

**Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen
Abteilung Innere Medizin II
(Schwerpunkt: Onkologie, Hämatologie, Klinische Immunologie,
Rheumatologie und Pulmologie)
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. L. Kanz
Sektion Transplantationsimmunologie und Immunhämatologie
Leiterin: Professor Dr. C. Müller**

Nachweis von IFN- γ in Granulozyten bei Morbus Behçet Patienten

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Sascha Marc Hoffmann
aus
Nagold**

2013

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. C. Müller

2. Berichterstatter: Professor Dr. T. Wieder

Meiner Familie und meinen beiden besten Freunden Kai und Oli

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	6
1.1. Definition und Diagnose des Morbus Behçet	6
1.1.1. Definition des Morbus Behçet	6
1.1.2. Diagnose der Erkrankung	7
1.2. Epidemiologie des Morbus Behçet	12
1.3. Ätiologie	12
1.4. Klinischer Verlauf und Prognose	15
1.5. Neutrophile Granulozyten und Interferon-γ	16
1.6. Therapie des Morbus Behçet	18
1.7. Fragestellung	19
2. MATERIAL UND METHODEN	20
2.1. Material	20
2.1.1. Chemikalien	20
2.1.2. Antikörper	21
2.1.3. Geräte	22
2.1.4. Proben von Patienten und Kontrollpersonen	23
2.2. Methoden	25
2.2.1. Zellgewinnung und Aufbereitung	25
2.2.1.1. Granulozytenisolierung über Polymorphprep TM	25
2.2.1.2. Bestimmung des Anteils vitaler Granulozyten	26
2.2.2. Durchflusszytometrie	26
2.2.2.1. Allgemeines	26
2.2.2.2. Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe	30
2.2.2.3 Stimulation der Neutrophilen mit fMLP (Formyl-Methionin-Leucin-Phenylalanin)	31
2.2.2.4. Indirekte Immunfluoreszenzanalyse	31
2.2.2.5. Doppelimmunfluoreszenzmarkierung von Zellen	32
2.3 Statistik	34

3. ERGEBNISSE	35
3.1. Phänotypischer Vergleich von Aktivierungsantigenen auf neutrophilen Granulozyten von Patienten mit M. Behçet und gesunden Kontrollpersonen	35
3.1.1. Expression der CD11a und CD11b Adhäsionsmoleküle	35
3.1.2. Expression des Differenzierungsantigens CD15	38
3.1.3. Expression des myeloischen Differenzierungsantigens CD33	40
3.1.4. Expression des Antigens CD83	42
3.2. Durchflusszytometrische Bestimmung der intrazellulären Expression von Interferon-γ der angereicherten Granulozytenfraktion	44
3.2.1. Intrazelluläre Expression von Interferon- γ in neutrophilen Granulozyten bei Patienten mit M. Behçet im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen	44
3.2.2. Intrazelluläre Expression von Interferon- γ in neutrophilen Granulozyten nach Stimulation mit fMLP bei Patienten mit M. Behçet im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen	46
4. DISKUSSION	50
5. ZUSAMMENFASSUNG	54
6. LITERATURVERZEICHNIS	55
7. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	64
8. TABELLENVERZEICHNIS	65
9. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	66
10. DANKSAGUNGEN	68
11. LEBENSLAUF	69

1. EINLEITUNG

1.1. Definition und Diagnose des M. Behçet

1.1.1. Definition des M. Behçet

Der M. Behçet ist eine chronisch inflammatorische Systemerkrankung, die, ausgehend von einer leukozytoklastischen Vaskulitis, Blutgefäße jeglicher Größe betreffen kann (Michealson und Chisari et al. 1982). Erstmals als eigene spezifische Krankheitsentität wurde der M. Behçet bereits von Hippokrates im antiken Griechenland des fünften Jahrhunderts vor Christus (Friegebenbaum et al. 1956) beschrieben.

Eine genauere Charakterisierung der Symptome geht auf Beobachtungen von Shigita (Shigita 1924), Adamantis (Adamantis 1931) und Whitwell (Whitwell 1934) zu Beginn des 20. Jahrhunderts zurück. Zum Namensgeber des Krankheitsbildes wurde der türkische Dermatologe Hulusi Behçet. Er beschrieb die Krankheit auf Grund seiner Beobachtungen an zwei Patienten als eine Triade aus rezidivierend auftretenden oralen und genitalen Aphthen (Schleimhautläsionen), sowie einer Uveitis (Entzündung der vorderen Augenkammer) mit Hypopyon (Eiteransammlung in der Augenvorderkammer) (Behçet 1937). Eine retinale Vaskulitis am Auge kann ohne Behandlung rasch zur Erblindung führen.

Der dem Krankheitskreis der Vaskulitiden zuzurechnende M. Behçet äußert sich jedoch nicht nur in den bei fast jedem Patienten feststellbaren Schleimhautläsionen (Aphthen) und einer Augenbeteiligung, sondern kann sich mit wechselnder Häufigkeit an vielen anderen Organen, wie den Gelenken, dem Darm oder dem zentralen Nervensystem manifestieren.

Eine leukozytoklastische Vaskulitis steht dabei auch dort als anatomisches Substrat im Vordergrund (Hamza et al. 1986).

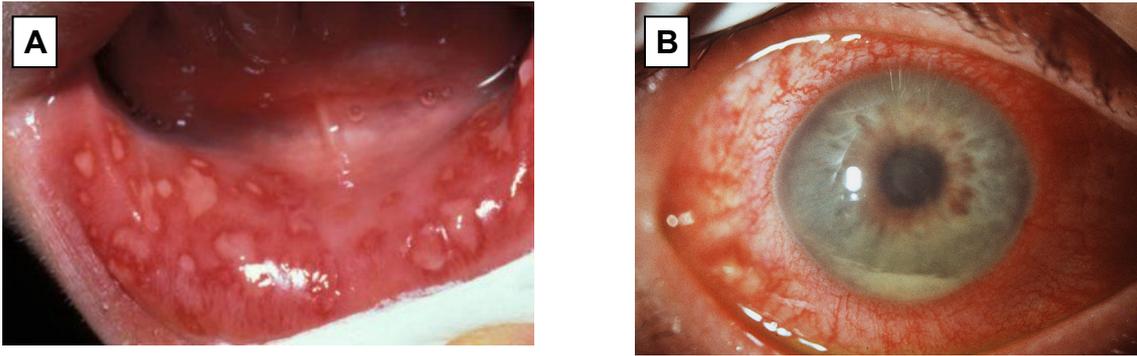


Abbildung 1:

A Orale Aphthen

(http://www.medizin.uniteuebingen.de/Patienten/Kliniken/Augenheilkunde/Augenklinik/Uveitis_Sprechstunde/Morbus+Behcet.html)

B Uveitis mit Hypopyon

(<http://img.medscape.com/pi/emed/ckb/ophthalmology/1189694-1209595-894tn.jpg>)

1.1.2. Diagnose der Erkrankung

Die Pathogenese der Erkrankung ist weiterhin nicht geklärt.

Es existiert daher noch kein pathognomonischer Labortest für den sicheren Nachweis eines M. Behçet. Die Diagnosestellung erfolgt vorwiegend anhand systemisch und okulär erhobener klinischer Befunde (Bonfioli et al. 2005).

In den akuten Phasen der Erkrankung findet man meist im Blut laborchemisch eine erhöhte Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG), ein erhöhtes C-reaktives Protein (CRP), sowie eine Leukozytose (Sobel et al. 1977) als Zeichen akuter Entzündung.

Bis ins Jahr 1990 wurden unterschiedlichste, international stark abweichende Kriterien zur Diagnosestellung des M. Behçet angewandt. Dies hatte problematische Folgen insbesondere im Hinblick auf Vergleichbarkeit und Interpretation internationaler Studien. Infolgedessen waren klinische und wissenschaftliche Fortschritte zur Therapie des M. Behçet erheblich erschwert. Eine international renommierte Studiengruppe beschloss 1990 standardisierte Kriterien zur Diagnose des M. Behçet vorzuschlagen, die im selben Jahr in der Fachzeitschrift

The Lancet publiziert wurden und bis heute breite Anwendung finden (Internationale Studiengruppe 1990).

Sie enthalten das Vorhandensein oraler Ulzeration plus zwei der folgenden Symptome: Genitale Ulzeration, spezifisch definierte Augenläsionen oder einen positiven Pathergietest (International Study Group for Behçet's Disease 1990).

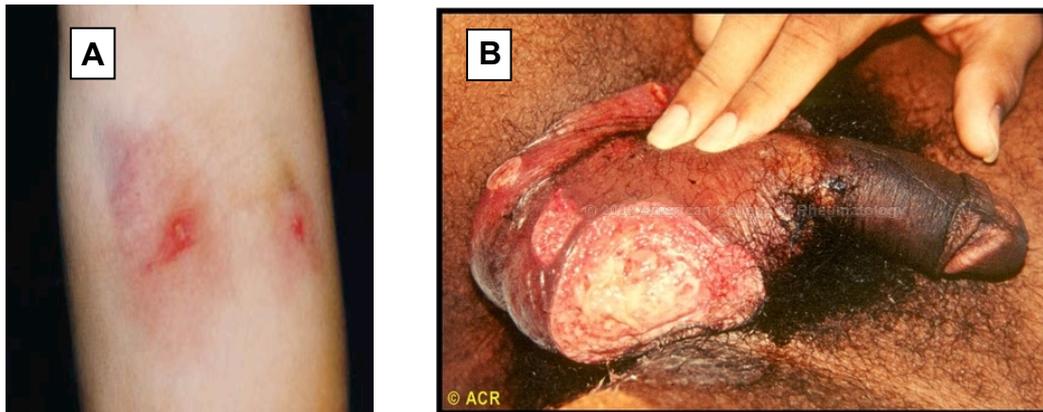


Abbildung 2:

A Pathergie Test

(<http://www.medizin.uni-tuebingen.de/webim2/images/behcet12.jpg>)

B Genitale Aphten

(http://images.rheumatology.org/image_dir/album75674/md_01-12-0046.jpg)

Der Pathergie Test ist als ein Diagnosekriterium des M. Behçet seit 1937 anerkannt (Blobner 1937). Seine Bedeutung wurde sowohl vom „Behçet's Disease Research Committee of Japan“, als auch von der „International Study Group of Behçet's Disease“ (Behçet's Disease Research Committee of Japan 1972; The International Study Group for Behçet's Disease 1990) anerkannt. Letztere gibt für die Durchführung des Tests an, dass eine 20-Gauge oder kleinere Nadel intradermal, schräg unter sterilen Bedingungen in den gebeugten Unterarm eingestochen werden soll. Nach 24 bis 48 Stunden soll die Stelle von einem Arzt auf Entwicklung von Rötung, Papel oder Pustel kontrolliert werden („The International Study Group for Behçet's Disease“ 1990).

Eine positive Pathergie Reaktion, die nach diesem Zeitraum zu den genannten Effloreszenzen führt, scheint für den M. Behçet spezifisch zu sein. Sie steht nicht in Zusammenhang mit der klinischen Variabilität oder der Ausprägung der Krankheit und lässt sich auch nur bei einem Teil der Patienten auslösen. Sie wird jedoch meistens nur in der aktiven Phase der Krankheit beobachtet (Chang et al. 2002).

Tabelle 1:

Häufigkeit der unterschiedlichen Symptome von M. Behçet Patienten in Japan, Deutschland, Türkei und Griechenland (Sakane et al. 1999)

	Japan	Japan	Deutschland	Türkei	Griechenland
	1972	1991	1996	1993	1997
	(N=2031)	(N=3316)	(N=130)	(N=496)	(N=64)
Symptom	Prozentualer Anteil der Patienten				
Diagnostisch					
Orale Ulzeration	96	98	98	100	100
Genitale Ulzeration	72	73	79	77	78
Augenläsion	67	69	48	47	75
Hautläsion	83	87	73	78	94
Positiver Pathergie Test	75	44	53	nicht erhoben	30
Andere					
Arthritis	54	57	59	47	48
Epididymitis	6	6	32	nicht erhoben	17
Gastrointestinale Läsion	25	16	nicht erhoben	5	3

ZNS Symptomatik	13	11	nicht erhoben	8	20
Vaskuläre Läsionen	7	9	nicht erhoben	38	8

Tabelle 2:*Diagnosekriterien des M. Behçet**(nach der "International Study Group for Behçet's Disease")*

Diagnosekriterien der „International Study Group for Behçet's Disease“ von 1990	
rezidivierende orale Aphthose	kleine oder große aphthöse oder herpetiforme Ulzerationen an der Mundschleimhaut, von einem Arzt oder Patienten beobachtet, die mindestens dreimal in einer 12-monatigen Periode wiederkehren
<i>plus 2 der folgenden Symptome:</i>	
rezidivierende genitale Läsionen	aphthöse Ulzerationen oder Vernarbungen an den Genitalien, von einem Arzt oder Patienten beobachtet
Augenläsionen	Uveitis anterior, Uveitis posterior oder Zellen im Glaskörper bei der Spaltlampen-Untersuchung oder retinale Vaskulitis, von einem Ophthalmologen beobachtet
Hautläsionen	Erythema nodosum, durch Arzt oder Patient beobachtet, Pseudofollikulitis oder papulopustulöse Läsionen oder akneiforme Knötchen bei postadoleszenten Patienten ohne Steroidtherapie

positiver Pathergie-Test	intrakutaner Nadelstich mit einer 20 G Kanüle am Unterarm (Innenseite) abgelesen durch einen Arzt nach 24 - 48 Stunden
--------------------------	---

1.2. Epidemiologie des M. Behçet

Patienten mit einem M. Behçet finden sich vor allem entlang der ehemaligen Seidenstraße. Die Prävalenz ist von Ostasien zum Mittelmeerraum (100-1.000/1.000.000) verglichen mit jener bei Einwohnern Großbritanniens oder auch Nordamerikas (1-2/1.000.000) um ein Vielfaches erhöht (Suzuki Kurokawa et al. 2004). Die höchste Prävalenz findet sich dabei in der Türkei. Auch eine, wenngleich selten auftretende familiäre Häufung in den endemischen Gebieten ist beschrieben (Aolu K et al. 1978, Kötter et al. 2001).



Abbildung 3:

Verlauf der Seidenstraße

(http://www.silkroadproject.org/Portals/0/images/lg_SilkRoadWallMap_color.jpg)

In Deutschland schätzt man die Häufigkeit des M. Behçet auf etwa 6 Fälle pro 1.000.000 Einwohner. Diese Häufigkeitsangabe ist aber wahrscheinlich falsch niedrig, da der M. Behçet hierzulande, insbesondere bei Patienten deutscher Abstammung, wenn überhaupt, erst zu einem sehr viel späteren Zeitpunkt und

meistens erst im fortgeschrittenen Krankheitsstadium diagnostiziert wird (Kötter et al. 1999).

Die Krankheit wird insgesamt häufiger bei Männern als bei Frauen beobachtet (ungefähr im Verhältnis 3:2) und betrifft typischerweise junge Erwachsene (Yurdakul et al. 1988, Bonfioli et al. 2005). Der Altersgipfel liegt zwischen dem 20. bis 40. Lebensjahr (Shek et al. 1999; Kone-Paut et al. 1998; Mavioglu 1958). Ein bereits im Jugend- oder sogar Kindesalter auftretender M. Behçet zeigt meist einen wesentlich aggressiveren Krankheitsverlauf (Gürler et al. 1997).

1.3. Ätiologie

Ging Hulusi Behçet 1937 noch von einer viralen Ursache des von ihm beschriebenen Symptomenkomplexes aus, so ist die genaue Ätiologie und Pathogenese des M. Behçet auch heute, über 70 Jahre später, nur unvollständig verstanden.

