

**Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik
Tübingen**

Abteilung Innere Medizin II

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. L. Kanz

**Sektion für Transplantationsimmunologie und
Immunhämatologie**

Leiterin: Frau Professor Dr. C.A. Müller

**Über die Expression von α -Defensinen HNP1-3 und
deren mögliche Rolle als Effektormoleküle in der Haut
von Patienten mit Morbus Behçet**

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

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

vorgelegt von

Dorothee Sibylle Mertens

aus

Freiburg im Breisgau

2012

Dekan: Professor Dr. I.B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Frau Professor Dr. C.A. Müller

2. Berichterstatter: Professor Dr. M. Zierhut

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	8
1.1	Morbus Behçet	8
1.1.1	Das Krankheitsbild Morbus Behçet	8
1.1.2	Ätiologie und Pathogenese mit immunologischen Besonderheiten des Morbus Behçet	11
1.1.3	Pathergiephänomen und Pathergie-Test.....	15
1.2	Antimikrobielle Peptide (AMP)	17
1.2.1	Struktur, Verteilung und Funktion der humanen Defensine.....	17
1.2.2	Defensine bei chronisch entzündlichen Erkrankungen der Haut und anderer Organe des Menschen	21
1.3	Zielsetzung	24
2	MATERIAL	26
2.1	Reagenzien/Chemikalien	26
2.2	Gefäße und Zubehör	27
2.3	Geräte	27
2.4	Primärantikörper	29
2.5	Sekundärantikörper	29
2.6	Herkunft und Art der Gewebeproben	30
3	METHODEN	35
3.1	Aufbereitung der Gewebeproben	35
3.2	Immunologische Methoden	35
3.2.1	Immunhistochemische Färbung	35
3.2.2	Mikroskopische Auswertung der Präparate	38
3.2.3	Dreifach-Immunfluoreszenzfärbung	38
3.3	Molekularbiologische Methoden	40
3.3.1	RNA-Isolierung.....	40

3.3.2 Reverse Transkription - Polymerasekettenreaktion (RT-PCR).....	41
3.3.3 Agarose – Gelelektrophorese	44
4 ERGEBNISSE	45
4.1 Expression von α-Defensinen HNP1-3 in der normalen Haut.....	45
4.1.1 Nachweis der Expression von α -Defensinen HNP1-3 in der Haut mit monoklonalen und polyklonalen Antikörpern.....	45
4.1.2 Verteilung der Expression von α -Defensinen HNP1-3 in der normalen Haut.....	47
4.2 Analyse der Expression von α-Defensinen HNP1-3 in Hautbiopsien bei Patienten mit Morbus Behçet.....	49
4.2.1 α -Defensine HNP1-3 Expression nach klassischer Pathergietestung	49
4.2.2 α -Defensine HNP1-3 Expression nach Pathergie-Test mit Injektion von Uratkristallen	52
4.2.3 α -Defensine HNP1-3 Expression in spontanen Hautläsionen des Morbus Behçet	54
4.2.4 α -Defensine HNP1-3 Expression in Kontrollbiopsien nicht manipulierter Hautareale von Patienten mit Morbus Behçet	54
4.3 Analyse der Verteilung der Expression von α-Defensinen HNP1-3 bei Patienten mit anderen Hauterkrankungen.....	56
4.4 Charakterisierung der α-Defensine HNP1-3 positiven Zellen mit Hilfe von Mehrfachmarkierungen in der indirekten Immunfluoreszenz	57
4.4.1 Doppelmarkierung von α -Defensinen HNP1-3 mit CD 45	57
4.4.2 Doppelmarkierung von α -Defensinen HNP1-3 mit CD 66b	58
4.4.3 Doppelmarkierung α -Defensine HNP1-3 mit Neutrophiler Elastase NP57.....	58
4.4.4 Doppelmarkierung von α -Defensinen HNP1-3 mit CD 15	59
4.4.5 Doppelmarkierung von α -Defensinen HNP1-3 mit CD 14	59
4.4.6 Doppelmarkierung von α -Defensinen HNP1-3 mit CD 1 (OKT 6).....	61
4.4.7 Doppelmarkierung von α -Defensinen HNP1-3 mit CD 56+ als NK-Zell spezifisches Antigen (NCAM).....	61
4.4.8 Doppelmarkierung von α -Defensinen HNP1-3 mit Antikörpern gegen den Antigenrezeptor von γ/δ T-Zellen.....	61
4.4.9 Doppelmarkierung von α -Defensinen HNP1-3 mit einem Endothelzellmarker TEN3...62	
4.5 Molekularbiologischer Nachweis der Expression von α-Defensinen HNP1-3	64

5	DISKUSSION	65
5.1	Spezifität der verwendeten monoklonalen und polyklonalen Antikörper α - Defensine HNP1-3	66
5.2	α -Defensine HNP1-3 in der normalen Haut.....	67
5.3	α -Defensine in der Haut von Patienten mit Morbus Behçet.....	68
5.4	Zellspezifische Expression von α -Defensinen HNP1-3 in der Haut.....	70
5.5	α -Defensine HNP1-3 als mögliche Effektormoleküle der (muko)kutanen Läsionen des Morbus Behçet	71
5.6	α -Defensine HNP1-3 bei anderen entzündlichen Hauterkrankungen	72
5.7	Schlussfolgerung und Ausblick	73
6	ZUSAMMENFASSUNG	75
7	LITERATURVERZEICHNIS	77
8	ANHANG	86
9	DANKSAGUNG	88

Abkürzungsverzeichnis

°	Grad
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AMP	Antimikrobielle Peptide
BSA	Bovines Serumalbumin
bp	Basenpaar
bzw	beziehungsweise
C	Celsius
CD	Cluster of differentiation
DAB	3,3'-Diaminobenzidin Chromogen
DAPI	4',6-Diamino-2-Phenylindol-Dihydrochlorid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
(c)DNA	(copy) Desoxyribnucleinsäure
EDTA	Ethylendiaminotetraacetat
h	Stunde
HBD	Human β -Defensin
HD	Humanes Defensin
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HLA	Human leukocyte antigen
HNP	Human neutrophil peptides
HRP	Horseradish-peroxidase
HSP	Hitze-Schock-Protein
HSV	Herpes simplex Virus
g	Gramm
G	Gauge
G-CSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor
ICAM	Intercellulare adhesion molecule
IFL	Immunfluoreszenz
IFN	Interferon
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin

kDA	Kilodalton
LL-37	Cathelicidin LL 37 (Länge der Aminosäuren 37)
(m)M	(milli)Molar
MB	Morbus Behçet
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein 1
MHC	Major Histocompatibility complex
MIC-A	MHC-Class I Chain Related A
mm	Millimeter
µl	Mikroliter
n	Number (Anzahl)
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
PAMPs	Pathogen associated molecular patterns
PBMC	Periphere Mononukleäre Blutzellen
PBS	Phosphate buffered Saline
PRRs	Pattern Recognition Receptors
RPMI 1640	Zellkulturmedium "Roswell Park Memorial Institute"
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription-Polymerase Ketten (chain) Reaktion
rpm	Rounds per minute
(m)RNA	(messenger) Ribonucleinsäure
s	Sekunde
SDS	Sodium dodecylsulfat
TBE	Tris-Borat-EDTA
TCR	T-Zell-Rezeptor
Th	T-Helfer-Zellen
TNF α	Tumornekrosefaktor- α
UV	Ultraviolett
VCAM	Vascular cell adhesion molecule

1 Einleitung

1.1 Morbus Behçet

Der Morbus Behçet gehört zu den entzündlichen Erkrankungen und ist eine multisystemische leukozytoklastische Vaskulitis, bei der sowohl Arterien als auch Venen gleichermaßen betroffen sein können.

Ein Symptomenkomplex aus Haut- und Schleimhautläsionen sowie Entzündungen des Auges stellt das charakteristische Krankheitsbild dar. Dieses wurde als Trias erstmals 1937 durch den türkischen Prof. Hulusi Behçet beschrieben, nach dem die Erkrankung heute benannt ist [14]. Das Krankheitsbild wurde schon früher unter anderem von Hippokrates von Kos (460-370 v. Chr.) erwähnt, ohne allerdings als eigene Entität definiert zu werden [98]. Im griechischen Sprachraum wird die Erkrankung häufig als Adamantiades-Behçet-Krankheit bezeichnet, da der griechische Augenarzt Benediktos Adamantiades bereits 1931 Teile des Krankheitsbildes beschrieb [2].

1.1.1 Das Krankheitsbild Morbus Behçet

Die klinische Manifestierung der Erkrankung ist auf Grund der Vaskulitis, die prinzipiell jedes Organ betreffen kann, sehr vielfältig.

Charakteristisch sind die Schleimhautläsionen mit rezidivierenden oralen Aphten, welche in 90-100% der Fälle auch als initiales Symptom auftreten, und genitalen Ulzerationen, welche häufig beim Mann am Skrotum und bei der Frau an der Vulva lokalisiert sind [5; 6; 91; 113].

Ein Hauptproblem stellt die okuläre Beteiligung dar, welche bei Therapieresistenz zum Verlust des Augenlichts führen kann. Typisch sind eine Beteiligung der Uvea und Retina in Form einer vorderen und hinteren Uveitis oder auch Panuveitis und die retinale nekrotisierende obliterierende Vaskulitis [21; 112]. 30-70% der Patienten sind von okulären Manifestationen betroffen, die in ihren Ausprägungen im Verlauf oft beidseits und gravierend sind, und circa ein Viertel dieser Patienten erblindet [74; 77; 91].

Hautläsionen treten in vielen verschiedenen Formen bei bis zu 80% (teilweise sogar bis 99%) der Patienten auf [74; 91; 113]. Häufig vertreten sind das Erythema nodosum sowie papulopustulöse Veränderungen wie akneiforme Läsionen und Pseudofollikulitiden [5]. Ebenfalls häufig sind oberflächliche Thrombophlebitiden.

Eine Besonderheit ist das Pathergiephänomen, auf das unter 1.1.3 näher eingegangen wird.

Arthritiden kommen in circa der Hälfte der Erkrankungen vor. In den meisten Fällen handelt es sich um Oligoarthritis, die nur sehr selten erosiv verlaufen [91].

Weniger häufige Manifestationen – verbunden aber mit umso höherer Morbidität und Mortalität - sind Vaskulitiden großer Gefäße mit Aneurysmata, Thrombosen und/oder Embolie sowie eine neurologische Beteiligung des zentralen Nervensystems (sehr viel seltener des peripheren Nervensystems) in Form von motorischen Defiziten, Hirnstammsymptomen und Meningoencephalitiden [54; 91].

Seltener können auch pulmonale, kardiale und gastrointestinale Symptome auftreten [91].

Die Diagnose des Morbus Behçet wird bei fehlenden spezifischen Nachweistests klinisch mit Hilfe von Diagnosekriterien gestellt. Am häufigsten angewendet werden die Klassifikationskriterien der Internationalen Studiengruppe für Morbus Behçet, die 1990 verabschiedet und 2006 überarbeitet wurden, wobei heute weiterhin die Kriterien von 1990 angewendet werden [20; 59]. Diese wurden allerdings entwickelt, um Patienten für Studien zu klassifizieren, und sind nur bedingt vor allem für die Erkennung der Krankheit in Frühstadien geeignet, so dass auch heute noch die älteren Diagnosekriterien von O'Duffy [83], Dilsen et al. [23], und in Asien auch die Japanischen Kriterien [78] angewandt werden [67].

Kriterien der Internationalen Studiengruppe 1990 [59]:

- Rezidivierende orale aphtöse oder herpetiforme Ulzerationen, die mindestens dreimal in den vergangenen 12 Monaten aufgetreten sein müssen.

Dazu zwei der folgenden Symptome:

- Rezidivierende genitale Aphten
- Ophthalmologische Läsionen: Uveitis anterior, Uveitis posterior oder mittels Spaltlampe diagnostizierte Zellen im Glaskörper oder Vaskulitis der Retina, die von einem Augenarzt diagnostiziert wurde.
- Hautläsionen: Erythema nodosum, Pseudofolikulitis, papulopustuläre Läsionen oder akneiforme Knoten bei postadoleszenten Patienten, die nicht unter Korticosteroiden stehen.
- Positiver Pathergie-Test, das heißt Auftreten einer papulopustulösen Effloreszenz an der Stelle eines einfachen Nadelstichs (20G-Kanüle) in die Haut oder intrakutaner Injektion von Kochsalz nach einer Latenzzeit von 24-48h.

Das Auftreten des Morbus Behçet wird auffällig gehäuft in den Ländern entlang der ehemaligen Seidenstrasse vom Mittelmeer bis in den mittleren Osten und Asien zwischen den 30° und 45° nördlichen Breitengraden beobachtet. In Deutschland ist die Prävalenz in den letzten zehn Jahren zwar von 0.6 Fällen/100.000 auf 4.16 Fällen/100.000 bei einer zunehmenden Inzidenz von 1/100.000 angestiegen, sie liegt aber dennoch deutlich unter den Zahlen der asiatischen und eurasischen Länder ([8; 113]. Die höchste Prävalenz der Erkrankung wurde mit 80-370 Fällen pro 100.000 Einwohnern in der Türkei berichtet [10; 91].

Der Erkrankungsgipfel liegt zwischen der dritten und vierten Lebensdekade und betrifft - nach den neueren Zahlen über Bevölkerungsgruppen hinweg betrachtet - Frauen und Männer gleichermaßen [8].

Die Therapie des Morbus Behçet ist bei nach wie vor ungeklärter Ätiologie der Erkrankung auf Grund der vielen verschiedenen Organe, die betroffen sein können, nach Möglichkeit interdisziplinär zu gestalten. Standardtherapie ist eine

immunsuppressive und anti-inflammatorische Medikation, die sich nach den betroffenen Organen und der Schwere des Befalls richtet. Es werden Immunsuppressiva und zytotoxische Substanzen wie Cyclosporin A, Azathioprin, Cyclophosphamid, Cholchicin und Thalidomid eingesetzt [49]. Kortikosteroide kommen ebenfalls bei fast allen Manifestationen zur Anwendung, vor allem aber bei akuten Exazerbationen oder kurzfristig hochdosiert bei schwerwiegenden Organmanifestationen wie einer ZNS Beteiligung [74; 91]. In den letzten Jahren sind neuere Medikamentengruppen, sogenannte Biologika, die immunmodulatorisch wirken wie Interferon- α und Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)-Antagonisten in den Vordergrund getreten [21; 49; 66].

1.1.2 Ätiologie und Pathogenese mit immunologischen Besonderheiten des Morbus Behçet

Die Pathogenese und Ätiologie des Morbus Behçet ist bis heute ungeklärt. Wie bei anderen (auto)entzündlichen Erkrankungen zeigt das Immunsystem bei Patienten mit Morbus Behçet eine aberrante Funktion durch bisher nicht vollständig geklärte Faktoren. Es wird vermutet, dass ein Ausbruch der Krankheit unter dem Einfluss externer Umweltfaktoren wie bestimmten Infektionserregern, unter anderem Streptokokken oder Herpesviren [26; 45; 53], bei Menschen mit bestimmten genetischen Voraussetzungen ausgelöst wird, und dabei möglicherweise eine falsche Regulation des Immunsystems mit überschüssiger Produktion von inflammatorischen Substanzen einsetzt [111].

Genetische Faktoren

Zahlreiche Untersuchungen in den letzten Jahren haben eine klare Assoziation zum Haupthistokompatibilitätsantigen (HLA-) B51 des HLA-B Locus ergeben [84; 68]. Dieses Antigen HLA-B51 konnte bei bis zu 80% der Erkrankten nachgewiesen werden [64; 111; 113]. Verity et al. konnten in ihrer Arbeit aus dem Jahr 1999 zeigen, dass die Prävalenz des Morbus Behçet entlang der Seidenstrasse der Häufigkeitsverteilung des HLA-B 51 entspricht (siehe Abbildung 1) [99].

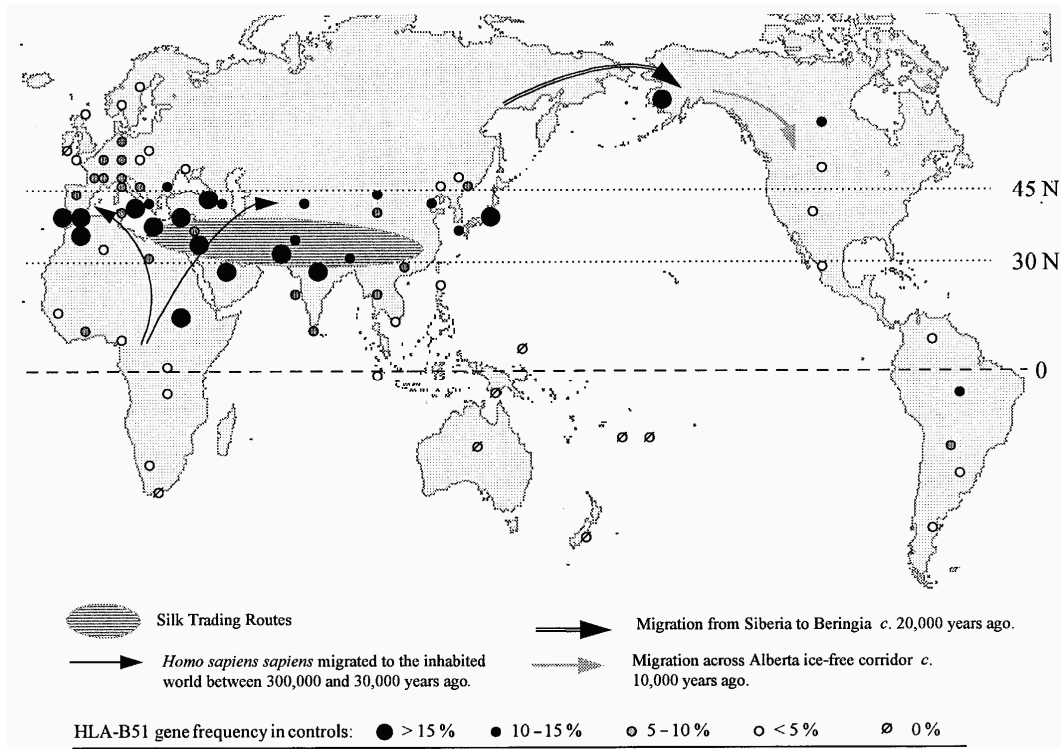


Abbildung 1: Regionale Häufigkeitsverteilung des HLA-B 51 (Quelle: [99]).

Es ist aber weiterhin ungeklärt, ob HLA-B51 als Molekül direkt in die Pathogenese involviert ist oder aber einen genetischen Marker für andere Gene vor allem im Kopplungsungleichgewicht und in direkter Nachbarschaft zum kodierenden HLA-B Genort („linkage disequilibrium“) darstellt. So wurden unter anderem die Genloci „MHC class I related gene A und B“ (MICA and MICB) und Tumornekrosefaktor (TNF) in mehreren Studien ausführlich untersucht, aber bisher konnte einstimmig nur die Assoziation zu HLA-B51 bewiesen werden [21].

Immunpathogenese

Eine Auslösung der Krankheit durch eine Infektion mit zahlreichen mikrobiologischen Krankheitserregern wie *Streptococcus sanguis* oder Herpes simplex virus I als ursächliches Antigen wurde seit der Erstbeschreibung durch Professor Behçet diskutiert [14; 42; 53; 54; 64]. Inzwischen gibt es aber einen Konsens, dass Morbus Behçet nicht durch eine direkte Infektion ausgelöst wird, sondern eher eine Dysfunktion des Immunsystems nach Kontakt mit diesen

Antigenen eine autoentzündliche Reaktion verursachen könnte [87; 111]. Dabei wurde die Hypothese einer Kreuzreaktion im Rahmen eines „Molekularen Mimikry Models“ näher untersucht. Bakterielle bzw. virale Antigene besitzen eine teilweise gleiche Aminosäuresequenz an der Oberfläche wie körpereigene Hitze-Shock-Proteine (HSP), besonders HSP 60/65 kDa, das bei zellulärem Stress hochreguliert wird. Die eigentlich humanen körpereigenen HSPs sollen unter Stress-Bedingungen als körperfremd erkannt werden und dann Antigene darstellen, die eine T-Zell-Aktivierung auslösen [24; 25; 70; 111].

Vieles deutet zudem darauf hin, dass T-Lymphozyten eine zentrale Rolle bei der Pathogenese spielen. So wurde eine Vermehrung von CD8⁺ γ/δ -T-Zellen und im aktiven Krankheitsstadium eine Erhöhung der CD56⁺ NK-Zellen bei Morbus Behçet-Patienten nachgewiesen [31; 32; 94; 96]. Eine eindeutige Beteiligung der NK- und NK-T-Zellen konnte in weiteren Studien aber nicht bewiesen werden [111].

Des Weiteren sprechen Untersuchungen der Zytokinprofile der Patienten mit Morbus Behçet für eine Erhöhung der proinflammatorischen Zytokine des Th1-Typs. Es wurden erhöhte Konzentrationen der Zytokine und Chemokine wie IFN γ , TNF α , IL-1, IL-8, IL-12, sowie der löslichen IL2-Rezeptoren (sIL-2R) und TNF-Rezeptoren im Serum von Patienten mit Morbus Behçet gefunden [31; 46; 87].

Die Höhe des Serumspiegels von Interleukin 8 soll mit der Krankheitsaktivität des Morbus Behçet korrelieren [43].

Manche Studien haben auch über erhöhte Th2 Typ Zytokine, vor allem für IL-4 und IL-10, berichtet. Allerdings könnten diese Befunde eventuell auch als kompensatorische Mechanismen gegenüber der massiven Th1 Typ Zytokinausschüttung interpretiert werden [111].

In mukokutanen Läsionen, wie den Manifestationen positiver Pathergie-Tests wurden ebenfalls erhöhte Spiegel der Zytokine IL-8, IL-12, Monocyten-Chemoattractant-Protein-1 (MCP-1) und Interferon γ nachgewiesen [15; 76; 81]. Da in den typischen Läsionen des Morbus Behçet, wie Pseudofollikulitis, Pathergieläsionen und Hypopyon, signifikant vermehrt neutrophile

Leukozyteninfiltrate gefunden wurden, wird immer wieder die Rolle und Funktion der Neutrophilen Granulozyten diskutiert. Es wurden eine Hyperreaktivität der Neutrophilen mit verstärkter Chemotaxis, Phagozytose und Bildung von Superoxiden (Dioxide) festgestellt [17; 21; 24; 27] Diese Beobachtungen wie die Erhöhung von TNF α und IL-8 sprechen auch für eine Beteiligung angeborener Immunmechanismen an der Pathogenese des Morbus Behçet. Die Abbildung 2 zeigt die heutigen hypothetischen Vorstellungen zu den pathogenetisch relevanten veränderten Immunreaktionen beim Morbus Behçet.

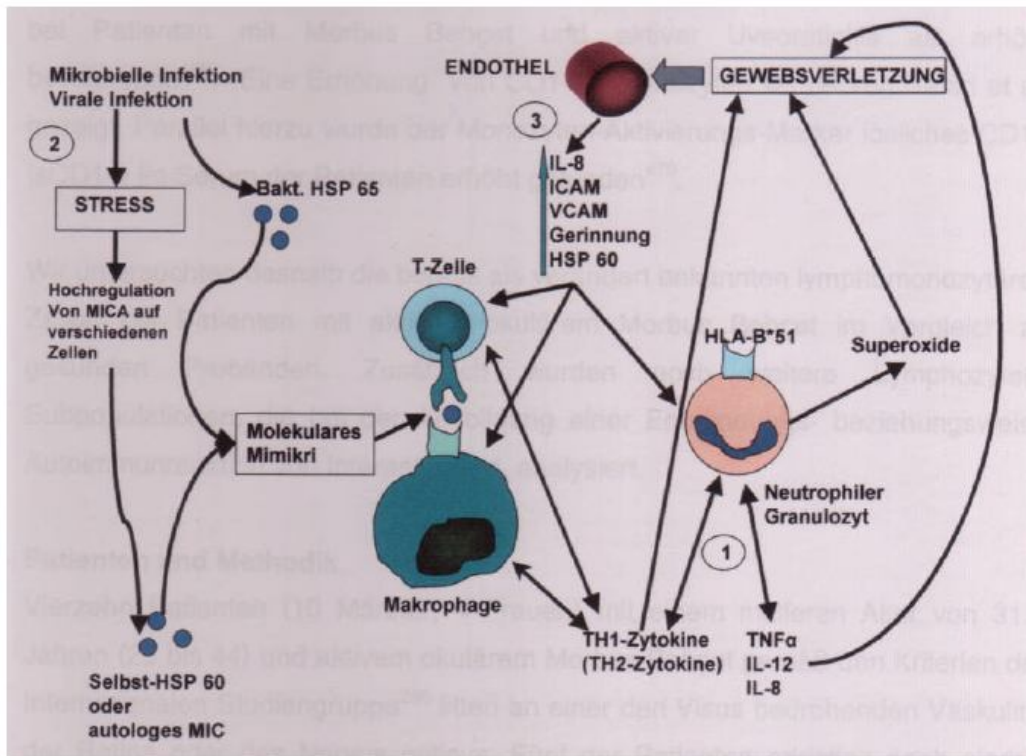


Abbildung 2: Hypothese zur Pathogenese des Morbus Behçet (Quelle: [67]).

