

Aus der Kinderklinik und Poliklinik

der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. C. P. Speer

**Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME)-spezifische IgG Antikörper
Konzentration, IgG Antikörper Avidität und FSME-spezifische T-Zell-
Antwort nach primärer Vakzinierung bei Kindern mit
Juveniler idiopathischer Arthritis**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Ricarda Charlotte Stern

aus Berlin

Würzburg, Juli 2019

Referentin: Professor Dr. Martina Prelog
Koreferent: Professor Dr. Carsten Scheller
Dekan: Professor Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 06.11.2020

Die Promovendin ist Ärztin.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Juvenile idiopathische Arthritis	1
1.1.1 Klassifikation der JIA	1
1.1.2 Pathogenese und -physiologie	4
1.1.3 Diagnostisches Vorgehen.....	6
1.1.4 Therapiekonzept.....	8
1.1.5 Krankheitsaktivität und -remission	11
1.2 Das Immunsystem	12
1.2.1 Unspezifisches Immunsystem	13
1.2.2 Spezifisches Immunsystem	15
1.2.2.1 Zelluläre Immunantwort	15
1.2.2.2 IFN- γ	18
1.2.2.3 T-Zell Subpopulationen.....	19
1.2.2.4 Humorale Immunantwort	19
1.3 Der Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus	21
1.3.1 Die Gattung der Flaviviren.....	22
1.3.2 Verlauf nach Infektion mit FSME-Viren.....	23
1.3.3 Diagnostik und Behandlungsmöglichkeiten	23
1.3.4 Die FSME-Impfung	24
1.3.5 Überprüfung des Impferfolges nach FSME-Immunisierung	26
1.3.6 Immunreaktion auf die FSME-Impfung	27
1.4 Rationale	27
2 Material und Methoden	30
2.1 Population	30
2.1.1 Patienten mit JIA	30

2.1.2 Immunologisch gesunde Probanden	30
2.1.3 Ein- und Ausschlusskriterien	30
2.2 Material	31
2.2.1 Antikörper	31
2.2.2 Chemikalien.....	32
2.2.3 Gerätschaften	32
2.2.4 Lösungen	33
2.2.5 Testsysteme	33
2.2.6 Verbrauchsmaterialen	34
2.3 Methoden	34
2.3.1 Isolierung von Lymphozyten	35
2.3.2 Kryokonservierung von Lymphozyten.....	36
2.3.3 Serumisolierung.....	36
2.3.4 Anti-FSME-Viren-ELISA	37
2.3.5 Anti-FSME-Viren-ELISA zur Aviditätsbestimmung	39
2.3.6 IFN- γ -ELISA	40
2.3.7 FSME-Antikörper-Neutralisationstest	42
2.3.8 Bestimmung FSME-spezifischer T-Zellen	43
2.3.8.1 FSME-Antigen stimulierte Zellkultur	43
2.3.8.2 IFN- γ Secretion Assay	44
2.3.8.3 Magnetische Zellseparation.....	45
2.3.8.4 Durchflusszytometrie	47
2.3.8.5 Phenotypisierung durch extrazelluläre Fluoreszenzfärbung	49
2.3.9 Statistische Datenauswertung	51
3 Ergebnisse	52

3.1 Demographische Daten.....	52
3.2 FSME-spezifische humorale Immunreaktion	59
3.2.1 Die IgG-anti-FSME-Konzentration	59
3.2.2 Die IgG-anti-FSME-Avidität	59
3.2.3 Der FSME-Neutralisations-Titer.....	60
3.2.4 Korrelationen des humoralen Immunsystems	60
3.3 FSME-spezifische zelluläre Reaktivität	66
3.3.1 IFN- γ -Produktion der T-Zellen nach Stimulation mit dem FSME-Antigen.....	66
3.3.2 IFN- γ -Produktion der T-Zellen nach Stimulation mit dem PHA.....	72
3.3.3 IFN- γ -Konzentration im Überstand der Zellkulturen.....	73
3.3.4 Korrelationen des zellulären Immunsystems	75
3.3.4.1 Zusammenhänge innerhalb der zellulären Parameter.....	75
3.3.4.2 Zusammenhang der zellulären Ergebnisse mit den demographischen Daten	76
3.4 Zusammenhang der humoralen und zellulären FSME-Immunantwort	79
4 Diskussion	81
4.1 Immunogenität nach FSME-Vakzinierung bei JIA-Patienten und HC.....	81
4.1.1 Aspekte der humoralen Immunreaktion.....	81
4.1.2 Aspekte der zellulären Immunreaktion	84
4.2 Korrelation des humoralen und zellulären Immunsystems in Bezug auf die FSME-Immunität.....	86
4.3 Relevanz der FSME-Boosterimpfungen	87
4.4 Einfluss der DMARD-Therapie auf die FSME-Impfantwort.....	89
4.5 Limitationen und Ausblick.....	91
4.5.1 Heterogenität der Studienpopulation	91

4.5.2 Methodisch-technische Limitationen.....92

4.5.3 Zukünftige Datenerhebung.....92

5 Zusammenfassung.....94

Literaturverzeichnis

Danksagung

Lebenslauf

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Pathomechanismen der Gelenkentzündung bei JIA	6
Abbildung 2: Therapiekonzept der JIA.....	9
Abbildung 3: Medikamentöse Behandlung der JIA-Patienten im Wandel	11
Abbildung 4: Zweidimensionales Modell eines Immunglobulin G.....	20
Abbildung 5: Dichtegradzentrifugation	36
Abbildung 6: Ablauf des Anti-FSME-Viren-ELISA	38
Abbildung 7: Standardkurve des IFN- γ -ELISAs	42
Abbildung 8: Darstellung des IFN- γ Secretion Assays.....	44
Abbildung 9: Darstellung der magnetischen Zelltrennung	46
Abbildung 10: Darstellung eines Durchflusszytometers.....	48
Abbildung 11: Durchflusszytometrie-Punktdiagramm	49
Abbildung 12: Korrelation der IgG-anti-FSME-Konzentration (A), - Avidität (B) und dem NT (C) mit Anzahl der FSME-Impfungen.....	62
Abbildung 13: CD4+CD69+ und CD8+CD69+ T-Zellen im IFN- γ -Gate bei JIA-Patienten und HC (Dotplots)	68
Abbildung 14: Prozentueller Anteil IFN- γ -positiver Zellen der aktivierten CD4+ und CD8+ T-Zellen nach Stimulation mit dem FSME-Antigen	69
Abbildung 15: Prozentueller Anteil IFN- γ -positiver Zellen der CD4+CD69+ T-Zell Subpopulationen nach Stimulation mit dem FSME-Antigen.....	70
Abbildung 16: Prozentueller Anteil IFN- γ -positiver Zellen der CD8+CD69+ T-Zell Subpopulationen nach Stimulation mit dem FSME-Antigen.....	71
Abbildung 17: Prozentueller Anteil IFN- γ -positiver Naiver-T-Zellen nach FSME-Antigen Stimulation.....	72
Abbildung 18: IFN- γ -Konzentration im Überstand der Zellkulturen	74
Abbildung 19: Prozentueller Anteil IFN- γ -positiver T-Zellen in Abhängigkeit von der Anzahl der FSME-Impfungen.....	76

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Subtypen der JIA	3
Tabelle 2: Schematische Übersicht des menschlichen Immunsystems	13
Tabelle 3: Typen der T-Lymphozyten	18
Tabelle 4: FSME-Impfschemata	25
Tabelle 5: Verwendete Antikörper	32
Tabelle 6: Verwendete Chemikalien	32
Tabelle 7: Verwendete Gerätschaften	33
Tabelle 8: Verwendete Lösungen	33
Tabelle 9: Verwendete Testsysteme	34
Tabelle 10: Verwendete Gebrauchsmaterialien	34
Tabelle 11: Färbepanel zur Phänotypisierung im Durchflusszytometer	50
Tabelle 12: Definierte durchflusszytometrische Gates	50
Tabelle 13: Demographische Daten der JIA-Patienten und HC	54
Tabelle 14: JIA-Patienten spezifische Daten	56
Tabelle 15: Medikamente der JIA-Patienten	58
Tabelle 16: IgG-anti-FSME-Konzentration	59
Tabelle 17: IgG-anti-FSME-Avidität	60
Tabelle 18: FSME-Neutralisations-Titer	60
Tabelle 19: Korrelation demographischer Daten und humoraler Parameter in JIA-Patienten	64
Tabelle 20: Korrelation demographischer Daten und humoraler Parameter in HC	65
Tabelle 21: Korrelationstabelle medikamentöser Therapie und humoraler Parameter der JIA-Patienten	66
Tabelle 22: IFN-γ-Produktion der T-Zellen nach Stimulation mit dem FSME-Antigen	67
Tabelle 23: IFN-γ-Produktion der T-Zellen nach Stimulation mit PHA	73
Tabelle 24: IFN-γ-Konzentration im Überstand der Zellkulturen	74
Tabelle 25: Korrelationstabelle innerhalb der zellulären Parameter	75
Tabelle 26: Korrelation der zellulären Ergebnisse mit den demographischen Daten	78
Tabelle 27: Korrelation der humoralen und zellulären FSME- Immunantwort	80

Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
ALAT	Alanin-Aminotransferase
ANA	Antinukleäre Antikörper
ASAT	Aspartat-Aminotransferase
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
CCP	Cyklische citrullinierte Peptid-Antikörper
CD	engl. <i>cluster of differentiation</i>
Ch.-B.	Chargen-Bezeichnung
CK	Creatinkinase
CrP	C-reaktives Protein
dl	Deziliter
DMARD	engl. <i>disease-modifying anti-rheumatic drug</i>
ELISA	engl. <i>enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ENA	Extrahierbare nukleäre Antigene
FACS	engl. <i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FKS	Fetales Kälberserum
FSME	Frühsommer-Meningoenzephalitis
GC	Glucocorticoide
g	Gramm
ggf.	gegebenenfalls
HC	engl. <i>healthy controls</i>
HLA	Humane Leukozyten-Antigene
HRP	engl. <i>horseradish peroxidase</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
ILAR	International League of Associations for Rheumatology
IL	Interleukin
JIA	Juvenile idiopathische Arthritis
LDH	Lactatdehydrogenase
MACS	engl. <i>magnetic-activated cell sorting</i>
ml	Milliliter
mM	Millimol pro Liter

MMP	Matrix-Metalloprotease
MRT	Magnetresonanztomographie
MTX	Methotrexat
nm	Nanometer
nl	Nanoliter
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NSAR	nichtsteroidale Antirheumatika
NT	Neutralisations-Titer
PBMCs	engl. <i>peripheral blood mononuclear cells</i>
pfu	engl. <i>plaque forming units</i>
pg	Pikogramm
PHA	Phytohämagglutinin
rpm	engl. <i>revolutions per minute</i>
RA	Rheumatoide Arthritis
RAI	Relativer Aviditätsindex
RF	Rheumafaktor
STIKO	Ständige Impfkommision
Tbl.	Tablette
Tc	Zytotoxische T-Zelle
TCR	engl. <i>t-cell receptor</i>
TEMRA	Terminal differenzierte Effektor-Gedächtnis-T-Zellen
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
Treg	Regulatorische T-Zelle
u. a.	unter anderem
v. a.	vor allem
VIEU	engl. <i>Vienna units</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Juvenile idiopathische Arthritis

Das kindliche Rheuma geht mit vielseitigen Erscheinungsbildern und Symptomkomplexen einher, die sowohl zu kurz- als auch langfristigen Lebenseinschränkung führen können [1]. Neben Schmerzen in den betroffenen Gelenken kann es auch zu deutlicher Reduktion der Bewegungsfreiheit kommen. Dies kann die Lebensqualität der Kinder sehr beeinträchtigen. In Deutschland erkranken 750-900 Kinder pro Jahr an der Juvenilen idiopathischen Arthritis (JIA) [2]. Damit zählt sie zu den häufigsten chronischen Erkrankungen im Kindesalter [3].

1.1.1 Klassifikation der JIA

Nach der International League of Associations for Rheumatology (ILAR) stehen unter dem Begriff der Juvenilen idiopathische Arthritis sieben Subtypen. Obwohl sehr heterogene Krankheitsverläufe die Regel sind, müssen bestimmte Voraussetzungen erfüllt sein, um die Diagnose der JIA zu stellen. Dazu zählen

- der Beginn der Erkrankung vor dem 16. Lebensjahr,
- die Dauer der Beschwerden über sechs Wochen und
- die unklare Ätiologie der Erkrankung [4].

Die Subtypen sind in Tabelle 1 dargestellt. Sie unterscheiden sich sowohl in der Anzahl der betroffenen Gelenke und dem Antikörper Verhalten als auch in der Beteiligung der Haut, Sehnen und Bindehaut. Insgesamt sind bei allen kindlichen Rheumaformen, außer bei der Enthesitis-assoziierte Arthritis (EAA), Mädchen häufiger betroffen als Jungen. Das mittlere Alter des Erkrankungsbeginns liegt bei sechs Jahren, wobei sich die Oligoarthritis (OA) schon mit durchschnittlich vier Jahren manifestieren kann und die EAA und Rheumafaktor-positiven Polyarthritis (RF+ PA) erst mit durchschnittlich 11-12 Jahren [4].

Der mit Abstand häufigste Subtyp ist die Oligoarthritis mit einer relativen Häufigkeit von 50-55 %. Typisch ist ein asymmetrischer Befall von maximal vier großen

Gelenken. Meist sind die Sprung- oder Kniegelenke betroffen. Eine häufige Komplikation ist die Uveitis anterior, die bei jedem fünften Patienten auftritt. In bis zu 70 % der Fälle können Antinukleäre Antikörper (ANA) im Blut nachgewiesen werden. Man unterscheidet weiterhin die erweiterte von der persistierenden OA, wobei die letztere von allen Subtypen die beste Prognose hat [4], [5].

Die zweithäufigsten kindlichen Rheumaformen sind die Rheumafaktor-negative Polyarthrit (RF- PA) und Enthesitis-assoziierte Arthritis in 15-20 % beziehungsweise in 10-15 % der Fälle. Klinische Kennzeichen der RF- PA sind ein symmetrischer Gelenkbefall von fünf oder mehreren kleinen und großen Gelenken, und bei der Hälfte der Patienten werden ANA nachgewiesen. Die EAA ist assoziiert mit der Insertionstendopathie und betrifft meist asymmetrisch die Gelenke der unteren Extremitäten, wie zum Beispiel den Ansatz der Achillessehne oder der Aponeurosis plantaris. 70 % der Patienten sind Humanes Leukozyten-Antigene (HLA)-B27 positiv. Die Erkrankung ist oft remittierend und verläuft milde. In manchen Fällen kann es jedoch zu einem Progress der Beschwerden kommen und zum klinischen Bild einer Spondylitis ankylosans (Morbus Bechterew) [1], [4].

Mit circa 5 % stehen die Psoriasisarthritis (PsA) und die Systemische Arthritis (sJIA) hinsichtlich der Häufigkeit an dritter Stelle der sieben Subtypen. Die PsA stellt eine nicht konkret definierte Entität dar. Bei der gleichzeitigen Anwesenheit einer Arthritis und einer Psoriasis oder psoriatischen Eigenschaften gibt es zwei definierte Populationen: eine, die zu der EAA-Kategorie gehört und mit einer Spondylarthropathie einhergeht, und die andere, die der ANA-positiven OA ähnelt, mit dem einzigen Unterschied, dass bei der PsA häufiger kleine Gelenke betroffen sind [6], [7]. Typisch sind hierbei eine Daktylitis und der Befall der Finger oder Zehen im Strahl [4]. Die sJIA, auch bekannt als Morbus Still, ist der verheerendste Subtyp und zeigt einzigartige systemische Merkmale, darunter hohes, wiederkehrendes Fieber, flüchtiges Exanthem, Lymphadenopathie, Hepatosplenomegalie, Polyserositis und schwere Gelenkschmerzen. Die sJIA verläuft in 50 % der Fälle chronisch progredient und ist häufig therapierefraktär [8].

Sehr selten und im klinischen Verlauf der rheumatoiden Arthritis (RA) der Erwachsenen sehr ähnlich ist die Rheumafaktor-positive Polyarthrit (RF+ PA) [4].

Tabelle 1: Subtypen der JIA

Oligoarthritis
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Arthritis in ≤ 4 Gelenke in den ersten 6 Krankheitsmonaten <ul style="list-style-type: none"> - Persistierende OA: Arthritis in ≤ 4 Gelenke über den gesamten Krankheitsverlauf - Erweiterte OA: Arthritis > 4 Gelenk nach den ersten 6 Krankheitsmonaten ▪ Ausschlusskriterien a, b, c, d, e
Rheumafaktor-negative Polyarthritis
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Arthritis in ≥ 5 Gelenke in den ersten 6 Krankheitsmonaten ▪ Der RF-Test ist einmalig negativ ▪ Ausschlusskriterien a, b, c, d, e
Rheumafaktor-positive Polyarthritis
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Arthritis in ≥ 5 Gelenke in den ersten 6 Krankheitsmonaten ▪ Der RF-Test ist zweimalig positiv im Abstand von 3 Monaten in den ersten 6 Krankheitsmonaten ▪ Ausschlusskriterien a, b, c, e
Psoriasisarthritis
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Arthritis und Psoriasis oder Arthritis und mindesten 2 der folgenden Beteiligungen <ul style="list-style-type: none"> - Daktylitis - Nagelbeteiligung: Nagellochfraß, Onycholyse - Psoriasis bei einem Verwandten 1.Grades ▪ Ausschlusskriterien b, c, d, e
Enthesitis-assozierte Arthritis
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Arthritis und Enthesitis oder Arthritis oder Enthesitis mit mindestens 2 der folgenden Erkrankungen <ul style="list-style-type: none"> - Sakroiliitis und/oder entzündlich lumbosakraler Schmerz - HLA-B27 positiv - Akute Uveitis anterior - Arthritis erstmalig bei einem Jungen ≥ 6. Lebensjahr - Stattgehabte Spondylitis ankylosans, Enthesitis-assozierte Arthritis, Sakroiliitis bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankung, Reiter-Syndrom oder akute Uveitis anterior oder eine dieser Erkrankungen bei einem Verwandten 1.Grades ▪ Ausschlusskriterien a, d, e
Systemische Arthritis
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Arthritis ≥ 1 Gelenk über mindestens 2 Wochen mit Fieber und mindestens einem der folgenden Begleiterscheinungen <ul style="list-style-type: none"> - Exanthem - Serositis - Lymphknotenvergrößerungen - Hepato- und/oder Splenomegalie ▪ Ausschlusskriterien a, b, c, d
Nicht klassifizierte Arthritis
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Arthritis, die keine oder ≥ 2 der oben genannten Kriterien erfüllt

Ausschlusskriterien: a: Psoriasis, stattgehabte Psoriasis oder Psoriasis bei Verwandten 1. Grades; b: HLA-B27 positive Arthritis bei einem Jungen ≥ 6. Lebensjahr; c: Spondylitis ankylosans, Enthesitis-assozierte Arthritis, Sakroiliitis bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankung, Reiter-

Syndrom oder akute Uveitis anterior oder eine dieser Erkrankungen bei einem Verwandten 1. Grades; d: RF-Test ist mindestens zweimal im Abstand von 3 Monaten positiv; e: Aktuelle Diagnose einer systemischen JIA. Modifiziert nach der ILAR Klassifikation [9].

1.1.2 Pathogenese und -physiologie

Die Pathogenese der JIA ist zum aktuellen Zeitpunkt nicht abschließend geklärt. Man geht von einem multifaktoriellen Geschehen aus, wobei genetische und umweltbedingte Faktoren das Auftreten und den Verlauf der Erkrankung zu bedingen scheinen [10]. Die Ergebnisse der Studie Thompson et al. unterstützen die Hypothese, dass bestimmte Genpolymorphismen, inklusive mindestens einer HLA-Region, die Prädisposition für JIA beeinflussen [1], [11]. Zum Beispiel sind die Gene CTLA4 und PTPN22 mit der JIA stark assoziiert. Auch bei anderen Autoimmunerkrankungen, wie Hashimoto Thyreoiditis, Diabetes mellitus Typ I und Zöliakie, können diese Gene nachgewiesen werden [12]. Die einzelnen Subtypen der JIA haben heterogene, immungenetische Hintergründe. Es gibt jedoch auch Patienten, die keines der assoziierten Gene tragen. Das Risiko für Familienangehörige, ebenfalls an Rheuma zu erkranken, ist deutlich geringer als bei einer Erkrankung mit einem autosomal-rezessiven Erbgang, jedoch haben die Eltern ein 20-fach und die Geschwister ein 30-fach erhöhtes Risiko, an einer RA beziehungsweise JIA zu erkranken [10].

Es wird angenommen, dass die autoreaktive Immunantwort bei der JIA initial von einem Autoantikörpern oder Autoantigen getriggert wird, das primär das zelluläre Immunsystems aktiviert [13]. Studien zeigen, dass sich aktivierte Gedächtnis-T-Zellen in der Synovia von entzündlichen Gelenken um antigenpräsentierende dendritische Zellen bündeln [14]–[16]. Jedoch nimmt nach dieser ersten Immunreaktion fast das ganze Immunsystem an der darauf folgenden Immunantwort teil. Es kommt nachweislich zu einer Neovaskularisation der Synovia [17], [18] und zu einer verstärkten Migration von Entzündungszellen in das Gewebe. Elektronenmikroskopisch können Lymphozyten, Makrophagen und proliferierte Fibroblasten sowie Makrophagen-ähnliche Synoviozyten nachgewiesen werden [19], [20]. Die verschiedenen T-Zell Populationen, wie Th1, Th2, Th17 und Regulatorische T-Zellen (Treg), spielen eine ausschlaggebende Rolle in der Pathophy-

siologie. Anzeichen lassen vermuten, dass diese nicht mehr separat voneinander, sondern als ein T-Zell-Verband gesehen werden sollten, der sich in einer ständig verändernden, dynamischen Balance befindet [13]. Es herrscht nicht nur eine komplexe chemotaktische Kommunikation zwischen den T-Zellen [19], sie können auch, durch die sogenannte T-Zell Plastizität, zu einer andern Population konvertieren. In der Studie Nistala et al. [21] wird beispielsweise beschrieben, dass Th17-Zellen aus den Gelenken von Kinder mit entzündlicher Arthritis in vitro zu Th17/1-Zellen werden und dabei Eigenschaften von Th1-Zellen annehmen [13]. Die Entzündungszellen sezernieren zahlreiche Zytokine, die in komplexen Netzwerken interagieren und die auto- und parakrine Sekretion der Zellen regulieren [16]. Ein weiterer Schritt der pathologischen Kaskade der JIA ist eine Dysbalance in diesem Netzwerk auf Grund einer unphysiologischen Sekretion diverser Zytokine. So hat sie durch eine hochregulierte Interleukin (IL)-17 Produktion massivste Auswirkung auf das Gewebe, da der IL-17-Rezeptoren auf den Zellen weit verbreitet ist. Es beeinflusst unter anderem die Stimulation von Makrophagen [22], die vermehrte Sekretion von IL-6 und IL-8 [23], die Hochregulation von Matrix-Metalloprotease (MMP) und die Stimulation der Osteoklastogenese durch Induktion des „Receptor Activator of NF- κ B“ (RANK)-Ligand [17], [24], [25]. IL-17 fördert ein proinflammatorisches Zytokin-Milieu in den Gelenken. Die aktivierten Makrophagen sezernieren IL-1, Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) und IL-6. Damit assoziiert ist die Runterregulation von Lymphozyten produzierten TNF- β und Interferon- γ (IFN- γ) [16], [26]. IL-1 und TNF- α stimulieren Fibroblasten, Chondrozyten und Osteoklasten, die gewebezerstörende MMP produzieren [17], [27]. Diese Prozesse führen einerseits durch die Aktivierung der MMP zu Knorpelschädigung und andererseits über die Osteoklastenstimulation zu Knochenerosion [28]. In Abbildung 1 ist der Pathomechanismen der Gelenkentzündung bei JIA schematisch dargestellt.

Abschließend ist wichtig, dass nicht bei allen Subtypen der JIA der Nachweis von Autoantikörpern oder die Assoziationen mit bestimmten HLA-Allelen gelingt und daher unter anderem die systemische JIA nicht als Autoimmunkrankheit, sondern als autoinflammatorische Erkrankung mit einer erhöhten Aktivität des angeborenen Immunsystems beschrieben wird [13].

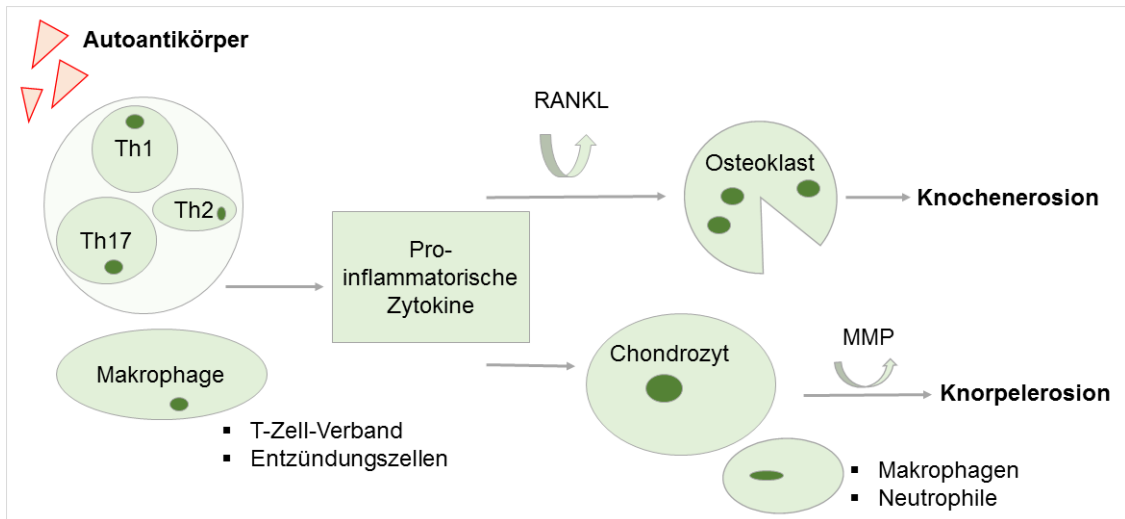


Abbildung 1: Pathomechanismen der Gelenkentzündung bei JIA

Durch Autoantigene werden Entzündungszellen (u. a. Makrophagen, Fibroblasten) und T-Zellen stimuliert, letztere bilden eine Art Verband. Sie sezernieren zahlreiche proinflammatorische Zytokine, durch die Osteoklasten und Chondrozyten stimuliert werden. Durch die erhöhte Produktion von Matrix-Metalloprotease (MMP) kommt es zur Knorpelerosion. Die Osteoklasten verursachen eine Knochenerosion und es kommt zu einer Gelenkentzündung. Modifiziert nach [28].

1.1.3 Diagnostisches Vorgehen

Die JIA ist eine klinische Diagnose. Es gibt keine pathognomonischen Labormarker und mögliche Hinweise auf eine JIA können bei erkrankten Kindern auch normwertig sein. Jedoch helfen die Blutuntersuchungen, um Differentialdiagnosen auszuschließen. Die Bildgebung spielt einerseits eine Rolle zur Ausschlussdiagnostik und andererseits, um das Entzündungsausmaß zu beurteilen. Auf Grund der häufigen Assoziation mit einer Uveitis anterior gehört die regelmäßige Vorstellung beim Augenarzt mit zur Standarddiagnostik. Vor allem, wenn es sich um eine systemische JIA handelt, sollte eine individuelle, organspezifische Diagnostik erfolgen [4], [29]. Zusammengefasst sind die wichtigsten Punkte bei dem Verdacht auf eine JIA folgende:

- Eine ausführliche Anamnese mit der Befragung der Familien-, Auslands- und Traumaanamnese.
- Eine gründliche klinische Untersuchung inklusive Erhebung des Gelenkstatus. Ein arthritisches Gelenk ist an den fünf kardinalen Entzündungszeichen nach Celsus und Galen zu erkennen: *Dolor* (dt. Schmerz), *rubor* (dt. Rötung), *calor* (dt. Überwärmung), *tumor* (dt. Schwellung) und *functio laesa* (dt. Funktionseinschränkung) [30].

- Labordiagnostik
 - Blutbild inklusive Differentialblutbild
 - Entzündungsparameter: C-reaktives Protein (CrP), Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG)
 - Klinische Chemie: Kreatinin, Alanin-Aminotransferase (ALAT), Aspartat-Aminotransferase (ASAT), Harnsäure, Creatinkinase (CK), Lactatdehydrogenase (LDH), Ferritin
 - Immunglobuline (Ig): IgG, IgM, IgA
 - Autoantikörper: ANA, RF, ENA (extrahierbare nukleäre Antigene), CCP (Cyklische citrullinierte Peptid)-Ak
 - Antigen: HLA-B27
 - Infektionsserologie: Borrelien-, FSME-, Streptokokken-, Parvovirus B19-, Salmonellen- und Yersinien-Antikörper und Immunglobuline, Tuberkulosestest
- Bildgebende Diagnostik
 - Arthrosonographie
 - Ggf. Röntgen der Gelenke
 - Ggf. Magnetresonanztomografie (MRT) der Gelenke
- Regelmäßige augenärztliche Kontrollen bei einer erhöhten Gefahr an einer Uveitis anterior zu erkranken.

Das Blutbild kann dahingehend Hinweise auf ein entzündliches Geschehen im Körper geben, wenn eine Leuko- oder Thrombozytose gemessen wird. Die Entzündungswerte im Blut können, müssen bei Kindern mit JIA jedoch nicht erhöht sein - ebenso die Komplementfaktoren. Leber- und Nierenwerte sind in Hinsicht auf eine mögliche Therapie mit NSAR, MTX oder TNF- α -Inhibitoren zu bestimmen. Zur immunologischen Diagnostik gehört die quantitative Messung von ANA, ENA, RF, CCP-Ak und HLA-B27. Um von einer ANA Positivität zu sprechen, muss der Titer bei zwei Messungen $\geq 1:160$ sein. Bei immunologischen Test haben 80 % der Kinder mit OA, 30-40 % der Kinder mit PA und 15-20 % der Kinder mit PsA und einem positiven ANA ein erhöhtes Risiko, an einer Uveitis anterior zu erkranken. ENA sind ein Hinweis für eine Kollagenose. Der Rheumafaktor ist

positiv nach zwei positiven Messungen in einem zeitlichen Abstand von drei Monaten innerhalb der ersten sechs Erkrankungsmonate. CCP-Ak kommen im Vergleich zu den erwachsenen Patienten mit Rheumatoider Arthritis seltener vor [29]. HLA-B27 ist hauptsächlich assoziiert mit EAA.

Zu den wichtigsten Differentialdiagnosen zählen die Coxitis fugax, septische und reaktive Arthritis, Osteomyelitis, Kollagenosen, Vaskulitiden, Malignome und Traumata.

1.1.4 Therapiekonzept

Ziel der Therapie der JIA ist es, Langzeitschäden wie Bewegungseinschränkungen und Wachstumsstörungen, die durch die Gelenkdestruktion oder -kontraktion entstehen, zu verhindern. Die rasche Behebung der Schmerzen ist ebenso relevantes Therapieziel. Voraussetzung dafür ist die rechtszeitige Diagnose der JIA [30]. Zwar gibt es, je nach JIA Subtyp, Unterschiede bei der medikamentösen Therapie, allen gemein ist jedoch die Mitbetreuung durch Physio- und Ergotherapeuten, Thermotherapie, Lymphdrainage und psychologische und soziale Interventionen [4], [30]. Eine grobe Übersicht des Therapiekonzepts der JIA ist in Abbildung 2 zu sehen.

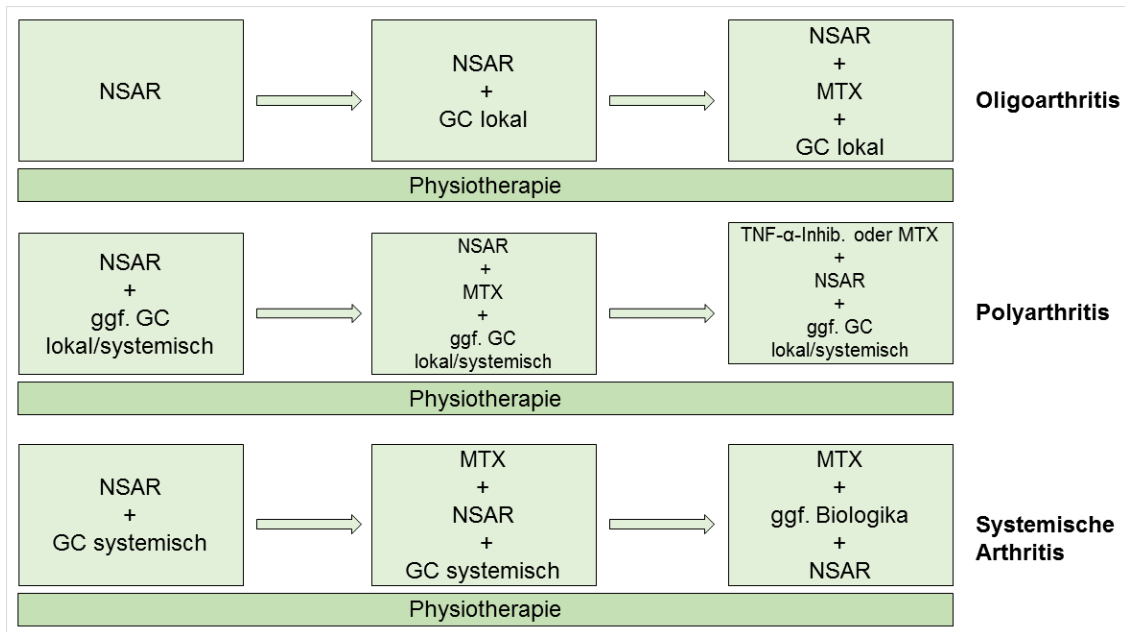


Abbildung 2: Therapiekonzept der JIA

Nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR), Glucocorticoide (GC), Methotrexat (MTX), TNF- α -Inhibitoren (Etanercept, Adalimumab), Biologika (u. a. TNF- α -Inhibitoren, IL-1-Inhibitoren, IL-6-Rezeptor-Inhibitor). Modifiziert nach [30].

Als Mittel der Wahl kommen zu Beginn der Erkrankung nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR) zum Einsatz. Über die Hemmung der Cyclooxygenase wirken sie antiphlogistisch und analgetisch. Eine Wirksamkeit ist unter anderem für Naproxen, Diclofenac, Ibuprofen und Indometacin nachgewiesen. Häufigste Nebenwirkung sind gastrointestinale Beschwerden. Bei hoher Krankheitsaktivität und nicht zuletzt zur Überbrückung des verzögerten Wirkeintrittes der Basistherapie werden Glucocorticoide (GC), sowohl intraartikulär als auch systemisch, verwendet. Sie zeichnen sich durch ihren raschen Wirkeintritt aus. Triamcinolonhexacetonid ist für die intraartikuläre Injektion empfohlen. Es zeigt ein sehr gutes Outcome bezüglich der lokalen Entzündungsaktivität und Schmerzen [30], [31]. Unerwünschte Arzneimittelwirkungen sind vor allem kosmetischer Art in Folge lokaler Fettgewebnekrosen. Iatrogene Gelenkinfektionen sind sehr selten [30].

Für die systemische Applikation von GC gibt es derzeit nur Empfehlungen für die Behandlung der JIA, jedoch keine Therapieleitlinie. So ist die Dauer und die Dosierung der GC Therapie eine individuelle Entscheidung des behandelnden Arztes. Neben den oben genannten Gründen stellen vor allem die sJIA und Organ-

manifestationen der JIA eine Indikation zur systemischen GC-Gabe dar. Das Nebenwirkungsprofil korreliert mit Dauer und Dosierung der Therapie. Gefürchtet sind unter anderem das iatrogene Cushing-Syndrom, Wachstumsstillstand, Infektanfälligkeit und Osteoporose [30], [32].

Obwohl kein genauer Zeitpunkt über den Beginn mit Basistherapeutika (*engl. disease modifying anti-rheumatic drugs*, DMARDs) besteht, sollte nach ausbleibender klinischer Remission unter der Therapie mit einem ausreichend dosierten NSAR über 6-8 Wochen und/oder einer intraartikulären Therapie mit GC der Einsatz von DMARDs diskutiert werden [33]. Der „first choice second-line agent“ der JIA ist Methotrexat (MTX). Jedes zweite Kind mit JIA wird inzwischen hiermit behandelt [4]. MTX inhibiert als Folsäureantagonist die DNA-Synthese, sodass ein antiproliferativer Effekt auf die an der Entzündung beteiligten Zellen vermutet wird [33], [34]. Bei leichten Nebenwirkungen wird der Einsatz von Folsäure empfohlen. Die Kombination von MTX mit NSAR oder GC ist möglich. MTX kann oral oder parenteral verabreicht werden [30]. Manche Patienten zeigen trotz Dosissteigerung kein adäquates Ansprechen auf MTX. Hier kommen nicht-biologische und biologische DMARDs zum Einsatz. Sie greifen auf unterschiedliche Art relativ gezielt in den rheumatischen Entzündungsprozess ein [4]. In Studien wird ein positiver Effekt auf die Reduktion der Krankheitsaktivität von TNF- α -Inhibitoren wie Etanercept und Adalimumab, vor allem bei Oligo- und Polyarthritis, beschrieben. TNF- α -Inhibitoren sind monoklonale anti-TNF Antikörper, die TNF und Lymphotoxin- α effektiv binden und ihre Entzündungsaktivität dadurch inhibieren [35]–[37]. Für Interleukin-Inhibitoren wie Anakinra und Canakinumab (IL-1-Inhibitoren) und Tocilizumab (IL-6-Rezeptor-Inhibitor) ist die Wirksamkeit bei systemischer JIA und zum Teil auch bei Polyarthritis nachgewiesen. Der Einsatz von dem Abatacept (Kostimulationsantagonist) kann bei Versagen der Therapie mit MTX und TNF- α -Inhibitoren bei einer PA erwogen werden. Abatacept ist ein lösliches Fusionsprotein, das durch Bindung an CD80 und CD86 die T-Zell-Aktivierung hemmt [30], [37]. Zu den nicht-biologischen DMARDs gehören unter anderem Leflunomid, Sulfasalazin und Azathioprin. Ihre Verwendung ist in den letzten Jahren deutlich zurückgegangen. Bei allen Biologika sind die Langzeitriskien bei Kin-

den und Jugendlichen noch nicht abschließend bewertbar. Ultima Ratio bei therapieresistenten Verläufen ist in Einzelfällen eine offene oder arthroskopische Synovialektomie [30].

