

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen und Poliklinik

Abteilung Innere Medizin II

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. L. Kanz

**Intrazelluläre Zytokine bei Morbus Behçet im Verlauf
unter einer Therapie mit Interferon- α 2a
-Vergleich mit HLA-B27-assoziierten Spondarthritiden-**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Eberhard Karls Universität

zu Tübingen

vorgelegt von

STEFANIE PHILIPPINE GROLL

aus

Ravensburg

2006

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Frau Privatdozentin Dr. I. Kötter

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. T. Orlikowsky

Für
Franz und Gabriela Groll
In Liebe und Dankbarkeit

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	6
1 EINLEITUNG	8
1.1 Morbus Behçet	8
1.2 Interferon- α 2a	10
1.3 Zytokine	12
1.4 Spondylitis ankylosans	14
1.5 Zielsetzung	15
2 MATERIAL	17
2.1 Reagenzien	17
2.2 Antikörper	18
2.3 Gefäße und Zubehör	19
2.4 Geräte	19
2.5 Patienten und gesunde Probanden	20
3 METHODEN	22
3.1 Lymphozytenisolierung	22
3.2 Einfrieren und Auftauen der Lymphozyten	22
3.2.1 Einfrieren	22
3.2.2 Auftauen	23
3.3 Immunfluoreszenzfärbung	23
3.3.1 In vitro Stimulation der T-Zellen	23
3.3.2 Oberflächen- und Intrazelluläre Zytokinfärbung	24
3.4 FACS-Analyse	27
3.4.1 Aufbau und Arbeitsprinzip des FACScan (Fa. Becton-Dickinson)	27

3.4.2	Messung am FACScan und Datenauswertung	29
3.5	Statistik	30
4	ERGEBNISSE	32
4.1	Intrazelluläre Produktion von IL 2, IFNγ, TNFα und IL 4 bei Patienten mit M. Behçet im Vergleich zu Patienten mit Spondylitis ankylosans und gesunden Probanden	32
4.1.1	Produktion von IL 2 bei Patienten mit M. Behçet, Patienten mit Spondylitis ankylosans und gesunden Probanden	32
4.1.2	Produktion von IFN γ bei Patienten mit M. Behçet, Patienten mit Spondylitis ankylosans und gesunden Probanden	34
4.1.3	Produktion von TNF α bei Patienten mit M. Behçet, Patienten mit Spondylitis ankylosans und gesunden Probanden	35
4.1.4	Produktion von IL 4 bei Patienten mit M. Behçet, Patienten mit Spondylitis ankylosans und gesunden Probanden	37
4.2	Intrazelluläre Produktion von IL 2, IFNγ, TNFα und IL 4 bei Patienten mit M. Behçet unter einer Therapie mit humanem rekombinantem IFNα2a	40
4.2.1	Produktion von IL 2 bei Patienten mit M. Behçet unter einer Therapie mit IFN α	40
4.2.2	Produktion von IFN γ bei Patienten mit M. Behçet unter einer Therapie mit IFN α	43
4.2.2	Produktion von TNF α bei Patienten mit M. Behçet unter einer Therapie mit IFN α	45
4.2.3	Produktion von IL 4 bei Patienten mit M. Behçet unter einer Therapie mit IFN α	47
5	DISKUSSION	50
5.1.1	Zytokinprofil bei Patienten mit Morbus Behçet	51
5.1.2	Zytokinprofil bei Patienten mit Spondylitis ankylosans	55
5.1.3	Einfluss von IFN α auf das Zytokinprofil bei Patienten mit Morbus Behçet	58
5.1.4	Einfluss von IFN α auf das Zytokinprofil bei verschiedenen Krankheiten	59
5.1.5	Schlussfolgerung	63
6	ZUSAMMENFASSUNG	64
7	LITERATURVERZEICHNIS	66

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
APC	Allophycocyanin
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Cluster of differentiation
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiaminetetraacetic Acid
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat
FSC	forward light scatter
g	Gramm
h	Stunden
HLA	Human leukocyte antigen
IE	Internationale Einheit
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kDa	Kilodalton
MB	Morbus Behçet
MHC	Major histocompatibility complex
MioE/d	Millionen Einheiten/Tag
ml	Milliliter
moAk	monoklonale Antikörper
NK-Zellen	natürliche Killerzellen

nm	Nanometer
NSAR	Nichtsteroidalen Antirheumatika
PBMC	Periphere Mononukleäre Blutzellen
PBS	Phosphate buffered Saline
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridin Chlorophyll
PHA	Phytohämagglutinin
PMA	Phorbol Myristat Acetat
SA	Spondylitis ankylosans
SSC	side scatter
Th	T-Helfer-Zellen
TNF α	Tumornekrosefaktor- α
U/min	Umdrehungen/Minute

1 Einleitung

1.1 *Morbus Behçet*

Der Morbus Behçet (MB), benannt nach dem Erstbeschreiber dieser Erkrankung, einem türkischen Dermatologen, ist eine Multisystemerkrankung mit dem histologischen Korrelat einer leukozytoklastischen Vaskulitis (Behçet 1937). Charakteristisch ist der Symptomenkomplex aus Haut- und Schleimhautläsion (Hautvaskulitis, oraler und genitaler Aphtose) und okulärer Entzündung. Oft kommen Oligo- und Spondarthritiden, Vaskulitiden großer Gefäße mit Aneurysmata, Thrombosen und Embolien hinzu. Außerdem können die Lunge, das zentrale Nervensystem, der Gastrointestinaltrakt, die Nieren und selten auch die Koronararterien betroffen sein. Ein Hauptproblem stellt die okuläre Beteiligung mit einer Uveitis beziehungsweise retinalen Vaskulitis dar, die in ca. 50% der Fälle zur konsekutiven Erblindung führt (Zierhut et al., 1995, Kötter und Stübiger, 1999, Gül 2001). Die Diagnosekriterien wurden 1990 von einer internationalen Studiengruppe neu definiert, um eine Vergleichbarkeit von verschiedenen Studien zu erreichen. Die Kriterien der internationalen Studiengruppe sind folgende (International study group, 1990):

- Rekurrende orale Aphtose

plus 2 der folgenden:

- Rekurrende genitale Läsionen
- Augenläsionen
- Hautläsionen
- Positiver Pathergie-Test.

Bis heute ist die Pathogenese der Erkrankung nicht geklärt. Es scheint eine genetische Komponente beteiligt zu sein, da das Haupthistokompatibilitätsantigen HLA B51 in 60-80% mit der Krankheit assoziiert ist. Dies trifft geographisch vor allem auf die Länder zu, die zwischen

dem 30° and 45° nördlichen Breitengrad entlang der früheren „Seidenstraße“ liegen (Ohno et al., 1982, Verity et al., 1999). Das Vorkommen von M. Behçet in diesen Ländern (Prävalenz 5/100 000 bis 370/100 000 in Griechenland und in der Türkei) unterscheidet sich erheblich von dem in Deutschland (geschätzte Prävalenz 0,6/100 000) (Kötter und Stübiger, 1999). Als Auslöser werden außerdem virale und bakterielle Antigene diskutiert, darunter vor allem Herpesviren und Streptokokken (Eglin et al., 1982, Mizushima et al., 1988, Hamzaoui et al., 1990, Hirohata et al., 1992). Vieles deutet daraufhin, dass T-Lymphozyten eine zentrale Rolle bei der Pathogenese spielen. Beschrieben wurde eine Verminderung der CD4⁺-, sowie eine Vermehrung der CD8⁺-Zellen, des weiteren eine Vermehrung der CD8⁺γδ-T-Zellen (Suzuki et al., 1992, Esin et al., 1997, Yamashita et al., 1997, Frassanito et al., 1999, Freysdottir et al., 1999). Bei Patienten im aktiven Krankheitsstadium fanden sich CD56⁺ NK-Zellen erhöht (Kaneko et al., 1985, Suzuki et al., 1992, Freysdottir et al., 1999). Untersuchungen hinsichtlich des Zytokinprofils bei Patienten mit Morbus Behçet sprechen für eine Th1-Polarisation mit erhöhten IFN γ - und TNF α -Werten (Sayinalp et al., 1996, Yamashita et al., 1997, Frassanito et al., 1999, Freysdottir et al., 1999, Kosar et al., 1999). Widersprüchliche Berichte gibt es über die T-Zell-Produktion von IL 2, die meisten Autoren fanden keinen Unterschied zwischen Patienten und Kontrollen (Sayinalp et al., 1996, Raziuddin et al., 1998, Kosar et al., 1999), Frassanito et al. beschrieben jedoch 1999 eine signifikante Erhöhung von IL 2 bei Behçet-Patienten. Es wurde kein Unterschied der T-Zell-Produktion von IL 4 und IL 10 im Vergleich zu gesunden Kontrollen festgestellt (Frassanito et al., 1999, Freysdottir et al., 1999).

Standardtherapie des M. Behçet ist eine Immunsuppression, die sich in ihrer Intensität nach Art und Schwere der vorhandenen Organmanifestation richtet. Als Immunsuppressiva werden vor allem Azathioprin, Cyclosporin A, Cyclophosphamid und Glukokortikosteroide eingesetzt, bei vorrangigem Schleimhautbefall Colchicin und Thalidomid. Obwohl sie oft eine effektive Therapie darstellen, muss mit schwerwiegenden Komplikationen, wie zum Beispiel Infektionen gerechnet werden (Kötter und Stübiger, 1999).

1.2 Interferon- α 2a

Interferon- α (IFN α) ist ein im menschlichen Körper vorkommendes Protein, das von Leukozyten produziert wird. Bei Untersuchungen über die virale Interferenz wurde es Mitte des letzten Jahrhunderts von Isaacs und Lindenmann zufällig entdeckt (Hall 1990). IFN α wirkt immunmodulatorisch, antiviral und antiproliferativ und wird seit rund zwanzig Jahren als klinisch nutzbare Substanz verwendet. Erfolgreich eingesetzt wird es bei verschiedenen Erkrankungen wie der Hepatitis B + C, der Chronischen myeloischen Leukämie, dem malignen Melanom, Condyloma acuminata und dem AIDS-assoziierten Kaposi-Sarkom (Hall, 1990, Langford und Sneller, 2003).

Studien bezüglich der immunologischen Effekte von IFN α haben vielfältige Einflüsse auf Lymphozytensubpopulationen und Monozyten gezeigt. Bei Patienten mit Hepatitis C wurde die Anzahl der CD8+-T-Zellen und der CD8+ $\gamma\delta$ -T-Zellen durch IFN α Behandlung reduziert. Weiterhin fand man eine signifikante Reduktion der vor Therapie erhöhten NK-Zellen (Wejstal et al., 1992). Bei Myasthenia gravis wurde ebenfalls durch IFN α eine Reduktion der NK-Zellen beschrieben (Bolay et al., 1998), obwohl die Aktivität der NK-Zellen gesteigert wurde. Die Anzahl der Monozyten und der Neopterin Serumspiegel, als Marker der Monozytenaktivierung, wurden bei gesunden Probanden durch IFN α erhöht (Corssmit et al., 1997). Die B-Zellen stiegen durch IFN α bei Patienten mit chronischer Hepatitis C an (Wejstal et al., 1992). Dieser Effekt kann durch die Hemmung der B-Zell-Rezeptor-vermittelten Apoptose erklärt werden (Su und David, 1999). An Myelomzelllinien wurde eine Verstärkung der Fas-vermittelten Apoptose beschrieben (Spets et al., 1998). Im Widerspruch dazu steht eine Arbeit, in der die Hemmung der Apoptose von aktivierten T-Zellen gezeigt wurde (Marrack et al., 1999). Der Einfluß einer Therapie mit IFN α auf das Zytokinnetzwerk wurde bei verschiedenen Krankheiten untersucht und lässt überwiegend eine verstärkte Th1-Antwort mit erhöhter Expression von Th1-Zytokinen wie IFN γ und IL 2 unter Therapie erkennen (Crossley et al., 1996, Czerwionka et al., 2000, Reuben et al., 2000, Hempel et al., 2001, Aswald et al., 2002).

Auch bei Morbus Behçet fokussieren sich jüngere Therapiestudien auf Interferon- α , das die Erkrankung erheblich zu verbessern scheint. Es gibt einige Fallberichte und offene, unkontrollierte, prospektive Studien, die die Anwendung von IFN α bei Patienten mit M. Behçet untersucht haben (Hamuryudan et al., 1994, O'Duffy et al., 1998, Kötter et al., 2003). In einer unlängst veröffentlichten Studie untersuchten Kötter et al. die Wirksamkeit von IFN α an 50 Patienten mit okulärem MB. Bei 92% der Patienten konnte eine signifikante Verbesserung der Sehschärfe schon innerhalb von zwei bis vier Wochen nach Therapiebeginn beobachtet werden und bei der Mehrzahl der Patienten führte IFN α zu einer kompletten Remission der okulären Vaskulitis. Des Weiteren wurde ein Stillstand extraokulärer Manifestationen wie genitale Ulzera, Arthritis und Hautläsionen unter der IFN α Therapie beobachtet (Kötter et al., 2003, Kötter et al., 2004c). Eine Pilotstudie von Stübiger et al. zur Wirksamkeit von IFN α bei Patienten mit einer Uveitis im Rahmen eines MB erreichte ebenfalls in über 90% der Fälle eine komplette Remission der uveitischen Veränderungen und Alpsoy et al. führten eine randomisierte, doppelblinde Studie durch, in der ebenfalls eine signifikante Verbesserung des Augenbefalls beschrieben wurde (Stübiger et al., 2001, Alpsoy et al., 2002).

Als Nebenwirkungen der Interferontherapie kam es zu grippeähnlichen Symptomen, reversiblen Leuko- und Thrombozytopenien, sowie zur Rötung der Einstichstelle. Weitere Nebenwirkungen waren außerdem Depressionen und Psychosen, Haarausfall, Juckreiz und Fibromyalgie (Hamuryudan et al., 1994, O'Duffy et al., 1998, Stübiger et al., 2001, Kötter et al., 2003, Kötter et al., 2004c). Die Entwicklung von Autoantikörpern wurde ebenfalls beobachtet (Stübiger et al., 2001, Kötter et al., 2003, Kötter et al., 2004c).

Eine Studie zur Immunantwort bei Patienten mit MB unter einer IFN α 2a-Therapie zeigte eine signifikante Reduktion der NK-Zellen und eine fallende Tendenz der CD8 $^{+}$ - $\gamma\delta$ -T-Zellen. B-Lymphozyten stiegen unter Therapie an. Auf Lympho- und Monozyten erhöhte sich die HLA-Klasse-I-Expression (Treusch und Kötter, 2001).

Die Frage nach dem Wirkmechanismus von Interferon- α bei M. Behçet ist jedoch weiterhin ungeklärt, da die herkömmlichen Therapien streng immunsuppressiv sind und Interferon- α zwar antiproliferativ, aber vorwiegend immunstimulatorisch wirkt.

1.3 Zytokine

Zytokine sind kleine Proteine (~25 kDa), die im Körper von verschiedenen Zellen als Reaktion auf einen Aktivierungsreiz freigesetzt werden. Durch Bindung an spezifische Rezeptoren lösen sie Reaktionen aus. Zytokine haben großen Einfluß auf die Entwicklung, Differenzierung und Regulation von Zellen des Immunsystems. Daraus resultiert die Annahme, dass eine Dysregulation ihrer Produktion oder Aktivierung für die Entwicklung von Autoimmunität und Autoimmunerkrankungen verantwortlich ist. Aktivierte T-Zellen unterteilen sich in zwei funktionelle Untergruppen, den T-Helfer-Zellen vom Typ 1 (Th1) und den T-Helfer-Zellen vom Typ 2 (Th2). Beide Untergruppen haben ein unterschiedliches Zytokinmuster und Effektorfunktionen. Th1-Zellen sezernieren vor allem Interleukin-2 (IL 2), Interferon- γ (IFN γ), und Tumornekrosefaktor- α (TNF α), aktivieren Makrophagen und sind für die zellvermittelte Immunität verantwortlich, wohingegen Th2-Zellen vornehmlich IL 4, IL 5, IL 10 und IL 13 produzieren und für die humorale Immunität zuständig sind. Im gesunden menschlichen Organismus ist ein Th1-Th2-Gleichgewicht vorhanden, dem eine wichtige regulatorische Rolle im Immunsystem zukommt (Romagnani, 1996, Frassanito et al., 1999). Verschiedene Studien weisen auf die Bedeutung der Th1-Th2-Ausgewogenheit hin (Kroemer et al., 1996, Nicholson und Kuchroo, 1996). Th1-Zellen tragen zur Pathogenese verschiedener organspezifischer Autoimmunerkrankungen bei, während Th2-Zellen die Induktion beziehungsweise Progression von Erkrankungen durch die Produktion von antiinflammatorischen Zytokinen kontrollieren (Nicholson und Kuchroo, 1996). Auf der anderen Seite hingegen kann die resultierende Aktivierung von Th2-Zytokinen für Hypergammaglobulinämien, gesteigerte Autoantikörperproduktion und verstärkte Immunsuppression verantwortlich sein (Kroemer et al., 1996). Dieses Modell scheint jedoch zu vereinfacht zu sein. Nicht alle

Autoimmunerkrankungen sind streng Th1-assoziiert, es gibt Krankheitsbeispiele, wie die Colitis ulcerosa beziehungsweise der systemische Lupus erythematodes in denen auch Th2-Antworten zur Pathogenese beitragen. Zytokine wie IL 2, IFN γ und TNF α können sowohl immunstimulatorisch, als auch immunsuppressiv wirken (O'Shea et al., 2002).

Tabelle 1. Funktionen der untersuchten Zytokine

	Immunstimulatorisch	Immunsuppressiv
IL 2	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Proliferation der T-Zellen 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Fas-abhängige Apoptose
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Induktion von TNFα und IFNγ 	
IFNγ	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Makrophagenaktivierung ▪ erhöhte Expression von MHC-Molekülen und Komponenten des Antigenprozessierungssystems 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ antiproliferativer Effekt auf myeloische und lymphatische Zellen
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Hemmung von Th2-Zellen 	
TNFα	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Proinflammatorisch durch Aktivierung von Makrophagen, Endothelzellen und Synoviozyten ▪ Induktion der Produktion von anderen proinflammatorischen Zytokinen (IL 1, IL 6) 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Apoptoseinduktion von Lymphozyten ▪ Unterdrückung der Lymphozytenproliferation ▪ Hemmung der T-Zell-Signalisierung
IL 4	<ul style="list-style-type: none"> ▪ B-Zell-Aktivierung 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Hemmung von Th1-Zellen

1.4 Spondylitis ankylosans

Die Spondylitis ankylosans (SA) ist eine abakterielle chronisch-entzündliche Erkrankung der Ligamenta und der Synovialis der Wirbelbogengelenke und der Iliosakralfugen, die zur Verknöcherung (Ankylose) und Versteifung der betroffenen Gelenke führt. Typische Merkmale der SA sind nächtliche Schmerzen im Kreuzbein- und Gesäßbereich, die in die Kniekehlen ausstrahlen, Persistenz der Kreuzschmerzen über mehr als 3 Monate, Morgensteifigkeit, Besserung der Beschwerden durch Bewegung und Beginn der Symptomatik vor dem 40. Lebensjahr. Häufig kommt es zu einer peripheren Gelenkbeteiligung, bei der meistens die unteren Extremitäten betroffen sind. Als systemische Manifestationen können Uveitiden, Aortiden und Urethritiden auftreten (Burmester und Ulrichs, 1999).

