

Aus der
Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen
Abteilung Innere Medizin II
(Schwerpunkt: Hämatologie, Onkologie, klinische Immunologie und
Rheumatologie)

**Phänotyp und Funktion Dendritischer Zellen bei
Patienten und Patientinnen mit Autoinflammatorischen
Erkrankungen**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Funk, Tanja

2022

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. F. Grünebach

2. Berichterstatter: Professorin Dr. U. Holzer

Tag der Disputation: 11.08.2022

Inhaltsverzeichnis

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	IV
TABELLENVERZEICHNIS	VI
ABKÜRZUNGEN	VII
1. EINLEITUNG	1
1.1. Das Immunsystem	1
1.1.1. Das unspezifische angeborene Immunsystem	1
1.1.2. Das spezifische adaptive Immunsystem	2
1.1.3. Autoimmunität	2
1.2. Dendritische Zellen	3
1.3. Autoinflammatorische Erkrankungen	6
1.3.1. Das Inflammasom	7
1.3.2. Familiäres Mittelmeerfieber (FMF)	9
1.3.3. Muckle-Wells Syndrom (MWS)	12
1.3.4. TNF-Rezeptor-assoziiertes periodisches Syndrom (TRAPS)	13
1.4. Fragestellung und Zielsetzung dieser Arbeit	15
2. MATERIAL	17
2.1. Geräte	17
2.2. Verbrauchsmaterialien	18
2.3. Medien und Puffer	19
2.4. Reagenzien	20
2.5. Zytokine	21
2.6. Antikörper	22
2.7. Software	24
3. METHODEN	25
3.1. Patienten und Patientinnen und Kontrollpersonen	25
3.2. Zellkultur	25
3.2.1. Isolation von PBMCs aus peripherem Blut über Dichtegradientenzentrifugation	25
3.2.2. Generierung von Mo-DCs aus plastikadhärenten Monozyten	26
3.2.3. Einfrieren von PBMCs	27
3.3. Phänotypisierung von Zellen	28
3.3.1. Färbung und FACS-Messung von PBMCs für DC-Subpopulationsanalysen	28
3.3.2. Färbung und FACS-Messung von Aktivierungs- und Reifungsmarkern auf primären PBDCs	29
3.3.3. Färbung und FACS-Messung von Oberflächenmarkern auf Mo-DCs	30

3.4.	Analyse der Funktion der Mo-DCs	31
3.4.1.	Messung der Migrationsfähigkeit von Mo-DCs in Transwell-Migrations-Assays	31
3.4.2.	CFSE-Proliferations-Assay	31
3.5.	Proteinanalysen	32
3.5.1.	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	32
3.6.	Statistische Analysen	32
4.	ERGEBNISSE	34
4.1.	Patientenkollektiv und -charakteristika	34
4.2.	Generierung von Mo-DCs <i>in vitro</i> von Patienten und Patientinnen mit FMF, MWS und TRAPS	39
4.3.	Frequenzen der PBDC-Subpopulationen bei FMF-, MWS- und TRAPS-Patienten und Patientinnen	40
4.4.	Einfluss immunsuppressiver Medikamente auf die Frequenz der PBDCs bei FMF-Patienten und Patientinnen	41
4.5.	Phänotyp der Mo-DCs	42
4.5.1.	Aktivierungs- und Reifungsmarker auf imMo-DCs von FMF-, MWS- und TRAPS-Patienten und Patientinnen	42
4.5.2.	Suszeptibilität der imMo-DCs von FMF-, MWS- und TRAPS-Patienten und Patientinnen gegenüber dem Reifungsstimulus LPS	44
4.5.3.	Expression von Reifungsmarkern auf PBDCs von FMF-Patienten und Patientinnen	47
4.6.	Funktion der Mo-DCs	48
4.6.1.	Migratorische Kapazität von imMo-DCs und mMo-DCs von FMF- und MWS-Patienten und Patientinnen	48
4.6.2.	T-Zell-stimulatorische Kapazität der imMo-DCs und mMo-DCs von FMF-, MWS- und TRAPS-Patienten und Patientinnen	49
4.6.3.	Zytokinsekretion der imMo-DCs und mMo-DCs von FMF-Patienten und Patientinnen	51
4.7.	Analyse der Mo-DCs eines Patienten im aktiven FMF-Schub (Fallbericht)	53
4.8.	Korrelation zwischen Mutationsstatus und klinischen Daten bei FMF-Patienten und Patientinnen	56
5.	DISKUSSION	57
5.1.	DCs im peripheren Blut von Patienten und Patientinnen mit FMF, MWS oder TRAPS	58
5.2.	Phänotyp der PBDCs und Mo-DCs von Patienten und Patientinnen mit FMF, MWS oder TRAPS	58
5.3.	T-Zell-stimulatorische Kapazität der Mo-DCs von Patienten und Patientinnen mit FMF und MWS	61
5.4.	Migration der Mo-DCs von Patienten und Patientinnen mit FMF und MWS	62

5.5. Zytokinsekretion durch Mo-DCs von Patienten und Patientinnen mit FMF	63
5.6. Analyse der DCs eines Patienten im aktiven FMF-Schub (Fallbericht)	64
5.7. Potentieller Einfluss der Colchicin- und Anti-IL-1β-Therapie auf Frequenz, Phänotyp und Funktion von DCs	65
5.8. Potentieller Einfluss einer immunsuppressiven Therapie auf Frequenz, Phänotyp und Funktion von DCs	66
5.9. Probleme und Grenzen dieser Arbeit	67
5.10. Ausblick	68
6. ZUSAMMENFASSUNG	70
7. LITERATURVERZEICHNIS	72
8. ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL	87
9. VERÖFFENTLICHUNGEN	88
10. DANKSAGUNG	89

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Dendritische Zellen.....	4
Abbildung 2 NLRP3- und Pyrin-Inflammasom.....	9
Abbildung 3 FACS-Gating-Strategie für DC-Subpopulationen im peripheren Blut.....	29
Abbildung 4 Exemplarische Darstellung der FACS-Gating-Strategie zur Identifizierung der CD83- und CD86-Expression auf PBDCs.	30
Abbildung 5 Exemplarischer Dotplot und Histogramme von CD14- und CD1a-FACS-Analysen von Mo-DCs.....	39
Abbildung 6 FACS-Analyse der Frequenz der verschiedenen DC-Subpopulationen im peripheren Blut von Patienten und Patientinnen mit FMF, MWS und TRAPS.	41
Abbildung 7 FACS-Analyse der DC-Subpopulationen im peripheren Blut von FMF-Patienten und Patientinnen mit Immunsuppressiva.....	42
Abbildung 8 FACS-Analyse der Expression von Oberflächenmolekülen auf FMF-imMo-DCs.....	43
Abbildung 9 FACS-Analyse der Expression von Oberflächenmarkern auf MWS- und TRAPS-imMo-DCs.	44
Abbildung 10 FACS-Analyse der Expression von Oberflächenmarkern auf mMo-DCs von FMF-Patienten und Patientinnen nach LPS-Stimulation.	45
Abbildung 11 FACS-Analyse der Expression von Oberflächenmarkern auf FMF-mMo-DCs.	46
Abbildung 12 FACS-Analyse der Expression von Oberflächenmarkern auf MWS- und TRAPS-mMo-DCs.....	47
Abbildung 13 FACS-Analyse der Expression von CD83 und CD86 auf DCs des peripheren Blutes (PBDCs) von Patienten und Patientinnen mit FMF.....	48
Abbildung 14 Migratorische Kapazität von FMF-imMo-DCs und FMF-mMo-DCs.	49

Abbildung 15 Migratorische Kapazität von MWS-imMo-DCs.	49
Abbildung 16 Exemplarische Histogramme des CFSE-Proliferations-Assays zur Analyse der T-Zell-stimulatorischen Kapazität.	50
Abbildung 17 T-Zell-stimulatorische Kapazität im CFSE-Proliferations-Assay mit FMF-Mo-DCs.....	50
Abbildung 18 T-Zell-stimulatorische Kapazität im CFSE-Proliferations-Assay mit MWS- und TRAPS-imMo-DCs.	51
Abbildung 19 TNF- β Konzentration in Zellkulturüberständen von FMF- imMo-DCs und FMF-mMo-DCs.....	52
Abbildung 20 FACS-Analyse der DC-Subpopulationen im peripheren Blut von Patient Nr. 31 im Vergleich zu anderen FMF-Patienten und Patientinnen und Kontrollen.	53
Abbildung 21 FACS-Analyse der Expression von Oberflächenmarkern auf imMo-DCs von Patient Nr. 31 im Vergleich zu anderen FMF- Patienten und Patientinnen und Kontrollen.....	54
Abbildung 22 FACS-Analyse der Expression von Oberflächenmarkern auf mMo-DCs von Patient Nr. 31 im Vergleich zu anderen FMF- Patienten und Patientinnen und Kontrollen.....	55
Abbildung 23 T-Zell-stimulatorische Kapazität im CFSE-Proliferations-Assay der Mo-DCs von Patient Nr. 31 im Vergleich zu anderen FMF- Patienten und Patientinnen und Kontrollen.....	55

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Zusammenfassung FMF, MWS und TRAPS	15
Tabelle 2 Geräte	17
Tabelle 3 Verbrauchsmaterialien	18
Tabelle 4 Medien und Puffer.....	19
Tabelle 5 Reagenzien.....	20
Tabelle 6 ELISA Kits.....	20
Tabelle 7 Zytokine	21
Tabelle 8 Antikörper für FACS.....	22
Tabelle 9 Software.....	24
Tabelle 10 Zellzahl in der Zellkultur zur Generierung von Mo-DCs aus PBMCs	26
Tabelle 11 Patientencharakteristika von FMF-Patienten und Patientinnen	36
Tabelle 12 Patientencharakteristika von MWS- und TRAPS-Patienten und Patientinnen	38
Tabelle 13 Rückgewinnungsrate in % (Mo-DCs aus PBMCs).....	40
Tabelle 14 Frequenzen von PBDCs und DC-Subpopulationen bei Patienten und Patientinnen mit FMF, MWS und gesunden Kontrollen.	41

Abkürzungen

APC	Antigen-Presenting Cell – Antigenpräsentierende Zelle
ASC	Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD – Apoptose-assoziiertes Speck-ähnliches Protein mit CARD
CAPS	Cryopyrin-assoziiertes periodisches Syndrom
CARD	Caspase Recruitment Domain – Caspase Rekrutierungs-Domäne
CD	Cluster of Differentiation
CFDA-SE/CFSE	5(6)-Carboxyfluorescein Diacetat Succinimidyl Ester
CIAS1	Cold-induced Autoinflammatory Syndrome 1 – Kälte-induziertes autoinflammatorisches Syndrom 1
CINCA	Chronic Infantile Neurologic, Cutaneous and Articular Syndrome – Chronisches infantiles neurologisches, kutanes und artikuläres Syndrom
CRP	C-reaktives Protein
DAMPs	Danger/Damage-Associated Molecular Patterns – Gefahren/Schaden-assoziierte molekulare Muster
DC	Dendritic Cell – Dendritische Zelle
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting – Durchflusszytometrie
FCAS	Familial Cold-induced Autoinflammatory Syndrome – Familiäres Kälte-induziertes autoinflammatorisches Syndrom
FMF	Familiäres Mittelmeerfieber
FMO	Fluorescence Minus One – Fluoreszenz minus eins
FSC	Forward-Scatter – Vorwärtsstreulicht
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor – Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor
GPNMB	Glykoprotein NMB

HAMPs	Homeostasis-Altering Molecular Processes – Homöostasis-verändernde molekulare Prozesse
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
IFN	Interferon
IL	Interleukin
imMo-DC	imature Mo-DC – unreife Mo-DC
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	Leucin-Rich-Repeat
MDC1	Myeloide DCs Typ 1
MDC2	Myeloide DCs Typ 2
MFI	Median der Fluoreszenzintensität
MHC	Major Histocompatibility Complex – Haupthistokompatibilitätskomplex
mMo-DC	mature Mo-DC – reife Mo-DC
Mo-DC	Monocyte-derived DC
MWS	Muckle-Wells Syndrom
NALP3	NACHT, LRR und PYD-Domänen-enthaltendes Protein 3
NF-κB	Nuclear factor-kappa B
NLR	NOD-like Rezeptor
NLRP3	NLR Family Pyrin Domain Containing 3
NOD	Nucleotide-binding Oligomerization Domain
NOMID	Neonatal Onset Multisystem Inflammatory Disease
NSAID	Nonsteroidal Anti-inflammatory Drug – Nichtsteroidales Antirheumatikum (NSAR)
PAMPs	Pathogen-Associated Molecular Patterns – Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PBDC	Peripheral Blood Dendritic Cell – DC des peripheren Blutes
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell – Mononukleäre Zelle des peripheren Blutes

PDC	Plasmazytoide DCs
PHA	Phytohämagglutinin
PKN	Proteinkinase N
PRR	Pattern Recognition Receptor
PYD	Pyrin Domäne
ROS	Reactive Oxygen Species – reaktive Sauerstoffspezies
SAA	Serumamyloid A
SD	Standard Deviation – Standardabweichung
SFI	Spezifischer Fluoreszenz Index
SLE	Systemischer Lupus Erythematodes
SSC	Side-scatter – Seitwärtsstreulicht
Th-Zellen	T-Helfer-Zellen
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR1	Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1
TNFRSF1A	TNFR Super-Family Member 1 A
tolDC	tolerogene DC
TRAPS	TNF-Rezeptor-assoziiertes periodisches Syndrom
Treg-Zellen	regulatorische T-Zellen
Tregs	regulatorische T-Zellen

1. Einleitung

1.1. Das Immunsystem

Für die kontinuierliche Auseinandersetzung mit Gefahren wie Bakterien, Viren, Parasiten oder Pilzen und Veränderungen körpereigener Zellen verfügen Vertebraten über komplizierte Abwehrmechanismen, die man als Immunsystem bezeichnet. Dieses kann in ein unspezifisches angeborenes und ein spezifisches adaptives Immunsystem unterteilt werden.

1.1.1. Das unspezifische angeborene Immunsystem

Das unspezifische angeborene Immunsystem ist für die initiale und möglichst schnelle Immunantwort gegenüber Pathogenen verantwortlich, die eine Infektion des Wirts verhindert, kontrolliert oder eliminiert und/oder das adaptive Immunsystem aktiviert. Dazu gehören physikalische und chemische Barrieren wie beispielsweise die Haut mit ihrem physiologischen Säuremantel, antimikrobielle Peptide auf Körperoberflächen oder das Flimmerepithel in den Atemwegen. Immunzellen des unspezifischen Immunsystems sind Monozyten, Makrophagen, Dendritische Zellen (DCs) und polymorphkernige Granulozyten (neutrophile, basophile und eosinophile), welche zur Phagozytose fähig sind, sowie Mastzellen und Natürliche Killer-(NK)-Zellen.

Antigenpräsentierende Zellen (APCs) präsentieren durch Phagozytose, Endozytose oder Makropinozytose aufgenommene Antigene auf MHC-Molekülen T-Lymphozyten und leiten die adaptive Immunantwort ein. Zu den APCs gehören u. a. Monozyten, Makrophagen und DCs. Sie verfügen u. a. über verschiedene sogenannte pattern recognition receptors (PRRs), die konservierte, molekulare Strukturen, sogenannte danger- und pathogen-associated molecular patterns (DAMPs und PAMPs), oder homeostasis-altering molecular processes (HAMPs) erkennen können. PAMPs sind hoch konservierte, für Pathogene spezifische Moleküle, die im Menschen nicht vorkommen (z. B. Lipopolysaccharid (LPS) gramnegativer Bakterien). PRRs finden sich sowohl in Membranen der Zelloberfläche und der Endosomen, wie

Einleitung

z. B. die Toll-like Rezeptoren (TLRs), als auch zytoplasmatisch, wie z. B. NOD-like Rezeptoren (NLRs). Die Aktivierung von PRRs führt u. a. zur vermehrten Phagozytose, zur Ausschüttung inflammatorischer Zytokine und Chemokine und zur Änderung des transkriptionellen Profils, wodurch auch Zellen des adaptiven Immunsystems rekrutiert und aktiviert werden. Daneben tragen Akute-Phase-Proteine (z. B. CRP, SAA (Serumamyloid A), Komplement C3, Ferritin) ebenfalls wesentlich zur Entzündungsreaktion bei (reviewed in Delves and Roitt, 2000b, 2000a; Frizinsky et al., 2019; Dempsey et al., 2003).

1.1.2. Das spezifische adaptive Immunsystem

Im Gegensatz zum angeborenen Immunsystem entwickelt sich das spezifische adaptive Immunsystem erst als Antwort auf eine Infektion und reagiert zielgerichteter und effektiver als das Unspezifische. Die Zellen des adaptiven Immunsystems sind B- und T-Lymphozyten. Beide besitzen klonal verteilte Rezeptoren für Antigene. B-Lymphozyten sind vor allem für die humorale Immunantwort verantwortlich. Nachdem ein passendes Antigen an einen antigen-spezifischen B-Zell-Rezeptor bindet, differenzieren die B-Lymphozyten zu Plasmazellen und proliferieren. Antikörper, welche dieselbe Antigen-spezifität haben, werden produziert und sekretiert. Von den ebenfalls antigenspezifischen und insbesondere für die zelluläre Abwehr verantwortlichen T-Lymphozyten gibt es drei große Klassen: zytotoxische T-Zellen, T-Helfer-(Th)-Zellen und regulatorische T-(Treg)-Zellen. Zytotoxische T-Zellen können infizierte oder entartete Zellen töten. Th-Zellen aktivieren oder beeinflussen andere Immunzellen und Treg-Zellen regulieren das Ausmaß der Reaktion, indem sie die Immunantwort unterdrücken können. Das Besondere am adaptiven Immunsystem ist, dass es Gedächtniszellen bilden und mit diesen auf eine sekundäre Infektion deutlich schneller reagieren kann (reviewed in Delves and Roitt, 2000b, 2000a; Bonilla and Oettgen, 2010).

1.1.3. Autoimmunität

Neben einer schnellen, zielgerichteten und effektiven Immunantwort ist auch eine rechtzeitige Limitierung ihrer Aktivität notwendig, um Schäden an körpereigenem Gewebe zu vermeiden. Zudem durchlaufen die Zellen des

adaptiven Immunsystems bei ihrer Entwicklung eine strenge Selektion, um zuverlässig zwischen „Fremd“ und „Selbst“ unterscheiden zu können.

Wenn dieses komplexe System aus seinem fein abgestimmten Gleichgewicht gerät, zu stark oder zu schwach reagiert oder sich gegen den eigenen Körper richtet, entstehen sogenannte autoinflammatorische und Autoimmunerkrankungen, entsprechend der beiden Teile des Immunsystems. So ist Autoinflammation eine Überaktivität von Teilen des unspezifischen Immunsystems, dessen Zellen und Signalmoleküle entzündliche Reaktionen auslösen (Ben-Chetrit et al., 2018; McDermott et al., 1999). Bei autoimmunologischen Krankheiten dagegen spielen vor allem Autoantikörper oder autoreaktive T-Zellen eine Rolle, welche sich gegen spezifische, körpereigene Proteine richten. Jedoch kann die Grenze nicht immer klar gezogen werden und die Krankheiten können eher in einem Kontinuum mit den beiden Entitäten als gegenüberstehende Pole gesehen werden (reviewed in McGonagle and McDermott, 2006; Ben-Chetrit et al., 2018; Savic et al., 2020).

1.2. Dendritische Zellen

DCs kommen in fast allen Geweben vor und sind die potentesten APCs. Sie haben die einzigartige Fähigkeit primäre Immunantworten zu initiieren und zu erhalten. Sie stehen damit an der Schnittstelle zwischen angeborener und erworbener Immunität und spielen eine zentrale Rolle in der Vermittlung und Aufrechterhaltung von Immunreaktionen und der Kommunikation zwischen unspezifischem und spezifischem Immunsystem. DCs tragen neben MHC-Klasse-I-Molekülen, welche auf allen kernhaltigen Zellen vorkommen, auch MHC-Klasse-II-Moleküle auf ihrer Oberfläche. Diese ermöglichen es ihnen aufgenommene Antigene zu präsentieren und naive T-Zellen zu aktivieren. Daneben exprimieren DCs eine Vielzahl an PRRs. Wenn diese PAMPs oder DAMPs binden oder die DCs anderweitig aktiviert werden, beginnt ein Reifungsprozess mit morphologischen und funktionellen Veränderungen, der durch eine verminderte Antigenaufnahme, verstärkte Antigenpräsentation und T-Zell-Aktivierung charakterisiert ist. Dazu werden MHC-Moleküle und kostimulatorische Oberflächenproteine wie CD80, CD86 oder CD40

Einleitung

hochreguliert, während Proteine zur Antigenaufnahme oder PRRs herunterreguliert werden. Funktionell verlieren die DCs ihre Adhäsionsfähigkeit und werden durch Umbau des Zytoskeletts deutlich mobiler, da sie nun in Lymphknoten einwandern, wo sie auf T-Zellen treffen. Die Chemotaxis wird vor allem durch den Rezeptor CCR7 vermittelt, der auf das Chemokin CCL19 reagiert. Zur Rekrutierung und Aktivierung weiterer Immunzellen schütten sie vermehrt proinflammatorische Zytokine, wie IL-1 oder IL-12, und Chemokine aus (reviewed in Banchereau et al., 2000; Banchereau and Steinman, 1998). Zur Induktion antigenspezifischer T-Zell-Antworten braucht es drei Signale: 1. Bindung eines Antigen-beladenen MHC-Klasse-II-Rezeptors an einen für das Antigen spezifischen T-Zell-Rezeptor; 2. Signale über kostimulatorische Rezeptoren, wie z. B. CD80 und CD86, welche an CD28 binden; 3. Signale über von DCs sekretierte Zytokine (reviewed in Malissen et al., 2014; Banchereau et al., 2000). So kann eine einzelne DC viele T-Zellen aktivieren. Zudem kontrollieren und regulieren DCs die Art der T-Zell-Antwort, indem sie die Differenzierung von naiven T-Lymphozyten in bestimmte Subklassen induzieren, wie z. B. Th1- oder Th2-Zellen (reviewed in Banchereau et al., 2000).

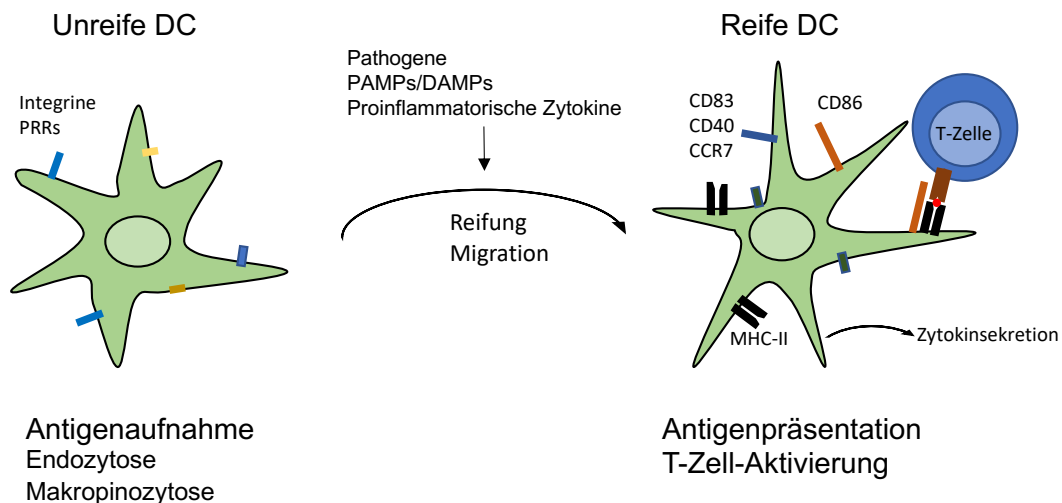


Abbildung 1 Dendritische Zellen. Vereinfachte Darstellung. Unreife DCs nehmen vor allem über Phagozytose, Endozytose und Makropinozytose Antigene aus der Umwelt auf und präsentieren sie. Nach Stimulation durch Pathogene oder Zytokine migrieren die DCs in lymphatische Organe und werden zu reifen DCs mit vermehrter Expression von u. a. MHC-Klasse-II- und kostimulatorischen Molekülen, sowie Sekretion von Zytokinen zur Stimulation naiver T-Zellen

Einleitung

DCs sind eine sehr heterogene Zellart mit diversen Subpopulationen, die unterschiedliche phänotypische und funktionelle Charakteristika und Lokalisationen haben (Enk et al., 1993; Steinbrink et al., 1997; Boks et al., 2012; Perry et al., 2014; reviewed in Domogalla et al., 2017). Sie machen etwa ein Prozent der Zellen im Blut aus (PBDCs; peripheral blood dendritic cells) (O'Doherty et al., 1994) und lassen sich in drei Subpopulationen unterteilen: i) plasmazytoide DCs (PDC), ii) CD1c⁺ myeloide DCs (MDC1) und iii) CD141⁺ myeloide DCs (MDC2). Ihnen allen gemeinsam ist die Expression von HLA-DR sowie das Fehlen typischer Marker für T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen und Monozyten (CD3, CD19/CD20, CD56, CD14). Sie unterscheiden sich dagegen in ihrem Rezeptorrepertoire z. B. bei TLRs und in ihrer Funktion (Dzionek et al., 2000; MacDonald et al., 2002; Ziegler-Heitbrock et al., 2010; Autenrieth et al., 2015).

CD123⁺/CD303(BDCA2)⁺/CD304(BDCA4)⁺ PDC reagieren insbesondere auf virale Infektionen, indem sie über TLR7/TLR9 DNA und RNA erkennen. Daraufhin sekretieren sie große Mengen Interferon (IFN), welches weitere Immunzellen für eine entsprechende antivirale Reaktion aktiviert (reviewed in Collin and Bigley, 2018; O'Keeffe et al., 2015; Gilliet et al., 2008). Dass sie auch teils körpereigene DNA erkennen und damit an der Pathogenese von Autoimmunkrankheiten beteiligt sind, konnte z. B. für Systemischen Lupus erythematoses oder Psoriasis gezeigt werden (Lande et al., 2007; Barrat et al., 2005; Means et al., 2005). Es gibt auch Hinweise darauf, dass sie eine Rolle bei Toleranzinduktion und Immunregulation spielen (Ochando et al., 2006).

Myeloide DCs (MDC) exprimieren myeloide Marker wie CD11c, CD11b oder CD33 und lassen sich weiter unterteilen in CD1c(BDCA1)⁺ MDC (MDC1) und CD141(BDCA3)⁺ MDC (MDC2). MDC1 stellen hier die Hauptpopulation dar. Sie exprimieren verschiedene PRRs und sind insbesondere für die Aktivierung von naiven T-Zellen und die entsprechende Modulation der T-Zell-Antwort zuständig (reviewed in Collin and Bigley, 2018; O'Keeffe et al., 2015; Autenrieth et al., 2015). MDC2 dagegen stellen mit < 10 % nur eine sehr kleine Population unter den MDC dar. Sie sind spezialisiert auf die Kreuzpräsentation von Antigenen und die Phagozytose apoptotischer oder nekrotischer Zellen (Bachem et al.,

2010; Jongbloed et al., 2010; reviewed in Autenrieth et al., 2015; Collin and Bigley, 2018).

Da PBDCs nur in sehr geringer Anzahl aus dem Blut isolierbar sind, war die Entdeckung, sie *in vitro* mithilfe von GM-CSF und TNF- α , GM-CSF und IL-4, FLT3 und IL-4 oder CD40L aus Monozyten, CD34⁺ Stammzellen oder Nabelschnurblut generieren zu können, ein wichtiger Meilenstein für die Erforschung der DCs (Caux et al., 1992; Santiago-Schwarz et al., 1992; Romani et al., 1994; Sallusto and Lanzavecchia, 1994; Young et al., 1995; Strunk et al., 1996; Bernhard et al., 1995; Flores-Romo et al., 1997; Brossart et al., 1998).

1.3. Autoinflammatorische Erkrankungen

Autoinflammatorische Erkrankungen sind durch unprovizierte inflammatorische Episoden in Abwesenheit von Autoantikörpern oder autoreaktiven T-Zellen charakterisiert (McDermott et al., 1999). Durch immer neue Erkenntnisse lässt sich die Grenze jedoch nicht mehr immer klar ziehen, sodass sich der Begriff mit der Zeit wiederholt gewandelt hat (reviewed in Savic et al., 2020). Die aktuelle Definition ist folgende:

„Autoinflammatory diseases are clinical disorders caused by defect(s) or dysregulation of the innate immune system, characterised by recurrent or continuous inflammation (elevated acute phase reactants (APR)) and the lack of a primary pathogenic role for the adaptive immune system (autoreactive T-cells or autoantibody production).“ – “Autoinflammatorische Erkrankungen sind Krankheiten, die durch Defekte im oder Fehlregulation des angeborenen Immunsystems entstehen. Sie sind charakterisiert durch wiederkehrende oder chronische Entzündungen (erhöhte Akute Phase Proteine) und keiner primären pathogenen Rolle des adaptiven Immunsystems (autoreaktive T-Zellen oder Autoantikörperproduktion).“ (Ben-Chetrit et al., 2018)

Autoinflammatorische Erkrankungen gehen oft mit einer dysregulierten Inflammasomaktivität oder damit assoziierten Signalwegen einher, aber auch mit zellulärem Stress, IFN- oder Nuclear factor-kappa B (NF- κ B) -Dysregulation und sind klassischerweise durch monogenetische Vererbung oder *de novo* Mutationen bedingt (reviewed in Marino et al., 2020). Typische

Einleitung

autoinflammatorische Erkrankungen sind u. a. das Familiäre Mittelmeerfieber (FMF), das TNF-Rezeptor-assoziierte periodische Syndrom (TRAPS) und das Hyperimmunoglobulinämie-D Syndrom (HIDS) als periodische Fiebersyndrome, sowie das Muckle-Wells Syndrom (MWS), familial cold-induced autoinflammatory syndrome (FCAS) und neonatal onset multisystem inflammatory disease (NOMID). Letztere drei werden unter dem Cryopyrin-assoziierten periodischen Syndrom (CAPS) zusammengefasst. Doch daneben gibt es noch zahlreiche seltene Syndrome (reviewed in Marino et al., 2020; Ben-Chetrit et al., 2018; Martorana et al., 2017).

