

**Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital der**

**Ludwig-Maximilians-Universität München**

**Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h. c. D. Reinhardt**

**Bestimmung von intrazellulären und zirkulierenden Zytokinen**

**im Fieberschub und im fieberfreien Intervall**

**bei 14 Kindern mit vier der häufigsten autoinflammatorischen**

**Fiebersyndromen**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

**vorgelegt von**

**Anja Kéry- Candela**

**aus**

**München**

**2009**

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. B. H. Belohradsky

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Josef Briegel  
Priv. Doz. Dr. Raphaela Waidelich

Dekan: Prof. Dr. Dr. h. c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 07.05.2009

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung und Fragestellung.....</b>	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>Einführung.....</b>	<b>5</b>
2.1	Einteilung der autoinflammatorischen Fiebersyndrome.....	5
2.2	Zytokine .....	10
<b>3</b>	<b>Patienten und Methodik.....</b>	<b>13</b>
3.1	Patienten und Kontrollen .....	13
3.2	Methodik .....	15
3.2.1	Messung von C-reaktivem Protein (CRP), Leukozyten und Blutsenkungsgeschwindigkeit (BKS).....	15
3.2.2	Aufbereitung der Blutproben für die Zytokinmessungen.....	15
3.2.3	Intrazelluläre Zytokinbestimmung in Lymphozyten.....	15
3.2.4	Zytokinbestimmung im Serum durch Cytometric bead array immunoassay .....	18
3.2.5	Bestimmung löslicher TNF- Rezeptoren im Serum.....	19
3.2.6	Statistische Auswertung.....	19
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>20</b>
4.1	<b>FMF .....</b>	<b>20</b>
4.1.1	3 Patienten und ihr klinisches Bild .....	20
4.1.2	Akut- Phase- Reaktionen .....	22
4.1.3	Ergebnisse der zirkulierenden Zytokine.....	23
4.1.4	PMA- stimulierte Zytokinsynthese in Lymphozyten .....	27
4.2	<b>HIDS.....</b>	<b>31</b>
4.2.1	3 Patienten und ihr klinisches Bild .....	31
4.2.2	Akut- Phase- Reaktionen .....	33
4.2.3	Ergebnisse der zirkulierenden Zytokine.....	33
4.2.4	PMA- stimulierte Zytokinsynthese in Lymphozyten .....	38
4.3	<b>TRAPS.....</b>	<b>41</b>
4.3.1	2 Patienten und ihr klinisches Bild .....	41
4.3.2	Akut- Phase- Reaktionen .....	43
4.3.3	Ergebnisse der zirkulierenden Zytokine.....	43
4.3.4	PMA- stimulierte Zytokinsynthese in Lymphozyten .....	48
4.4	<b>PFAPA.....</b>	<b>51</b>
4.4.1	Patienten .....	51
4.4.2	Akut- Phase- Reaktion .....	52
4.4.3	Ergebnisse der zirkulierenden Zytokine der 6 PFAPA- Kinder.....	53
4.4.4	Ergebnisse der PMA- stimulierten Zytokinsynthese in Lymphozyten.....	56
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>60</b>
5.1	Akut- Phase- Reaktion, Amyloidoserisiko und IL-6.....	60
5.2	Fieber: IL-1 $\beta$ und TNF- $\alpha$ .....	62
5.3	TH1-/ TH2- Gleichgewicht .....	70
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>81</b>
<b>7</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>85</b>
<b>8</b>	<b>Curriculum Vitae .....</b>	<b>90</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>92</b>

# 1 Einleitung und Fragestellung

Beschreibungen periodisch auftretender Erkrankungen lassen sich seit Beginn des 19. Jahrhunderts in der medizinischen Literatur finden [4]. Der Begriff „periodische Erkrankungen“ wurde erstmals Ende der 40-er Jahre von Reimann vorgeschlagen. Er umfasst eine heterogene Gruppe von Symptomen unklarer Genese, welche durch Erkrankungsperioden charakterisiert sind, die regelmäßig für mehrere Jahre bei ansonsten gesunden Individuen auftreten. Von Arav-Bogner und Spirer wurden diese zur Vereinfachung in periodische Erkrankungen mit und ohne Fieber eingeteilt. Zu letzteren gehören beispielsweise das zyklische Erbrechen, rekurrente abdominelle Schmerzen und rekurrende Kopfschmerzen [4]. Diesen fieberfreien periodischen Erkrankungen stehen die periodischen Fiebersyndrome (PFS) gegenüber, welche durch wiederkehrende, selbstlimitierende Fieberschübe mit Temperaturen  $> 38,5^{\circ}\text{C}$  charakterisiert sind. Meist sind sie genetisch bedingt und manifestieren sich vor allem im Kindesalter.

PFS gehören zum Überbegriff des Fiebers unklarer Genese (FUO; Fever of unknown Origin). Über drei Wochen andauernde, tägliche Fieberschübe charakterisieren FUO, deren Hauptursachen 1) infektiöse, 2) rheumatologische/autoimmune und 3) maligne Erkrankungen sind. Einer 4), mit „sonstige Ursachen“ betitelten Gruppe verschiedener Erkrankungen werden PFS zugeordnet, die sich als autoinflammatorische Syndrome von den übrigen FUOs abgrenzen, da sie definitionsgemäß von rekurrenten Schüben multisystemischer Entzündungsreaktionen begleitet sind, welchen keine Infektion zugrunde liegt, d.h. die mikrobiologischen, immunologischen und onkologischen Befunde sind negativ, und bei welchen im Gegensatz zu Autoimmundefekten, weder Autoantikörper noch Antigen- spezifische T- Lymphozyten nachzuweisen sind [2]. Das Wachstum und die Entwicklung dieser PFS- Kinder sind normal. In den fieberfreien Intervallen sind PFS- Patienten symptomfrei.

Zu den häufigsten autoinflammatorischen Fiebersyndromen zählen das familiäre Mittelmeerfieber (FMF), das Tumor- Nekrose- Faktor- Rezeptor 1- assoziierte periodische Syndrom (TRAPS) und das Hyper- IgD Syndrom (HIDS), welche neben mindestens fünf weiteren Syndromen unter den Begriff „hereditäre autoinflammatorische Fiebersyndrome“ fallen, und das PFAPA- Syndrom.

## Fragestellung

Den autoinflammatorischen Fiebersyndromen FMF, HIDS, TRAPS und PFAPA sind rekurrente Entzündungsreaktionen, gekennzeichnet durch eine starke Akut- Phase Reaktion (z.B. CRP- Erhöhung), mit meist klinisch gleichförmig verlaufenden Fieberschüben, bei wiederholt nicht nachweisbarer Infektion gemein. Leukozyten und andere Zellen setzen Zytokine frei, die als endogene Pyrogene (z.B. Interleukin- 1) über eine Kaskade von Prozessen zu Fieber und anderen Symptomen mit Akut- Phase- Reaktion führen.

Die Ätiologie des PFAPA- Syndroms ist bislang ungeklärt. Während die hereditären Fiebersyndrome Defekte in der angeborenen Immunität aufweisen, die zu einer Hyperinflammation führen, und durch Genetik und Labordaten diagnostiziert werden können, handelt es sich bei dem PFAPA- Syndrom um eine Ausschlussdiagnose.

Trotz der bekannten Genetik und dem damit verbundenen Immundefekt sind für die periodischen Fiebersyndrome FMF, HIDS und TRAPS die klinischen Ausprägungen nicht gänzlich geklärt. Eine abnormale Zytokinproduktion der zirkulierenden Lymphozyten kann Ursache für eine insgesamt gestörte Zytokinsynthese sein, die für die klinische Manifestation der PFS verantwortlich sein kann. Für die erblichen Fiebersyndrome FMF [7], [8], [23], [39] HIDS [27], [28], [29], [35], und TRAPS [72], [79] sind Zytokinprofile bei erwachsenen, jedoch nicht pädiatrischen Patienten erstellt worden. Zu PFAPA wurden bisher nur Erhöhungen der Zytokine Interferon- gamma- (IFN- $\gamma$ ), Tumornekrosefaktor- alpha- (TNF-  $\alpha$ ) und Interleukin- 6- (IL-6) Konzentrationen veröffentlicht [103].

Ziel dieser Arbeit ist es,

- durch serielle Messungen sowohl der Zytokinsynthese in peripheren Lymphozyten, als auch der zirkulierenden Zytokine im Serum- im Fieberschub und im symptomfreien Intervall- zu eruieren, ob bei den PFS- Kindern eine veränderte Zytokinausschüttung vorliegt.
- da den PFS eine Akut- Phase Reaktion gemeinsam ist, zu ergründen, ob es bei den einzelnen PFS spezifische Zytokinmuster gibt und wenn dies so ist, ob sie untereinander Ähnlichkeiten aufweisen.
- die gewonnenen Daten der Kinder mit den bereits veröffentlichten von Erwachsenen zu vergleichen,

um dadurch mögliche Zusammenhänge mit der Pathogenese der vier autoinflammatorischen Fiebersyndrome FMF, HIDS, TRAPS und dem PFAPA- Syndrom bei Kindern zu ermitteln.

## 2 Einführung

### 2.1 Einteilung der autoinflammatorischen Fiebersyndrome

#### **Familiäres Mittelmeerfieber (FMF)**

##### *Klinik*

Das Familiäre Mittelmeerfieber (FMF), als häufigstes autoinflammatorisches Fiebersyndrom, ist eine meist autosomal rezessiv vererbte Multisystemerkrankung, welche v.a. bei Sephardischen Juden, Armeniern, Arabern und der türkischen Bevölkerung vorkommt. Weltweit sind 10.000 Patienten betroffen [55]. Eine autosomal dominante Vererbung wurde ebenfalls beschrieben, ist jedoch sehr selten [12].

In der ersten Lebensdekade (80% vor dem 10.Lj. ), jedoch auch erst im Erwachsenenalter (90% vor dem 20.Lj) tritt bei den Patienten eine wiederkehrende, schmerzhaft Polyserositis mit massiven Bauchschmerzen als häufiges Leitsymptom auf, begleitet von sechs bis achtundneunzig Stunden anhaltenden Fieberschüben unterschiedlicher Chronologie [10]. Sowohl die Symptome, als auch die Dauer des symptomfreien Intervalls mit 1 Woche bis 3-4 Monaten sind sehr variabel. Durch erhöhte Akut- Phase Parameter in den symptomfreien Intervallen ist FMF mit einem hohen Amyloidoserisiko assoziiert [42]. Sind dabei die Nieren irreversibel durch die systemische Amyloidose vom AA- Typ betroffen, ist dies nicht selten der lebenslimitierende Faktor [61]. Ohne Amyloidose ist die Lebenserwartung der FMF- Patienten normal.

##### *Genetik*

Das für FMF verantwortliche rezessiv vererbte *MEFV*- Gen wurde 1997 auf dem kurzen Arm von Chromosom 16 (16p13.3) lokalisiert [34], [42], [53], [62]. Bisher sind mindestens 73 verschiedene Mutationen des *MEFV*- Gens identifiziert worden [98], die meisten davon Missens- Mutationen. Das 10 kb lange *MEFV*- Gen wird vorwiegend in myeloiden Zellen exprimiert und kodiert das Protein Pyrin/ Marenostin. Pyrin/ Marenostin ist an der Regulation von Inflammation und Apoptose beteiligt [13]. Die hohe klinische Variabilität der klinischen Ausprägung der Erkrankung lässt sich auf die Heterogenität der Allele des *MEFV*- Gens zurückführen: homozygote M649V-Träger und Träger des komplexen V726A- E148 Allels erkranken an der schwersten Form des FMF und entwickeln häufig im Verlauf eine renale Amyloidose. Die Mutationen E148Q und V726A weisen eine reduzierte Penetranz auf [40].

##### *Diagnose*

Bislang sind nur unspezifische Entzündungsmediatoren, wie die Erhöhung von CRP und Serum-Amyloid- A während des akuten Schubes messbar. Die Diagnose wird primär molekulargenetisch gestellt [62].

### *Therapie*

Colchicin ist die Therapie der Wahl, da es bis heute die einzige wirksame Therapie ist, mit einer Non- Responder- Rate von 5-10% [81]. Es senkt die Frequenz der Fieberschübe und führt zur Vermeidung bzw. der Verminderung einer Progredienz der Amyloidose [20], [109]. Es sollte daher lebenslang verabreicht werden.

### ***Hyper- IgD- Syndrom (HIDS)***

#### *Klinik*

Das Hyper- IgD Syndrom (HIDS), wurde erstmals 1984 von van der Meer definiert [25], [110]. Diese Krankheit ist durch selbstlimitierende Schübe rezidivierenden Fiebers (>39°C) von 3-7 Tagen Dauer charakterisiert, begleitet von abdominellen Schmerzen, Diarrhö, Erbrechen und Kopfschmerzen. HIDS hebt sich klinisch von den übrigen hereditären Fiebersyndromen durch eine fieberbegleitende zervikale Lymphadenopathie, eine Splenomegalie, sowie durch die Tatsache ab, dass die Schübe durch Impfungen provoziert werden können. Häufig finden sich zudem ein stammbetontes makulopapulöses Exanthem und eine Arthropathie in Form einer symmetrischen Oligoarthritis. Diese Leitsymptome treten meist innerhalb des ersten Lebensjahres alle 4 bis 6 Wochen auf, wobei die individuelle Variabilität sehr hoch ist. Die Fieberschübe können von oralen oder vaginalen Aphthen begleitet sein. Mögliche Prodromalsymptome sind Halsschmerzen, Rückenschmerzen, extreme Müdigkeit, Vertigo und Erkältungen [26]. Eine im Vergleich zu FMF eher seltene Komplikation des HIDS- Syndroms stellt auch hier die Amyloidose dar [80], [82].

#### *Genetik*

Das Hyper- IgD- Syndrom wird autosomal rezessiv vererbt. Seit 1999 ist der Locus des HIDS assoziierten *MVK*- Gens auf dem langen Arm von Chromosom 12 (12q14) bekannt. Meist handelt es sich um Missense- Mutationen. Die meisten Patienten weisen eine Kombination zweier verschiedener Mutationen auf. Das Gen kodiert das Schlüsselenzym der Cholesterinbiosynthese und der Biosynthese der Isoprenoide, die Mevalonatkinase (MVK). Sie phosphoryliert Mevalonsäure, welche auf einer frühen Stufe der Cholesterinbiosynthese gebildet wird, katalysiert von der 3- Hydroxy- 3- Methylglutaryl- Coenzym A- Reduktase. Die auf 1-10% der Norm reduzierte Aktivität der MVK bei HIDS- Patienten [18], [48], [49] führt während der Fieberschübe zu einer erhöhten Plasmakonzentration und einer vermehrten Ausscheidung von Mevalonsäure im Urin [37]. Die V377I- Mutation soll im Gegensatz zu anderen Mutationen einen relativ milden Effekt auf die Mevalonatkinase- Aktivität haben [50]. HIDS und die Mevalonazidurie, eine Stoffwechselerkrankung, die mit mentaler Retardierung, Ataxie, Myopathie und frühem Sterben einhergeht, werden als zwei Enden eines Spektrums von Erkrankungen angesehen, die durch eine

reduzierte Mevalonatkinase- Aktivität verursacht werden, wobei HIDS die milde klinische Ausprägung aufweist [35].

### *Diagnose*

Rekurrente Fieberschübe assoziiert mit einer Elevation der IgD- Werte (>100IU/ml), nach zweimaliger Messung im Abstand von mindestens 4 Wochen, sowie der IgA und IgG3- Konzentrationen, bei normaler T- und B- Zellfunktion sind diagnoseweisend, jedoch nicht obligat. Die Fieberschübe sind von einer Akut- Phase- Reaktion begleitet, mit Leukozytose, CRP und Serum Amyloid A- Erhöhung und Aktivierung des Zytokin- Netzwerks [54]. Eine im Fieberschub erhöhte Mevalonsäure- Ausscheidung im Urin weist auf die Erkrankung hin [27]. Die Diagnose wird genetisch gestellt.

### *Therapie*

Es gibt bislang keine kausale Therapie. Colchicin, Cyclosporin, Immunglobuline, Naproxen und Thalidomid haben sich bei HIDS als unwirksam gezeigt. Die Therapie ist daher symptomatisch [55]. Die meisten klinischen Studien, sowie Experimente an *in vitro* Modellen, welche die Wirkung von Statinen auf die Immunantwort untersuchten, zeigten antiinflammatorische Effekte, im Sinne einer erhöhten Apoptose von Entzündungszellen und eine Verminderung der Zytokinexpression. Neuere Studien mit Biologics wie Anakinra zeigten einen positiven Effekt auf den Schweregrad und die Frequenz der Schübe [11], [90]. Die Prognose ist allgemein gut, da die Frequenz und die Intensität der Schübe häufig mit zunehmendem Alter abnehmen [55].

### ***Das Tumornekrosefaktorrezeptor-1-assoziierte periodische Syndrom (TRAPS)***

Unter dem Tumornekrosefaktorrezeptor-1-assoziierten periodischen Syndrom (TRAPS) werden das autosomal- dominant vererbte Hibernian- Fieber, welches erstmals 1982 von *Williamson et al.* [111] bei einer Irischen Familie beschrieben wurde, und das familiäre periodische Fieber zusammengefasst.

### *Klinik*

TRAPS- Patienten erkranken meist später als FMF Patienten, jedoch vor dem 20. Lebensjahr an prolongierten Fieberschüben. Die lange Dauer der Schübe, von einer bis zu mehreren Wochen, unterscheidet dieses PFS deutlich von den anderen. Bei 50% der Patienten treten sich zentrifugal an unterschiedlichen Körperstellen ausbreitende, erythematöse Plaques mit örtlich begrenzten Myalgien und eine häufig unilaterale Konjunktivitis mit periorbitalem Ödem auf. Häufige Begleitsymptome sind außerdem Kopfschmerzen, Bauchschmerzen, nicht selten kolikartig assoziiert mit Diarrhö und Erbrechen und Arthralgien [75].



Wie bei FMF und HIDS ist auch hier die Prognose von der Entwicklung einer Amyloidose abhängig, die etwa 10% der Patienten im Verlauf entwickeln [2]. Das Amyloidose- Risiko ist bei einer Erhöhung der Akut- Phase- Parameter in den symptomfreien Intervallen gesteigert [42].

### *Genetik*

TRAPS ist das häufigste autosomal- dominant vererbte PFS. Ursache dieses Syndroms sind Mutationen in Exon 2-4 und 6 des 1999 auf Chromosom 12 (12p13) identifizierten *TNFRSF1A*- Gens [52], [73]. Dieses Gen kodiert den Typ 1 TNF-Rezeptor (TNF- Rezeptor- Superfamilie 1A; TNFRS1A). TNFRS1A ist ein zellmembrangebundenes Protein, welches u.a. von Monozyten und Granulozyten exprimiert wird. Es wird während physiologischen Entzündungsreaktionen nach Aktivierung enzymatisch abgespalten und als löslicher Rezeptor ins Blut freigesetzt, wo es inhibitorisch auf TNF-  $\alpha$  wirkt. Dieser Vorgang wird als Shedding bezeichnet. Bislang sind über 45 Mutationen bekannt, von welchen einige durch strukturelle Veränderung des extrazellulären Rezeptoranteils das Shedding einschränken bzw. unmöglich machen sollen. Dies hätte eine vermehrte TNF- $\alpha$ - Wirkung und somit eine verminderte Inhibition der Entzündungsreaktion zur Folge.

Da TRAPS durch eine inkomplette Penetranz charakterisiert ist, zeigen nicht alle Patienten, die eine Mutation aufweisen Symptome [55].

### *Diagnose*

Während der Schübe sind Neutrophilie und ein erhöhtes CRP auffällig. Ein erniedrigter Serumspiegel des löslichen TNFRS1A- Rezeptors (<1 ng/ml) ist nur fakultativ nachzuweisen, weshalb der molekulargenetische Nachweis der TRAPS- assoziierten Mutationen die Diagnostik der Wahl ist [55].

### *Therapie*

Im Gegensatz zu FMF hilft Colchicin bei TRAPS- Patienten nur in Einzelfällen. Wirksam sind orale Glukokortikoide in einer täglichen Dosis über 20mg während der Fieberschübe [69]. TRAPS kann mit Etanercept, einem auf TNFRSF1B basierendem rekombinanten löslichem TNF- Rezeptor behandelt werden, wodurch sich die Attacken reduzieren und das Fortschreiten der Nierenamyloidose verlangsamt wird [52].

### **PFAPA- Syndrom**

PFAPA ist das einzige nicht- hereditäre periodische Fiebersyndrom. Erstmals 1987 beschrieben Marshall et al. [66] diese Erkrankung, ein Akronym für den Symptomenkomplex **P**eriodisches

Fieber, Aphthöse Stomatitis, Pharyngitis und zervikale Adenitis. Weltweit sind über 200 Patienten betroffen. Unter den PFS hat es die beste Prognose mit einer Spontanremission zwischen dem 4. und 8. Lebensjahr von ca. 30% der erkrankten Kinder.

### *Klinik*

Die Fieberepisoden manifestieren sich meist vor dem fünften Lebensjahr. Sie beginnen sehr regelmäßig alle 3-8 Wochen mit abrupt ansteigendem Fieber  $>39^{\circ}\text{C}$  und bilden sich nach 3-6 Tagen spontan zurück. Begleitet sind diese Fieberepisoden von dem namensgebenden Symptomenkomplex, aber auch Kopfschmerzen, Übelkeit, Erbrechen und Bauchschmerzen sind typisch [19], [64], [83], [84], [103]. Weder das Wachstum, noch die psychomotorische Entwicklung der Kinder sind beeinträchtigt.

### *Diagnose*

Die Diagnose ist eine Ausschlussdiagnose. Im Einzelfall muss das Spektrum des Fiebers unklarer Ursache differentialdiagnostisch berücksichtigt werden, insbesondere z.B. andere PFS, autoimmune und rheumatologische Erkrankungen, infektiöse und maligne Prozesse. Vorangegangene Studien berichten, dass Patienten im Fieberschub einen deutlichen Anstieg der Akut- Phase- Parameter CRP und BKS aufweisen [83], [84], [103]. Die wichtigste Differentialdiagnose ist die zyklische Neutropenie, die sich v.a. durch den ca. alle 21 Tage wiederkehrenden Abfall der Neutrophilen im peripheren Blut und der damit verbundenen Infektanfälligkeit abgrenzen lässt [60]. Im Gegensatz zu FMF und HIDS lassen sich nur selten Arthralgien oder Arthritis, und im Vergleich zu Morbus Behçet – einer mit Fieber einhergehenden Autoimmunerkrankung - weder genitale Ulcera, noch Uveitis und Urethritis nachweisen. Zudem tritt PFAPA familiär nicht gehäuft auf [66].

### *Therapie*

Therapeutisch zeigen Steroide schon bei einer Einzelgabe von 1-2mg/KG/d bei 76% der Patienten ein promptes Ansprechen und unterbrechen das Fieber in wenigen Stunden. Jedoch werden weitere Schübe nicht unterbunden, und die symptomfreien Intervalle können dadurch sogar verkürzt werden. Cimetidin kann bei 30% der Fälle zur Remission führen, wenn es über 6-9 Monate gegeben wird [33]. Studien mit jedoch kleinen Fallzahlen beschrieben bei 72% der Betroffenen einen heilenden Effekt der Adenotonsillektomie [103].

In **Tabelle 1** sind die spezifischen klinischen und genetischen Charakteristika der 4 häufigsten periodischen Fiebersyndrome zusammengefasst.

**Tab. 1:** Gegenüberstellung der vier häufigsten periodischen Fiebersyndrome

	<b>FMF</b>	<b>HIDS</b>	<b>TRAPS</b>	<b>PFAPA</b>
<b>Alter bei Beginn</b>	<10 Jahre	<1 Jahr	<20 Jahre	<5 Jahre
<b>Fieberdauer</b>	1-3 Tage	3-7 Tage	> 7 Tage	3-5 Tage
<b>Symptomfreies Intervall</b>	Wochen-Monate	4-8 Wochen	bis zu mehreren Monaten	3-6 Wochen
<b>Spezifische Befunde</b>	Polyserositis: Peritonitis Arthritis Pleuritis	Lymphadenopathie Bauchschmerzen Erbrechen Diarrhö Arthralgien Arthritis (Splenomegalie)	Periorbitale Ödeme Konjunktivitis Myalgien	zervikale Lymphadenopathie Pharyngitis Weisse tonsilläre Plaques Aphthöse Stomatitis
<b>Hautbefunde</b>	erysipelartig (beinbetont)	makulopapulös	schmerzhafte erythematöse Plaques	Keine
<b>Spezifische Laborveränderungen</b>	C5a- Inhibitor In serösen Flüssigkeiten vermindert	IgD- Erhöhung MVK- Verminderung	Typ 1- TNF- Rezeptor im Serum vermindert	Keine
<b>Komplikationen</b>	Amyloidose	Amyloidose, selten	Amyloidose	keine
<b>Erbgang</b>	Autosomal rezessiv	Autosomal rezessiv	Autosomal dominant	unbekannt
<b>Therapie</b>	Colchicin	Steroide Anakinra Etanercept	Kortikosteroide Etanercept	Kortikosteroide Cimetidin ATE

Abkürzungen: FMF= Familiäres Mittelmeerfieber; HIDS= Hyper- IgD- Syndrom, TRAPS= Tumor- Nekrosefaktor-assoziertes periodisches Syndrom, PFAPA= Periodisches Fieber, aphthöse Stomatitis und/oder zervikale Adenitis, TNF= Tumor- Nekrose- Faktor, ATE= Adenotonsillektomie.

## 2.2 Zytokine

Zytokine sind lösliche Glykoproteine und Peptide, die als Mediatoren die Funktion, das Wachstum und die Differenzierung von Zellen regulieren. Während der Immunantwort werden Zytokine vorwiegend von aktivierten Monozyten, T- Lymphozyten und anderen Entzündungszellen sezerniert. Sie vermitteln und unterhalten u.a. generalisierte und lokalisierte Entzündungsreaktionen und sind als endogene Pyrogene Vermittler von Fieber [39]. Neben Immun- und Entzündungsreaktionen sind Zytokine auch an der Blutbildung beteiligt.

Die vorwiegend durch Antigene oder Zytokine stimulierten Zellen synthetisieren und sezernieren Zytokine in sehr geringen Mengen und aktivieren Zielzellen über eine spezifische hochaffine Rezeptorbindung. Durch die Bindung an den spezifischen Rezeptor, werden z.B. via Phosphorylierung Transkriptionsfaktoren (z.B. Nuklearfaktor  $\kappa$ B) im Zellinneren aktiviert und somit Informationen in den Kern vermittelt, die auf Transkriptionsebene unterschiedliche Gene regulieren. Auf diese Weise werden u.a. von Zytokinen erneut Zytokine produziert bzw. inhibiert oder Rezeptoren vermehrt exprimiert.

Die Wechselwirkungen der Zytokine bilden ein komplexes Netzwerk, wodurch Zellen auf pathologische Ereignisse optimal abgestimmt reagieren können.

Nach ihrer Hauptaktivität werden Zytokine in vier Klassen eingeteilt. Dazu gehören Interferone, Interleukine, Tumor- Nekrose- Faktoren und Wachstumsfaktoren. Sie sind heute alle gentechnisch synthetisierbar und finden vor allem in der Tumorthherapie breite Anwendung.

In dieser Arbeit wurden IFN- $\gamma$ , die Interleukine IL1- $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12p70 und TNF-  $\alpha$  bestimmt. Die Funktionen und Wirkungen dieser Zytokine sind in **Tabelle 2** zusammengefasst. Diese zeigt neben der Klassenzuteilung der Zytokine und der Angabe der unterschiedlichen produzierenden Zellen, dass die einzelnen Zytokine an verschiedene Rezeptoren binden und parallel zahlreiche unterschiedliche Effekte auslösen können. Einige Zytokine binden an denselben Rezeptor und wirken damit ähnlich, was zu einer hohen Redundanz führt. Zudem ist ersichtlich, dass jedes Zytokin einen vorwiegend pro- oder anti- inflammatorischen Effekt hat.

IL1- $\beta$  und IL-6 z.B. aktivieren Lymphozyten und Makrophagen, die Zytokine synthetisieren und induzieren die Synthese der Akut- Phase- Proteine und haben somit eine vorwiegend pro-inflammatorische Wirkung, während IL-4 und IL-10 durch Inhibierung von Entzündungszellen vorwiegend anti- inflammatorisch wirksam sind. Für eine effektive Immunabwehr ist die regulierte Interaktion der Zytokine notwendig.

Bei der spezifischen zellulären Immunantwort wird die TH1- von der TH2- Reaktion unterschieden. TH1- Zellen produzieren IL-2, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  und dominieren in Autoimmunreaktionen, während die TH2- Zellen, die vorwiegend IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13 ausschütten, bei allergischen und parasitären Erkrankungen nachweisbar sind [91]. Die Polarisierung versus TH1- oder TH2- Antwort ist von dem Verhältnis IL-12, welches im Wesentlichen von antigenpräsentierenden Zellen produziert wird und die TH1- Antwort induziert und IL-4, welches die TH2- Reaktion begünstigt, abhängig. Beide Immunreaktionen wirken gegenseitig inhibitorisch und damit regulatorisch aufeinander [78].

Dadurch dass die Zytokin- Sekretion auch von Hormonen wie Kortisol beeinflusst wird, unterliegen die Zytokin- Konzentrationen einem zirkadianen Rhythmus. Die Zytokine IL-6 und IL-1 z. B weisen die höchste Konzentration zwischen 12 Uhr nachts und 3 Uhr morgens auf. Nach Untersuchungen von Petrovsky et al. besteht eine indirekte Korrelation zwischen IFN- $\gamma$ , IL- 2, TNF- $\alpha$ , bzw. weniger bei der IL-6 und IL-10 Produktion und dem Plasma- Kortisol [86]. Die größte Sensibilität gegenüber der inhibitorischen Wirkung durch physiologische Kortisol- Konzentrationen liegt bei IFN- $\gamma$ , IL-12, und TNF- $\alpha$ , gefolgt von IL-1 und am geringsten ist sie bei IL-6 und IL-10 [9].

Aus dieser kurzen Zusammenfassung über Zytokine und ihre Wirkungen wird klar, dass die mit Zytokinen verbundenen Pathologien auf vielerlei Ebenen, wie z.B. der Zytokinstruktur, der Rezeptoren, der Transkriptionsfaktoren, der Genetik und der Hormone ihre Ursache(n) haben können.

**Tab. 2: Die gemessenen Zytokine und ihre Wirkung**

	<b>Bez.</b>	<b>Rezeptor(en)</b>	<b>prod. Zellen</b>	<b>Effekt</b>
Interleukine	IL-1 $\beta$	CD121a, CD121b	ubiquitär, v.a. mononukleäre Makrophagen,	proinflammatorisch Fieber, Neutrophilie, Induktion der Produktion von IL-2, Akut- Phase- Proteine und zirkulierendes IL-6 . Steigerung der Synthese von IL-1 und Prostaglandin Aktivierung von B- und T- Lymphozyten T- Zell-, und Makrophagen- Aktivierung
Interleukine	IL-2, T-cell- growth factor 1		TH-1- Zellen	proinflammatorisch Wachstum und Aktivierung von B- und T- Zellen und NK- Zellen, Induktion sekundärer Zytokine, wie IL-1, IFN- $\gamma$ und TNF- $\alpha$
Haemato- poetine	IL-4 BCGF-1 BSF-1	CD 124 CD132	TH-2- Zellen, Basophile	antiinflammatorisch Schlüsselzytokin der TH2-Antwort Induziert Proliferation und Differenzierung von T- und B- Zellen, Steigerung der IgG und IgE- Synthese
Haemato- poetine	IL-6 IFN- $\beta$ 2 BSF-2 BCDF	CD 126 CD130	T-Zellen (TH1) Makrophagen Endothelzellen	proinflammatorisch Produktion von Akut-Phase-Proteinen Aktivierung von B- und T-Zellen Fieber, Steigerung der IgA- Synthese suppressiver Effekt auf TNF- $\alpha$
Haemato- Poetine	IL-10 Cytokine- Synthesis- Inhibitor- Faktor	IL-10R $\alpha$ CFR 2-4	T-Zellen (TH2) Makrophagen NK- Zellen	antiinflammatorisch inhibiert Synthese v. TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 in Neutrophilen Eosinophilen und Mastzellen Inhibitor v. Makrophagenfunktionen entzündungshemmende B-Zell-Stimulation hemmt Produktion von IFN- $\gamma$ und IL-2 in T-Zellen d.h. hemmt TH1- Antwort
	IL-12 NK-Cell- Stim-Faktor	IL-12R $\beta$ 1 IL-12R $\beta$ 2	B-Zellen Makrophagen	proinflammatorisch Schlüsselzytokin der TH1- Antwort synergistische Wirkung mit IL-12 in der Aktivierung zytotoxischer Zellen fördert Differenzierung von NK- und T- Zellen
Inter- ferone	IFN- $\gamma$	CD119 IFNGR2	T-Zellen, B- Zellen NK-Zellen	Pro- und antiinflammatorisch reguliert B- und T-Zellen erhöhte Expression v. MHC- Molekülen, Aktivierung von NK- Zellen und Makrophagen Ig- Klassenwechsel, hemmt TH2- Zellen (IL-4 und IL-10)
TNF- Familie	TNF- $\alpha$ Cachectin	p55, p75 CD 120a CD120b	Makrophagen NK- Zellen T-Zellen	proinflammatorisch Induziert Akut- Phase- Parameter und Zytolyse, Fieber, Endothelaktivierung, Kachexie

Nach Janeway: Immunologie, 5.Ausgabe 2002 und Schmidt, Thews: Physiologie des Menschen, 27. Auflage, Springer Verlag 1997; Niederle, Bergmann, Ganser: Zytokine, Präklinik und Klinik, 1. Auflage, Gustav Fischer Verlag Jena 1996 und Dinarello CA. Infection, fever, and exogenous and endogenous pyrogens: some concepts have changed. *J Endotoxin Res* 2004; 10: 201.33. Dinarello CA. Blocking IL-1 in systemic inflammation. *J Exp Med* 2005; 201: 1355.

## 3 Patienten und Methodik

### 3.1 Patienten und Kontrollen

#### Patienten

Im März 2004 waren in der diagnostischen Datenbank der infektiologisch- immunologischen Abteilung des Dr. v. Haunerschen Kinderspitals 247 Patienten mit V.a. rezurrenente Fieberschüben eingetragen. Aus dieser Datenbank nahmen 33 Patienten an der Zytokin- Studie teil.

Diese Kinder wurden entweder von Ärzten zugewiesen, kamen direkt oder nach telefonischer Absprache in die Klinik zur Untersuchung. Die Eltern bzw. Patienten wurden sachgemäß über die Studie, Ihre Risiken und Ziele aufgeklärt und bewilligten die Durchführung schriftlich. Die Studie wurde von der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Ludwig- Maximilians- Universität in München genehmigt.

#### *Diagnosestellung*

Um die Verdachtsdiagnose eines PFS standardisiert zu klären, wurde zunächst die Periodizität des Fiebers anamnestisch ergründet. Wichtig war dabei die Angabe des Alters bei Beginn des Fiebers, der zeitliche Verlauf der Fieberschübe, Dauer und Höhe der gemessenen Körpertemperatur, sowie Therapieversuche und das Ansprechen auf Medikamente wie beispielsweise Antibiotika oder Kortison. Assoziationen mit Lymphknotenschwellung, Aphthen, Erbrechen, Durchfall, Bauchschmerz, Peritonitis, Gelenkschwellung bzw. -schmerzen, Exanthem, ethnische Herkunft und Familienanamnese wurden erfragt und gaben erste Hinweise zu den einzelnen Untergruppen der PFS.

Wurde durch die Angaben der Verdacht auf ein rezidivierendes Fieber bestätigt, folgte der befundorientierte Ausschluss von Differentialdiagnosen, insbesondere von akuten Infektionen, Immundefekten, rheumatologischen/ autoimmunologischen und onkologischen Erkrankungen.

Daraufhin wurde eine laborchemische Basisuntersuchung wie sie in **Tabelle 3** aufgezeigt ist durchgeführt, die zusammen mit der Anamnese eine erste Zuteilung zu einer der vier PFS ermöglichte. Durch serologische Messungen des IgD, durch Bestimmung der Mevalonatkinase-Aktivität bei Verdacht auf HIDS im fieberfreien Intervall und molekulargenetisch nach DNA-Isolation wurde der Verdacht auf ein PFS bestätigt und eine endgültige Diagnose gestellt.

**Tab. 3: Basisuntersuchungen zur PFS- Diagnostik****Labor:**

- Blutbild+Diff. / Ausstrich, CRP, BKS, Leber-, Nierenwerte, LDH, Serum- Elpho, TSH, fT4
- Blutkultur im Fieber
- Urinstatus, ggf. Urinkultur
- Immunglobuline (incl. IgD)
- IgG- Subklassen u. T/B-Lymphozyten quantitativ ggf. incl. Stimulation
- befundorientierte Mikrobiologie (Blutserologie, -PCR, Urin, Stuhl)
- ANA-Screening, ASL, Anti-DNAse
- Katecholamine (Urin) < 5 Jahren
- Hämoccult
- ACE

**weitere Untersuchungen:**

Röntgen- Thorax, Sono- Abdomen, EKG, Herz- Echo  
Augenarzt, HNO

Abkürzungen: Diff= Differentialblutbild, CRP= C-Reaktives- Protein, BKS= Blutsenkung, Elpho= Elektrophorese, ACE= Angiotensin-Converting- Enzyme

**Studienbedingungen für die Patientenauswahl**

Die durch Bestätigung der Verdachtsdiagnose ausgewählten PFS- Patienten wurden angewiesen sich sowohl in Remission, als auch innerhalb der ersten 12 Stunden nach Beginn des Schubes vorzustellen. Akute Fieberschübe wurden definiert als akute Temperaturerhöhungen >38,5°C und weitere Symptome der aktiven Erkrankung. Als Remission hingegen galt eine symptomfreie Phase von mindestens 10 Tagen.

Die Patienten wurden von PFS- erfahrenen Ärzten bei jeder Vorstellung anamnestisch befragt und klinisch untersucht. Die Körpertemperatur wurde rektal mit einem digitalen Thermometer gemessen. Für die Bestimmung der Akut- Phase- Reaktion und Messung der Zytokine wurden Blutproben in Remission (R), 6-12 Stunden (F1), 18-24 Stunden (F2) und 24-30 Stunden (F3) nach Fieberschubbeginn gewonnen. Diese Zeitabschnitte wurden nach der Halbwertszeit der Zytokine und der Dauer der Fieberepisoden der Patienten gewählt, um frühe Veränderungen der Zytokinprofile ermitteln zu können. Eine Medikation war, mit Ausnahme von Nicht- steroidal Antiphlogistika nach der Blutentnahme im Schub, für die Studienzeit nicht zulässig. Zum Ausschluss bakterieller oder viraler Infektionen wurden Halsabstriche mikrobiologisch analysiert und Antikörpertiter viraler und bakterieller Antigene im akuten Schub und im symptomfreien Intervall ermittelt.

**Kontrollpersonen**

Als Kontrollen für die lymphozytäre Zytokinsynthese fungierten für FMF, HIDS und TRAPS 22 (13 Jungen und 9 Mädchen, Durchschnittsalter 9.22 Jahre, +- 2.66 SA, Bereich 4-18 Jahre) und für PFAPA 20 (15 Jungen und 5 Mädchen; Durchschnittsalter 7.4 Jahre, +- 0.69 SA; Bereich 4-13) gesunde, altersentsprechende Kinder,

Für Kontrollwerte der zirkulierenden Zytokine dienten Messungen an weiteren 15 gesunden Kindern (7 Jungen und 8 Mädchen; Durchschnittsalter 7.9 Jahre, +- 0.6 SA; Bereich 4-12).

Bei den Kontrollpersonen handelt es sich um Kinder, welche sich einer Elektiv- Operation in unserer kinderchirurgischen Klinik unterzogen. Durch präoperative Untersuchungen wurden sowohl akute und chronische Erkrankungen, als auch Medikationen ausgeschlossen.

Die Blutentnahme und –verarbeitung, sowie die erforderlichen Messungen waren mit denen, der Patienten identisch. Die Kontrollpersonen bzw. deren Erziehungsberechtigte wurden sachgemäß über die Studie, Ihre Risiken und Ziele aufgeklärt und bewilligten die Durchführung schriftlich.

## **3.2 Methodik**

### **3.2.1 Messung von C-reaktivem Protein (CRP), Leukozyten und Blutsenkungsgeschwindigkeit (BKS)**

Die CRP- Konzentration wurde mittels eines Immunoturbid Assays bestimmt. CRP- Werte unter 0.5mg/dl, sowie Leukozytenzahlen zwischen 5000 und 10500/ $\mu$ l waren im Normbereich. Die BKS wurde nach der Methode von Westergreen ermittelt und nach einer Stunde abgelesen. Werte von 0– 15 mm/h waren in der Norm.

### **3.2.2 Aufbereitung der Blutproben für die Zytokinmessungen**

Es wurden Blutproben von peripheren Venen abgenommen und sowohl in ein mit Heparin gefülltes, endotoxinfreies Reagenzglas als auch in ein Serum- Röhrchen gefüllt (Sarstedt, Nübrecht, Germany). Um eine spontane ex vivo Zytokinsynthese und –ausschüttung zu vermeiden, wurden die Röhrchen für die Bestimmung der Zytokine im Serum sofort zentrifugiert (225g für 10min), und das Serum wurde bis zur Messung bei -70°C eingefroren.

### **3.2.3 Intrazelluläre Zytokinbestimmung in Lymphozyten**

Um ein Zytokinprofil erstellen zu können, wurden bei allen Patienten in Remission einmalig, im akuten Fieberschub in zeitlichen Abständen von 6-12h und 18-24h nach Fieberbeginn, heparinisiertes venöses Vollblut (1:1000) unter sterilen Bedingungen abgenommen und innerhalb der folgenden 4-6 Stunden verarbeitet. Vorangegangene Experimente zeigten Veränderungen in der Zytokin- Produktion, wenn mit der Verarbeitung nicht innerhalb der ersten 6 Stunden nach Probengewinnung begonnen wurde. Es wurde zu jedem Abnahmezeitpunkt ebenfalls Serum für die spätere Bestimmung von Zytokin- Konzentrationen akquiriert.



### **Oberflächenmarkierung**

In jeder Blutprobe wurden die Prozentanteile von B-Zellen und T-Zellen und ihren Subpopulationen, NK-Zellen und Monozyten durch Immunphenotypisierung mittels FACS-Standardmethoden bestimmt. Folgende monoklonale Antikörper der Firma Becton Dickinson (BD, Heidelberg) mit jeweiligem Fluorochrom wurden für die Markierung verwendet: CD3- FITC, CD4- APC, CD8- PE, CD16/56- PE, CD19- APC. Die markierten Zellen wurden mit einem FACScan Durchflußzytometer bestimmt. Die Ergebnisse wurden in dem prozentualen Anteil der positiven Zellen in den Zellsuspensionen angegeben.