Die SA zeigt eine sehr enge Assoziation mit dem Histokompatibilitätsantigen HLA B27; über 90% der Patienten sind HLA B27 positiv. Da die Häufigkeitsverteilung des Vorkommens von HLA B27 in verschiedenen ethnischen Gruppen und geographischen Regionen sehr unterschiedlich ist, zeigt sich weltweit eine unterschiedliche Prävalenz der Erkrankung. In Deutschland beträgt diese 1%. Männer erkranken zwei bis viermal häufiger als Frauen. Die Diagnose wird anhand der modifizierten New York Kriterien gestellt (Van der Linden et al., 1984):

1. Klinische Kriterien:

- a) Tiefsitzende Rückenschmerzen und Steifigkeit, die länger als drei Monate bemerkbar ist und sich durch Bewegung bessert
- b) Einschränkung der Wirbelsäulenbeweglichkeit in der Sagittal- und Frontalebene
- c) Einschränkung der Brustexpansion, in Relation zu Normwerten des entsprechenden Alters und Geschlechts

2. Radiologisches Kriterium:

a) Bilaterale Sakroiliitis Grad ≥ 2 oder unilaterale Sakroiliitis Grad 3-4

Die Pathogenese der Erkrankung ist nicht vollständig geklärt. Sie scheint komplex und multifaktoriell zu sein, die enge Assoziation mit HLA B27 spricht für eine genetische Disposition. Jedoch sind nicht alle Patienten HLA B27-positiv und bei eineiigen Zwillingen erkranken nur 50-75% (Brown et al., 1997, Höhler et al., 1999). Weitere Faktoren in der Krankheitsentstehung werden diskutiert. Immunologische Aspekte, wie inflammatorische zelluläre Infiltrate und Zytokine scheinen eine Rolle zu spielen, als auch Umweltfaktoren, wie das Enterobakterium *Klebsiella pneumoniae* (Mäki-Ikola et al., 1995, Sieper und Braun, 1995, Sieper et al. 2002). Das Zytokinprofil im peripheren Blut von Patienten mit SA deutet auf ein Th1/Th2-Ungleichgewicht hin, wobei die Produktion von Th1-Zytokinen wie IL 2, IFN γ und TNF α meist erniedrigt war (Canete et al., 2000, Rudwaleit et al., 2001b, Van Damme et al., 2001, Baeten et al., 2002, Zou et al., 2002a). Bezüglich der Produktion von IL 4 wurden keine Unterschiede im Vergleich zu gesunden Kontrollen festgestellt (Rudwaleit et al., 2001b, Zou et al., 2002a). Der Goldstandard der Therapie besteht momentan in Nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR). Patienten, die nicht darauf ansprechen, erhalten Sulfasalazin, Methotrexat oder intraartikuläre Glukokortikoidinjektionen (Khan, 2002).

Ein neuer Ansatz in der Therapie der Spondylitis ankylosans ist der Einsatz von TNF α -Antagonisten, wie Infliximab und Etanercept, die antiinflammatorisch wirken und somit nicht nur ausschließlich eine symptomatische Therapie bieten, sondern potentiell die Krankheitsprogression beeinflussen können (Sieper et al., 2002, Zou et al., 2003).

1.5 Zielsetzung

Diese Arbeit untersuchte T-Lymphozyten von Patienten mit Morbus Behçet auf ihre intrazelluläre Zytokinproduktion vor und im Verlauf unter einer Therapie mit humanem rekombinanten Interferon- α 2a. Vergleichend wurden Patienten mit Spondylitis ankylosans und gesunde Probanden hinsichtlich ihres Zytokinprofils

untersucht. Dieser Vergleich wurde aufgrund einiger Gemeinsamkeiten der beiden Erkrankungen vorgenommen. Die SA ist wie der MB mit einem HLA-Klasse-I-Antigen (HLA B27 bzw. HLA B51) assoziiert. In der Symptomatik finden sich ebenfalls Parallelen, wie die Möglichkeit der Entwicklung von Oligoarthritiden und Sakroiliitiden, Entzündungen großer arterieller Gefäße und Uveitiden.

Anhand dieser Untersuchungen soll Einblick in die Wirkungsweise von IFN α bei M. Behçet gewonnen werden.

2 Material

2.1 Reagenzien

- Biocoll Separating Solution (1,077 g/ml) Biochrom AG, Berlin
- Brefeldin A (*Penicillium brefeldianum*) Sigma, Schnelldorf
- BSA (Bovines Serumalbumin) Sigma, Deisenhofen
- CaliBRITE APC Becton-Dickinson, USA
- Dimethylsulfoxid (DMSO) Sigma Chemical Co, USA
- EDTA 0,5 M (Ethyldiaminetetraacetic Acid) AccuGENE, USA
- FCS (Fetales Kälberserum) CC-Pro, Neustadt
- Formalin 10% Sigma Diagnostics, USA
- Heparin-Natrium 10 000 IE/ml B. Braun Melsungen AG
- Ionomycin (v. *Streptomyces conglobatus*) Sigma, Schnelldorf
- PBS (Phosphate buffered Saline) GIBCO, UK
- PHA (Phytohämagglutinin) Biochrom AG, Berlin
- PMA (Phorbol Myristat Acetat) Sigma, Schnelldorf
- Refobacin® (Gentamicinsulfat) Merck KgaA, Darmstadt
- RPMI 1640 Medium mit Glutamax-I GIBCO, UK
- Saponin Roth GmbH, Karlsruhe
- Trypanblau 0,4% Gibco BRL, Eggenstein

2.2 Antikörper

Tabelle 2. Liste der für die FACS-Analyse verwendeten Antikörper

Antikörper	Konjugat	Funktion/Wirkung	Hersteller
IgG1-Maus	FITC	Isotypkontrolle	BD
IgG1-Maus	PE	Isotypkontrolle	BD
IgG1-Maus	PerCP	Isotypkontrolle	BD
IgG1-Maus	APC	Isotypkontrolle	BD
IgG2a-Ratte	PE	Isotypkontrolle	BD
CD8-Maus	FITC	Corezeptor für MHC-Klasse-I-Molekül	BD
CD4-Maus	PE	Corezeptor für MHC-Klasse-II-Molekül	BD
CD4-Maus	APC	Corezeptor für MHC-Klasse-II-Molekül	BD
CD3-Maus	PerCP	Teil des T-Zell-Rezeptor-Komplex, notwendig für die Zelloberflächenexpression und Signalübertragung	BD
IFN γ -Maus	PE	Makrophagenaktivierung, erhöhte Expression von MHC-Molekülen, hemmt Th2-Zellen	BD
TNF α -Maus	PE	lokale Entzündungen, Endothelaktivierung	BD
IL 2-Ratte	PE	Proliferation der T-Zellen	BD
IL 4-Maus	PE	B-Zell-Aktivierung, hemmt Th1-Zellen	BD

2.3 Gefäße und Zubehör

- Kryo-Röhrchen, 2 ml Greiner Labortechnik
- Eppendorfbehälter 1,5 ml Greiner, Solingen
- Falcon® Pipetten 10 ml, 25 ml Becton-Dickinson, USA
- Falcon® 15 ml Tubes Becton-Dickinson, USA
- Falcon® 5 ml Round-Bottom-Tubes Becton-Dickinson, USA
- Falcon® 50 ml Tubes Becton-Dickinson, USA
- Neubauerzählkammer Superior, Marienfeld
- U-shape, 96-Well-Platte Greiner bio-one

2.4 Geräte

- Brutschrank: Heraeus Instruments Heraeus, Fellbach
- Eppendorfpipetten Eppendorf, Hamburg
- FACScan (fluoreszenz-activated cell sorter) Becton-Dickinson, Heidelberg
- Mikroskop: Laborlux S Leitz, Portugal
- Pipettierhilfe: pipetus® -akku Hirschmann Laborgeräte
- Sterilbank: Hera Safe Kendro Laboratory Products
- Sterilbank: Heraeus Lamin Air Kendro Laboratory Products
- Voretax: Heidolph Top-Mix 94323 Bioblock Scientific
- Wasserbad: Thermomix Bu B. Braun
- Zentrifuge: Biofuge 15 Heraeus Sepatech, Osterode
- Zentrifuge: Hettich Rotanta/AP Hettich Zentrifugen, Tuttlingen

2.5 Patienten und gesunde Probanden

Es wurden mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) von 10 Patienten mit Morbus Behçet vor und im Verlauf unter einer Therapie mit humanem rekombinantem Interferon- α 2a (hrIFN α) untersucht. Das mediane Alter der Patienten betrug 31 Jahre (Range: 25 - 39), die mediane Krankheitsdauer war 4 Jahre (Range: 1 - 7). Sieben der Patienten waren HLA-B51 positiv und alle erfüllten die Kriterien der International Study Group (International Study Group, 1990). Alle Patienten hatten bereits aktiven okulären MB (posterior uveitis score > 1 (BenEzra et al., 1991)), d.h. es war bereits eine Augenbeteiligung in Form einer Vaskulitis der Retina oder des N. opticus beziehungsweise einer Uveitis eingetreten. Bei den 10 Patienten wurde vor Beginn der Therapie mit IFN α 2a anhand des Morbus Behçet Index (bestehend aus Menge der oralen Ulzera, Arthritis und anderen Zeichen einer aktiven Vaskulitis) eine Krankheitsaktivität von 15 gemessen, die in Woche 12 der Therapie auf 6 abfiel. Der Median der okulären Krankheitsaktivität (gemessen durch den posterior uveitis score) war 3, beziehungsweise 1,5 auf dem anderen Auge und reduzierte sich auf 0 in beiden Augen nach 12 Wochen Behandlung mit IFN α 2a. Die erste Blutabnahme erfolgte vor Therapie mit hrIFN α 2a, die zweite 4 und die dritte 12 Wochen nach Beginn der Immunmodulation. Zum Zeitpunkt der Blutentnahme nach Woche 4 bestand die mediane Interferon- α 2a Therapie aus einer subkutanen Gabe von 6 MioE/d zur Nacht, nach Woche 12 betrug die mediane Dosis 4,5 MioE/d. Vier Patienten erhielten zusätzlich eine geringe orale Dosis Prednisolon zwischen 5-10 mg. Vier Patienten wurden vor Beginn der IFN α 2a Therapie mit einer höheren Dosis Prednisolon (20-75 mg/d) behandelt, die zügig auf 10 mg/d reduziert wurde. Vor Woche 0 erhielten zwei Patienten Cyclosporin A (CSA), ein Patient erhielt Azathioprin (AZA) und ein weiterer Patient die Kombination von CSA und AZA. Die Einnahme von CSA und AZA wurde am Tag vor Beginn der Therapie mit IFN α 2a gestoppt. Ebenso wurde die Therapie eines Patienten mit Cholchizin beendet.

Es gab zwei unterschiedliche Kontrollgruppen. Als erste Kontrollgruppe dienten 10 Patienten mit HLA-B27-assoziierten Spond- und Oligoarthritis. Die Diagnose wurde anhand der modifizierten New York Kriterien gestellt (Van der Linden et al., 1984). In dieser Gruppe betrug das mediane Alter 40,5 Jahre (Range: 27 - 69), die mediane Krankheitsdauer 12 Jahre (Range: 1 - 15). Alle bis auf drei Patienten wurden ausschließlich mit nicht-steroidalen Antirheumatika behandelt (zwei Patienten erhielten Sulfasalazin, ein Patient erhielt ein niedrig dosiertes Steroid). Zum Zeitpunkt der Blutentnahme wurde die Krankheitsaktivität anhand der visuellen Analogskala (VAS), des C-reaktiven Proteins (CRP) und der Blutsenkungsgeschwindigkeit bestimmt. Der Median der VAS war 4, das mediane CRP betrug 0,62 mg/dl (Range: 0,2 - 2,66 mg/dl) und die mediane BSG war 8 mm in der ersten Stunde (Range 4 - 41 mm).

Die zweite Kontrollgruppe bestand aus 10 gesunden Probanden, deren medianes Alter 27,5 Jahre war (Range: 24 - 33). Die Blutentnahmen erfolgten nach einer ausführlichen Information und schriftlichen Einverständnis der Patienten beziehungsweise Probanden. Von der Ethikkommission der Universität Tübingen wurde das Einverständnis für die IFN α 2a Therapie der Patienten mit okulärem MB und für die Entnahme der Blutproben erteilt.

3 Methoden

3.1 Lymphozytenisolierung

Die Isolierung der peripheren mononukleären Zellen des Blutes erfolgte unter der Sterilbank. Heparinisiertes Blut (60 ml) wurde auf drei 50 ml Röhren verteilt und mit RPMI 1640 auf 50 ml aufgefüllt und somit verdünnt. In sechs weiteren 50 ml Röhren wurde 15 ml Ficoll-Trennlösung (Dichte 1.077) vorgelegt und sehr vorsichtig mit 25 ml verdünntem Blut unter Zuhilfenahme einer sterilen Pipette überschichtet. Es schloss sich eine ungebremste Zentrifugation über 20 Minuten bei 2000 U/min und 20 °C an. Da Erythrozyten, polymorphkernige Leukozyten und Thrombozyten eine größere Dichte hatten, wurden sie durch die Ficoll-Trennlösung hindurchzentrifugiert, während mononukleäre Zellen darüber eine Schicht bildeten. Der so in der Interphase (zwischen Ficoll-Trennlösung und Plasma/RPMI-Gemisch) entstandene Zellring wurde mit einer sterilen Pipette abgenommen und jeweils in ein 15 ml Röhren überführt und mit RPMI 1640 auf 15 ml aufgefüllt. Eine erneute Zentrifugation über 10 Minuten bei 2000 U/min, 20 °C und ungebremster Zentrifuge erfolgte. Nach Abkippen des Überstandes wurden die Zellen resuspendiert und erneut mit RPMI 1640 gewaschen. In der nun erhaltenen Zellsuspension befanden sich mononukleäre Zellen, wohingegen Erythrozyten, Thrombozyten, Granulozyten sowie Plasma und Ficoll-Trennlösung weitgehend entfernt waren.

3.2 Einfrieren und Auftauen der Lymphozyten

3.2.1 Einfrieren

Während des letzten Waschvorganges der Lymphozytenisolation wurden sechs 1,8 ml Kryo-Röhren des bereits aliquotierten DMSO-Einfriermediums aufgetaut. Die Zellen wurden in DMSO suspendiert und auf sechs Einfriertubes verteilt. Das Einfrieren ging schnell vonstatten, da das DMSO toxisch auf die Zellen wirkt. Die Zellen wurden zunächst bei -70 °C gelagert und innerhalb von zwei Wochen in flüssigen Stickstoff (-196 °C) überführt. Im Durchschnitt befanden sich 8×10^6 Zellen in jedem Röhren.

3.2.2 Auftauen

Als Auftaumedium wurde FCS mit RPMI 1640 im Verhältnis 1:10 gemischt und 1,5 ml Refobacin[®] pro 500 ml Auftaulösung zugegeben. Die Kryo-Röhrchen wurden direkt vom flüssigen Stickstoff in ein 37 °C warmes Wasserbad transferiert. Sobald die Zellsuspension aufgetaut war, wurde diese in ein 15 ml Röhrchen gekippt und mit Auftaumedium aufgefüllt. Es schloss sich eine gebremste Zentrifugation über 10 Minuten bei 1400 U/min und 4 °C an. Nach Abkippen des Überstandes erfolgte eine Resuspension in 2800 ml RPMI 1640 + 10% FCS + Refobacin[®].

3.3 Immunfluoreszenzfärbung

3.3.1 In vitro Stimulation der T-Zellen

Zunächst wurden die Stimulantien Phorbol Myristat Acetat (PMA) und Ionomycin und das zur Verhinderung der Zytokinfreisetzung dienende Brefeldin A, folgendermaßen mit der RPMI-FCS-Refobacin-Lösung verdünnt:

Tabelle 3. Verdünnungsschema der Stimulantien und Brefeldin

	RPMI-Medium	Verdünnungsverhältnis
1 µl PMA	19 µl	1:20
2 µl Ionomycin	18 µl	1:10
6 µl Brefeldin	54 µl	1:10

Nachdem die Zellzahl mit Hilfe einer Trypanblaufärbung in der Neubauerzählkammer unter dem Mikroskop bestimmt worden war, wurden pro Ansatz 12 wells einer 96-well-round-bottom-Mikrotiterplatte mit jeweils 5×10^5 - 1×10^6 Zellen versehen. Außer die wells, die später als unstimulierte Negativkontrollen dienen sollten, erhielten alle jeweils 2 µl verdünntes PMA und Ionomycin (I). Jedem well wurden 4 µl verdünntes Brefeldin (B) zugefügt. Um

die optimale Stimulanz für IL 4 herauszufinden, wurde die Stimulation durch 1%iges PHA mit der Stimulation durch die Kombination von PMA mit Ionomycin verglichen. Wie schon durch andere Arbeitsgruppen beschrieben, erwies sich PHA als effektiver bei der Stimulation der IL 4 Produktion (Freysdottir et al., 1999), Aufgründessen wurde anstatt PMA und Ionomycin unverdünntes PHA (2 µl) als Stimulanz in das well zugegeben, das mit dem intrazellulären IL 4-AK gefärbt werden sollte. Anschließend wurde der Ansatz 48 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Stimulation über 48 h erfolgte in der Annahme, eine deutlichere Th2-Antwort zu erhalten. Um eine Verfälschung der Ergebnisse durch diese lange Stimulationszeit auszuschließen, wurde in einer Versuchsreihe die intrazelluläre Zytokinproduktion von PBMC's zweier gesunder Probanden gemessen. Die Zellen wurden in jeweils zweistündigen Abständen bis zu einer Inkubationszeit von 48 h untersucht. Es zeigte sich, dass die Negativkontrollen stets negativ blieben und somit kein verfälschtes Ergebnis durch die längere Stimulationszeit zu erwarten war.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	PMA, I, B		PHA, B						
B									
C	PMA, I, B		B		B		B		B
D									
E	PMA, I, B								
F									
G	PMA, I, B								

Abbildung 1. 96-Loch-Platte – schematisch dargestellt

3.3.2 Oberflächen- und Intrazelluläre Zytokinfärbung

Die Immunfluoreszenz ist eine Methode, mit der zelluläre Antigene mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern nachgewiesen werden können. Bei der direkten Immunfluoreszenz, die hier zur Anwendung kam, werden spezifische monoklonale Antikörper (moAk) eingesetzt, an die ein Fluoreszenzfarbstoff kovalent gebunden ist. Die Zellen in den wells 1A und 1C wurden mit moAk

gegen IgG als Isotypenkontrolle markiert, die mit folgenden Farbstoffen konjugiert waren. 1A: IgG1-Fluoreszeinisothiozyanat (FITC), IgG1-Phycoerythrin (PE), IgG1-Peridin Chlorophyll (PerCP), IgG1-Allophycocyanin (APC). 1C: IgG1- FITC, IgG2a-PE, IgG1-PerCP, IgG1-APC. Der Zellsuspension in 1E und 1G wurden monoklonale Oberflächenantikörper wie folgt zugegeben: 1E: CD8-FITC, CD4-PE, CD3-PerCP; 1G: CD8-FITC, CD4-APC, CD3-PerCP (siehe Abbildung 1). Mit diesen Proben erfolgte die Kompensation und Feineinstellung am Durchflusszytometer.

Um die Zytokinproduktion Subpopulationen zuordnen zu können, wurde in den restlichen wells eine Oberflächenmarkierung gegen CD8-FITC, CD4-APC, CD3-PerCP vorgenommen. Die Färbung fand unter der dunklen Sterilbank statt, um eine vorzeitige Lichtemission der Farbstoffe zu verhindern. Von den moAk, die mit den Farbstoffen FITC, PE und PerCP konjugiert waren, wurden 10 µl, von den APC-konjugierten Antikörpern 5 µl zu den Zellen pipettiert. Die Mikrotiterplatte mit dem Ansatz wurde in Alufolie verpackt und 30 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation von 1400 U/min, bei 4 °C über 5 min. Der Überstand wurde vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und das nach der Zentrifugation sichtbare Zellpellet am abgerundeten Boden der Mikrotiterplatte mit 100 µl Formalin (10%ig) resuspendiert. Die Formalinfixation dauerte bei Raumtemperatur 15 min. Danach wurden die wells mit 100 µl Zellkulturmedium aufgefüllt. Ein Waschvorgang mit Zentrifugation und Abnehmen des Überstandes schloss sich an. Um die Zellen zu permeabilisieren und somit durchlässig für die moAk gegen die intrazellulären Zytokine IFN γ , TNF α , IL 2 und IL 4 zu machen, wurde Saponin zusammen mit den PE-konjugierten intrazellulären moAk zugegeben. 0,25 g Saponin wurde in 45 ml PBS und 5 ml 10%igem BSA gelöst. Von den PE-konjugierten moAks gegen IFN γ und IL 4 wurde den Zellen 1 µl hinzugefügt, außerdem zusätzlich 49 µl Saponin. Von den PE-konjugierten moAk gegen TNF α und IL 2, die in jeweils 40 µl Saponin gelöst waren, wurden 10 µl in die wells pipettiert (siehe Abbildung 2).

Eine Inkubation von 30 min bei 4 °C folgte.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	PMA, I, B, S, IgG1 (4 Farben)		PMA, I, B, S, CD3, CD4, CD8, IFN γ		PMA, I, B, S, CD3, CD4, CD8, IL2		PMA, I, B, S, CD3, CD4, CD8, TNF α		PHA, B, S, CD3, CD4, CD8, IL4
B									
C	PMA, I, B, S, IgG2a, IgG1 (3 Farben)		B, S, CD3, CD4, CD8, IFN γ		B, S, CD3, CD4, CD8, IL2		B, S, CD3, CD4, CD8, TNF α		B, S, CD3, CD4, CD8, IL4
D		B : Brefeldin I : Ionomycin IFN: Interferon IL: Interleukin PMA: Phorbol Myristat Acetat S: Saponin TNF: Tumornekrosefaktor							
E	PMA, I, B, S, CD3, CD4, CD8								
F									
G	PMA, I, B, S, CD3, CD4, CD8								

Abbildung 2. 96-well-Mikrotiterplatte – schematisch dargestellt

Nach der Inkubation wurden die wells mit 150 μ l Saponinlösung aufgefüllt, zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Die nun markierten Zellen wurden in 200 μ l PBS resuspendiert, in Falcon[®] 5 ml Round-Bottom-Tubes überführt und bis zur FACS-Analyse auf Eis gestellt.

