicher Weise besteht bzw. verstärkt ist. Interessant wäre auch die Untersuchung von Patienten unter Therapie mit einer Interleukin-1-Blockade oder der *in vitro* Einsatz dieser.

Zuletzt sind die Messungen für IL-1 $\beta$  nicht aussagekräftig. Ob dies ein methodischer Fehler ist, oder ob die Sekretion bei diesen Patienten so niedrig ist, sollte erneut getestet werden.

#### 4.8 Schlussfolgerung und Aussicht

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten erstmals die Aktivität des Inflammasoms in Neutrophilen von FMF Patienten und lieferten wichtige Aspekte. Zusammenfassend und beziehend auf die anfangs gestellten Fragen kann man sagen:

- i) Neutrophile von Patienten mit der "high-risk" Mutation M694V zeigen eine hohe Spontanaktivität des Inflammasoms mit erhöhten Werten für IL-18 und Caspase-1. In den PBMCs kann man eine derartige Spontanaktivität nicht beobachten.
- ii) Gleichermaßen werden S100A8/9 und S100A12 verstärkt sezerniert. Insbesondere Neutrophile tragen zu dieser Hypersekretion bei.
- iii) Die Hypersekretion von IL-18, Caspase-1 und der S100 Proteine ist durch zusätzliche Stimulation mit LPS, PMA oder LPS+ATP nicht steigerbar und zeigt eine Art Erschöpfung der Neutrophilen an.
- iv) Die *in vitro* Zugabe von Colchizin führt zu einer signifikanten Abnahme der Sekretion sowohl der inflammasomabhängigen Zytokine, als auch der S100 Proteine und spricht für einen möglichen gemeinsamen alternativen Sekretionsweg, bei dem Mikrotubuli beteiligt sind.
- v) Die gesteigerte inflammatorische Aktivität der Neutrophilen mit vermehrter Sekretion von IL-18, Caspase-1 und der S100 Proteine findet auf Proteinebene statt. Die Transkription dieser Proteine scheint nicht wesentlich verändert zu sein, wenn man die mRNA von Patienten und Kontrollen vergleicht.

Für die Praxis lässt sich schlussfolgern, dass es wichtig ist "high-risk" Patienten zu identifizieren, um die Entwicklung einer Amyloidose zu vermeiden. Hierzu sollten S100A8/9 und S100A12 im klinischen Alltag zur Einschätzung der Krankheitsaktivität zusätzlich zu klassischen Akute-Phase-Proteinen herangezogen werden. Diese dienen auch zur besseren Abgrenzung des FMF zu anderen Erkrankungen, die mit Fieber einhergehen. Auch die Bestimmung der Inflammasomaktivität durch Messung der Caspase-1 oder des IL-18 wären mögliche diagnostische Tests zur Beurteilung der subklinischen Inflammation.

Insbesondere für IL-18 und S100A12 konnte gezeigt werden, dass es zur Bestimmung der Krankheitsaktivität beiträgt und mit dem Genotyp korreliert.<sup>111</sup>

Bei Patienten mit einem instabilen Krankheitsverlauf, d.h. die trotz Colchizinthherapie weiterhin Schübe entwickeln, besteht das Risiko der Entwicklung einer Amyloidose und die Therapie ist nicht ausreichend. In diesen Fällen müssen zusätzliche Therapieoptionen erwogen werden. Erfahrungen mit einer Interleukin-1-Blockade beim FMF bestehen bereits. Dennoch gibt es Patienten, die auch mit diesem Ansatz keine komplette Remission der Erkrankung zeigen bzw. bei denen der Einsatz durch die Nebenwirkungen der Interleukin-1-Blockade limitiert ist. Andere Ansatzpunkte wie eine IL-18-Blockade, welches beim FMF, wie hier gezeigt, auch stark erhöht ist, wären denkbare Therapieoptionen. Eine Blockade der S100-Proteine, wäre entsprechend auch eine Möglichkeit. Noch spezifischerer Ansätze wie die Inhibition dem Inflammasom vorgeschalteter Signalkaskaden oder eine Hemmung des Pyrin-Inflammasoms würden eine krankheitsspezifischere Therapie ermöglichen.