### **Lymphozytenstimulation**

Für die *in vitro* Zellstimulation wurden von jeder Person 8 x 100µl Blut mit 900 µl RPMI 1640 Kulturmedium (Biochrom, Berlin), welches mit 10% hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum (FCS, Biochrom) und L- Glutamin (Biochrom) versetzt wurde, in einer 24- Loch- Mikrotiterplatte kultiviert. Die Kinetik der Zytokinproduktion wurde durch die vergleichende Analyse unstimulierter und stimulierter Zellen ermittelt. Daher wurden 4 der 8 Proben mit 10ng/ml Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA, Sigma, München), 0.75µg/ml Ionomycin (Sigma,) und 1.73µg/ml Monensin (Sigma,) stimuliert. Monensin wurde hinzugefügt, um den Export der im Golgi- Apparat neusynthetisierten Zytokine aus der Zelle zu unterbinden und damit die Menge von intrazellulärem Zytokin pro Zelle zu steigern. Die Zellen wurden für 6h bei 37°C in einer Atmosphäre von 95% Luft und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

### **Färbung**

Die intrazelluläre Färbung für die durchflußzytometrische Messung wurde nach den Protokollen von *Jung et al* [56] und *Prussin et al.* [87], [88] mit geringer Modifikation durchgeführt.

Unmittelbar nach der 6-stündigen Inkubation wurden die Zellen von den 8 Wells jeweils in ein 12x75mm Polystyrene- Röhrchen mit Rundboden (Becton Dickinson) pipettiert und zweimal in jeweils 3ml Puffer- Lösung (Phosphatpufferlösung, mit 1% FCS) gewaschen. Anschließend wurden die Erythrozyten mit je 500µl Formaldehyd- Fixierlösung (4% Paraformaldehyd (Serva, Heidelberg) in PBS) für 10min bei 4°C lysiert. Nach Zentrifugation (1250 U/min, 5min, 4°C) wurde der Überstand dekantiert und erneut zweimal mit Waschpuffer- Lösung gewaschen. Hier war es möglich die Proben bis zu 48h bei 4°C aufzubewahren.

Die Proben wurden dann einmal mit dem PBS- Puffer gewaschen und durch Vortexen mit 1ml Permeabilisationspuffer, ein mit 5µg/ml Saponin (Serva) und 2.38µg/ml Hepes (Merck, Darmstadt), versetzter Waschpuffer, resuspendiert und für 10min bei 4°C inkubiert. Nach Hinzufügen von 2ml Permeabilisationslösung wurden die Zellen zentrifugiert und dekantiert.

Im nächsten Schritt wurden simultan 50µl- Aliquots (~50.000 Zellen/Röhrchen) unstimulierter und stimulierter Kulturen mit 7.5 µl des Oberflächenmarkers CD3- Peridin- Chlorophyll-a-protein (CD3-PerCP, Becton Dickinson), 5.0 µl CD8- Fluorescein isothiocyanate (FITC, Coulter Immunotech, Krefeld) und mit 10 µl der verdünnten, R- Phycoerythrin (PE)- markierten, monoklonalen Zytokin-Antikörper TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, und der entsprechenden Isotypenkontrollen (Coulter Immunotech, Krefeld,) und IL-10 (BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg) inkubiert. Die Verdünnung der Zytokin- Antikörper mit Permeabilisationspuffer erfolgte im Verhältnis 1:20 (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-10), 1:40 (IL-2) und 1:4 (IL-4).

Alle Proben wurden in Dunkelheit bei 4°C für 25 min gefärbt. Zuletzt wurden die markierten Zellen dreimal gewaschen und mit 250µl Fixierlösung bestehend aus 4% Paraformaldehyd versetzt und sofort durchflußzytometrisch gemessen oder bei 4°C aufbewahrt und innerhalb von 24h bestimmt.

### ***Durchflußzytometrische Messung und Ergebnisanalyse***

Die Intensität der Fluoreszenz wurde mittels FACScan Durchflußzytometer (Becton Dickinson (BD)) gemessen. Die Einstellungen waren für jede Probe identisch. 10.000 Ereignisse wurden gemessen und mit Hilfe der CELL Quest Software (BD) ausgewertet.

Die Kompensationseinstellungen wurden mittels monoklonaler Einzel- Farb- Antikörper, z.B. CD3 oder CD8, in separaten Röhrchen, für jedes der drei Fluorochrome bestimmt: FITC, PE und PerCP.

Bei der Analyse wurden Dot- Plot- Graphiken mit Forward- scatter gegen Side- scatter verwendet und eine Lymphozyten- Region R1 gesetzt. Die Dot- plot Quadrantenstatistik wurde in Bezug auf CD8+ (FL-1, FITC) oder CD8-/ CD4+ T-Zellen versus Zytokin-Fluoreszenz (FL-2) analysiert. Dies war notwendig, da die PMA/ Ionomycin Stimulation die CD4+- Expression herunter regulieren und damit die Ergebnisse der CD4+ Zellen verfälschen kann [85]. Zytokin- positive CD4+ oder CD8+ T-Zellen wurden über Setzen einer unteren Grenze für Fluoreszenzpositivität anhand der unstimulierten Zellen ermittelt. Die Daten wurden als Prozentanteile von CD4+ oder CD8+ Zellen mit Zytokinexpression innerhalb der Lymphozyten- Region ausgedrückt. Absolutwerte von CD4+ und CD8+ Zellen erhielt man durch Multiplikation der jeweiligen Prozentzahlen von Zytokin-positiven Ereignissen mit der Konzentration der Lymphozyten im peripheren Blut. Für die Quantifizierung der Zytokinmenge in der einzelnen positiven Zelle wurde die durchschnittliche Fluoreszenzintensität der positiven Ereignisse herangezogen.

Um die Konzentrationsunterschiede der intrazellulären Zytokine zu vergleichen, wurde die prozentuale, intrazelluläre Zytokinsynthese für jedes einzelne Zytokin in Verhältnis zum Mittelwert der altersentsprechenden Kontrollgruppe gesetzt.

### 3.2.4 Zytokinbestimmung im Serum durch Cytometric bead array immunoassay

Um die Serumzytokine IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 and IL-12 zu erfassen wurden die Th1/Th2- und Entzündungs- Cytometric bead array immunoassays (CBA, Becton Dickinson) wie beschrieben durchgeführt [16].

#### **Methode**

Der CBA ist eine Messung mit Hilfe von Mikropartikeln in Form von Polystyrene- K ugelchen (beads). Jedes Partikel bindet kovalent an eines der Zytokin- Antikörper. Die Partikel haben eine Wellenlänge von ca. 650 nm (FL-3). Die Antikörper- Partikel dienen dazu, ein auf eine Immunoassay- Platte gegebenes Zytokin zu binden (Sandwich). Durch die Bindung eines Zytokins ergeben sich für jedes Partikel eines der sechs möglichen Fluoreszenzintensitäten. Somit repräsentiert jedes Partikel eine bestimmte Population für die Erstellung eines Immunoassays eines jeden Zytokins, einmalig in seiner FL-3- Intensität. Dadurch ist es möglich gleichzeitig mehrere Zytokine in einem Gemisch zu detektieren, um sie dann mittels durchflu zytometrischer Messungen zu quantifizieren:

Die gebundenen Zytokine werden durch den direkten Immunoassay unter Verwendung von sechs verschiedenen, sekundären Antikörpern detektiert, die an PE gebunden sind. PE hat eine Wellenlänge von ca. 585nm (FL-2). Die gemessene Intensität der Fluoreszenz ist proportional zur Zytokin- Konzentration in den Proben.

Die Kalibratoren (Standardbereich von 0 bis 5000pg/ml) für das Assay- System (capture Ab-bead reagent, detector Ab-PE reagent) sind eine Mischung aus allen sechs Zytokinen.

Aus einem Kalibrator- Set erhält man sechs Standardkurven (Sechs Ergebnisse pro Kalibrationspunkt).

#### **Durchführung**

Für das Antikörper- Partikel- Reagenz wurden die Mikropartikel nach der bekannten Methode [16] präpariert und mit den Antikörper der Zytokine IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-10 versetzt. Für jedes Proben- und jedes Zytokin- Standardgemisch, wurden 5-10 $\mu$ l der Probe oder des Standards zu dem Gemisch aus je 50 $\mu$ l des gebundenen Antikörper- Partikel- Reagenz und dem Detektor- Antikörper- PE Reagenz hinzu pipettiert.

Das Gemisch (105-110 $\mu$ l) wurde sofort für 20min bei Raumtemperatur inkubiert und gewaschen, um ungebundene Antikörper- PE- Detektoren zu entfernen. Dann folgte die Datenerhebung mittels Durchflußzytometer. Eine Kundensoftware wurde für die Datenanalyse, zur Erstellung der Kalibrationskurven und zur Berechnung der Zytokinkonzentration der Proben zur Verfügung gestellt.

Die Sensitivität der Arrays mit einem 5-10 µl Probevolumen war 15.6 pg/ml (IFN-γ), 3.7 pg/ml (TNF-α), 7.2 pg/ml (IL-1β), 6.6 pg/ml (IL-2), 6.5 pg/ml (IL-4), 2.5 pg/ml (IL-6), 3.3 pg/ml (IL-10) und 1.9 pg/ml (IL-12).

### **3.2.5 Bestimmung löslicher TNF- Rezeptoren im Serum**

Die Messung der löslichen TNF- Rezeptoren p55 und p75 erfolgte automatisch mittels eines CobasCore Messgerätes (Roche, Schweiz) mit enzyme- linked immunosorbent assays (ELISAs) (Biosource Europe, Belgien). Der Rezeptor- Assay ermittelt Konzentrationen löslicher und gebundener Rezeptoren von bis zu 100pg/ml und wird weder von freiem, noch von ungebundenem TNF unter einer Konzentration von 10ng/ml beeinträchtigt [58].

### **3.2.6 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung der **PFAPA**- Daten (n=6) wurde mit dem Windows SPSS ® 12.0 Programm unter Verwendung gepaarter und ungepaarter t- Tests durchgeführt. Vor ungepaarten t- Tests wurde zusätzlich der Levene Test von Varianzunterschieden zwischen den zu vergleichenden Gruppen durchgeführt und im Falle einer Abweichung von der Normalverteilung der Welch Test verwendet. Eine Angleichung für multiple Vergleiche wurde aufgrund der kleinen Fallzahl (n=6) nicht durchgeführt.

Die **übrigen PFS**- Patienten waren in ihrer Anzahl so gering, dass sie jeweils als Einzelfälle beschrieben wurden.

## 4 Ergebnisse

Von den 33 Patienten, die an der Zytokin- Studie teilnahmen, stellten sich 14 Kinder sowohl im fieberfreien Intervall, als auch im akuten Fieberschub vor. Eine dreifache Verlaufsmessung war bei 4 dieser Patienten, eine zweifache bei 10 von ihnen möglich. Drei Patienten die sich nur im Fieberschub zu Verfügung stellten, wobei für 2 von ihnen die Zytokine zweimal im Verlauf bestimmt wurden, gingen nicht in die Auswertung ein. Nicht ausgewertet wurden auch die Daten der 17 Patienten, die sich nur im fieberfreien Intervall vorstellten, bei einem dieser Patienten war das Fieber während der Anreise abgeklungen.

### 4.1 FMF

#### 4.1.1 3 Patienten und ihr klinisches Bild

Die Diagnose des familiären Mittelmeerfiebers konnte bei 3 Patienten, durch den Nachweis einer Mutation des *MEFV*- Gens, davon 1 Junge und 2 Mädchen gestellt werden. Alle 3 nahmen an der Messung in Remission teil. Bei dem Jungen (ID16) und eines der Mädchen (ID72) konnten die Messungen in F1 bis F3, bei dem anderen Mädchen (ID17) nur F2 und F3 ausgewertet werden.

Bei den Patienten ID17 und ID16 handelte es sich um 2 Geschwister türkischer Abstammung, deren Eltern konsanguin waren. Weitere Familienmitglieder, darunter 2 weitere Geschwister, waren nicht betroffen. Die Diagnose konnte bei der Schwester ID17 am 30.7.02 und bei dem Bruder ID16 am 25.5.02 molekulargenetisch verifiziert werden: Beide sind homozygote Träger der M694V- Mutation in Exon 10 des *MEFV*- Gens.

Der **Bruder (ID16)**, ist am 09.04.1989 in Deutschland geboren. Seinen ersten Fieberschub bekam er mit 36 Monaten. Die Fieberschübe mit einer maximalen Körpertemperatur von bis zu 39 °C kündigten sich meist mit heftigen abdominellen Schmerzen an, traten bei ihm bis zu 24 mal im Jahr auf und dauerten 1-2 Tage mit einem durchschnittlichen fieberfreien Intervall von 1-6 Wochen. Präzipitierende Faktoren waren Überbelastung jeglicher Art, sowie der Konsum von Cola. Weitere Begleitsymptome waren Kopfschmerzen, Arthralgien im Knie, Bauchschmerzen, Erbrechen und Brustschmerzen. Die körperliche Untersuchung ergab eine Pleuritis und eine Splenomegalie. Während des akuten Schubes waren die Ohren des Jungen rot und geschwollen. Seine Lippen wiesen zahlreiche Bläschen auf und er klagte über vermehrte Schmerzen beim Atmen. Durch eine Rektumbiopsie am 15.6.98 wurde eine bestehende Amyloidose ausgeschlossen. Im Oktober 1997 wurde bei dem Jungen ein intrathorakales Lymphangiom reseziert. Die Entwicklung des Jungen war altersgemäß. Therapeutisch kamen Paracetamol, was kaum einen Effekt hatte, sowie Colchicin zur Anwendung. Letzteres hatte keinen Effekt auf die Frequenz oder die Dauer der Fieberschübe, wurde jedoch prophylaktisch zur Vermeidung der Amyloidose eingenommen.

Die **Schwester (ID17)** wurde am 10.07.1983 in der Türkei geboren und lebte ab dem 4. Lebensjahr in Deutschland. Sie war beim ersten Fieberschub 24 Monate alt. Auch ihre Schübe kündigten sich durch heftige Bauchschmerzen an. Das Fieber stieg bis auf maximal 39°C an und dauerte 1-2 Tage mit einem fieberfreien Intervall von 2-4 Wochen. Begleitet wurde das Fieber von Kopfschmerzen, Arthralgien im Sprunggelenk, Bauchschmerzen mit Erbrechen und Diarrhö, sowie Brustschmerzen. Die körperlichen Befunde wiesen eine Pleuritis und eine Splenomegalie auf. 1997 wurde eine bestehende Amyloidose durch eine Rektumbiopsie ausgeschlossen. Während des akuten Schubes war der Allgemeinzustand der Patientin wesentlich schlechter. Neben starkem Schwitzen, litt sie an heftigen abdominellen Schmerzen bei sehr geblähtem Bauch, sowie an schmerzhafter Respiration. Sonographisch konnte während des akuten Schubes wenig freie Flüssigkeit im Becken nachgewiesen werden.

Paracetamol bewirkte in einer täglichen Dosis von 40 mg/ED/die eine Reduktion des Fiebers für 2-3 Stunden. Die tägliche Einnahme von 1,5 mg Colchicin reduzierte die Symptome und verlängerte die fieberfreien Intervalle.

Das **andere Mädchen (ID 72)** wurde am 02.08.2001 in Deutschland als Tochter einer Phillipinin und eines Deutschen geboren. Ihre Klinik ließ zunächst an ein typisches PFAPA- Syndrom denken: periodisch auftretende Fieberschübe, ab dem 3. Lebensjahr im Abstand von 2-3 Wochen, und 2-6 Tagen Dauer mit einer maximalen Temperaturerhöhung von 41,6°C. Die Fieberschübe waren assoziiert mit inguinaler Lymphadenopathie und fest haftenden Belägen auf den Tonsillen. Zudem litt die Patientin im Schub an Diarrhö, Erbrechen, Bauchschmerzen, Kopfschmerzen und symmetrischen Arthralgien. Durch die standardisierten molekulargenetischen Untersuchungen, zum Ausschluss der hereditären PFS, konnte eine komplexe Heterozygotie für FMF nachgewiesen werden: Die Patientin ist ein heterozygoter Merkmalsträger zweier Mutationen: einer Pro<sub>369</sub>->Ser- und einer Arg<sub>408</sub> -> Gln- Substitution, die beide in Exon 3 des Marenostriin/ Pysin- Gens kodiert werden. Diese Genetik konnte sowohl beim Vater, als auch bei der Mutter und der Großmutter väterlicherseits nachgewiesen werden.

Während Colchicin, Cimetidin und Steroide keinen therapeutischen Effekt aufwiesen, entfieberte die Patientin bereits bei einer einmaligen Gabe von 250mg/ED/die Paracetamol für 4-6 Stunden.

#### 4.1.2 Akut- Phase- Reaktionen

Alle drei Patienten zeigten im akuten Schub eine deutliche Erhöhung des **CRP** und der **BKS**. Während die CRP- Werte bei dem Jungen ID16 und dem Mädchen ID72 im Verlauf der 3 Messungen im Schub zunahmen und eine Normalisierung in Remission eintrat, war bei der Schwester ID17 das Gegenteil der Fall (**Tab. 4**).

Bei den Geschwistern ID16 und ID17 waren die **Leukozytenzahlen** im Vergleich zum symptomfreien Intervall bereits in FS1 erhöht und nahmen im Verlauf des Schubes ab. Die Patientin ID72 hatte in FS1 einen erhöhten Wert der Leukozytenzahlen (12100  $10 \times 3/\mu\text{l}$ ), der ebenfalls im Verlauf abnahm, jedoch im symptomfreien Intervall den Maximalwert (12700  $10 \times 3/\mu\text{l}$ ) erreichte.

**Tab. 4:** Leukozyten und Akut- Phase- Proteine der 3 FMF- Patienten vor und während der Fieberschübe

ID	GS	Alter	OF/FS	Leukos	CRP	BKS	Temp.
17	w	18	OF	5800	0,8	kA	36,9
17	w	18	<b>FS 2</b>	8300	17,78	44/76	37,6
17	w	18	<b>FS 3</b>	3900	13,14	39/76	37,2
16	m	12	OF	8900	2,97	36/72	kA
16	m	13	<b>FS1</b>	11800	10,16	45/78	37,7
16	m	13	<b>FS2</b>	7300	17,56	37/48	37,1
16	m	13	<b>FS3</b>	5000	19,95	59/96	36,8
72	w	4	OF	12700	0,43	4/35	36,9
72	w	5	<b>FS1</b>	12100	3,4	26/54	39,4
72	w	5	<b>FS2</b>	11000	5,3	30/61	39,2
72	w	5	<b>FS3</b>	10800	10,55	21/27	35,8

Abkürzungen: GS, Geschlecht; OF: Ohne Fieber; FS1: 6-12h nach Beginn des Fieberschubes; FS2: 18-24h nach Beginn des Fieberschubes, kA: keine Angabe.

#### 4.1.3 Ergebnisse der zirkulierenden Zytokine

Die Konzentrationen der Zytokine im Serum der 3 FMF- Kinder vor und während des Fieberschubes sind in **Tabelle 5** aufgelistet. Die im Vergleich zu den Kontrollen erhöhten Werte sind mit orangem, die dazu erniedrigten Werte mit blauem Hintergrund markiert.

**Tab. 5:** Die Zytokinkonzentrationen im Serum der 3 FMF- Kinder im Fieberschub und im symptomfreien Intervall

ID-Nr.	OF/FS	IFN- $\gamma$ pg/ml	IL-6 pg/ml	IL-1 $\beta$ pg/ml	TNF- $\alpha$ pg/ml	IL-2 pg/ml	IL-12p70 pg/ml	IL-10 pg/ml	IL-4 pg/ml
17	OF	26,38	19,61	28,70	6,71	10,76	4,93	12,36	6,73
17									
17	FS2	<=0	148,53	<=0	5,50	6,23	4,93	18,68	4,60
17	FS3	<=0	9,85	22,52	4,53	9,69	<=0	14,23	6,73
16	OF	<=0	30,87	<=0	1,34	3,02	4,68	35,03	8,95
16	FS1	34,42	197,27	<=0	6,10	3,02	4,68	13,29	5,07
16	FS2	<=0	576,51	<=0	5,01	<=0	6,63	18,68	<=0
16	FS3	<=0	6,19	37,89	3,80	4,86	6,63	25,07	19,26
72	OF	32,81	25,78	49,95	7,97	<=0	18,08	27,54	4,10
72	FS1	208,53	44,86	7,81	5,98	6,85	8,71	10,50	<=0
72	FS2	384,15	60,14	<=0	2,11	4,06	<=0	<=0	5,93
72	FS3	251,87	39,00	18,48	4,04	3,02	12,42	8,63	4,10
<b>Kontrolle</b>		<b>13,1</b>	<b>2,60</b>	<b>1,4</b>	<b>6,70</b>	<b>2</b>	<b>12,2</b>	<b>7,4</b>	<b>11,9</b>

Abkürzungen: OF= ohne Fieber, FS= Fieberschub, FS1=6-12 Stunden nach Fieberbeginn, FS2=18-24h nach Fieberbeginn, <=0= nicht messbar, oranger Hintergrund= Werte höher als Kontrollen, blauer Hintergrund= Werte niedriger als bei Kontrollen

#### Die proinflammatorischen Zytokine der FMF- Patienten

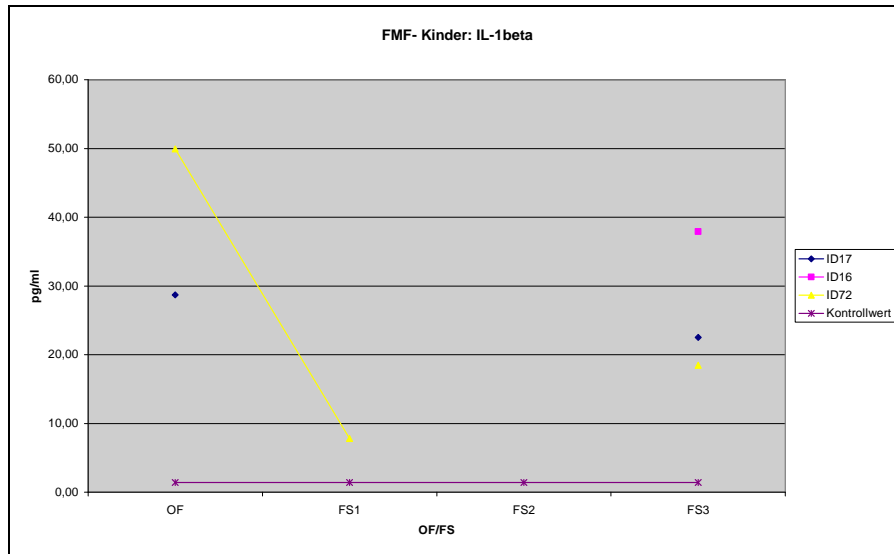
Die **IL-1 $\beta$** - Konzentrationen waren in FS3 bei allen Patienten im Vergleich zu den Gesunden erhöht. In der symptomfreien Phase waren die IL-1 $\beta$ - Werte der beiden Mädchen verglichen mit den Kontrollen deutlich erhöht. Nicht messbar war dieser Wert bei allen drei Patienten in FS2 und bei dem Jungen ID16 zusätzlich in OF und FS1 (**Abb.1A**).

**TNF- $\alpha$**  war in allen Messungen bei allen 3 FMF- Patienten verglichen mit den Kontrollen erniedrigt bzw. unverändert mit Ausnahme einer Erhöhung bei dem Mädchen ID72 im fieberfreien Intervall (**Abb.1B**).

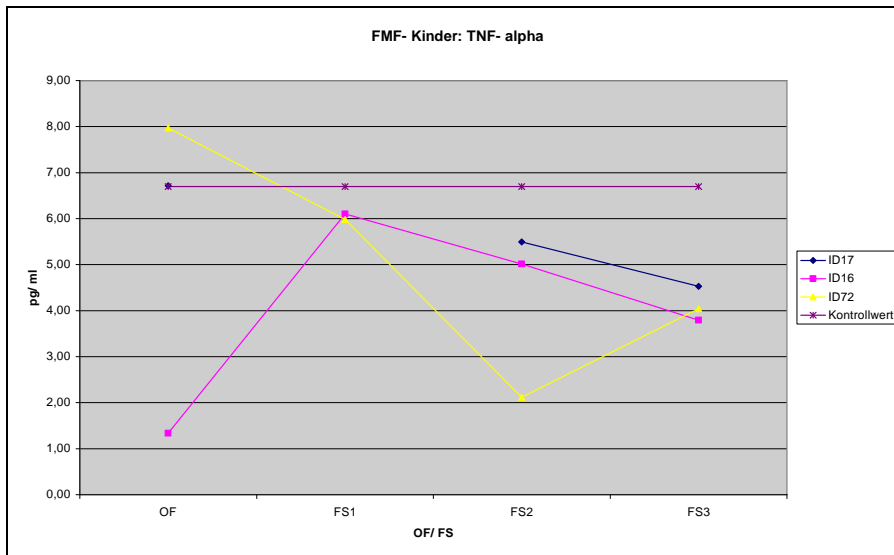


**Abb.1:** Die proinflammatorischen Zytokine der FMF- Patienten und ihrer Kontrollen im Serum

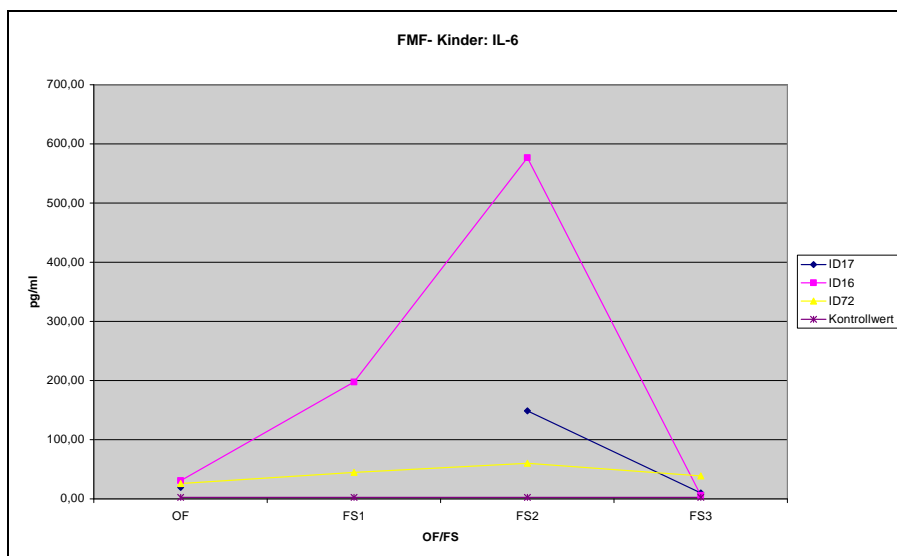
**A**

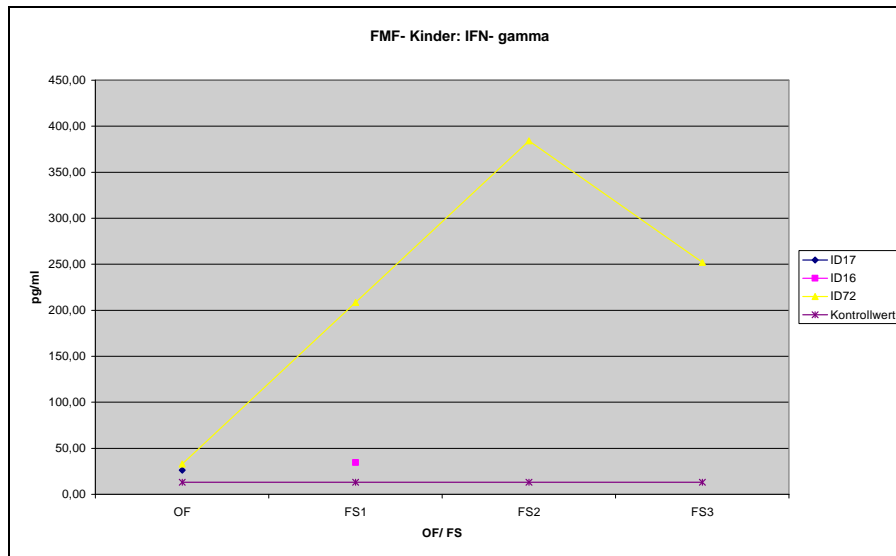
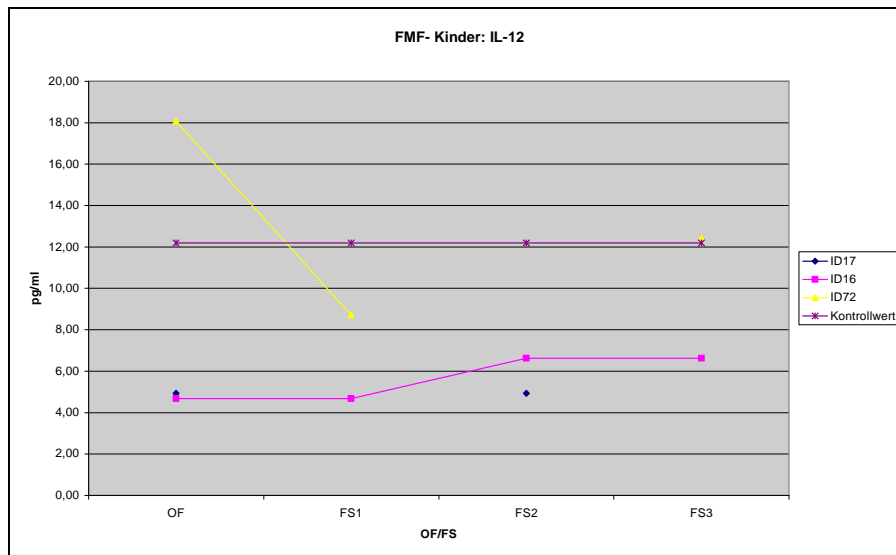


**B**



**C**



Fortsetzung **Abb. 1:****D****E**

Abkürzungen: OF= ohne Fieber, FS= Fieberschub, FS1=6-12 Stunden nach Fieberbeginn, FS2=18-24h nach Fieberbeginn, FS3=24-30h nach Fieberbeginn.

Verglichen mit den Kontrollen waren bei allen FMF- Kindern in allen Phasen der Erkrankung erhöhte **IL-6**-Konzentrationen messbar. Dabei waren die darstellbaren **IL-6** Konzentrationen in OF stets niedriger als in der ersten Messung im Fieberschub (FS1) (**Abb.1C**).

Alle messbaren **IFN- $\gamma$** - Konzentrationen waren in allen Phasen der Erkrankung gegenüber den Gesunden erhöht messbar (**Abb.1D**).

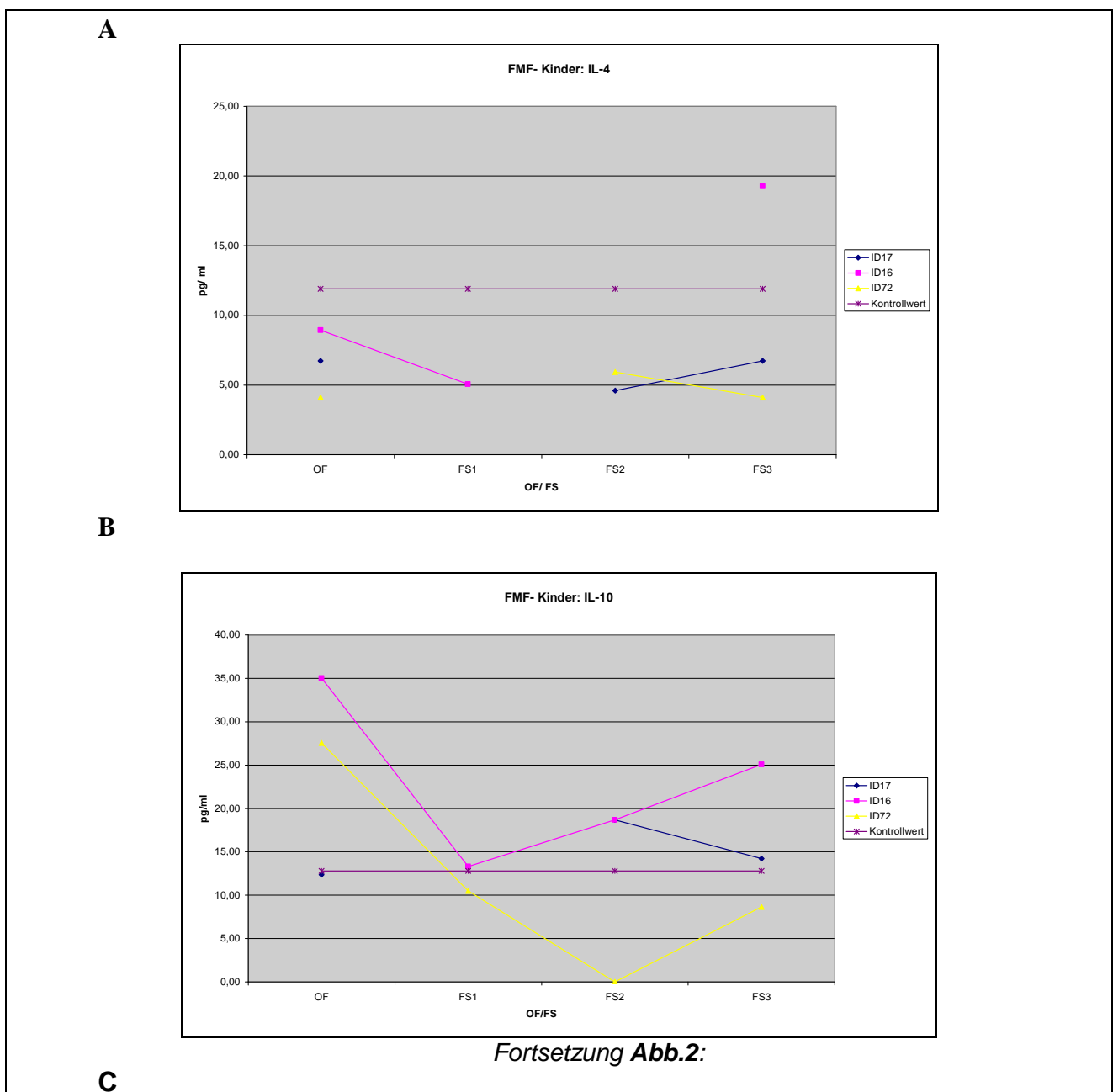
Die Geschwister wiesen fast gleich bleibende **IL-12p70** Konzentrationen in den seriellen Messungen und im fieberfreien Intervall auf, welche gegenüber den Kontrollen erniedrigt waren. Ebenso waren diese Werte bei dem Mädchen ID72 in FS1 erniedrigt, jedoch in der fieberfreien Episode und in FS3 im Vergleich zu den Kontrollen erhöht. IL-12 in FS2 war bei dieser Patientin nicht messbar (**Abb.1E**).

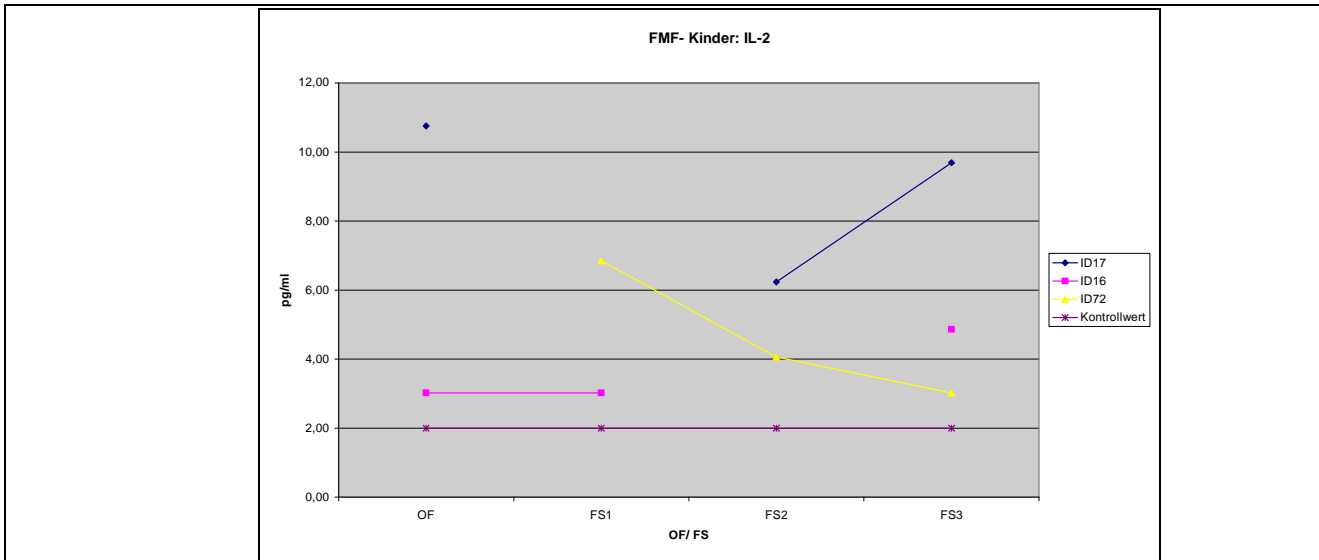
### Die anti-inflammatorischen Zytokine der FMF- Patienten

Die beiden Mädchen ID17 und ID72 zeigten in allen Phasen niedrigere **IL-4**- Werte, als die Kontrollen. Der Bruder wies ebenso erniedrigte IL-4 Werte in OF und FS1 auf, hingegen zeigte die Konzentration in FS3 einen erhöhten Wert (**Abb.2A**).

Bei allen drei Patienten waren die **IL-10**- Werte in allen Phasen im Vergleich zu den Kontrollen erhöht (**Abb.2B**). Das traf auch für die messbaren **IL-2**- Werte der Patienten in allen Phasen der Erkrankung im Vergleich zu den Kontrollen zu (**Abb.2C**).

**Abb.2:** Die anti- inflammatorischen Zytokine der 3 FMF- Kinder und ihrer Kontrollen im Serum





Abkürzungen: OF= ohne Fieber, FS= Fieberschub, FS1=6-12 Stunden nach Fieberbeginn, FS2=18-24h nach Fieberbeginn, FS3 24-30h nach Fieberbeginn.

#### 4.1.4 PMA- stimulierte Zytokinsynthese in Lymphozyten

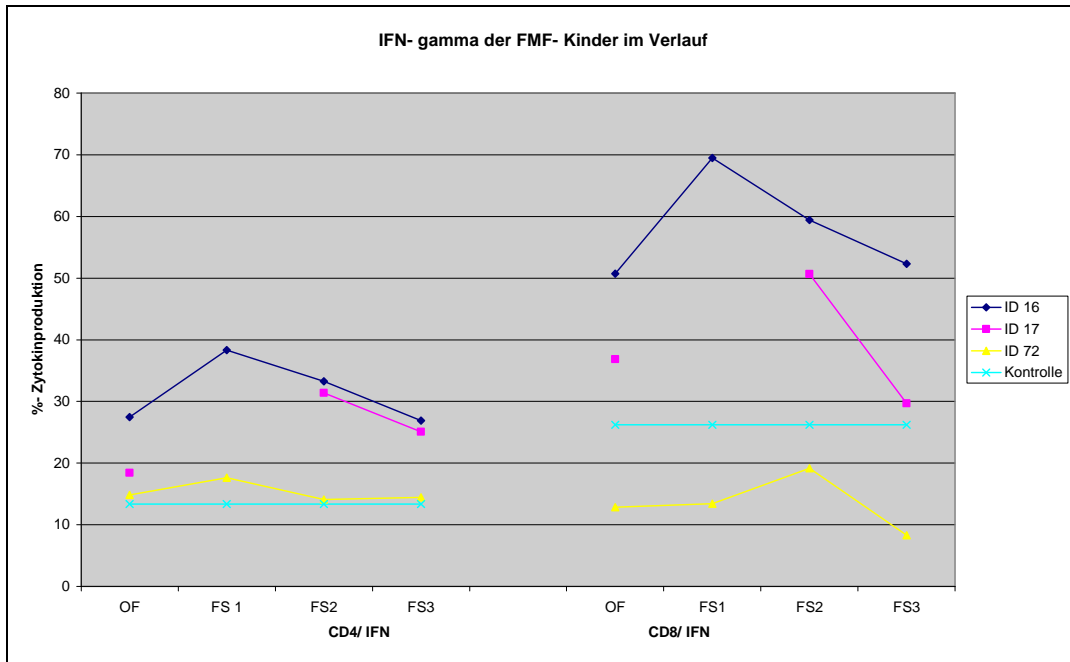
Die PMA- stimulierte intrazelluläre Zytokinproduktion von Lymphozyten führte bei allen 3 FMF- Patienten zu einer zur Kontrollgruppe vergleichsweise erhöhten **IFN- $\gamma$** - Ausschüttung der CD4+- Lymphozyten sowohl in Remission, als auch in allen Messungen im Fieberschub. Alle gemessenen Konzentrationen nahmen im Verlauf des Fieberschubes ab, bzw. bei ID72 blieb sie zwischen FS2 und FS3 gleich.

Bei den Konzentrationen der CD8+- Zellen zeigte ID72 in allen Messungen im Vergleich zu den Kontrollen erniedrigte Werte, während ID16 und ID17 stets erhöht waren. Die IFN- $\gamma$ - Konzentrationen waren bei ID16 stets höher, als die von ID17. Beide zeigten im Fieberverlauf, sowie in CD4+- Zellen auch in CD8+- Zellen eine Konzentrationsabnahme (**Abb. 3**).

Für das proinflammatorische Zytokin **TNF-  $\alpha$**  der CD4+- Zellen konnten bei allen drei Patienten in allen Fiebermessungen im Vergleich zu den Kontrollen erhöhte Werte beobachtet werden. Weitere Gemeinsamkeiten unter den Patienten im Verlauf waren bei den CD4+- Zellen nicht zu beobachten. Bei dem Jungen ID16 waren die TNF- $\alpha$ - Konzentrationen der CD4+- und deutlich auch in CD8+- Zellen in allen Phasen der Erkrankung im Vergleich zu den Kontrollen erhöht.

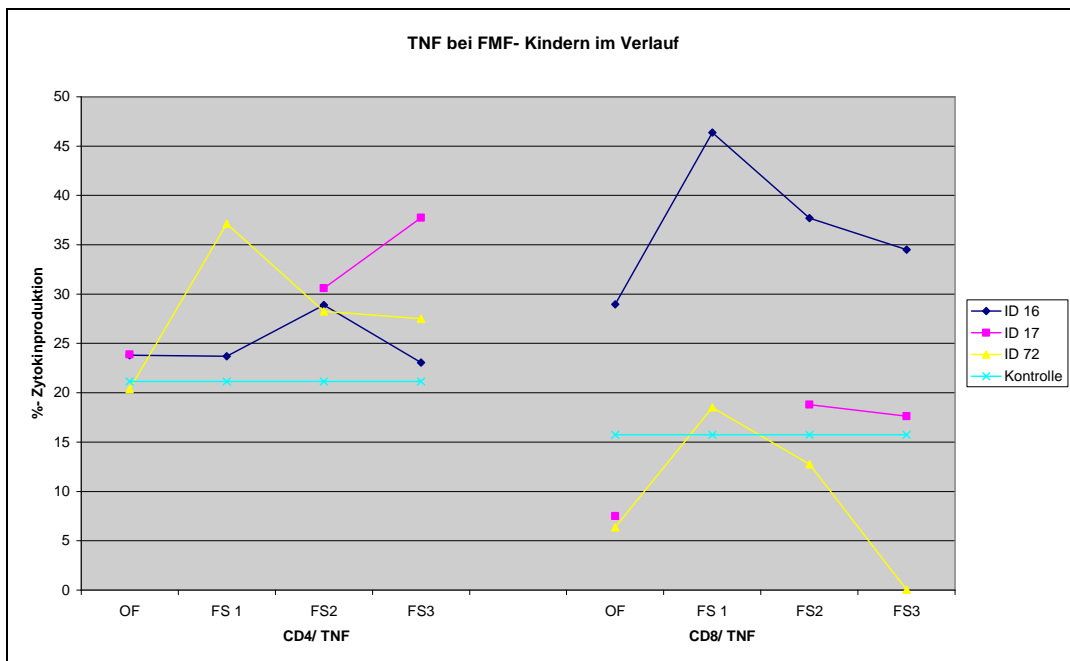
ID72 wies in OF und FS2 einen im Vergleich zu den Kontrollen und den beiden andere Kindern erniedrigte Werte in CD8+- Zellen auf. Die CD8+- Stimulation im Fieberverlauf ergab bei allen Kindern eine Konzentrationsabnahme und in OF waren bei jedem Kind die niedrigsten Konzentrationen messbar (**Abb.4**).