1.3.1. Das Inflammasom

Ein Inflammasom ist ein zytoplasmatischer Multiproteinkomplex, der eine wichtige Rolle in der Abwehr intrazellulärer Pathogene spielt und durch Pyroptose und die Sekretion von Zytokinen zur Inflammation beiträgt. Es findet sich primär in Zellen des unspezifischen Immunsystems wie Monozyten, Makrophagen, DCs und Neutrophilen (Kummer et al., 2007; Seshadri et al., 2007; Netea et al., 2009; Sharp et al., 2009; Bakele et al., 2014). Zytoplasmatische PRRs wie NLRs (NOD-like receptors), RLRs (retinoic acid-inducible gene I-like receptors), AIM2-like-(absent in Melanoma 2)-Rezeptoren oder Pysin fungieren als Sensoren und erkennen jeweils spezifische PAMPs, DAMPs oder HAMPs. Ihre Aktivierung führt zur Oligomerisierung und Rekrutierung des Adapterproteins ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD) über eine PYD- (Pyrin) oder CARD- (Caspase recruitment) Domäne. Über eine weitere CARD-CARD Interaktion rekrutiert ASC die Cystein-Protease Pro-Caspase-1, worauf deren Autoaktivierung und die Prozessierung von Zielmolekülen folgt. Zielmoleküle sind insbesondere die proinflammatorischen Zytokine Pro-IL-1 β und Pro-IL-18, die nun als IL-1 β und IL-18 sekretiert werden und diverse Immun- und Entzündungsreaktionen anstoßen oder verstärken. Ein zweiter bekannter Effektormechanismus ist die Induktion von Pyroptose über Caspase-1, einer stark entzündlichen Form des programmierten Zelltods (Abbildung 2) (Fink and Cookson, 2006; reviewed in Awad et al., 2018). Am besten charakterisiert ist das NLRP3-Inflammasom. Als

Einleitung

Teil der NLRP-Familie enthält es die dafür typischen PYD-, NOD- (nucleotide-binding oligomerization domain) und LRR- (Leucin-rich-repeat) Domänen (reviewed in Fritz et al., 2006; Tschopp and Schroder, 2010). Signale, auf welche es reagiert, sind z. B. zelluläre Veränderungen durch extrazelluläres ATP, bakterielle Toxine oder Cathepsin B (Mariathasan et al., 2006; reviewed in Schnappauf et al., 2019; de Torre-Minguela et al., 2017).

Ein relativ neues Mitglied der inflammasombildenden Proteine ist Pyrin (Marenostrin, TRIM20). Es enthält eine N-terminale PYD-Domäne, mit welcher ASC rekrutiert werden kann, und eine C-terminale B30.2- (PRY/SPRY) Domäne, welche mit Caspase-1 und NLRP3 interagieren kann (Papin et al., 2007; Chae et al., 2006). Zudem wurde eine Interaktion mit Mikrotubuli und eine Kolokalisation mit Aktin beschrieben (Mansfield et al., 2001; Waite et al., 2009; Van Gorp et al., 2016; Kim et al., 2015; Gao et al., 2016). Xu et al. konnten 2014 als Erste zeigen, dass Pyrin auch als PRR fungiert und Modifikationen und Inaktivierung von RhoGTPasen durch bakterielle Toxine erkennt. Ebenso kann Aktindepolymerisation das Pyrininflammasom aktivieren (Kim et al., 2015). Dadurch ist Pyrin weniger ein direkter Sensor pathogener Strukturen, sondern vielmehr der dadurch hervorgerufenen zellulären Veränderungen. Pyrin liegt im Grundzustand phosphoryliert und an das inhibitorische Protein 14-3-3 gebunden vor. PKN1 und PKN2 (Proteinkinase N) phosphorylieren es an den Serinresten an Position 208 und 242 (Park et al., 2016). PKN1/2 reagieren auf RhoA-Inaktivierung mit verringerter Aktivität, sodass die Hemmung von Pyrin durch Phosphorylierung wegfällt (Gao et al., 2016; Park et al., 2016). Inzwischen wird eine Aktivierung des Pyrininflammasoms in zwei Schritten angenommen: 1. Dephosphorylierung und 2. Interaktion mit Mikrotubuli bzw. dem Zytoskelett (Abbildung 2) (Gao et al., 2016; reviewed in Savic et al., 2020; Awad et al., 2018).

Einleitung

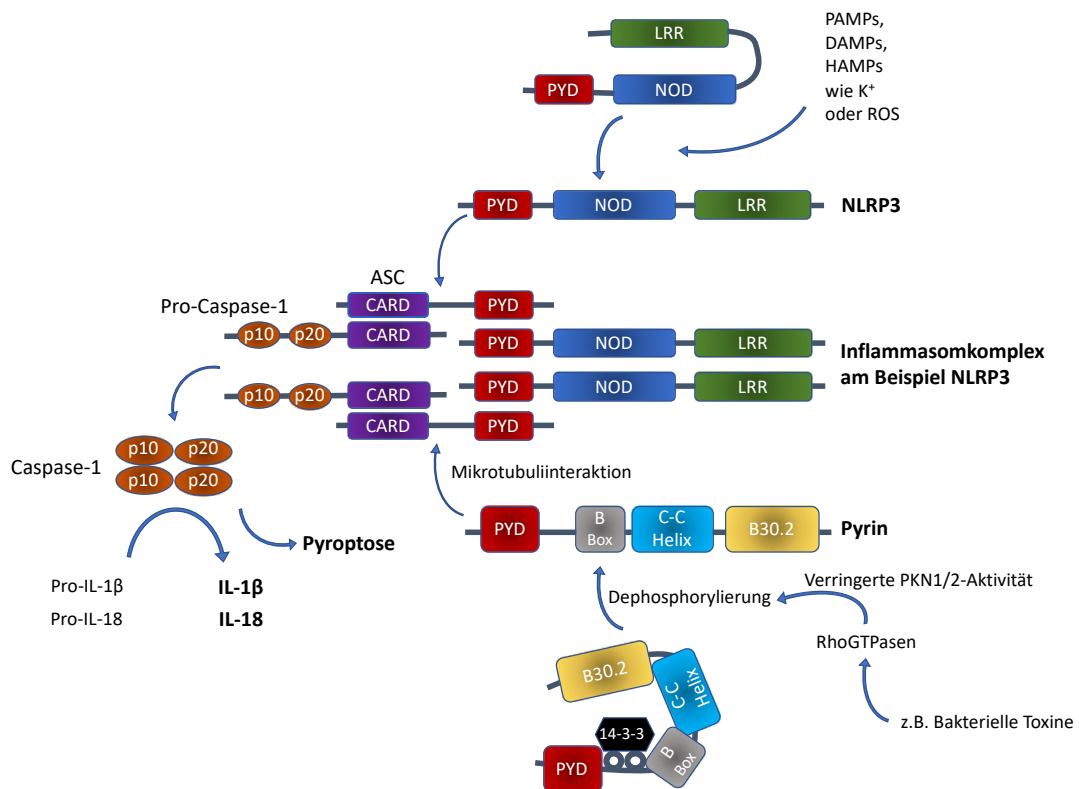


Abbildung 2 NLRP3- und Pyrin-Inflammasom (verändert nach Awad et al., 2018; Gao et al., 2016; Tschopp and Schroder, 2010). NLRP3 oder Pyrin verändern als Reaktion auf spezifische Signale wie PAMPs und DAMPs bzw. Inaktivierung von RhoGTPasen ihre Konformation und können daraufhin oligomerisieren. Im Fall von Pyrin erfolgt dabei eine Dephosphorylierung und Abspaltung des Proteins 14-3-3. Über ihre PYD- (Pyrin) Domäne rekrutieren sie ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD). Pro-Caspase-1 wird über CARD (caspase recruitment domain) gebunden. Nach dessen Autoaktivierung spaltet sie Pro-IL-1 β und Pro-IL-18 in ihre aktive Form und führt zur Pyroptose. LRR (Leucine-rich-repeat), NOD (nucleotide-binding oligomerization domain).

1.3.2. Familiäres Mittelmeerfieber (FMF)

FMF ist die häufigste monogenetische autoinflammatorische Erkrankung. Die Prävalenz unterscheidet sich stark zwischen verschiedenen Ethnien und zeigt die höchsten Werte mit teils mehr als 1 : 1000 bei Populationen aus dem östlichen Mittelmeerraum, insbesondere Arabern, Türken, Armeniern und non-Ashkenazi Juden (Daniels et al., 1995; Ozen et al., 1998; Ben-Chetrit and Touitou, 2009; Sönmez et al., 2016; Özen et al., 2017).

Die Krankheit verläuft typischerweise in wiederkehrenden, selbstlimitierenden, ein bis vier Tagen dauernden Schüben von Fieber und Polyserositiden (z. B. Peritonitis, Synovialitis, Pleuritis) begleitet von Schmerzen und hohen Leveln an Akute-Phase-Proteinen (Sohar et al., 1967; Ben-Chetrit and Levy, 1998). Die

Einleitung

schwerwiegendste mögliche Komplikation stellt die Amyloidose dar. Sie kann insbesondere zu Nierenversagen führen (Tabelle 1).

Bei den meisten Patienten und Patientinnen liegt eine Mutation des Pycinodierenden MEFV-Gens auf Chromosom 16 zugrunde (French FMF Consortium, 1997; International FMF Consortium, 1997; Bernot et al., 1998). Dieses wird besonders in Granulozyten, Monozyten und DCs, sowie synovialen, peritonealen und dermalen Fibroblasten aber nicht in Lymphozyten exprimiert (Diaz et al., 2004; Centola et al., 2000; Matzner et al., 2000). Ursprünglich ging man von einem autosomal-rezessiven Erbgang aus (Rogers et al., 1989; International FMF Consortium, 1997), doch da sich auch manche heterozygote Träger mit einem entsprechenden klinischen Bild präsentiert haben, wird heute zumindest für einige Mutationen ein dominanter Erbgang mit unvollständiger Penetranz oder die Heterozygotie als Prädispositionsfaktor FMF-ähnlicher multifaktorieller Formen diskutiert (Jéru et al., 2013; Marek-Yagel et al., 2009; Procopio et al., 2018). Dementsprechend zeigen auch manche heterozygote Träger ohne klinisches Krankheitsbild subklinisch erhöhte Entzündungswerte (Lachmann et al., 2006). Seitdem MEFV-Mutationen 1997 als zugrunde liegende Ursache identifiziert wurden, sind bis heute bereits 389 Sequenzvarianten beschrieben worden, jedoch teils mit unterschiedlicher oder unbekannter klinischer Relevanz (Infefers: an online database for autoinflammatory mutations. Available at <https://infefers.umai-montpellier.fr/> together with the following references: Milhavet et al., 2008; Sarrauste de Menthère et al., 2003; Touitou et al., 2004; Van Gijn et al., 2018, Stand 16.03.2022). 2012 wurde der Konsensus erlangt bei klinischem Verdacht auf 14 MEFV-Sequenzvarianten zu testen (Shinar et al., 2012). Darunter sind die 9 eindeutig pathogenen Mutationen (M694V, M694I, M680I, V726A, R761H, A744S, I692del, E167D, T267I), sowie fünf mit unklarer Signifikanz (Özen et al., 2017). Insbesondere die am häufigsten vorkommende M694V-Mutation wird mit einem früheren Beginn und schwerem Verlauf in Verbindung gebracht (Dewalle et al., 1998) (Tabelle 1). Trotz der Möglichkeit der Genanalyse bleibt FMF eine klinische Diagnose, da ein negativer Mutationsstatus die Krankheit nicht ausschließt (Gattorno et al., 2019).

Einleitung

Das MEFV-Gen codiert für das Protein Pyrin, welches einen eigenen Inflammasom-Komplex bilden kann (siehe 1.3.1) (Yu et al., 2006; Xu et al., 2014; Chae et al., 2011). Bei FMF-Mutationen scheint eine verringerte Phosphorylierung und damit weniger Inhibition von Pyrin vorzuliegen (Park et al., 2016). Mutationen könnten auch in anderer Weise das Binden des inhibitorischen Proteins 14-3-3 oder die Phosphorylierung durch PKN1/2 behindern. Auch eine Störung der Autoinhibition von Pyrin wurde postuliert, indem sich dessen Sekundärstruktur verändert (reviewed in Schnappauf et al., 2019). Eine Arbeit von Van Gorp et al., 2016 zeigte, dass Pyrin-Mutationen, welche hauptsächlich in der C-terminalen B30.2-Domäne liegen, es unabhängig von Mikrotubuli machen, während andere Autoren die Bildung des Pyrininflammasoms mit Colchicin unabhängig von der Dephosphorylierung verhindern konnten (Gao et al., 2016). Magnotti et al., 2019 konnten letzteres bestätigen und hinzufügen, dass die Dephosphorylierung ausreichend war, bei FMF-Patienten und Patientinnen das Pyrininflammasom zu aktivieren. Letztlich führte dies über Caspase-1 zu einer IL-1 β -Sekretion und einer Entzündungsreaktion (Chae et al., 2011; Magnotti et al., 2019). Eine weitere Arbeit zeigte, dass mutiertes Pyrin selbst durch Caspase-1 vermehrt gespalten wird und dadurch den Transkriptionsfaktor NF- κ B aktiviert (Chae et al., 2008).

Die Standardtherapie für FMF ist seit 1972 die Einnahme von Colchicin. Sie verringert effektiv die Frequenz der Attacken, unterdrückt die chronische subklinische Inflammation und reduziert das Amyloidoserisiko (Goldfinger, 1972; Ozen et al., 2016). Colchicin ist durch seine Wirkung auf die Mikrotubulihomöostase als Spindelgift bekannt und so wurde eine Verbindung zur Zytoskelettorganisation angenommen, da auch eine Kolo-kalisation von Pyrin und dem Zytoskelett gezeigt werden konnte (Mansfield et al., 2001). Zudem legt eine Arbeit von Park et al., 2016 nahe, dass Colchicin über RhoA zu einer verringerten IL-1 β -Sekretion führt. Untersuchungen von Van Gorp et al., 2016 dagegen zeigten, dass die FMF-Mutation M694V die Abhängigkeit des Pyrininflammasoms von Mikrotubuli aufhob und es damit unabhängig von Colchicin machte. Die Autoren gingen daher davon aus, dass es seine Wirkung vor allem durch die Inhibition von Migration und Phagozytose entfaltet.

Therapeutische Alternativen bei Colchicinresistenz oder -intoleranz stellen Anti-IL-1-Therapien mit dem IL-1-Rezeptor-Antagonisten Anakinra oder den IL-1-Inhibitoren Canakinumab und Rilonacept dar (Ben-Zvi and Livneh, 2014; Gül et al., 2015; Ozen et al., 2016; Özen et al., 2017; van der Hilst et al., 2016). In akuten Attacken können NSAIDs (Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs) oder gegebenenfalls Kortikosteroide zur Symptomlinderung gegeben werden (Ozen et al., 2016).

1.3.3. Muckle-Wells Syndrom (MWS)

Das MWS, ebenfalls eine seltene autoinflammatorische Erkrankung, zählt zum Cryopyrin-assoziierten periodischen Syndrom (CAPS, Prävalenz 1 - 3 : 1.000.000 (Lachmann, 2017)). Dies umfasst ein Spektrum dreier Krankheiten unterschiedlichen Schweregrades, die durch autosomal dominant vererbte oder *de novo* Mutationen im NLRP3-(CIAS1/NALP3/PYPAF1/CLR1.1)-Gen auf Chromosom 1 verursacht werden (Tabelle 1) (Hoffman et al., 2000; Hoffman et al., 2001; Aksentijevich et al., 2002). Das MWS wurde erstmals 1962 in einer Familie mit Urtikaria, Taubheit und Amyloidose beschrieben (Muckle and Wells, 1962). Typische klinische Manifestationen sind Fieber, Fatigue, meist Urtikaria-ähnlicher Hautausschlag, Arthralgien, Konjunktivitis und Episkleritis, welche episodisch wiederkehrend oder chronisch auftreten und bereits im Kindesalter beginnen. Folgen der übermäßigen Inflammation sind Amyloidose und progressive sensorineurale Taubheit (Tabelle 1), aber auch Einschränkungen der Sehkraft. (Levy et al., 2015; Kuemmerle-Deschner, 2015). Die milde Form, familial cold autoinflammatory syndrome (FCAS) hat typischerweise Kälte als Triggerfaktor für Urtikaria und Fieber, aber auch Arthralgien und Konjunktivitis. Neonatal onset multisystem inflammatory disorder (NOMID)/chronic infantile neurologic, cutaneous and articular syndrome (CINCA) stellt die schwerste Form dar, manifestiert sich bereits sehr früh und kann durch Mitbeteiligung des Nervensystems oder der Gelenke zu Entwicklungsstörungen oder Deformitäten der Knochen führen. CRP und SAA sind typischerweise erhöht, auch zwischen inflammatorischen Exazerbationen

(Levy et al., 2015; reviewed in Marino et al., 2020; Kuemmerle-Deschner, 2015).

Vom NLRP3-Gen sind bisher 254 Sequenzvarianten bekannt, wovon 115 als pathogen oder wahrscheinlich pathogen eingestuft werden. Die (pathogenen) Mutationen liegen vor allem in Exon 3 (Infevers: an online database for autoinflammatory mutations. Available at <https://infevers.umai-montpellier.fr/> together with the following references: Milhavel et al., 2008; Touitou et al., 2004; Van Gijn et al., 2018; Sarrauste de Menthière et al., 2003; Stand 16.03.2022). Es zeigt sich eine gewisse variable Penetranz und doch eine enge Genotyp-Phänotyp-Korrelation. T348M und D303N sowie seltene Mutationen sind z. B. mit einem schwereren Verlauf assoziiert. Bei E311K kommt Taubheit vermehrt vor (Levy et al., 2015).

Das NLRP3-Gen codiert für das Protein NLRP3 (NALP3, Cryopyrin), welches einen intrazellulären PRR aus der Familie der NLRs darstellt. Bei Aktivierung durch DAMPs oder PAMPs bildet es das NLRP3-Inflammasom und führt so über Caspase-1 zur vermehrten Sekretion von IL-1 β . Bei CAPS-Patienten und Patientinnen ist das NLRP3-Inflammasom über eine gain-of-function Mutation überaktiv (Tschopp et al., 2003; Agostini et al., 2004; Lachmann et al., 2009b). Die Erkrankung ist somit eine typische Inflammasomopathie. Durch diesen Pathomechanismus ist auch die gute therapeutische Wirkung von IL-1-Antagonisten/Inhibitoren wie Anakinra, Canakinumab und Rilonacept zu erklären. Sie stellen die Standardtherapie (Tabelle 1) dar und können die Entzündungsreaktion sowie Langzeitfolgen reduzieren (Kullenberg et al., 2016; Lachmann et al., 2009a; Hoffman et al., 2008; Hawkins et al., 2004).

1.3.4. TNF-Rezeptor-assoziiertes periodisches Syndrom (TRAPS)

TRAPS ist eine hereditäre autoinflammatorische Erkrankung, welche durch wiederkehrende, teils bis zu mehreren Wochen dauernden Fieberattacken charakterisiert ist. Diese sind unter anderem oft von Hautausschlägen, Myalgien, Arthralgien oder Bauchschmerzen begleitet. Die periodische Natur der Erkrankung legt auch hier Triggerfaktoren wie z. B. Infektionen, Stress oder Traumata nahe, die die übermäßige Entzündungsreaktion anstoßen

Einleitung

(McDermott et al., 1999). Wie bei anderen autoinflammatorischen Erkrankungen finden sich auch hier erhöhte Werte von SAA, sodass die Amyloidose die bedeutendste Komplikation und Langzeitfolge darstellt. Während einer Attacke sind insbesondere Akute-Phase-Proteine erhöht (Tabelle 1) (Cudrici et al., 2020).

Bei TRAPS handelt es sich um eine autosomal dominant vererbte Erkrankung mit Missense-Mutationen im TNFRSF1A-Gen (TNF-receptor super-family member 1A) auf Chromosom 12, welche zuerst von McDermott et al., 1999 in einer irisch/schottischen Familie beschrieben wurden. Nach der INFEVERS Datenbank sind bis jetzt 181 Sequenzvarianten von TNFRSF1A beschrieben worden. Davon werden 105 als pathogen oder wahrscheinlich pathogen eingestuft (Infevers: an online database for autoinflammatory mutations. Available at <https://infevers.umai-montpellier.fr/> together with the following references: Milhavet et al., 2008; Sarrauste de Menthière et al., 2003; Touitou et al., 2004; Van Gijn et al., 2018; Stand 16.03.2022).

Verschiedene Hypothesen zur Pathogenese von TRAPS wurden aufgestellt. So scheint eine veränderte zelluläre Verteilung des TNF-Rezeptors 1 (TNFR1) eine wesentliche Rolle zu spielen. Durch intrazelluläre Akkumulation und gestörte Autophagie von mutiertem TNFR1 werden inflammatorische Signalwege wie NF- κ B oder IL-1 β -Sekretion aktiviert (Lobito et al., 2006; Bachetti et al., 2013). Auch die Liganden-unabhängige Aktivierung von TNFR1 wurde für bestimmte Mutationen beschrieben (Yousaf et al., 2005). Durch Abspaltung der extrazellulären Domäne des membrangebundenem TNFR1 entsteht löslicher TNFR1 (sTNFR – soluble TNFR1). Dieser fängt im Blut zirkulierenden TNF ab und wirkt dadurch entzündungshemmend. Bei einigen TRAPS-Mutationen konnte eine erniedrigte sTNFR1-Konzentration im Blut nachgewiesen werden, woraus sich die Hypothese der gestörten Abspaltung von sTNFR1 ergab (McDermott et al., 1999). Zytokine, die bei der Pathogenese eine wesentliche Rolle spielen, sind IL-1 β , IL-6, IL-8 oder TNF. Dementsprechend nehmen Biologika einen hohen Stellenwert in der Therapie von TRAPS ein. Der TNF- α -Inhibitor Etanercept zeigte in Studien jedoch nicht immer eine hinreichende therapeutische Effektivität (Cudrici et al., 2020; Cantarini et al., 2010; Aróstegui

et al., 2005). Daneben spielen Anti-IL-1-Therapien mit Anakinra oder Canakinumab, welche effektiv Attacken reduzieren und das Amyloidoserisiko senken können, eine wichtige Rolle (Tabelle 1) (De Benedetti et al., 2018; Gattorno et al., 2008, 2017; Brizi et al., 2012; Simon et al., 2004).

Tabelle 1 Zusammenfassung FMF, MWS und TRAPS

	FMF	MWS	TRAPS
Gen	MEFV	NLRP3	TNFRSF1A
Protein	Pyrin	NLRP3	TNFR1
Genetik	autosomal rezessiv? autosomal dominant?	autosomal dominant	autosomal dominant
Klinik	Fieberschübe (wiederkehrend, Tage) Polyserositis Schmerzen	Fieber Fatigue Hautausschlag Arthralgie Konjunktivitis	Fieberschübe (wiederkehrend, Wochen) Hautausschlag Myalgie Bauchschmerzen
Therapie	Colchicin (Anakinra, Canakinumab)	Anakinra, Canakinumab	Anakinra, Canakinumab Etanercept
Komplikationen	Amyloidose	Amyloidose Taubheit	Amyloidose

1.4. Fragestellung und Zielsetzung dieser Arbeit

DCs sind das zentrale Bindeglied zwischen unspezifischem und spezifischem Immunsystem. Dementsprechend sind sie auch Gegenstand der Forschung zu autoimmunologischen Erkrankungen wie Systemischer Lupus erythematoses (SLE) oder Colitis ulcerosa, wo bereits Veränderungen festgestellt werden konnten (Köller et al., 2004; Scheinecker et al., 2001; Ding et al., 2006; Ikeda et al., 2001; reviewed in Mehling and Beissert, 2003). Ihre Rolle bei der Pathogenese von autoinflammatorischen Erkrankungen ist jedoch weitgehend unbekannt.

Einleitung

In Vorarbeiten für das Promotionsprojekt konnten wir zeigen, dass das MEFV-Gen in DCs, die *in vitro* aus Monozyten gesunder Spender generiert wurden (Mo-DCs), exprimiert wird (pers. Mitteilung PD Dr. Frank Grünebach). Zudem ergaben erste Vorversuche zum Phänotyp von Mo-DCs aus FMF-Patienten und Patientinnen, dass die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86, typische DC-Reifungs-/Aktivierungsmarker, im Vergleich zu gesunden Spendern stark erhöht war.

Ziel der Promotionsarbeit ist daher die weitergehende systematische Untersuchung des Phänotyps, der Zytokinsekretion und der Funktion von Mo-DCs bei den autoinflammatorischen Krankheiten FMF, MWS und TRAPS. Zudem sollen primäre, im Blut der Patienten und Patientinnen vorkommende PBDCs phänotypisch analysiert werden.

Aus den gewonnenen Daten könnten sich neue Aspekte zur und ein besseres Verständnis der Pathogenese ergeben.

Zusammengefasst sind folgende Fragen von Interesse:

- 1) Ist die Frequenz der PBDCs bei Patienten und Patientinnen im Vergleich zu gesunden Probanden und Probandinnen verändert?
- 2) Lassen sich Mo-DCs aus PBMCs der Patienten und Patientinnen generieren?
- 3) Zeigen Mo-DCs der Patienten und Patientinnen einen aktivierten Phänotyp im Sinne einer erhöhten Expression von Aktivierungs- und Reifungsmarkern?
- 4) Sind Aktivierungs- und Reifungsmarker auch auf PBDCs der Patienten und Patientinnen vermehrt exprimiert?
- 5) Zeigen Mo-DCs der Patienten und Patientinnen eine veränderte Funktion im Sinne einer vermehrten Migrationsfähigkeit und einer verstärkten Kapazität T-Zellen zu stimulieren als Zeichen einer intrinsischen Aktivierung?
- 6) Lassen sich in Mo-DC-Zellkulturüberständen von Patienten und Patientinnen vermehrt proinflammatorische Zytokine nachweisen?
- 7) Korrelieren die experimentellen Daten mit dem Vorhandensein der häufigsten FMF-Mutation M694V?

2. Material

2.1. Geräte

Tabelle 2 Geräte

Gerät	Hersteller
Freezer -20 °C	Liebherr, Biberach an der Riss
Freezer -80 °C	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Gammacell 1000 elite Cäsium-Strahlungsquelle	MDS Nordion, Bucks, Großbritannien (inzw.: Best Theratronics, Ottawa, Kanada)
Gefrierbehälter (Nalgene® Cryo 1 °C Freezing Container)	Sigma Aldrich/Merck, Taufkirchen
Inkubator APT.line C150 (E2) CO ₂ Incubator	Binder GmbH, Tuttlingen
Inkubator Sanyo CO ₂ Incubator	Marshall Scientific, Hampton, NH, USA
Mikroskop Axiovert 25 CFL	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Neubauer Zählkammer 0,100 mm, 0,0025 mm ²	Bioanalytic GmbH, Umkirch
Pipetboy	INTEGRA Biosciences GmbH, Biebertal
Pipetboy, Accu-jet	Brand, Wertheim
Pipetten 2 µl, 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Sterilbank HeraSafe	Heraeus Instruments, Hanau
Vacunsafe Comfort	IBS INTEGRA Biosciences GmbH, Biebertal
Vortex Minishaker MS1	IKA Labortechnik, Staufen

Material

Wasserbad No 1083	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel
Zentrifuge 5804R	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge Heraeus Fresco 17	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Zentrifuge Megafuge 3.0 R	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Multifuge 3 S-R	Heraeus, Hanau
Zytometer FACSCalibur	BD Biosciences, Heidelberg
Zytometer LSR Fortessa	BD Biosciences, Heidelberg

2.2. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
Cell Culture Insert, Transparent	Corning, Kaiserslautern
PET Membrane, 24 Well, 8,0 µm pore size	
Cellstar® 96 well Platte, flat bottom	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Combitips plus 2,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Companion Platte, 24-well	Corning, Kaiserslautern
Costar® Stripette, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 30 ml	Corning, Kaiserslautern
Falcon® Rundbodenröhrchen 5 ml	Corning, Kaiserslautern
Falcon® Rundbodenröhrchen 5 ml steril	Corning, Kaiserslautern
Falcon® Zellkulturflasche 25 cm ²	Corning, Kaiserslautern
Falcon® Zellkulturflasche 75 cm ²	Corning, Kaiserslautern

Material

Falcon® Zellkulturplatte, 6 well, flat bottom	Corning, Kaiserslautern
Falcon® Zentrifugationsröhrchen (50 ml und 15 ml)	Corning, Kaiserslautern
Nunc® CryoTubes®, konischer Boden, Sternenfuß, 1,0 ml, 1,8 ml	Merck KGaA, Darmstadt
Reaktionsgefäße Safe-Lock Tubes 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg
S-Monovette® 7,5 ml Z, Serum mit Gerinnungsaktivator	Sarstedt AG & Co KG, Nümbrecht
S-Monovette® 9 ml AH NH4-Heparin: 16 I.U./ml	Sarstedt AG & Co KG, Nümbrecht
SurPhob SafeSeal LOW BINDING filtered tips sterile 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf

2.3. Medien und Puffer

Tabelle 4 Medien und Puffer

Produkt	Hersteller
X-vivo-20-Medium	Lonza/Biozyme, Hessisch Oldendorf
RPMI-Medium 1640 mit GlutaMAX und HEPES	Gibco/Life technologies/Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Fötiales Kälberserum (FCS)	Gibco/Life technologies/Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Dulbeccos's Phosphate Buffered Saline (PBS) ohne CaCl ₂ und MgCl ₂ (500 ml) D8537	Sigma-Aldrich/Merck, Taufkirchen

Material

Einfriermedium	FCS + 10 % Cryosure DMSO
FACS-Puffer	PBS + 5 % MACS BSA stock solution
RP10-Medium	RPMI-Medium + 10 % FCS + 2 % Penicillin/Streptomycin

2.4. Reagenzien

Tabelle 5 Reagenzien

Material	Hersteller
Biocoll Separating Solution L6115	BioChrom/Merck, Darmstadt
CFDA-SE-Lösung 5 mM	Life Technologies/Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
CryoSure-DMSO >99,9% DMSO, USP Grade	WAK-Chemie Medical GmbH, Steinbach
Formalin solution neutral buffered 10 %	Sigma-Aldrich/Merck, Taufkirchen
IgG from human serum	Sigma-Aldrich/Merck, Taufkirchen
MACS BSA stock solution	Miltenyibiotec, Bergisch Gladbach
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen/Life technologies/Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Pulmozym 2500 E/2,5 ml	Roche, Basel, Schweiz
RBC Lysis Solution	Qiagen, Hilden
Trypanblau	Sigma-Aldrich/Merck, Taufkirchen

Tabelle 6 ELISA Kits

Produkt	Hersteller
Human IL-18 ELISA Kit	MBL/Biozol Diagnostica, Eching

Material

Human IL-1 β /IL1F2 Quantikine ELISA Kit	R&D Systems/Bio-Techne, Wiesbaden
Human Pro-IL-1 β /IL-1F2 Quantikine ELISA Kit	R&D Systems/Bio-Techne, Wiesbaden-Nordenstadt
Human IL-1 α ELISA	BioLegend/Biozol Diagnostica, Eching
Human IL-5 ELISA Set	BD Biosciences, Heidelberg
Human IL-6 ELISA Set	BD Biosciences, Heidelberg
Human IL-10 ELISA Set	BD Biosciences, Heidelberg
Antihuman-IL-13-Antikörper	Pharmingen, San Diego, CA, USA
Human GM-CSF ELISA Set	BD Biosciences, Heidelberg
Human IFN- γ ELISA Set	BD Biosciences, Heidelberg
Human TNF- α ELISA Set	BD Biosciences, Heidelberg
Human TNF- β -Antikörper	BD Biosciences, Heidelberg