Der M. Behçet manifestiert sich als leukozytoklastische Vaskulitis. Dabei sind im Gegensatz zu den meisten anderen Vaskulitiden sowohl Arterien als auch Venen betroffen (Pay et al. 2007).

Die Histopathologie am Auge während einer akut inflammatorischen Phase der Krankheit wurde als neutrophile Vaskulitis in der Iris, im Ziliarkörper und der choroidalen Retina mit perivaskulärer und diffuser Infiltration des uvealen Gewebes mit neutrophilen Granulozyten beschrieben. Während der Remission soll sich eine perivaskuläre Infiltration von Lymphozyten und Plasmazellen weiterhin beobachten lassen (Proenca et al. 1996).

Infiltrate von Granulozyten, aber auch T- und B-Zellen wurden in basalen Schichten von Hautläsionen, Ulzerationen der Schleimhäute und beim Pathergietest beschrieben (Michaelson 1993).

Obwohl die Ätiologie der Erkrankung noch immer unbekannt ist, wird das Vorhandensein eines auslösendes Agens, das bei Vorliegen einer genetischen Disposition zu einer generalisierten Vaskulitis führt, postuliert. Vermutlich liegt eine multifaktorielle Genese mit einer genetischen Disposition (HLA-B*51 oder ein anderes in der Nähe zum HLA-B Locus liegendes Gen auf dem Chromo-

som-6) und einer initialen Triggerung durch einen Erreger, dessen Identität bis heute unklar ist, zu Grunde. Auch andere Umwelteinflüsse werden diskutiert.

Es wurde gezeigt, dass das Vorkommen des HLA Antigens B*51 in 60-80% mit der Krankheit assoziiert ist. Dies trifft geographisch vor allem auf die Länder zu, die zwischen dem 30° und 45° nördlichen Breitengrad entlang der früheren „Seidenstraße“ liegen (siehe oben) (Ohno et al. 1982; Verity et al. 1999).

Die Prävalenz eines familiären M. Behçet liegt zwischen 1 – 18 %. Das Vorkommen von beteiligten Familienmitgliedern unterstützt eine genetische Hypothese (Arber et al. 1991; Akpolat et al. 1992; Kone-Paut et al. 1999; Gul et al. 2000; Nishiyama et al. 2002)

Das relative Erkrankungsrisiko unter Geschwistern wurde auf 11,4 - 52,5 geschätzt (Gul et al. 2000).

Außerdem werden als Auslöser unterschiedliche virale und bakterielle Antigene diskutiert, insbesondere Herpesviren und Streptokokken (Eglin et al. 1982; Mizushima et al. 1988; Hamzaoui et al. 1990; Hirohata et al. 1992).

Aus der Mundhöhle von Behçet-Patienten ließ sich *Streptococcus sanguis* isolieren und führte in vitro zu einer gesteigerten Immunantwort der Lymphozyten (Kurauchi et al. 2005).

Bei Patienten mit hauptsächlich Gelenkbeteiligung konnte die Therapie mit Antibiotika die Häufigkeit der Schübe deutlich reduzieren. Dies deutet so ebenfalls auf eine bakterielle Genese hin (Calguneri et al. 1996; Kaneko et al. 1997). Yoshikawa et al. (1996) wiesen einen erhöhten Antikörpertiter und eine Hypersensitivität vom verzögerten Typ gegen Streptokokken-Antigene bei Morbus Behçet im Vergleich zu gesunden Probanden nach.

Weitere Studien konnten bei an M. Behçet erkrankten Patienten jedoch auch Antikörper gegen Herpes simplex Virus Typ 1 und vermehrt Herpes simplex-DNA im Speichel und in den Hautläsionen nachweisen (Lee et al. 1996; Tojo et al. 2003).

Als weitere mögliche Erreger gelten das Parvovirus B 19, *Helicobacter pylori* und *Borrelia burgdorferi* (Lehner et al. 1991; Kiraz et al. 1996; Aksu et al. 1999; Avci et al. 1999; Onder et al. 2001).

Es wurde ferner berichtet, dass T-Lymphozyten eine zentrale Rolle in der Pathogenese spielen könnten. Beschrieben wurde eine Verminderung der CD4⁺-, eine Vermehrung der CD8⁺-Zellen, sowie 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 positive NK-Zellen erhöht (Kaneko et al. 1985; Suzuki et al. 1992; Freysdottir et al. 1999).

Weitere wichtige Faktoren in der Pathogenese der Erkrankung scheinen immunologische Mechanismen, wie eine gesteigerte Monozytenfunktion, eine Erhöhung zahlreicher Zytokine, wie IL-1, IL-8, IL-17 und TNF-α, zu sein (Sayinalp et al. 1996; Yamashita et al. 1997; Frassanito et al. 1999; Freysdottir et al. 1999; Kosar et al. 1999).

Einige Autoren postulierten einen Anstieg von Zytokinen aus Th2-Lymphozyten (IL-4, IL-6 und IL-10) im Serum und auch eine Beteiligung der Th2 Zellen an der Pathogenese des M. Behçet (Guenane et al. 2006; Hamzaoui et al. 2002).

Im Gegensatz dazu wurde von Frassantino et al. (1999) und auch Freysdottir et al. (1999) kein Unterschied der T-Zell-Produktion von IL-4 und IL-10 im Vergleich zu gesunden Kontrollen festgestellt.

Widersprüchliche Berichte gibt es auch 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.

Bei M. Behçet-Patienten soll es eine Imbalance zwischen Th1- und Th2- T-Zell-Populationen in der Immunantwort mit Steigerung der Th1 –Zellpopulation geben (Turan et al. 1997; Direskeneli et al. 1999).

Unabhängig von der erworbenen Immunität gibt es auch Hinweise dafür, dass Störungen in der angeborenen Immunität von Bedeutung sind. Weitere Faktoren in der Pathogenese scheinen Störungen an der Gefäßwand zu sein, wobei insbesondere über eine Endotheldysfunktion und vermehrte NO-Freisetzung berichtet wurde (Evereklioglu et al. 2002).

1.4. Klinischer Verlauf und Prognose

Neben den primären Prädilektionsstellen an Haut und Schleimhäuten findet sich bei 70-80% der Patienten mit M. Behçet eine okuläre Manifestation (Suzuki et al. 2004). Eine Beteiligung des Intestinums und des Zentralen Nervensystems deutet meist auf eine eher ungünstige Prognose hin.

Während eine Beteiligung des ZNS, die in Form einer nekrotisierenden Vaskulitis zum Tode führt, wechselhaft beobachtet wird, gehen Manifestationen an den Augen in Form einer Retinitis meist rasch mit einem Verlust des Visus einher. Thrombotische Syndrome und arterielle Aneurysmata mit einem hohen Rupturrisiko stellen weitere lebensbedrohliche Komplikationen der Erkrankung dar. Trotz der Fortschritte in der Behandlung sind Rückfälle nach Remission häufig und die systemische Erkrankung bleibt verbunden mit einer ungünstigen Prognose (Störk et al. 2008).

Obwohl die Behandlung des M. Behçet bisher nicht kausal erfolgt, konnte in den vergangenen Jahren gezeigt werden, dass eine frühe, effektive und dauerhafte Behandlung der akut entzündlichen Läsionen dazu beiträgt, die Zahl der Rückfälle zu verringern, die Beschwerden zu vermindern und das „Outcome“ zu verbessern (Gul 2007).

Das Vorliegen von HLA-B*51 scheint mit einer schlechteren Prognose assoziiert zu sein (Zouboulis et al. 1993).

1.5. Therapie des M. Behçet

Die Therapie des M. Behçet richtet sich nach der im Vordergrund stehenden Organmanifestation und hierbei jeweils nach der schwersten bzw. der prognostisch ungünstigsten. Die Empfehlungen der EULAR (European League Against Rheumatism) zur Behandlung des M. Behçet wurden 2008 publiziert.

Therapeutisch werden bei leichten Krankheitsmanifestationen niedrig dosierte Steroide und Colchicin eingesetzt, bei mittelgradigen Manifestationen Azathioprin und Steroide, alternativ dazu Cyclosporin A und Steroide. Bei schweren Manifestationen erfolgt die Interferon- α , TNF-Antagonisten oder Zystostatikagabe. In Studien werden aktuell Interleukin-1-Antagonisten erprobt (Kötter et al. 2012).

<p>Jeder Patient mit Morbus Behçet und entzündlicher Augenerkrankung, die den hinteren Augenabschnitt betrifft, sollte ein Therapieregime unter Einschluss von systemischen Glukokortikosteroiden und Azathioprin erhalten</p>	
<p>Wenn der Patient eine schwere Augenbeteiligung hat, definiert als >2 Linien Abfall des Visus auf einer 10/10-Skala, und/oder retinale Beteiligung (retinale Vaskulitis oder Beteiligung der Makula), wird empfohlen, entweder Cyclosporin A oder Infliximab in Kombination mit Azathioprin und GC einzusetzen, alternativ kann Interferon-α mit oder ohne GC eingesetzt werden</p>	
<p>Es gibt keine klare Evidenz für die Behandlung der Beteiligung großer Gefäße. Für die Behandlung der tiefen Venenthrombose werden Immunsuppressiva wie GC, AZA, CYC oder CSA empfohlen, Für die Behandlung sowohl pulmonalarterieller als auch peripher arterieller Aneurysmen werden CYC und GC empfohlen</p>	
<p>Ebenso gibt es keine kontrollierten Daten über oder Evidenz für den Nutzen von Antikoagulanzen, Thrombozytenaggregationshemmern oder Fibrinolytika bei den venösen Thrombosen oder arteriellen Läsionen</p>	
<p>Es gibt keine evidenzbasierte Behandlung, die für die gastrointestinale Beteiligung empfohlen werden könnte. Substanzen wie Sulfasalazin, GC, AZA, TNF-Antagonisten und Thalidomid sollten vor evtl. Chirurgie versucht werden, außer in Notfällen</p>	
<p>Bei den meisten Patienten kann die Arthritis mit Colchicin beherrscht werden</p>	
<p>Es gibt keine kontrollierten Daten zur Behandlung der ZNS-Beteiligung. Für die parenchymatöse Beteiligung sollten die Substanzen, die versucht werden, GC, IFN-α, AZA, CYC, MTX und TNF-Antagonisten beinhalten. Für die Sinusvenenthrombose werden GC empfohlen</p>	
<p>Cyclosporin A sollte nicht bei Patienten mit Morbus Behçet und ZNS-Beteiligung eingesetzt werden, außer wenn es für die Behandlung der Augenbeteiligung unerlässlich ist</p>	
<p>Die Entscheidung, eine Haut- und Schleimhautbeteiligung zu behandeln, hängt von der durch den Arzt und Patienten eingeschätzten Schwere ab. Die mukokutane Beteiligung</p>	<p>Topische Behandlung (z. B. lokale GC) sollte die Erstlinientherapie für isolierte orale und genitale Ulzera sein</p>

sollte nach den dominanten und kodominanten Manifestationen behandelt werden	<p>Akneartige Läsionen sind normalerweise nur kosmetisch störend. Deshalb sind hier topische Maßnahmen ausreichend</p> <p>Colchicin sollte bevorzugt werden, wenn die dominante Läsion ein Erythema nodosum ist</p> <p>Ulcera crurum bei Morbus Behçet können unterschiedliche Ursachen haben. Die Behandlung sollte sich hiernach richten</p> <p>AZA, IFN-α und TNF-Antagonisten können in therapierefraktären Fällen in Erwägung gezogen werden</p>
--	---

In der Tabelle verwendete Abkürzungen: GC Glukokortikosteroide, AZA Azathioprin, CYC Cyclophosphamid, CSA Cyclosporin A, MTX Methotrexat.

Abb. 4 EULAR Empfehlungen für die Behandlung des Morbus Behçet (Hatami et al. 2008) modifiziert nach Kötter et al. 2012

1.6. Neutrophile Granulozyten und Interferon- γ

Neutrophile Granulozyten gelten als essentielle Effektorzellen der angeborenen Immunität, da sie durch Killing und Phagozytose von Mikroorganismen eine sofortige Beseitigung von Pathogenen vermitteln können. Aktuelle Studien konnten zeigen, dass sie in der Lage sind mit dendritischen Zellen zu kommunizieren, die nach heutigem Verständnis ein Bindeglied zwischen angeborener und erworbener Immunität darstellen. Diese Kommunikation soll durch Zelloberflächen-Rezeptoren wie Mac-1 und CEA (carcinoembryonic antigen)-related „Cellular adhesion molecule“ auf neutrophilen Granulozyten und C-Type Lektinen auf dendritischen Zellen ermöglicht werden. Es scheint auch gesichert, dass dendritische Zellen umgekehrt die Lebensspanne von Neutrophilen durch Interaktion verlängern können, so wie auch Neutrophile eine durch dendritische Zellen vermittelte Aktivierung erworbener T-Zell Antworten steuern können sollen

(Ludwig et al. 2006). In einer neuen Studie wurde postuliert, dass Granulozyten bei Degranulierung oder Absterben eine Vielfalt von „Alarminen“ freisetzen, die dendritische Zellen mobilisieren und aktivieren können (Yang et al. 2009).

Interferon- γ ist ein Zytokin, das von T-Zellen und NK-Zellen nach Kontakt mit antigenpräsentierenden Zellen nach vorangegangener Antigenphagozytose gebildet wird. CD4-positive T-Zellen, CD8-positive T-Zellen, sowie Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) können Interferon- γ produzieren. Die Stimulation zur Produktion und Ausschüttung von Interferon- γ erfolgt nach spezifischer Antigenpräsentation und Erkennung durch dendritische Zellen, Monozyten und B-Zellen.

Neutrophile Granulozyten zeigen nach Inkubation mit Interferon- γ eine gesteigerte Phagozytose, eine gesteigerte Aktivität ihrer «oxidativen Burst» Aktivität, vermehrte Proteinsynthese, eine gesteigerte Degranulation, vermehrte Chemotaxis, erhöhte mikrobizide Aktivität und eine Steigerung der Antikörper abhängigen Zytotoxizität (Melby et al. 1982, Shalaby et al. 1985). Neben NK-Zellen (Fehninger et al. 2000) und T-Zellen (Ariel et al. 2002), sollen auch Makrophagen (Munder et al. 1998), B-Lymphozyten (Yoshimoto et al. 1997) und eosinophilen Granulozyten (Woerly et al. 1999) an der Interferon- γ Produktion beteiligt sein.

Beim M. Behçet stellt die Hyperaktivität der Neutrophilen ein auffallendes und bisher ungeklärtes Phänomen unter den beobachtbaren immunologischen Veränderungen dar. Die Hyperaktivität ist gekennzeichnet durch Chemotaxis, Phagozytose, verstärkte Bildung von Superoxiden und Myeloperoxidase, sowie eine erhöhte Expression von CD11a, einem Adhäsionsmolekül, CD10 und CD14 auf der Zelloberfläche (Zierhut et al. 2003).

Cassatella et al. (1999) und Yamashiro et al. (2001) beschrieben, dass neutrophile Granulozyten nach Aktivierung durch Zytokine eine verlängerte Lebenszeit, sowie Veränderungen der Expression von Oberflächenmolekülen, wie z.B. CD 40 und CD 83, ähnlich wie dendritische Zellen aufweisen können und verstärkt proinflammatorische Zytokine, wie IL-1, IL-1Ra und MIF produzieren.

Aktivierete Neutrophile sezernieren damit Zytokine, die in einem positiven Feed-Forward sie selbst und ebenso Th1 Zellen stimulieren können.

Die Ursache der Hyperaktivität der Granulozyten beim M. Behçet ist bisher nicht entschlüsselt ist. Grundsätzlich könnte es sich um eine intrinsische Eigenschaft der Granulozyten handeln, wie sie nach heutiger Kenntnis durch epigenetische Veränderungen vermittelt werden könnte.