3.4 FACS-Analyse

3.4.1 Aufbau und Arbeitsprinzip des FACScan (Fa. Becton-Dickinson)

Lymphozyten zeigen ein scheinbar einheitliches Aussehen. Alle Zellen sind klein und rund, sie besitzen einen verdichteten Kern und wenig Zytoplasma. Dennoch umfassen diese Zellen zahlreiche funktionelle Subpopulationen, die sich voneinander unter anderem durch die Expression ihrer jeweiligen Zelloberflächenproteine und durch die Produktion verschiedener Zytokine unterscheiden. Diese können durch spezifische, an fluoreszierende Farbstoffe gekoppelte Antikörper nachgewiesen werden.

Das Prinzip der Durchflusszytometrie besteht aus simultaner Messung von Fluoreszenz- und Streulichtsignalen einzelner Zellen. Zellgröße, Granularität, sowie verschiedene Fluoreszenzintensitäten können für mehrere tausend Zellen in weniger als einer Minute ermittelt werden.

Die sich im FACS-Röhrchen befindende Zellsuspension wird über eine Stahlkapillare durch Überdruck in die Meßküvette eingeführt. Die Zellen passieren dabei, von einer Flüssigkeitshülle umgeben, einzeln über eine Kapillare den Analysepunkt, wo sie den Lichtstrahl eines Argon-Lasers (488 nm) kreuzen. Dort werden folgende Parameter analysiert:

1. Lichtstreuung der Zellen

Die Zellen streuen das einfallende Licht vor allem in der Vorwärtsrichtung, d.h. entlang der Achse des Lichtstrahls. Die Intensität des hierbei entstehenden Vorwärtsstreulichts („forward light scatter“, FSC) ist hauptsächlich ein Maß für die Zellgröße. Das im rechten Winkel zum Laserstrahl gestreute Rechtwinkelstreulicht („side scatter“, SSC) korreliert vor allem mit der Granularität und der Dichte der Zellen.

2. Fluoreszenz der Zellen

Die Zellen, die mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern besetzt sind, absorbieren einfallendes Laserlicht. Durch diese Energie werden Elektronen auf ein höheres Energieniveau gehoben. Unter Emission von längerwelligem Licht kehren die Elektronen zu ihrem Grundzustand zurück. Dieser Strahlungsübergang wird als Fluoreszenz bezeichnet. Der Lichtbereich, über den eine fluoreszierende Verbindung angeregt werden kann, wird als Absorptionsspektrum bezeichnet. Da beim Absorptionsübergang mehr Energie aufgenommen wurde, als beim Fluoreszenzübergang emittiert wird, ist das emittierte Licht langwelliger als das Anregungslicht und bildet das Emissionsspektrum. Bei der Mehrfarbenfluoreszenzmessung muss die Anregungswellenlänge sorgfältig gewählt werden, damit die Fluoreszenzen gut voneinander unterscheidbar sind. Die Absorptionsspektren verschiedener Farbstoffe sollen sich überlappen, um zu ermöglichen, mehrere Farbstoffe gleichzeitig anzuregen. Entscheidend ist, dass sich die Gipfel der Emissionsmaxima deutlich voneinander unterscheiden und eine getrennte Messung der einzelnen Farbstoffe mit verschiedenen Detektoren möglich ist.

Vorwärtsstreulicht, Rechtwinkelstreulicht und Fluoreszenz werden von einem elektronischen Detektorsystem aufgenommen. Werden mehrere Fluoreszenzfarbstoffe für Mehrfachmarkierungen eingesetzt, so trennt ein optischer Filter die Emission in ihre Komponenten auf und führt sie verschiedenen Detektoren zu. Ein FACScan besitzt zwei Arten von Detektoren: eine Photodiode und vier Photoröhren. Diese wandeln die optischen Signale in proportional hohe elektronische Signale um. Sie werden linear (Vorwärts- und Rechtwinkelstreulicht) oder logarithmisch (Immunfluoreszenz) verstärkt und von einem Analog-Digital-Wandler in ein digitales, computergerechtes Signal umgewandelt. Mit Hilfe eines angeschlossenen Computersystems werden die Daten gespeichert und ausgewertet.

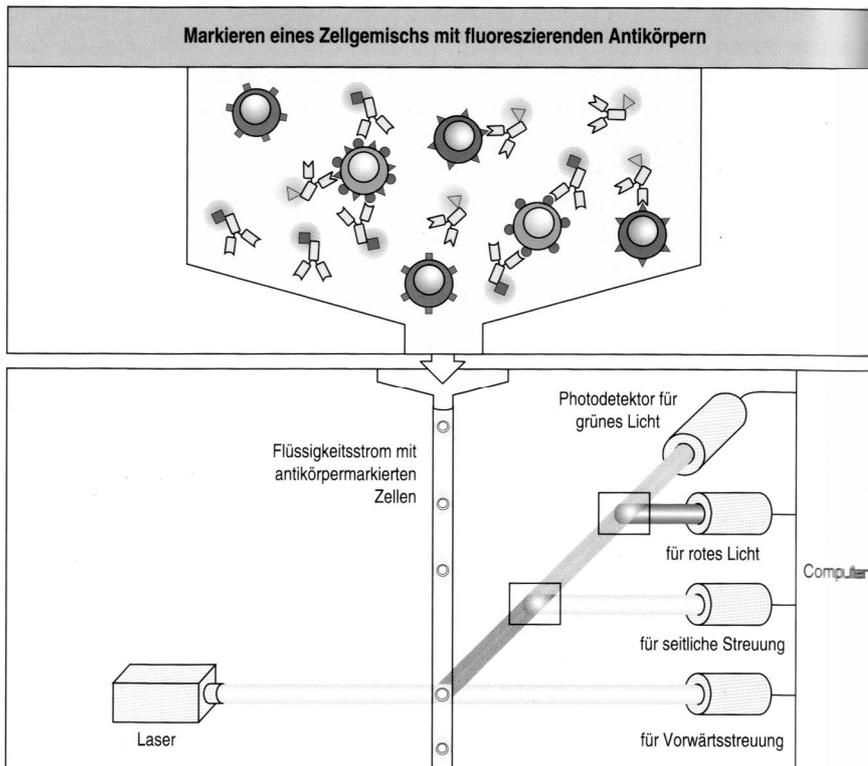


Abbildung 3. Aufbau eines Durchflußzytometers aus Janeway et al., 2002 (682)

3.4.2 Messung am FACScan und Datenauswertung

Mit dem FACScan können bis zu fünf Eigenschaften (zwei Lichtstreuungen und drei Fluoreszenzen) gleichzeitig gemessen werden. Die Zuschaltung eines zweiten Lasers ist notwendig zur Messung eines vierten Farbstoffes, in diesem Fall APC. Von jeder Probe wurden FSC, SSC und Fluoreszenz von 100 000 Zellen gemessen. FSC und SSC wurden linear, die Fluoreszenz logarithmisch gemessen. Als Negativkontrolle für die intrazelluläre Zytokinbestimmung dienten unstimulierte Zellen. Da die Stimulation durch PMA und Ionomycin die Oberflächenexpression von CD4 reduziert, wurden die CD4⁺ Zellen indirekt bestimmt, durch Subtraktion der CD8⁺ T-Zellen von den CD3⁺ T-Zellen (Rudwaleit et al., 2001b).

Die Daten wurden mit dem Programm Cell Quest ausgewertet. Um eine quantitative Auswertung zu erhalten, können zwei beliebige Parameter miteinander korreliert werden (Zweiparameterdarstellung, Dot-Plot). Die

Intensitätsachsen des Signalpaares werden gegeneinander aufgetragen. In das Achsenkreuz wird jeweils dort ein Punkt eingezeichnet, an der sich die Intensitätswerte der beiden Parameter einer gegebenen Zelle schneiden. Durch Vorgabe von Begrenzungen (Gating) kann man eine Zellpopulation mit bestimmten Eigenschaften für die Auswertung auswählen.

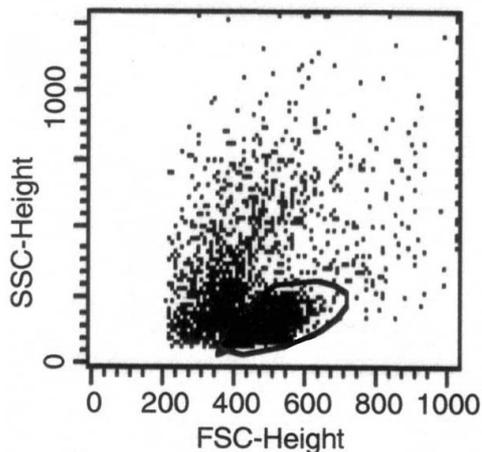


Abbildung 4. Gating der Lymphozytenpopulation in der Dot-plot-Darstellung

Die Abbildung 4 zeigt beispielhaft die korrelierte Darstellung von FSC (Größe) mit SSC (Granularität) einer Probe von peripheren mononukleären Blutzellen. Die Lymphozytensubpopulation lässt sich durch ihr eigenes charakteristisches Muster identifizieren und eingrenzen.

3.5 Statistik

Die Zielgrößen wurden als Anteile angegeben, stammen aber aus der Auszählung von Zellen. Daher liegt es nahe, dass die Standardabweichung proportional zur Quadratwurzel aus dem Mittelwert ist. Diese Annahme wurde verifiziert, indem eine Varianzanalyse (ANOVA) mit allen Daten und allen Faktoren sowie deren Wechselwirkungen dazu verwendet wurde, die Box-Cox-Transformation zu schätzen. Die wurzeltransformierten Daten wurden für jede Kombination von Zytokin und Leukozyt mit je einer ANOVA auf Unterschiede zwischen den gesunden Probanden, den SA-Patienten und den MB-Patienten vor der Behandlung sowie auf eine Veränderung im Verlauf der Behandlung mit IFN α geprüft. Bei letzterer ANOVA wurde noch der MB-Patient als zufälliger

Faktor berücksichtigt (außer in zwei Fällen, in denen die Schätzwerte der Varianzkomponenten negativ geworden wären, so dass Patient als fester Faktor verwendet wurde). Das Signifikanzniveau wurde mittels der Bonferroni-Holm-Prozedur innerhalb jeder Gruppe von 12 ANOVAS gleichen Typs adjustiert. In den Diagrammen, die die Daten darstellen, sind auch die als Mediane zu interpretierenden vorhergesagten Werte eingetragen, sowie die Quartile von deren Verteilung. Die statistischen Tests der medianen IL 4 Produktion war nur eingeschränkt beurteilbar, da nur 5 Proben pro Gruppe zur Verfügung standen.

4 Ergebnisse

4.1 Intrazelluläre Produktion von IL 2, IFN γ , TNF α und IL 4 bei Patienten mit M. Behçet im Vergleich zu Patienten mit Spondylitis ankylosans und gesunden Probanden

4.1.1 Produktion von IL 2 bei Patienten mit M. Behçet, Patienten mit Spondylitis ankylosans und gesunden Probanden

Die intrazelluläre IL 2 Produktion durch T-Lymphozyten von 10 Patienten mit MB vor Beginn der Therapie mit rhIFN α 2a wurde mit 10 Patienten, die an einer HLA-B27-positiven SA erkrankt waren und 10 gesunden Probanden verglichen. Nach einer Stimulation mit PMA und Ionomycin bestand ein erheblicher Unterschied sowohl zwischen den MB-Patienten und den gesunden Kontrollen, als auch zwischen den SA-Patienten und der gesunden Kontrollgruppe. Bei beiden Patientengruppen war die Produktion von IL 2 erniedrigt. Der Median der IL 2 produzierenden CD3 $^{+}$ -Zellen der gesunden Probanden betrug 12,35%, wohingegen die MB-Gruppe einen Median von 6,65% erzielte ($P = 0,02$). Die mediane IL 2 Produktion der CD3 $^{+}$ -Zellen der SA-Patienten betrug 5,75% ($P = 0,02$) (Abbildung 5a).

Bei der CD4 $^{+}$ -T-Lymphozytensubpopulation verhielt sich IL 2 ähnlich. Die mediane IL 2 Produktion der gesunden Probanden betrug 10,45%, bei den MB-Patienten war die Produktion mit 3,9% erniedrigt und bei den SA-Patienten zeigte sich mit 4,5% ebenfalls eine deutlich geringere IL 2 Produktion ($P = 0,007$) (Abbildung 5c).

Es gab keine Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen in der CD8 $^{+}$ /IL 2 Produktion (GK: 2,05%, MB: 1,85%, SA: 1,2%; $P = 0,77$) (Abbildung 5b).

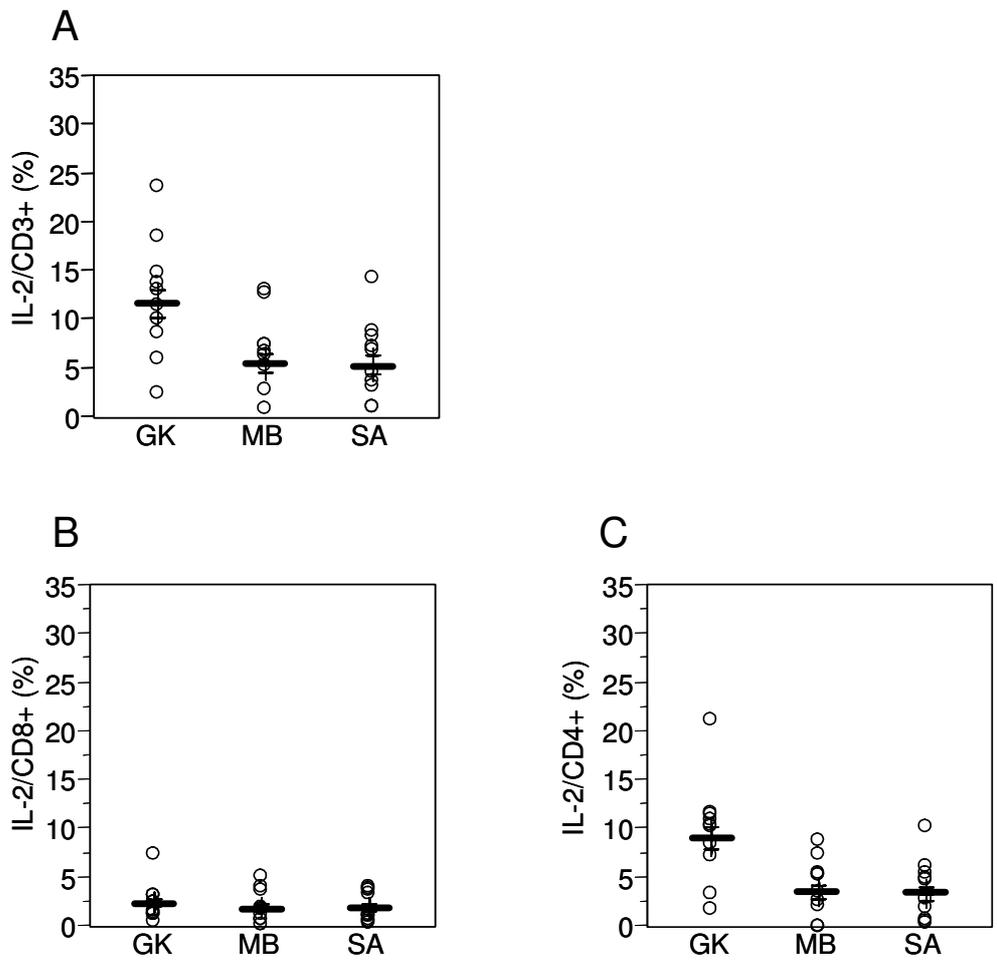


Abbildung 5. Prozentualer Anteil von Interleukin-2 (IL 2) positiven CD3+ (**A**), CD8+ (**B**) und CD4+ (**C**) T-Lymphozyten bei 10 gesunden Kontrollen (GK), 10 Patienten mit Morbus Behçet (MB) und 10 Patienten mit Spondylitis ankylosans (SA). Die Querbalken indizieren den Median.

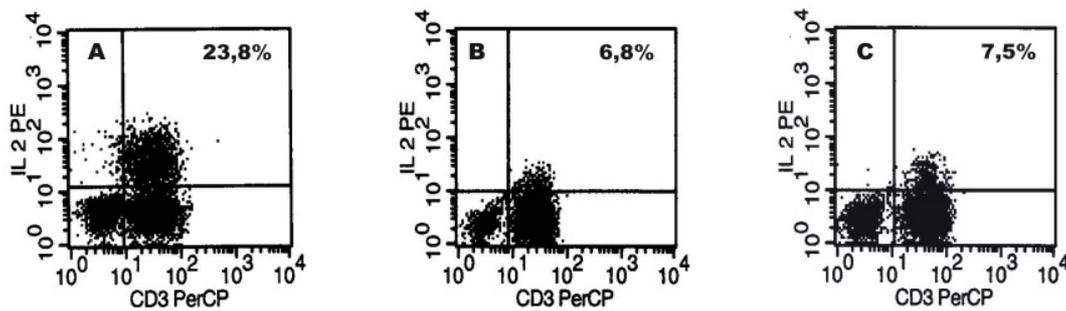


Abbildung 6. Punktwolkendarstellung (Dot-plot) einer durchflusszytometrischen Analyse von CD3+/IL 2+ Lymphozyten am repräsentativen Beispiel eines gesunden Probanden (**A**), eines Patienten mit Morbus Behçet (**B**) und eines Patienten mit Spondylitis ankylosans (**C**). Die intrazelluläre Produktion von IL 2 ist bei beiden Patienten im Vergleich zu der gesunden Kontrollperson deutlich eingeschränkt. Der Anteil der CD3+ Lymphozyten, die mit dem intrazellulären PE-konjugierten monoklonalen Antikörper gegen IL 2 markierbar waren sind in Prozent angegeben. PE = Phycoerythrin; FITC = Fluoreszeinisothiozyanat.

4.1.2 Produktion von IFN γ bei Patienten mit M. Behçet, Patienten mit Spondylitis ankylosans und gesunden Probanden

Um die intrazelluläre Produktion von IFN γ zu messen, wurden T-Lymphozyten gleichermaßen mit PMA und Ionomycin stimuliert. Die mediane IFN γ Produktion der MB-Patienten (22,3%) war in der CD3+ T-Zellpopulation erhöht im Vergleich zu Patienten mit SA (11,8%) und der gesunden Kontrollgruppe (10,65%; $P = 0,05$) (Abbildung 7a).

Die intrazellulär gemessenen medianen IFN γ Werte bei CD8+-Zellen ließen eine Tendenz zu einer Erhöhung bei MB-Patienten erkennen, die jedoch nicht signifikant war. (GK: 5,9%, MB: 10,45%, SA: 6,9%; $P = 0,11$) (Abbildung 7c).

Es gab keine Unterschiede der IFN γ Produktion in der CD4+ Population (GK = 5,2%; MB: 5,6%, SA = 4,6%; $P = 0,41$) (Abbildung 7b).