**Abb.3:**



Abkürzungen: OF= ohne Fieber, FS= Fieberschub, FS1=6-12 Stunden nach Fieberbeginn, FS2=18-24h nach Fieberbeginn, FS3 24-30h nach Fieberbeginn.

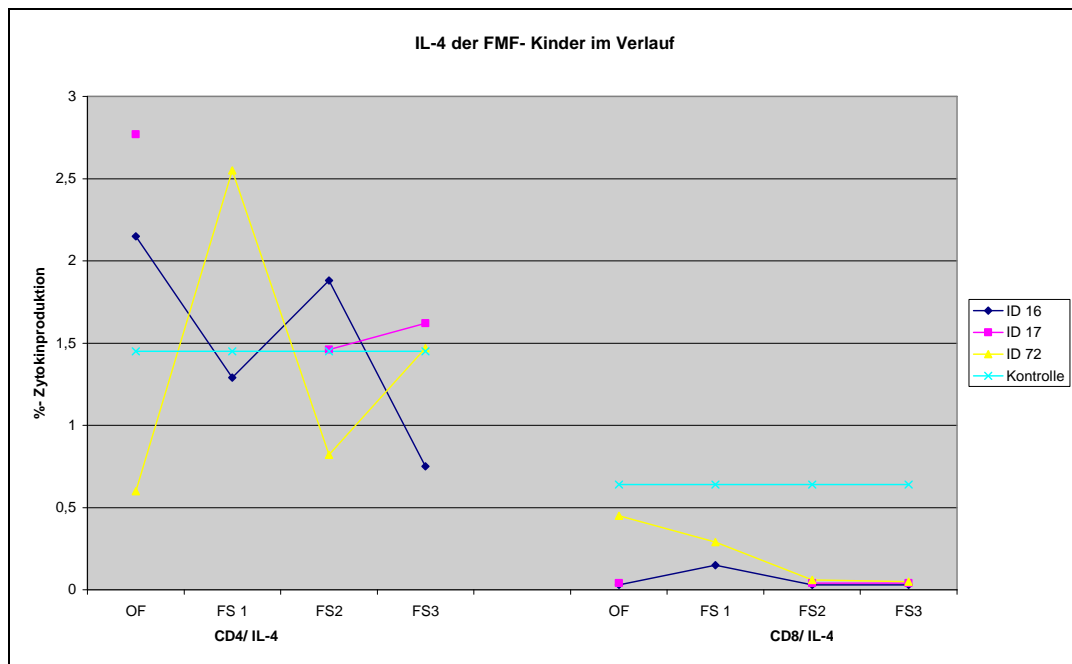
**Abb.4:**



Abkürzungen: OF= ohne Fieber, FS= Fieberschub, FS1=6-12 Stunden nach Fieberbeginn, FS2=18-24h nach Fieberbeginn, FS3 24-30h nach Fieberbeginn.

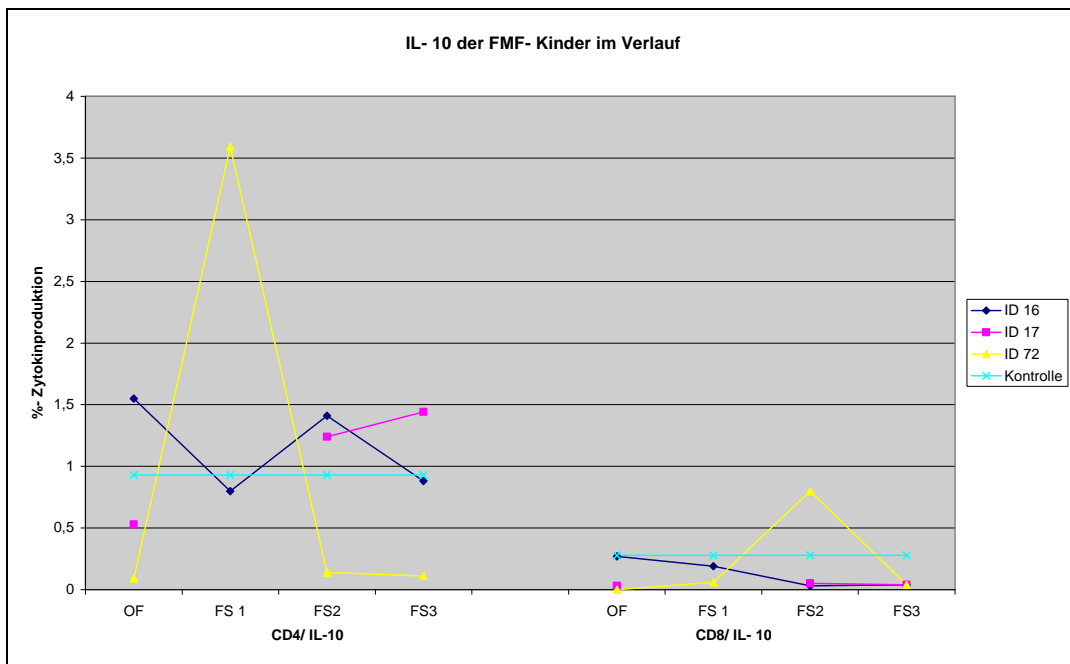
Die intrazelluläre **IL-4**- Ausschüttung der CD8+- Zellen zeigte bei allen Patienten in Remission und in allen FS- Messungen einen zur Kontrollgruppe vergleichsweise erniedrigten Wert. ID17 zeigte in allen CD8+- Messungen identische Werte. ID72 wies in OF die höchste Konzentration auf. Dagegen wiesen die CD4+- Lymphozyten keinerlei einheitliche Tendenz unter den Patienten oder im Bezug auf die Kontrollwerte auf (**Abb. 5**).

**Abb.5:**



Abkürzungen: OF= ohne Fieber, FS= Fieberschub, FS1=6-12 Stunden nach Fieberbeginn, FS2=18-24h nach Fieberbeginn, FS3 24-30h nach Fieberbeginn.

Auch die **IL-10**- Ausschüttungen der CD4+- Lymphozyten zeigten keine Gemeinsamkeiten unter den Messwerten auf. Auffällig waren die gemessenen Konzentrationen des Mädchens ID72, welches eine deutliche Konzentrationserhöhung der CD4+- Zellen in FS1 aufwies, die auch die Konzentrationen der Kontrollen und der anderen beiden Kinder übertraf, während ihre Werte in OF, FS1 und FS3 vergleichsweise die niedrigsten waren. Auch bei den CD8+- Zellen fiel diese Patientin mit einer deutlich erhöhten Konzentration im Vergleich zu den anderen Kindern, den Kontrollen und im Verlauf auf. Hingegen waren alle weiteren Konzentrationen der CD8+- Zellen in allen Messungen im Vergleich zu den Kontrollen erniedrigt (**Abb. 6**).

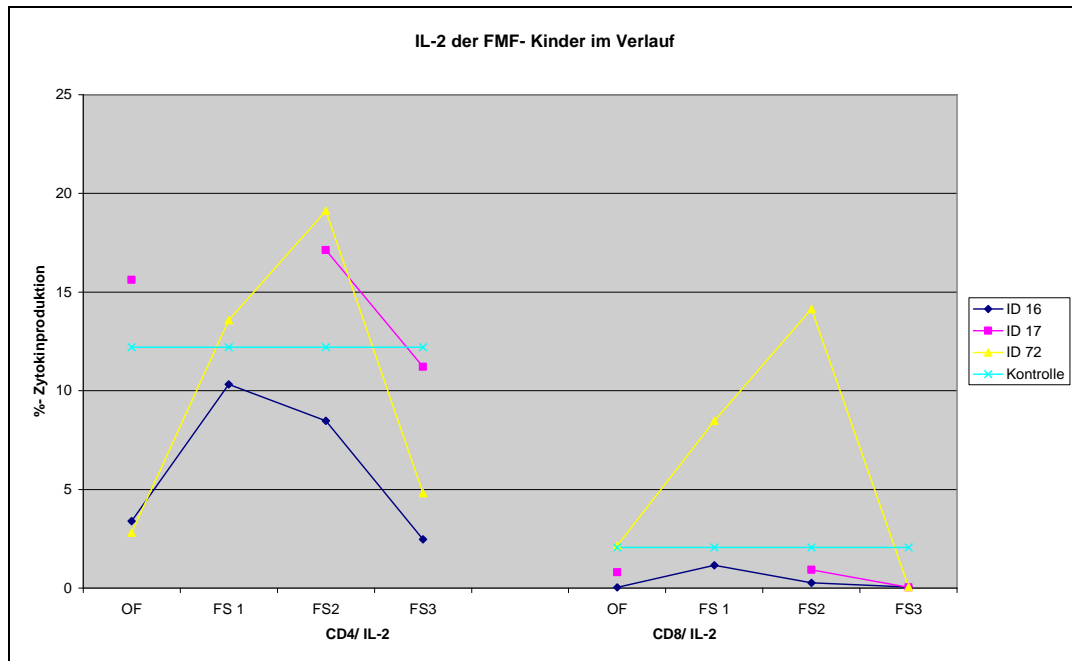
**Abb.6:**

Abkürzungen: OF= ohne Fieber, FS= Fieberschub, FS1=6-12 Stunden nach Fieberbeginn, FS2=18-24h nach Fieberbeginn, FS3 24-30h nach Fieberbeginn.

Die **IL-2** Konzentrationen des Jungen ID16 waren sowohl in CD4+, als auch in CD8+- Zellen in jeder Phase- mit und ohne Fieber im Vergleich zu den Kontrollen erniedrigt. Zudem wiesen ID16 und ID17 ähnliche IL-2 Konzentrationsveränderungen im Verlauf auf: sie nahmen im Fieberverlauf ab und waren in OF im Vergleich zu FS3 erhöht. Bei der Patientin ID72 waren die Konzentrationen in CD4+- und CD8+- Zellen in FS1 und FS2 im Vergleich zu den Kontrollen erhöht, wiesen die niedrigste Konzentration in OF auf und zeigten im Verlauf eine Zunahme der Werte zwischen OF und FS1 und FS1 und FS2 und eine Senkung in FS3.

Hingegen zeigten die IL-2- Konzentrationen der CD8+- Zellen im Fieberverlauf bei ID16 und ID17 eine Abnahme.

In FS3 waren die Konzentrationen bei allen drei Patienten sowohl in CD4+- als auch in CD8+- Zellen im Vergleich zu den Kontrollen erniedrigt (**Abb.7**).

**Abb.7:**

Abkürzungen: OF= ohne Fieber, FS= Fieberschub, FS1=6-12 Stunden nach Fieberbeginn, FS2=18-24h nach Fieberbeginn, FS3 24-30h nach Fieberbeginn.

## 4.2 HIDS

### 4.2.1 3 Patienten und ihr klinisches Bild

Eine mit HIDS assoziierten Mutation des *MVK*- Gens wurde bei 6 Patienten ermittelt, die Hälfte davon Mädchen. Die Messung in Remission konnte bei allen vorgenommen werden.

In die endgültige Auswertung mit zwei zusätzlichen Messungen im akuten Schub gingen 2 Jungen (ID 9 und 43) im Alter von 9 und 15 Jahren und 1 Mädchen mit 16 Jahren (ID 169) ein. Alle Kinder sind in Deutschland geboren.

Der **Junge ID9** wurde am 06.03.97 geboren. Die molekulargenetische Untersuchung ergab eine Homozygotie für die V377I- Mutation in Exon 11 des *MVK*- Gens. Der Bub hatte seinen ersten Fieberschub mit drei Monaten, nach der ersten Diphtherie- Tetanus- Impfung. Jede weitere Impfung löste bei dem Jungen einen Fieberschub aus, der länger anhielt, als die vorherigen Fieberschübe. Bis zu 20mal im Jahr litt der Junge nach symptomfreien Intervallen von 1-3 Wochen für 3-4 Tage an Fieber bis zu 41°C, symmetrischen Arthralgien (v. a. am Knie) und Erbrechen. Letzteres Symptom war das subjektiv schlimmste, da das Erbrechen 48h andauerte und in den ersten 36 Stunden erbrach der Patient bis zu 5x/h. Der körperliche Befund ergab weiße orale Plaques, Splenomegalie und ein stets am 3. Fiebertag auftretendes wanderndes, girlandenförmiges, teils konfluierendes Exanthem, welches einen Tag anhielt. Bei seinen



infektgetriggerten Schüben hielt das Fieber für 3 Wochen an, jedoch verlängerten sich die symptomfreien Intervalle.

Die zu Beginn stets auftretenden Halsschmerzen und die leichte zervikale Lymphknotenschwellung konnten durch eine ATE am 01.01.97 aufgehoben werden. Paracetamol (250mg/d) wurde wegen schlechter Verträglichkeit (starkes Schwitzen) nur kurzzeitig eingenommen. Die 9- monatige Einnahme von Colchicin hatte keinen Effekt und der therapeutische Versuch mit Acetylsalicylsäure (ASS) (500mg) zeigte nur zu Beginn der akuten Phase Linderung.

Das **Mädchen mit ID168**, geboren am 14.6.86 ist heterozygote Trägerin der V203A- Mutation in Exon 6 und der I268T- Mutation in Exon 9 des *MVK*- Gen und hat eine Schwester mit derselben Diagnose. Die Patientin bekam ihren ersten Fieberschub im Alter von einem Monat. Ca. 4mal im Jahr hatte sie nach symptomfreien Intervallen von 2-10 Wochen Fieberattacken von 7-14 Tagen Dauer, getriggert durch Stress, Schlafmangel, Alkoholkonsum und Infekte. Die Körpertemperatur stieg bis auf 41°C, begleitet von asymmetrischen Arthralgien und oralen Aphthen. Bei der körperlichen Untersuchung fielen eine zervikale, eine axilläre und eine inguinale Lymphadenopathie, eine Pharyngitis, eine Angina tonsillaris mit weißen Plaques auf. Weiter konnte eine Splenomegalie festgestellt werden. Die Lymphknotenbiopsie vom 2.12.86 ergab eine chronische Lymphadenitis. Allgemein zeigte die junge Patientin eine Neigung zu bronchialen Infekten und litt unabhängig vom Fieber an Pollakisurie und Übelkeit. Sie berichtete über gelegentlich auftretende blutige Stühle. Im Jahr 2000 hatte sie eine EBV- Infektion.

Nur im ersten Lebensjahr war die orale Gabe von 2x10mg/d Paracetamol wirksam: es sprach in den ersten zwei Fiebertagen prompt an, d.h. das Fieber einschließlich der assoziierten Beschwerden sistierte sofort. Die Versuche mit Ammono 1x2 ml/d und 2x25mg/d Azulfidine und mit Azathioprin waren ineffektiv.

Das **Kind mit ID42** kam am 03.12.92 via Sektio aufgrund eines verzögerten Geburtsverlaufs zur Welt. Im vierten Schwangerschaftsmonat hatte die Mutter aufgrund einer Pyelonephritis Antibiotika eingenommen. Bei ihm wurde eine zusammengesetzte Heterozygotie der W188X- Mutation in Exon 6, und der V377I-Mutation in Exon 11 des *MVK*- Gens nachgewiesen. Seit seiner 2. Lebenswoche litt der Junge 24mal im Jahr an 5-6 Tage anhaltenden Fieberschüben. Nach symptomfreien Intervallen von 2-6 Wochen traten plötzlich Temperaturen bis zu 41°C auf, begleitet von Schüttelfrost, asymmetrischen Arthralgien und Bauchschmerzen assoziiert mit Diarrhö und Erbrechen. Ca. 5x im Jahr kam es außerdem zu Fieberkrämpfen und blutig- schleimiger Diarrhö (3.-4. Tag).

Die körperliche Untersuchung erbrachte eine zervikale Lymphadenopathie, eine Pharyngitis, sowie ein kleinfleckiges, makulo- papulöses Exanthem stammbetont und an den Oberschenkeln. Durch

eine Rektumbiopsie konnte eine gering- bis mittelgradig aktive, uncharakteristische und bereits chronifizierte Colitis festgestellt werden. Der Junge war in seiner Sprachentwicklung verzögert und hatte eine Laktoseunverträglichkeit.

Therapeutisch zeigten weder Paracetamol (250mg/d), noch Antibiotika, noch eine Adenotomie irgendeinen Effekt. Lediglich die Bauchschmerzen konnten durch Buscopan gelindert werden.

#### 4.2.2 Akut- Phase- Reaktionen

Beide Jungen (ID9 und ID42) wiesen sowohl in FS1, als auch in FS2 im Vergleich zur Remission erhöhte Werte der **Leukozyten und CRP**, und der Temperatur auf (**Tab.6**). Dabei waren bei diesen beiden Patienten die Leukozytenzahlen und CRP in FS2 höher, als in FS1, stiegen also im Verlauf des Schubes an.

Die **BKS** zeigte ebenfalls erhöhte Werte bei beiden Messungen im Fieberschub. Jedoch war diese bei dem Jungen (ID 42) auch in Remission erhöht. Bei dem Mädchen liegen keine Angaben über die BKS in Remission und in FS1 vor. In FS2 zeigten sich Leukozyten, CRP und Temperatur ebenfalls erhöht im Vergleich zu den Messungen im Intervall.

**Tab. 6:** Leukozyten und Akut- Phase- Proteine der HIDS- Patienten vor und während der Fieberschübe

ID	GS	Alter	OF/FS	Leukos	CRP	BKS	Temp.
168	w	15	OF	7300	5,78	kA	36,2
168	w	16	<b>FS 1</b>	kA	kA	kA	39,5
168	w	16	<b>FS 2</b>	9000	11,34	21/48	39,1
9	m	14	OF	4800	0,1	15/41	37
9	m	15	<b>FS 1</b>	12200	9,38	21/45	38,1
9	m	15	<b>FS 2</b>	13500	11,5	20/47	38,4
42	m	9	OF	8000	0,78	33/69	36,9
42	m	9	<b>FS 1</b>	11500	8,6	33/69	kA
42	m	9	<b>FS 2</b>	11900	13,5	61/98	39

Abkürzungen: GS, Geschlecht; OF, ohne Fieber; FS, Fieberschub; FS1, 6-12h nach Fieberbeginn, FS2: 18-24h nach Beginn des Fieberschubes; kA, keine Angabe.

#### 4.2.3 Ergebnisse der zirkulierenden Zytokine

**Tabelle 7** zeigt die Ergebnisse der Serumkonzentrationen bei den 3 HIDS- Kindern in allen Phasen- mit und ohne Fieber- und die Werte der Kontrollpersonen. Im Vergleich zu den Kontrollen erhöhte Konzentrationen sind mit orangem, die dazu erniedrigten Werte mit blauem Hintergrund gekennzeichnet.

**Tab. 7:** Die Zytokinkonzentrationen im Serum der 3 HIDS- Kinder im Fieberschub und im symptomfreien Intervall

ID-Nr.	OF/FS	IL-12p70 pg/ml	TNF- $\alpha$ pg/ml	IFN- $\gamma$ pg/ml	IL-6 pg/ml	IL-1 $\beta$ pg/ml	IL-2 pg/ml	IL-4 pg/ml	IL-10 pg/ml
168	OF	54,72	3,89	31,21	42,4	71,49	10,76	5,07	7,49
168	FS1	23,46	4,42	376,61	104,64	44,52	<0=	10,7	12,05
168	FS2	19,65	<0=	195,46	268,6	12,17	<0=	<0=	6,68
9	OF	4,93	4,04	<0=	69,52	<0=	5,23	<0=	9,88
9	FS1	4,93	2,89	42,49	1687,76	26,29	<0=	<0=	4,51
9	FS2	<0=	<0=	44,11	1881,47	<0=	6,23	9,3	nm
42	OF	5,68	3,02	<0=	7,41	12,17	<0=	<0=	17,07
42	FS1	5,92	6,59	131,8	93,91	18,48	4,06	5,93	11,12
42	FS2	3,25	3,54	89,48	77,27	<0=	6,85	<0=	<0=
<b>Kontrollen</b>		<b>12,2</b>	<b>6,7</b>	<b>13,1</b>	<b>2,6</b>	<b>1,4</b>	<b>2</b>	<b>11,9</b>	<b>7,4</b>

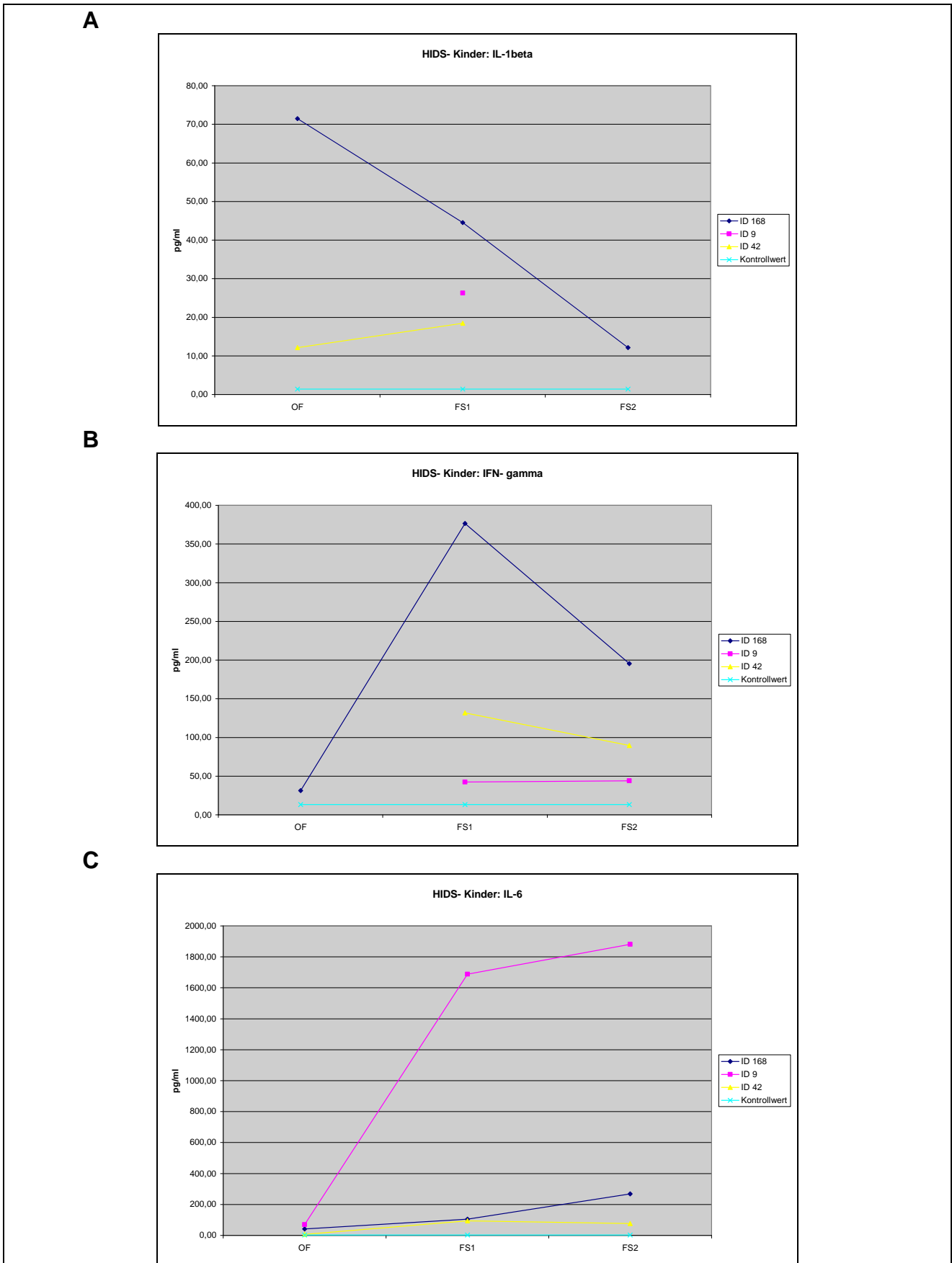
Abkürzungen: OF= ohne Fieber, FS= Fieberschub, FS1=6-12 Stunden nach Fieberbeginn, FS2=18-24h nach Fieberbeginn, <=0= nicht messbar, oranger Hintergrund= Werte höher als Kontrollen, blauer Hintergrund= Werte niedriger als bei Kontrollen

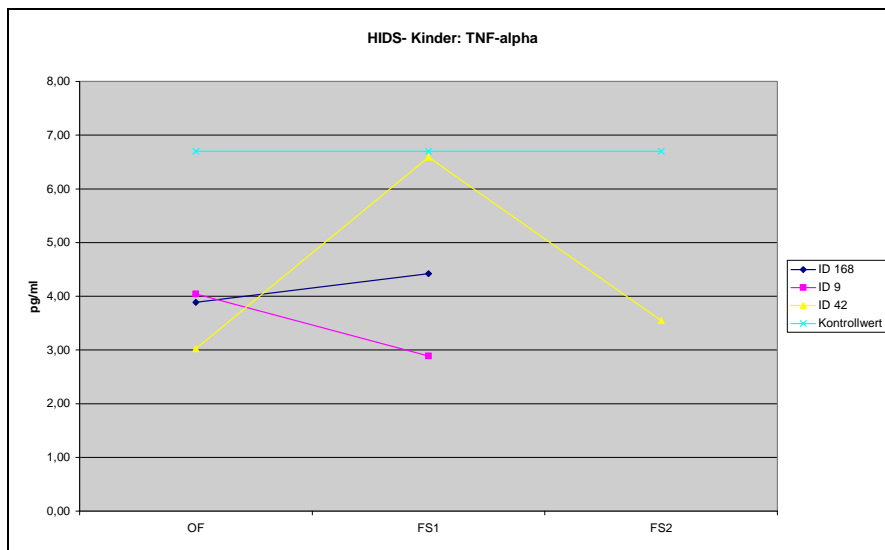
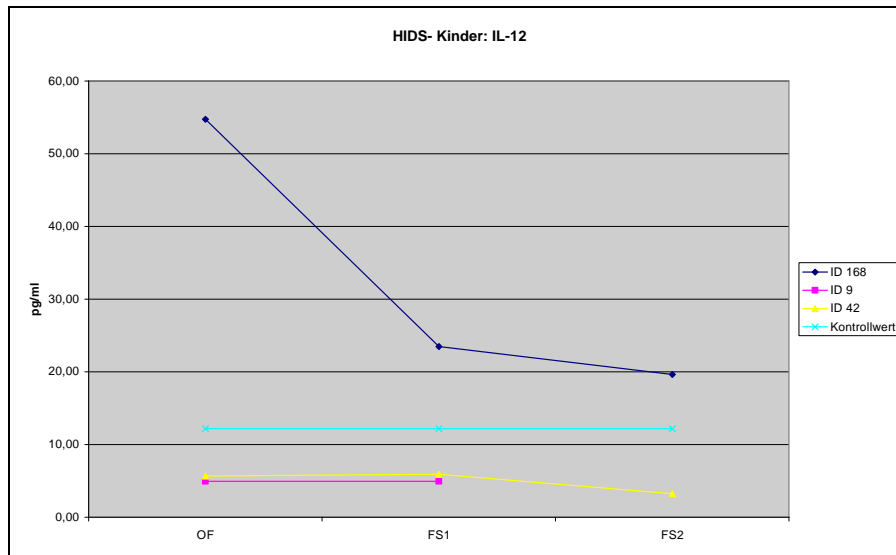
### **Die proinflammatorischen Zytokine der HIDS- Patienten**

Im Vergleich zu den Kontrollen wiesen die Konzentrationen der proinflammatorischen Zytokine **IL-1 $\beta$**  (**Abb.8A**), **IFN- $\gamma$**  (**Abb.8B**) und **IL-6** (**Abb.8C**) aller HIDS- Kinder stets höhere, die von **TNF- $\alpha$**  stets niedrigere Werte auf (**Abb.8D**). Die **IL-12-** Konzentrationen waren bei Patientin ID168 stets über dem Kontrollwert messbar, die beiden Jungen ID9 und ID42 zeigten hingegen in allen Phasen erniedrigte **IL-12p70-** Konzentrationen im Serum (**Abb.8E**)

Das messbare **IL-6** war zudem bei allen 3 Patienten sowohl in FS1, als auch in FS2 im Vergleich zum fieberfreien Intervall erhöht.

**Abb.8:** Die proinflammatorischen Zytokine der 3 HIDS- Kinder und ihrer Kontrollen im Serum



Fortsetzung **Abb.8:****D****E**

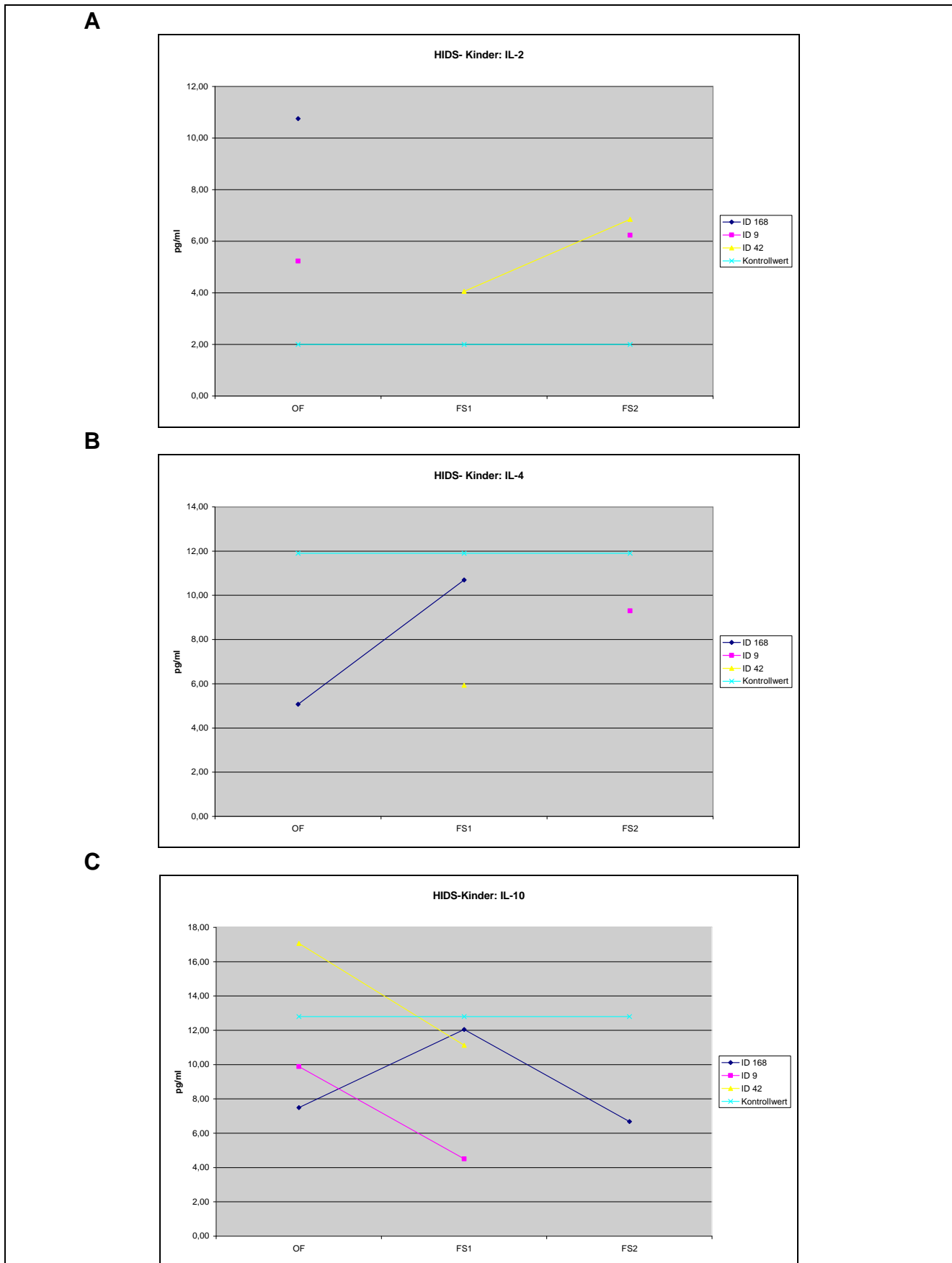
Abkürzungen: OF= ohne Fieber, FS= Fieberschub, FS1=6-12 Stunden nach Fieberbeginn, FS2=18-24h nach Fieberbeginn, FS3 24-30h nach Fieberbeginn.

### Die anti-inflammatorischen Zytokine der HIDS- Patienten

Die messbaren Konzentrationen des anti- inflammatorischen **IL-2** (**Abb.9A**) waren bei allen HIDS-Kindern höher, die messbaren **IL-4**- Konzentrationen stets niedriger, als die der Kontrollen (**Abb.9B**).

**IL-10** war bei allen Patienten im Fieber vermindert messbar im Vergleich zu den Kontrollen. Die Jungen ID9 und ID42 zeigten in FS1 niedrigere IL-10- Werte, als in OF (**Abb.9C**).

**Abb.9:** Die anti- inflammatorischen Zytokine der 3 HIDS- Kinder und ihrer Kontrollen im Serum

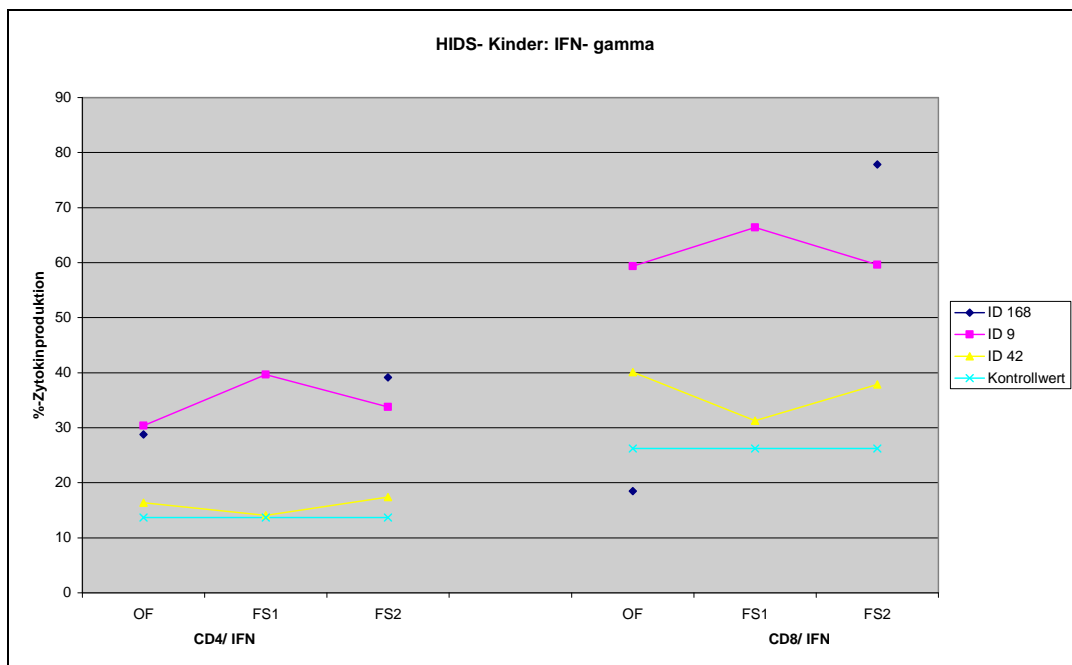


Abkürzungen: OF= ohne Fieber, FS= Fieberschub, FS1=6-12 Stunden nach Fieberbeginn, FS2=18-24h nach Fieberbeginn, FS3 24-30h nach Fieberbeginn.

#### 4.2.4 PMA- stimulierte Zytokinsynthese in Lymphozyten

Die stimulierte intrazelluläre Zytokinsynthese von Lymphozyten führte bei allen 3 HIDS- Patienten zu einer zur Kontrollgruppe vergleichsweise erhöhten **IFN- $\gamma$** - Ausschüttung der CD4+- Lymphozyten sowohl in Remission, als auch in allen Messungen im Fieberschub. Die Messungen im Verlauf zeigten keine einheitliche Veränderungen unter den Kindern: Während ID9 im Verlauf stets eine Abnahme aufwies, wurde bei ID 42 eine Zunahme gemessen. Die Stimulation ergab für CD8+- Zellen bei allen 3 HIDS- Kindern im Fieberschub erhöhte Konzentrationen im Vergleich zu den Kontrollen (**Abb.10**).

**Abb.10:**



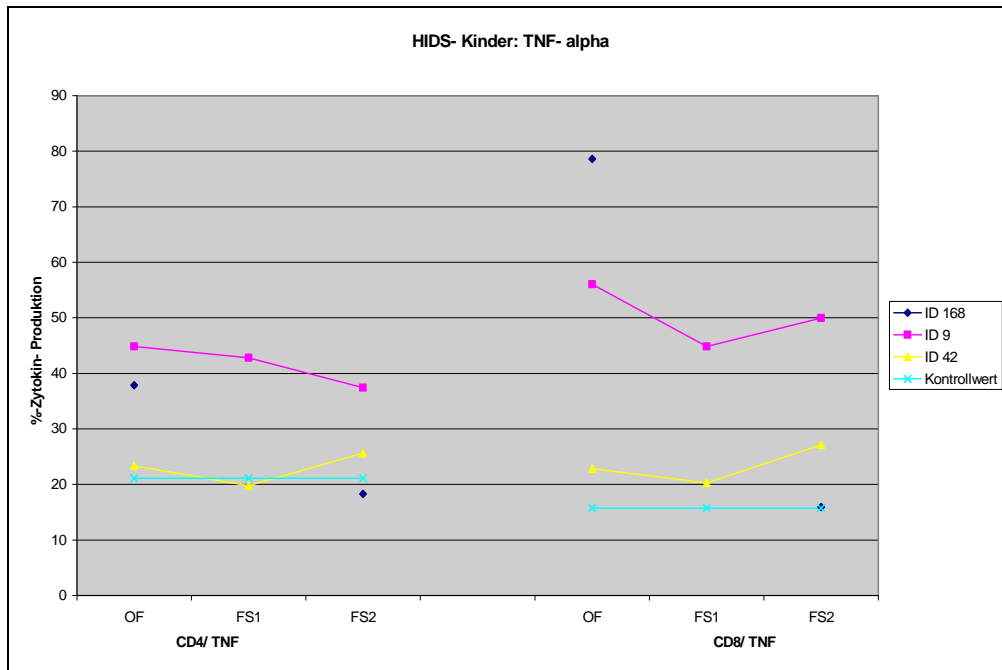
Abkürzungen: OF= ohne Fieber, FS= Fieberschub, FS1=6-12 Stunden nach Fieberbeginn, FS2=18-24h nach Fieberbeginn, FS3 24-30h nach Fieberbeginn.

Für das proinflammatorische Zytokin **TNF-  $\alpha$**  der CD8+- Zellen konnten bei allen drei Patienten im Vergleich zu den Kontrollen erhöhte Konzentrationen beobachtet werden. Die Messung in OF fiel bei ID 168 mit einer deutlichen Erhöhung im Vergleich zu den anderen Kindern, zu den Kontrollen und im Fieberverlauf auf. Bei den CD4+- Zellen wurde bei allen Patienten in Remission eine im Vergleich zu den Kontrollen höhere Konzentration gemessen. Einheitliche Veränderungen unter den Kindern im Verlauf waren nicht nachweisbar (**Abb.11**).

Die **IL-4**- Ausschüttung der CD4+- Lymphozyten zeigte bei allen Patienten in FS2 einen zur Kontrollgruppe vergleichsweise höheren Wert und die Konzentration bei ID9 war in FS1 im

Vergleich zu den Kontrollen, den übrigen beiden Kindern und im Verlauf deutlich erhöht. Die CD8+- Zellen wiesen bei den HIDS- Kindern in Remission die höchsten IL-4- Konzentrationen auf, zwei davon (ID9 und ID42) waren verglichen mit den Kontrollen ebenfalls erhöht, während alle CD8+- Messungen im Fieber im Vergleich zu den Kontrollen eindeutig erniedrigte IL-4- Werte ergaben. Die IL- 4- Konzentration der CD4+- Zellen jedes Kindes war in Remission stets geringer, die der CD8+- Zellen stets höher, als die Konzentrationen in FS2 (**Abb.12**).

**Abb.11:**

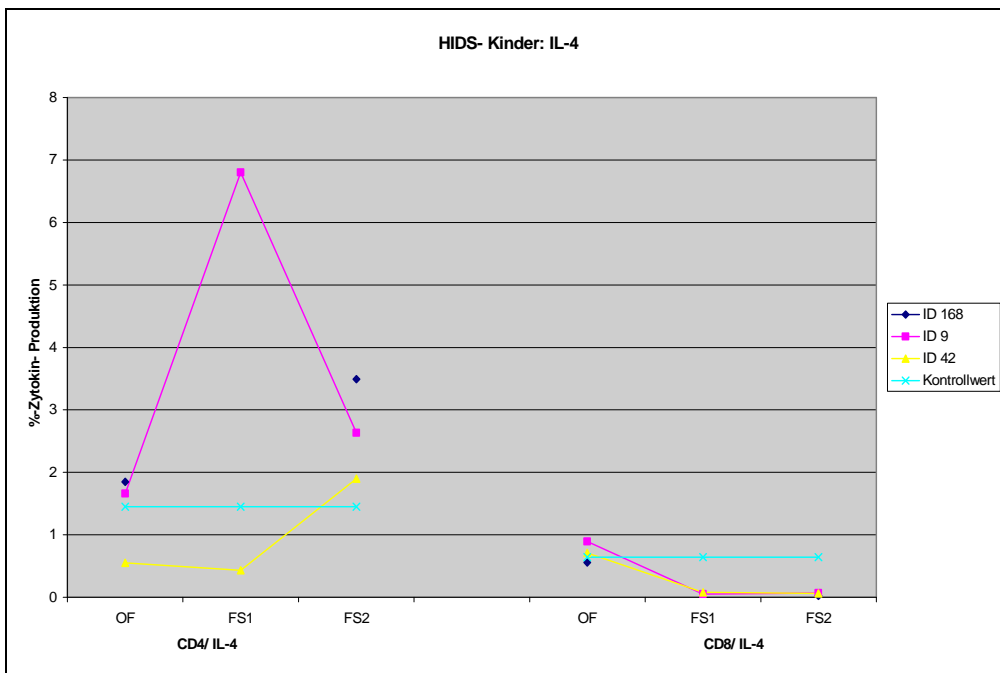


Abkürzungen: OF= ohne Fieber, FS= Fieberschub, FS1=6-12 Stunden nach Fieberbeginn, FS2=18-24h nach Fieberbeginn, FS3 24-30h nach Fieberbeginn.