2.5. Zytokine

Tabelle 7 Zytokine

Produkt	Hersteller
CCL19/MIP-3 β	R&D Systems/Bio-Techne, Wiesbaden-Nordenstadt
GM-CSF (Sargramostim/Leukine)	Sanofi-Aventis, Bridgewater, NJ, USA
IL-4	R&D Systems/Bio-Techne, Wiesbaden-Nordenstadt
Lipopolysaccharid (LPS)	Sigma Aldrich/Merck, Taufkirchen
Phytohämagglutinin (PHA)	Sigma Aldrich/Merck, Taufkirchen

2.6. Antikörper

Tabelle 8 Antikörper für FACS

Antikörper	Klon	Hersteller
Anti-CCR7-PE	Mouse IgG2a Clone #150503	R&D Systems/Bio-Techne, Wiesbaden-Nordenstadt
Anti-CD1a-FITC	Mouse IgG1, κ Clone HI149	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-CD1c-PE/Dazzle	Mouse IgG1, κ Clone L161	BioLegend/Biozol Diagnostica, Eching
Anti-CD3-BV510	Mouse IgG2a Clone OKT3	BioLegend/Biozol Diagnostica, Eching
Anti-CD4-PE	Mouse IgG1, κ Clone L200	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-CD11c-PE-Cy7	Mouse IgG1, κ Clone Bu15	BioLegend/Biozol Diagnostica, Eching
Anti-CD14-FITC	Mouse IgG2a, κ Clone M5E2	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-CD14-PerCP	Mouse IgG2b, κ Clone M ϕ P9	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-CD16-AF700	Mouse IgG1, κ Clone 3G8	BioLegend/Biozol Diagnostica, Eching
Anti-CD19-BV510	Mouse IgG1, κ Clone HIB19	BioLegend/Biozol Diagnostica, Eching
Anti-CD20-BV510	Mouse IgG2b, κ Clone 2H7	BioLegend/Biozol Diagnostica, Eching
Anti-CD40-APC	Mouse IgG1, κ Clone 5C3	BD Biosciences, Heidelberg

Material

Anti-CD56-BV510	Mouse IgG1, κ Clone HCD56	BioLegend/Biozol Diagnostica, Eching
Anti-CD80-FITC	Mouse IgG1, κ Clone 2D10.4	eBioscience, Frankfurt
Anti-CD83-APC	Mouse IgG1, κ Clone HB15e	eBioscience, Frankfurt
Anti-CD83-PE	Mouse IgG1, κ Clone HB15e	eBioscience, Frankfurt
Anti-CD86-APC	Mouse IgG1, κ Clone 2331	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-CD86-BV421	Mouse IgG1, κ Clone 2331	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-CD141-APC	Mouse IgG1, κ Clone M80	BioLegend/Biozol Diagnostica, Eching
Anti-CD206-FITC	Mouse IgG1, κ Clone 19.2	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-CD209-PerCP	Mouse IgG2b Clone #120507	R&D Systems/Bio-Techne, Wiesbaden-Nordenstadt
Anti-CD303-PerCP- Cy5.5	Mouse IgG2a, κ Clone 201A	BioLegend/Biozol Diagnostica, Eching
Anti-GPNMB-PE	Mouse IgG2b Clone 303822	R&D Systems/Bio-Techne, Wiesbaden-Nordenstadt
Anti-HLA-DR-APC	Mouse IgG2b, κ Clone LN3	eBioscience, Frankfurt
Anti-HLA-DR-BV650	Mouse IgG2a, κ Clone L243	BioLegend/Biozol Diagnostica, Eching

Material

IgG1 isotype-APC	Mouse IgG1, κ Clone # 11711	R&D Systems/Bio-Techne, Wiesbaden-Nordenstadt
IgG1 isotype-FITC	Mouse IgG1, κ Clone X40	BD Biosciences, Heidelberg
IgG1 isotype-PE	Mouse IgG1, κ Clone P3.6.2.8.1	eBioscience, Frankfurt
IgG2b isotype-PerCP	Mouse IgG2b Clone #133303	R&D Systems/Bio-Techne, Wiesbaden-Nordenstadt
Zombie Aqua		BioLegend/Biozol Diagnostica, Eching

2.7. Software

Tabelle 9 Software

Produkt	Hersteller
Cell Quest Pro	BD Biosciences, Heidelberg
Flow Jo software version 10	TreeStar, FlowJo LCC, Ashland, OR, USA
FACSDiva Software	BD Biosciences, Heidelberg
GraphPad Prism Version 8.1.0	GraphPad Software, La Jolla, CA, USA
Mendeley	Mendeley Ltd., NY, USA
Microsoft Exel 2010	Microsoft, Redmond, WA, USA

3. Methoden

3.1. Patienten und Patientinnen und Kontrollpersonen

Nach schriftlichem und informiertem Einverständnis wurden Blutproben von Patienten und Patientinnen und gesunden, freiwilligen Kontrollpersonen am Universitätsklinikum Tübingen abgenommen. Die Studie wurde vom Ethikkomitee der medizinischen Fakultät der Eberhard-Karls-Universität Tübingen und des Universitätsklinikums Tübingen (111/2017BO2 vom 13.03.2017) als mit den ethischen Standards und der Helsinki Deklaration übereinstimmend zugelassen.

Die Patienten und Patientinnen wurden im Rahmen von regulären Kontrollterminen in der Rheumatologischen Ambulanz des Universitätsklinikums Tübingen rekrutiert und das Blut im Rahmen einer regulären Blutentnahme abgenommen. Einschlusskriterium war eine diagnostizierte FMF- (nach den Tel Hashomer Kriterien), MWS- oder TRAPS- Erkrankung. Ausschlusskriterien waren ein Alter von unter 18 Jahren, eine eingeschränkte Einwilligungsfähigkeit, das Vorliegen einer weiteren Erkrankung des autoinflammatorischen und rheumatologischen Spektrums sowie die Ablehnung der Teilnahme an der Studie. Bei den gesunden Probanden und Probandinnen wurde darauf geachtet, dass keine akute Infektion wie z. B. eine Erkältung vorlag. Für einen Teil der Kontrollen und zur Isolierung von PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) der Proliferationsversuche wurden ausschließlich anonymisierte Buffy Coats verwendet, welche vom Zentrum für klinische Transfusionsmedizin Tübingen bezogen wurden.

3.2. Zellkultur

3.2.1. Isolation von PBMCs aus peripherem Blut über Dichtegradientenzentrifugation

Nach der Blutentnahme von 20 – 50 ml Blut in Heparinmonovetten wurden PBMCs über eine Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Dazu wurde das Vollblut 1 : 2, Buffy Coats 1 : 4 mit PBS verdünnt und damit Biocoll-Trennlösung (Dichte 1,077 g/ml) vorsichtig überschichtet. Danach wurden die Proben bei

Methoden

Raumtemperatur 20 min bei 650 g ohne Bremse zentrifugiert. Biocoll trennt dabei die Blutzellen anhand der Dichte in verschiedene Populationen auf. Während PBMCs eine höhere Dichte als Biocoll haben, sinken Erythrozyten, Granulozyten und Thrombozyten durch ihre geringere Dichte nach unten. Die über dem Biocoll gelegene weiße Zellschicht mit den PBMCs, welche Lymphozyten, Monozyten und DCs enthalten, wurde vorsichtig abgenommen und zweimal mit PBS gewaschen (400 g, 5 min bei Raumtemperatur). Anschließend erfolgte ein Thrombozytenwaschschritt bei 150 g für 12 min bei Raumtemperatur. Die Zellzahl der so gewonnenen PBMCs wurde in einer Neubauerzählkammer mit Trypanblau (1 : 1) bestimmt und mindestens zwei ganze Quadranten ausgezählt. Zur Bestimmung der absoluten Zellzahl wurde folgende Formel verwendet:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{Zahl der gezählten Quadranten}} * \text{Verdünnungsfaktor} * \text{aufgenommene ml PBS} * 10^4$$

Für die Untersuchung der Subpopulationen wurden 6×10^6 Zellen in FACS-Röhrchen überführt. Der Rest wurde bei 400 g und Raumtemperatur für 5 min zentrifugiert und in 37 °C warmem x-vivo-20-Medium für die Mo-DC-Generierung in entsprechender Konzentration (siehe 3.2.2) eingestellt.

3.2.2. Generierung von Mo-DCs aus plastikadhärenten Monozyten

Um *in vitro* Mo-DCs zu generieren, wird die Eigenschaft von Monozyten genutzt, in der Zellkultur am Plastik adhären zu können und unter dem Einfluss von GM-CSF und IL-4 zu differenzieren.

Dazu wurden die über Dichtegradientenzentrifugation gewonnenen PBMCs wie folgt in x-vivo-20-Medium aufgenommen und je nach Zellzahl auf Flaschen bzw. einzelne wells in 6-well Platten verteilt:

Tabelle 10 Zellzahl in der Zellkultur zur Generierung von Mo-DCs aus PBMCs

	T75-Flasche	T25-Flasche	6-well Platte
Endvolumen pro Flasche/well	10 ml	5 ml	3 ml
Zellzahl	ca. 3,5 - 13 x 10 ⁷	ca. 1,5 - 3,5 x10 ⁷	< 1,5 x 10 ⁷

Methoden

Nach 1 - 2 h Adhärenz bei 37 °C und 5 % CO₂ im Zellkultur-Inkubator wurden die nicht adhärenen Zellen, hauptsächlich Lymphozyten, abgewaschen. Die adhärenen Monozyten wurden in RP10-Medium mit IL-4 (20 ng/ml) und GM-CSF (100 ng/ml) für 7 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Differenzierung zu Mo-DCs wurde durch erneute Zugabe von IL-4 (20 ng/ml) und GM-CSF (100 ng/ml) alle zwei bis drei Tage induziert. Um unreife (imMo-DCs) mit reifen DCs (mMo-DCs) vergleichen zu können, wurden zwei Kulturen angesetzt und eine davon an Tag 6, 24 h vor der Ernte, zur Ausreifung von mMo-DCs mit 100 ng/ml LPS stimuliert.

Nach einer Woche wurden die Mo-DCs geerntet. Nach der Zentrifugation bei 400 g und Raumtemperatur für 5 min wurde je 1 ml des Überstands in drei beschriftete 1,5 ml - Reaktionsröhrchen überführt und diese bei -20 °C gelagert. Die Zellkulturflaschen wurden ein weiteres Mal mit PBS gespült und die Zellsuspension erneut zentrifugiert. Anschließend wurden Zellen in PBS aufgenommen und wie in 3.2.1. beschrieben gezählt.

3.2.3. Einfrieren von PBMCs

Um PBMCs einzufrieren wurden sie in einer Konzentration von 1 - 2 x 10⁷/ml Einfriermedium aufgenommen und zügig in Cryoröhrchen überführt. In einem isopropanolgefüllten Gefrierbehälter wurden sie bei -80 °C gleichmäßig mit einer Kühlungsrate von -1 °C/min eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Zum Auftauen wurden die Zellen mit warmem RP10-Medium resuspendiert und in vorgelegtes warmes RP10-Medium überführt. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 400 g und 20 °C für 5 min wurden die Zellen gezählt und erneut mit RP10-Medium gewaschen. Für Versuche mit vitalen Zellen wurden sie zur Regeneration in RP10-Medium mit Zusatz von 3 µg/ml Pulmozym über Nacht mit nicht vollständig geschlossenem Drehverschluss in den Brutschrank gestellt (5 - 10 x 10⁶ Zellen/ml). Danach wurden sie erneut gewaschen, gezählt und entsprechend ihrer Verwendung in Medium aufgenommen.

3.3. Phänotypisierung von Zellen

Um die Expression von Oberflächenmolekülen der Zellen zu untersuchen werden spezifische mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelte Antikörper verwendet. Die so markierten Zellen lassen sich durch Durchflusszytometrie (FACS) untersuchen. Dabei passieren die Zellen jeweils einzeln einen Laserstrahl, welcher die Fluoreszenzfarbstoffe spezifisch anregt. Die emittierten Fluoreszenzen werden über ein optisch-elektronisches System registriert. Aus diesen Daten lassen sich über die Expression bestimmter Oberflächenmarker definierte Zelltypen identifizieren und/oder phänotypisch charakterisieren.

3.3.1. Färbung und FACS-Messung von PBMCs für DC-Subpopulationsanalysen

Die nach der PBMC-Isolation abgenommenen Zellen wurden in FACS-Röhrchen zunächst zum Blocken unspezifischer Bindungen der Antikörper an die Fc-Rezeptoren der Zellen mit 1 ml humanem IgG (0,01 mg/ml) für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen nach Zugabe von FACS-Puffer zentrifugiert (5 min, 400 g, Raumtemperatur) und der Überstand verworfen. Die Färbung mit fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörpern gegen CD1c-PE-Dazzle, CD3-BV510, CD11c-PE-Cy7, CD14-FITC, CD16-AF700, CD19-BV510, CD20-BV510, CD56-BV510, CD141-APC, CD303-PerCP-Cy5.5, HLA-DR-BV650 sowie Zombie Aqua (siehe Tabelle 8) erfolgte für 20 min bei 4 °C. Nach einem Waschschrift (5 min, 400 g, 4 °C) wurden die Zellen in FACS-Puffer aufgenommen und an einem LSR II Fortessa Durchflusszytometer mit FACSDiva-Software analysiert und mit FlowJo ausgewertet. Zur Bestimmung der PBDC-Subpopulationen wurde eine hierarchische Gating-Strategie angewandt beginnend mit einem Singlet-Gate zum Ausschluss von Dubletten, gefolgt von einem Leukozyten-Gate basierend auf FSC (forward-scatter) und SSC (side-scatter) Charakteristika. Anschließend wurden lineage-positive Zellen auf CD3, CD19, CD20 und CD56 sowie tote Zellen ausgeschlossen (lin⁻/live Population). Über CD14 und CD16 wurden im nächsten Schritt Monozyten ausgeschlossen. Die CD14⁻/CD16⁻ sowie HLA-DR⁺ Zellen wurden als PBDCs und ihre Subpopulationen als CD303⁺/CD11c⁻ PDC,

Methoden

CD11c⁺/CD1c⁺/CD141⁻ MDC1 sowie CD11c⁺/CD141⁺ MDC2 definiert (Abbildung 3).

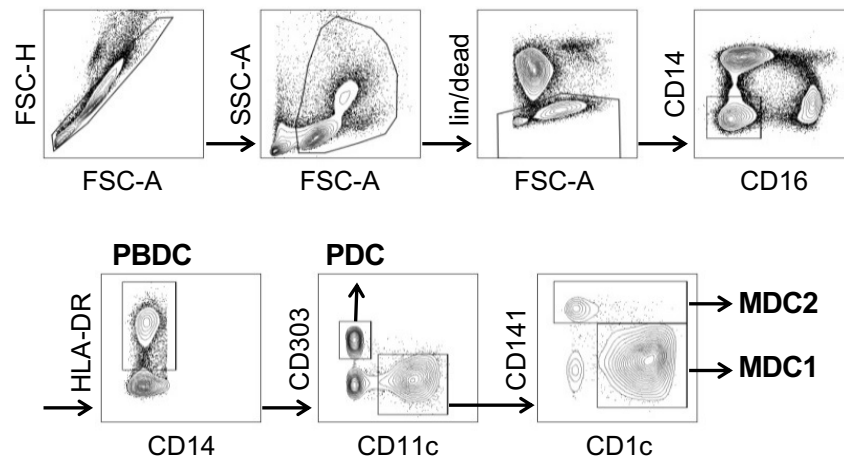


Abbildung 3 FACS-Gating-Strategie für DC-Subpopulationen im peripheren Blut. Zuerst erfolgte der Ausschluss von Zell-Dubletten, dann wurden über FSC und SSC die Leukozyten identifiziert. Aus ihnen wurden lineage-positive und tote Zellen sowie CD14⁺ und CD16⁺ Zellen ausgeschlossen. Davon wurden die HLA-DR⁺ Zellen als PBDCs definiert. Diese lassen sich in CD303⁺/CD11c⁻ PDC, CD11c⁺/CD1c⁺/CD141⁻ MDC1 und CD11c⁺/CD141⁺ MDC2 unterteilen.

3.3.2. Färbung und FACS-Messung von Aktivierungs- und Reifungsmarkern auf primären PBDCs

Die Analyse von Aktivierungs- und Reifungsmarkern auf primären PBDCs verlief analog zur Analyse der Subpopulationen mit PBMCs und fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörpern gegen CD3-BV510, CD11c-PE-Cy7, CD14-FITC, CD16-AF700, CD19-BV510, CD20-BV510, CD56-BV510, CD83-APC, CD86-BV421, CD303-PerCP-Cy5.5, HLA-DR-BV650 sowie Zombie Aqua (siehe Tabelle 8). Die gefärbten Zellen wurden an einem LSR II Fortessa Durchflusszytometer mit FACSDiva-Software analysiert und mit FlowJo ausgewertet. Bis hin zur Definition von PBDCs wurde dieselbe Gating-Strategie angewandt wie in 3.3.1. Daraufhin wurden CD83- und CD86-positive Zellen bestimmt. Die Grenze zwischen positiven und negativen Zellen wurde so gelegt, dass 99 % einer FMO (fluorescence minus one) Kontrolle in der negativen Population liegen. Die mediane Fluoreszenzintensität (MFI) der positiven Population zeigte die Expression an (Abbildung 4).

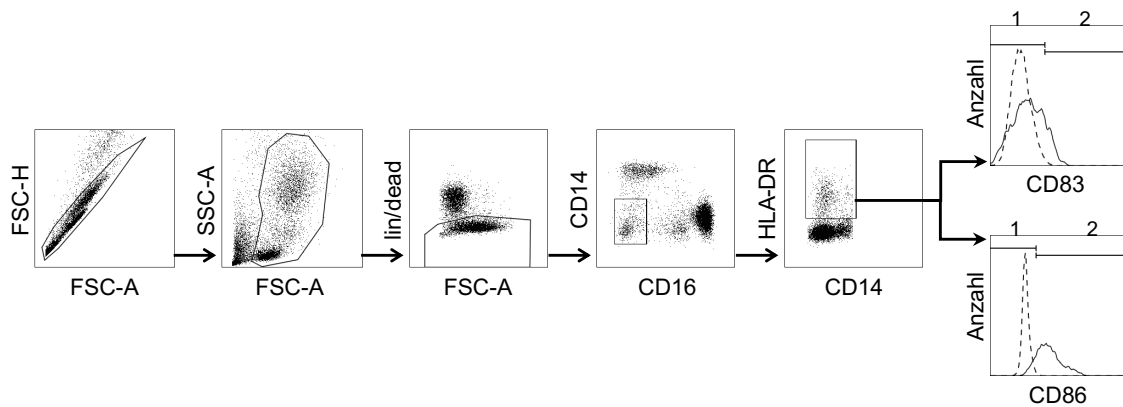


Abbildung 4 Exemplarische Darstellung der FACS-Gating-Strategie zur Identifizierung der CD83- und CD86-Expression auf PBDCs. Die Histogramme zeigen die FMO-Kontrolle (gestrichelte Linie) sowie eine Messprobe (durchgezogene Linie). Nach dem Ausschluss von Zell-Dubletten wurden die Leukozyten im SSC- und FSC-Gate identifiziert. Lebende, lineage⁺, CD14⁻ und CD16⁻ sowie HLA-DR⁺ Zellen wurden als PBDCs definiert und ihre Expression von CD86 und CD83 im Histogramm bestimmt. Zuvor wurde das Gate so gelegt, dass 99 % der FMO-Kontrolle im negativen Gate (Gate 1) lagen. Der MFI der Zellen in Gate 2 wurde verglichen.

3.3.3. Färbung und FACS-Messung von Oberflächenmarkern auf Mo-DCs

Zur phänotypischen Charakterisierung der Mo-DCs wurden die Zellen zunächst mit FcR-blocking-Reagenz für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu verhindern. Nach einem Waschgang mit FACS-Puffer (5 min, 400 g, Raumtemperatur) wurden die Zellen mit fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörpern und entsprechenden IgG-Isotyp-Kontrollen in FACS-Puffer gefärbt. Folgende Antikörper wurden verwendet: FITC-gekoppelte IgG1, anti-CD1a, anti-CD206 und anti-CD80, PE-gekoppelte IgG1, anti-CD83, anti-GPNMB und anti-CCR7, PerCP-gekoppelte IgG2b, anti-CD209 und anti-CD14 sowie APC-gekoppelte IgG1, anti-HLA-DR, anti-CD86 und anti-CD40. Die Zellen wurden mit einem FACS Calibur Durchflusszytometer und Cell Quest Pro Software analysiert und mit FlowJo weiter ausgewertet. Spezifische Fluoreszenz Indizes (SFI) wurden über die mediane Fluoreszenz der spezifischen Antikörper dividiert durch jene der entsprechenden Isotypkontrolle berechnet.

3.4. Analyse der Funktion der Mo-DCs

3.4.1. Messung der Migrationsfähigkeit von Mo-DCs in Transwell-Migrations-Assays

Dieser Assay wurde in 24-well-Platten mit eingehängten Transwell-Einsätzen mit einer Porengröße von 8 μm angesetzt. In der unteren Kammer wurde RP10-Medium mit oder ohne 100 ng/ml CCL19/MIP-3 β (Makrophage Inflammatory Protein 3 Beta) vorgelegt. Das Chemokin CCL19 wirkt stark chemotaktisch auf DCs. Die Mo-DCs wurden in einer Konzentration von 2×10^5 Zellen/ml/well ebenfalls in RP10-Medium in die Transwells gegeben und bei 37 °C und 5 % CO₂ für 16 h inkubiert. Die in die untere Kammer migrierten Zellen wurden in FACS-Röhrchen überführt, bei 400 g 5 min zentrifugiert und in 200 μl FACS-Puffer aufgenommen. Die Zellen wurden mit einem FACS Calibur Durchflusszytometer und Cell Quest Pro Software für 1 min bei 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ Durchflussrate gezählt. Jede Bedingung wurde in Triplikaten angesetzt. Die Ergebnisse wurden mit GraphPad Prism auf die imMo-DCs ohne CCL19 (entspricht 1) normalisiert.

3.4.2. CFSE-Proliferations-Assay

Um die Mo-DCs auf ihre Fähigkeit T-Zellen zur Proliferation anzuregen zu testen, wurden sie als Stimulatoren zuerst durch γ -Strahlung mit 30 Gy und 100 % inaktiviert. Anschließend wurden 2×10^4 Zellen/well zusammen mit 2×10^5 CFSE-gefärbten allogenen PBMCs/well in 96-well-Platten mit flachem Boden ausgesät. Die PBMCs stammten von Buffy Coats gesunder freiwilliger Spender, enthalten die proliferationsfähigen Responder-Zellen und wurden bei einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml mit 0,5 $\mu\text{l}/\text{ml}$ 5 mM CFDA-SE gefärbt. Intrazellulär wird der Diacetat-Rest des CFDA-SE abgespalten und es bleibt CFSE. Als Negativ-Kontrollen dienten CFSE-gefärbte PBMCs, während für Positiv-Kontrollen zu den CFSE-gefärbten PBMCs 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PHA (Phytohämagglutinin) als starker Proliferationsstimulator hinzugegeben wurde. Alle Bedingungen wurden in Triplikaten angesetzt. Nach 6 Tagen der Kokultur bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden die Zellen an einem FACS Calibur

Durchflusszytometer mit Cell Quest Pro Software analysiert. Proliferation ließ sich anhand der Dilution des CFSE-Farbstoffes bei jeder neuen Zellgeneration detektieren, während eine anti-CD4-PE-Färbung eine Identifizierung von CD4⁺ T-Zellen erlaubte. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden alle Ergebnisse der Probanden und Probandinnen auf ihre jeweiligen positiven und negativen Kontrollen normiert. Dazu wurde in GraphPad Prism die negative Kontrolle als „0 %“ und die positive Kontrolle als „100 %“ festgelegt („normalize function“).

3.5. Proteinanalysen

3.5.1. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

ELISAs dienen der Detektion von Proteinen über spezifische Antikörper und Chemolumineszenz und erlauben eine Konzentrationsbestimmung. Die ELISAs wurden entsprechend ihren Herstellerprotokollen durchgeführt. Standards und Waschpuffer wurden entsprechend des Protokolls vorbereitet und verdünnt. Standard und Überstände wurden jeweils in die 96-well-Platten pipettiert und 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Der Überstand wurde verworfen und die wells viermal mit Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde mit dem entsprechenden Antikörper-Konjugat 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und danach wieder viermal mit Waschpuffer gewaschen. Die Inkubation mit Substratlösung (1 : 1 Reagenz A und B) erfolgte im Dunkeln bei Raumtemperatur und nach 20 - 30 min wurde die Stopp-Lösung hinzugegeben. Die Messung fand innerhalb von 30 min mit einem Microplatereader bei 450 nm statt.

3.6. Statistische Analysen

Statistische Analysen wurden mit GraphPad Prism[®] durchgeführt. Wenn nicht anders angegeben sind Mediane mit Interquartilrange dargestellt, da nicht immer eine Normalverteilung vorlag. Für Vergleiche von Patienten und Patientinnen mit Kontrollen wurde der Mann-Whitney-U-Test für ungepaarte, nicht-parametrische Werte verwendet. Der Wilcoxon-Test fand bei gepaarten, nicht-parametrischen Werten Anwendung, wenn unreife mit reifen Mo-DCs derselben Probanden bzw. Probandinnen verglichen wurden. Ein p-Wert kleiner

Methoden

0,05 wurde als signifikant definiert und mit „*“, ein p-Wert kleiner 0,01 mit „**“ und einer kleiner 0,001 mit „***“ gekennzeichnet.

4. Ergebnisse

4.1. Patientenkollektiv und -charakteristika

Die Patienten und Patientinnen wurden von April 2017 bis März 2020 (FMF) bzw. Februar 2019 (MWS) in der Rheumatologischen Ambulanz des Universitätsklinikums Tübingen rekrutiert. Dabei konnten nach Ein- und Ausschlusskriterien 31 FMF-Patienten und Patientinnen (nach den Tel Hashomer Kriterien), acht MWS-Patienten und Patientinnen und eine TRAPS-Patientin in die Studie eingeschlossen werden. Detaillierte Patientencharakteristika der FMF-Patienten und Patientinnen sind in Tabelle 11 aufgeführt. Die Patienten und Patientinnen 1 bis 25 sind in Funk et al., 2020 eingeschlossen. Bei den Patienten und Patientinnen 21 bis 25 wurde nur die CD83- und CD86-Expression auf PBDCs untersucht. Patienten und Patientinnen mit Sternchen (UPN Nr. 26 bis 30) wurden aufgrund der Einnahme von immunsuppressiven Medikamenten als separate Gruppe analysiert.

Die Patienten und Patientinnen gaben zum Zeitpunkt des Ambulanzbesuchs keine Beschwerden an. Zehn von ihnen berichteten über leichte bis mittelschwere Schübe seit der letzten Vorstellung, die anderen befanden sich in Remission mit keinen oder nur leichten Beschwerden im Intervall. Die Analysedaten von Patient Nr. 31 wurden gesondert ausgewertet, da von ihm zwei Blutproben im Abstand von zwei Monaten akquiriert werden konnten, wovon die letztere im akuten Schub mit Krankenhausaufenthalt vor Erhalt der Medikamente wie z. B. Piperacillin/Tazobactam, Tocilizumab und Schmerzmitteln wie Metamizol oder Dipidolor abgenommen wurde. Ein Monat zuvor war bei ihm aufgrund einer vermuteten medikamentös toxischen Panzytopenie die Medikation mit Methotrexat und Tocilizumab abgesetzt worden.

Für die MWS- und TRAPS-Patienten und Patientinnen sind die Patientencharakteristika in Tabelle 12 zusammengefasst. Die TRAPS-Patientin hatte bei einem weiteren Ambulanztermin eine weitere Blutprobe abgegeben. Die daraus entstandenen Daten zum Phänotyp sind als zweite Punkte in den Graphen enthalten. Alle Patienten und Patientinnen hatten zum

Ergebnisse

Vorstellungszeitpunkt keine Beschwerden und befanden sich in kompletter bis weitestgehender Remission.

Die Patienten und Patientinnen wurden bei der statistischen Auswertung der einzelnen Versuche nicht nach spezifischen Charakteristika oder Werten, wie Mutationsstatus oder Krankheitsaktivität gruppiert.

Als Kontrollen dienten 24 gesunde Kontrollpersonen und 19 anonymisierte Buffy Coats. Unter den 24 Kontrollpersonen befanden sich 15 Frauen und 9 Männer im Alter zwischen 22 und 61 Jahren mit einem Alter von 34 als Median bzw. 35 als Mittelwert. Weitere Daten wurden zu ihnen nicht erhoben. Die Kontrollen sind mit den FMF-Patienten und Patientinnen in Funk et al., 2020 veröffentlicht, wurden aber auch als Kontrollen für die Auswertung und Darstellung der erhobenen Daten der nicht in der Publikation eingeschlossenen Patienten und Patientinnen verwendet.

Aufgrund der z. T. niedrigen Leukozytenzahlen im Blut konnten nicht bei jeder Patienten-, Patientinnen- und Kontrollprobe alle Versuche durchgeführt werden, wodurch die unterschiedlichen Zahlen in den Versuchen zustande kamen. Versuche mit mMo-DCs wurden erst ab Patient Nr. 10 begonnen.