- 1) Genetische Faktoren wie HLA-B51 induzieren eine generelle Hyperaktivität des Immunsystems (Th1-Zytokine, Granulozyten)
- 2) Bakterielle oder virale Infektionen stimulieren Expression von HSP 60 (Selbst) und MICA auf verschiedenen Zellen (unter anderem Endothel), Hochregulation von Adhäsionsmolekülen, Aktivierung der Gerinnung, Stimulation von T-Zellen (γ/δ -T-Zellen und NK-Zellen), weiterer Steigerung der Zytokinproduktion und schließlich
- 3) Gewebeschaden (Vaskulitis). Zusätzlich könnte es zum molekularen Mimikry über HLA-B51 kommen. Parallel werden B-Zellen polyklonal stimuliert (in der Abbildung nicht dargestellt) und produzieren vermehrt Antikörper (zum Beispiel gegen HSP).

1.1.3 Pathergiephänomen und Pathergie-Test

Das Pathergiephänomen, wie es sich im Pathergie-Test zeigt, ist eine Besonderheit des Morbus Behçet und beschreibt die Hyperreaktivität der Haut am Ort eines Nadeleinstichs. Obwohl ein positiver Pathergie-Test in den Klassifikationskriterien von 1990 und 2006 gefordert wird, gibt es dafür bisher keine standardisierte Durchführung. In der Regel ist der Ablauf des Tests wie im Folgenden beschrieben.

An einer unauffälligen, haarlosen Hautstelle im Bereich des Unterarms erfolgt ein intrakutaner Einstich mit einer sterilen 20G Nadel (oder zusätzliche Injektion von physiologischer Kochsalzlösung). Nach 48 Stunden wird der Test abgelesen. Der Test ist positiv, wenn sich an der Punktionsstelle eine Papel mit einem Durchmesser > 2 mm oder eine Pustel gebildet hat [74; 97].

Dieser Test ist das einzige spezifische Merkmal des Morbus Behçet, er zeigt jedoch eine große geographische Variabilität. So ist der Test in 60-70% der türkischen und japanischen Patienten positiv [6; 106], aber nur zu 33.7% in den westlichen Ländern wie Deutschland [8] und zu 0% in Grossbritannien [106]. Ein Pathergiephänomen kann gelegentlich auch bei anderen Erkrankungen wie z.B. bei Pyoderma gangraenosum, neutrophilen Dermatosen, dem Sweetsyndrom oder der chronischen myeloischen Leukämie (CML) beobachtet werden [97].

Das Pathergiephänomen wurde bei Patienten mit Morbus Behçet nicht nur nach einem Nadelstich beobachtet, sondern auch nach chirurgischen Interventionen wie Dentalhygiene, Kataraktoperationen und vaskulären oder gastrointestinalen Anastomosen beschrieben [21;97].

Histologische und molekularbiologische Untersuchungen von Hautbiopsien nach Pathergie-Tests im Vergleich zu Biopsien normaler Haut von gleich behandelten Kontrollgruppen zeigen, dass vor allem in der Frühphase vermehrt neutrophile Granulozyten in das Gewebe einwandern. Im weiteren Verlauf wandern dann auch in erhöhter Zahl Lymphozyten, Monozyten und aktivierte dendritische Zellen ein [30; 41]. Nach 48h wurden auch erhöhte mRNA-Spiegel für Zytokine und Chemokine, insbesondere für IL-8, Monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) und Th1 assoziierte Zytokine wie IFN γ und IL-12 aber auch IL-10 (Th2-Zytokin) nachgewiesen [15; 76].

In einigen histopathologischen Untersuchungen fand sich wie bei anderen kutanen Läsionen des Morbus Behçet eine leukozytoklastische Vaskulitis [61]. Dennoch wurden auch bei fehlenden Zeichen einer klinisch akuten Entzündung fokale Infiltrationen mononukleärer Zellen (Monozyten und Lymphozyten) in der Dermis um Gefäße und Hautanhangsorgane beschrieben [30]. Auch eine vermehrte Anzahl von Mastzellen in den Läsionen von positiven Pathergie-

Tests wurde beschrieben [44]. Die große Variabilität der histopathologischen Korrelate könnte Ausdruck interindividueller Unterschiede der Immunantwort bei den untersuchten Patienten verschiedener ethnischer Herkunft (Pathergie-Test nicht in allen geographischen Regionen gleich sensitiv, siehe oben) oder von dem angewandten Testverfahren beeinflusst sein [97].

1.2 Antimikrobielle Peptide (AMP)

Das angeborene Immunsystem ist die erste Front der körpereigenen Abwehr und kann sich gegen eine Vielzahl von Mikroorganismen mit verschiedensten Mechanismen zur Wehr setzen. Bestandteil des angeborenen Immunsystems bei Säugetieren sind kleine kationische Peptide, die antimikrobielle Mitwirkung gegenüber gram-positiven und gram-negativen Bakterien, Pilzen und Viren besitzen. Beim Menschen findet man hauptsächlich zwei Kategorien solcher antimikrobiellen Peptide (AMP), die sogenannten Cathelicidine und die Defensine, welche auch eine immunmodulatorische Funktion durch chemotaktische Wirkung auf Zellen des erworbenen angeborenen Immunsystems zeigen.

1.2.1 Struktur, Verteilung und Funktion der humanen Defensine

Bei den Defensinen handelt es sich um kationische Peptide mit einer Länge von 29-42 Aminosäuren und einer molekularen Masse zwischen drei bis fünf kDa [50]. Sie zeigen eine β -Faltblattstruktur mit drei intramolekularen Disulfidbrücken zwischen sechs konservierten Cysteinen [35; 36; 52]. Nach Peptidlänge und Verknüpfung der Cysteine lassen sich die Defensine in zwei Klassen, die α - und β -Defensine, unterteilen [36; 72]. Eine dritte, relativ neuentdeckte Untergruppe der Defensine, die θ -Defensine, wurde nicht beim Menschen gefunden, sondern nur bei Rhesusaffen [36; 72].

Bisher wurden beim Menschen sechs unterschiedliche α -Defensine identifiziert. Die α -Defensine 1-3 – auch als „Human Neutrophil Peptides“ (HNP) bezeichnet – und zum Teil auch HNP-4 werden konstitutiv in den azurophilen Granula der

neutrophilen Granulozyten exprimiert [34; 40]. HNP1-3 wurden aber auch in NK-Zellen nachgewiesen [4; 18]. Agerberth et al. zeigten mittels Doppelimmunfluoreszenzfärbung α -Defensine HNP1-3 zusätzlich auch in γ/δ -T-Zellen, CD19+ B-Zellen und CD14+ Monozyten isoliert aus PMBC, wobei sie die spezifische mRNA-Ebene nur in NK-Zellen und CD19+ B-Zellen fanden [4]. In einer neueren Arbeit wurden α -Defensine in unreifen dendritischen Zellen detektiert, die von Monozyten abstammend (immature Monocyte-derived Dendritic Cells = imMDDC), noch zur Phagozytose fähig sind, nicht aber mehr in reifen dendritischen Zellen ohne Phagozytosefunktion [90].

α -Defensine 5 und 6 – Humane Defensine HD-5 und HD-6 – findet man dagegen hauptsächlich konstitutiv in den Granula spezifischer Epithelzellen des Darms, den sogenannten Paneth-Zellen [80; 105].

Von den humanen β -Defensinen sind sechs Formen (HBD 1-6) bisher identifiziert. β -Defensine werden hauptsächlich in Epithelzellen, die in direktem Kontakt mit der Umwelt stehen wie den Epithelien der Atemwege und des Urogenitaltraktes sowie in den Keratinozyten der Haut, exprimiert [36; 72]. HBD 2 und 3 wurden initial aus Psoriasisherden isoliert [36]. HBD 4-6 wurden in Zellen der Testis und Epididymis festgestellt. Sie sind in ihrer Funktion und in ihrem Vorkommen heute noch ungenügend untersucht [72].

Die α -Defensine HNP1-3 werden in den Granula der neutrophilen Granulozyten und NK-Zellen konstitutiv exprimiert, sie können aber auch durch proinflammatorische Zytokine induziert werden. Ebenfalls konstitutiv exprimiert werden HD 5 und 6 wie auch HBD 1 in Epithelien. HBD 2-4 dagegen werden nur durch verschiedene Stimuli (Lipopolysaccharide, Bakterien-Antigen, Zytokine) induziert [105].

Sowohl α - als auch β -Defensine liegen in prä-pro-Vorläuferform vor, die erst nach proteolytischer Abspaltung einer Prä-Sequenz (proteolytisch) und einer Pro-Sequenz (Mechanismus bisher nicht genauer bekannt) in eine aktive Form überführt werden [92; 105]. Anschließend werden die „reifen“ β -Defensine auf der Oberfläche der Epithelzellen in die direkte Umgebung sezerniert. Die „reifen“ α -Defensine werden in den Granula von Neutrophilen und Paneth-Zellen gespeichert und auf Stimulation ausgeschüttet [92; 105].

Die Hauptfunktion der Defensine liegt in ihrer direkten antimikrobiellen Wirkung als Effektoren des angeborenen Immunsystems vor allem an den Grenzonen des Körpers wie der Haut. In mehreren Studien wurde immer wieder in vitro ihre breite antimikrobielle Wirkung gegen eine Vielzahl von gramnegativen und grampositiven Bakterien (z.B. Staphylococcus aureus, Escherichia coli), gegen verschiedene Pilze, einige (umhüllte) Viren (darunter HSV und HIV) und Parasiten gezeigt [35; 50; 51; 105].

Bisherige Studien haben als Wirkmechanismus zu folgendem Verständnis der direkten antibiotischen Wirkung der α -Defensine geführt. Die Mikroorganismen werden durch Phagozytose in die neutrophilen Granulozyten aufgenommen und kommen durch die Fusion der Vesikel mit den Granula in direkten Kontakt mit den α -Defensinen. Diese führen auf Grund ihrer Struktureigenschaften zu einer erhöhten Permeabilität der bakteriellen Membran durch Porenbildung und zerstören somit den Mikroorganismus. [37; 62; 71; 100].

In den vergangenen Jahren konnten in zahlreichen Studien weitere Funktionen der Defensine gezeigt werden, welche Einfluss auf das angeborene und erworbene Immunsystem nehmen.

Im Vordergrund stehen dabei vor allem chemotaktische Effekte. Territo et al. zeigten 1989 als erste eine chemotaktische Wirkung von HNP 1 und 2 auf Monozyten [95]. Inzwischen wurden durch weitere Autoren chemotaktische Funktionen der α -Defensine auf CD8+ und naive (CD45RA+) CD4+ T-Lymphozyten sowie auf unreife dendritische Zellen beschrieben [19; 103; 104]. HBD 2 wirkt ebenfalls chemotaktisch auf dendritische Zellen und T-Lymphozyten [102]. Reaktionen des adaptativen Immunsystems sollen durch Defensin vermittelte Verstärkung der Antigenaufnahme, Induktion der Ausreifung und Antigenpräsentation von dendritische Zellen erhöht werden [50; 105]. Durch chemotaktische Effekte der Defensine wird auch die Funktion von CD4+ und CD8+ T-Zellen beeinflusst [105].

HNP1-3 und HBD2 wirken pro-entzündlich durch die Stimulation der Ausschüttung von Histamin aus Mastzellen [13], wodurch lokal Gefäßreaktionen

induziert und die Infiltration von Phagozyten wie Neutrophilen und Monozyten mit sekundärer Produktion von IL-8 und IL-5 erhöht werden kann [9;105].

Allgemein erhöhen α -Defensine die Produktion von TNF- α , IL-1, CXCL8 (IL-8) sowie CXCL5 (IL-5) in Monozyten und Macrophagen [50; 105]. β -Defensine stimulieren die Synthese von IL-6, IL-10, MCP-1 und IFN γ -induzierendem Protein 10 (IP-10) [50].

Defensine zeigen in hohen Konzentrationen Zytotoxizität gegenüber verschiedenen eukaryotischen Zellen [72; 73]. In niedrigeren Konzentrationen konnten mitogene Effekte der α -Defensine vor allem auf normale und pathologische Epithelzellen wie Nierenkarzinom-Zelllinien [79], Lungeneithelien [1] oder Blasentumoreithelien [56] in vitro nachgewiesen werden. Andere Funktionen der α -Defensine HNP1-3 betreffen die Stimulation der Zellmigration, wie sie bei Wundheilungsprozessen an murinen (Maus) Fibroblasten und Epithelzellen beobachtet wurde, sowie die Erhöhung der Expression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 [72; 82; 105].

Als pathochemische Effekte sind eine Aktivierung des klassischen Komplementweges durch α -Defensine über die Interaktion mit Komplement C1 bekannt [88]. Außerdem wurde über eine Blockade des ACTH-Receptors mit der Folge einer Inhibition der Glukokortikoidproduktion in Ratten bei in vitro Experimenten berichtet [105].

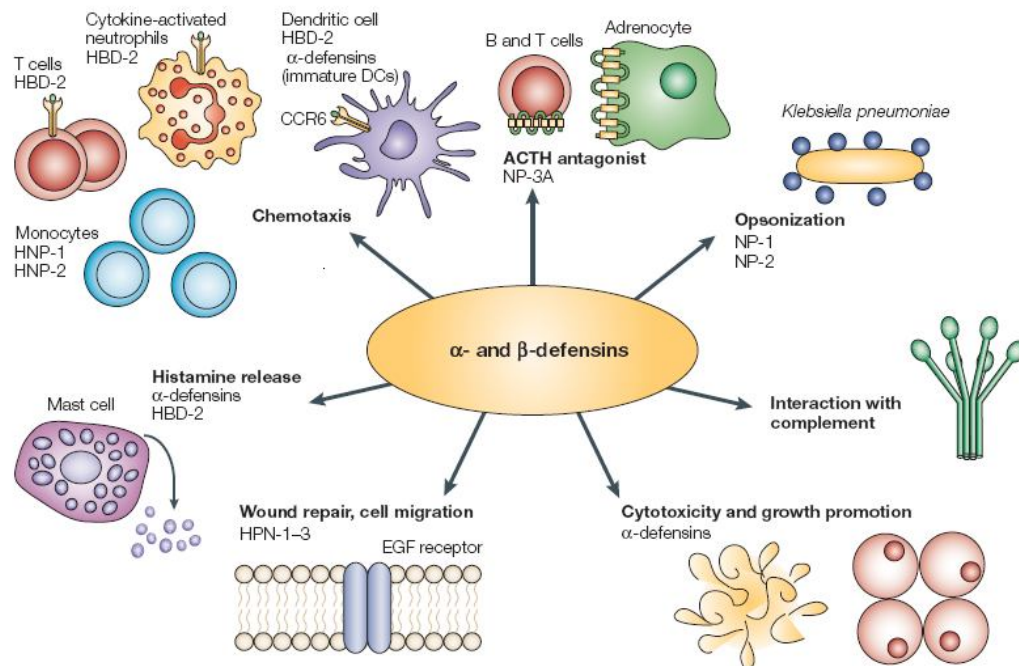


Abbildung 3: Funktionen der α - und β -Defensine. (Quelle: [72])

HNP: Human Neutrophil Peptide; NP: Neutrophil Peptide; HBD: Human Beta Defensin; CCR: Chemokin Rezeptor; NP: Neutrophil Peptide; EGF: Epidermal Growth Factor; ACTH: Adrenocorticotropes Hormon.

1.2.2 Defensine bei chronisch entzündlichen Erkrankungen der Haut und anderer Organe des Menschen

Die Haut als wichtige Schutzzone des Körpers zeigt drei Schichten: die Epidermis, die Dermis und die Subcutis, die mechanisch und chemisch die Adhäsion und den Eintritt von Pathogenen ins Körperinnere verhindern können. Dabei spielen spezifische Rezeptoren, sogenannte „Pattern Recognition Receptors“ (PRRs) auf den Epithelzellen und Immunzellen eine wichtige Rolle. Mit diesen Proteinen können diese Hautzellen Pathogene an spezifischen molekularen Mustern, sogenannte „Pathogen associated molecular patterns“ (PAMPs) erkennen. Die Bindung der PRRs führt zur Aktivierung der entsprechenden Zellen mit Produktion einer großen Anzahl von antimikrobiellen Peptiden, zu denen Defensine und Cathelicidine als die wichtigsten Vertreter gehören [75]. α - und β -Defensine werden in den dort lokalisierten Effektorzellen konstitutiv bzw. nach Stimulation, exprimiert (siehe oben). Verschiedene Krankheiten mit Veränderungen der Expression von antimikrobiellen Peptiden

und Zeichen der erhöhten Anfälligkeit für bestimmte Erreger deuten darauf hin, dass antimikrobielle Peptide wie Defensine und Cathelicidin LL-37 in vivo in der menschlichen antimikrobiellen Immunität der Haut und Schleimhäute eine wichtige Rolle spielen. Als Beispiel kann hier der Morbus Kostmann, eine schwere kongenitale Neutropenie, erwähnt werden. Diese Patienten weisen nach Behandlung mit G-CSF eine normale Konzentration der Neutrophilen im Blut auf, zeigen aber dennoch eine erhöhte Anfälligkeit für peridontale Infektionen. Hier scheint die deutlich reduzierte Expression von α -Defensinen HNP1-3 und LL-37 im Plasma und Speichel verantwortlich zu sein [89].

Auch bei der cystischen Fibrose sollen nach Smith et al. rezidivierende Infektionen der oberen und unteren Atemwege durch die vermehrte Besiedelungen des Epithels mit *Staphylococcus aureus* oder *Haemophilus influenzae* mit einer defekten lokalen mikrobiellen Abwehr in Zusammenhang stehen. Dabei soll die Hemmung der Defensinsekretion durch die veränderte Zusammensetzung des Bronchialsekretes der Patienten mit cystischer Fibrose (erhöhte Ionenkonzentrationen) relevant sein. Bisher sind dies aber keine bewiesenen Hypothesen [36; 93].

Auch bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wird die beobachtete verminderte Expression von Defensinen, insbesondere von HD 5 und 6 in den Panethzellen des Darms mit pathogenetisch relevanten Barrierefunktionsstörungen der Mukosa in Zusammenhang gebracht [80].

Veränderungen in der Expression von antimikrobiellen Peptiden wurden mehrfach auch bei Patienten mit Hauterkrankungen detektiert und als Ursache für erhöhte Anfälligkeit gegenüber Pathogenen beschrieben

So konnte in den spezifischen Läsionen bei der Psoriasis, einer entzündlichen Hauterkrankung mit einer angenommenen Automimmunpathogenese, eine erhöhte Expression von Cathelicidinen sowie von HBD2 und 3 festgestellt werden [33; 85]. Aber auch die α -Defensine HNP1-3 wurden vermehrt gefunden [47; 101]. Bei der Rosacea, einer anderen entzündlichen Hauterkrankung, wurde ebenfalls Cathelicidin verstärkt nachgewiesen. Patienten mit Psoriasis und Rosacea zeigen trotz einer gestörten Barrierefunktion der Haut häufig eine relative Resistenz gegenüber Hautinfektionen, die auf eine protektive Wirkung

der erhöhten antimikrobiellen Peptide hinzuweisen scheint. Dafür spricht auch, dass bei der atopischen Dermatitis, die klinisch meist durch rezidivierende Hautinfekte auffällt, eine Verminderung der antimikrobiellen Peptide in den Läsionen nachgewiesen wurde [33; 101].

Nach Verletzungen der Haut bei Gesunden wurde in verschiedenen Studien über einen Anstieg der Defensine berichtet. Dies schien sowohl α -Defensine zu betreffen, deren Zunahme durch die vermehrte Einwanderung von neutrophilen Granulozyten und NK-Zellen bedingt war, wie auch β -Defensine, die im Epithel bzw. den Keratinozyten durch die verstärkte Chemokinproduktion bzw. direkte Aktivierung über PRRs stimuliert wurden [101]. Nach Verbrennungen wiederum wurde eine Abnahme der Defensine in der Haut beobachtet, die zu einer erhöhten Rate an Infektionen z.B. mit *Pseudomonas aeruginosa* lokal in den Verbrennungswunden zu führen schien [33].

Die superficielle Follikulitis wird als entzündliche papulo-pustulöse Hauterkrankung der Haarfollikel definiert. In einer Studie aus dem Jahr 2003 wurde in den Infiltraten neutrophiler Granulozyten der spezifischen Läsionen dieser Hauterkrankung eine vermehrte Expression von HBD 2 und von HNP1-3 detektiert [86]. Die Autoren vermuten auf Grund des Verteilungsmusters der HBD-2 im Epithel oberhalb der Basalmembran und der HNP1-3 in den infiltrierenden Neutrophilen, dass - nachdem ein Pathogen die epidermalen β -Defensine überwunden hat - die HNP1-3 Teil einer zweiten Verteidigungsgrenze sind und als Verbindungsglied zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem fungieren.

Auch für die Pathogenese der Arteriosklerose scheinen Defensine relevant zu sein. So wurde in den Endothelzellen und den glatten Muskelzellen der Intima und Media arteriosklerotischer Arterien der Koronarien und Karotiden eine vermehrte Expression der α -Defensine gefunden [11]. Pathophysiologisch wird vermutet, dass zu Beginn der Arteriosklerose auf Grund einer endothelialen Dysfunktion eine Entzündungsreaktion ausgelöst wird. Dabei wandern Entzündungszellen wie neutrophile Granulozyten vermehrt in die Intima der Gefäßwände ein und schütten dort unter anderem aus den Granula α -Defensine HNP1-3 aus. α -Defensine HNP1-3 scheinen mit Lipoprotein (a)

(Lp(a)) und LDL einen Komplex einzugehen und stimulieren dann die Bindung von LDL und Lp(a) an Endothelzellen, glatte Muskelzellen und Fibroblasten und deren Akkumulation im Endothel. Dies führt zur weiteren Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten, die wiederum α -Defensine HNP1-3 ausschütten und somit in einem positiven Feedback die Entzündung modulieren und den Verlauf der Artherosklerose negativ beeinflussen könnten [69].

In anderen Studien wurde berichtet, dass Defensine auch die Progression von Tumoren beeinflussen könnten. Müller et al. wiesen HNP1-3 in Zellen des Nierenzellkarzinoms mit proliferierender Wirkung auf die malignen Epithelien nach [79], auch bei kutanem T-Zell-Lymphom wurde eine Expression von α -Defensinen HNP1-3 in den Zellen gezeigt [28].

1.3 Zielsetzung

Die α -Defensine HNP1-3 sind als antimikrobielle Peptide wichtige Effektormoleküle aktivierter Granulozyten.

Beim Morbus Behçet handelt es sich um eine leukozytoklastische Vaskulitis, bei der hyperaktive Granulozyten eine wichtige pathogenetische Rolle zu spielen scheinen. Dafür sprechen experimentelle Untersuchungen wie auch der sogenannte Pathergie-Test, der bei den Patienten eine beschleunigte und erhöhte Einwanderung von neutrophilen Granulozyten und mononukleären Zellen in die Dermis zeigt.

α -Defensine besitzen neben ihrer antimikrobiellen Wirkung auch eine Reihe weiterer Funktionen, die angeborene und erworbene Immunreaktionen modulieren und auf die Proliferation bzw. das Überleben von epithelialen Zellen und Fibroblasten Einfluss nehmen können. Aufgrund der zytotoxischen und chemotaktischen Funktionen könnten sie wichtige Effektormoleküle der (muko)kutanen Läsionen des Morbus Behçet sein, die nach Sezernierung durch die infiltrierenden Granulozyten oder andere Immunzellen wie z.B. NK-Zellen zu den beobachteten Läsionen führen.

Ziel dieser Arbeit war es daher, die Lokalisation von α -Defensinen HNP1-3 in der Haut von Patienten mit Morbus Behçet mittels immunhistochemischer

Methoden im Vergleich zu Biopsien von normaler Haut von Gesunden und Patienten zu untersuchen und deren Rolle als mögliche Effektormoleküle zu diskutieren.

2 Material

2.1 Reagenzien/Chemikalien

Es wurden, sofern nicht anders erwähnt, Lösungsmittel der Firma Merck (Darmstadt) und Chemikalien der Firma Sigma-Aldrich (Taufkirchen) verwendet.