Dass die Therapie der JIA im Wandel ist, zeigen die Daten der Kinder-Kerndokumentation von 2000 bis 2012 (Abbildung 3). Vor allem der Einsatz von NSAR aber auch der von GC ist deutlich rückläufig. DMARDs hingegen nehmen zu, wobei MTX und biologische DMARDs deutlich häufiger verwendet werden als nicht-biologische DMARDs [37].

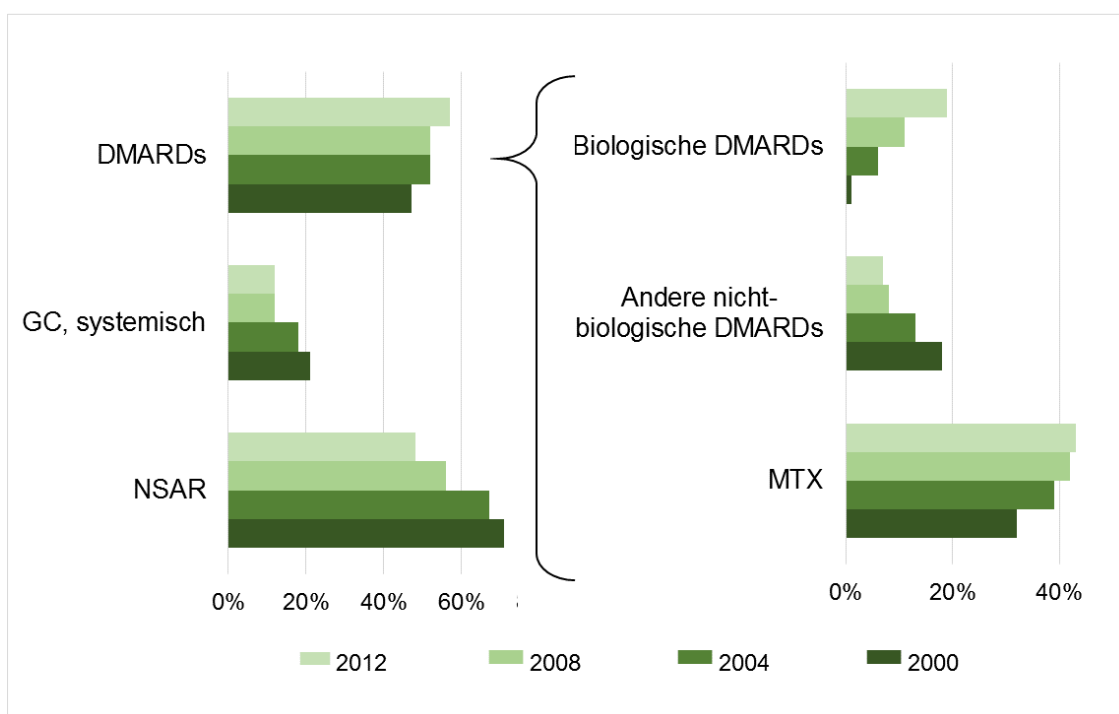


Abbildung 3: Medikamentöse Behandlung der JIA-Patienten im Wandel

Biologische DMARDs: TNF- α -Inhibitoren (Etanercept, Adalimumab), IL-1-Inhibitoren (Anakinra, Canakinumab) und IL-6-Inhibitor (Tocilizumab). Andere, nicht-biologische DMARDs: Leflunomid, Sulfasalazin und Azathioprin. Modifiziert nach Minden et al. [4].

1.1.5 Krankheitsaktivität und -remission

Zur objektiven Beurteilung der Krankheitsaktivität und -remission existieren verschiedene Bewertungskriterien. Um die Krankheitsaktivität der JIA zu beschreiben, sind folgende Scores bekannt: ACR Pedi (American College of Rheumatology Pediatric) Score 30, 50 und 70, JADAS (Juvenile Arthritis Disease Activity Score), DAS28 (Disease Activity Score in 28 joints) und CDAI (Clinical Disease

Activity Index). Der JADAS hat sich als ein valides Instrument für die Einschätzung der Krankheitsaktivität der JIA erwiesen und findet Verwendung im Klinikalltag und in Studien. Er basiert auf einer einfachen arithmetischen Summe von vier klinischen Messungen:

- Ärztlicher Einschätzung der Krankheitsaktivität mittels der Visuelle Analogskala (VAS; 0 [keine Aktivität] - 10 [maximale Aktivität])
- Einschätzung des Wohlbefindens durch den Patient oder die Eltern mittels VAS (0 [sehr gut] - 10 [sehr schlecht])
- Anzahl der akut entzündlichen Gelenke
- Ergebnis der Blutsenkungsgeschwindigkeit

In der Studie Consolaro et al. wurde unter anderem die Bestimmung von Cutoff-Werte im JADAS untersucht, die eine Remission und eine minimale Krankheitsaktivität darstellen. Für die Klassifikation einer inaktiven Erkrankung lag der JADAS bei 1. Der Cutoff-Wert für eine minimale Krankheitsaktivität bei Oligoarthritis lag bei 2 und für Polyarthritis bei 3,8 [38]. Bei der Definition der Remission nach Wallace wird unterschieden zwischen der inaktiven Erkrankung unter Medikamenten für sechs Monate und der inaktiven Erkrankung ohne Medikamente für zwölf Monate [39].

1.2 Das Immunsystem

Der Körper ist ununterbrochen mit pathogenen Antigenen aus der Umwelt konfrontiert. Anatomische und physikalische Hürden, wie die intakte Haut, mukoziliäre Clearance und der niedriger pH-Wert im Magen, stellen die erste wichtige Barriere gegen Krankheitserreger dar [40]. Werden diese durchbrochen setzt sich ihnen das Immunsystem zur Wehr und bildet im besten Fall eine langanhaltende Immunität gegenüber dem Erreger. Eine grobe Übersicht der Zusammensetzung des Immunsystems ist in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Schematische Übersicht des menschlichen Immunsystems

	Unspezifisches Immunsystem	Spezifisches Immunsystem
Zelluläres Immunsystem	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Makrophagen ▪ Natürliche Killerzellen ▪ Dendritische Zellen ▪ Mastzellen 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ B-Zellen ▪ T-Zellen
Humorales Immunsystem	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Komplement-System ▪ C-reaktives Protein 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Immunglobuline

Modifiziert nach [40].

Man unterscheidet die unspezifische von der spezifischen Immunantwort. Beide setzen sich aus einer zellulären und humoralen Komponente zusammen. Das unspezifische Immunsystem ist für eine rasche Immunabwehr verantwortlich. Das spezifische Immunsystem hingegen ist lernfähig und bildet spezifische Antikörper gegen die Erreger, wodurch sie bei erneuter Infektion gezielt erkannt und eliminiert werden können [41]. Das ist auch der Mechanismus, von dem Impfungen Gebrauch machen. Hier wird der Körper je nach Impfstoff entweder mit attenuierten Erregern, wie bei Lebendimpfstoffen, oder mit toten Erregern oder Erregerpartikeln, wie bei Totimpfstoffen, konfrontiert. Ziel beider Impfstoffe ist es, dass das Immunsystem spezifische Antikörper gegen den Krankheitserreger bildet.

1.2.1 Unspezifisches Immunsystem

Das unspezifische oder angeborene Immunsystem ist 500-700 Millionen Jahre älter als das spezifische Immunsystem [41], [42]. Es reagiert extrem schnell, innerhalb weniger Minuten, auf eine Erregerexposition mit einer Entzündungsreaktion. Es spielt weiterhin eine zentrale Rolle in der Aktivierung der darauffolgenden spezifischen Immunreaktion [40]. Das unspezifische Immunsystem besitzt ein begrenztes Repertoire an Rezeptoren, die sogenannten *pattern recognition receptors* (PRRs), um eindringende Pathogene zu erkennen. Die Informationen der Rezeptoren sind in der Keimbahn verschlüsselt [42]. Zu ihnen gehört unter anderem der *toll-like receptor* (TLR) [43]. Die fehlende Vielfalt der Rezeptoren wird dadurch kompensiert, dass sie Komponenten erkennen, die von großen Gruppen von Mikroorganismen exprimiert werden, den sogenannten *pathogen-associated*

molecular patterns (PAMPs). Eine weitere Strategie ist, *damage-associated molecular patterns* (DAMPs) zu erkennen, die metabolische Komponenten einer Entzündung darstellen. Hierzu zählen unter anderem Harnsäure und Hitzeschockproteine. Zu dem zellulären Abwehrmechanismus gehören unter anderem neutrophile und eosinophile Granulozyten, natürliche Killerzellen (NK-Zellen), Makrophagen und Monozyten, deren Aufgabe es ist, Pathogene oder infizierte Zellen durch Phagozytose zu eliminieren [40], [41]. Dendritische Zellen hingegen sind antigenpräsentierende Zellen und bilden eine Brücke zwischen dem unspezifischen und spezifischen Immunsystem [41], [44].

Chemokine, Zytokine, Defensine und das Komplementsystem zählen zu dem humoralen Abwehrmechanismus des unspezifischen Immunsystems. Die Plasmaproteine zirkulieren im Körper und sind sowohl in die Detektion von Mikroben als auch in die Potenzierung einer Entzündungsreaktion involviert. Wird das Komplementsystem aktiviert, löst das eine Kaskade aus, die zu einer Eliminierung des Erregers durch Opsonisierung und Phagozytose führt.

Der klassische Aktivierungsweg wird hauptsächlich durch Antigen-Antikörper-Komplexe, Bakterien und deren Produkte, apoptotische Zellen und nekrotisches Gewebe aktiviert. C1q ist das Erkennungsmolekül, das zur Aktivierung von C2 und C4 führt. Der Lektinweg hingegen wird von komplexen Kohlenhydratstrukturen bakterientypischer Zucker aktiviert. Hierbei bildet das mannosebindende Lektin (MBL) mit der Serinprotease MASP-2 (engl. *mannan associated serine protease-2*) einen Komplex, der durch den Kontakt mit den Kohlenhydratstrukturen ebenfalls zur Aktivierung von C2 und C4 führt. Der Lektinweg ist von großer Bedeutung, wenn das angeborene Immunsystem eingeschränkt ist, wie zum Beispiel bei Patienten unter Immunsuppression. Durch die Aktivierung von C2 und C4 entsteht die C3-Konvertase. Der Alternative Aktivierungsweg beginnt erst bei C3. Aktuell werden zwei mögliche Pathomechanismen diskutiert: Hydrolysiertes C3 bildet mit Faktor B und D eine C3-Konvertase [45] oder bestimmte Pathogene beziehungsweise apoptotische und nekrotische Zellen reagieren direkt mit Properdin, Faktor P, das als direkte Andockstelle für hydrolysiertes C3 dient und die C3-Konvertase bildet [46]. In der gemeinsamen Endstrecke aktiviert die C3-

Konvertase die C5-Konvertase, die den Membranangriffskomplex (engl. *membrane attack complex*, MAC) aus C5b-9 bildet.

Weitere wichtige Plasmaproteine, die bei der Entzündungsreaktion eine Rolle spielen, sind zum Beispiel das C-reaktive Protein (CrP), Lipopolysaccharid-bindendes Protein oder Serum Amyloid P [40], [41].

1.2.2 Spezifisches Immunsystem

Nur Wirbeltiere besitzen ein spezifisches Immunsystem, das auch adaptives oder erworbenes Immunsystem genannt wird [47], [48]. Im Vergleich zum angeborenen Immunsystem werden unzählige individuelle Immunrezeptoren durch Rekombination und Divergenz verschiedener Gensegmente gebildet. Weiterhin basiert es auf klonaler Expansion von Zellen, die einen spezifischen Rezeptor gegen verschiedene Pathogen tragen. Daraus resultiert ein individuell einzigartiges Rezeptorrepertoire [42], [47]. Nach dem initialen Kontakt mit einem Antigen exprimieren die Immunzellen einen spezifischen Immunrezeptor und persistieren lebenslang im menschlichen Körper. So stellen sie rasche Immunreaktion bei einer Reexposition sicher [49]. Auf humoraler Ebene werden unter anderem von den T-Lymphozyten IFN- γ und eine Vielzahl von Interleukinen sowie von den B-Lymphozyten Antigen-spezifische Antikörper, die sogenannten Immunglobuline, gebildet. Letztere bilden entweder einen Teil des B-Zell-Rezeptors oder werden sezerniert und zirkulieren frei im Körper [50].

1.2.2.1 Zelluläre Immunantwort

Die zellulären Vertreter des spezifischen Immunsystems sind die T-Lymphozyten und die Antikörper-produzierenden B-Lymphozyten. Lymphozyten sind sehr mobil. Nachdem sie aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen entstanden waren, entwickeln sie sich in den primär lymphatischen Organen, dem Knochenmark und im Falle der T-Zellen auch im Thymus, weiter und migrieren dann in die sekundär lymphatischen Organe wie Milz, Lymphknoten und Lymphfollikel [49].

B-Zellen passieren im Knochenmark verschiedene Entwicklungsstufen, in denen sie ihre Antigen-spezifität erlangen. Als unreife B-Zellen verlassen sie das Knochenmark und beenden die Entwicklung zum reifen oder naiven B-Lymphozyten in den sekundär lymphatischen Organen. Bis zu dieser Stufe verläuft die Entwicklung ohne jeglichen Kontakt zu exogenen Antigenen [49], [51]. Die zweite Phase der B-Zell Entwicklung wird mit dem Zusammentreffen eines Antigen initiiert. Abhängig von verschiedenen Einflussfaktoren und Zytokine wird aus der naiven B-Zelle entweder eine B-Gedächtniszelle, die in der Zukunft bei erneutem Kontakt mit dem Antigen wieder aktiviert wird, oder eine Plasmazelle, die eine große Menge an spezifischen Antikörpern, Immunglobulinen, produziert [49], [52]. Die Strukturen und Funktionen der Immunglobuline werden in Kapitel 1.2.2.4 eingehender erläutert.

Unreife T-Vorläuferzellen entstehen im Knochenmark und migrieren über das Blut in die Thymusrinde. Sie bilden einen Prä-T-Zell-Rezeptor (engl. *t-cell receptor*, TCR) aus und werden als doppelt-negativ bezeichnet, da sie CD4-CD8- (engl. *cluster of Differentiation*, CD) sind [53], [54]. Diese sogenannten Thymozyten proliferieren und der TCR wird komplettiert und funktionsfähig. Sie erlangen eine doppelte-Positivität durch Expression der Cofaktoren CD4+CD8+. Nun treten sie in Kontakt mit den Thymusepithelzellen, die Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. *major histocompatibility complex*, MHC)-Moleküle der Klasse I und II auf ihrer Zelloberfläche tragen. Das Schicksal der doppelt-positiven Thymozyten hängt von dem Signal ab, das von der Interaktion zwischen MHC und TCR vermittelt wird [53], [55]. Ist das Signal zu stark oder zu schwach, führt das zu einer Apoptose des jeweiligen T-Lymphozyten. Ist das Signal angemessen, reift der T-Lymphozyt weiter. Dieser Mechanismus wird als positive Selektion bezeichnet. In der corticomedullären Übergangszone und im Thymusmark präsentieren insbesondere Dendritische Zellen den Thymozyten körpereigene Antigene. Bindet ein T-Lymphozyt an eines dieser körpereigenen MHC-Moleküle, könnte das über den Thymus hinaus eine Autoimmunreaktion hervorrufen. Signale einer Bindung zwischen TCR und körpereigenem MHC-Molekül führen daher rasch durch Apoptose zum Zelltod. Dieser Mechanismus nennt man negative Selektion.

tion. Thymozyten, deren TCR MHC-I-Moleküle binden, werden zu CD8+ T-Zellen, wohingegen Thymozyten, die MHC-II-Moleküle binden, zu CD4+ T-Zellen werden. Sie sind nun jeweils einfach-positiv (CD4-CD8+ oder CD4+CD8-) und migrieren in die sekundär lymphatischen Organe [53], [56].

CD4+ T-Zellen bilden die größte Gruppe der T-Zellen im Körper und werden auch als T-Helferzellen (T_H Zellen) bezeichnet. Sie können in verschiedene Lymphozytentypen unterteilt werden: T_H1, T_H2, T_H17 und CD4+ Treg. Jede zeichnet sich durch eine individuelle Effektorfunktion und ein spezifisches Zytokinprofil aus [53], [57], [58]. Hauptfunktionen sind neben der Sekretion verschiedenster Interleukine, IFN- γ , TNF- α und TGF- β , die Aktivierung, Suppression oder Inhibierung anderer T-Lymphozyten und die Induktion von Antikörperklassenwechsel [57]–[62]. Eine Übersicht der Typen der T-Lymphozyten ist in Tabelle 3 abgebildet.

Der meist beschriebene Typ der CD8+ T-Zellen sind die zytotoxischen T-Zellen (T_c), auch als T-Killerzellen bezeichnet. Sie erkennen infizierte oder Tumorzellen und induzieren deren Zelltod durch Apoptose. Des Weiteren scheinen sie eine Rolle in der Entwicklung von Autoimmunerkrankungen und Allergien zu spielen [59], [63], [64].

Tabelle 3: Typen der T-Lymphozyten

	Typ	Funktion
CD4+	T _{H1}	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Sekretion von IFN-γ, IL-2 und TNF-α ▪ Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen ▪ Induktion von Antikörperklassenwechsel und dadurch indirekte Aktivierung des Komplementsystems
	T _{H2}	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Sekretion von IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13 und IL-25 ▪ Unterstützung der antikörperabhängigen zelluläre Zytotoxizität ▪ Induktion von Antikörperklassenwechsel zu IgG1 und IgE ▪ Assoziation mit allergischer Reaktion ▪ Suppression von T_{H1} und T_{H17}
	T _{H17}	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Sekretion von IL-17, IL-21, IL-22 und IFN- γ ▪ Suppression von Treg
	CD4+ Treg	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Sekretion von IL-10 und TGF-β ▪ Inhibierung von T_H Zellen, CD8⁺ T-Zellen und dem unspezifischen Immunsystem
CD8+	T _c	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Sekretion von IFN-γ, TNF-α, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17, IL-21, Granzyme und Perforin ▪ Zytotoxizität gegen Tumorzellen und intrazelluläre Pathogene ▪ Propagation von Autoimmunität und Allergien
	CD8+ Treg	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Sekretion von IL-10, TGF-β, Granzyme und Perforin ▪ Inhibierung von T_H Zellen und der Immunantwort gegenüber einer Infektion

Modifiziert nach [59].

1.2.2.2 IFN-γ

In dieser Arbeit wird die Antigen-spezifische T-Zell-Antwort über die IFN-γ-Produktion gemessen, daher wird auf dieses Zytokin im Folgenden näher eingegangen.

IFN-γ ist der einzige Vertreter der Typ II Interferone. Es ist strukturell nicht verwandt mit den Typ I IFN, bindet an andere Rezeptoren und ist durch einen eigenen Genlocus verschlüsselt. IFN-γ wird von CD4⁺ T-Helferzellen Typ 1 und 17, CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen und natürlichen Killerzellen produziert. Teil aktueller Forschung ist, ob auch Makrophagen, antigenpräsentierende Zellen oder B-Zellen IFN-γ produzieren können [65]–[67]. Makrophagen, die durch IFN-γ stimuliert werden, lösen direkt antimikrobielle und -tumorale Mechanismen aus und regulieren die Signalwegen der Antigenpräsentation und -prozessierung hoch. Des Weiteren zieht IFN-γ Leukozyten an und steuert deren Reifung und Differenzierung [66], [68]–[70]. Zusätzlich verstärkt es die NK-Zell-Aktivität und reguliert

die B-Zell-Funktion hinsichtlich der Produktion von Immunglobulinen und Antikörperklassenwechsel hoch [66], [71], [72].

1.2.2.3 T-Zell Subpopulationen

Sowohl CD4+ als auch CD8+ T-Zellen differenzieren sich anhand ihrer Antigenerfahrung in T-Zell Subpopulationen, die durch spezifische Funktionen und individuelle Oberflächenmarke-Kombinationen charakterisiert sind. Appay et al. legten folgenden linearen Differenzierungspfad nach der T-Zell-Antigenerfahrung vor: Naive-T-Zellen → Gedächtnis-T-Zellen → Effektor-T-Zellen → TEMRA [73]. Naive-T-Zellen sind ruhende T-Zellen, die keinen Antigenkontakt haben, bis sie den Thymus verlassen. Ihr Phänotyp ist durch die Expression der Oberflächenmarker CD45RA und CD28, das für die Kostimulation der T-Zell-Aktivierung wichtig ist, bestimmt [74]. CD45 ist ein Leukozyten-Oberflächenmarker mit verschiedenen Isoformen, der die Assoziation zum TCR beschreibt. CD45RA wird hauptsächlich von Naiven-T-Zellen exprimiert und hat eine geringe Assoziation zum TCR, wohingegen CD45R0 eine starke Assoziation zum TCR hat und von Gedächtnis-T-Zellen exprimiert wird [75].

Nach Aktivierung durch Antigenkontakt differenzieren die Naiven-T-Zellen entweder zu Effektor-Gedächtnis-T-Zellen oder zu Zentralen Gedächtnis-T-Zellen. Sie bleiben auch während einem Mangel an Antigenstimulation präsent und haben die Eigenschaft, nach erneutem Antigenkontakt sehr schnell zu expandieren. Sie haben ein größeres Zytokinprofil als Naive-T-Zellen und helfen den B-Zellen effektiver beim Antikörperklassenwechsel [74].

Effektor-T-Zellen sind aktivierte Zellen, die in der Lage sind, spezifische Funktionen mit hoher Leistungsfähigkeit, jedoch ohne weiteres Differenzierungspotenzial, durchzuführen [74]. Terminal differenzierte Effektor-Gedächtnis-T-Zellen mit einer Re-Expression der CD45 Isoform RA sind sogenannte TEMRA.

1.2.2.4 Humorale Immunantwort

Humor heißt in der lateinischen Sprache Flüssigkeit. Die humorale Immunantwort des spezifischen Immunsystems ist eine Form der Immunität, die von in den Körperflüssigkeiten zirkulierenden Antikörpern (IgG, IgM, IgA, IgE und IgD) vermittelt

wird [76]. Sie werden von Plasmazellen sezerniert und beteiligen sich durch folgende Mechanismen an der Immunantwort:

- Aktivierung des klassischen Aktivierungsweg des Komplementsystems aus [50], [77]
- Neutralisation von Pathogenen und Toxinen [78]
- Opsonierung von Pathogenen [79], [80]
- Vorbereitung der Immunzellen auf eine Immunantwort [50], [81]

Immunglobuline gehören zu der namensgebenden Immunglobulin-Superfamilie [82], [83]. Sie setzen sich aus zwei leichten Ketten (engl. *light chains*, L) und zwei schweren Ketten (engl. *heavy chains*, H) zusammen, wie in Abbildung 4 dargestellt ist. Jede Kette besitzt eine variable Domäne (V) mit NH₂-Terminus und eine oder mehrere konstante Domänen (C) mit COOH-Terminus. Sowohl die leichten und schweren Ketten als auch die schweren Ketten untereinander sind mit Disulfidbrücken verbunden. Jede V oder C Domäne besteht aus circa 110-130 Aminosäuren. Weiterhin unterteilt man die Immunglobuline in das antigenbindende Fragment (engl. *antigen-binding fragment*, Fab) und in das kristallisierbare Fragment (engl. *crystallisable fragment*, Fc). Ersteres bindet an das Antigen, letzteres an die Oberfläche der Lymphozyten [82], [84].

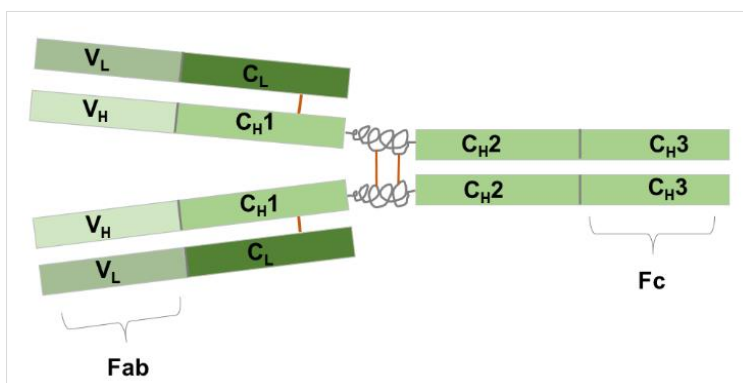


Abbildung 4: Zweidimensionales Modell eines Immunglobulin G

Das Molekül setzt sich aus zwei leichten Ketten (engl. *light chains*, L) und zwei schweren Ketten (engl. *heavy chains*, H) zusammen. Jede Kette besitzt eine variable Domäne (V) und eine oder mehrere konstante Domänen (C). Sowohl die leichten und schweren Ketten, als auch die schweren Ketten sind untereinander mit Disulfidbrücken verbunden. Weiterhin unterteilt man die Immunglobuline in das antigenbindende Fragment (engl. *antigen-binding fragment*, Fab) und in das kristallisierbare Fragment (engl. *crystallisable fragment*, Fc), das sich an die Oberfläche der Lymphozyten bindet. Modifiziert nach [82].

Es existieren fünf verschiedene Immunglobulinklassen: IgG, IgM, IgA, IgE und IgD. Sie unterscheiden sich in der Anzahl ihrer C_H-Regionen. IgM wird als erster der Isotypen, vor einem Antikörperklassenwechsel, produziert; es erkennt und eliminiert wirksam Pathogene in der ersten Phase der Immunabwehr [50], [85]–[87]. Unter einer Antigenstimulation konvertieren B-Lymphozyten in Plasmazellen, die hoch-affine IgG, IgA, IgE und IgD produzieren. IgG ist der vorherrschende Isotyp im menschlichen Körper und hat die längste Serum-Halbwertszeit. Es besteht aus weiteren vier Subtypen (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4). Es ist als einziges plazentagängig um dem Fötus einen Teil der mütterlichen Immunität zu verleihen [50], [88]. IgA, auf der Schleimhautoberfläche des Gastrointestinal-, Respirations- und Urogenitaltraktes vertreten, spielt eine entscheidende Rolle bei der mukosalen Immunität [50], [89].

Die Qualität der humoralen Immunität wird in dieser Arbeit über die spezifische IgG Antikörper Konzentration und Avidität und die neutralisierenden Antikörper (engl. *neutralizing antibodies*, NABs) bestimmt. Die Affinität bezeichnet eine einfache bimolekulare Bindung zwischen dem Antikörper und dem Antigen. Wenn der Antikörper über zwei oder mehrere Bindungsstellen zum Antigen verfügt, verstärkt das die Affinität [90]. Die Avidität stellt ein Maß für die Bindungsfähigkeit des Antikörpers an das Antigen dar und ist ein Indiz für die Langzeit-Antikörper-Reaktion. Die Avidität reift durch klonale Selektion von B-Zellen, die durch somatische Hypermutation Antikörper mit stärkerer Affinität zu dem Antigen produzieren. Unter NABs versteht man Antikörper, deren wichtigste Funktion ist, die Infektiosität der Viren zu neutralisieren. Dabei binden sich Antikörper an die Oberfläche der Viren und verhindern den Eintritt der Viren in die Wirtszelle [91], [92].

1.3 Der Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus

Der FSME-Virus kommt weltweit vor. Die Infektion kann mit schweren zentralnervösen Entzündungen einhergehen und letal verlaufen. Es existiert keine kausale Therapie, daher ist die Prävention durch eine aktive Immunisierung umso bedeutender.

1.3.1 Die Gattung der Flaviviren

Die Gattung der Flaviviren zählen wie die Pesti- und Hepaciviren zu der Familie der Flaviviridae. Der namengebende Virus der Gattung der Flaviviren ist der Gelbfieber-Virus (lat. *flavus*, gelb). Sie werden weiterhin zu den Arboviren gezählt, da sie durch Gliederfüßler wie Stechmücken oder Zecken übertragen werden. *Arbo* steht als Akronym für die englischen Worte *arthropod-borne viruses* [93]. Flaviviren besitzen eine Virushülle und enthalten eine einzelsträngige RNA mit (+)-Polarität des Genoms. Aktuell sind mehr als 70 Flaviviren bekannt, die wiederum nach dem Übertragungsweg in drei Gruppen eingeordnet werden: durch Stechmücken-übertragende, durch Zecken-übertragene und durch unbekannte-Vektoren-übertragende Gruppen [94], [95]. Alle für Menschen pathogenen Flaviviren werden von den ersten zwei genannten Gruppen übertragen. Die wichtigsten Enzephalitis Erreger stellen die Spezies der Japanischen-Enzephalitis-Viren (JEV), der West-Nil-Viren (WNV) und der FSME-Viren dar [93]. Weitere bekannte Vertreter sind unter anderem die Spezies der Dengue-, Gelbfieber- und Zika-Viren.

Diese Arbeit bespricht den FSME-Virus. Infektionen mit diesem Virus haben zwischen 1990 und 2009 zu fast 170.000 Meldungen von klinischen Fällen in Europa und Russland geführt, mit stetig steigender Tendenz. Aktuell sind drei Subtypen in Europa bekannt: *Far-eastern Subtype*, *Western European Subtype* und *Siberian Subtype* [96]. Der *Western European Subtype* kommt in ländlichen und bewaldeten Gebieten Zentral-, Ost- und Nordeuropas vor. Risikogebiete in Deutschland sind Bayern, Baden-Württemberg, Südhessen und das süd-östliche Thüringen. Im Mai 2016 definierte das Robert-Koch-Institut 146 Landkreise in Deutschland als FSME-Risikogebiete [97]. Der FSME-Virus wird hauptsächlich über die Schildzecken, *Ixodes species pluralis*, auf den Menschen oder domestizierte Tiere übertragen. Der Gemeine Holzbock, *Ixodes ricinus*, ist die verbreitetste Zeckenart. Die Übertragung auf domestizierte Tiere spielt eine entscheidende Rolle, da Menschen sich über den Konsum von nicht pasteurisierter Milch und daraus hergestellten Produkten, wie zum Beispiel Käse, anstecken können. Im Juli 2008 haben sich sechs Menschen in einer Bergregion in Österreich durch unbehandelte Ziegenmilch infiziert, wie in der Studie Holzmann et al. beschrieben

wird [98]. Des Weiteren fungieren die Tiere als Wirt für große Zeckenpopulationen [99].

1.3.2 Verlauf nach Infektion mit FSME-Viren

Die durchschnittliche Inkubationszeit zwischen dem Zeckenstich und Symptombeginn liegt bei 7 bis 14 Tagen. Bei einem Drittel der Patienten bleibt der Stich unbemerkt [101]. Die Infektion verläuft typischerweise biphasisch, wobei initial grippeähnliche Symptome mit kurzen, hohen Fieberschüben, Schwächegefühl, Erbrechen, Kopf- und Gliederschmerz auftreten. Es folgt eine zwei bis zehntägige asymptomatische Phase. Zwei Drittel der Patienten zeigen keine weiteren Symptome, bei einem Drittel verbreitet sich der Virus im zentralen Nervensystem (ZNS). Charakteristisch für die zweite Phase ist plötzliche ZNS-Symptomatik mit hohem Fieber [102]. Die ZNS-Infektion kann sich in den Meningen (Meningitis), im Hirnparenchym (Enzephalitis), Rückenmark (Myelitis) und Nervenwurzel (Radikulitis) manifestieren. Zu den zahlreichen Symptomen zählen unter anderem Übelkeit und Erbrechen, Photophobie, Hyperakusis, Paresen, Krampfanfälle, Hyperkinesie der Extremitäten und der Gesichtsmuskulatur bis hin zu Somnolenz und Koma. Binnen einer Woche nach Symptombeginn kann der Tod eintreten [102],[103].

Das Postenzephalitische Syndrom ist eine signifikant erhöhte Spätkomplikationen, das nach einer akuten FSME-Virus Infektion auftreten kann. Eine Reihe unspezifischer Symptome, wie zum Beispiel Kopfschmerzen, Reizbarkeit, ein beeinträchtigt Lern- und Auffassungsvermögen, Koordinationsstörungen, Hörverlust, Tremor und chronische Müdigkeit, werden beschrieben [103].

1.3.3 Diagnostik und Behandlungsmöglichkeiten

Wenn die ZNS-Symptomatik sich klinisch zeigt, steht die Diagnostik im Vordergrund. Diese ist unkompliziert und es existieren klare Regeln der Vorgehensweise. Die FSME-RNA kann vor der Serokonversion in der ersten Krankheitsphase durch eine Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) aus dem Blut isoliert werden. FSME-spezifische IgM Antikörper und für gewöhn-

lich auch schon FSME-spezifische IgG Antikörper sind in den Serumproben während der zweiten Krankheitsphase nachweisbar. Der FSME-Virus kann ebenfalls im Liquor nachgewiesen werden, es besteht jedoch das Risiko, falsch-positive Ergebnisse zu messen auf Grund des unspezifischen Charakters der in dem Enzymimmunoassay (engl. *enzyme-linked Immunosorbent assay*, ELISA) benutzten Antikörper. Es kann hierbei zu Kreuzreaktionen der Moleküle mit anderen Flaviviren kommen. Daher ist ein FSME-Antikörper-Neutralisationstest empfohlen, um das Ergebnis zu bestätigen [101], [103], [104].

Es existiert keine kurative Therapie für die FSME-Virus Infektion. Zu den supportiven Therapiemaßnahmen zählen die Gabe von Paracetamol, Aspirin und anderer nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR). Sowohl der Einsatz von Kortikosteroiden als auch die Therapie mit Immunglobulinen ist umstritten. In Hinsicht auf die progressive FSME-Virus Erkrankung werden in Studien zwei unterschiedliche Kategorien beschrieben: eine ohne Anwesenheit von FSME-Viren, die auf eine immunmodulatorische Therapie anspricht, und eine andere, bei der FSME-Viren präsent sind und die für eine antivirale Therapie sensibel ist [105]. Bei schwerer ZNS-Manifestation ist das kontinuierliche Monitoring der Vitalparameter und die Möglichkeit zur sofortigen Intubation und Beatmung erforderlich [101]–[103].

1.3.4 Die FSME-Impfung

Auf Grund der Gefahr des dramatischen Verlaufes der FSME-Virus Erkrankung empfiehlt die Ständige Impfkommission (STIKO) eine Schutzimpfung für Personen, die in FSME-Risikogebieten Zecken exponiert sind, des Weiteren für Menschen, die auf Grund ihrer beruflichen Tätigkeit gefährdet sind. Hierzu zählen unter anderem Forstarbeiter und Landwirte, aber auch exponiertes Laborpersonal. Es sollte auch bei Reisen in ein FSME-Risikogebiet außerhalb von Deutschland eine Schutzimmunisierung erfolgen [106]. Das Wissen um die typischen Lebensräume der Zecken zählt weiterhin zu den präventiven Grundlagen. Lichte Wälder und hohe Gräser oder Büsche, wie sie auch in Gärten und städtischen Parks vorkommen, sind der optimale Lebensraum für Zecken. Schutzmaßnahmen können durch das Tragen heller, geschlossener Kleidung und das Auftragen

von Insektenschutzmitteln vorgenommen werden. Die sofortige, fachgerechte Entfernung der Zecke und die Desinfektion der Stichstelle sind angeraten [97].

Der FSME-Impfstoff ist ein Totimpfstoff mit inaktivierten FSME-Viren verschiedener Stämme, je nach Hersteller. Es existieren aktuell zwei Hersteller: FSME-Immun® von Baxter und Encepur® von Novartis. Wie in Tabelle 4 dargestellt ist, sind bei beiden Herstellern nach dem Standardimpfschema drei Teilimpfungen notwendig, um die primäre Vakzinierung bzw. die FSME-Grundimmunisierung und damit den vollen Impfschutz zu erhalten. Im Anschluss müssen regelmäßig Auffrischimpfungen erfolgen. Es gibt ebenfalls die Möglichkeit einer Schnellimmunisierung, bei der im Falle von FSME-Immun® nur zwei Impfungen innerhalb von zwei Wochen notwendig sind [107], [108]. Es gibt von beiden Herstellern spezielle Impfstoffe für Kinder. Encepur® Kinder von Novartis enthält 0,75 µg statt 1,5 µg des inaktivierten FSME-Virus Stamm K23. Es kann ab dem ersten bis zum vollendeten zwölften Lebensjahr verordnet werden. In dem Impfstoff FSME-Immun® Junior von Baxter sind 1,2 µg statt 2,4 µg des inaktivierten FSME-Virus Stamm Neudörfl enthalten. Dieser Impfstoff ist vom 1.-16. Lebensjahr zugelassen. Das Impfschemata ist weitestgehend identisch zu dem der Erwachsenen [109], [110].