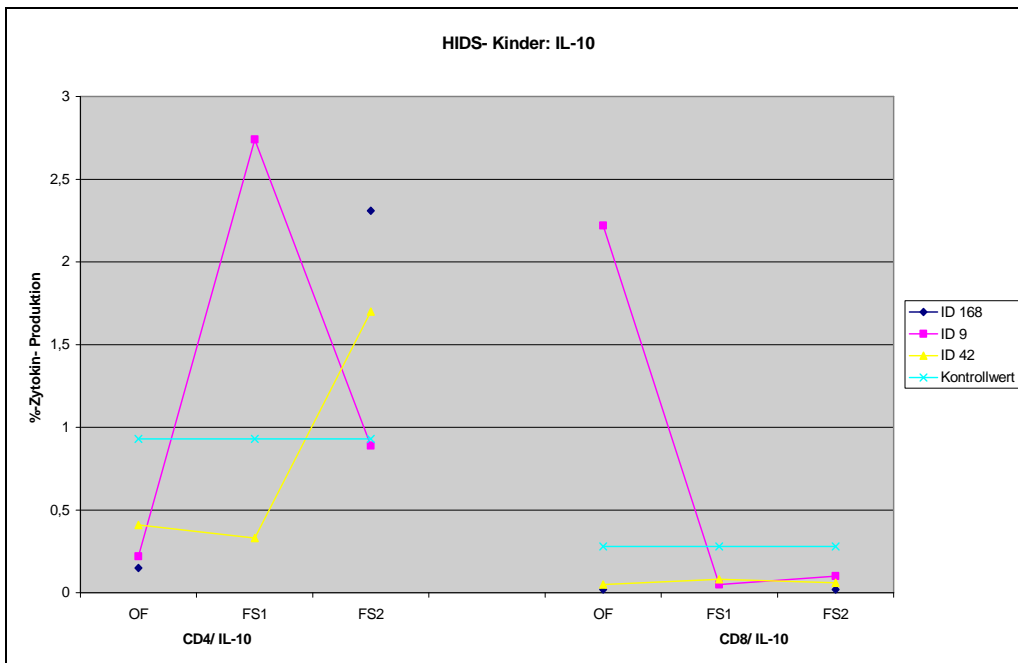
Die **IL-10-** Konzentration der stimulierten CD4+-Lymphozyten war bei allen HIDS- Kindern in Remission geringer, als die der Kontrollen. In CD8+- Zellen waren, bis auf die Ausnahme einer deutlichen Erhöhung bei den IL- 10- Konzentrationen des Jungen ID9 in OF, in allen Messungen im Vergleich zu den Kontrollen erniedrigte Werte messbar. Einheitliche Veränderungen unter den Kindern bei den CD4+- und CD8+- Messungen im Verlauf konnten nicht nachgewiesen werden (**Abb. 13**).

Die **IL-2-** Konzentration in CD4+- und CD8+- Zellen nahm bei den Patienten ID9 und ID42 zwischen OF und FS1 und zwischen FS1 und FS2 stets zu. Im Vergleich zu den Kontrollen waren keine einheitlichen Veränderungen messbar, weder für CD4+- noch für CD8+- Zellen. Die Stimulation der CD8+- Zellen ergab bei allen Patienten in Remission im Vergleich zu den Kontrollen und zu den Messungen im Fieberverlauf erniedrigte IL-2- Werte (**Abb. 14**).



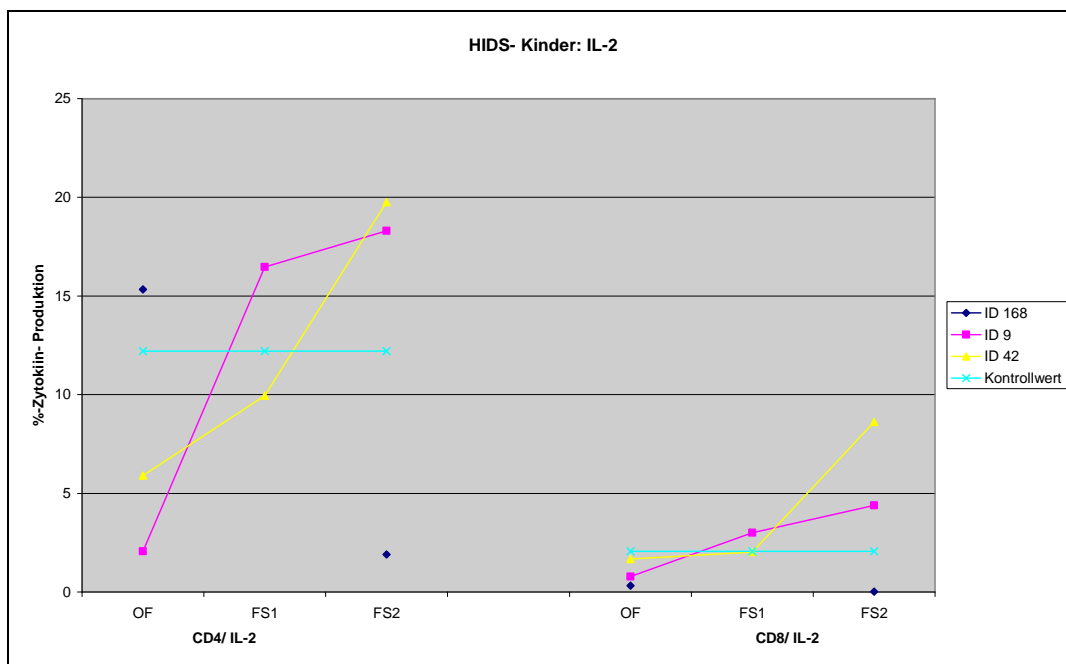
**Abb.12:**

Abkürzungen: OF= ohne Fieber, FS= Fieberschub, FS1=6-12 Stunden nach Fieberbeginn, FS2=18-24h nach Fieberbeginn, FS3 24-30h nach Fieberbeginn.

**Abb.13:**

Abkürzungen: OF= ohne Fieber, FS= Fieberschub, FS1=6-12 Stunden nach Fieberbeginn, FS2=18-24h nach Fieberbeginn, FS3 24-30h nach Fieberbeginn.

Abb.14:



Abkürzungen: OF= ohne Fieber, FS= Fieberschub, FS1=6-12 Stunden nach Fieberbeginn, FS2=18-24h nach Fieberbeginn, FS3 24-30h nach Fieberbeginn.

### 4.3 TRAPS

#### 4.3.1 2 Patienten und ihr klinisches Bild

Bei 2 Mädchen und 2 Jungen mit einer nachweislichen Mutation des *TNFRSF1A*- Gens, d.h. der Diagnose TRAPS, konnten die Zytokine in Remission gemessen werden. Davon unterzogen sich ein Junge (ID 14) mit 11 Jahren und ein Mädchen (ID 183) mit 6 Jahren weiteren 3 Messungen im Fieberschub. Die Übrigen stellten sich nicht in der symptomatischen Phase vor. Bei einem Jungen konnten die Messungen nur im akuten Fieberschub, nicht aber in Remission durchgeführt werden.

Das am 30.12.95 in Deutschland geborene **Mädchen (ID183)** ist heterozygote Trägerin sowohl einer R92Q- Mutation in Exon 4 des *TNFRSF1A*- Gens, als auch einer V377I- Mutation in Exon 11 des *MVK*- Gens. Sie litt seit ihrem 4. Lebensjahr bis zu 12mal im Jahr an 1-3 Tage langen Fieberattacken: Nach symptomfreien Episoden von 2-4 Wochen stieg, häufig nach präzipitierenden Faktoren wie Frieren (beim Schwimmen, im Regen) oder psychischem Stress, die Körpertemperatur rapide auf bis zu 40,3°C an. Das Fieber wurde von asymmetrischen, generalisierten Arthralgien, Bauchschmerzen und oralen Aphthen begleitet. Ihre Mutter nannte Vorboten wie eine nasale Stimme, bellenden Husten, beginnende Bauchschmerzen und glasige Augen. Während des akuten Fieberschubes waren eine zervikale Lymphadenopathie, sowie eine Splenomegalie und orale Bläschen bei der körperlichen Untersuchung auffällig.

Der Vater hatte im Alter von 11 Jahren für ein Jahr lang ebenfalls an rezidivierenden Fieberschüben gelitten. Die Mutter wies eine Pollen- und eine Amoxicillin- Allergie auf, und sowohl der Großvater väterlicherseits, als auch ihr Bruder hatten Asthma.

Die Einnahme von 2-3mal 250mg Paracetamol führte zu einer Fiebersenkung für 6 Stunden. Ibuprofen bewirkte eine kürzere Fieberreduktion als Paracetamol. Decortin in einer Dosis von 50mg/ED/d hatte zwar eine rasche Entfieberung zur Folge, jedoch verkürzte sich das symptomfreie Intervall auf 2 Wochen und die Körpertemperatur war beim nächsten Schub höher. Die Adenotomie am 14.3.01 hatte keinen Effekt.

Bei dem, in der Wertung einbezogenen 12- jährigen, adipösen **Jungen (ID14)**, handelt es sich um einen erstmals beschriebenen Patienten chinesischer Abstammung, der sich mit, seit dem ersten Lebensjahr alle drei Wochen auftretenden Fieberschüben bis zu 40°C und schweren abdominellen Schmerzen von 2-3 Wochen Dauer präsentierte. Seit dem 11. Lebensjahr reduzierte sich die Dauer der Fieberschübe auf 4 Tage und die der symptomfreien Intervalle erweiterte sich auf 2-4 Wochen. Prodromalsymptome waren Erkältungen und starke abdominelle Schmerzen. Die mit dem Fieberschub assoziierten Symptome waren bei diesem Jungen Kopfschmerzen, Pharyngitis und eine milde exsudative Tonsillitis. Gelegentlich litt er an Arthralgien, Diarrhö und Hautausschlägen. Lymphadenopathie, Splenomegalie, Myalgien, periorbitales Ödem oder Konjunktivitis traten nicht bei ihm auf.

Die DNA- Analyse ergab, dass er sowohl heterozygoter Träger einer zuvor nicht beschriebenen *de novo* Missense- Mutation auf Exon 2 des *TNFRSF1A*- Gens, als auch- wie sein Vater- heterozygoter Träger der proinflammatorischen E148Q- Mutation auf Exon 2 des *MEFV*- Gens ist. Die *de novo* Missense- Mutation hat eine Tyrosin- Substitution (TAT) durch Aspartamsäure (GAT) auf der Aminosäureposition 20 (Y20D) zur Folge. Diese Mutation war weder bei den Eltern noch bei den zwei Geschwistern nachweisbar. Wie sich durch die PMA- Stimulation der Monozyten des Probanden herausstellte, war die Substitution der Aminosäure nicht mit einem *TNFRSF1A*- Shedding- Defekt assoziiert.

Trotz der Tatsache, dass der Patient und sein Vater heterozygote Träger der proinflammatorischen E148Q- Mutation auf Exon 2 des *MEFV*- Gens sind, welche in der chinesischen Population sehr häufig vorkommt, ähnelt das klinische Bild dem TRAPS- Syndrom.

Gelegentlich waren die Schübe mit einer Mikrohämaturie und einer milden Proteinurie assoziiert, was in den fieberfreien Intervallen nicht nachweisbar war. Erhöhte Serumkonzentrationen der Immunglobuline IgA (Maximum 627 mg/dl) und IgM (Maximum 277 mg/dl) waren dagegen kontinuierlich messbar. Das Serum- IgD, die Mevalonatkinaseaktivität, die *MVK*- Gen- Analyse, zelluläre und humorale Immunität, antinukleäre Antikörper, mikrobiologische und serologische Tests auf Bakterien und Viren waren hingegen stets normal bzw. negativ. Durch eine rektale Biopsie wurde eine Amyloidose ausgeschlossen.

Der Therapie- Versuch mit Colchicin über 4 Jahre blieb ohne Effekt, während die Schübe nach einer Einzelgabe von Prednison (2 mg/kg) innerhalb weniger Stunden vollständig verschwanden, wenn sie innerhalb des ersten Tages des Fieberschubes verabreicht wurde. Jedoch auch die fieberfreien Intervalle verkürzten sich. Nicht- steroidale Antiphlogistika reduzierten die Temperatur und die Arthralgien temporär.

#### 4.3.2 Akut- Phase- Reaktionen

Die **BKS** war bei allen 2 Patienten in den Fieberschub- Messungen höher als im fieberfreien Intervall und auch im fieberfreien Intervall war sie beschleunigt. Bei beiden Kindern wurden erhöhte **CRP**- Werte in den Fieberschubmessungen ermittelt, und ID183 hatte auch in Remission einen erhöhten CRP- Wert. Zudem waren die Konzentrationen im Schub gegenüber denen im Intervall stets erhöht. Die **Leukozytenzahlen** waren bei Patient ID183 gegenüber den Werten in Remission erhöht. Der Patient ID14 wies erhöhte, pathologische Werte im fieberfreien Intervall auf. Bei ihm war die Anzahl an Leukozyten im Schub im Vergleich zum fieberfreien Intervall vermindert. Die **Körpertemperatur** erhöhte sich von FS1 auf FS2 bei beiden Kindern und nahm dann wieder ab (**Tab. 8**).

**Tab. 8:** Leukozyten und Akut- Phase- Proteine der 3 TRAPS- Patienten vor und während der Fieberschübe

ID	GS.	Alter	OF/FS	Leukos	CRP	BKS	Temp.
14	m	11	OF	12600	3,32	35/69	36,4
14	m	11	<b>FS1</b>	6700	3,7	40/75	38,3
14	m	11	<b>FS2</b>	8100	4,87	51/76	39,4
183	w	5	OF	7000	0,11	22/53	36,3
183	w	6	<b>FS 1</b>	8700	1,94	24/54	39
183	w	6	<b>FS 2</b>	9400	7,93	39/70	39,6

Abkürzungen: GS = Geschlecht; OF = ohne Fieber; FS, Fieberschub; FS1, 6-12h nach Fieberbeginn, FS2: 18-24h nach Beginn des Fieberschubes; kA, keine Angabe.

#### 4.3.3 Ergebnisse der zirkulierenden Zytokine

In der nachfolgenden **Tabelle 9** sind die Ergebnisse der Serumkonzentrationen der 2 TRAPS- Kinder in allen Episoden und die Werte der Kontrollen zusammengestellt. Im Vergleich zu den Kontrollen erhöhte Konzentrationen sind mit orangem Hintergrund, die dazu erniedrigten Werte mit blauem Hintergrund gekennzeichnet.

**Tab. 9:** Die Zytokinkonzentrationen im Serum der 2 TRAPS- Kinder im Fieberschub und im symptomfreien Intervall

ID-Nr.	MF/OF	IFN- $\gamma$ pg/ml	IL-2 pg/ml	IL-6 pg/ml	IL-1 $\beta$ pg/ml	IL-12p70 pg/ml	TNF- $\alpha$ pg/ml	IL-10 pg/ml	IL-4 pg/ml
14	OF	<=0	<=0	93,91	21,21	61,74	10,36	10,5	<=0
14	FS1	27,99	<=0	55,97	42,32	47,41	14,81	30,46	7,86
14	FS2	<=0	4,06	37,69	23,8	37,15	6,22	30,46	8,59
14	FS3	43,3	4,06	41,02	67,17	45,86	4,53	14,54	11,73
183	OF	55,7	<=0	12,77	<=0	<=0	<=0	16,43	<=0
183	FS1	200,64	3,58	78,79	7,81	8,94	8,48	16,75	11,73
183	FS2	329,9	<=0	193,27	<=0	6,86	4,53	16,65	4,1
183	FS3	34,42	4,06	7,41	3,36	4,14	5,25	9,26	9,65
<b>Kontrolle</b>		<b>13,1</b>	<b>2</b>	<b>2,6</b>	<b>1,4</b>	<b>12,2</b>	<b>6,7</b>	<b>7,4</b>	<b>11,9</b>

Abkürzungen: OF= ohne Fieber, FS= Fieberschub, FS1=6-12 Stunden nach Fieberbeginn, FS2=18-24h nach Fieberbeginn, <=0= nicht messbar, oranger Hintergrund= Werte höher als Kontrollen, blauer Hintergrund= Werte niedriger als bei Kontrollen

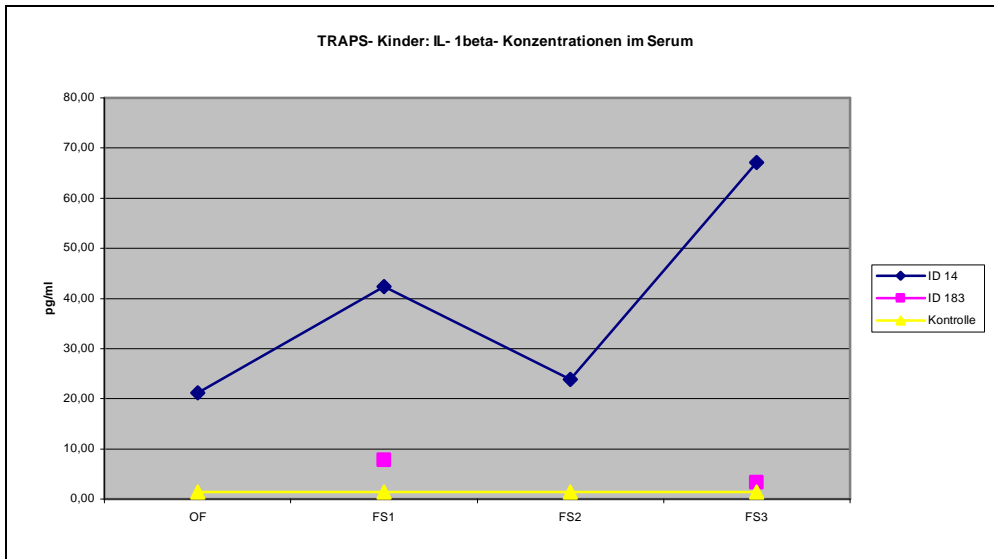
### **Die proinflammatorischen Zytokine der TRAPS- Patienten**

Die messbaren Konzentrationen von **IFN- $\gamma$**  (**Abb.15A**), **IL-1 $\beta$**  (**Abb.15B**) und **IL-6** (**Abb.15C**) waren bei beiden TRAPS- Patienten im Vergleich zu den Kontrollen in allen Erkrankungsphasen erhöht. Unter den Patienten ließ sich keine einheitliche Veränderung der Konzentrationen dieser Zytokine im Verlauf nachweisen, d.h. es war weder eine gemeinsame Zu- noch Abnahme aufzeigbar.

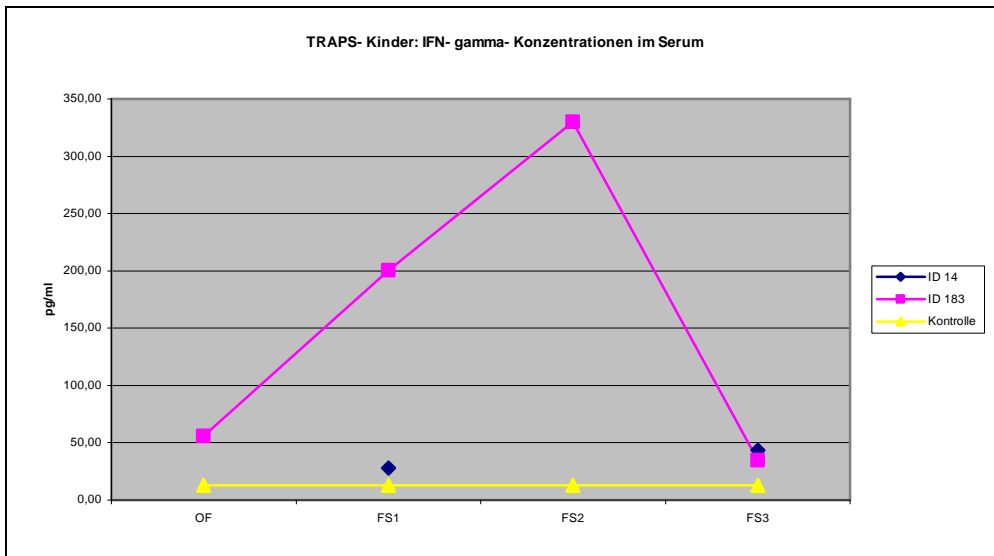
**TNF- $\alpha$**  war bei allen Patienten im Vergleich zu den gesunden Kontrollen in FS1 stets erhöht, während die Konzentrationen im weiteren Verlauf unterhalb der Werte der Kontrollen lagen (**Abb.15D**). Die **IL-12p70**- Konzentrationen waren bei dem Jungen in allen Phasen der Erkrankung im Vergleich zu den Kontrollen erhöht, während das Mädchen erniedrigte Werte aufwies (**Abb.15E**).

**Abb.15:** Die proinflammatorischen Zytokine der 2 TRAPS- Kinder und ihrer Kontrollen im Serum

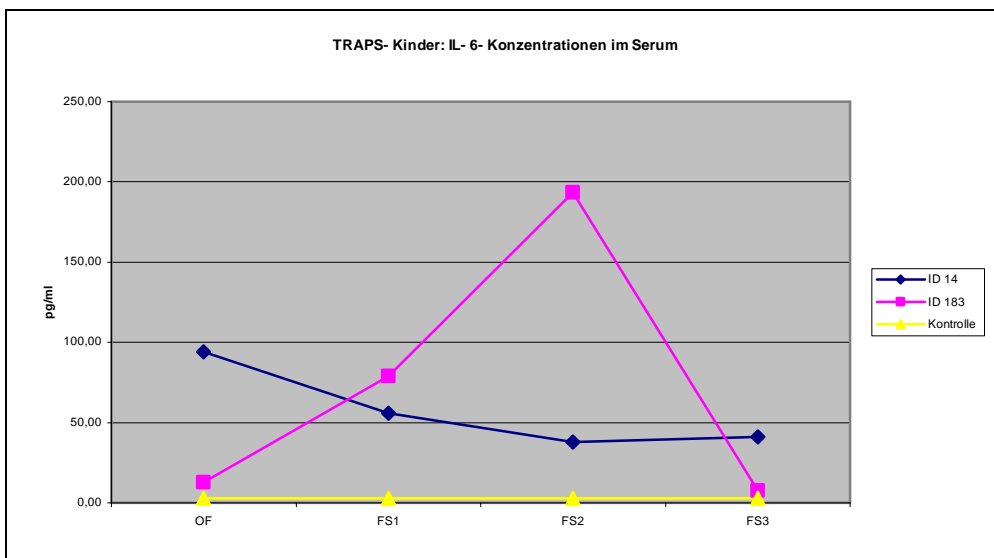
**A**

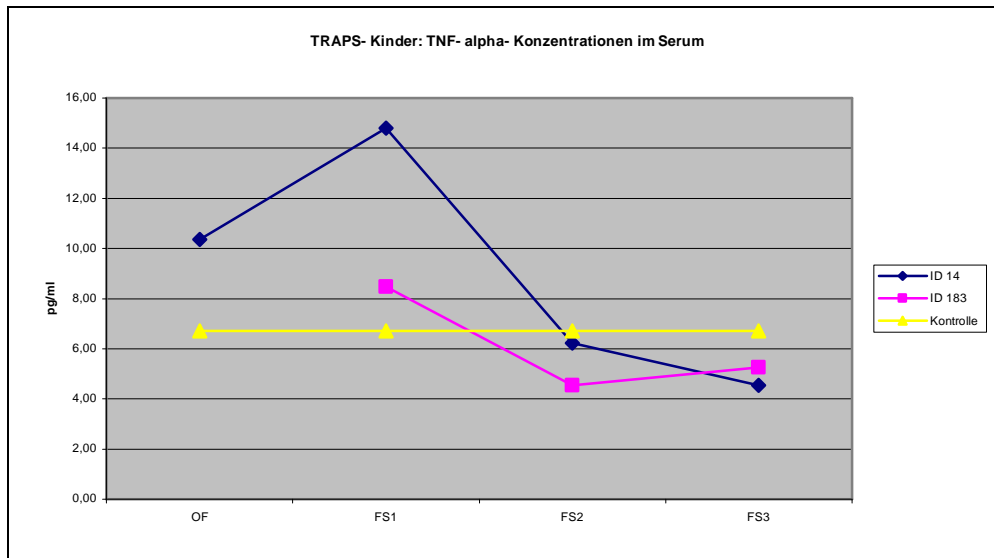
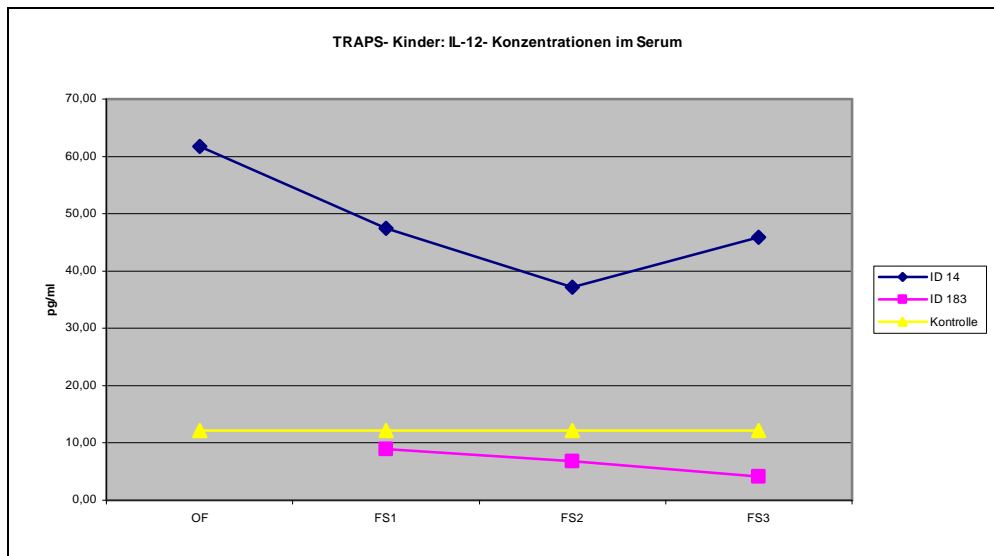


**B**



**C**



Fortsetzung **Abb.15:****D****E**

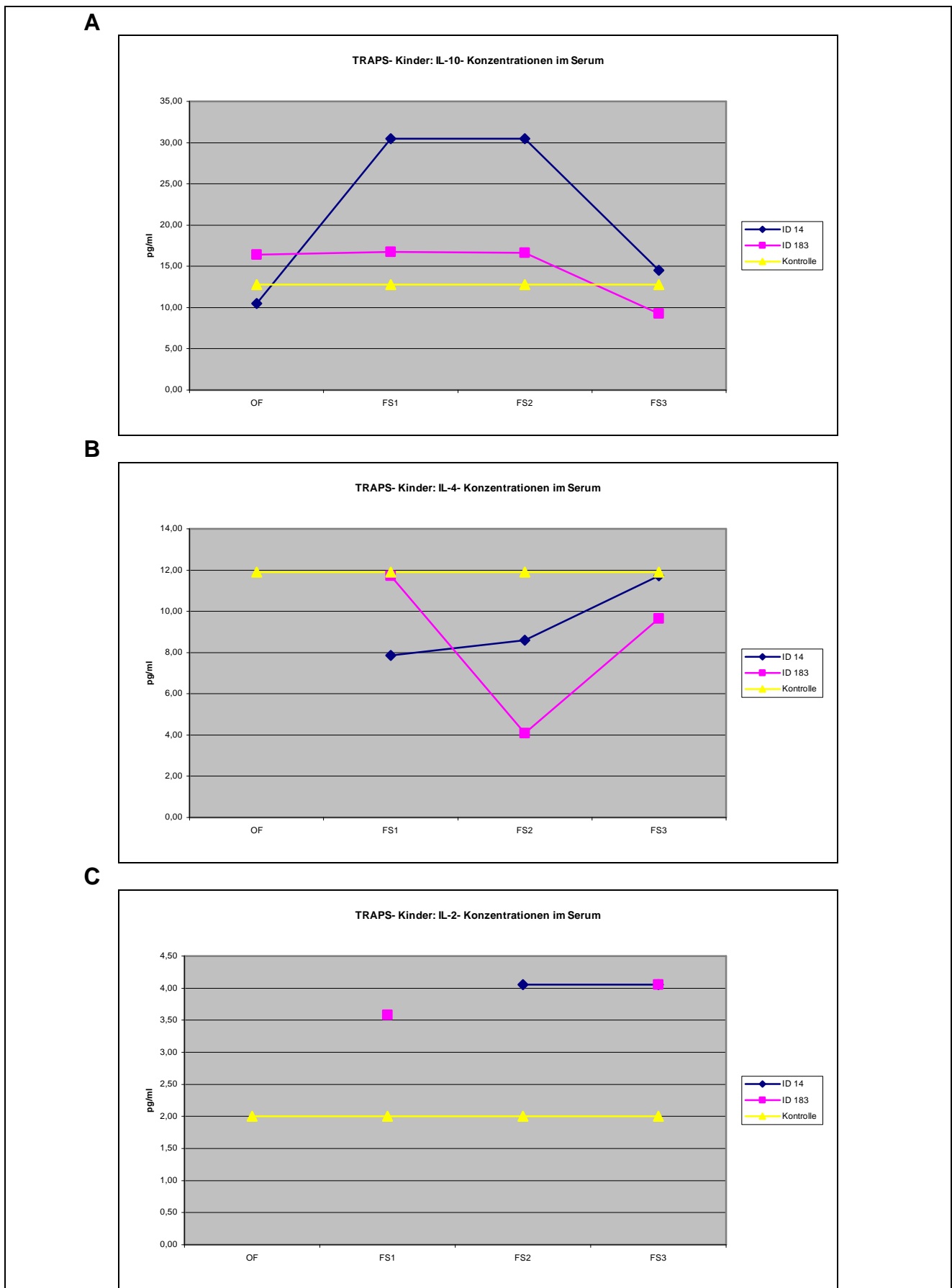
Abkürzungen: OF= ohne Fieber, FS= Fieberschub, FS1=6-12 Stunden nach Fieberbeginn, FS2=18-24h nach Fieberbeginn, FS3 24-30h nach Fieberbeginn.

### **Die anti-inflammatorischen Zytokine der TRAPS- Patienten**

Alle messbaren **IL-4**- Konzentrationen lagen in allen Phasen, mit und ohne Fieber unterhalb der gemessenen Werte der Kontrollen, die bestimmaren **IL-2**- Konzentrationen hingegen lagen stets über den Kontrollwerten.

Bei allen Patienten waren die messbaren **IL-10**- Konzentrationen im Vergleich zu den Kontrollen im FS1 und FS2 erhöht, während in OF im Vergleich zu den Kontrollen bei ID14 erniedrigte und bei ID183 erhöhte Konzentrationen gemessen wurden (**Abb.16**).

**Abb.16:** Die anti-inflammatorischen Zytokine der 2 TRAPS- Kinder und ihrer Kontrollen im Serum



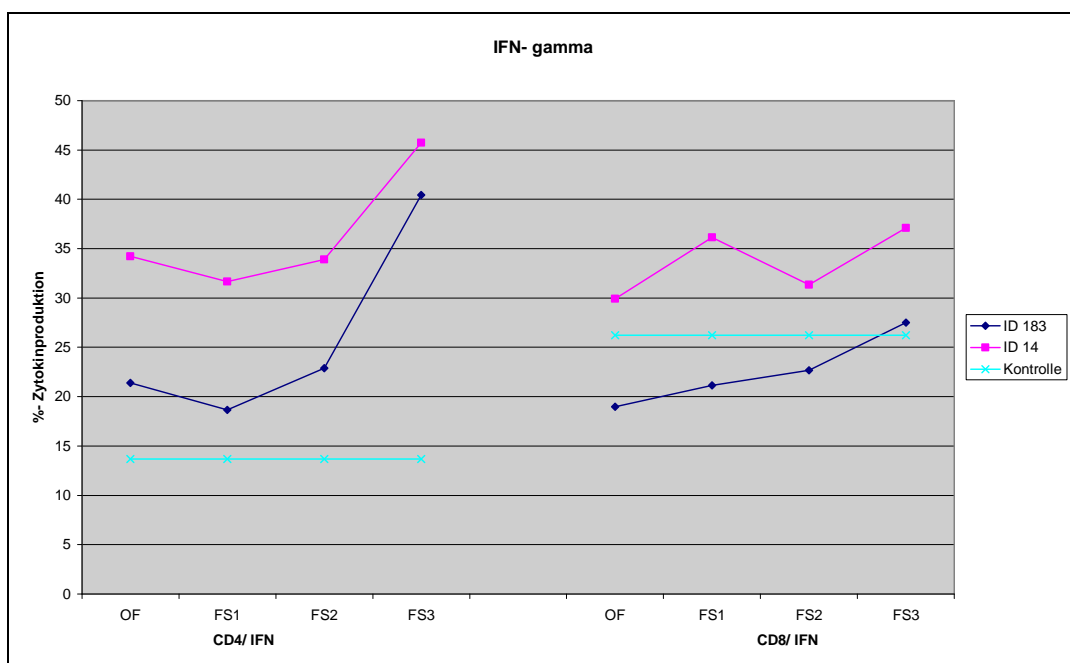
Abkürzungen: OF= ohne Fieber, FS= Fieberschub, FS1=6-12 Stunden nach Fieberbeginn, FS2=18-24h nach Fieberbeginn, FS3 24-30h nach Fieberbeginn.



#### 4.3.4 PMA- stimulierte Zytokinsynthese in Lymphozyten

Die PMA- Stimulation ergab bei den 2 TRAPS- Kindern im Vergleich zu den Kontrollen höhere **IFN- $\gamma$** - Konzentrationen in CD4+- Zellen in Remission, als auch in den Messungen im Fieberschub. Zudem wiesen die Konzentrationen einen gleichsinnigen Verlauf: die Konzentrationen nahmen in FS1 im Vergleich zu OF und nahmen im weiteren Fieberverlauf zu. Die IFN- $\gamma$ - Konzentrationen der CD8+- Zellen wiesen in FS1 stets höhere Werte als in OF auf. Die Konzentrationen in FS3 lagen über den Kontrollwerten (**Abb.17**).

**Abb.17:**



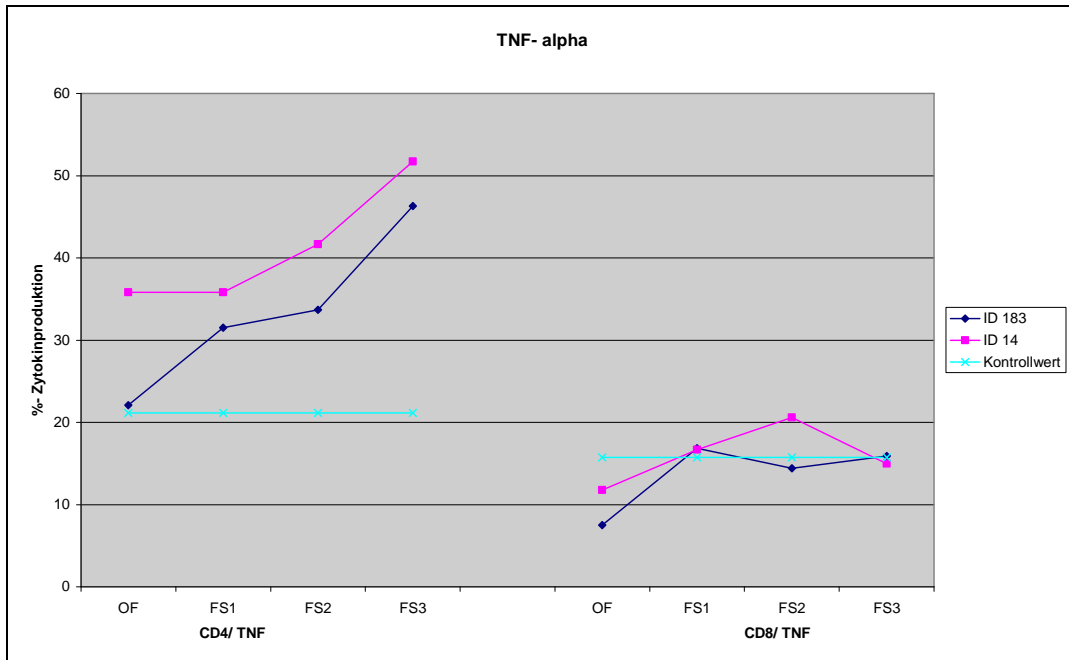
Abkürzungen: OF= ohne Fieber, FS= Fieberschub, FS1=6-12 Stunden nach Fieberbeginn, FS2=18-24h nach Fieberbeginn, FS3 24-30h nach Fieberbeginn.

Auch die **TNF- $\alpha$** - Konzentrationen der CD4+- Zellen waren bei den Patienten ID183 und ID14 im Vergleich zu den Kontrollen in allen Messungen erhöht und nahmen im Fieberverlauf stets zu. Die TNF- $\alpha$ - Konzentrationen der CD8+- Lymphozyten waren im Vergleich zu den Kontrollen in OF erniedrigt, und waren in FS1 im Vergleich zu den Werten in OF und zu den Kontrollen höher (**Abb. 18**).

Für CD4+ lagen alle IL-4- Werte in OF unterhalb des Kontrollwertes. Die IL-4- Konzentration in CD4+- Zellen stieg bei beiden Kindern im Verlauf zwischen OF und FS2 an und sank in FS3 wieder ab und zeigten somit einen gleichsinnigen Gesamtverlauf. Die **IL-4**- Konzentration der CD8+- Zellen zeigte in allen Messungen im Vergleich zu den Kontrollen deutlich verminderte

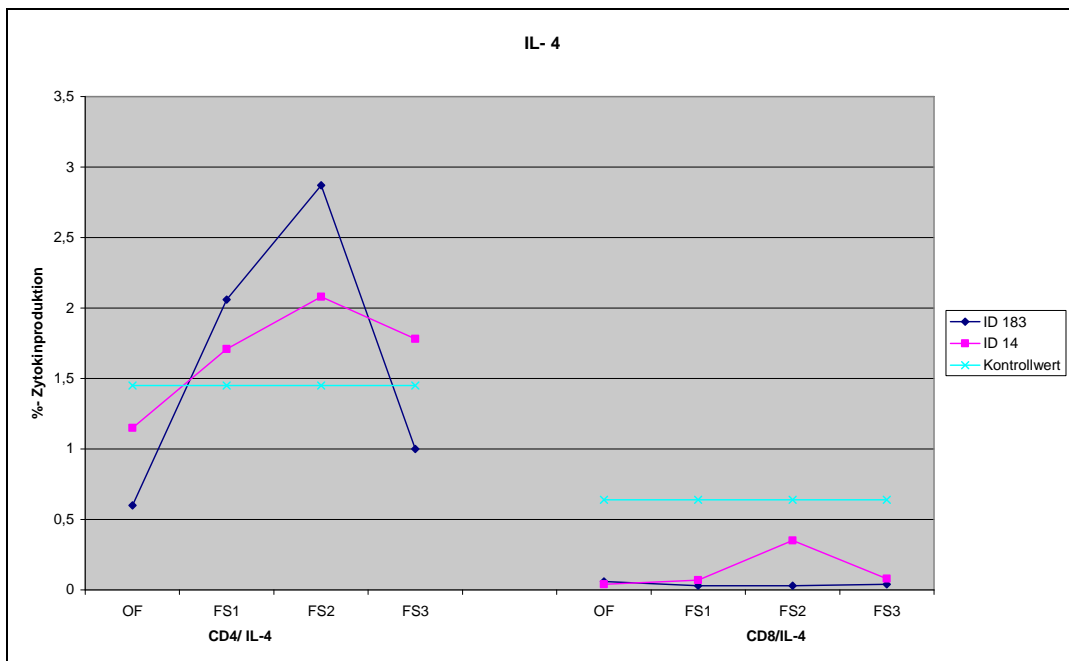
Werte. Die Veränderungen im Verlauf wiesen zwischen den Patienten keine Gemeinsamkeiten auf (**Abb.19**).

**Abb.18:**



Abkürzungen: OF= ohne Fieber, FS= Fieberschub, FS1=6-12 Stunden nach Fieberbeginn, FS2=18-24h nach Fieberbeginn, FS3 24-30h nach Fieberbeginn.

**Abb. 19:**



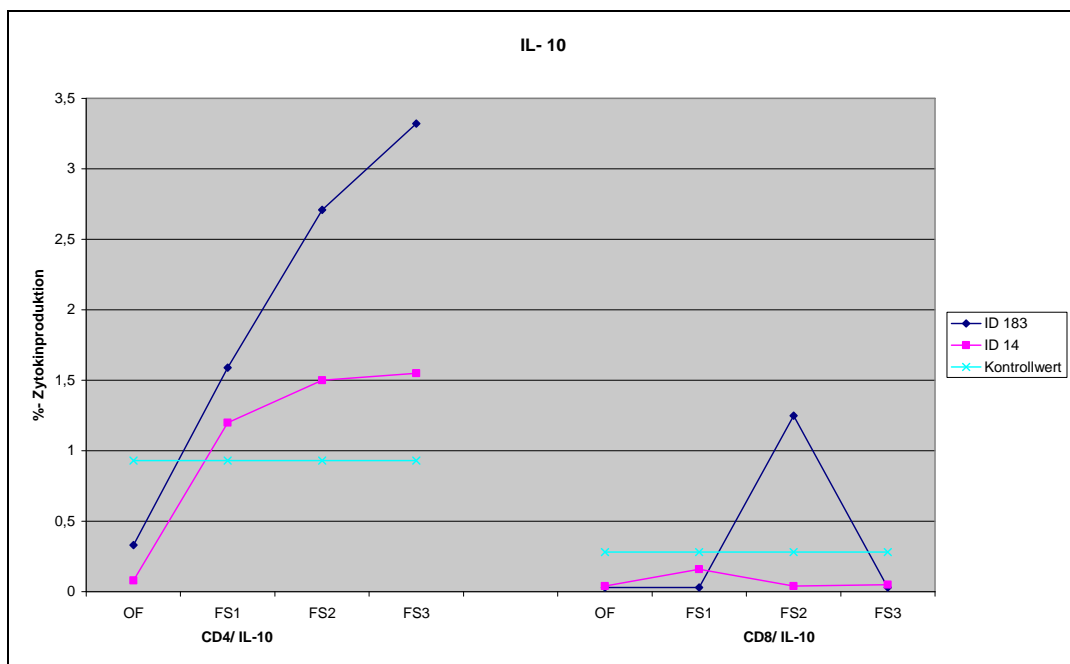
Abkürzungen: OF= ohne Fieber, FS= Fieberschub, FS1=6-12 Stunden nach Fieberbeginn, FS2=18-24h nach Fieberbeginn, FS3 24-30h nach Fieberbeginn.