- Kit DAKO EnVision™+System, Peroxidase (DAB) von DAKO Corporation, USA
- RNeasy Mini Kit, Qiagen, Hilden
- RNase-Free DNase Set, Qiagen, Hilden
- SuperScript™ II First-Strand Synthese System, Gibco-BRL, Eggenstein
- pUC Mix Marker 8, MBI Fermentas, St. Leon-Rot
- AmpliTaq DNA-Polymerase, Roche, Mannheim
- Ziege Normalserum, DAKO Corporation, USA
- Kaninchen Normalserum, DAKO Corporation, USA
- Gibco® RPMI 1640 Medium, Gibco BRL, Eggenstein (jetzt Invitrogen, Karlsruhe)
- Tissue Tek® O.C.T.™ Compound, Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen
- 4',6-Diamino-2-Phenylindol-Dihydrochlorid (DAPI), Sigma-Aldrich, Taufkirchen
- Bovines Serum Albumin (BSA), Böhringer, Mannheim
- Phosphat buffered saline (PBS) Puffer, Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
- Aqua bidest, Laboreigen
- Mowiol 4-88, Calbiochem® (jetzt Merck, Darmstadt)
- 1,4-Diazabicyclo-[2,2,2]-Oktan (DABCO), Merck Schuchhardt OHG, Hohenbrunn
- TRIzol®, Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
- Meyers Hämalun Lösung, Merck, Darmstadt
- Entellan®, Merck, Darmstadt
- Diethylpyrocarbonat (DEPC), Sigma, Taufkirchen
- Aceton, Merck, Darmstadt

- Wasserstoffperoxid (H₂O₂) 30%, Merck, Darmstadt
- TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan), Sigma-Aldrich, Taufkirchen
- Natriumchlorid (NaCl), Sigma-Aldrich, Taufkirchen
- Chlorwasserstoffsäure (HCl), Sigma-Aldrich, Taufkirchen
- Dinatriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄), Sigma-Aldrich, Taufkirchen
- Chloroform (CHCl₃), Merck, Darmstadt
- Ethidiumbromid, Merck, Darmstadt
- Ficoll® 400, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
- Lachssperma, Sigma-Aldrich, Taufkirchen

2.2 Gefäße und Zubehör

- Eppendorf Cup, 1.5ml. Eppendorf®, Greiner Bio one, Solingen
- Inkubationskammer, Laboreigen
- KIMTECH Science Kimwipe Tücher, Kimberley-Clarke Professional, Surrey UK
- Kryoröhrchen, Greiner Bio one, Solingen
- Objektträger Superfrost®Plus und Deckgläser, Langenbrinck, Emmendingen
- PAP-Pen, Beckman Coulter, Krefeld
- Pipetten 1-10µl, 10-100µl, 200µl-1000µl, Eppendorf AG, Hamburg
- Pipettenspitzen Typ Eppendorf® 1-10µl, 10-100µl, 200µl-1000µl, Greiner Bio one, Solingen
- Tauchbecken gläsern, Laboreigen

2.3 Geräte

- Computersoftware: AnalySIS®, Soft Imaging System GmbH, Leinfelden-Echterdingen; LQwin (Fotoverarbeitung Leica)
- Kamera: Nikon Coolpix 4500
- Kryotom: Leica CM3050 S, Leica Microsystems, Bensheim
- Mikroskope: Axiophot und Axiovert 135, Carl Zeiss AG, Oberkochen

- Mikroskop mit integrierter Kamera: Leitz DM RBE, Leitz Heidelberg mit Digitalkamera Leica DC 300F, Leica Microsystems, Bensheim
- Netzgeräte: Electrophoresis Power supply ST606T Gibco BRL, Eggenstein
- PCR-Gerät: PTC 100™ programmable Thermal Controller, Biozym, Hameln
- Photometer: GeneQuant RNA/DNA Calculator, Amersham Pharmacia, Freiburg
- Sterilbank: Lamin Air HBB 2448, Heraeus, Hanau
- Speedvac: Bachofer SpeedVac Concentrator, Bachofer, Reutlingen
- Wasserbad: GFL 1086
- Vortex-Mixer: Vortex-Genie, Bender und Hobein, Schweiz
- Zentrifugen: Eppendorf Zentrifuge 5402, Eppendorf AG, Hamburg

2.4 Primärantikörper

Die verwendeten Primärantikörper sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Eingesetzte Primärantikörper

Antikörperspezifität	Klon	Wirt	Klonalität	Verwendung (Verdünnung)	Hersteller/Referenz
α -Defensin HNP 1-3		Kaninchen	Polyklonal	IFL (1:100)	Dr. H. Kalbacher, MNF, Tübingen
α -Defensin HNP 1-3	DEF3	Maus	Monoklonal	IHC (1:600)	BMA Biomedicals AG, Augst, Schweiz
CD56 NK-Zellen (NCAM)	Eric-1	Maus	Monoklonal	IFL (1:100)	Ancell Corporation, USA
CD66b Granulozyten	80H3	Maus	Monoklonal	IFL (1:100)	Serotec, Oxford, UK
CD14 Monozyten	TM3 GN3/22.F11.3	Maus	Monoklonal	IFL (1:10)	Hybridomüberstand; Prof. Dr. C.A. Müller Tübingen/Leucocyte Typing III (1987) p. 603
CD45 Hämatopoetische Zellen	TL-1 GN14/234.A5.1	Maus	Monoklonal	IFL (1:7500)	Hybridomüberstand; Prof. Dr. G.A. Müller Universitätsklinikum Göttingen/ Leucocyte Typing IV (1989) p.628
Human Neutrophil Elastase Neutrophile Granulozyten	NP57	Maus	Monoklonal	IFL (1:250)	DAKO A/S, Dänemark
Endothel	TEN3 LN29/423.3.1	Maus	Monoklonal	IFL (unverdünnt)	Hybridomüberstand; Prof. Dr. A. Ziegler, Berlin
CD1 Thymozyten, Langerhans Zellen, Dendritische Zellen	OKT6	Maus	Monoklonal	IFL (1:100)	Hybridom von ATCC , Ortho Pharmaceutical Corporation, USA
CD15 Neutrophile Granulozyten, Monozyten	CBL144	Maus	Monoklonal	IFL (1:100)	Cymbus Biotechnology Ltd., UK via Dianova, Hamburg
γ/δ TCR	5A6.E9	Maus	Monoklonal	IFL (1:5)	Serotec, Oxford, UK
HLA-Klasse I Positiv Kontrolle	W6/32HL	Maus	Monoklonal	IHC (unverdünnt)	Hybridomüberstand; Prof. Dr. A. Ziegler, Berlin/ [12]
Negativ Kontrolle	W6/32HK	Maus	Monoklonal	IHC (Unverdünnt)	Hybridomüberstand; Prof. Dr. A. Ziegler, Berlin/ [110]

2.5 Sekundärantikörper

Für die immunhistochemische Färbung wurde ein polymerer an Horseradish-Peroxidase gekoppelter Ziege anti-Maus Sekundärantikörper aus dem Kit DAKO EnVision™+System, Peroxidase (DAB) von DAKO Corporation, USA verwendet.

Bei der Immunfluoreszenzfärbung wurde zur Detektion der Bindung des polyklonalen Defensin-Antikörpers ein mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy2™ (Carbocyanin) markierter polyklonaler Ziege anti-Kaninchen IgG Sekundärantikörper (Anti-rabbit) eingesetzt. Zur Detektion der murinen monoklonalen Reagenzien wurde ein mit Cy3™ (Indocarbocyanin) markierter polyklonaler Ziege anti-Maus (IgG) gerichteter Antikörper der Firma Dianova, Hamburg, verwendet.

Zur Darstellung der Zellkerne mittels Anfärbung der dsDNA wurde 4',6-Diamino-2-Phenylindol-Dihydrochlorid (DAPI) eingesetzt.

Tabelle 2: Eingesetzte Sekundärantikörper

Antikörper	Klonalität	Detektion von	Kopplung mit	Verwendung (Verdünnung)	Hersteller
Ziege Anti-Maus	Polyklonal	Maus IgG	Peroxidase	IHC (Unverdünnt)	DAKO Corporation, USA
Ziege Anti-Maus	Polyklonal	Maus IgG (H+L)	Cy3™	IFL (1:500)	Dianova, Hamburg
Ziege Anti-Kaninchen	Polyklonal	Kaninchen IgG (H+L)	Cy2™	IFL (1:100)	Dianova, Hamburg

2.6 Herkunft und Art der Gewebeproben

Die Hautbiopsien, die für die immunhistologischen Analysen in dieser Studie zur Verfügung standen, wurden in einer Zusammenarbeit mit Prof. Hasan Yasici von der Abteilung für Medizin der Cerraphasa Universität Istanbul nach vorheriger Einwilligung der Patienten mit der Akzeptanz eines Ethikvotums durch die Türkei gewonnen. Zwei Proben waren von der Abteilung für Rheumatologie der Universität Tübingen zur Diagnosestellung und nach Aufklärung und Einverständnis der Patienten entsprechend dem Ethikvotum (Projektnr. 96/2005V) entnommen worden.

Als Kontrollen wurden Hautbiopsien verwendet, die der Sektion für Transplantationsimmunologie und Immunhämatologie als anonymisierte Proben

aus der Hautklinik nach entsprechendem Ethikvotum zur Verfügung standen (Ethikvotum Projektnr. 165/2007/BO1).

Auf Grund des langen Transportweges aus der Türkei waren trotz durchgehender sachgemäßer Kühlung und Lagerung 16 der 54 zugesandten Hautproben von insgesamt 28 Patienten mit Morbus Behçet (MB) aus Istanbul nicht mehr für die Untersuchung verwendbar.

Es wurden insgesamt vier verschiedene Patientengruppen mit Morbus Behçet untersucht, wobei Gruppe eins und zwei verschiedenen Formen des Pathergie-Testes unterzogen worden waren. Die Biopsien, die in Tabelle 3 in ihrer Herkunft beschrieben sind, wurden alle am Vorderarm unter sterilen Kautelen gewonnen.

Die Gruppe 1 (n=15) bildeten Biopsien von Patienten mit Morbus Behçet, bei denen ein klassischer Pathergie-Test durchgeführt worden war. In der Gruppe 1a (n=10) war das Testergebnis nach 48h positiv, d.h. es zeigte sich eine typische Effloreszenz (Pustel oder Papel). In der Gruppe 1b (n=5) war das Ergebnis des Pathergie-Tests negativ. Es wurde jeweils nach 48h das entsprechend zuvor punktierte Areal biopsiert.

In die Gruppe 2 mit der Bezeichnung „Urat“ (n= 10) wurden Proben eingeschlossen, bei denen statt eines Pathergie-Testes nach Standardverfahren mit einfachem Nadelstich 2.5mg Uratkristalle unter die Haut gespritzt worden waren. In dieser Gruppe wurden nur positive Reaktionen beobachtet, welche ebenfalls nach 48h entnommen wurden.

Zusätzlich wurden in der Studie zwei spontan entstandene Läsionen von Patienten mit Morbus Behçet als Gruppe 3 „Spontane Läsionen“ untersucht, die in der rheumatologischen Ambulanz der Universität Tübingen biopsiert worden waren.

„Kontrolle MB“ (n= 11) bedeutet, dass diese Proben von Patienten mit Morbus Behçet stammen, bei denen keinerlei Manipulation am Arm durchgeführt wurde und die dort als Kontrolle entnommene Stelle klinisch blande, das heisst keine

sichtbare Läsion des jeweiligen Patienten mit Morbus Behçet gezeigt hatte. Diese wurden als Testgruppe 4 geführt.

Bei einem Teil der Patienten wurden zwei Hautbiopsien entnommen. Eine Probe wurde an der Stelle des durchgeführten Pathergie-Tests (klassisch oder mit Urat) entnommen, die andere am kontralateralen nicht getesteten Arm als Kontrolle.

Das Durchschnittsalter der an Morbus Behçet erkrankten Patienten war 37 Jahre (Range 17-53 Jahre), das Verhältnis Männer zu Frauen lag bei 14:1. Bei einem Patienten war leider das Alter nicht bekannt. Zehn von 30 Patienten waren HLA-B 5, bzw. sechs HLA-B51 positiv und alle Patienten erfüllten die Kriterien der Internationalen Studiengruppe (International Study Group 1990). Sechs Patienten hatten nach Auskunft der behandelnden türkischen Kollegen zum Zeitpunkt der Untersuchung keine medikamentöse Therapie; die zwei Patienten aus der rheumatologische Ambulanz der Universität Tübingen hatten zum Zeitpunkt der Biopsientnahme ebenfalls keine Therapie. Ein Teil der Patienten wurde immunsuppressiv hauptsächlich mit Colchizin und Azathioprin behandelt, Interferon α , Cyclosporin A oder Prednison erhielten nur je 2 Patienten (Originaldaten Patientenliste siehe Anhang)

Als Kontrollgruppe „Normale Haut“ (n= 7) wurden 7 anonymisierte Biopsien normaler Haut von Patienten aus früheren Kooperationen der Sektion für Transplantationsimmunologie und Immunhämatologie mit der Dermatologie der Universität Tübingen untersucht. Zu diesen Proben gab es keine Angaben zu Alter und Geschlecht der Donoren. Zum Vergleich wurden auch zwei Biopsien von Patienten (männlich, Alter 30 u. 32 Jahre) mit anderen dermatologischen Erkrankungen analysiert. Hierbei handelte es sich um Biopsien aus einem Psoriasisherd bzw. der Effloreszenz eines Lichen ruber. Leider war es trotz intensiver Bemühungen nicht möglich, weitere Proben zur Vergrößerung dieser Kontrollgruppe zu erhalten.

Auf Grund der kleinen Fallzahl und der verschiedenen Ausgangsbedingungen der untersuchten Biopsien konnte keine statistische Auswertung der Ergebnisse durchgeführt werden, sondern es wurde eine morphologisch-beschreibende Auswertung vorgenommen.

Tabelle 3: Einteilung der analysierten Hautbiopsien in 6 Gruppen entsprechend ihrer klinischen Voraussetzungen.

	Nummer	Geschlecht	Alter	Testart	Testergebnis
Gruppe 1a MB Pathergie positiv (n= 10)	MB 10	m	38	Pathergie	positiv
	MB 11	w	47	Pathergie	positiv
	MB 19	m	17	Pathergie	positiv
	MB 21	m	44	Pathergie	positiv
	MB 29	m	27	Pathergie	positiv
	MB 33	m	45	Pathergie	positiv
	MB 37	m	32	Pathergie	positiv
	MB 40	m	48	Pathergie	positiv
	MB 54	m	51	Pathergie	positiv
	MB 62	m	48	Pathergie	Positiv
Gruppe 1b MB Pathergie negativ (n= 5)	MB 26	m	26	Pathergie	Negativ
	MB 27	m	39	Pathergie	Negativ
	MB 30	m	27	Pathergie	Negativ
	MB 38	m	32	Pathergie	Negativ
	MB 39	m	48	Pathergie	Negativ
Gruppe 2 MB Urat (n= 10)	MB 1	m	39	Urat	Positiv
	MB 6	w	28	Urat	Positiv
	MB 8	m	38	Urat	Positiv
	MB 16	m	34	Urat	Positiv
	MB 17	m	36	Urat	Positiv
	MB 23	m	46	Urat	Positiv
	MB 32	m	48	Urat	Positiv
	MB 51	m	?	Urat	Positiv
	MB 63	m	29	Urat	Positiv
MB 67	m	27	Urat	Positiv	
Gruppe 3 MB Spontane Läsion (n= 2)	S 2575	m	40	spontan	Spontan
	S 2576	m	53	spontan	Spontan
Gruppe 4 MB Kontrollgruppe (n= 11)	MB 5	w	28	Kontrolle	normale Haut
	MB 7	m	38	Kontrolle	normale Haut
	MB 9	m	38	Kontrolle	normale Haut
	MB 15	m	34	Kontrolle	normale Haut
	MB 20	m	17	Kontrolle	normale Haut
	MB 24	m	46	Kontrolle	normale Haut
	MB 34	m	45	Kontrolle	normale Haut
	MB 61	m	48	Kontrolle	normale Haut
	MB 64	m	29	Kontrolle	normale Haut
	MB 66	m	19	Kontrolle	normale Haut
MB 68	m	27	Kontrolle	normale Haut	
Gruppe 5 Kontrollgruppe Normale Haut (n= 7)	S 120	?	39	Normale Haut	
	S 233	F	30	Normale Haut	
	S 323	?	?	(Tätowierung) Haut	
	S 641	?	?	Normale Haut	
	S 832	?	?	Normale Haut/Leiche	
	S 1576	F	62	Normale Haut/Patho	
	S 2055	M	62	Normale Haut	
Gruppe 6 Kontrollgruppe Hauterkrankung (n= 2)	S 404	M	30	Psoriasis	
	S 800	M	32	Lichen ruber	

3 Methoden

3.1 Aufbereitung der Gewebeproben

Die Gewebeproben wurden nach Biopsie in RPMI Medium und Einfriermedium Tissue Tek® überführt, dann sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend in Stickstofftanks bei -196°C in Gefrier Röhrchen bis zur Verwendung aufbewahrt.

Auch die Proben aus der Türkei wurden während des Transportes in Stickstoff gelagert, um die Kühlkette aufrecht zu erhalten.

Im Kryotom wurden bei -25°C Kammertemperatur Gefriergewebeschnitte mit einer Dicke von 5µm angefertigt, die auf Objektträger aufgetragen und anschließend für eine Stunde bei Raumtemperatur (RT) getrocknet wurden. Danach wurden sie zehn Minuten in -20°C kaltem Aceton fixiert und anschließend nochmals 30 Minuten bei RT getrocknet. Wenn die Schnitte nicht direkt weiterverwendet wurden, wurden sie bei -20°/-70°C aufbewahrt und dann vor Bearbeitung eine Stunde bei Raumtemperatur getrocknet.

Die Schnitte wurden für die indirekte immunhistochemische Färbung und für die Dreifach-Immunfluoreszenz Färbung verwendet.

3.2 Immunologische Methoden

3.2.1 Immunhistochemische Färbung

Der Nachweis der Expression von α -Defensinen HNP1-3 in der Haut erfolgte mittels indirekter immunhistochemischer Färbung. Die Methode wird als indirekt bezeichnet, da in einem ersten Schritt ein primärer Antikörper, der spezifisch gegen das nachzuweisende Antigen gerichtet ist, gebunden wird und danach in einem zweiten Schritt ein (tier)spezies-spezifischer Zweitantikörper, an den ein Enzym, z.B. Peroxidase (hier verwendet Horseradish Peroxidase (HRP)) gekoppelt ist, hinzugegeben wird. Dieser reagiert mit dem Primärantikörper, der im ersten Schritt an das Antigen gebunden hat. Das gekoppelte Enzym setzt in einem abschließenden Schritt ein Chromogensubstrat, z.B. DAB (3,3'-Diaminobenzidin) zu einem Farbniederschlag (in diesem Falle braun) um, der

als Position des spezifisch gebundenen Antigens im Gewebe mikroskopisch beurteilt werden kann.

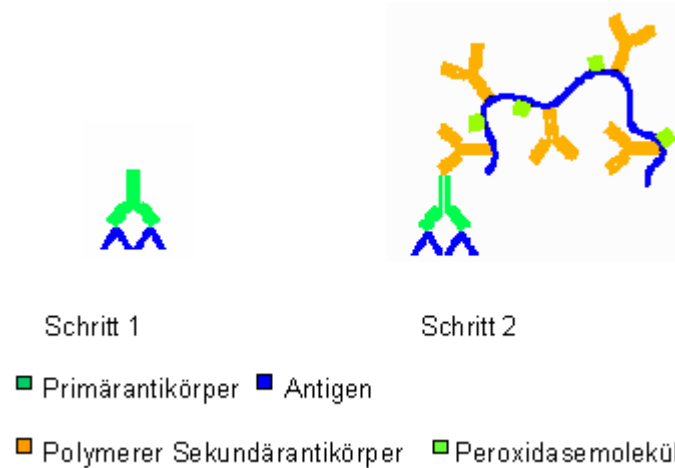


Abbildung 4: Schematische Darstellung der indirekten immunhistochemischen Färbung mit DAKO EnVision™+System, Peroxidase (DAB) (modifiziert nach Boenisch T. Handbuch Immunhistochemische Färbemethoden. 3. Auflage. DakoCytomation GmbH Hamburg; 2003)

Protokoll der Färbung:

Für die Färbung wurde folgender Waschpuffer bzw. Spülpuffer verwendet:

Zur Herstellung von 2L Stammlösung:

12g TRIS

34,8g NaCl

2000 ml Aqua bidest

Mit HCl 37% auf pH 7,4 eingestellt.

Die Stammlösung wurde dann zum Waschen der Gewebeschnitte 1:10 mit NaCl 0,9% verdünnt.

Zur Verdünnung der Antikörper wurde PBS (Phosphat buffered saline) Puffer verwendet.

Die Färbung wurde mit dem Kit DAKO EnVision™+System, Peroxidase (DAB) von DAKO Corporation, USA, durchgeführt.

Zuerst wurden die Gefrierschnitte auf dem Objektträger mit einem Fettstift zur Begrenzung der Flüssigkeitsbenetzung während der Färbung umrandet. Die gesamte Färbung fand in einer feuchten Kammer statt.

Im ersten Schritt wurden die endogenen Peroxidasen des Gewebes mit dem Peroxidase Block (0,03% Wasserstoffperoxid) aus dem Kit fünf Minuten geblockt, um eine unspezifische Umsetzung des Chromogens durch das endogene Enzym zu verhindern. Danach folgten zwei Waschgänge à drei Minuten im Tauchbecken mit Waschpuffer.

Zur Blockierung potenzieller unspezifischer Antikörperbindungsstellen wurden die Schnitte 30 Minuten mit 1:10 in Spülpuffer verdünntem Ziegen-Normalserum (150µl) inkubiert. Danach wurde das Serum abgekippt und abgesaugt mit Kimwipe-Tüchern.

Als nächster Schritt wurden 150 µl des Primärantikörpers in geeigneter Verdünnung in PBS sowie die Positiv- (W6/32.HL) und Negativ-Kontrollen (W6/32.HK) auf jeweils einen Schnitt aufgetragen und für 30 Minuten inkubiert und anschließend ungebundener Antikörper durch dreimaliges Waschen für fünf Minuten mit Spülpuffer entfernt.

Dann wurden 150 µl Sekundärantikörper des peroxidase- und Ziege-anti-Maus Immunglobulin-gekoppelten Polymers aus dem Kit unverdünnt aufgetragen und ebenfalls für 30 Minuten inkubiert. Es folgten vier Waschschrte à fünf Minuten in Spülpuffer. Danach wurde durch die gebundene Peroxidase und durch die Zugabe des Chromogens DAB+ (3,3'-Diaminobenzidin Chromogen Lösung), das in einer Wasserstoffperoxid-Pufferlösung des Kits verdünnt wurde, nach einer Inkubationszeit von zehn Minuten eine Farbreaktion mit einem braunen Farbniederschlag ausgelöst und damit die Lokalisation der gebundenen Primärantikörper detektiert.

Mit Mayer's Hämalaun wurden die Schnitte circa 1 Minute gegengefärbt und abschließend unter fließendem Leitungswasser gebläut.

Die getrockneten Präparate wurden zur besseren Haltbarkeit mit Entellan® Schnelleindeckmittel und Deckgläsern bedeckt und bis zur Auswertung und Dokumentation dunkel gelagert.

3.2.2 Mikroskopische Auswertung der Präparate

Die gefärbten Präparate wurden mit dem Lichtmikroskop nach Stärke der Färbereaktion, Anzahl und morphologischen Lokalisation der markierten Zellen beurteilt und mit dem Leitz Mikroskop DM RBE mit einer integrierten Digitalkamera zur Dokumentation fotografiert. Die Vergrößerung wurde jeweils in den Bildern bzw. in der Beschriftung dokumentiert.

Es wurden in jedem Färbeansatz Schnitte mitgeführt, die mit positiven bzw. negativen Kontrollantikörpern gefärbt worden waren.

Die gefärbten Schnitte wurden unter dem Mikroskop durch die Autorin in Supervision durch die Betreuerin ausgewertet.

Die semiquantitative Beurteilung der Färbung erfolgte bezogen auf das Gesamtbild und die Verteilung in den oberflächlichen Hautschichten und Strukturen.

Die Färbereaktion wurde nach folgendem Schema dargestellt:

0: keine Anfärbung in der Übersichtsvergrößerung 100fache Vergrößerung (x100).

1+: nur sehr vereinzelte (bis 5) Anfärbung von Zellen in der 100fachen Übersichtsvergrößerung (x100).

2+: > 5 zellgebundene Markierungen in der 100fachen Übersichtsvergrößerung (x100).

3+: > 15 zellgebundene Markierungen in der 100fachen Übersichtsvergrößerung (x100).

3.2.3 Dreifach-Immunfluoreszenzfärbung

Elvanol:

0,166 g/ml Mowiol 4-88 (Calbiochem®), PBS/Glycerol (1:2), 50 mg/ml DABCO

Mittels der Dreifach-Immunfluoreszenzfärbung wurden im Gewebe die Zelltypen identifiziert, die α -Defensin HNP1-3 exprimieren.

Um eine Unterscheidung der jeweils spezifisch von den beiden Primärantikörpern erkannten Antigene zu gewährleisten, wurde bei der

Kombination der Primärantikörper darauf geachtet, dass die beiden Antikörper nicht der gleichen Spezies angehörten. Deswegen wurde hier der polyklonale Defensin-Antikörper HNP1-3 (Dr. H. Kalbacher, MNF, Tübingen) verwendet, der in der Spezies Kaninchen hergestellt worden war, während alle anderen Antikörper aus Mäusen gewonnen worden waren.

Die gesamte Färbung wurde in der feuchten und zusätzlich abgedunkelten Kammer bei Raumtemperatur durchgeführt.

Zunächst wurden die Gewebeschnitte zur Begrenzung der Flüssigkeitsbenetzung mit einem Fettstift umrandet. Nach Fixierung in -20°C Aceton wurden die Präparate zweimal fünf Minuten mit PBS gewaschen. Auf Grund der Doppel-Immunfluoreszenzfärbung wurden im ersten Schritt gleichzeitig je $150\mu\text{l}$ zwei unterschiedlicher Primärantikörper (verdünnt in PBS mit 0,1%BSA) mit einer Inkubationsdauer von einer Stunde aufgetragen. Anschließend wurde ungebundener Primärantikörper in drei Waschgängen à fünf Minuten in PBS entfernt. Im nächsten Schritt wurden die Gewebeschnitte für eine Stunde mit jeweils zwei entsprechend Fluorchrom-gekoppelten Sekundärantikörpern (verdünnt in PBS mit 0,1%BSA) inkubiert. Zur Unterscheidung der jeweils durch den Primärantikörper spezifisch erkannten Strukturen wurden die Sekundärantikörper mit zwei unterschiedlichen Fluorchromen Cy2™ (Carbocyanin) und Cy3™ (Indocarbocyanin) gekoppelt. Zur Anfärbung der dsDNA der Zellkerne wurde die Sekundärantikörperlösung zusätzlich mit $1\mu\text{g/ml}$ DAPI versetzt. Es folgte erneut eine dreimalige Waschung mit PBS für jeweils fünf Minuten. Zum Schluss wurden die gefärbten Gewebeschnitte mit Elvanol, dem zur Fluoreszenzstabilisierung DABCO zugesetzt wurde, und danach mit Deckgläsern bedeckt. Die Präparate wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop Zeiss Axiophot ausgewertet, das zur Dokumentation der Immunfluoreszenzfärbungen mit einer Digitalkamera ausgestattet war. Die Auswertung der Färbungen erfolgte unter Verwendung der Software AnalySIS®.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 RNA-Isolierung

Zur Überprüfung der Expression von α -Defensinen HNP1-3 in den Hautgewebeproben wurde RNA aus dem Gewebe isoliert, um in der RT-PCR die mRNA nachzuweisen.