Tabelle 4: FSME-Impfschemata

Impfschemata der FSME-Grundimmunisierung	FSME-Immun®		Encepur®	
	Standard	Schnell	Standard	Schnell
1. FSME-Teilimpfung	0. Tag		0. Tag	
2. FSME-Teilimpfung	1.-3. Monat	14. Tag	1.-3. Monat	7. Tag
3. FSME-Teilimpfung	5.-12. Monat		9.-12. Monat	21. Tag
1. FSME-Auffrischimpfung	-		-	12.-18. Monat
FSME-Auffrischimpfungen alle	3 Jahre		3 Jahre (> 49 Jahre) 5 Jahre (≤ 49 Jahre)	

Vergleich FSME-Immun® von der Firma Baxter und Encepur® von der Firma Novartis. Beide Firmen empfehlen im Zuge des Standardimpfschemas die 2. FSME-Teilimpfung 1-3 Monate nach der 1. FSME-Teilimpfung. Die 3. FSME-Teilimpfung wird von Baxter nach 5-12 Monate und von Novartis 9-12 Monate nach der 1. FSME-Teilimpfung empfohlen. Baxter rät alle 3 Jahre eine FSME-Auffrischimpfungen für alle Altersstufen an. Novartis dagegen rät allen Personen > 49 Jahren alle 3 Jahre und Personen ≤ 49 Jahren alle 5 Jahre eine FSME-Auffrischimpfungen an. Das Schnellimpfschema bei Baxter sieht 2 FSME-Teilimpfungen am 0. und 14. Tag vor. Das von Novartis 3 am 0., 7. und 21. Tag und eine vorgezogene 1. FSME-Auffrischimpfung 12-18 Monate nach der 1. FSME-Teilimpfung.

Wie bei jeder Immunisierung gibt es auch bei der FSME-Impfung das Risiko von Nebenwirkungen. Impfreaktionen wie lokale Rötung, Schmerzen und Schwellung der Injektionsstelle, Übelkeit sowie grippeähnliche Symptome mit Fieber, Kopfschmerzen, Myalgien und Arthralgien sind häufige Symptome, das heißt in 1-10 % der Fälle. Seltener manifestieren sich Myalgien und Arthralgien im Nackenbereich und die mit meningitischen Beschwerden einhergehen können. Eine gefürchtete Impfkomplication ist die allergische Reaktion. Hierbei entwickelt der Patient zum Beispiel eine generalisierte Urtikaria, Schwellungen der Schleimhäute und daraus resultierenden Stridor, Dyspnoe, Bronchospasmus und Hypotension. In Einzelfällen beschreiben das Auftreten von Polyneuritis, Guillain-Barré-Syndrom oder Enzephalitis nach der FSME-Impfung. Hinsichtlich des Verursachens oder Auslösens eines akuten Schubes von Multipler Sklerose oder JIA existieren derzeit zu wenige Daten. Ob eine FSME-Impfung einen Impfschaden verursachen kann, wird diskutiert [107], [108], [111]. Bei jeder Impfung muss eine individuelle Nutzen-Risikoabwägung getroffen werden.

1.3.5 Überprüfung des Impferfolges nach FSME-Immunisierung

Obwohl die Impfung eine der effektivsten Wege ist sich vor eine Infektion zu schützen, bietet keine Immunisierung einen 100%igen Schutz. Es gibt immer wieder Fälle von Impfversagen. Bei der FSME-Impfung wird von einer sehr hohen Wirksamkeit mit $\geq 95\%$ ausgegangen [112], [113]. Es existieren verschiedene laborchemische Methoden um den Impferfolg nach einer FSME-Immunisierung zu kontrollieren. Der mit Abstand am häufigsten verwendete Test ist jedoch der ELISA, bei dem die FSME-spezifische Antikörper Konzentration im Serum nachgewiesen wird. Diese Methode ist seit den 1970´er Jahren etabliert. [114]. Ein weiteres ELISA Verfahren, dass immer mehr klinischen Nutzen findet, bestimmt die Avidität der FSME-spezifische Antikörper und ist ein Maß für die Langzeit-Antikörper-Reaktion [115]. Die humorale Immunität kann ebenfalls mit dem Neutralisationstest bestimmt werden. Mit diesem Verfahren wird die Fähigkeit der spezifische Antikörper zur Neutralisation der Infektiosität der Viren gemessen [92]. Zusätzlich kann die zelluläre Reaktivität gemessen werden. Dies hat zum aktuellen Zeitpunkt jedoch wenig klinische Relevanz. In dieser Studie wurden die drei

oben aufgeführten Methoden zur Bestimmung der humoralen Immunität angewandt und zusätzlich die zelluläre Immunität durch einen IFN- γ Secretion Assay gemessen.

1.3.6 Immunreaktion auf die FSME-Impfung

Mehrere Studien belegen, dass die humorale Immunität auf die FSME-Impfung bei älteren Personen [93]–[95] und Patienten mit einem eingeschränkten Immunsystem, wie zum Beispiel durch therapeutische Immunsuppression [96] oder nach Thymektomie [97], verändert ist. Die Arbeitsgruppe um Stiasny et al. zeigte, dass die Avidität und funktionelle Antikörperaktivität altersunabhängig sind, wobei die Titer bei Älteren nach einer Impfung signifikant niedriger sind [93], [98]. In der Studie von Prelog et al. zeigten thymektomierte Kinder nach der zweiten FSME-Impfung signifikant niedrigere IgG Anti-körper Konzentrationen verglichen mit den gesunden, gleichaltrigen Kontrollen, aber eine normale Immunantwort nach der dritten Impfung [97]. Die zelluläre Immunität auf eine FSME-Impfung hingegen ist besonders bei Patienten mit Arthritis autoimmunologischer Genese durch die Immunsuppression beeinträchtigt. Bei Kindern mit JIA gibt es Hinweise für ein vorzeitig gealtertes Immunsystem [99], wodurch eine pathologische Immunantwort zusätzlich erklärt wird. Die FSME-Impfung stellt nach dem Robert-Koch-Institut aus Sicherheitsaspekten kein Problem dar, da es sich um einen Totimpfstoff handelt. Der Impferfolg kann jedoch aus den oben genannten Gründen nicht sicher vorhergesagt werden [100].

1.4 Rationale

Impfungen mit inaktivierten Impfstoffen, zu denen auch der FSME-Impfstoff zählt, sind bei Kindern mit JIA ausdrücklich auf Grund der zu erwartenden höheren Krankheitsschwere vieler impfpräventabler Erkrankungen durch die Immundysregulation durch die Erkrankung selbst und/oder durch die immunsuppressive/modulatorische Therapie empfohlen. Durch die immer besser werdenden Therapiemöglichkeiten, zunehmende Mobilität von Kindern mit JIA und dem erfreulicherweise ähnlichem Reise- und Freizeitverhalten zu gesunden Kindern steigt

auch für JIA Patienten das Risiko, eine FSME Infektion zu erwerben. Die Wirksamkeit der FSME Impfung bei Kindern mit JIA wurde bisher nicht in prospektiven Wirksamkeitsstudien untersucht.

Es gibt auch keine Untersuchungen bezüglich der Korrelation der IgG-anti-FSME-Konzentration und -Avidität (synergistische Antikörperbindungsfähigkeit) bei Kinder mit JIA, die vor, während oder nach einer immunsuppressiven oder -modulatorischen Therapie geimpft wurden. Es fehlen weiterhin Daten zu der Korrelation zwischen der humoralen Antikörperantwort und zellulären Immunantwort (FSME-spezifische T-Zellen) auf eine FSME-Impfung bei Kindern mit JIA, da insbesondere die zelluläre Immunantwort auf neue Antigene durch die immunsuppressive/-modulatorische Therapie beeinträchtigt ist.

Die allgemeine Hypothese dieser Studie ist, dass bei Kindern mit JIA eine Korrelation zwischen der IgG-anti-FSME-Konzentration und -Avidität besteht, jedoch nicht zwischen dem humoralen und zellulären Immunsystem, wie es bereits bei anderen immunkomprimierten pädiatrischen Patienten gesehen wurde [116], [117].

- Das primäre Ziel ist, bei Kindern mit JIA, die vor, während oder nach Beginn der Erkrankung und vor, während oder nach einer immunsuppressiven und/oder -modulatorischen Therapie eine FSME-Grundimmunisierung erhalten hatten, die Konzentration und Avidität der FSME-spezifischen IgG Antikörper zu messen und deren Korrelation zu berechnen.
- Das sekundäre Ziel ist, die FSME-spezifische zelluläre Reaktivität auf FSME-Impfantigen mittels IFN- γ -Produktion der T-Zellen zu bestimmen und die Korrelation mit der IgG-anti-FSME-Konzentration und -Avidität zu berechnen.

Korreliert die FSME-spezifische IgG Antikörper Konzentration mit der FSME-spezifischen IgG Antikörper Avidität, könnte die Avidität als Marker für die Langzeit-Antikörper-Immunität des humoralen Immunsystems dienen.

Weiter gilt es zu prüfen, ob die FSME-spezifische T-Zell-Antwort nach der FSME-Grundimmunisierung bei Kindern mit JIA im Vergleich zu immunologisch gesun-

den Kindern verändert ist. Daraus kann man auf die Funktionstüchtigkeit des zellulären Immunsystems schließen. Sollte es Abweichungen zwischen den Ergebnissen geben, könnten eventuell modifizierte Impfempfehlungen (z. B. engere Abstände der Boosterimpfungen) für Kinder mit JIA abgeleitet werden.

2 Material und Methoden

Es handelt sich bei dieser Studie um eine nicht-interventionelle, retrospektive Querschnittsstudie. Die Studie wurde nach den ethischen Richtlinien der medizinischen Forschung am Menschen durchgeführt, die der aktuellen Revision 2013 der Deklaration von Helsinki entspricht. Das Ethikvotum wurde von der Ethikkommission der Universität Würzburg mit der Ethikvotum-Nummer 300/13 erteilt. Der Projektteil zur allgemeinen Erhebung des Impfstatus und zur Bestimmung der Virus-spezifischen Immunantworten wurden durch die Ethikvoten 243/11 bzw. 239/10 von der Ethikkommission der Universität Würzburg genehmigt.

2.1 Population

2.1.1 Patienten mit JIA

Die Rekrutierung der Patienten mit JIA erfolgte sowohl in dem Deutschen Zentrum für Kinder- und Jugendrheumatologie (DZKJR) in Garmisch-Partenkirchen als auch in der Universitäts-Kinderklinik der Universität Würzburg. Der Rekrutierungszeitraum erstreckte sich von Januar 2014 bis September 2015. Insgesamt wurde eine Fallzahl von 100 JIA-Patienten erreicht.

2.1.2 Immunologisch gesunde Probanden

In der Abteilung für Kinderchirurgie der Klinik und Poliklinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie, Gefäß- und Kinderchirurgie der Universitätsklinik Würzburg fand die Rekrutierung der immunologisch gesunden Probanden statt. Der Rekrutierungszeitraum entspricht dem der Patienten mit JIA. Im Ganzen nahmen 47 immunologisch gesunde Kinder an der Untersuchung teil.

2.1.3 Ein- und Ausschlusskriterien

Die Entnahme der Blutprodukte aller Studienteilnehmer erfolgte im Rahmen einer Routinelaborkontrolle. Das Volumen der Blutentnahme richtete sich nach dem Körpergewicht der Patienten. Vorgesehen war folgende Staffelung: < 20 kg: 12

ml, 20 - 30 kg: 18 ml, > 30 kg: 24 ml. Vor der Probenentnahme erfolgte die ausführliche Aufklärung über die Studie. Jeder Teilnehmer erhielt einen Fragebogen bezüglich der Daten der FSME-Teilimpfungen und der aktuellen pharmakologischen Therapie.

Folgende Bedingungen mussten zum Einschluss in die Studie vorliegen. Alle Kinder und Jugendlichen mussten zwischen dem 5. und 20. Lebensjahr sein. Der Nachweis einer abgeschlossenen FSME-Grundimmunisierung mit drei Teilimpfungen im empfohlenen zeitlichen Abstand war vorzulegen. Die FSME-Impfung durfte nicht studieninduziert sein, sondern musste im Vorfeld erfolgt sein. Eine mündliche und schriftliche Einverständniserklärung des Patienten oder gesunder Probanden und bei Minderjährigen deren Sorgeberechtigten musste nach einem Aufklärungsgespräch über die Inhalte der Studie erfolgen. Jeder Studienteilnehmer bekam ein entsprechendes Informationsblatt ausgehändigt.

Zu den Ausschlusskriterien der Studie zählten Begleiterkrankungen wie Malignome, Syndrome und Immundefekte. Eine Schwangerschaft musste ausgeschlossen sein. Der Erhalt von Blutprodukten wie Erythrozytenkonzentrate, Thrombozytenkonzentrate, intravenöse Immunglobuline und Plasmaprodukte in den letzten drei Monaten führte ebenfalls zum Ausschluss aus der Studie, da diese zu Verfälschungen der serologischen Ergebnisse führen können.

2.2 Material

Im folgenden Absatz werden von den verwendeten Materialien der Produktname, die Chargen-Bezeichnung (Ch.-B.) beziehungsweise Katalognummer (Cat. no.), der Hersteller und im Falle der Antikörper die Farbe und der Klon aufgelistet.

2.2.1 Antikörper

Die in Tabelle 5 aufgeführten Antikörper wurden in der Studie verwendet.

Tabelle 5: Verwendete Antikörper

	Farbe	Klon	Ch.-B.	Cat. no.	Hersteller
CD4	Brilliant Violet 421	OKT4	B187127	317434	BioLegend, Kalifornien, USA
CD8	APC-H7	SK1	6140812	560179	BD Biosciences, New Jersey, USA
CD28	Pe/Cy7	CD28-2	B189875	302926	BioLegend, Kalifornien, USA
CD45RO	PerCP/Cy5.5	UCHL1	B193211	304222	
CD69	FITC	FN50	B141183	310904	
CD69	APC	FN50	B176306	310910	
IFN- γ	Pe	-	5170320253	130-091-653	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D
Ki67	APC	-	B183619	350514	BioLegend, Kalifornien, USA

2.2.2 Chemikalien

Die in Tabelle 6 aufgeführten Chemikalien wurden in der Studie verwendet.

Tabelle 6: Verwendete Chemikalien

	Produktname	Ch.-B./ Cat. no.	Hersteller
Antigen	FSME-Immun-Antigen (Ticovac like (4,8 μ g/ml))	-	-
Feststoff	Ammoniumchlorid	39H013015	Sigma-Aldrich Corporation, Missouri, USA
	Kaliumbicarbonat	71K0121	
	Natriumazid	106H2540	
	Trypanblau	628	
Fertiglösung	Aqua ad iniectiones	114558061	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
	Isotonische Kochsalzlösung	14FA1014	Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, D
Medium	FicoLite-H (Human)	151122P	Linaris Biologische Produkte GmbH, Dossenheim, D
	FKS (Fötale Kälberserum)	10270-106	Gibco, Life Technologies, Kalifornien, USA
	Penicillin Streptomycin	A2213	Biochrom GmbH, Berlin, D
	RPMI 1640	R8758	Sigma-Aldrich Corporation, Missouri, USA
Puffer	Bovines Serum Albumin (BSA)	A2058-1G	Sigma-Aldrich Corporation, Missouri, USA
	Dimethylsulfoxid (DMSO)	D8418-50ML	
	Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	E-5134	
	Phosphate buffered saline (PBS)	P-9144	
Stimulanzen	Brefeldin A (BFA) in Ethanol	B6542-5MG	Sigma-Aldrich Corporation, Missouri, USA
	Ionomycin	I9657-1MG	
	Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) in DMSO+RPMI	P81391-1MG	
	Phytohämagglutinin (PHA)	11082132001	
	Concanavalin A (ConA)	C5275	

2.2.3 Gerätschaften

Die in Tabelle 7 aufgeführten Gerätschaften wurden in der Studie verwendet.

Tabelle 7: Verwendete Gerätschaften

	Produktname	Ch.-B./ Cat. no.	Hersteller
Eiswürfelbereiter	AF 103	DL1157	Scotsman Ice, Mailand, I
Flowzytometer	FACSCanto II	-	BD Biosciences, New Jersey, USA
Inkubator	B 5060 EK-CO2	19476	Heraeus Holding GmbH, Hanau, D
Kühlschrank	Liebeherr 4-8° C	1000831	Liebherr-International AG, Bulle, CH
	Liebherr Comfort -20° C	A24153	
	Hera Freeze -80° C	1013508	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, D
Magnetic Cell Separation (MACS)	MiniMACS™ Separator	130-042- 102	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D
	VarioMACS™ Separator	130-090- 282	
Mikroskop	Wilovert 30	5610-306- 01	Helmut Hund GmbH, Wetzlar, D
Zählkammer	Neubauer-Zählkam- mer	ZK13	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, D
pH-Messgerät	pH Meter, pH 523	09070190	WTW, Weilheim, D
Photometer	BioPhotometer	613100470	Eppendorf AG, Hamburg, D
Pipetten	Easypet	3033181	Eppendorf AG, Hamburg, D
	Research plus 10µl	492499Z	
	Research plus 100µl	493057Z	
	Research plus 200µl	379067Z	
	Research plus 1000µl	494528Z	
Pipettierhilfen	Integra PIPETBOY		INTEGRA Biosciences GmbH, Biebertal, D
	Multipipette Plus		Eppendorf AG, Hamburg, D
Sterilbank	Gelaire BSBS 6A	11031	Flow Laboratories GmbH, Meckenheim, D
Vortex	RetschMixer		A. Hartenstein GmbH, Würzburg, D
Waage	Sartorius	CP1245	Denver Instrument, New York, USA
Wasserbad	GFL Typ 1003	10549679	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burg- wedel, D
Zentrifuge	Rotanta/K	19477	Hettich GmbH, Tuttlingen, D
	Universal 32R	1610	

2.2.4 Lösungen

Die in Tabelle 8 aufgeführten Lösungen wurden in der Studie verwendet.

Tabelle 8: Verwendete Lösungen

	Zusammensetzung
Einfriermedium	20 % FKS + 10 % DMSO in RPMI
Erythrozyten-Lysepuf- fer	8,26 g Ammoniumchlorid + 1 g Kaliumbicarbonat + 0,037 g EDTA in 1 l Aqua ad iniectionabilia
FACS-Puffer	0,5 % BSA + 0,01 % Natriumazid in PBS
MACS-Puffer	0,5 % BSA + 2 mM EDTA in PBS
Nährmedium	1 % Penicillin Streptomycin + 10 % FKS in RPMI
PBS-Puffer	1 Tbl in 500ml Aqua ad iniectionabilia
Waschpuffer	PBS/0,01 % Tween

2.2.5 Testsysteme

Die in Tabelle 9 aufgeführten Testsysteme wurden in der Studie verwendet.

Tabelle 9: Verwendete Testsysteme

	Produktname	Ch.-B./ Cat. no.	Hersteller
FSME Aviditäts ELISA	Anti-FSME-Viren-ELISA (IgG)	EI 2661-9601	EUROIMMUN AG, Lübeck, D
IFN-γ ELISA	Human IFN-γ, ELISA MAX™ Standard Set	430102	BioLegend, Kalifornien, USA
IFN-γ Secretion Assay	Cytokine Secretion Assay, Cell Enrichment an Detection Kit (PE)	130-054-201	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D

2.2.6 Verbrauchsmaterialien

Die in Tabelle 10 aufgeführten Verbrauchsmaterialien wurden in der Studie verwendet.

Tabelle 10: Verwendete Gebrauchsmaterialien

	Produktname	Ch.-B./ Cat. no.	Hersteller
Blutentnahmesystem	S-Monovette, NH4-Hep.	6033411	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, D
	S-Monovette, Serum-Gel	6033911	
Einfrierröhrchen	Kryoröhrchen	10018734	VWR, Pennsylvania, USA
Einmalpipette	Serological Pipette 10 ml	14080751	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Reaktionsgefäße	SafeSeal 1,5 ml	72.706	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, D
	SafeSeal 2ml	72.695	
FACS Tube	Round-Bottom Tubes 5ml	352008	BD Biosciences, New Jersey, USA
Zentrifugenröhrchen	Cellstar, 15ml	188271	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
	Cellstar, 50ml	227261	
Gefrierbehälter	Cryo Freezing Container	51000001	Nalgene, New York, USA
Glaspipette	Cellstar, 10ml	607 180	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Handschuhe	Peha Nitril Handschuhe		P. Hartmann AG, Heidenheim, D
MACS Separation Columns	LS Columns	130-042-401	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D
	MS Columns	130-042-201	
Pipettenspitze	Biosphere Filter tips 10µl	70.760.210	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, D
	Biosphere Filter tips 100µl	70.760.212	
	Biosphere Filter tips 1000µ	70.760.211	
Petrischale	Cellstar, 24 Well Cell Culture Plate	662160	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
	Cellstar, Tissue Culture Dishes, PS, 60x15mm	628160	

2.3 Methoden

Nachstehend folgt eine Beschreibung der Experimente und Methoden, die im Zuge der Studie Verwendung gefunden haben.

2.3.1 Isolierung von Lymphozyten

Die mononukleären Zellen des peripheren Blutes (engl. *peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs) werden aus heparinisiertem Vollblut mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Diese Technik nutzt die Zentrifugalkraft, um die Zellen gemäß ihres Sedimentationskoeffizienten zu trennen. Nach dem Gesetz von Stokes ist die Rate der Partikelsedimentation direkt proportional zu ihrer Größe und Dichte und relativ proportional zu der Dichte der Suspension, in der sie sich befinden [118]. Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer (Ficoll) dient bei der Isolierung von PBMCs als Suspension. Da sowohl die Dichte als auch die Größe der sich in Vollblut befindenden Zellen sehr unterschiedlich ist, entstehen während der Zentrifugation verschiedene Schichten. Schwere Partikel wie Erythrozyten und neutrophile Granulozyten erscheinen am Boden, während mononukleäre Zellen eine schmale Schicht zwischen dem Ficoll und Plasma bilden [118].

In ein 50 ml Tube wurde $\frac{1}{3}$ Ficoll vorgelegt und mit $\frac{2}{3}$ Vollblut eines Studienteilnehmers vorsichtig und langsam überschichtet, sodass sich so wenig wie möglich vermischt. Hierauf wurde das Tube bei 1700 rpm 25 Minuten zentrifugiert. Die Bremse der Zentrifuge wurde ausgestellt, sodass die Schichten beim Auslaufen der Zentrifuge getrennt blieben, siehe Abbildung 5. Der nun sichtbare Lymphozytenring wurde mittels Glaspipette geerntet und in einen neuen 50 ml Tube pipettiert. Dieser wurde mit 0,9 % NaCl aufgefüllt. Erneut wurde bei 1700 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstands wurde das Zellpellet mit 5 ml Erythrozyten-Lysepuffer resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Zellsuspension mit 10 ml Nährmedium aufgefüllt und bei 1500 rpm 5 Minuten zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet mit 5 ml Nährmedium resuspendiert.

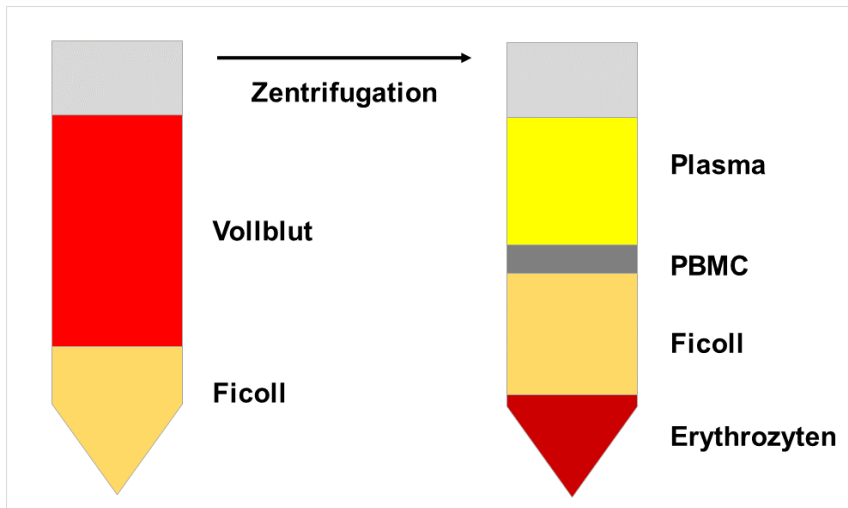


Abbildung 5: Dichtegradientenzentrifugation

Darstellung des Tubes vor (links) und nach (rechts) der Zentrifugation. Modifiziert nach [6].

Um die Anzahl der Zellen im Nährmedium zu bestimmen, wurden 10 µl Zellsuspension und 90 µl Trypanblau-Lösung in ein Reaktionsgefäß überführt und gemischt. Trypanblau ist ein Farbstoff, der auf die Zellvitalität schließen lässt. Färbt sich eine Zelle nach Zugabe des Farbstoffes blau, spricht das dafür, dass die Zellmembran nicht intakt und die Zelle tot ist. Von dieser Suspension wurden 10 µl auf eine Zählkammer pipettiert und die Anzahl der lebenden, nicht angefärbten Zellen unter dem Lichtmikroskop ausgezählt.

2.3.2 Kryokonservierung von Lymphozyten

Da die Verarbeitung der Zellen zu einem späteren Zeitpunkt stattfand, wurden sie kryokonserviert aufbewahrt. Pro Einfrierröhrchen wurde eine Zellzahl von 5×10^6 Zellen pro Milliliter festgelegt. Das Tube wurde bei 1500 rpm 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und mit der errechneten Menge an Einfriermedium resuspendiert. Je 1 ml der Zellsuspension wurde zügig in ein Einfrierröhrchen pipettiert und für 2 Tage bei -80°C in einer FrostyBox eingefroren. Anschließend wurden die Röhrchen in flüssigen Stickstoff überführt.

2.3.3 Serumisolierung

Die Quantität und Qualität der Antikörper im Serum sind eine wichtige Aussage über den Impfschutz. Um das Serum aus dem Vollblut zu trennen, wurden die

mit Gerinnungsaktivatoren beschichteten Serum-Röhrchen bei 3000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Hierbei setzt sich der Blutkuchen als Sediment vom Serum ab. Nach dem vorsichtigen Abpipettieren des Serums, wurde jeweils 1 ml davon in ein Einfrierröhrchen gefüllt. Das Serum wurde bei -20°C gelagert und zu einem späteren Zeitpunkt weiterverarbeitet.

2.3.4 Anti-FSME-Viren-ELISA

Zur Bestimmung der Konzentration der IgG-anti-FSME-Antikörper wurde ein Anti-FSME-Viren-ELISA (*engl. enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA*) verwendet. Dieses quantitative Nachweisverfahren basiert auf einer Antigen-Antikörper Reaktion. Ein Farbumschlag, der durch die Zugabe von einer Enzymkonjugat-Lösung und einer Substrat-Lösung erzielt wird, dient dazu, das Vorhandensein und die Konzentration bestimmter Moleküle/Antikörper nachzuweisen. In Abbildung 6 ist der Ablauf schematisch dargestellt [114], [119].

Zur Vorbereitung auf die Testdurchführung wurden die Serumproben 1:101 mit Probenpuffer verdünnt. Im ersten Schritt wurden je 100 µl von der Kalibrierungslösung, von den positiv und negativ Kontrollen und von den verdünnten Seren in die Reagenzgefäße einer Mikrotiterplatte pipettiert, die mit FSME-Antigen beschichtet war. Die Inkubationszeit betrug 30 Minuten bei Raumtemperatur. In dieser Phase binden die spezifischen Antikörper in den Seren an die auf der Mikrotiterplatte fixierten Antigene. Im folgenden Waschschrift wurden die Reagenzgefäße entleert und anschließend drei Mal gewaschen. Für jeden Waschzyklus wurden die Reagenzgefäße mit 300 µl Waschpuffer aufgefüllt. Nach 30-60 Sekunden Einwirkzeit wurden die Platten entleert und die Mikrotiterplatte mit der Öffnung nach unten kräftig auf saugfähigem Papier ausgeschlagen, sodass Waschpufferreste möglichst vollständig entfernt werden konnten. Im zweiten Schritt wurden je 100 µl Enzymkonjugat-Lösung in jedes Reagenzgefäß der Mikrotiterplatte pipettiert und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden die Reagenzgefäße entleert und erneut drei Waschzyklen wie oben beschrieben durchgeführt. Im dritten Schritt wurden je 100 µl Chromogen/Substrat-Lösung in alle Reagenzgefäße der Mikrotiterplatte pipettiert und 15 Minuten bei Raumtem-

peratur inkubiert. Danach wurden 100 µl von der Stopplösung in die Reagenzgefäße pipettiert, ohne sie vorher zu entleeren. Dabei war darauf zu achten, dass die gleiche Reihenfolge und Geschwindigkeit wie bei der Zugabe der Chromogen/Substrat-Lösung eingehalten wurde. In den folgenden 30 Minuten erfolgte die photometrische Messung bei einer Messwellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge zwischen 620 nm und 650 nm. Kurz vor dem Messen wurde die Mikrotiterplatte vorsichtig geschüttelt, damit sich die Farblösung homogen verteilen konnte.

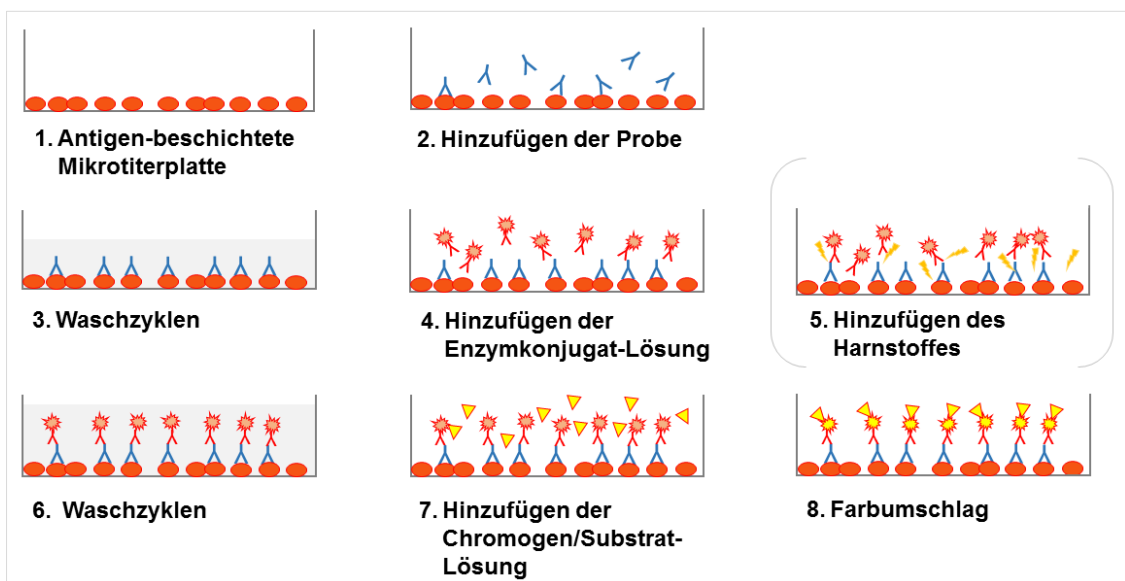


Abbildung 6: Ablauf des Anti-FSME-Viren-ELISA

Auf die mit dem FSME-Antigen beschichtete Mikrotiterplatte wurde die Serumprobe pipettiert. Nach den Waschzyklen wurden mit der Enzymkonjugat-Lösung die Antigen-Antikörper-Komplexe markiert. Im Falle des Avidität-ELISAs folgte der 5. Schritt und Harnstofflösung wurde der Probe hinzugefügt, um den Antigen-Antikörper-Komplexe zu strapazieren. Nach einem Waschzyklus wurde die Chromogen/Substrat-Lösung hinzugefügt und auf den Farbumschlag gewartet. Modifiziert nach [120].

Die Serum IgG-anti-FSME-Konzentration wurde in Vienna Units (VIEU) pro Milliliter angegeben. Werte ≥ 165 VIEU/ml wurde als positiv definiert und Werte zwischen 120 VIEU/ml und 165 VIEU/ml als grenzwertig. Negative Werte lagen bei ≤ 120 VIEU/ml. Bedauerlicherweise brach die Messung bei 1000 VIEU/ml ab.

2.3.5 Anti-FSME-Viren-ELISA zur Aviditätsbestimmung

Die Avidität von Antikörpern gegen FSME-Viren wurde durch einem Anti-FSME-Viren-ELISA mit Aviditätsbestimmung ermittelt. Die Gleichgewichtskonstante einer reversiblen Bindung zwischen einem Antikörper und dem Epitop eines Antigens bezeichnet die Affinität. Die Avidität wiederum ist die Anzahl aller Bindungen eines Antigen-Antikörper-Komplexes, die je nach Anzahl der Bindungsstellen eines Antigens und der Beschaffenheit der Antikörper entsteht [121]. Der Versuchsablauf ist ähnlich dem des Anti-FSME-Viren ELISA in Kapitel 2.3.4, jedoch wird ein zusätzlicher Dissoziationsschritt hinzugefügt, um die Bindungsfähigkeit der Antigen-Antikörper-Komplexe zu bestimmen. Die Spaltung der Komplexe wird durch eine Harnstofflösung provoziert, wie in Abbildung 6 im 5. Schritt abgebildet ist.

Vor der Probeninkubation wurden die Seren verdünnt. Hierbei wurden Serumproben, die eine IgG-anti-FSME-Konzentration 1000 VIEU/ml aufwiesen, 2:402 und Seren, die eine IgG-anti-FSME-Konzentration von < 1000 VIEU/ml aufwiesen, 3:303 mit Probenpuffer verdünnt. Im ersten Schritt wurden je 100 µl der verdünnten Seren und der Kontrollen als Doppelwert in zwei parallele Mikrotiterstreifen der Reagenzgefäße pipettiert und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Entleerung der Reagenzgefäße folgte ein Waschzyklus. Hierzu wurden jeweils 300 µl Waschpuffer in die einzelnen Reagenzgefäße pipettiert. Nach einer Einwirkzeit von 30-60 Sekunden wurden die Reagenzgefäße ausgeschüttet. Mit der Öffnung nach unten erfolgte das kräftige Ausschlagen auf ein saugfähiges Papier, damit die Waschpufferreste vollständig entfernt werden konnten. Die Inkubation des Harnstoffes fand im zweiten Schritt statt. Es wurden jeweils 200 µl Harnstofflösung in die Reagenzgefäße des ersten Mikrotiterstreifens und in die Reagenzgefäße des zweiten Mikrotiterstreifens jeweils 200 µl PBS pipettiert. Nach 10-minütiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur erfolgte die Entleerung der Reagenzgefäße und das Waschen wie oben beschrieben, jedoch drei Mal. Im dritten Schritt wurden jeweils 100 µl Enzymkonjugat-Lösung in der Reagenzgefäße pipettiert und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Reagenzgefäße entleert und drei Waschzyklen, wie oben beschrie-

ben, durchgeführt. Das Hinzufügen von jeweils 100 µl Chromogen/Substrat-Lösung in die Reagenzgefäße erfolgte im vierten Schritt. Die Inkubationszeit betrug 15 Minuten bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurden jeweils 100 µl Stopplösung in gleicher Reihenfolge und Geschwindigkeit wie die Chromogen/Substrat-Lösung in die Reagenzgefäße pipettiert. Die photometrische Messung erfolgte innerhalb von 30 Minuten nach dem Stoppen bei einer Messwellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge zwischen 620 nm und 650 nm. Die Mikrotiterplatte wurde kurz vor dem Messen vorsichtig geschüttelt, um eine gleichmäßige Verteilung der Farblösung zu sichern.

Die Avidität wurde mit dem relativen Aviditätsindex (RAI) in Prozent angegeben. Dieser errechnete sich aus den Extinktionswerten der Proben mit und ohne Harnstoffbehandlung. Als hoch-avide Antikörper galten diejenigen mit einem RAI > 60 %. Zwischen 40 % und 60 % lagen grenzwertig-avide Werte und niedrig-avide Werte < 40 %. In der Studie von Kneitz et al. wurde diese Methode zur Bestimmung der Avidität Varizella-Zoster-spezifischer IgG Antikörper verwendet und zeigte vergleichbare Werte zu Standardmessmethoden [122].

2.3.6 IFN- γ -ELISA

Bei diesem Testverfahren wurde das IFN- γ im Überstand der Zellkultur (Kapitel 2.3.8.1) ermittelt. Der Ablauf ist ähnlich mit dem in Kapitel 2.3.4 beschriebenen ELISA, jedoch muss die Platte vorher beschichtet werden.