Ergebnisse

Tabelle 11 Patientencharakteristika von FMF-Patienten und Patientinnen

UPN	Alter	Geschlecht	Alter bei ED	M694V Mutation	Anderer Mutation	Colchicin [mg/d]	Biologicals und Immunsuppressiva	LEU [1/µl]	LY abs [x1000/µl]	MO abs [x1000/µl]	BSG [mm/1h]	KR [mg/dl]	CRP [mg/dl]	Eisen [µg/dl]	SAA [mg/l]
1	38	M	35	heterozygot	E148Q/-	2	-	9160	3,21	0,45	5	0,7	1,06	39	15
2	31	M	30	heterozygot	-	1,5	-	5720	1,39	0,48	2	0,9	0,20	67	3
3	38	M	32	homozygot	-	1,5	Anakinra	3800	0,95	0,42	16	6,5	0,05	60	2
4	26	M	24	keine	R202Q/-	1	-	5880	1,59	0,64	1	0,7	0,17	135	2
5	35	F	28	keine	E148Q/- S339F/-	1,5	-	8500	2,56	0,62	6	0,4	0,64	85	8
6	42	F	31	keine	-	3	-	5860	1,64	0,37	19	0,6	0,69	47	12
7	47	M	38	n.a.	n.a.	1,5	-	7580	2,27	0,51	2	0,9	0,12	113	3
8	39	F	3	n.a.	n.a.	1,5	Canakinumab	7490	2,44	0,38	7	0,5	0,01	45	3
9	24	F	8	heterozygot	V726A/-	2	Anakinra	7920	3,14	0,46	13	0,9	1,45	67	12
10	26	F	23	heterozygot	E148Q/-	1,5	-	6890	2,26	0,39	4	0,6	0,06	149	-
11	29	M	21	keine	M680I/- V726A/-	1	-	4620	1,71	0,31	1	0,9	0,01	161	2
12	20	F	3	homozygot	-	1	-	10260	2,7	0,37	23	0,7	6,83	62	459
13	22	M	2	homozygot	-	2	Anakinra	5190	1,67	0,42	2	0,6	0,81	112	-
14	35	F	34	keine	E148Q/- R202Q/- P369S/P369S R408Q/R408Q	1	-	6510	1,89	0,38	16	0,5	0,61	59	11
15	33	M	23	n.a.	n.a.	2	-	9100	2,79	0,64	2	1,0	0,69	41	14
16	41	F	34	keine	M680I/M680I	2	-	7590	1,41	0,52	6	0,6	0,03	53	1

Ergebnisse

17	41	M	28	heterozygot	-	1,5	Anakinra	5000	1,91	0,36	4	0,9	0,02	85	2
18	23	F	11	homozygot	-	1,5	-	5990	2,56	0,34	19	0,6	1,54	31	5
19	22	F	4	heterozygot	R761A/-	1,5	Anakinra im Schub	5760	2,05	0,47	41	0,6	3,15	32	121
20	21	F	8	heterozygot	V726A/-	1,5	-	7190	1,92	0,38	32	0,6	2,01	75	7
21	24	M	12	heterozygot	M680I/-	1	-	5860	1,66	0,39	4	1,0	0,35	112	16
22	42	M	13	heterozygot	V726A/-	1	-	6570	2,58	0,51	4	0,8	0,35	82	4
23	19	M	12	keine	E148Q/-	2,5	-	6640	1,82	0,67	29	0,7	2,49	53	140
24	36	F	32	heterozygot	-	2	-	4970	1,59	0,3	11	0,6	1,3	32	16
25	28	F	18	n.a.	n.a.	2	-	7510	2,21	0,56	17	0,7	0,65	67	12
26*	21	F	15	keine	E167D/- V726A/-	1,5	Prednisolon	7470	1,33	0,74	16	0,6	0,27	41	-
27*	29	F	10	homozygot?	R202Q/?	1,5	Methotrexat	5910	2,01	0,25	8	0,6	1,24	72	17
28*	27	F	20	keine	R/Q und P/S in Exon3	-	Azathioprin	5780	1,89	0,69	9	0,6	0,01	52	4
29*	20	F	4	homozygot	-	3	Prednisolon Methotrexat	8570	1,27	0,23	28	0,5	1,12	68	-
30*	38	F	35	homozygot	-	2	Anakinra Prednisolon vor kurzem	13100	2,43	0,86	6	0,7	1,46	67	46
31	48	M	11	homozygot	-	-	Tocilicumab Methotrexat	6350	1,77	0,33	4	1,0	0,01	222	<1
31-S						-	-	14650	1,49	1,06	120	0,9	14,68	-	-

Abkürzungen: M, männlich; F, weiblich; n.a., nicht analysiert; ED, Erstdiagnose; LEU, Leukozyten; LY, Lymphozyten; abs, absolut; MO, Monozyten; BSG, Blutsenkungsgeschwindigkeit; KR, Kreatinin; CRP, C-reaktives Protein; SAA, Serumamyloid A; mg/d, Milligramm pro Tag; mm/1h, Millimeter in einer Stunde; mg/dl, Milligramm pro Deziliter; µg/dl, Mikrogramm pro Deziliter.

Mutationen beziehen sich auf das MEFV-Gen; Teile der Daten wurden bereits veröffentlicht in Funk et al., 2020

Ergebnisse

Tabelle 12 Patientencharakteristika von MWS- und TRAPS-Patienten und Patientinnen

UPN	Alter	Ge- schlecht	Diagnose	Alter bei ED	Genetik	Canakinumab	LEU [1/ μ l]	NEU [x1000/ μ l]	LY [x1000/ μ l]	MO [x1000/ μ l]	BSG [mm/h]	KR [mg/dl]	CRP [mg/dl]	Ferritin [μ g/dl]	SAA [mg/l]
1	46	M	MWS	34	E311K	300mg alle 8 Wochen	4640	2,71	1,53	0,33	9	1	0,16	12	1
2	23	M	MWS	11	E311K	300mg alle 6 Wochen	6270	3,05	2,52	0,53	5	0,8	0,03	20	<1
3	54	F	MWS	47	A439V	300mg alle 8 Wochen zuletzt vor 1 Jahr	4310	2,2	1,55	0,39	17	0,7	0,06	6,9	3
4	50	F	MWS	48	E311K	150mg alle 8 Wochen	5010	2,98	1,6	0,36	4	0,7	0,08	13	3
5	80	M	MWS	71	heterozyot A439V	150mg sehr unregelmäßig	4400	3,16	0,79	0,39	11	1	0,18	43	5
6	57	M	MWS	51	E311K	150mg alle 8 Wochen	9390	6,44	1,89	0,79	13	0,8	0,74	33	5
7	56	M	MWS	41	n.a.	150mg alle 10 Wochen	3770	1,82	1,28	0,41	7	1	0,04	27	1
8	20	M	MWS	12	A439V	300mg alle 8 Wochen	4090	1,75	1,99	0,24	7	0,8	0,20	15	3
9	36	F	TRAPS	28	TNFRSF1A-Gen in Exon 4: Arg zu Glut heterozygot	150mg alle 4 Wochen	5260	3,15	1,67	0,35	11	0,7	0,76	1,8	12
9-2						150mg alle 4 Wochen	5550	2,44	2,42	0,52	11	0,6	0,09	2,4	4

Abkürzungen: MWS, Muckle-Wells Syndrom; TRAPS, TNFR-assoziertes periodisches Syndrom; M, männlich; F, weiblich; n.a., nicht analysiert; ED, Erstdiagnose; LEU, Leukozyten; NEU, Neutrophilie; LY, Lymphozyten; MO, Monozyten; BSG, Blutsenkungsgeschwindigkeit; KR, Kreatinin; CRP, C-reaktives Protein; SAA, Serumamyloid A; mm/1h, Millimeter in einer Stunde; mg/dl, Milligramm pro Deziliter; μ g/dl, Mikrogramm pro Deziliter.

MWS Mutationen beziehen sich auf das NLRP3-Gen

4.2. Generierung von Mo-DCs *in vitro* von Patienten und Patientinnen mit FMF, MWS und TRAPS

Ein etabliertes *In-vitro*-Modell für DCs ist deren Generierung aus Monozyten in Gegenwart von IL-4 und GM-CSF. Unter dem Mikroskop konnten nach siebentägiger Kulturzeit sowohl bei Patienten und Patientinnen als auch bei gesunden Probanden und Probandinnen große, runde Zellen mit einzelnen, für DCs typischen, dendritischen Ausläufern beobachtet werden. Zudem konnte in den FACS-Analysen der typische Verlust der Expression des Monozytenmarkers CD14 und das Vorhandensein des DC-Markers CD1a gezeigt werden (Abbildung 5).

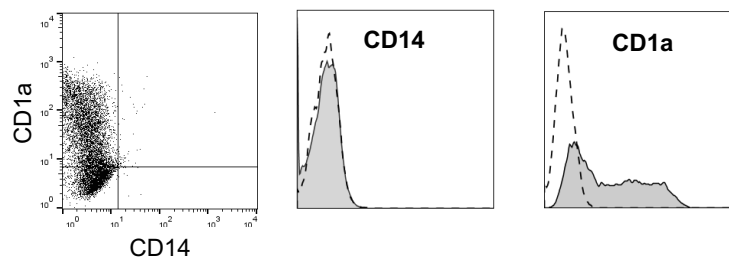


Abbildung 5 Exemplarischer Dotplot und Histogramme von CD14- und CD1a-FACS-Analysen von Mo-DCs. (Isotyp (gestrichelte Linie), Probe (durchgezogene Linie, gefüllt)).

Auch die Rückgewinnungsrate, d. h. die pro Anzahl an eingesetzten PBMCs generierten Mo-DCs, zeigte zwischen FMF-Proben und Kontrollen keine signifikanten Unterschiede (Tabelle 13). Bei vier MWS-Patienten und Patientinnen und der TRAPS-Patientin war die Rückgewinnungsrate im Vergleich zu Kontrollen signifikant verringert. Diese Patienten hatten jedoch im Vergleich zu den FMF-Patienten und Patientinnen im Durchschnitt auch geringere Monozytenzahlen im Blut (Tabelle 11 und Tabelle 12). Bei den Patienten und Patientinnen als Gesamtgruppe zeigte sich eine Korrelation zwischen der Monozytenzahl im Blutbild des Zentrallaborbefunds und der Anzahl der generierten Mo-DCs.

Ergebnisse

Tabelle 13 Rückgewinnungsrate in % (Mo-DCs aus PBMCs). (Mittelwert und Standardabweichung)

	Kontrollen	FMF	MWS/ TRAPS
n=	38	26	5 ¹
Rückgewinnungsrate in %	6,87	6,99	3,48
SD	2,08	2,93	1,31

Als erstes Ergebnis der vorliegenden Arbeit konnte daher konstatiert werden, dass sich die *In-vitro*-Generierung der Mo-DCs nicht zwischen Patienten und Patientinnen und gesunden Probanden und Probandinnen unterschied.

4.3. Frequenzen der PBDC-Subpopulationen bei FMF-, MWS- und TRAPS-Patienten und Patientinnen

Die im peripheren Blut befindlichen DCs (PBDCs) können beim Menschen in drei Subpopulationen unterteilt werden: CD1c⁺ MDC1, CD141⁺ MDC2 und CD303⁺ PDC. Ob Veränderungen in ihrer Anzahl oder ihres Verhältnisses zueinander bei Patienten und Patientinnen mit autoinflammatorischen Erkrankungen vorliegen, sollte mittels FACS-Analysen untersucht werden. Abbildung 6 und Tabelle 14 zeigen, dass zwischen Patienten und Patientinnen mit FMF und gesunden Probanden und Probandinnen im peripheren Blut kein signifikanter Unterschied der DC-Subpopulationen vorlag (Daten wurden zum Teil veröffentlicht in Funk et al., 2020). Dasselbe galt auch für MWS- und TRAPS-Patienten und Patientinnen (Abbildung 6).

¹ Von vier Patienten und Patientinnen wurden die PBMC-Zellzahlen nicht dokumentiert

Ergebnisse

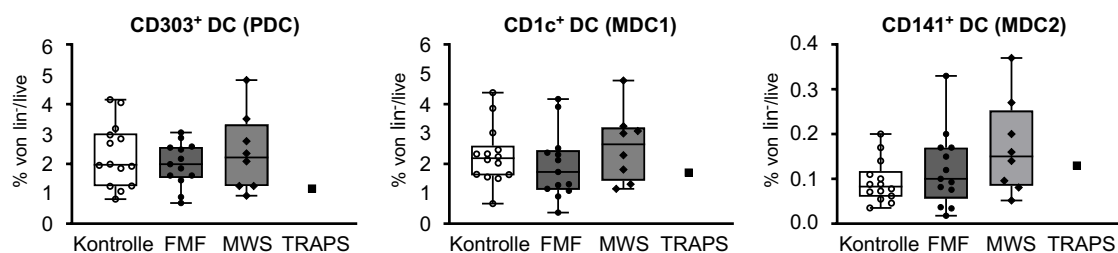


Abbildung 6 FACS-Analyse der Frequenz der verschiedenen DC-Subpopulationen im peripheren Blut von Patienten und Patientinnen mit FMF, MWS und TRAPS. Lineage⁻/HLA-DR⁺ Zellen wurden als PBDCs definiert und anhand von CD303, CD11c/CD1c und CD11c/CD141 entsprechend in plasmazytoide (PDC) und myeloide DCs 1 und 2 (MDC1 und MDC2) unterteilt. Anteil dargestellt als Prozent der lin⁻/live Population. Kontrolle n = 14, FMF n = 13, MWS n = 8, TRAPS n = 1. Box-Whisker-Plot mit Median, Minimum und Maximum, Mann-Whitney-U-Test, * p < 0,05 (Daten der Kontrollen und FMF-Patienten und Patientinnen wurden veröffentlicht in Funk et al., 2020).

Tabelle 14 Frequenzen von PBDCs und DC-Subpopulationen bei Patienten und Patientinnen mit FMF, MWS und gesunden Kontrollen. (Mittelwert und Standardabweichung). (Daten von FMF und Kontrollen veröffentlicht in Funk et al., 2020)

Zelltyp		PBDC	MDC1	MDC2	PDC
FMF	Frequenz (% von lin ⁻ /live)	5,70	1,95	0,12	1,98
	SD	1,71	1,13	0,08	0,73
Kontrolle	Frequenz (% von lin ⁻ /live)	5,62	2,28	0,09	2,29
	SD	1,96	0,97	0,05	1,06
MWS	Frequenz (% von lin ⁻ /live)	7,88	2,60	0,17	2,37
	SD	3,53	1,20	0,11	1,31

4.4. Einfluss immunsuppressiver Medikamente auf die Frequenz der PBDCs bei FMF-Patienten und Patientinnen

Fünf der an der Studie beteiligten FMF-Patienten und Patientinnen erhielten zusätzlich zu Colchicin oder Anti-IL-1-Therapien weitere Immunsuppressiva wie Azathioprin, Methotrexat oder Prednisolon. Analysierte man diese Patienten und Patientinnen als eigene Untergruppe, so konnte ein signifikant verminderter Anteil aller DC-Subpopulationen im Vergleich zu gesunden Probanden und Probandinnen und bei MDC auch zu den FMF-Patienten und Patientinnen ohne immunsuppressive Therapie festgestellt werden (Abbildung 7). Aus Gründen der besseren Vergleichbarkeit und Homogenität des Patientenkollektivs wurden

Ergebnisse

diese Patienten und Patientinnen für die weitere Auswertung ausgeschlossen und als separate Patientengruppe betrachtet. Es ergaben sich jedoch in den folgenden Experimenten keine weiteren signifikanten Unterschiede zu den nicht immunsuppressiv behandelten FMF-Patienten und Patientinnen (Daten nicht gezeigt).

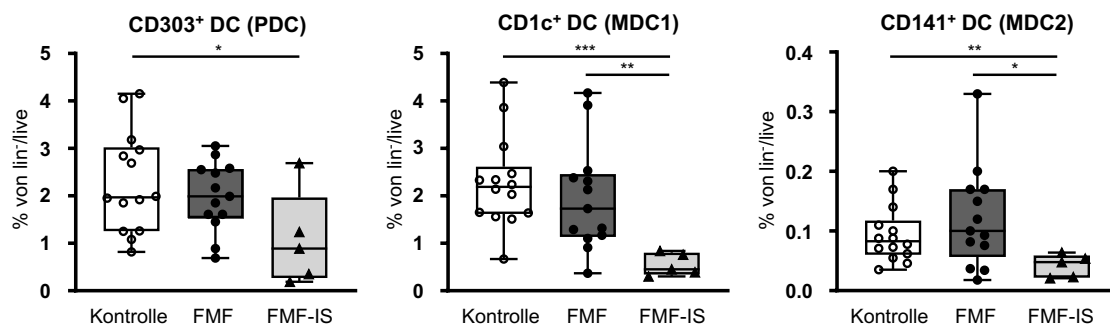


Abbildung 7 FACS-Analyse der DC-Subpopulationen im peripheren Blut von FMF-Patienten und Patientinnen mit Immunsuppressiva. Dargestellt als Prozent der lin⁺/live Population mit den Kontrollen und FMF-Patienten und Patientinnen wie in Abbildung 6 als Vergleich. FMF-IS n = 5, Box-Whisker-Plot mit Median, Minimum und Maximum, Mann-Whitney-U-Test, * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 (Daten der Kontrolle und FMF wurden veröffentlicht in Funk et al., 2020).

4.5. Phänotyp der Mo-DCs

4.5.1. Aktivierungs- und Reifungsmarker auf imMo-DCs von FMF-, MWS- und TRAPS-Patienten und Patientinnen

Nach der *In-vitro*-Generierung von imMo-DCs wurden diese phänotypisch mittels FACS auf typische Oberflächenmarker hin untersucht. Abbildung 8A zeigt repräsentative Histogramme einer Probe mit ihren entsprechenden Isotypkontrollen. Dabei wurde bei FMF-Patienten und Patientinnen eine signifikant erhöhte Expression von CD83, einem Reifungsmarker, CD86, einem kostimulatorischen Molekül, und HLA-DR beobachtet. Dagegen waren PRRs wie CD206 und CD209 herunterreguliert. Auch das koinhibitorische Transmembranmolekül GPNMB (Glykoprotein NMB; Osteoactivin; DC-HIL) war signifikant erniedrigt. CD1a, CD40, CD80 und CCR7 zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen FMF-Patienten und Patientinnen und gesunden Kontrollen (Abbildung 8B, Daten wurden veröffentlicht in Funk et al., 2020). Damit ergab sich das Bild von bereits intrinsisch aktivierteren bzw. reiferen

Ergebnisse

imMo-DCs bei Patienten und Patientinnen mit FMF im Vergleich zu gesunden Kontrollen.

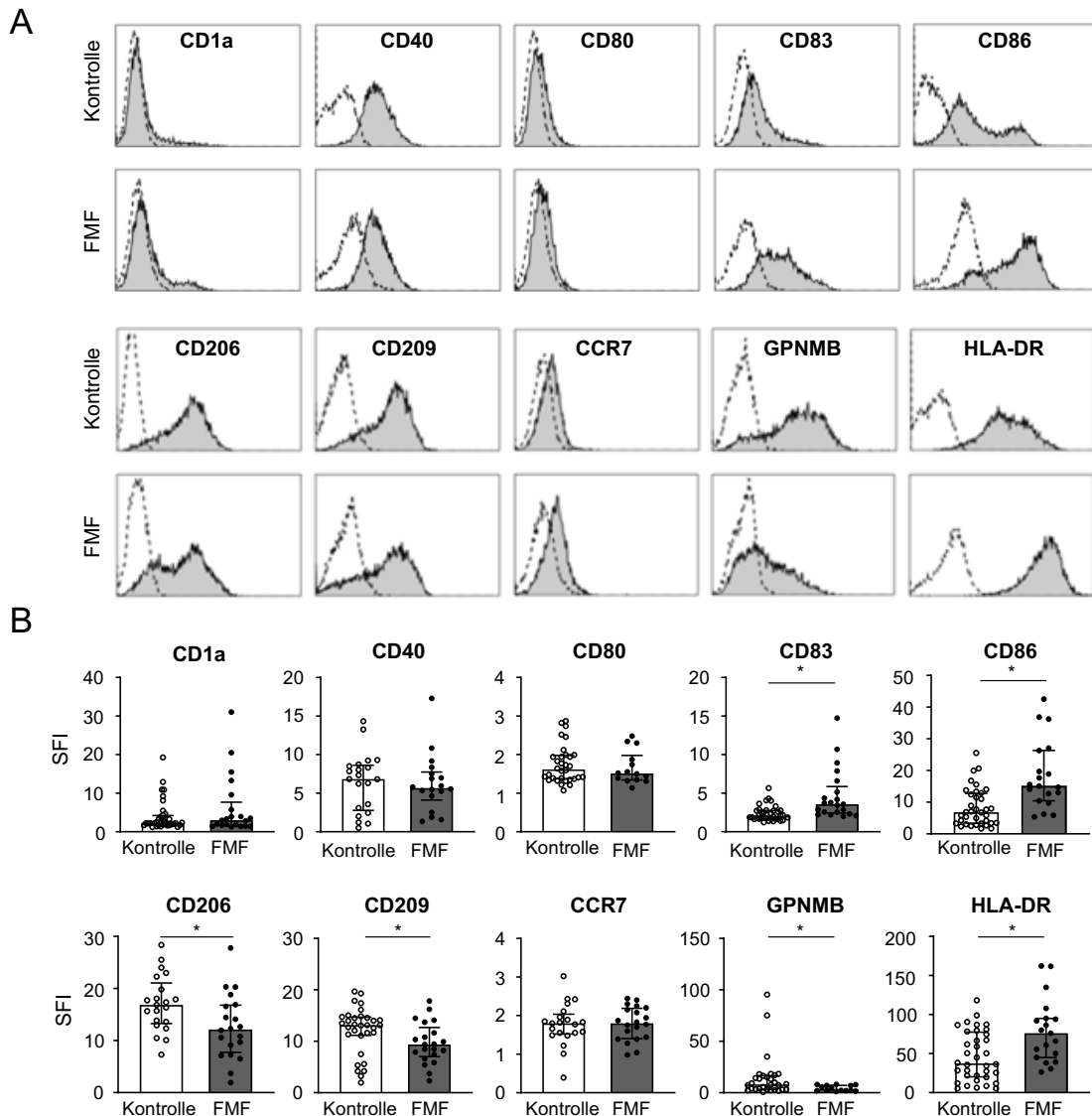


Abbildung 8 FACS-Analyse der Expression von Oberflächenmolekülen auf FMF-imMo-DCs. (A) Repräsentative Histogramme einer gesunden Kontrolle (obere Reihe, grau) und eines FMF-Patienten (untere Reihe, grau) sowie der entsprechenden Isotypkontrollen (gestrichelt, leer). (B) Analyse von $n \geq 14$ Patienten und Patientinnen und $n \geq 21$ Kontrollen. Der SFI (Spezifischer Fluoreszenz Index) wurde durch Division der medianen Fluoreszenzintensität der Probe durch die entsprechende Isotypkontrolle berechnet. Median und Interquartilrange, Mann-Whitney-U-Test, * $p < 0,05$ (Daten wurden veröffentlicht in Funk et al., 2020).

Auch bei MWS-Patienten und Patientinnen fand sich eine signifikant erhöhte Expression von CD83, CD86 und HLA-DR, sowie eine signifikant erniedrigte Expression von CD206 und GPNMB (Abbildung 9). Von der TRAPS-Patientin lagen z. T. zwei Werte mit einem Abstand von etwa einem Jahr vor. Hierbei fiel

Ergebnisse

eine Veränderung bei CD80, CD209 sowie tendenziell bei CD206 auf, wobei die niedrigeren Werte von der ersten Blutentnahme stammten. Insgesamt reihen sich die Werte der TRAPS-Patientin in etwa bei denen von MWS-Patienten und Patientinnen ein.

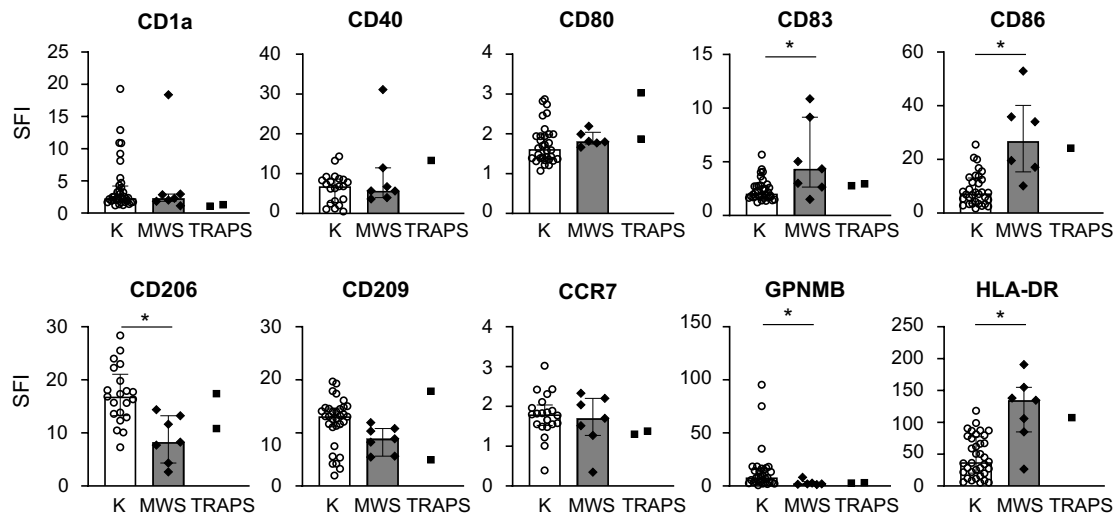


Abbildung 9 FACS-Analyse der Expression von Oberflächenmarkern auf MWS- und TRAPS-imMo-DCs. Der SFI (Spezifischer Fluoreszenz Index) wurde durch Division der medianen Fluoreszenzintensität der Probe durch die entsprechende Isotypkontrolle berechnet. Kontrollen (K) $n \geq 21$; MWS $n = 7$; TRAPS $n = 1$ bzw. 2 (selbe Patientin), Median und Interquartilrange, Mann-Whitney-U-Test, * $p < 0,05$.

4.5.2. Suszeptibilität der imMo-DCs von FMF-, MWS- und TRAPS-Patienten und Patientinnen gegenüber dem Reifungsstimulus LPS

DCs reagieren auf verschiedene aktivierende Stimuli mit einer Änderung ihres Aktivitätsprofils. Dabei regulieren sie ihre Fähigkeit zur Antigenprozessierung und -präsentation herunter, während die Fähigkeit zu Migration und zur Aktivierung von T-Zellen verstärkt wird. Diese Veränderungen konnten in der Zellkultur nach Zugabe von LPS, einem TLR4-Liganden und Reifungsstimulus, sowohl bei den Mo-DCs der gesunden Kontrollen als auch bei den Patienten und Patientinnen beobachtet werden (Abbildung 10, Daten wurden veröffentlicht in Funk et al., 2020). So wurden PRRs wie CD206 und CD209 oder GPNMB, ein koinhibitorisches Molekül, typischerweise signifikant herunterreguliert, während kostimulatorische Moleküle wie CD40, CD80 und CD86 und der Reifungsmarker CD83 signifikant hochreguliert wurden. Der CC-Chemokinrezeptor CCR7 und der DC-Marker CD1a zeigten keine statistisch signifikante Veränderung. Auffallend war, dass die HLA-DR-Expression auf den

Ergebnisse

mMo-DCs der gesunden Kontrollen noch einen, wenn auch nicht signifikanten, Anstieg zeigte, bei den FMF-Patienten und Patientinnen jedoch bereits die imMo-DCs in etwa dieses Expressionslevel erreichten und mMo-DCs ihre HLA-DR-Expression unter LPS kaum mehr steigerten.

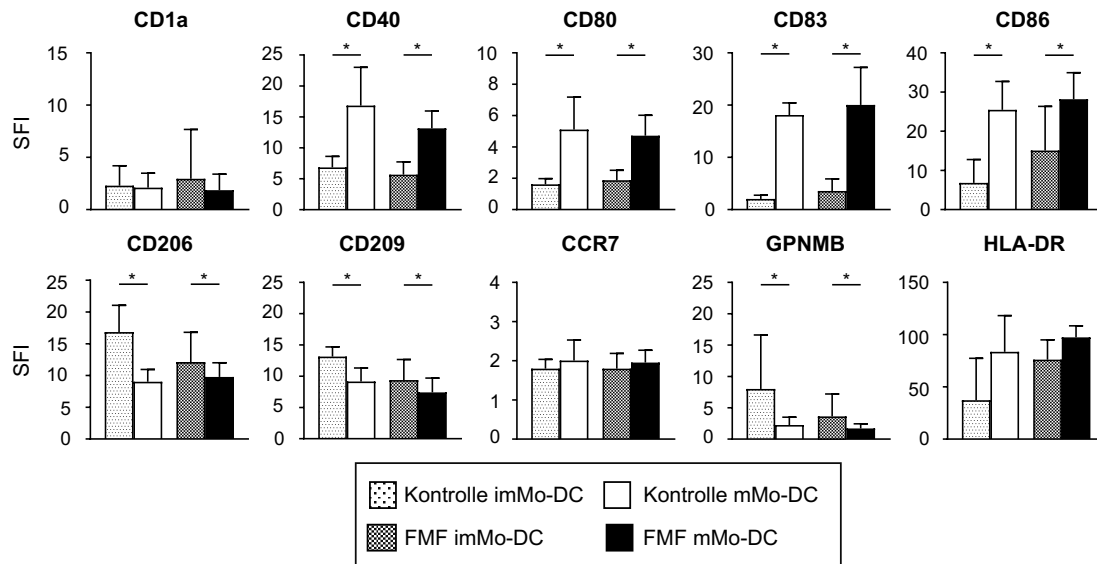


Abbildung 10 FACS-Analyse der Expression von Oberflächenmarkern auf mMo-DCs von FMF-Patienten und Patientinnen nach LPS-Stimulation. Der SFI (Spezifischer Fluoreszenz Index) wurde durch Division der medianen Fluoreszenzintensität der Probe durch die entsprechende Isotypkontrolle berechnet. Kontrollen $n \geq 11$, FMF $n \geq 10$, Median und Interquartilrange, Mann-Whitney-U-Test, * $p < 0,05$ (Daten wurden veröffentlicht in Funk et al., 2020).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Mo-DCs der FMF-Patienten und Patientinnen trotz intrinsischer Aktivierung, wie in den vorherigen Versuchen gesehen, weiterhin mit entsprechender Regulierung ihrer Oberflächenmarker auf LPS reagieren konnten. Als einzige schien die HLA-DR-Expression schon bei imMo-DCs auf einem annähernd hohen Level wie bei mMo-DCs zu sein.

Vergleich man die mMo-DCs der FMF-Patienten und Patientinnen mit den mMo-DCs der gesunden Kontrollen, ließen sich keine signifikanten Unterschiede feststellen (Abbildung 11, Daten wurden veröffentlicht in Funk et al., 2020).