Die **IL-10**-Konzentrationen waren für CD4+- und CD8+- T- Zellen nach Stimulation im Vergleich zu den Kontrollen in OF bei beiden Kindern erniedrigt. Zudem waren die Werte der CD4+- Zellen beider Kinder im gesamten Verlauf zunehmend und ihre Konzentrationen im Fieberschub waren stets über dem Kontrollwert

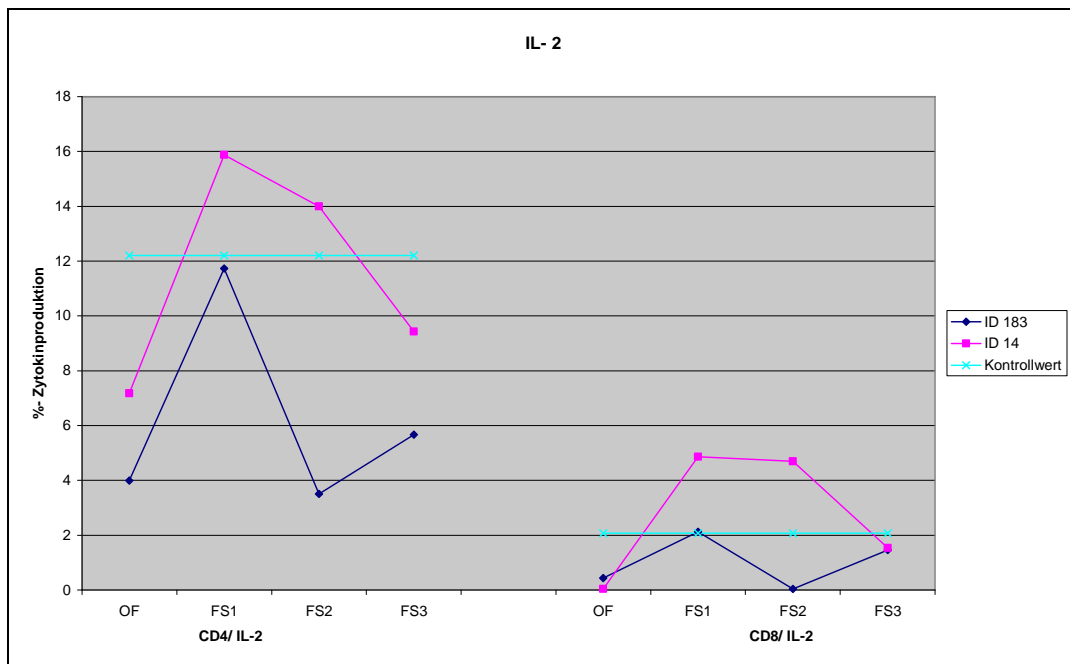
Bei den CD8+- Zellen waren die Konzentrationen der Messungen in OF, FS1 und FS3 unterhalb der Kontrollen, jedoch im Verlauf zeigten die Werte der TRAPS- Kinder keine Übereinstimmungen (**Abb.20**).

Die **IL-2** Konzentrationen der CD4+- und CD8+- Zellen waren in OF bei allen Patienten im Vergleich zu den Kontrollen und im Vergleich zu FS1 erniedrigt und im Verlauf zeigten beide eine Konzentrationsabnahme zwischen FS1 und FS2. Auffällig waren die **IL-12**-Konzentrationsveränderungen der einzelnen Kinder, die sich für CD4+ und CD8+-Zellen gleichsinnig im Verlauf und auch im Bezug zu den Kontrollen veränderten (**Abb. 21**).

**Abb.20:**



Abkürzungen: OF= ohne Fieber, FS= Fieberschub, FS1=6-12 Stunden nach Fieberbeginn, FS2=18-24h nach Fieberbeginn, FS3 24-30h nach Fieberbeginn.

**Abb.21:**

Abkürzungen: OF= ohne Fieber, FS= Fieberschub, FS1=6-12 Stunden nach Fieberbeginn, FS2=18-24h nach Fieberbeginn, FS3 24-30h nach Fieberbeginn.

## 4.4 PFAPA

### 4.4.1 Patienten

19 Patienten erfüllten die standardisierten klinischen Kriterien für das PFAPA- Syndrom mit 1) periodischem Fieber ( $> 38,5^{\circ}\text{C}$ ) begleitet von aphthöser Stomatitis und/oder Pharyngitis und/oder zervikaler Lymphadenitis; 2) Krankheitsbeginn vor dem 5. Lebensjahr; 3) Ausschluss von Infektionen und zyklischer Neutropenie; 4) völlig asymptomatisch in den Intervallen zwischen den Fieberepisoden; 5) Wachstum und Entwicklung normal [103]. Die genetisch bedingten PFS TRAPS, HIDS, und FMF wurden molekulargenetisch, durch DNA-Extraktion von Leukozyten und Sequenzanalyse aller Exons der Gene *TNFRSF1A*, *MVK* und *MEFV* ausgeschlossen.

Von den 19 Kindern erschienen 11 nur im fieberfreien Intervall und 2 ausschließlich im akuten Schub und gingen somit nicht in die Auswertung ein.

Bei den übrigen 6 Patienten waren die Messung in Remission und mindestens 2 Zytokinbestimmungen im Fieberschub möglich.

Davon waren 4 Jungen und 2 Mädchen im Durchschnittsalter von 8 Jahren (+/- 1,2 SEM; Bereich 4-13). Der durchschnittliche Zeitabschnitt zwischen der Blutabnahme im symptomfreien Intervall und dem folgenden Fieberschub betrug 17 Tage (+/- 3,4 SEM; Bereich 11-33). Das Fieber dauerte durchschnittlich 2,5 bis 6,5 Tage und die symptomfreien Intervalle 3,5 bis 6,5 Wochen.

Das Fieber war bei allen Patienten mindestens begleitet von Adenitis und Pharyngitis.

Die Zusammenfassung der demographischen Daten und klinisch wichtigsten Merkmale zeigt **Tabelle 10**.

**Tab. 10:** *Demographie und klinische Daten der sechs PFAPA Patienten*

Patient ID	Ge- schlecht	Alter bei Beginn der Erkrankung (Jahre)	Dauer der Fieberschübe (Tage)	Dauer des symptomfreien Intervalls (Wochen)	Maximale Temperatur (°C)	Zervikale Adenitis	Pharyngitis	Aphthöse Stomatitis
1	W	2.0	4.0	3.5	40.0	+	+	-
2	M	0.9	2.5	3.5	40.1	+	+	-
3	M	0.7	4.0	6.0	41.0	+	+	-
4	W	4.1	3.5	6.0	40.9	+	+	+
5	M	3.7	6.5	6.0	40.9	+	+	-
6	M	2.0	4.0	6.0	40.6	+	+	-

Abkürzungen M= männlich; W= weiblich; + = vorhanden; - = abwesend.

#### 4.4.2 Akut- Phase- Reaktion

Charakteristisch für die akuten Fieberschübe der 6 PFAPA- Patienten war die Akut- Phase Reaktion, die sich in den symptomfreien Intervallen normalisierte: Bereits 6-12h nach Fieberbeginn (FS1) stiegen **Leukozytenzahlen** ( $p= 0.043$ ) und **BKS** ( $p=0.043$ ) im Vergleich zur symptomfreien Phase signifikant an. Hingegen zeigten **CRP- Werte** ( $p= 0.007$ ) und **BKS** ( $p=0.031$ ) 18-24h (FS2) nach Schubbeginn einen signifikanten Anstieg (**Tab.11**).

**Tab. 11:** Leukozyten und Akut- Phase- Proteine der sechs PFAPA Patienten vor und während der Fieberschübe

<b>Leukozyten (10<sup>3</sup>/µl)</b>					
	N	MW	SSM	p- Wert	95% KI
OF vs	5	6.3	± 0.9	0.019	-8.4; -1.3
FS1	5	11.1	± 0.9		
OF vs	5	6.6	± 0.8	0.052	-7.9; 0.06
FS2	5	10.5	± 0.9		
F1 vs	4	11.7	± 0.9	0.368	-2.7; 5.4
FS2	4	10.3	± 1.1		
<b>CRP (mg/dl)</b>					
	N	MW	SSM	p- Wert	95% KI
OF vs	5	0.09	± 0.02	0.054	-5.6; -0.07
FS1	5	2.8	± 1.0		
OF vs	4	0.09	± 0.02	0.007	-12.8; -4.6
FS2	4	8.8	± 1.3		
FS1 vs	3	4.0	± 1.2	0.024	-6.2; -1.2
FS2	3	7.7	± 0.8		
<b>BKS (mm/h)</b>					
	N	MW	SSM	p- Wert	95% KI
OF vs	5	14.4	± 5.6	0.023	-20.2; -2.6
FS1	5	25.8	± 3.6		
OF vs	4	14.0	± 7.3	0.031	-29.6; -2.8
FS2	4	30.2	± 3.3		
FS1 vs	3	26.7	± 5.8	0.130	-13.6; 3.6
FS2	3	31.7	± 4.2		

Abkürzungen: OF= ohne Fieber, FS1= 6-12h nach Fieberbeginn, FS2= 18-24h nach Fieberbeginn, vs= versus, N= Anzahl der Patienten, MW= Mittelwert, SSM = Standardfehler des Stichprobenmittelwertes, KI= Konfidenzintervall

#### 4.4.3 Ergebnisse der zirkulierenden Zytokine der 6 PFAPA- Kinder

##### **Die proinflammatorischen Zytokine im Serum**

Die Fieberschübe waren 6-12 Stunden nach Temperaturanstieg assoziiert mit einer signifikanten Erhöhung der **IL-6**- (p= 0.008) und der **IFN-γ**- Konzentrationen im Vergleich zum fieberfreien Intervall (p= 0.029) (**Tab. 12**).

Verglichen mit den gesunden Kontrollen wiesen die PFAPA- Kinder im akuten Schub eine signifikante Erhöhung des **IL-6** und **IFN-γ**, als auch der Zytokine **IL-1β** und des **IL-12p70** auf.

In den fieberfreien Intervallen konnte keine spontane **IFN-γ**- Ausschüttung beobachtet werden und die **IFN-γ**- Konzentration im Serum war signifikant erniedrigt gegenüber den Normalwerten (p= 0.000) (**Tab.12**).

Die **TNF- $\alpha$** - Serumkonzentrationen waren sowohl im fieberfreien Intervall, als auch im akuten Schub im Vergleich zu den Kontrollen signifikant erhöht (**Tab.12**).

Während der fieberfreien Episode wiesen die PFAPA- Patienten im Vergleich zu den Kontrollen signifikant erhöhte Serumkonzentrationen der proinflammatorischen Zytokine **IL-1 $\beta$** , **IL-6** und **IL-12p70** auf.

### ***Die anti-inflammatorischen Zytokine im Serum***

Es wurde weder für **IL-4** noch für **IL-10** ein signifikanter Unterschied der Serumkonzentrationen zwischen den fieberfreien Intervallen und den akuten Schüben beobachtet (**Tab. 12**).

Im Vergleich zu den Kontrollen waren die **IL-4**- Konzentrationen während der symptomfreien Intervalle und in FS2 signifikant erniedrigt.

Die Bestimmung der **löslichen TNF- Rezeptoren** ergab eine signifikante Erhöhung des **sTNFRp55** in FS2 verglichen mit der fieberfreien Phase, und eine im Vergleich zu den Kontrollen signifikante Erhöhung des **sTNFRp75** während der Fieberschübe. In den symptomfreien Intervallen war die sTNFRp55-Sekretion im Vergleich zu den Gesunden signifikant erniedrigt und erreichte lediglich während der Fieberschübe die Werte der Kontrollen (Tab.12)

**Tab.12:** Konzentrationen der zirkulierenden Zytokine von 15 gesunden Kontrollen (7 Jungen, 8 Mädchen; Durchschnittsalter 7.9 Jahre,  $\pm 0.6$  SSM, Bereich 4-12) und der sechs PFAPA Patienten während des Fieberschubes und in den symptomfreien Intervallen

		IL-6 (pg/ml)				
	N	MW	SSM	p Wert	95% KI	
Kontrollen vs	15	2.6	$\pm 0.5$	0.001	-38.3; -11.3	
PFAPA_OF	6	27.4	$\pm 10.5$			
Kontrollen vs	15	2.6	$\pm 0.5$	< 0.001	-86; -69.2	
PFAPA_FS1	6	80.2	$\pm 15.9$			
Kontrollen vs	15	2.6	$\pm 0.5$	< 0.001	-177.4; -68.6	
PFAPA_FS2	5	125.6	$\pm 47.6$			
PFAPA_OF vs	6	27.4	$\pm 10.5$	0.008	-84.6; -21	
PFAPA_FS1	6	80.2	$\pm 6.5$			
PFAPA_OF vs	5	30.3	$\pm 12.4$	0.07	-203.3; 12.6	
PFAPA_FS2	5	125.6	$\pm 47.6$			
PFAPA_FS1 vs	5	79.8	$\pm 7.9$	0.363	-169.4; 77.9	
PFAPA_FS2	5	125.6	$\pm 47.6$			
		IL-1 $\beta$ (pg/ml)				
	N	MW	SSM	p Wert	95% KI	
Kontrollen vs	15	1.4	$\pm 0.4$	0.001	-109; -30.6	
PFAPA_OF	6	71.2	$\pm 30.8$			
Kontrollen vs	15	1.4	$\pm 0.4$	< 0.001	-110.4; -52.6	
PFAPA_FS1	6	82.9	$\pm 22.7$			
Kontrollen vs	15	1.4	$\pm 0.4$	< 0.001	-118.2; -41.9	
PFAPA_FS2	5	81.5	$\pm 33.4$			
PFAPA_OF vs	6	71.2	$\pm 30.8$	0.585	-63.2; 39.8	
PFAPA_FS1	6	82.9	$\pm 22.7$			
PFAPA_OF vs	5	83.0	$\pm 34.9$	0.955	-69.9; 73.0	
PFAPA_FS2	5	81.5	$\pm 33.4$			
PFAPA_FS1 vs	5	82.4	$\pm 27.8$	0.931	-25.4; 27.1	
PFAPA_FS2	5	81.5	$\pm 33.4$			
		TNF- $\alpha$ (pg/ml)				
	N	MW	SSM	p Wert	95% KI	
Kontrollen vs	15	3.7	$\pm 0.4$	0.030	-9.1; -0.7	
PFAPA_OF	6	8.6	$\pm 1.6$			
Kontrollen vs	15	3.7	$\pm 0.4$	0.006	-7; -1.7	
PFAPA_FS1	6	8.1	$\pm 1.0$			
Kontrollen vs	15	3.7	$\pm 0.4$	0.001	-9.5; -2.7	
PFAPA_FS2	5	9.8	$\pm 2.7$			
PFAPA_OF vs	6	8.6	$\pm 1.6$	0.741	-3.3; 4.3	
PFAPA_FS1	6	8.1	$\pm 1.0$			
PFAPA_OF vs	5	9.2	$\pm 1.9$	0.636	-4.0; 2.7	
PFAPA_FS2	5	9.8	$\pm 2.7$			
PFAPA_FS1 vs	5	7.9	$\pm 1.3$	0.383	-7.4; 3.5	
PFAPA_FS2	5	9.8	$\pm 2.7$			
		IL-2 (pg/ml)				
	N	MW	SSM	p Wert	95% KI	
Kontrollen vs	15	2.0	$\pm 0.6$	0.659	-4.2; 2.8	
PFAPA_OF	6	2.6	$\pm 1.3$			
Kontrollen vs	15	2.0	$\pm 0.6$	0.374	-4.6; 1.9	
PFAPA_FS1	6	3.3	$\pm 1.3$			
Kontrollen vs	15	2.0	$\pm 0.6$	0.004	0.7; 3.2	
PFAPA_FS2	5	0.0	$\pm 0.0$			
PFAPA_OF vs	6	2.6	$\pm 1.3$	0.607	-3.6; 2.3	
PFAPA_FS1	6	3.3	$\pm 1.3$			
PFAPA_OF vs	5	2.2	$\pm 1.6$	0.232	-2.1; 6.6	
PFAPA_FS2	5	0.0	$\pm 0.0$			
PFAPA_FS1 vs	5	3.3	$\pm 1.5$	0.097	-0.9; 7.6	
PFAPA_FS2	5	0.0	$\pm 0.0$			
		IL-4 (pg/ml)				
	N	MW	SSM	p Wert	95% KI	
Kontrollen vs	15	11.9	$\pm 1.0$	0.004	3.7; 14.0	
PFAPA_OF	6	3.1	$\pm 2.0$			
Kontrollen vs	15	11.9	$\pm 1.0$	0.069	-0.5; 10.8	
PFAPA_FS1	6	6.8	$\pm 2.2$			
Kontrollen vs	15	11.9	$\pm 1.0$	0.001	3.6; 10.8	
PFAPA_FS2	5	4.7	$\pm 1.2$			
PFAPA_OF vs	6	3.1	$\pm 2.0$	0.299	-11.8; 4.5	
PFAPA_FS1	6	6.8	$\pm 2.2$			
PFAPA_OF vs	5	3.7	$\pm 2.3$	0.594	-5.8; 3.8	
PFAPA_FS2	5	4.7	$\pm 1.2$			
PFAPA_FS1 vs	5	6.1	$\pm 2.5$	0.58	-4.8; 7.5	
PFAPA_FS2	5	4.7	$\pm 1.2$			
		IL-10 (pg/ml)				
	N	MW	SSM	p Wert	95% KI	
Kontrollen vs	15	13.7	$\pm 2.8$	0.272	-3.6; 12	
PFAPA_OF	6	9.5	$\pm 2.4$			
Kontrollen vs	15	13.7	$\pm 2.8$	0.401	-15.8; 6.9	
PFAPA_FS1	6	18.1	$\pm 4.2$			
Kontrollen vs	15	13.7	$\pm 2.8$	0.796	-10; 7.8	
PFAPA_FS2	5	14.8	$\pm 3.0$			
PFAPA_OF vs	6	9.5	$\pm 2.4$	0.138	-21.3; 4.0	
PFAPA_FS1	6	18.1	$\pm 4.2$			
PFAPA_OF vs	5	11.4	$\pm 1.8$	0.28	-10.9; 4.1	
PFAPA_FS2	5	14.8	$\pm 3.0$			
PFAPA_FS1 vs	5	18.9	$\pm 5.1$	0.561	-14.1; 22.4	
PFAPA_FS2	5	14.8	$\pm 3.0$			



Fortsetzung Tab.12:

IL-12p70 (pg/ml)						sTNFRp55 (ng/ml)					
	N	MW	SSM	p Wert	95% KI		N	MW	SSM	p Wert	95% KI
Kontrollen vs	15	12.2	± 2.6	0.002	-107.4; -29.5	Kontrollen vs	13	2.0	± 0.1	0.036	0.04; 0.8
PFAPA_OF	6	80.7	± 29.9			PFAPA_OF	5	1.5	± 0.1		
Kontrollen vs	15	12.2	± 2.6	0.006	-124.6; -24.2	Kontrollen vs	13	2.0	± 0.1	0.517	-0.8; 0.5
PFAPA_FS1	6	86.6	± 38.9			PFAPA_FS1	5	2.1	± 0.2		
Kontrollen vs	15	12.2	± 2.6	0.024	-146.2; -11.6	Kontrollen vs	13	2.0	± 0.1	0.169	-1.0; 0.2
PFAPA_FS2	5	91.1	± 58.2			PFAPA_FS2	4	2.3	± 0.2		
PFAPA_OF vs	6	80.7	± 29.9	0.722	-46.4; 34.5	PFAPA_OF vs	4	1.5	± 0.2	0.11	-1.0; 0.2
PFAPA_FS1	6	86.6	± 38.9			PFAPA_FS1	4	1.9	± 0.04		
PFAPA_OF vs	5	84.3	± 36.3	0.82	-84.2; 70.7	PFAPA_OF vs	3	1.6	± 0.2	0.014	-0.8; -0.3
PFAPA_FS2	5	91.1	± 58.2			PFAPA_FS2	3	2.2	± 0.2		
PFAPA_FS1 vs	5	85.8	± 47.6	0.658	-35.9; 25.4	PFAPA_FS1 vs	4	2.2	± 0.3	0.546	-0.7; 0.5
PFAPA_FS2	5	91.1	± 58.2			PFAPA_FS2	4	2.3	± 0.2		
IFN-γ (pg/ml)						sTNFRp75 (ng/ml)					
	N	MW	SSM	p Wert	95% KI		N	MW	SSM	p Wert	95% KI
Kontrollen vs	15	13.1	± 1.2	< 0.001	9.2; 17.0	Kontrollen vs	13	3.9	± 0.2	0.342	-1.1; 0.4
PFAPA_OF	6	0.0	± 0.0			PFAPA_OF	5	4.3	± 0.2		
Kontrollen vs	15	13.1	± 1.2	< 0.001	-211.6; -78.6	Kontrollen vs	13	3.9	± 0.2	0.012	-3.6; -0.5
PFAPA_FS1	6	158.2	± 52.2			PFAPA_FS1	5	6.0	± 1.1		
Kontrollen vs	15	13.1	± 1.2	< 0.001	-158.2; -56.5	Kontrollen vs	13	3.9	± 0.2	< 0.001	-4.0; -1.4
PFAPA_FS2	5	120.5	± 44.3			PFAPA_FS2	4	6.6	± 0.8		
PFAPA_OF vs	6	0.0	± 0.0	0.029	-292.5; -23.9	PFAPA_OF vs	3	4.4	± 0.4	0.428	-4.5; 2.8
PFAPA_FS1	6	158.2	± 52.2			PFAPA_FS1	3	5.2	± 1.1		
PFAPA_OF vs	5	0.0	± 0.0	0.053	-243.5; 2.6	PFAPA_OF vs	3	4.4	± 0.4	0.096	-4.4; 0.8
PFAPA_FS2	5	120.5	± 44.3			PFAPA_FS2	3	6.2	± 1.0		
PFAPA_FS1 vs	5	130.2	± 54.0	0.887	-169.4; 188.9	PFAPA_FS1 vs	4	6.0	± 1.1	0.193	-1.9; 0.6
PFAPA_FS2	5	120.5	± 44.3			PFAPA_FS2	4	6.6	± 0.8		

Abkürzungen: PFAPA- OF= symptomfreies Intervall der PFAPA- Patienten; PFAPA-FS1 = 6-12 Stunden nach Fieberbeginn; PFAPA- FS2 =18-24 Stunden nach Fieberbeginn; MW = Mittelwert; SSM = Standardfehler des Stichprobenmittelwertes ; KI = Konfidenzintervall.

#### 4.4.4 Ergebnisse der PMA- stimulierten Zytokinsynthese in Lymphozyten

Die PMA- stimulierte **IFN-γ**- Synthese wies für CD4+- Zellen, verglichen mit den Kontrollen und den Werten in FS1 eine signifikante Erhöhung in FS2 auf (26,7% FS2, 21,5% FS1; p= 0.041; 15.9% Kontrollen; p=0.030) (Abb.22A).

Im Vergleich zu den Kontrollen war in FS2 der prozentuale Anteil an **IFN-γ**- (46.5% FS2, 27.9% Kontrollen; p=0.029) und IL-2- (4.8% FS2, 1.5% Kontrollen; p=0.015) produzierenden CD8+- T-Zellen erhöht (Abb.22A).

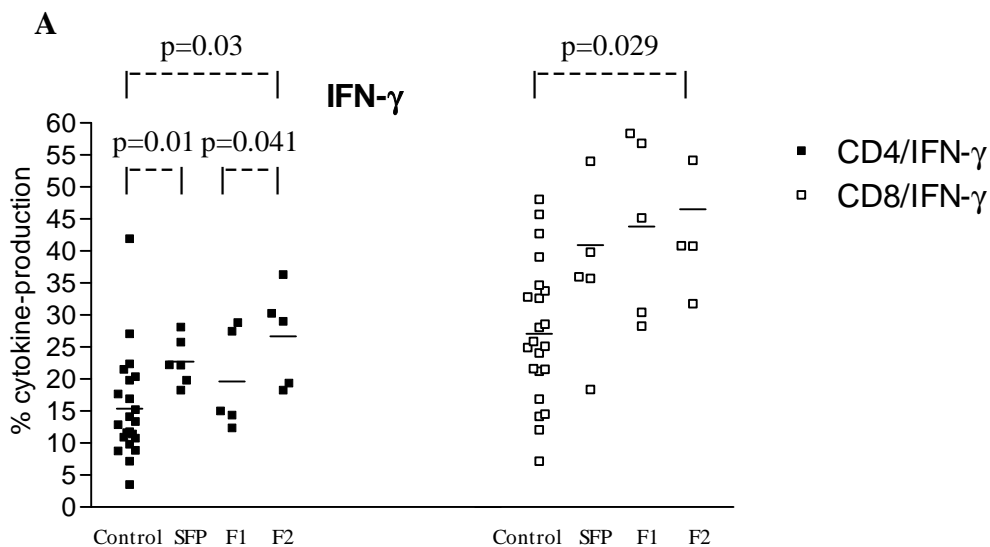
Für das proinflammatorische Zytokin **TNF-α** konnte in keiner Phase der Erkrankung weder für CD4+- Zellen noch für CD8+- Zellen ein Anstieg der intrazellulären *ex vivo* Produktion beobachtet werden. Jedoch verglichen mit der Kontrollgruppe war die TNF-α- Ausschüttung vor allem der CD8+- Zellen vermehrt (Abb. 22B). (CD4: R 1.6; F1 1.2; F2 1.4; CD8 R 2.3; F1 2.6; F2 1.9)

Eine intrazelluläre **IL-4-** und **IL-10-** Ausschüttung der Lymphozyten konnte in keiner Phase induziert werden. Die Konzentrationen lagen unter den Werten der gesunden Vergleichsgruppe (Abb. 22C, 22D). (CD4: R 0.7; F1 1.3; F2 1.6; CD8 R 0.6; F2 0.9; F2 0.7)

Die intrazelluläre **IL-2-** Produktion der CD8+- Zellen nahm 18-24h nach Fieberschubbeginn deutlich zu (Abb. 22E)

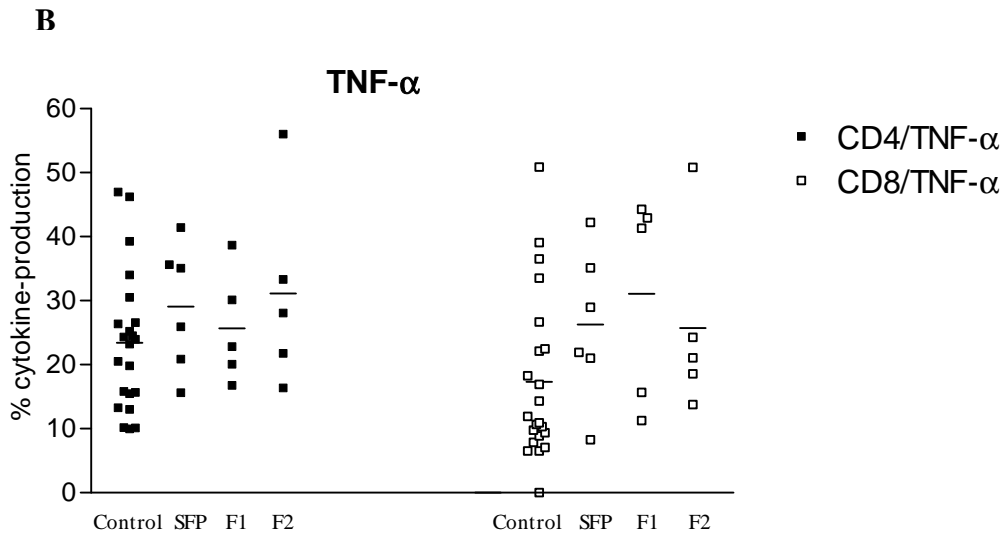
Die Ergebnisse der Zytokinkonzentrationen im Serum und in den Lymphozyten ergaben keine signifikante Korrelation mit der Länge der Intervalle zwischen den Fieberschüben.

**Abb. 22:** PMA- stimulierte intrazelluläre Zytokinproduktion in CD4+- und CD8+- Zellen der 6 PFAPA- Kinder vor und während der Fieberschübe

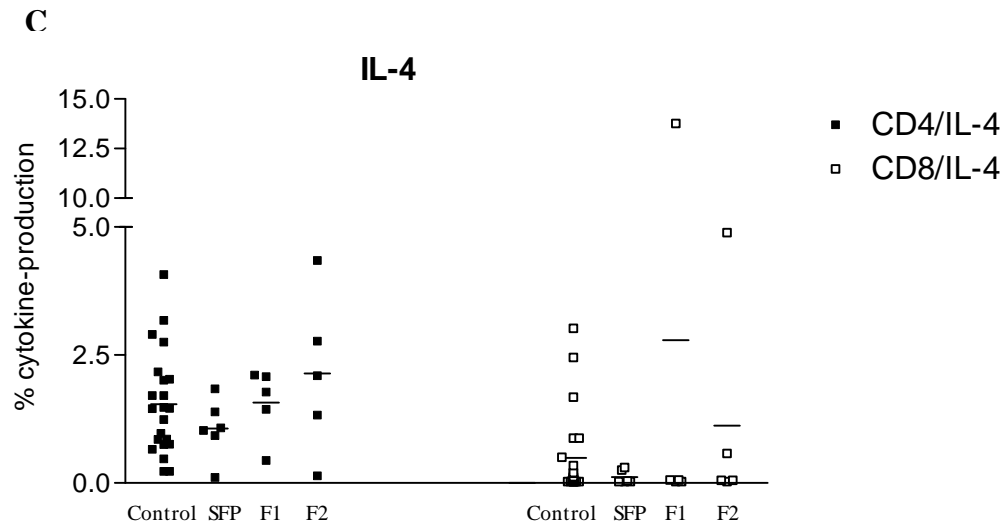


Erklärung: Intrazelluläre IFN- $\gamma$  – Produktion in CD4+ und CD8+- Zellen der 6 PFAPA- Kinder während und zwischen den Fieberschüben. Der prozentuale Anteil der IFN- $\gamma$  - positiven Zellen ist als Mittelwert der Patienten und der Kontrollgruppe angegeben (Daten sind als Einzelwerte angegeben, horizontale Balken zeigen den Durchschnittswert jeder Gruppe).

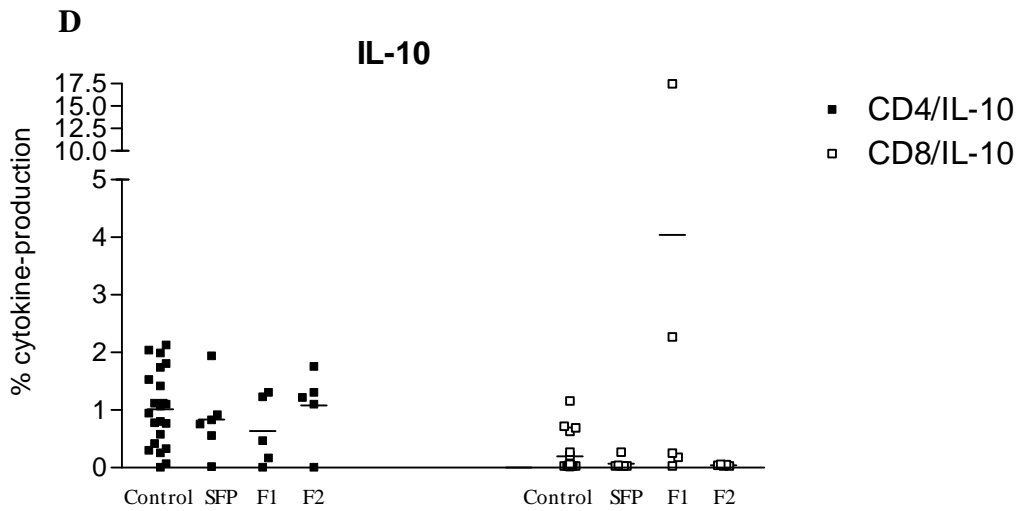
Fortsetzung **Abb. 22:**



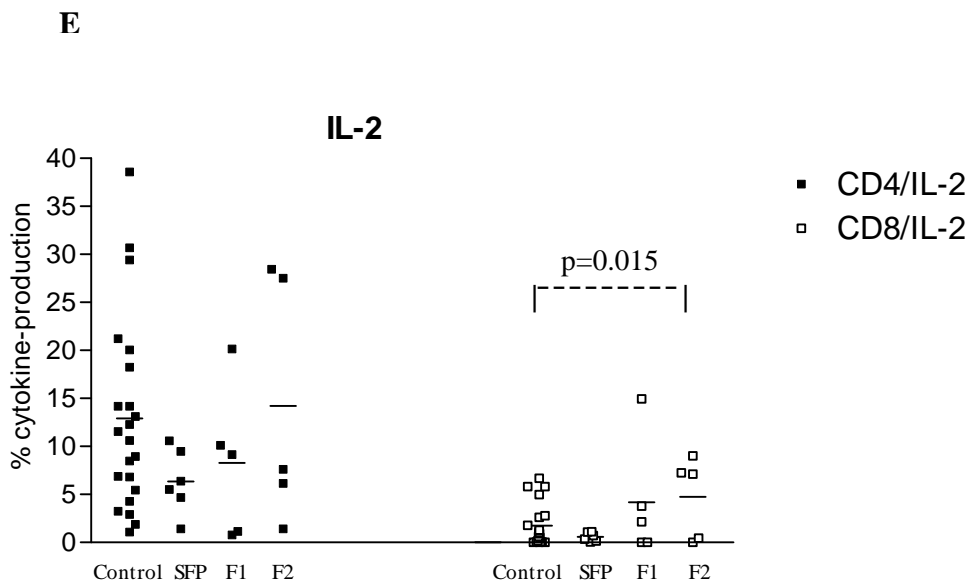
Erklärung: Intrazelluläre TNF-  $\alpha$  – Produktion in CD4+ und CD8+ - Zellen der 6 PFAPA- Kinder während und zwischen den Fieberschüben. Der prozentuale Anteil der TNF-  $\alpha$  - positiven Zellen ist als Mittelwert der Patienten und der Kontrollgruppe angegeben. Daten sind als Einzelwerte angegeben, horizontale Balken zeigen den Durchschnittswert jeder Gruppe.



Erklärung: Intrazelluläre IL-4– Produktion in CD4+ und CD8+ - Zellen der 6 PFAPA- Kinder während und zwischen den Fieberschüben. Der prozentuale Anteil der IL-4 - positiven Zellen ist als Mittelwert der Patienten und der Kontrollgruppe angegeben. Daten sind als Einzelwerte angegeben, horizontale Balken zeigen den Durchschnittswert jeder Gruppe.



Erklärung: Intrazelluläre IL-10 – Produktion in CD4+ und CD8+- Zellen der 6 PFAPA- Kinder während und zwischen den Fieberschüben. Der prozentuale Anteil der IL-10 - positiven Zellen ist als Mittelwert der Patienten und der Kontrollgruppe angegeben. Daten sind als Einzelwerte angegeben, horizontale Balken zeigen den Durchschnittswert jeder Gruppe.



Erklärung: Intrazelluläre IL-2 – Produktion in CD4+ und CD8+- Zellen der 6 PFAPA- Kinder während und zwischen den Fieberschüben. Der prozentuale Anteil der IL-2 - positiven Zellen ist als Mittelwert der Patienten und der Kontrollgruppe angegeben. Daten sind als Einzelwerte angegeben, horizontale Balken zeigen den Durchschnittswert jeder Gruppe.

## 5 Diskussion

Durch serielle Messungen wurde bei je drei FMF- und HIDS-, bei zwei TRAPS- und sechs PFAPA-Patienten eine Vielfalt wichtiger pro- und antiinflammatorischer Zytokine im Serum und deren lymphozytäre *ex vivo* Produktion im peripheren Blut bestimmt. Bei den sechs PFAPA-Kindern wurden zusätzlich die löslichen, antiinflammatorischen TNF- Rezeptoren p55 (sTNFRSF1A) und p75 (sTNFRSF1B) im Serum gemessen.

Eventuelle Fehler z.B. beim Pipettieren, Verunreinigungen der Geräte bzw. Reagenzgläser sind trotz sorgfältigster Arbeit nicht auszuschließen und potenzieren fehlerhafte Ergebnisse insbesondere bei kleinen Fallzahlen. Die Ergebnisse, vor allem der FMF-, HIDS-, und TRAPS-Kinder lassen daher lediglich die Erhebung möglicher Tendenzen ihrer Zytokinprofile zu, nicht zuletzt da nicht jedes Zytokin in jeder Erkrankungsphase messbar war.

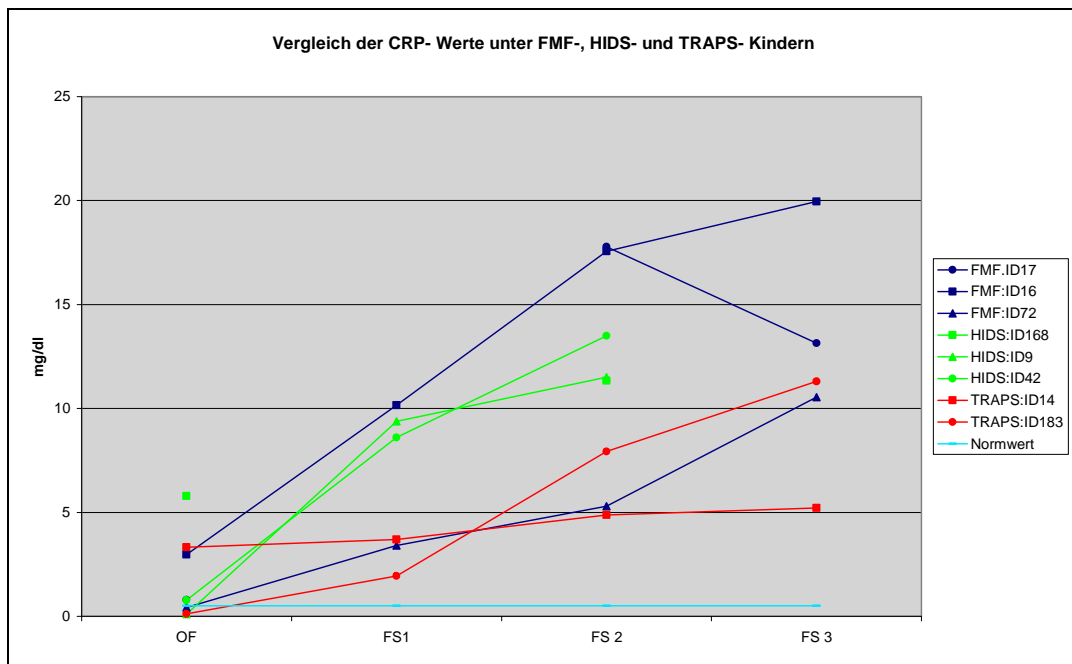
Die Zytokinmessungen wurden u.a. durchgeführt, um die Zytokinveränderungen der Kinder vergleichen zu können, mit der Frage, ob sich für jedes einzelne Syndrom ein spezielles Zytokinprofil erstellen lässt. Jedoch waren die Zytokinprofile individuell und sogar unter den beiden Geschwistern mit identischer FMF- Genetik, und den zwei HIDS- Kindern mit gleicher Mutation für die Bestimmungen im Serum, sowie in den Lymphozyten nicht immer identisch.

### 5.1 Akut- Phase- Reaktion, Amyloidoserisiko und IL-6

Die Messungen des Akut- Phase- Parameters CRP ergab sowohl für die drei hereditären PFS, als auch für die PFAPA- Kinder eine eindeutige Erhöhung während der Fieberschübe. **Abbildung 23** zeigt die gemessenen CRP- Werte der Kinder mit hereditärem PFS.

Zwei HIDS- Kinder (ID168, ID42), ein FMF- (ID16) und ein TRAPS- Kind (ID14) wiesen außerdem auch im fieberfreien Intervall erhöhte CRP- Werte auf. Diese Ergebnisse sind wichtig für die Prognose der Patienten, da erhöhte CRP- Konzentrationen, bedingt durch erhöhte Konzentrationen der proinflammatorischen Zytokine, zwischen den einzelnen Fieberschüben mit einem Amyloidoserisiko assoziiert sein können, wie sich bei FMF- und TRAPS- Kindern herausstellte [42].

Die Akut- Phase Parameter der PFAPA- Patienten hingegen normalisierten sich zwar während der symptomfreien Intervalle vollkommen, interessanterweise waren jedoch die Serumkonzentrationen der proinflammatorischen Zytokine **IL-1 $\beta$** , **IL-6**, **TNF- $\alpha$**  und **IL-12** im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht. Für PFAPA- Patienten ist bisher keine Amyloidose beschrieben worden. Eine mögliche Ursache hierfür ist, dass die Erkrankung und damit die rekurrente Entzündungsreaktion meist mit Eintritt des Erwachsenenalters zum Erliegen kommt. Außerdem ist es möglich, dass die Konzentrationen der proinflammatorischen Zytokine während der symptomfreien Phasen zu gering sind, um die Synthese, der mit dem Amyloidoserisiko assoziierten Akut- Phase- Parameter zu induzieren bzw. die zur Amyloidose führende Konzentration zu erreichen.

**Abb.23:**

Erklärung: Die Abbildung zeigt die CRP- Werte jedes einzelnen Patienten mit hereditärem Fiebersyndrom im fieberfreien Intervall und in den 3 Messungen im Fieberschub im Vergleich zum Normwert. Nicht dargestellte Werte sind nicht messbare Werte. OF= fieberfreies Intervall, FS1 = 6-12h nach Fieberbeginn, FS2 = 18-24h nach Fieberbeginn, FS3 = 24-30h nach Fieberbeginn, blau = FMF- Kinder, grün = HIDS- Kinder, rot = TRAPS- Kinder

Die CRP- Ausschüttung der Hepatozyten kann durch **IL-6** induziert werden [59].

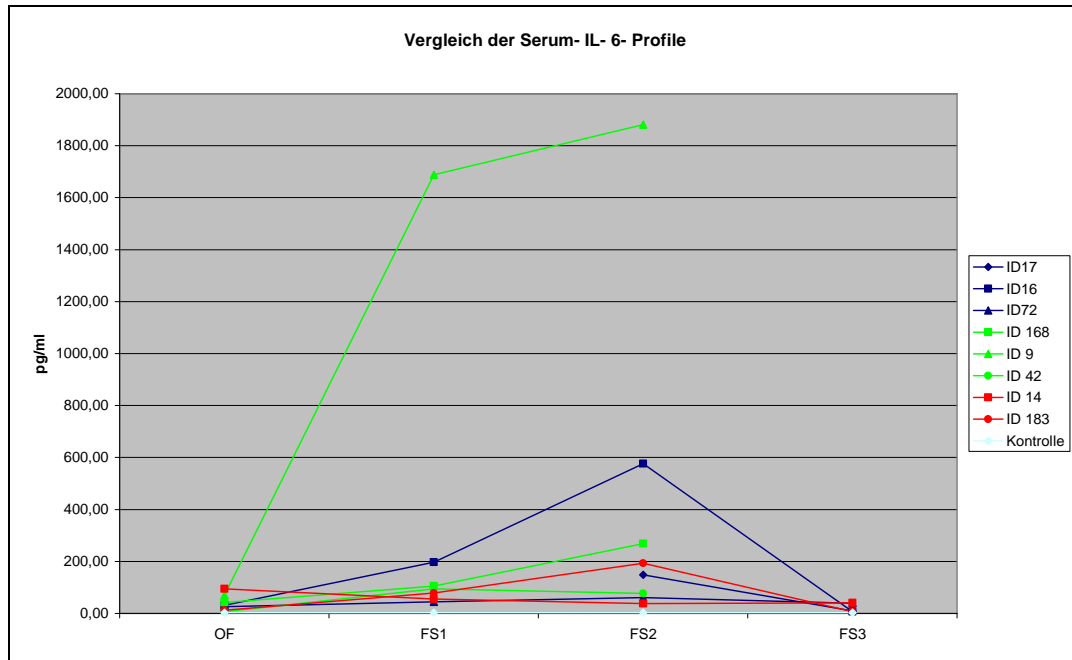
IL-6, auch bekannt als B- cell- stimulatory- factor-2 (BSF-2) oder Interferon- beta (IFN- $\beta$ ), ist ein potentes, pleiotropes Zytokin. Es ist ein wichtiger Regulator der Akut- Phase- Antwort auf Verletzungen und Infektion und wird v.a. von myeloiden Zellen sezerniert.