Am ersten Tag der Testdurchführung erfolgte die Beschichtung der Mikrotiterplatte mit dem IFN- γ -Antikörper. Dafür wurde der Coating Buffer (dt. *Beschichtungspuffer*; 0,2M Carbonate-Bicarbonate buffer pH 9,2) mit 5µg/ml IFN- γ -Antikörper (Klon: MD.1) gemischt und jeweils 50 µl der Lösung in die Reagenzgefäße der Mikrotiterplatte pipettiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C. Hierbei bindet der IFN- γ -Antikörper, der sogenannte Capture Antibody (dt. *Fänger-Antikörper*) an den Boden der Mikrotiterplatte. Am zweiten Tag erfolgten drei Waschzyklen. Dabei wurden in die Reagenzgefäße der Mikrotiterplatte entleert und in jedes Reagenzgefäß 100 µl Waschpuffer pipettiert. Die Platte wurde nach 30-60 Sekunden Einwirkzeit entleert und kräftig auf einem saugfähigen Papier ausge-

schlagen. Um unspezifische Bindungen zu verhindern, wurden je 100 µl der Blocking Solution (dt. *Blockierende-Lösung*; PBS/5 % milk) in die Reagenzgefäße pipettiert und bei Raumtemperatur 30 Minuten inkubiert. Derweil wurden in einer Verdünnungsreihe 8 rh-IFN-γ (engl. *recombinant human IFN-γ*) Standardkonzentrationen vorbereitet: 2500 pg/ml, 1250 pg/ml, 625 pg/ml, 312,5 pg/ml, 156,3 pg/ml, 78,1 pg/ml, 39,1 pg/ml und 0 pg/ml. Anschließend wurde die Blocking Solution abgekippt und je 50 µl der verdünnten Standard- oder Probenlösungen in die Reagenzgefäße pipettiert. Das in den Standard- und Probenlösungen enthaltene IFN-γ bindet an den auf dem Boden der Mikrotiterplatte fixierten IFN-γ-Antikörper. Nach zwei stündiger Inkubation erfolgten drei Waschzyklen wie oben erläutert. Hierauf wurden 1 µg/ml Detection Antibody (dt. *Detektions-Antikörper, Biotin*) mit PBS/BSA 2 % verdünnt und pro Reagenzgefäß 50 µl von der Detection Antibody-Lösung pipettiert. Während der einen Stunde Inkubationszeit bindet der Detection Antibody an das IFN-γ. Anschließend erfolgten drei Waschzyklen, wie oben beschrieben. Im nächsten Schritt wurde Avidin-HRP (engl. *horseradish peroxidase*) 1:1000 in PBS/BSA 2 % verdünnt und je 50 µl dieser Lösung pro Reagenzgefäß hinzugefügt. Dies bewirkt eine Verstärkung schwacher Signale und erhöht die Nachweisbarkeit des gezielten Moleküls [123]. Nach einer Stunde erfolgte drei Waschzyklen, wie bereits erläutert, und pro Reagenzgefäß wurden 50 µl TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin)-Peroxidase-Lösung pipettiert, das als Chromogen dient. Nachdem ein Farbumschlag zu sehen war, wurden pro Reagenzgefäß 50 µl Stopplösung in der gleichen Reihenfolge und Geschwindigkeit wie die Zugabe der TMB-Peroxidase-Lösung pipettiert. Die photometrische Messung erfolgte innerhalb von 30 Minuten bei einer Messwellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 620 nm. Um sicherzustellen, dass die Farblösung während der Messung homogen verteilt ist, wurde die Mikrotiterplatte kurz vor der Messung vorsichtig geschüttelt.

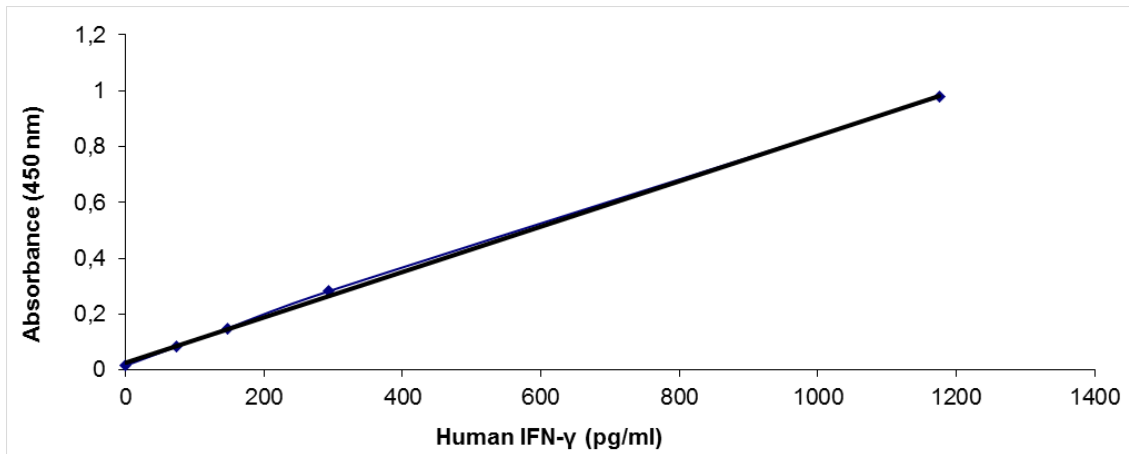


Abbildung 7: Standardkurve des IFN- γ -ELISAs

Die Standardkurve aus den Standardkonzentrationen der Verdünnungsreihe. Die X-Achse stellt die IFN- γ -Konzentrationen (pg/ml) und die Y-Achse den Absorptionsgrad (450 nm) dar.

Um die IFN- γ -Konzentrationen in den Proben zu berechnen, wurde zunächst eine Standardkurve (Abbildung 7) aus den Standardkonzentrationen der Verdünnungsreihe berechnet. Hierzu wurde ein Koordinatensystem erstellt. Mit dem Absorptionswerten der Proben konnten dann die unbekanntes IFN- γ -Konzentrationen der Studienteilnehmer ermittelt werden.

2.3.7 FSME-Antikörper-Neutralisationstest

Der FSME-Antikörper-Neutralisationstest dient der Bestimmung von neutralisierenden IgG Antikörper im Serum. Während einige antivirale Aktivitäten von Antikörpern auf infizierte Zellen zielen, scheint die wichtigste Funktion die Neutralisation der Infektiosität der Viren zu sein. Dabei binden Antikörper an die Oberfläche der Viren und verhindern dadurch den Eintritt der Viren in die Wirtszelle [91], [92]. Neben dem Avidität-ELISA gibt der Neutralisationstest eine Aussage über die Qualität und Funktionstüchtigkeit der Antikörper an.

Der FSME-Antikörper-Neutralisationstest wurde mit Nierenzellen von Hamstersäuglingen (ATCC BHK-21) durchgeführt. Nach zweifacher Verdünnung wurden die hitzeinaktivierten Serumproben in Doppelbestimmung mit 25 pfu (engl. *plaque forming units*) FSME-Viren vom Stamm Neudörfel für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Hamsterzellen hinzugefügt und die Inkubation für drei Tage fortgeführt. Danach wurde das Vorhandensein von Viren im Überstand mittels ELISA-Verfahren ermittelt.

Der FSME-Neutralisation-Titer (NT) wurde als Reziproke der verdünnten Serumproben definiert, die eine Reduktion von 90 % in der Absorption ergaben, das in dem ELISA ermittelt und mit den Kontrollen ohne Antikörper verglichen wurde. Ein NT Titer > 1:10 wurde als positiv gewertet [112].

2.3.8 Bestimmung FSME-spezifischer T-Zellen

Um die zelluläre Immunantwort gegen FSME-Viren zu ermitteln, setzten wir eine Zellkultur an, die mit FSME-Antigen stimuliert wurde. Zu jedem Patienten wurde zeitgleich eine zweite Zellkultur als Positivkontrolle angesetzt, die mit Phytohämagglutinin (PHA) stimuliert wurde. PHA aktiviert T-Zellen, indem es an den T-Zell-Rezeptor bindet und zu einer Stimulation der Zellteilung führt [124], [125]. Die IFN- γ -Ausschüttung diente als Marker für die Aktivierung der Zellen und wurde durch einen IFN- γ Secretion Assay, magnetische Zellseparation und Durchflusszytometrie ermittelt.

2.3.8.1 FSME-Antigen stimulierte Zellkultur

Vor dem Auftauen der kryokonservierten PBMCs wurden die Nährmedien X-VIVO und RPMI/FKS 5 % in einem Wasserbad auf 37°C erwärmt. In einen 15 ml Falcon Tube wurden 5 ml warmes RPMI/FKS 5 % pipettiert und die ebenfalls im Wasserbad rasch aufgetauten PBMCs zügig hinzugefügt. Anschließend wurde das Tube bei 1500 rpm für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet mit 5 ml RPMI/FKS 5 % resuspendiert. Das Zählen der lebenden Zellen erfolgte mit der Trypanblau-Lösung, wie in Kapitel 2.3.1 beschrieben. Nach erneuter Zentrifugation bei 1500 rpm 5 Minuten und Absaugen des Überstandes wurde das Pellet mit einer individuellen Menge des Nährmedium X-VIVO resuspendiert, sodass sich pro Milliliter $1 \cdot 10^6$ Zellen befanden. Für die FSME-Viren-Stimulation, eine Positiv- und eine Negativkontrolle, wurde in drei Reagenzgefäße einer 24-Mikrotiterplatte je 1 ml der Zellsuspension eines Studienteilnehmers pipettiert. Die Zellkultur wurde über Nacht im Inkubator bei 37°C und 5-7 % CO₂ kultiviert.

Am darauffolgenden Tag wurde lichtmikroskopisch kontrolliert, ob sich die Zellen im Nährmedium adaptiert hatten. Es erfolgte die Stimulation der Zellen. Das erste

Reagenzgefäß jedes Studienteilnehmers wurde mit 1 µg/ml PHA als Positivkontrolle, das zweite mit 1 µg/ml FSME-Antigen vorsichtig resuspendiert. Ein drittes Reagenzgefäß blieb unbehandelt als Negativkontrolle. Erneut wurden die Zellen für 20 Stunden in dem Inkubator bei 37°C und 5-7 % CO₂ belassen.

2.3.8.2 IFN-γ Secretion Assay

Bei diesem Verfahren werden FSME-spezifische Leukozyten markiert, isoliert und analysiert. Der Ablauf ist schematisch in Abbildung 8 dargestellt. Die Stimulation der *in vitro*-Zellkultur mit dem FSME-Antigen löst unter anderem die Sekretion von IFN-γ aus den FSME-spezifischen Lymphozyten aus. Der *Catch Reagent* (dt. *Fangende-Reagenz*) ist ein Antikörper mit zweifacher Spezifität und bindet nach dem Hinzufügen in die Zellkultur sowohl an die Oberfläche aller Leukozyten als auch an IFN-γ. Anschließend werden die Zellen mit einem weiteren IFN-γ-spezifischem Antikörper (engl. *IFN-γ Detection Antibody*) markiert, der wiederum mit PE (Phycoerythrin) konjugiert ist. PE ist ein Fluorochrom und sensitiver Nachweis in der Durchflusszytometrie. Im letzten Schritt wird ein Anti-PE Antikörper dazugegeben, der mit magnetischen *MicroBeads* (dt. *Mikrokügelchen*) verbunden ist. Dadurch können die markierten Zellen in der magnetischen Zelltrennung isoliert und separat weiterverarbeitet werden [126].

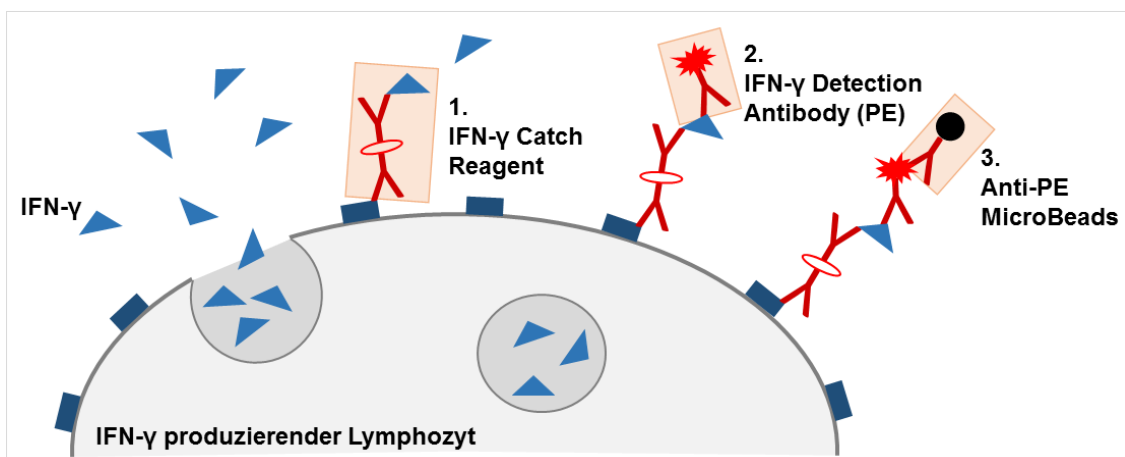


Abbildung 8: Darstellung des IFN-γ Secretion Assays

Der Lymphozyt schüttet nach der Stimulation mit dem FSME-Antigen IFN-γ aus. Der 1. Antikörper, IFN-γ-Catch Reagent, bindet sowohl an einen Oberflächenmarker der Zelle als auch an IFN-γ. Der 2. Antikörper, IFN-γ Detection Antibody, bindet an das bereits an den 1. Antikörper gebundene IFN-γ. Im letzten Schritt bindet der 3. Antikörper, Anti-PE MicroBeads, an den 2. Antikörper. Nach diesen Schritten sind die IFN-γ-produzierenden Lymphozyten einer Probe markiert. Modifiziert nach [126].

Vor Beginn der Testdurchführung wurden pro Reagenzgefäß 100 ml 4-8°C kalter MACS-Puffer, 100 µl 4-8°C kaltes X-VIVO und 10 ml 37°C warmes X-VIVO vorbereitet. Der erste Schritt diente der Markierung der IFN-γ-sezernierenden Lymphozyten mit dem IFN-γ *Catch Reagent*. Dazu wurde die Zellkultur in ein 15 ml Tube überführt und durch Zentrifugation bei 1500 rpm für 5 Minuten vom Überstand getrennt. Je 600 µl des Überstands wurden in Einfrierröhrchen pipettiert, bei -20°C gelagert und im IFN-γ-ELISA weiterverarbeitet, wie in Kapitel 2.3.6 beschrieben. Das Zellpellet wurde mit 10 ml kaltem MACS-Puffer gewaschen und bei 1250 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstandes wurde das Pellet mit 80 µl kaltem X-VIVO resuspendiert und anschließend 20 µl IFN-γ *Catch Reagent* hinzugefügt. Auf Eis wurde die Zellsuspension 5 Minuten inkubiert. Hierauf schloss sich durch das Hinzufügen von 10 ml warmen X-VIVO die IFN-γ-Sekretionszeit an. Dazu wurden die Zellen in einem fest verschlossenen Tube für 45 Minuten in einem 37°C warmen Wasserbad inkubiert und regelmäßig geschwenkt. Durch den Temperaturumschwung sezernierten die vorher nur mit kaltem Nährmedium behandelten Zellen nun in dem warmen Milieu Zytokine. Im nächsten Schritt wurden die Zellen, wie oben erläutert, gewaschen und das Pellet mit 80 µl kaltem MACS-Puffer resuspendiert. 20 µl IFN-γ *Detection Antibody* (PE) wurden hinzupipettiert und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Nach dem Waschen folgte der dritte Schritt, indem mit 80 µl kaltem MACS-Puffer das Zellpellet resuspendiert und 20 µl Anti-PE *MicroBeads* dazugefügt wurden. Die *MicroBeads* sind 50 nm große Partikel, die eine superparamagnetische Wirkung haben, welche für die magnetische Zelltrennung Voraussetzung ist, siehe Kapitel 2.3.8.3. Die Inkubationszeit betrug 15 Minuten bei 4-8°C im Kühlschrank. Im letzten Schritt erfolgte das Waschen der Zellen und Resuspendieren des Zellpellet mit 500 µl kaltem MACS-Puffer.

2.3.8.3 Magnetische Zellseparation

Die magnetische Zellseparation (engl. *magnetic-activated cell sorting*, MACS) ist eine Methode, mit der die magnetisch markierten Zellen von dem Überstand und den unmarkierten Zellen getrennt werden. Hierbei erreicht man einen hohen

Reinheitsgrad der Zellfraktionen [127]. Durch das Zusammenführen einer mit ferromagnetischen Kugeln gefüllten Zelltrennsäule und einem Permanentmagnet wird ein magnetisches Feld aufgebaut. Wenn eine Zellsuspension mit MicroBeads markierten Zellen auf die Säule gelegt wird, bleiben die markierten Zellen aufgrund der magnetisch vorherrschenden Kraft in der Säule. Das Durchlaufen der unmarkierten Zellen wird Negativ-selektiert genannt, wohingegen die Zellen die in der Säule verbleiben positiv selektioniert werden. In diesem Experiment stellt die positive Zellfraktion die FSME-spezifischen Lymphozyten dar. Der Ablauf ist in Abbildung 9 dargestellt.

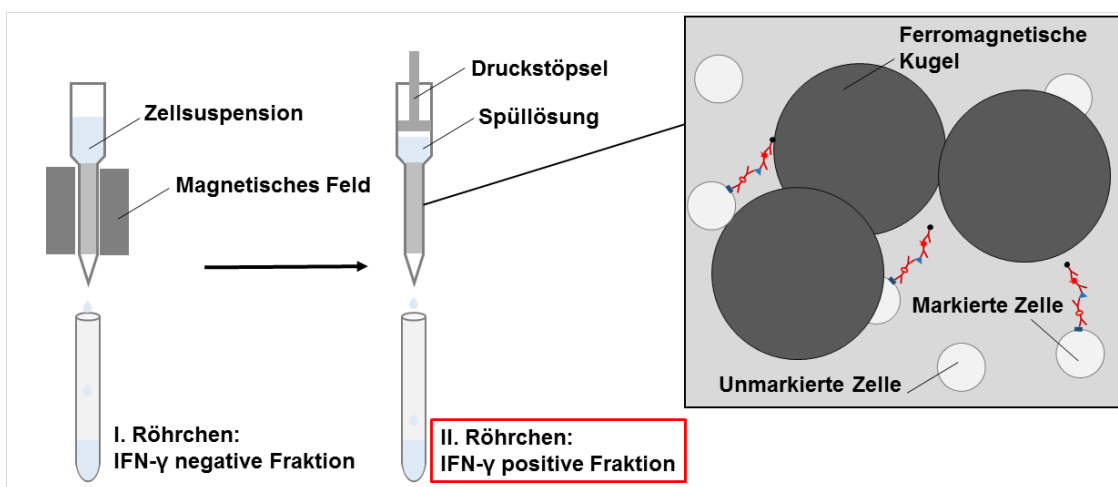


Abbildung 9: Darstellung der magnetischen Zelltrennung

Im ersten Schritt läuft die Zellsuspension mit den markierten Zellen durch das magnetische Feld. In das 1. Röhrchen wird die negative Fraktion, das heißt die unmarkierten Zellen, gesammelt. Im zweiten Schritt wird das magnetische Feld entfernt und ein 2. Röhrchen fängt die positive Fraktion, die markierten und IFN- γ -positiven Zellen, nach Durchspülen mit dem Druckstößel auf. Modifiziert nach [126].

Zu Beginn des Versuches wurde eine MS-Zelltrennsäule in den Permanentmagneten VarioMACS oder MiniMACS Separator gesteckt, sodass ein magnetisches Feld entstand. Bevor die mit dem IFN- γ Secretion Assay vorbereitete Zellsuspension in die MS-Säule pipettiert wurde, erfolgte die Spülung dieser mit 500 μ l reinem MACS-Puffer. Nach dem Durchlaufen des MACS-Puffers wurde die Zellsuspension auf die Säule gelegt. Damit keine Zellen in dem Tube verblieben, wurde dieser mit 500 μ l MACS-Puffer gespült und die Suspension in die MS-Säule pipettiert. Darauf folgte die dreimalige Spülung der Säule mit jeweils 500 μ l MACS-Puffer. Es war darauf zu achten, dass keine Bläschen beim Einfüllen der Zellsu-

suspension und des MACS-Puffers in die Säule entstehen und Zellen an der Säulenwand oberhalb des magnetischen Feldes kleben bleiben. Des Weiteren musste nach jedem Spüldurchlauf gewartet werden, bis der MACS-Puffer komplett durchgelaufen war. In einem unterhalb der Säule positioniertem FACS-Röhrchen I (negative Zellfraktion) wurden die unmarkierten Zellen aufgefangen. Anschließend erfolgte die Zentrifugation des FACS-Röhrchens bei 1500 rpm für 5 Minuten. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet mit 500 µl MACS-Puffer resuspendiert und die Zellsuspension erneut in die Säule pipettiert. Es folgten, wie oben beschrieben, drei Spüldurchläufe. Im nächsten Schritt wurde die Säule von dem Permanentmagnet entfernt, rasch ein FACS-Röhrchen II (positive Zellfraktion) positioniert und mit 500 µl MACS-Puffer gespült. Damit die markierten Zellen sich von den ferromagnetischen Kugeln in der Säule gut trennen konnten, wurde der MACS-Puffer aktiv mit einem sterilen Druckstößel zügig durch die Säule gedrückt. In dem FACS-Röhrchen II befanden sich die markierten FSME-spezifischen Lymphozyten, mit denen weitergearbeitete wurde.

2.3.8.4 Durchflusszytometrie

Vereinfacht ausgedrückt ist die Durchflusszytometrie ein Verfahren, das Streulichtsignale misst und analysiert, die durch Partikel ausgelöst werden, die durch einen Lichtstrahl fließen. Diese Partikel können zum Beispiel Zellen, Chromosomen oder Moleküle sein [128]. Die Hauptbestandteile eines Durchflusszytometers sind

- eine feine Messkammer,
- eine Lichtquelle, meist in Form eines Laserstrahls,
- ein elektronisches Netzwerk, das die Lichtsignale detektiert und in Zahlen konvertiert, die proportional zur Lichtintensität sind sowie
- ein Computer, der die Zahlen erfasst und analysiert [128].

In Abbildung 10 ist der Aufbau eines Durchflusszytometers schematisch dargestellt.

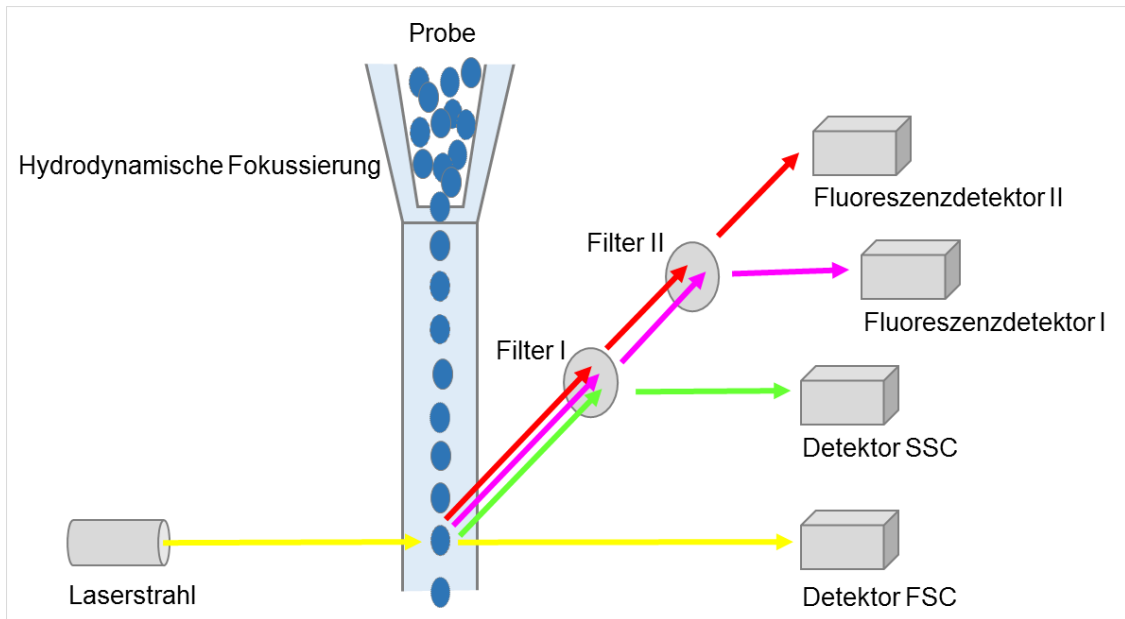


Abbildung 10: Darstellung eines Durchflusszytometers

Die Probe fließt durch die Messkammer. Ein Laserstrahl fällt auf die Zellen und erzeugt eine Lichtstreuung. Es entsteht ein Vorwärtsstreuung (engl. *forward scatter*, FSC) und Seitwärtsstreuung (engl. *side scatter*, SSC). Markiert man die Zellen vor der Messung mit fluoreszierenden Antikörpern, können durch die Fluoreszenzdetektoren noch genauere Aussagen über die Morphologie der Zellen getroffen werden. Modifiziert nach [128].

Bevor die Probe in die Messkammer gelangt, bewirkt die hydrodynamische Fokussierung, dass die Zellen einzeln und nacheinander durch die feine Messkammer fließen. Jede Zelle passiert den Laserstrahl und verursacht eine einzigartige Lichtstreuung. Die Beugung des Lichtes, das nach vorne streut, das Vorwärtsstreuung (engl. *forward scatter*, FSC), ist bedingt durch die Größe der Zelle. Licht, das im 90°-Winkel zu dem ursprünglichen Lichtstrahl einfällt, ist das Seitwärtsstreuung (engl. *side scatter*, SSC) und die Brechung ist abhängig von Granularität und Zelloberfläche. Beide, FSC und SSC, sind individuell für jede Zelle, und aus einer heterogenen Probe wie dem Blut kann eine grobe Differenzierung der Zelltypen erfolgen. Jedoch ist eine weitaus genauere Aussage durch die Fluoreszenzmessung möglich. Hierbei werden Oberflächenmarker (engl., *cluster of differentiation*, CD) oder intrazelluläre Moleküle wie DNA oder Zytokine mit verschiedenen fluoreszierenden Antikörpern markiert. Die maximale Emission der Fluorochrome reicht von 420-794 nm. Das Durchflusszytometer benutzt verschiedene Kanäle, Filter und Fluoreszenzdetektoren, um die unterschiedlichen Wellenlängen zu messen [129].

Die Datenanalyse der Durchflusszytometrie basiert im Wesentlichen auf dem Prinzip des Gatens (dt. „Schleusen“). In einer Koordinatenachse, bei dem die Abszissenachse dem FSC und die Ordinatenachse dem SSC entspricht, wird ein Streudiagramm erstellt. Jede Punktauftragung (engl. *dotplot*) steht für eine gemessene Zelle. Durch das Setzen von sequentiellen Gates ist die genaue Analyse einzelner Zellpopulationen möglich. In Abbildung 11 ist eine Analyse unmarkierter PBMCs dargestellt. Anhand der oben genannten Gründe ist eine Differenzierung in Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten möglich.

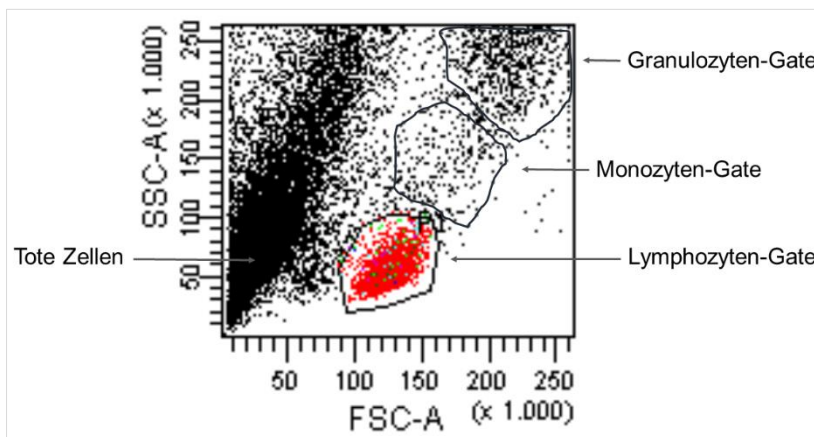


Abbildung 11: Durchflusszytometrie-Punktplot

Repräsentative Darstellung einer Dotplot-Graphik von PBMCs. Jeder Punkt stellt eine Zelle dar. In der Graphik sind 3 Gates gesetzt: Granulozyten-, Monozyten- und Lymphozyten-Gate.

2.3.8.5 Phenotypisierung durch extrazelluläre Fluoreszenzfärbung

Wir arbeiteten mit der Population der FSME-spezifischen Lymphozyten weiter, die bereits, wie in Kapitel 2.3.8.3 erläutert, durch die magnetische Zellseparation von den anderen PBMCs isoliert wurden. Die Zellen besitzen durch den IFN- γ Secretion Assay, Kapitel 2.3.8.2, bereits einen IFN- γ -Antikörper. Um weitere Aussagen über die Population treffen zu können, erfolgte die Phänotypisierung durch Fluoreszenzfärbung der CD-Moleküle. Der Mastermixes setzt sich aus den in Tabelle 11 aufgelisteten Antikörper zusammen.

Tabelle 11: Färbepanel zur Phänotypisierung im Durchflusszytometer

Antikörper	Fluorochrom	Zelltyp
CD4	BV421	T _H Zellen, CD4+ Treg
CD8	Per/CP	Tc, CD8+ Treg
CD28	PE/Cy7	T-Zellen
CD45RA	FITC	Alle Leukozyten, RA=geringe Assoziation zum TCR
CD69	APC	Aktivierte T-Zellen

Dafür wurden für jede Probe 50 µl FACS-Puffer und je 0,3 µl Fluorochrom-konjugierte Antikörper, im Falle des CD8-Antikörpers 0,5 µl, angesetzt und kühl aufbewahrt. Die Zellen wurden mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen und bei 1500 rpm 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet mit dem Mastermix resuspendiert und 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Es folgte ein erneuter Waschzyklus und das Pellet wurde mit 250 µl FACS-Puffer resuspendiert. Im Anschluss fand zügig die Messung am Durchflusszytometer statt.

Um die CD4+ und CD8+ T-Zellen mit der BD Software FACS DIVA weiter phänotypisch zu charakterisieren, wurden konstante Gates definiert, die sich neben Expression der Oberflächenmarker CD4 und CD8 auch nach der Expression der Oberflächenmarker CD45RA, CD69 und CD28 richten, wie in Tabelle 12 dargestellt ist. CD69 wurde als Aktivierungsmarker genutzt [73], [130]. Naive-T-Zellen wurden als CD45RA+CD28+ definiert, Gedächtnis-T-Zellen als CD45RA-CD28+, Effektor-T-Zellen als CD45RA-CD28- und terminal differenzierte Effektor-Gedächtnis-T-Zellen mit Re-Expression der CD45 Isoform RA (TEMRA), als CD45RA+CD28- [73].

Tabelle 12: Definierte durchflusszytometrische Gates

	CD45RA+	CD45RA-
CD28+	Naive-T-Zellen	Gedächtnis-T-Zellen
CD28-	TEMRA	Effektor-T-Zellen

Die Gates beziehen sich auf CD4+ und CD8+ T-Zellen. Naive-T-Zellen: CD45RA+CD28+, Gedächtnis-T-Zellen: CD45RA-CD28+, Effektor-T-Zellen: CD45RA-CD28-, terminal differenzierte Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (TEMRA): CD45RA+CD28-.

2.3.9 Statistische Datenauswertung

Zur statistischen Datenauswertung wurde die Statistik- und Analysesoftware IBM SPSS Statistics 25 (Chicago, IL, USA) benutzt. Die Graphiken wurden mit Microsoft PowerPoint 2013 und IBM SPSS Statistics 25 erstellt.

Die Berechnung von absoluten und relativen Häufigkeiten erfolgte für nominal-skalierte Variablen. Für kardinal skalierte Variablen wurden deskriptive Kennziffern, wie der Mittelwert, die Standardabweichung, der Median, Minimum und Maximum, definiert. Die Unterschiede der Gruppen wurden bei nicht normal-verteilten Variablen (Vortestung durch Komolgorov-Smirnov-Test) mit dem Mann-Whitney-U-Test analysiert. Für dichotome Variablen wurde der Chi²-Test und bei einer Stichprobengröße < 20 bei dichotomen Variablen der Exakte Test nach Fisher verwendet. Die Analyse der Korrelationen, zwischen der FSME-spezifischen IgG Antikörper Konzentration und der FSME-spezifischen IgG Antikörper Avidität sowie zwischen der FSME-spezifischen T-Zell-Antwort und der FSME-spezifischen IgG Antikörper Konzentration und der FSME-spezifischen IgG Antikörper Avidität wurde mit dem Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman berechnet. Ein p-Wert ≤ 0.05 wurde als statistisch signifikant betrachtet.

3 Ergebnisse

3.1 Demographische Daten

Die demographischen Daten der Patienten mit JIA und der immunologisch gesunden Kontrollgruppe (engl. *healthy control*, HC) im Vergleich zeigt Tabelle 13.

JIA-Patienten und HC zeigten eine ähnliche Verteilung hinsichtlich des Geschlechts. 63,0 % (63, N=100) der Patienten und 45,2 % (14, N=31) der HC waren weiblich ($p=0,096$). Die Patienten waren signifikant älter als die HC ($p=0,001$). Das durchschnittliche Alter am Tag der Blutentnahme betrug 14,2 Jahre bei den JIA-Patienten und 12,0 Jahre bei den HC.

Mit 6,2 Jahren waren die JIA-Patienten signifikant älter zum Zeitpunkt der ersten FSME-Teilimmunisierung als die Kontrollgruppe mit 4,7 Jahren ($p=0,014$). 62,0 % (62, N=100) der JIA-Patienten und 58,1 % (18, N=31) der HC erhielten FSME-Boosterimpfungen ($p=0,671$). Davon hatten 42 (67,7 %, N=62) JIA-Patienten 1 Boosterimpfung, 16 (25,8 %, N=62) JIA-Patienten 2 Boosterimpfungen und 4 (6,5 %, N=62) JIA-Patienten 3 Boosterimpfungen, wohingegen 14 (77,8 %, N=18) HC 1 Boosterimpfung, 4 (22,2 %, N=18) HC 2 Boosterimpfungen und kein HC 3 Boosterimpfungen vorwies. Sowohl bei den Patienten als auch bei HC betrug die Anzahl aller FSME-Impfungen, Grundimmunisierung und Boosterimpfungen miteingeschlossen, im Median 4 ($p=0,397$). In beiden Gruppen war die letzte FSME-Impfung im Durchschnitt 3,3 Jahre ($p=0,457$) her und die FSME-Grundimmunisierung circa 6 Jahre vor der Blutentnahme ($p=0,971$). Die Zeitspanne zwischen FSME-Grundimmunisierung und der ersten Boosterimpfung war mit 3-4 Jahren ähnlich lang wie in der JIA-Patienten- und Kontrollgruppe ($p=0,175$).

Die Blutwerte zeigten bei 19 (23,8 %, N=80) der JIA-Patienten pathologische Befunde bezüglich der Blutsenkungsgeschwindigkeit (> 10 mm/h), bei 9 (10,5 %, N=86) des C-reaktiven Proteins (> 5 mg/L) und bei 2 (2,7 %, N=74) der Leukozyten ($> 12.000/\mu\text{l}$) außerhalb der Altersnorm. In der Kontrollgruppe zeigte kein

Teilnehmer pathologische Werte der genannten Laborparameter. Die Thrombozytenwerte waren bei 1 (11,1 %, N=9) HC und 3 (4,1 %, N=74) Patienten über die Altersnorm erhöht und bei 2 (2,7 %, N=74) Patienten unter der Altersnorm erniedrigt.

Tabelle 13: Demographische Daten der JIA-Patienten und HC

	JIA-Patienten						HC						p-Wert
	N	MW	SD	Median	Min	Max	N	MW	SD	Median	Min	Max	
Alter bei Blutentnahme	100	14,2	3,2	14,8	5,8	19,9	31	12,0	2,9	11,9	5,9	17,6	0,001
Alter bei 1. FSME-Teilimpfung	92	6,2	3,4	6,5	0,9	14,9	31	4,7	2,6	4,4	1,3	12,7	0,034
Zeit seit FSME-Grundimmunisierung	92	6,4	2,9	5,9	0,3	16,1	31	6,0	2,9	6,2	0,21	10,5	0,496
Zeit zwischen FSME-Grundimmunisierung und 1. Boosterimpfung	59	3,4	1,4	3,3	0,1	8,3	18	3,8	0,8	3,8	2,9	6,0	0,175
Zeit seit letzter FSME-Impfung (allgemein)	92	3,3	2,1	3,1	0,1	9,1	31	3,3	2,3	2,8	0,1	8,2	0,971
Zeit seit letzter FSME-Impfung (keine Boosterimpfung erhalten)	34	4,1	2,1	5,0	0,0	9,0	13	3,8	3,0	2,8	0,0	0,8	
Zeit seit letzter FSME-Impfung (1 Boosterimpfung erhalten)	39	2,2	2,0	2,0	0,0	7,0	14	2,4	2,0	1,8	0,0	6,0	
Zeit seit letzter FSME-Impfung (2 Boosterimpfungen erhalten)	16	1,9	2,0	1,2	0,0	4,0	4	1,8	1,5	1,0	0,0	3,0	
Anzahl alle FSME-Impfungen	100	3,9	0,8	4,0	3	6	31	3,7	0,7	4,0	3	5	0,397
Geschlecht	N=100						N=31						0,096
Weiblich	63 (63,0 %)						14 (45,2 %)						
Männlich	37 (37,0 %)						17 (54,8 %)						
FSME-Boosterimpfung	N=100						N=31						0,671
Erhalten	62 (62,0 %)						18 (58,1 %)						
Nicht erhalten	35 (35,0 %)						13 (41,9 %)						
Unbekannt	3 (3,0 %)						-						
Anzahl der FSME-Boosterimpfungen	N=62						N=18						0,202
1	42 (67,7 %)						14 (77,8 %)						
2	16 (25,8 %)						4 (22,2 %)						
3	4 (6,5 %)						-						
Entzündungswerte	N=80						N=5						
BSG	N=80						N=5						
> 10,0 mm/h	19 (23,8 %)						-						
≤ 10,0 mm/h	61 (76,3 %)						5 (100 %)						
CrP	N=86						N=6						
> 5 mg/L	9 (10,5 %)						-						
≤ 5 mg/L	77 (89,5 %)						6 (100 %)						
Blutbild	N=74						N=9						
Leukozyten	N=74						N=9						
> 12.000/μl	2 (2,7 %)						-						
8.000-12.000/μl	72 (97,3 %)						9 (100 %)						
Thrombozyten	N=74						N=9						
> 390/nl	2 (2,7 %)						-						
< 150/nl	3 (4,1 %)						1 (11,1 %)						
150-390/nl	69 (93,2 %)						8 (88,9 %)						
Hämoglobin	N=74						N=9						
> 16 g/dl	4 (5,4 %)						-						
6,8-16 g/dl	70 (94,6 %)						9 (100 %)						

Die Daten beziehen sich auf den Zeitpunkt der Blutentnahme und sind mit der Anzahl (N) und der prozentualen Häufigkeit (%) aufgeführt. Die Werte sind als Mittelwert (MW) ± Standardab-

weichung (SD) und als Median inklusive minimalem (Min) und maximalem Wert (Max) angegeben. Dargestellt werden das Alter bei der Blutentnahme und das Alter bei der 1. FSME-Teilimpfung, die Zeit seit der FSME-Grundimmunisierung, die Zeit zwischen der FSME-Grundimmunisierung und der 1. Boosterimpfung und die Zeit seit der letzten Impfung (in Jahren) und die Anzahl aller Impfungen, das heißt die drei Teilimpfungen der Grundimmunisierung plus die Anzahl aller Boosterimpfungen. Ferner zeigt die Tabelle das Geschlecht, das Erhalten von Boosterimpfungen und deren Anzahl sowie die Entzündungswerte Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG) in Millimeter pro Stunde (mm/h) und C-reaktives Protein (CrP) in Milligramm pro Liter (mg/L). Die Blutbildwerte zeigen die Anzahl der Leukozyten pro Mikroliter (μ l), die Anzahl der Thrombozyten pro Nanoliter (nl) und den Hämoglobin-Wert in Gramm pro Deziliter (g/dl). Die Analyse der Häufigkeit erfolgte beim Alter mit dem Mann-Whitney-U-Test, bei den dichotomen Variablen mit dem Chi²-Test und sonst mit dem t-Test.