Ergebnisse

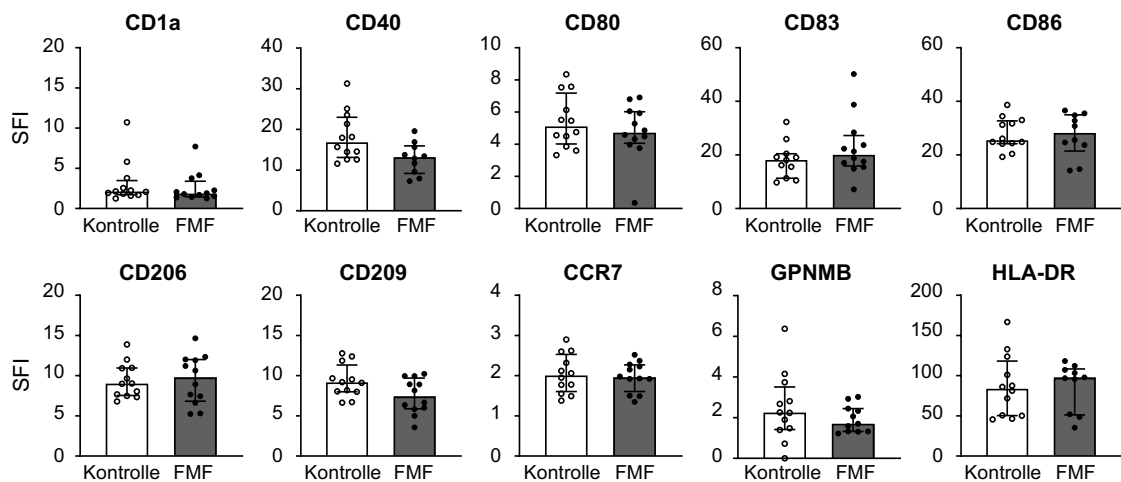


Abbildung 11 FACS-Analyse der Expression von Oberflächenmarkern auf FMF-mMo-DCs. Der SFI (Spezifischer Fluoreszenz Index) wurde durch Division der medianen Fluoreszenzintensität der Probe durch die entsprechende Isotypkontrolle berechnet. Kontrollen $n \geq 11$, FMF $n \geq 10$, Median und Interquartilrange, Mann-Whitney-U-Test, * $p < 0,05$ (Daten wurden veröffentlicht in Funk et al., 2020).

Bei Patienten und Patientinnen mit MWS konnten nur von zwei Blutproben mMo-DCs generiert und analysiert werden. Daher war keine statistische Analyse möglich und es ließen sich nur Tendenzen beschreiben (Abbildung 12). Es schien hier, dass bei mMo-DCs die CD83-, CD86- und die HLA-DR-Expression noch weiter stieg als bei Kontrollen. Bei HLA-DR lagen beide Werte sogar über dem Maximum der Kontrollen. Ähnlich wie bei den imMo-DCs zeigten diese zwei Patienten eine erniedrigte CD209-Expression. Auffallend waren aber auch die teils großen Differenzen zwischen den mMo-DCs dieser beiden Patienten, insbesondere bei der CD80- und CD206-Expression.

Ergebnisse

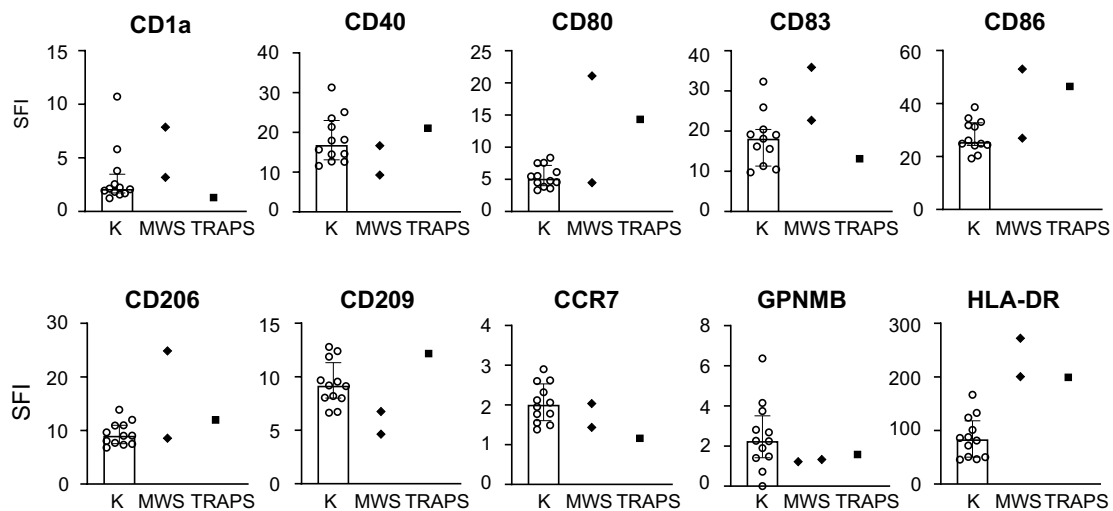


Abbildung 12 FACS-Analyse der Expression von Oberflächenmarkern auf MWS- und TRAPS-mMo-DCs. Der SFI (Spezifischer Fluoreszenz Index) wurde durch Division der medianen Fluoreszenzintensität der Probe durch die entsprechende Isotypkontrolle berechnet. Kontrollen (K) $n \geq 11$, MWS $n = 2$, TRAPS $n = 1$, Median und Interquartilrange, Mann-Whitney-U-Test, * $p < 0,05$.

4.5.3. Expression von Reifungsmarkern auf PBDCs von FMF-Patienten und Patientinnen

Nachdem bei imMo-DCs gezeigt wurde, dass bei FMF-Patienten und Patientinnen Reifungs- und Aktivierungsmarker vermehrt exprimiert werden, sollte dies anhand CD83 und CD86 auch bei primären PBDCs aus Blut von FMF-Patienten und Patientinnen untersucht werden. Fünf, sich unter Colchicin-Therapie in Remission befindende Patienten und Patientinnen wurden mit altersentsprechenden gesunden Probanden und Probandinnen verglichen.

Zusammengenommen zeigten die FMF-Patienten und Patientinnen eine signifikant erhöhte Expression von CD86 auf den PBDCs. Auch bei CD83 ließ sich tendenziell eine erhöhte Expression nachweisen, welche jedoch noch nicht statistisch signifikant war (Abbildung 13, Daten veröffentlicht in Funk et al., 2020). Der Prozentsatz an CD83⁺ bzw. CD86⁺ PBDCs im Verhältnis zur Gesamt-PBDC-Population war dagegen vergleichbar (Daten nicht gezeigt).

Zusammengenommen war dies ein weiteres Indiz dafür, dass DCs bei FMF-Patienten und Patientinnen einen reiferen Phänotyp aufweisen und intrinsisch aktivierter sind.

Ergebnisse

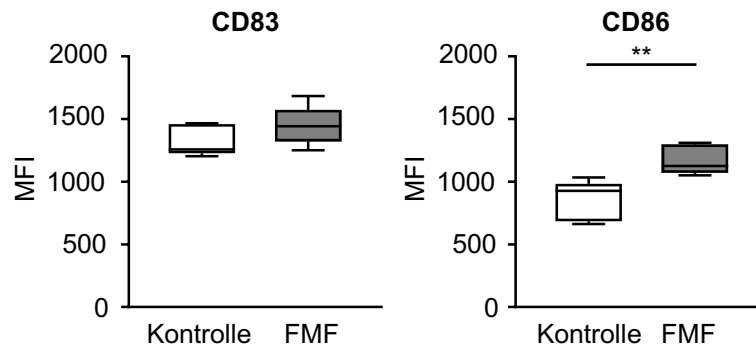


Abbildung 13 FACS-Analyse der Expression von CD83 und CD86 auf DCs des peripheren Blutes (PBDCs) von Patienten und Patientinnen mit FMF. Dargestellt als MFI (mediane Fluoreszenzintensität) im Box-Whisker-Plot mit Median, Interquartilrange, Minimum und Maximum, Mann-Whitney-U-Test, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. $n = 5$ (Daten wurden veröffentlicht in Funk et al., 2020).

4.6. Funktion der Mo-DCs

4.6.1. Migratorische Kapazität von imMo-DCs und mMo-DCs von FMF- und MWS-Patienten und Patientinnen

Eine zentrale Eigenschaft insbesondere von reifen DCs ist es, in Gewebe, lymphatische Organe oder zum Entzündungsgeschehen migrieren zu können. Dabei reagieren sie auf chemotaktische Signale und Zytokine wie das Chemokin CCL19. In Transwell-Migrations-Assays migrierten imMo-DCs von FMF-Patienten und Patientinnen im Vergleich zu gesunden Kontrollen sowohl spontan als auch als Reaktion auf CCL19 signifikant stärker (Abbildung 14 A, Daten veröffentlicht in Funk et al., 2020). Bei mMo-DCs war die Migrationsfähigkeit im Vergleich zu den imMo-DCs erwartungsgemäß erhöht, aber der Unterschied zwischen den Gruppen nicht mehr signifikant vorhanden (Abbildung 14 B).

Passend zu den vorherigen Ergebnissen zeigte sich also auch in Bezug auf die Migrationsfähigkeit das Bild von bereits aktivierteren imMo-DCs bei FMF-Patienten und Patientinnen.

Ergebnisse

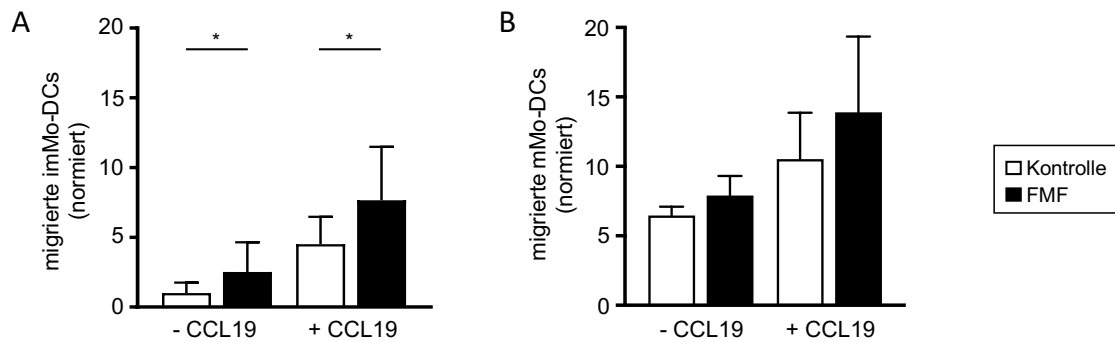


Abbildung 14 Migratorische Kapazität von FMF-imMo-DCs und FMF-mMo-DCs. Transwell-Migrationsassays mit FMF-imMo-DCs (A, Kontrollen $n \geq 9$, FMF $n = 11$. Daten wurden veröffentlicht in Funk et al., 2020) und FMF-mMo-DCs (B, Kontrollen $n = 5$, FMF $n = 3$). Die gemessene Anzahl migrierter Zellen wurde auf die spontane (ohne CCL19) Migration der imMo-DCs der Kontrollen (entspricht 1) normiert. Median und Interquartilrange, Mann-Whitney-U-Test, * $p < 0,05$.

Auch imMo-DCs von drei MWS-Patienten und Patientinnen zeigten sowohl mit als auch ohne CCL19 eine signifikant erhöhte Migration im Vergleich zu gesunden Kontrollen (Abbildung 15).

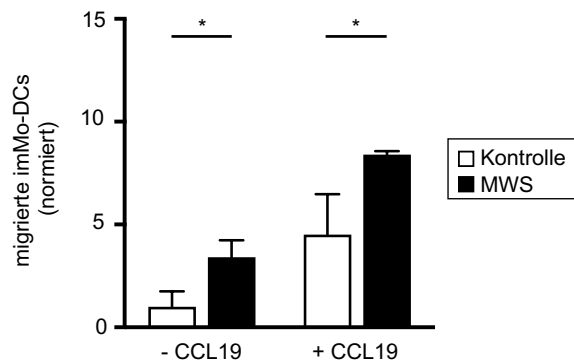


Abbildung 15 Migratorische Kapazität von MWS-imMo-DCs. Transwell-Migrationsassays mit MWS-imMo-DCs. Die gemessene Anzahl migrierter Zellen wurde auf die spontane (ohne CCL19) Migration der Kontrollen (entspricht 1) normiert. Kontrollen $n \geq 9$, MWS $n = 3$, Mann-Whitney-U-Test, * $p < 0,05$.

4.6.2. T-Zell-stimulatorische Kapazität der imMo-DCs und mMo-DCs von FMF-, MWS- und TRAPS-Patienten und Patientinnen

Eine zentrale Funktion von reifen DCs ist die Aktivierung und Stimulation von T-Zellen. Diese wurde *in vitro* mit CFSE-Proliferations-Assays getestet. Dabei sollten zuvor durch γ -Strahlung inaktivierte Mo-DCs von Patienten und Patientinnen sowie gesunden Probanden und Probandinnen allogene CFSE-gefärbte $CD4^+$ T-Zellen zur Proliferation anregen. Abbildung 16 zeigt

Ergebnisse

exemplarisch die Auswertung der FACS-Histogramme von Negativkontrolle (- PHA), Positivkontrolle (+ PHA), imMo-DCs und mMo-DCs.

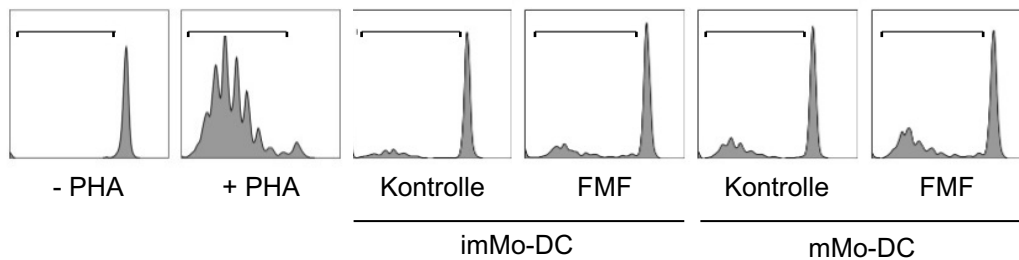


Abbildung 16 Exemplarische Histogramme des CFSE-Proliferations-Assays zur Analyse der T-Zell-stimulatorischen Kapazität. Bestrahlte Mo-DCs wurden mit allogenen CFSE-gefärbten PBMCs zusammen kultiviert und deren Proliferation nach sechs Tagen mittels FACS ausgewertet. Die Zugabe von Phytohämagglutinin (PHA) als Proliferationsstimulanz diente als Positivkontrolle, PBMCs ohne PHA als Negativkontrolle. Die Gates wurden anhand Negativ- (rechter Rand) und Positivkontrolle (linker Rand) angelegt und zeigen den Bereich der proliferierten Zellen an, deren Generationen durch die CFSE-Verdünnung angezeigt werden (veröffentlicht in Funk et al., 2020).

Beim Vergleich von FMF-Patienten und Patientinnen mit gesunden Kontrollen ließ sich eine signifikant erhöhte Proliferation der T-Zellen sowohl bei imMo-DCs als auch bei mMo-DCs als Stimulatoren feststellen. Insbesondere zeigten die FMF-imMo-DCs bereits eine höhere stimulatorische Kapazität als die mMo-DCs der Kontrollen (Abbildung 17, Daten wurden veröffentlicht in Funk et al., 2020).

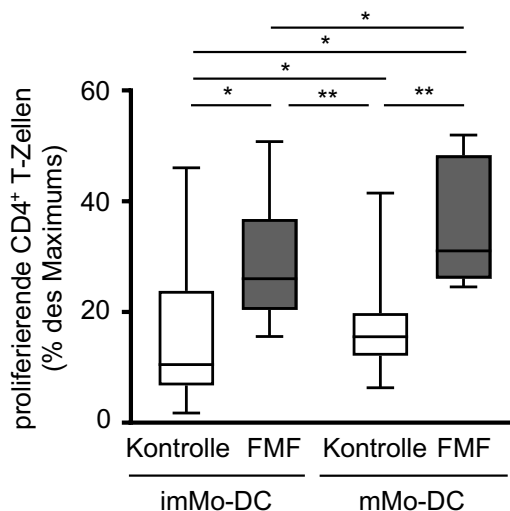


Abbildung 17 T-Zell-stimulatorische Kapazität im CFSE-Proliferations-Assay mit FMF-Mo-DCs. Bestrahlte Mo-DCs wurden mit allogenen CFSE-gefärbten PBMCs zusammen kultiviert und deren Proliferation nach sechs Tagen mittels FACS ausgewertet. Die Daten wurden mithilfe der Negativ- und Positivkontrollen auf % des Maximums (Positivkontrolle) normiert. Kontrollen $n \geq 12$, FMF $n \geq 6$. Box-Whisker-Plot mit Median, Minimum und Maximum, Mann-Whitney-U-Test für Kontrolle vs FMF, Wilcoxon Test für Kontrolle vs Kontrolle bzw. FMF vs FMF, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (Daten wurden veröffentlicht in Funk et al., 2020).

Ergebnisse

Bei den vier analysierten MWS-Patienten und Patientinnen gab es zwei Gruppen: Die Mo-DCs von zwei Patienten und Patientinnen zeigten eine höhere stimulatorische Kapazität gegenüber T-Zellen, während die anderen beiden CD4⁺ T-Zellen nur in einem Maße stimulierten, das mit dem Median der Kontrollen vergleichbar war (Abbildung 18).

Die imMo-DCs der TRAPS-Patientin waren dagegen verhältnismäßig starke Stimulatoren im Vergleich zu gesunden Kontrollen.

Zusammengenommen waren diese Ergebnisse ein weiteres Anzeichen dafür, dass die DCs bei allen drei Krankheiten bereits als imMo-DCs einen reiferen Phänotyp aufweisen. Worauf die starke Differenz bei den MWS-DCs zurückzuführen war, lässt sich hier nicht beantworten und bedarf weiterer Untersuchungen.

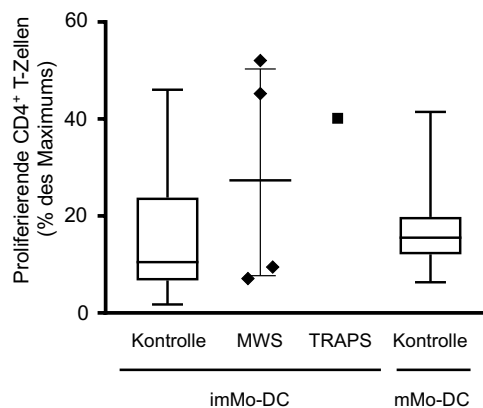


Abbildung 18 T-Zell-stimulatorische Kapazität im CFSE-Proliferations-Assay mit MWS- und TRAPS-imMo-DCs. Bestrahlte imMo-DCs wurden mit allogenen CFSE-gefärbten PBMCs zusammen kultiviert und deren Proliferation nach sechs Tagen mittels FACS ausgewertet. Die Daten wurden mithilfe der Negativ- und Positivkontrollen auf % des Maximums (Positivkontrolle) normiert. Kontrollen $n \geq 12$, MWS $n = 4$, TRAPS $n = 1$. Box-Whisker-Plot mit Median, Minimum und Maximum.

4.6.3. Zytokinsekretion der imMo-DCs und mMo-DCs von FMF-Patienten und Patientinnen

Um die Zytokinsekretion der Mo-DCs der Patienten und Patientinnen zu untersuchen, wurden die Zytokine IL-1 α , Pro-IL-1 β , IL-1 β , IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-18, IFN- γ , TNF- α und TNF- β in Überständen der Zellkulturen mittels ELISA quantifiziert.

Ergebnisse

Ausschließlich für TNF- β ließ sich eine signifikante Zunahme der Konzentration in den Kulturüberständen der mMo-DCs der FMF-Patienten und Patientinnen im Vergleich zu den Kontrollen beobachten (Abbildung 19).

Auffallend waren die sehr geringen IL-1 β -Konzentrationen bei FMF-imMo-DC-Kulturen, welche allerdings nach Zugabe von LPS wie bei den Kontrollen etwas anstiegen. Einer der hier untersuchten Patienten und Patientinnen erhielt als Therapie zusätzlich zu Colchicin, welches alle sieben Patienten und Patientinnen einnahmen, den IL-1-Rezeptor-Antagonisten Anakinra. Er unterschied sich jedoch in der IL-1 β -Konzentration nicht signifikant von den anderen Proben. IL-18 dagegen war nur in wenigen Kulturen in detektierbaren Konzentrationen vorhanden und zeigte keine signifikanten Unterschiede. Auch die Zytokine Pro-IL-1 β , IL-1 β , IL-6, IL-10 und IL-13 waren sowohl bei Kontrollen als auch bei FMF-Proben nicht in allen Überständen detektierbar.

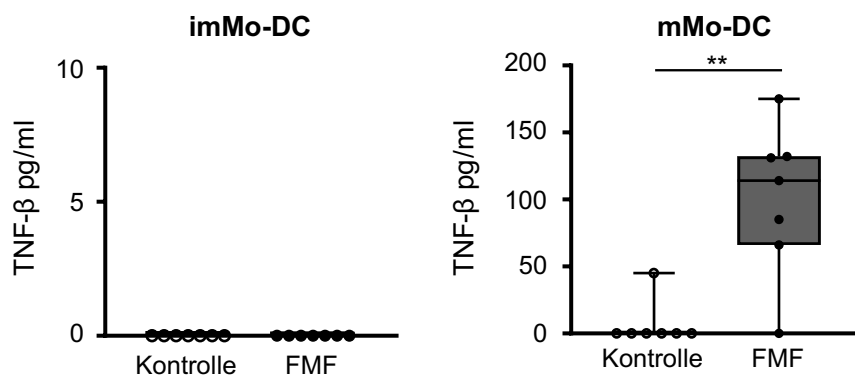


Abbildung 19 TNF- β Konzentration in Zellkulturüberständen von FMF-imMo-DCs und FMF-mMo-DCs. Die Zytokinkonzentration wurde mittels ELISA nach sieben Tagen Kultur analysiert. Kontrolle n = 9, FMF n = 7. Box-Whisker-Plot mit Median, Minimum und Maximum, Mann-Whitney-U-Test, ** p < 0,01.

Bei IL-6, IL-10, IL-13 und TNF- α konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. IL-1 α , IFN- γ und IL-5 wurden weder in der Kultur von imMo-DCs noch von mMo-DCs detektiert (Daten nicht gezeigt).

4.7. Analyse der Mo-DCs eines Patienten im aktiven FMF-Schub (Fallbericht)

Patient Nr. 31 befand sich zum Zeitpunkt der Blutentnahme aufgrund eines akuten FMF-Schubes in stationärer Behandlung. Zuvor war bereits eine Blutprobe in Beschwerdefreiheit etwa zwei Monate vorher abgenommen und untersucht worden. Zur Einordnung der Ergebnisse wurden die in Funk et al., 2020 veröffentlichten Daten zu FMF und Kontrollen herangezogen. Dieser Patient zeigte insbesondere während des Schubes, aber auch schon in der Remission unter Methotrexat und Tocilicumab, eine deutliche Reduktion der Frequenz aller drei DC-Subpopulationen im peripheren Blut (Abbildung 20).

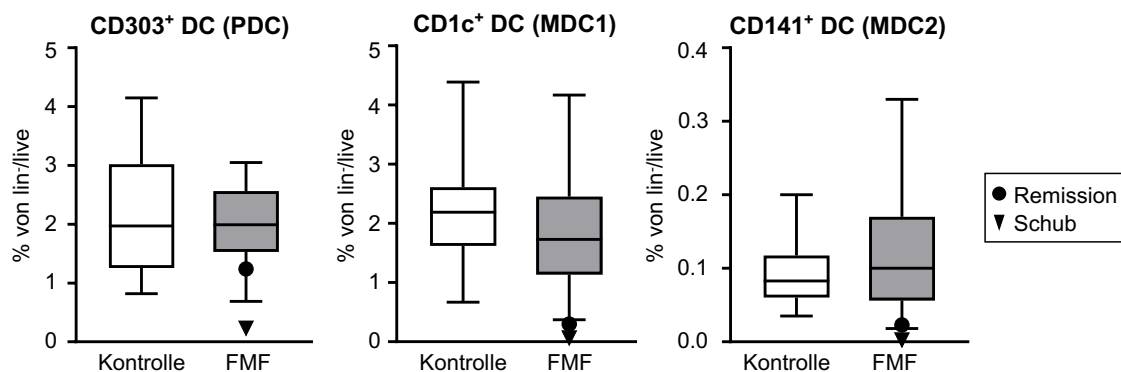


Abbildung 20 FACS-Analyse der DC-Subpopulationen im peripheren Blut von Patient Nr. 31 im Vergleich zu anderen FMF-Patienten und Patientinnen und Kontrollen. Lineage⁺/HLA-DR⁺ Zellen wurden als PBDCs definiert und anhand von CD303, CD11c/CD1c und CD11c/CD141 entsprechend in plasmazytoide (PDC) und myeloide DCs 1 und 2 (MDC1 und MDC2) unterteilt. Anteil dargestellt als Prozent der lin⁺/live Population. Zum Vergleich sind die Kontrollen und FMF-Patienten und Patientinnen aus Abbildung 6 dargestellt. Box-Whisker-Plot mit Median, Minimum und Maximum.

Phänotypisch zeigte sich bei den imMo-DCs des sich im Schub befindenden Patienten eine moderate Steigerung der Expression von CD206 und CD209, während CD83, CD40 und HLA-DR tendenziell reduziert waren. Der Vergleich mit den anderen FMF-Patienten und Patientinnen ergab keine Unterschiede und sowohl in Remission als auch im Schub befanden sich die Werte im Bereich anderer FMF-Patienten und Patientinnen (Abbildung 21).

Ergebnisse

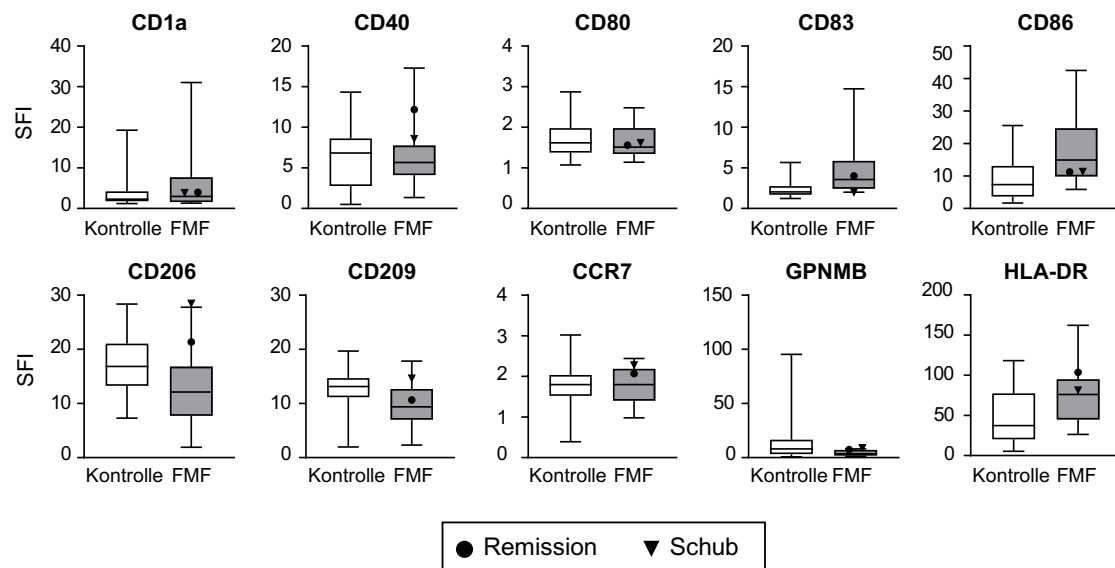


Abbildung 21 FACS-Analyse der Expression von Oberflächenmarkern auf imMo-DCs von Patient Nr. 31 im Vergleich zu anderen FMF-Patienten und Patientinnen und Kontrollen. Zum Vergleich sind die Kontrollen und FMF-Patienten und Patientinnen wie in Abbildung 8 dargestellt. Der SFI (Spezifischer Fluoreszenz Index) wurde durch Division der medianen Fluoreszenzintensität der Probe durch die entsprechende Isotypkontrolle berechnet. Box-Whisker-Plot mit Median, Minimum und Maximum.

Auffallend war jedoch die starke Reaktion dieser aus dem Patienten im Schub hervorgegangenen imMo-DCs auf den Reifungsstimulus LPS. Hier ließ sich ein starker Anstieg der Expression von CD86, HLA-DR, CD209 und CD40 nachweisen, z. T. mit höheren Werten als das bei den anderen Proben gemessene Maximum. Die CD83-Expression war dagegen deutlich reduziert (Abbildung 22).

Ergebnisse

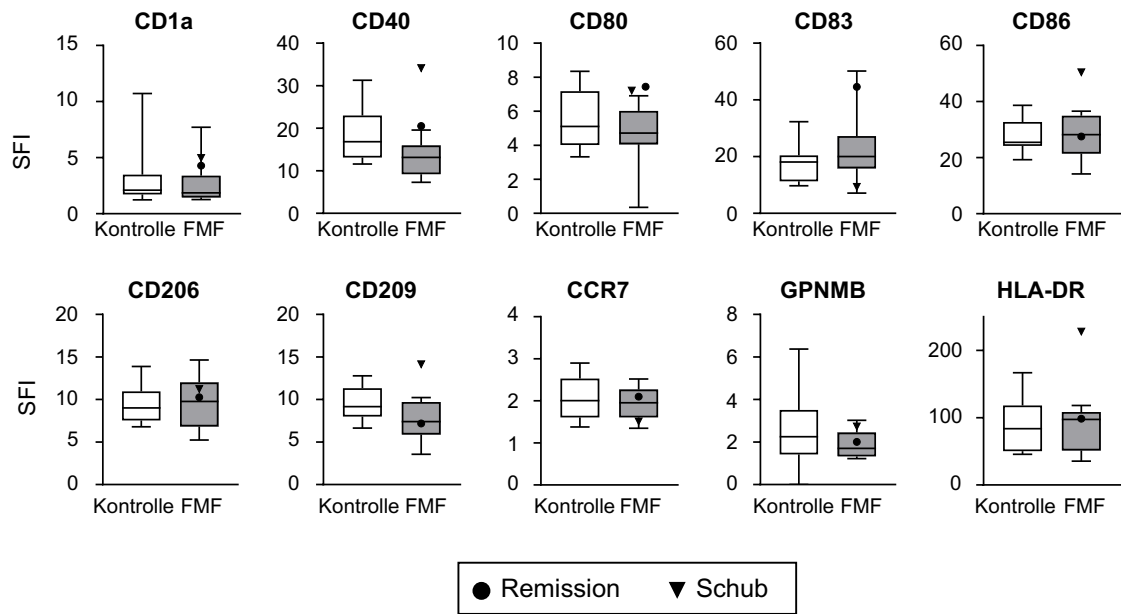


Abbildung 22 FACS-Analyse der Expression von Oberflächenmarkern auf mMo-DCs von Patient Nr. 31 im Vergleich zu anderen FMF-Patienten und Patientinnen und Kontrollen. Zum Vergleich sind die Kontrollen und FMF-Patienten und Patientinnen wie in Abbildung 11 dargestellt. Der SFI (Spezifischer Fluoreszenz Index) wurde durch Division der medianen Fluoreszenzintensität der Probe durch die entsprechende Isotypkontrolle berechnet. Box-Whisker-Plot mit Median, Minimum und Maximum.

Die T-Zell-stimulatorische Kapazität der imMo-DCs im Schub war geringer als der niedrigste Wert der anderen FMF-Proben. Bei mMo-DCs lag Patient Nr. 31 im oberen Bereich der anderen FMF-Patienten und Patientinnen (Abbildung 23).