Denkbar sind aber auch extrinsische Faktoren, die von NK-Zellen und dendritischen Zellen als möglichen Sensoren im Gewebe, oder auch epithelialen Zellen in ihrer Barriere- und Schutzfunktion gegenüber eindringenden Mikroorganismen abgegeben werden und auf Neutrophile Einfluss nehmen. So sind vermutlich auch IL-17/IL-23 als wichtige pro-inflammatorische Zytokin- Achse und Kaskade bei M. Behçet betroffen.

1.7. Fragestellung

Ausgehend von Beobachtungen in Voruntersuchungen sollte in dieser Arbeit weiter überprüft werden, ob die Aktivierung und Hyperreaktivität der Granulozyten bei Patienten mit M. Behçet mit einer Expression von Interferon- γ als immunmodulatorischem Zytokin in Zusammenhang steht. Hierzu sollten Immunfluoreszenzanalysen an Granulozyten, die aus Blut angereichert wurden, für die Expression von Aktivierungsmarkern und intrazellulärer Produktion von Interferon- γ am Durchflusszytometer durchgeführt werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien

Lösungsmittel wurden von Merck (Darmstadt), Chemikalien von den unten stehenden Herstellern erworben.

Tabelle 3:

Hersteller der verwendeten Chemikalien und Materialien

ABC Kit Vectastain	Vectorlab, Peterborough, UK
AEC Substrat Kit	Vectorlab, Peterborough, UK
Brefeldin A (Penicillium brefeldianum)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
BSA (Bovines Serumalbumin)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
FCS (Fetales Kälberserum)	CC-Pro, Neustadt
fMLP (Formyl-Methionin-Leucin-Phenylalanin)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Formalin 10%	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Heparin-Natrium 10 000 IE/ml 10ml Röhrchen	B. Braun AG, Melsungen
Multiscore 96 Patte	Millipore, Schwalbach
PBS („Phosphate buffered Saline“)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Polyglobin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Polymorphprep™	Axis-Shield, Oslo, Norwegen
96 Well-Platten	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

2.1.2. Antikörper

Unten aufgeführt sind Herkunft und Spezifität der verwendeten primären Antikörper. Es handelt sich um monoklonale Antikörper aus der Maus. Ein Teil der Antikörper wurde käuflich als direkt markierte Antikörper mit Kopplung an Fluoreszenzfarbstoffe erworben. Die übrigen Antikörper standen unmarkiert als vorgefertigte Hybridomüberstände aus der Sektion für Transplantationsimmunologie und Immunhämatologie zur Verfügung und wurden für indirekte Färbungen verwendet. Für die Detektion der Bindung der monoklonalen unmarkierten Primärantikörper in Immunoassays wurde der in Tabelle 4 genannte polyklonale FITC markierte Antikörper gegen Mausimmunoglobuline verwendet.

Tabelle 4:

Verwendete primäre und sekundäre Antikörper

Antikörper (Klon)	Spezifität	Herkunft	Markierung	Referenz
W6/32.HL	Anti-human MHC Klasse I	Hybridomüberstand	unmarkiert	Barnstable et al. 1978
W6/32.HK	inaktive Variante von W6/32.HL	Hybridomüberstand	unmarkiert	Ziegler und Milstein 1979
My 9	Anti-CD33	Hybridomüberstand	unmarkiert	Wellhausen et al. 1995
80H3	Anti-CD66b	Serotec, Düsseldorf	unmarkiert	Mannoni et al. 1982
11C2	Anti-CD11b	Hybridomüberstand	unmarkiert	Springer et al. 1979
80H3	Anti-CD66b	Serotec, Düsseldorf	FITC	Mannoni et al. 1982
HB15e	Anti-CD83	Serotec, Düsseldorf	FITC	Zhou et al. 1992
4S.B3	Anti-human IFN γ	Becton Dickinson	PE/Cy7	Miller et al. 2004
38	Anti-CD11a	MABTECH Hoelzel, Köln	unmarkiert	Dansfield et al. 1989

Antikörper/Bezeichnung	Detektion von	Hersteller	Kopplung mit
Ziege Anti-Maus Klon X40	Maus IgG (H+L)	Dianova, Hamburg	FITC

2.1.3. Geräte

Autoklav:

Hochdruckdampf Sterilisator Typ KSG 114 (KSG GmbH, Olching, Deutschland)

Brutschrank:

B 5060 EK/CO₂ (Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland)

Durchflusszytometer:

FACScan (Becton Dickinson Biosciences, Heidelberg, Deutschland)

BD LSR II (Becton Dickinson Biosciences, Heidelberg, Deutschland)

Elispot:

A.EL.VIS (Automated Elisa Spot Assay Systems) (A.EL.VIS GmbH, Hannover, Deutschland)

Mikroskop:

DIASVERT (Leica, Wetzlar, Deutschland)

Laborlux K (Leica, Wetzlar, Deutschland)

Software:

FACS Diva 5.0.2 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, Vereinigte Staaten von Amerika)

FlowJo 7.2.5 (Tree Star Incorporation, Ashland, Vereinigte Staaten von Amerika)

WinMiDi für Windows 2.9 (Freeware, geschrieben von Joseph Trotter vom Scripps Institute, La Jolla, Vereinigte Staaten von Amerika)

Pages (Apple, Cupertino, Vereinigte Staaten von Amerika)

Numbers (Apple, Cupertino, Vereinigte Staaten von Amerika)

Excel (Microsoft, Redmond, Vereinigte Staaten von Amerika)

Sterilbank:

LaminAir, HBB 2448 (Heraeus Hoding GmbH, Hanau, Deutschland)

Wasserbad:

Wasserbad GFL (Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel, Deutschland)

Zentrifugen:

Eppendorf Centrifuge 5402 (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)

IEC Centra - 8R Centrifuge (Thermo Scientific, Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika)

Sonstiges:

Neubauer Zählkammer (Brand GmbH, Wertheim, Deutschland)

Pipetten von Eppendorf (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)

Eppendorf-Cups und Pipettenspitzen von Eppendorf (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)

2.1.4. Proben von Patienten und Kontrollpersonen

Nach entsprechender Aufklärung und Einwilligung wurden von 16 Patienten in der rheumatologischen Ambulanz des Universitätsklinikums Tübingen 20 ml Citrat-Blut entnommen, um daraus für FACS-Analysen Granulozyten mittels PolymorphprepTM zu isolieren und anzureichern. Ebenso wurden 10 Kontrollpersonen 20 ml Citrat-Blut zur Analyse der Granulozyten entnommen. Die Proben wurden möglichst sofort nach Entnahme weiterverarbeitet.

Für die Durchführung der Studie lag ein Ethikvotum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät mit der Nummer 319/2007BO7 „Immunphänotypische

und biochemische Diagnostik von Zelloberflächenmerkmalen der Granulozyten und Lymphozyten im Blut von Patienten mit Morbus Behçet“ vor.

Tabelle 5:

Charakterisierung des Patientenkollektivs

Patient	Geschlecht/ Alter	HLA B51	Krankheits- aktivität	Therapie	Erst- Diagnose
1	m/42	negativ	stabil	Roferon, Prednisolon, Kalzium, Vitamin D	2003
2	w/49	positiv	stabil	Leflunomid, Azathi- oprin, Saroten, Ibu- profen, Diovan, ASS	1996
3	m/48	negativ	stabil	Decortin, ASS, Osso- fortin, Imurek	2001
4	w/39	negativ	stabil	Decortin, Imurek, ASS, Ideos, Omepra- zol, Tebonin, Cipralex, Lioresal, Detrusitol, Sirdalut	1992
5	m/52	negativ	stabil	Colchicin, Volon, Dic- lofenac, ASS	2000
6	m/48	positiv	wenig aktiv	Prednisolon, Roferon, Ben-u-ron, Norvasc	1989
7	w/57	positiv	stabil	Infliximab, Decortin	1986
8	m37	positiv	stabil	Humira, ASS	1993
9	m/35	positiv	stabil	Prednisolon, Colchi- cin, Calcium, Vitamin D	2003

Patient	Geschlecht/ Alter	HLA B51	Krankheits- aktivität	Therapie	Erst- Diagnose
10	w/51	negativ	stabil	Prednisolon, Inflanefran forte	1983
11	m/43	positiv	aktiv	Colchicin	2007
12	m/59	negativ	stabil	Prednisolon, Calcium, Vitamin D	2002
13	m/35	positiv	stabil	Azathioprin, Decortin, ASS100, Omeprazol	2000
14	m/48	positiv	stabil	ASS, Decortin, Infliximab, Pantozol	1994
15	w/44	negativ	wenig aktiv	Prednisolon, Imurek, Jodid, Presomen	1996
16	w/53	negativ	wenig aktiv	Prednisolon, Leukeran, CoDiovan	1988

Ein Patient litt unter einem aktiven Krankheitsschub, bei zwei Patienten war eine geringe Krankheitsaktivität und in den übrigen Fällen ein stabiler Krankheitszustand zum Zeitpunkt der Blutabnahme zu beobachten.

2.2. Methoden

2.2.1. Zellgewinnung und Aufbereitung

2.2.1.1. Granulozytenisolierung über Polymorphprep™

Leukozyten wurden mit Hilfe einer Dichtegradientenzentrifugation nach Überschichtung von Polymorphprep™ (Nycomed, Unterschleißheim) mit Vollblut (Citrat) isoliert. Das Prinzip der Isolierung beruhte auf der Auftrennung von Zellen aus Vollblut über eine geschichtete Flüssigkeit aus Komponenten unterschiedlicher Dichte. Polymorphprep™ wurde mit Citrat-Vollblut überschichtet und ohne Bremse der Zentrifuge im Auslauf zentrifugiert. Lymphozyten, Granulozyten und

übrige Zellen reicherten sich dabei in unterschiedlichen Phasen des Dichtegradienten an.

Nach Verwerfen des Serums (obere Phase) erfolgte das Abpipettieren des Lymphozytenringes, um im nächsten Schritt die Granulozyten aus dem folgenden Zellring isolieren zu können. Die isolierten Granulozyten wurden in normaler Kochsalzlösung (0,45%) im Verhältnis 1:1 aufgenommen, um diese wieder in ein Milieu physiologischer Osmolarität zu überführen und osmotisch getriggerte Zellschwellung der Granulozyten vorzubeugen.

Anschließend wurden die Zellen erneut zentrifugiert, der Überstand verworfen. Die unter Umständen in der isolierten Granulozytenfraktion verbliebenen Erythrozyten wurden mit Hilfe von RCLB-Puffer (Universitätsapotheke, Uniklinikum Tübingen) lysiert, um die Reinheit der isolierten Granulozyten zu gewährleisten. Danach wurden die Granulozyten zum Waschen in PBS aufgenommen. Nachdem die Zellen entweder in PBS oder FACS-Waschpuffer aufgenommen worden waren, wurden sie anschließend ausgezählt.

2.2.1.2. Bestimmung des Anteils vitaler Granulozyten

Eine 10 µl Probe der zu untersuchenden Zellsuspension wurde mit 10 µl Trypanblau (0,5%) gemischt und manuell mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer ausgezählt. Zellen, die infolge einer defekten Membran den Farbstoff aufgenommen hatten und im mikroskopischen Bild daher blau erschienen, wurden beim Zählen als Anteil toter Zellen berücksichtigt.

Bei den durchflusszytometrischen Messungen wurden die Ansätze mit EMA-Färbung auf Vitalität überprüft (siehe unten).

2.2.2. Durchflusszytometrie

2.2.2.1. Allgemeines

Das Prinzip der Durchflusszytometrie beruht darauf, dass Zellen nach ex vivo oder in vivo Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen unterschieden werden können. Verschiedene mikroskopisch kleine Partikel und Zellen können zunächst schon anhand ihrer Größe, Struktur, Oberflächeneigenschaften und auch intra-

zellulären Zusammensetzung wegen spezifischer Autofluoreszenzen, die über Laserlicht angeregt werden, differenziert werden.

Um Zellen weiter zu unterscheiden, werden heute meistens Antikörper genutzt, die spezifisch gegen bestimmte zelluläre Strukturen bzw. Proteine wie z.B. Oberflächenmerkmale gerichtet sind. Diese Antikörper können als Markierungsreagenzien, die direkt mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt (direkte Markierung) sind, eingesetzt werden, oder müssen als primär unmarkierte Reagenzien in einer Bindung an Zellen mit einem fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörper (indirekte Markierung) nachgewiesen werden.

Die Messung und Beurteilung der Zellen im Durchflusszytometer beruht darauf, dass die so markierten Zellen in einem Flüssigkeitsstrom einzeln an einem Laserstrahl vorbeigeführt werden. Dadurch kommt es zur Anregung der zellgebundenen Fluoreszenzen mit Emission von Fluoreszenzlicht, das über spezifische Filter detektiert und gemessen wird. Die Wellenlänge des emittierten Lichts hängt von dem jeweiligen eingesetzten Fluoreszenzfarbstoff ab. Die Verwendung von Lasern, die Licht einer bestimmten Wellenlänge, monochromatisches Licht aussenden, mit dem sich die verwendeten Fluoreszenzen anregen lassen, ist dabei weitere Grundvoraussetzung der Durchflusszytometrie.

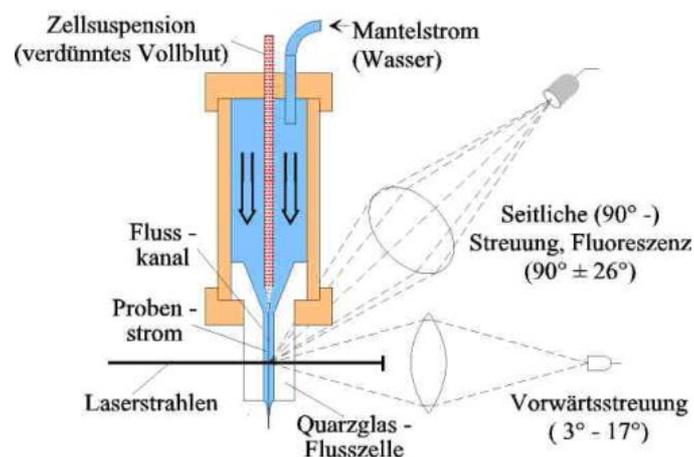


Abbildung 5:

Prinzip einer durchflusszytometrischen Messung

(www.berlin.ptb.de/8/83/832/DurchflussZytometrie.html)

Alle Zellen, die im Probenstrom der FACS Flusszelle vereinzelt am Laserlichtstrahl vorbeigeführt werden, werden zunächst im direkten Lichtstrahl auf Grund ihrer spezifischen Lichtstreuung in Abhängigkeit von ihrer Zellgröße im sog. „Forward Scatter“ (FSC) beurteilt. Das in einem 90°-Winkel abgestrahlte Seitwärtsstreulicht wird als „Side Scatter“ (SSC) bezeichnet und dient als Maß für die Zellgranularität.

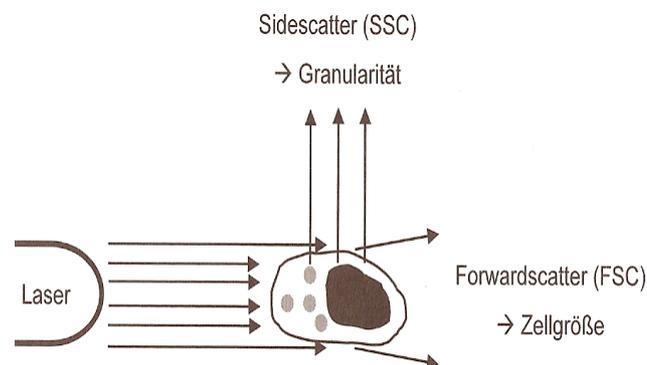


Abbildung 6:

Die Parameter „Forward Scatter (FSC) und „Side Scatter“ (SSC)

(Luttmann et al. 2004)

Es lassen sich hierbei neben der Größe und Granularität der Zellen weitere Parameter bestimmen. Sind die Zellen, wie oben erwähnt, mit einem bestimmten fluoreszenzgekoppelten Antikörper oder direkt mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert, wird ein Teil der Lichtenergie durch das entsprechende Fluorochrom absorbiert und Fluoreszenzlicht einer höheren charakteristischen Wellenlänge wieder emittiert.