Zur Isolierung der RNA aus dem Hautgewebe, das bis zur Verarbeitung in Stickstofftanks bei -196°C aufbewahrt worden war, wurden am Kryotom bei -20°C bis zu 30mg Gewebe gehobelt und nach Überführung in ein Eppendorf-Cup sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Durch das Schockgefrieren wird eine Freisetzung der RNA durch Zerstörung der Zellmembranen bewirkt.

Bei der Verarbeitung der Proben wurde streng darauf geachtet, RNase-freie Materialien und Handschuhe zu verwenden, um eine Reaktion der Ribonucleasen (RNasen) mit der RNA zu verhindern.

Mittels 1ml TRIzol® wurden die Zellen weiter lysiert, kräftig vermengt und nach fünf Minuten wurden 200 μl Chloroform hinzugegeben. Anschließend wurde auf dem Vortex-Mixer die Lösung gemischt, bis die zwei Phasen sich verbunden hatten und daraufhin 15 Minuten bei 12'400 rpm und 4°C zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein frisches Eppendorfcup überführt, mit gleichem Volumen Ethanol 70% gemischt und dann auf eine RNeasy-Isolationssäule (max. 700 μl) gegeben, so dass die enthaltene RNA gebunden wurde. Bei 10'000 rpm wurden für 15 s die Säulen zentrifugiert und das Eluat verworfen. Anschließend wurde die Säule mit 350 μl RW1-Puffer des RNeasy Kit gewaschen und mit den gleichen oben genannten Parametern erneut zentrifugiert. Um etwaige Verunreinigungen mit genomischer DNA zu eliminieren, erfolgte ein Verdau mit der im Kit enthaltenen RNase-free DNase. Es wurden 10 μl DNase Mixl verdünnt in 70 μl RDD-Puffer des Sets auf die Säulen gegeben und nach 15minütiger Inkubation sowie nach Waschung mit 350 μl RW1-Puffer ein weiteres Mal für 15 s bei 10'000 rpm zentrifugiert. Mit 500 μl RPE-Puffer des Qiagen RNeasy Kit folgten nochmals zwei Waschgänge sowie eine erneute Zentrifugation. Die Säulen wurden in ein neues

Eppendorfcup überführt und mit 50 µl DEPC-Wasser, einem starken RNase-Inhibitor, versetzt und für 10 Minuten bei RT inkubiert. Schließlich wurde zur Elution der RNA die Säule eine Minute bei 10'000 rpm abzentrifugiert. Die Konzentration und Reinheit der RNA wurden durch Messungen der Absorption bei 260 nm und des Verhältnisses der Absorption bei 260 und 280 nm (Reinheitsquotient zwischen 1,5-2,0) am Photometer ermittelt. Als Positiv-Kontrolle diente Lachssperma (Sigma).

3.3.2 Reverse Transkription - Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Die zuvor isolierte RNA wurde nun mittels einer „Two-Step“ RT-PCR in komplementäre cDNA umgeschrieben. Im ersten Ansatz wurde aus der isolierten mRNA mittels Reverser Transkriptase und spezifischer Umschreibung mit Oligo(dT)₁₂₋₁₈ cDNA synthetisiert, welche anschließend als Matrize (Template) für die spezifische PCR dienen sollte.

Für die RT-PCR wurden die Reagenzien des SuperScript™ II First-Strand Synthese System von Gibco-BRL (Invitrogen) verwendet. Mit jedem Ansatz wurde auch eine Kontroll-RNA aus dem Set mitgeföhren, um die Umschreibung zu kontrollieren.

Schritt 1: Reverse Transkription:

Pro Ansatz wurden zunächst folgende Komponenten zugegeben:

- X µl RNA (Einsatzmenge 100 ng bis 5 µg)
- 1 µl dNTP-Mix (10 mM)
- 1 µl Oligo(dT)₁₂₋₁₈ (0,5 µg/µl)
- Ad 10 µl DEPC-Wasser

Die Proben wurden für fünf Minuten bei 65°C inkubiert und danach sofort auf Eis eine Minute lang abgeköhlt.

Pro Ansatz wurde folgendes hinzugegeben:

- 2 μ l 10x RTX-Puffer
- 4 μ l $MgCl_2$ (25 mM)
- 2 μ l DTT (0,1 mM)
- 1 μ l RNaseOUT Rekombinant RNase

Für einen so genannten „hot start“ wurden die Proben 2 Minuten bei 42°C inkubiert. Erst danach wurde jedem Reaktionsansatz 1 μ l (= 50 Units) SuperScript™ II RT (das Enzym) zugesetzt und 50 Minuten bei 42°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Inaktivierung des Enzyms mittels 15-minütiger Erhitzung auf 70°C gestoppt und sofort auf Eis abgekühlt.

Nach einer kurzen Zentrifugation wurde zur vollständigen Zerstörung der Template - RNA 1 μ l RNase H hinzugegeben und es folgte eine 20-minütige Inkubation bei 37°C. Anschliessend wurde die Menge der erhaltenen cDNA pro μ l je nach eingesetzter Menge mRNA berechnet.

Schritt 2: Polymerasekettenreaktion (PCR)

Von der erhaltenen cDNA wurden in der anschließenden PCR maximal 500 ng verwendet. Als DNA-Polymerase wurde die AmpliTaq DNA-Polymerase von Roche eingesetzt. Als Positivkontrolle und zur Überprüfung der Qualität der verwendeten RNA wurde stets eine Reaktion mit cDNA und spezifischen Primern für das konstitutive Gen β -Aktin durchgeführt.

Zur Detektion des α -Defensins HNP1-3 wurden die in Tabelle 4 genannten spezifischen Primer eingesetzt.

Tabelle 4: Verwendete Primer für RT-PCR und deren Sequenzen

Gen	Primerbezeichnung und –sequenz (5'→3')	Referenz	PCR-Produkt Länge (bp)
Humanes α -Defensin 1-3	HNP1-3 for: CACTCCAGGCAAGAGCTGATGAGGTTG HNP1-3 rev: AATGCCCAAGAGTCTTCCCTGGTAGATG	Zhao et al., 1996 [109]	215
β -Aktin	β -Aktin for: TCAGAAGGATTCCTATGTGGGC β -Aktin rev: CCATCACGATGCCAGTGGTA	Harris et al., 1992 [48]	317

Eine Reaktion wurde in einem Volumen von 50 μ l angesetzt:

- X μ l cDNA (maximal 500 ng)
- 0,4 μ l 100 mM dNTP's (jedes 25 mM)
- 5 μ l 10x RP PE (Puffer)
- 1,5 μ l spezifische Primer for (10 pmol/ μ l)
- 1,5 μ l spezifische Primer rev (10 pmol/ μ l)
- 0,2 μ l AmpliTaq DNA-Polymerase
- 2,5 μ l Dimethylsulfoxid (5%) (nur bei α -Defensin HNP1-3 Ansatz)
- Ad 50 μ l Aqua bidest

PCR Parameter:

95°C für 7 Minuten Initialdenaturierung

26-mal Zyklus I:

Denaturierung:	95°C	15 s			
Annealing:	68°C	45 s	abzüglich	0,2°C	bei jedem Zyklus
Elongation:	72°C	30 s		1,5°C/s	Aufheizen

20-mal Zyklus II:

Denaturierung:	95°C	15 s			
Annealing:	62°C	45 s	abzüglich	0,1°C	bei jedem Zyklus
Elongation:	72°C	30 s			

72°C für 5 Minuten Enddenaturierung

Danach wurden die Proben auf 4°C abgekühlt und die Amplifikationsprodukte entweder direkt durch eine Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt oder bei 6-8°C (Kühlschrank) aufbewahrt.

3.3.3 Agarose – Gelelektrophorese

10x Ladepuffer:

20% Ficoll, 0,1 M EDTA (pH 8,0), 1% SDS, 0,25 % Bromphenolblau

TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA-Puffer):

1,1 % (w/v) TRIS-Base, 0,55 % (w/v) Borsäure, 2 mM EDTA (pH 8,0)

Zur Trennung und Identifizierung der erhaltenen PCR-Produkte wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Dabei wurden die Amplifikate gemäß ihrer Molekulargewichte in 2%igem Agarose-Gels aufgetrennt. Zur Herstellung des 2%igen Agarose-Gels wurden 2 g Agarosegel in 100 ml TBE-Puffer durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst und in die Gelkammer gegossen. Nach Abkühlen wurde der Kamm entfernt und die Gelapparatur mit TBE-Puffer aufgefüllt.

Die Proben wurden mit 10x Ladepuffer versetzt und in die Ladetaschen des Gels geladen. Als Marker wurde der pUC Mix Marker 8 (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) benutzt. Die Elektrophorese lief für 35 Minuten bei 80 V und 80 mA. Anschließend wurde das Gel 10 Minuten in ein Ethidiumbromidbad (0,0001 % Ethidiumbromid in ddH₂O) gelegt, um die aufgetrennten PCR-Produkte anzufärben. Das Ergebnis wurde unter dem UV-Licht bei 362 nm fotografisch dokumentiert.

4 Ergebnisse

α -Defensine HNP1-3 stellen antimikrobielle Peptide mit potentiell zytotoxischen und immunmodulatorischen Eigenschaften dar, die vor allem von myeloischen Zellen, insbesondere Granulozyten, gebildet und in neutrophilen Granula gespeichert werden. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob bei Patienten mit Morbus Behçet Zellen des Immunsystems verstärkt α -Defensine HNP1-3 als mögliche Effektormoleküle von Entzündungsprozessen in der Haut exprimieren. Dazu wurden immunhistologische und molekularbiologische Analysen durchgeführt.

4.1 Expression von α -Defensinen HNP1-3 in der normalen Haut

4.1.1 Nachweis der Expression von α -Defensinen HNP1-3 in der Haut mit monoklonalen und polyklonalen Antikörpern

Für die Untersuchungen der Expression von α -Defensinen HNP1-3 wurden ein monoklonaler muriner Antikörper der Firma BMA sowie ein polyklonaler Antikörper verwendet. Der polyklonale Antikörper wurde durch Herrn Dr. Kalbacher von der Mathematisch Naturwissenschaftliche Fakultät (MNF) Tübingen gegen ein in vitro synthetisiertes humanes α -Defensin HNP1-3 Peptid durch Immunisierung von Kaninchen und anschließender Aufreinigung aus dem Serum der Tiere produziert. Die Spezifität des Antikörpers war in einem enzyme-linked Immunosorbent assay (ELISA) überprüft und bereits für immunhistologische Färbungen verwendet worden [79].

Zunächst wurde in einer Vortestung an Gefrierschnitten von Proben normaler gesunder Haut und Thymusgewebe die Reaktivität dieser beiden Reagenzien in der indirekten Immunoperoxidasemarkierung verglichen und ihre optimalen Titerbereiche bestimmt. Mit beiden Antikörpern konnte eine reproduzierbare identische Färbung erreicht werden, so dass im Folgenden der monoklonale murine Antikörper der Firma BMA in der Verdünnung 1:600 für die indirekte Immunoperoxidasetechnik eingesetzt wurde. Der polyklonale Antikörper aus dem Kaninchen wurde in der Verdünnung 1:100 in der

Immunfluoreszenzfärbung für Mehrfachmarkierungen eingesetzt, bei denen neben den Antikörpern gegen α -Defensine HNP1-3 weitere murine monoklonale Reagenzien zur Bestimmung der Spezifität der HNP1-3 synthetisierenden Zellen verwendet wurden. Damit wurden unspezifische Kreuzreaktionen der fluoreszenz-gebundenen Sekundärantikörper weitestgehend vermieden, die zur Detektion der gebundenen Primärantikörper in den indirekten Fluoreszenzmarkierungen eingesetzt werden mussten. Die Färbungen wurden in der Übersicht mit 100facher Vergrößerung (x100) unter dem Mikroskop ausgewertet und je nach Menge der angefärbten Strukturen mit einer Bewertungsskala (Score) von 0, 1+, 2+, 3+ bewertet (siehe Kapitel 3.2.2.). Die Epidermis zeigte in den Epithelzellen keine Anfärbung von α -Defensinen HNP1-3. Nur die abgeschilferten Zellen des Stratum corneum, der Hornschicht, waren teilweise bräunlich angefärbt, obwohl in den Färbungen mit dem Antikörper W6/32.HL (Positivkontrolle) oder dem Antikörper W6/32.HK (Negativkontrolle) keine Markierung zu beobachten war.

Markierungen für die Expression von α -Defensinen HNP1-3 wurden vor allem in der Dermis beobachtet. Hier fanden sich intrazelluläre auf die Zelle beschränkte Anfärbungen. Daneben fielen Färbungen auf, die sich über spezifische Zellgrenzen hinaus in den Extrazellularraum ausbreiteten, das heißt nicht nur intrazelluläre oder oberflächengebundene Bindung der Antikörper, sondern auch Reaktivität im engen oder weiteren direkten Umfeld einzelner Zellen erkennen ließen und als fleckförmige (patchy) Färbung bezeichnet wurden. Ferner ließen sich besonders um Blutgefäße herum großflächige und sehr stark ins Gewebe „auslaufende“ Markierungen für HNP1-3 beobachten. Einige Zellen in der Dermis um Blutgefäße herum erschienen auf Grund von Vakuolen geschädigt zu sein.

Nicht in jedem Schnitt waren Anteile der Subkutis vorhanden. Sofern sie erfasst wurde, konnte ein ähnliches Markierungsmuster wie in der darüber liegenden Lederhaut festgestellt werden. Meistens fiel hier eine Konzentration der Expression von α -Defensinen HNP1-3 an beziehungsweise um Blutgefäße auf. Insgesamt ließ sich eine verstärkte Expression der α -Defensine HNP1-3 in der Dermis beobachten.

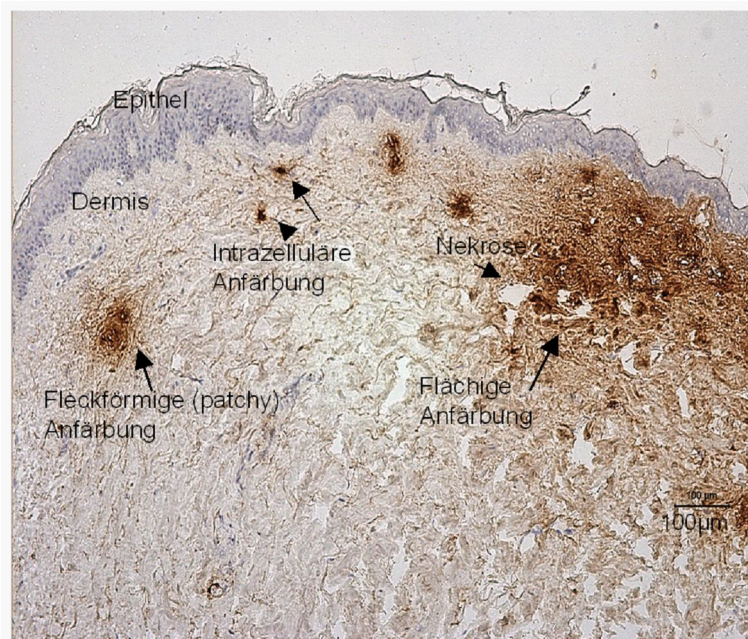


Abbildung 5: Beispiel für die unterschiedlichen immunhistochemischen Färbemuster für die Expression von α -Defensinen HNP1-3, die in der immunhistochemischen Untersuchung normaler Hautbiopsien (S233) detektiert wurden.

Vergrößerung: Maßstab im Bild angegeben.

4.1.2 Verteilung der Expression von α -Defensinen HNP1-3 in der normalen Haut

Zur Untersuchung der Expression von α -Defensinen HNP1-3 wurden als Kontrollgruppe sieben Biopsien von normaler Haut, die im Rahmen von Untersuchungen in der dermatologischen Klinik erhalten worden waren, untersucht. In den indirekten immunhistochemischen Färbungen mit dem monoklonalen murinen Antikörper zeigte sich eine Expression von α -Defensinen HNP1-3 in 4 von 7 Proben (57%) mit einem Score von 1+. Eine vermehrte Expression mit der Bewertung 2+ wurde in 1 von 7 Biopsien detektiert. In zwei Proben war eine sehr starke Expression (Score 3+) sichtbar. Dort fiel eine intensive großflächige Färbung in der Dermis bis zur Subkutis unter Aussparung des Epithels auf, die sich in Wiederholungsfärbungen bestätigte. Da die Positiv- und Negativkontrollen bei diesen Färbungen korrekt

erschienen, musste von einer spezifischen abnorm erhöhten Expression in diesen Proben ausgegangen werden.

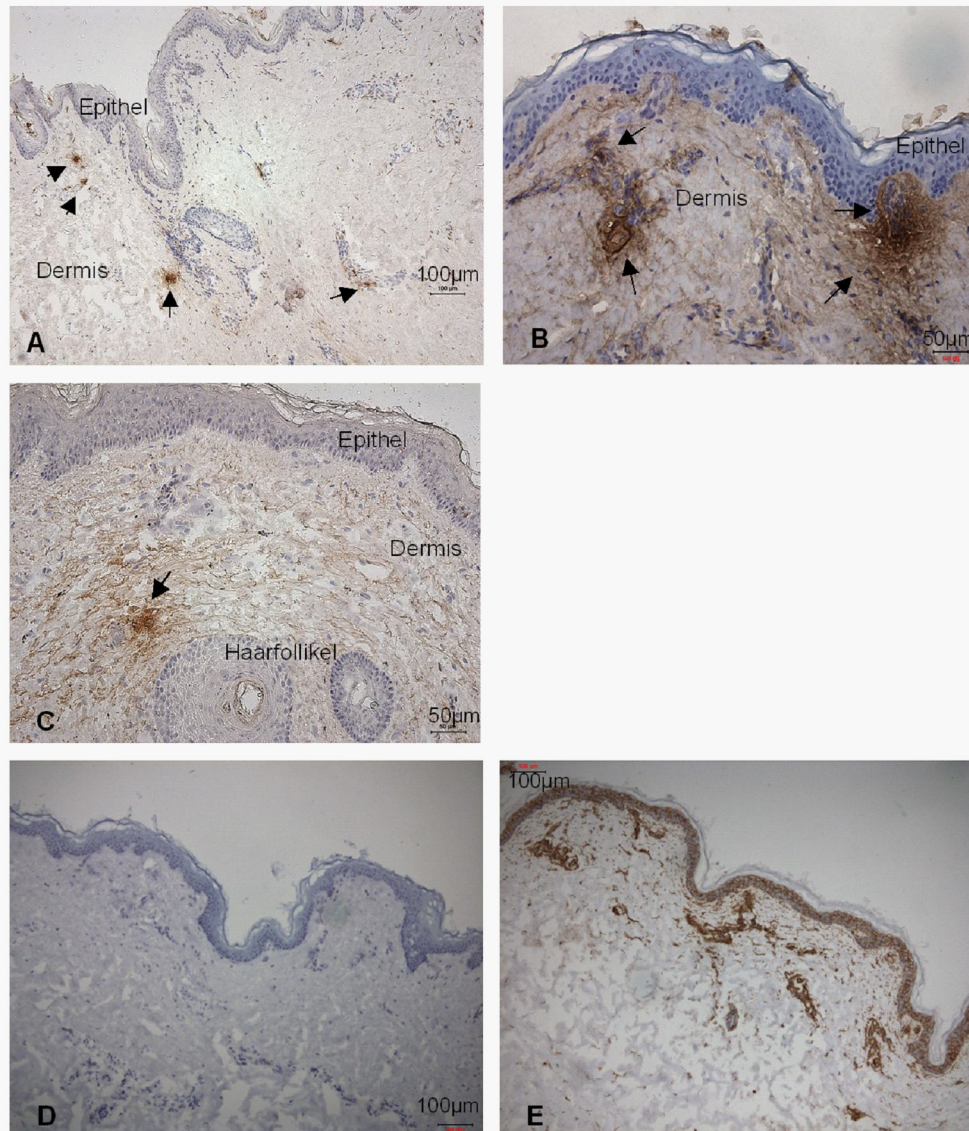
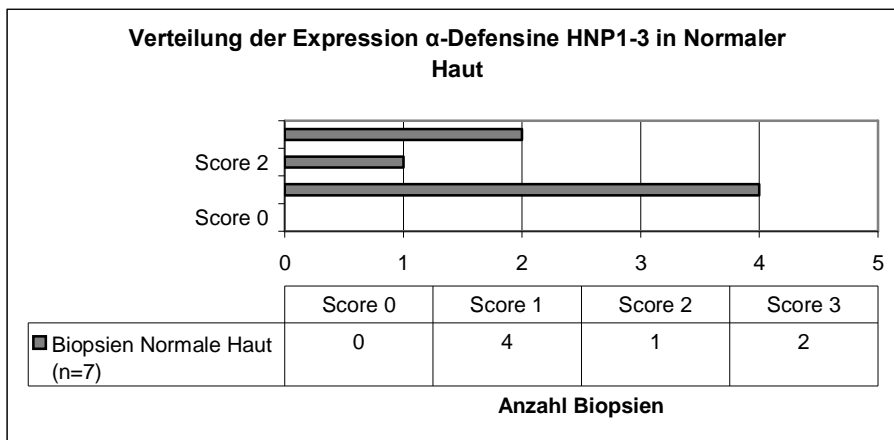


Abbildung 6: Immunhistochemischen Färbungen in normaler Haut: **A:** α -Defensine HNP1-3 Expression in normaler Haut mit Score 1+ bewertet (S641). **B:** α -Defensine HNP1-3 Färbung in normaler Haut mit Score 2 bewertet (S832); auffallend ist eine Durchbrechung der Markierung an der Basalmembran des Epithels im rechten Bereich der Biopsie. **C:** α -Defensine HNP1-3 Positivität in normaler Haut mit Score 3+ bewertet (S1576). **D:** Negativ-Kontrolle mit dem Antikörper W6/32.HK (S832). **E:** Positiv-Kontrolle mit dem Antikörper W6/32.HL (S832). Vergrößerung: Maßstab jeweils im Bild angegeben.

Tabelle 5: Zusammenfassung der Ergebnisse der α -Defensine HNP1-3 Expression in der Gruppe der normalen Hautbiopsien .



4.2 Analyse der Expression von α -Defensinen HNP1-3 in Hautbiopsien bei Patienten mit Morbus Behçet

Die Zielsetzung dieser Arbeit war, die Expression von α -Defensinen HNP1-3 in der Haut bei Patienten, die an Morbus Behçet erkrankt sind, näher zu untersuchen. Es wurden die Expression in insgesamt 38 Hautproben von Patienten mit Morbus Behçet nach indirekter Immunperoxidasefärbung mit Hilfe einer semiquantitativen Skalierung in der 100fachen Übersichtsvergrößerung beurteilt und bewertet. Wie bereits im Kapitel „Material und Methoden“ im Einzelnen dargestellt ist, wurden die Proben auf Grund unterschiedlicher vorangegangener Behandlungen in unterschiedliche Gruppen unterteilt.

4.2.1 α -Defensine HNP1-3 Expression nach klassischer Pathergietestung

15 Proben stammten von Patienten, die einem klassischen Pathergie-Test unter sterilen Kautelen unterzogen worden waren. 10 dieser Tests fielen nach visueller Beurteilung positiv aus, das heißt es zeigte sich eine papulöse oder pustulöse Effloreszenz, welche 48h nach Durchführung des Tests biopsiert worden war. Bei fünf Biopsien war das Testergebnis negativ, das zuvor punktierte Areal wurde ebenfalls nach 48 h biopsiert.

In der Gruppe „Pathergie positiv“ war bei 8 Patienten von 10 (80%) eine verstärkte Expression mit Scorewerten von 2+ und 3+ zu verzeichnen (4 Proben mit Score 2+ und 4 Proben mit Score 3+). Keine oder nur eine sehr geringe Expression von α -Defensinen HNP1-3 war in je einer Probe festzustellen. In der Gruppe der visuell negativen Testergebnisse wurde in 3 Proben von 5 eine leicht vermehrte Expression mit einer Bewertung von 2+ nachgewiesen, Score 0 und 1+ wurden für die spezifische Markierung in jeweils einer weiteren Probe vergeben.

Wie bereits in den Färbungen der Biopsien der normalen Haut, war auch in diesen Biopsien wieder das typische Verteilungsmuster mit einer flächig ins Extrazellulargewebe auslaufenden Färbung neben intrazellulärer Färbung zu beobachten. Bei besonders ausgeprägter Expression der α -Defensine HNP1-3 zeigten sich auch Zeichen für schwere Zellschädigungen im dermalen Gewebe.