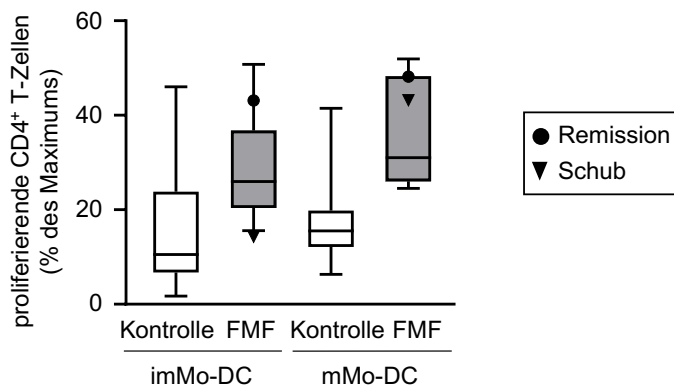


Abbildung 23 T-Zell-stimulatorische Kapazität im CFSE-Proliferations-Assay der Mo-DCs von Patient Nr. 31 im Vergleich zu anderen FMF-Patienten und Patientinnen und Kontrollen. Bestrahlte Mo-DCs wurden mit allogenen CFSE-gefärbten PBMCs zusammen kultiviert und deren Proliferation nach sechs Tagen mittels FACS ausgewertet. Die Daten wurden mithilfe der Negativ- und Positivkontrollen auf % des Maximums (Positivkontrolle) normiert. Zum Vergleich wurden die Kontrollen und FMF-Patienten und Patientinnen wie in Abbildung 17 dargestellt. Box-Whisker-Plot mit Median, Minimum und Maximum.

4.8. Korrelation zwischen Mutationsstatus und klinischen Daten bei FMF-Patienten und Patientinnen

Um eine potentielle Korrelation des Phänotyps und/oder der Funktion der Mo-DCs mit der am häufigsten vorkommenden M694V Mutation zu untersuchen, wurden drei Gruppen gebildet: i) mit M694V-Mutation, ii) ohne M694V-Mutation und iii) Mutationsstatus nicht bekannt. Die Ergebnisse aus den vorangegangenen Analysen mit signifikanten Unterschieden zu den Kontrollen wurden in diesen drei Kategorien verglichen. Dabei konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Die Laborparameter befanden sich bis auf wenige Ausnahmen zum Zeitpunkt der Blutentnahme im Referenzbereich und wiesen keine klinisch relevante Streubreite auf. Auch konnten bis auf Patient Nr. 31, welcher separat betrachtet wurde, keine Patienten und Patientinnen mit relevanter Krankheitsaktivität eingeschlossen werden.

5. Diskussion

Bei den seltenen autoinflammatorischen Erkrankungen führen Defekte oder Fehlregulation des angeborenen Immunsystems zu einer übermäßigen Aktivität und wiederkehrenden Entzündungen (Ben-Chetrit et al., 2018). Die häufigste autoinflammatorische Erkrankung ist das FMF, welches meist durch Mutationen im MEFV-Gen, welches für Pyrin codiert, bedingt ist. Dieses fungiert im Zytosol als Sensor und kann bei Aktivierung einen Inflammasomkomplex bilden (Gao et al., 2016; Park et al., 2016).

Auch das MWS ist eine autoinflammatorische Erkrankung und eine typische Inflammasomopathie. Mutationen im NLRP3-Gen führen hier zu einer Überaktivität des NLRP3-Inflammasoms.

TRAPS hat dagegen eine andere Pathogenese, mit jedoch ähnlichem klinischem Bild. Hier liegen missense Mutationen im TNFR1-Gen vor.

Als professionelle APCs spielen DCs in der Homöostasis und Aktivierung des Immunsystems eine zentrale Rolle. Sie sind das wichtigste Bindeglied zwischen unspezifischem und spezifischem Immunsystem. Daher liegt die Vermutung nahe, dass auch sie in Erkrankungen des immunologischen Spektrums involviert sind. So konnte z. B. bereits bei Psoriasis, SLE oder Typ 1 Diabetes eine Beteiligung von DCs an der Entstehung oder dem Verlauf der Krankheit gezeigt werden (reviewed in Ganguly et al., 2013).

Bei autoinflammatorischen Erkrankungen ist jedoch bisher nur wenig über die immunpathologische Rolle der DCs bekannt. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit DCs von Patienten und Patientinnen mit den autoimmunologischen Erkrankungen FMF, MWS und TRAPS einerseits phänotypisch und andererseits funktionell charakterisiert und mit Zellen gesunder Probanden und Probandinnen verglichen.

5.1. DCs im peripheren Blut von Patienten und Patientinnen mit FMF, MWS oder TRAPS

DCs sind eine heterogene Gruppe von Zellen mit verschiedenen Subpopulationen, welche sich neben ihren Funktionen auch in ihrer Lokalisation unterscheiden. Im Blut befinden sich hauptsächlich drei DC-Populationen: PDC, CD1c⁺ MDC1 und CD141⁺ MDC2. Eine Veränderung ihrer Frequenz oder ihres Verhältnisses zueinander konnte bei diversen Krankheiten, wie z. B. SLE oder Rheumatoider Arthritis, gezeigt werden (Migita et al., 2005; Fiore et al., 2008; Gill et al., 2002; Sennikov et al., 2016). Außerdem stehen PDC und ihre Sekretion von IFN im Verdacht bei Autoimmunerkrankungen wie Psoriasis, Diabetes mellitus oder Sjögren Syndrom eine pathogene Rolle zu spielen, da in betroffenen Geweben erhöhte Konzentrationen nachgewiesen werden konnten (Gottenberg et al., 2006; Nestle et al., 2005; Huang et al., 1995; reviewed in Ueno et al., 2007).

In der hier vorgelegten Arbeit konnten jedoch keine numerischen Unterschiede von PBDCs, MDC1, MDC2 und PDC zwischen den hier untersuchten Patienten und Patientinnen mit FMF, MWS oder TRAPS und gesunden Probanden und Probandinnen festgestellt werden.

5.2. Phänotyp der PBDCs und Mo-DCs von Patienten und Patientinnen mit FMF, MWS oder TRAPS

Da DCs im peripheren Blut nur in geringer Anzahl vorhanden sind, wurde für die phänotypische und funktionelle Charakterisierung auf das etablierte Modell der *in vitro* generierten Mo-DCs zurückgegriffen (z. B. Brossart et al., 1998; Sallusto and Lanzavecchia, 1994; Chapuis et al., 1997; Romani et al., 1996; Zhou and Tedder, 1996; Sallusto et al., 1995).

DCs ändern je nach Reifungs- und Aktivierungsgrad die Expression ihrer Oberflächenmoleküle und passen sich so den sich verändernden Aufgaben an. Unreife DCs sind besonders gut im Erkennen und Prozessieren von PAMPs und DAMPs, während reife DCs vor allem sehr effektiv T-Zellen aktivieren können. Diese Veränderungen spiegeln sich im Profil der typischen Oberflächenmarker wider und waren nach Stimulation mit LPS in FMF-Mo-DCs

Diskussion

genauso wie in gesunden Kontrollen zu beobachten, sodass sich der Phänotyp der mMo-DCs beider Gruppen nicht signifikant unterschied (Abbildung 10 und Abbildung 11). Jedoch ließ sich bei FMF- und MWS-imMo-DCs eine Verschiebung hin zum Phänotyp reifer(er) Mo-DCs feststellen, da die Reifungs- und Aktivierungsmarker CD83, CD86 und HLA-DR signifikant hoch- und die PRRs, Adhäsions- oder inhibitorischen Moleküle CD206, GPNMB und, bei FMF, CD209 herunterreguliert waren (Abbildung 8). Musabak et al., 2004 stellten fest, dass T-Zellen auch in Remissionsphasen von FMF aktiver sind und sie postulierten unter anderem eine niedrigere Aktivierungsschwelle der T-Zellen.

In Zusammenschau mit den Ergebnissen aus der hier vorgelegten Arbeit ist auch eine verstärkte T-Zell-Stimulation durch bereits intrinsisch aktivierte DCs denkbar. In Einklang mit dieser Hypothese stehen auch die Ergebnisse der Proliferationsassays (siehe 4.6.2 und 5.3).

Die HLA-DR-Expression entsprach bei FMF-imMo-DCs bereits annähernd der von mMo-DCs und wurde nach LPS-Stimulation kaum mehr gesteigert. Da HLA-Moleküle mit ihren gebundenen Antigenen T-Zell-Rezeptoren stimulieren, zeigen diese Ergebnisse einen möglichen Mechanismus zur verstärkten Aktivierung von T-Zellen auf. Auf der anderen Seite steht z. B. das koinhibitorische Protein GPNMB, welches über seinen Rezeptor Syndecan-4 T-Zellen inhibieren kann. Es wird normalerweise bei der Aktivierung von DCs herunterreguliert (Gutknecht et al., 2015; Schwarzbich et al., 2012) und war bei FMF- und MWS-imMo-DCs bereits signifikant niedriger exprimiert als bei gesunden Kontrollen. Es zeigte sich also der unter physiologischen Bedingungen biologisch sinnhafte Zusammenhang zwischen der Hochregulation von immunstimulierenden Molekülen einerseits und der Herunterregulation inhibitorischer Moleküle andererseits.

Normalerweise treten alle diese Veränderungen jedoch erst nach Kontakt mit PAMPs oder DAMPs auf, wobei über intrazelluläre Signalwege entsprechende inflammatorische Zytokine und Chemokine induziert werden (Dieu et al., 1998).

Unsere Versuche zeigten also zusammengefasst, dass imMo-DCs bereits ohne externe Stimuli, wie z. B. TLR-Liganden, phänotypisch reiferen DCs glichen. Sie

Diskussion

reagierten jedoch weiterhin auf entsprechende Reifungsstimuli wie LPS. Ein Einfluss durch humorale Faktoren und proinflammatorische Zytokine aus dem Blut der Patienten und Patientinnen auf die Aktivierung bzw. Ausreifung ist dabei unwahrscheinlich, da die Mo-DCs *ex vivo* in Zellkultur generiert wurden. Allerdings ist es nicht ausgeschlossen, dass die Monozyten bereits *in vivo* aktiviert wurden. Um diese Frage zu klären, müssten Oberflächenmarker und der Aktivierungsgrad von CD14⁺ Monozyten aus Patienten und Patientinnen mit denen gesunder Probanden und Probandinnen verglichen und die potentielle Persistenz der eventuellen Aktivierung über die Zellkulturzeit analysiert werden. In den Untersuchungen zu Zytokinen in Zellkulturüberständen konnten abgesehen von TNF- β bei mMo-DCs keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (siehe 4.6.3 und 5.5).

Aufgrund der geringen Anzahl an MWS-Patienten und Patientinnen war keine statistische Analyse der phänotypischen Veränderungen der Mo-DCs nach LPS-Stimulation, sondern nur eine beschreibende Interpretation möglich. Hierbei fiel auf, dass insbesondere bei der HLA-DR-Expression die Werte der beiden Probanden über dem Maximum der Kontrollen lagen. Auch die CD83- und CD86-Expression schien im Vergleich zu den Kontrollen erhöht und die CD209-Expression erniedrigt. Ebenso lagen die Werte von CD80, CD86 und HLA-DR bei der TRAPS-Patientin oberhalb des Maximums der Kontrollen. Dies lässt die Hypothese zu, dass bei MWS und TRAPS im Gegensatz zu FMF die Mo-DCs durch TLR4-Stimulation ein höheres Aktivitätsniveau im Vergleich zu gesunden Kontrollen erreichen können, also einen quasi hyperreaktiven Phänotyp besitzen. Um dies zu verifizieren wäre eine größere Anzahl an Patientenproben notwendig, insbesondere auch im Hinblick auf die teils große Streubreite der erhobenen Daten.

Ob die bei imMo-DCs beobachteten Veränderungen auch bei primären PBDCs zu finden sind, wurde mit Blutproben von FMF-Patienten und Patientinnen überprüft. Auf eine immunphänotypische Differenzierung der PBDC-Subpopulationen wurde hier aufgrund ihrer geringen Anzahl im peripheren Blut verzichtet und nur die bei imMo-DCs erhöhten Marker CD83 und CD86 auf der Gesamtpopulation der PBDCs analysiert. Interessanterweise zeigte sich in

Übereinstimmung mit den Ergebnissen bei imMo-DCs eine signifikant erhöhte Expression von CD86 in FMF-PBDCs, welche die Hypothese der verstärkten DC-Aktivierung auch *in vivo* stützte. Die CD83-Expression war ebenfalls tendenziell erhöht, wenn auch (noch) nicht statistisch signifikant. Hierbei muss bedacht werden, dass reife PBDCs aus dem Blut in lymphatische Organe auswandern. So fanden sich z. B. bei SLE-Patienten und Patientinnen trotz hoher IFN-Spiegel nur sehr wenige IFN-produzierende PDC im peripheren Blut, da sie vermutlich ins Gewebe ausgewandert waren (Cederblad et al., 1998; Blomberg et al., 2001; Blomberg et al., 2003). Somit könnten die aufgrund der Krankheit aktivierten DCs nur in geringem Maße im Blut zu finden sein (vergleiche dazu Decker et al., 2006) und man müsste daher die DCs aller peripheren Gewebe des Körpers in die Analyse einbeziehen, insbesondere die DCs in den lymphatischen Organen.

5.3. T-Zell-stimulatorische Kapazität der Mo-DCs von Patienten und Patientinnen mit FMF und MWS

Wenn DCs ausreifen und zu mDCs werden, verändern sie auch ihre Funktionen. So reagieren sie weniger auf Signale wie PAMPs oder DAMPs, migrieren dafür aber stärker und steigern ihre T-Zell-Stimulations-Kapazitäten.

Die phänotypische Analyse der FMF- und MWS-imMo-DCs ergab das Bild von bereits aktivierteren imMo-DCs im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Insbesondere die signifikant erhöhte Expression von CD83, CD86 und HLA-DR legte nahe, dass diese imMo-DCs potentere T-Zell-Stimulatoren sind. Dies wurde durch die Beobachtung untermauert, dass FMF-imMo-DCs eine signifikant höhere Kapazität zur Stimulation von allogenen T-Zellen im Proliferationsassay zeigten, welche sogar das Niveau von mMo-DCs der gesunden Kontrollen überstieg (Abbildung 17).

Musabak et al., 2004 hatten bereits gezeigt, dass verschiedene T-Zell-Subpopulationen im Blut von FMF-Patienten und Patientinnen im Vergleich zu gesunden Probanden und Probandinnen sowohl absolut als auch prozentual signifikant erhöht sind und daher von einer vermehrten Aktivität ausgegangen werden könnte. Auch Kholoussi et al., 2018 fanden erhöhte Zahlen von CD3⁺,

CD4⁺ und CD8⁺ Zellen bei FMF-Patienten und Patientinnen im Vergleich zu gesunden Probanden und Probandinnen.

In Zusammenschau mit den hier vorgelegten Daten könnten diese Beobachtungen eine Folge von reiferen DCs sein, die sehr potent T-Zellen zur Proliferation anregen können. In zukünftigen Untersuchungen wäre es daher von großem Interesse, die T-Zellen von Patienten und Patientinnen mit autoinflammatorischen Erkrankungen eingehend phänotypisch und funktionell zu untersuchen.

Zur Verifizierung der Ergebnisse mit MWS-imMo-DCs sind aufgrund der großen Streubreite der erhobenen Daten der vier untersuchten Proben weitere Experimente mit größeren Fallzahlen nötig (Abbildung 18).

5.4. Migration der Mo-DCs von Patienten und Patientinnen mit FMF und MWS

Zur Migration in Richtung lymphatischer Organe reagieren mDCs auf die Chemokine CCL19 und CCL21, welche vom Chemokinrezeptor CCR7 erkannt werden. Interessanterweise konnte keine verstärkte Expression von CCR7 auf den *in vitro* generierten Mo-DCs festgestellt werden, weder im Vergleich von gesunden Probanden und Probandinnen mit Patienten und Patientinnen noch im Vergleich von imMo-DCs mit mMo-DCs. Trotzdem zeigten die mMo-DCs aller Gruppen eine gesteigerte Migrationsfähigkeit mit oder ohne CCL19 als Chemoattraktant im Transwell-Assay. Im Vergleich von gesunden Probanden und Probandinnen mit FMF- oder MWS-Patienten und Patientinnen konnten wir feststellen, dass die FMF-/MWS-Mo-DCs generell eine vermehrte Chemotaxis zeigten und diese bei FMF- und MWS-imMo-DCs signifikant erhöht ist.

Auch diese Beobachtungen untermauern die Hypothese, dass bei den untersuchten autoinflammatorischen Erkrankungen die DCs bereits inhärent ein erhöhtes Aktivierungsniveau haben und daher auch funktionell mehr reifen DCs ähneln.

5.5. Zytokinsekretion durch Mo-DCs von Patienten und Patientinnen mit FMF

Durch die Aktivierung und Reifung unter physiologischen Bedingungen verändert sich das Zytokinprofil der DCs. Von besonderem Interesse war in diesem Kontext die Frage, ob sich bei FMF-Mo-DCs eine erhöhte IL-1 β - und/oder IL-18-Sekretion nachweisen lässt, da diese beiden Zytokine durch die Aktivierung des Pyrin-Inflammasoms aktiviert und sezerniert werden. Es konnte jedoch in ELISAs bei beiden Zytokinen in den Zellkulturüberständen der Mo-DCs kein signifikanter Unterschied zwischen FMF-Patienten und Patientinnen und gesunden Probanden und Probandinnen festgestellt werden. Auch bei der inaktiven Form des IL-1 β , dem Pro-IL-1 β , gab es keinen Unterschied. Als Proform kommt es allerdings auch hauptsächlich intrazellulär und weniger in Zellkulturüberständen sezerniert vor. Zur weiteren Abklärung wären daher intrazelluläre Zytokinfärbungen in Kombination mit Durchflusszytometrie notwendig.

Auch im Serum von FMF-Patienten und Patientinnen wurden keine erhöhten IL-1 β -Konzentrationen gefunden (Koga et al., 2016), allerdings konnten sowohl in Remission als auch während einer Fieberattacke erhöhte IL-18-Spiegel im Vergleich zu gesunden Kontrollen nachgewiesen werden (Koga et al., 2016; Haznedaroglu et al., 2005). Beim Vergleich mit diesen Literaturdaten ist jedoch zu beachten, dass die Zytokine im Serum auch von anderen Zellen und weniger von DCs stammen könnten. Besonders auffallend war auch bei der hier vorgelegten Arbeit, dass in einigen Zellkulturüberständen kein IL-1 β oder IL-18 mittels ELISA nachweisbar war. Hier könnte die Sensitivität des ELISAs zur Detektion nicht ausgereicht haben. Zudem wäre denkbar, dass die Zytokine unter den hier angewandten Bedingungen zu instabil sind und damit unter die Nachweisgrenze des ELISAs fallen.

Die weiteren untersuchten Zytokine IL-1 α , IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IFN- γ und TNF- α konnten in der hier vorliegenden Arbeit in den Zellkulturüberständen der Mo-DCs entweder nicht detektiert oder kein Unterschied zu gesunden Kontrollen festgestellt werden.

Hingegen war in unseren Zellkulturüberständen die Konzentration von TNF- β , einem proinflammatorischen Protein, bei mMo-DCs von FMF-Patienten und Patientinnen im Vergleich zu den Kontrollen signifikant erhöht. Damit passt auch diese Beobachtung zu unserer Hypothese von bereits reiferen DCs bei FMF.

Zu TNF- β in FMF-Patienten und Patientinnen ist in der Literatur nach unserer Kenntnis bisher nichts beschrieben. Aufgrund dieser Beobachtung wäre jedoch eine weitere Untersuchung des TNF- β -Spiegels bei Patienten im aktiven Schub von großem Interesse.

5.6. Analyse der DCs eines Patienten im aktiven FMF-Schub (Fallbericht)

Während des Studienzeitraums konnte ein Patient im aktiven Fieberschub für die Studie akquiriert werden. Dabei erfolgte die Blutentnahme vor Beginn der akuten Therapie. Zudem lag vom selben Patienten bereits eine Probe von zwei Monaten davor als Vergleich vor. Dieser Patient war daher besonders interessant, um Veränderungen durch die Krankheitsaktivität zu untersuchen. Auffallend war vor allem die starke Suszeptibilität der Mo-DCs auf die Stimulation mit LPS. Insbesondere Aktivierungs- und Reifungsmarker wie HLA-DR, CD86 oder CD40 überstiegen dabei die bei gesunden Probanden und Probandinnen und FMF-Patienten und Patientinnen in Remission gemessenen Maximalwerte. Die imMo-DCs unterschieden sich nicht von Patienten und Patientinnen in Remission. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Mo-DCs von Patienten und Patientinnen im FMF-Schub stärker auf Stimuli reagieren, aber ihre Grundaktivität nicht erhöht ist. Somit würden kleinere Reize ausreichen stärkere Entzündungsreaktionen auszulösen, was zum klinischen Krankheitsbild der plötzlich eintretenden Entzündungsphasen passen würde.

Die verringerte Frequenz der PBDC-Subpopulationen im Blut lässt sich möglicherweise mit der initialen Methotrexat-Einnahme erklären (siehe 5.8). Zum Zeitpunkt des Fieberschubes hatte der Patient bereits ca. einen Monat kein Methotrexat mehr aufgrund von Nebenwirkungen eingenommen. Dass auch hier weniger DCs im Blut zu finden waren, könnte neben einer

Restwirkung des Methotrexats auch an einer aufgrund der Entzündungsaktivität vermehrten Migration der DCs ins Gewebe gelegen haben.

Eine erhöhte T-Zell-stimulatorische Kapazität der Mo-DCs dieses Patienten konnte hingegen nicht nachgewiesen werden. Vielmehr lag sie im Schub unterhalb der Vergleichsprobe aus der Remissionszeit. Diese Einzelfallbeobachtungen bedürfen einer Validierung mit größerer Stichprobenzahl.

5.7. Potentieller Einfluss der Colchicin- und Anti-IL-1 β -Therapie auf Frequenz, Phänotyp und Funktion von DCs

Colchicin ist als Spindelgift bekannt, welches die Mitose in der Metaphase hemmt. Durch die Bindung an Tubulin verhindert es die Polymerisation von Mikrotubuli. Diese sind neben der Zellteilung auch an diversen weiteren zellulären Prozessen beteiligt, wie der Erhaltung der Zellform, Migration, Zytokin- und Chemokin-Sekretion oder dem intrazellulären Transport. Dies alles sind Prozesse, die auch bei Immunzellen eine wichtige Rolle spielen. Hier wird angenommen, dass die Hauptwirkung von Colchicin in der Reduktion der Chemotaxis, Adhäsion und Mobilität von Leukozyten, vor allem der Neutrophilen, liegt (Paschke et al., 2013; Fordham et al., 1981; Ehrenfeld et al., 1980; Caner, 1965; reviewed in Leung et al., 2015).

Bei FMF ist Colchicin die Standardtherapie. Daher war die überwiegende Mehrzahl der in der vorliegenden Studie eingeschlossenen Patienten und Patientinnen seit Jahren unter dieser Behandlung. Colchicin kann sich in Leukozyten anreichern und dort deutlich höhere Konzentrationen im Vergleich zum Blutplasma erreichen (reviewed in Leung et al., 2015; Chappey et al., 1993). Ehrenfeld et al., 1980 konnten z. B. nach 8 Tagen oralem Colchicin (1 mg/d) eine verminderte Chemotaxis der polymorphonukleären Zellen zeigen, welche erst nach wenigen Tagen nachließ.

Wie sich oral eingenommenes Colchicin auf die Zellkultur, insbesondere bei Mo-DCs auswirkt, ist nicht bekannt. In Zusammenschau lässt sich ein Einfluss des Colchicins auf die hier erhobenen Daten der Mo-DCs und PBDCs jedoch nicht mit absoluter Sicherheit ausschließen. Nichtsdestotrotz zeigten die

Mo-DCs der Patienten und Patientinnen sogar eine verstärkte gezielte und ungezielte Migration (Abbildung 14 und Abbildung 15) und damit keine erkennbare Hemmung der Chemotaxis. Weitere Untersuchungen mit einer FMF-Kontrollgruppe, welche kein Colchicin erhält, könnten hier Aufschluss geben.

Anakinra ist ein rekombinanter Anti-IL-1-Rezeptor-Antikörper und wird unter anderem bei Rheumatoider Arthritis, CAPS, Still-Syndrom und FMF eingesetzt. Es blockiert die Wirkung von IL-1 α und IL-1 β am IL-1-Rezeptor durch kompetitive Hemmung, aber auch intrazelluläre Effekte sind beschrieben worden (van de Veerdonk et al., 2022; Pariano et al., 2021). Canakinumab bindet als Antikörper gegen IL-1 β nicht primär an Zellen. Wie sich diese beiden Medikamente speziell auf DCs auswirken oder sich ihre Konzentration in Zellpräparation und -kultur verhält ist meines Wissens nach nicht bekannt. Ein störender Einfluss kann daher nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, kann aber im Vergleich zu Colchicin anhand der Wirkmechanismen als eher weniger relevant eingestuft werden.

5.8. Potentieller Einfluss einer immunsuppressiven Therapie auf Frequenz, Phänotyp und Funktion von DCs

Fünf FMF-Patienten und Patientinnen nahmen eines oder mehrere der immunsuppressiven Medikamente Prednisolon, Methotrexat und Azathioprin teils zusätzlich zu Colchicin ein. Daher wurden diese Patienten und Patientinnen als separate Gruppe betrachtet.

Bei der Untersuchung der Frequenz der PBDC-Subpopulationen konnte eine signifikante Reduktion sowohl der PDC- als auch beider MDC-Populationen beobachtet werden (Abbildung 7). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass Immunsuppressiva einen Einfluss auf die Frequenz der PBDCs haben. Dementsprechend sind solche Effekte auch in der Literatur beschrieben. So fanden z. B. Shodell et al., 2003 eine Reduktion der PDC unter Prednisolon bei Gesunden. Auch Hsu et al., 2004 und Mitosek-Szewczyk et al., 2009 zeigten bei Idiopathischer Thrombozytopenie bzw. Multipler Sklerose, dass die Frequenz der PBDCs unter Prednisolontherapie erniedrigt war.

In Bezug auf Phänotyp und Funktion der DCs ist beispielsweise für das Steroid Dexamethason vorbeschrieben, dass es die Reifung der DCs inhibiert und zu einer niedrigen MHC-II- und CD86-Expression führt (reviewed in Mackern-Oberti et al., 2015). Der aktive Metabolit von Azathioprin, 6-Mercaptopurin, kann ebenfalls die DC-Aktivierung/Reifung inhibieren (Aldinucci et al., 2010).

Bei den *in vitro* Versuchen an Mo-DCs konnten in der vorgelegten Arbeit keine signifikanten Unterschiede des Phänotyps oder der Funktion im Vergleich zu nur mit Colchicin behandelten Patienten und Patientinnen festgestellt werden. Die Zellen wurden jedoch nicht unter weiterer Zugabe der Medikamente kultiviert, sodass deren Auswirkungen auf die Mo-DCs in unserem experimentellen Setting nicht benannt werden können.

5.9. Probleme und Grenzen dieser Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurden die Frequenzen von DC-Subpopulationen und die Aktivierungsmarker CD83 und CD86 auf PBDCs aus dem peripheren Blut von Patienten und Patientinnen untersucht. Da sich jedoch im Blut nur eine geringe Anzahl an PBDCs befindet und aktivierte DCs in die Lymphknoten auswandern, wurde zur Durchführung der umfassenden phänotypischen und funktionellen Analysen auf das etablierte *In-vitro*-Modell der Mo-DCs zurückgegriffen. Dadurch hielten sich auch die Blutentnahmemengen für die Patienten und Patientinnen in einem zumutbaren Rahmen. Die hier *in vitro* erlangten Ergebnisse sollten jedoch vor diesem Hintergrund betrachtet werden.

Zudem konnte aufgrund der Seltenheit der Erkrankungen im Zeitrahmen dieser Arbeit nicht für alle Entitäten genügend große Stichprobenzahlen erreicht werden, sodass eine statistisch valide Analyse der Daten nicht immer möglich war.

Eine weitere Limitation der Studie lag darin, dass die Patienten und Patientinnen schon lange in Therapie waren und zum Zeitpunkt der Blutabnahme keine Symptome hatten. Somit bilden die hier dargestellten Ergebnisse den Zustand in Remission ab. Für einen besseren Einblick in die direkte Krankheitspathogenese wären daher Proben von Patienten und Patientinnen vor Erstdiagnose (meist im Kindesalter) oder im Schub

wünschenswert. Jedoch sind schwere Schübe mit den heutigen Behandlungsmöglichkeiten selten. Somit kann diese Arbeit, abgesehen von einem singulären Fallbericht, keine Aussagen über die Rolle der DCs in aktiven Krankheitsschüben machen.

5.10. Ausblick

Mit den Ergebnissen dieser Arbeit wurde zum ersten Mal gezeigt, dass auch die DCs bei autoinflammatorischen Krankheiten, im Speziellen bei FMF und MWS, sowie, vorbehaltlich weiterer Untersuchungen, auch TRAPS, im Sinne einer verstärkten Aktivierung pathologisch verändert sind. Da DCs eine maßgebliche Rolle bei der Aktivierung von T-Zellen spielen, kann die Hypothese aufgestellt werden, dass auch deren Aktivität beeinflusst und sie durch diese DCs verstärkt aktiviert werden.

In weitergehenden Untersuchungen könnte nun beispielsweise die Interaktion der Mo-DCs von Patienten und Patientinnen mit T-Zellen in Kokulturen analysiert werden. Auch wäre die eingehende phänotypische und funktionelle Analyse primärer T-Zellen aus peripherem Blut von Patienten und Patientinnen von großem Interesse. Insbesondere zur weiteren Erforschung der Pathogenese wären dabei vor allem Patienten und Patientinnen, welche noch keine Therapie erhalten haben oder sich im akuten Schub befinden, besonders interessant.

NF- κ B ist ein zentrales Molekül inflammatorischer Signalwege und wird u. a. durch von Caspase-1 gespaltenem Pyrin aktiviert (Chae et al., 2008). Somit wären auch Analysen dieses Signalwegs in DCs von FMF-Patienten und Patientinnen sehr interessant. In eigenen ersten Experimenten konnte bereits mittels Western Blots eine erhöhte Expression von aktiviertem p-NF- κ B bei imMo-DCs und mMo-DCs von einem bzw. drei der vier FMF-Patienten und Patientinnen im Vergleich zu gesunden Probanden und Probandinnen beobachtet werden. Diese präliminären Daten bilden eine Grundlage für weitere Untersuchungen dieses Signalwegs bei FMF-DCs.