Die Unterscheidung der gebundenen Fluoreszenzfarbstoffe erfolgt danach über Filter, die emittiertes Licht nur spezifischer Wellenlängen passieren lassen. Danach werden die ankommenden Lichtsignale über Dioden detektiert und entsprechend verstärkt, bevor sie mit der angeschlossenen Computereinheit als Ergebnisse ausgewertet und graphisch als Histogramm, Dot-Plot oder Density-Plot dargestellt werden können. Bei der Darstellung als Dot-Plot, der auch als

Punktegraph bezeichnet wird, werden zwei Parameter für jede gemessene Zelle/Partikel, z.B. FSC u. SSC oder eine Farbstoffintensität, gegeneinander in 2D-Diagrammen aufgetragen, in denen die Schnittstelle der beiden Werte als Punkt dargestellt (korrelierte Zweipunktdarstellung) wird. Beim Density-Plot, der dem Prinzip des Dot-Plots entspricht, wird zusätzlich durch unterschiedliche Farbgebung die Häufigkeitsverteilung der Schnittpunkte dargestellt.

Zusammenfassend gibt die Methode uns Aufschluss über:

- Zellgröße
- Granularität und
- spezifische Fluoreszenzen

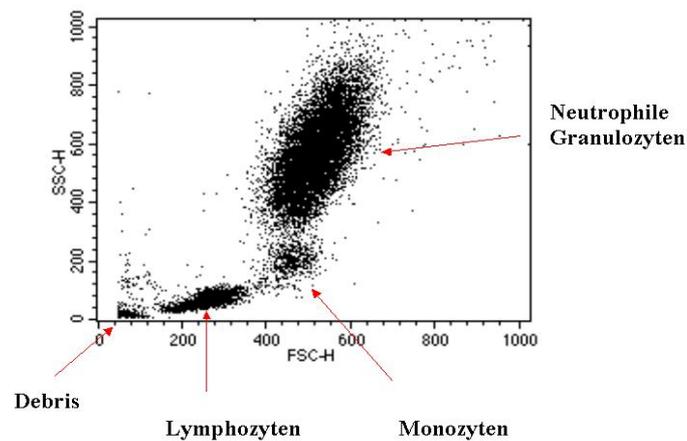


Abbildung 7:

Exemplarischer Dot-Plot

(<http://www.rrk-berlin.de>)

Im Histogramm zeigt die Abszisse die Fluoreszenzkanäle, in denen ein gewählter Parameter gemessen wurde (Intensität der Fluoreszenz) und die Ordinate die Anzahl der jeweiligen Messsignale in diesem Kanal (Einparameterdarstellung).

Mit Hilfe dieser graphischen Darstellungsmethoden lassen sich auch Teilpopulationen in gesonderten Fenstern („gates“) betrachten und statistisch auswerten.

Insbesondere ist dies hilfreich, wenn innerhalb eines Zellgemisches nur eine definierte Population für ein bestimmtes Merkmal, wie zum Beispiel die Vitalität, untersucht werden soll.

2.2.2.2. Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe

Die hier verwendeten Fluoreszenzen sind zum einen der wohl am häufigsten verwendete Farbstoff Fluorescein-Isothiocyanat (FITC), der sowohl in direkter Kopplung an einen spezifischen Erstantikörper, wie auch an einen Zweitantikörper für die indirekte Fluoreszenzmethode verwendet wurde.

Des Weiteren wurden PE/Cy7 eingesetzt. Ethidium Monoazid Bromide (EMA) wurde verwendet, weil es wie Propidium Jodid (PI) in Zellen mit defekter Zellmembran diffundiert. Es diente damit dazu, tote Zellen in der Durchflusszytometrie zu identifizieren. Nach Bestrahlung mit einer Neonlampe bindet EMA kovalent an die DNS. Als Positivkontrolle wurde in jedem Ansatz in einer unmarkierten Probe durch Zugabe von 70 % Ethanolösung die Apoptose der Zellen induziert. Danach wurde eine Markierung mit EMA durchgeführt. Mit Hilfe dieser EMA positiven Probe wurden in allen übrigen Testproben durch elektronisches „Gaten“ EMA negative Zellen selektioniert.

Bei allen Tests, in denen die Zellen spezifisch markiert wurden, wurde einer Probe Ethanol (70%ig) zugesetzt und diese 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunklen gehalten. Nach Ablauf der Zeit wurde der Ansatz zentrifugiert und anschließend mit 50 µl Polyglobin (1%ig) + 1 µl EMA zunächst auf Eis und dann unter Neonlicht inkubiert. Letzter Schritt war nach dem Zugeben von 150 µl FACS Waschpuffer die Zentrifugation 1 Minute lang bei 250 x g, 8°C und das erneute Auffüllen und resuspendieren in 200 µl FACS Waschpuffer. Der Ansatz wurde bis zur Messung im Eppendorf Cup auf Eis im Dunkeln gelagert.

2.2.2.3. Stimulation der Neutrophilen mit fMLP (Formyl-Methionin-Leucin-Phenylalanin)

Nachdem die Granulozyten isoliert und ausgezählt worden waren, wurden die zu stimulierenden Zellen in Falcon Tubes in FACS Waschpuffer in Lösung gebracht.

Anschließend erfolgte das Überführen der Granulozyten in eine 96-Well-Platte in Portionen von jeweils 2×10^5 Zellen pro Loch (Well). Die Zellen wurden nach Zentrifugation der Platte in je 0,2 ml RPMI/10% FCS resuspendiert und zur Stimulation mit je 10 μ l fMLP (100 ng/ μ l) versetzt. Es erfolgte die Inkubation im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ - Partialdruck für zwei Stunden. fMLP ist ein primär chemotaktisch wirksames Peptid, das aktivitätssteigernd auf Granulozyten wirkt.

Nach einer halben Stunde wurden 10 μ l Brefeldin (1:100) hinzu gegeben und die Proben im Brutschrank für weitere drei Stunden inkubiert. Brefeldin ist ein Lacton Antibiotikum. Die Hemmung des Golgi Apparates durch Brefeldin verhinderte eine Sekretion von Zellprodukten wie Interferon- γ . Die stimulierten Zellen wurden entweder mit Hilfe einer indirekten Einfach- oder einer direkten Doppel-Immunfluoreszenzmarkierung charakterisiert.

2.2.2.4. Indirekte Immunofluoreszenzanalyse

Zur Analyse der Expression von Zelloberflächenantigenen wurden die aus Blut isolierten unstimulierten oder kurzzeitig mit fMLP stimulierten Granulozyten nach einmaliger Abzentrifugation in FACS-Waschpuffer aufgenommen und auf eine 96-Well-Platte (Greiner, Bio-One, Frickenhausen) aufgetragen. Der FACS-Waschpuffer wurde mit 500 ml PBS, 500 mg BSA und 3,2 ml Natriumazid hergestellt.

Im Anschluss daran wurden alle Zellsuspensionen, bis auf den unmarkierten Ansatz, mit Polyglobin (10% verdünnt in ddH₂O Bayer, Leverkusen) versetzt und auf Eis inkubiert. Damit sollten unspezifische Bindungen der Antikörper durch Blockade der Fc-Rezeptoren auf der Zelloberfläche verhindert werden. Nach der Inkubation wurden die Zellen zur Entfernung des Polyglobins zweimal in FACS- Waschpuffer aufgenommen, jeweils abzentrifugiert und resuspendiert.

Zu jedem Test-Well mit Ausnahme des unmarkierten Ansatzes wurde nun jeweils ein spezifischer Antikörper oder die Antikörper W6/32.HL bzw. W6/32.HK als positive und negative Kontrollen in vorher bestimmten Titerstufen zugesetzt und auf Eis inkubiert. Es erfolgten danach erneut 2 Waschschriffe mit FACS-Waschpuffer wie bereits zuvor beschrieben.

Danach wurden in einzelne Wells FITC-konjugierte F(ab)₂ Fragmente von Ziege-Anti-Maus IgG Antikörpern zur Detektion der Bindung der Erstantikörper zugegeben (indirekte Immunfluoreszenzmarkierung) und diese 30 min wiederum im Dunkeln auf Eis inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Granulozyten, wie oben beschrieben, dreimal mit FACS-Waschpuffer gewaschen. Zuletzt wurden die Zellen in FACS-Waschpuffer aufgenommen und durch ein engmaschiges Drahtnetz in Messröhrchen (Becton Dickinson, Heidelberg) für die FACS-Analyse überführt. Die Messungen erfolgten am FACScan (Becton Dickinson Biosciences) und am BD LSR II (Becton Dickinson Biosciences) Durchflusszytometer.

2.2.2.5. Doppelimmunfluoreszenzmarkierung von Zellen

Die zu markierenden Zellen wurden pro Markierungsansatz in einer Menge von 2×10^5 Zellen in 0,2 ml FACS-Waschpuffer aufgenommen.

Ein Probenansatz wurde unmarkiert als negative Kontrolle in einem 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß bis zur Messung im Dunkeln auf Eis gelagert.

Ein Ansatz wurde wie unter 2.2.2.2 beschrieben behandelt und als positive Kontrolle der avitalen Zellen bis zur Messung im Dunkeln auf Eis gelagert.

In einem dritten Probenansatz wurde eine spezifische Oberflächenmarkierung für CD66b (Serotec, Mannoni et al. 1982) sowie eine intrazelluläre Markierung für IFN- γ (Becton Dickinson Biosciences, Miller et al. 2004) durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen nach Vorinkubation mit 50 μ l Polyglobin (1%ig) + 1 μ l EMA für 10 min bei 4°C auf Eis, danach 10min unter der Neonlampe inkubiert. Nach einem Waschschriff wurden 8 μ l des FITC-gekoppelten anti-CD66b Antikörpers in 50 μ l FACS-Waschpuffer hinzugegeben u. 20 min bei 4°C auf Eis im

Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Zellen durch Zugabe von 150 µl FACS-Waschpuffer und Zentrifugation bei 250 x g für 1 min bei 8°C gewaschen. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 100 µl Cytoperm/ Cytofix™ (BD Pharmingen, Heidelberg) für 25 min bei 4°C im Dunkeln fixiert und permeabilisiert, Danach wurde die Probe mit 100 µl Perm/Wash™ (1:9) aufgefüllt, 1min bei 250 x g u. 8°C zentrifugiert und PE-Cy7 gekoppelter (5 µl / 10⁶ Zellen) anti-IFN-γ Antikörper hinzugefügt.

Der Ansatz wurde 30 min bei 4°C auf Eis inkubiert. Erneut wurde mit 150 µl Perm/Wash aufgefüllt und danach die Zellen abzentrifugiert. Der Waschgang wurde 2-mal wiederholt.

Zuletzt wurden zu den resuspendierten Zellen nach der Zentrifugation 200 µl Perm/Wash hinzugegeben und der Ansatz in ein FACS-Röhrchen (Becton Dickinson Biosciences) überführt. Bis zur Messung wurden auch diese Ansätze auf Eis und im Dunkeln gelagert.

Für die Kompensation der eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe mit Hilfe der FACS-Diva Software am Durchflusszytometer wurden Beads eingesetzt, die mit dem FITC-markierten anti-CD66b Antikörper (Serotec, Mannoni et al. 1982) bzw. mit dem PE-CY7 gekoppelten anti-IFN-γ Antikörper (Becton Dickinson Biosciences, Miller et al. 2004) einzeln beladen worden waren.

In 3 Ansätzen wurden je 10 µl Beads in Eppendorf Gefäßen mit 100 µl FACS-Waschpuffer (neg. Kontrolle) oder mit 5 µl PE-Cy7 gekoppeltem anti-IFN-γ Antikörper bzw. 8 µl FITC-gekoppeltem anti-CD66b AK in 100 µl FACS-Waschpuffer (pos. Kontrollen) bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert. Danach wurden die Beads bei 11.000 g bei 8°C für 2 min zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die Proben mit je 200 µl FACS-Waschpuffer aufgefüllt. Der Waschvorgang wurde 1-mal wiederholt und die Ansätze dann bis zum Umfüllen in FACS-Röhrchen im Dunkeln auf Eis gelagert.

Alle Ansätze wurden beim Umfüllen in die FACS- Messröhrchen durch ein engmaschiges Drahtnetz pipettiert, um eventuelle Zell-Bead-Konglomerate zu entfernen.

Die Messungen erfolgten am BD LSR II (Becton Dickinson Biosciences).

2.3 Statistik

Die statistische Beurteilung der Ergebnisse wurde mit Hilfe der Graphpad Prism Software unter Verwendung des Mann-Whitney U Test durchgeführt. P Werte < 0.5 wurden als signifikant beurteilt.

3. Ergebnisse

3.1. Phänotypischer Vergleich von Aktivierungsantigenen auf neutrophilen Granulozyten von Patienten mit M. Behçet und gesunden Kontrollpersonen

3.1.1. Expression CD11a und CD11b Adhäsionsmoleküle

CD11a ist als Alpha L Kette Teil eines Integrin, das auf Lymphozyten, Granulozyten, Monozyten und Makrophagen exprimiert wird. Es spielt eine bedeutende Rolle bei der Vermittlung der Zell-Migration sowie bei der Interaktion von T-Zellen mit antigen-präsentierenden Zellen oder Zielzellen (Janeway et al. 2005).

Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied der CD11a Expression zwischen den gesunden Kontrollpersonen und den M. Behçet Patienten (p-Wert = 0,497).