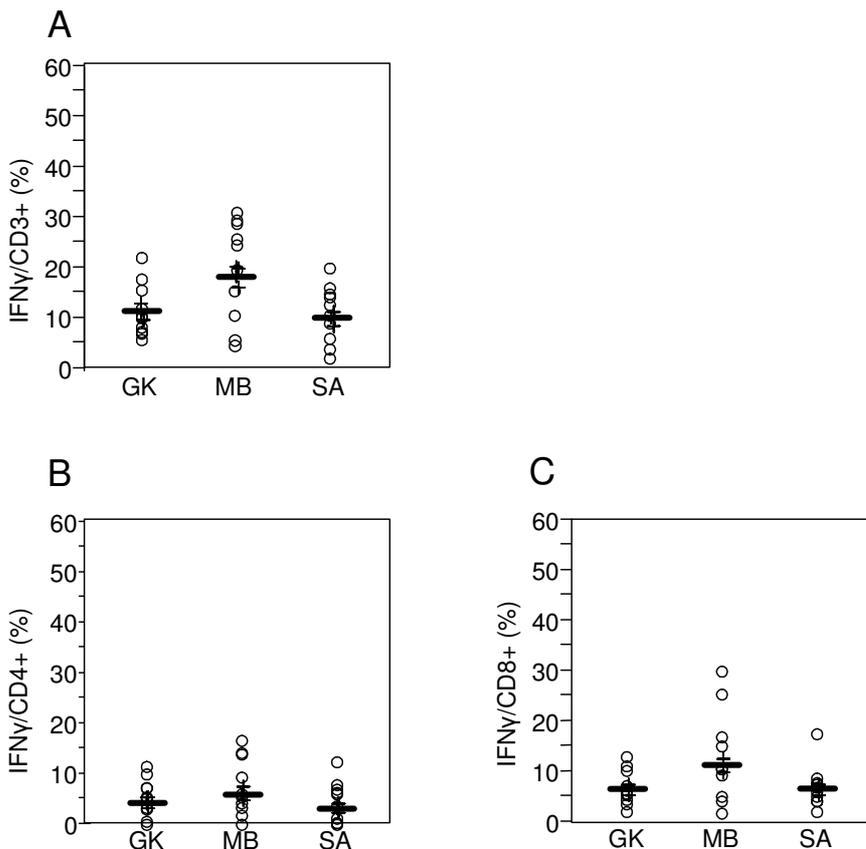


Abbildung 7. Prozentualer Anteil von Interferon- γ (IFN γ) positiven CD3+ (**A**), CD4+ (**B**) und CD8+ (**C**) T-Lymphozyten bei 10 gesunden Kontrollen (GK), 10 Patienten mit Morbus Behçet (MB) und 10 Patienten mit Spondylitis ankylosans (SA). Die Querbalken indizieren den Median.

4.1.3 Produktion von TNF α bei Patienten mit M. Behçet, Patienten mit Spondylitis ankylosans und gesunden Probanden

Es gab keine signifikanten Unterschiede in der intrazellulären TNF α Produktion der CD3+ T-Lymphozyten zwischen den Gruppen. Die intrazelluläre TNF α Produktion durch CD3+-T-Zellen betrug bei der gesunden Kontrollgruppe im Median 14,85%, bei den MB-Patienten 22% und bei den Patienten mit SA 13,3% (P = 0,41; Abbildung 8a).

Bei der CD4+ Population waren ebenfalls keine Unterschiede bei der intrazellulären Produktion von TNF α feststellbar. Die mediane TNF α Produktion

der gesunden Probanden betrug 11,25%, die der MB-Patienten 11,86% und die der SA-Patienten 7,1% ($P = 0,87$, Abbildung 8b).

Bei den MB-Patienten zeichnete sich eine erhöhte Tendenz der medianen TNF α Produktion durch CD8+ T-Zellen ab (GK: 4,25%, MB: 10,45%, SA: 6,3%; $P = 0,18$) (Abbildung 8c).

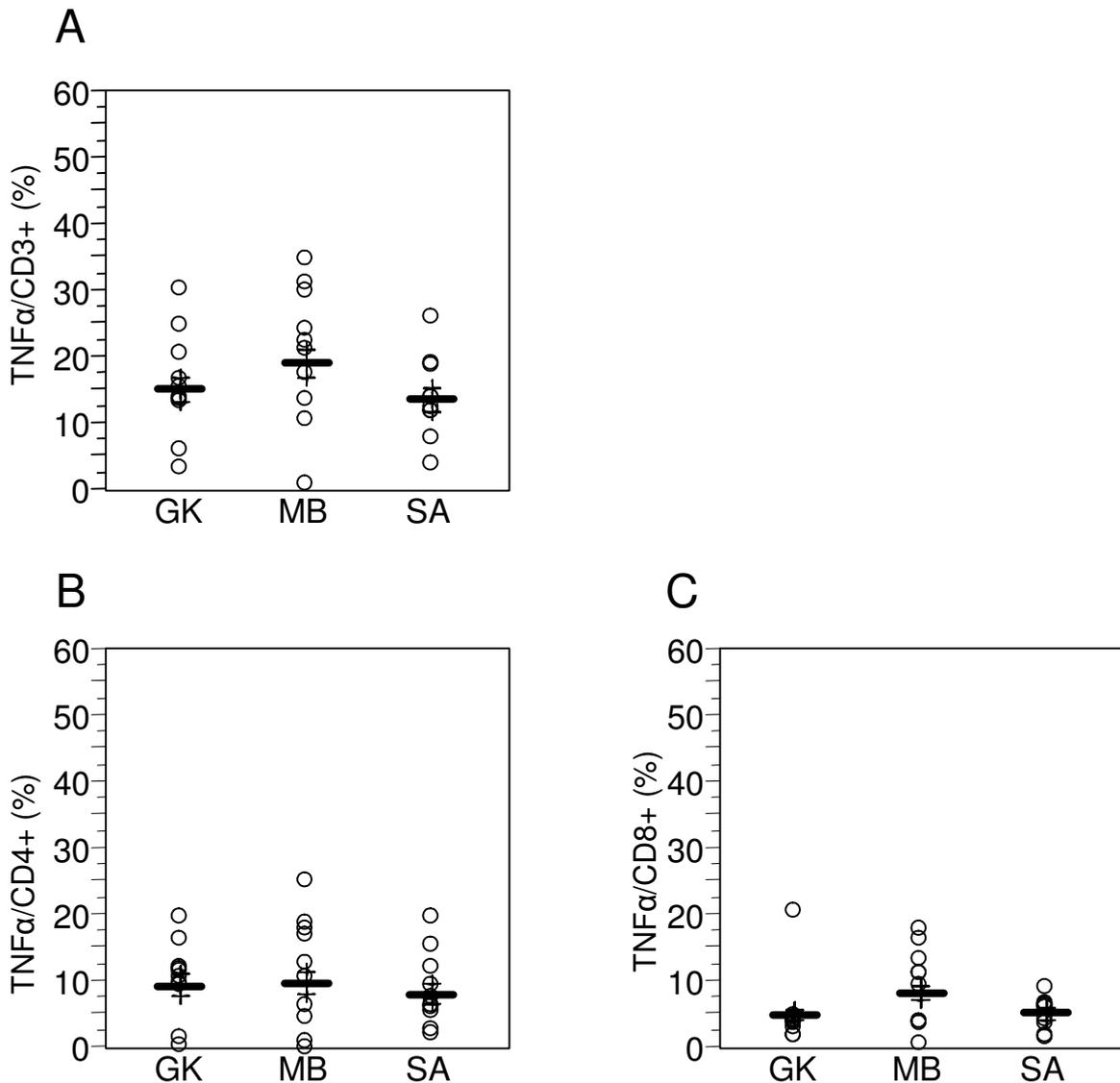


Abbildung 8. Prozentualer Anteil von Tumornekrosefaktor- α (TNF α) positiven CD3+ (A), CD4+ (B) und CD8+ (C) T-Lymphozyten bei 10 gesunden Kontrollen (GK), 10 Patienten mit Morbus Behçet (MB) und 10 Patienten mit Spondylitis ankylosans (SA). Die Querbalken indizieren den Median.

4.1.4 Produktion von IL 4 bei Patienten mit M. Behçet, Patienten mit Spondylitis ankylosans und gesunden Probanden

Mit PHA stimulierte T-Lymphozyten von jeweils fünf Patienten wurden auf die intrazelluläre Produktion von IL 4 untersucht. Es gab keine statistischen Unterschiede zwischen den Gruppen bei den einzelnen Lymphozytensubpopulationen. Die intrazelluläre IL 4 Produktion durch CD3+-T-Zellen betrug bei der gesunden Kontrollgruppe im Median 6,75%, bei den MB-Patienten 1,86% und bei den Patienten mit SA 1,3% (P = 0,13; Abbildung 9a).

Bei der CD4+ Population waren ebenfalls keine Unterschiede bei der intrazellulären Produktion von IL 4 feststellbar. Die mediane IL 4 Produktion der gesunden Probanden betrug 0,65%, die der MB-Patienten 11,86% und die der SA-Patienten 7,1% (P = 0,87, Abbildung 9b).

Es gab keine Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen in der CD8+/IL 4 Produktion (GK: 0,65%, MB: 0,4%, SA: 0,67%; P = 0,35) (Abbildung 9c).

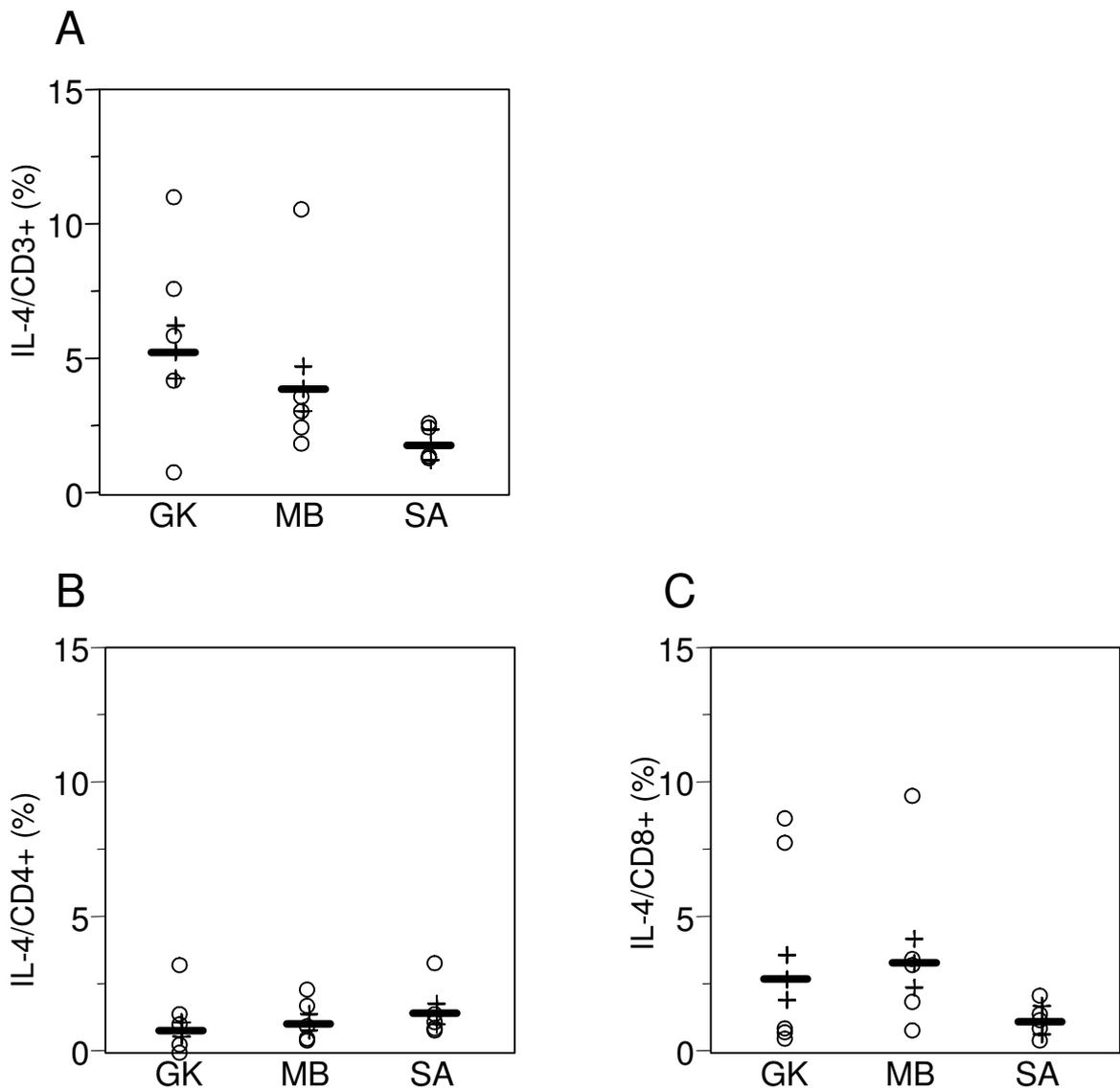


Abbildung 9. Prozentualer Anteil von Interleukin-4 (IL 4) positiven CD3+ (**A**), CD4+ (**B**) und CD8+ (**C**) T-Lymphozyten bei fünf gesunden Kontrollen (GK), fünf Patienten mit Morbus Behçet (MB) und fünf Patienten mit Spondylitis ankylosans (SA). Die Querbalken indizieren den Median.

Tabelle 4. Intrazelluläre Produktion von Interleukin-2 (IL 2), Interferon- γ (IFN γ), Tumornekrosefaktor- α (TNF α) und Interleukin-4 (IL 4) durch CD3+, CD8+ und CD4+ T-Zellen von zehn* gesunden Kontrollen (GK), zehn* Patienten mit Morbus Behçet (MB) und zehn* Patienten mit Spondylitis ankylosans (SA). Dargestellt sind die Mediane und in Klammern die Minimum- und Maximumwerte.

* bzw. fünf bei IL 4

		GK	MB	SA
IL 2	CD3	12,35 (2,5 – 23,8)	6,65 (0,3 – 13,1)	5,75 (1,1 – 14,4)
	CD8	2,05 (0,7 – 7,6)	1,85 (0,2 – 5,3)	1,2 (0,5 – 4,2)
	CD4	10,45 (1,8 – 21,3)	3,9 (0,1 – 8,9)	4,5 (0,5 – 10,4)
IFNγ	CD3	10,65 (6,2 – 22,4)	22,3 (4,9 – 31,1)	11,8 (2,2 – 20,1)
	CD8	5,9 (2,1 – 13)	10,45 (1,6 – 29,9)	6,9 (2,1 – 17,3)
	CD4	5,2 (0 – 11,3)	5,6 (0 – 16,5)	4,6 (0 – 12,4)
TNFα	CD3	14,85 (3,6 – 30,6)	22 (1 – 34,9)	13,3 (4,2 – 26,3)
	CD8	4,25 (1,9 – 20,7)	10,45 (0,7 – 18,1)	6,3 (1,6 – 9,2)
	CD4	11,25 (0,5 – 20)	11,86 (0,3 – 25,4)	7,1 (2,2 – 19,8)
IL 4*	CD3	6,75 (0,15 – 11)	1,86 (0,16 – 10,55)	1,3 (0,3 – 10,2)
	CD8	4,35 (0,09 – 8,7)	0,87 (0,08 – 9,53)	0,4 (0,2 – 5,7)
	CD4	0,65 (0 – 3,2)	0,69 (0,15 – 2,34)	0,9 (0,3 – 5,2)

4.2 Intrazelluläre Produktion von IL 2, IFN γ , TNF α und IL 4 bei Patienten mit M. Behçet unter einer Therapie mit humanem rekombinantem IFN α 2a

PBMC's von 10 Patienten mit M. Behçet, die eine Therapie mit IFN α erhielten, wurden auf die intrazelluläre Produktion von IL 2, IFN γ , TNF α und IL 4 zu drei verschiedenen Zeitpunkten untersucht. Die erste Untersuchung mittels Durchflusszytometrie fand vor Beginn der Therapie statt. Die Untersuchungen zum Therapieverlauf erfolgten in Woche 4 und 12 nach Therapiebeginn.

4.2.1 Produktion von IL 2 bei Patienten mit M. Behçet unter einer Therapie mit IFN α

Nach 4 Wochen Therapie mit IFN α konnte bei den CD3+-T-Lymphozyten der MB-Patienten ein hochsignifikanter Anstieg des intrazellulär produzierten IL 2 festgestellt werden. Das vor Beginn der Therapie erniedrigte IL 2 (siehe 4.1.1) stieg nach Woche 4 im Median auf 16,2% vs. 6,65% vor Therapie ($P < 0,00001$). In Woche 12 nach einer Dosisreduktion von IFN α war die mediane IL 2 Produktion noch immer erhöht messbar und betrug 14% (Abbildung 10a).

Die IL 2 Produktion der CD4+ T-Zellen erhöhte sich ebenfalls signifikant unter der Therapie mit IFN α . Vor Therapiebeginn betrug die mediane Produktion 4,5%, zu Woche 4 11,2% und zu Woche 12 10,4% ($P < 0,00001$) (Abbildung 10b).

Die mediane intrazelluläre Produktion von IL 2 unter einer Therapie mit IFN α bei CD8+-T-Zellen stieg signifikant von 1,85% vor Therapie auf 2,75% nach Woche 4 und 3,45% nach Woche 12 ($P = 0,0002$) (Abbildung 10c).

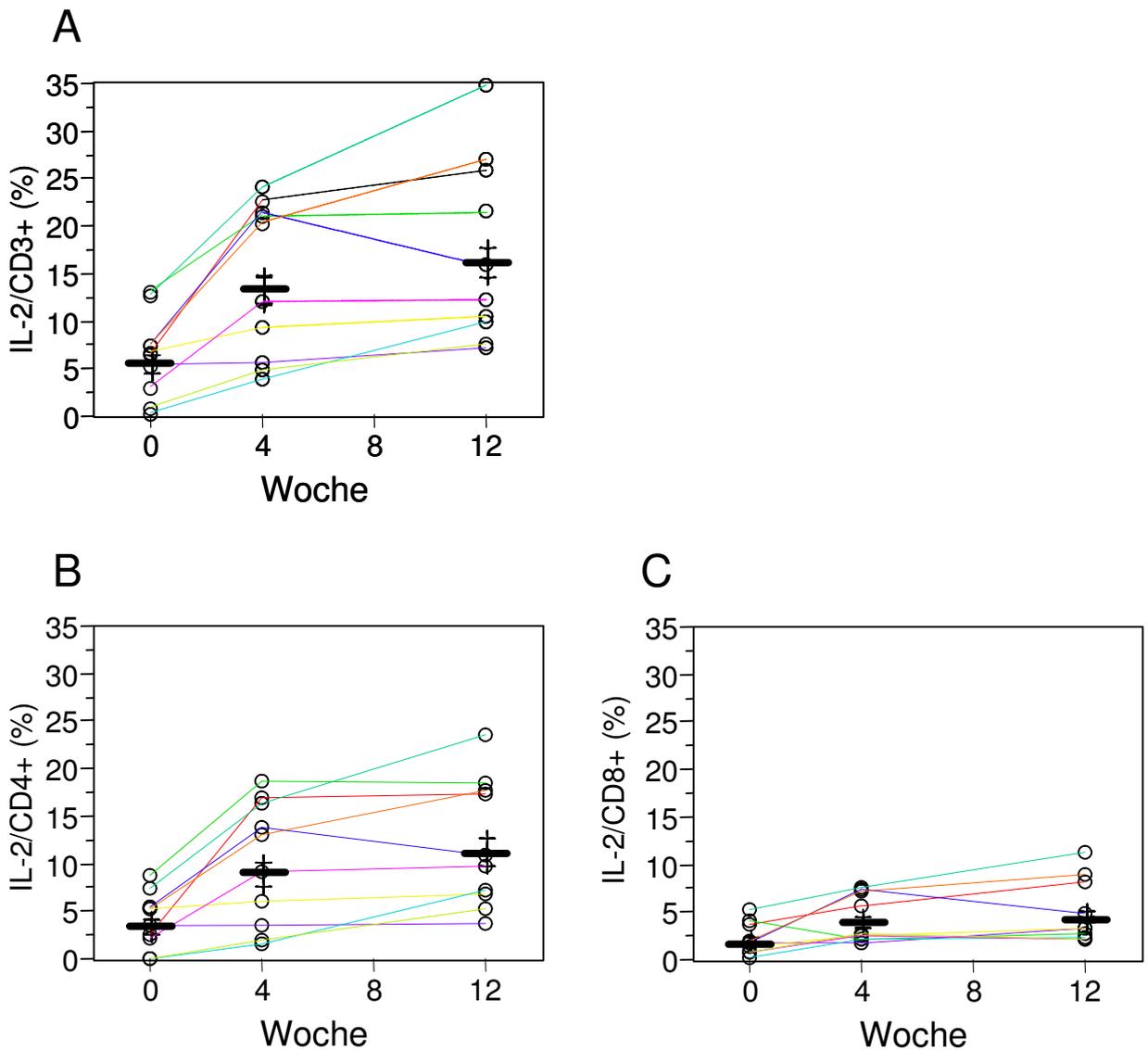


Abbildung 10. Prozentualer Anteil von Interleukin-2 (IL 2) positiven CD3+ (**A**), CD4+ (**B**) und CD8+ (**C**) T-Lymphozyten bei Patienten mit Morbus Behçet im Verlauf unter einer Therapie mit Interferon- α 2a (IFN α). Die Querbalken indizieren den Median.