Erhöhte IL- 6 Werte sind für FMF [7], [8],[23],[39], HIDS, [27], [28], [29], [35], und TRAPS [72], [79] bereits beobachtet worden.

Übereinstimmend lagen die zirkulierenden **IL-6- Serumkonzentrationen** aller FMF-, HIDS, TRAPS- und PFAPA- Kinder sowohl im fieberfreien Intervall (OF), als auch bei den Messungen im Fieberschub über den Kontrollwerten (**Abb.24**). Bis auf ID14 zeigten alle Kinder eine im Vergleich zu OF erhöhte IL-6- Serumkonzentration in FS1, wie dies auch bei den CRP- Werten der Fall war. Betrachtet man jedoch im weiteren Verlauf die CRP- Werte der FMF-, HIDS- und TRAPS- Kinder und vergleicht sie mit dem der IL-6- Konzentrationen, so weichen 3 Kinder (ein FMF-, ein HIDS- und ein TRAPS- Kind) von der sonst stets bestehenden Zunahme zwischen FS2 und FS3 ab. Gesetzt den Fall, dass diese Abweichung nicht technisch bedingt ist, so zeigt der Verlauf, dass lediglich der CRP- Anstieg innerhalb der ersten 6-12h nach Fieberbeginn mit der IL-6- Konzentration begründet werden kann, d.h. dass IL- 6 zwar die CRP- Ausschüttung initiiert, jedoch im weiteren Verlauf keine direkt ersichtliche Wirkung hat, obwohl beide Parameter in allen Messungen erhöht sind. Zudem ist anzumerken, dass besonders die IL-6- Erhöhung bei den

Patienten ID73, ID42 und ID183 nur sehr geringe Abweichungen zu den Kontrollwerten und im Verlauf zeigten, was technisch bedingt sein kann oder eine pathologische Ausschüttung in Frage stellen lässt.

**Abb. 24:**



Erklärung: Die Abbildung zeigt die Serum- IL-6- Konzentrationen jedes einzelnen Patienten mit hereditärem Fiebersyndrom im fieberfreien Intervall und in den 3 Messungen im Fieberschub im Vergleich zum Kontrollwert. Nicht dargestellte Werte sind nicht messbare Werte. OF= fieberfreies Intervall, FS1 = 6-12h nach Fieberbeginn, FS2 = 18-24h nach Fieberbeginn, FS3 = 24-30h nach Fieberbeginn, blau = FMF- Kinder, grün = HIDS- Kinder, rot = TRAPS- Kinder

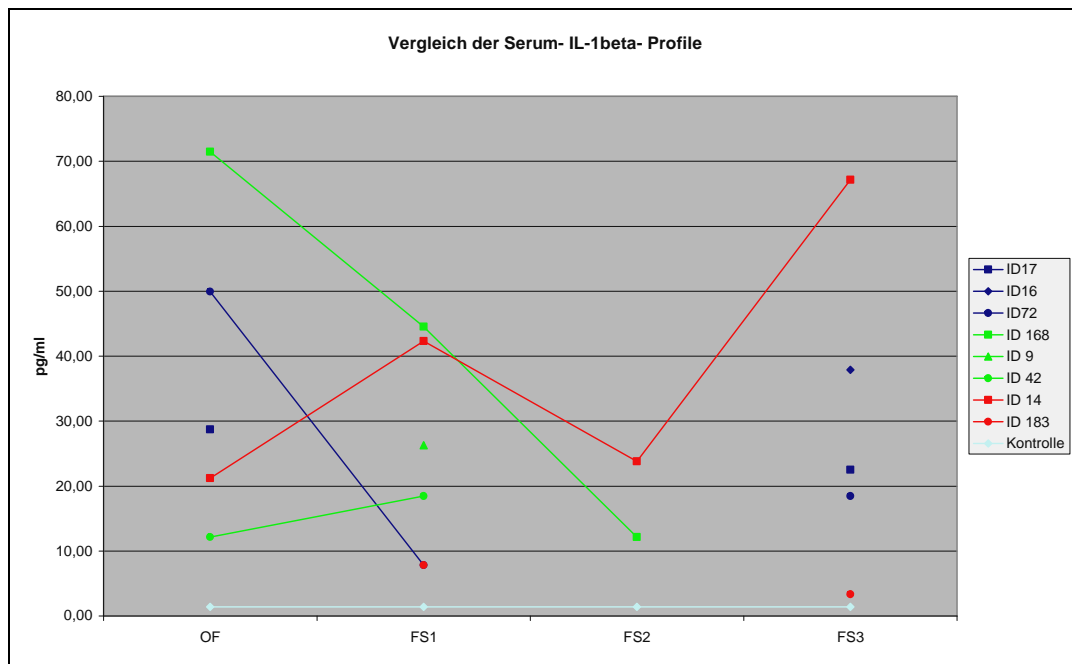
## 5.2 Fieber: IL-1 $\beta$ und TNF- $\alpha$

Das Symptom Fieber wird innerhalb weniger Minuten durch die intrinsisch- pyrogenen Zytokine wie z.B. IL-1 $\beta$  und TNF-  $\alpha$  induziert.

**IL-1 $\beta$**  ist ein hochaktives Zytokin, das wichtigste Pyrogen und Schlüsselmediator der Entzündung, welches u.a. von Makrophagen/Monozyten sezerniert wird. **IL-1 $\beta$**  induziert die Prostaglandin-Synthese mit nachfolgender Fieberinduktion, aktiviert T- Lymphozyten und steigert die Expression von Adhäsionsmolekülen auf endothelialen Zellen [22].

**Abbildung 25** zeigt die IL-1 $\beta$ - Serumkonzentrationen der 3 hereditären PFS im Vergleich untereinander und zu den Kontrollen. Dabei fielen die bei allen Kindern im Vergleich zu den Kontrollen stets erhöhten Werte auf, sei es im fieberfreien Intervall, als auch im Fieberschub. Auch die PFAPA- Kinder wiesen eine leichte, jedoch signifikante Erhöhung in OF und in den Messungen im Fieber auf. HIDS- Studien demonstrierten auch eine erhöhte lymphozytäre *ex vivo* Produktion des IL-1 $\beta$  [28], [29], [36].

Abb. 25:



Erklärung: Die Abbildung zeigt die Serum- IL-1 $\beta$ - Werte jedes einzelnen Patienten mit hereditärem Fiebersyndrom im fieberfreien Intervall und in den 3 Messungen im Fieberschub im Vergleich zum Kontrollwert. Nicht dargestellte Werte sind nicht bestimmbare Werte. OF= fieberfreies Intervall, FS1 = 6-12h nach Fieberbeginn, FS2 = 18-24h nach Fieberbeginn, FS3 = 24-30h nach Fieberbeginn, blau = FMF- Kinder, grün = HIDS- Kinder, rot = TRAPS- Kinder

IL-1 $\beta$  gehört mit IL-1 $\alpha$  und IL-1- Rezeptorantagonist (IL- 1RA) zur Interleukin-1 Familie. IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  werden als Vorläuferproteine synthetisiert. Durch Spaltung des ca. 115 Aminosäuren langen Propeptids entsteht das biologisch aktive Carboxy- Fragment, was für IL-1 $\beta$  notwendig ist, da das 31-kD Vorläuferprotein (pro-IL-1 $\beta$ ) inaktiv ist. Die Abspaltung geschieht durch das Enzym Caspase-1, welches ebenfalls zunächst als inaktives Vorläuferprotein (pro-caspase- 1) produziert und durch so genannte Inflammasome aktiviert wird. Dabei handelt es sich um zytosolische Multiproteinkomplexe, die sich nach Triggern bestimmter NOD- LRR- Proteine bilden [67]. NOD- LRR Proteine tragen unter anderem diese Bezeichnung aufgrund des stets gleichen N- terminalen Endes dieser Proteinfamilie, die entscheidend an der Regulation der Immunantwort beteiligt zu sein scheint [105]. Bei einigen dieser NOD- LRR- Proteine wurde gezeigt, dass sie Teil eines intrazellulären Pathogen- Sensor- Systems des angeborenen Immunsystems sind [105].

Das gebildete Inflammasom besteht aus einem NOD- LRR- Protein, als Sensor, einem oder mehreren Adapterproteinen und einem oder mehreren Effektorproteinen in Form von inflammatorischen Caspasen [70], [89], [99]. Ein Adaptermolekül ist das ASC (apoptosis-associated specklike protein with a CARD), welches aus einer Pyrin und einer CARD- Domäne besteht. Jede dieser Domänen interagiert mit Domänen des gleichen Typs.



Das Inflammasom NALP3 verbindet 2 inaktive pro- Caspase- 1- Moleküle zu aktivierter Caspase- 1, welches dann IL-1 $\beta$  aktiviert [1], [67], [68].

Die erhöhten IL-1 $\beta$ - Konzentrationen der **FMF**- Kinder könnten durch die so genannte Sequestrations- Hypothese erklärt werden, die besagt, dass Pyrin durch kompetitive Bindung an die Pyrin- Domäne des ASC und Caspase-1 eine inhibierende Wirkung auf die Caspase-1- vermittelte IL-1 $\beta$ - Aktivierung hat. Chae et al zeigten in einem Mausmodell anhand einer gekürzten Pyrinvariante und transfizierten Zelllinien, einen inhibitorischen Effekt des Pyrins auf die Bildung IL-1 $\beta$ . Als Ursache gaben sie eine Inhibition der Bildung des Inflammasoms NALP3 durch Pyrin an [14]. In einem Transfektionsmodell wurde zudem gezeigt, dass Pyrin ASC- unabhängig durch seine B30.2/rfp/SPRY- Domäne sowohl die inaktivierte, als auch die aktivierte Caspase-1 direkt binden und dadurch die Aktivierung des IL-1 $\beta$  inhibieren kann. Außerdem war in Pyrin Knockdown- Versuchen, eine erhöhte IL-1 $\beta$ - Sekretion zu beobachten [15]. Mit der Pyrin- Inflammasom- Hypothese hingegen wird behauptet, dass Pyrin auch direkt an Inflammasomkomplexe binden und dadurch die Caspase-1 aktivieren kann [113]. Demnach würde das bei FMF mutationsbedingt veränderte Pyrin/ Marenostin auf den verschiedenen beschriebenen Wegen den inhibierenden Effekt auf die Aktivierung der Caspase-1 verlieren und zu einer überschiessenden Immunantwort führen, die u.a. die Aktivierung des IL-1 $\beta$  zur Folge hat. Dass IL-1 $\beta$  eine pathogenetisch wichtige Rolle bei FMF spielt wird zudem von der Tatsache untermauert, dass der IL-1RA Anakinra einen positiven therapeutischen Effekt hat[15].

Die höchste IL-1 $\beta$ - Konzentration befindet sich im Zytosol, wovon sich ein geringer Anteil in spezialisierte sekretorische Lysosome absondert. Wie IL-1 $\beta$  sezerniert wird ist noch nicht gänzlich geklärt. Durch die Bindung des IL-1 $\beta$  an den extrazellulären IL-1-Rezeptoranteil, wird via Phosphorylierung der Transkriptionsfaktor Nuklear- Faktor  $\kappa$ B im Zellinneren aktiviert, der auf Transkriptionsebene die Expression proinflammatorischer Gene reguliert. Zudem ist ASC nicht nur an der Aktivierung der pro- Caspase-1, sondern auch an der des NF- $\kappa$ B beteiligt [44].

Es wurde gezeigt, dass nicht nur Fehler im IL-1-Prozessing, sondern auch in der Regulation des Nuklear- Faktors  $\kappa$ B, im Zusammenhang mit der Pathogenese der hereditären PFS stehen [33], [38], [74]. Die Wirkung des Pyrin auf die NF-kappaB- Regulation ist noch nicht geklärt. Für die FMF- Patienten wurde der Effekt des Pyrin auf die NF- $\kappa$ B- Regulation untersucht, mit dem Ergebnis, dass dieses Protein sowohl inhibierend, als auch völlig wirkungslos sein kann [24], [71], [100], [113].

Die bei den **HIDS**- Patienten auf 1-10% der Norm reduzierte Aktivität der MVK scheint sich mit Temperaturzunahme weiter zu vermindern [47]. Mit der Mevalonsäurekonzentration im Urin, welche im Fieberschub auf maximale Werte steigt, nimmt auch die Aktivität der HMG- CoA-

Reduktase, zu [45], [57], [96]. Studien mit Statinen wiesen sowohl pro-, als auch antiinflammatorische Wirkungen nach, wobei der bemerkenswerteste proinflammatorische Effekt der kompetitiven HMG- CoA- Inhibitoren eine Erhöhung der Caspase-1- Aktivierung und der IL-1 $\beta$ - Sekretion in Monozyten, nach Stimulation mit *Mycobacterium tuberculosis* oder Mitogenen unter Abnahme des Geranylgeraniols war [17], [35], [76], [77]. Zudem wurde gezeigt, dass der Effekt des HMG-CoA- Reduktase- Hemmers, die IL-1 $\beta$ - Sekretion zu erhöhen, durch Mevalonat, Geranyl und Farnesol, vermindert wird, während Mevalonat allein keinen Einfluss auf die IL-1 $\beta$ - Sekretion zeigte [35].

Geranyl und Farnesol sind Isoprenyl- Endprodukte, die sich im Zuge der Isoprenylierung posttranslational an bestimmte Proteine binden. Eine Hypothese besagt, dass ein beispielsweise durch eine Impfung ausgelöstes Fieber die MVK- Aktivität vermindert, was zu einem transienten Konzentrationsabfall der Isoprenyl- Endprodukte führt, was wiederum die HMG- CoA- Reduktase hochreguliert und damit die Konzentration der Mevalonsäure zunimmt.

Unter Abnahme der Isoprenyl- Endprodukte scheinen folglich sowohl die HMG- CoA- Reduktase- Aktivität, als auch die des IL-1 $\beta$  induziert zu werden, was die bei den HIDS- Kindern stets erhöhten IL- 1 $\beta$ - Werte im Serum und den nachgewiesenen positiven Effekt der der IL-1RAs begründen würde[11].

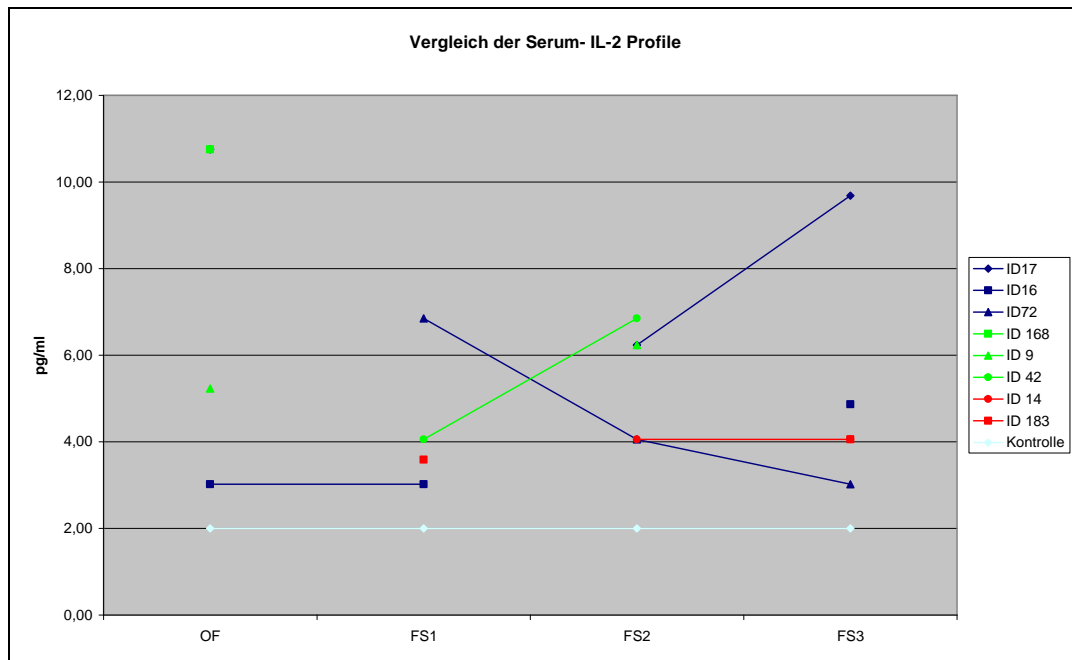
IL-1 $\beta$  bewirkt außerdem, neben Fieberinduktion und Neutrophilie, eine erhöhte IL-6- Serumkonzentration [21], [59]. Dementsprechend wurden bei allen Kindern in allen Messungen, d.h. auch im fieberfreien Intervall, im Vergleich zu den Kontrollen neben den erhöhten IL-1 $\beta$ , auch erhöhte IL-6- Serumkonzentrationen gemessen (siehe 5.1) (**Abb.24**).

Die im Serum gemessenen **IL-2**- Konzentrationen der FMF-, HIDS-, TRAPS- und PFAPA- Kinder waren ebenfalls in jeder Phase, d.h. mit und ohne Fieber erhöht (**Abb.26**). Die IL-2- Produktion wird u.a. ebenfalls von IL- 1 $\beta$  induziert [22].

Eine weitere Auffälligkeit war, dass trotz der im Vergleich zu den Kontrollen stets erhöhten IL-1 $\beta$  Serumkonzentrationen, sowohl bei den Messungen der 14 Kinder, mit Ausnahme von ID14 und ID 42, als auch bei erwachsenen FMF- Patienten [39], kein Anstieg des IL-1 $\beta$  im akuten Schub beobachtbar war, was man aufgrund des Fieberbeginns annehmen würde.

Die kontinuierliche Erhöhung des zirkulierenden IL-1 $\beta$  mit gleichzeitig stets erhöhten IL-6- und IL-2- Werten im Serum bei den FMF-, HIDS-, TRAPS- und PFAPA- Kinder, sowie der fehlende IL-1 $\beta$ - Anstieg im Fieberschub lassen vermuten, dass ein fehlreguliertes IL-1 $\beta$ - Processing nicht nur in der Pathogenese der hereditären PFS- Patienten, sondern auch beim PFAPA- Syndrom eine entscheidende Rolle spielen könnte.

Abb. 26:

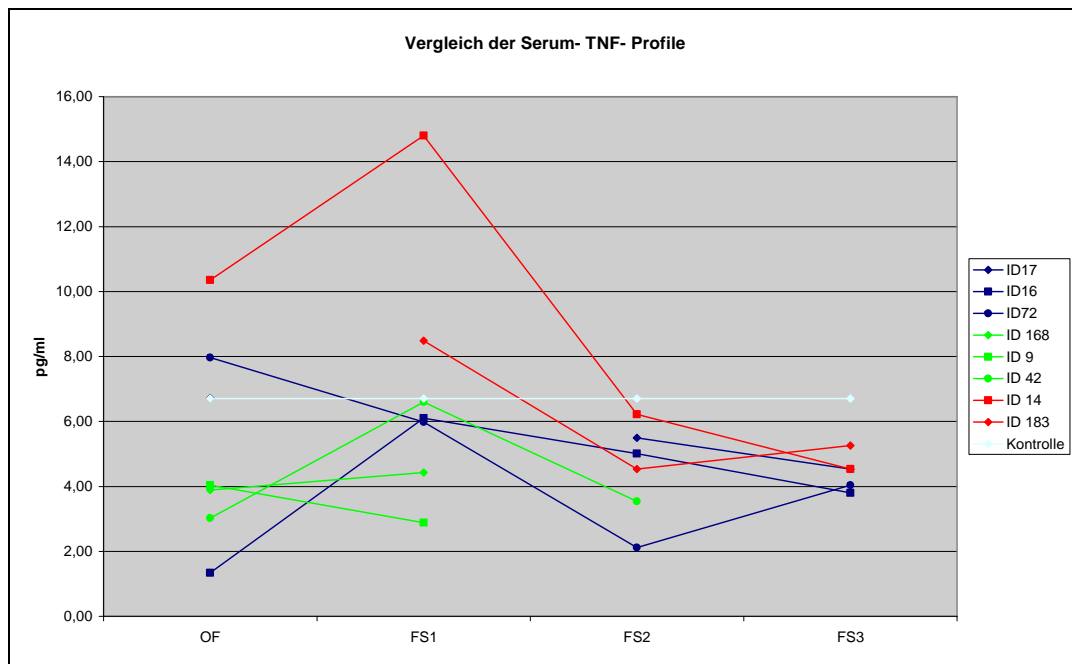


Erklärung: Die Abbildung zeigt die Serum- IL-2- Werte jedes einzelnen Patienten mit hereditärem Fiebersyndrom im fieberfreien Intervall und in den 3 Messungen im Fieberschub im Vergleich zum Kontrollwert. Nicht dargestellte Werte sind nicht bestimmbare Werte. OF= fieberfreies Intervall, FS1 = 6-12h nach Fieberbeginn, FS2 = 18-24h nach Fieberbeginn, FS3 = 24-30h nach Fieberbeginn, blau = FMF- Kinder, grün = HIDS- Kinder, rot = TRAPS- Kinder

Unter den hereditären PFS waren keine Gemeinsamkeiten bzgl. des IL-1 $\beta$ - Verlaufs nachweisbar, was damit begründet werden könnte, dass die IL-1 $\beta$ - Erhöhung bei den PFS unterschiedliche Ursachen hat und dass die Zytokinausschüttung tageszeitlichen Schwankungen unterliegt. Jedoch ist zu vermerken, dass viele IL-1 $\beta$ - Werte nicht bestimmbar waren und, dass sich das Zytokin IL-1 $\beta$  vorwiegend im Zytosol konzentriert, im Serum jedoch meist nicht messbar ist [3], d.h. die gemessenen erhöhten Konzentrationen könnten hier auch technisch begründbar sein.

Das proinflammatorische Zytokin **TNF-  $\alpha$**  gehört zur Tumor- Nekrose Faktor- Superfamilie und ist ein endogenes Pyrogen, welches von Makrophagen/ Monozyten, Lymphozyten und Mastzellen gebildet wird. Bemerkenswert ist daher, dass es während der Fieberphasen im Serum nur bei den TRAPS- Kindern in der FS1- Messung und bei den PFAPA- Kindern, jedoch weder bei den FMF- Patienten, noch bei den HIDS- Kindern im Vergleich zu den Kontrollen erhöht war. Außerdem zeigten alle Kinder mit hereditärem PFS eine Konzentrationsabnahme zwischen FS1 und FS2. Auch die Konzentrationen in OF waren bis auf die Werte von ID14 und ID72 unterhalb der Kontrollen messbar (**Abb. 27**). Übereinstimmend mit den Werten bei den Kindern, war bei erwachsenen FMF- Patienten **TNF-  $\alpha$**  im Serum während der akuten Phase ebenfalls nicht erhöht [39].

Abb. 27:



Erklärung: Die Abbildung zeigt die Serum- TNF- $\alpha$ - Werte jedes einzelnen Patienten mit hereditärem Fiebersyndrom im fieberfreien Intervall und in den 3 Messungen im Fieberschub im Vergleich zum Kontrollwert. Nicht dargestellte Werte sind nicht bestimmbare Werte. OF= fieberfreies Intervall, FS1 = 6-12h nach Fieberbeginn, FS2 = 18-24h nach Fieberbeginn, FS3 = 24-30h nach Fieberbeginn, blau = FMF- Kinder, grün = HIDS- Kinder, rot = TRAPS- Kinder

Eine Erklärung für die nicht erhöhten Konzentrationen des TNF-  $\alpha$  bei den FMF- und HIDS- und Kindern im Serum während der Fieberschübe könnte die kurze Halbwertszeit von 6 min sein [35]. Obwohl versucht wurde die Blutabnahmen möglichst früh nach Fieberbeginn durchzuführen, ist die relevante Zeitspanne möglicherweise überschritten worden.

Eine weitere Ursache könnte die mögliche Bindung des Zytokins an seine löslichen Rezeptoren, dem hochaffinen sTNFR p55 und dem sTNFR p75 mit geringerer Affinität sein, welche auch noch Stunden nach TNF- Abbau im Blut messbar sind [88].

Diese Hypothese stimmt mit der Beobachtung überein, dass bei erwachsenen FMF- Patienten während der akuten Phase sTNFR p55 und sTNFR p75 signifikant anstiegen [39] und auch Messungen an HIDS- Patienten ergaben signifikant erhöhte Konzentrationen der antiinflammatorisch wirkenden löslichen Rezeptoren sTNFR p55 und sTNFR p75 und wiesen eine Korrelation untereinander auf [54].

Die TRAPS- Kinder hingegen wiesen in FS1 im Vergleich zu den Kontrollen und den anderen PFS erhöhte **TNF-  $\alpha$** - Werte auf, die dann im weiteren Verlauf erstmals bei der Messung FS2, 18-24 Stunden nach Fieberbeginn, ebenfalls unterhalb die Kontrollwerte sanken. Ursache für die erhöhten TNF- $\alpha$ - Serumwerte könnte sowohl die Beobachtung, dass bei TRAPS- Patienten aufgrund der mutationsbedingt veränderten TNFR1- Molekülstruktur weniger TNF- Rezeptoren an

der Zelloberfläche exprimiert werden [51], [94], als auch der mit TRAPS assoziierte Shedding-Defekt sein. Beides hätte zur Folge, dass weniger lösliche TNF- Rezeptoren abgespalten werden können, die normalerweise an TNF- $\alpha$  binden und dadurch inhibitorisch auf TNF- $\alpha$  wirken würden. Zudem wurde gezeigt, dass mutierte lösliche TNF- Rezeptoren eine geringere Affinität zu TNF-  $\alpha$  aufweisen [107]. Dies alles hätte zur Folge, dass die messbare TNF-  $\alpha$  - Konzentration erhöht, bzw. TNF-  $\alpha$  im Blut länger nachweisbar wäre.

Die vermehrte Retention des veränderten TNFR1- in Neutrophilen, eine verminderte Expression des Rezeptors an der Zellwand, sowie eine Verringerung des löslichen Rezeptors sind u.a. mutationsabhängig [106]. Physiologischerweise kann die extrazelluläre, nicht abgespaltene TNFR1- Domäne ebenfalls TNF-  $\alpha$  binden und somit über die trans- und intrazelluläre Domäne die Bildung eines Proteinkomplexes vermitteln, der zur NF- kappaB- Aktivierung führt. Die veränderte Bindungskapazität des mutierten TNFR1 hat eine verminderte NF- $\kappa$ B- Aktivierung zur Folge [93], [94].

Bei den PFAPA- Kindern waren die TNF-  $\alpha$ - Serumkonzentrationen im akuten Fieberschub signifikant erhöht bei gleichzeitig im Vergleich zu den Kontrollen unveränderten intrazellulären TNF- $\alpha$  – Konzentrationen. Jedoch waren die Konzentrationen des löslichen Rezeptors sTNFRp55 im fieberfreien Intervall sogar signifikant vermindert und erreichten mit den Kontrollen vergleichbare Werte nur während des Fieberschubes. Obwohl Lymphozyten nicht die Hauptquelle des TNF- $\alpha$  sind, was eine Erklärung für den in keiner Phase zu beobachtenden Anstieg der intrazellulären *ex vivo* Produktion dieser Zellen bei den PFAPA- Kindern sein könnte, sprechen die Ergebnisse der Serumkonzentrationen dafür, dass TNF- $\alpha$  keine entscheidende Rolle in der Rolle Pathogenese des PFAPA- Syndroms spielt [101].

Auffällig waren auch die bei den FMF-, HIDS-, TRAPS- und PFAPA- Kindern erhöht gemessenen lymphozytären TNF- $\alpha$ - Ausschüttungen nach Stimulation: Bei den hereditären Fiebersyndromen waren die im Fieberschub gemessenen Konzentrationen der CD4+- Zellen mit Ausnahme von ID42 in FS1 und ID168 in FS2- und der CD8+- Zellen mit Ausnahme von ID72 und ID183 in FS2 im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht (**Abb.28**). Im fieberfreien Intervall lagen alle TNF- $\alpha$ - Konzentrationen der CD4+- Zellen mit Ausnahme von ID72 über den Kontrollwerten.

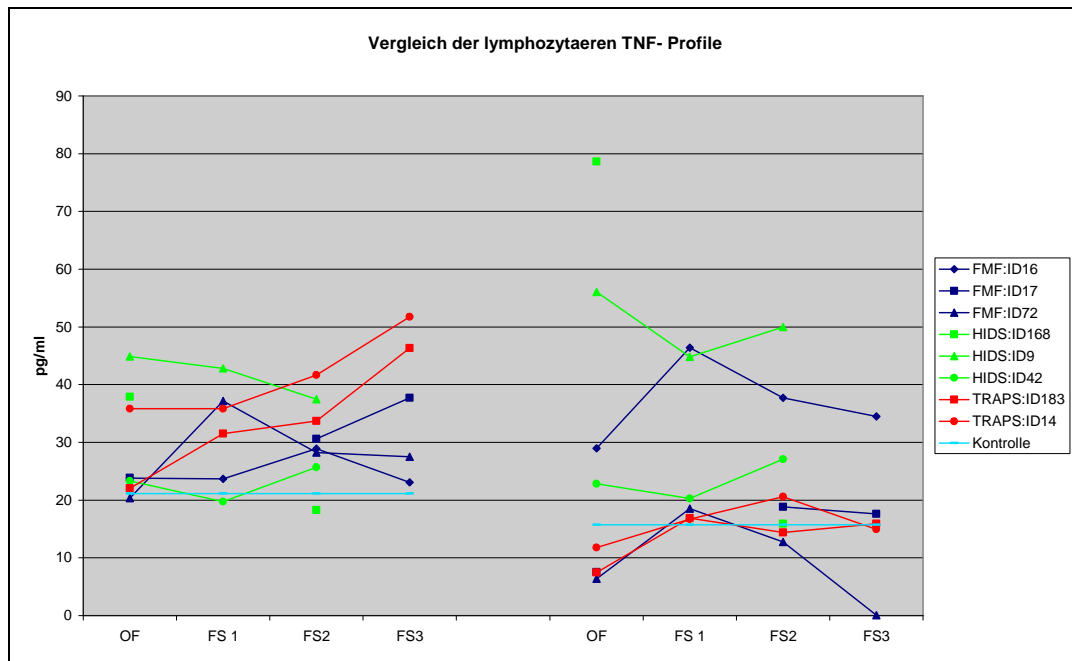
Bei den PFAPA- Kindern war die TNF- $\alpha$ - Ausschüttung vor allem der CD8+- Zellen in jeder Phase der Erkrankung verglichen mit der Kontrollgruppe vermehrt.

Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass bei diesen PFS- Kindern mononukleäre Zellen bereits *in vivo* programmiert sind, erhöhte Mengen dieses Zytokins zu produzieren.

Die Ursache der intrazellulär im Vergleich zu den im Serum erhöht gemessenen TNF- $\alpha$ - Konzentrationen könnte ein verändertes TNF-  $\alpha$ - Processing und/ oder eine reduzierte bzw. fehlende TNF-  $\alpha$ - Sekretion sein. Demnach ist dieses intrazellulär erhöhte TNF- $\alpha$ , welches, wie IL-

IL-1 $\beta$  in der Lage ist NF- $\kappa$ B zu aktivieren, möglicherweise ein weiterer entscheidender Faktor in der Pathogenese der Fiebersyndrome.

**Abb. 28:**



Erklärung: Die Abbildung zeigt links die lymphozytären TNF- $\alpha$ -Konzentrationen der CD4+- und rechts der CD8+-Zellen- jedes einzelnen Patienten mit hereditärem Fiebersyndrom im fieberfreien Intervall und in den 3 Messungen im Fieberschub im Vergleich zum Kontrollwert. Nicht dargestellte Werte sind nicht bestimmbare Werte. OF= fieberfreies Intervall, FS1 = 6-12h nach Fieberbeginn, FS2 = 18-24h nach Fieberbeginn, FS3 = 24-30h nach Fieberbeginn, blau = FMF- Kinder, grün = HIDS- Kinder, rot = TRAPS- Kinder

Bei TRAPS- Patienten zeigten intrazelluläre Beobachtungen neben der vermehrten TNFR1-Retention in Leukozyten, dass sich das mutierte TNF- Rezeptorprotein aufgrund der veränderten Molekülstruktur, nicht wie unter physiologischen Bedingungen im Golgi-Apparat, sondern im endoplasmatischen Retikulum ansammelt [63], [107] und dass sich Aggregate der mutierten TNFR1 im Zytoplasma bilden. So entstand neben dem Shedding-Defekt eine weitere Hypothese, die besagt, dass entweder die zytoplasmatischen Aggregate zu einer liganden-unabhängigen Signalwirkung führen [107] oder dass das, im endoplasmatischen Retikulum angehäufte, veränderte Protein eine überschüssige Reaktion zur Folge hat, die eine Induktion der Zytokine wie IL-1 $\beta$  nach sich zieht [63]. Laut dieser Hypothese wäre bei TRAPS das mutierte TNFR1 die Ursache der erhöhten IL-1 $\beta$ -Konzentrationen. Dass IL-1 $\beta$  beim TRAPS- Syndrom pathogenetisch von großer Bedeutung ist, wird zudem bestätigt durch die Tatsache, dass die Antagonisierung des IL-1 $\beta$  mit dem IL-1RA- Anakinra sogar wirkungsvoller ist, als die des TNF- $\alpha$  [95].

Zudem hat **IL-6** u. a. einen suppressiven Effekt auf die TNF-  $\alpha$ - Produktion [92], [104].

Zieht man nochmals die Ergebnisse der IL- 6- Messungen der FMF- und HIDS- Kinder heran (**Abb.24**), die zu allen Messzeitpunkten im Vergleich zu den Kontrollen erhöht waren, so könnten diese die in allen Messungen erniedrigten TNF-  $\alpha$ - Serumkonzentrationen (mit Ausnahme von ID72 in OF) verursacht haben. Da IL-6 durch IL-1 $\beta$  induziert wird, könnte die eigentliche Ursache der erniedrigten TNF-  $\alpha$ - Konzentrationen auch hier bei den stets erhöhten IL-1 $\beta$ - Werten liegen. Dagegen sprechen die intrazellulär erhöht gemessenen TNF-  $\alpha$ - Konzentrationen, die jedoch nicht unbedingt auf eine normale bzw. erhöhte TNF- Produktion schließen lassen, sondern auch Folge einer inhibierten Ausschüttung sein könnten.

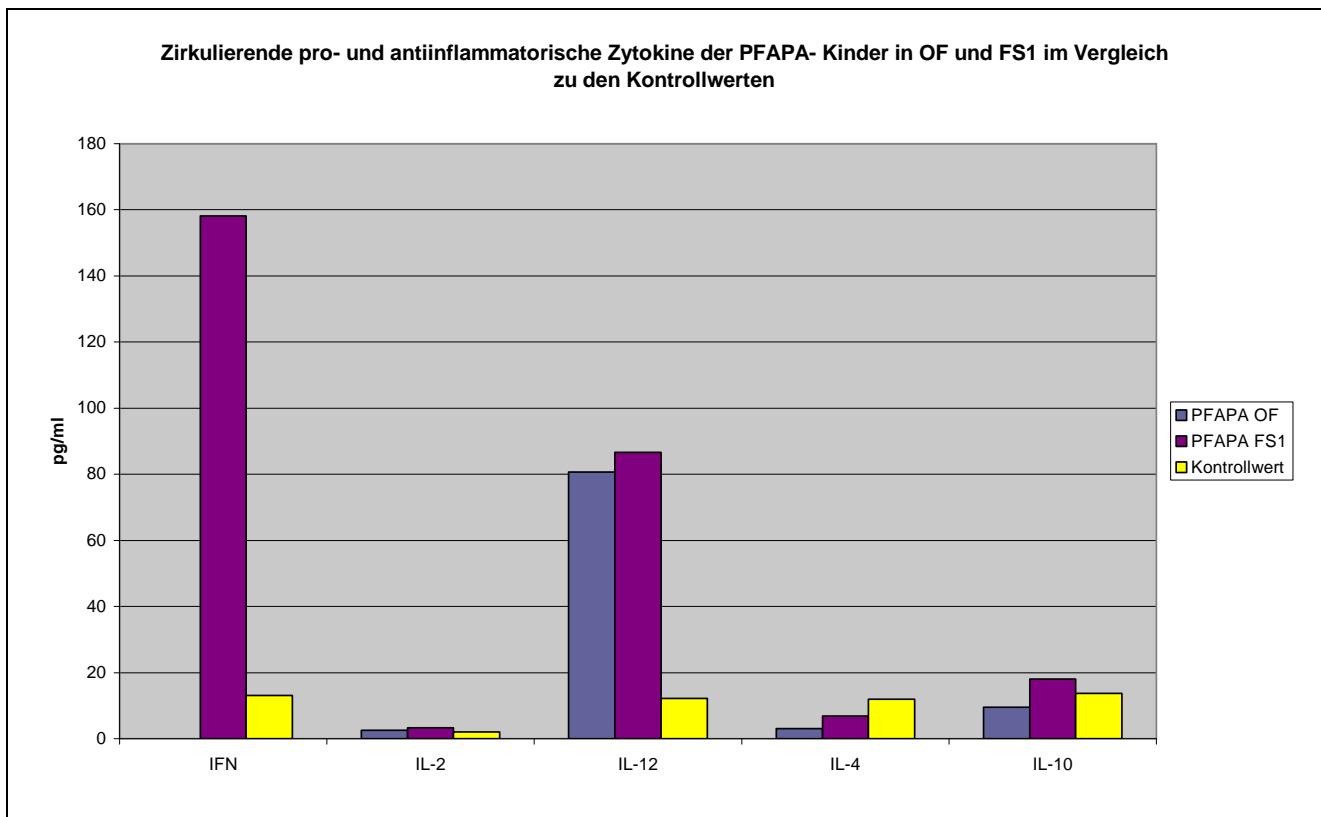
### 5.3 TH1-/ TH2- Gleichgewicht

Bei der erworbenen zellulären Immunantwort wird die TH1- von der TH2- Reaktion unterschieden. Während die TH1- Reaktion vorwiegend zur Sekretion von IFN- $\gamma$ , IL-2 und IL-12 führt und hauptsächlich bei Autoimmunerkrankungen dominiert, findet sich bei allergischen und parasitären Erkrankungen ein vorherrschendes TH2- Zytokinprofil im Sinne eines Konzentrationsanstiegs der Zytokine IL-4,IL-10, IL-5, IL-6, IL-9, IL-13. In der frühen Phase der Immunantwort induziert IL-12 u.a. T-Zellen zur IFN- $\gamma$ - Produktion, was nicht nur eine TH1- Polarisierung, sondern auch eine Deletion der IL-4- Zellen und damit eine Inhibierung der TH2- Antwort zur Folge hat [32].

IFN- $\gamma$  ist ein Einzelpeptid bestehend aus 148 Aminosäuren, dessen Gen sich auf Chromosom 12 befindet und vorwiegend von CD8+- Lymphozyten und NK- Zellen produziert wird [32].

Die PFAPA- Kinder wiesen in den ersten 6-12h nach Fieberbeginn eine drastische IFN- $\gamma$ - Erhöhung im Serum auf, welche zusätzlich von einer erhöhten lymphozytären IFN- $\gamma$ - Produktion und 18-24h nach Fieberschubbeginn von einer vermehrten IL-2- Produktion in CD8+- Zellen begleitet wurde, was auf eine TH1- Aktivierung hinweist [101] .

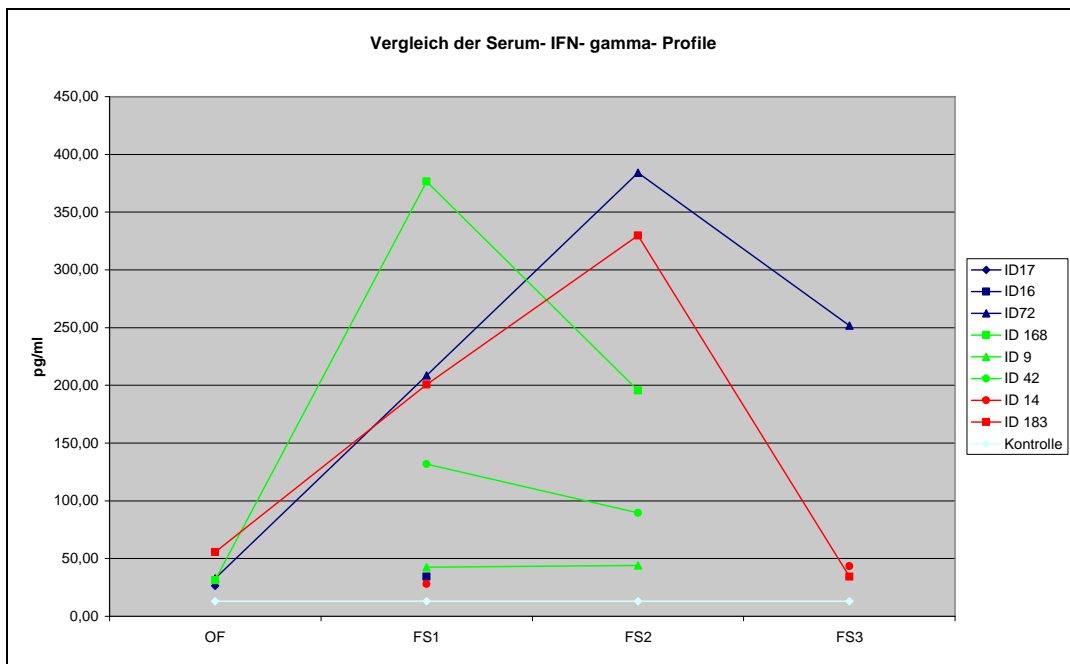
Außerdem waren bei den PFAPA- Kindern neben der IFN- $\gamma$ - Erhöhung im akuten Schub und den kaum messbaren zirkulierenden IL-4- Konzentrationen, nach Stimulation kein intrazellulärer IL-4- Anstieg zu beobachten. Zudem waren, der TH1- Theorie entsprechend, die IL-12- Konzentrationen im Fieberschub im Vergleich zu den Kontrollen stets erhöht und es fehlte bei den PFAPA- Kindern ein Anstieg des antiinflammatorischen **IL-10**, sowohl im Serum, als auch intrazellulär nach *ex vivo* Stimulation der Lymphozyten (**Abb.29**). Jedoch ist zu beachten, dass auch andere Zellen wie NK- Zellen IFN- $\gamma$  produzieren, d.h. die im Serum drastisch erhöhte Serumkonzentration des IFN- $\gamma$  muss nicht bedingt sein durch eine Aktivierung der erworbenen Immunität.

**Abb.29:**

Bei den hereditären PFS konnte im akuten Schub für das zirkulierende IFN- $\gamma$  sowohl bei einem FMF- (ID72), einem HIDS- (ID168) und einem TRAPS- Kind (ID183) eine drastische IFN- $\gamma$ -Erhöhung im Serum innerhalb der ersten 6-12h nach Fieberbeginn nachgewiesen werden und alle im Fieber gemessenen Werte lagen über denen der Kontrollen (**Abb.30**). Erhöhte IFN- $\gamma$ -Serumkonzentrationen wurden ebenfalls für erwachsene HIDS- Patienten [8], [28] beschrieben. Gleichzeitig nahm auch die intrazelluläre IFN- $\gamma$ -Produktion der CD8 $^{+}$ -Zellen für alle Kinder mit hereditären autoinflammatorischen Syndromen (mit Ausnahme von ID42) zu und sowohl die IFN- $\gamma$ -Produktion der CD4 $^{+}$ -, als auch der CD8 $^{+}$ -Zellen (außer ID183 und ID72) war im Vergleich zu den Kontrollen erhöht (**Abb.31**).