Tabelle 6:

Prozentanteil CD11a positiver Zellen in der über Percoll angereicherten Granulozytenpopulation nach FACS-Analyse der CD11a Markierung

Kontrollpersonen	Anzahl CD11a positiver Zellen in %	Patienten	Anzahl CD11a positiver Zellen in %
1	30,14	1	23,96
2	85,86	2	34,44
3	47,98	3	2,07
4	1,85	4	0,86
5	5,54	5	15
6	78,90	6	22,34
7	18,81	7	39,82
		8	11,09
		9	26,35
		10	31,04
		11	77,57
Mittelwerte	38,44		25,87

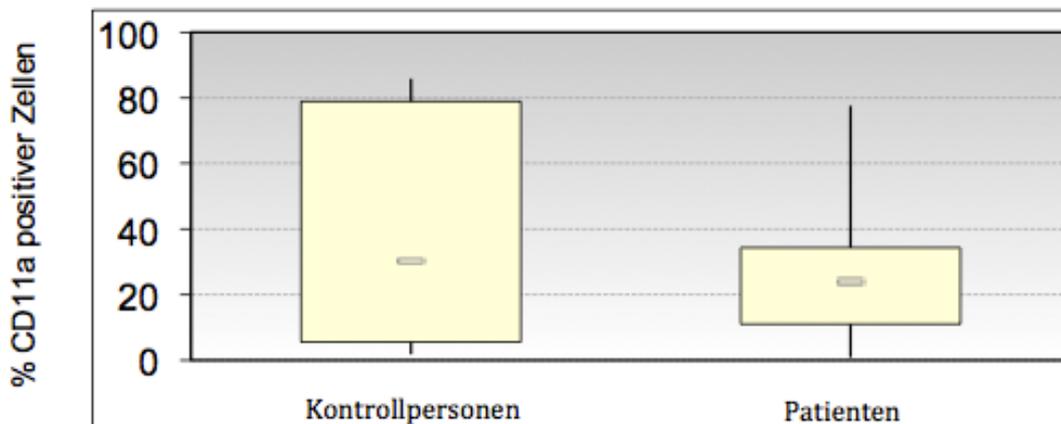


Abbildung 8:

Prozentanteil CD11a positiver Zellen in der über Percoll angereicherten Granulozytenpopulation nach FACS-Analyse der CD11a Markierung

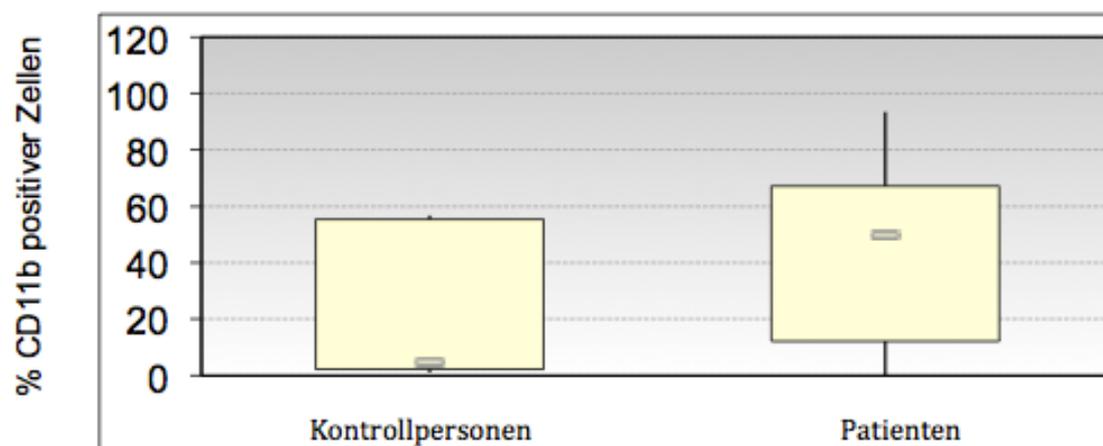
CD11b wird auf der Oberfläche von aktivierten Monozyten, Granulozyten, Makrophagen und Natural Killer Cells als Teil eines $\beta 2$ Integrins exprimiert. Es vermittelt Entzündungsreaktionen, indem es die Adhäsion und Migration der Leukozyten reguliert. Außerdem ist es beteiligt an immunologischen Prozessen wie Phagozytose, Zell vermittelter Zytotoxizität, Chemotaxis und Zellaktivierung (Janeway et al. 2005). Es spielt des Weiteren eine Rolle durch seine Bindungsfähigkeit von inaktiviertem Komplementfaktor C3bi im Komplementsystem (Arnaout M. et al. 1983).

Auf den untersuchten Granulozyten bei Kontrollpersonen und Patienten fand sich CD11b in unterschiedlichem Ausmaß. Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied der CD11b Expression zwischen den gesunden Kontrollpersonen und den M. Behçet Patienten (p -Wert = 0,077).

Tabelle 7:

Prozentanteil CD11b positiver Zellen in der über Percoll angereicherten Granulozytenpopulation nach FACS-Analyse der CD11b Markierung

Kontrollpersonen	Anzahl CD11b positiver Zellen in %	Patienten	Anzahl CD11b positiver Zellen in %
1	4,71	1	47,68
2	56,73	2	59,76
3	4,52	3	7,82
4	0,99	4	51,24
5	4,68	5	12,14
6	2,31	6	49,81
7	55,38	7	0,07
		8	19,32
		9	67,28
		10	96,37
		11	81,4
Mittelwerte	18,47		44,81

**Abbildung 9:**

Prozentanteil CD11b positiver Zellen in der über Percoll angereicherten Granulozytenpopulation nach FACS-Analyse der CD11b Markierung

3.1.2. Expression des Differenzierungsantigens CD15

CD15 oder auch Lewis X Antigen wird von neutrophilen und eosinophilen Granulozyten sowie Monozyten exprimiert (Sato T. al. 1994). Es ist ein terminales Trisaccharid, das auf Glykolipiden und vielen Glykoproteinen der Zelloberfläche exprimiert wird (Janeway et al. 2005). Auf neutrophilen Granulozyten ist CD15 an Zell-Zell-Interaktionen, Phagozytose, Stimulation der Degranulation und des respiratorischen Bursts beteiligt (Warren et al. 1996).

Die M. Behçet Patienten zeigten sowohl ohne (p -Wert = 0,019) und auch nach Stimulation mit fMLP (p -Wert = 0,037) eine statistisch signifikant erhöhte Expression des CD15 Antigens gegenüber den nicht mit fMLP stimulierten gesunden Kontrollpersonen. Im Vergleich zwischen unstimulierten und mit fMLP stimulierten neutrophilen Granulozyten von M. Behçet Patienten zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied in der Expression des CD15 Antigens (p -Wert = 0,71).

Tabelle 8:

Prozentanteil CD15 positiver Zellen in der über Percoll angereicherten Granulozytenpopulation nach FACS-Analyse der CD15 Markierung

	Kontrollpersonen	Patienten ohne Stimulation mit fMLP	Patienten nach Stimulation mit fMLP
	Anzahl CD15 positiver Zellen in %	Anzahl CD15 positiver Zellen in %	Anzahl CD15 positiver Zellen in %
1	98,73	86,3	
2	98,20	97,5	
3	99,85	94,61	
4	99,16	96,59	
5	98,85	98,15	
6	99,22	99,22	
7	97,41	88,16	
8	99,95	27,23	
9	96,97	99,38	

	Kontrollpersonen	Patienten ohne Stimulation mit fMLP	Patienten nach Stimulation mit fMLP
10	88,36	97,13	
11		68,77	
12		97,9	98,66
13		95,59	84,76
14		98,48	87,7
15		94,36	98,14
16		94,67	94,18
Mittelwerte	97,67	89,63	92,688

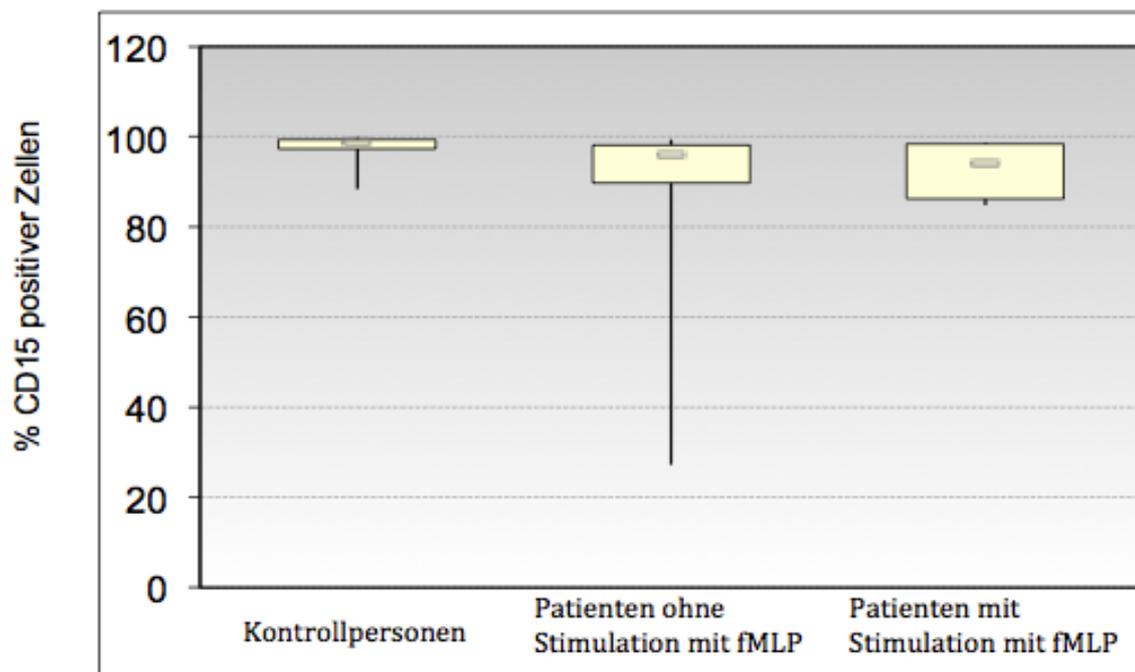


Abbildung 10:

Prozentanteil CD15 positiver Zellen in der über Percoll angereicherten Granulozytenpopulation nach FACS-Analyse der CD15 Markierung

3.1.3. Expression des myeloischen Differenzierungsantigens CD33

Das CD33 Oberflächenantigen wird auf myelomonozytären Vorläuferzellen exprimiert (Janeway et al. 2005). Die FACS-Analysen an den Granulozytenfraktionen zeigten bei den Kontrollen eine große Variation CD33 positiver Zellen, während bei den Patienten im Vergleich zu den gesunden Personen die Frequenz der CD33 positiven Vorläuferzellen eher erniedrigt zu sein schien. Nach Stimulation mit fMLP ließ sich bei den getesteten Patienten fast immer ein Anstieg der CD33 positiven Zellen beobachten.

Die M. Behçet Patienten zeigten ohne Stimulation mit fMLP eine statistisch signifikant verminderte Expression des CD33 Antigens gegenüber den nicht mit fMLP stimulierten gesunden Kontrollpersonen (p-Wert = 0,015). Es zeigte sich ebenfalls eine statistisch signifikante Erhöhung in der Expression des CD33 Antigens der mit fMLP stimulierten neutrophilen Granulozyten von M. Behçet Patienten gegenüber den nicht mit fMLP stimulierten neutrophilen Granulozyten von M. Behçet Patienten (p-Wert = 0,035) .

Jedoch ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied in der Expression des CD33 Antigens zwischen den nicht mit fMLP stimulierten gesunden Kontrollpersonen und den mit fMLP stimulierten neutrophilen Granulozyten von M. Behçet Patienten (p-Wert = 0,74).

Tabelle 9:

Prozentanteil CD33 positiver Zellen in der über Percoll angereicherten Granulozytenpopulation nach FACS-Analyse der CD33 Markierung

	Kontrollen	Patienten ohne Stimulation	Patientin nach 2h Stimulation mit fMLP
	Anzahl CD33 positiver Zellen in %	Anzahl CD33 positiver Zellen in %	Anzahl CD33 positiver Zellen in %
1	1,99	0,19	3,35
2	0,32	1,08	20,04
3	2,46	0,55	6,43
4	3,93	2,41	0,51
5	7,83	0,63	28,3

	Kontrollen	Patienten ohne Stimulation	Patientin nach 2h Stimulation mit fMLP
6	8,62	5,37	
7	24,89	0,04	
8	1,13	1,65	
9	73,55	0,5	
10		0,21	
11		1,25	
12		2,3	
13		0,41	
14		1,14	
15		1,8	
16		7,4	
Mittelwerte	13,86	1,68	11,726

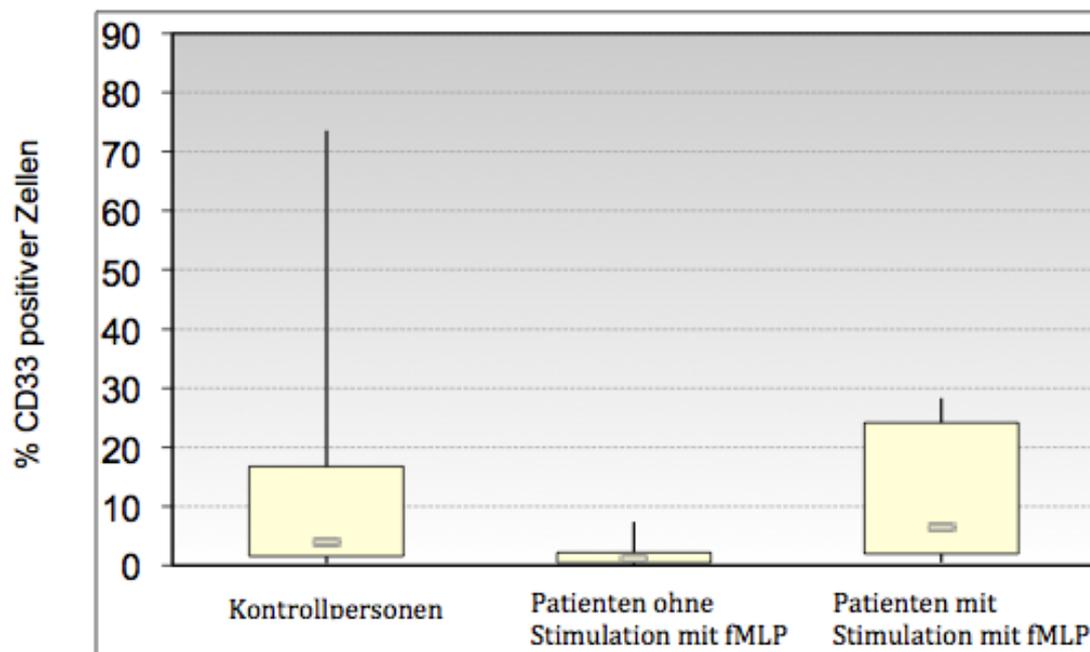


Abbildung 11:

Prozentanteil CD33 positiver Zellen in der über Percoll angereicherten Granulozytenpopulation nach FACS-Analyse der CD33 Markierung

3.1.4. Expression des Antigens CD83

Das CD83 ist ein Marker für reife, aktivierte dendritische Zellen und zum Teil auch für aktivierte Lymphozyten. Aufgrund seiner immunglobulinähnlichen Domänen und seines Expressionsmusters wird CD83 eine wichtige Rolle in der Antigenpräsentation und/oder den zellulären Interaktionen, die der Lymphozytenaktivierung folgen, zugesprochen. Für myelomonocytaire Zellen bzw. Granulozyten wurde beschrieben, dass sie dieses Antigen im Rahmen einer Weiterdifferenzierung zu Granulozyten mit Befähigung zur Antigenpräsentation wie bei dendritischen Zellen exprimieren. Im Unterschied zu den Kontrollen scheinen die Granulozytenfraktionen der Patienten eher geringere Anteile an CD83 positiven Zellen aufzuweisen.

Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied in der Expression des CD83 Antigens zwischen den gesunden Kontrollpersonen und den nicht mit fMLP stimulierten neutrophilen Granulozyten von M. Behçet Patienten (p-Wert = 0,38), zwischen den gesunden Kontrollpersonen und den mit fMLP stimulierten neutrophilen Granulozyten von M. Behçet Patienten (p-Wert = 0,93) und auch nicht zwischen den unstimulierten und den den mit fMLP stimulierten neutrophilen Granulozyten von M. Behçet Patienten (p-Wert = 0,17).