Tabelle 14 stellt die JIA-Patienten spezifische Daten dar. Die juvenile idiopathische Oligoarthritis war mit 33,0 % (33, N=100) der am häufigsten vertretende JIA-Subtyp, gefolgt von der Rheumafaktor-negativen Polyarthritits mit 17,0 % (17, N=100). Das durchschnittliche Alter bei Erstdiagnose der JIA betrug 9 Jahre. 4 von 100 Patienten befanden sich in Remission, davon 3 ohne und 1 Patient unter Medikamenteneinnahme. Bei 21 (42,9 %, N=49) Patienten zeigte zum Zeitpunkt der Blutentnahme mindestens ein Gelenk Entzündungszeichen. 27,0 % (27, N=100) der Patienten erhielten die FSME-Grundimmunisierung nach der Erstdiagnose JIA, wohingegen 61,0 % (61, N=100) die FSME-Grundimmunisierung davor abgeschlossen hatten. Von den 62 JIA-Patienten die eine Boosterimpfung erhielten, waren 56,5 % (35, N=62) bei der ersten Boosterimpfung an JIA erkrankt. In Tabelle 15 ist dargestellt welche Medikamente die JIA-Patienten zum Zeitpunkt der Blutentnahme und der Impfung eingenommen haben. 71 (78,0 %, N=91) der Patienten nahmen zum Zeitpunkt der Blutentnahme Medikamente ein. 43 (60,6 %, N=71) nahmen 1 Medikament, 22 (31,0 %, N=71) nahmen 2 Medikamente, 5 (7,0 %, N=71) nahmen 3 Medikamente und 1 (1,4 %, N=71) JIA-Patient nahm 4 Medikamente. Über die Hälfte der Patienten, 53,5 % (38, N=71), nahmen Wirkstoffe aus der Gruppe der nichtsteroidalen Antirheumatika ein. Ebenfalls knapp die Hälfte, 49,3 % (35, N=71), wurde mit Methotrexat und 19,7 % (14, N=71) mit TNF-Inhibitoren therapiert. Zum Zeitpunkt der Impfung nahmen 23 (28,1 %, N=82) JIA-Patienten Medikamente ein. Davon bekamen 15 (65,2 %, N=23) Patienten 1 und 8 (34,8 %, N=23) Patienten 2 Medikamente. Wirkstoffe aus der Gruppe der nichtsteroidalen Antirheumatika wurden von circa der Hälfte der Patienten, 47,8 % (11, N=23), eingenommen. Mit Methotrexat wurden 43,5

% (10, N=23) und mit TNF-Inhibitoren 13,0 % (3, N=23) der JIA-Patienten zum Zeitpunkt der Impfung behandelt.

Tabelle 14: JIA-Patienten spezifische Daten

	N	MW	SD	Median	Min	Max
Alter bei JIA-Erstdiagnose	88	9,0	5,0	9,3	0,6	17,4
Subtyp der JIA	N=100					
Oligoarthritis	33					
RF- Polyarthritis	17					
Nicht klassifizierte JIA	15					
Psoriasisarthritis	11					
Enthesitis-assoziierte Arthritis	8					
Nicht dokumentiert	8					
Systemische JIA	7					
RF+ Polyarthritis	1					
JIA-Erkrankung bei FSME-Grundimmunisierung	N=62					
Ja	27					
Nein	61					
Unbekannt	12					
JIA-Erkrankung bei 1. FSME-Boosterimpfung	N=62					
Ja	35 (56,5 %)					
Nein	20 (32,3 %)					
Unbekannt	7 (11,3 %)					
Laborwerte						
RF	N=55					
Positiv (> 15,0 IU/ml)	2 (3,6 %)					
Negativ (< 15,0 IU/ml)	53 (96,4 %)					
ANA	N=73					
Positiver Titer (1:> 80)	51 (69,9 %)					
Negativ Titer (1:< 80)	22 (30,1 %)					
HLA-B27	N=44					
Positiv	10 (22,7 %)					
Negativ	34 (77,3 %)					
Krankheitsremission z.Z. der Blutentnahme						
Ja mit Medikament	1					
Ja ohne Medikament	3					
Nein	96					
Entzündlich aktives Gelenk z.Z. der Blutentnahme	N=49					
Ja	21 (42,9 %)					
Nein	28 (57,1 %)					

Die Daten beziehen sich auf den Zeitpunkt der Blutentnahme und sind mit der Anzahl (N) und der prozentualen Häufigkeit (%) aufgeführt. Dargestellt ist das Alter bei Erstdiagnose in Jahren. Dieser Wert ist als Mittelwert (MW) ± Standardabweichung (SD) und als Median inklusive minimalem (Min) und maximalem Wert (Max) angegeben. Ferner zeigt die Tabelle die Verteilung der Subtypen der JIA (Oligoarthritis, Rheumafaktor-negative Polyarthritis, Nicht klassifizierte juvenile idiopathische Arthritis, Psoriasisarthritis, Juvenile idiopathische Arthritis mit Enthesitis, Systemische

juvenile idiopathische Arthritis, Rheumafaktor-positive Polyarthrit), ob die Erkrankung bei FSME-Grundimmunisierung oder 1. Boosterimpfung bestand und ob folgende Laborwerte positiv oder negativ waren: Rheumafaktor (RF) positiv ($> 15,0$ IU/ml) und negativ ($< 15,0$ IU/ml), antinukleärer Antikörper (ANA) positiver Titer ($1:> 80$) und negativ Titer ($1:< 80$) und humanes Leukozytenantigen B27 (engl. *human leukocyte antigen-B27*, HLA-B27). Weiter ob eine Krankheitsremission nach den Wallace Kriterien zum Zeitpunkt der Blutentnahme bestand und wenn ja, ob mit oder ohne Medikamente und ob ein oder mehrere Gelenke kardinale Entzündungszeichen nach Celsus und Galen zum Zeitpunkt der Blutentnahme aufwiesen.

Tabelle 15: Medikamente der JIA-Patienten

Medikamente z.Z. der Blutentnahme	N=91
Ja	71 (78,0 %)
Nein	20 (22,0 %)
Anzahl der Medikamente z.Z. der Blutentnahme	N=71
1	43 (60,6 %)
2	22 (31,0 %)
3	5 (7,0 %)
4	1 (1,4 %)
Wirkstoff z.Z. der Blutentnahme	N=71
NSAR-Wirkstoffgruppen	38 (53,5 %)
Methotrexat	35 (49,3 %)
TNF-Inhibitor	14 (19,7 %)
Etanercept	10 (14,1 %)
Adalimumab	3 (4,2 %)
Infliximab	1 (1,4 %)
Glucocorticoide	7 (9,9 %)
Sulfasalazin	4 (5,6 %)
Hydroxychloroquin	3 (4,2 %)
Leflunomid	2 (2,8 %)
Anakinra	1 (1,4 %)
Azathioprin	1 (1,4 %)
Tocilizumab	1 (1,4 %)
Medikamente z.Z. der Impfung	N=82
Ja	23 (28,1 %)
Nein	59 (72,0 %)
Anzahl der Medikamente z.Z. der FSME-Impfung	N=23
1	15 (65,2 %)
2	8 (34,8 %)
Wirkstoff z.Z. der Impfung	N=23
NSAR-Wirkstoffgruppen	11 (47,8 %)
Methotrexat	10 (43,5 %)
TNF-Inhibitor	3 (13,0 %)
Etanercept	2 (8,7 %)
Adalimumab	1 (4,3 %)
Hydroxychloroquin	1 (8,7 %)
Anakinra	1 (4,3 %)
Glucocorticoide	1 (4,3 %)
Sulfasalazin	1 (4,3 %)

Die Tabelle führt auf, ob die JIA-Patienten zum Zeitpunkt (z.Z.) der Blutentnahme und/oder z.Z. der FSME-Impfung Medikamente eingenommen haben und wenn ja, die Anzahl und den Wirkstoff. Die Anzahl (N) und die prozentuale Häufigkeit (%) sind aufgeführt. Folgende Wirkstoffgruppen sind aufgelistet: Nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR) in den jeweiligen Durchschnittsdosierungen laut Fachinformation, Methotrexat (MTX) in der Durchschnittsdosierung 10-15 mg/m² Körperoberfläche/Woche, Tumornekrosefaktor (TNF)-Inhibitor (Etanercept, Adalimumab, Infliximab) in der üblichen Dosierung laut Fachinformation, Glucocorticoide in der Durchschnittsdosierung < 0,1 mg/kg Körpergewicht/Tag, Sulfasalazin in der Durchschnittsdosierung 30-40 mg/kg

Körpergewicht/Tag, Hydroxychloroquin in der Durchschnittsdosierung $\leq 6,5$ mg/kg Körpergewicht/Tag, Leflunomid in der Durchschnittsdosierung 10-20 mg/kg Körpergewicht/Tag, Azathioprin in der Durchschnittsdosierung 1,5-3 mg/kg Körpergewicht/Tag und die Biologika Anakinra, und Tocilizumab in der üblichen Dosierung laut Fachinformation.

3.2 FSME-spezifische humorale Immunreaktion

3.2.1 Die IgG-anti-FSME-Konzentration

Bedauerlicherweise führten wir mit dem Probenmaterial eines in der Studie eingeschlossenen JIA-Patienten keine Versuche zur IgG-anti-FSME-Konzentration, -Avidität und dem FSME-Neutralisations-Titer durch, woraus folgt, dass die Anzahl der Patienten bei den Messungen 99 ist. 98,0 % (97, N=99) der JIA-Patienten und 100 % (31, N=31) der HC zeigten eine positive IgG-anti-FSME-Konzentration ≥ 165 VIUE/ml, wie in Tabelle 16 dargestellt ist. Drei Viertel beider Gruppen, 77,3 % (75, N=99) der JIA-Patienten und 74,2 % (23, N=31) der HC, zeigten eine stark positive IgG-anti-FSME-Konzentration mit einem Wert von 1000 VIUE/ml. Einen grenzwertigen (120-165 VIUE/ml) und einen negativen (< 120 VIUE/ml) Wert zeigten je 1 (1,0 %, N=99) JIA-Patient.

Tabelle 16: IgG-anti-FSME-Konzentration

	JIA-Patienten	HC	p-Wert
IgG-anti-FSME-Konzentration	N=99	N=31	
≥ 165 VIUE/ml	97 (98,0 %)	31 (100 %)	0,316
120-165 VIUE/ml	1 (1,0 %)	-	-
< 120 VIUE/ml	1 (1,0 %)	-	-
1000 VIUE/ml	75 (77,3 %)	23 (74,2 %)	-

Die Tabelle zeigt die IgG-anti-FSME-Konzentration bei JIA-Patienten und HC in VIUE/ml mit positiven (≥ 165 VIUE/ml), grenzwertigen (120-165 VIUE/ml), negativen (< 120 VIUE/ml) und stark positiven (1000 VIUE/ml) Werten. Die Analyse der Häufigkeit erfolgte mit dem Chi²-Test.

3.2.2 Die IgG-anti-FSME-Avidität

Tabelle 17 zeigt die IgG-anti-FSME-Avidität. Einen positiven relativen Aviditätsindex (RAI) mit > 60 % hatten 94 (94,9 %, N=99) JIA-Patienten und alle HC. 5 (5,1 %, N=99) der JIA-Patienten hatten einen grenzwertigen RAI zwischen 40-60 %. Keine Gruppe zeigte einen negativen RAI < 40 %.

Tabelle 17: IgG-anti-FSME-Avidität

	JIA-Patienten	HC	p-Wert
IgG-anti-FSME-Avidität in RAI	N=99	N=31	
> 60 %	94 (94,9 %)	31 (100 %)	0,474
40-60%	5 (5,1 %)	-	-
< 40 %	-	-	-

Die Tabelle zeigt die IgG-anti-FSME-Avidität bei JIA-Patienten und HC in RAI. Positive Werte sind > 60%, 40-60 % grenzwertige und < 40% negative Wert. Die Analyse der Häufigkeit erfolgte mit dem Chi²-Test.

3.2.3 Der FSME-Neutralisations-Titer

Im FSME-Antikörper-Neutralisationstest zeigten 88,5 % (23, N=26) der JIA-Patienten und 100 % (11, N=11) der HC einen positiven FSME-Neutralisations-Titer (NT) > 1:10. Einen negativen NT ≤ 1:10 hatten 3 (11,5 %, N=26) JIA-Patienten und kein HC. Die Daten zeigt Tabelle 18.

Tabelle 18: FSME-Neutralisations-Titer

	JIA-Patienten	HC	p-Wert
FSME-Neutralisations-Titer	N=26	N=11	
> 1:10	23 (88,5 %)	11 (100 %)	0,335
≤ 1:10	3 (11,5 %)	-	-

Die Tabelle zeigt den FSME-Neutralisations-Titer bei JIA-Patienten und HC. Der FSME-Neutralisations-Titer ist positiv bei Werten > 1:10 und negativ bei Werten ≤ 1:10. Die Analyse der Häufigkeit erfolgte mit dem exakten Test nach Fisher.

3.2.4 Korrelationen des humoralen Immunsystems

Die IgG-anti-FSME-Konzentration zeigt bei den JIA-Patienten eine signifikant positive Korrelation mit dem FSME-Neutralisation-Titer (R=0,690, p=0,001) und bei den HC dieselbe Tendenz (R=0,590, p=0,056). Korrelationsangaben der JIA-Patienten sind in Tabelle 19 und der HC in Tabelle 20 aufgelistet. Die Anzahl der Boosterimpfungen zeigte eine signifikant positive Korrelation mit der IgG-anti-FSME-Avidität bei den JIA-Patienten (R=0,458, p=0,001). Mit steigender Anzahl an FSME-Impfungen, das heißt, die 3 Teilimmunisierungen der FSME-Grundimmunisierung addiert mit der Anzahl der FSME-Boosterimpfungen, zeigt sich bei den JIA-Patienten eine signifikant höhere IgG-anti-FSME-Konzentration (R=0,240, p=0,017) und -Avidität (R=0,398, p=0,026). Die steigende Anzahl der FSME-Impfungen verbesserte auch bei den HC die IgG-anti-FSME-Avidität signifikant (R=0,398, p=0,026). Auf den FSME-Neutralisation-Titer hat die Anzahl

an FSME-Impfungen weder bei den JIA-Patienten noch bei den HC einen Einfluss. In Abbildung 12 A-C ist das Verhältnis der Anzahl der FSME-Impfungen mit der IgG-anti-FSME-Konzentration, -Avidität und dem NT dargestellt.

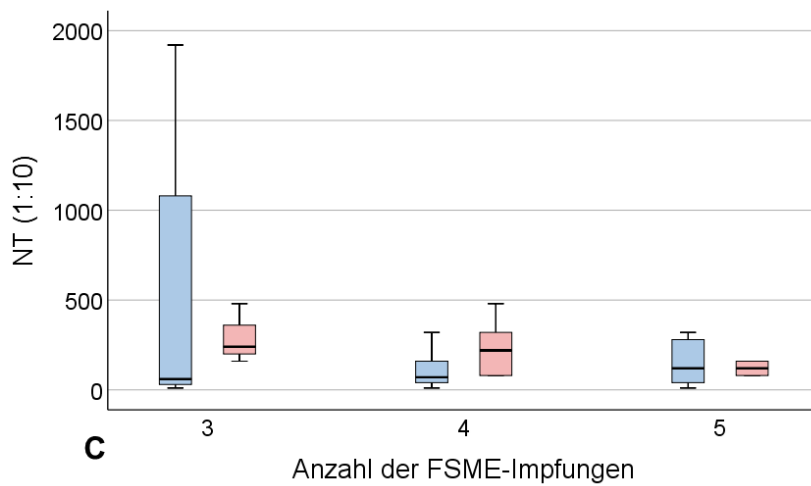
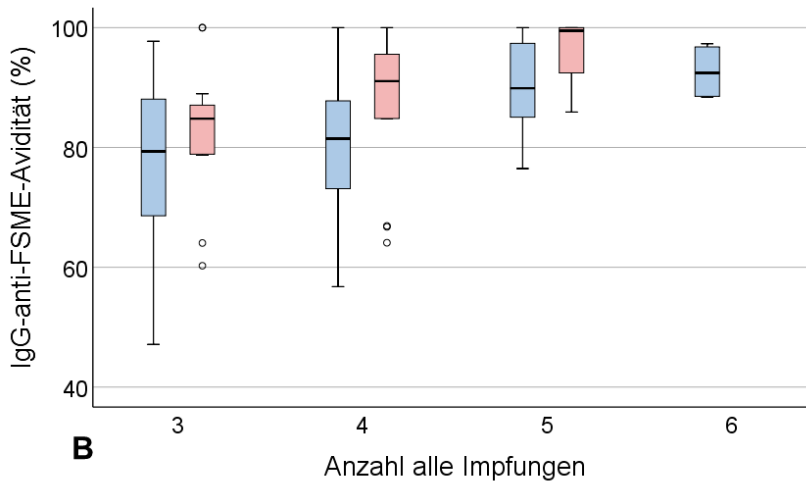
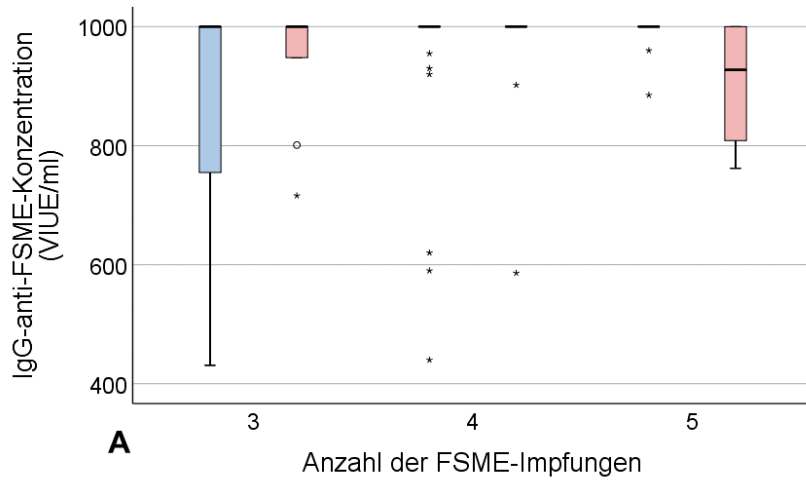


Abbildung 12: Korrelation der IgG-anti-FSME-Konzentration (A), -Avidität (B) und dem NT (C) mit Anzahl der FSME-Impfungen

Die blauen Balken sind die Patienten und die roten Balken die HC.

Zu A: Dargestellt ist das Verhältnis zwischen der Anzahl der FSME-Impfungen zu der IgG-anti-FSME-Konzentration in VIUE/ml. Mit dem maximal gemessenen Wert 1000 VIUE/ml kann keine endgültige Aussage über die IgG-anti-FSME-Konzentration getroffen werden. Je mehr FSME-Impfungen, desto mehr Patienten erreichen den maximalen Wert der IgG-anti-FSME-Konzentration. Bei den HC zeigt sich bei 5 FSME-Impfungen jedoch eine relativ niedrigere IgG-anti-FSME-Konzentration als bei 3 oder 4. Kein HC hat 6 FSME-Impfungen erhalten.

Zu B: Dargestellt ist das Verhältnis von der Anzahl der FSME-Impfungen zu der IgG-anti-FSME-Avidität (RAI in %). Je mehr FSME-Impfungen, desto höher die Avidität, sowohl bei den Patienten als auch bei den HC.

Zu C: Dargestellt ist das Verhältnis von der Anzahl der FSME-Impfungen zu dem FSME-Neutralisations-Titer (NT). Man sieht keine signifikante Veränderung mit steigender Anzahl an Impfungen. Zur besseren Darstellung wurde ein Ausreißer mit dem NT-Wert 3840 aus dem Boxplot der JIA-Patienten mit 3 Impfungen ausgeschlossen.

Je länger die Zeit zwischen der FSME-Grundimmunisierung und der ersten Boosterimpfung war, desto signifikant niedrigere Werte zeigte sich bei der IgG-anti-FSME-Avidität der HC ($R=-0,522$, $p=0,026$), nicht aber bei den JIA-Patienten ($R=0,090$, $p=0,496$). Eine längere Zeitspanne zwischen der FSME-Grundimmunisierung und ersten Boosterimpfung hatte keinen Einfluss auf die IgG-anti-FSME-Konzentration bei JIA-Patienten oder HC ($R=-0,048$, $p=0,716$ und $R=0,170$, $p=0,500$).

Es zeigte sich sowohl bei den JIA-Patienten als auch bei den HC, dass die Avidität der FSME-spezifischen IgG Antikörper mit der Zeit nach der FSME-Grundimmunisierung signifikant zunahm ($R=0,506$, $p=0,001$ und $R=0,522$, $p=0,003$). Die Konzentration der FSME-spezifischen IgG Antikörper tendierte, wie die IgG-anti-FSME-Avidität, bei den JIA-Patienten zur Zunahme ($R=0,205$, $p=0,051$). Der FSME-Neutralisations-Titer blieb bei JIA-Patienten und HC unbeeinflusst.

Bei den Studienteilnehmern, die eine FSME-Boosterimpfung erhalten haben, war diese bei den JIA-Patienten im Mittel 2,2 Jahre und bei den HC 2,4 Jahre her. Es zeigte sich bei den JIA-Patienten ein signifikant positiver Einfluss auf die IgG-anti-FSME-Avidität je längerer die 1. FSME-Boosterimpfung her war ($R=0,422$, $p=0,001$). Bei den HC hingegen nahm die IgG-anti-FSME-Konzentration signifikant ab mit längerer Zeit nach der 1. FSME-Boosterimpfung ($R=-0,588$, $p=0,010$). Der FSME-Neutralisations-Titer blieb diesbezüglich bei JIA-Patienten und HC unbeeinflusst.

Tabelle 19: Korrelation demographischer Daten und humoraler Parameter in JIA-Patienten

		IgG-anti-FSME-Konzentration	IgG-anti-FSME-Avidität	Neutralisations-Titer
IgG-anti-FSME-Avidität	Korrelationskoeffizient	0,170	-	-
	Signifikanz (2-seitig)	0,092	-	-
	N	99	-	-
FSME-Neutralisations-Titer	Korrelationskoeffizient	0,690	0,125	-
	Signifikanz (2-seitig)	0,001	0,542	-
	N	26	26	-
Anzahl der Boosterimpfungen	Korrelationskoeffizient	0,165	0,458	0,141
	Signifikanz (2-seitig)	0,201	0,001	0,577
	N	62	62	18
Anzahl aller FSME-Impfungen	Korrelationskoeffizient	0,240	0,359	0,049
	Signifikanz (2-seitig)	0,017	0,001	0,811
	N	99	99	26
Zeit zwischen FSME-Grundimmunisierung und 1. Boosterimpfung	Korrelationskoeffizient	-0,048	0,090	-0,398
	Signifikanz (2-seitig)	0,716	0,496	0,102
	N	59	59	18
Zeit nach der FSME-Grundimmunisierung	Korrelationskoeffizient	0,205	0,506	0,102
	Signifikanz (2-seitig)	0,051	0,001	0,628
	N	91	91	25
Zeit seit 1. FSME-Boosterimpfung	Korrelationskoeffizient	0,116	0,422	0,264
	Signifikanz (2-seitig)	0,383	0,001	0,290
	N	59	59	18

Die Tabelle bezieht sich auf die JIA-Patienten und zeigt den Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman, die Signifikanz (2-seitig) und die Anzahl (N). Die Korrelation zwischen der IgG-anti-FSME-Konzentration und -Avidität und dem FSME-Neutralisations-Titer untereinander und jeweils mit der Anzahl der FSME-Boosterimpfungen, der Anzahl aller FSME-Impfungen, das heißt die 3 Teilimmunisierungen der FSME-Grundimmunisierung plus die Anzahl der Boosterimpfungen, der Zeit zwischen der FSME-Grundimmunisierung und 1. FSME-Boosterimpfung, der Zeit nach der FSME-Grundimmunisierung und der Zeit seit der 1. FSME-Boosterimpfung.

Tabelle 20: Korrelation demographischer Daten und humoraler Parameter in HC

		IgG-anti-FSME-Konzentration	IgG-anti-FSME-Avidität	Neutralisations-Titer
IgG-anti-FSME-Avidität	Korrelationskoeffizient	0,044	-	-
	Signifikanz (2-seitig)	0,816	-	-
	N	31	-	-
FSME-Neutralisations-Titer	Korrelationskoeffizient	0,590	-0,180	-
	Signifikanz (2-seitig)	0,056	0,596	-
	N	11	11	-
Anzahl der Boosterimpfungen	Korrelationskoeffizient	-0,354	0,439	-0,260
	Signifikanz (2-seitig)	0,150	0,069	0,534
	N	18	18	8
Anzahl aller FSME-Impfungen	Korrelationskoeffizient	0,013	0,398	-0,414
	Signifikanz (2-seitig)	0,945	0,026	0,206
	N	31	31	11
Zeit zwischen FSME-Grundimmunisierung und 1. Boosterimpfung	Korrelationskoeffizient	0,170	-0,522	0,516
	Signifikanz (2-seitig)	0,500	0,026	0,191
	N	18	18	8
Zeit nach der FSME-Grundimmunisierung	Korrelationskoeffizient	-0,175	0,522	-0,370
	Signifikanz (2-seitig)	0,348	0,003	0,262
	N	31	31	11
Zeit seit der 1. FSME-Boosterimpfung.	Korrelationskoeffizient	-0,588	0,350	-0,454
	Signifikanz (2-seitig)	0,010	0,155	0,258
	N	18	18	8

Die Tabelle bezieht sich auf die HC und zeigt den Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman, die Signifikanz (2-seitig) und die Anzahl (N). Die Korrelation zwischen der IgG-anti-FSME-Konzentration und -Avidität und dem FSME-Neutralisations-Titer untereinander und jeweils mit der Anzahl der FSME-Boosterimpfungen, der Anzahl aller FSME-Impfungen, das heißt die 3 Teilimmunisierungen der FSME-Grundimmunisierung plus die Anzahl der Boosterimpfungen, der Zeit zwischen der FSME-Grundimmunisierung und 1. FSME-Boosterimpfung, der Zeit nach der FSME-Grundimmunisierung und der Zeit seit der 1. FSME-Boosterimpfung.

Eine MTX-Therapie während der FSME-Impfung hatte einen signifikant negativen Einfluss auf die IgG-anti-FSME-Avidität ($R=-0,356$, $p=0,001$), siehe Tabelle 21. Einen tendenziell negativen Einfluss zeigte eine TNF-Inhibitor-Therapie auf die IgG-anti-FSME-Konzentration sowohl während der FSME-Impfung ($R=-0,214$, $p=0,053$) als auch zum Zeitpunkt der Blutentnahme ($R=-0,204$, $p=0,055$). Im Gegensatz dazu zeigte der FSME-Neutralisations-Titer eine im Verhältnis positive Entwicklung unter der TNF-Inhibitor-Therapie während der FSME-Impfung ($R=0,854$, $p=0,060$) und zum Zeitpunkt der Blutentnahme ($R=0,395$, $p=0,056$).

Tabelle 21: Korrelationstabelle medikamentöser Therapie und humoraler Parameter der JIA-Patienten

		IgG-anti-FSME-Konzentration	IgG-anti-FSME-Avidität	Neutralisations-Titer
MTX-Therapie während FSME-Impfung	Korrelationskoeffizient	-0,113	-0,356	-0,040
	Signifikanz (2-seitig)	0,315	0,001	0,872
	N	9	9	2
MTX-Therapie z.Z. der Blutentnahme	Korrelationskoeffizient	-0,121	-0,103	-
	Signifikanz (2-seitig)	0,255	0,336	-
	N	35	35	-
TNF-Inhibitor-Therapie während FSME-Impfung	Korrelationskoeffizient	-0,214	-0,021	0,854
	Signifikanz (2-seitig)	0,053	0,427	0,060
	N	3	3	3
TNF-Inhibitor-Therapie z.Z. der Blutentnahme	Korrelationskoeffizient	-0,204	-0,091	0,395
	Signifikanz (2-seitig)	0,055	0,396	0,056
	N	13	13	5

Die Tabelle bezieht sich auf die JIA-Patienten und zeigt den Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman, die Signifikanz (2-seitig) und die Anzahl (N) der IgG-anti-FSME-Konzentration und -Avidität und dem FSME-Neutralisations-Titer mit einer MTX-Therapie während der FSME-Impfung, einer MTX-Therapie zum Zeitpunkt (z.Z.) der Blutentnahme, einer TNF-Inhibitor-Therapie während der FSME-Impfung und einer TNF-Inhibitor-Therapie z.Z. der Blutentnahme.

3.3 FSME-spezifische zelluläre Reaktivität

Die FSME-spezifische zelluläre Reaktivität wurde mit der IFN- γ -Produktion im IFN- γ Secretion Assay nach Stimulation mit dem FSME-Antigen mit Hilfe der Durchflusszytometrie gemessen. Die spezifische Stimulation erfolgte mit dem FSME-Antigen des Impfstoffes. Zudem wurde eine Positivkontrolle durchgeführt, indem eine Stimulation der T-Zellen mit Phytohämagglutinin (PHA) erfolgte und eine Negativkontrolle ohne jeglichen Stimulus.

3.3.1 IFN- γ -Produktion der T-Zellen nach Stimulation mit dem FSME-Antigen

Tabelle 22 zeigt die prozentuale IFN- γ -Produktion der CD4+ und CD8+ T-Zellen nach Stimulation mit FSME-Antigen, jeweils im Vergleich von JIA-Patienten und HC.

Tabelle 22: IFN- γ -Produktion der T-Zellen nach Stimulation mit dem FSME-Antigen

	JIA-Patienten						HC						p-Wert
	N	MW	SD	Median	Min	Max	N	MW	SD	Median	Min	Max	
IFN-γ-Produktion (%) der T-Zellen nach Stimulation mit FSME-Antigen													
CD4+ T-Zellen	26	10,6	12,0	5,6	0,3	43,5	12	4,5	6,5	2,1	0,2	20,1	0,035
Naive-T-Zellen	26	13,7	13,2	9,4	1,7	58,1	12	4,8	4,7	3,9	0,0	13,0	0,005
Gedächtnis-T-Zellen	26	26,9	21,2	21,5	0,0	71,0	12	19,9	12,5	17,9	2,3	36,6	0,466
Effektor-T-Zellen	26	2,0	3,8	0,7	0,0	18,2	12	1,8	3,1	0,5	0,0	11,1	0,792
TEMRA	26	1,4	2,5	0,8	0,0	11,0	12	1,0	1,2	0,6	0,0	4,0	0,914
CD4+CD69+ T-Zellen	26	5,4	5,4	4,1	0,1	18,7	12	3,1	4,5	2,0	0,1	13,1	0,081
Naive-T-Zellen	26	3,9	8,4	1,7	0,0	42,9	12	1,0	1,5	0,3	0,0	5,1	0,071
Gedächtnis-T-Zellen	26	22,9	21,0	14,8	0,0	65,2	12	16,1	10,1	16,0	1,1	30,8	0,722
Effektor-T-Zellen	26	1,4	3,2	0,2	0,0	15,9	12	0,5	0,8	0,3	0,0	2,8	0,699
TEMRA	26	0,8	1,6	0,0	0,0	5,9	12	0,5	0,7	0,2	0,0	2,3	0,699
CD8+ T-Zellen	26	8,4	16,4	2,1	0,2	68,8	12	1,8	1,8	1,0	0,1	6,4	0,114
Naive-T-Zellen	26	11,0	10,9	8,5	0,0	44,6	12	3,8	2,7	4,3	0,0	8,0	0,012
Gedächtnis-T-Zellen	26	3,9	6,2	2,2	0,0	30,4	12	1,8	1,2	2,1	0,3	3,9	0,588
Effektor-T-Zellen	26	2,3	3,7	1,1	0,0	18,2	12	2,8	4,0	1,9	0,0	14,8	0,393
TEMRA	26	8,1	8,7	4,6	0,0	35,0	12	8,4	15,2	4,3	0,0	55,8	0,566
CD8+CD69+ T-Zellen	26	3,2	6,7	0,9	0,0	27,2	12	1,1	1,7	0,5	0,0	6,3	0,137
Naive-T-Zellen	26	1,6	2,0	1,3	0,0	9,4	12	0,9	0,7	1,0	0,0	2,3	0,343
Gedächtnis-T-Zellen	26	3,0	6,1	1,9	0,0	30,4	12	1,2	1,1	0,9	0,0	3,7	0,429
Effektor-T-Zellen	26	1,6	3,2	0,6	0,0	15,9	12	1,2	1,5	0,5	0,0	3,7	0,722
TEMRA	26	4,8	6,6	2,6	0,0	25,8	12	6,8	15,1	2,3	0,0	54,5	0,988

Die Tabelle zeigt die prozentuale IFN- γ -Produktion der T-Zellen bei JIA-Patienten und HC im Vergleich nach Stimulation mit FSME-Antigen. Es werden von CD4+, CD4+CD69+, CD8+ und CD8CD69+ T-Zellen jeweils folgende Subpopulationen gezeigt: Naive-T-Zellen (CD45RA+CD28+), Gedächtnis-T-Zellen (CD45RA-CD28+), Effektor-T-Zellen (CD45RA+CD28-), TEMRA (CD45RA-CD28-). Die Werte sind als Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung (SD) und als Median inklusive minimalem (Min) und maximalem Wert (Max) angegeben. Die Analyse der Häufigkeit erfolgte mit dem Mann-Whitney-U-Test.

Die JIA-Patienten und gesunde Kontrollen zeigten im IFN- γ Secretion Assay eine ähnliche Verteilung der IFN- γ produzierenden aktivierten CD4+CD69+ und CD8+CD69+ T-Zellen nach Stimulation mit dem FSME-Antigen. In beiden Fällen haben die JIA-Patienten eine leicht erhöhte IFN- γ -Produktion im Gegensatz zu den HC, jedoch ohne signifikanten Unterschied. In Abbildung 13 ist eine Beispieldarstellung der Dotplot-Ergebnisse in der Durchflusszytometrie in JIA-Patienten

und HC dargestellt. Die graphische Darstellung der Ergebnisse zeigen die Boxplots in Abbildung 14.