Ein Schwachpunkt dieser Arbeit und der Ergebnisse ist die kleine Fallzahl. Daher bedarf es weiterer Arbeiten die einerseits diese Ergebnisse durch eine größere Fallzahl stützen und die Untersuchung auf FMF Patienten mit anderen Mutationen bzw. nur einer Mutation ausweiten, um zu beurteilen ob ein "gene-dose" Effekt des MEFV-Gens vorliegt. Weitere interessante Erweiterungen wären der Einsatz von Interleukin-1-Blockern in therapeutischer Dosis in *in vitro* Messungen.

Da sich die Messung von Interleukin-1 $\beta$  im Serum als schwierig erweist und die klassischen Inflammationsmarker bei subklinischer Inflammation nicht wegweisend sind, eignen sich S100 Proteine, vor allem S100A12, als Aktivitätsmarker für das FMF.

Aus diesen Ergebnissen könnten für die Klinik strengere Kontrollen der Inflammationsmarker, vor allem Kontrollen der S100 Proteine, bei Patienten mit der Mutation M694V abgeleitet und eine frühzeitige Therapieoptimierung erwogen werden. Insbesondere zur Verhinderung der Amyloidoseentwicklung ist die Eindämmung der

Inflammation ausschlaggebend. Zusätzliche Therapieoptionen wie zum Beispiel mit einer Interleukin-1-Blockade sind dann indiziert.

## 5. Literaturverzeichnis

1. Sohar E, Gafni J, Pras M, Heller H. Familial Mediterranean fever. A survey of 470 cases and review of the literature. *The American journal of medicine* 1967;43:227-53.
2. Ben-Chetrit E, Levy M. Familial Mediterranean fever. *Lancet* 1998;351:659-64.
3. Ben-Chetrit E, Touitou I. Familial mediterranean Fever in the world. *Arthritis and rheumatism* 2009;61:1447-53.
4. Sugiura T, Kawaguchi Y, Fujikawa S, et al. Familial Mediterranean fever in three Japanese patients, and a comparison of the frequency of MEFV gene mutations in Japanese and Mediterranean populations. *Modern rheumatology / the Japan Rheumatism Association* 2008;18:57-9.
5. Lainka E, Bielak M, Lohse P, et al. Familial Mediterranean fever in Germany: epidemiological, clinical, and genetic characteristics of a pediatric population. *European journal of pediatrics* 2012.
6. Tunca M, Akar S, Onen F, et al. Familial Mediterranean fever (FMF) in Turkey: results of a nationwide multicenter study. *Medicine* 2005;84:1-11.
7. Shohat M, Halpern GJ. Familial Mediterranean fever--a review. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics* 2011;13:487-98.
8. Ancient missense mutations in a new member of the RoRet gene family are likely to cause familial Mediterranean fever. *The International FMF Consortium. Cell* 1997;90:797-807.
9. French FMFC. A candidate gene for familial Mediterranean fever. *Nature genetics* 1997;17:25-31.
10. Goldfinger SE. Colchicine for familial Mediterranean fever. *The New England journal of medicine* 1972;287:1302.
11. Marek-Yagel D, Berkun Y, Padeh S, et al. Clinical disease among patients heterozygous for familial Mediterranean fever. *Arthritis and rheumatism* 2009;60:1862-6.
12. Ozen S. Changing concepts in familial Mediterranean fever: is it possible to have an autosomal-recessive disease with only one mutation? *Arthritis and rheumatism* 2009;60:1575-7.
13. Ozen S, Aktay N, Lainka E, Duzova A, Bakkaloglu A, Kallinich T. Disease severity in children and adolescents with familial Mediterranean fever: a comparative study to explore environmental effects on a monogenic disease. *Annals of the rheumatic diseases* 2009;68:246-8.