Tabelle 10:

Prozentanteil CD83 positiver Zellen in der über Percoll angereicherten Granulozytenpopulation nach FACS-Analyse der CD83 Markierung

	Kontrollen	Patienten ohne Stimulation mit fMLP	Patientin nach 2h Stimulation mit fMLP
	Anzahl CD83 positiver Zellen in %	Anzahl CD83 positiver Zellen in %	Anzahl CD83 positiver Zellen in %
1	0,04	0,21	2,48
2	31,89	3,8	15,26
3	15,98	2,55	6,99
4	2,18	4,47	3,28
5	23,19	3,46	
6	25,75	11,24	

	Kontrollen	Patienten ohne Stimulation mit fMLP	Patientin nach 2h Stimulation mit fMLP
7	2,01	0,89	
8	2,18	2,58	
9		2,49	
10		1,5	
11		3,19	
12		3	
13		1,84	
14		2,3	
15		1,9	
16		12,32	
Mittelwerte	12,90	3,61	7,00

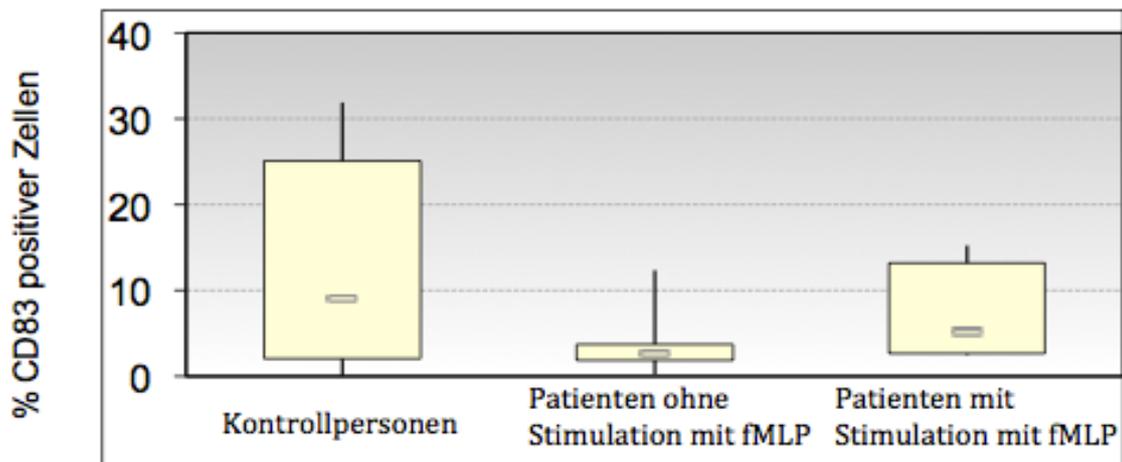


Abbildung 12:

Prozentanteil CD83 positiver Zellen in der über Percoll angereicherten Granulozytenpopulation nach FACS-Analyse der CD83 Markierung

3.2. Durchflusszytometrische Bestimmung der intrazellulären Expression von Interferon- γ in der angereicherten Granulozytenfraktion

3.2.1. Intrazelluläre Expression von Interferon- γ in neutrophilen Granulozyten bei Patienten mit M. Behçet im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen

Bei 9 gesunden Probanden und 9 Patienten mit M. Behçet wurde durchflusszytometrisch der Anteil der intrazellulär Interferon- γ positiven Zellen an den CD 66b positiven Zellen der angereicherten Granulozytenfraktion ermittelt. CD 66b wird von reifen aktivierten Granulozyten und Meta-Myelozyten, aber nur schwach von Myelozyten des Knochenmarkes exprimiert. Periphere Monozyten im Blut sowie Lymphozyten exprimieren keine signifikanten Mengen dieses Antigens. Mit Hilfe des Antigens CD 66b sollten damit Granulozyten von monozytären Zellen, die in der angereicherten Granulozytenfraktion noch enthalten sein konnten, weitestgehend unterschieden werden.

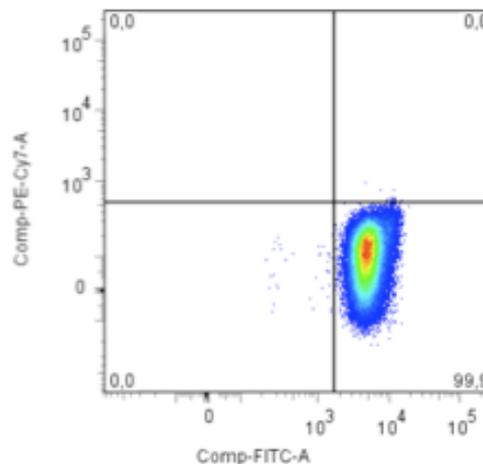


Abbildung 13:

Density Plot der FACS-Analyse der Granulozytenfraktion eines gesunden Probanden nach Immunfluoreszenzmarkierung mit dem PE-Cy-7 markierten anti-Interferon- γ Antikörpers (Y-Achse) und dem FITC markierten anti-CD66b Antikörper (X-Achse)

Bei den gesunden Kontrollpersonen konnte intrazellulär nur in zwei von neun Fällen und nur in minimaler Menge Interferon- γ nachgewiesen werden (Tabelle 11). Bei Patienten mit M. Behçet wurde in neun von neun Fällen Interferon- γ nachgewiesen (Tabelle 12).

Tabelle 11:

Prozentualer Anteil der intrazellulär Interferon- γ positiven / CD 66b positiven Zellen (Granulozyten) bei gesunden Probanden entsprechend der FACS-Analyse

Kontrollpersonen	CD 66b + / INF γ -	CD 66b + / INF γ +
1	99,9%	0,1%
2	99,8%	0,2%
3	100,0%	0,0%
4	99,9%	0,1%
5	100,0%	0,0%
6	99,9%	0,1%
7	100,0%	0,0%
8	99,7%	0,3%
9	99,9%	0,1%
Mittelwert	99,9%	0,1%
Range	99,7 - 100 %	0 - 0,3%

Tabelle 12:

Prozentualer Anteil der intrazellulär Interferon- γ positiven / negativen Zellen an den CD 66b positiven Zellen (Granulozyten) bei den getesteten Patienten mit M. Behçet entsprechend der FACS-Analysen

Patienten	CD 66b + / INF γ -	CD 66b + / INF γ +
1	98,8%	1,2%
2	99,6%	0,4%
3	99,6%	0,4%
4	99,7%	0,3%

5	99,4%	0,3%
6	98,3%	1,4%
7	98,0%	1,9%
8	92,5%	7,4%
9	97,7%	2,3%
Mittelwert	98,2 %	1,8%
Range	92,5 - 99,7%	0,3 - 7,4%

3.2.2. Intrazelluläre Expression von Interferon- γ in neutrophilen Granulozyten nach Stimulation mit fMLP bei Patienten mit M. Behçet im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen

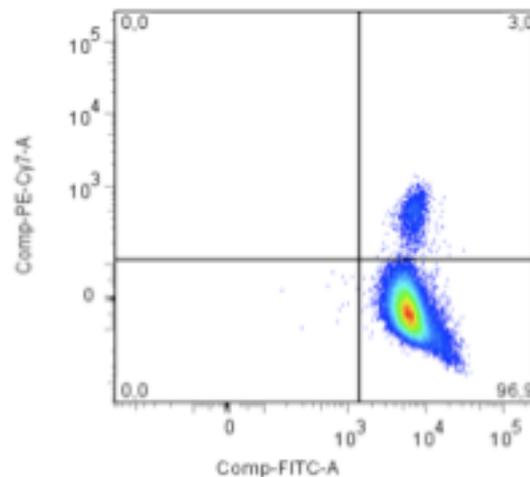


Abbildung 14:

Density Plot der FACS-Analyse der Granulozytenfraktion eines M. Behçet Patienten: Immunfluoreszenzmarkierung mit dem PE-Cy-7 markierten anti-Interferon- γ Antikörper (Y-Achse) und dem FITC markierten anti-CD66b Antikörper (X-Achse)

Bei 9 gesunden Probanden und 9 Patienten mit M. Behçet wurde nach Stimulation mit fMLP durchflusszytometrisch in den CD 66b positiven Zellpopulationen

der angereicherten Granulozyten der Anteil der intrazellulär Interferon- γ positiven Zellen ermittelt (Tabelle 13).

Unter den gesunden Probanden fand sich außer in zwei von neun Fällen ein geringer Anteil Interferon- γ positiver /CD 66b positiver Zellen (0,1 – 3,7%).

Es zeigten sich statistisch signifikante Erhöhungen der intrazellulären INF- γ Produktion von CD66b positiven Zellen

- der mit fMLP stimulierten Kontrollpersonen gegenüber den nicht mit fMLP stimulierten Kontrollpersonen (p-Wert = 0,018)
- der nicht mit fMLP stimulierten M. Behçet Patienten gegenüber den nicht mit fMLP stimulierten Kontrollpersonen (p-Wert = 0,0004)
- der mit fMLP stimulierten M. Behçet Patienten gegenüber den mit fMLP stimulierten Kontrollpersonen (p-Wert = 0,038).

Keinen statistisch signifikanten Unterschied in der intrazellulären INF- γ Produktion zeigte der Vergleich zwischen unstimulierten und mit fMLP stimulierten CD66b positiven Zellen von M. Behçet Patienten (p-Wert = 0,31).

Tabelle 13:

Prozentualer Anteil der intrazellulär Interferon- γ positiven / CD 66b positiven Zellen (Granulozyten) bei gesunden Probanden nach Stimulation mit fMLP entsprechend der FACS-Analyse

Kontrollpersonen	CD 66b + / INF γ - nach fMLP Stimulation	CD 66b + / INF γ + nach fMLP Stimulation
1	99,9%	0,1%
2	99,9%	0,0%
3	98,3%	1,7%
4	99,8%	0,2%
5	99,0%	1,0%
6	99,8%	0,0%
7	99,9%	0,1%
8	96,2%	3,7%

Kontrollpersonen	CD 66b + / INF γ - nach fMLP Stimulation	CD 66b + / INF γ + nach fMLP Stimulation
9	99,6%	0,3%
Mittelwert		
Range	98,3 - 99,9%	0 - 3,7%

Tabelle 14:

Prozentualer Anteil der intrazellulär Interferon- γ positiven CD 66b positiven Zellen (Granulozyten) bei Patienten mit M. Behçet nach Stimulation mit fMLP entsprechend der FACS-Analyse

Patienten	CD 66b + / INF γ - nach fMLP Stimulation	CD 66b + / INF γ + nach fMLP Stimulation
1	96,9%	3,0%
2	53,8%	46,2%
3	75,9%	24,1%
4	99,6%	0,4%
5	99,5%	0,2%
6	99,0%	0,7%
7	99,1%	0,9%
8	96,7%	3,3%
9	97,6%	2,3%
Mittelwert		
Range	53,8 - 99,6%	0,2 - 46,2%

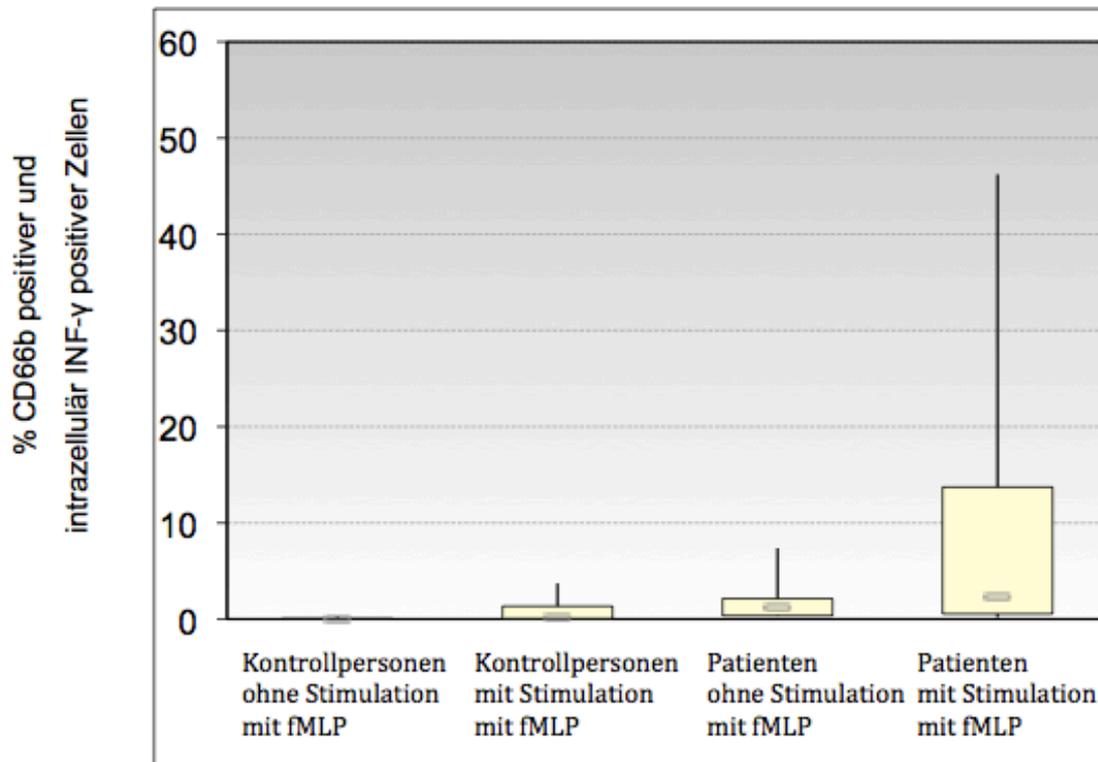


Abbildung 15:

Prozentualer Anteil der intrazellulär INF- γ positiven und CD 66b positiven Zellen (Granulozyten) bei Patienten mit *M. Behçet* mit und ohne Stimulation mit fMLP entsprechend der FACS-Analyse

4. DISKUSSION

Patienten mit M. Behçet sollen nach verschiedenen Autoren hyperaktive Granulozyten aufweisen, die durch proinflammatorische Funktion zu den für die Erkrankten spezifischen Hautläsionen führen. In Voruntersuchungen der Arbeitsgruppe hatten sich Hinweise für ein Vorkommen von IFN- γ in den Granulozyten der Patienten mit M. Behçet ergeben .

In dieser Arbeit konnte bei M. Behçet Patienten in unstimulierten Granulozyten intrazellulär IFN- γ nachgewiesen werden im Gegensatz zu unstimulierten neutrophilen Granulozyten gesunder Probanden.

Die bisherigen experimentellen und klinischen Untersuchungen zur Ursache des M. Behçet deuten darauf hin, dass wahrscheinlich eine Störung der angeborenen Immunität dem Pathomechanismus zugrunde liegen könnte. Es ist eine Krankheit, die mit einem ausgeprägten Th1-Zytokinprofil in Verbindung gebracht wurde (Sugi-Ikai et al. 1998, Frassanito et al. 1999, Freysdottir et al., 1999 Gül et al. 2000).

Weiteres Merkmal der Erkrankung ist die hohe Prävalenz von HLA-B51. An transgenen Mäusen, in denen HLA-B51 mit und ohne humanes β 2 Mikroglobulin zur Expression gebracht wurde, konnte gezeigt werden, dass es nach Stimulation mit dem bakteriellen chemotaktischen Peptid fMLP in den Tieren zu einer gesteigerten Produktion von Sauerstoffradikalen in Granulozyten kam, ähnlich wie es bei den HLA-B51 positiven gesunden und kranken Personen beobachtet werden konnte (Takeno et al. 1995). Bei den in dieser Arbeit untersuchten Oberflächenmarkern der unstimulierten und stimulierten Granulozyten von M. Behçet Patienten und gesunden Kontrollpersonen konnten mit Ausnahme der Tendenz einer leicht vermehrten Expression von CD11b auf Granulozyten von M. Behçet Patienten keine phänotypischen Unterschiede zwischen Patienten und gesunden Kontrollpersonen als Zeichen von Hyperaktivität ausgemacht werden.

Die vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen wie CD11b könnte Ausdruck einer stärkeren Chemotaxis sein, die wahrscheinlich durch ein verändertes Zytokinprofil in der Erkrankung bedingt ist.

Unterschiedliche Untersuchungen zeigten wiederholt eine Überexpression von proinflammatorischen Zytokinen wie IFN- γ und TNF α sowohl im Serum, als auch in Lymphozyten (Mege et al. 1993, Sayinalp et al., Yamashita et al. 1997, Sugi-Ikai et al. 1995, Frassanito et al. 2000, Freysdottir et al. 2000, Hamazaoui et al. 2002).