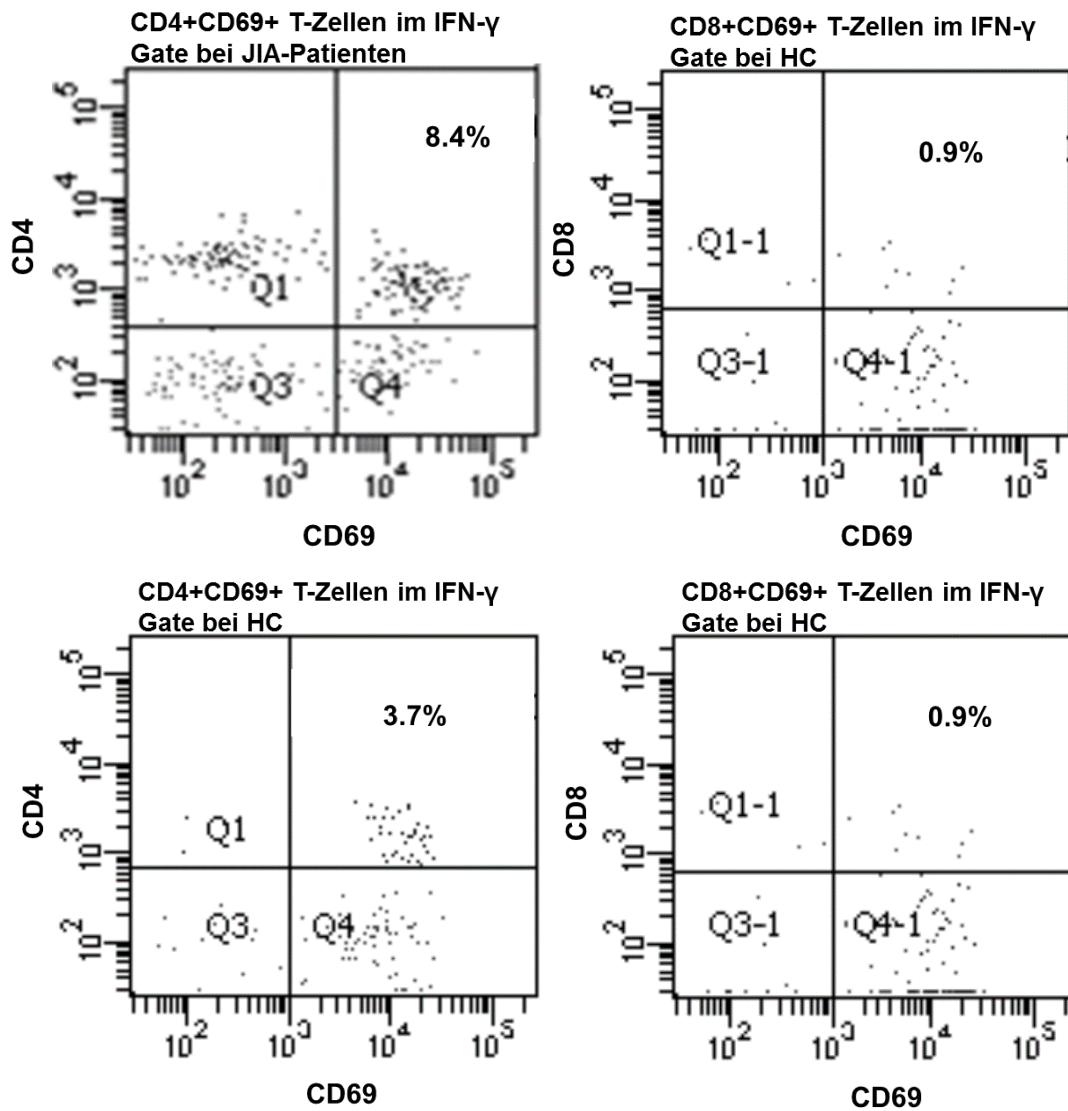


Abbildung 13: CD4+CD69+ und CD8+CD69+ T-Zellen im IFN- γ -Gate bei JIA-Patienten und HC (Dotplots)

Beispieldarstellung der Ergebnisse in der Durchflusszytometrie der CD4+CD69+ und CD8+CD69+ T-Zellen im IFN- γ -Gate bei JIA-Patienten und HC. Die Prozentangaben beziehen sich auf die IFN- γ positiven T-Zellen.

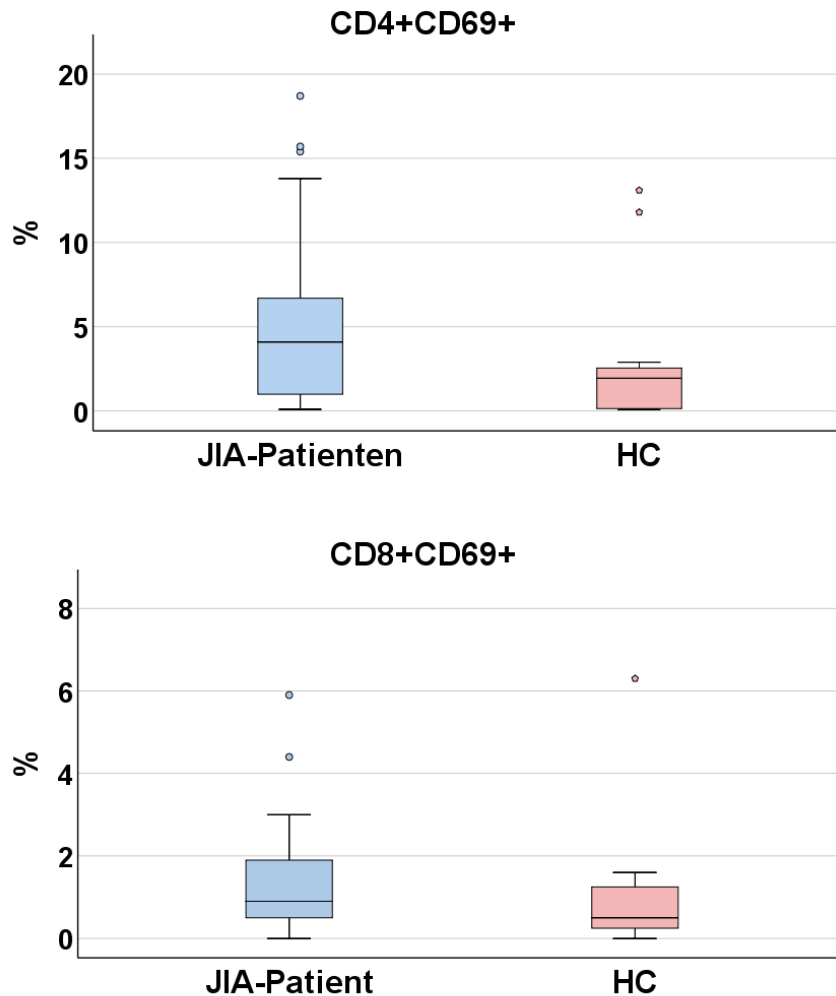


Abbildung 14: Prozentueller Anteil IFN- γ -positiver Zellen der aktivierten CD4+ und CD8+ T-Zellen nach Stimulation mit dem FSME-Antigen

Es zeigen sich proportional dezent mehr CD4+CD69+ T-Zellen bei den JIA-Patienten (blau) als bei den HC (rot), jedoch ohne signifikanten Unterschied. Ein ähnliches Verhältnis von JIA-Patienten und HC zeigen die CD8+CD69+ T-Zellen. Zur besseren Darstellung wurden aus dem Boxplot CD8+CD69+ T-Zellen bei den JIA-Patienten folgende Extremwerte entfernt: 27,2 % und 23,3 %.

In Abbildung 15 ist die IFN- γ -Produktion der aktivierten CD69+ Subpopulation der CD4+ T-Zellen nach Stimulation mit dem FSME-Antigen im Vergleich bei JIA-Patienten und HC dargestellt. Es zeigte sich in keiner CD4+CD69+ T-Zell Subpopulation ein signifikanter Unterschied zwischen den JIA-Patienten und HC. Die CD4+CD69+ Gedächtnis-T-Zellen produzierten am meisten IFN- γ in beiden Gruppen, gefolgt von den Naiven-T-Zellen. Im Verhältnis zeigten die CD4+CD69+ T-Zell Subpopulation der JIA-Patienten eine leicht erhöhte IFN- γ -Produktion im Vergleich zu den HC.

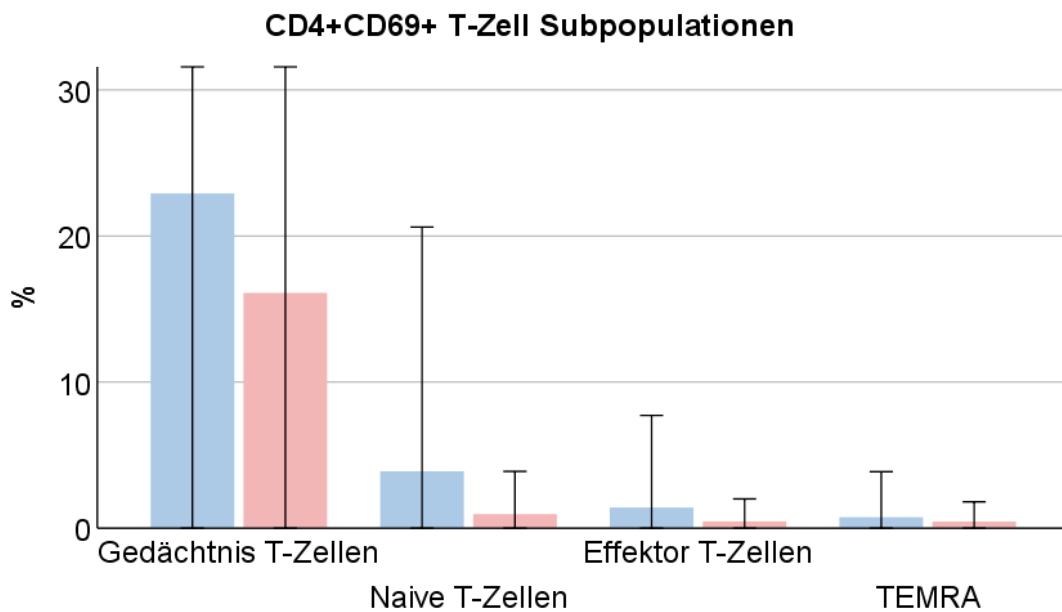


Abbildung 15: Prozentueller Anteil IFN- γ -positiver Zellen der CD4+CD69+ T-Zell Subpopulationen nach Stimulation mit dem FSME-Antigen

In der Verteilung der aktivierten CD4+CD69+ T-Zell Subpopulationen zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den JIA-Patienten (blau) und HC (rot).

Die IFN- γ -Produktion der CD8+CD69+ T-Zell Subpopulationen nach Stimulation mit dem FSME-Antigen bei JIA-Patienten und HC im Vergleich sind in Abbildung 16 dargestellt. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Die CD8+CD69+ TEMRA produzierten, verglichen mit den anderen Subpopulationen, am meisten IFN- γ . Es ist die einzige T-Zell Subpopulation, in der die HC im Verhältnis eine höhere IFN- γ -Produktion hatten als die JIA-Patienten. Bei der IFN- γ -Produktion der CD8+CD69+ Naiven-, Gedächtnis- und Effektor-T-Zellen, zeigen die JIA-Patienten dagegen leicht höhere Werte als die HC.

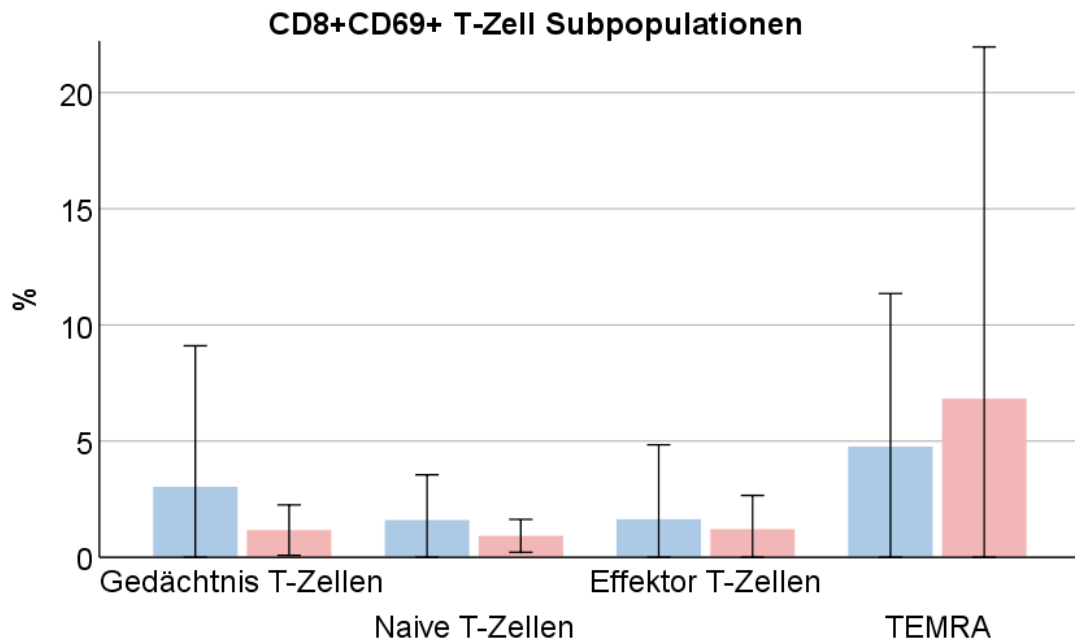


Abbildung 16: Prozentueller Anteil IFN- γ -positiver Zellen der CD8+CD69+ T-Zell Subpopulationen nach Stimulation mit dem FSME-Antigen

In der Verteilung der aktivierten CD8+CD69+ T-Zell Subpopulationen zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen JIA-Patienten (blau) und HC (rot).

Signifikante Unterschiede zwischen den JIA-Patienten und HC nach Simulation mit dem FSME-Antigen stellten sich sowohl in der Verteilung CD4+ und CD8+ T-Zellen als auch in der Verteilung der CD4+ und CD8+ Naiven-T-Zellen dar, wie in Abbildung 17 dargestellt.

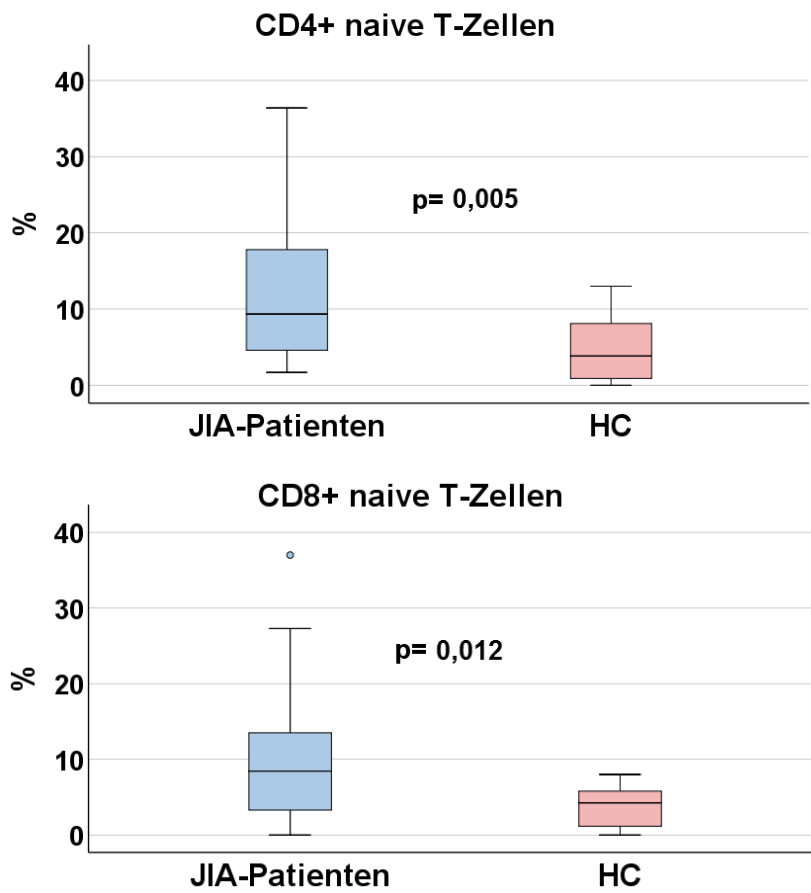


Abbildung 17: Prozentueller Anteil IFN- γ -positiver Naiver-T-Zellen nach FSME-Antigen Stimulation

Ein signifikanter Unterschied ist in der CD4+ T-Zell Subpopulation der Naiven-T-Zellen zwischen JIA-Patienten (blau) und HC (rot) mit einem p-Wert von 0,005 und in der CD8+ T-Zell Subpopulation der Naiven-T-Zellen mit einem p-Wert von 0,012 dargestellt. Zur besseren Übersicht wurden aus dem Boxplot der JIA-Patienten der CD4+ Naiven-T-Zellen der Extremwert 58,1 % und der CD8+ Naiven-T-Zellen der Extremwert 44,6 % entfernt.

3.3.2 IFN- γ -Produktion der T-Zellen nach Stimulation mit dem PHA

Die IFN- γ -Produktion der CD4+ und CD8+ T-Zellen nach Stimulation mit PHA zeigt Tabelle 23. In JIA-Patienten und HC stellt sich eine ähnliche Verteilung der IFN- γ -Produktion der CD4+ und CD8+ T-Zellen dar. Die IFN- γ -Produktion ist höher als nach der Stimulation mit dem FSME-Antigen. Jedoch die Tendenz in der IFN- γ -Produktion der CD4+ und CD4+CD69+ Naiven-T-Zellen ($p=0,057$ und $p=0,093$).

Tabelle 23: IFN- γ -Produktion der T-Zellen nach Stimulation mit PHA

	JIA-Patienten						HC						p-Wert
	N	MW	SD	Median	Min	Max	N	MW	SD	Median	Min	Max	
IFN-γ-Produktion (%) der T-Zellen nach Stimulation mit PHA													
CD4+ T-Zellen	26	22,2	14,0	20,8	2,0	49,2	12	15,6	10,6	15,0	2,6	39,7	0,207
Naive-T-Zellen	26	10,5	8,7	7,1	0,8	28,9	12	5,5	5,1	4,4	1,4	19,1	0,057
Gedächtnis-T-Zellen	26	22,3	13,3	21,3	0,0	57,5	12	19,3	11,1	18,4	6,3	46,2	0,343
Effektor-T-Zellen	26	0,6	0,9	0,2	0,0	4,2	12	0,5	0,5	0,3	0,0	1,5	0,525
TEMRA	26	1,1	2,7	0,2	0,0	11,0	12	0,3	0,2	0,3	0,0	0,8	0,327
CD4+CD69+ T-Zellen	26	21,0	13,6	20,2	0,7	45,5	12	14,8	9,8	14,6	2,5	35,5	0,269
Naive-T-Zellen	26	10,4	9,4	7,1	0,4	30,9	12	5,1	4,5	4,2	1,3	16,8	0,093
Gedächtnis-T-Zellen	26	21,3	13,1	20,4	0,0	55,1	12	18,6	10,8	17,8	6,0	45,7	0,359
Effektor-T-Zellen	26	0,5	0,9	0,2	0,0	4,2	12	0,4	0,4	0,2	0,0	1,4	0,963
TEMRA	26	0,7	2,1	0,2	0,0	10,5	12	0,3	0,2	0,3	0,0	0,8	0,411
CD8+ T-Zellen	26	22,2	20,4	19,2	0,8	95,5	12	17,4	10,2	16,5	1,7	38,1	0,566
Naive-T-Zellen	26	14,7	10,5	12,2	2,2	39,5	12	10,0	7,6	8,5	2,6	28,9	0,185
Gedächtnis-T-Zellen	26	10,4	10,9	8,1	0,0	53,0	12	8,6	4,3	9,9	1,6	15,8	0,816
Effektor-T-Zellen	26	3,3	3,9	1,8	0,0	17,5	12	6,1	11,1	2,2	0,9	39,9	0,447
TEMRA	26	5,7	6,3	3,4	1,3	31,8	12	4,1	3,4	3,3	0,5	12,1	0,393
CD8+CD69+ T-Zellen	26	20,7	20,5	17,3	0,6	94,0	12	16,9	9,8	16,3	1,7	36,7	0,865
Naive-T-Zellen	26	14,1	10,6	12,0	0,9	38,5	12	9,7	7,5	8,2	2,5	28,5	0,256
Gedächtnis-T-Zellen	26	9,9	10,8	7,5	0,0	52,3	12	8,3	4,3	9,3	1,6	15,6	0,745
Effektor-T-Zellen	26	3,1	3,9	1,5	0,0	17,2	12	5,9	11,0	2,1	0,7	39,4	0,411
TEMRA	26	4,5	3,8	3,2	0,0	16,2	12	4,0	3,4	2,8	0,5	11,9	0,609

Die Tabelle zeigt die prozentuale IFN- γ -Produktion der T-Zellen bei JIA-Patienten und HC im Vergleich nach Stimulation mit PHA. Es werden von CD4+, CD4+CD69+, CD8+ und CD8CD69+ T-Zellen jeweils folgende Subpopulationen gezeigt: Naive-T-Zellen (CD45RA+CD28+), Gedächtnis-T-Zellen (CD45RA-CD28+), Effektor-T-Zellen (CD45RA+CD28-), TEMRA (CD45RA-CD28-). Die Werte sind als Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung (SD) und als Median inklusive minimalem (Min) und maximalem Wert (Max) angegeben. Die Analyse der Häufigkeit erfolgte mit dem Mann-Whitney-U-Test.

Die IFN- γ -Produktion der T-Zellen der Zellkultur ohne Stimulus zeigte deutlich geringere Werte, sowohl in JIA-Patienten (N=5) und HC (N=2). Die Daten sind auf Grund der geringen Fallzahl nicht aufgezeigt.

3.3.3 IFN- γ -Konzentration im Überstand der Zellkulturen

Die IFN- γ -Konzentration im Überstand der Zellkulturen nach Stimulation mit FSME-Antigenen und PHA wurde bei 12 JIA-Patienten und 10 HC gemessen. Die

Ergebnisse zeigen Tabelle 24 und Abbildung 18. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den JIA-Patienten und HC. Die IFN- γ -Konzentration war nach Stimulation mit PHA deutlich höher als nach Stimulation mit dem FSME-Antigen sowohl in JIA-Patienten als auch in HC.

Tabelle 24: IFN- γ -Konzentration im Überstand der Zellkulturen

	JIA-Patienten						HC						p-Wert
	N	MW	SD	Median	Min	Max	N	MW	SD	Median	Min	Max	
FSME-Antigen	12	834,1	747,1	552,0	10,8	2063,3	10	472,5	661,7	143,3	27,0	1905,8	0,254
PHA	12	1170,9	685,9	1304,5	60,8	1913,3	10	1342,3	472,2	1405,8	443,3	2013,3	0,674

IFN- γ -Konzentration im Überstand der Zellkulturen nach Stimulation mit dem FSME-Antigen und PHA in JIA-Patienten und HC wurde mit einem IFN- γ ELISA ermittelt und ist in der Einheit pg/ml dargestellt. Die Analyse der Häufigkeit erfolgte mit dem Mann-Whitney-U-Test.

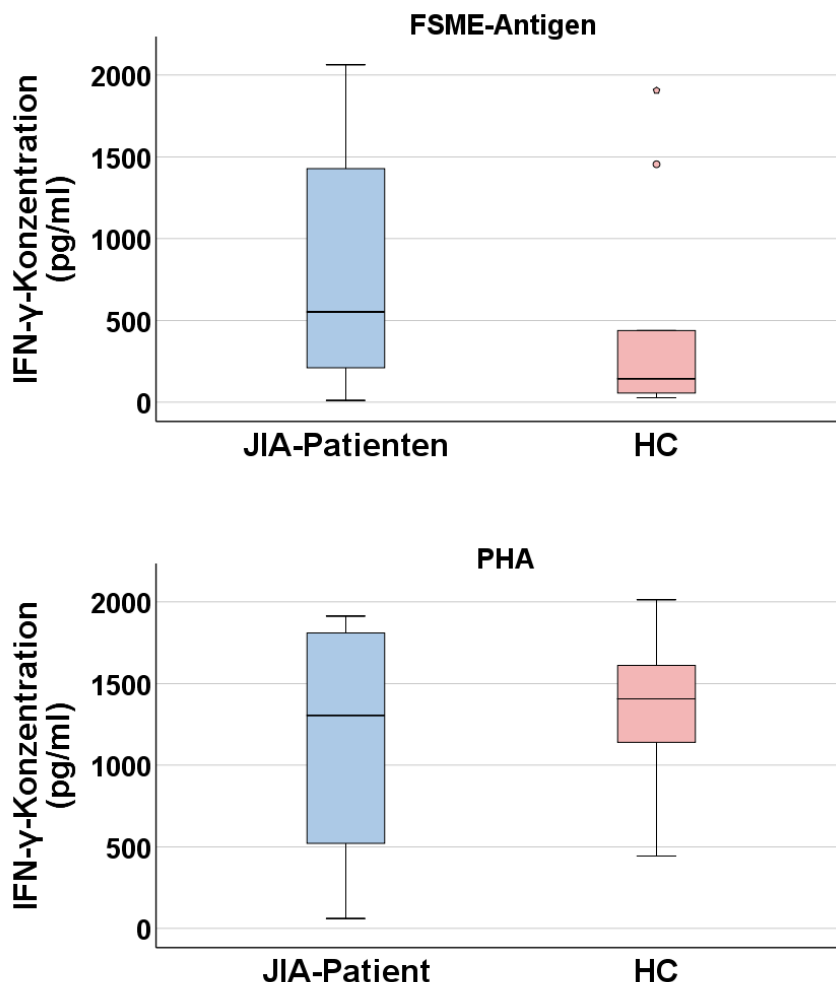


Abbildung 18: IFN- γ -Konzentration im Überstand der Zellkulturen

Nach Stimulation mit dem FSME-Antigen zeigen die JIA-Patienten (blau) eine leicht erhöhte IFN- γ -Produktion, jedoch nicht signifikant höher als die der HC (rot). Im Vergleich zu der Stimulation

mit PHA haben beiden Gruppen eine deutlich niedrigere IFN- γ -Produktion. Nach Stimulation mit PHA zeigten die HC eine leicht erhöhte IFN- γ -Produktion.

3.3.4 Korrelationen des zellulären Immunsystems

3.3.4.1 Zusammenhänge innerhalb der zellulären Parameter

Es zeigte sich eine signifikant positive Korrelation zwischen der IFN- γ -Konzentration im Überstand der Zellkultur nach Stimulation mit FSME-Antigen mit der Verteilung der IFN- γ -Produktion der CD4+ (R=0,641, p=0,025) und CD4+CD69+ (R=0,680, p=0,015) T-Zellen bei den JIA-Patienten (siehe Tabelle 25). Die IFN- γ -Produktion der CD8+ (R=0,517, p=0,085) und der CD8+CD69+ (R=0,510, p=0,090) T-Zellen zeigten eine ähnliche Tendenz, jedoch keine signifikanten Ergebnisse mit der IFN- γ -Konzentration im Überstand der Zellkultur nach Stimulation mit FSME-Antigen bei den JIA-Patienten. Bei den HC zeigte die IFN- γ -Produktion weder mit den CD4+ oder CD4+CD69+ noch mit den CD8+ oder CD8+CD69+ T-Zellen eine signifikante Korrelation mit der IFN- γ -Konzentration im Überstand der Zellkultur nach Stimulation mit FSME-Antigen. Die IFN- γ -Konzentration im Überstand der Zellkultur nach Stimulation mit PHA zeigte keinen Zusammenhang mit der Verteilung der IFN- γ -Produktion der CD4+, CD4+CD69+, CD8+ oder CD8+CD69+ T-Zellen weder bei JIA-Patienten noch bei HC.

Tabelle 25: Korrelationstabelle innerhalb der zellulären Parameter

		JIA	HC
		IFN- γ -Konzentration im Überstand der Zellkultur nach Stimulation mit FSME-Antigen	
CD4+	Korrelationskoeffizienten	0,641	0,511
	Signifikanz (2-seitig)	0,025	0,132
	N	12	10
CD4+CD69+	Korrelationskoeffizienten	0,680	0,468
	Signifikanz (2-seitig)	0,015	0,172
	N	12	10
CD8+	Korrelationskoeffizienten	0,517	0,426
	Signifikanz (2-seitig)	0,085	0,220
	N	12	10
CD8+CD69+	Korrelationskoeffizienten	0,510	0,529
	Signifikanz (2-seitig)	0,090	0,116
	N	12	10

Die Tabelle bezieht sich auf die 12 JIA-Patienten und 10 HC bei denen die IFN- γ -Konzentration im Überstand der Zellkultur nach Stimulation mit FSME-Antigen gemessen wurde und zeigt den Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman, die Signifikanz (2-seitig) und die Anzahl (N) jeweils mit dem prozentuellen Anteil IFN- γ -positiver CD4+, CD4+CD69+, CD8+ und CD8+CD69+ T-Zellen nach FSME-Antigen Stimulation.

3.3.4.2 Zusammenhang der zellulären Ergebnisse mit den demographischen Daten

Die Anzahl aller erhaltenden FSME-Impfungen, das heißt, die 3 Teilimmunisierungen der FSME-Grundimmunisierung addiert mit der Anzahl an Boosterimpfungen, zeigt keine Korrelation mit der durchflusszytometrisch gemessenen IFN- γ -Produktion der CD4+CD69+ und CD8+CD69+ T-Zellen in der mit dem FSME-Antigen stimulierten Zellkultur, weder bei JIA-Patienten noch bei HC. Eine graphische Darstellung zeigt Abbildung 19.

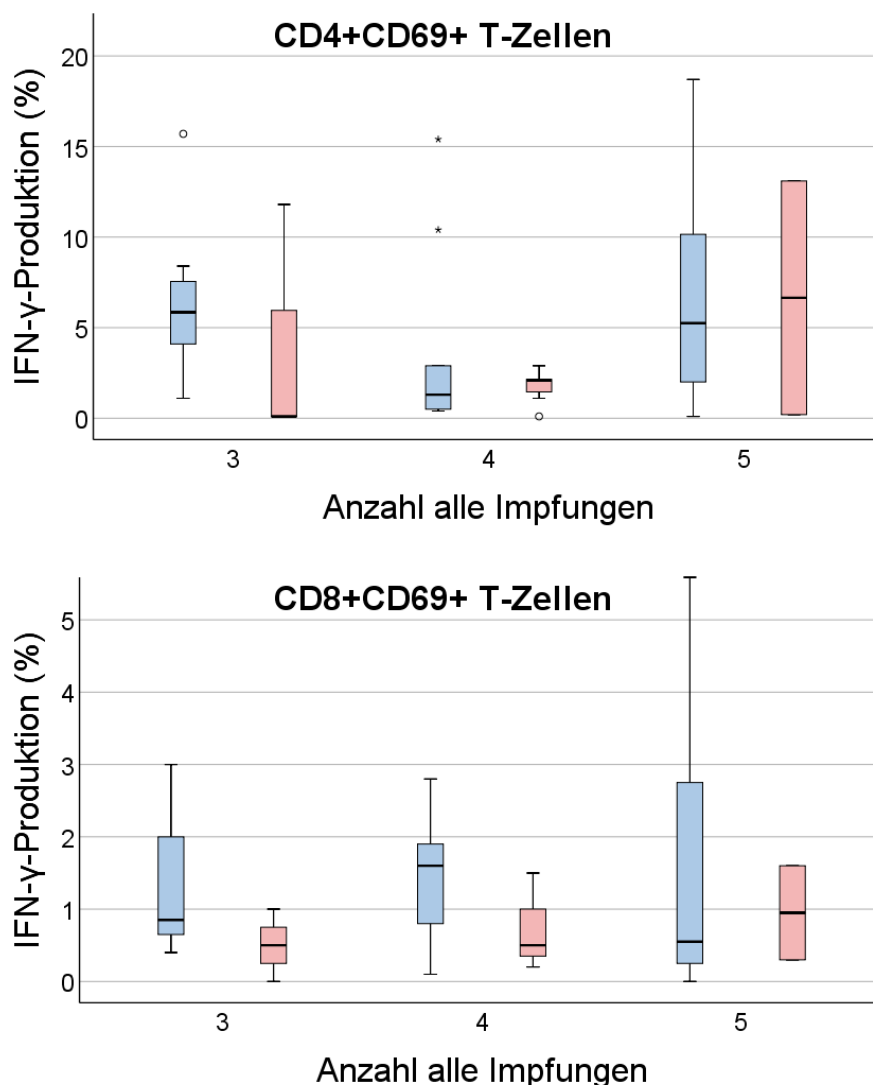


Abbildung 19: Prozentueller Anteil IFN- γ -positiver T-Zellen in Abhängigkeit von der Anzahl der FSME-Impfungen

Es zeigten sich kaum Unterschiede in der durchflusszytometrisch gemessenen IFN- γ -Produktion der CD4+CD69+ (oben) und CD8+CD69+ (unten) T-Zellen in der mit dem FSME-Antigen stimulierten Zellkulturen, trotz unterschiedlicher Anzahl von FSME-Impfungen in JIA-Patienten (blau) und HC (rot).

Einen Ausschnitt der Zusammenhänge der zellulären Ergebnisse mit den demographischen Daten stellt Tabelle 26 dar. Es zeigten sich keine signifikanten Zusammenhänge zwischen den IFN- γ produzierenden CD4+ und CD4+CD69+ oder den IFN- γ produzierenden CD8+ und CD8+CD69+ T-Zellen mit der Anzahl der FSME-Boosterimpfungen, einer längere Zeitspanne zwischen der FSME-Grundimmunisierung und der ersten Boosterimpfung und der Zeit seit der letzten FSME-Impfung weder bei JIA-Patienten noch bei HC.

Sowohl das Alter bei Erstdiagnose der JIA ($R=0,458$, $p=0,024$) als auch die Erkrankung bei FSME-Grundimmunisierung ($R=0,490$, $p=0,011$) zeigen einen signifikanten Zusammenhang mit der durchflusszytometrisch gemessenen IFN- γ -Produktion der CD4+CD69+ T-Zellen aus der mit FSME-Antigen stimulierten Zellkulturen. Speziell die T-Zell Subpopulation der Gedächtnis-T-Zellen zeigte einen signifikanten Zusammenhang mit dem Alter bei der JIA Erstdiagnose ($R=0,536$, $p=0,007$). Die Einnahme von TNF-Inhibitoren zum Zeitpunkt der Blutentnahme hatte einen signifikant negativen Einfluss auf die mit FSME-Antigen stimulierten IFN- γ -Produktion der CD4+CD69+ T-Zellen ($R=-0,459$, $p=0,024$), vor allem der Gedächtnis-T-Zellen ($R=-0,417$, $p=0,042$). Einen geringen nicht signifikant negativen Einfluss auf die IFN- γ -Produktion der CD4+CD69+ T-Zellen hatte die Einnahme von TNF-Inhibitoren ($R=-0,377$, $p=0,101$) und MTX ($R=-0,238$, $p=0,327$) während der FSME-Impfungen.

Tabelle 26: Korrelation der zellulären Ergebnisse mit den demographischen Daten

		JIA-Patient	HC
		CD4+CD69+ T-Zellen	
Anzahl der FSME-Boosterimpfungen	Korrelationskoeffizient	0,281	0,104
	Signifikanz (2-seitig)	0,259	0,790
	N	18	9
Zeit zwischen der FSME-Grundimmunisierung und der ersten Boosterimpfung	Korrelationskoeffizient	-0,057	0,059
	Signifikanz (2-seitig)	0,823	0,881
	N	18	9
Zeit seit der letzten FSME-Impfung	Korrelationskoeffizient	0,277	0,374
	Signifikanz (2-seitig)	0,180	0,231
	N	25	12
Alter bei JIA-Erstdiagnose	Korrelationskoeffizient	0,458	-
	Signifikanz (2-seitig)	0,024	-
	N	24	-
JIA-Erkrankung bei FSME-Grundimmunisierung	Korrelationskoeffizient	0,490	-
	Signifikanz (2-seitig)	0,011	-
	N	26	-
JIA-Erkrankung bei FSME-Boosterimpfung	Korrelationskoeffizient	0,393	-
	Signifikanz (2-seitig)	0,106	-
	N	18	-
TNF-Inhibitoren z.Z. der Blutentnahme	Korrelationskoeffizient	-0,459	-
	Signifikanz (2-seitig)	0,024	-
	N	13	-
TNF-Inhibitoren z.Z. der FSME-Impfung	Korrelationskoeffizient	-0,377	-
	Signifikanz (2-seitig)	0,101	-
	N	3	-
MTX z.Z. der FSME-Impfung	Korrelationskoeffizient	-0,238	-
	Signifikanz (2-seitig)	0,327	-
	N	9	-
		CD4+CD69+ Gedächtnis-T-Zellen	
Alter bei JIA-Erstdiagnose	Korrelationskoeffizient	0,536	-
	Signifikanz (2-seitig)	0,007	-
	N	24	-
TNF-Inhibitoren z.Z. der Blutentnahme	Korrelationskoeffizient	-0,417	-
	Signifikanz (2-seitig)	0,042	-
	N	13	-
		CD8+CD69+ T-Zellen	
Anzahl der FSME-Boosterimpfungen	Korrelationskoeffizient	-0,291	0,106
	Signifikanz (2-seitig)	0,241	0,787
	N	18	9
Zeit zwischen der FSME-Grundimmunisierung und der ersten Boosterimpfung	Korrelationskoeffizient	0,277	0,094
	Signifikanz (2-seitig)	0,266	0,811
	N	18	9
Zeit seit der letzten FSME-Impfung	Korrelationskoeffizient	0,065	0,071
	Signifikanz (2-seitig)	0,759	0,826
	N	25	12

Die Tabelle bezieht sich auf die JIA-Patienten und HC und zeigt den Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman, die Signifikanz (2-seitig) und die Anzahl (N). Dargestellt ist der Zusammenhang zwischen dem prozentuellen Anteil IFN- γ -positiver CD4+CD69+, CD8+CD69+ und CD4+CD69+ Gedächtnis-T-Zellen nach FSME-Antigen Stimulation und der Anzahl der FSME-Boosterimpfungen, der Zeit zwischen der FSME-Grundimmunisierung und der ersten Boosterimpfung und der Zeit seit der letzten FSME-Impfung. Bezüglich der JIA-Patienten spezifische Daten zeigt die Tabelle die Korrelation zwischen den CD4+CD69+ IFN- γ produzierenden T-Zellen und dem Alter bei JIA-Erstdiagnose, einer JIA-Erkrankung bei FSME-Grundimmunisierung, einer JIA-Erkrankung bei einer FSME-Boosterimpfung, einer TNF-Inhibitoren Therapie zum Zeitpunkt

(z.Z.) der Blutentnahme, einer TNF-Inhibitoren Therapie z.Z. der FSME-Impfung und einer MTX Therapie z.Z. der FSME-Impfung.