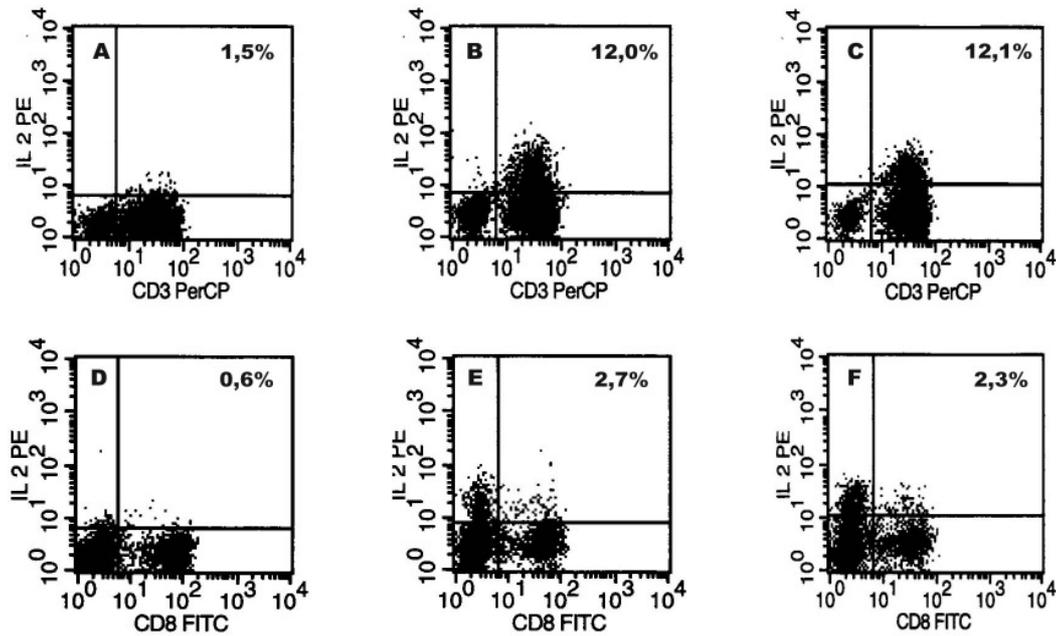


Abbildung 6. Produktion von Interleukin-2 (IL 2) am repräsentativen Beispiel eines Patienten mit Morbus Behçet unter einer Therapie mit Interferon- α 2a. Das Punktwolkendiagramm zeigt einen deutlichen Anstieg der IL 2 Produktion durch CD3+ und CD8+ Lymphozyten von Woche 0 vor Therapiebeginn (**A** und **D**) auf Woche 4 nach Therapiestart (**B** und **E**). Die IL 2 Produktion bleibt in Woche 12 unter der IFN α Therapie erhöht messbar (**C** und **F**). Der Anteil der CD3+ bzw. CD8+ Lymphozyten, die mit dem intrazellulären PE-konjugierten monoklonalen Antikörper gegen IL 2 markierbar waren sind in Prozent angegeben. PE = Phycoerythrin; FITC = Fluoreszeinisothiozyanat.

4.2.2 Produktion von IFN γ bei Patienten mit M. Behçet unter einer Therapie mit IFN α

Es gab keine signifikanten Unterschiede der intrazellulären IFN γ Produktion der CD3+ Zellen unter einer Therapie mit IFN α . Die mediane Produktion vor Therapiebeginn betrug 22,3%, nach Woche 4 26,8% und nach Woche 12 24,85% (P = 0,21; Abbildung 11a).

4 Wochen nach Beginn der IFN α Therapie wurde bei dem von CD4-Zellen produzierten IFN γ der MB-Patienten ein signifikanter Anstieg der Mediane festgestellt (5,6% vor Therapie vs. 12,2% in Woche 4; P = 0,0018), der auch noch in Woche 12 anhielt (12,6%) (Abbildung 11b).

Bei den CD8-positiven T-Zellen konnte unter der IFN α Therapie kein Unterschied vermerkt werden (mediane IFN γ Produktion vor Therapie: 10,45%, in Woche 4: 11,65%, in Woche 12: 11,65%; P = 0,88) (Abbildung 11c).

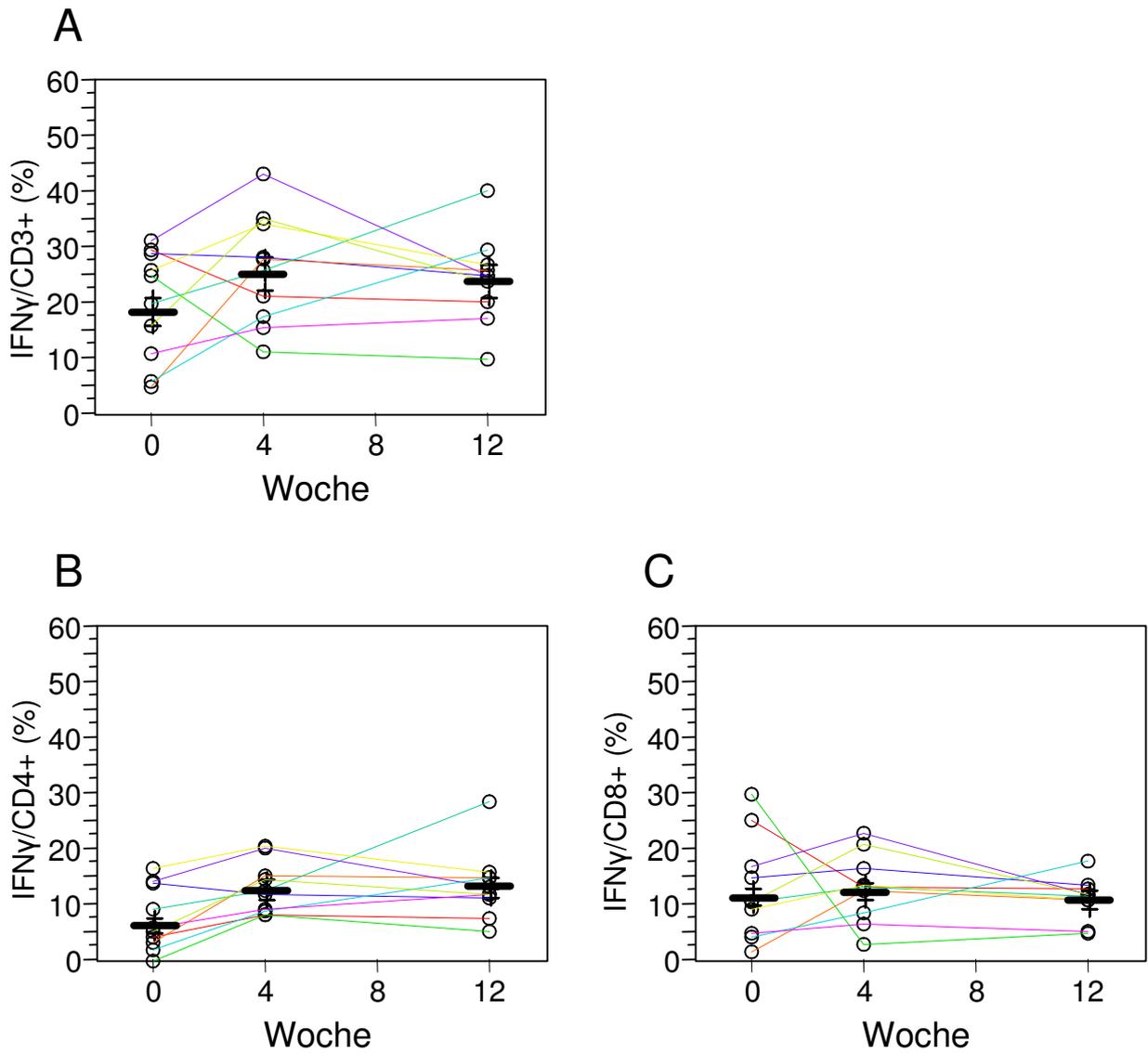


Abbildung 11. Prozentualer Anteil von Interferon- γ (IFN γ) positiven CD3+ (**A**), CD4+ (**B**) und CD8+ (**C**) T-Lymphozyten bei Patienten mit Morbus Behçet im Verlauf unter einer Therapie mit Interferon- α 2a (IFN α). Die Querbalken indizieren den Median.

4.2.2 Produktion von TNF α bei Patienten mit M. Behçet unter einer Therapie mit IFN α

In der CD3+-T-Zellpopulation konnte kein Unterschied in der medianen TNF α Produktion vor und während der IFN α Therapie festgestellt werden. Die CD3+-Zellen produzierten vor Therapie 22%, nach 4 Wochen 21,1% und nach 12 Wochen 25,35% (P = 0,15; Abbildung 12a).

Die TNF α Produktion der CD4+ T-Zellen unter Therapie (Woche 4: 15,05%, Woche 12: 17,2%) war vergleichbar mit der Produktion vor Therapiebeginn (11,86%; P = 0,01) (Abb. 12b).

Es bestand ebenfalls kein Unterschied in der TNF α Produktion der CD8+ T-Zellen vor und unter Therapie mit IFN α . Die Produktion betrug im Median 10,45% vor Therapiebeginn, 7,4% nach 4 Wochen und 8,85% nach 12 Wochen Behandlungsdauer (P = 0,61) (Abb. 12c).

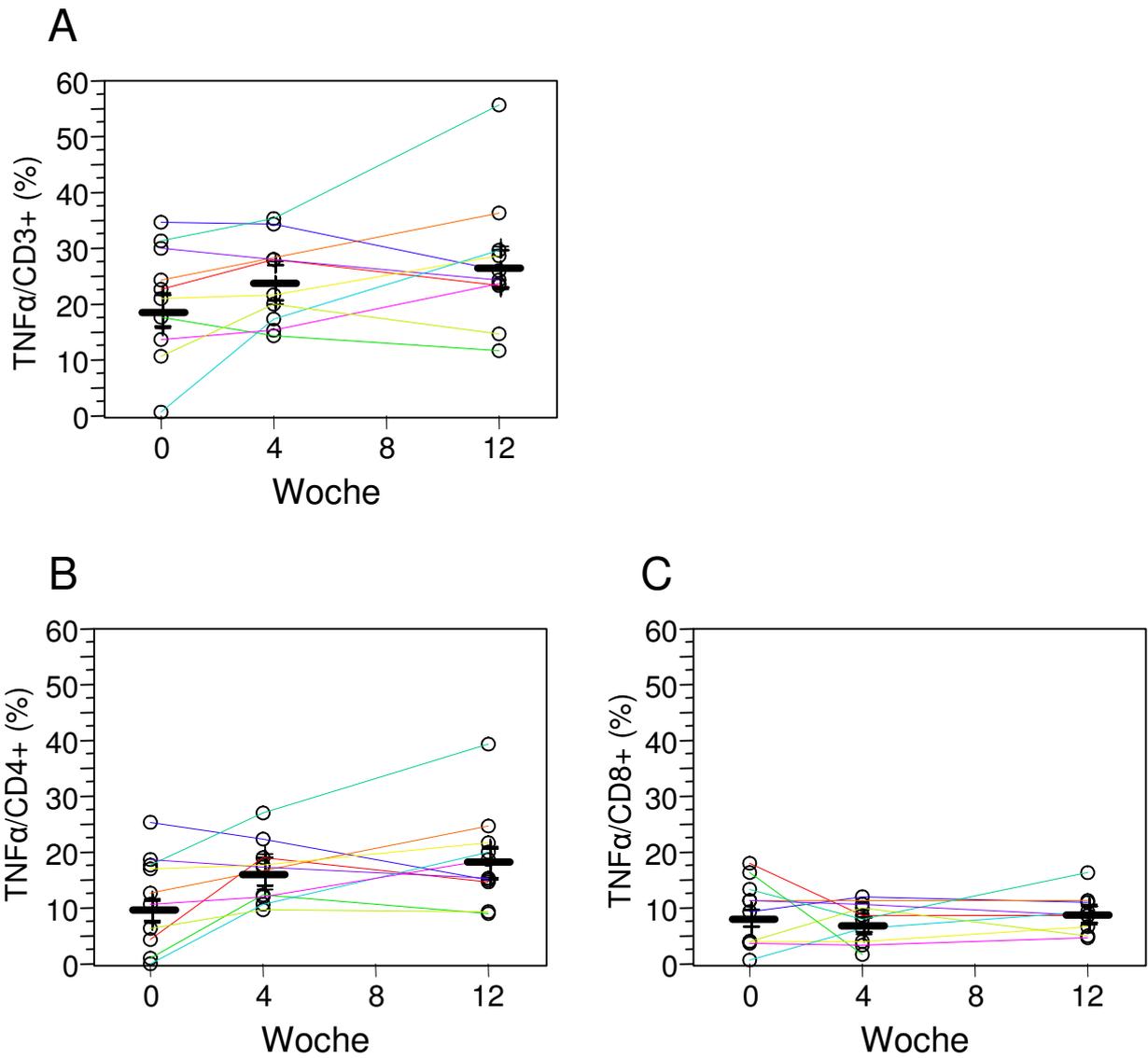


Abbildung 12. Prozentualer Anteil von Tumornekrosefaktor- α (TNF α) positiven CD3+ (**A**), CD4+ (**B**) und CD8+ (**C**) T-Lymphozyten bei Patienten mit Morbus Behçet im Verlauf unter einer Therapie mit Interferon- α 2a (IFN α). Die Querbalken indizieren den Median.

4.2.3 Produktion von IL 4 bei Patienten mit M. Behçet unter einer Therapie mit IFN α

Die IL 4 Produktion durch T-Lymphozyten von MB-Patienten änderte sich nicht unter der Therapie mit IFN α . Die mediane IL 4 Produktion der CD3+-T-Zellen vor Therapiebeginn betrug 1,86%, nach Woche 4 2,16% und nach Woche 12 2,43% (Abbildung 13a).

In der CD4+-T-Zellpopulation konnte kein Unterschied der medianen IL 4 Produktion unter Therapie mit IFN α festgestellt werden (vor Therapie: 0,69%, Woche 4: 0,98%, Woche 12 1,25%; Abbildung 13b). Bei der statistischen Berechnung der p-Werte der CD3+- und CD4+-Populationen wurde der Patient als fester Faktor angenommen, da die Varianzkomponente des zufälligen interindividuellen Effektes sonst auf einen Wert unter Null geschätzt worden wäre.

Es bestand ebenfalls kein Unterschied in der IL 4 Produktion der CD8+ T-Zellen vor und unter Therapie mit IFN α . Die Produktion betrug im Median 0,87% vor Therapiebeginn, 0,74% nach 4 Wochen und 1,78% nach 12 Wochen Behandlungsdauer (P = 0,73) (Abbildung 13c).

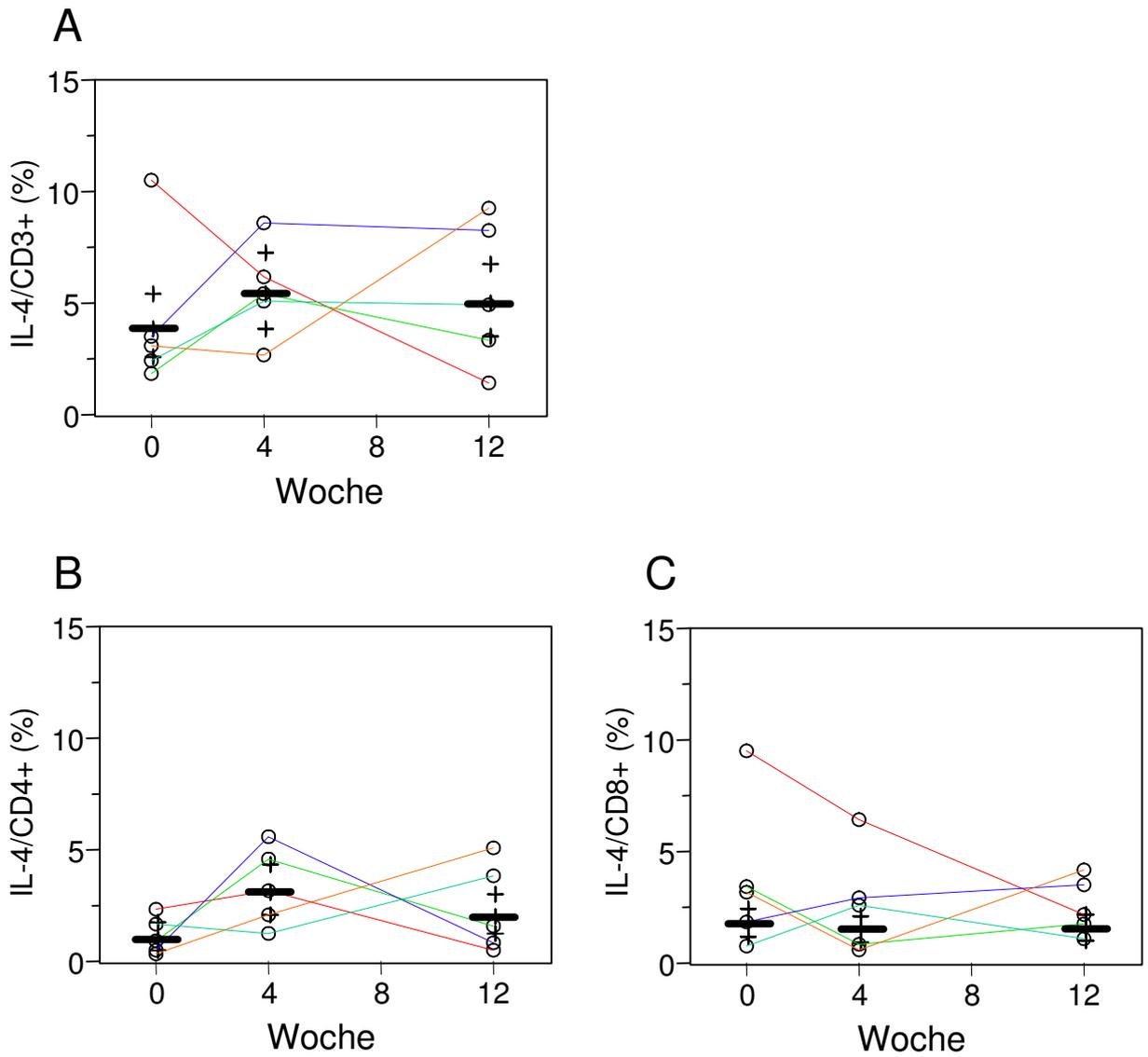


Abbildung 13. Prozentualer Anteil von Interleukin-4 (IL 4) positiven CD3+ (**A**), CD4+ (**B**) und CD8+ (**C**) T-Lymphozyten bei Patienten mit Morbus Behçet im Verlauf unter einer Therapie mit Interferon- α 2a (IFN α). Die Querbalken indizieren den Median.

Tabelle 5. Intrazelluläre Produktion von Interleukin-2 (IL 2), Interferon- γ (IFN γ), Tumornekrosefaktor- α (TNF α) und Interleukin-4 (IL 4) durch CD3+, CD8+ und CD4+ T-Zellen von zehn* Patienten mit Morbus Behçet (MB) vor (Woche 0) und unter einer Therapie mit Interferon- α 2a (Woche 4 und Woche 12). Dargestellt sind die Mediane und in Klammern die Minimum- und Maximumwerte.

*IL 4 wurde bei fünf MB-Patienten analysiert

		Woche 0	Woche 4	Woche 12
IL 2	CD3	6,65 (0,3 – 13,1)	16,2 (3,8 – 24,1)	14 (7,1 – 34,7)
	CD8	1,85 (0,2 – 5,3)	2,75 (1,9 – 7,6)	3,45 (2,2 – 11,4)
	CD4	3,9 (0,1 – 8,9)	11,2 (1,6 – 18,8)	10,4 (3,7 – 23,6)
IFN γ	CD3	22,3 (4,9 – 31,1)	26,8 (11,1 – 43,1)	24,85 (9,9 – 40,2)
	CD8	10,45 (1,6 – 29,9)	13,15 (2,9 – 23)	11,65 (4,7 – 17,7)
	CD4	5,6 (0 – 16,5)	12,2 (8,1 – 20,6)	12,6 (5,2 – 28,6)
TNF α	CD3	22 (1 – 34,9)	21,1 (0 – 35,4)	25,35 (11,7 – 56)
	CD8	10,45 (0,7 – 18,1)	7,4 (0 – 12,1)	8,85 (2,5 – 16,6)
	CD4	11,86 (0,3 – 25,4)	15,05 (0 – 27,2)	17,2 (9,2 – 39,4)
IL 4*	CD3	1,86 (0,16 – 10,55)	2,16 (0,11 – 8,6)	2,43 (0,23 – 9,3)
	CD8	0,87 (0,08 – 9,53)	0,75 (0,09 – 6,47)	1,78 (0,35 – 4,2)
	CD4	0,69 (0,15 – 2,34)	0,98 (0,04 – 5,6)	1,25 (0,1 – 5,1)

5 Diskussion

In den vergangenen Jahren konnte in mehreren Fallberichten und klinischen Studien beobachtet werden, dass eine Therapie mit IFN α bei aktivem Morbus Behçet (MB) eine äußerst effiziente Behandlung darstellt (Stübiger et al., 2001, Alpsoy et al., 2002, Kötter et al., 2003, Kötter et al., 2004c). In einer kürzlich veröffentlichten Übersichtsarbeit wurde die bislang erschienene Literatur zur IFN α Therapie bei MB zusammengefasst. Insgesamt wurden 338 MB-Patienten systemisch mit IFN α Therapie behandelt, von denen 86% der Patienten mit Haut- und Schleimhautbefall, 96% mit Arthritis und 94% mit Uveitis eine partielle oder komplette Remission unter der Therapie zeigten (Kötter et al., 2004a). Der genaue Wirkmechanismus von IFN α ist bislang weitgehend ungeklärt. Es gibt Studien hinsichtlich der immunologischen Effekte von IFN α , die verschiedene Einflüsse auf Lymphozytensubpopulationen und Monozyten dargelegt haben (Aulitzky et al., 1991, Wejstal et al., 1992, Corssmit et al., 1997, Su und David, 1999, Spets et al., 1998, Treusch und Kötter, 2001). Untersuchungen des Zytokinprofils bei MB-Patienten unter einer IFN α Therapie sind rar und dies ist die erste Studie, die das Verhalten intrazellulärer Zytokine unter einer IFN α Therapie beschreibt.