Von IFN- γ weiß man, dass es als proinflammatorisches Zytokin bei Krankheiten mit einem Th1-Profil erhöht ist und Th2-Zellen hemmen kann (Janeway et al. 2005). Außerdem 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. (1995) wurden CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen auf ihre IFN- γ Produktion untersucht. Patienten mit M. Behçet hatten eine signifikant höhere Menge an intrazellulärem IFN- γ im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe und zu immunsuppressiv behandelten Patienten (Sugi-Ikai et al. 1995). In einer weiteren Arbeit beschrieben Hamazaoui et al. (2002) eine Erhöhung von IFN- γ im Serum und in CD4⁺ T-Zellen von Patienten mit aktivem M. Behçet, verglichen mit Patienten in Remission und gesunden Probanden (Hamazaoui et al. 2002). Die Gruppe um Freysdottir bestätigte ebenso eine erhöhte IFN- γ Produktion im peripheren Blut von Patienten mit aktivem M. Behçet (Freysdottir et al. 2000).

Ein weiteres Indiz für die Bedeutung von IFN- γ für den Pathomechanismus der Erkrankung ist, dass Frassanito nicht nur eine Erhöhung der IFN- γ Konzentration in T-Lymphozyten von M. Behçet Patienten fand, sondern dass er auch zeigen konnte, dass sie unter einer immunsuppressiven Therapie sank (Frassanito et al. 1999).

Die im letzten Abschnitt zitierten Arbeiten zeigten alle eine Erhöhung des Th1-Zytokins IFN- γ , wohingegen 1998 Raziuddin mit seiner Arbeitsgruppe eine defiziente IFN- γ Produktion in stimulierten PBMC's der Patienten beobachtete. Er folgerte daraus eine geringere Anzahl von IFN- γ produzierenden Zellen bzw. eine eingeschränkte Funktion dieser Zellen bei an M. Behçet erkrankten Patienten. Die Studie zeigte eine Erhöhung der Th2-Zytokine: IL 4, IL 10 und IL 13,

aber auch eine normale IL 2 Sekretion. Daraus schlussfolgerte Raziuddin, dass M. Behçet keine strenge Th1- oder Th2-assoziierte Erkrankung sei, sondern vielmehr eine komplexe Interaktion zwischen unterschiedlichen Zytokinen in der Pathogenese eine Rolle spiele (Raziuddin et al. 1998).

Der große Vorteil in der Bestimmung der Zytokine mittels FACS Analyse besteht in der Möglichkeit Zytokin und produzierende Zelle durch Mehrfachmarkierung eventuell zuordnen zu können.

Granulozyten können durch verschiedene Stimuli in ihrer Aktivität beeinflusst werden. Dazu zählen bakterielle Produkte, antimikrobielle Peptide, wie Defensine, verschiedene Zytokine und Chemokine. Bei fMLP handelt es sich um einen Vertreter der formyl-Peptide, die von allen Bakterien gebildet werden (Schiffmann et al. 1975). Nachdem auf der Zelloberfläche von neutrophilen Granulozyten ein Rezeptor mit hoher Affinität zu fMLP nachgewiesen werden konnte, ergaben weitere Untersuchungen, dass sich neutrophile Granulozyten in Richtung eines fMLP Gradienten bewegen (Schiffmann et al. 1975).

Der Gruppe um Ellis war es schon gelungen, eine IFN- γ Produktion in neutrophilen Granulozyten als Antwort auf eine Vielzahl von Infektionserregern nachzuweisen (Ellis et al. 2004). Zwei Jahre zuvor konnten Ellis et al. zeigen, dass nach einer Lungeninfektion mit dem Erreger *Nocardia asteroides*, Neutrophile sogar die einzige Quelle von IFN- γ darstellen können (Ellis et al. 2002).

In der vorliegenden Arbeit führte eine Stimulation mit fMLP zu einer vermehrten Expression von IFN- γ in Granulozyten. Durchflusszytometrisch fand sich auch vor Stimulation schon vermehrt intrazellulär IFN- γ in neutrophilen Granulozyten erkrankter Patienten im Vergleich zu den gesunden Probanden.

Nach Stimulation mit fMLP zeigten die Neutrophilen der gesunden Probanden eine Erhöhung der IFN- γ positiven Zellen. Bei den an M. Behçet erkrankten Patienten fand sich nach Stimulation mit fMLP eine noch deutlichere Zunahme der intrazellulär IFN- γ positiven Zellen.

Was die IFN- γ Produktion bei Neutrophilen insbesondere im Rahmen der angeborenen Immunität bedeutet, ist ungeklärt. Bekannt ist eine Verzögerung der Apoptose von Neutrophilen durch Typ I und Typ II Interferone. Diese Verzöge-

rung der Apoptose erfolgt über Aktivierung des JAK2-STAT3 Pathways, worauf es zu einer Hochregulierung des zellulären Apoptose-Inhibitors (cIAP2) kommt. cIAP2 bindet an spezifische Caspasen, eine Gruppe intrazellulärer Cysteinproteasen, und blockiert so deren proapoptotische Wirkung (Sakamoto et al. 2005). Es konnte gezeigt werden, dass das Überleben der Granulozyten von 48 auf 96 h gesteigert werden konnte (Sakamoto et al. 2005).

Möglicherweise führt diese durch IFN- γ induzierte Apoptoseverzögerung zu einer längeren Verweildauer der neutrophilen Granulozyten in den entzündeten Geweben. Somit könnte es bei M. Behçet Patienten zwar zu einer wirksamen Bekämpfung von Pathogenen, aber eben auch zu einer stärkeren Schädigung des Gewebes durch aktivierte neutrophile Granulozyten kommen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Der M. Behçet ist eine Multisystemerkrankung mit bis heute ungeklärter Pathogenese. Charakteristisch ist der Symptomenkomplex aus Haut- und Schleimhautläsion (Hautvaskulitis, oraler und genitaler Aphthose) und okulärer Entzündung. Wahrscheinlich liegt eine Störung der angeborenen Immunität dem Pathomechanismus zugrunde. Es ist eine Krankheit, die hauptsächlich mit einem ausgeprägten Th1-Zytokinprofil in Verbindung gebracht wird, wobei vor allem für IFN- γ eine Erhöhung im Blut berichtet wurde. In dieser Arbeit zeigten neutrophile Granulozyten der an M. Behçet erkrankten Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden ein erhöhtes Vorkommen an IFN- γ positiven Zellen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass IFN- γ durch fMLP sowohl bei gesunden Probanden als auch bei Erkrankten induziert wird. Zur schon früher beobachteten Hyperreaktivität der neutrophilen Granulozyten könnte eine vermehrte IFN- γ Produktion beitragen und im Sinne der durch IFN- γ induzierten Apoptoseverzögerung zu einer längeren Verweildauer der neutrophilen Granulozyten in entzündlichen Geweben führen.

Bisher ließen sich keine Hinweise für eine genetische Ursache solcher Veränderungen finden oder eine Korrelation zu dem assoziierten prädisponierenden Antigen HLA-B51 zeigen.

Diese Arbeit liefert weitere Hinweise, dass ein verändertes Zytokinprofil der Erkrankung zugrunde liegt. Insbesondere deutet sie daraufhin, dass eine erhöhte IFN- γ Produktion in Granulozyten für den Pathomechanismus der Erkrankung eine wichtige Bedeutung besitzen könnte.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Adamantis B. Sur un cas d'iritis a recidevante. *Ann Ocul* 1931; 168: 271–274.
- Akpolat T, Koc Y, Yeniay I. Familial Behcet's disease. *Eur J Med* 1992; 1(7):391-5.
- Aksu K, Kabasakal Y, Sayiner A, Keser G, Oksel F, Bilgic A, Gumusdis G, Doganavsargil E. Prevalences of hepatitis A,B,C and E viruses in Behcet's disease. *Rheumatology* 1999; 38(12):1279-81.
- Aolu K, Ohno S, Ohguchi M, Sugiura S. Familial Behçet's disease. *Jpn J Ophthalmol* 1978; 22:72-75.
- Arber N, Klein T, Meiner Z, Pras E, Weinberger A. Close association of HLA-B51 and B52 in Israeli patients with Behcet's syndrome. *Ann Rheum Dis* 1991; 50(6):351-3.
- Ariel A, Novick D, Rubinstein M, et al. IL-12 and IL-18 induce MAP kinase-dependent adhesion of T cells to extracellular matrix components. *J Leukoc Biol* 2002;72:192–198.
- Arnaout M, Todd R, Dana N, Melamed J, Schlossman S, Colten H. Inhibition of phagocytosis of complement C3- or immunoglobulin G-coated particles and of C3bi binding by monoclonal antibodies to a monocyte-granulocyte membrane glycoprotein (Mol). *J Clin Invest* 1983; 72(1):171–9.
- Avci O, Ellidokuz E, Simsek I, Buyukgebiz B, Gunes AT. Helicobacter pylori and Behcet's disease. *Dermatology* 1999; 199(2):140-3
- Barnes CG. *Ann Med Interne* 1999; 150(6):477-82.
- Behcet H. Über rezidivierende Aphthose, durch ein Virus verursachte Geschwüre am Mund, am Auge und an den Genitalien. *Dermatol Wochenschr* 1937; 105: 1152–1157.
- Behcet H. Considerations sur les lesions aphteuse de la bouche et de la parties genitales ainsi que sur les manifestations oculaires d'origin perment virutique et observations consernant leur foyer d'infection. *Arch Dermatol Suvniligr.* 1937; 23–24: 1521–1529.
- Behcet H. Some observation on the clinical picture of the so called triple symptom complex. *Dermatologica* 1940; 81: 73–76.
- Bonfioli AA, Orefice F. *Semin Ophthalmol* 2005; 20(3):199-206.

Blobner F. Zur rezidivierenden Hypopyon-Iritis. *Z Augenheilk* 1937; 91: 129 – 139.

Calguneri M, Kiraz S, Ertenli I, Benekli M, Karaarslan Y, Celik I. The effect of prophylactic penicillin treatment on the course of arthritis episodes in patients with Behcet's disease. A randomized clinical trial. *Arthritis Rheum* 1996; 39(12):2062-5.

Cassatella MA. Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound. *Adv Immunol* 1999; 73:369–509

Chang HK, Cheon KS. The clinical significance of a pathergy reaction in patients with Behcet's disease. *J Korean Med Sci.* 2002;17(3):371-4.

Coulie P. Human tumour antigens recognized by T cells: new perspectives for anti-cancer vaccines? 1997. *Mol Med Today* 3:261-268.

Czerkinsky CC, Nilsson LA, Nygren H, Ouchterlony O, Tarkowski A. A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells. *J Immunol Methods* 1983; 65: 109-121.

Czerkinsky CC, Andersson G, Ekre HP, Nilsson LA, Klareskog L, Ouchterlony O. Reverse ELISPOT assay for clonal analysis of cytokine production. Enumeration of gamma-interferon-secreting cells. *J Immunol Methods* 1988; 110: 29-36.

Dalpiaz A, Spisani S, Biondi C, Fabbri E, Nalli M, Ferretti ME. Studies on human neutrophil biological functions by means of formyl-peptide receptor agonists and antagonists. *Curr Drug Targets Immune EndocrMetabol Disord* 2003; 1:33-42.

Deuter CM, Kötter I, Wallace GR, Murray PI, Stübiger N, Zierhut M. Behçet's disease: ocular effects and treatment. *Prog Retin Eye Res.* 2008; 27(1):111-36.

Dilsen N, Konice M, Ovul M., Behcet's Disease Research Committee of Japan. Clinicopathological studies on Behcet's disease. In "Behcet's Disease" 1972; 103:177–180.

Direskeneli H, Eksioğlu-Demiralp E, Kibaroglu A, Yavuz S, Ergun T, Akoglu T. Oligoclonal T cell expansions in patients with Behçet's disease. *Clin Exp Immunol.* 1999; 117(1):166-170.

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

Ellis TN, Beaman BL. Interferon-gamma activation of polymorphonuclear neutrophil function. *Immunology* 2004;112(1):2-12.

Ellis TN, Beaman BL. Murine polymorphonuclear neutrophils produce interferon-gamma in response to pulmonary infection with *Nocardia asteroides*. *J Leukoc Biol* 2002; 72(2):373-81.

Ertenli I, Kiraz S, Çalgüneri I, Çelik M, Erman IC, Haznedaroglu S, Kirazli. Synovial fluid cytokine levels in Behçet's disease. *Clinical and Experimental Rheumatology* 2001; 19 (24):37-41.

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* 1997; 107:520-527.

Evereklioglu C, Turoz Y, Er H, Inaloz HS, Ozbek E, Cekmen M. Increased nitric oxide production in patients with Behçet's disease: is it a new activity marker? *J Am Acad Dermatol.* 2002; 46(1):50-54.

Fehniger TA, Yu H, Cooper MA, et al. Cutting Edge: IL-15 costimulates the generalized Schwartzman reaction and innate immune IFN γ production in vivo. *J Immunol* 2000; 164:1643–1647.

Frassanito MA, Dammacco R, Cafforio P, Dammacco F. Th1 polarization of the immune response in Behçet's disease: a putative pathogenetic role of interleukin-12. *Arthritis Rheum* 1999; 42:1967–1974.

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

Friegenbaum A, Description of Behçet's syndrome in the Hippocratic Third Book of Endemic Diseases. *Br J Ophthalmol* 1956; 28:516–521.

Gürler A, Boyvat A, Tursen U. Clinical manifestations of Behçet's disease: an analysis of 2147 patients. *Yonsei Med J* 1997; 38:423-425.

Gul A, Inanc M, Ocal L, Aral O, Konice M. Familial aggregation of Behçet's disease in Turkey. *Ann Rheum Dis* 2000; 59(8):622-5.

Gul A. Standard and novel therapeutic approaches to Behçet's disease. *Drugs* 2007; 67(14): 2013-22.

Hamza M, Ayed K, Ben-Ayed H. Maladie de Behçet. In "Maladie Systemique" (M. F. Khan, and A. P. Peltier, Eds.), Flammarion, Paris, 1986; pp. 668 – 686

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

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

Hatemi G, Silman A, Bang D et al EULAR recommendations for the management of Behcet disease. *Ann Rheum* 2008; 67:1656–1662.

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* 1992; 140:410-9.

International Study Group for Behçet's Disease. Criteria for diagnosis of Behçet's disease. *Lancet* 1990; 335:1078-80.

Janeway, Travers, Walport, Shlomchik. *Immunobiology* (6th. edition) 2005.

Kaneko F, Oyama N, Nishibu A. Streptococcal infection in the pathogenesis of Behcet's disease and clinical effects of minocycline on the disease symptoms. *Yonsei Med J* 1997; 38(6):444-54.

Kiraz S, Ertenli I, Benekli M, Calguneri M. Parvovirus B19 infection in Behcet's disease. *Clin Exp Rheumatol* 1996; 14(1):71-3.

Kone-Paut I, Geisler I, Wechsler B, Ozen S, Ozdogan H, Rozenbaum M, Touitou I. Familial aggregation in Behcet's disease: high frequency in siblings and parents of pediatric probands. *J Pediatr* 1999; 135(1):89-93.

Kone-Paut I, Yardakul S, Bahabri SA, Shafae N, Ozen S, Ozdogan TL, Bernard, JL. Clinical picture of Behcet's disease in children. An international collaborative study of 86 cases. *J Pediatr* 1998; 132:721–725.

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* 1999; 19(1-2):1-4.

Kötter I, Vonthein R, Gunaydin I, et al. Behcet's disease in patients of German and Turkish origin - a comparative study. *Adv Exp Med Biol* 2003; 528:53-8.

Kötter I, Gunaydin I, Stubiger N, et al. Comparative analysis of the association of HLA-B*51 suballeles with Behcet's disease in patients of German and Turkish origin. *Tissue Antigens* 2001; 58:166-70.

Kötter I, Xenitidis T, Fierlbeck G, Schanz S, Melms A, Horger M, Ernemann U, Deuter C. Behçet's disease. *Z Rheumatol*. 2012;71(8):685-97.

Krause I, Weinberger A. Behçet's disease. *Curr Opin Rheumatol* 2008; 20(1):82-7.