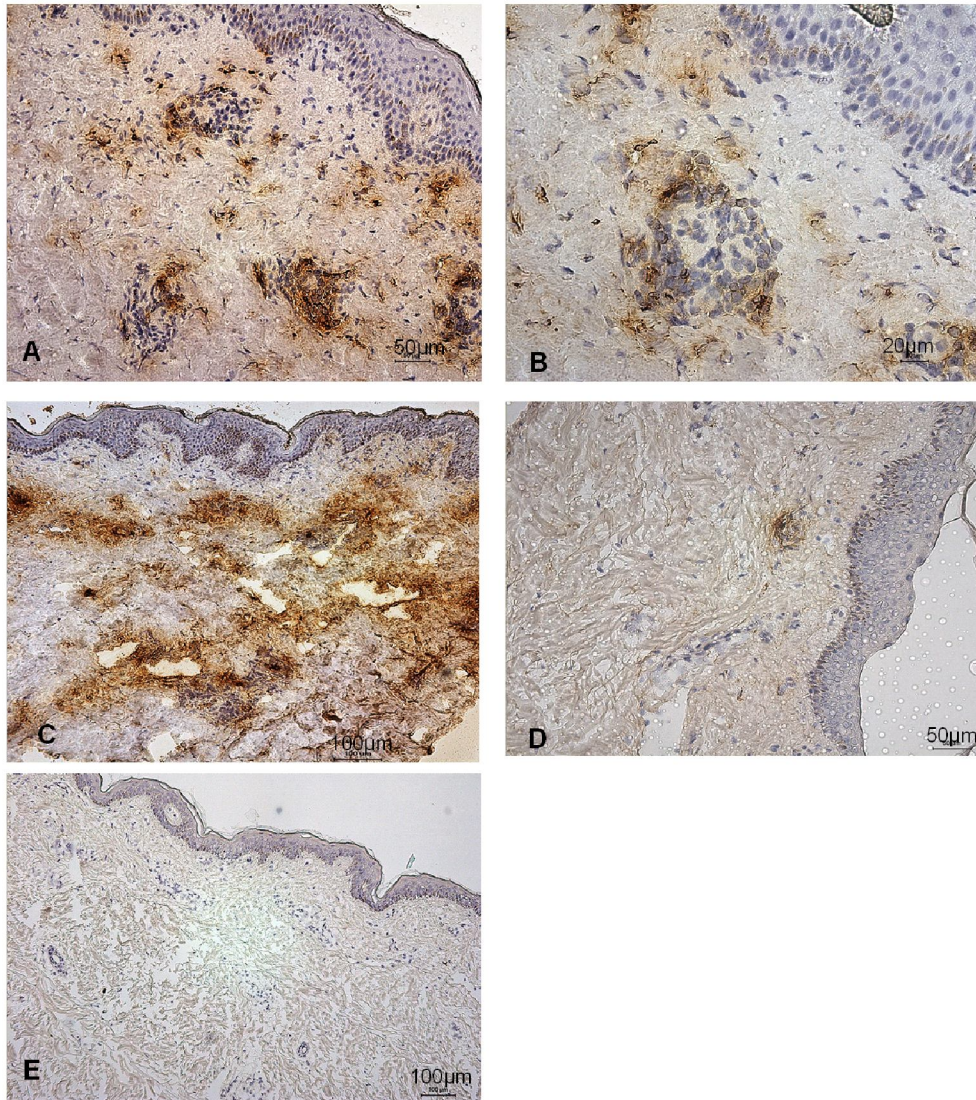
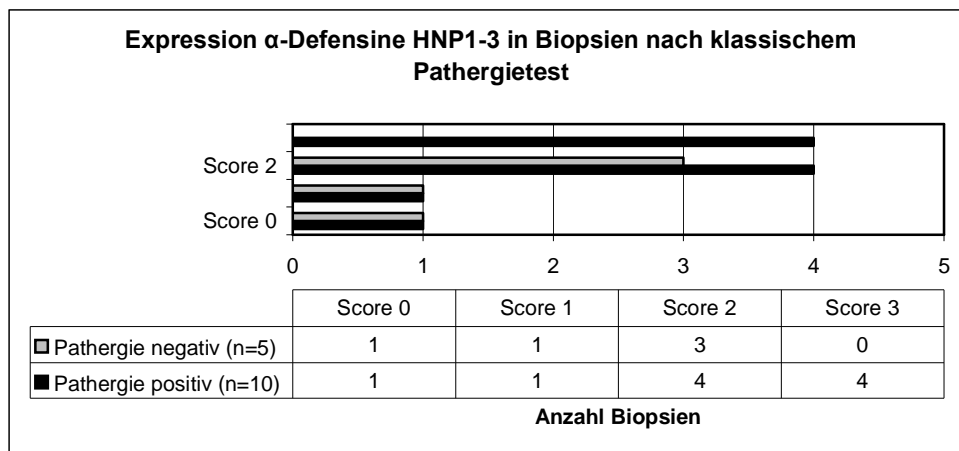


Abbildung 7: Immunhistochemische Färbung. **A:** Expression der α -Defensine HNP1-3 bei positivem klassischem Pathergie-Test in der Hautbiopsie eines Patienten mit Morbus Behçet (MB 10), mit Score 3+ bewertet. **B:** Detailausschnitt aus Bild A. Intrazelluläre und extrazelluläre Färbung der α -Defensine HNP1-3 bei positivem Pathergie-Test (MB10). **C:** Starke Expression der α -Defensine HNP1-3 nach positivem Pathergie-Test eines Patienten mit Morbus Behçet (MB19), mit Score 3+ bewertet. **D:** Expression der α -Defensine HNP1-3 bei negativem Pathergie-Test in der Haut eines Patienten mit Morbus Behçet (MB26), mit Score 1+ bewertet. Bild. **E:** Negativkontrolle mit dem Antikörper W6/32.HK (MB27).
Vergrößerung: Maßstab jeweils im Bild angeben.

Tabelle 6: Zusammenfassung der Ergebnisse der Expression von α -Defensinen HNP1-3 in der Gruppe der Patienten mit Morbus Behçet nach klassischem Pathergie-Test.



4.2.2 α -Defensine HNP1-3 Expression nach Pathergie-Test mit Injektion von Uratkristallen

Bei 10 Patienten mit Morbus Behçet war statt eines klassischen Pathergie-Testes eine Injektion mit 2.5mg Uratkristallen intrakutan vorgenommen worden, die in früheren Studien zu einer Verstärkung der Hautreaktion im Rahmen eines Pathergie-Test geführt hatte. Auch hier waren nach 48h die Ergebnisse des Testes biopsiert worden, wobei es bei allen Patienten zu positiven Reaktionen geführt hatte.

In nahezu allen Proben dieser Gruppe zeigt sich eine extensive Expression von α -Defensinen HNP1-3. In 9 von 10 (90%) Biopsien war eine verstärkte Anfärbung, d.h. ein Score > 2+ zu sehen, wobei 5 von 10 (50%) sehr stark (Score 3+) α -Defensine HNP1-3 exprimierten. Nur eine einzige Probe zeigte eine geringe Expression mit einer Bewertung von 1+. In jeder Probe konnte eine positive Färbung für α -Defensine HNP1-3 festgestellt werden.

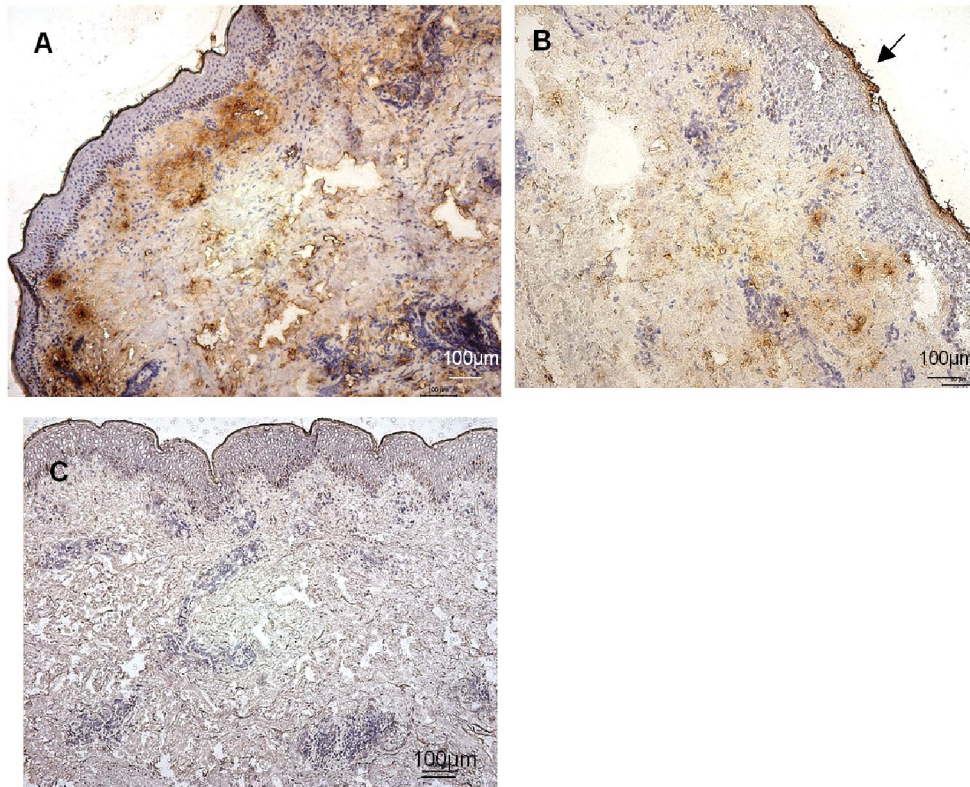
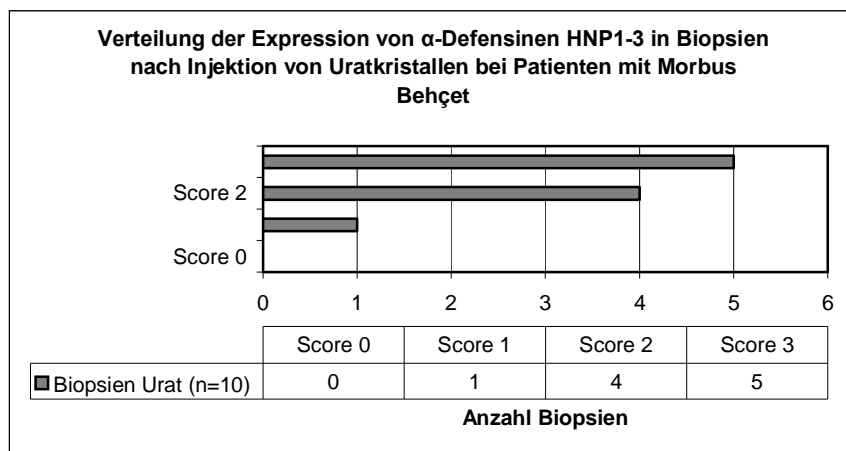


Abbildung 8: Immunhistochemische Färbungen. **A:** Expression der α -Defensine HNP1-3 bei positivem Pathergie-Test nach Injektion von 2.5mg Uratkristallen in der Haut eines Patienten mit Morbus Behçet (MB 51), mit Score 3+ bewertet. **B:** Expression von α -Defensinen HNP1-3 nach Pathergie-Test mit Injektion von Uratkristallen. Pfeilmarkierung zeigt eine positive Markierung des Stratum corneum (MB 63), mit Score 3+ bewertet. **C:** Negativkontrolle mit dem Antikörper W6/32.HK (MB27). Vergrößerung: Maßstab jeweils im Bild angegeben

Tabelle 7: Zusammenfassung der Ergebnisse der Expression von α -Defensinen HNP1-3 in der Gruppe der Patienten mit Morbus Behçet nach klassischem Pathergie-Test.



4.2.3 α -Defensine HNP1-3 Expression in spontanen Hautläsionen des Morbus Behçet

Für die Studie konnten zwei Biopsien spontaner Hautläsion gewonnen werden, die bei zwei Patienten mit Morbus Behçet spontan aufgetreten waren und das Bild einer pustulösen erythematösen Effloreszenz zeigten. In diesen beiden Biopsien fand sich eine starke Expression von α -Defensinen HNP1-3 in der Dermis, wie in der folgenden Abbildung 9 zu sehen ist. Auch hier zeigte sich erneut vor allem eine fleckförmige, „patchy“ Verteilung der Markierung über die Zellgrenzen hinaus.

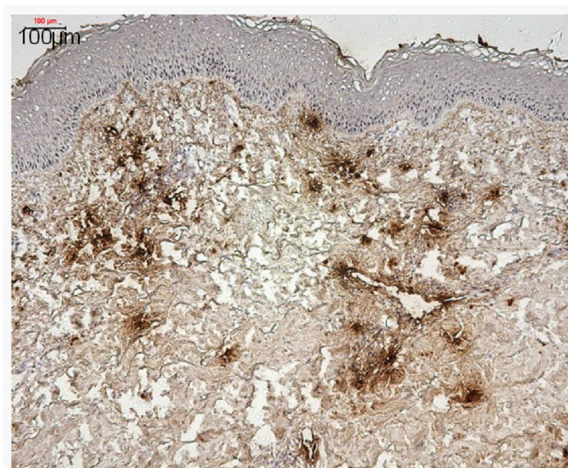


Abbildung 9: Immunhistochemische Markierung von α -Defensinen HNP1-3 in einer spontanen Läsion eines Patienten mit Morbus Behçet (S2576). Vergrößerung: Maßstab im Bild angegeben.

4.2.4 α -Defensine HNP1-3 Expression in Kontrollbiopsien nicht manipulierter Hautareale von Patienten mit Morbus Behçet

Des Weiteren standen 11 Biopsien von Patienten mit Morbus Behçet zur Verfügung, deren Haut im biopsierten Areal keine makroskopischen Auffälligkeiten zeigte und nicht mittels Pathergie-Test behandelt worden war. Hier war nur eine sehr geringe Menge positiv gefärbter Zellen nachweisbar. In 91% der Fälle, d.h. in 10 von 11 Proben, waren keine (Score 0) oder nur vereinzelte Zellen (Score 1+) angefärbt. Nur eine Probe unterschied sich von diesem Markierungsbild. Sie zeigte eine deutliche Expression mit einer

typischen „fleckigen“ und flächigen Verteilung von HNP1-3 in der Dermis direkt unterhalb des Epithels (Score 3+).

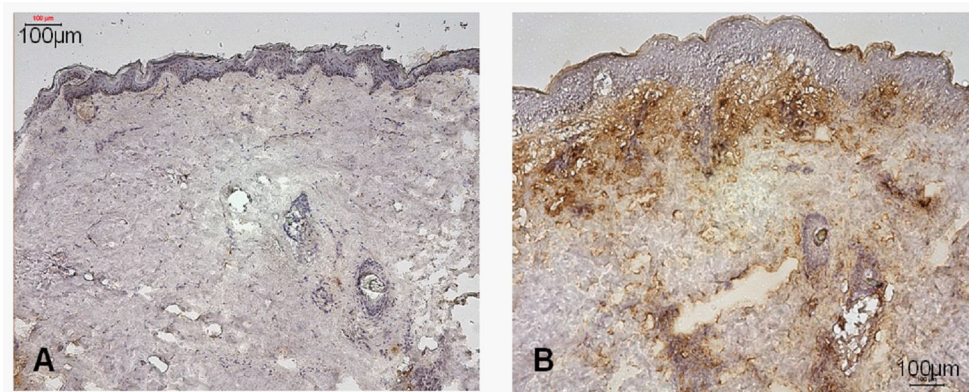
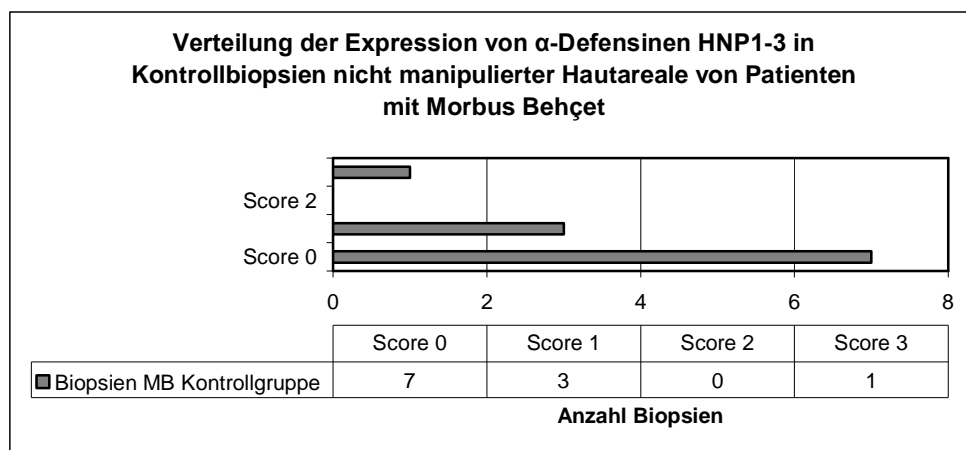


Abbildung 10: Immunhistochemische Färbung. **A:** Beispiel für die fehlende Expression von α -Defensinen HNP1-3 in einer Biopsie unmanipulierter Haut von einem Patienten mit Morbus Behçet (MB 68), mit Score 0 bewertet. **B:** Atypische verstärkte Expression von HNP1-3 in Probe MB 20 in unmanipulierter Haut eines Patienten mit Morbus Behçet, mit Score 3+ bewertet. Vergrößerungen in den Bildern angegeben.

Tabelle 8: Zusammenfassung der Ergebnisse der Expression von α -Defensinen HNP1-3 in der Gruppe der Kontrollbiopsien nicht manipulierter Hautareale der Patienten mit Morbus Behçet



4.3 Analyse der Verteilung der Expression von α -Defensinen HNP1-3 bei Patienten mit anderen Hauterkrankungen

Um die Expression von α -Defensinen HNP1-3 auch bei anderen Hauterkrankungen zu analysieren, wurden eine Probe eines Patienten mit einem Psoriasisherd sowie eine Biopsie eines Lichen ruber untersucht.

In der Probe der Psoriasis zeigten sich ebenfalls fleckförmige positive Areale in der Dermis, wie sie typischerweise auch in den Biopsien der Patienten mit Morbus Behçet und auch in den Kontrollen gesunder Haut beobachten werden konnten.

In der Probe des Lichen ruber fiel auf, dass dort, wo die Basalmembran im Epithel durchbrochen zu sein schien, eine Markierung für HNP1-3 auftrat. Zusätzlich war in der oberen Epidermis eine fleckförmige wie auch zellgebundene intrazelluläre Expression von HNP1-3 zu sehen.

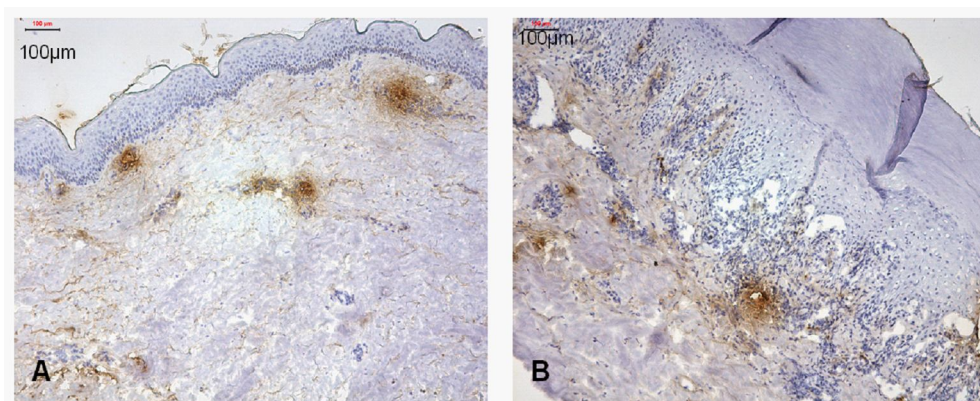


Abbildung 11: Immunhistochemische Färbung der α -Defensine HNP1-3 in anderen Hauterkrankungen. **A:** Markierung von HNP1-3 in einer Hautbiopsien eines Psoriasisherdes.

B: Expression von Defensinen HNP1-3 in einer Biopsie eines Lichen ruber.

Vergrößerung: Maßstab im Bild angegeben.

4.4 Charakterisierung der α -Defensine HNP1-3 positiven Zellen mit Hilfe von Mehrfachmarkierungen in der indirekten Immunfluoreszenz

Nachdem die α -Defensine HNP1-3 in der Haut von Patienten mit Morbus Behçet und in der normalen Haut mittels der indirekten Immunperoxidase-Markierung nachgewiesen worden waren, wurde in den folgenden Untersuchungen versucht, die Zellspezifität der Expression zu bestimmen. Dazu wurden Dreifachmarkierungen in der Immunfluoreszenz auf den nativen Kryogewebeschnitten mit dem polyklonalen α -Defensin HNP1-3 Antikörper und verschiedenen Antikörpern gegen Zelldifferenzierungsmerkmale durchgeführt. α -Defensine HNP1-3 wurden mit Hilfe des polyklonalen Kaninchen-Antikörpers und einem Indocarbocyanin (Cy3) markierten Sekundärantikörper als grüne Fluoreszenz detektiert, die monoklonalen Antikörper gegen Zelldifferenzierungsmerkmale wurden mit einem Carbocyanin (Cy2) gebundenen Zweitantikörper als rote Fluoreszenz nachgewiesen. Eine überlagernde Anfärbung der fluochrommarkierten Antikörper mit Gelbmarkierungen in den Ergebnisbildern ließ auf eine Ko-Lokalisation der getesteten Merkmale mit der Expression von HNP1-3 schließen. Zur Markierung der Zellkerne wurde 4',6-Diamino-2-Phenylindol-Dihydrochlorid (DAPI) verwendet, welches unter Fluoreszenzlicht blau leuchtet.

Die Dreifachmarkierungen wurden an Gewebeschnitten durchgeführt, bei denen in der immunhistochemischen Färbung eine verstärkte Expression von α -Defensinen detektiert worden war. Es wurde bei jedem Färbvorgang gleichzeitig eine negative Kontrolle ohne Primärantikörper zur Detektion von unspezifischen Bindungen der Sekundärantikörper bzw. von Autofluoreszenzen des Gewebes durchgeführt.

4.4.1 Doppelmarkierung von α -Defensinen HNP1-3 mit CD 45

CD 45 - auch als „allgemeines Leukocytenantigen“ bezeichnet - ist das Transmembranprotein Tyrosinphosphatase, welches zur Modulation der intrazellulären Signalübertragung der Antigenrezeptoren der Lymphozyten gebraucht wird. CD 45 wird bei der Entwicklung lymphatischer und myeloischer

Zellen exprimiert. Es gibt verschiedene Isoformen, welche wiederum spezifisch für die B-Zell-Entwicklung bzw. für T-Zellen sind.

Der hier verwendete Klon TL-1 CD 45 erkennt alle Formen dieses Moleküls und damit das „allgemeine Leukozytenantigen“ auf lymphatischen und myeloischen Zellen der Hämatopoese.

Mittels der Doppelmarkierung mit α -Defensinen HNP1-3 in der Immunfluoreszenz konnte hier auf Grund der Ko-Lokalisation der Fluoreszenzmarkierung eine Expression von α -Defensin HNP1-3 durch CD45 positive Zellen intra- und extrazellulär nachgewiesen werden. Circa ein Drittel der CD 45 positiven Zellen zeigte eine Expression von HNP1-3, darunter war die intra- und extrazelluläre Expression etwa gleich verteilt.

4.4.2 Doppelmarkierung von α -Defensinen HNP1-3 mit CD 66b

CD 66b (vormals CD 67) ist ein Oberflächenantigen der Granulozyten, dessen Funktion nicht bekannt ist. Es gehört zur Familie der karzinoembryonalen Antigene (CEA).

Wie aus Abbildung 12 ersichtlich ist, wurde eine Ko-Lokalisation nachgewiesen, wodurch eine Expression von α -Defensin HNP1-3 durch Granulozyten bestätigt wurde. Intra- und extrazellulär. CD 66b und HNP1-3 positive Granulozyten erschienen im Vergleich zu CD 14 positiven Monozyten/Makrophagen deutlich vermehrt zu sein.

4.4.3 Doppelmarkierung α -Defensine HNP1-3 mit neutrophiler Elastase NP57

Die neutrophile Elastase ist eine Serinprotease der primären Granula der neutrophilen Granulozyten. Hier zeigte sich in allen Granula der neutrophilen Granulozyten eine eindeutige Übereinstimmung der Färbung mit α -Defensinen HNP1-3 als Ausdruck der bevorzugten Expression durch neutrophile Granulozyten in allen Hautbiopsien.

4.4.4 Doppelmarkierung von α -Defensinen HNP1-3 mit CD 15

Das Adhäsionsmolekül CD 15 findet sich als membrangebundenes Oberflächenantigen auf den eosinophilen und neutrophilen Granulozyten sowie zum Teil auch auf Monozyten. Neutrophile Granulozyten tragen zu Entzündungsprozessen mit ihren Eigenschaften der Chemotaxis, Phagozytose und Sekretion von Substanzen aus Granula bei. Der hier verwendete Antikörper CD 15 Klon CBL144 detektiert >95% der Granulozyten. Wie auf Grund der Vorergebnisse zu erwarten war, konnte auch hier eine intrazelluläre überlappende Expression mit α -Defensinen HNP1-3 gezeigt werden, wobei nicht alle der CD15 positiven Granulozyten eine Expression von HNP1-3 zeigten.

4.4.5 Doppelmarkierung von α -Defensinen HNP1-3 mit CD 14

CD 14 ist der Rezeptor für den Komplex aus Lipopolysaccharid und lipopolysaccharidbindendem Protein, der von myelomonozytären Zellen, d.h. vor allem Monozyten und Makrophagen, exprimiert wird. Monozyten und Makrophagen gehören zum System der mononukleären Phagozyten und gehören zum angeborenen Immunsystem.