14. Touitou I, Lesage S, McDermott M, et al. Infevers: an evolving mutation database for auto-inflammatory syndromes. *Human mutation* 2004;24:194-8.
15. Touitou I. The spectrum of Familial Mediterranean Fever (FMF) mutations. *European journal of human genetics : EJHG* 2001;9:473-83.
16. Hershko AY, Ben-Chetrit E. The MEFV E148Q allele: a deleterious mutation or harmless variation? *Clinical and experimental rheumatology* 2006;24:S51-2.
17. Centola M, Wood G, Frucht DM, et al. The gene for familial Mediterranean fever, MEFV, is expressed in early leukocyte development and is regulated in response to inflammatory mediators. *Blood* 2000;95:3223-31.
18. Matzner Y, Abedat S, Shapiro E, et al. Expression of the familial Mediterranean fever gene and activity of the C5a inhibitor in human primary fibroblast cultures. *Blood* 2000;96:727-31.
19. Samuels J, Aksentijevich I, Torosyan Y, et al. Familial Mediterranean fever at the millennium - Clinical spectrum, ancient mutations, and a survey of 100 American - Referrals to the National Institutes of Health. *Medicine* 1998;77:268-97.
20. Ozdogan H, Arisoy N, Kasapcapur O, et al. Vasculitis in familial Mediterranean fever. *The Journal of rheumatology* 1997;24:323-7.
21. Gedalia A, Zamir S. Neurologic manifestations in familial Mediterranean fever. *Pediatric neurology* 1993;9:301-2.
22. Eshel G, Vinograd I, Barr J, Zemer D. Acute scrotal pain complicating familial Mediterranean fever in children. *The British journal of surgery* 1994;81:894-6.
23. Ben-Chetrit E, Ben-Chetrit A. Familial Mediterranean fever and menstruation. *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology* 2001;108:403-7.
24. Twig G, Livneh A, Vivante A, et al. Mortality risk factors associated with familial Mediterranean fever among a cohort of 1.25 million adolescents. *Annals of the rheumatic diseases* 2014;73:704-9.
25. Touitou I, Sarkisian T, Medlej-Hashim M, et al. Country as the primary risk factor for renal amyloidosis in familial Mediterranean fever. *Arthritis and rheumatism* 2007;56:1706-12.
26. Shohat M, Magal N, Shohat T, et al. Phenotype-genotype correlation in familial Mediterranean fever: evidence for an association between Met694Val and amyloidosis. *European journal of human genetics : EJHG* 1999;7:287-92.

27. Tunca M, Akar S, Onen F, et al. Familial Mediterranean fever (FMF) in Turkey: results of a nationwide multicenter study. *Medicine* 2005;84:1-11.
28. Gershoni-Baruch R, Brik R, Zacks N, Shinawi M, Lidar M, Livneh A. The contribution of genotypes at the MEFV and SAA1 loci to amyloidosis and disease severity in patients with familial Mediterranean fever. *Arthritis and rheumatism* 2003;48:1149-55.
29. Medlej-Hashim M, Delague V, Chouery E, et al. Amyloidosis in familial Mediterranean fever patients: correlation with MEFV genotype and SAA1 and MICA polymorphisms effects. *BMC medical genetics* 2004;5:4.
30. Kallinich T, Wittkowski H, Keitzer R, Roth J, Foell D. Neutrophil-derived S100A12 as novel biomarker of inflammation in familial Mediterranean fever. *Annals of the rheumatic diseases* 2010;69:677-82.
31. Pras E, Livneh A, Balow JE, Jr., et al. Clinical differences between North African and Iraqi Jews with familial Mediterranean fever. *American journal of medical genetics* 1998;75:216-9.
32. Mor A, Shinar Y, Zaks N, et al. Evaluation of disease severity in familial Mediterranean fever. *Seminars in arthritis and rheumatism* 2005;35:57-64.
33. Livneh A, Langevitz P, Zemer D, et al. Criteria for the diagnosis of familial Mediterranean fever. *Arthritis and rheumatism* 1997;40:1879-85.
34. Yalcinkaya F, Ozen S, Ozcakar ZB, et al. A new set of criteria for the diagnosis of familial Mediterranean fever in childhood. *Rheumatology (Oxford)* 2009;48:395-8.
35. Booty MG, Chae JJ, Masters SL, et al. Familial Mediterranean fever with a single MEFV mutation: where is the second hit? *Arthritis and rheumatism* 2009;60:1851-61.
36. Giancane G, Ter Haar NM, Wulffraat N, et al. Evidence-based recommendations for genetic diagnosis of familial Mediterranean fever. *Annals of the rheumatic diseases* 2015.
37. Goldstein RC, Schwabe AD. Prophylactic colchicine therapy in familial Mediterranean fever. A controlled, double-blind study. *Annals of internal medicine* 1974;81:792-4.
38. Dinarello CA, Wolff SM, Goldfinger SE, Dale DC, Alling DW. Colchicine therapy for familial mediterranean fever. A double-blind trial. *The New England journal of medicine* 1974;291:934-7.
39. Zemer D, Revach M, Pras M, et al. A controlled trial of colchicine in preventing attacks of familial mediterranean fever. *The New England journal of medicine* 1974;291:932-4.