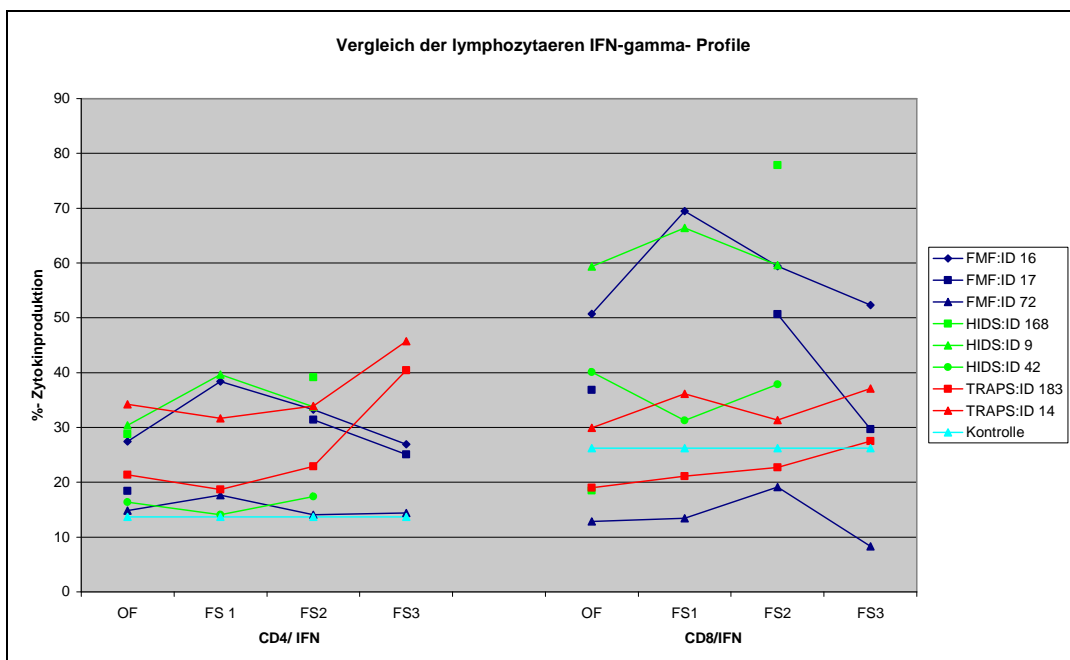


Abb.30:



Erklärung: Die Abbildung zeigt die Serum- IFN- $\gamma$ - Werte jedes einzelnen Patienten mit hereditärem Fiebersyndrom im fieberfreien Intervall und in den 3 Messungen im Fieberschub im Vergleich zum Kontrollwert. Nicht dargestellte Werte sind nicht bestimmbare Werte. OF= fieberfreies Intervall, FS1 = 6-12h nach Fieberbeginn, FS2 = 18-24h nach Fieberbeginn, FS3 = 24-30h nach Fieberbeginn, blau = FMF- Kinder, grün = HIDS- Kinder, rot = TRAPS- Kinder.

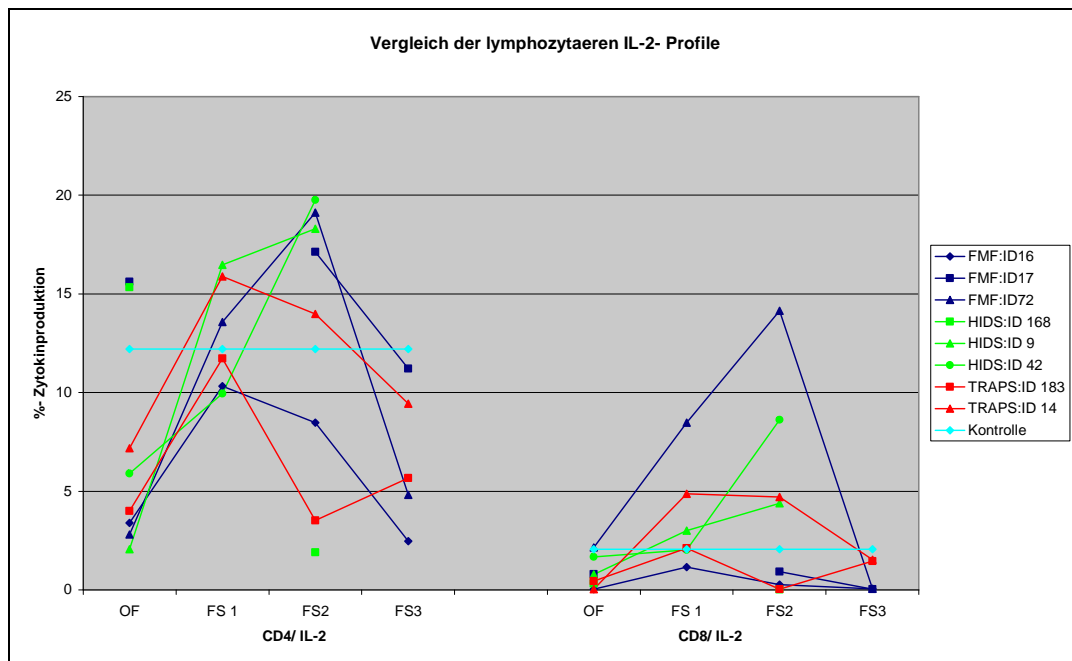
Abb. 31:



Erklärung: Die Abbildung zeigt links die intrazellulären IFN- $\gamma$ - Werte der CD4+- und rechts der CD8+-Zellen jedes einzelnen Patienten mit hereditärem Fiebersyndrom im fieberfreien Intervall und in den 3 Messungen im Fieberschub im Vergleich zum Kontrollwert. Nicht dargestellte Werte sind nicht bestimmbare Werte. OF= fieberfreies Intervall, FS1 = 6-12h nach Fieberbeginn, FS2 = 18-24h nach Fieberbeginn, FS3 = 24-30h nach Fieberbeginn, blau = FMF- Kinder, grün = HIDS- Kinder, rot = TRAPS- Kinder

Die im akuten Fieberschub erhöht gemessenen IFN- $\gamma$ - Konzentrationen sowohl im Serum, als auch intrazellulär, weisen ebenfalls auf eine mögliche TH1- Polarisierung der FMF-, HIDS- und TRAPS- Kinder hin. Zudem war bei den Kindern mit hereditärem Fiebersyndrom gleichzeitig die IL-2- Serumkonzentration im Vergleich zu den Kontrollen stets erhöht (**Abb. 26**) und in den CD4+- und CD8+- Zellen war mit dem akuten Schub eine vermehrte IL-2- Produktion zu beobachten (**Abb.31**).

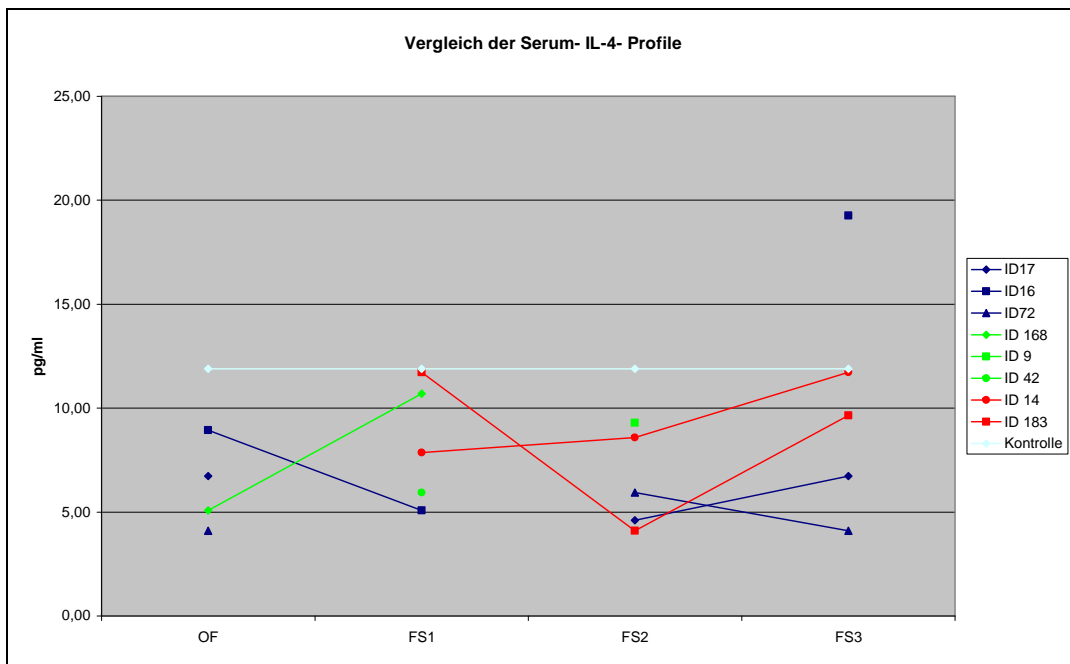
**Abb. 31:**



Erklärung: Die Abbildung zeigt links die intrazellulären IL-2- Konzentrationen der CD4+- und rechts der CD8+- Zellen jedes einzelnen Patienten mit hereditärem Fiebersyndrom im fieberfreien Intervall und in den 3 Messungen im Fieberschub im Vergleich zum Kontrollwert. Nicht dargestellte Werte sind nicht bestimmbare Werte. OF= fieberfreies Intervall, FS1 = 6-12h nach Fieberbeginn, FS2 = 18-24h nach Fieberbeginn, FS3 = 24-30h nach Fieberbeginn, blau = FMF- Kinder, grün = HIDS- Kinder, rot = TRAPS- Kinder

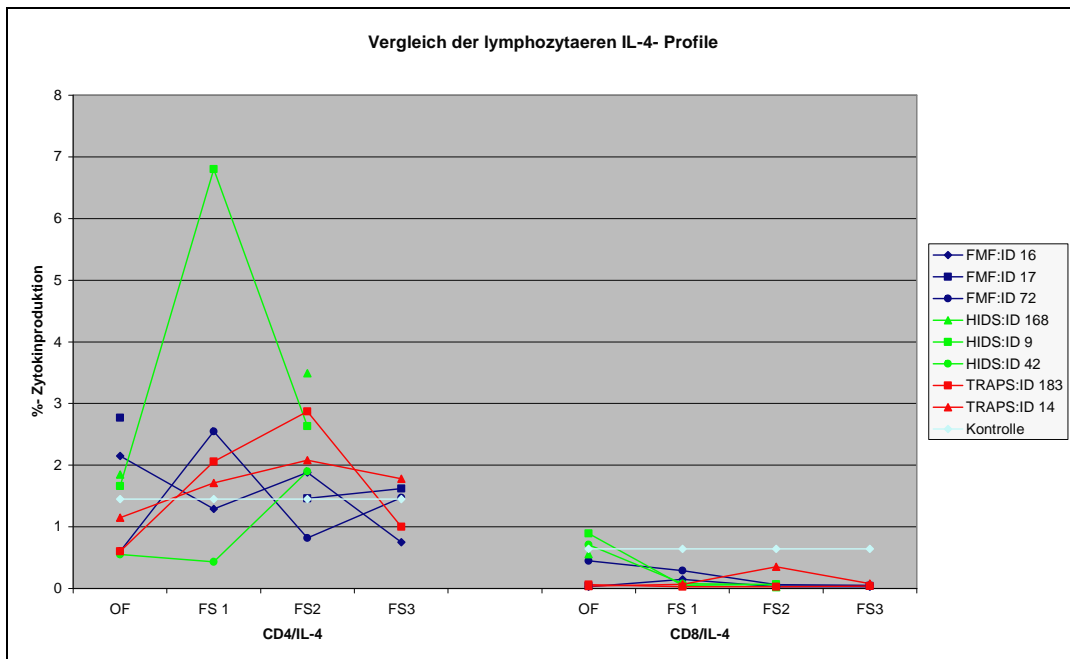
Auch das antiinflammatorische, zirkulierende **IL-4** war, mit Ausnahme von ID16 in FS3, bei allen Kindern mit genetisch bedingtem FS im Vergleich zu den Kontrollen gemäß der TH1- Reaktion nicht erhöht (**Abb.32**). Die intrazellulären IL-4 Messungen ergaben bei den FMF- Kindern in CD8+- Zellen bei allen Messungen eine verglichen mit den Kontrollen verminderte Produktion mit minimalen Konzentrationsunterschieden zwischen OF und dem Fieberschub (**Abb.33**).

Abb. 32:



Erklärung: Die Abbildung zeigt die Serum- IL-4- Werte jedes einzelnen Patienten mit hereditärem Fiebersyndrom im fieberfreien Intervall und in den 3 Messungen im Fieberschub im Vergleich zum Kontrollwert. Nicht dargestellte Werte sind nicht bestimmbare Werte. OF= fieberfreies Intervall, FS1 = 6-12h nach Fieberbeginn, FS2 = 18-24h nach Fieberbeginn, FS3 = 24-30h nach Fieberbeginn, blau = FMF- Kinder, grün = HIDS- Kinder, rot = TRAPS- Kinder.

Abb. 33:

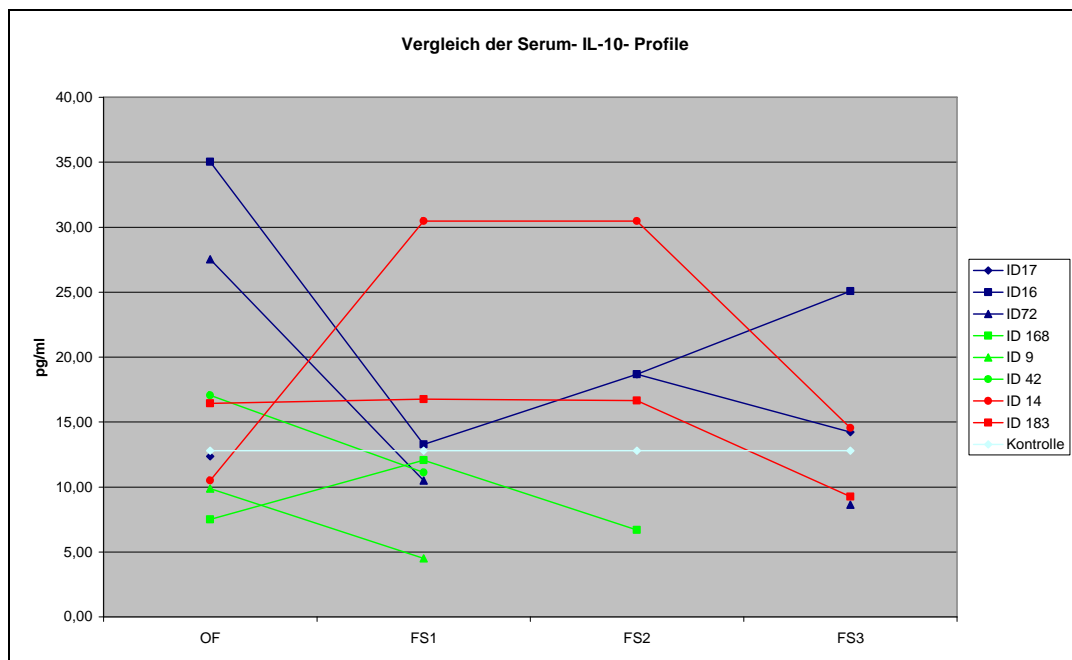


Erklärung: Die Abbildung zeigt links die intrazellulären IL-4- Werte der CD4+- und rechts der CD8+- Zellen jedes einzelnen Patienten mit hereditärem Fiebersyndrom im fieberfreien Intervall und in den 3 Messungen im Fieberschub im Vergleich zum Kontrollwert. Nicht dargestellte Werte sind nicht bestimmbare Werte. OF= fieberfreies Intervall, FS1 = 6-12h nach Fieberbeginn, FS2 = 18-24h nach Fieberbeginn, FS3 = 24-30h nach Fieberbeginn, blau = FMF- Kinder, grün = HIDS- Kinder, rot = TRAPS- Kinder.

Betrachtet man die **zirkulierenden IL-10**- Konzentrationen der Messungen im Fieberschub, so wiesen 2 HIDS- und 2 FMF- Kinder eine Konzentrationsabnahme in FS1 im Vergleich zu OF auf. Zusätzlich waren die Werte aller HIDS- Kinder und eines FMF- Kindes (ID72) in FS1 im Vergleich zu den Kontrollen erniedrigt (**Abb. 34**).

Die im Vergleich zu den Kontrollen sowohl im Serum, als auch in den Lymphozyten erhöht gemessenen Konzentrationen des IFN- $\gamma$  und des IL-2, bei gleichzeitiger Abnahme der zirkulierenden IL-4 und IL-10 Konzentrationen weisen auf eine TH1- Polarisierung der HIDS- und FMF- Kinder im akuten Schub hin.

**Abb. 34:**



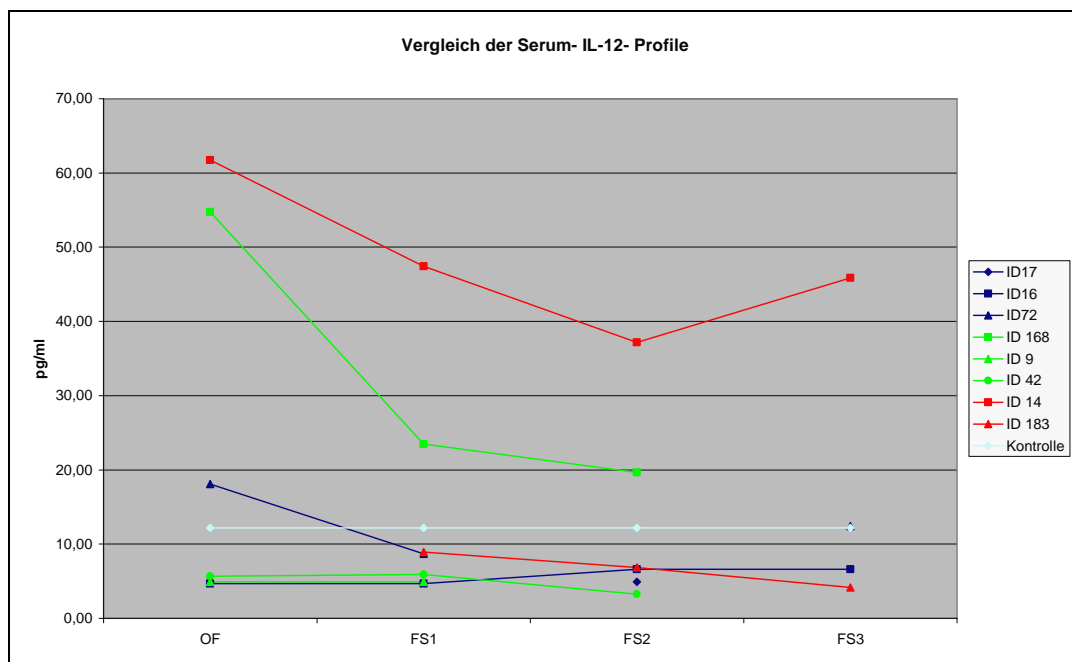
Erklärung: Die Abbildung zeigt die Serum- IL-10- Werte jedes einzelnen Patienten mit hereditärem Fiebersyndrom im fieberfreien Intervall und in den 3 Messungen im Fieberschub im Vergleich zum Kontrollwert. Nicht dargestellte Werte sind nicht bestimmbare Werte. OF= fieberfreies Intervall, FS1 = 6-12h nach Fieberbeginn, FS2 = 18-24h nach Fieberbeginn, FS3 = 24-30h nach Fieberbeginn, blau = FMF- Kinder, grün = HIDS- Kinder, rot = TRAPS- Kinder

Erstaunlicherweise waren jedoch weder bei den FMF-, HIDS-, noch bei den TRAPS- Kindern die **Serumkonzentrationen des proinflammatorischen IL-12** in den ersten 6-12h nach Fieberbeginn zunehmend und nahmen bei den HIDS- und den TRAPS- Kindern in den folgenden 12h weiter ab. Und auch in Remission sind erhöhte Werte des proinflammatorischen Zytokins IL-12 im Vergleich zu den Kontrollen nur bei einem HIDS, einem FMF und einem TRAPS- Kind nachweisbar (**Abb.35**). Dies ist besonders auffällig, da das potente proinflammatorische IL-12 nicht nur Produkt der TH1- Antwort ist, sondern auch eine immunregulatorische Schlüsselfunktion bei der Induktion

der TH1- Antwort hat. Die Bildung von TH1- bzw. TH2- Lymphozyten ist von dem Verhältnis zwischen IL-12, welches die TH1- Antwort begünstigt und IL-4, das die TH2- Antwort vermittelt, abhängig [108].

Ein Grund für die niedrig gemessenen IL-12- Konzentrationen könnte der zeitliche Rahmen der Messungen sein. Nach LPS- Injektion wird nach 2-3h gleichzeitig sowohl die IL-12 Produktion als auch die IL-12- Rezeptor- Expression induziert. Diesem folgt eine IFN- $\gamma$ - Produktion nach 5-7 Stunden [112]. D.h. innerhalb von 10 Stunden nach LPS- Stimulation folgte eine IFN- $\gamma$ - Produktion, was im Fall unserer PFS- Kinder den FS1- Messungen (6-12h) entspricht. Da alle Kinder, deren IFN- $\gamma$ - Konzentrationen im Verlauf bestimmbar waren, in den FS1- Messungen erhöhte IFN- $\gamma$ - Werte aufwiesen, ist es denkbar, dass die FS1- Messungen zwar bereits innerhalb der ersten 6-12h nach Fieberbeginn, jedoch für die Darstellung einer zu erwartenden IL-12- Erhöhung zu spät durchgeführt wurden. Die intrazellulär erhöht gemessenen IL-2- Konzentrationen würden diese Annahme ebenfalls bestätigen. Um dies nachzuweisen, bedarf es, nicht zuletzt aufgrund der zahlreichen nicht bestimmbar Werte, Messungen an größeren Fallzahlen und zeitlich kürzere Messabstände.

**Abb. 35:**



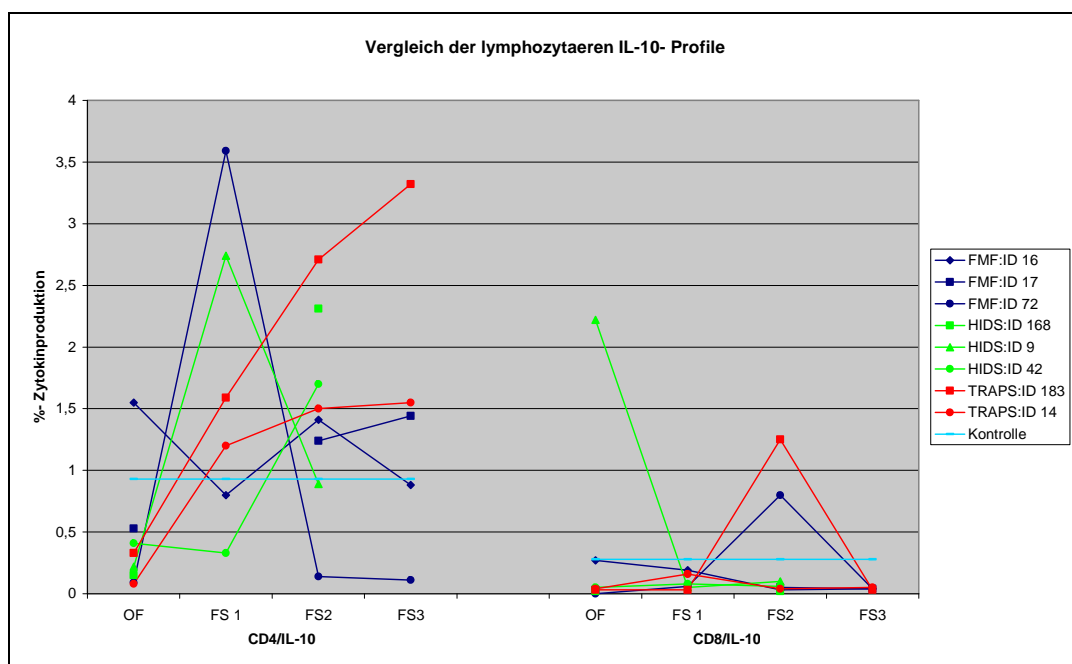
Erklärung: Die Abbildung zeigt die Serum- IL-2- Werte jedes einzelnen Patienten mit hereditärem Fiebersyndrom im fieberfreien Intervall und in den 3 Messungen im Fieberschub im Vergleich zum Kontrollwert. Nicht dargestellte Werte sind nicht bestimmbar. OF= fieberfreies Intervall, FS1 = 6-12h nach Fieberbeginn, FS2 = 18-24h nach Fieberbeginn, FS3 = 24-30h nach Fieberbeginn, blau = FMF- Kinder, grün = HIDS- Kinder, rot = TRAPS- Kinder.

Die Ergebnisse der IL-12- Messungen der Kinder mit hereditärem Fiebersyndrom sprechen gegen eine TH1- Polarisierung.

Auch kam es bei den beiden TRAPS- Kindern einheitlich während der ersten 6-12h nach Fieberbeginn zu einem Konzentrationsanstieg des IL-10 im Serum und in FS1 und FS2 waren sie im Vergleich zu den Kontrollen erhöht messbar, was gegen eine TH1- Reaktion bei den TRAPS Kindern spricht.<sup>1</sup>

Zudem war nicht bei allen HIDS- und FMF- Kindern eine Abnahme des zirkulierenden IL-10 im Fieberschub nachweisbar und nur ein FMF- Kind wies IL-10- Konzentrationen unterhalb der Kontrollwerte auf. Die intrazellulären IL- 10- Konzentrationen der CD4+- Zellen zeigten mit Ausnahme von ID16 und ID42, in den ersten 6-12 Stunden nach Fieberbeginn eine Zunahme über die Kontrollwerte (**Abb. 36**).

**Abb. 36:**

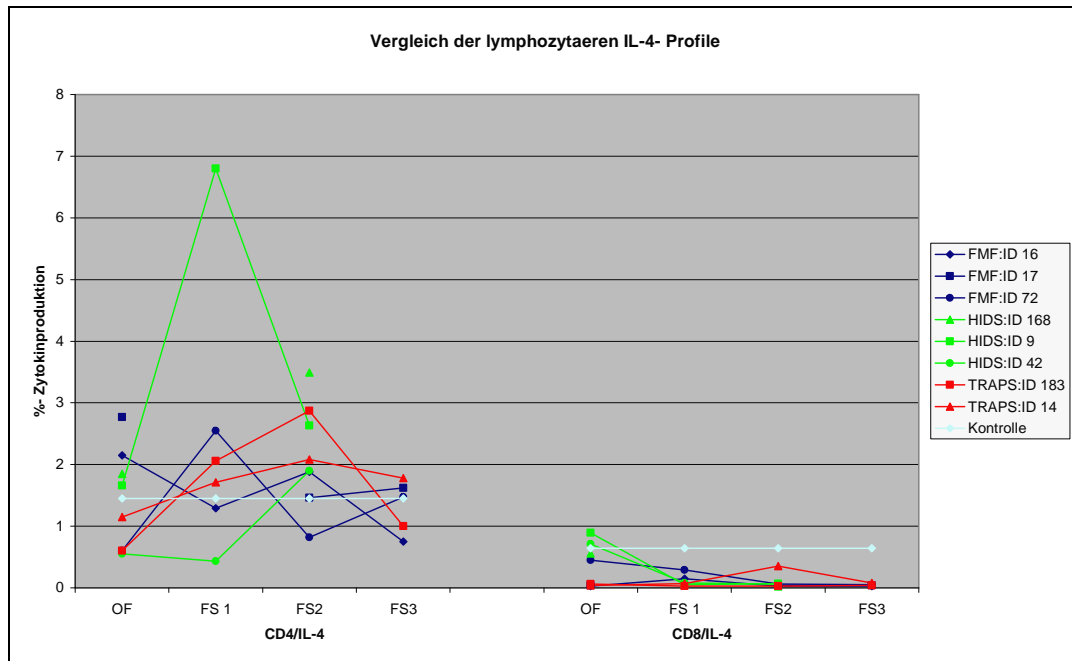


Erklärung: Die Abbildung zeigt links die intrazellulären IL-10- Werte der CD4+- und rechts der CD8+- Zellen jedes einzelnen Patienten mit hereditärem Fiebersyndrom im fieberfreien Intervall und in den 3 Messungen im Fieberschub im Vergleich zum Kontrollwert. Nicht dargestellte Werte sind nicht bestimmbare Werte. OF= fieberfreies Intervall, FS1 = 6-12h nach Fieberbeginn, FS2 = 18-24h nach Fieberbeginn, FS3 = 24-30h nach Fieberbeginn, blau = FMF- Kinder, grün = HIDS- Kinder, rot = TRAPS- Kinder.

<sup>1</sup> Es wurde gezeigt, dass Medikamente, welche die TNF- $\alpha$ - Synthese hemmen häufig zu einer erhöhten IL-10- Expression führen [65]. D.h. die erhöhten IL-10- Konzentrationen der TRAPS- Kinder wären möglicherweise erklärbar durch einen supprimierenden Effekt auf die TNF-  $\alpha$ - Synthese, durch das, bei den TRAPS- Kindern erhöhte TNF- $\alpha$  im Sinne einer negativen Rückkopplung und die inhibitorisch wirkende, erhöhte IL-6- Konzentration.

IL-4 war bei den HIDS- Kindern ID9 und ID168 sowohl in den CD4+- als auch in den CD8+- Zellen stets erhöht messbar (**Abb.37**) und die zirkulierenden IL-10- Konzentrationen im fieberfreien Intervall waren für keines der hereditären Syndrome eindeutig einer TH1- Polarisierung zuzuordnen.

**Abb. 38:**



Erklärung: OF= fieberfreies Intervall, FS1 = 6-12h nach Fieberbeginn, FS2 = 18-24h nach Fieberbeginn, FS3 = 24-30h nach Fieberbeginn, blau = FMF- Kinder, grün = HIDS- Kinder, rot = TRAPS- Kinder

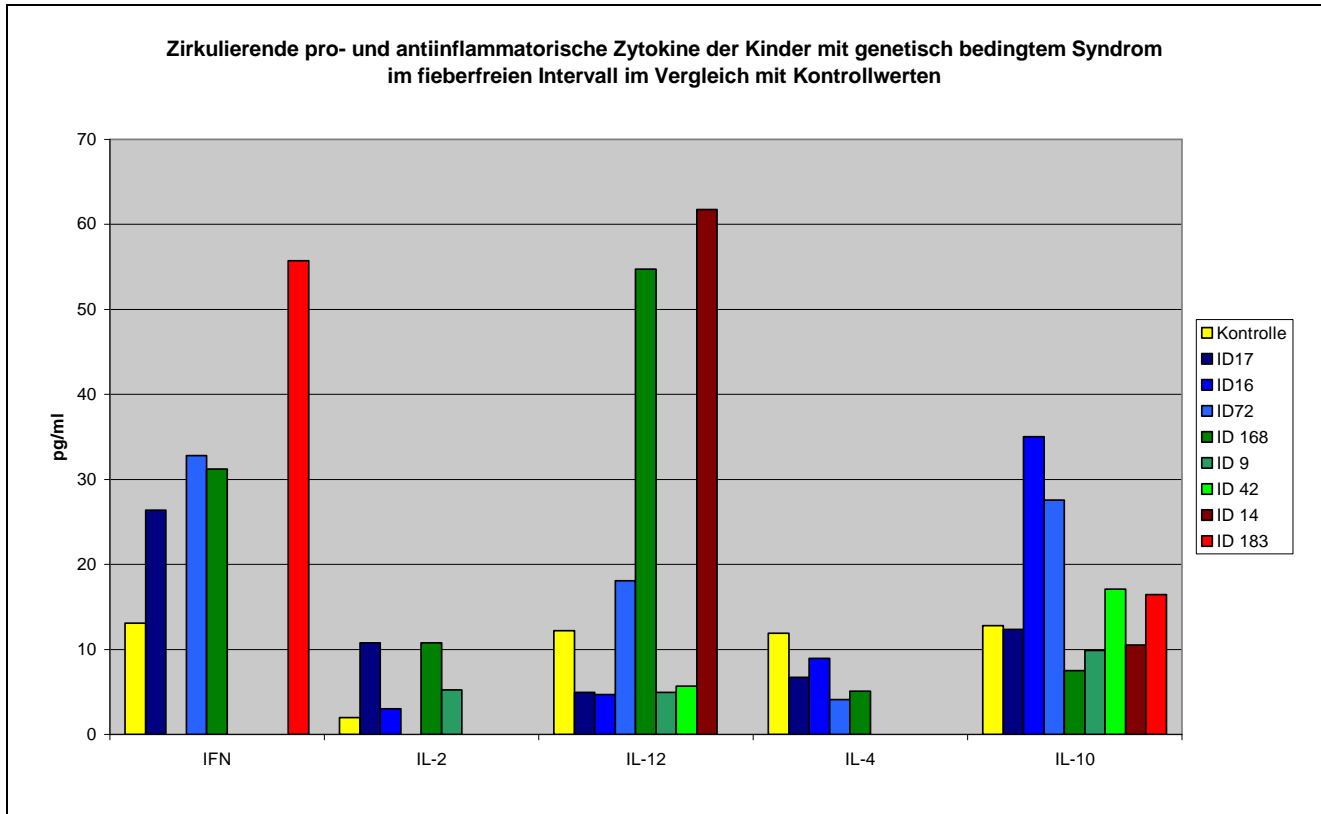
Die FMF- Kinder wiesen außerdem im Vergleich zu den Kontrollen in CD4+- Zellen eine vermehrte, in den CD8+- Zellen eine verminderte IL-4- Produktion auf (**Abb.37**). Bei Aypar et al. bestand bezüglich der IL- 4 Produktion von T- Zellen zwischen FMF- Patienten und der gesunden Kontrollgruppe kein Unterschied [6].

Nicht zuletzt muss bedacht werden, dass nicht bei allen Kindern alle IFN-  $\gamma$ - Konzentrationen bestimmbar waren und zudem könnten auch hier neben den T- Zellen noch andere Zellpopulationen wie NK- Zellen an der IFN-  $\gamma$ - Produktion beteiligt sein, die nicht Teil der erworbenen Immunität sind. Eine TH1- Reaktion ist somit in der vorliegenden Arbeit bei den hereditären Fiebersyndromen nicht eindeutig nachweisbar.

Besonders interessant war die Beobachtung, dass bei den Kindern mit hereditärem Fiebersyndrom auch im fieberfreien Intervall sowohl im Serum, als auch intrazellulär (mit Ausnahme von ID183, ID168 und ID72 in CD8+- Zellen) gegenüber den Kontrollen eine erhöhte IFN- $\gamma$ - Aktivierung zu beobachten war. Auch IL-2 war bei diesen Kindern erhöht. Das antiinflammatorische IL-4 hingegen war bei allen erniedrigt. Auch die **IL- 10-** Produktion war bei allen Kindern mit hereditärem PF in

den CD4+- Zellen (außer ID16) und den CD8+- Zellen (außer ID9) ID16 im Vergleich zu den Kontrollen vermindert (**Abb.39**).

**Abb. 39:**



In einer Studie wurde bei 24 FMF- Patienten (19 im Schub, 5 in Remission) die Konzentration des IL-12 und des IL-10 im Plasma mittels ELISA gemessen [31]. Bei dieser Untersuchung war das **IL-10** bei allen FMF- Patienten im Vergleich zu den Kontrollen erhöht. Zudem waren die Konzentrationen im akuten Schub höher, als in Remission. Die signifikante Erhöhung der IL-10-Konzentrationen im Rahmen dieser FMF- Studie wurde als eine kompensatorische Unterdrückung einer Entzündungsreaktion in der akuten Erkrankungsphase gedeutet. Die mittleren **IL-12**-Konzentrationen dieser FMF- Patienten im Schub entsprachen denen in Remission, waren jedoch in beiden Fällen höher, als bei den gesunden Kontrollen. Die unabhängig von der Symptomatik erhöhten IL-12- Konzentrationen wiesen auf einen kontinuierlichen proinflammatorischen Zustand auch in der inaktiven Episode bei den FMF- Kindern hin.

Vergleicht man diese FMF- Studie mit den Ergebnissen unserer FMF- Patienten, so konnte weder eine stets bestehende IL-10- Erhöhung im Vergleich zu den Kontrollen, noch eine IL- 10 Zunahme im akuten Schub dargestellt werden. Auch konnte nur bei einem FMF- Kind eine gleich bleibende IL-12- Konzentration in FS1 im Vergleich zu OF beobachtet werden und die Konzentrationen waren auch im Vergleich zu den Kontrollen nicht erhöht.



Jedoch weisen die Ergebnisse, d.h. die bei den hereditären PFS im Vergleich zu den Kontrollen stets erhöhten Konzentrationen der proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-2 und IFN- $\gamma$ , bei gleichzeitig verminderten bzw. unveränderten Konzentrationen des antiinflammatorischen IL-4 und bei den PFAPA- Kindern stets erhöhten Konzentrationen der proinflammatorischen Zytokine IL1 $\beta$ , IL-6 und IL-12 bei gleichzeitig fehlender IL-4 und IL-10 Ausschüttung auf einen kontinuierlichen proinflammatorischen Zustand als Gemeinsamkeit aller autoinflammatorischen Fiebersyndrome hin.

Bei den PFAPA- Kindern waren die IFN-  $\gamma$ - Serumkonzentrationen im fieberfreien Intervall im Gegensatz zu den hereditären autoinflammatorischen Syndromen nicht erhöht, während in CD8+- Zellen eine deutlich vermehrte Produktion messbar war, was ein verändertes IFN- $\gamma$ - Prozessing zur Ursache haben kann. Im Gegensatz zu den Kindern mit genetisch bedingtem PFS konnte bei den PFAPA- Kindern in keiner Erkrankungsphase eine intrazelluläre **IL-4** und **IL-10**- Ausschüttung der Lymphozyten induziert werden, zwei antiinflammatorische Zytokine deren Synthese bekanntermaßen durch IFN- $\gamma$  unterdrückt wird, und die Konzentrationen lagen unter den Werten der gesunden Vergleichsgruppe. Diese Ergebnisse und die damit assoziierte Aktivierung der proinflammatorischen Zytokine IL- 12 und IL-2 deuten sehr darauf hin, dass IFN- $\gamma$ , dessen Konzentration auch im akuten Fieberschub, sowohl im Serum, als auch intrazellulär erhöht war, eine wichtige Rolle in der PFAPA- Pathophysiologie spielt. Diese Hypothese wird zudem bestätigt durch die Tatsache, dass **Cimetidin** bei PFAPA Kindern zu vollständiger Remission führen kann. Dieser H2-Blocker hat einen suppressiven Effekt auf CD8+- Zellen, die eine IFN- $\gamma$ - Quelle darstellen.

Die Bestimmung der intrazellulären und zirkulierenden pro- und antiinflammatorischen Zytokine ergab bei allen 14 Kindern eine pathologische Zytokinausschüttung. Dabei wiesen die Zytokinveränderungen aller Kinder auf einen kontinuierlichen proinflammatorischen Zustand hin, der auf Fehlregulationen des **angeborenen** Immunsystems zurückzuführen ist, bei welchen das Zytokin **IL-1 $\beta$**  eine pathophysiologisch zentrale Rolle spielt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützen die Hypothese, dass dem PFAPA- Syndrom eine Fehlregulation der angeborenen Immunität mit Beteiligung des IL-1 $\beta$ - Inflammasoms zugrunde liegt. Zudem konnte die möglicherweise entscheidende Rolle des **IFN-  $\gamma$**  in der Pathophysiologie des PFAPA- Syndroms aufgezeigt werden.

Die weitere Erforschung der, den autoinflammatorischen Syndromen zugrunde liegenden molekularen Mechanismen, könnte wesentlich zum besseren Verständnis und damit zu effektiveren Therapien beitragen. Für das PFAPA- Syndrom konnten die in der vorliegenden Arbeit aufgezeigten Zytokinveränderungen und die damit verbundenen Beobachtungen wesentlich zur Klärung der pathophysiologischen Grundlagen dieses Syndroms beitragen.

## 6 Zusammenfassung

Autoinflammatorische Erkrankungen bilden eine neue, wachsende Kategorie unter den Entzündungskrankheiten, die charakterisiert sind durch scheinbar spontane Attacken multisystemischer Entzündungen ohne nachweisliche Infektion, Autoantikörper- oder antigen-spezifische T-Zellen- Bildung [66].

Die Periodischen Fiebersyndrome (PFS) gehören mit ihren charakteristischen rekurrenten Fieberschüben zu dieser Erkrankungsgruppe. Die häufigsten PFS in unseren Breiten sind das Familiäre Mittelmeerfieber (FMF), das Hyperimmunglobulinämie D und periodische Fiebersyndrom (HIDS) und das TNF- Rezeptor- assoziierte- Periodische Syndrom (TRAPS), welche unter dem Begriff „hereditäre autoinflammatorische Syndrome“ subsummiert sind, und das PFAPA- Syndrom, das Akronym für den Symptomenkomplex Periodisches Fieber, Aphthöse Stomatitis, Pharyngitis und zervikale Adenitis, dessen Ätiologie bislang ungeklärt ist.

Diesen Syndromen sind neben den Fieberepisoden eine Erhöhung der Akut- Phase- Proteine im akuten Schub gemein. Da Zytokine in einem komplexen Netzwerk generalisierte und lokalisierte Entzündungsreaktionen vermitteln bzw. unterhalten und als endogene Pyrogene Fieber induzieren, sind in dieser Arbeit erstmalig 14 pädiatrische Patienten der 4 verschiedenen PFS (3 FMF-, 3 HIDS-, 2 TRAPS- und 6 PFAPA-Kinder) auf mögliche pathologische Zytokinausschüttungen untersucht worden.

Dazu wurde die *ex vivo* Synthese der Zytokine Tumor- Nekrose- Faktor- alpha (TNF- $\alpha$ ), Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ), und der Interleukine IL-10, IL-2 und IL-4 in CD4+ und CD8+ Lymphozyten gemessen und gleichzeitig wurde die *in vivo* Produktion des inflammatorischen Mediators C-reaktives- Protein (CRP), der proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IFN- $\gamma$ , und IL-2 und die Konzentrationen der vorwiegend inhibitorisch wirkenden Zytokine IL-4 und IL-10 bei den Patienten sowohl im fieberfreien Intervall, als auch 6-12h, 18-24h und bei den Kindern mit hereditärem Fiebersyndromen zudem 24-30h nach Fieberschubbeginn im Serum durchflußzytometrisch bestimmt. Bei den PFAPA- Kindern wurden zusätzlich die löslichen, antiinflammatorischen TNF- Rezeptoren p55 (sTNFRSF1A) und p75 (sTNFRSF1B) im Serum gemessen.

Die Werte wurden sowohl mit gesunden, gleichaltrigen Kontrollpatienten, als auch mit den bereits veröffentlichten Zytokinprofilen erwachsener Patienten verglichen. Die auf diese Weise ersichtlich gewordenen Gemeinsamkeiten bzw. Unterschiede zwischen den autoinflammatorischen Syndromen wurden anhand der aktuellen Daten zu Pathogenese dieser Erkrankungsgruppe diskutiert.