Die Durchflusszytometrie ist hierfür eine sowohl gut geeignete, als auch spezifische Methode. Mittels Antikörpermarkierungen können die Zytokine denjenigen Zellen zugeordnet werden, von denen sie tatsächlich produziert werden. Zytokinanalysen im Serum durch ELISA beispielsweise, haben den Nachteil, dass die zelluläre Herkunft des gemessenen Zytokins unbekannt ist. Es kann jedoch selbst bei der Durchflusszytometrie nicht ausgeschlossen werden, dass die Stimulation in vitro nicht exakt das physiologische Verhalten der T-Zellen in vivo reflektiert. Des Weiteren ist es nicht einfach, Arbeiten über quantitative Zytokinanalysen zu vergleichen, da die Studienprotokolle meist erheblich voneinander abweichen. Es werden unterschiedliche Methoden verwendet, wie die Zytokinermessung im Serum auf der einen und die intrazelluläre Zytokinbestimmung auf der anderen Seite. Oft werden unterschiedliche Zellstimulantien eingesetzt und die Zellen unterschiedlich

lange stimuliert. Baeten et al. berichteten von einer Abweichung der intrazellulären Zytokinproduktion zwischen frisch isolierten und eingefrorenen sowie wiederaufgetauten peripheren Blutlymphozyten (Baeten et al., 2004). Da diese Differenz jedoch stabil bleibt, kann sie als systemischer Fehler bewertet und vernachlässigt werden. Sicherlich gibt es außerdem Unterschiede in der Zusammensetzung der untersuchten Patientenkollektive.

5.1.1 Zytokinprofil bei Patienten mit Morbus Behçet

Eine unausgeglichene Expression von Th1- oder Th2-Zytokinen wird im Tiermodell mit entzündlichen Veränderungen assoziiert und Vieles deutet darauf hin, dass eine derartige Inbalance auch beim Menschen eine große Rolle bei der Pathogenese von inflammatorischen Erkrankungen spielt. Der M. Behçet ist eine Krankheit, die hauptsächlich mit einem ausgeprägten Th1-Zytokinprofil in Verbindung gebracht wird (Sugi-Ikai et al., 1998, Frassanito et al., 1999, Freysdottir et al., 1999, Gül, 2001). In zahlreichen Untersuchungen wurde eine Überexpression von proinflammatorischen Zytokinen wie IFN γ und TNF α sowohl im Serum, als auch auf zellulärer Basis beobachtet (Mege et al., 1992, Sayinalp et al., 1996, Yamashita et al., 1996, Sugi-Ikai et al., 1998, Frassanito et al., 1999, Freysdottir et al., 1999, Hamazaoui et al., 2002).

IFN γ ist bekannt als proinflammatorisches Zytokin, das bei Krankheiten mit einem Th1-Profil erhöht ist und Th2-Zellen hemmen kann (Janeway et al., 2002). Es ist bekannt, dass IFN γ Antigenpräsentierende Zellen (APC) aktiviert und die Th1-Differenzierung durch die Hochregulierung des Transkriptionsfaktors T-bet fördert (Lighvani et al., 2001). In einer Studie von Sugi-Ikai et al. wurden CD4 $^{+}$ und CD8 $^{+}$ T-Zellen auf ihre IFN γ Produktion untersucht. Patienten mit MB hatten eine signifikant höhere Menge an intrazellulärem IFN γ im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe und zu immunsuppressiv behandelten Patienten (Sugi-Ikai et al., 1998). Freysdottir und Kollegen demonstrierten ebenso eine erhöhte IFN γ Produktion im peripheren Blut von Patienten mit aktivem MB (Freysdottir et al., 1999). In einer anderen Arbeit fand sich IFN γ in T-Lymphozyten von MB-Patienten erhöht und sank unter einer immunsuppressiven Therapie (Frassanito et al., 1999). Hamazaoui

et al. beschrieben eine Erhöhung von IFN γ im Serum und in CD4 $^{+}$ T-Zellen von Patienten mit aktivem MB, verglichen mit Patienten in Remission und gesunden Probanden (Hamazaoui et al., 2002). Im Gegensatz zu diesen Arbeiten, die alle eine Erhöhung des Th1-Zytokins IFN γ beschrieben, beobachteten Raziuddin et al. eine defiziente IFN γ Produktion in stimulierten PBMC's. Die Autoren vermuteten entweder eine geringere Anzahl von IFN γ produzierenden Zellen oder eingeschränkte Funktion dieser Zellen bei MB. Da in dieser Studie zwar eine Erhöhung der Th2-Zytokine IL 4, IL 10 und IL 13 gemessen wurde, aber eine normale IL 2 Sekretion, wurde nahegelegt, dass der MB keine strenge Th1- oder Th2-assoziierte Erkrankung sei, sondern vielmehr eine komplexe Interaktion zwischen unterschiedlichen Zytokinen eine Rolle bei der Pathogenese spiele (Raziuddin et al., 1998).

TNF α ist bekanntlich bei verschiedenen inflammatorischen, infektiösen, malignen oder Autoimmunerkrankungen erhöht (Grunfeld und Palladino, 1990). Mege et al. fanden TNF α in PBMC's bei Patienten mit aktivem MB signifikant erhöht und vermuteten, dass die Krankheitsaktivität verantwortlich ist für eine direkte Aktivierung von zirkulierenden Monozyten und somit zu einer Ausschüttung von proinflammatorischen Mediatoren führt (Mege et al., 1993). In einer anderen Arbeit wurde ebenfalls eine Überproduktion von TNF α in PBMC's von MB-Patienten festgestellt (Yamashita et al., 1997). Sayinalp et al. untersuchten TNF α im Serum von MB-Patienten und beobachteten eine Erhöhung, die den bestehenden inflammatorischen Prozess reflektierte (Sayinalp et al., 1996). Freysdottir et al. wiesen mittels Durchflusszytometrie nach, dass die Anzahl der $\gamma\delta$ -T-Zellen bei MB-Patienten im peripheren Blut erhöht war und diese vermehrt TNF α produzierten (Freysdottir et al., 1999).

In Übereinstimmung mit vorherigen Studien zeigten die Th1-Zytokine IFN γ und TNF α in dieser Arbeit ebenfalls eine Tendenz zu einer erhöhten intrazellulären Expression in T-Lymphozyten. IFN γ /CD3 bei MB-Patienten erwies sich im Vergleich zu gesunden Probanden und zu Patienten mit SA als doppelt so hoch. Eine Ausnahme dazu bildete das in CD4 $^{+}$ T-Zellen gemessene IFN γ , das nicht erhöht war (Abb. 7). Das von CD8 $^{+}$ T-Zellen produzierte TNF α war bei

MB-Patienten intrazellulär leicht erhöht (Abb. 8). Die Erhöhung dieser Zytokine könnte entweder an der Pathogenese des MB beteiligt, aber auch im Sinne einer Immunantwort auf den inflammatorischen Prozess hochreguliert sein.

Im Gegensatz zu den erhöhten Zytokinen IFN γ und TNF α , fand sich das ebenfalls Th1-assoziierte Zytokin IL 2 sowohl bei den MB-Patienten, als auch bei der SA-Kontrollgruppe im Vergleich zu den gesunden Probanden deutlich erniedrigt (Abb. 5). Bislang gibt es nur wenige Studien, in denen IL 2 bei Patienten mit MB untersucht wurde. In den meisten Arbeiten erfolgte die Analyse von IL 2 im Serum und entweder waren keine Unterschiede zwischen der IL 2 Aktivität von MB-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen festzustellen (Sakane et al., 1986, Sayinalp et al., 1996, Raziuddin et al., 1998), oder die Autoren beschrieben erhöhte IL 2 Spiegel (Sugi-Ikai et al., 1998, Frassanito et al., 1999). Raziuddin et al. stellten eine normale IL 2 Produktion in PBMC's mittels ELISA fest (Raziuddin et al., 1998). Sayinalp et al. ermittelten normale IL 2 Werte im Serum, fanden jedoch den löslichen IL 2-Rezeptor bei Patienten mit MB erhöht (Sayinalp et al., 1996). Sakane et al. hingegen fanden trotz normalen IL 2 Werten im Serum eine verminderte IL 2 Antwort, der sowohl eine verringerte Anzahl von T-Zellen mit IL 2 Oberflächenrezeptoren, als auch eine verringerte IL 2 Rezeptorendichte zugrunde lag. Die eingeschränkte IL 2 Antwort bei MB-Patienten könnte ein intrinsischer Defekt sein und somit zu der geschwächten Immunfunktion, die bei dieser Erkrankung beobachtet wird, beitragen (Sakane et al., 1986).

Sugi-Ikai et al. untersuchten IL 2 im Zytoplasma mittels intrazellulärer Antikörperfärbung und Durchflusszytometrie. Sie fanden eine erhöhte IL 2 Produktion bei MB-Patienten (Sugi-Ikai et al., 1998). Frassanito et al. untersuchten IL 2 in CD3-Lymphozyten und beobachteten ebenfalls einen erhöhten Prozentsatz in Patienten mit aktivem MB im Vergleich zu Patienten in Remission und zu gesunden Personen (Frassanito et al., 1999). Die Diskrepanz zwischen der erhöht gemessenen Produktion von IL 2 in diesen beiden Arbeiten und der erniedrigten IL 2 Produktion von MB-Patienten in der vorliegenden Studie kann verschiedene Ursachen haben. Obwohl die IL 2 Expression von T-

Zellen in allen Arbeiten mit dem Durchflusszytometer erfasst wurde, stimmt die Methodik nicht exakt überein. Zum einen wurde in der Untersuchung von Sugi-Ikai et al. eine andere Zellstimulanz verwendet. Sugi-Ikai et al. stimulierten ihre PBMC's mit monoklonalen Antikörpern gegen CD3, in dieser Studie hingegen erfolgte die Zellstimulation mit PMA und Ionomycin. Zum anderen waren die Stimulationszeiten unterschiedlich lang. Sugi-Ikai et al. stimulierten ihre Zellen sechs Stunden, Frassanito et al. fünf Stunden und in dieser Arbeit wurden die T-Lymphozyten 48 Stunden mit den Stimulantien inkubiert (Sugi-Ikai et al., 1998). In der Arbeit von Frassanito et al. erhielten außerdem fast alle Patienten mit aktivem MB eine immunsuppressive Therapie (11 von 14 Patienten erhielten Prednisolon, Methotrexat, Azathioprin oder Colchizin), die sich beträchtlich auf das Zytokinsystem und die Expression von IL 2 ausgewirkt haben kann (Frassanito et al., 1999).

Zytokine sind Teil einer komplexen Kaskade im Immunsystem. Sie haben bedeutende Funktionen in der Entwicklung, Differenzierung und Regulierung von immunkompetenten Zellen. Es wird daher angenommen, dass eine fehlerhafte Regulierung der Zytokinproduktion und der Zytokinaktivität eine zentrale Rolle bei der Entwicklung von Autoimmunerkrankungen einnimmt. Überraschenderweise hat ein Eingriff in das Zytokinsystem nicht notwendigerweise den erwarteten Effekt. Zytokine, von denen bislang angenommen wurde, dass sie ausschließlich für das Zustandekommen einer Immunantwort und für inflammatorische Prozesse verantwortlich sind, zeigen unerwartete immunsuppressive Wirkungen. Aus diesem Grund ist es vielleicht vereinfacht zu sagen, dass proinflammatorische Zytokine Autoimmunerkrankungen verursachen, wohingegen regulierende Zytokine diese unterdrücken. Ein Beispiel hierfür ist das Th-1 Zytokin IL 2. Horak et al. untersuchten IL 2 und IL 2-Rezeptor Knock-out-Mäuse. Aufgrund der bekannten proliferativen Wirkung von IL 2 auf Lymphozyten, wäre ein immundefizienter Phänotyp der Mäuse zu erwarten gewesen. Stattdessen entwickelten die Mäuse eine Hyperplasie der Lymphozyten und produzierten eine große Menge an verschiedenen Autoantikörpern. Innerhalb von zwei Monaten verstarb die Hälfte der Mäuse an einer autoimmunhämolytischen Anämie, die andere Hälfte

entwickelte eine chronisch entzündliche Darmerkrankung. Interessanterweise konnte die Pathologie durch die Gabe von exogenem IL 2 und IL 2 produzierenden Lymphozyten aufgehoben werden (Horak et al., 1995, Refaeli et al., 1999). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass IL 2 eine bedeutende Rolle bei der Erhaltung der peripheren Toleranz spielt. Es gibt mehrere Mechanismen durch die IL 2 Einfluss auf die periphere Toleranz nimmt. Ein Wirkmechanismus ist die Fähigkeit zur Induktion der Fas-abhängigen Apoptose (Lenardo et al., 1991). Ein weiterer Mechanismus ist der Einfluss von IL 2 auf CD4+CD25+ T-Zellen, die als regulatorische Zellen vermutlich Autoimmunkrankheiten verhindern können (Janeway et al., 2003). CD4+CD25+-Zellen fehlen in IL 2 defizienten Mäusen und tragen somit möglicherweise zur Pathogenese von Autoimmunkrankheiten in IL 2 Knock-out-Mäusen bei (Wolf et al., 2001). Des Weiteren gibt es Hinweise auf die Notwendigkeit von IL 2 zur Differenzierung von CD4-Zellen in IL 4 produzierende Th2-Zellen (Horak et al., 1995, Skapenko et al., 2001). Offensichtlich existieren mehrere Mechanismen, mit denen IL 2 aktivierte T-Zellen und Immunantworten negativ regulieren kann und die Abwesenheit des Zytokins scheint von Autoimmunkrankheiten begleitet zu sein (O'Shea et al., 2002).

5.1.2 Zytokinprofil bei Patienten mit Spondylitis ankylosans

Spondylitis ankylosans (SA) ist eine weitere komplexe Erkrankung, die mit einem HLA-Klasse-I-Antigen assoziiert ist (HLA B27). Die Pathogenese ist weitgehend ungeklärt, es gibt jedoch Hinweise, dass ein gestörtes Zytokinegleichgewicht eine bedeutende Rolle in der Entstehung dieser Erkrankung spielt. In der vorliegenden Arbeit war die intrazelluläre Produktion von IL 2 bei Patienten mit SA gegenüber der gesunden Kontrollgruppe deutlich erniedrigt. Die Expression der Th1-Zytokine IFN γ und TNF α hingegen ließ keine Unterschiede zwischen den SA-Patienten und den gesunden Probanden erkennen.

Übereinstimmend mit den vorliegenden Ergebnissen beschrieben die meisten Autoren in ihren Arbeiten entweder keine Veränderung, oder aber eine

Erniedrigung der Th1-Zytokine IL 2, IFN γ und TNF α bei Patienten mit Spondylitis ankylosans (Toussirot et al., 1994, Rudwaleit et al., 2001b, Van Damme et al., 2001, Vazquez et al., 2002, Zou et al., 2002a). Eine Ausnahme bildete eine Studie von Gratacos et al., die IFN γ und TNF α im Serum von SA-Patienten untersuchten und eine normale IFN γ Serumkonzentration und erhöhte Werte für TNF α fanden. Als Kontrollen dienten jedoch keine gesunden Individuen, sondern Patienten mit rheumatoider Arthritis und Patienten mit nicht-inflammatorischen Rückenschmerzen. Die Zytokinbestimmung im Serum statt auf zellulärer Basis, sowie die fehlende gesunde Kontrollpopulation machen den Vergleich zu dieser Arbeit nahezu unmöglich (Gratacos et al., 1994). Vazquez-Del Mercado et al. verglichen die intrazelluläre TNF α Produktion von PBMC's von 27 Patienten mit AS mit gesunden Kontrollen und beobachteten keinen Unterschied zwischen den beiden Gruppen (Vazquez-Del Mercado et al., 2002). In einer Arbeit von Rudwaleit et al. wurde eine erniedrigte T-Zell-Produktion der Th1-Zytokine IFN γ und TNF α bei Patienten mit HLA B-27 positiver SA beschrieben (Rudwaleit et al., 2001b). Toussirot et al. bemerkten interessanterweise eine signifikante Erniedrigung des löslichen IL 2 Rezeptors und eine nicht-signifikante Erhöhung von TNF α im Serum von SA-Patienten (Toussirot et al., 1994). Eine andere Arbeitsgruppe untersuchte IL 2 sowohl in peripheren T-Zellen, als auch in T-Zellen der Darmmukosa von SA-Patienten und konnte in beiden Studien eine verringerte intrazelluläre IL 2 Expression beobachten (Baeten et al., 2000, Van Damme et al., 2001). Des Weiteren beschrieben sie eine Korrelation zwischen dem erniedrigten Zytokin IL 2 und einer hohen Krankheitsaktivität, die durch die Entzündungsparameter C reaktives Protein und der Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit evaluiert wurde (Van Damme et al., 2001).

Zusammengefasst deuten diese Studien auf ein Th1/Th2-Ungleichgewicht hin, das sich nicht nur im peripheren Blut manifestiert, sondern auch in T-Zellen der Darmmukosa von Patienten mit SA. Diese Beobachtungen passen zu der Hypothese, dass eine verringerte Th1-Antwort eine Schlüsselrolle bei der Pathogenese der SA spielt. Eine pathologische IL 2 Immunantwort durch eine geringere IL 2 Rezeptorenzahl und eine erniedrigte intrazelluläre IL 2

Produktion könnte Ursache einer Schwächung der peripheren Toleranz sein. Diese Abwehrschwäche kann beispielsweise zur Persistenz von intrazellulären Bakterien führen, die sowohl eine Entzündung als auch eine Autoimmunreaktion auslösen können (Sieper und Braun, 1995). Die Behandlung solcher Patienten mit TNF α -Antagonisten zeigte eine Wiederherstellung des Th1/Th2-Profiles (Baeten et al., 2000, Baeten et al., 2001, Zou et al., 2002b). Zou et al. untersuchten die Expression von IFN γ , TNF α und IL 4 in peripheren T-Lymphozyten von 10 SA-Patienten vor und unter einer Therapie mit Etanercept, einem Fusionsprotein aus humanem TNF α -Rezeptor und dem Fc-Anteil eines IgG1. Etanercept induzierte einen signifikanten Anstieg von IFN γ und TNF α , der von einer klinischen Verbesserung der Symptomatik begleitet wurde. Das Th2-Zytokin IL 4 änderte sich nicht unter der Therapie (Zou et al., 2003). In einer weiteren Arbeit wurden intrazelluläre Zytokine (IFN γ , IL 2, IL 10, IL 4) bei Patienten mit aktiver Spondylarthropathie vor und nach Therapie mit dem TNF α -Inhibitor Infliximab untersucht. Eine vor Therapie geschwächte Produktion von Th1-Zytokinen konnte durch Infliximab wiederhergestellt werden. 21 Patienten mit einer aktiven Spondylarthropathie (10 Patienten mit SA, 9 Patienten mit Psoriasis-Arthritis und 2 Patienten mit undifferenzierter Spondylitis) wurden auf das intrazelluläre Zytokinprofil der CD3+ T-Zellen untersucht. Die Anzahl der IL 10 produzierenden Zellen war signifikant erhöht, wohingegen die Th1-Zytokine IFN γ und IL 2 im Gegensatz zu den gesunden Kontrollen erniedrigt waren. Bei der IL 4 Produktion waren keine Unterschiede erkennbar. Unter dem Einfluss des TNF α -Inhibitors Infliximab stieg die Produktion der beiden Th-1 Zytokine IFN γ und IL 2 an, bei den Th-2 Zytokinen IL 10 und IL 4 konnte kein Unterschied festgestellt werden (Baeten et al., 2001). In der vorliegenden Arbeit konnte ebenfalls eine signifikante Erniedrigung der IL 2 Produktion in T-Zellen von Patienten mit SA festgestellt werden. Zusätzlich zeigte die Zytokinanalyse von IL 2 bei Patienten mit M. Behçet gleichermaßen eine erniedrigte intrazelluläre Produktion im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe. Im Gegensatz zu Baeten et al. wurden keine Unterschiede in der intrazellulären Produktion von IFN γ , TNF α und IL 4 bei SA-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen festgestellt. Die Ursache für die

Unterschiede in der IFN γ Produktion könnte an der unterschiedlich langen Stimulationszeit liegen (6 Stunden bzw. 48 Stunden). Des Weiteren beschrieben Baeten et al. eine höhere Krankheitsaktivität der untersuchten Patienten zum Zeitpunkt der Blutentnahme.