40. Zemer D, Pras M, Sohar E, Modan M, Cabili S, Gafni J. Colchicine in the prevention and treatment of the amyloidosis of familial Mediterranean fever. *The New England journal of medicine* 1986;314:1001-5.
41. Zemer D, Livneh A, Danon YL, Pras M, Sohar E. Long-term colchicine treatment in children with familial Mediterranean fever. *Arthritis and rheumatism* 1991;34:973-7.
42. Kallinich T, Haffner D, Niehues T, et al. Colchicine use in children and adolescents with familial Mediterranean fever: literature review and consensus statement. *Pediatrics* 2007;119:e474-83.
43. Ben-Chetrit E, Levy M. Colchicine prophylaxis in familial Mediterranean fever: reappraisal after 15 years. *Seminars in arthritis and rheumatism* 1991;20:241-6.
44. Cronstein BN, Molad Y, Reibman J, Balakhane E, Levin RI, Weissmann G. Colchicine alters the quantitative and qualitative display of selectins on endothelial cells and neutrophils. *The Journal of clinical investigation* 1995;96:994-1002.
45. Paschke S, Weidner AF, Paust T, Marti O, Beil M, Ben-Chetrit E. Technical advance: Inhibition of neutrophil chemotaxis by colchicine is modulated through viscoelastic properties of subcellular compartments. *Journal of leukocyte biology* 2013;94:1091-6.
46. Ehrenfeld M, Levy M, Bar Eli M, Gallily R, Eliakim M. Effect of colchicine on polymorphonuclear leucocyte chemotaxis in human volunteers. *British journal of clinical pharmacology* 1980;10:297-300.
47. Martinon F, Petrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* 2006;440:237-41.
48. Taskiran EZ, Cetinkaya A, Balci-Peynircioglu B, Akkaya YZ, Yilmaz E. The effect of colchicine on pyrin and pyrin interacting proteins. *Journal of cellular biochemistry* 2012;113:3536-46.
49. Lidar M, Scherrmann JM, Shinar Y, et al. Colchicine nonresponsiveness in familial Mediterranean fever: clinical, genetic, pharmacokinetic, and socioeconomic characterization. *Seminars in arthritis and rheumatism* 2004;33:273-82.
50. Ben-Chetrit E, Ozdogan H. Non-response to colchicine in FMF--definition, causes and suggested solutions. *Clinical and experimental rheumatology* 2008;26:S49-51.
51. Calligaris L, Marchetti F, Tommasini A, Ventura A. The efficacy of anakinra in an adolescent with colchicine-resistant familial Mediterranean fever. *European journal of pediatrics* 2008;167:695-6.