Insgesamt sind die Ergebnisse dieser Arbeit ein starker Hinweis darauf, dass DCs auch bei autoinflammatorischen Erkrankungen eine Rolle in der

Diskussion

Pathogenese spielen. Daher ist es naheliegend, DCs auch diagnostisch und als Ziel zukünftiger Therapien autoinflammatorischer Erkrankungen in Betracht zu ziehen. In der Tumorthherapie und auch bei autoimmunologischen Krankheiten wird z. B. die Generierung von tolerogenen DCs (tolDCs), welche regulatorische T-Zellen (Tregs) induzieren können, therapeutisch angestrebt. So gibt es bereits Phase I Studien mit tolDCs z. B. bei Diabetes oder Rheumatoider Arthritis (Bell et al., 2017; Giannoukakis et al., 2011; reviewed in Domogalla et al., 2017). Dementsprechend könnten sich hieraus auch bei autoinflammatorischen Erkrankungen therapeutische Optionen ergeben.

6. Zusammenfassung

Das Immunsystem schützt unseren Körper vor diversen internen und externen Gefahren. Durch Fehlregulation dieses komplexen und streng regulierten Systems können sogenannte autoimmunologische und autoinflammatorische Krankheiten entstehen. Dazu zählen u. a. Familiäres Mittelmeerfieber (FMF), Muckle-Wells Syndrom (MWS) und TNF-Rezeptor-assoziiertes periodisches Syndrom (TRAPS), die durch eine übermäßige Aktivität des angeborenen Immunsystems mit rezidivierenden Entzündungen gekennzeichnet sind.

Dendritische Zellen (DCs) sind professionelle antigenpräsentierende Zellen (APCs), verbinden das angeborene mit dem adaptiven Immunsystem und regulieren verschiedene Immunreaktionen. Im Gegensatz zu anderen APCs sind sie in der Lage naive T-Zellen zu aktivieren. Sie werden durch Bindung von PAMPs oder DAMPs (pathogen- bzw. danger-associated molecular patterns) an PRRs (pattern recognition receptors) aktiviert und verändern sich daraufhin sowohl morphologisch wie auch funktionell, um in Lymphknoten einwandern und effektiv andere Zellen aktivieren zu können. Über ihre Rolle bei autoinflammatorischen Erkrankungen ist jedoch nur wenig bekannt. Daher sollten in der vorliegenden Arbeit durch eingehende Untersuchung von PBDCs (DCs des peripheren Blutes) und *in vitro* generierten Mo-DCs (monocyte-derived DCs) von FMF-, MWS- und TRAPS-Patienten und Patientinnen potentielle krankheitsassoziierte Veränderungen nachgewiesen werden.

Die FACS-Analysen der PBDC-Subpopulationen ergaben keinen Unterschied der PDC-, MDC1- und MDC2-Frequenzen zwischen Patienten und Patientinnen und gesunden Probanden und Probandinnen. Bei der Analyse einer kleinen Patientengruppe unter immunsuppressiver Therapie konnte jedoch eine signifikante Reduktion der PDC festgestellt werden.

Für die weiteren umfassenden Analysen des Phänotyps und der Funktion wurden *in vitro* generierte Mo-DCs verwendet. Dazu wurden Monozyten aus dem Blut isoliert und sieben Tage lang mit IL-4 und GM-CSF kultiviert. Zur Reifung wurden imMo-DCs 24 Stunden lang mit bakteriellen Bestandteilen (LPS) stimuliert.

Zusammenfassung

Die FACS-Analyse von typischen Oberflächenmarkern zeigte bei unreifen FMF- und MWS-imMo-DCs eine signifikant erhöhte Expression der Aktivierungs- und Reifungsmarker CD83, CD86 und HLA-DR, bei gleichzeitig signifikant erniedrigter Expression der PRRs und inhibitorischen Moleküle CD206, CD209 (nur FMF) und GPNMB. Diese neuen Ergebnisse konnten zudem durch den Nachweis einer signifikant erhöhten Expression von CD86 auch auf primären PBDCs der FMF-Patienten und Patientinnen bestätigt werden.

Die eingehenden funktionellen Untersuchungen ergaben bei den FMF- und MWS-imMo-DCs eine signifikant erhöhte migratorische Kapazität sowohl mit als auch ohne den Chemoattraktant CCL19, sowie bei FMF-imMo-DCs und FMF-mMo-DCs eine signifikant stärkere Stimulation von allogenen T-Zellen im CFSE-Proliferationsassay.

Bei der Analyse verschiedener relevanter Zytokine in den Zellkulturüberständen mittels ELISA wurde für das proinflammatorische Zytokin TNF- β eine signifikante Zunahme der Konzentration bei FMF-mMo-DCs im Vergleich zu den Kontrollen beobachtet.

Abschließend konnten die DCs einer TRAPS-Patientin sowie ein FMF-Patient im aktiven Fieberschub analysiert und die Ergebnisse als Fallberichte dargestellt werden.

Zusammengefasst konnte in der hier vorliegenden Arbeit für PBDCs und/oder imMo-DCs von FMF- und MWS-Patienten und Patientinnen gezeigt werden, dass sie sowohl phänotypisch als auch funktionell intrinsisch aktivierter waren und somit reiferen DCs glichen. Dies legt die Hypothese nahe, dass sie bei der Pathogenese autoinflammatorischer Erkrankungen eine Rolle spielen. DCs sollten daher bei diesen Erkrankungen weiter erforscht und auch diagnostisch und therapeutisch in Betracht gezogen werden.

7. Literaturverzeichnis

- Agostini, L., Martinon, F., Burns, K., McDermott, M.F., Hawkins, P.N., Tschopp, J., 2004. NALP3 forms an IL-1beta-processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. *Immunity* 20, 319–325.
- Aksentijevich, I., Nowak, M., Mallah, M., Chae, J.J., Watford, W.T., Hofmann, S.R., Stein, L., Russo, R., Goldsmith, D., Dent, P., Rosenberg, H.F., Austin, F., Remmers, E.F., Balow, J.E., Rosenzweig, S., Komarow, H., Shoham, N.G., Wood, G., Jones, J., Mangra, N., Carrero, H., Adams, B.S., Moore, T.L., Schikler, K., Hoffman, H., Lovell, D.J., Lipnick, R., Barron, K., O’Shea, J.J., Kastner, D.L., Goldbach-Mansky, R., 2002. De novo CIAS1 mutations, cytokine activation, and evidence for genetic heterogeneity in patients with neonatal-onset multisystem inflammatory disease (NOMID): a new member of the expanding family of pyrin-associated autoinflammatory diseases. *Arthritis Rheum.* 46, 3340–3348.
- Aldinucci, A., Biagioli, T., Manuelli, C., Repice, A.M., Massacesi, L., Ballerini, C., 2010. Modulating dendritic cells (DC) from immunogenic to tolerogenic responses: A novel mechanism of AZA/6-MP. *J. Neuroimmunol.* 218, 28–35.
- Aróstegui, J.I., Solís, P., Aldea, A., Cantero, T., Rius, J., Bahillo, P., Plaza, S., Vives, J., Gómez, S., Yagüe, J., 2005. Etanercept plus colchicine treatment in a child with tumour necrosis factor receptor-associated periodic syndrome abolishes auto-inflammatory episodes without normalising the subclinical acute phase response. *Eur. J. Pediatr.* 164, 13–16.
- Autenrieth, S.E., Grimm, S., Rittig, S.M., Grünebach, F., Gouttefangeas, C., Bühring, H.-J., 2015. Profiling of primary peripheral blood- and monocyte-derived dendritic cells using monoclonal antibodies from the HLDA10 Workshop in Wollongong, Australia. *Clin. Transl. Immunol.* 4, e50.
- Awad, F., Assrawi, E., Louvrier, C., Jumeau, C., Georgin-Lavialle, S., Grateau, G., Amselem, S., Giurgea, I., Karabina, S.-A., 2018. Inflammasome biology, molecular pathology and therapeutic implications. *Pharmacol. Ther.*
- Bachem, A., Güttler, S., Hartung, E., Ebstein, F., Schaefer, M., Tannert, A., Salama, A., Movassaghi, K., Opitz, C., Mages, H.W., Henn, V., Kloetzel, P.-M., Gurka, S., Kroczeck, R.A., 2010. Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c+CD141+ cells as homologues of mouse CD8+ dendritic cells. *J. Exp. Med.* 207, 1273–1281.
- Bachetti, T., Chiesa, S., Castagnola, P., Bani, D., Di Zanni, E., Omenetti, A., D’Ossualdo, A., Fraldi, A., Ballabio, A., Ravazzolo, R., Martini, A., Gattorno, M., Ceccherini, I., 2013. Autophagy contributes to inflammation in patients with TNFR-associated periodic syndrome (TRAPS). *Ann. Rheum. Dis.* 72, 1044–1052.

- Bakele, M., Joos, M., Burdi, S., Allgaier, N., Pöschel, S., Fehrenbacher, B., Schaller, M., Marcos, V., Kümmerle-Deschner, J., Rieber, N., Borregaard, N., Yazdi, A., Hector, A., Hartl, D., 2014. Localization and Functionality of the Inflammasome in Neutrophils. *J. Biol. Chem.* 289, 5320–5329.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.-J., Pulendran, B., Palucka, K., 2000. Immunobiology of Dendritic Cells. *Annu. Rev. Immunol.* 18, 767–811.
- Banchereau, J., Steinman, R.M., 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245–252.
- Barrat, F.J., Meeker, T., Gregorio, J., Chan, J.H., Uematsu, S., Akira, S., Chang, B., Duramad, O., Coffman, R.L., 2005. Nucleic acids of mammalian origin can act as endogenous ligands for Toll-like receptors and may promote systemic lupus erythematosus. *J. Exp. Med.* 202, 1131–1139.
- Bell, G.M., Anderson, A.E., Diboll, J., Reece, R., Eltherington, O., Harry, R.A., Fouweather, T., MacDonald, C., Chadwick, T., McColl, E., Dunn, J., Dickinson, A.M., Hilkens, C.M.U., Isaacs, J.D., 2017. Autologous tolerogenic dendritic cells for rheumatoid and inflammatory arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 76, 227–234.
- Ben-Chetrit, E., Gattorno, M., Gul, A., Kastner, D.L., Lachmann, H.J., Touitou, I., Ruperto, N., On behalf of the Paediatric Rheumatology International Trials Organisation (PRINTO) and the AIDs Delphi study participants, 2018. Consensus proposal for taxonomy and definition of the autoinflammatory diseases (AIDs): a Delphi study. *Ann. Rheum. Dis.* 77, 1558–1565.
- Ben-Chetrit, E., Levy, M., 1998. Familial Mediterranean fever. *Lancet* 351, 659–664.
- Ben-Chetrit, E., Touitou, I., 2009. Familial Mediterranean Fever in the World. *Arthritis Rheum.* 61, 1447–1453.
- Ben-Zvi, I., Livneh, A., 2014. Colchicine failure in familial mediterranean fever and potential alternatives: Embarking on the Anakinra trial. *Isr. Med. Assoc. J.* 16, 271–273.
- Bernhard, H., Disis, M.L., Heimfeld, S., Hand, S., Gralow, J.R., Cheever, M.A., 1995. Generation of Immunostimulatory Dendritic Cells from Human CD34+ Hematopoietic Progenitor Cells of the Bone Marrow and Peripheral Blood. *Cancer Res.* 55, 1099–1104.
- Bernot, A., da Silva, C., Petit, J.-L., Cruaud, C., Caloustian, C., Castet, V., Ahmed-Arab, M., Dross, C., Dupont, M., Cattan, D., Smaoui, N., Dodé, C., Pêcheux, C., Nédelec, B., Medaxian, J., Rozenbaum, M., Rosner, I., Delpech, M., Grateau, G., Demaille, J., Weissenbach, J., Touitou, I., 1998. Non-founder mutations in the MEFV gene establish this gene as the cause of familial Mediterranean fever (FMF). *Hum. Mol. Genet.* 7, 1317–1325.
- Blomberg, S., Eloranta, M.L., Cederblad, B., Nordlin, K., Alm, G. V, Ronnblom, L., 2001. Presence of cutaneous interferon-alpha producing cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 10, 484–490.
- Blomberg, S., Eloranta, M.L., Magnusson, M., Alm, G. V, Ronnblom, L., 2003. Expression of the markers BDCA-2 and BDCA-4 and production of

- interferon-alpha by plasmacytoid dendritic cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 48, 2524–2532.
- Boks, M.A., Kager-Groenland, J.R., Haasjes, M.S.P., Zwaginga, J.J., van Ham, S.M., ten Brinke, A., 2012. IL-10-generated tolerogenic dendritic cells are optimal for functional regulatory T cell induction - a comparative study of human clinical-applicable DC. *Clin. Immunol.* 142, 332–342.
- Bonilla, F.A., Oettgen, H.C., 2010. Adaptive immunity. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125, S33–S40.
- Brizi, M.G., Galeazzi, M., Lucherini, O.M., Cantarini, L., Cimaz, R., 2012. Successful Treatment of Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Periodic Syndrome With Canakinumab. *Ann. Intern. Med.* 156, 907–908.
- Brossart, P., Grünebach, F., Stuhler, G., Reichardt, V.L., Mohle, R., Kanz, L., Brugger, W., Möhle, R., Kanz, L., Brugger, W., 1998. Generation of Functional Human Dendritic Cells From Adherent Peripheral Blood Monocytes by CD40 Ligation in the Absence of Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor. *Blood* 92, 4238–4247.
- Caner, J.E.Z., 1965. Colchicine inhibition of chemotaxis. *Arthritis Rheum.* 8, 757–764.
- Cantarini, L., Rigante, D., Lucherini, O.M., Cimaz, R., Laghi Pasini, F., Baldari, C.T., Benucci, M., Simonini, G., Di Sabatino, V., Brizi, M.G., Galeazzi, M., 2010. Role of etanercept in the treatment of tumor necrosis factor receptor-associated periodic syndrome: personal experience and review of the literature. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 23, 701–707.
- Caux, C., Dezutter-Dambuyant, C., Schmitt, D., Banchereau, J., 1992. GM-CSF and TNF- α cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature* 360, 258–261.
- Cederblad, B., Blomberg, S., Vallin, H., Perers, A., Alm, G. V, Ronnblom, L., 1998. Patients with systemic lupus erythematosus have reduced numbers of circulating natural interferon-alpha-producing cells. *J Autoimmun* 11, 465–470.
- Centola, M., Wood, G., Frucht, D.M., Galon, J., Aringer, M., Farrell, C., Kingma, D.W., Horwitz, M.E., Mansfield, E., Holland, S.M., O 'shea, J.J., Rosenberg, H.F., Malech, H.L., Kastner, D.L., 2000. The gene for familial Mediterranean fever, MEFV, is expressed in early leukocyte development and is regulated in response to inflammatory mediators. *Blood* 95, 3223–3231.
- Chae, J.J., Cho, Y.H., Lee, G.S., Cheng, J., Liu, P.P., Feigenbaum, L., Katz, S.I., Kastner, D.L., 2011. Gain-of-Function Pyrin Mutations Induce NLRP3 Protein-Independent Interleukin-1 β Activation and Severe Autoinflammation in Mice. *Immunity* 34, 755–768.
- Chae, J.J., Wood, G., Masters, S.L., Richard, K., Park, G., Smith, B.J., Kastner, D.L., 2006. The B30.2 domain of pyrin, the familial Mediterranean fever protein, interacts directly with caspase-1 to modulate IL-1beta production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 9982–9987.
- Chae, J.J., Wood, G., Richard, K., Jaffe, H., Colburn, N.T., Masters, S.L., Gumucio, D.L., Shoham, N.G., Kastner, D.L., 2008. The Familial

Literaturverzeichnis

- Mediterranean fever protein, pyrin, is cleaved by caspase-1 and activates NF-kappaB through its N-terminal fragment. *Blood* 112, 1794–1803.
- Chappey, O.N., Niel, E., Wautier, J.-L., Hung, P.P., Dervichian, M., Cattan, D., Scherrmann, J.M., 1993. Colchicine disposition in human leukocytes after single and multiple oral administration. *Clin. Pharmacol. Ther.* 54, 360–367.
- Chapuis, F., Rosenzweig, M., Yagello, M., Ekman, M., Biberfeld, P., Gluckman, J.C., 1997. Differentiation of human dendritic cells from monocytes in vitro. *Eur. J. Immunol.* 27, 431–441.
- Collin, M., Bigley, V., 2018. Human dendritic cell subsets: an update. *Immunology* 154, 3–20.
- Cudrici, C., Deutch, N., Aksentijevich, I., 2020. Revisiting TNF Receptor-Associated Periodic Syndrome (TRAPS): Current Perspectives. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 3263.
- Daniels, M., Shohat, T., Brenner-Ullman, A., Shohat, M., 1995. Familial Mediterranean fever: high gene frequency among the non-Ashkenazic and Ashkenazic Jewish populations in Israel. *Am. J. Med. Genet.* 55, 311–314.
- De Benedetti, F., Gattorno, M., Anton, J., Ben-Chetrit, E., Frenkel, J., Hoffman, H.M., Koné-Paut, I., Lachmann, H.J., Ozen, S., Simon, A., Zeff, A., Calvo Penades, I., Moutschen, M., Quartier, P., Kasapcopur, O., Shcherbina, A., Hofer, M., Hashkes, P.J., Van der Hilst, J., Hara, R., Bujan-Rivas, S., Constantin, T., Gul, A., Livneh, A., Brogan, P., Cattalini, M., Obici, L., Lheritier, K., Speziale, A., Junge, G., 2018. Canakinumab for the Treatment of Autoinflammatory Recurrent Fever Syndromes. *N. Engl. J. Med.* 378, 1908–1919.
- de Torre-Minguela, C., del Castillo, P.M., Pelegrín, P., Mesa Del Castillo, P., Pelegrín, P., 2017. The NLRP3 and pyrin inflammasomes: Implications in the pathophysiology of autoinflammatory diseases. *Front. Immunol.* 8, 43.
- Decker, P., Kötter, I., Klein, R., Berner, B., Rammensee, H.G., 2006. Monocyte-derived dendritic cells over-express CD86 in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* 45, 1087–1095.
- Delves, P.J., Roitt, I.M., 2000a. The immune system. First of two parts. *N. Engl. J. Med.* 343, 37–49.
- Delves, P.J., Roitt, I.M., 2000b. The immune system - Second of two parts. *N. Engl. J. Med.* 343, 108–117.
- Dempsey, P.W., Vaidya, S.A., Cheng, G., 2003. The Art of War: Innate and adaptive immune responses. *Cell. Mo. Life Sci.* 60, 2604 – 2621.
- Dewalle, M., Domingo, E., Rozenbaum, M., Etrit, B.-C., Cattan, D., Bernot, A., Dross, C., Dupont, M., Notarnicola, E., Levy, M., Rosner, I., Demaille, J., Toutou, I., 1998. Phenotype-genotype correlation in Jewish patients suffering from familial Mediterranean fever (FMF). *Eur. J. Hum. Genet.* 6, 95–97.
- Diaz, A., Hu, C., Kastner, D.L., Schaner, P., Reginato, A.M., Richards, N., Gumucio, D.L., 2004. Lipopolysaccharide-induced expression of multiple alternatively spliced MEFV transcripts in human synovial fibroblasts: A

- prominent splice isoform lacks the C-terminal domain that is highly mutated in familial mediterranean fever. *Arthritis Rheum.* 50, 3679–3689.
- Dieu, M.C., Vanbervliet, B., Vicari, A., Bridon, J.M., Oldham, E., Ait-Yahia, S., Briere, F., Zlotnik, A., Lebecque, S., Caux, C., 1998. Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J Exp Med* 188, 373–386.
- Ding, D., Mehta, H., McCune, W.J., Kaplan, M.J., 2006. Aberrant phenotype and function of myeloid dendritic cells in systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 177, 5878–5889.
- Domogalla, M.P., Rostan, P. V, Raker, V.K., Steinbrink, K., 2017. Tolerance through Education: How Tolerogenic Dendritic Cells Shape Immunity. *Front. Immunol.* 8, 1764.
- Dzionek, A., Fuchs, A., Schmidt, P., Cremer, S., Zysk, M., Miltenyi, S., Buck, D.W., Schmitz, J., Kraft, D., Kinet, J.P., Stingl, G., 2000. BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J. Immunol.* 165, 6037–6046.
- Ehrenfeld, M., Levy, M., Bar Eli, M., Gallily, R., Eliakim, M., 1980. Effect of colchicine on polymorphonuclear leucocyte chemotaxis in human volunteers. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 10, 297–300.
- Enk, A.H., Angeloni, V.L., Udey, M.C., Katz, S.I., 1993. Inhibition of Langerhans cell antigen-presenting function by IL-10. A role for IL-10 in induction of tolerance. *J. Immunol.* 151, 2390–2398.
- Fink, S.L., Cookson, B.T., 2006. Caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages. *Cell. Microbiol.* 8, 1812–1825.
- Fiore, N., Castellano, G., Blasi, A., Capobianco, C., Loverre, A., Montinaro, V., Netti, S., Torres, D., Manno, C., Grandaliano, G., Ranieri, E., Schena, F.P., Gesualdo, L., 2008. Immature myeloid and plasmacytoid dendritic cells infiltrate renal tubulointerstitium in patients with lupus nephritis. *Mol Immunol* 45, 259–265.
- Flores-Romo, L., Björck, P., Duvert, V., van Kooten, C., Saeland, S., Banchereau, J., 1997. CD40 Ligation on Human Cord Blood CD34+Hematopoietic Progenitors Induces Their Proliferation and Differentiation into Functional Dendritic Cells. *J. Exp. Med.* 185, 341–350.
- Fordham, J.N., Kirwan, J., Cason, J., F Currey, H.L., 1981. Prolonged reduction in polymorphonuclear adhesion following oral colchicine. *Ann. Rheum. Dis.* 40, 605–608.
- French FMF Consortium, 1997. A candidate gene for familial Mediterranean fever. *Nat. Genet.* 17, 25–31.
- Fritz, J.H., Ferrero, R.L., Philpott, D.J., Girardin, S.E., 2006. Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. *Nat. Immunol.* 7, 1250–1257.
- Frizinsky, S., Haj-Yahia, S., Machnes Maayan, D., Lifshitz, Y., Maoz-Segal, R., Offengenden, I., Kidon, M., Agmon-Levin, N., 2019. The innate immune perspective of autoimmune and autoinflammatory conditions. *Rheumatology* 58, vi1–vi8.

- Funk, T., Fuchs, A.R., Altdörfer, V.S., Klein, R., Autenrieth, S.E., Müller, M.R., Salih, H.R., Henes, J., Grünebach, F., Dörfel, D., 2020. Monocyte-derived dendritic cells display a highly activated phenotype and altered function in patients with familial Mediterranean fever. *Clin. Exp. Immunol.* 201, 1–11.
- Ganguly, D., Haak, S., Sisirak, V., Reizis, B., 2013. The role of dendritic cells in autoimmunity. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 566–577.
- Gao, W., Yang, J., Liu, W., Wang, Y., Shao, F., 2016. Site-specific phosphorylation and microtubule dynamics control Pyrin inflammasome activation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, E4857–E4866.
- Gattorno, M., Hofer, M., Federici, S., Vanoni, F., Bovis, F., Aksentijevich, I., Anton, J., Arostegui, J.I., Barron, K., Ben-Cherit, E., Brogan, P.A., Cantarini, L., Ceccherini, I., De Benedetti, F., Dedeoglu, F., Demirkaya, E., Frenkel, J., Goldbach-Mansky, R., Gul, A., Hentgen, V., Hoffman, H., Kallinich, T., Kone-Paut, I., Kuemmerle-Deschner, J., Lachmann, H.J., Laxer, R.M., Livneh, A., Obici, L., Ozen, S., Rowczenio, D., Russo, R., Shinar, Y., Simon, A., Toplak, N., Touitou, I., Uziel, Y., van Gijn, M., Foell, D., Garassino, C., Kastner, D., Martini, A., Sormani, M.P., Ruperto, N., 2019. Classification criteria for autoinflammatory recurrent fevers. *Ann. Rheum. Dis.* 78, 1025–1032.
- Gattorno, M., Obici, L., Cattalini, M., Tormey, V., Abrams, K., Davis, N., Speziale, A., Bhansali, S.G., Martini, A., Lachmann, H.J., 2017. Canakinumab treatment for patients with active recurrent or chronic TNF receptor-associated periodic syndrome (TRAPS): an open-label, phase II study. *Ann. Rheum. Dis.* 76, 173–178.
- Gattorno, M., Pelagatti, M.A., Meini, A., Obici, L., Barcellona, R., Federici, S., Buoncompagni, A., Plebani, A., Merlini, G., Martini, A., 2008. Persistent efficacy of anakinra in patients with tumor necrosis factor receptor-associated periodic syndrome. *Arthritis Rheum.* 58, 1516–1520.
- Giannoukakis, N., Phillips, B., Finegold, D., Harnaha, J., Trucco, M., 2011. Phase I (safety) study of autologous tolerogenic dendritic cells in type 1 diabetic patients. *Diabetes Care* 34, 2026–2032.
- Gill, M.A., Blanco, P., Arce, E., Pascual, V., Banchereau, J., Palucka, A.K., 2002. Blood dendritic cells and DC-poietins in systemic lupus erythematosus. *Hum Immunol* 63, 1172–1180.
- Gilliet, M., Cao, W., Liu, Y.-J.J., 2008. Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 594–606.
- Goldfinger, S.E., 1972. Colchicine for familial Mediterranean fever. *N. Engl. J. Med.* 287, 1302.
- Gottenberg, J.-E., Cagnard, N., Lucchesi, C., Letourneur, F., Mistou, S., Lazure, T., Jacques, S., Ba, N., Ittah, M., Lepajolec, C., Labetoulle, M., Ardizzone, M., Sibilila, J., Fournier, C., Chiochia, G., Mariette, X., 2006. Activation of IFN pathways and plasmacytoid dendritic cell recruitment in target organs of primary Sjögren’s syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 2770–2775.

Literaturverzeichnis

- Gül, A., Ozdogan, H., Erer, B., Ugurlu, S., Kasapcopur, O., Davis, N., Sevgi, S., 2015. Efficacy and safety of canakinumab in adolescents and adults with colchicine-resistant familial Mediterranean fever. *Arthritis Res. Ther.* 17, 243.
- Gutknecht, M., Geiger, J., Joas, S., Dörfel, D., Salih, H.R., Müller, M.R., Grünebach, F., Rittig, S.M., 2015. The transcription factor MITF is a critical regulator of GPNMB expression in dendritic cells. *Cell Commun. Signal.* 13, 19.
- Hawkins, P.N., Lachmann, H.J., Aganna, E., McDermott, M.F., 2004. Spectrum of clinical features in Muckle-Wells syndrome and response to anakinra. *Arthritis Rheum.* 50, 607–612.
- Haznedaroglu, S., Oztürk, M.A., Sancak, B., Goker, B., Onat, A.M., Bukan, N., Ertelen, I., Kiraz, S., Calguneri, M., 2005. Serum interleukin 17 and interleukin 18 levels in familial Mediterranean fever. *Clin. Exp. Rheumatol.* 23, S77-80.
- Hoffman, H.M., Mueller, J.L., Broide, D.H., Wanderer, A.A., Kolodner, R.D., 2001. Mutation of a new gene encoding a putative pyrin-like protein causes familial cold autoinflammatory syndrome and Muckle-Wells syndrome. *Nat. Genet.* 29, 301–305.
- Hoffman, H.M., Throne, M.L., Amar, N.J., Sebai, M., Kivitz, A.J., Kavanaugh, A., Weinstein, S.P., Belomestnov, P., Yancopoulos, G.D., Stahl, N., Mellis, S.J., 2008. Efficacy and safety of riloncept (interleukin-1 trap) in patients with cryopyrin-associated periodic syndromes: Results from two sequential placebo-controlled studies. *Arthritis Rheum.* 58, 2443–2452.
- Hoffman, H.M., Wright, F.A., Broide, D.H., Wanderer, A.A., Kolodner, R.D., 2000. Identification of a Locus on Chromosome 1q44 for Familial Cold Urticaria. *Am. J. Hum. Genet* 66, 1693–1698.
- Hsu, N.C., Chung, C.-Y., Horng, H.-C., Chang, C.-S., 2004. Corticosteroid administration depresses circulating dendritic cells in ITP patients. *Platelets* 15, 451–454.
- Huang, X., Yuang, J., Goddard, A., Foulis, A., James, R.F., Lernmark, A., Pujol-Borrell, R., Rabinovitch, A., Somoza, N., Stewart, T.A., 1995. Interferon expression in the pancreases of patients with type I diabetes. *Diabetes* 44, 658–664.
- Ikeda, Y., Akbar, F., Matsui, H., Onji, M., 2001. Characterization of antigen-presenting dendritic cells in the peripheral blood and colonic mucosa of patients with ulcerative colitis. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 13, 841–850.
- Infevers: an online database for autoinflammatory mutations. Available at <https://infevers.umai-montpellier.fr/> together with the following references: [WWW Document], n.d.
- International FMF Consortium, 1997. Ancient missense mutations in a new member of the RoRet gene family are likely to cause familial Mediterranean fever. *The International FMF Consortium. Cell* 90, 797–807.
- Jéru, I., Hentgen, V., Cochet, E., Duquesnoy, P., Le Borgne, G., Grimprel, E., Stojanovic, K.S., Karabina, S., Grateau, G., Amselem, S., 2013. The Risk

- of Familial Mediterranean Fever in MEFV Heterozygotes: A Statistical Approach. *PLoS One* 8, 1–6.
- Jongbloed, S.L., Kassianos, A.J., McDonald, K.J., Clark, G.J., Ju, X., Angel, C.E., Chen, C.-J.J., Dunbar, P.R., Wadley, R.B., Jeet, V., Vulink, A.J.E., Hart, D.N.J., Radford, K.J., 2010. Human CD141+ (BDCA-3)+ dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens. *J. Exp. Med.* 207, 1247–1260.
- Kholoussi, S., Kholoussi, N., Zaki, M.E., El-Bassyouni, H.T., Elnady, H., Morcos, B., Abo-Shanab, A., 2018. Immunological Evaluation in Patients with Familial Mediterranean fever. *Maced. J. Med. Sci.* 15, 310–313.
- Kim, M.L., Chae, J.J., Park, Y.H., De Nardo, D., Stirzaker, R.A., Ko, H.-J., Tye, H., Cengia, L., DiRago, L., Metcalf, D., Roberts, A.W., Kastner, D.L., Lew, A.M., Lyras, D., Kile, B.T., Croker, B.A., Masters, S.L., 2015. Aberrant actin depolymerization triggers the pyrin inflammasome and autoinflammatory disease that is dependent on IL-18, not IL-1 β . *J. Exp. Med.* 212, 927–938.
- Koga, T., Migita, K., Sato, S., Umeda, M., Nonaka, F., Kawashiri, S.Y., Iwamoto, N., Ichinose, K., Tamai, M., Nakamura, H., Origuchi, T., Ueki, Y., Masumoto, J., Agematsu, K., Yachie, A., Yoshiura, K.I., Eguchi, K., Kawakami, A., 2016. Multiple serum cytokine profiling to identify combinational diagnostic biomarkers in attacks of familial mediterranean fever. *Med.* 95, e3449.
- Köller, M., Zwölfer, B., Steiner, G., Smolen, J.S., Scheinecker, C., 2004. Phenotypic and functional deficiencies of monocyte-derived dendritic cells in systemic lupus erythematosus (SLE) patients. *Int Immunol* 16, 1595–1604.
- Kuemmerle-Deschner, J.B., 2015. CAPS — pathogenesis, presentation and treatment of an autoinflammatory disease. *Semin. Immunopathol.* 37, 377–385.
- Kullenberg, T., Löfqvist, M., Leinonen, M., Goldbach-Mansky, R., Olivecrona, H., 2016. Long-term safety profile of anakinra in patients with severe cryopyrin-associated periodic syndromes. *Rheumatology* 55, 1499–1506.
- Kummer, J.A., Broekhuizen, R., Everett, H., Agostini, L., Kuijk, L., Martinon, F., van Bruggen, R., Tschopp, J., 2007. Inflammasome components NALP 1 and 3 show distinct but separate expression profiles in human tissues suggesting a site-specific role in the inflammatory response. *J. Histochem. Cytochem.* 55, 443–452.
- Lachmann, H.J., 2017. Periodic fever syndromes. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* 596–609.
- Lachmann, H.J., Kone-Paut, I., Kuemmerle-Deschner, J.B., Leslie, K.S., Hachulla, E., Quartier, P., Gitton, X., Widmer, A., Patel, N., Hawkins, P.N., 2009a. Use of Canakinumab in the Cryopyrin-Associated Periodic Syndrome. *N. Engl. J. Med.* 360, 2416–2425.
- Lachmann, H.J., Lowe, P., Felix, S.D., Rordorf, C., Leslie, K., Madhoo, S., Wittkowski, H., Bek, S., Hartmann, N., Bosset, S., Hawkins, P.N., Jung, T., 2009b. In vivo regulation of interleukin 1 β in patients with cryopyrin-associated periodic syndromes. *J. Exp. Med.* 206, 1029–1036.