5.1.3 Einfluss von IFN α auf das Zytokinprofil bei Patienten mit Morbus Behçet

In der vorliegenden Studie konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die Therapie von aktivem MB mit IFN α einen Anstieg des von T-Zellen produzierten IL 2 induziert. Das Th1-Zytokin IL 2 war bei den Patienten mit MB vor Therapie im Vergleich mit der gesunden Kontrollgruppe erniedrigt und stieg nach 4 Wochen Therapie deutlich an. In Woche 12 war die intrazelluläre IL 2 Produktion noch nahezu gleich hoch wie in Woche 4. Die Expression von IL 2 in Woche 4 nach Therapiebeginn war etwas höher als die IL 2 Expression der gesunden Probanden. Nach einer medianen IFN α Dosisreduktion von 6 Mio/E auf 4,5 Mio/E vor der Messung in Woche 12, glich sich die IL 2 Produktion der MB-Patienten den gesunden Probanden an (Abb. 5, 10). Die Behandlung mit IFN α und der resultierende Anstieg von IL 2 ging mit einer bemerkenswerten Besserung der okulären Vaskulitis und anderer Krankheitssymptome einher. Die Augenbeteiligung wurde anhand des Uveitis scoring systems erfasst, mit welchem die Sehschärfe, die Kataraktprogression und die Entzündungsaktivität der vorderen und hinteren Kammer beurteilt wurde (BenEzra et al., 1991). Andere Krankheitsmerkmale wurden mit dem Behçet's disease activity scoring system erfasst (Rigby et al., 1995). Interessanterweise war die Produktion von IL 2 durch CD3- und CD4-Lymphozyten bei der SA-Kontrollgruppe ähnlich vermindert wie die IL 2 Expression der MB-Patienten vor Therapiebeginn (Abb. 5a, 5c, 9a-c).

Das von CD4+ Lymphozyten produzierte IFN γ der MB-Patienten reagierte ebenfalls mit einem signifikanten Anstieg auf die Therapie (Abb. 11b). Die Produktion vor Therapie war vergleichbar mit der IFN γ Produktion von CD4+ T-Zellen der gesunden Kontrollgruppe und stieg unter Therapie auf das etwa dreifache des Ausgangswertes. Es ist bekannt, dass IFN α die Menge der IFN γ

mRNA in humanen CD4-Zellen steigert (Brinkmann et al., 2001). Die IFN γ Produktion der CD3- und CD8-Population bei Patienten mit MB war vor Therapiebeginn tendenziell erhöht (Abb. 7a, 7c). Im Verlauf der Therapie änderte sich die Produktion von IFN γ bei diesen Zellpopulationen nicht (Abb 11a, 11c). IFN γ vermittelt nicht nur bestimmte Krankheiten, sondern dient in Autoimmunmodellen auch als protektiver Faktor (O'Shea et al., 2002). Ein möglicher Mechanismus ist die Anregung von Proteinen, die zur SOCS-Familie gehören und als klassische Feedback-Inhibitoren dienen (Gadina et al., 2001). Somit steht der Anstieg von IFN γ in CD4+ T-Zellen unter einer Therapie mit IFN α nicht notwendigerweise im Gegensatz zur klinischen Wirkung von IFN α . TNF α war vor Therapie bei der CD8+-Zellpopulation tendenziell erhöht und blieb unverändert unter dem Einfluss von IFN α (Abb. 8c, 12a-c). Zwischen der TNF α und der IFN γ Produktion der SA-Patienten und den gesunden Probanden gab es keine Unterschiede (Abb. 7, 8). IL 4 wurde nur bei jeweils fünf Patienten und Probanden untersucht und erreichte möglicherweise aufgrund dieser geringen Fallzahl keine Signifikanz.

Experimente über den Einfluss einer IFN α Therapie auf Zytokine speziell bei MB gibt es bislang kaum. Kosar et al., untersuchten das Th1-Zytokin IL 2 und den IL 2 Rezeptor im Serum von 22 MB-Patienten vor und nach Behandlung mit IFN α , konnten jedoch keinen Unterschied während der Therapie und im Vergleich mit einer gesunden Kontrollgruppe feststellen. Das ebenfalls untersuchte TNF α war vor Therapie bei den MB-Patienten erhöht und sank unter der Behandlung (Kosar et al., 1999). Es bedarf weiterer Untersuchungen, die vor allem Zytokine auf zellulärer Basis im Verlauf unter einer Therapie mit IFN α bei MB berücksichtigen.

5.1.4 Einfluss von IFN α auf das Zytokinprofil bei verschiedenen Krankheiten

Interferone waren zunächst bekannt für ihre Fähigkeit, die virale Replikation und Produktion zu hemmen. Vielfältige immunmodulatorische Effekte wurden später beschrieben. Inzwischen wird IFN α bei Krankheiten mit unterschiedlicher Pathogenese wie der chronischen Hepatitis B + C, dem malignen Melanom, der

Chronisch myeloischen Leukämie, der Haarzelleukämie und dem Karposisarkom eingesetzt (Hall, 1990, Langford und Sneller, 2003).

Der Wirkmechanismus ist noch nicht vollständig geklärt, es werden jedoch verschiedene Effekte auf das Immunsystem diskutiert. Mehrere Untersuchungsergebnisse deuten auf einen Eingriff von IFN α in die Zytokinkaskade und das T-Zellsystem hin (Belardelli und Gresser, 1996, Tilg 1997, Beignon et al., 2003). IFN α stimuliert Th1-Zellen, die vorwiegend IL 2 und IFN γ exprimieren. Brinkmann et al. beobachteten eine erhöhte Anzahl von IFN γ sezernierenden CD4+-T-Zellen unter IFN α (Brinkmann et al., 1993). Weiterhin zeichnete sich eine Unterdrückung von Th2-Zytokinen wie IL 4 ab (Brinkmann et al., 1993, Belardelli und Gresser, 1996). Zusammengefasst sprechen diese Ergebnisse dafür, dass IFN α eine große Rolle bei der T-Zelldifferenzierung in Richtung einer Th1-Immunantwort spielt, was bei der Behandlung von viralen Infektionen und Th2-dominierten Krankheiten, wie der Colitis ulcerosa und dem Asthma bronchiale von Bedeutung sein könnte (Gutterman, 1995, Wills-Karp et al., 1998, Heller et al., 2003). Zu dieser These passt, dass Th1-assoziierte Krankheiten wie die Psoriasis durch eine IFN α Therapie verschlechtert werden oder sich gar zum ersten Mal manifestieren können (Belardelli und Gresser, 1996, Kötter et al., 2003).

Eine andere Möglichkeit die Wirkung von IFN α auf verschiedene Krankheiten zu erklären, ist die Fähigkeit zur Induktion der Fas-abhängigen Apoptose. Aktivierte Lymphozyten werden unter dem Einfluss von IFN α eliminiert und können so ihre inflammatorische Wirkung nicht mehr ausüben (Aulitzky et al., 1991, Kaser et al., 1999). Das Potential, die Apoptose von aktivierten T-Zellen zu induzieren, könnte die Wirksamkeit von IFN α auf Th1-assoziierte Erkrankungen wie der Multiplen Sklerose erklären (Kaser et al., 1999). Beide Wirkmechanismen könnten für den beobachteten positiven Effekt einer IFN α Therapie bei Patienten mit MB verantwortlich sein. Sowohl die Wiederherstellung einer suffizienten IL 2 Synthese, als auch die Apoptoseinduktion von aktivierten T-Zellen kann zur klinischen Besserung der Krankheitssymptome beitragen.

In verschiedenen Studien, in denen der Einfluss einer IFN α Therapie auf Zytokine bei Krankheiten wie der chronischen Hepatitis C, der chronischen myeloischen Leukämie und der idiopathischen thrombozytopenischen Purpura untersucht wurde, zeigte sich in Übereinstimmung mit der vorliegenden Arbeit ein Anstieg von IL 2 nach Therapiebeginn (Crossley et al., 1996, Czerwionka et al., 2000, Reuben et al., 2000). Reuben et al. untersuchten PBMC's von Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie auf intrazelluläres IL 2 und fanden eine erhöhte IL 2 Produktion bei Patienten, die mit IFN α behandelt wurden und sich daraufhin in Remission befanden. Ebenso wie bei den MB-Patienten war die IL 2 Expression von CD8- und CD4-positiven T-Lymphozyten vor Therapiebeginn erniedrigt (Reuben et al., 2000). Crossley et al. stellten ähnliche Ergebnisse in einer Arbeit fest, in der der Einfluss von IFN α auf intrazelluläres IL 2 bei Patienten mit idiopathischer thrombozytopenischer Purpura beschrieben wurde. Das vor IFN α Therapie erniedrigte Zytokin stieg unter Therapie an (Crossley et al., 1996).

Grund für den mehrfach beobachteten IL 2 Anstieg könnte eine indirekte Wirkung von IFN α auf T-Lymphozyten sein. Von IFN α stimulierte Makrophagen sezernieren IL 1, welches zusammen mit dem MHC-II-Antigenkomplex T-Helfer-Zellen aktiviert. Die Kaskade führt zur Proliferation und zur Bildung eines T-Helfer-Zell-Klons, der unter anderem IL 2 ausschüttet (Hall, 1990). Zusammengefasst spricht Einiges dafür, dass die Besserung der klinischen Symptome bei Morbus Behçet und anderen Erkrankungen unter einer Therapie mit IFN α auf die Wiederherstellung einer suffizienten IL 2 Synthese zurückzuführen sein könnte.

Im Verlauf der Therapie mit IFN α fiel auf, dass die IFN γ Produktion der CD3- und CD8-positiven T-Zellen bereits vor Beginn der Therapie tendenziell erhöht war und nicht weiter anstieg. Die intrazelluläre IFN γ Expression von CD4+ T-Lymphozyten der MB-Patienten hingegen war vor der Therapie vergleichbar mit den gesunden Probanden und stieg jedoch in Woche 4 signifikant an und war in Woche 12 ebenso erhöht messbar (Abb. 11b).

In verschiedenen Arbeiten über eine IFN α Therapie bei viralen und hämatologischen Erkrankungen reagierte IFN γ gleichermaßen mit einem Anstieg (Crossley et al., 1996, Reuben et al., 2000, Hempel et al., 2001, Aswald et al., 2002). Brinkmann et al. untersuchten T-Zellen von gesunden Individuen nach In-vitro-Stimulation mit IFN α und beobachteten einen Anstieg von IFN γ mRNA. Daraufhin erhöhten sich die CD4 $^{+}$ T-Zellen und das von ihnen sezernierte IFN γ um das zehnfache (Brinkmann et al., 1993). Crossley et al. beschrieben einen Anstieg von IFN γ in PBMC's von Patienten mit idiopathischer thrombozytopenischer Purpura. Im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe war das Zytokin vor der Therapie erniedrigt (Crossley et al., 1996). In einer weiteren Studie, in der T-Zellen von 81 Patienten mit einer chronisch myeloischen Leukämie untersucht wurden, konnte ebenfalls eine erhöhte IFN γ Produktion durch CD4 $^{+}$ T-Lymphozyten bei Patienten, die sich unter einer IFN α Therapie in Remission befanden, festgestellt werden. Patienten, die sich in einer akuten Phase der Erkrankung befanden, zeigten eine geringere IFN γ Produktion als Patienten in Remission und gesunde Probanden (Reuben et al., 2000). Aswald et al. beschrieben die gleiche Wirkung von IFN α auf PBMC's von Patienten mit einer chronisch myeloischen Leukämie (Aswald et al., 2002). In einer anderen Arbeit über Zytokine unter einer IFN α Therapie bei Patienten mit chronischer Hepatitis C, reagierte das von PBMC's produzierte Th1-Zytokin IFN γ , unabhängig von der klinischen Wirkung, mit einer Erhöhung auf die Behandlung mit IFN α (Hempel et al., 2001). Diese Ergebnisse machen noch deutlicher, dass die Anwendung von IFN α zu einer T-Zelldifferenzierung in Richtung eines Th1-Profiles führt. Die IFN γ Produktion von CD4 $^{+}$ T-Zellen wird verstärkt und könnte somit den suppressiven Effekt von IL 4 auf IFN γ antagonisieren (Brinkmann et al., 1993, Tilg, 1997). Weitere Untersuchungen der intrazellulären Zytokine unter einer Therapie mit IFN α , speziell beim MB werden benötigt, um die bisherigen Beobachtungen zu festigen.

5.1.5 Schlussfolgerung

Es gibt Hinweise darauf, dass die IL 2 Produktion durch CD3+/CD4+ T-Lymphozyten sowohl bei MB-Patienten, als auch bei Patienten mit SA erniedrigt ist und durch effektive Therapie wiederhergestellt werden kann (IFN α 2a bei MB, bzw. Infliximab bei SA). Es ist zu früh um sagen zu können, dass diese Ergebnisse auf eine Gemeinsamkeit in der Pathogenese beider HLA-I-assoziierten Erkrankungen hindeuten, oder ob es sich nur um ein sekundäres Phänomen einer effektiven Therapie handelt und sich darin die Remission der Erkrankungen widerspiegelt.

6 Zusammenfassung

Der Morbus Behçet (MB) ist eine Multisystemerkrankung mit bis heute ungeklärter Pathogenese. Charakteristisch ist der Symptomenkomplex aus Haut- und Schleimhautläsion (Hautvaskulitis, oraler und genitaler Aphthose) und okulärer Entzündung. Das Hauptproblem stellt die okuläre Beteiligung mit einer Uveitis beziehungsweise retinalen Vaskulitis dar, die in ca. 50% der Fälle zur konsekutiven Erblindung führt. Bislang besteht die Standardtherapie des MB aus Immunsuppressiva wie Azathioprin, Cyclosporin A, Cyclophosphamid und Glukokortikosteroiden. Jüngere Studien fokussieren sich auf die immunmodulatorische Therapie mit Interferon- α (IFN α), einem körpereigenen Zytokin, das die Erkrankung erheblich zu verbessern scheint. IFN α wirkt immunmodulatorisch, antiviral und antiproliferativ und wird bereits erfolgreich bei verschiedenen Erkrankungen wie der Hepatitis B + C, der CML, dem malignen Melanom und dem AIDS-assoziierten Kaposi-Sarkom eingesetzt. Der genaue Wirkmechanismus ist unbekannt, verschiedene Studien lassen jedoch eine Th1-Antwort mit erhöhter Expression von Th1-Zytokinen wie IL 2 und IFN γ unter einer IFN α Therapie erkennen.

Ziel der Arbeit war, den Einfluss einer IFN α 2a Therapie auf die intrazellulären Zytokine Interleukin 2 (IL 2), Interferon γ (IFN γ), Tumornekrosefaktor α (TNF α) und Interleukin 4 (IL 4) bei Patienten mit MB mittels Durchflusszytometrie (FACS) zu untersuchen. Es wurden mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) von 10 Patienten mit MB, die aufgrund einer schweren Augenbeteiligung erstmalig eine Therapie mit IFN α 2a erhielten, analysiert. Die Untersuchungen erfolgten vor Beginn der Therapie, nach Woche 4 und Woche 12. Als Kontrollgruppen dienten jeweils 10 gesunde Probanden und 10 Patienten mit HLA B27 positiver Spondylitis ankylosans (SA). Dieser Vergleich wurde aufgrund einiger Gemeinsamkeiten beider Erkrankungen, wie der Assoziation mit einem HLA-Klasse-I-Antigen, der ähnlichen Symptomatik und dem Ansprechen auf eine immunmodulatorische Therapie vorgenommen.

Die mediane intrazelluläre IL 2 Produktion durch CD3+ und CD4+ T-Lymphozyten sowohl der MB-Patienten vor Therapiebeginn, als auch der SA-Patienten war im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe deutlich erniedrigt ($p = 0,02$ bzw. $p = 0,007$). Die Anzahl der IFN γ produzierenden CD3+ T-Zellen unbehandelter MB-Patienten war im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe und zu SA-Patienten erhöht ($p = 0,05$). Unter der Therapie mit IFN α stieg das zuvor erniedrigte intrazelluläre IL 2 im Median in allen T-Zellsubpopulationen signifikant an ($p < 0,001$). Das von CD4+ T-Lymphozyten produzierte IFN γ stieg ebenfalls signifikant unter der IFN α Therapie ($p = 0,002$). TNF α + und IL 4+ T-Lymphozyten blieben unverändert.

Aufgrund der erniedrigten IL 2 Produktion sowohl der MB-Patienten, als auch der Patienten mit SA ist es denkbar, dass Gemeinsamkeiten bei der Pathogenese dieser beiden HLA-Klasse-I-assoziierten Erkrankungen bestehen. Es gibt Hinweise darauf, dass IL 2 eine bedeutende Rolle bei der Erhaltung der peripheren Toleranz spielt und die Abwesenheit des Zytokins scheint von Autoimmunkrankheiten begleitet zu sein. IFN α reguliert das zuvor erniedrigte IL 2 in den CD3+, CD8+ und CD4+ T-Zellen der MB-Patienten hoch. Die Wiederherstellung einer suffizienten IL 2 Synthese unter einer Therapie mit IFN α und die vermutliche Restauration der peripheren Toleranz könnte ein relevanter Mechanismus sein, um die klinische Wirksamkeit dieser Therapie zu erklären.

Der Anstieg des von CD4+ T-Lymphozyten produzierten IFN γ unter einer Therapie mit IFN α könnte ebenfalls die klinische Wirkung erklären. Das Th1-Zytokin IFN γ vermittelt nicht nur bestimmte Erkrankungen, sondern zeigte sich in Autoimmunmodellen als protektiver Faktor und steht somit nicht notwendigerweise im Gegensatz zur Annahme dass MB eine Th1 induzierte Erkrankung ist. Sicherlich spielt eine komplexe Interaktion unterschiedlicher Zytokine eine Rolle sowohl bei der Pathogenese von MB als auch bei der Wirksamkeit einer IFN α Therapie.