52. Ozen S, Bilginer Y, Aktay Ayaz N, Calguneri M. Anti-interleukin 1 treatment for patients with familial Mediterranean fever resistant to colchicine. *The Journal of rheumatology* 2011;38:516-8.
53. Hashkes PJ, Spalding SJ, Giannini EH, et al. Riloncept for colchicine-resistant or -intolerant familial Mediterranean fever: a randomized trial. *Annals of internal medicine* 2012;157:533-41.
54. Hacıhamdioglu DO, Ozen S. Canakinumab induces remission in a patient with resistant familial Mediterranean fever. *Rheumatology (Oxford)* 2012;51:1041.
55. Hashkes PJ, Spalding SJ, Giannini EH, et al. Riloncept for Colchicine-Resistant or -Intolerant Familial Mediterranean Fever A Randomized Trial. *Annals of internal medicine* 2012;157:533-+.
56. Brik R, Butbul-Aviel Y, Lubin S, et al. Canakinumab for the treatment of children with colchicine-resistant familial Mediterranean fever: a 6-month open-label, single-arm pilot study. *Arthritis & Rheumatology* 2014;66:3241-3.
57. Gul A, Ozdogan H, Erer B, et al. Efficacy and safety of canakinumab in adolescents and adults with colchicine-resistant familial Mediterranean fever. *Arthritis research & therapy* 2015;17.
58. Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Molecular cell* 2002;10:417-26.
59. Martinon F, Mayor A, Tschopp J. The inflammasomes: guardians of the body. *Annual review of immunology* 2009;27:229-65.
60. Stojanov S, Kastner DL. Familial autoinflammatory diseases: genetics, pathogenesis and treatment. *Current opinion in rheumatology* 2005;17:586-99.
61. Lamkanfi M, Dixit VM. Inflammasomes and their roles in health and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2012;28:137-61.
62. Chae JJ, Aksentijevich I, Kastner DL. Advances in the understanding of familial Mediterranean fever and possibilities for targeted therapy. *British journal of haematology* 2009;146:467-78.
63. Papin S, Cuenin S, Agostini L, et al. The SPRY domain of Pyrin, mutated in familial Mediterranean fever patients, interacts with inflammasome components and inhibits proIL-1beta processing. *Cell death and differentiation* 2007;14:1457-66.
64. Chae JJ, Wood G, Masters SL, et al. The B30.2 domain of pyrin, the familial Mediterranean fever protein, interacts directly with caspase-1 to modulate IL-1beta

production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006;103:9982-7.

65. Chae JJ, Cho YH, Lee GS, et al. Gain-of-Function Pyrin Mutations Induce NLRP3 Protein-Independent Interleukin-1 beta Activation and Severe Autoinflammation in Mice. *Immunity* 2011;34:755-68.

66. Chae JJ, Wood G, Richard K, et al. The familial Mediterranean fever protein, pyrin, is cleaved by caspase-1 and activates NF-kappaB through its N-terminal fragment. *Blood* 2008;112:1794-803.

67. Donato R. Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microscopy research and technique* 2003;60:540-51.

68. Hermann A, Donato R, Weiger TM, Chazin WJ. S100 calcium binding proteins and ion channels. *Frontiers in pharmacology* 2012;3:67.

69. Foell D, Roth J. Proinflammatory S100 proteins in arthritis and autoimmune disease. *Arthritis and rheumatism* 2004;50:3762-71.

70. Foell D, Wittkowski H, Vogl T, Roth J. S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules. *Journal of leukocyte biology* 2007;81:28-37.

71. Wittkowski H, Frosch M, Wulffraat N, et al. S100A12 is a novel molecular marker differentiating systemic-onset juvenile idiopathic arthritis from other causes of fever of unknown origin. *Arthritis and rheumatism* 2008;58:3924-31.

72. Foell D, Kucharzik T, Kraft M, et al. Neutrophil derived human S100A12 (EN-RAGE) is strongly expressed during chronic active inflammatory bowel disease. *Gut* 2003;52:847-53.

73. Vogl T, Ludwig S, Goebeler M, et al. MRP8 and MRP14 control microtubule reorganization during transendothelial migration of phagocytes. *Blood* 2004;104:4260-8.

74. Rammes A, Roth J, Goebeler M, Klempt M, Hartmann M, Sorg C. Myeloid-related protein (MRP) 8 and MRP14, calcium-binding proteins of the S100 family, are secreted by activated monocytes via a novel, tubulin-dependent pathway. *The Journal of biological chemistry* 1997;272:9496-502.

75. Vogl T, Tenbrock K, Ludwig S, et al. Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock. *Nature medicine* 2007;13:1042-9.