Die Markierung mit CD 14 zeigte, dass sich eine Expression von α -Defensinen HNP1-3 vor allem extrazellulär in direkter Nachbarschaft zu den CD14 positiven Monozyten/Makrophagen bestimmen ließ. Im Unterschied zu den Granulozyten schien die intrazelluläre Anfärbung geringer zu sein.

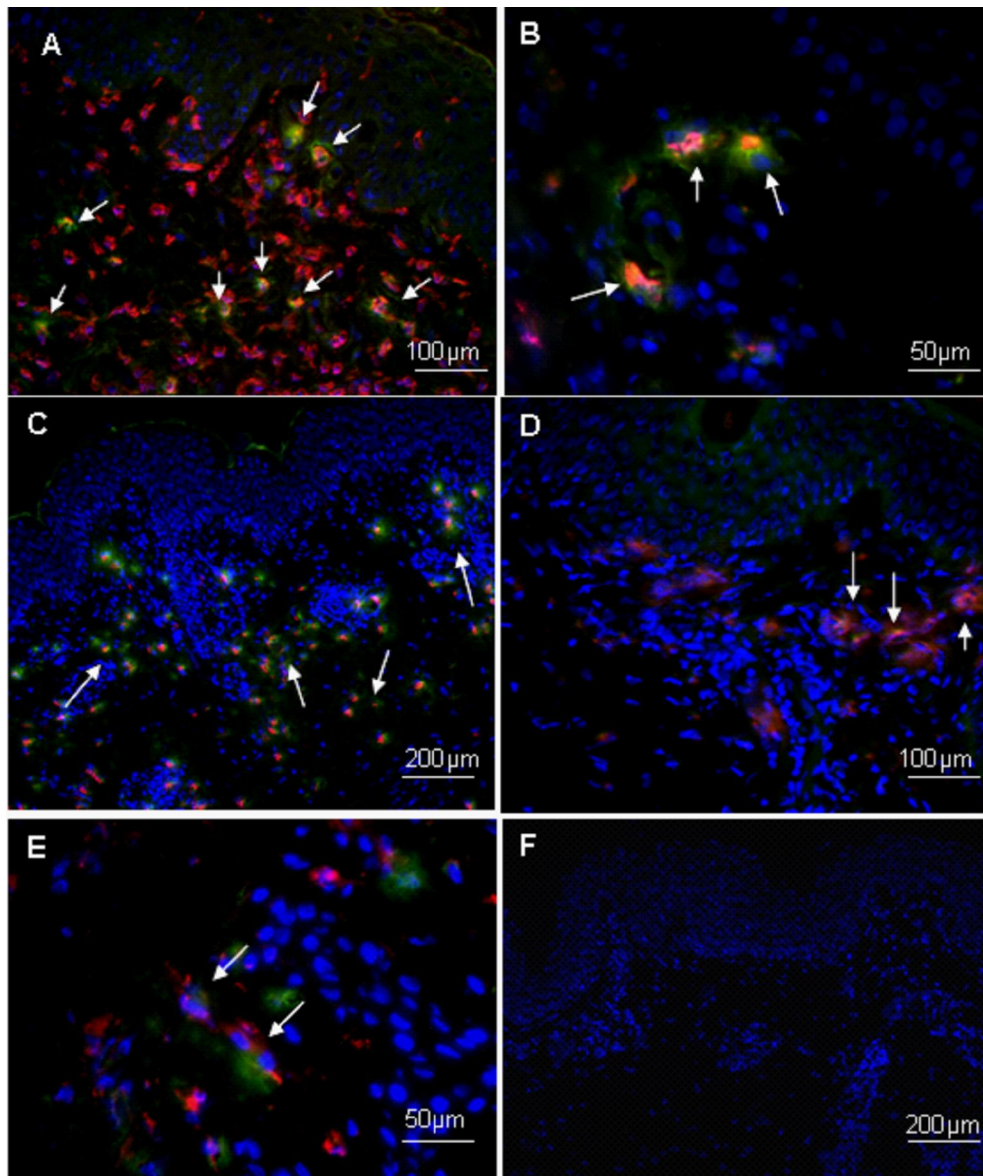


Abbildung 12: Ergebnisbilder der indirekten Immunfluoreszenzfärbung von Hautproben mit α -Defensinen HNP1-3 (Cy2-markiert, grün) mit verschiedenen zellspezifischen Antikörpern (Cy3-markiert, rot). Eine Überlagerung der rot markierten Zellen mit den grün fluoreszierenden Markierungen erkennbar als gelbe Anfärbung deutet auf eine Ko-Lokalisation von HNP1-3 mit den getesteten Zellmarkern hin. Zellkerne mittels DAPI blau markiert. **A:** Markierung von α -Defensinen HNP1-3 mit CD 45 positiven lymphoiden und myeloischen Zellen. **B:** Markierung von α -Defensinen HNP1-3 mit CD66b positiven Granulozyten. **C:** Markierung von α -Defensinen HNP1-3 mit neutrophiler Elastase, d.h. Granula der neutrophilen Granulozyten. **D:** Markierung von α -Defensinen HNP1-3 mit CD 15 positiven Granulozyten. **E:** Markierung von α -Defensinen HNP1-3 mit CD14 positiven Monozyten/Makrophagen. **F:** Negativkontrolle. Vergrößerung: Maßstab jeweils im Bild angegeben.

4.4.6 Doppelmarkierung von α -Defensinen HNP1-3 mit CD 1 (OKT 6)

Der CD 1 spezifische Klon OKT 6 detektiert in der Haut dendritische Zellen, zu denen vor allem auch Langerhans'sche Zellen gehören. Langerhans'sche Zellen kommen in der Haut im Epithel und als Vorläuferformen auch in der Dermis vor.

Die Immunfluoreszenzmarkierungen von α -Defensinen HNP1-3 mit der OKT 6 zeigten keine eindeutige Ko-Lokalisation, obwohl die Markierungen der Antikörper in Bezug auf den Zellkern einer dendritischen Zelle häufig benachbart zu sein erschienen. In den Färbungen konnte nicht geklärt werden, ob die Markierungen auf der gleichen Zelle unterschiedlich lokalisiert waren. Auffällig war in diesen Markierungen, dass die Langerhans'schen Zellen, die mit dem Zellkörper im Stratum granulosum der Epidermis lagen, vermutlich durch Ausläufer ins Stratum corneum eine positive Markierung der α -Defensine HNP1-3 aufwiesen, wie in Bild A der Abbildung 13 dargestellt.

4.4.7 Doppelmarkierung von α -Defensinen HNP1-3 mit CD 56+ als NK-Zell spezifisches Antigen (NCAM)

Aus früheren Publikationen war bekannt, dass NK-Zellen HNP1-3 exprimieren können. Es wurde daher versucht, in Doppelmarkierungen mit CD 56 einem Zelladhäsionsmolekül, das für Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) charakteristisch ist, eine Expression von HNP1-3 in diesen Zellen zu überprüfen. Es wurden nur sehr vereinzelt CD56 positiv markierte Zellen in den untersuchten Gewebeschnitten der Patienten mit Morbus Behçet detektiert. Damit konnte nicht belegt werden, dass NK-Zellen zur HNP1-3 positiven Zellpopulation in der Haut der Patienten gehören können.

4.4.8 Doppelmarkierung von α -Defensinen HNP1-3 mit Antikörpern gegen den Antigenrezeptor von γ/δ T-Zellen

γ/δ T-Zellen exprimieren einen Antigenrezeptor, der sich aus den γ - und δ - Ketten zusammensetzt. Sie zirkulieren nur zu einem geringen Prozentsatz im peripheren Blut und in den konventionellen lymphatischen Organen. γ/δ T-

Zellen sind aber vermehrt in epithelialen Geweben wie der Haut vor allem in der Maus beschrieben worden. Es wird vermutet, dass sie an der immunologischen Abwehr der Haut teilnehmen. Bei Patienten mit Morbus Behçet wurden sie zum Teil vermehrt im Blut nachgewiesen. In den untersuchten Gewebeschnitten der Patienten fanden sich nur vereinzelt γ/δ T-Zellen. Eine Ko-Lokalisation mit α -Defensinen HNP1-3 ließ sich hier nicht feststellen.

4.4.9 Doppelmarkierung von α -Defensinen HNP1-3 mit einem Endothelzellmarker TEN3

TEN 3 ist ein Marker, der Endothelzellen erkennt. Wie bereits in den immunhistochemischen Färbungen beobachtet wurde, zeigte sich auch in der Immunfluoreszenz häufig eine benachbarte Expression von α -Defensinen HNP1-3 an den Blutgefäßen, welche den Endothelzellmarker TEN3 aufwiesen. In den lichtmikroskopischen Analysen konnte nicht geklärt werden, ob eine tatsächliche Ko-Lokalisation zu Endothelzellen gegeben war.

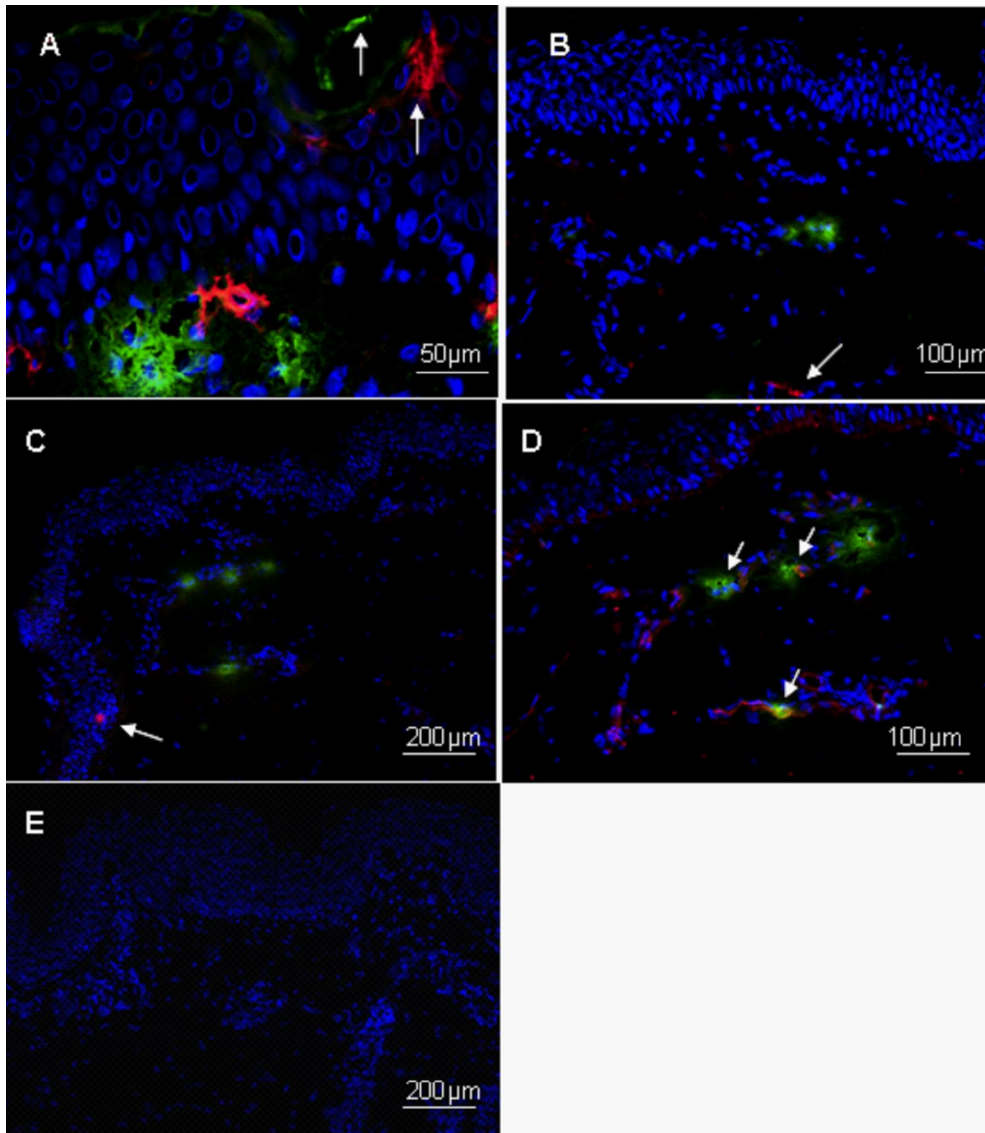


Abbildung 13: Ergebnisbilder der indirekten Immunfluoreszenzfärbung von Hautproben mit α -Defensinen HNP1-3 (Cy2-markiert, grün) mit verschiedenen zellspezifischen Antikörpern (Cy3-markiert, rot). Eine Überlagerung der rot markierten Zellen mit den grün fluoreszierenden Markierungen erkennbar als gelbe Anfärbung deutet auf eine Ko-Lokalisation von HNP1-3 mit den getesteten Zellmarkern hin. Zellkerne mittels DAPI blau markiert.

A: Markierung von α -Defensinen HNP1-3 mit CD1 positiven Langerhans'schen Zellen, welche zum Teil im Stratum granulosum lagen mit darüberliegender positiver HNP1-3 Markierung im Stratum corneum. **B:** Markierung von α -Defensinen HNP1-3 mit CD56 positiven NK-Zellen. **C:** Markierung von α -Defensinen HNP1-3 mit γ/δ -T-Zellen. **D:** Markierung von α -Defensinen HNP1-3 mit Endothelzellen (TEN3). **E:** Negativkontrolle.

Vergrößerung: Maßstab jeweils im Bild angegeben.

4.5 Molekularbiologischer Nachweis der Expression von α -Defensinen HNP1-3

Zur weiteren Bestätigung der Expression von α -Defensinen HNP1-3 in der Haut wurden spezifische RT-PCR Analysen durchgeführt. Hierzu wurde aus einer Probe eines positiven Pathergie-Testes (MB63), einer spontanen Läsion (S2575), einer nicht betroffenen Hautbiopsie eines Morbus Behçet Patienten (MB64), sowie einer gesunden Haut (S641) total RNA extrahiert und nach Umschreiben in cDNA mit Hilfe von spezifischen intron-überspannenden Primern und Zugabe einer Polymerase, Transkripte für HNP1-3 als PCR Amplifikate spezifisch nachgewiesen. Als positive Kontrolle und Referenzamplifikation zum semiquantitativen Vergleich der HNP1-3 PCR-Produkte wurde gleichzeitig die Expression von β -Aktin als zelluläres „housekeeping“ Gen untersucht. In den untersuchten Hautbiopsien der gesunden und kranken Personen zeigten sich Amplifikate mit einer Länge von 215 Basenpaaren (bp), die die für α -Defensine HNP1-3 erwartete Größe besaßen. In der Vergleichsamplifikation von β -Aktin waren diese ebenfalls in der erwarteten Größe von 317bp nachweisbar.

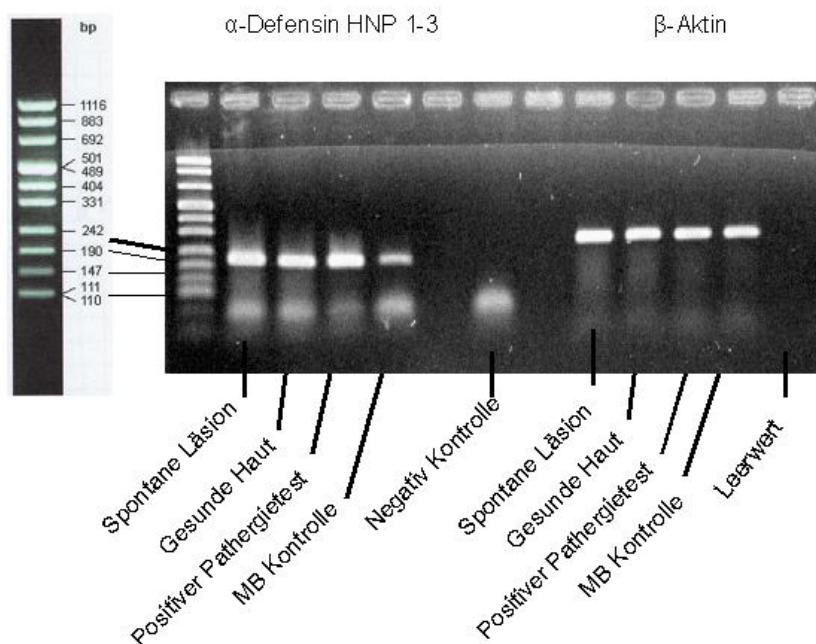


Abbildung 14: Produkte der RT-PCR für α -Defensine HNP1-3 aus verschiedenen Hautbiopsien

5 Diskussion

Der Morbus Behçet ist eine systemische Vaskulitis, deren charakteristischer Verlauf aus rezidivierenden plötzlich auftretenden Entzündungszuständen mit intermittierenden Phasen einer kompletten Remission besteht. Die Ursache des Morbus Behçet ist bis heute nicht eindeutig geklärt, sie liegt aber wahrscheinlich in einer Störung des angeborenen Immunsystems. Es wird vermutet, dass auf bestimmte Trigger hin eine überschießende Entzündungsreaktion ausgelöst wird, die im Folgenden auf Grund defekter Steuerungsmechanismen im Immunsystem unzureichend herunterreguliert wird. Für diese Reaktion besteht eine genetische HLA-assoziierte Suszeptibilität. Eine Infiltration von neutrophilen Granulozyten in die typischen Läsionen des Morbus Behçet wurde wiederholt beschrieben [22; 29; 61; 65]. Eine Aktivierung bzw. Hyperreaktivität der Neutrophilen als wichtiger Faktor der Pathogenese wird immer wieder diskutiert [17; 42; 91]. Die Hyperfunktion der neutrophilen Granulozyten äussert sich in der Haut in einer gesteigerten Aktivierbarkeit mit verstärkter Freisetzung von Sauerstoffradikalen (Superoxiden) [27] sowie von entzündlichen und antimikrobiellen Substanzen aus spezifischen Granula, wie es sich auch im Rahmen lokaler Abwehr von Mikroorganismen beobachten lässt. α -Defensine HNP1-3 stellen 30-50% der enthaltenen Peptide aus azurophilen Granula dar [72]. Daher ist bei einer vermehrten Einwanderung von Granulozyten auch eine verstärkte Freisetzung dieser Peptide zu erwarten.

Die beobachtete Erhöhung von NK-Zellen und γ/δ -T-Zellen im Blut der Patienten mit Morbus Behçet [31; 32; 94; 96] könnte mit der vermehrten Produktion von spezifischen Zytokinen und Chemokinen (proinflammatorischen Zytokine wie IL-6, IL-8, TNF-alpha, IFN γ , IL-1, IL-12, und deren Rezeptoren wie sIL-2R) in Zusammenhang stehen und so Rekrutierung und Aktivierung von Phagozyten wie Granulozyten und Monozyten/Makrophagen im positiven Feedback begünstigen.

In dieser Studie wurde die Freisetzung von α -Defensinen HNP1-3 in Hautbiopsien von Patienten mit Morbus Behçet untersucht. Diese

antimikrobiellen Peptide werden aus azurophilen Granula der Neutrophilen, verschiedenen anderen myelomonozytären Zellen und teilweise auch NK-Zellen und NK-T-Zellen sezerniert. Beim Morbus Behçet sind sie als mögliche pathogenetisch relevante Effektormoleküle interessant, weil sie neben ihrer antimikrobiellen Aktivität auch verschiedene immunmodulatorische Eigenschaften besitzen, in Abhängigkeit von ihrer Konzentration aber auch zytotoxisch sind und damit ursächlich mit den beobachteten Zellschäden an Gefäßen und Epithel in Zusammenhang stehen könnten.

5.1 Spezifität der verwendeten monoklonalen und polyklonalen Antikörper α -Defensine HNP1-3

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst anhand immunhistochemischer Färbungen die Expression von α -Defensinen HNP1-3 in der normalen Haut untersucht. Mittels der indirekten Immunperoxidase-Technik ließen sich sowohl intrazelluläre wie auch extrazelluläre zell-assoziierte Markierungen zeigen, die für den polyklonalen wie auch monoklonalen Antikörper identisch waren. Für die Spezifität der Reaktion sprachen RT-PCR Untersuchungen, mit denen mRNA für α -Defensine HNP1-3 in den Hautproben parallel nachgewiesen wurden. Auf den Proteinnachweis mußte wegen der geringen Probenmenge verzichtet werden. In früheren Untersuchungen waren in der Arbeitsgruppe in Nierengeweben parallel zur Anfärbung der verwendeten Antikörper α -Defensine HNP1-3 als spezifisch detektierte Peptide nachgewiesen worden [79]. Daher konnte man annehmen, dass auch in der Haut mit den identischen Antikörpern spezifisch α -Defensine HNP1-3 erkannt wurden. Das als Detektionsreagenz verwendete Zweitantikörper peroxidase- und antikörper-gekoppelte Polymer erwies sich an den Gefrierschnitten als sensitiver und zeigte weniger Hintergrundfärbung als Färbungen mit Streptavidin-Biotingekoppelten Zweitantikörpern.

Bei den hier gezeigten Färbungen ist davon auszugehen, dass die verwendeten Antikörper spezifisch α -Defensine HNP1-3 erkennen, da sowohl mit dem

monoklonalen als auch polyklonalen Antikörper gegen α -Defensine HNP1-3 eine stabile gleichwertige Färbung erreicht werden konnte.

5.2 α -Defensine HNP1-3 in der normalen Haut

In der normalen Haut wurde nach Literaturrecherchen bisher hauptsächlich eine Expression von β -Defensinen untersucht, welche konstitutiv in den Keratinozyten (HBD1) exprimiert werden [36]. Erst nach Verletzungen oder Kontakt mit Pathogenen wurde über eine Hochregulierung von den weiteren β -Defensinen (HBD 2 und 3) als Antwort auf die Gewebeschädigung berichtet [33; 72]. In der gesunden Haut wurden bisher sehr selten α -Defensine HNP1-3 untersucht [3; 101]. In der vorliegenden Untersuchung wurde in den sieben Proben normaler Haut die konstitutive Expression von HNP1-3 überprüft. Ein grösserer Anteil (57%) der Proben zeigte eine sehr geringe Expression in einzelnen Zellen. Zwei Proben, die eine sehr starke Expression von HNP1-3 in und um eine größere Anzahl von Zellen in der Dermis präsentierten, waren in der Pathologie Leichen entnommen worden. Über die Grunderkrankung dieser Donoren, die makroskopisch keine Hautmanifestationen hatten, konnte retrospektiv keine weitere Information erhalten werden. Daher war es möglich, dass die starke Expression von HNP1-3 in diesen Biopsien mit der Todesursache bzw. dem Sterbeprozess in Zusammenhang stand, und damit diese Ergebnisse vermutlich keine normalen Verhältnisse der Expression von HNP1-3 in der gesunden Haut widerspiegelten. Für eine statistische Analyse der Expression von HNP1-3 in der Haut Gesunder war die Anzahl der untersuchten Proben zu gering. Weitere Hautbiopsien gesunder Personen für zusätzliche Untersuchungen waren trotz intensiver Bemühungen nicht zu erhalten. Es gibt bisher nur eine Studie, in der ebenfalls die Verteilung der Expression von HNP1-3 in der normalen Haut untersucht wurde. Es handelt sich hier um eine Vergleichsanalyse von Adisen et al., in der immunhistochemisch die Expression von HNP1-3 in Läsionen von Akne vulgaris (n=35) im Vergleich zur Expression in nicht betroffener Haut der gleichen Patienten mit Akne vulgaris und in der Haut gesunder Probanden

(n=25) untersuchte wurde [3]. Die Autoren konnten im Gegensatz zu unseren Untersuchungen keinerlei Expression von HNP1-3 in der gesunden Haut feststellen. Ebenfalls in der nicht-afektierten Haut der Akne-Patienten konnte keine Expression von HNP1-3 nachgewiesen werden. In den pustulösen Akne-Läsionen dagegen wurden vermehrt neutrophile Granulozyten und α -Defensine HNP1-3 beobachtet [3].

5.3 α -Defensine in der Haut von Patienten mit Morbus Behçet

In dieser Arbeit wurden Patienten mit Morbus Behçet mit spontanen Läsionen, vor allem aber nach unterschiedlichen lokalen Vorbehandlungen der Haut im Rahmen von Pathergietestungen untersucht. Es zeigte sich eine Tendenz, dass α -Defensine HNP1-3 in den spontanen und Pathergie-induzierten Läsionen der Patienten mit Morbus Behçet im Vergleich zu nicht-afektierte Haut und Biopsien gesunder Personen vermehrt exprimiert werden. Es wurden vor allem Proben analysiert, die aus der positiven oder negativen Hautstelle eines klassischen Pathergie-Tests entstammten. Außerdem wurden Biopsien nach Uratkristallinjektionen entnommen, die bei allen Patienten und auch gesunden Personen eine Immunantwort in der Haut erwarten ließen. Ferner wurden Proben unmanipulierter klinisch inerte Haut von Patienten mit Morbus Behçet untersucht.