3.4 Zusammenhang der humoralen und zellulären FSME-Immunantwort

Bei den JIA-Patienten korreliert die IgG-anti-FSME-Avidität signifikant mit der IFN- γ -Konzentration im Überstand der mit dem FSME-Antigen stimulierten Zellkulturen ($R=0,622$, $p=0,031$), siehe Tabelle 27. Es konnte jedoch keine Korrelation mit der IgG-anti-FSME-Avidität und dem prozentuellen Anteil IFN- γ -positiver CD4+CD69+ und CD8+CD69+ T-Zellen und deren Subpopulationen nach FSME-Antigen Stimulation bei JIA-Patienten festgestellt werden. Bei den HC zeigte sich kein Zusammenhang mit der IgG-anti-FSME-Avidität und dem prozentuellen Anteil IFN- γ -positiver CD4+CD69+ oder CD8+CD69+ T-Zellen und deren Subpopulationen nach FSME-Antigen Stimulation beziehungsweise mit der IFN- γ -Konzentration im Überstand der mit dem FSME-Antigen stimulierten Zellkulturen. Die IgG-anti-FSME-Konzentration und der FSME-Neutralisations-Titer korrelierten weder mit dem prozentuellen Anteil IFN- γ -positiver CD4+CD69+ oder CD8+CD69+ T-Zellen und deren Subpopulationen nach FSME-Antigen Stimulation noch mit der IFN- γ -Konzentration im Überstand der mit dem FSME-Antigen stimulierten Zellkulturen, sowohl bei den JIA-Patienten als auch bei den HC.

Tabelle 27: Korrelation der humoralen und zellulären FSME-Immunantwort

		JIA-Patient	HC
		CD4+CD69+ T-Zellen	
IgG-anti-FSME-Konzentration	Korrelationskoeffizient	0,000	0,040
	Signifikanz (2-seitig)	0,998	0,902
	N	26	12
IgG-anti-FSME-Avidität	Korrelationskoeffizient	0,214	0,360
	Signifikanz (2-seitig)	0,293	0,251
	N	26	12
FSME-Neutralisations-Titer	Korrelationskoeffizient	0,311	0,474
	Signifikanz (2-seitig)	0,149	0,140
	N	23	11
		CD8+CD69+ T-Zellen	
IgG-anti-FSME-Konzentration	Korrelationskoeffizient	-0,240	0,138
	Signifikanz (2-seitig)	0,237	0,669
	N	26	12
IgG-anti-FSME-Avidität	Korrelationskoeffizient	0,083	0,082
	Signifikanz (2-seitig)	0,687	0,800
	N	26	12
FSME-Neutralisations-Titer	Korrelationskoeffizient	-0,055	0,477
	Signifikanz (2-seitig)	0,804	0,138
	N	23	11
		IFN- γ -Konzentration im Überstand der Zellkultur nach Stimulation mit dem FSME-Antigen	
IgG-anti-FSME-Konzentration	Korrelationskoeffizient	-0,054	0,007
	Signifikanz (2-seitig)	0,867	0,984
	N	12	10
IgG-anti-FSME-Avidität	Korrelationskoeffizient	0,622	-0,248
	Signifikanz (2-seitig)	0,031	0,489
	N	12	10
FSME-Neutralisations-Titer	Korrelationskoeffizient	0,265	0,060
	Signifikanz (2-seitig)	0,405	0,879
	N	12	9

Die Tabelle bezieht sich auf die JIA-Patienten und HC und zeigt den Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman, die Signifikanz (2-seitig) und die Anzahl (N). Dargestellt ist der Zusammenhang zwischen IgG-anti-FSME-Konzentration, IgG-anti-FSME-Avidität und FSME-Neutralisations-Titer jeweils mit dem prozentuellen Anteil IFN- γ -positiver CD4+CD69+ und CD8+CD69+ T-Zellen nach FSME-Antigen Stimulation und der IFN- γ -Konzentration im Überstand der Zellkultur nach Stimulation mit dem FSME-Antigen.

4 Diskussion

Ziel der vorliegenden Studie war, bei Kindern mit JIA, die vor, während oder nach Beginn der Erkrankung und vor, während oder nach einer immunsuppressiven oder -modulatorischen Therapie eine primäre FSME-Immunsierung erhalten haben, die Konzentration und Avidität der FSME-spezifischen IgG Antikörper zu messen und deren Korrelation zu berechnen, um die FSME-spezifischen IgG Antikörper Avidität als Langzeit-Parameter für die humorale Immunität vorzuschlagen. Des Weiteren wurde die FSME-spezifische zelluläre Reaktivität mittels IFN- γ -Produktion der T-Zellen bestimmt und die Korrelation mit der IgG-anti-FSME-Konzentration und -Avidität berechnet, um hieraus auf die Funktionstüchtigkeit des spezifischen Immunsystems der JIA-Patienten gegen FSME-Impfantigene zu schließen.

Sowohl wegen der ansteigenden Inzidenz der gemeldeten FSME-Erkrankungen im Jahr 2018 in Deutschland auf 583 Fälle als auch auf Grund der ansteigenden FSME-Risikogebiete in Deutschland auf 161 (Stand: Januar 2019) hat diese Studie Relevanz, um aktuelle Impfeempfehlungen für die FSME-Impfung zu unterstreichen und die Bedeutung einer positiven Impfquote zu betonen. Circa 97 % der gemeldeten FSME-Erkrankten im Jahr 2017 war nicht oder unzureichend geimpft, heißt es im Epidemiologischen Bulletin 17/2018 [100], [131].

4.1 Immunogenität nach FSME-Vakzinierung bei JIA-Patienten und HC

4.1.1 Aspekte der humoralen Immunreaktion

Zunächst untersuchten wir die humorale Immunantwort auf die FSME-Vakzinierung, indem wir die IgG-anti-FSME-Konzentration und -Avidität aus den Serumproben von 99 JIA-Patienten und 31 immunologisch gesunden Kindern bestimmten. Hier zeigten die Mehrheit der JIA-Patienten (98,0 %) und alle HC eine positive IgG-anti-FSME-Konzentration ≥ 165 VIUE/ml. Jeweils ein JIA-Patient zeigte eine grenzwertige IgG-anti-FSME-Konzentration zwischen 120-165 VIUE/ml und eine negative < 120 VIUE/ml. Bei der Bestimmung der IgG-anti-FSME-Avidität

zeigten ebenfalls die Mehrheit der JIA-Patienten (94,9 %) und alle HC einen positiven RAI > 60 %. Fünf der JIA-Patienten hatten einen grenzwertigen RAI zwischen 40-60 % und weder ein JIA-Patient noch ein HC hatte einen negativen RAI < 40 %. Zur weiteren Bestimmung der humoralen Immunantwort wurde bei 26 JIA-Patienten und 11 HC der FSME-Neutralisation-Titer gemessen. Dieser gibt zusätzliche Information über die Funktionstüchtigkeit der Antikörper. Die Ergebnisse sind denen der vorherigen Versuche zur IgG-anti-FSME-Konzentration und -Avidität sehr ähnlich, in welchem ein Großteil der JIA-Patienten (88,5 %) und alle HC einen positiven FSME-Neutralisation-Titer > 1:10 gegenüber dem FSME-Antigen aufwiesen. Einen negativen FSME-Neutralisation-Titer \leq 1:10 hatten drei JIA-Patienten.

Obwohl man einen Zusammenhang zwischen der Konzentration und Avidität der FSME-spezifischen IgG Antikörper erwartet, wurde dieser in unserer Studie weder bei JIA-Patienten noch HC nachgewiesen. Stiasny et al. stellten ebenfalls keine signifikante Korrelation zwischen der IgG-anti-FSME-Konzentration und -Avidität bei immunologisch gesunden, FSME-geimpften Personen, gleich welcher Altersklasse, fest [132]. Bei immunologisch beeinträchtigten Kindern durch eine Thymektomie beobachteten Zlomy et al. zu keinem Zeitpunkt der FSME-Grundimmunisierung eine Korrelation der beiden humoralen Parameter IgG-anti-FSME-Konzentration und -Avidität [117]. Der JIA-Patient mit einer grenzwertigen IgG-anti-FSME-Konzentration hatte einen positiven RAI und der JIA-Patient mit einer negativen IgG-anti-FSME-Konzentration einen grenzwertigen RAI. Dies könnte ein, wenn auch durch die geringe Fallzahl nur ein sehr dezenter Hinweis darauf sein, dass die IgG-anti-FSME-Avidität ein Surrogatmarker für eine längere Immunität ist als die -Konzentration. Möglicherweise kann z. B. ein Patient niedrige Antikörperkonzentrationen und trotzdem gut bindende, das heißt hoch avide Antikörper haben, was auch einen Schutz vermuten lässt. Einen FSME-Antikörper-Neutralisationstest führten wir methodisch bedingt bei den Patienten mit einer grenzwertigen oder negativen IgG-anti-FSME-Konzentration nicht durch. Vier von den fünf JIA-Patienten mit einer grenzwertigen IgG-anti-FSME-Avidität hat-

ten eine positive IgG-anti-FSME-Konzentration. Bei zwei von diesen JIA-Patienten wurde der FSME-Antikörper-Neutralisationstest durchgeführt und zeigte positive Werte.

In unserer Studie zeigte die Avidität der FSME-spezifischen IgG Antikörper in JIA-Patienten ebenso wie in HC mit längerer Zeit nach der FSME-Grundimmunisierung eine signifikante Zunahme. Dass die Reifung der Avidität eines Antikörpers maßgeblich von der Zeit abhängt und nicht von der Antikörperkonzentration, wiesen unter anderem Pichichero et al. in einer Studie zur Impfung gegen *Haemophilus influenzae* Typ b nach [133]. Es ist bekannt, dass auf Grund der klonalen Selektion von B-Zellen und der somatischen Hypermutation, Antikörpern mit höherer Affinität zu dem spezifischen Antigen entstehen [91], [92], [134], was das Ergebnis zu Langzeit-Immunität von Antikörpern unserer Studie bekräftigt.

Der FSME-Neutralisation-Titer wies bei den JIA-Patienten eine signifikant positive Korrelation mit der IgG-anti-FSME-Konzentration und bei den HC konnte dieselbe Tendenz berechnet werden. Dies zeigt, dass für die erfolgreiche Neutralisation der Infektiosität der Viren durch FSME-spezifischen IgG Antikörpern, deren Konzentration prognostisch relevant ist. Diese bedeutende Rolle des FSME-Neutralisations-Titers beschrieb Holzmann et al. in einer Untersuchung zu der Korrelation zwischen IgG Antikörpern und Neutralisations-Titern nach FSME-Vakzinierung [112], [135].

Primäres Ziel dieser Arbeit ist, die IgG-anti-FSME-Avidität als Langzeitparameter der humoralen Immunogenität bei JIA-Patienten vorzuschlagen. Unsere Daten zeigen, dass die IgG-anti-FSME-Avidität bei den JIA-Patienten mit längerer Zeit nach der letzten Impfung steigt. Wir empfehlen, zur Kontrolle eines ausreichenden Impfschutzes nach der FSME-Immunisierung bei JIA-Patienten zusätzlich zur IgG-anti-FSME-Konzentration, auch die IgG-anti-FSME-Avidität und den FSME-Neutralisations-Titer zu bestimmen, um die Qualität und Funktionalität der Antikörper zu analysieren.

4.1.2 Aspekte der zellulären Immunreaktion

Nach der Bestimmung der humoralen Immunantwort folgte die Untersuchung der zellulären Immunantwort auf die FSME-Vakzinierung. Diese ist zum aktuellen Zeitpunkt im Vergleich zur humoralen Immunantwort nicht Teil intensiver Forschung, insbesondere in Hinblick auf JIA-Patienten. Grund dafür könnte unter anderem die Ungewissheit sein, wie groß die Bedeutung der FSME-spezifischen zellulären Reaktivität im Schutz vor einer klinischen FSME-Erkrankung ist. Hierzu erschien kürzlich ein schwedisches Review von Blom et al., in dem die Rolle der natürlichen Killerzellen und die T-Zell-Antwort in der zweiten Phase einer FSME-Erkrankung bei ansonsten gesunden Menschen beleuchtet wurde. Sie wiesen eine Aktivierung der NK-Zellen und CD8+ zytotoxische T-Zellen durch die Messung einer verstärkten Expression des Proliferationsmarkers Ki67 nach. Im Gegensatz dazu zeigten CD4+ T-Helferzellen nur ein moderates oder niedriges Aktivierungslevel [136].

In unserer Studie bestimmten wir die IFN- γ -Synthese der PBMCs in der Zellkultur nach Stimulation mit dem FSME-Antigen, um die FSME-spezifische zelluläre Reaktivität nach der FSME-Impfung zu messen. Dazu führten wir bei 26 JIA-Patienten und 12 HC einen IFN- γ Secretion Assay durch. Mittels Durchflusszytometrie phänotypisierten wir die IFN- γ produzierenden T-Zellen durch Markierung der Oberflächenmarker CD4, CD8, CD28, CD45RA, CD69. Des Weiteren ermittelten wir die IFN- γ -Konzentration im Überstand der Zellkulturen.

Die JIA-Patienten und gesunden Kontrollen zeigten im IFN- γ Secretion Assay eine ähnliche Verteilung des prozentuellen Anteils IFN- γ -positiver Zellen der aktivierten CD4+ und CD8+ T-Zellen und deren Subpopulationen nach Stimulation mit dem FSME-Antigen. Zwar beobachteten wir bei den JIA-Patienten in beiden Fällen eine leicht erhöhte IFN- γ -Produktion, jedoch ohne signifikante Unterschiede zu den HC. Eine veränderte Immunogenität im Vergleich zu immunologisch gesunden Kindern auf die FSME-Impfung könnte unter anderem durch die JIA und deren Krankheitsaktivität und/ oder durch die immunsuppressive und/o-

der -modulatorische Therapie zu erklären sein. Der Einfluss der immunsuppressiven und/oder -modulatorische Therapie auf die FSME-spezifische Immunantwort wird in Kapitel 4.4 diskutiert.

Die aktivierten CD4+ T-Helferzellen produzierten im Vergleich zu den aktivierten CD8+ zytotoxischen T-Zellen mehr IFN- γ nach Stimulation mit dem FSME-Antigen in beiden Gruppen. Die Aktivierung der CD4+ T-Helferzellen ist wichtig für die B-Zell-Stimulation und die darauffolgende Produktion der pathogen-spezifischen Antikörper [137]. In den Subpopulationen der CD4+CD69+ T-Zellen wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den JIA-Patienten und HC nachgewiesen. Die CD4+CD69+ Gedächtnis-T-Zellen produzierten im Vergleich zu den CD4+CD69+ TMERA, Effektor- oder Naiven-T-Zellen, am meisten IFN- γ sowohl in den JIA-Patienten als auch in den HC, gefolgt von den Naiven-T-Zellen. Die JIA-Patienten hatten eine leicht erhöhte IFN- γ -Produktion in allen CD4+CD69+ T-Zell Subpopulation im Vergleich zu den HC, jedoch ohne signifikante Unterschiede. CD4+ Gedächtnis-T-Zellen besitzen wichtige Schlüsselfunktionen in der Immunantwort. Dazu zählt, dass sie schon auf geringe Mengen von Antigenbruchstücken reagieren und nach ihrer Aktivierung ein umfangreiches antiinflammatorisches und antivirales Zytokinprofil besitzen und rasch zu lymphatischen Organen migrieren [138].

Aberle et al. verglichen die CD4+ T-Helferzell Immunantwort nach FSME-Impfung und -Erkrankung und wiesen einen Unterschied im Zytokinprofil nach. Die CD4+ T-Helferzellen von Personen nach einer FSME-Impfung zeigten eine niedrigere IFN- γ -Antwort und proportional mehr TNF- α und IL-2 positive CD4+ T-Zellen als die von Patienten nach einer FSME-Erkrankung [137]. In unserer Studie wurde die TNF- α - und IL-2-Produktion nicht untersucht. Jedoch kann der Nachweis der IFN- γ -Produktion von CD4+ Gedächtnis-T-Zellen nach der Stimulation von PBMCs in der Zellkultur mit dem FSME-Antigen als erfolgreiche zelluläre Impfantwort auf die FSME-Impfung interpretiert werden.

CD8+ zytotoxische T-Zellen haben die Fähigkeit infizierte Zellen zu erkennen und deren Zelltod durch Apoptose zu induzieren. Im Rahmen der Immunantwort se-

zernieren sie IFN- γ und TNF- α . Die CD8+ Gedächtnis-T-Zellen antworten mit einer starken Zellproliferation und raschen Konvertierung in CD8+ Effektor-T-Zellen auf die Reexposition eines bekannten Pathogens [64]. In unserer Arbeit produzierte die aktivierte CD8+ T-Zell Subpopulation TEMRA, verglichen mit den anderen bereits genannten Subpopulationen, am meisten IFN- γ . Es war die einzige T-Zell Subpopulation, in der die HC im Verhältnis eine leicht höhere IFN- γ -Produktion aufwiesen als die JIA-Patienten. Bei der IFN- γ -Produktion der CD8+CD69+ Gedächtnis-, Effektor- und Naiven-T-Zellen zeigten die JIA-Patienten dagegen wieder höhere Werte als die HC. Geginat und Lanzavecchia et al. untersuchten die Differenzierung CD8+ T-Zellen in Bezug auf die Antigen-Antwort. Die TEMRA zeigten die höchste Rate an Zytokinsekretion, was sich mit den Daten unserer Studie deckt, und eine flinke Migration zu inflammatorischen peripheren Gewebe [139]. Somit kann auch eine effektive zelluläre Immunantwort auf die FSME-Impfung mit dem Nachweis der Aktivierung der CD8+ TEMRA nach der Stimulation von PBMCs in der Zellkultur mit dem FSME-Antigen bestätigt werden.

Die durchflusszytometrisch gemessenen Daten, in denen die PBMCs der JIA-Patienten im Vergleich zu den HC mehr IFN- γ nach Stimulation mit dem FSME-Antigen produzierten, konnte mittels IFN- γ -ELISA aus dem Überstand der Zellkulturen bestätigt werden. Es zeigte sich außerdem, dass sowohl bei den JIA-Patienten als auch in den HC eine deutlich höhere IFN- γ -Produktion in der Positivkontrolle nach Stimulation mit PHA und eine deutlich niedrige IFN- γ -Produktion in der Negativkontrolle ohne Stimulation erfolgten. Diese Ergebnisse bestätigten wir ebenfalls mittels Bestimmung der IFN- γ -Konzentration aus dem Überstand der Zellkulturen. Die Funktionstüchtigkeit des zellulären Immunsystems in Bezug auf die FSME-Impfung bei JIA-Patienten ist anhand dieser Daten nachgewiesen.

4.2 Korrelation des humoralen und zellulären Immunsystems in Bezug auf die FSME-Immunität

Das sekundäre Ziel dieser Studie ist, die FSME-spezifische zelluläre Reaktivität durch IFN- γ -Produktion der T-Zellen zu bestimmen und die Korrelation mit den

humoralen Parametern zu berechnen beziehungsweise indirekt mit der B-Zell Funktion darzustellen, da diese die spezifischen Antikörper produzieren und entsprechend deren Quantität und Qualität beeinflussen.

Die IgG-anti-FSME-Konzentration korreliert weder mit der IFN- γ -Produktion der aktivierten CD4+ oder CD8+ T-Zellen noch mit der IFN- γ -Konzentration im Überstand der Zellkulturen, und dies weder bei den JIA-Patienten noch bei den HC. Die IgG-anti-FSME-Avidität deckte sich mit der IFN- γ -Konzentration im Überstand der Zellkulturen in den JIA-Patienten. Eine Korrelation mit der IgG-anti-FSME-Avidität und der IFN- γ -Produktion der CD4+ oder CD8+ T-Zellen oder deren Subpopulationen konnte jedoch nicht festgestellt werden. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich bei den HC, da kein Zusammenhang mit der IgG-anti-FSME-Avidität und der IFN- γ -Produktion der CD4+ oder CD8+ T-Zellen oder mit der IFN- γ -Konzentration im Überstand der Zellkulturen konstatiert werden konnte. Der FSME-Neutralisations-Titer verhielt sich entsprechend wie die IgG-anti-FSME-Konzentration bei JIA-Patienten und HC und zeigte keinen Zusammenhang mit den genannten zellulären Parametern. In dieser Studie konnte folglich keine Korrelation zwischen dem humoralen und zellulären Immunsystem in Bezug auf die FSME-Impfantwort weder bei den JIA-Patienten noch bei den HC nachgewiesen werden.

Ähnliche Ergebnisse erhielten Prelog et al. in einer Untersuchung zu Varizella-Zoster-spezifischen Immunantwort bei immunsupprimierten Patienten nach einer Organtransplantation [140]. Es wurde keine Korrelation zwischen der humoralen und zellulären Immunantwort gemessen und dahingehend interpretiert, dass die T- und B-Zell-abhängige Immunantworten möglicherweise während der Impfantwort getrennt voneinander ablaufen.

4.3 Relevanz der FSME-Boosterimpfungen

Einen beeindruckenden Effekt auf eine effektive humorale Immunantwort hatte die steigende Anzahl aller FSME-Impfungen, das heißt der Erhalt von Boosterimpfungen. Die JIA-Patienten wiesen eine signifikant höhere IgG-anti-FSME-Konzentration und -Avidität auf, je mehr FSME-Impfungen sie erhielten. Bei den

gesunden Kontrollen war jedoch nur die IgG-anti-FSME-Avidität, nicht aber die IgG-anti-FSME-Konzentration, abhängig von der Anzahl der erhaltenden FSME-Impfungen. Die Anzahl der FSME-Impfung scheint auf den FSME-Neutralisation-Titer sowohl bei den JIA-Patienten als auch bei den HC in unserer Studie keinen starken Einfluss zu haben. Mit der durchflusszytometrisch gemessenen IFN- γ -Produktion der CD4+CD69+ und CD8+CD69+ T-Zellen in der mit dem FSME-Antigen stimulierten Zellkultur wiesen wir keine erwähnenswerte Korrelation mit der Anzahl aller erhaltenden FSME-Impfungen nach, weder bei JIA-Patienten noch bei HC. Rendi-Wagner et al. untersuchten die Langzeit-Immunität bei Gesunden zwei und drei Jahre nach der ersten FSME-Boosterimpfung, die wiederum ≥ 3 Jahre nach der FSME-Grundimmunisierung erfolgte, und beobachteten in beiden Gruppen in ≥ 95 % der Fälle einen positiven FSME-Neutralisation-Titer und in ≥ 97 % der Fälle eine ausreichende FSME-spezifische IgG Antikörper Konzentration. Die FSME-spezifische IgG Antikörper Avidität wurde in dieser Studie nicht untersucht [141].

Die Zeit zwischen der FSME-Grundimmunisierung und der ersten Boosterimpfung war bei den JIA-Patienten im Mittel 3,4 Jahre und bei den HC 3,8 Jahre. Die Empfehlung zur zeitgerechten Boosterimpfung nach der FSME-Grundimmunisierung differiert je nach Hersteller. FSME-Immun® der Firma Baxter rät zur ersten Auffrischimpfung 3 Jahre nach der FSME-Grundimmunisierung und Encepur® von Novartis 5 Jahren nach der FSME-Grundimmunisierung bei Personen ≤ 49 Jahren [107], [110]. Leider erfassten wir in der Studie nicht den Hersteller der erhaltenen FSME-Impfungen. Es zeigte sich, dass eine zeitnahe erste Boosterimpfung nach der FSME-Grundimmunisierung einen signifikant positiven Einfluss auf die IgG-anti-FSME-Avidität bei den HC hatte. Die Zeit zwischen den oben genannten Zeitpunkten zeigte keinen Einfluss auf die die IgG-anti-FSME-Konzentration und den FSME-Neutralisations-Titers, weder bei JIA-Patienten noch bei HC.

Den erfolgreichen Effekt von FSME-Boosterimpfungen auf den Langzeit-Impfschutz wiesen mehrere Studien zu 3-, 5- und 6-Jahres-Follow-up nach. Es zeigte sich, dass nach 3 Jahren noch ein voller Impfschutz bestand, sodass eine Nachprüfung der Intervalle der FSME-Boosterimpfungen empfohlen wurde [141]–

[144]. Dies können wir mit den Daten unserer Studienteilnehmer, die mindestens eine Boosterimpfung erhalten haben bestätigen. Die Avidität der FSME-spezifischen IgG Antikörper der gesunden Kontrollen nahm mit der Zeit nach der 1. FSME-Boosterimpfung signifikant zu. Hingegen nahm die Konzentration der FSME-spezifischen IgG Antikörper bei den JIA-Patienten signifikant mit der Zeit ab. In einer aktuellen Studie aus dem Jahr 2018 von Beran et al. hatten ≥ 90 % der immunologisch gesunden Probanden, die nach der FSME-Grundimmunisierung eine Boosterimpfung erhielten, einen positiven FSME-Neutralisations-Titer 10 Jahre nach der FSME-Boosterimpfung. Diese Ergebnisse bestätigen einen zufriedenstellenden Langzeit-Impfschutz gegen den FSME-Virus nach der FSME-Grundimmunisierung und nur einer -Boosterimpfung [145].

4.4 Einfluss der DMARD-Therapie auf die FSME-Impfantwort

Eine immunsuppressive oder -modulatorische Therapie beeinflusst das Immunsystem. Ziel der Therapie ist, die Lymphozyten-Aktivierung und -Proliferation zu hemmen und Zytokine zu binden beziehungsweise deren Synthese zu reduzieren. Diese Reaktionen sind jedoch Teil der gewünschten zellulären und humoralen Immunantwort auf eine Impfung [34]–[36].

In unserer Studie haben zum Zeitpunkt der FSME-Vakzinierung etwa ein Drittel (28,1 %) der untersuchten JIA-Patienten immunsuppressive und/oder -modulatorische Medikamente eingenommen. Davon hat wiederum ein Drittel (34,8 %) zwei und der Rest ein Medikament angegeben. Eine Therapie mit nichtsteroidalen Antirheumatika (47,8 %) und mit Methotrexat (43,5 %) war die häufigste, gefolgt von einer Behandlung mit TNF-Inhibitoren (13,0 %) wie Etanercept und Adalimumab. Zum Zeitpunkt der Blutentnahme haben deutlich mehr JIA-Patienten (78,0 %) immunsuppressive und/oder -modulatorische Medikamente eingenommen als zum Zeitpunkt der FSME-Vakzinierung. Über die Hälfte der JIA-Patienten (60,6 %) haben ein Medikament angegeben, die übrigen zwei bis vier Medikamente. Die am häufigsten verordneten Wirkstoffe waren, wie zum Zeitpunkt der FSME-Vakzinierung, nichtsteroidale Antirheumatika, Methotrexat und TNF-Inhibitoren.

Eine MTX-Therapie während der FSME-Impfung hatte einen signifikant negativen Einfluss auf die IgG-anti-FSME-Avidität. Eine TNF-Inhibitor-Therapie zeigte tendenziell einen negativen Einfluss auf die IgG-anti-FSME-Konzentration sowohl während der FSME-Impfung als auch zum Zeitpunkt der Blutentnahme. Hingegen entwickelte sich der FSME-Neutralisations-Titer im Verhältnis positiv unter einer TNF-Inhibitor-Therapie während der FSME-Impfung und zum Zeitpunkt der Blutentnahme. Obwohl die Anzahl der JIA-Patienten, die zum Zeitpunkt der FSME-Impfung eine TNF-Inhibitor-Therapie erhielten, sehr gering ist, lassen die Ergebnisse Platz für Interpretationen, ob die Kontrolle des Entzündungsgeschehens bei JIA, zum Beispiel durch TNF-Inhibitoren, eine effiziente Immunreaktion auf die FSME-Impfung veranlassen, obwohl die IgG-anti-FSME-Konzentration sinkt.

Hertzell et al. erhoben in einer open-label-Studie zur FSME-Grundimmunisierung bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis unter Immunsuppression durch Methotrexat und/oder TNF-Inhibitoren folgende Daten. Die alleinige Therapie mit Methotrexat oder TNF-Inhibitoren zeigte keinen negativen Effekt auf die Immunogenität. Die Kombination der beiden Medikamente führte bei den RA-Patienten jedoch zu einem signifikant niedrigeren Level an neutralisierenden FSME-Antikörpern als bei den gesunden Kontrollen [146]. In unserer Studie hat lediglich ein JIA-Patient zum Zeitpunkt der FSME-Impfung sowohl Methotrexat als auch TNF-Inhibitoren eingenommen und zeigte eine mittelhohe IgG-anti-FSME-Konzentration und eine grenzwertige -Avidität.

In Bezug auf die zelluläre Immunreaktion auf die FSME-Impfung zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der IFN- γ -Produktion der Subpopulation der Naiven-T-Zellen zwischen JIA-Patienten und HC, sowohl in den CD4+ und CD8+ T-Zellen nach Stimulation mit dem FSME-Antigen. Almanzar et al. untersuchten die Differenzierung der T-Zell Subpopulationen bei JIA-Patienten und wiesen eine verstärkte Proliferation der Naiven-T-Zellen bei denjenigen nach, die unter immunsuppressiver Medikation in Remission waren [147]. Es konnte eine Rekonstitution der Thymusfunktion mit der Analyse von T-cell receptor excision circles

und einen daraus folgenden erhöhten Level an peripheren Naiven-T-Zellen nachgewiesen werden. In unserer Studie befand sich lediglich ein JIA-Patient in Krankheitsremission unter Medikation und drei weitere ohne Medikation.

4.5 Limitationen und Ausblick

4.5.1 Heterogenität der Studienpopulation

Die JIA-Patienten waren zum Zeitpunkt der Blutentnahme signifikant älter als die HC ($p=0,001$). Das durchschnittliche Alter der JIA-Patienten betrug 14,2 Jahre und das der HC 12,0 Jahre. Das Geschlechterverhältnis war einigermaßen ausgeglichen, wobei etwas mehr Mädchen in der JIA-Gruppe vertreten waren.

Die HC waren zum Zeitpunkt der ersten FSME-Teilimmunisierung mit 4,7 Jahren deutlich jünger als den JIA-Patienten mit 6,2 Jahren ($p=0,034$). Das Alter beeinflusst nach Stiansy et al. jedoch nicht die FSME-spezifische IgG Antikörper Avidität bei jüngeren (< 30 Jahre) und älteren (> 50 Jahre) gesunden Erwachsenen [132]. Inwiefern der Altersunterschied in dieser Altersklasse Einfluss auf die FSME-spezifische IgG Antikörper Konzentration und Avidität, den FSME-Neutralisation-Titer und die FSME-spezifische T-Zell-Antwort hat, ist ungeklärt. Weiterhin gab es Unterschiede in der Anzahl der Boosterimpfungen zwischen den JIA-Patienten und den HC. Es erhielten mehr JIA-Patienten zwei oder drei Boosterimpfungen als die HC. Das kann einerseits damit zusammenhängen, dass die JIA-Patienten schon älter waren als die HC, und andererseits, dass sie auf Grund der Immunsuppression durch die Erkrankung und/oder ihrer Therapie ein erhöhtes Infektionsrisiko aufwiesen. Jedoch betrug die Anzahl aller FSME-Impfungen, FSME-Grundimmunisierung und Boosterimpfungen eingeschlossen, in beiden Gruppen im Median 4.

Die JIA ist eine sehr heterogene Erkrankung. In dieser Studie sind JIA-Patienten mit den verschiedenen JIA-Subtypen eingeschlossen. Einige befinden sich in Krankheitsremission, zum Teil mit und zum Teil ohne Medikamente. Die Therapieform ist ebenfalls äußerst uneinheitlich - so gibt es Unterschiede sowohl in der Dauer als auch in den eingenommenen Wirkstoffen und deren Dosierung. Diese

Faktoren erschweren die Interpretation der erhobenen Daten. Die JIA-Patienten können nicht als eine Gruppe zusammengefasst werden, sondern bedürfen der genauen Betrachtung der oben genannten Faktoren.

4.5.2 Methodisch-technische Limitationen

Um die IgG-anti-FSME-Konzentration zu bestimmen, führten wir einen Anti-FSME-Viren-ELISA durch. Im letzten Schritt erfolgte die photometrische Messung des Farbumschlags der Lösung. Kritisch zu diskutieren ist der Abbruch der Messung bei 1000 VIEU/ml. Dadurch entsteht eine allgemeine Messungenauigkeit. Obwohl eine IgG-anti-FSME-Konzentration ≥ 165 VIEU/ml schon als positiv gilt und von einem Immunschutz ausgegangen werden kann, wäre es interessant, welches die Maximalwerte sind und ob es in den oberen Messbereichen Unterschiede zwischen den JIA-Patienten und den HC gibt.

Die FSME-spezifische zelluläre Reaktivität wurde mittels des Zytokins IFN- γ gemessen. Es gibt noch eine Reihe weiterer T-Zell typischer Zytokine, mit denen deren Aktivierung bestimmt werden kann. Die Arbeitsgruppe um Aberle et al. hat neben IFN- γ auch noch Interleukin-2 gemessen, um CD4+ T-Helferzellen nach einer FSME-Impfung oder Erkrankung zu beobachten [148]. Jedoch wurde neben dem IFN- γ Secretion Assay und der Bestimmung der aktivierten CD4+ und CD8+ T-Zellen auch noch die IFN- γ Konzentration im Überstand der mit FSME-Antigen stimulierten Zellkulturen ermittelt. Dadurch wurden die Ergebnisse zur FSME-spezifische zellulären Reaktivität zuverlässiger.

4.5.3 Zukünftige Datenerhebung

Diese Studie beschreibt und vergleicht die Momentaufnahme der humoralen und zellulären FSME-Immunogenität bei JIA-Patienten und immunologisch gesunden Kindern nach FSME-Impfungen. Neben der Heterogenität der JIA Erkrankung, der Krankheitsaktivität und des Therapiekonzepts haben die unterschiedlichen Zeitpunkte der FSME-Impfungen zusätzlich die Ergebnisbeurteilung erschwert. Um den Verlauf der FSME-Immunantwort nach der FSME-Grundimmunisierung und Boosterimpfungen einheitlich zu beobachten und zu beurteilen, wäre eine prospektive open-label-Langzeitstudie zur Überprüfung der Immunogenität der

FSME-Impfung bei JIA Patienten hinsichtlich der humoralen und zellulären Immunantwort sicher sehr interessant.

5 Zusammenfassung

Bei Kindern mit Juveniler idiopathischer Arthritis (JIA) sind Impfungen auf Grund der immunsuppressiven Umstände durch die Erkrankung und die entsprechende Therapie dringend empfohlen. Daher sollten JIA-Patienten, die sich längere Zeit in einem Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME)-Risikogebiet aufhalten oder leben, dringend eine aktive Immunisierung gegen den FSME-Virus durchführen.

In der vorliegenden Studie verglichen wir sowohl die humorale als auch die zelluläre Immunantwort auf die FSME-Impfung bei 99 gegen FSME geimpften JIA-Patienten mit 30 immunologisch gesunden, altersgleichen Kindern (HC). Dazu untersuchten wir die FSME-spezifische IgG Antikörper Konzentration und Avidität, den FSME-Neutralisatins-Titer und die FSME-spezifische T-Zell-Antwort mittels IFN- γ Secretion Assay und Ermittlung der IFN- γ Konzentration im Überstand der mit FSME-Antigen stimulierten Zellkulturen.

Es zeigten sich ähnliche Ergebnisse hinsichtlich der IgG-anti-FSME-Konzentration, -Avidität und des FSME-Neutralisations-Titers. Der Erhalt von FSME-Boosterimpfungen hatte einen positiven Effekt auf die FSME-spezifische IgG Antikörper Konzentration bei den JIA-Patienten und die FSME-spezifische IgG Antikörper Avidität sowohl bei den JIA-Patienten als auch bei den HC. JIA-Patienten, die eine Therapie mit Methotrexat (MTX) während der FSME-Impfung erhielten, hatten weniger häufig einen RAI ≥ 60 %. Hinsichtlich der zellulären Immunreaktion zeigten sich ähnliche Ergebnisse zwischen den JIA-Patienten und den HC. Bei der durchflusszytometrischen Bestimmung der T-Zellen beobachteten wir in beiden Gruppen, dass die aktivierten CD4+ T-Helferzellen im Vergleich zu den aktivierten CD8+ zytotoxischen T-Zellen mehr IFN- γ nach der Stimulation mit dem FSME-Antigen produzierten. Die JIA-Patienten wiesen signifikant mehr IFN- γ produzierende Naive-T-Zellen auf als die HC. Die humorale und zelluläre FSME-Immunreaktion schienen nicht miteinander zu korrelieren.

Ungeachtet der Tatsache, an der JIA erkrankt zu sein oder nicht, zeigten die FSME-geimpften Kinder dieser Studie auch einige Jahre nach der letzten FSME-Impfung eine ähnliche humorale und zelluläre Immunogenität gegen FSME. Besonders wichtig ist die Gabe von FSME-Boosterimpfungen, um eine erfolgreiche

Immunantwort zu erreichen und zu erhalten. Trotz des negativen Effekts der immunsuppressiven Therapie erreichten fast alle JIA-Patienten eine ausreichend humorale und zelluläre Immunogenität. Daher scheint eine erfolgreiche FSME-Immunisierung bei JIA-Patienten mit immunsuppressiver Therapie realisierbar zu sein.