Durch serielle Messungen konnten in der vorliegenden Arbeit bei allen vier periodischen Fiebersyndromen im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe veränderte Zytokinausschüttungen

gemessen werden. Ein für jedes der Fiebersyndrome spezifisches Zytokinprofil war nicht nachweisbar.

Die in allen Phasen im Vergleich zu den Kontrollen erhöhten Konzentrationen der proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-2 und IL-6 mit gleichzeitiger Verminderung, bzw. nicht induzierbarer Produktion des antiinflammatorischen Zytokins IL-4 deuten bei allen Kindern auf einen kontinuierlichen proinflammatorischen Zustand auch in der inaktiven Phase hin. Bei den Patienten mit hereditärem Fiebersyndrom sind erhöhte Konzentrationen proinflammatorischer Zytokine mit einem Amyloidoserisiko assoziiert, während dies beim PFAPA- Syndrom bislang nicht nachgewiesen wurde. Der kontinuierlich proinflammatorische Zustand ist vereinbar mit der, den autoinflammatorischen Syndromen zugrunde liegenden Fehlregulation des **angeborenen** Immunsystems, bei dem das bei allen autoinflammatorischen Fiebersyndromen im Serum erhöhte **IL-1 $\beta$**  eine pathophysiologisch zentrale Bedeutung hat.

Die IL-1 $\beta$ - Erhöhung bei den **FMF**- Kindern ist u.a. mit der Pyrin- Sequestrations - Hypothese vereinbar, die dem Pyrinmolekül auf Ebene des Inflammasoms, einem makromolekularen Proteinkomplex, der via Caspase-1-Aktivierung zur Prozessierung von IL-1 $\beta$  führt, eine inhibierende Wirkung auf die IL-1 $\beta$ - Aktivierung zuschreibt. Dies kann im Falle des mutierten Pyrins bei den FMF- Kindern zu einer verstärkten IL-1 $\beta$ - Induktion führen.

Bei den **TRAPS**- Kindern wird die erhöhte intrazelluläre Retention der veränderten TNFR1- Rezeptormoleküle, welche sich vermehrt im endoplasmatischen Retikulum ansammeln und/ oder im Zytosol Aggregate bilden, mit einer vermehrten IL-1 $\beta$ - Aktivierung in Zusammenhang gebracht.

Die verminderte Mevalonatkinase (MVK)- Aktivität, die mit Temperaturerhöhung nochmals abnimmt, soll bei den **HIDS**- Patienten zu einer Reduktion der Isoprenyl- Endprodukte und damit sowohl zu einer erhöhten Aktivität der HMG-CoA- Reduktase, als auch zu einer IL-1 $\beta$ - Induktion führen.

Die Rolle des IL-1 $\beta$  in der Pathogenese der hereditären autoinflammatorischen Syndrome wurde zudem durch den positiven Effekt einer Behandlung dieser Patienten mit dem IL-1 $\beta$ - Rezeptorantagonisten Anakinra deutlich.

Die in der vorliegenden Arbeit sowohl bei den FMF-, HIDS- und TRAPS-, als auch bei den PFAPA- Kindern gemessene IL-1 $\beta$ - Erhöhung, sowie die gleichzeitig bestehenden Konzentrationserhöhungen der von IL-1 $\beta$  induzierbaren Zytokine IL-6 und IL-2, bestätigen die wichtige Rolle des IL-1 $\beta$  nicht nur in der Pathogenese der hereditären autoinflammatorischen Syndrome, sondern auch der des PFAPA- Syndroms.

Bei den **TRAPS**- Kindern war zudem **TNF- $\alpha$**  innerhalb der ersten 6-12h nach Schubbeginn erhöht, was die Hypothese untermauert, dass bei TRAPS mutationsbedingte TNFR1- Molekülveränderungen und der mit TRAPS assoziierte Shedding- Defekt zu einer verminderten Abspaltung und damit zur Verringerung der löslichen Rezeptoren führen, die unter physiologischen Bedingungen an TNF- $\alpha$  binden und dadurch inhibitorisch auf TNF- $\alpha$  wirken würden. Zudem ist

mutationsbedingt nicht nur die Affinität des löslichen, sondern auch des noch nicht von der Zellwand abgespaltenen TNFR1- Rezeptors, TNF- $\alpha$  zu binden vermindert, sodass auch die unter physiologischen Bedingungen durch die Bindung initiierte Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B vermindert ist.

Die bei den **FMF-** und **HIDS- Kindern** in der akuten Phase fehlende Erhöhung der Serumkonzentration des endogenen Pyrogens **TNF- $\alpha$**  und der bei erwachsenen FMF- und HIDS- Patienten in der akuten Phase nachgewiesene signifikante sTNFRp55 und sTNFRp75 Konzentrationanstieg, bestärken die Hypothese einer Bindung des TNF-  $\alpha$  an die inhibierend wirkenden löslichen TNF- Rezeptoren. Durch die Bindung des TNF-  $\alpha$  an die Rezeptoren ist es als solches nicht mehr messbar. Demnach ist die fehlende Erhöhung der TNF-  $\alpha$ - Serumkonzentration messbedingt, d.h. bei den FMF- und HIDS- Kindern liegt keine pathologisch verminderte TNF-  $\alpha$ - Ausschüttung in der akuten Phase vor.

Die bei den **PFAPA-** Kindern im Vergleich zu den Kontrollwerten im akuten Schub signifikant erhöhte **TNF- $\alpha$ -** Serumkonzentration und die im akuten Fieberschub im Vergleich zu den Kontrollwerten unveränderten intrazellulären TNF- $\alpha$ - Konzentrationen lassen vermuten, dass das proinflammatorische Zytokin TNF- $\alpha$  beim PFAPA- Syndrom keine pathogenetisch wichtige Rolle spielt.

Sowohl bei den FMF-, HIDS- und TRAPS- Kindern, als auch bei den **PFAPA-** Kindern war eine deutlich vermehrte intrazelluläre IFN- $\gamma$ - Produktion, sowie eine erhöhte IFN- $\gamma$ - Serumkonzentration im akuten Schub messbar, was auf eine gemeinsame IFN-  $\gamma$ - Aktivierung bei allen PFS deutet. Eine IL-12- induzierte IFN-  $\gamma$ - Erhöhung, im Rahmen einer Aktivierung der erworbenen Immunität, im Sinne einer TH1- Polarisierung konnte für die FMF-, HIDS- und TRAPS- Kinder nicht bestätigt werden. Die PFAPA- Kindern wiesen zwar in den Messungen im Fieberschub für eine TH1- Reaktion typische Zytokinveränderungen auf, jedoch ist zu beachten, daß auch andere Zellen wie NK- Zellen massgeblich an der IFN- $\gamma$ - Produktion beteiligt sind, d.h. die im Serum drastisch erhöhte Serumkonzentration des IFN- $\gamma$  muss nicht bzw. nicht ausschliesslich durch eine Aktivierung der erworbenen Immunität bedingt sein.

Da IFN- $\gamma$  bekannterweise die Synthese der antiinflammatorischen Zytokine IL-4 und IL-10 inhibiert, weisen die völlig ausbleibende IL-4- und IL-10- Produktion, sowie die vermehrte IL-1 $\beta$ - und IL-6- Ausschüttung bei den PFAPA- Kindern darauf hin, dass IFN- $\gamma$  eine entscheidende Rolle in der Pathogenese des PFAPA- Syndroms spielen könnte. Die Zytokin- Profile der PFAPA- Kinder heben sich von den Kindern mit hereditärem autoinflammatorischen Syndrom dadurch ab, dass bei den PFAPA- Patienten die Konzentrationen des zirkulierenden IFN- $\gamma$  im fieberfreien Intervall vermindert waren, während intrazellulär eine vermehrte **IFN- $\gamma$ -** Produktion zu beobachten war, was erneut die Bedeutung des IFN-  $\gamma$  in der Pathogenese dieses Syndroms hervorhebt. Diese Hypothese wird durch die Tatsache unterstützt, dass **Cimetidin**, ein Inhibitor der CD8+- Zellen, einer IFN- $\gamma$ - Quelle, bei PFAPA- Kindern wirksam eingesetzt werden kann.

Die Ergebnisse der PFAPA- Kinder bestärken die Hypothese, dass diesem Syndrom eine Fehlregulation der angeborenen Immunität im Sinne einer kontinuierlichen IL-1 $\beta$ - Aktivierung zugrunde liegt und zeigen, daß IFN- $\gamma$  beim PFAPA- Syndrom eine pathogenetisch wichtige und im Vergleich zu den hereditären Fiebersyndromen gesonderte Rolle spielt. Diese Beobachtungen könnten einen wesentlichen Beitrag zur Ergründung der pathophysiologischen Grundlagen dieses bislang ungeklärten Syndroms leisten, denn während bei den hereditären Fiebersyndromen, zwischen denen bzgl. ihrer unterschiedlichen Genetik und ihren Behandlungserfolgen klare Abgrenzungen bestehen und man in der Erforschung derer Pathogenese bereits große Fortschritte erzielt hat, müssen bei dem PFAPA- Syndrom mögliche genetische und/ oder umweltbedingte pathogenetische Faktoren erst eruiert werden.

## 7 Literatur

1. **Agostini L, Martinon F, Burns K, McDermott MF, Hawkins PN and Tschopp J.** NALP3 forms an IL-1beta- processing inflammasome with increased activity in Muckle- Well autoinflammatory disorder. *Immunity* 2004; 20: 319-325.
2. **Aksentijevich I, Galon J, Soares M, Mansfield E, Hull K, Oh HH, Goldbach- Mansky R, Dean J, Athreya B, Reginato AJ et al.** The tumor-nekrosis-factor receptor- associated periodic syndrome: new mutations in TNFRSF1A, ancestral origins, genotype-phenotype studies, and evidence for further genetic heterogeneity of periodic fevers. *Am J Hum Genet* 2001; 69:301-314.
3. **Andrei C, Margiocco P, Poggi A, Loit LV, Torrisi MR and Rubartelli A.** Phospholipases C and A2 control lysosome- mediated IL-1beta secretion: Implications for inflammatory processes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 9745-9750.
4. **Arav Bogner R.** Periodic Syndromes of childhood. *Advances in Pediatrics* 1997; 44:389-428.
5. **Aróstegui JI, Solís P, Aldea A, Cantero T, Rius J, Bahillo P, Plaza S, Vives J, Gómez S, Yagüe J.** Etanercept plus colchicine treatment in a child with tumour necrosis factor receptor-associated periodic syndrome abolishes auto-inflammatory episodes without normalising the subclinical acute phase response. *Eur J Pediatr.* 2005;164:13-6.
6. **Aypar E, Ozen S, Okur H, Kutluk T, Besbas N, Bakkaloglu A.** Th1 polarization in familial Mediterranean fever. *J Rheumatol.* 2003; 30:2011-2013.
7. **Bagci S, Toy B, Tuzun A, Ates Y, Aslan M, Inal A, Gulsen M, Karaeren N, Dagalp K.** Continuity of cytokine activation in patients with Mediterranean fever. *Clin Rheumatol* 2004; 23:333.
8. **Baykal Y, Saglam K, Yilmaz MI, Taslipinar A, Akinci SB, Inal A.** Serum sIL-2r, IL-6, IL-10 and TNF- $\alpha$  level in familial Mediterranean fever patients. *Clin Rheumatol* 2003; 22:99.
9. **Bejanaro MT, De Waal Malefyt R, Abrams JS, Bigler M, Bacchetta R, de Vries JE, Roncarolo MG.** Interleukin 10 inhibits allogenic proliferative and cytotoxic T cell responses generated in primary mixed lymphocyte cultures. *Internat Immunol.* 1992; 4:1389-97.
10. **Ben-Chetrit E, Levy M.** Familial Mediterranean fever. *Lancet* 1998; 351: 659-64.
11. **Bodar EJ, van der Hilst JCH, Drenth JPH, van der Meer JWM, Simon A.** Effekt of etanercept and anakinra on inflammatory attacks of hyper- IgD syndrome: introducing a vaccination provocation model. *Neth J Med* 2005 Jul-Aug; 63(7):260-4.
12. **Booth DR, Gillmore JD, Lachmann HJ, Booth S, Bybee A, Soyuturk M, Akar S, Pepys MB, Tunca M, Hawkins PN.** The genetic basis of autosomal dominant familial fever Mediterranean fever. *Q J Med* 2000; 93:217-221.
13. **Centola M, Wood G, Frucht DM et al.** The gene for familial Mediterranean fever, MEFV, is expressed in early leukocyte development and is regulated in response to inflammatory mediators. *Blood* 2000; 95:3223-31.
14. **Chae JJ, Komarow HD, Cheng J, Wood G, Raben N, Liu PP und Kastner DL.** Targeted disruption of pyrin, the FMF protein, causes heightened sensitivity to endotoxin and a defect in macrophage apoptosis. *Mol Cell* 2003; 11:531-604.
15. **Chae JJ, Wood, Masters SL, Richards K, Park G, Smith BJ and Kastner DL.** The B30.2 domain of pyrin, the familial Mediterranean fever protein, interacts directly with caspase-1 to modulate IL-1beta production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 9982-9987.
16. **Chen R, Lowe L, Wilson JD, Crowther E, Tzeggai K, Boshop JE, Varro R.** Simultaneous quantification of six human cytokines in a single sample using microparticle-based flow cytometry technology. *Clin Chem* 1999; 45:1693.
17. **Coward WR, Marei A, Yang A, Vasa- Nicotera MM and Chow SC.** Statin- induced proinflammatory response in mitogen- activated peripheral blood mononuclear cells through the activation of caspase-1 and IL-18 secretion in monocytes. *J Immunol* 2006; 176:5284-5292.
18. **Cuisset L, Drenth JPH, Simon A, Vincent MF, van der Velde- Visser SD, van der Meer JWM, Grateau G and Delpech M.** Molekular analysis of MVK mutations and enzymatic activity in hyper-IgD and periodic fever syndrome. *Eur J Hum Genet* 2001, 9: 260-266.
19. **Dahn KA, Glode MP, Chan KH.** Periodic fever and pharyngitis in young children: a new disease for the otolaryngologist? *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2000; 126: 1146.
20. **Dinarello CA, Wolff SM, Goldfinger SE, Dale DC, Ailing DW.** Colchicine therapy for familial mediterranean fever. *N Eng J Med* 1974; 291:932-4.
21. **Dinarello CA.** Infection, fever, and exogenous and endogenous pyrogens: some concepts have changed. *J Endotoxin Res* 2004; 10: 201.
22. **Dinarello CA.** The IL-1 family and inflammatory diseases. *Clin Exp Rheumatol* 2002; 20:S1-13.
23. **Direskeneli H, Ozdogan H, Korkmaz C, Akoglu T, Yazici HG.** Serum soluble intracellular adhesion molecule 1 and interleukin 8 levels in familial Mediterranean fever. *J Rheumatol* 1999; 26:1983.

24. **Dowds TA, Masumoto J, Chen FF, Ogura Y, Inohara N and Nunez G.** Regulation of Cryopyrin/Pypaf1 signaling by pyrin, the familial Mediterranean feve gene product. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 302:575-580.
25. **Drenth JP, Cuisset L, Grateau G et al.** Mutation of the Gene encoding mevalonate kinase cause hyper IgD and periodic fever syndrome. *Nat Genet* 1999; 22:178-81.
26. **Drenth JP, Haagsma CJ, van der Meer JW.** Hyperimmunoglobulinemia D and periodic fever syndrome: the clinical spectrum in a series of 50 patients. International Hyper- IgD- study Group. *Medicine (Baltimore)*,1994; 73:133-144.
27. **Drenth JPH, Powell RJ, Brown NS, van der Meer JWM.** Interferon- $\gamma$  and urine neopterin in attacks of the hyperimmunoglobulinemia D and periodic fever syndrome. *Eur J Clin Invest* 1995; 25: 683.
28. **Drenth JPH, van der Meer JWM, Kushner I.** Unstimulated peripheral blood mononuclear cells from patients with the hyper-IgD syndrome produce cytokines capable of potent induction of C-reactive protein and serum amyloid A in Hep3B cells. *J Immunol* 1996; 157: 400.
29. **Drenth JPH, van Deuren M, van der Ven-Jongekrijg J, Schalkwijk CG, van der Meer JWM.** Cytokine activation during attacks of the hyperimmunoglobulinaemia D and periodic fever syndrome. *Blood* 1995; 85:3586.
30. **Drewe E, Huggins ML, Morgan AG, Cassidy MJ and Powell RJ.** Treatment of renal amyloidosis with etanercept in tumor necrosis factor receptor- associated periodic syndome. *Rheumatology* 2004;43:1405.
31. **Erken E, Ozer HT, Gunesacar R.** Plasma interleukin-10 und interleukin-12 levels in patients with Mediterranean fever. *Rheumatol Int.* 2006 jan; 1-3.
32. **Farrar MA, Schreiber RD.** The molecular cell biology of interferon- gamma and its receptor. *Annu Rev Immunol* 1993; 11:571-611.
33. **Feder HM Jr.** Cimetidin Treatment for periodic fever associated with aphthous somatitis, pharyngitis and cervical adenitis, *Pediatr Infect Dis J* 1992; 11:318.
34. **French FMF Consortium.** A candidate gene for Mediterranean fever. *Nat Genet* 1997; 17:25-31.
35. **Frenkel J, Rijkers GT, Mandey SH, Buurman SW, Houten SM, Wanders RJ, Waterham HR, Kuis W.** Lack of isoprenoid products raises ex vivo interleukin-1 $\beta$  secretion in hyperimmunoglobulinaemia D and periodic fever syndrome. *Arthritis Rheum* 2002; 46:2794.
36. **Frenkel J, Wulffraat NM and Kuis W.** Anakinra in mutation- negative NOMID/CINCA syndrome: comment on the articles by Hawkins et al and Hoffman and Patel. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 3738-3739.
37. **Frenkel, Houten SM, Waterham HR, Wanders RJA, Rijkers GT, Duran M, Kuijpers TW, Van Luijk W, Poll-The BT, Kuis W.** Clinical and molecular variability in childhood periodic fever with hyperimmunoglobulinaemia. *Paediatric Rheumatol* 2001; 40:579-584.
38. **Galon J, Aksentijevich I, McDermott MF, O'Shea JJ, Kastner DL.** TNFRSF1A mutations and autoinflammatory syndromes. *Curr Opin Immunol.* 2000; 12:479-486.
39. **Gang N, Joost PH, Drenth, et al.** Activation of the cytokine network in familial Mediterranean fever. *J Rheumatol* 1999; 26:4.
40. **Gershoni-Baruch R, Brink R, Shinawi M, Livneh A.** The differential contribution of MEFV mutant alleles to the clinical profile of familial Mediterranean fever. *Eur J Genet* 2002 Feb; 10(2): 145-9.
41. **Goldman M, Marchant A, Schandene L.** Endogenous interleukin-10 in inflammatory disorders: regulatory roles and pharmacological modulation. *Ann NY Acad Sci* 1996; 796:282-293.
42. **Grateau G. et al.** Hereditary fevers. *Curr Opin Rheumatology* 1999; 11: 75-78.
43. **Grateau G, Jeru I, Rouaghe S, Cazeneuve C, Ravet N, Duquesnov P, Cuisset L, Dode C, Depelch M, Amselm S.** Amyloidosis and auto-inflammatory syndromes. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2005; 4:57.
44. **Gumucio DL, Diaz A, Schaner P, Richards N, Babcock C, Schaller M, Cesena T.** Fire and ICE: the role of pyrin domain- containing proteins in inflammation and apoptosis. *Clin Exp Rheumatol* 2002; 20: S45-53.
45. **Hoffman GF, Charpentier C, Mayatepek E, Mancini J, Leichsenring M, Gibson KM, Divry P, Hrebicek M, Lehnert W, Sartor K.** Clinical and biochemical phenotype in 11 patients with mevalonic aciduria. *Pediatrics* 1993; 91:915-921.
46. **Houten SM, Frenkel J and Waterham HR.** Isoprenoid biosynthesis in hereditary periodic fever syndromes and inflammation. *Cell Mol Life Sci* 2003; 60: 1118-1134.
47. **Houten SM, Frenkel J, Rijkers GT, Wanders RJ, Kuis W und Waterham HR.** Temperature dependence of mutant mevalonate kinase as a pathogenic factor in hyper-IgD and periodic fever syndrome. *Hum Mol Genet* 2002; 3115-3124.
48. **Houten SM, Koster J, Romeijn GJ, Frenkel J, Di Rocco M, Caruso U, Landrieu P, Kelley RI, Kuis W, Poll-The BT, Gibson KM, Wanders RJ and Waterham HR.** Organisation of the mevalonat kinase (MVK) gene and identification of novel mutations causing mevalonic aciduria and hyperimmunoglobulinaemia D and periodic fever syndrome. *Eur J Hum Genet* 2001, 9: 253-259.

49. **Houten SM, Kuis W, Duran M, de Koning TJ, Royen-kerkhof A, Romeijn GJ, Frenkel J, Dorland L, de Barse MM, Huijbers WA, Rijkers GT, Waterham HR, Wanders RJ and Poll-The BT.** Mutations in MVK, encoding mevalonate kinase, cause hyperimmunoglobulinemia D and periodic fever syndrome. *Nat Genet* 1999; 22: 175-177.
50. **Houten SM, Van Woerden CS, Wijburg FA, Wanders RJ and Waterham HR.** Carrier frequency of the V377I (1129G>A) MVK mutation, associated with hyper-IgD and periodic fever syndrome, in the Netherlands. *Eur J Hum Genet* 2003; 11:196-200.
51. **Huggins ML, Radford PM, McIntosh RS, Bainbridge SE, Dickinson P, Draper- Morgan KA, Tighe PJ, Powell PJ, and Todd I.** Shedding of mutant tumor necrosis factor receptor superfamily 1A associated with tumor necrosis factor receptor-associated periodic syndrome: differences between cell types. *Arthritis Rheum* 2004; 2651-2659]
52. **Hull KM, Drewe E, Aksentijevic I, Singh HK, Wong K, McDermott EM, Dean J, Powell RJ, Kastner DL.** The TNF receptor-associated periodic syndrome (TRAPS): emerging concepts of an autoinflammatory disorder. *Medicine (Baltimore)* 2002; 81:349-368.
53. **International FMF Consortium.** Ancient missense mutations in a new member of the RoRet gene family are likely to cause familial Mediterranean fever. *Cell* 1997; 90:797-807.
54. **Joost PH Drenth, Marcel van Deuren, J.v.d.Ven- Jogekrijg:** Cytokine Activation during attack of the hyperimmunoglobulinemia D and periodic fever syndrome, *Blood* 1995; 85 (12): 3586-93.
55. **Joost PH, Drenth JP, van der Meer JW.** Hereditary periodic fever. *N Engl J Med* 2001; 345:1748-1757.
56. **Jung T, Schauer U, Heusser C, Rieger CJ.** Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *J Immunol Methods* 1993; 159:198.
57. **Kelley RI and Herman GE.** Inborn errors of sterol biosynthesis. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2001; 2: 299-341.
58. **Kern P, Hemmer CJ, Gallati H, Neifer S, Krennsner P, Dietrich M, Porzsoft F.** Soluble tumor necrosis factor receptors correlate with parasitemia and disease severity in human malaria. *J Infect Dis* 1992; 166: 930.
59. **Kushner I, Jiang SL, Zhang D, Lozanski G, Samols D.** Do post-transcriptional mechanisms participate in induction of C-reactive protein and serum amyloid A by IL-6 and IL-1? *Ann NY Acad Sci.* 1995; 762:102-107.
60. **Lange RD.** Cyclic neutropenia. Review of clinical manifestation and management. *Am J Paediatr Hematol Oncol* 1981;3:363-7.
61. **Livneh A, Langevitz P, Zemer D, Zaks N, Kees S, Lidar T et al.** Criteria for the diagnosis of familial Mediterranean fever. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 1879-1885.
62. **Livneh V, Langevitz P.** Diagnostic and treatment concerns in familial Mediterranean fever. *Baillieres best Pract Res Clin Rheumatol* 2000; 14:477-98.
63. **Lobito AA, Kimberley FC, Muppidi JR, Komarow H, Jackson AJ, Hull KM, Kastner DL, Sreaton GR and Siegel RM.** Abnormal disulfide-linked oligomerization results in ER retention and altered signaling by TNFR1 mutants in the TNFR1 associated periodic fever syndrome (TRAPS). *Blood* 2006.
64. **Long SS.** Syndrome of periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis, and adenitis (PFAPA) – what it isn't. What is it? *J Pediatr* 1999; 135: 1.
65. **Manetti R, Parronchi P, Giudizi M, Piccinni M, Maggi E, Trinchieri G, Romagnani S:** Natural killer cell stimulatory factor(NKSF/IL12) induces h1- type specific immune response and inhibits the development of IL-4-producing cells. *J Exp Med* 1993; 177: 1199.
66. **Marshall GS, Edward KS, Butler J, Lawton AR.** Syndrome of periodic fever, pharyngitis and aphthous stomatitis. *J Pediatr* 1987; 110:43-46.
67. **Martinon F and Tschopp J.** Inflammatory caspases: linking an intracellular innate immune system to autoinflammatory diseases. *Cell* 2004; 117: 561-574.
68. **Martinon F, Burns K and Tschopp J.** The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-1beta. *Mol Cell* 2002; 10:417-426.
69. **Masson C, Simon V, Hoppe E, Insalaco P, Cisse I, Audran M.** Tumor necrosis factor receptor-associated periodic syndrome (TRAPS): definition, semiology, prognosis, pathogenesis, treatment and place related to other periodic joint diseases; *Joint Bone spine* 2004 Jul; 71(4): 284-90.
70. **Matsumoto J, Taniguchi S, Ayukawa K, Sarvotham H, Kishino T, Niikawa N, Hidaka E, Katsujama T, Higuchi T and Sagara J.** ASC, a novel 22-kDa protein, aggregates during apoptosis of human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *J Biol Chem* 1999; 274: 33835-33838.
71. **Matsumoto J, Dowds TA, Schaner P, Chen FF, Ogura Y, Li M, Zhu L, Katsuyama T, Sagara J, Taniguchi S, Gumucio DL, Nunez G and Inohara N.** ASC is an activating adaptor for NF-kappa B and caspase-8-dependent apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 303: 69-73.



72. **McDermott E, Powell R.** Circulating cytokine concentration in familial Hibernian fever. In: Sohar E, Gafin J, Pras M, eds. *Familial Mediterranean fever, 1st International Conference; 1997; Jerusalem, Israel. Tel Aviv: Freund Publishing house, 1997:189.*
73. **McDermott MF, Aksentjevich I, Galon J, McDermott EM, Ogunkolade BW, Centola M, Mansfield E, Gandina M, Karenko I, Pettersson T et al.** Germline mutations in the extracellular domains of the 55 kDa TNF- receptor TNFR1, define a family of dominantly inherited autoinflammatory syndromes. *Cell* 1999; 97:133-144.
74. **McDermott MF, Aksentjevich I.** The autoinflammatory syndromes. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2002; 2:511-516.
75. **McDermott MF, Smilie DM, Powell RJ.** Clinical spectrum of Hibernian fever: a 14- year follow-up study of the index case and extended family. *Mayo Clin Proc* 1997 72: 806-817.
76. **Montero MT, Hernandez O, Suarez Y, Matilla J, Ferruelo AJ, Martinez- Botas J, Gomez-Coronado D and Lasuncion MA.** Hydroxymethylglutaryl- coenzyme A reductase inhibition stimulates caspase-1 activity and TH1- cytokine release in peripheral blood mononuclear cells. *Atherosclerosis* 2000; 153: 303-313.
77. **Montero MT, Matilla J, Gomez- Mampaso E and Lasuncion MA.** Geranylgeraniol regulates negatively caspase-1 autoprocessing: implication in the TH1- response against Mycobacterium tuberculosis. *J Immunol* 2004; 173:4936-4944.
78. **Mosmann TR, Coffman RL, TH1 and TH2 cells.** Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Ann Rev Immunol* 1989; 7:145-173.
79. **Nowlan M, Drewe E, Bulsara H, Esposito N, Robins RA, Tighe PJ, Powell RJ, Todd I.** Systemic cytokine levels and the effect of etanercept in TNF- receptor associated periodic syndrome (TRAPS) involving a C33Y mutation in TNFRSF1A. *Rheumatology* 2006; 45:31.
80. **Obici L, Manno C, Muda AO, Picco P, D'Ossualdo A, Palladini G, Avanzini MA, Torres D, Marciano S, Merlini G.** First report of systemic reactive (AA) Amyloidosis in a patient with the hyperimmunoglobulinaemia D with periodic fever syndrome. *Arthritis Rheum* 2004; 50:2966-2969.
81. **Orbach H, Ben- Chertrit.** Familial mediterranean fever- a review and update. *Minerva Med* 2001 Dec; 92(6):421-30.
82. **Ostuni P, Vertolli U, Marson P.** Atypical hyperimmunoglobulinaemia D syndrome with amyloidosis: an overlap with familial Mediterranean Fever? *Clin Rheumatol* 1996; 15:610-612.
83. **Ovetchkine P, Bry ML, Reinert P. Marshall syndrome.** results of a retrospective national survey. *Arch Pediatr* 2000; 7 Suppl 3: 578s.
84. **Padeh S, Brezniak N, Zemer D, Pras E, Livneh A, Langevitz P, Migdal A, Pras M, Passwell JH.** Periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis, and adenopathy syndrome: clinical characteristics and outcome. *J Pediatr* 1999; 135: 98.
85. **Pelchen- Matthews A, Parson IJ, Marsh M.** Phorbol ester- induced downregulation of CD4 is a multistep process involving dissociation from p53lck, increased association with clathrin-coated pits, and altered endosomal sorting. *J Exp Med* 1993; 178:1209.
86. **Petrovsky N, McNair, Harrison LC.** Diurnal rhythms of proinflammatory cytokines: Regulation by plasma cortisol and therapeutic implications. *Cytokine* 1998; 10: 307-312.
87. **Prussin C, Metcalfe DD.** Detection of intracytoplasmatic cytokine using flow cytometry and directly conjugated anti- cytokine antibodies. *J Immunol Methods* 1995; 188:117.
88. **Prussin C.** Cytokine flow cytometry: understanding cytokine biology at the single cell level. *J Clin Immunol* 1997; 17:195.
89. **Richards N, Schaner P, Diaz A, Stuckey J, Ahelden E, Wadhwa A and Gumucio DL.** Interaction between Pvrin and the Apoptotic Speck Protein (ASC) Modulates ASC- induced Apoptosis. *J Biol Chem* 2001; 276: 39320-39329.
90. **Rigate D, Ansuini V, Bertoni B, Pugliese AL, Avallone L, Federico G, Stabile A.** Treatment with Anakinra in the Hyperimmunoglobulinaemia D/ periodic fever syndrome. *Rheumatol Int.* 2006 Nov; 27(11):97-100]. der Meer JW: Hereditary periodic Fever. *N Engl J Med* 2001; 345:1748-1757.
91. **Romagnani S.** Biology of human TH1 and TH2 cells. *J Clin Immunol* 1995; 15:12.
92. **Schindler R, Mancilla J, Endres S; Ghorbani R, Clark SC, Dinarello CA.** Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1 and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF. *Blood* 1990; 75:40- 47.
93. **Siebert S, Amos N, Fielding CA, Wang EC, Aksentjevich I, Williams BD and Brennan P.** Reduced tumor necrosis factor signaling in primary human fibroblasts containing a tumor necrosis factor receptor superfamily 1A mutant. *Arthritis Rheum* 2005; 52:1287-1292.
94. **Siebert S, Fielding CA, Williams BD and Brennan P.** Mutation of the extracellular domain of tumor necrosis factor receptor 1 causes reduced NF- kappaB activation due to increased surface expression. *FEBS Lett* 2005; 579:5193-5198
95. **Simon A, Bodar EJ, van der Hilst, van der Meer JW, Fiselier TJ, Cuppen MP, and Drenth JP.** Beneficial response to interleukin- 1 receptor antagonist in traps. *Am J Med* 2004; 117: 208-210.

96. **Simon A, Drewe EJ, van der Meer JW, Powell RJ, Kelley RI, Stahlenhoef AF and Drenth JP.** Simvastatin treatment for inflammatory attacks of the hyperimmunoglobulinemia D and periodic fever syndrome. *Clin Pharmacol Ther* 2004; 75:476-483.
97. **Simon A, Mariman EC, van der Meer JWM and Drenth JPH.** A founder effect in the hyperimmunoglobulinemia D and periodic fever syndrome. *Am J Med* 2003; 114:148-152.
98. **Simon A, van der Meer JWM.** Pathogenesis of familial periodic fever syndromes or hereditary autoinflammatory syndromes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007; 292: R86-98
99. **Srinivasula SM, Poyet JL, Razmara M, Datta P, Zhang Z and Alnemri ES.** The PYRIN\_CARD protein ASC is an activating adaptor for caspase -1. *J Biol Chem* 2002; 277:21119-21122.
100. **Stehlik C, Fiorentino L, Dorfleutner A, Bruey JM, Ariza EM, Sagara J and Reed JC.** The PAD/PYRIN- Family Protein ASC Is a Dual Regulator of a Conserved Step in Nuclear Factor kappaB Activation Pathways. *J Exp Med* 2002; 196: 1605-1615.
101. **Stojanov S, Hoffmann F, Kéry A, Renner E, Zellerer S, Lohse P, Fraunberger P, Malley JD, Albert MH, Belohradsky BH.** Cytokine profile in PFAPA syndrome suggests continuous inflammation and reduced anti-inflammatory response. *Eur Cytokine Netw.* 2006 Jun;17(2):90.
102. **Stojanov S, McDermott MF.** The tumour necrosis factor receptor-associated periodic syndrome: current concepts. *Expert Rev Mol Med.* 2005; 7:1-18.
103. **Thomas KT, Feder HM, Lawton AR, Edwards KM.** Periodic fever syndrome in children. *J Pediatr* 1999; 135:15-21.
104. **Tilg H, Trehu E, Atkins MB, Dinarello CA, Mier JW.** Interleukin-6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor p55. *Blood* 1994; 83:113-118.
105. **Ting JP, Kastner DL and Hoffmann HM.** CATERPILLERS, pyrin and hereditary immunological disorders. *Nat rev Immunol* 2006; 6: 183-195.
106. **Todd I, Radford PM, Daffa N, Bainbridge SE, Powell RJ, Tighe PJ.** Mutant tumor necrosis factor receptor associated with tumor necrosis factor receptor-associated periodic syndrome is altered antigenically and is retained within patients' leukocytes. *Arthritis Rheum* 2007; 56:2765-73.
107. **Todd I, Radford PM, Draper- Morgan KA, McIntosh R, Bainbridge S, Dickinson P, Jamhawi L, Sansaridi M, Huggins ML, Tighe PJ et al.** Mutant forms of tumor necrosis factor receptor I that occur in TNF-receptor-associated periodic syndrome retain signalling functions but show abnormal behaviour. *Immunology* 2004; 113:65-79.
108. **Trinchieri G.** Interleukin-12 and its role in the generation of TH1-cells. *Immunol Today* 1993; 14:335.
109. **van der Hilst JC, Simon A, Drenth JP.** Hereditary periodic fever and reactive amyloidosis; *Clin Exp Med* 2005 oct; 5(3):87-98.
110. **van der Meer JWM, Vossen JM, Radl J, Van Nieuwkoop JA, Meijer CJLM, Lobatto S, Van Furth R.** Hyperimmunoglobulinemia D and periodic fever: A new syndrome. *Lancet i* 1994; 1087-90.
111. **Williamson LM, Hull D, Mehta R, Reeves WG et al.** Familial Hibernian fever. *Q J Med* 1982; 204:469-80.
112. **Wysocka M, Kubin M, Vieira LQ, Ozmen L, Garotta G, Scott P, Trinchieri G.** Proinflammatory and Immunoregulatory functions of IL-12. *Eur J. Immunol.* 1995; 25: 672-676.
113. **Yu JW, Wu J, Zhang Z, Datta P, Ibrahimi I, Taniguchi S, Sagara J, Fernandes- Alnemri T and Alnemri ES.** Cryopyrin and pyrin activate caspase-1, but not NF-kappaB, via ASC oligomerization. *Cell Death Differ* 200; 13:236-249.

## 8 Curriculum Vitae

<b><u>Persönliche Daten:</u></b>	<b>Name:</b> <b>Anja Elisabeth Kéry- Candela</b> <b>Geburtsdatum:</b> 07.08.1974 <b>Geburtsort:</b> München <b>Familienstand:</b> verheiratet, 2 Kinder <b>Nationalität:</b> deutsch <b>Eltern:</b> Dipl. Ing. Bálint Kéry, Maria Anna Kéry
<b><u>Berufliche Tätigkeit:</u></b>	Seit Jan 2009 Assistenzärztin der Plastischen, Ästhetischen und Wiederherstellungschirurgie (Univ. Doz. Dr. A. Gardetto) Krankenhaus Brixen, Südtirol/ Italien  Feb- Dez 2008 Ärztliche Leiterin der klinischen Pathologie (Chefarzt Dr. M. Ogriseg), Krankenhaus Brixen, Südtirol/ Italien
<b><u>Wissenschaftliche Arbeiten:</u></b>	<p><b>Publikationen</b></p> <p>* Periodic fever due to a novel TNFRSF1A mutation in a heterozygous Chinese carrier of MEFV E148Q.  Stojanov S, Lohse P, McDermott MF, Renner ED, Kéry A, Mirakian R, Hammond LJ, Aganna E, Hoffmann F, Zellerer S, Belohradsky BH  Rheumatology (Oxford). 2004 Apr;43(4):5126-7.</p> <p>* Molecular analysis of the MVK and TNFRSF1A genes in patients with a clinical presentation typical of the hyperimmunoglobulinemia D with periodic fever syndrome: a low-penetrance TNFRSF1A variant in a heterozygous MVK carrier possibly influences the phenotype of hyperimmunoglobulinemia D with periodic fever syndrome or vice versa.  Stojanov S, Lohse P, Lohse P, Hoffmann F, Renner ED, Zellerer S, Kéry A, Shin YS, Haas D, Hoffmann GF, Belohradsky BH.  Arthritis Rheum. 2004 Jun;50(6):1951-8</p> <p>*Identification of a novel mevalonate kinase gene mutation in combination with the common MVK V377I substitution and the low-penetrance TNFRSF1A R92Q mutation.  Hoffmann F, Lohse P, Stojanov S, Shin YS, Renner ED, Kéry A, Zellerer S, Belohradsky BH. Eur J Hum Genet. 2005 Apr;13(4):510-2.</p> <p>* Cytokine profile in PFAPA syndrome suggests continuous inflammation and reduced anti- inflammatory response.  Stojanov S., Hoffmann F., Kéry A., et al. Eur Cytokine Netw. 2006 Jun;17(2):90-7.</p> <p><b>Poster</b></p> <p>Pädiatrischer Kongress in Bonn (2003)  Intrazelluläres Zytokinprofil und Zytokine im Serum bei 6 Patienten mit PFAPA-Syndrom (Periodisches Fieber, Adenitis, Pharyngitis, Aphthöse Stomatitis) im fieberfreien Intervall und im akuten Fieberschub  F. Hoffmann, S. Stojanov, A. Kéry, E. Renner, S. Zellerer, P. Lohse, M. Albert, B.H. Belohradsky</p> <p><b>Okt 2004</b></p> <p>Abstract für die European Society of Immunodeficiencies, Versailles:  Cytokine dysbalance with induction of proinflammatory mediators and reduced anti-inflammatory response in PFAPA-syndrome  F. Hoffmann, S. Stojanov, A. Kery ,E. Renner, S. Zellerer, K. Schmid, P. Lohse, M. Albert, B. H. Belohradsky</p>

**Ausbildung:**

Okt 2004	3. Medizinisches Staatsexamen an der LMU
Mrz 2003	2. Medizinisches Staatsexamen an der LMU
Mrz 2001	1. Medizinisches Staatsexamen an der LMU
Sept 1999	Physikum an der LMU in München
Okt 1997	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der LMU-München
Okt 1996	Beginn des Biologiestudiums an der Ludwig- Maximilian-Universität (LMU) in München
Mrz 1996	3- monatiger Arbeitsaufenthalt in Südafrika, (Großwild-Jagd- Co.-Leiterin)
Nov.1995	Graphik- Praktikum in der Werbeagentur Stawicki in München
Sept 1994	13- monatiger Arbeitsaufenthalt in den USA (Washington D.C., Chicago)
Juli 1994	Abitur am naturwissenschaftlichen und neusprachlichen Gymnasium in Otterbrunn

**Med. Praktika:****Praktisches Jahr:**

Ab April 2004	letztes Tertial des PJ- Abschnittes im Bürgerspital Solothurn (Schweiz), Gynäkologie und Geburtshilfe (Chefärztin Dr. F. Maurer)
Ab Feb 2004	2- monatige PJ- Tätigkeit in der Universitätsklinik Royal North Shore Hospital, Sydney, Australien, Visceral- (Prof. Ross Smith) und Neurochirurgie
Ab Dez 2003	2- monatige PJ- Tätigkeit in Klinikum Innenstadt, Universitätsklinikum der LMU- München, Vaskuläre Chirurgie (Prof. Dr. Steckmeier) und chirurgische Notfallambulanz (Dr. Kranz)
Ab Aug 2003	4- monatiger PJ- Abschnitt in Sanitätsbetrieb Bozen, Italien, Innere Medizin (Prim. Dr. Mario Marchesi)

**Famulaturen:**

Aug 2002	Pädiatrie, Universitätsklinik Dr .v. Haunersches Kinderspital, München
Feb/Mrz 2002	Neurologie, (Prof. Dr. Marx), Universitätsklinikum Benjamin Franklin , Berlin
Aug 2001	Neonatologie und Kinderkardiologie (PD Fr. Dr. Genzel), Klinikum Großhadern
Sept/Okt 2000	Kinderchirurgie, (Prof. Dr. Dietz) Universitätsklinik Dr .v. Haunersches Kinderspital, München
Okt. 1999	Endokrinologie, Praxis Dr. Mojto, Prinzregentenplatz, München

## 9 Danksagung

Ganz herzlich möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Belohradsky für die Möglichkeit, in seiner Abteilung für Infektionsimmunologie promovieren zu dürfen.

Für die interessante Aufgabenstellung, die Betreuung und die Korrekturen, die wesentlich zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen haben, danke ich Frau Dr. Stojanov.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Florian Hoffmann. Seine Anleitung zum wissenschaftlichen Denken und Arbeiten, seine motivierte Mitbetreuung, sowie sein Interesse am Fortgang der Arbeit waren außergewöhnlich.

Zudem möchte ich mich bei allen weiteren Mitarbeitern des Infektions-Immunologischen Labors des Dr. von Haunerschen Kinderspitals, namentlich hier Sabine Meier bedanken. Sie alle standen mir immer hilfreich zur Seite und integrierten mich als Doktorandin einzigartig in ihre Abteilung.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Patienten und Eltern bedanken, ohne deren außerordentlich ausdauernde Mitarbeit diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Nicht zuletzt ein herzliches Dankeschön an meinen besten Freund und Ehemann Kilian für seine unendliche Geduld und seine liebe und tatkräftige Unterstützung während der Fertigstellung der Doktorarbeit.

Mein Dank geht aber vor allem auch an meine Eltern, die mir das Studium der Medizin ermöglicht haben. Ihnen ist diese Arbeit gewidmet.