In den zehn Proben, die nach klassischem Pathergie-Test eine positive Reaktion zeigten, wiesen acht (80%) eine vermehrte Expression der α -Defensine HNP1-3 mit einem Score von größer 2+ auf. HNP1-3 positive Zellen fanden sich meistens in Clustern um Gefäße. Die Färbung war teils intrazellulär gebunden, aber größtenteils auch als eine in den Extrazellularraum auslaufende Färbung („patchy“) zu sehen. Bei drei der fünf getesteten klinisch Pathergie negativen Proben fand sich auch nur eine geringfügig niedrigere Expression mit einem Score 2+, die beiden übrigen Proben zeigten einen zur normalen Haut vergleichbaren Status (1x Score 0, 1x Score 1+). α -Defensin HNP1-3 positive Zellen fanden sich ebenfalls in Clustern in den Pathergie-induzierten aber makroskopisch negativen Läsionen. Diese Beobachtung deckt

sich mit histopathologischen Beschreibungen, in denen neutrophilen Granulozyten um die Nadeleinstichstelle herum gruppiert vermehrt bereits innerhalb der ersten vier Stunden nach Punktion gesehen wurden. Ergun et al. führten eine chronologische angesetzte histopathologische Untersuchung von Pathergieläsionen nach 4h, 24h und 48h durch [30]. Bereits nach vier Stunden waren perivaskulär Infiltrate von Neutrophilen und gemischte monopolynukleäre Entzündungszellen zu sehen. Die Dichte der Entzündungszellen war nach 24 Stunden bei einem Grossteil der Proben am höchsten und nach 48h gleichbleibend oder abgefallen, nur bei zwei von acht Patienten stieg sie noch weiter an [30]. Auch Gül et al. fanden bei 11 Patienten 48h nach positivem Pathergie-Test in der Dermis eine Infiltration von mononukleären Zellen [41]. Sie berichteten vor allem über Infiltrate von CD4+/CD45RO+ Memory-T-Zellen, aber auch von Monozyten/Makrophagen fokal konzentriert um Blutgefäße und Hautanhangsorganen herum. Neutrophile Granulozyten machten in dieser Untersuchung weniger als 5% der infiltrierenden Zellen aus, waren jedoch hauptsächlich im Bereich des Nadeleinstichs gehäuft aufgetreten. Zwischen den Befunden von Biopsien aus Bereichen eines negativen Pathergie-Tests und den Kontrollbiopsien nicht-affektierter Haut von Patienten mit Morbus Behçet bestanden histologisch keine Unterschiede [41]. Der Nachweis von α -Defensinen HNP1-3 in negativ ausgefallenen Pathergie-Tests, wie es hier in dieser Studie gezeigt wurde, entspricht Beobachtungen von Gül et al., die ebenfalls Einwanderung von neutrophilen Granulozyten in größeren Gruppen angeordnet um die Einstichstelle herum fanden [41].

Neun der zehn Proben (90%) nach Injektion von Uratkristallen wiesen eine verstärkte α -Defensine HNP1-3 Anfärbung auf. Cakir et al. hatten eine vermehrte erythematöse Reaktion nach intradermaler Injektion von Uratkristallen bei Patienten mit Morbus Behçet festgestellt [16]. Urat ist ein sehr wirksames Gefahrensignal für die Aktivierung von angeborenen Immunmechanismen und Entzündungsprozessen über das Inflammasome NLRP3 in der Haut [108]. Nach Gogus et al. können neutrophile Granulozyten nach Inkubation mit Uratkristallen aktiviert und zu einer verstärkten oxidativen Antwort induziert werden [39]. Die Beobachtungen an der Haut nach

Uratinjektion bei Patienten mit Morbus Behçet deuteten somit ebenfalls auf Aktivierung angeborener Immunreaktionen hin, bei denen neutrophile Granulozyten in die papulo-erythematösen Läsionen vermehrt eingewandert waren und zu einer vermehrten Expression der α -Defensine HNP1-3 geführt hatten.

Auch spontane Hautveränderungen beim Morbus Behçet gehen in der Regel histopathologisch mit einer leukozytoklastischen Vaskulitis einher, bei der perivaskulär Infiltrate mit neutrophilen Granulozyten auftreten [7; 57; 63]. Zwei spontan aufgetretene Läsionen bei Patienten mit Morbus Behçet zeigten eine zu Pathergie-induzierten Läsionen vergleichbar starke Expression der α -Defensine HNP1-3. Dies könnte darauf hinweisen, dass die Expression von α -Defensinen HNP1-3 ein wichtiges Zeichen für die Aktivierung spezifischer angeborener Immunreaktionen auch in den Spontanläsionen sein könnten. Für die Bestätigung dieser Befunde bedarf es jedoch weiterer Analysen. In den elf Kontrollbiopsien der unmanipulierten Haut der Patienten mit Morbus Behçet war dagegen im Vergleich zu den Pathergie-induzierten Proben nur eine geringe Expression von HNP1-3 festzustellen. Sieben Proben (64%) zeigten keinerlei Expression (Score 0), drei Proben (27%) einen Score von 1. Nur in einer einzigen Probe (MB 20) war eine verstärkte Expression von HNP1-3 zu beobachten. Dieser Patient hatte klinisch sowohl orale als auch genitale Ulcerationen, so dass hier trotz der erfolgten Behandlung eventuell noch eine erhöhte Krankheitsaktivität vorlag. Insgesamt glichen die Kontrollbiopsien aus unmanipulierter Haut der Patienten in ihrer HNP1-3 Expression den sieben Proben von gesunden Patienten mit einem geringen oder fehlenden Nachweis von α -Defensinen HNP1-3. Auf Grund der geringen Fallzahlen konnte leider noch keine statistische Bewertung der vermehrten Expression der α -Defensine in den Pathergie-induzierten Läsionen der Behçet-Patienten gegenüber der nichtaffektierten Haut durchgeführt werden.

5.4 Zellspezifische Expression von α -Defensinen HNP1-3 in der Haut

Mit Hilfe von Dreifach-Immunfluoreszenzfärbungen wurde versucht zu klären, welche Zellen zur vermehrten Expression von α -Defensinen HNP1-3 in den

Pathergie-induzierten oder spontanen Läsionen von Patienten mit Morbus Behcet beitragen. Es konnte eine Expression von α -Defensin HNP1-3 in nahezu allen CD 45+ Leukozyten, CD66b+ und neutrophile Elastase exprimierenden Granulozyten in den perivaskulären Infiltraten dieser Biopsien gesehen werden, wie es bei bekannter konstitutiver Expression von α -Defensine HNP1-3 in neutrophilen Granulozyten zu erwarten war. HNP1-3 ließen sich auch in CD14+ Monozyten/Makrophagen nachweisen, die eine Minderheit der perivaskulären Infiltratzellen im Vergleich zu den Granulozyten darstellten. Die Dichte der Neutrophilen war gegenüber den Monozyten/Makrophagen deutlich erhöht. Eine Expression von α -Defensinen HNP1-3 durch NK-Zellen und γ/δ T-Zellen, die nach Agerberth et al. [4] und Chalifour et al. [18], ebenfalls α -Defensine HNP1-3 exprimieren können, ließ sich in der vorliegenden Arbeit nicht zeigen, wobei hier auch nur sehr vereinzelt NK-Zellen und γ/δ T-Zellen in der Haut überhaupt nachgewiesen werden konnten.

5.5 α -Defensine HNP1-3 als mögliche Effektormoleküle der (muko)kutanen Läsionen des Morbus Behçet

α -Defensine HNP1-3, die in dieser Arbeit in den immunhistochemischen und immunfluoreszenzierenden Fäbungen erstmalig verstärkt in Pathergie-induzierten und spontanen Läsionen beim Morbus Behcet nachgewiesen wurden, könnten im Ablauf der spezifischen Entzündungsprozesse wichtige Effektormoleküle darstellen. Neben immunmodulatorischen Eigenschaften ist seit langem eine konzentrationsabhängige zytotoxische Wirkung der Defensine bekannt [36; 73]. Für zytotxische Effekte auch in vivo beim Morbus Behcet sprach, dass die verstärkte Expression von HNP1-3 in den Spontanläsionen lokal mit Zeichen der Zellschädigung an den Gefäßendothelien und/oder Epithelien beobachtet werden konnte. Die immer wieder anzutreffende charakteristische flächige Markierung um Granulozyten deutete auf eine Freisetzung von HNP1-3 in erhöhten Konzentrationen aus den azurophilen Granula hin.

Da α -Defensine HNP1-3 vor allem die Produktion von IL-8 stimulieren können, kann von einer Rekrutierung von Neutrophilen und Monozyten/Makrophagen im positiven Feedback ausgegangen werden. Diese Hypothese wird unterstützt von Beobachtungen von Ben Ahmed et al., die in mukokutanen Läsionen, vor allem oralen Ulcera, von Patienten mit Morbus Behçet eine Erhöhung der Zytokine IL-8 und MCP-1 fanden [15]. α -Defensine HNP1-3 können auch die Ausschüttung von Histamin aus Mastzellen stimulieren und so Entzündungsprozesse verstärken. Befus et al. [13] sowie Haim et al. [44] fanden eine Mastzellerhöhung in den Pathergie-induzierten Läsionen von Patienten mit Morbus Behçet. Inwieweit α -Defensine HNP1-3 hier von Bedeutung sind, muss ebenfalls weiter abgeklärt werden. Auch eine Beeinflussung von T-Zellaktivitäten könnte in Zusammenhang mit der verstärkten Expression von α -Defensinen stehen. So beobachteten Gül et al. auch eine vermehrte Infiltration von T-Lymphozyten in die Pathergie-induzierten Läsionen [41], die über chemotaktische Funktionen der α -Defensine HNP1-3 auf T-Lymphozyten hervorgerufen werden könnte [19; 103]. Auch die bei Behçet-Patienten festgestellte Th1 Polarisation der Zytokine [31; 46] könnte damit indirekt durch α -Defensine HNP1-3 beeinflusst sein.

5.6 α -Defensine HNP1-3 bei anderen entzündlichen Hauterkrankungen

Die Expression von α -Defensinen HNP1-3 wurde vereinzelt auch bei anderen entzündlichen Hauterkrankungen analysiert. In einer Untersuchung von Harder et al. zeigte sich eine Erhöhung der α -Defensine HNP1-3 in den Läsionen von chronischen Psoriasisplaques, in denen eigentlich keine vermehrte Infiltration von Neutrophilen mehr gefunden wird [47]. Eine Infiltration von Neutrophilen ist bei der Psoriasis, typischerweise in der akuten Phase der Plaques zu sehen. Die in dieser Arbeit untersuchte Biopsie einer Psoriasisläsion zeigte eine verstärkte Expression von α -Defensinen HNP1-3 in der Dermis, die sich auch als eine flächig auslaufende sezernierende Färbung präsentierte. Die Hypothese, dass die Expression von α -Defensinen HNP1-3 in der Haut mit der Abwehr von Mikroorganismen in Zusammenhang steht, wird durch

Beobachtungen bei der atopischen Dermatitis unterstützt. In Biopsien dieser Hauterkrankung wurde eine verminderte Anzahl an α -Defensinen HNP1-3 positiven Zellen festgestellt. Patienten mit atopischer Dermatitis leiden häufig an bakteriellen Superinfektionen der Haut, was für eine protektive antibakterielle Wirkung der α -Defensinen HNP1-3 spricht. Ein Vergleich der Expression von HNP1-3 in anderen entzündlichen Hauterkrankungen könnte weitere Einblicke in ihre Rolle als Effektormoleküle der angeborenen Immunität bieten. In der in dieser Studie untersuchten Läsion eines Lichen ruber, einer chronisch-entzündlich papulösen Hyperkeratose mit leukohistiozytären Infiltraten unterhalb der Epidermis, zeigte sich ebenfalls eine deutliche intra- und extrazelluläre Färbung für HNP1-3. Der atopischen Dermatitis wie dem Lichen ruber gemeinsam ist das Koebner - Phänomen, bei dem ähnlich wie bei dem Pathergietest auf einen mechanischen Reiz hin die Auslösung einer neuen Effloreszenz beobachtet wird. Eine verstärkte Expression von α -Defensinen HNP1-3 scheint damit nicht ausschließlich für die Manifestationen des Morbus Behcet spezifisch zu sein.

Um weitere Aussagen über die Rolle und Funktion der α -Defensine HNP1-3 bei den einzelnen (auto)entzündlichen Hauterkrankungen treffen zu können, müssten vor allem die Zellspezifität in weiteren histopathologischen und immunhistologischen Studien geklärt sowie ihre Induktion in in vitro Analysen untersucht werden.

5.7 Schlussfolgerung und Ausblick

In dieser Arbeit wurde beobachtet, dass bei Patienten mit Morbus Behçet die Expression der α -Defensine HNP1-3 in spontanen und Pathergie-induzierten Läsionen im Vergleich zu den nicht betroffenen Hautarealen häufig erhöht ist. Patienten mit Morbus Behçet scheinen sich darin auch von der Haut Gesunder zu unterscheiden, obwohl in dieser Studie die untersuchte Fallzahl besonders der normalen Haut Gesunder gering war und nur eine semiquantitative subjektive Auswertung der Präparate angewendet werden konnte. Um eine statistisch signifikante Aussage treffen zu können, müssten diese Beobachtung

aber mittels einer grösseren Fallzahl vor allem der Kontrollgruppen unter Anwendung eventueller objektiver quantitativer Bildanalyseprogramme verifiziert werden. Von Interesse wäre auch, ob medikamentöse, immunsuppressive Therapien, die auf die klinische Krankheitsaktivität des Morbus Behçet Einfluss nehmen, auch die Expression von α -Defensinen HNP1-3 in der Haut modulieren. Ebenfalls interessant könnte es sein, auch die Expression von anderen antimikrobiellen Peptiden wie den β -Defensinen und Cathelicidinen LL-37 in den Hautläsionen der Patienten mit Morbus Behçet zu bestimmen.

Diese Arbeit ist nach heutigem Kenntnisstand der Wissenschaft die erste Untersuchung, die sich mit der Expression von α -Defensinen in der Haut von Patienten mit Morbus Behçet beschäftigt und einen ersten Einblick in die mögliche Beteiligung der antimikrobiellen Peptide wie α -Defensine HNP1-3 in den (muko)kutanen Läsionen des Morbus Behçet bringt. Besonders die Rolle der α -Defensine HNP1-3 als Effektormoleküle in den Hautläsionen des Morbus Behçet sollte in weiterführenden, auch in in vitro Studien genauer eruiert werden.

6 Zusammenfassung

Die charakteristischen klinischen Manifestationen des Morbus Behçet sind Schleimhautläsionen sowie entzündliche Veränderungen der Haut und der Augen. Es besteht eine genetische HLA-assoziierte Suszeptibilität, jedoch wird vermutet, dass ein Ausbruch der Krankheit unter dem Einfluss externer Umweltfaktoren (Infektionserreger) ausgelöst wird und dabei eine defekte Regulation des Immunsystems mit überschüssender Produktion von inflammatorischen Substanzen einsetzt. Histopathologisch handelt es sich beim Morbus Behçet um eine leukozytoklastische Vaskulitis, bei der hyperaktive Granulozyten eine wichtige pathogenetische Rolle zu spielen scheinen, die beim sogenannten Pathergie-Phänomen eine beschleunigte und erhöhte Einwanderung in die Dermis zeigen. α -Defensine HNP1-3 werden konstitutiv in azurophilen Granula der neutrophilen Granulozyten und zum Teil auch in NK- und NK-T-Zellen exprimiert.

Ziel dieser Arbeit war es auf Grund zytotoxischer und chemotaktischer Funktionen die Expression und Lokalisation der antimikrobiellen α -Defensine HNP1-3, in der Haut von Patienten mit Morbus Behçet mittels immunhistochemischer Methoden im Vergleich zu Biopsien von normaler Haut von Gesunden und Patienten zu untersuchen und deren Rolle als mögliche Effektormoleküle der (muko)kutanen Läsionen des Morbus Behçet zu diskutieren.

Dazu wurden in 38 Hautproben von Patienten mit Morbus Behçet, welche unterschiedlichen Testverfahren (klassischer Pathergie-Test, Uratkristallinjektion, spontaner Läsionen und keiner Behandlung) unterzogen worden waren, mittels immunhistochemischer und Immunfluoreszenz-Färbungen die Expression und Lokalisation der α -Defensine HNP1-3 untersucht. Zum Vergleich wurden 7 Proben normaler Haut Gesunder und 2 Proben von Patienten mit entzündlichen Hauterkrankungen (Psoriasis und Lichen ruber) analysiert.

Es zeigte sich in den Färbungen eine charakteristische flächige „patchy“ Markierung der Expression der α -Defensine HNP1-3. In den Ergebnissen konnte eine verstärkte Expression von α -Defensinen HNP1-3 in den Pathergie-induzierten und spontanen Hautläsionen der Patienten mit Morbus Behçet besonders im Vergleich zu normaler Haut Gesunder und der unmanipulierten Haut der Patienten mit Morbus Behçet beobachtet werden.

In nahezu allen CD 45+ Leukozyten, CD66b+ und neutrophile Elastase exprimierenden Granulozyten sowie in CD14+ Monozyten/Makrophagen in den perivaskulären Infiltraten dieser Biopsien wurde eine Expression von HNP1-3 gesehen. Eine Expression von α -Defensinen HNP1-3 durch NK-Zellen und γ/δ T-Zellen ließ sich in der vorliegenden Arbeit nicht zeigen.

In dieser Arbeit wurden erstmalig α -Defensine HNP1-3 in immunhistochemischen und immunfluoreszendierenden Färbungen in der Haut von Patienten mit Morbus Behçet nachgewiesen. Die Beobachtungen, dass in den Pathergie-induzierten und spontanen Läsionen von Patienten mit Morbus Behçet im Vergleich zur unmanipulierten Haut und normalen Haut Gesunder vermehrt α -Defensine HNP1-3 exprimiert wurden, deuteten auf eine Aktivierung angeborener Immunreaktionen hin, bei denen neutrophile Granulozyten in die papulo-erythematösen Läsionen vermehrt eingewandert waren und zu einer vermehrten Expression der α -Defensine HNP1-3 geführt hatten.

Die immer wieder anzutreffende charakteristische flächige Markierung um Granulozyten deutete auf eine Freisetzung von HNP1-3 in erhöhten Konzentrationen aus den azurophilen Granula hin. Die verstärkte lokale Expression von HNP1-3 in den Spontanläsionen und Pathergie-induzierten Läsionen mit Zeichen der Zellschädigung an den Gefäßendothelien und/oder Epithelien sprachen für zytotoxische Effekte der α -Defensine in vivo. α -Defensine HNP1-3 könnten als mögliche Effektormoleküle der (muko)kutanen Läsionen durch eine Stimulation der Produktion von IL-8 die Rekrutierung von Neutrophilen und Monozyten/Makrophagen durch ein positives Feedback beeinflussen, bzw. sogar verstärken. Um diese Beobachtungen noch weiter zu verifizieren, müssten Untersuchungen mittels einer größeren Fallzahl vor allem

der Kontrollgruppen unter Anwendung eventueller objektiver quantitativer Bildanalyseprogramme mit statistischen Bewertungen angeschlossen werden.

7 Literaturverzeichnis

1. Aarbiou J, Ertmann M, van Wtering S, van Noort P, Rook D, Rabe KF, Litvinov SV, van Krieken JH, de Boer WI, Hiemstra PS (2002). Human neutrophil defensins induce lung epithelial cell proliferation in vitro. *J Leukoc Biol*; **72**; 167-174.
2. Adamantiades B (1931). Sur un cas d'iritis a hypopyon recidivant. *Ann Ocul (Paris)* ; **168** ; 271-278.
3. Adışen E, Yůksek J, Erdem O, Aksakal FN, Aksakal AB (2010). Expression of human neutrophil proteins in acne vulgaris. *J Eur Acad Dermatol Venereol*; **24**; 32-37.
4. Agerberth B, Charo J, Werr J, Olsson B, Idali F, Lindbom L, Kiessling R, Jůrnvall H, Wigzell H, Gudmundsson GH (2000). The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and alpha-defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations. *Blood*; **96**; 3086-3093.
5. Alpsoy E, Zouboulis CC, Ehrlich GE (2007a). Mucocutaneous Lesions of Behçet's disease. *Yonsei Med J*; **48(4)**; 573-585.
6. Alpsoy E, Donmez L, Onder S, Usta A, Karıncaoglu Y, Kandi B, Buyukkara S, Keseroglu O, Uzun S, Tursen U, Seyhan M, Akman A (2007b). Clinical features and natural course of Behçet's disease in 661 cases: a multicenter study. *Br J Dermatol*; **157**; 901-906.
7. Alpsoy E, Uzun S, AKman A, Acar MA, Memisoglu HR, Basaran E (2003). Histological and immunofluorescence findings of non-follicular papulopustular lesions in patients with Behçet's disease. *J Eur Acad Dermatol Venereol*; **17**; 521-524.
8. Altenburg A, Papoutsis N, Orawa H, Martus P, Krause L, Zouboulis CC (2006). Epidemiologie und Klinik des Morbus Adamantiades-Behçet in Deutschland - Aktuelle pathogenetische Konzepte und therapeutische Möglichkeiten. *J Dtsch Dermatol Ges*; **4**; 49-64.
9. Auvynet C, Rosenstein Y (2009). Multifunctional host defense peptides Antimicrobial peptides, the small yet big players in innate and adaptive immunity. *FEBS J*; **276**; 6497-6508.
10. Azizlerli G, Kůse AA, Sarica G, Gůl A, Tutkun IT, Kulac M, Tunc R, Urgancıoglu M, Disci R (2003). Prevalence of Behçet's disease in Istanbul, Turkey. *Int J Dermatol*; **42**; 803-806.

11. Barnathan ES, Raghunath PN, Tomaszewski JE, Ganz T, Cines DB, Higazi A al-R (1997). Immunohistochemical localization of defensin in human coronary vessels. *Am J Pathol*; **150**; 1009-1020

12. Barnstable CJ, Bodmer WF, Brown G, Galfré G, Milstein C, Williams AF, Ziegler A (1978). Production of monoclonal antibodies to Group A erythrocytes, HLA and other human cell surface antigens- new tools for genetic analysis. *Cell*; **14**; 9-20.

13. Befus AD, Mowat C, Gilchrist M, Hu J, Solomon S, Bateman A (1999). Neutrophil defensins induce histamine secretion from mast cells: mechanisms of action. *J Immunol*; **163**; 947-953.

14. Behçet H (1937). Über rezidivierende, aphöse durch ein Virus verursachte Geschwüre am Mund, am Auge und an den Genitalen. *Dermatol Wochenschr*; **105**; 1152–1157.

15. Ben Ahmed M, Houman H, Miled M, Dlagi K, Louzir H (2004). Involvement of Chemokines and Th1 Cytokines in the Pathogenesis of Mucocutaneous Lesions of Behçet's Disease. *Arthr and Rheum*; **50**; 2291-2295.

16. Cakir N, Yazici H, Chamberlain MA, Barnes CG, Yurdakul S, Atasoy S, Akcasu A, Iscimen A (1991). Response to intradermal injection of monosodium urate crystals in Behçet's syndrome. *Annals of the Rheumatic Disease*; **50**; 634-636.

17. Carletto A, Pacor ML, Biasi D, Caramaschi P, Zeminian S, Bellavite P, Bambara LM (1997). Changes of neutrophil migration without modification of in vitro metabolism and adhesion in Behçet's disease. *J Rheumatol*; **24**; 1332-1336.

18. Chalifour A, Jeannin P, Gauchat JF, Blaecke A, Malissard M, N'Guyen T, Thieblemont N, Delneste Y (2004). Direct bacterial protein PAMP recognition by human NK cells involves TLRs and triggers alpha-defensin production. *Blood*; **104**; 1778-1783.

19. Certov O, Michiel DF, Xu L, Wang JM, Tani K, Murphy WJ, Longo DL, Taub DD, Oppenheim JJ (1996). Identification of defensin-1, defensin-2, and CAP37/azurocidin as T-cell chemoattractant proteins released from interleukin-8-stimulated neutrophils. *J Biol Chem*; **271**; 2935-40.

20. Davatchi F, Sadeghi Abdollahi B, Shahram F, Nadji A, Chams-Davatchi C, Shams H, Naderi N, Akhlaghi M, Faezi T, Faridar A (2010). Validation of the International criteria of Behçet's disease (ICBD) in Iran. *Int J Rheum Dis*; **13**; 55-60.

21. Deuter CM, Kötter I, Wallace GR, Murray PI, Stübiger N, Zierhut M (2008). Behçet's disease: Ocular effects and treatment. *Prog Retin Eye Res*; **27**; 111-136.