76. Kopp EB, Medzhitov R. The Toll-receptor family and control of innate immunity. *Curr Opin Immunol* 1999;11:13-8.

77. Kessel C, Holzinger D, Foell D. Phagocyte-derived S100 proteins in autoinflammation: putative role in pathogenesis and usefulness as biomarkers. *Clin Immunol* 2013;147:229-41.
78. Vogl T, Propper C, Hartmann M, et al. S100A12 is expressed exclusively by granulocytes and acts independently from MRP8 and MRP14. *The Journal of biological chemistry* 1999;274:25291-6.
79. Hofmann MA, Drury S, Fu C, et al. RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell* 1999;97:889-901.
80. Foell D, Wittkowski H, Kessel C, et al. Proinflammatory S100A12 Can Activate Human Monocytes via Toll-like Receptor 4. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2013;187:1324-34.
81. Ozturk C, Halicioglu O, Coker I, et al. Association of clinical and genetical features in FMF with focus on MEFV strip assay sensitivity in 452 children from western Anatolia, Turkey. *Clinical rheumatology* 2012;31:493-501.
82. Majeed HA, El-Shanti H, Al-Khateeb MS, Rabaiha ZA. Genotype/phenotype correlations in Arab patients with familial Mediterranean fever. *Seminars in arthritis and rheumatism* 2002;31:371-6.
83. Giaglis S, Papadopoulos V, Kambas K, et al. MEFV alterations and population genetics analysis in a large cohort of Greek patients with familial Mediterranean fever. *Clinical genetics* 2007;71:458-67.
84. Gunesacar R, Celik MM, Arica V, Elmacioglu S, Ozturk OH. Frequency of MEFV gene mutations in Hatay province, Mediterranean region of Turkey and report of a novel missense mutation (I247V). *Gene* 2014;546:195-9.
85. Yilmaz E, Ozen S, Balci B, et al. Mutation frequency of Familial Mediterranean Fever and evidence for a high carrier rate in the Turkish population. *European journal of human genetics : EJHG* 2001;9:553-5.
86. Lidar M, Doron A, Kedem R, Yosepovich A, Langevitz P, Livneh A. Appendectomy in familial Mediterranean fever: clinical, genetic and pathological findings. *Clinical and experimental rheumatology* 2008;26:568-73.
87. Reissman P, Durst AL, Rivkind A, Szold A, Ben-Chetrit E. Elective laparoscopic appendectomy in patients with familial Mediterranean fever. *World journal of surgery* 1994;18:139-41; discussion 41-2.
88. Bayram MT, Cankaya T, Bora E, et al. Risk factors for subclinical inflammation in children with Familial Mediterranean fever. *Rheumatology international* 2015;35:1393-8.

89. Korkmaz C, Ozdogan H, Kasapcopur O, Yazici H. Acute phase response in familial Mediterranean fever. *Annals of the rheumatic diseases* 2002;61:79-81.
90. Lachmann HJ, Sengul B, Yavuzsen TU, et al. Clinical and subclinical inflammation in patients with familial Mediterranean fever and in heterozygous carriers of MEFV mutations. *Rheumatology (Oxford)* 2006;45:746-50.
91. Frosch M, Ahlmann M, Vogl T, et al. The myeloid-related proteins 8 and 14 complex, a novel ligand of toll-like receptor 4, and interleukin-1beta form a positive feedback mechanism in systemic-onset juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis and rheumatism* 2009;60:883-91.
92. Weber A, Wasiliew P, Kracht M. Interleukin-1 (IL-1) pathway. *Sci Signal* 2010;3:cm1.
93. Novick D, Kim S, Kaplanski G, Dinarello CA. Interleukin-18, more than a Th1 cytokine. *Semin Immunol* 2013;25:439-48.
94. Haznedaroglu S, Ozturk MA, Sancak B, et al. Serum interleukin 17 and interleukin 18 levels in familial Mediterranean fever. *Clinical and experimental rheumatology* 2005;23:S77-80.
95. Manukyan G, Petrek M, Kriegova E, Ghazaryan K, Fillerova R, Boyajyan A. Activated phenotype of circulating neutrophils in familial Mediterranean fever. *Immunobiology* 2013;218:892-8.
96. Manukyan G, Aminov R, Hakobyan G, Davtyan T. Accelerated apoptosis of neutrophils in familial mediterranean Fever. *Front Immunol* 2015;6:239.
97. Xu H, Yang J, Gao W, et al. Innate immune sensing of bacterial modifications of Rho GTPases by the Pyrin inflammasome. *Nature* 2014;513:237-41.
98. Piccioli P, Rubartelli A. The secretion of IL-1beta and options for release. *Semin Immunol* 2013;25:425-9.
99. Carta S, Tassi S, Semino C, et al. Histone deacetylase inhibitors prevent exocytosis of interleukin-1beta-containing secretory lysosomes: role of microtubules. *Blood* 2006;108:1618-26.
100. Misawa T, Takahama M, Kozaki T, et al. Microtubule-driven spatial arrangement of mitochondria promotes activation of the NLRP3 inflammasome. *Nature immunology* 2013;14:454-60.
101. Mansfield E, Chae JJ, Komarow HD, et al. The familial Mediterranean fever protein, pyrin, associates with microtubules and colocalizes with actin filaments. *Blood* 2001;98:851-9.