7 Literaturverzeichnis

Alpsoy E, Durusoy C, Yilmaz E: Interferon alfa-2a in the treatment of Behcet disease: a randomized placebo-controlled and double-blind study. *Arch Dermatol* 138:467-471, 2002

Aswald JM, Lipton JH, Messner HA: Intracellular cytokine analysis of interferon-gamma in T cells of patients with chronic myeloid leukemia. *Cytokines Cell Mol Ther* 7(2):75-82, 2002

Aulitzky WE, Tilg H, Vogel W, Aulitzky W, Berger M, Gastl G, Herold M, Huber C: Acute hematologic effects of interferon alpha, interferon gamma, tumor necrosis factor alpha and interleukin 2. *Ann Hematol* 62:25-31, 1991

Baeten D, De Keyser F, Van Damme N, Veys EM, Mielants H: Influence of the gut and cytokine patterns in spondyloarthritis. *Clin Exp Rheumatol* 20:38-42, 2002

Baeten D, Kruithof E, Van den Bosch F, et al. Immunomodulatory effects of anti-tumor necrosis factor alpha therapy on synovium in spondylarthritis: histologic findings in eight patients from an open-label pilot study. *Arthritis Rheum* 44:186-95, 2001

Baeten D, Vandooren B, De Rycke L, Veys EM, De Keyser F: Effect of infliximab treatment on T cell cytokine responses in spondylarthritis: comment on the article by Zou et al. *Arthritis Rheum* 50(3):1015-6; author reply 1017, 2004

Behçet H: Über rezidivierende, durch ein Virus verursachte Geschwüre am Mund, am Auge und an den Genitalien. *Dtsch Derm Wschr* 36:1152-1157, 1937

Beignon AS, Skoberne M, Bhardwaj N: Type I interferons promote cross-priming: more functions for old cytokines. *Nat Immunol* 4:939-941, 2003

Belardelli F, Gresser I: The neglected role of type I interferon in the T-cell response: implications for its clinical use. *Immunol Today* 17:369-372, 1996

BenEzra D, Forrester JV, Nussenblatt RB. *Uveitis scoring system*: Springer Verlag, Berlin, 1991

Bolay H, Karabudak R, Aybay C, Candemir H, Varli K, Imir T, Kansu E: Alpha interferon in myasthenia gravis: effects on natural killer cell activity. *J Neuroimmunol* 82:109-115, 1998

Brinkmann V, Geiger T, Alkan S, Heusser CH: Interferon α increases the frequency of interferon γ -producing human CD4⁺ T cells. *J Exp Med* 178:1655-1663, 1993

Brown MA, Kennedy LG, MacGregor AJ, Darke C, Duncan E, Shatford JL, et al.: Susceptibility to ankylosing spondylitis in twins. *Arthritis Rheum* 40:1823-8, 1997

Burmester GR, Ulrichs T: *Rheumatologie aus erster Hand*. Novartis, Schopfheim, 1999

Canete JD, Martinez SE, Farres J, Sanmarti R, Blay M, Gomez A, Salvador G, Munoz-Gomez J: Differential Th1/Th2 cytokine patterns in chronic arthritis: interferon γ is highly expressed in synovium of rheumatoid arthritis compared with seronegative spondylarthropathies. *Ann Rheum Dis* 59:263-268, 2000

Corssmit EPM, Heijligenberg R, Hack CE, Endert E, Sauerwein HP, Romijn JA: Effects of interferon-alpha (IFN- α) administration on leucocytes in healthy humans. *Clin Exp Immunol* 107:359-363, 1997

Crossley AR, Dickinson AM, Proctor SJ, Calvert JE: Effects of interferon-alpha therapy on immune parameters in immune thrombocytopenic purpura. *Autoimmunity* 24(2):81-100, 1996

Czerwionka-Szaflarska M, Chrobot A, Szaflarska-Szczepanik A. Studies of the effectiveness of interferon alpha treatment for chronic hepatitis C in children. *Med Sci Monit*; 6:964-70, 2000

Eglin RP, Lehner T, Subak-Sharpe JH: Detection of RNA complementary to herpes simplex virus in mononuclear cells from patients with Behçet's syndrome and recurrent oral ulcers. *Lancet* 2:1356-61, 1982

Esin S, Gül A, Hodara V, Jeddi-Tehrani M, Dilsen N, Koniçe M, Andersson R, Wigzell H: Peripheral blood T cell expansions in patients with Behçet's disease. *Clin Exp Immunol* 107:520-527, 1997

Frassanito MA, Dammacco R, Cattorio P, Dammacco F: Th1 polarization of the immune response in Behçet's disease: a putative pathogenic role of IL 12. *Arthritis Rheum* 42:1967-74, 1999

Freysdottir J, Lau S, Fortune F. Gammadelta-T-cells in Behçet's disease (BD) and recurrent aphthous stomatitis (RAS). *Clin Exp Immunol* 118:451-7, 1999

Gadina M, Hilton D, Johnston JA, et al. Signaling by type I and II cytokine receptors: ten years after. *Curr Opin Immunol*; 13:363-73, 2001

Gratacos J, Collado A, Filella X, Sanmarti R, Canete J, Llena J, Moli Ballesta A, Munoz-Gomez J: Serum cytokines (IL 6, TNF-alpha, IL-beta and IFN-gamma) in ankylosing spondylitis: a close correlation between serum IL 6 and disease activity and severity. *Br J Rheumatol* 33(10):927-31, 1994

Grunfeld C, Palladino MA: Tumor necrosis factor: Immunologic, antitumor, metabolic and cardiovascular activities. *Adv Intern Med* 35:45-72, 1990

Gül A: Behçet's disease: An update on the pathogenesis. Clin Exp Rheumatol 19:6-12, 2001

Gutterman JU: Cytokine therapeutics: lessons from interferon alpha. Proc Natl Acad Sci 91:1198-1205, 1995

Hall MJ: Herstellung, Reindarstellung und Wirkungsmechanismus von Interferon. Schweiz Rundschau med (Praxis) 79:1441-1451, 1990

Hamazaoui K, Hamazaoui A, Guemira F, Bessioud M, Hamza M, Ayed K: Cytokine profile in Behçet's disease patients. Relationship with disease activity. Scand J Rheumatol 31(4):205-10, 2002

Hamuryudan V, Moral F, Yurdakul S: Systemic interferon α 2a treatment in Behçet's syndrome. J Rheumatol 21:1098-100, 1994

Hamzaoui K, Kahan A, Ayed K, Hamza M: Cytotoxic T cells against herpes simplex virus in Behçet's disease. Clin Exp Immunol 81:390-5, 1990

Heller F, Boirivant M, Mannon P, Blumberg RS, Niewenhaus E, Strober W, Fuss IJ: IL 13 secretion by CD4+CD161+ NK-T cells is increased in oxazolone and human ulcerative colitis (UC). Gastroenterology 124:A-35 (abstract 276), 2003

Hempel G, Galle PR, Lohr HF: Quantitative analysis of specific Th1/Th2 helper cell responses and IgG subtype antibodies in interferon-alpha-treated patients with chronic hepatitis C. J Med Virol 64(3):340-9, 2001

Hirohata S, Oka H, Mizushima Y: Streptococcal-related antigens stimulate production of IL 6 and interferon-gamma by T cells from patients with Behçet's disease. Cell Immunol 140:410-9, 1992

Höhler T, Hug R, Schneider PM, Krummenauer F, Gripenberg-Lerche C, Granfors K, Märker-Hermann E: Ankylosing spondylitis in monozygotic twins: studies on immunological parameters. Ann Rheum Dis 58:435-440, 1999

Horak I, Lohler J, Ma A, Smith KA: Interleukin-2 deficient mice: a new model to study autoimmunity and self-tolerance. Immunol Rev 148:35-44, 1995

International Study Group for Behçet's disease: Criteria for diagnosis of Behçet's disease. Lancet 335:1078-1080, 1990

Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M: Immunologie. 5. Auflage, Spektrum, Heidelberg, Berlin, 2002

Kaneko F, Takahashi Y, Muramatsu R, Adachi K, Miura Y, Nakane A, Minagawa T: Natural Killer cell numbers and function in peripheral lymphoid cells in Behçet's disease. Br J Dermatol 113 :313-318, 1985

Kaser A, Deisenhammer F, Berger T, Tilg H: Interferon beta1b augments activation-induced T-cell death in multiple sclerosis patients. *Lancet* 353:1413-1414, 1999

Kaser A, Nagata S, Tilg H: Interferon alpha augments activation-induced T-cell death by upregulation of Fas (CD95/APO-1) and Fas ligand expression. *Cytokine* 11:736-743, 1999

Khan MA: Ankylosing spondylitis: introductory comments on its diagnosis and treatment. *Ann Rheum Dis* 61:3-7, 2002

Kosar A, Haznedaroglu S, Karaaslan Y, Buyukasik Y, Haznedaroglu IC, Ozath D, Sayinalp N, Ozcebe O, Kirazli S, Dundar S: Effects of interferon-alpha2a treatment on serum levels of tumor necrosis factor-alpha, tumor necrosis factor-alpha2 receptor, interleukin-2, interleukin-2 receptor and E-selectin in Behçet's disease. *Rheumatol Int* 19(1-2):1-4, 1999

Kötter I, Eckstein A K, Stübinger N, Zierhut M: Treatment of ocular symptoms of Behçet's disease with interferon α 2a: a pilot study. *BJO* 82:488-494, 1998

Kötter I, Günaydin I, Zierhut M, Stübiger N: The use of interferon α in Behçet disease: Review of the Literature. *Semin Arthritis Rheum* 33:320-335, 2004a

Kötter I, Stübinger N: Aktuelle Aspekte der Diagnostik und Therapie des Morbus Behçet. *Akt Rheumatol* 24:51-57, 1999

Kötter I, Vonthein R, Müller CA, Günaydin I, Zierhut M, Stübiger N: Behçet's disease in patients of german and turkish origin living in Germany: a comparative analysis. *J Rheumatol* 31:133-9, 2004b

Kötter I, Vonthein R, Zierhut M, Eckstein AK, Ness T, Günaydin I, Grimbacher B, Blaschke S, Peter HH, Stübiger N: Differential efficacy of human recombinant interferon- α 2a on ocular and extraocular manifestations of Behçet disease: results of an open 4-center trial. *Semin Arthritis Rheum* 33:311-319, 2004c

Kötter I, Zierhut M, Eckstein AK, Vonthein R, Ness T, Günaydin I, Grimbacher B, Blaschke S, Meyer-Riemann W, Peter HH, Stübiger N: Human recombinant interferon alfa-2a for the treatment of Behçet's disease with sight threatening posterior or panuveitis. *Br J Ophthalmol* 87:423-431, 2003

Kroemer G, Hirsch F, Gonzalez-Garcia A, Martinez CA: Differential involvement of Th1 and Th2 cytokines in autoimmune diseases. *Autoimmunity* 24:25-33, 1996

Langford CA, Sneller MC: Biologic therapies in the vasculitides. *Curr Opin Rheumatol* 15:3-10, 2003

Lenardo MJ: Interleukin-2 programs mouse $\alpha\beta$ T lymphocytes for apoptosis. *Nature* 353:858-861, 1991

Lighvani AA, Frucht DM, Jankovic D, et al. T-bet is rapidly induced by interferon-gamma in lymphoid and myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci USA*; 98:15137-42, 2001

Mäki-Ikola O, Nissilä M, Lehtinen K, Leirisalo-Repo M, Toivanen P, Granfors K: Antibodies to *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis* in the sera of patients with axial and peripheral form of ankylosing spondylitis. *Br J Rheumatol* 34:413-17, 1995

Marrack P, Kappler J, Mitchell T: Type I interferons keep activated T cells alive. *J Exp Med* 189:521-529, 1999

Mege JL, Dilsen N, Sanguedolce V: Overproduction of monocyte derived tumor necrosis factor α , interleukin (IL) 6, IL 8 and increased neutrophil superoxide generation in Behçet's disease. A comparative study with familial Mediterranean fever and healthy subjects. *J Rheumatol* 20:1544-9, 1993

Mizushima Y, Matsuda T, Hshi K: Induction of Behçet's disease symptoms following dental treatment and streptococcal antigen skin test. *J Rheumatol* 15: 1029-30, 1998

Nicholson LB, Kuchroo VK: Manipulation of the Th1/Th2 balance in autoimmune disease. *Curr Opin Immunol* 8:837-42, 1996

O'Duffy JD, Calamia K, Cohen S, Goronzy JJ, Herman D, Jorizzo J, Weyand C, Matteson E: Interferon- α treatment of Behçet's disease. *J Rheumatol* 25:1938-1944, 1998

O'Shea JJ, Ma A, Lipsky P: Cytokines and autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 2:37-45, 2002

Ohno S, Ohguchi M, Hirose S, Matsuda H, Wakisaka A, Aizawa M: Close association of HLA-Bw51 with Behçet's disease. *Arch Ophthalmol* 100:1455-8, 1982

Raziuddin S, al-Dalaan A, Bahabri S, Siraj AK, al-Sedairy S: Divergent cytokine production profile in Behçet's disease. Altered Th1/Th2 cell cytokine production. *J Rheumatol* 25(2):329-33, 1998

Refaeli Y, Van PL, Abbas AK: Genetic models of abnormal apoptosis in lymphocytes. *Immunol Rev* 169:273-282, 1999

Reuben JM, Lee BN, Johnson H, Fritsche H, Kantarjian HM, Talpaz M. Restoration of Th1 cytokine synthesis by T cells of patients with chronic myelogenous leukemia in cytogenetic and hematologic remission with interferon-alpha. *Clin Cancer Res*; 6:1671-7, 2000

Rigby AS, Chamberlain MA, Bhakta B: Behçet's disease. In: Classification and assessment of rheumatic diseases: Part I Bailliere's clinical rheumatology. 9:375-95, 1995

Romagnani S: Short analytical review: Th1 and Th2 in human diseases. Clin Immunol Immunopathol 80:225-35, 1996

Rudwaleit M, Hohler T: Cytokine gene polymorphisms relevant for the spondylarthropathies. Curr Opin Rheumatol 13(4):250-4, 2001a

Rudwaleit M, Siebert S, Yin Z, Eick J, Thiel A, Radbruch A, Sieper J, Braun J: Low T cell production of TNF α and IFN γ in ankylosing spondylitis: its relation to HLA-B27 and influence of the TNF-308 gene polymorphism. Ann Rheum Dis 60:36-42, 2001b

Sakane T, Suzuki N, Ueda Y: Analysis of interleukin-2 activity in patients with Behçet's disease. Arthritis Rheum 29:371-8, 1986

Sayinalp N, Ozcebe OI, Ozdemir O, Haznedaroglu IC, Dundar S: Cytokines in Behçet's disease. J Rheumatol 23(2):321-2, 1996

Sieper J, Braun J, Rudwaleit M, Boonen A, Zink A: Ankylosing spondylitis: an overview. Ann Rheum Dis 61:8-18, 2002

Sieper J, Braun J: Pathogenesis of spondyloarthropathies. Persistent bacterial antigen, autoimmunity, or both? Arthritis Rheum 35:1547-53, 1995

Skapenko A, Lipsky PE, Kraetsch HG, Kalden JR, Schulze-Koops H: Antigen-independent Th2 cell differentiation by stimulation of CD28: regulation via IL 4 gene expression and mitogen-activated protein kinase activation. J Immunol 166:4283-4292, 2001

Spets H, Georgii-Hemming P, Siljason J, Nilsson K, Jernberg-Wilund H: Fas/APO-1 (CD95)-mediated apoptosis is activated by interferon- γ and interferon- α in IL 6-dependent and IL 6-independent multiple myeloma cell lines. Blood 92:2914-2923, 1998

Stübiger N, Kötter I, Deuter C, Zierhut M: M. Behçet: Uveitis-Therapie mit Interferon- α 2a – prospektive klinische (Pilot-)Studie an 33 Patienten. Klin Monatsbl Augenheilkd 218:768-773, 2001

Su L, David M: Inhibition of B-Cell receptor mediated apoptosis by interferon. J Immunol 162:6317-6321, 1999

Sugi-Ikai N, Nakazawa M, Nakamura S, Ohno S, Minami M: Increased frequencies of interleukin 2 interferon γ -producing T cells in patients with active Behçet's disease. Invest Ophthalmol Vis Sci 39:996-1004, 1998

Suzuki Y, Hoshi K, Matsuda T, Mizushima Y: Increased peripheral blood $\gamma\delta$ + T cells and Natural Killer Cells in Behçet's disease. J Rheumatol 19:588-592, 1992

Tilg H: New insights into the mechanisms of interferon alfa: an immunoregulatory and anti-inflammatory cytokine. *Gastroenterology* 112:1017-1021, 1997

Toussirot E, Lafforgue P, Boucraut J, Despieds P, Schiano A, Bernard P, Acquaviva PC: Serum levels of interleukin 1-beta, tumor necrosis factor-alpha, soluble interleukin2 receptor and soluble CD8 in seronegative spondylarthropathies. *Rheumatol Int* 13(5);175-80, 1994

Treusch Michaela, Kötter Ina: Untersuchung zur Immunantwort bei Patienten mit Morbus Behçet unter einer immunmodulatorischen Therapie mit humanem rekombinantem Interferon alpha 2a. Poster 2001

Van Damme N, De Vos M, Baeten D : Flow cytometric analysis of gut mucosal lymphocytes supports an impaired Th1 cytokine profile in spondyloarthritis. *Ann Rheum Dis* 60: 495-9, 2001

Van der Linden S, Valkenburg HA, Cats A: Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis: a proposal for modification of the New York criteria. *Arthritis Rheum* 27:361-8, 1984

Vazquez-Del MM, Garcia-Gonzalez A, Munoz-Valle JF, Garcia-Iglesias T, Martinez-Bonilla G, Bernard-Medina G, Sanchez-Ortiz A, Ornelas-Aguirre JM, Salazar-Paramo M, Gamez-Nava JI, Gonzalez-Lopez L: Interleukin 1beta (IL 1beta), IL 10, tumor necrosis factor-alpha, and cellular proliferation index in peripheral blood mononuclear cells in patients with ankylosing spondylitis. *J Rheumatol* 29(3):522-6, 2002

Verity DH, Marr JH, Ohno S, Wallace GR, Stanford MR: Behçet's disease, the Silk Road and HLA-B51: Historical and geographical perspectives. *Tissue Antigens* 54:213-20, 1999

Wejstal R, Norkrans G, Lenkei R, Weiland O, Schvarcz R, Fryden A: Peripheral blood lymphocyte subsets in patients with chronic hepatitis C – effects of interferon treatment. *Liver* 12:161-167, 1992

Wills-Karp M, Luyimbazi J, Xu X, Schofield B, Neben TY, Karp CL, Donaldson DD: Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. *Science* 282:2258-2261, 1998

Wolf M, Schimpl A, Hunig T: Control of T cell hyperactivation in IL 2-deficient mice by CD4+CD25- and CD4+CD25+ T cells: evidence for two distinct regulatory mechanisms. *Eur J Immunol* 6:1637-1644, 2001

Yamashita N, Kaneoka H, Kaneko S, Takeno M, Oneda K, Koizumi H, Kogure M, Inaba G, Sakane T: Role of $\gamma\delta$ T lymphocytes in the development of Behçet's disease. *Clin Exp Immunol* 107:241-247, 1997

Zierhut M, Saal JG, Pleyer U, Kötter I, Dürk H, Fierlbeck G: Behcet's disease: epidemiology and eye manifestations in German and Mediterranean patients. *Germ J Ophthalmol* 4:246-251, 1995

Zou J, Braun J, Sieper J: Immunological basis for the use of TNF α -blocking agents in ankylosing spondylitis and immunological changes during treatment. *Clin Exp Rheumatol* 20:34-37, 2002a

Zou J, Rudwaleit M, Brandt J, Thiel A, Braun J, Sieper J: Down-regulation of the nonspecific and antigen-specific T cell cytokine response in ankylosing spondylitis during treatment with infliximab. *Arthritis Rheum* 48:780-790, 2003

Zou J, Rudwaleit M, Brandt J, Thiel A, Braun J, Sieper J: Up regulation of the production of tumor necrosis factor α and interferon γ by T cells in ankylosing spondylitis during treatment with etanercept. *Ann Rheum Diss* 48:561-564, 2002b

Danken möchte ich...

...Frau PD Dr. med Ina Kötter für die Überlassung des interessanten Themas, die stets weiterführenden Ratschläge und die überaus engagierte Zusammenarbeit.

...Frau Dr. med. Michaela Amberger für die hervorragende fachliche Betreuung, die viele Zeit besonders in der Einarbeitungsphase und die mentale Unterstützung.

...Frau Sylvia Koch für die Einführung in die Methodik der Lymphozytenisolierung.

...der gesamten Rheumaambulanz und insbesondere Herrn PD Dr. med Ilhan Günaydin für die Unterstützung und die Zurverfügungstellung der Patienten.

...allen Patienten und gesunden Personen für ihr Einverständnis an dieser Arbeit mitzuwirken.

...Herrn Dr. med. R. Vonthein für die Hilfe bei der statistischen Auswertung.

...meinen Eltern, die mir mein Studium ermöglicht haben und jederzeit für mich da sind.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Stefanie Philippine Groll
Geburtsdatum	28.06.1978
Geburtsort	Ravensburg

Schulbildung

1984-1988	Grundschule in Ravensburg
1988-1998	Albert-Einstein-Gymnasium Ravensburg Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
1994-1995	North Central High School, Indianapolis, USA
1998-1999	Auslandsaufenthalt als Au-pair in Rom mit Sprachschule

Hochschulbildung

03/1999	Aufnahme des Medizinstudiums an der Karl- Eberhard-Universität in Tübingen
22.03.2001	Ärztliche Vorprüfung
21.03.2002	1. Staatsexamen
07.09.2004	2. Staatsexamen
29.11.2005	3. Staatsexamen

Berufliche Nebentätigkeiten

1996-1997	Ausbildung zur Rettungssanitäterin in der DRK-Landesschule Pfalzgrafenweiler
1993-2000	Ehrenamtliche Mitarbeit im Sanitäts- und Rettungsdienst bei der Johanniter-Unfall-Hilfe Ravensburg
2000-2003	Extra- und Nachtwache als Pflegehelferin der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen, zuletzt 8 Monate auf der Station für Knochenmarkstransplantation