Kurauchi T, Yokota K, Matsuo T, Fujinami Y, Isogai E, Isogai H, Ohtsuki H, Oguma K. Neutrophil and lymphocyte responses to oral *Streptococcus* in Adamantiades-Behçet's disease. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005; 43(2):125-31.

Lee FK, Nahmias AJ, Lowery S, Nesheim S, Reef S, Thompson S, Oleske J, Vahine A, Czerkinsky C. ELISPOT: a new approach to studying the dynamics of virus-immune system interaction for diagnosis and monitoring of HIV infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1989; 5:517-523.

Lee S, Bang D, Cho YH, Lee ES, Sohn S. Polymerase chain reaction reveals herpes simplex virus DNA in saliva of patients with Behçet's disease. *Arch Dermatol Res* 1996; 288(4):179-83.

Lehner T. Pathology of recurrent oral ulceration and oral ulceration in Behçet's syndrome: Light, electron and fluorescence microscopy. *J Pathol* 1969; 97:481-494.

Lehner T, Lavery E, Smith R, van der Zee R, Mizushima Y, Shinnick T. Association between the 65-kilodalton heat shock protein, *Streptococcus sanguis*, and the corresponding antibodies in Behçet's syndrome. *Infect Immun* 1991; 59(4): 1434-41.

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

Ludwig IS, Geijtenbeek TB, van Kooyk Y. Two way communication between neutrophils and dendritic cells. *Curr Opin Pharmacol* 2006; 6(4):408-13.

Luttmann W, Bratke K, Küpper M, Myrtek D. *Der Experimentator Immunologie* 2004; 79.

Mavioglu H. Behçet's recurrent disease. Analytical review of the literature. *Mis-souri Med* 1958; 1209-1217.

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* 1993; 20:1544-9.

Melby K, Midtvedt T, Degre M: Effect of human leukocyte interferon on phagocytic activity of polymorphonuclear leukocytes. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand Sect B* 1982; 90:181.

Mendes D, Correia M, Barbedo M, Vaio T, Mota M, Gonçalves O, Valente J. Behçet's disease - a contemporary review. *J Autoimmun* 2009; 32(3-4):178-88. Michealson JB, Chisari FV. *Surv Ophthalmol* 1982; 26(4):190-203. Michaelson JB. Diffuse uveitis. *Ophthalmic Clin North America* 1993; 55-68.

Midori M, Eri H, Mitsuhiro T, Yukiko T, Yuko I, Takashi T, Atsuhisa A, Satoshi N, Shigeaki O, Yoshiaki I. Cytokine production profile in patients with Behcet's disease treated with infliximab. *Cytokine* 2003; 24(5):210-218.

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

Munder M, Mallo M, Eichmann K, et al. Murine macrophages secrete Interferon- γ upon combined stimulation with interleukin (IL)-12 and IL-18: a novel pathway of autocrine macrophage activation. *J Exp Med* 1998;187:2103-2108.

Nishiyama M, Nakae K, Kuriyama T, Hashimoto M, Hsu ZN. A study among related pairs of Japanese patients with familial Behcet's disease: group comparisons by interval of disease onsets. *J Rheumatol* 2002; 29(4):743-7.

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

Onder M, Gurer MA. The multiple faces of Behcet's disease and its aetiological factors. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2001; 15(2):126-36.

Otto K, Andersen MH, Eggert A, Keikavoussi P, Pedersen LO, Rath JC, Bock M, Broucker EB, Straten PT, Kampgen E, Becker JC. Lack of toxicity of therapy-induced T cell responses against the universal tumour antigen. *Vaccine* 2005; 23(7):884-889.

Pay S, Simşek I, Erdem H, Dinç A. Immunopathogenesis of Behçet's disease with special emphasize on the possible role of antigen presenting cells. *Rheumatol Int* 2007; 27(5):417-24.

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

Sakamoto E, Hato F, Kato T, Sakamoto C, Akahori M, Hino M, Kitagawa S. Type I and type II interferons delay human neutrophil apoptosis via activation of STAT3 and up-regulation of cellular inhibitor of apoptosis 2. *J Leukoc Biol* 2005; 78(1):301-9.

Sakane T, Takeno M, Suzuki N, Inaba G. Behçet's disease. *N Engl J Med* 1999; 341(17):1284-91.

Samiha Hegab, Samia Al-Mutawa, Immunopathogenesis of Behcet's Disease. *Clinical Immunology* 2000; 96(3):174 –186.

Satoh T, et al. Expression of lacto-N-fucopentaose III (CD15)- and sialyl-Lewis X-bearing molecules and their functional properties in eosinophils from patients with the idiopathic hypereosinophilic syndrome. *Immunology* 1994; 83(2):313-318.

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

Schiffmann E, Corcoran BA, Wahl SM. N-formylmethionyl peptides as chemoattractants for leucocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1975; 72(3):1059–1062.

Shalaby MR, Aggarwal BB, Rinderknecht E, Svedersky LP, Fide BS, Palladino MA Jr. Activation of human polymorphonuclear neutrophil functions by interferon γ and tumor necrosis factor. *J Immunol* 1985; 135:2069.

Sek LP, Lee, BW, Lehman, TJ. Thalidomide responsiveness in an infant with Behçet's syndrome. *Paediatrics* 1999; 103:1295–1297.

Shigita T. Recurrent iritis hypopyon and its pathological significance. *Acta Soc Jpn* 1924; 28:516 –521.

Sobel JD, Haim S, Obendeau N, et al. Polymorphonuclear leucocyte function in Behçet's disease. *J Clin Pathol* 1977; 30:250 – 253.

Störk S, Kneitz C, Bröcker EB, Hoyer C, Ertl G, Angermann CE. Adamantiades- Behçet's disease. *Clinical Review. Med Klin* 2008; 103(3):143-52.

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

Suzuki Kurokawa M, Suzuki N. Behçet's disease. *Clin Exp Med.* 2004; 4(1):10-20.

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* 1992; 19:588-592.

Takeno M, Kariyone A, Yamashita N, Takiguchi M, Mizushima Y, Kaneoka H, Sakane T. Excessive function of peripheral blood neutrophils from patients with Behçet's disease and from HLA-B51 transgenic mice. *Arthritis Rheum* 1995; 38(3):426-33.

Tennant JR: Evaluation of the trypan blue technique for determination of cell viability. *Transplantation* 1964; 2: 685.

The International Study Group for Behçet's Disease. Evaluation of diagnostic (classification) criteria in Behçet's disease— Towards internationally agreed criteria. *Br J Rheumatol* 1992; 31:299–308.

Tojo M, Zheng X, Yanagihori H, Oyama N, Takahashi K, Nakamura K, Kaneko F. Detection of herpes virus genomes in skin lesions from patients with Behçet's disease and other related inflammatory diseases. *Acta Derm Venereol* 2003; 83(2):124-7.

Turan B, Gallati H, Erdi H, Gürler A, Michel BA, Villiger PM. Systemic levels of the T cell regulatory cytokines IL10 and IL12 in Behçet's disease; soluble TNFR-75 as a biological marker of disease activity. *J Rheumatol.* 1997; 24(1):128-132.

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* 1999; 54:213-20.

Warren HS, et al. A carbohydrate structure associated with CD15 (Lewis x) on myeloid cells is a novel ligand for human CD2. *J Immunol* 1996; 156:2866-2873.

Whitwell GPB. Recurrent buccal and vulvular ulcers with associated embolic phenomena in skin and eye. *Br J Dermatol* 1934; 46:414 – 419.

Woerly G, Roger N, Loiseau S, et al. Expression of CD28 and CD86 by human eosinophils and role in the secretion of type 1 cytokines (interleukin 2 and interferon- γ): inhibition by immunoglobulin A complexes. *J Exp Med* 1999; 16:487–495.

Yamashiro S, Kamohara H, Wang JM, et al. (Phenotypic and functional change of cytokine-activated neutrophils: inflammatory neutrophils are heterogeneous and enhance adaptive immune responses. *J Leukoc Biol* 2001; 69:698–704.

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* 1997; 107:241-247.

Yang D, de la Rosa G, Tewary P, Oppenheim JJ. Alarmins link neutrophils and dendritic cells. *Trends Immunol* 2009; 30(11):531-537.

Yoshikawa K, Kotake S, Matsuda H. Behcet's disease and streptococcal antigens. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi* 1996; 100(3):173-80.

Yoshimoto T, Okamura O, Tagawa Y-I, et al. Interleukin-18 together with interleukin-12 inhibits IgE production by induction of interferon production from activated B cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:3948–3957.

Yurdakul SC, Günaydin S, Tüzün Y, Tankurt N, Pazarli H, Ozyazgan Y, Yazici H. The prevalence of Behçet's syndrome in a rural area in Northern Turkey. *J Rheumatol* 1988; 15: 820-822.

Zierhut M, Mizuki N, Ohno S, et al. Immunology and functional genomics of Behçet's disease. *Cell Mol Life Sci* 2003; 60:1903–22.

Zouboulis CC, Buttner P, Djawari D, Kirch W, Keitel W, Garbe C, von Keyserlingk-Eberius HJ, Orfanos CE. The HLA pattern in Adamantiades- Behçet's disease in Germany. Association of occurrence, clinical symptoms and follow-up in 39 patients. *Hautarzt* 1993; 44(2):81-5.

7. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1 Orale Aphthen, Uveitis mit Hypopyon.....	7
Abbildung 2 Pathergie-Test, genitale Aphthen	8
Abbildung 3 Verlauf der Seidenstraße.....	11
Abbildung 4 EULAR Empfehlungen für die Behandlung des Morbus Behçet.....	17
Abbildung 5 Prinzip einer durchflusszytometrischen Messung.....	27
Abbildung 6 Die Parameter FSC und SSC	28
Abbildung 7 Exemplarischer DotPlot	29
Abbildung 8 Prozentanteil CD11a positiver Zellen in der über Percoll ange- reicherten Granulozytenpopulation nach FACS-Analyse der CD11a Markie- rung.....	35
Abbildung 9 Prozentanteil CD11b positiver Zellen in der über Percoll ange- reicherten Granulozytenpopulation nach FACS-Analyse der CD11b Markie- rung.....	37
Abbildung 10 Prozentanteil CD15 positiver Zellen in der über Percoll ange- reicherten Granulozytenpopulation nach FACS-Analyse der CD15 Markie- rung.....	39
Abbildung 11 Prozentanteil CD33 positiver Zellen in der über Percoll ange- reicherten Granulozytenpopulation nach FACS-Analyse der CD33 Markie- rung.....	41
Abbildung 12 Prozentanteil CD83 positiver Zellen in der über Percoll ange- reicherten Granulozytenpopulation nach FACS-Analyse der CD83 Markie- rung.....	43
Abbildung 13 Density Plot Durchflusszytometrie eines gesunden Probanden	44
Abbildung 14 Density Plot Durchflusszytometrie eines M. Behçet Patienten	46
Abbildung 15 Prozentualer Anteil der intrazellulär INF- γ positiven und CD 66b posi- tiven Zellen (Granulozyten) bei Patienten mit M. Behçet mit und ohne Stimulation mit fMLP entsprechend der FACS-Analyse	49

8. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1 Häufigkeit der unterschiedlichen Symptome von M. Behçet Patienten in Japan, Deutschland, Türkei und Griechenland.....	9
Tabelle 2 Diagnosekriterien des M. Behçet	10
Tabelle 3 Hersteller der verwendeten Chemikalien	20
Tabelle 4 Verwendete primäre und sekundäre Antikörper.....	21
Tabelle 5 Charakterisierung von Patientenkollektiv und Kontrollpersonen	24
Tabelle 6 Prozentanteil CD11a positiver Zellen in der über Percoll angereicherten Granulozytenpopulation nach FACS Analyse der CD11a Markierung.....	35
Tabelle 7 Prozentanteil CD11b positiver Zellen in der über Percoll angereicherten Granulozytenpopulation nach FACS Analyse der CD11b Markierung.....	37
Tabelle 8 Prozentanteil CD15 positiver Zellen in der über Percoll angereicherten Granulozytenpopulation nach FACS Analyse der CD15 Markierung.....	38
Tabelle 9 Prozentanteil CD33 positiver Zellen in der über Percoll angereicherten Granulozytenpopulation nach FACS Analyse der CD33 Markierung.....	40
Tabelle 10 Prozentanteil CD83 positiver Zellen in der über Percoll angereicherten Granulozytenpopulation nach FACS Analyse der CD83 Markierung.....	42
Tabelle 11 Prozentualer Anteil der intrazellulär IFN- γ positiven CD 66b positiven Zellen (Granulozyten) bei gesunden Probanden	45
Tabelle 12 Prozentualer Anteil der intrazellulär IFN- γ positiven CD 66b positiven Zellen (Granulozyten) unter Patienten mit M. Behçet	45
Tabelle 13 Prozentualer Anteil der intrazellulär IFN- γ positiven CD 66b positiven Zellen (Granulozyten) bei gesunden Probanden nach Stimulation mit fMLP entsprechend der FACS-Analyse.....	47
Tabelle 14 Prozentualer Anteil der intrazellulär IFN- γ positiven CD 66b positiven Zellen (Granulozyten) bei Patienten mit M. Behçet nach Stimulation mit fMLP entsprechend der FACS-Analyse.....	48

9. Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	“Cluster of Differentiation”
ddH ₂ O	“double-distilled water”
DMSO	Dimethylsulfoxid
EMA	Ethidium Monoazid Bromide
EDTA	Ethylendiaminetetraacetic Acid
FACS	“Fluorescence Activated Cell Sorter”
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat
fMLP	Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine
g	Gramm
h	Stunden
HLA	„Human Leukocyte Antigen“
IE	Internationale Einheit
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-1Ra	Interleukin-1 receptor antagonist
M.	Morbus
MHC	Major Histocompatibility Complex
MIF	Makrophagen Migrations-inhibitorischer Faktor
min	Minute
ml	Milliliter
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
PBMC	Periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	Phosphate buffered Saline
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein

PI	Propidium Jodid
RCLB	“Red Cell Lysis Buffer”
RPMI	Zellkulturmedium benannt nach dem Roswell Park Memorial Institut
Th	T-Helfer-Zellen
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
UK	„United Kingdom“
U/min	Umdrehungen/Minute
ZNS	Zentrales Nervensystem

10. DANKSAGUNGEN

Mein Dank gilt Frau Professor Dr. C. Müller für die Vergabe des Themas und die Betreuung.

Ein ganz besonderer Dank gilt Frau Ingeborg Steiert, welche mich mit viel Geduld und Einsatz unterstützt hat und die viel zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Professor Dr. I. Kötter für die Kooperation und bei Schwester Gabi Reichert für die Koordination der Blutentnahmen der Patienten in der rheumatologischen Ambulanz, sowie bei den Patienten die sich zur Teilnahme an dieser Studie bereit erklärt haben.

Auch den Mitarbeitern der AG Pawelec und AG Klein, die für Fragen immer offen und hilfsbereit waren, gilt mein Dank.

Doch vor allem möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken!

10. LEBENSLAUF

Schulischer Werdegang

- 1988 - 1992 Grundschule Oberes Enztal
1992 - 1999 Progymnasium Bad Wildbad
1999 - 2001 Abitur am Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Gymnasium
 Neuenbürg

Wehrdienst

- 2001 - 2002 Grundwehrdienst Fallschirmjägerbataillon 261./2. in Lebach

Studium

- WS 2002/03 Studium der Humanmedizin
SS 2004 Physikum
01 - 05/2006 Hilfswissenschaftlicher Angestellter in der Psychosomatischen
 Abteilung des UKTs
2007 Volontariatseinsatz im Windhoek Central Hospital Namibia
11/2008 Staatsexamen mit Approbation

Klinische Tätigkeit

- Seit 03/2009 Assistenzarzt an der Universitätsfrauenklinik Tübingen