102. van der Naalt J, Haaxma-Reiche H, van den Berg AP, Hazenberg BP, Molenaar WM. Acute neuromyopathy after colchicine treatment. *Annals of the rheumatic diseases* 1992;51:1267-8.
103. Allen JN, Herzyk DJ, Wewers MD. Colchicine has opposite effects on interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha production. *The American journal of physiology* 1991;261:L315-21.
104. Omenetti A, Carta S, Delfino L, Martini A, Gattorno M, Rubartelli A. Increased NLRP3-dependent interleukin 1beta secretion in patients with familial Mediterranean fever: correlation with MEFV genotype. *Annals of the rheumatic diseases* 2014;73:462-9.
105. Gang N, Drenth JP, Langevitz P, et al. Activation of the cytokine network in familial Mediterranean fever. *The Journal of rheumatology* 1999;26:890-7.
106. Manukyan GP, Ghazaryan KA, Ktsoyan Zh A, et al. Cytokine profile of Armenian patients with Familial Mediterranean fever. *Clin Biochem* 2008;41:920-2.
107. Yildirim K, Uzkeser H, Keles M, et al. Relationship between serum interleukin-1beta levels and acute phase response proteins in patients with familial Mediterranean fever. *Biochem Med (Zagreb)* 2012;22:109-13.
108. Migita K, Izumi Y, Fujikawa K, et al. Dysregulated mature IL-1beta production in familial Mediterranean fever. *Rheumatology (Oxford)* 2015;54:660-5.
109. Manukyan G, Petrek M, Tomankova T, et al. Colchicine modulates expression of pro-inflammatory genes in neutrophils from patients with familial Mediterranean fever and healthy subjects. *J Biol Regul Homeost Agents* 2013;27:329-36.
110. Notarnicola C, Didelot MN, Seguret F, Demaille J, Touitou I. Enhanced cytokine mRNA levels in attack-free patients with familial Mediterranean fever. *Genes Immun* 2002;3:43-5.
111. Gohar F, Orak B, Kallinich T, Jeske M, al. e. Secretory activity of neutrophils correlates with genotype in Familial Mediterranean Fever Submitted at *Arthritis and Rheumatology* 2015.

## 6. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Banu Orak, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Ex vivo Inflammasomaktivität in Leukozyten von Patienten mit homozygoter MEFV – Gen Mutation“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

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

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

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

Datum

Unterschrift

## 7. Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Banu Orak hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

1. **Orak, B.** , Kallinich, T., Neues zum Familiären Mittelmeerfieber, Zeitschrift für Kinder- und Jugendmedizin, 2015.