Literaturverzeichnis

- [1] A. Ravelli and A. Martini, "Juvenile idiopathic arthritis.," *Lancet*, vol. 369, no. 9563, pp. 767–78, 2007.
- [2] S. von Koskull, H. Truckenbrodt, R. Holle, and A. Hörmann, "Incidence and prevalence of juvenile arthritis in an urban population of southern Germany: a prospective study.," *Ann. Rheum. Dis.*, vol. 60, no. 10, pp. 940–5, 2001.
- [3] J. Von Bremen and S. Ruf, "Juvenile idiopathic arthritis—and now? A systematic literature review of changes in craniofacial morphology," *J. Orofac. Orthop.*, vol. 73, no. 4, pp. 265–276, 2012.
- [4] K. Minden, "Rheuma im Kindesalter – Häufigkeit, Klinik, Therapie," *Kinderarztl. Prax.*, vol. 85, no. 3, pp. 162–169, 2014.
- [5] E. Nordal, M. Zak, K. Aalto, L. Berntson, A. Fasth, T. Herlin, P. Lahdenne, S. Nielsen, B. Straume, and M. Rygg, "Ongoing disease activity and changing categories in a long-term nordic cohort study of juvenile idiopathic arthritis," *Arthritis Rheum.*, vol. 63, no. 9, pp. 2809–2818, 2011.
- [6] A. Martini, D. J. Lovell, and U. Genova, "Juvenile idiopathic arthritis: state of the art and future perspectives," 2010.
- [7] A. Martini, "Are the Number of Joints Involved or the Presence of Psoriasis Still Useful Tools to Identify Homogeneous Disease Entities in Juvenile Idiopathic Arthritis?," vol. 30, no. 9, 2003.
- [8] L. J. Mirkinson and I. M. Katona, "Systemic onset juvenile idiopathic arthritis: update on pathogenesis and treatment.," *Expert Rev. Clin. Immunol.*, vol. 3, no. 3, pp. 313–21, 2007.
- [9] R. E. Petty, T. R. Southwood, P. Manners, J. Baum, D. N. Glass, X. He, J. Maldonado-cocco, J. Orozco-alcala, and A. Prieur, "International League of Associations for Rheumatology Classification of Juvenile Idiopathic Arthritis: Second Revision , Edmonton , 2001," *J Rheumatol*, vol. 31, no. 2, pp. 390–92, 2004.
- [10] J. P. Haas, "Gene und Risikofaktoren bei der juvenilen idiopathischen Arthritis," pp. 147–152, 2005.
- [11] S. D. Thompson, M. B. Moroldo, L. Guyer, M. Ryan, E. M. Tombragel, E. S. Shear, S. Prahalad, M. Sudman, M. A. Keddache, W. M. Brown, E. H. Giannini, C. D. Langefeld, S. S. Rich, W. C. Nichols, and D. N. Glass, "A genome-wide scan for juvenile rheumatoid arthritis in affected sibpair families provides evidence of linkage," *Arthritis Rheum.*, vol. 50, no. 9, pp. 2920–2930, 2004.
- [12] S. Prahalad and D. N. Glass, "A comprehensive review of the genetics of juvenile idiopathic arthritis," *Pediatr. Rheumatol.*, vol. 6, no. 1, p. 11, 2008.
- [13] B. Prakken, S. Albani, and A. Martini, "Juvenile idiopathic arthritis," *Lancet*, vol. 377, no. 9783, pp. 2138–2149, 2011.
- [14] L. R. Wedderburn, N. Robinson, A. Patel, H. Varsani, and P. Woo, "Selective recruitment of polarized T cells expressing CCR5 and CXCR3 to the inflamed joints of children with juvenile idiopathic arthritis.," *ARTHRITIS Rheum.*, vol. 43, no. 4, pp. 765–774, 2000.
- [15] A. Gregorio, C. Gambini, V. Gerloni, A. Parafioriti, M. P. Sormani, S. Gregorio, G. De Marco, F. Rossi, A. Martini, and M. Gattorno, "Lymphoid neogenesis in juvenile idiopathic arthritis correlates with ANA positivity and plasma cells infiltration," *Rheumatology*, vol. 46, pp. 308–313, 2007.
- [16] B. A. Eberhard, R. M. Laxer, U. Andersson, and E. D. S. Division, "Local synthesis of both macrophage and T cell cytokines by synovial fluid cells from children with juvenile rheumatoid arthritis," *Clin. Exp. Immunol.*, no. 96, pp. 260–266, 1994.
- [17] Y.-S. Hahn and J.-G. Kim, "Pathogenesis and clinical manifestations of juvenile rheumatoid arthritis.," *Korean J. Pediatr.*, vol. 53, no. 11, pp. 921–30, 2010.
- [18] M. P. Scola, T. Imagawa, G. P. Boivin, E. H. Giannini, D. N. Glass, R. Hirsch, and A. A. Grom, "Expression of Angiogenic Factors in Juvenile Rheumatoid Arthritis Engrafted Into SCID Mice," *ARTHRITIS Rheum.*, vol. 44, no. 4, pp. 794–801, 2001.
- [19] A. A. Grom and R. Hirsch, "T-cell and T-cell receptor abnormalities in the immunopathogenesis of juvenile rheumatoid arthritis.," *Curr. Opin. Rheumatol.*, vol. 12, no. 5, pp. 420–4, 2000.
- [20] H. Anderson, A. M. Turano, M. Baron, and C. H. Anderson, "Light- and Electron-microscopic Findings of Juvenile Rheumatoid Arthritis Synovium: Comparison with Normal Juvenile Synovium," *Semin. Arthritis Rheum.*, vol. 7, no. 4, pp. 287–302, 1978.
- [21] K. Nistala, S. Adams, H. Cambrook, S. Ursu, B. Olivito, W. De Jager, and J. G. Evans, "Th17 plasticity in human autoimmune arthritis is driven by the inflammatory environment," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 107, no. 33, pp. 14751–14756, 2010.
- [22] D. V Jovanovic, J. A. Di Battista, J. Martel-Pelletier, F. C. Jolicoeur, Y. He, M. Zhang, F. Mineau, and J. P. Pelletier, "IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages.," *J. Immunol.*, vol. 160, no. 7, pp. 3513–21, 1998.
- [23] Y. Katz, O. Nadiv, and Y. Beer, "Interleukin-17 Enhances Tumor Necrosis Factor α – Induced Synthesis of Interleukins 1 , 6 , and 8 in Skin and Synovial Fibroblasts," *ARTHRITIS Rheum.*, vol. 44, no. 9, pp. 2176–2184, 2001.
- [24] M. Chabaud, P. Garnero, J.-M. Dayer, P.-A. Guerne, F. Fossiez, and P. Miossec, "Contribution of Interleukin 17 To Synovium Matrix Destruction in Rheumatoid Arthritis," *Cytokine*, vol. 12, no. 7, pp. 1092–1099, 2000.
- [25] K. Sato, A. Suematsu, K. Okamoto, A. Yamaguchi, Y. Morishita, Y. Kadono, S. Tanaka, T. Kodama, S. Akira, Y. Iwakura, D. J. Cua, and H. Takayanagi, "Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction.," *J. Exp. Med.*, vol. 203, no. 12, pp. 2673–82, 2006.
- [26] J. M. Alvaro-Gracia, N. J. Zvaifler, and G. S. Firestein, "Cytokines in chronic inflammatory arthritis. V. Mutual antagonism between interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha on HLA-DR expression, proliferation, collagenase production, and granulocyte macrophage colony-stimulating factor production by rhu," *J. Clin. Invest.*, vol. 86, no. 6, pp. 1790–1798, 1990.
- [27] M. Shingu, Y. Nagai, T. Isayama, T. Naono, and M. Nobunaga, "The effects of cytokines on metalloproteinase inhibitors (TIMP) and collagenase production by human chondrocytes and TIMP production by synovial cells and endothelial cells.," *Clin. Exp. Immunol.*, vol. 94, no. 1, pp. 145–9, 1993.
- [28] W. B. van den Berg, P. L. van Lent, L. A. B. Joosten, S. Abdollahi-roodsaz, and M. I. Koenders, "Amplifying elements of arthritis and joint destruction," *Ann. Rheum. Dis.*, vol. 66 (Suppl.), p. iii45–iii48, 2007.
- [29] V. Viswanathan and K. J. Murray, "Management of Children with Juvenile Idiopathic Arthritis," vol. 83, no. January, pp. 63–70, 2016.

- [30] M. Arbogast, G. Dannecker, I. Foeldvari, M. Frosch, G. Ganser, N. Guellac, A. Heiligenhaus, and E. Al., "Aktualisierte, interdisziplinäre S2-Therapieleitlinie der Juvenilen Idiopathischen Arthritis (2. Auflage)," *Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften online*, no. 27, pp. 1–30, 2011.
- [31] F. Zulian, G. Martini, D. Gobber, C. Agosto, C. Gigante, and F. Zaccello, "Comparison of intra-articular triamcinolone hexacetonide and triamcinolone acetonide in oligoarticular juvenile idiopathic arthritis," *Rheumatology*, vol. 42, no. 10, pp. 1254–1259, 2003.
- [32] R. I. Scheinman, P. C. Cogswell, a K. Lofquist, and a S. Baldwin, "Role of transcriptional activation of I kappa B alpha in mediation of immunosuppression by glucocorticoids.," *Science (80-.)*, vol. 270, no. 5234, pp. 283–286, 1995.
- [33] T. Niehues, G. Horneff, H. Michels, M. Sailer Höck, and L. Schuchmann, "Evidenzbasierter einatz von Methotrexat bei kindern mit rheumatischen erkrankungen," *Z. Rheumatol.*, vol. 63, no. 2, pp. 147–159, 2004.
- [34] N. Olsen and L. Murray, "Antiproliferative effects of methotrexate on peripheral blood mononuclear cells," *Arthritis Rheum.*, vol. 32, no. 4, pp. 378–385, 1989.
- [35] D. J. Lovell, G. H. Edward, and A. Reiff, "Etanercept in Children With Polyarticular Juvenile Rheumatoid Arthritis," *N. Engl. J. Med.*, vol. 342, no. 11, pp. 763–769, 2000.
- [36] P. C. Taylor, "Pharmacology of TNF blockade in rheumatoid arthritis and other chronic inflammatory diseases," *Curr. Opin. Pharmacol.*, vol. 10, no. 3, pp. 308–315, 2010.
- [37] D. J. Lovell, N. Ruperto, S. Goodman, A. Reiff, L. Jung, K. Jarosova, D. Nemcova, R. Mouy, C. Sandborg, J. Bohnsack, D. Elewaut, I. Foeldvari, V. Gerloni, J. Rovensky, K. Minden, R. K. Vehe, L. W. Weiner, G. Horneff, H.-I. Huppertz, N. Y. Olson, J. R. Medich, R. Carcereri-De-Prati, M. J. McIlraith, E. H. Giannini, and A. Martini, "Adalimumab with or without methotrexate in juvenile rheumatoid arthritis.," *N. Engl. J. Med.*, vol. 359, no. 8, pp. 810–820, 2008.
- [38] A. Consolaro, G. Bracciolini, N. Ruperto, A. Pistorio, S. Magni-Manzoni, C. Malattia, S. Pederzoli, S. Davi, A. Martini, and A. Ravelli, "Remission, minimal disease activity, and acceptable symptom state in juvenile idiopathic arthritis: Defining criteria based on the juvenile arthritis disease activity score," *Arthritis Rheum.*, vol. 64, no. 7, pp. 2366–2374, 2012.
- [39] C. a Wallace, N. Ruperto, E. Giannini, and C. Arthritis, "Preliminary Criteria for Clinical Remission for Select Categories of Juvenile Idiopathic Arthritis re er d," *J. Rheumatol.*, vol. 31, no. 11, pp. 2290–94, 2004.
- [40] S. E. Turvey and D. H. Broide, "Chapter 2: Innate Immunity," *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 125, no. 2, pp. S24–S32, 2010.
- [41] L. Koenderman, W. Buurman, and M. R. Daha, "The innate immune response," *Immunol. Lett.*, vol. 162, no. 2, pp. 95–102, 2014.
- [42] N. Danilova, "The Evolution of Immun Mechanisms," *J. Exp. Zool. (Molecular Dev. Evol.)*, vol. 306, pp. 469–520, 2006.
- [43] T. Hato and P. C. Dagher, "How the innate immune system senses trouble and causes trouble," *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 10, no. 8, pp. 1459–1469, 2015.
- [44] A. Boltjes and F. van Wijk, "Human dendritic cell functional specialization in steady-state and inflammation," *Front. Immunol.*, vol. 5, no. 131, pp. 1–13, 2014.
- [45] D. T. Fearon and K. F. Austen, "Properdin: binding to C3b and stabilization of the C3b-dependent C3 convertase.," *J. Exp. Med.*, vol. 142, no. 4, pp. 856–63, 1975.
- [46] C. Kemper, J. P. Atkinson, and D. E. Hourcade, "Properdin: Emerging Roles of a Pattern-Recognition Molecule," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 28, no. 1, pp. 131–155, 2010.
- [47] T. Boehm and J. B. Swann, "Origin and Evolution of Adaptive Immunity," *Annu. Rev. Anim. Biosci.*, vol. 2, no. 1, pp. 259–283, 2014.
- [48] T. Boehm, I. Hess, and J. B. Swann, "Evolution of lymphoid tissues," *Trends Immunol.*, vol. 33, no. 6, pp. 315–321, 2012.
- [49] F. A. Bonilla and H. C. Oettgen, "Adaptive immunity," *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 125, no. 2 SUPPL. 2, pp. S33–S40, 2010.
- [50] S. Panda and J. L. Ding, "Natural Antibodies Bridge Innate and Adaptive Immunity," *J. Immunol.*, vol. 194, no. 1, pp. 13–20, 2015.
- [51] M. E. Conley, A. K. Dobbs, D. M. Farmer, S. Kilic, K. Paris, S. Grigoriadou, E. Coustan-Smith, V. Howard, and D. Campana, "Primary B Cell Immunodeficiencies: Comparisons and Contrasts," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 27, no. 1, pp. 199–227, 2009.
- [52] S. Richards, C. Watanabe, L. Santos, A. Craxton, and A. Edward, "Regulation of B-cell entry into cell cycle," *Immunol. Rev.*, vol. 224, pp. 183–200, 2009.
- [53] R. N. Germain, "T-cell development and the CD4–CD8 lineage decision," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 2, no. May, pp. 309–322, 2002.
- [54] H. Von Boehmer and J. Hans, "Structure and function of the pre-T-cell receptor," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 15, pp. 433–52, 1997.
- [55] E. Robey and B. J. Fowlkes, "Selective events in T-cell development," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 12, pp. 675–705, 1994.
- [56] P. Matzinger and S. Guerder, "Does T-cell tolerance require a dedicated antigen-presenting cell?," *Letters to Nature*, vol. 338, pp. 74–76, 1989.
- [57] V. Dardalhon, T. Korn, V. K. Kuchroo, and A. C. Anderson, "Role of Th1 and Th17 cells in organ-specific autoimmunity," *J. Autoimmun.*, vol. 31, no. 3, pp. 252–256, 2008.
- [58] T. R. Mosmann and R. L. Coffman, "TH1 AND TH2 CELLS : Different Patterns of Lymphokine Secretion Lead to Different Functional Properties," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 7, pp. 145–73, 1989.
- [59] Z. Shuai, M. W. Leung, X. He, W. Zhang, G. Yang, P. S. Leung, and M. Eric Gershwin, "Adaptive immunity in the liver," *Cell. Mol. Immunol.*, vol. 13, no. 3, pp. 354–368, 2016.
- [60] G. Del Prete, M. De Carli, F. Almerigogna, M. G. Giudizi, R. Biagiotti, and S. Romagnani, "Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production.," *J. Immunol.*, vol. 150, no. 2, pp. 353–360, 1993.
- [61] L. E. Harrington, R. D. Hatton, P. R. Mangan, H. Turner, T. L. Murphy, K. M. Murphy, and C. T. Weaver, "Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages.," *Nat. Immunol.*, vol. 6, no. 11, pp. 1123–32, 2005.
- [62] T. Korn, E. Bettelli, M. Oukka, and V. K. Kuchroo, "IL-17 and Th17 Cells.," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 27, pp.

- 485–517, 2009.
- [63] A. Visekruna, J. Ritter, T. Scholz, L. Campos, A. Guralnik, L. Poncette, H. Raifer, S. Hagner, K. Loser, and M. Huber, "Tc9 cells, a new subset of CD8 + T cells, support Th2-mediated airway inflammation," *Eur. J. Immunol.*, vol. 43, pp. 606–618, 2013.
- [64] H.-W. Mittrücker, A. Visekruna, and M. Huber, "Heterogeneity in the Differentiation and Function of CD8 + T Cells," *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*, vol. 62, pp. 449–458, 2014.
- [65] M. A. Kursunel and G. Esendagli, "The untold story of IFN- γ in cancer biology," *Cytokine Growth Factor Rev.*, vol. 31, pp. 73–81, 2016.
- [66] K. Schroder, P. J. Hertzog, T. Ravasi, and D. A. Hume, "Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions," *J. Leukoc. Biol.*, vol. 75, no. February, pp. 163–189, 2004.
- [67] D. M. Frucht, T. Fukao, C. Bogdan, H. Schindler, J. J. O'Shea, and S. Koyasu, "IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge," *Trends Immunol.*, vol. 22, no. 10, pp. 556–60, 2001.
- [68] U. Boehm, T. Klamp, M. Groot, and J. C. Howard, "Cellular Responses to IFN- γ ," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 15, pp. 749–95, 1997.
- [69] B. Y. B. Perussia, E. T. Dayton, and V. Fanning, "IMMUNE INTERFERON AND LEUKOCYTE-CONDITIONED MEDIUM INDUCE NORMAL AND LEUKEMIC MYELOID CELLS TO DIFFERENTIATE ALONG THE PATHWAY," *J. Exp. Med.*, vol. 158, pp. 2058–2080, 1983.
- [70] H. A. Young and K. J. Hardy, "Role of interferon-gamma in immune cell regulation," *J. Leukoc. Biol.*, vol. 58, no. 4, pp. 373–81, 1995.
- [71] C. Carraud, D. Lee, O. Donnars, S. H. Park, A. Beavis, Y. Koezuka, and A. Bendelac, "Cutting edge: Cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells," *J. Immunol.*, vol. 163, pp. 4647–4650, 1999.
- [72] F. D. Finkelman, I. M. Katona, T. R. Mosmann, and R. L. Coffman, "IFN-gamma regulates the isotypes of Ig secreted during in vivo humoral immune responses," *J. Immunol.*, vol. 140, pp. 1022–7, 1988.
- [73] V. Appay, R. A. van Lier, F. Sallusto, and M. Roederer, "Phenotype and Function of Human T Lymphocyte Subsets: Consensus and Issues," *Cytom. A*, vol. 73, pp. 975–983, 2008.
- [74] B. C. Zimmermann, K. Brduscha-tliem, C. Blaser, R. M. Zinkernagel, and H. Pircher, "Visualization, Characterization, and Turnover of CD8 + Memory T Cells in Virus-infected Hosts," *J. Exp. Med.*, vol. 183, no. April, pp. 1367–1375, 1996.
- [75] C. A. Michie, A. Mcleant, C. Alcock, and P. C. L. Beverley, "Lifespan of human lymphocyte subsets defined by CD45 isoforms," *Nature*, vol. 360, no. November, pp. 264–265, 1992.
- [76] Mosby, "humoral immunity," in *Mosby's Medical Dictionary*, 9th ed., 2012, p. 860.
- [77] P. Boross and J. H. W. Leusen, "Boosting antibody therapy with complement," *Blood*, vol. 119, no. 25, pp. 5945–5947, 2012.
- [78] D. Corti and A. Lanzavecchia, "Broadly neutralizing antiviral antibodies," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 31, pp. 705–742, 2013.
- [79] K. Kurosaka, N. Watanabe, and Y. Kobayashi, "Potentiation by human serum of anti-inflammatory cytokine production by human macrophages in response to apoptotic cells," *J. Leukoc. Biol.*, vol. 71, no. 6, pp. 950–956, 2002.
- [80] S. P. Hart, C. Jackson, L. M. Kremmel, M. S. McNeill, H. Jersmann, K. M. Alexander, J. a Ross, and I. Dransfield, "Specific binding of an antigen-antibody complex to apoptotic human neutrophils," *Am. J. Pathol.*, vol. 162, no. 3, pp. 1011–1018, 2003.
- [81] G. Mota, M. Manciualea, E. Cosma, I. Popescu, M. Hirt, E. Jensen-Jarolim, A. Calugaru, C. Galatiuc, T. Regalia, D. Tamandl, A. Spittler, and G. Boltz-Nitulescu, "Human NK cells express Fc receptors for IgA which mediate signal transduction and target cell killing," *Eur. J. Immunol.*, vol. 33, no. 8, pp. 2197–2205, 2003.
- [82] H. W. J. Schroeder and L. Cavacini, "Structure and Function of Immunoglobulins," *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 125, pp. S41–S52, 2010.
- [83] Y. Harpaz and C. Chothia, "Many of the immunoglobulin superfamily domains in cell adhesion molecules and surface receptors belong to a new structural set which is close to that containing variable domains," *Journal of molecular biology*, vol. 238, pp. 528–539, 1994.
- [84] A. F. Williams and A. N. Barclay, "THE IMMUNOGLOBULIN SUPERFAMILY-DOMAINS FOR CELL SURFACE RECOGNITION," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 6, pp. 381–405, 1988.
- [85] M. Boes, "Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses," *Mol. Immunol.*, vol. 37, pp. 1141–1149, 2000.
- [86] J. Stavnezer, J. Guikema, and C. Schrader, "Mechanism and regulation of class switch recombination," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 26, pp. 261–292, 2008.
- [87] J. S. Fellah, M. V. Wiles, J. Charlemagne, and J. Schwager, "Evolution of vertebrate IgM: complete amino acid sequence of the constant region of *Ambystoma mexicanum* μ chain deduced from cDNA sequence," *Eur. J. Immunol.*, vol. 22, pp. 2595–2601, 1992.
- [88] P. H. Schur, "IgG subclasses--a review," *Ann. Allergy, Asthma Immunol.*, vol. 58, pp. 89–96, 99, 1987.
- [89] J. M. Woof and M. A. Ken, "The function of immunoglobulin A in immunity," *J. Pathol.*, vol. 208, pp. 270–282, 2006.
- [90] G. Vauquelin and S. J. Charlton, "Exploring avidity: understanding the potential gains in functional affinity and target residence time of bivalent and heterobivalent ligands," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 168, pp. 1771–1785, 2013.
- [91] K. Stiasny, S. Kiermayr, H. Holzmann, and F. X. Heinz, "Cryptic Properties of a Cluster of Dominant Flavivirus Cross-Reactive Antigenic Sites," *J. Virol.*, vol. 80, no. 19, pp. 9557–9568, 2006.
- [92] L. Hangartner, R. M. Zinkernagel, and H. Hangartner, "Antiviral antibody responses: the two extremes of a wide spectrum," vol. 6, no. March, pp. 231–243, 2006.
- [93] L. Turtle, M. J. Griffiths, and T. Solomon, "Encephalitis caused by flaviviruses," *Qjm*, vol. 105, no. 3, pp. 219–223, 2012.
- [94] P. Leyssen, E. De Clercq, and J. Neyts, "Perspectives for the treatment of infections with Flaviviridae," *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 13, no. 1, pp. 67–82, 2000.
- [95] G. Kuno, G. J. Chang, K. R. Tsuchiya, N. Karabatsos, and C. B. Cropp, "Phylogeny of the genus *Flavivirus*," *J. Virol.*, vol. 72, no. 1, pp. 73–83, 1998.
- [96] J. Süss, "Tick-borne encephalitis 2010: Epidemiology, risk areas, and virus strains in Europe and Asia-An overview," *Ticks Tick. Borne. Dis.*, vol. 2, no. 1, pp. 2–15, 2011.

- [97] Robert-Koch-Institut, "FSME: Risikogebiete in Deutschland (Stand: Mai 2016) Bewertung des örtlichen Erkrankungsrisikos," *Epidemiol. Bull.*, vol. 18, pp. 151–166, 2016.
- [98] H. Holzmann, S. W. Aberle, K. Stiasny, P. Werner, A. Mischak, B. Zainer, M. Netzer, S. Koppi, E. Bechter, and F. X. Heinz, "Tick-borne encephalitis from eating goat cheese in a mountain region of Austria," *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 15, no. 10, pp. 1671–1673, 2009.
- [99] J. R. Valarcher, S. Hägglund, M. Juremalm, G. Blomqvist, L. Renström, S. Zohari, M. Leijon, and J. Chirico, "Tick-borne encephalitis," *Rev. Sci. Tech.*, vol. 34, no. 2, pp. 453–466, 2015.
- [100] Robert Koch-institut, "Epidemiologisches Bulletin, FSME: Risikogebiete in Deutschland (Stand: April 2018)," no. 17, pp. 161–173, 2018.
- [101] L. Lindquist and O. Vapalahti, "Tick-borne encephalitis," *Lancet*, vol. 371, pp. 1861–1871, 2008.
- [102] K. L. Mansfield, N. Johnson, L. P. Phipps, J. R. Stephenson, A. R. Fooks, and T. Solomon, "Tick-borne encephalitis virus - A review of an emerging zoonosis," *J. Gen. Virol.*, vol. 90, no. 8, pp. 1781–1794, 2009.
- [103] R. Kaiser, "Tick-Borne Encephalitis," *Infect. Dis. Clin. North Am.*, vol. 22, no. 3, pp. 561–575, 2008.
- [104] M. Wiedlocha, P. Marcinowicz, and B. Stańczykiewicz, "Psychiatric Aspects of Herpes Simplex Encephalitis, Tick-Borne Encephalitis and Herpes Zoster Encephalitis Among Immunocompetent Patients," *Adv. Clin. Exp. Med.*, vol. 5276, pp. 361–371, 2015.
- [105] A. Mickiene, A. Laiskonis, G. Günther, S. Vene, A. Lundkvist, and L. Lindquist, "Tickborne encephalitis in an area of high endemicity in lithuania: disease severity and long-term prognosis.," *Clin. Infect. Dis.*, vol. 35, no. 6, pp. 650–658, 2002.
- [106] Robert Koch-institut, "Empfehlungen der Ständigen Impfkommission (STIKO) am RKI - 2016/17," *Epidemiol. Bull.*, no. 34, pp. 301–340, 2016.
- [107] Baxter, "Baxter FSME-IMMUN Erwachsene," *Arzneim. Beipackzettel*, pp. 1–3, 2005.
- [108] N. BEHRING, "Encepur Erwachsene," *Arzneim. Beipackzettel*, pp. 1–3, 2008.
- [109] Baxter, "Baxter FSME-IMMUN Junior," *Arzneim. Beipackzettel*, pp. 1–3, 2005.
- [110] C. BEHRING, "Encepur Kinder," *Arzneim. Beipackzettel*, pp. 1–2, 2005.
- [111] Robert Koch-institut, "Hinweise für Ärzte zum Aufklärungsbedarf über mögliche unerwünschte Wirkungen bei Schutzimpfungen/Stand: 2007," *Epidemiol. Bull.*, vol. 25, pp. 209–232, 2007.
- [112] K. Stiasny, H. Holzmann, and F. X. Heinz, "Characteristics of antibody responses in tick-borne encephalitis vaccination breakthroughs," *Vaccine*, vol. 27, no. 50, pp. 7021–7026, 2009.
- [113] F. X. Heinz, H. Holzmann, A. Essl, and M. Kundi, "Field effectiveness of vaccination against tick-borne encephalitis," *Vaccine*, vol. 25, pp. 7559–7567, 2007.
- [114] S. Aydin, "A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA," *Peptides*, vol. 72, pp. 4–15, 2015.
- [115] S. L. Hazell, "Clinical utility of avidity assays.," *Expert Opin. Med. Diagn.*, vol. 1, no. 4, pp. 511–9, 2007.
- [116] M. Prelog, C. Wilk, M. Keller, T. Karall, D. Orth, R. Geiger, G. Walder, G. Laufer, M. Cottogni, B. Zimmerhackl, J. Stein, B. Grubeck-loebenstein, and R. Wuerzner, "Diminished response to tick-borne encephalitis vaccination in thymectomized children," *Vaccine*, vol. 26, pp. 595–600, 2008.
- [117] M. Zlamy, R. Würzner, H. Holzmann, A. Brandstätter, V. Jeller, L. Bernd, and M. Prelog, "Antibody dynamics after tick-borne encephalitis and measles – mumps – rubella vaccination in children post early thymectomy," *Vaccine*, vol. 28, pp. 8053–8060, 2010.
- [118] W. S. Low and W. A. B. W. Abas, "Benchtop Technologies for Circulating Tumor Cells Separation Based on Biophysical Properties," *Biomed Res. Int.*, vol. 2015, 2015.
- [119] E. Engvall and P. Perlmann, "Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G," *Immunochemistry*, vol. 8, no. 9, pp. 871–874, 1971.
- [120] S. D. Gan and K. R. Patel, "Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay.," *J. Invest. Dermatol.*, vol. 133, no. 9, p. e12, 2013.
- [121] H. N. Eisen, "Affinity enhancement of antibodies: how low-affinity antibodies produced early in immune responses are followed by high-affinity antibodies later and in memory B-cell responses.," *Cancer Immunol. Res.*, vol. 2, no. 5, pp. 381–92, 2014.
- [122] R. Kneitz, J. Schubert, F. Tollmann, W. Zens, K. Hedman, and B. Weissbrich, "A new method for determination of varicella-zoster virus immunoglobulin G avidity in serum and cerebrospinal fluid," *BMC Infect. Dis.*, vol. 4:33, pp. 1–11, 2004.
- [123] S. A. Othman and S. Radiman, "Role of Horseradish Peroxidase in Polypyrrole Conductivity Role of Horseradish Peroxidase in Polypyrrole Conductivity," no. December, 2017.
- [124] T. Fujii, Y. Takada-takatori, and K. Kawashima, "Basic and Clinical Aspects of Non-neuronal Acetylcholine : Expression of an Independent , Non-neuronal Cholinergic System in Lymphocytes and Its Clinical Significance in Immunotherapy," *J Pharmacol Sci*, vol. 106, pp. 186–192, 2008.
- [125] T. Fujii, S. Yamada, Y. Watanabe, H. Misawa, and S. Tajima, "Induction of choline acetyltransferase mRNA in human mononuclear leukocytes stimulated by phytohemagglutinin , a T-cell activator," *J. Neuroimmunol.*, vol. 82, pp. 101–107, 1998.
- [126] "Cytokine Secretion Assay, IFN- γ Secretion Assay," *Miltenyi Biotec*, pp. 1–39.
- [127] I. Safarik and M. Safarikova, "Use of magnetic techniques for the isolation of cells," *J. Chromatogr.*, vol. 722, pp. 33–53, 1999.
- [128] A. L. Givan, *Flow cytometry: First principles*. 2001.
- [129] BIO-RAD, "Flow Cytometry Basics Guide."
- [130] R. Testi, D. D'Ambrosio, R. De Maria, and A. Santoni, "The CD69 receptor : a multipurpose cell-surface trigger for hematopoietic cells," *Immunol. Today*, vol. 15, pp. 479–483, 1994.
- [131] Robert Koch-institut, "Epidemiologisches Bulletin, FSME: Risikogebiete in Deutschland (Stand: Januar 2019)," no. 7, pp. 57–74, 2019.
- [132] K. Stiasny, J. H. Aberle, M. Keller, B. Grubeck-Loebenstein, and F. X. Heinz, "Age affects quantity but not quality of antibody responses after vaccination with an inactivated flavivirus vaccine against tick-borne encephalitis," *PLoS One*, vol. 7, no. 3, pp. 1–7, 2012.
- [133] M. Pichichero, T. Voloshen, D. Zajac, and S. Passador, "Avidity Maturation of Antibody to Haemophilus influenzae Type b (Hib) after Immunization with Diphtheria-Tetanus – Acellular Pertussis – Hib – Hepatitis B Combined Vaccine in Infants," *J. Infect. Dis.*, no. 180, pp. 1390–1393, 1999.
- [134] J. Ridings, I. C. Nicholson, W. Goldsworthy, R. Haslam, D. M. Robertson, and H. Zola, "Somatic hypermutation

- of immunoglobulin genes in human neonates," *Clin. Exp. Immunol.*, no. 108, pp. 366–374, 1997.
- [135] H. Holzmann, M. Kundi, K. Stiasny, J. Clement, P. McKenna, C. Kunz, and F. X. Heinz, "Correlation between ELISA, hemagglutination inhibition, and neutralization tests after vaccination against tick-borne encephalitis," *J. Med. Virol.*, vol. 48, no. 1, pp. 102–107, 1996.
- [136] K. Blom, A. Cuapio, J. T. Sandberg, R. Varnaite, J. Michaëlsson, N. K. Björkström, J. K. Sandberg, J. Klingström, L. Lindquist, S. G. Russ, H. Ljunggren, and A. Marcello, "Cell-Mediated Immune Responses and Immunopathogenesis of Human Tick-Borne Encephalitis," *Front. Immunol.*, vol. 9, pp. 1–10, 2018.
- [137] J. H. Aberle, J. Schwaiger, S. W. Aberle, K. Stiasny, O. Scheinost, M. Kundi, V. Chmelik, and F. X. Heinz, "Human CD4+ T Helper Cell Responses after Tick-Borne Encephalitis Vaccination and Infection," *PLoS One*, pp. 1–15, 2015.
- [138] I. J. Amanna and M. K. Slifka, "Contributions of humoral and cellular immunity to vaccine-induced protection in humans," *Virology*, vol. 411, pp. 206–215, 2011.
- [139] J. Geginat, A. Lanzavecchia, and F. Sallusto, "Proliferation and differentiation potential of human CD8+ memory T-cell subsets in response to antigen or homeostatic cytokines," *Blood*, vol. 101, pp. 4260–4266, 2003.
- [140] M. Prelog, J. Schönlaub, V. Jeller, G. Almanzar, K. Höfner, S. Gruber, T. Eiwegger, and R. Würzner, "Reduced varicella-zoster-virus (VZV) -specific lymphocytes and IgG antibody avidity in solid organ transplant recipients," *Vaccine*, vol. 31, pp. 2420–2426, 2013.
- [141] P. Rendi-Wagner, M. Paulke-Korinek, M. Kundi, U. Wiedermann, B. Laaber, and H. Kollaritsch, "Antibody persistence following booster vaccination against tick-borne encephalitis : 3-Year post-booster follow-up," *Vaccine*, no. 25, pp. 5097–5101, 2007.
- [142] M. Paulke-Korinek, P. Rendi-Wagner, M. Kundi, B. Laaber, U. Wiedermann, and H. Kollaritsch, "Booster vaccinations against tick-borne encephalitis: 6 Years follow-up indicates long-term protection," *Vaccine*, vol. 27, no. 50, pp. 7027–7030, 2009.
- [143] P. Rendi-wagner, M. Kundi, O. Zent, G. Dvorak, P. Jaehnig, H. Holzmann, A. Mikolasek, and H. Kollaritsch, "Persistence of protective immunity following vaccination against tick-borne encephalitis — longer than expected?," *Vaccine*, vol. 22, pp. 2743–2749, 2004.
- [144] C. Wittermann, A. Izu, E. Petri, D. Gniel, and E. Fragapane, "Five year follow-up after primary vaccination against tick-borne encephalitis in children," *Vaccine*, vol. 33, pp. 1824–1829, 2015.
- [145] J. Beran, M. Lattanzi, F. Xie, L. Moraschini, and I. Galgani, "Second five-year follow-up after a booster vaccination against tick-borne encephalitis following different primary vaccination schedules demonstrates at least 10 years antibody persistence," *Vaccine*, 2018.
- [146] K. B. Hertzell, K. Pauksens, L. Rombo, A. Knight, S. Vene, and H. H. Askling, "Tick-borne encephalitis (TBE) vaccine to medically immunosuppressed patients with rheumatoid arthritis : A prospective , open-label , multi-centre study," *Vaccine*, vol. 34, pp. 650–655, 2016.
- [147] G. Almanzar, M. Zlamy, C. Koppelstaetter, A. Brunner, V. Jeller, C. Duftner, C. Dejaco, J. Brunner, and M. Prelog, "Increased replication of CD4+ naive T cells and changes in T cell homeostasis in a case of acute exacerbation of juvenile idiopathic arthritis: a case comparison study.," *J. Med. Case Rep.*, vol. 7, no. 1, p. 135, 2013.
- [148] J. Schwaiger, J. H. Aberle, K. Stiasny, B. Knapp, W. Schreiner, I. Fae, G. Fischer, O. Scheinost, V. Chmelik, and F. X. Heinz, "Specificities of Human CD4+ T cell Responses to an Inactivated Flavivirus Vaccine and Infection: Correlation with Structure and Epitope Prediction.," *J. Virol.*, no. April, Apr. 2014.

Danksagung

Frau Professor Dr. med. Martina Prelog danke ich für ihre zahlreichen Anregungen und stete Geduld. Bei dem gesamten Laborteam möchte ich mich bedanken, insbesondere bei Herrn PD Dr. rer. nat. Giovanni Almanzar, Frau Kerstin Höfner und Frau Kristin Robrade, für die immerwährende Unterstützung. Aus dem Deutschen Zentrum für Kinder- und Jugendrheumatologie in Garmisch-Partenkirchen danke ich Herrn Professor Dr. med. J.-P. Haas, Frau Dr. med. R. Häfner und Herrn Dr. med. F. Speth für ihre Hilfe und die lehrreichen Stunden. Ein besonderer Dank gilt den Studienteilnehmerinnen und -teilnehmern. Ich bedanke mich bei meiner Familie und meinen Freunden, die mir mit Wort, Tat und Rat jederzeit zur Seite standen.