22. Demirkesen C, Tüzüner N, Mat C, Senocak M, Büyükbabani N, Tüzün Y, Yazici H (2001) Clinicopathologic evaluation of nodular cutaneous lesions of Behçet syndrome. *Am J Clin Pathol*; **116**; 341-346.
23. Dilsen N, Konice M, Aral O (1985). Our diagnostic criteria of Behçet's disease: an overview. Recent Advances in Behçet's disease. Services Royal Society of Medicine; London.
24. Direskeneli H, Saruhan-Direskeneli G (2010). Disease Mechanism, Kapitel aus Behçet's Syndrome. S. 243-264. Yazici Y, Yazici H (Hrsg.). Behçet's Syndrome. Springer Verlag New York, Ebook, 1. Auflage 2010.
25. Direskeneli H, Eksioglu-Demiralp E, Yavuz S, Ergun T, Shinnick T, Lehner T, Akoglu T (2000) T cell response to 60/65 kD heat shock protein derived peptides in Turkish patients with Behçet's disease. *J Rheumatol*; **27**; 708-713.
26. Eglin RP, Lehner T, Subak-Sharpe JH (1982). Detection of RNA complementary to herpes-simplex virus in mononuclear cells from patients with Behçet's syndrome and recurrent oral ulcers. *Lancet*; **2**; 1356-1361.
27. Eksioglu-Demiralp E, Direskeneli H, Kibaroglu A, Yavuz S, Ergun T, Akoglu T (2001). Neutrophil activation in Behçet's disease. *Clin Exp Rheumatol*; **19**; S19-24.
28. Escher N, Spies-Weißhart B, Kaatz M, Melle C, Bleul A, Driesch D, Wollina U, von Eggeling F (2006). Identification of HNP3 as a tumor marker in CD4+ and CD4- lymphocytes of patients with cutaneous T-cell lymphoma. *Eur J Cancer*; **42**; 249-255.
29. Ergun T, Gurbuz O, Dogusoy G, Mat C, Yazici H (1998a). Histopathologic features of the spontaneous pustular lesions of Behçet's syndrome. *Int J Dermatol*; **37**; 194-196.
30. Ergun T, Gurbuz O, Harvell J, White W (1998b). The histopathology of pathergy: a chronologic study of skin hyperreactivity in Behçet's disease. *Int J Dermatol*; **37**; 929-933.
31. Frassanito MA, Dammacco R, Cafforio P, Dammacco F (1999) Th1 Polarization of the Immune Response in Behçet's disease. *Arthritis Rheum*; **42**; 1967-1974.
32. Freysdottir J, Lau S, Fortune F, (1999). γ/δ -T-Cells in Behçet's disease and recurrent aphtous stomatitis. *Clin Exp Immunol*; **118**; 451-457.
33. Gallo RL, Murakami M, Ohtake T, Zaiou M (2002). Biology and clinical relevance of naturally occurring antimicrobial peptides. *J Allergy Clin Immunol*; **110**; 823-831.
34. Ganz T, Selsted ME, Szklarek D, Harwig SS, Daher K, Bainton DF, Lehrer RI (1985). Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J Clin Invest*; **76**; 1427-1435.
35. Ganz T, Lehrer RI (1995) Defensins. *Pharmacol Ther*; **66**; 191-205.

36. Ganz T (2003) Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol*; **3**; 710-720.
37. Ganz T (2005). Defensins and other antimicrobial peptides: a historical perspective and an update. *Comb Chem High Throughput Screen*; **8**; 209-217.
38. Gilhar A, Weinstein G, Turani H, Landau J, Etzioni A (1989). Skin hyperreactivity response (pathergy) in Behçet's disease. *J Am Acad Dermatol*; **21**; 547-552.
39. Gogus F, Fresko I, Elbir Y, Eksioglu-Demiralp E, Direskeneli H (2005). Oxidative burst response to monosodium urate crystals in patients with Behçet's syndrome. *Clin Exp Rheumatol*; **23**; S81-S85
40. Greenwald GI, Ganz T (1987). Defensins mediate the microbicidal activity of human neutrophil granule extract of *Acinetobacter calcoaceticus*. *Infect Immun*; **55**; 1365-1368.
41. Gül A, Esin S, Dilsen N, Konice M, Wigzell H et al. (1995). Immunohistology of skin pathergy reaction in Behçet's disease. *Br J Dermatol*; **132**; 901-907.
42. Gül A (2001) Behçet's disease: an update on the pathogenesis. *Clin Exp Rheumatol*; **19**; S6-12.
43. Gür-Toy G, Lenk N, Yalcin B, Aksaray S, Alli N (2004). Serum Interleukin-8 a serologic marker of activity in Behçet's disease. *Int J Dermatol*; **44**; 657-660.
44. Haim S, Sobel JD, Friedmann-Birnbaum R, Lichtig C (1976). Histological and direct immunofluorescence study of cutaneous hyperreactivity in Behçet's disease. *Br J Dermatol*; **95**; 631-636.
45. Hamzaoui K, Kahan A, Ayed K, Hamza M (1990). Cytotoxic T cells against herpes simplex virus in Behçet's disease. *Clin Exp Immunol*; **81**; 390-395.
46. Hamzaoui K, Hamzaoui A, Guemira F, Bessioud M, Hamza M, Ayed K (2002). Cytokine profile in Behçet's disease patients. Relationship with disease activity. *Scand J rheumatol*; **31**; 205-210.
47. Harder J, Schröder JM (2005). Psoriatic scales: a promising source for the isolation of human skin-derived antimicrobial peptides. *J Leukoc Biol*; **77**; 476-486.
48. Harris DE, Warshaw DM, Periasamy M (1992). Nucleotide sequence of the rabbit alpha-smooth-muscle and beta-non-muscle actin mRNAs. *Gene*; **112**; 265-266.
49. Hatemi G, Silman A, Bang D, Bodaghi B, Chamberlain AM, Gul A et al. (2008). EULAR recommendations of the management of Behçet's disease. *Ann rheum Dis*; **67**; 1656-1662.
50. Hazlett L, Wu M (2011) Defensins in innate immunity. *Cell Tissue Res*; **343**; 175-188.

51. Hazrati E, Galen B, Lu W, Wang W, Ouyang Y, Keller MJ, Lehrer RI, Herold BC (2006). Human α - and β -Defensins Block Multiple Steps in Herpes Simplex Virus Infection. *J Immunol*; **177**; 8658-8666.
52. Hill CP, Yee J, Selsted ME, Eisenberg D (1991). Crystal structure of defensin HNP-3, an amphiphilic dimer: mechanisms of membrane permeabilization. *Science*; **251**; 1481-1485.
53. Hirohata S, Oka H, Mizushima Y (1992). Streptococcal-related antigens stimulate production of IL6 and interferon-gamma by T cells from patients with Behcet's disease. *Cell Immunol*; **140**; 410-419.
54. Hirohata S, Kikuchi H (2003). Behçet's disease. *Arthritis Res Ther*; **5**; 139-146.
55. Holländer GA (Hrsg.). Immunologie. Grundlagen für Klinik und Praxis. Urban&Fischer Verlag, München, 1. Auflage 2006.
56. Holtermann DA, Diaz JI, Blackmore PF, Davis JW, Schellhammer PF, Corica A, Semmes OJ, Vlahou A (2006). Overexpression of alpha-defensin is associated with bladder cancer invasiveness. *Urol Oncol*; **24**; 97-108.
57. Ilknur T, Pabuccuoglu U, Akin C, Lebe B, Gunes AT (2006). Histopathologic and direct immunofluorescence findings of the papulopustular lesions in Behçet's disease. *Eur J Dermatol*; **16**; 146-150.
58. Inaloz HS, Evereklioglu C, Unal B, Kirtak N, Eralp A, Inloz SS (2004). The significance of immunohistochemistry in the skin pathergy reaction of Patients with Behçet's syndrome. *J Eur Acad Dermatol Venereol*; **18**; 56-61.
59. International Study Group for Behçet's Disease (1990). Criteria for diagnosis of Behçet's disease. *Lancet*; **335**; 1078-1080.
60. Janeway C (2002). Immunologie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 5. Auflage.
61. Jorizzo JL, Solomon AR, Cavallo T (1985). Behçet's syndrome: Immunopathologic and histopathologic assessment of pathergy lesions is useful in diagnosis and follow-up. *Arch Pathol Lab Med*; **109**; 747-751.
62. Kagan BL, Selsted ME, Ganz T, Lehrer RI (1990). Antimicrobial defensin peptides form voltage-dependent ion-permeable channels in planar lipid bilayer membranes. *Proc Natl Acad Sci*; **87**; 210-214.
63. Kalkan G, Karadag AS, Astarci HM, Akbay G, Ustun H, Eksioglu E (2009). A histopathological approach: when papulopustular lesions should be in the diagnostic criteria of Behçet's disease? *J Eur Acad Dermatol Venereol*; **23**; 1056-1060.
64. Kapsimali V, Kanakis M, Vaiopoulos G, Kaklamanis P (2010). Etiopathogenesis of Behçet's disease with emphasis on the role of immunological aberrations. *Clin Rheumatol*; **29**; 1211-1216.

65. Kobayashi M, Ito M, Nakagawa A, Matsushita M, Nishikimi N, Sakurai T, Nimura Y (2000). Neutrophil and endothelial cell activation in the vasa vasorum in vasculo-Behçet disease. *Histopathology*; **36**; 362-371.
66. Kötter I (2010). Behandlung des Morbus Behçet. *Z Rheumatol*; **69**; 658-659.
67. Kötter I (2003). Zur Epidemiologie, Immungenetik, Pathogenese und Therapie des Morbus Behçet. Medizinische Habilitationsschrift, Universität Tübingen.
68. Kötter I, Günaydin I, Stübiger N, Yazici H, Fresko I, Zouboulis CC; Adler Y, Steiert I, Kurz B, Wernet D, Braun B, Müller CA (2001). Comparative analysis of the association of HLA-B*51 suballeles with Behçet's disease in patients of German and Turkish origin. *Tissue Antigens*; **58**; 166-170.
69. Kougias P, Chai H, Lin PH, Yao Q, Lumdsen AB, Chen C (2005). Defensins and cathelicidins: neutrophil peptides with roles in inflammation, hyperlipidemia and atherosclerosis. *J Cell Mol Med*; **9**; 3-10.
70. Lehner T (1997). The role of heat shock protein, microbial and autoimmune agents in aetiology of Behçet's disease. *Intern Rev Immunol*; **14**; 21-32.
71. Lehrer RI, Barton A, Daher KA, Harwig SS, Ganz T, Selsted ME (1989). Interaction of human defensins with Escherichia coli. Mechanism of bactericidal activity. *J Clin Invest*; **84**; 553-561.
72. Lehrer R I (2004). Primate defensins. *Nat Rev Microbiol*; **2**; 727-738.
73. Lichtenstein A (1991). Mechanism of mammalian cell lysis mediated by peptide defensins. Evidence for an initial alteration of the plasma membrane. *J Clin Invest*; **88**; 93-100.
74. Marshall SE (2004). Behçet's disease. *Best Pract Res Clin Rheumatol*; **18**; 291-311.
75. Medzhitov R (2007). Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*; **449**; 819-826.
76. Melikoglu M, Uysal S, Krueger JG, Kaplan G, Gogus F, Yazici H, Oliver S (2006). Characterization of the divergent wound-healing responses occurring in the pathergy reaction and normal healthy volunteers. *J Immunol*; **177**; 6415-6421.
77. Mendes D, Correia M, Barbedo M, Vaio T, Mota M, Goncalves O, Valente J (2009). Behçet's disease – a contemporary review. *J Autoimmun* ; **32** ; 178-188.
78. Mizushima Y (1988). Revised diagnostic criteria for Behçet's disease in 1987. *Ryumachi*; **28**; 66-70.
79. Müller CA, Markovic-Lipkovski J, Klatt T, Gamper J, Schwarz G, Beck H, Deeg M, Kalbacher H, Widmann S, Wessels JT, Becker V, Müller GA; Flad T (2002). Human alpha-defensins HNPs-1, -2, and -3 in renal cell

- carcinoma: influences on tumor cell proliferation. *Am J Pathol*; **160**; 1311-1324.
80. Müller CA, Autenrieth IB, Peschel A (2005). Innate defenses of the intestinal epithelial barrier. *Cell Mol Life Sci*; **62**; 1297-1307.
 81. Mumcu G, Ergun T, Elbir Y, Eksioglu-Demiralp E, Yavuz S, Atalay T, Direskeneli H (2005). Clinical and immunological effects of azithromycin in Behçet's disease. *J Oral Pathol Med*; **34**; 13-16.
 82. Murphy CJ, Foster BA, Mannis MJ, Selsted ME, Reid TW (1993). Defensins are mitogenic for epithelial cells and fibroblasts. *J Cell Physiol*; **155**; 408-413.
 83. O'Duffy JD (1974). Critères proposes pour le diagnostic de la maladie de Behçet. *Rev Med*; **36**; 2371-2379.
 84. Ohno S, Ohguchi M, Hirose S, Matsuda H, Wakisaka A, Aizawa M (1982). Close association of HLA-Bw51 with Behçet's disease. *Arch Ophthalmol*; **100**; 1455-1458.
 85. Ong PY, Ohtake T, Brandt C, Strickland I, Boguniewicz M, Ganz T, Gallo RL, Leung DY (2002). Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis. *N Engl J Med*; **347**; 1151-1160.
 86. Oono T, Huh WK, Shirafuji Y, Akiyama H, Iwatsuki K (2003). Localization of human β -defensin-2 and human neutrophil peptides in superficial folliculitis. *Br J Dermatol*; **148**; 188-191.
 87. Pay S, Simsek I, Erdem H, Dinç A (2007). Immunopathogenesis of Behçet's disease with special emphasize on the possible role of antigen presenting cells. *Rheumatol Int*; **27**; 417-424.
 88. Prohaszka Z, Nemet K, Csermely P, Hudecz F, Mezo G, Füst G (1997). Defensins purified from human granulocytes bind C1q and activate the classical complement pathway like the transmembrane glycoprotein gp41 of HIV-1. *Mol Immunol*; **34**; 809-816.
 89. Pütsep K, Carlsson G, Boman HG, Andersson M (2002). Deficiency of antibacterial peptides in patients with Morbus Kostmann: an observation study. *Lancet*; **360**; 1144-1149.
 90. Rodriguez-Garcia M, Oliva H, Climent N, Garcia F, Gatell JM, Gallart T (2007). Human immature monocytes-derived dendritic cells produce and secrete alpha-defensins 1-3. *J Leukoc Biol*; **82**; 1143-1146.
 91. Sakane T, Takeno M, Suzuki N, Inaba G (1999). Behçet's disease. *New England Journal of Medicine*; **341(17)**; 1284-1291.
 92. Selsted ME, Ouellette AJ (2005). Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. *Nat Immunol*; **6**; 551-557.
 93. Smith JJ, Travis SM, Greenberg EP, Welsh MJ (1996). Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid. *Cell*; **85**; 229-236.

94. Suzuki Y, Hoshi K, Matsuda T, Mizushima Y (1992). Increased peripheral blood gamma delta+ T Cells and natural killer cells in Behçet's disease. *J Rheumatol*; **19**; 588-592.
95. Territo MC, Ganz T, Selsted ME, Lehrer RI (1989). Monocyte-chemotactic activity of defensins from human neutrophils. *J Clin Invest*; **84**; 2017-2020.
96. Treusch M, Vonthein R, Baur M, Günaydin I, Koch S, Stübiger N, Eckstein AK, Peter HH, Ness T, Zierhut M, Kötter I (2004). Influence of human recombinant interferon-alpha2a (rhIFN-alpha2a) on altered lymphocyte subpopulations and monocytes in Behçet's disease. *Rheumatology (Oxford)*; **43**; 1275-1282.
97. Varol A, Seifert O, Anderson C (2009). The skin pathergy test: innately useful? *Arch Dermatol Res*; **302**; 155-168.
98. Verity DH, Wallace GR, Vaughan RW, Stanford MR (2003). Behçet's disease: from Hippocrates to the third millennium. *Br J Ophthalmol*; **87**; 1175-1183.
99. Verity DH, Marr JE, Ohno S, Wallace GR; Stanford MR (1999). Behçet's disease, the Silk Road and HLA-B51: historical and geographical perspectives. *Tissue Antigens*; **54**; 213-220.
100. Wimley WC, Selsted ME, White SH (1994). Interactions between human defensins and lipid bilayers: evidence for formation of multimeric pores. *Protein Sci*; **3**; 1362-1373.
101. Yamasaki K, Gallo RL (2008). Antimicrobial peptides in human skin disease. *Eur J Dermatol* ; **18**; 11-21.
102. Yang D, Chertov (1999). β -Defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T-Cell CCR6. *Science*; **286**; 525-528.
103. Yang D, Chen Q, Chertov O, Oppenheim JJ (2000). Human neutrophil defensins selectively chemoattract naive T and immature dendritic cells. *J Leuc Biol*; **68**; 9-14.
104. Yang D, Biragyn A, Kwak LW, Oppenheim JJ (2002). Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal. *Trends Immunol*; **23(6)**; 291-296.
105. Yang D, Biragyn D, Hoover DM, Lubkowski J, Oppenheim JJ (2004). Multiple Roles of antimicrobial defensins, cathelicidins, and eosinophil-derived neurotoxin in host defense. *Annu Rev Immunol* ; **22** ; 181-215.
106. Yazici H, Chamberlain MA, Tüzün J, Yurdakul S, Müftüoğlu A (1984). A comparative study of the pathergy reaction among Turkish and British patients with Behçet's disease. *Ann Rheum Dis*; **43**; 74-75.
107. Yazici Y, Yazici H (Hrsg.) (2010). Behçet's Syndrome. Springer Verlag, New York, elektronische Ausgabe, 1. Auflage 2010.
108. Zeiser R, Penack O, Holler E, Idzcko M (2011). Danger signals activating innate immunity in graft-versus-host disease. *J Mol Med*; **89**; 833-845.

109. Zhao C, Wang I, Lehrer RI (1996). Widespread expression of beta-defensin hBD-1 in human secretory glands and epithelial cells. *FEBS Lett*; **396**; 319-322.
110. Ziegler A, Milstein C (1979). A small polypeptide different from β 2-microglobulin associated with a human cell surface antigen. *Nature*; **279**; 243-244.
111. Zierhut M, Mizuki N, Ohno S, Inoko H, Gül A, Onoé K, Isogai E (2003). Immunology and functional genomics of Behçet's disease. *Cell Mol Life Sci*; **60**; (1903-1922).
112. Zierhut M, Stübiger N, Deuter CM, Kötter I (2005). Chapter 12: Behçet's disease. S.173-200. Aus Uveitis and immunological disorders. Pleyer U et Mondino B (Hrsg.), Springer-Verlag, Berlin, 2005.
113. Zouboulis CC, Kötter I, Djawari D, Kirch W, Kohl PK, Ochsendorf FR, Keitel W, Stadler R, Wollina U, Proksch E, Söhnchen R, Weber H, Gollnick HP, Hölzle E, Fritz K, Licht T, Orfanos CE (1997). Epidemiological Features of Adamantiades-Behçet's Disease in Germany and in Europe. *Yonsei Med J*; **38**; 411-422.

8 Anhang

Tabelle 9: Patientenliste aller Proben (inklusive nicht verwendbarer Proben) mit Angaben zu Alter, Geschlecht, Klinik und Therapie. n.v.= nicht verfügbar, w= weiblich, m= männlich; ?= unbekannt, G= Geschlecht.

Patienten nr.	Proben nr.	G	Alter	HLA-B*	klinische Manifestation	Therapie	Injektions-behandlung/ Testergebnis	Auswertung
1	MB 1	m	39	n.v.	Orale Ulcera, Genitale Ulcera, Haut	keine Therapie	Urat +	Ja
	MB 2						Kontrolle	Nein
2	MB 3	m	33	HLA-B51 positiv	Auge (Uveitis)	Azathioprin 50mg/d	Pathergie +	Nein
	MB 4						Kontrolle	Nein
3	MB 5	w	28	HLA-B5 positiv	Orale Ulcera, Haut	Colchicin 1.5 mg/d	Kontrolle	Ja
	MB 6						Urat +	Ja
4	MB 7	m	38	n.v.	Neurologisch	Colchicin 1.5 mg/d	Kontrolle	Ja
	MB 8						Urat +	Ja
5	MB 9	m	38	n.v.	Orale Ulcera, Genitale Ulcera, Haut, Thrombophlebitis	Colchicin 1.5 mg/d NSAR	Kontrolle	Ja
	MB 10						Pathergie +	Ja
6	MB 11	w	47	HLA-B5 positiv	Orale Ulcera, Haut	keine Therapie	Pathergie +	Ja
	MB 12						Kontrolle	Nein
7	MB 13	m	38		Orale und genitale Ulcera, Tiefe Beinvenenthrombose	Azathioprin 150mg/d	Pathergie +	Nein
	MB 14						Kontrolle	Nein
8	MB 15	m	34	n.v.	Orale und genitale Ulcera, Haut, Athralgien	keine Therapie	Kontrolle	Ja
	MB 16						Urat +	Ja
9	MB 17	m	36	n.v.	Auge (Uveitis)	Interferon 5x10 ⁶ E/d	Urat +	Ja
	MB 18						Kontrolle	Nein
10	MB 19	m	17	n.v.	Orale und genitale Ulcera, Auge	Azathioprin 175 mg/d, Cyclosporin-A 350 mg/d	Pathergie +	Ja
	MB 20						Kontrolle	Ja
11	MB 21	m	44	HLA-B51 positiv	Haut	Colchicin 1,5 mg/d	Pathergie +	Ja
	MB 22						Kontrolle	Nein
12	MB 23	m	46	n.v.	Orale Ulcera, Haut	Colchicin 1 mg/d	Urat +	Ja
	MB 24						Kontrolle	Ja
13	MB 25	m	42	n.v.	Orale Ulcera, Thrombophlebitis,	keine Therapie	Pathergie -	Nein
14	MB 26	m	26	n.v.	Orale Ulcera, Haut, Vaskulär (Aneurysma und Thrombose)	Azathioprin 150 mg/d, Prednisolon 15 mg/d	Pathergie -	Ja
15	MB 27	m	39	HLA-B51 negativ	Orale Ulcera, Haut, Athralgien/Arthritis	Colchicin 1,5 mg/d	Pathergie -	Ja
16	MB 28	m	28	HLA-B51 positiv	Orale und Genitale Ulcera, Haut, Uveitis	Azathioprin 150mg/d	Pathergie -	Nein

17	MB 29	m	27	HLA-B51 positiv	Orale und Genitale Ulcera, Haut, Thrombophlebitis, Auge (Uveitis)	Interferon 5x10 ⁶ E/d	Pathergie +	Ja
	MB 30						Pathergie -	Ja
18	MB 31	m	48	n.v.	Orale und genitale Ulcera, Auge (Uveitis)	keine Therapie	Kontrolle	Nein
	MB 32						Urat +	Ja
19	MB 33	m	45	HLA-B51 negativ	Orale und genitale Ulcera, Arthritis	Azathioprin 150 mg/d, Prednisolon 15 mg/d, NSAR	Pathergie +	Ja
	MB 34						Kontrolle	Ja
20	MB 35	m	34	HLA-B51 positiv	Orale Ulcera, Haut	Colchicin 1.5 mg/d	Pathergie -	Nein
	MB 36						Kontrolle	Nein
21	MB 37	m	32	n.v.	Orale Ulcera, Haut, Athralgien	Colchicin 1,5 mg/d	Pathergie +	Ja
	MB 38						Pathergie -	Ja
22	MB 39	m	48	n.v.	Haut	Azathioprin 150 mg/d	Pathergie -	Ja
	MB 40						Pathergie +	Ja
23	MB 51	m	?	n.v.	unbekannt	unbekannt	Urat +	Ja
	MB 52						Kontrolle	Nein
24	MB 53	m	51	HLA-B5 positiv	Orale und genitale Ulcera, Haut, Arthritis	Methotrexat 15mg/Woche	Kontrolle	Nein
	MB 54						Pathergie +	Ja
25	MB 61	m	48	HLA-B51 positiv	Orale und genitale Ulcera, Haut, Auge	Azathioprin 150 mg, Cyclosporin-A 300 mg/d	Kontrolle	Ja
	MB 62						Pathergie +	Ja
26	MB 63	m	29	n.v.	Haut, Auge	keine Therapie	Urat +	Ja
	MB 64						Kontrolle	Ja
27	MB 65	m	19	HLA-B5 positiv	Orale und genitale Ulcera, Haut	Colchicin 1,5mg/d	Urat +	Nein
	MB 66						Kontrolle	Ja
28	MB 67	m	27	n.v.	Orale Ulcera, Auge	Azathioprin 150 mg/d	Urat +	Ja
	MB 68						Kontrolle	Ja
29	S2575	m	40	n.v.	nicht bekannt	keine Therapie	spontane Läsion	Ja
30	S2576	m	53	n.v.	nicht bekannt	keine Therapie	spontane Läsion	Ja
31	S120	?	39				Normale Haut	Ja
32	S233	F	30				Normale Haut	Ja
33	S323	?	?		Tätowierung		Normale Haut	Ja
34	S641	?	?				Normale Haut	Ja
35	S832	?	?		Leiche		Normale Haut	Ja
36	S1576	f	62		Leiche		Normale Haut	Ja
37	S2055	m	62				Normale Haut	Ja
38	S404	m	30				Psoriasis	Ja
39	S800	m	32				Lichen ruber	Ja

9 Danksagung

Ich danke herzlich,

Frau Professor Claudia A. Müller für die Überlassung des Themas und jederzeit prompte sowie gute fachliche und menschliche Betreuung, besonders auch bei der Fertigstellung der Dissertationsschrift.

Frau Professor Ina Kötter für die fachlichen Anregungen und die Unterstützung besonders an der 11th International Conference on Behçet's Disease 2004.

Herr Dr. İlhan Günaydin für die Übersetzungshilfe im Kontakt mit den türkischen Kollegen sowie die Entnahme der Proben in der Rheumaambulanz der Universitätsklinik Tübingen.

Herrn Professor Hasan Yasiçi und Dr. İzzet Fresko der Cerraphasa Universität Istanbul, Türkei, für die Überlassung der Proben.

Inge Steiert für die hervorragende Einführung in die Laborarbeit und offene Ohren bei arbeitstechnischen Fragen, sowie der AG Klein für labortechnische Unterstützungen.

Meinen Eltern und Geschwistern für die Ermöglichung des Studiums, mentale Unterstützung während der Zeit der Doktorarbeit und ihre Verlässlichkeit als Familie.

Henrik Bollerer als dem besten Partner an meiner Seite für die stetigen und unermüdlichen Ermunterungen durch die Tiefen der Arbeit.

Simone Utz für ihre Freundschaft und Anteilnahme am Fortschritt der Arbeit.