Alleinige Erstellung des Manuskripts mit Unterstützung von Herrn PD Dr. T. Kallinich.  
Literaturrecherche und Zusammenstellung graphischer Darstellungen.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift der Doktorandin

## 8. Publikationen

### Vorträge mit Abstraktveröffentlichungen:

1. **Orak, B.**, Fathi, A., Wittkowski, H., von Bernuth, H., Kallinich, T., Foell, D. Aberrant inflammasome priming and dysregulated secretory pathways contribute to parallel IL-18 and S100A12 hypersecretion from neutrophils in instable familial Mediterranean fever (FMF), gemeinsamer Kongress der European League against Rheumatism (EULAR) und Pediatric Rheumatology European Society (PRES), Young Investigator Meeting, Berlin 2012.

2. **Orak, B.**, Fathi, A., Wittkowski, H., von Bernuth, H., Kallinich, T., Foell, D. Abnorme Inflammasom-Aktivität und dysregulierte Sekretionswege verursachen parallele IL-18 und S100A12 Hypersekretion in Neutrophilen bei Patienten mit familiärem Mittelmeerfieber (FMF). Wissenschaftssymposium der Gesellschaft für Kinder- und Jugendrheumatologie, Bochum 2012

### Poster mit Abstraktveröffentlichungen:

**Orak, B.**, Kallinich, T., Lieber, M., von Bernuth, H., Wittkowski, H., Foell, D. The Inflammasome and secretory pathways in FMF. Kongress der International Society of Systemic Auto-Inflammatory Diseases (ISSAID), Lausanne 2013.

### Publizierte Artikel:

**Orak, B.**, Kallinich, T., Neues zum Familiären Mittelmeerfieber, Zeitschrift für Kinder- und Jugendmedizin, Schattauer Verlag, 2015.

### Noch nicht publizierter Artikel:

Gohar, F., **Orak, B.**, Kallinich, T., Jeske, M., Lieber, M., von Bernuth, H., Giese, A., Weissbarth-Riedel, E., Haas, JP., Dressler, F., Holzinger, D., Lohse, P., Neudorf, U., Lainka, E., Hinze, C., Masjosthusmann, K., Kessel, C., Weinhage, T., Foell, D., Wittkowski, H., Secretory activity of neutrophils correlates with genotype in Familial Mediterranean Fever. Eingereicht bei "Arthritis and Rheumatology", Oktober 2015

## **9. Lebenslauf**

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

## 10. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater und Mentor Herrn PD Dr. T. Kallinich für die Erarbeitung dieses spannenden Themas, die hervorragende wissenschaftliche Betreuung und die unermüdliche Diskussions- und Hilfsbereitschaft, die maßgeblich zur Vervollständigung dieser Arbeit beigetragen haben.

Weiterhin möchte ich mich bei den ehemaligen und noch jetzigen Mitarbeiterinnen des pädiatrisch-immunologischen Labors der Charité bedanken. Petra Ellensohn, in Gedenken, Margret Oberreit-Menesis und Christine Seib, die mir besonders am Anfang mit ihrer großen Erfahrung und Ruhe zur Seite standen und mich die Methoden lehrten. Prof. Dr. H. v. Bernuth danke ich für die Bereitstellung des Labors.

Dem immunologischen Labor in Münster und insbesondere Prof. Dr. D. Foell und PD Dr. H. Wittkowski danke ich für die Zusammenarbeit und die Unterstützung bei der Durchführung der Versuche.

Außerdem möchte ich mich bei allen Patienten, Eltern und Kontrollen bedanken, die an dieser Arbeit teilgenommen haben und ohne deren Mitwirken ich diese Arbeit nicht hätte durchführen können.

Mein größter Dank gilt meiner Familie. Meinen Eltern, Nezaket und Müslüm Orak, möchte ich für die bedingungslose, liebevolle und selbstlose Unterstützung danken, die mir das Studium und auch die Doktorarbeit ermöglicht haben. Meinen Geschwistern, Baris und Berna Orak, möchte ich danken. Sie haben mich in meinem Werdegang geprägt und waren immer für mich da. Walid möchte ich danken, der mich in jeder Lebenssituation unterstützt hat, meine Launen immer ertragen musste und mit seiner Liebe mir Kraft und Mut gegeben hat, diese Arbeit zu vervollständigen.