Literaturverzeichnis

- Lachmann, H.J., Şengül, B., Yavuzşen, T.U., Booth, D.R., Booth, S.E., Bybee, A., Gallimore, J.R., Soytürk, M., Akar, S., Tunca, M., Hawkins, P.N., 2006. Clinical and subclinical inflammation in patients with familial Mediterranean fever and in heterozygous carriers of MEFV mutations. *Rheumatology* 45, 746–750.
- Lande, R., Gregorio, J., Facchinetti, V., Chatterjee, B., Wang, Yi-Hong, Homey, B., Cao, W., Wang, Yui-Hsi, Su, B., Nestle, F.O., Zal, T., Mellman, I., Schröder, J.-M., Liu, Y.-J., Gilliet, M., 2007. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature* 449, 564–569.
- Leung, Y.-Y.Y., Li, L., Hui, Y., Kraus, V.B., Leung, Y.-Y.Y., Hui, L.L.Y., Kraus, V.B., 2015. Colchicine --- update on mechanisms of action and therapeutic uses. *Semin Arthritis Rheum* 45, 341–350.
- Levy, R., Gérard, L., Kuemmerle-Deschner, J., Lachmann, H.J., Koné-Paut, I., Cantarini, L., Woo, P., Naselli, A., Bader-Meunier, B., Insalaco, A., Al-Mayouf, S.M., Ozen, S., Hofer, M., Frenkel, J., Modesto, C., Nikishina, I., Schwarz, T., Martino, S., Meini, A., Quartier, P., Martini, A., Ruperto, N., Neven, B., Gattorno, M., for PRINTO and Eurofever, 2015. Phenotypic and genotypic characteristics of cryopyrin-associated periodic syndrome: a series of 136 patients from the Eurofever Registry. *Ann. Rheum. Dis.* 74, 2043–2049.
- Lobito, A.A., Kimberley, F.C., Muppidi, J.R., Komarow, H., Jackson, A.J., Hull, K.M., Kastner, D.L., Sreaton, G.R., Siegel, R.M., 2006. Abnormal disulfide-linked oligomerization results in ER retention and altered signaling by TNFR1 mutants in TNFR1-associated periodic fever syndrome (TRAPS). *Blood* 108, 1320–1327.
- MacDonald, K.P., Munster, D.J., Clark, G.J., Dzionek, A., Schmitz, J., Hart, D.N., 2002. Characterization of human blood dendritic cell subsets. *Blood* 100, 4512–4520.
- Mackern-Oberti, J.P., Llanos, C., Riedel, C.A., Bueno, S.M., Kalergis, A.M., 2015. Contribution of dendritic cells to the autoimmune pathology of systemic lupus erythematosus. *Immunology* 146, 497–507.
- Magnotti, F., Lefeuvre, L., Benezech, S., Malsot, T., Waeckel, L., Martin, A., Kerever, S., Chirita, D., Desjonqueres, M., Duquesne, A., Gerfaud-Valentin, M., Laurent, A., Sève, P., Popoff, M.-R., Walzer, T., Belot, A., Jamilloux, Y., Henry, T., 2019. Pyrin dephosphorylation is sufficient to trigger inflammasome activation in familial Mediterranean fever patients. *EMBO Mol. Med.* 11, e10547.
- Malissen, B., Grégoire, C., Malissen, M., Roncagalli, R., 2014. Integrative biology of T cell activation. *Nat. Immunol.* 15, 790–797.
- Mansfield, E., Chae, J.J., Komarow, H.D., Brotz, T.M., Frucht, D.M., Aksentijevich, I., Kastner, D.L., 2001. The familial Mediterranean fever protein, pyrin, associates with microtubules and colocalizes with actin filaments. *Blood* 98, 851–859.
- Marek-Yagel, D., Berkun, Y., Padeh, S., Abu, A., Reznik-Wolf, H., Livneh, A., 2009. Clinical disease among patients heterozygous for familial Mediterranean fever. *Arthritis Rheum* 60, 1862–1866.

- Mariathasan, S., Weiss, D.S., Newton, K., McBride, J., O'Rourke, K., Roose-Girma, M., Lee, W.P., Weinrauch, Y., Monack, D.M., Dixit, V.M., 2006. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* 440, 228–232.
- Marino, A., Tirelli, F., Giani, T., Cimaz, R., 2020. Periodic fever syndromes and the autoinflammatory diseases (AIDs). *J. Transl. Autoimmun.* 3, 100031.
- Martorana, D., Bonatti, F., Mozzoni, P., Vaglio, A., Percesepe, A., 2017. Monogenic Autoinflammatory Diseases with Mendelian Inheritance: Genes, Mutations, and Genotype/Phenotype Correlations. *Front. Immunol.* 8, 344.
- Matzner, Y., Abedat, S., Shapiro, E., Eisenberg, S., Bar-Gil-Shitrit, A., Stepensky, P., Calco, S., Azar, Y., Urieli-Shoval, S., 2000. Expression of the familial Mediterranean fever gene and activity of the C5a inhibitor in human primary fibroblast cultures. *Blood* 96, 727–731.
- McDermott, M.F., Aksentijevich, I., Galon, J., McDermott, E.M., Ogunkolade, B.W.W., Centola, M., Mansfield, E., Gadina, M., Karenko, L., Pettersson, T., McCarthy, J., Frucht, D.M., Aringer, M., Torosyan, Y., Teppo, A.-M., Wilson, M., Karaarslan, H.M.M., Wan, Y., Todd, I., Wood, G., Schlimgen, R., Kumarajeewa, T.R., Cooper, S.M., Vella, J.P., Amos, C.I., Mulley, J., Quane, K.A., Molloy, M.G., Ranki, A., Powell, R.J., Hitman, G.A., O'Shea, J.J., Kastner, D.L., 1999. Germline Mutations in the Extracellular Domains of the 55 kDa TNF Receptor, TNFR1, Define a Family of Dominantly Inherited Autoinflammatory Syndromes. *Cell* 97, 133–144.
- McGonagle, D., McDermott, M.F., 2006. A proposed classification of the immunological diseases. *PLoS Med.* 3, e297.
- Means, T.K., Latz, E., Hayashi, F., Murali, M.R., Golenbock, D.T., Luster, A.D., 2005. Human lupus autoantibody-DNA complexes activate DCs through cooperation of CD32 and TLR9. *J. Clin. Invest.* 115, 407–417.
- Mehling, A., Beissert, S., 2003. Dendritic cells under investigation in autoimmune disease. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 38, 1–21.
- Migita, K., Miyashita, T., Maeda, Y., Kimura, H., Nakamura, M., Yatsushashi, H., Ishibashi, H., Eguchi, K., 2005. Reduced blood BDCA-2⁺ (lymphoid) and CD11c⁺ (myeloid) dendritic cells in systemic lupus erythematosus. *Clin. Exp. Immunol.* 142, 84–91.
- Milhavet, F., Cuisset, L., Hoffman, H.M., Slim, R., El-Shanti, H., Aksentijevich, I., Lesage, S., Waterham, H., Wise, C., Sarrauste de Menthiere, C., Touitou, I., 2008. The infevers autoinflammatory mutation online registry: update with new genes and functions. *Hum. Mutat.* 29, 803–308.
- Mitosek-Szewczyk, K., Tabarkiewicz, J., Radej, S., Belniak, E., Bartosik-Psujek, H., Stelmasiak, Z., Rolinski, J., 2009. Changes in circulating dendritic cells and B-cells in patients with multiple sclerosis relapse during corticosteroid therapy. *J. Neuroimmunol.* 207, 107–110.
- Muckle, T.J., Wells, M., 1962. Urticaria, deafness, and amyloidosis: A new heredo-familial syndrome. *Q. J. Med.* 31, 235–248.
- Musabak, U., Sengul, A., Oktenli, C., Pay, S., Yesilova, Z., Kenar, L., Sanisoglu, S.Y., Inal, A., Tuzun, A., Erdil, A., Bagci, S., 2004. Does immune activation

- continue during an attack-free period in familial Mediterranean fever? *Clin. Exp. Immunol.* 138, 526–533.
- Nestle, F.O., Conrad, C., Tun-Kyi, A., Homey, B., Gombert, M., Boyman, O., Burg, G., Liu, Y.-J., Gilliet, M., 2005. Plasmacytoid dendritic cells initiate psoriasis through interferon-alpha production. *J. Exp. Med.* 202, 135–143.
- Netea, M.G., Nold-Petry, C.A., Nold, M.F., Joosten, L.A.B., Opitz, B., van der Meer, J.H.M., van de Veerdonk, F.L., Ferwerda, G., Heinhuis, B., Devesa, I., Funk, C.J., Mason, R.J., Kullberg, B.J., Rubartelli, A., van der Meer, J.W.M., Dinarello, C.A., 2009. Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1beta in monocytes and macrophages. *Blood* 113, 2324–2335.
- O'Doherty, U., Peng, M., Gezelter, S., Swiggard, W.J., Betjes, M., Bhardwaj, N., Steinman, R.M., 1994. Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature. *Immunology* 82, 487–493.
- O'Keeffe, M., Mok, W.H., Radford, K.J., 2015. Human dendritic cell subsets and function in health and disease. *Cell. Mol. Life Sci.* 72, 4309–4325.
- Ochando, J.C., Homma, C., Yang, Y., Hidalgo, A., Garin, A., Tacke, F., Angeli, V., Li, Y., Boros, P., Ding, Y., Jessberger, R., Trinchieri, G., Lira, S.A., Randolph, G.J., Bromberg, J.S., 2006. Alloantigen-presenting plasmacytoid dendritic cells mediate tolerance to vascularized grafts. *Nat. Immunol.* 7, 652–662.
- Özen, S., Batu, E.D., Demir, S., 2017. Familial mediterranean fever: Recent developments in pathogenesis and new recommendations for management. *Front. Immunol.* 8, 253.
- Ozen, S., Demirkaya, E., Erer, B., Livneh, A., Ben-Chetrit, E., Giancane, G., Ozdogan, H., Abu, I., Gattorno, M., Hawkins, P.N., Yuce, S., Kallinich, T., Bilginer, Y., Kastner, D., Carmona, L., 2016. EULAR recommendations for the management of familial Mediterranean fever. *Ann. Rheum. Dis.* 75, 644–651.
- Ozen, S., Karaaslan, Y., Ozdemir, O., Saatci, U., Bakkaloglu, A., Koroglu, E., Tezcan, S., 1998. Prevalence of juvenile chronic arthritis and familial Mediterranean fever in Turkey: a field study. *J. Rheumatol.* 25, 2445–2449.
- Papin, S., Cuenin, S., Agostini, L., Martinon, F., Werner, S., Beer, H.-D., Grütter, C., Grütter, M., Tschopp, J., 2007. The SPRY domain of Pyrin, mutated in familial Mediterranean fever patients, interacts with inflammasome components and inhibits proIL-1beta processing. *Cell Death Differ.* 14, 1457–1466.
- Pariano, M., Pieroni, S., De Luca, A., Iannitti, R.G., Borghi, M., Puccetti, M., Giovagnoli, S., Renga, G., D'Onofrio, F., Bellet, M.M., Stincardini, C., Della-Fazia, M.A., Servillo, G., van de Veerdonk, F.L., Costantini, C., Romani, L., 2021. Anakinra Activates Superoxide Dismutase 2 to Mitigate Inflammasome Activity. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 6531.
- Park, Y.H., Wood, G., Kastner, D.L., Chae, J.J., 2016. Pyrin inflammasome activation and RhoA signaling in the autoinflammatory diseases FMF and HIDS. *Nat. Immunol.* 17, 914–923.

- Paschke, S., Weidner, A.F., Paust, T., Marti, O., Beil, M., Ben-Chetrit, E., 2013. Technical Advance: Inhibition of neutrophil chemotaxis by colchicine is modulated through viscoelastic properties of subcellular compartments. *J. Leukoc. Biol.* 94, 1091–1096.
- Perry, J.S.A., Lio, C.-W.J., Kau, A.L., Nutsch, K., Yang, Z., Gordon, J.I., Murphy, K.M., Hsieh, C.-S., 2014. Distinct contributions of Aire and antigen-presenting-cell subsets to the generation of self-tolerance in the thymus. *Immunity* 41, 414–426.
- Procopio, V., Manti, S., Bianco, G., Conti, G., Romeo, A., Maimone, F., Arrigo, T., Cutrupi, M.C., Salpietro, C., Cuppari, C., 2018. Genotype-phenotype correlation in FMF patients: A “non classic” recessive autosomal or “atypical” dominant autosomal inheritance? *Gene* 641, 279–286.
- Rogers, D.B., Shohat, M., Petersen, G.M., Bickal, J., Congleton, J., Schwabe, A.D., Rotter, J.I., 1989. Familial Mediterranean fever in Armenians: Autosomal recessive inheritance with high gene frequency. *Am. J. Med. Genet.* 34, 168–172.
- Romani, N., Gruner, S., Brang, D., Kämpgen, E., Lenz, A., Trockenbacher, B., Konwalinka, G., Fritsch, P.O., Steinman, R.M., Schuler, G., 1994. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J. Exp. Med.* 180, 83–93.
- Romani, N., Reider, D., Heuer, M., Ebner, S., Kämpgen, E., Eibl, B., Niedewieser, D., Schuler, G., 1996. Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. *J. Immunol. Methods* 196, 137–151.
- Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C., Lanzavecchia, A., 1995. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J. Exp. Med.* 182, 389–400.
- Sallusto, F., Lanzavecchia, A., 1994. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 179, 1109–1118.
- Santiago-Schwarz, F., Belilos, E., Diamond, B., Carsons, S.E., 1992. TNF in combination with GM-CSF enhances the differentiation of neonatal cord blood stem cells into dendritic cells and macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 52, 274–281.
- Sarrauste de Menthière, C., Terrière, S., Pugnère, D., Ruiz, M., Demaille, J., Touthou, I., 2003. INFEVERS: the Registry for FMF and hereditary inflammatory disorders mutations. *Nucleic Acids Res.* 31, 282–285.
- Savic, S., Caseley, E.A., McDermott, M.F., 2020. Moving towards a systems-based classification of innate immune-mediated diseases. *Nat. Rev. Rheumatol.* 16, 222–237.
- Scheinecker, C., Zwölfer, B., Köller, M., Manner, G., Smolen, J.S., 2001. Alterations of dendritic cells in systemic lupus erythematosus: phenotypic and functional deficiencies. *Arthritis Rheum* 44, 856–865.

- Schnappauf, O., Chae, J.J., Kastner, D.L., Aksentijevich, I., 2019. The Pyrin Inflammasome in Health and Disease. *Front. Immunol.* 10, 1745.
- Schwarzbich, M.A., Gutknecht, M., Salih, J., Salih, H.R., Brossart, P., Rittig, S.M., Grunebach, F., 2012. The immune inhibitory receptor osteoactivin is upregulated in monocyte-derived dendritic cells by BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Immunol Immunother* 61, 193–202.
- Sennikov, S. V., Falaleeva, S.A., Shkaruba, N.S., Chumasova, O.A., Obleukhova, I.A., Sizikov, A.E., Kurilin, V. V., 2016. Maturation and cytokine production potential of dendritic cells isolated from rheumatoid arthritis patients peripheral blood and induced in vitro. *Hum. Immunol.* 77, 930–936.
- Seshadri, S., Duncan, M.D., Hart, J.M., Gavrilin, M.A., Wewers, M.D., 2007. Pyrin levels in human monocytes and monocyte-derived macrophages regulate IL-1beta processing and release. *J. Immunol.* 179, 1274–1281.
- Sharp, F.A., Ruane, D., Claass, B., Creagh, E., Harris, J., Malyala, P., Singh, M., O'Hagan, D.T., Pétrilli, V., Tschopp, J., O'Neill, L.A.J., Lavelle, E.C., 2009. Uptake of particulate vaccine adjuvants by dendritic cells activates the NALP3 inflammasome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 870–875.
- Shinar, Y., Obici, L., Aksentijevich, I., Bennetts, B., Austrup, F., Ceccherini, I., Costa, J.M., De Leener, A., Gattorno, M., Kania, U., Kone-Paut, I., Lezer, S., Livneh, A., Moix, I., Nishikomori, R., Ozen, S., Phylactou, L., Risom, L., Rowczenio, D., Sarkisian, T., van Gijn, M.E., Witsch-Baumgartner, M., Morris, M., Hoffman, H.M., Touitou, I., 2012. Guidelines for the genetic diagnosis of hereditary recurrent fevers. *Ann Rheum Dis* 71, 1599–1605.
- Shodell, M., Shah, K., Siegal, F.P., 2003. Circulating human plasmacytoid dendritic cells are highly sensitive to corticosteroid administration. *Lupus* 12, 222–230.
- Simon, A., Bodar, E.J., van der Hilst, J.C.H., van der Meer, J.W.M., Fiselier, T.J.W., Cuppen, M.P.J.M., Drenth, J.P.H., 2004. Beneficial response to interleukin 1 receptor antagonist in traps. *Am. J. Med.* 117, 208–210.
- Sohar, E., Gafni, J., Pras, M., Heller, H., 1967. Reviews Familial Mediterranean Fever* A Suruey of 470 Cases and Review of the Literature. *Am. J. Med.* 43, 227–253.
- Sönmez, H.E., Batu, E.D., Özen, S., 2016. Familial mediterranean fever: Current perspectives. *J. Inflamm. Res.* 9, 13–20.
- Steinbrink, K., Wöflf, M., Jonuleit, H., Knop, J., Enk, A.H., 1997. Induction of Tolerance by IL-10-Treated Dendritic Cells. *J. Immunol.* 159, 4772–4780.
- Strunk, D., Rappersberger, K., Egger, C., Strobl, H., Krömer, E., Elbe, A., Maurer, D., Stingl, G., 1996. Generation of human dendritic cells/Langerhans cells from circulating CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood* 87, 1292–1302.
- Touitou, I., Lesage, S., McDermott, M., Cuisset, L., Hoffman, H., Dode, C., Shoham, N., Aganna, E., Hugot, J.-P., Wise, C., Waterham, H., Pugnere, D., Demaille, J., Sarrauste de Menthier, C., 2004. Infervers: an evolving mutation database for auto-inflammatory syndromes. *Hum. Mutat.* 24, 194–198.

- Tschopp, J., Martinon, F., Burns, K., 2003. NALPs: a novel protein family involved in inflammation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 95–104.
- Tschopp, J., Schroder, K., 2010. NLRP3 inflammasome activation: the convergence of multiple signalling pathways on ROS production? *Nat. Rev. Immunol.* 10, 210–215.
- Ueno, H., Klechevsky, E., Morita, R., Aspod, C., Cao, T., Matsui, T., Di Pucchio, T., Connolly, J., Fay, J.W., Pascual, V., Palucka, A.K., Banchereau, J., 2007. Dendritic cell subsets in health and disease. *Immunol. Rev.* 219, 118–142.
- van de Veerdonk, F.L., Renga, G., Pariano, M., Bellet, M.M., Servillo, G., Fallarino, F., De Luca, A., Iannitti, R.G., Piobbico, D., Gargaro, M., Manni, G., D’Onofrio, F., Stincardini, C., Sforza, L., Borghi, M., Castelli, M., Pieroni, S., Oikonomou, V., Vilella, V.R., Puccetti, M., Giovagnoli, S., Galarini, R., Barola, C., Maiuri, L., Della Fazio, M.A., Cellini, B., Talesa, V.N., Dinarello, C.A., Costantini, C., Romani, L., 2022. Anakinra restores cellular proteostasis by coupling mitochondrial redox balance to autophagy. *J. Clin. Invest.* 132, e144983.
- van der Hilst, J.C., Moutschen, M., Messiaen, P.E., Lauwerys, B.R., Vanderschueren, S., 2016. Efficacy of anti-IL-1 treatment in familial Mediterranean fever: a systematic review of the literature. *Biologics* 10, 75–80.
- Van Gijn, M.E., Ceccherini, I., Shinar, Y., Carbo, E.C., Slofstra, M., Arostegui, J.I., Sarrabay, G., Rowczenio, D., Omoyimni, E., Balci-Peynircioglu, B., Hoffman, H.M., Milhavet, F., Swertz, M.A., Touitou, I., 2018. New workflow for classification of genetic variants’ pathogenicity applied to hereditary recurrent fevers by the International Study Group for Systemic Autoinflammatory Diseases (INSAID). *J. Med. Genet.* 55, 530–537.
- Van Gorp, H., Saavedra, P.H. V, de Vasconcelos, N.M., Van Opdenbosch, N., Vande Walle, L., Matusiak, M., Prencipe, G., Insalaco, A., Van Hauwermeiren, F., Demon, D., Bogaert, D.J., Dullaers, M., De Baere, E., Hochepped, T., Dehoorne, J., Vermaelen, K.Y., Haerynck, F., De Benedetti, F., Lamkanfi, M., 2016. Familial Mediterranean fever mutations lift the obligatory requirement for microtubules in Pyrin inflammasome activation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, 14384–14389.
- Waite, A.L., Schaner, P., Hu, C., Richards, N., Balci-Peynircioglu, B., Hong, A., Fox, M., Gumucio, D.L., 2009. Pyrin and ASC Co-Localize to Cellular Sites that Are Rich in Polymerizing Actin. *Exp. Biol. Med.* 234, 40–52.
- Xu, H., Yang, J., Gao, W., Li, L., Li, P., Zhang, L., Gong, Y.N., Peng, X., Xi, J.J., Chen, S., Wang, F., Shao, F., 2014. Innate immune sensing of bacterial modifications of Rho GTPases by the Pyrin inflammasome. *Nature* 513, 237–241.
- Young, J.W., Szabolcs, P., Moore, M.A., 1995. Identification of dendritic cell colony-forming units among normal human CD34+ bone marrow progenitors that are expanded by c-kit-ligand and yield pure dendritic cell colonies in the presence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and tumor n. *J. Exp. Med.* 182, 1111–1119.

Literaturverzeichnis

- Yousaf, N., Gould, D., Aganna, E., Hammond, L., Mirakian, R., Turner, M., Hitman, G., McDermott, M., Chernajovsky, Y., 2005. Tumor necrosis factor receptor I from patients with tumor necrosis factor receptor-associated periodic syndrome interacts with wild-type tumor necrosis factor receptor I and induces ligand-independent NF-kappaB activation. *Arthritis Rheum.* 52, 2906–2916.
- Yu, J.-W., Wu, J., Zhang, Z., Datta, P., Ibrahimi, I., Taniguchi, S., Sagara, J., Fernandes-Alnemri, T., Alnemri, E.S., 2006. Cryopyrin and pyrin activate caspase-1, but not NF- κ B, via ASC oligomerization. *Cell Death Differ.* 13, 236–249.
- Zhou, L.J., Tedder, T.F., 1996. CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 2588–2592.
- Ziegler-Heitbrock, L., Ancuta, P., Crowe, S., Dalod, M., Grau, V., Hart, D.N., Leenen, P.J.M., Liu, Y., Macpherson, G., Randolph, G.J., Scherberich, J., Schmitz, J., Shortman, K., Sozzani, S., Strobl, H., Zembala, M., Austyn, J.M., Lutz, M.B., 2010. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 116, 5–7.

8. Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Medizinischen Klinik, Abteilung Innere II, Hämatologie/Onkologie/klinische Immunologie und Rheumatologie des Universitätsklinikums Tübingen unter Betreuung von Herrn PD Dr. Frank Grünebach durchgeführt.

Die Konzeption der Experimente erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Daniela Dörfel und Herrn PD Dr. Frank Grünebach.

Die Versuche wurden nach Einarbeitung durch Sylvia Klein, Jennifer Richardson, Kristin Bieber und Elke Malenke von mir eigenständig durchgeführt und ausgewertet.

Die ELISAs wurden von Sandra Plankenhorn im Immunpathologischen Labor der Abteilung Innere Medizin II (Leitung Prof. Dr. Reinhild Klein) mit meinem Proben durchgeführt und die Rohdaten von mir ausgewertet.

15 BuffyCoat-Kontrollgruppenwerte der phänotypischen Analysen von imMo-DCs wurden von Vanessa Altdörfer erhoben und ausgewertet und mir zur Verfügung gestellt.

Die Versuche mit drei FMF-Patienten und Patientinnen wurden zusammen mit Alexander Fuchs durchgeführt. Die Rohdaten zu vier MWS-Patienten und Patientinnen wurden von Alexander Fuchs und Sarah Schütte erhoben und mir zur Auswertung zur Verfügung gestellt.

Die statistische Auswertung sowie Erstellung der Diagramme erfolgten eigenständig durch mich.

Die Daten wurden in Teilen von mir mit einem Poster auf dem Kongress der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie (DGRh), 19. – 22. September 2018, vorgestellt.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den

9. Veröffentlichungen

Funk, T., Fuchs, A.R., Altdörfer, V.S., Klein, R., Autenrieth, S.E., Müller, M.R., Salih, H.R., Henes, J., Grünebach, F., Dörfel, D., 2020. Monocyte-derived dendritic cells display a highly activated phenotype and altered function in patients with familial Mediterranean fever. *Clin. Exp. Immunol.* 201, 1–11.

Dörfel, D., Lechner, C.J., Joas, S., Funk, T., Gutknecht, M., Salih, J., Geiger, J., Kropp, K.N., Maurer, S., Müller, M.R., Kopp, H.G., Salih, H.R., Grünebach, F., Rittig, S.M., 2018. The BCR-ABL inhibitor nilotinib influences phenotype and function of monocyte-derived human dendritic cells. *Cancer Immunol Immunother.* 67, 775-783.

Funk, T., Altdörfer, V., Henes, J., Grünebach, F., Dörfel, D., 2018. Phenotype and function of dendritic cells in patients with familial Mediterranean fever. Meeting Abstract und Poster (ER.11). 46. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie (DGRh), 32. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Orthopädische Rheumatologie (DGORh), Wissenschaftliche Herbsttagung der Gesellschaft für Kinder- und Jugendrheumatologie (GKJR). Mannheim, 19.-22.09.2018.

10. Danksagung

Ganz besonders möchte ich zuerst allen Patienten und Patientinnen, sowie gesunden Probanden und Probandinnen danken, die durch ihre Bereitschaft eine Blutprobe zu spenden diese Dissertation erst möglich gemacht haben.

Bei Herrn PD Dr. Frank Grünebach und Frau Dr. Daniela Dörfel möchte ich mich ganz herzlich für die Möglichkeit in diesem interessanten Bereich zu forschen, bedanken, ebenso wie für die hervorragende Betreuung und Unterstützung und das immer offene Ohr für alle Fragen. Herrn PD Dr. Frank Grünebach danke ich zudem für die konstruktiven Anmerkungen zur vorliegenden Arbeit.

Frau Sylvia Klein möchte ich für die sehr freundliche Aufnahme im Labor und für die exzellente Einarbeitung in die Methoden und die Labororganisation danken. Auch wenn sie nach meiner Einarbeitung das Labor wechselte, konnte ich bei Fragen weiterhin auf ihren reichen Wissens- und Erfahrungsschatz zurückgreifen.

Den Ärzten der Rheumatologischen Ambulanz am Universitätsklinikum Tübingen danke ich für die Aufklärung und Bereitstellung der Patienten und Patientinnen. Insbesondere möchte ich mich bei Prof. Dr. Jörg Henes bedanken, der mich bei jeglichen medizinischen Fragen zu den Krankheiten oder Patienten und Patientinnen unterstützt hat und ganz wesentlich zur Auswahl und Akquirierung der Patienten und Patientinnen beigetragen hat. Auch den MTAs der Rheumatologischen Ambulanz danke ich für ihre freundliche Art und gute Zusammenarbeit, ohne die die Blutproben nicht so schnell und reibungslos im Labor bei mir angekommen wären.

Bei Elke Malenke, Jennifer Richardson und Kristin Biber möchte ich mich für die Einarbeitung in einzelne Methoden bedanken. Ihnen sowie allen anderen Mitarbeitern der verschiedenen Arbeitsgruppen, insbesondere AG Kopp, AG

Danksagung

Müller und AG Salih gilt ein großer Dank für die stets freundliche Unterstützung bei kleinen und großen Fragen, sowie das gute Arbeitsklima.

Der AG Klein, insbesondere Sandra Plankenhorn, danke ich für die Durchführung der ELISAs.

Der Flow Cytometry Core Facility Tübingen danke ich für die Bereitstellung und Wartung der FACS-Zytometer.

Für die Aufnahme in das IZKF-Promotionskolleg und die finanzielle und wissenschaftliche Förderung möchte ich mich beim IZKF herzlich bedanken.

Jasmin und Alina danke ich für die fröhlichen, lustigen und erholsamen Stunden im und außerhalb des Labors. Ihre Freundschaft hat diese Zeit bereichert.

Zuletzt, aber nicht weniger herzlich, möchte ich meiner Familie danken, die mich stets auf meinem Lebensweg unterstützt und mich durch alle Auf's und Abs der Dissertationszeit getragen hat.