

**Aus der Kinderklinik und Poliklinik
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. C. Härtel**



**Rekonstitution der prämaternen
Immunoseneszenz-Parameter unter
anti-TNF-alpha-Therapie
bei juveniler idiopathischer Arthritis**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Angelika Christina Mutterer

aus Giebelstadt

Würzburg, Juli 2021

Referentin: Prof. Dr. med. Martina Prelog

Korreferent: apl. Prof. Dr. med. Hans-Peter Tony

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 20.12.2021

Die Promovendin ist Ärztin

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Dissertation „Rekonstitution der prämaternen Immunoseneszenz-Parameter unter Therapie mit anti-TNF-alpha-Inhibitor bei juveniler idiopathischer Arthritis“ eigenständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den verwendeten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe. Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt wurde.

Giebelstadt, den 20.12.2021

Inhaltsverzeichnis:

1. Einführung	1
1.1. Juvenile idiopathische Arthritis	1
1.1.1. Klassifikation der JIA	1
1.1.1.1. Systemische JIA	4
1.1.1.2. Oligoarthritis	6
1.1.1.3. Polyarthritis	6
1.1.1.4. Juvenile Psoriasis-Arthritis	7
1.1.1.5. Enthesitis-assoziierte Arthritis	8
1.1.2. Ätiopathogenese	10
1.1.2.1. Genetische Suszeptibilität	10
1.1.2.2. Exogene Auslöser (Trigger)	11
1.1.2.2.1. Darmmodell	12
1.1.2.3. Dysbalance zwischen Selbsttoleranz und Inflammation auf zellulärer Ebene ..	13
1.1.3. Disease Activity Scores	15
1.1.4. Behandlung der JIA	16
1.1.4.1. Nicht-steroidale Antirheumatika	18
1.1.4.2. Glukokortikoide	19
1.1.4.3. DMARDs (disease-modifying antirheumatic drugs)	20
1.1.4.4. Biologika	22
1.1.4.4.1. TNF α -Inhibitoren	23
1.1.4.4.2. IL-1-/IL-6-Inhibitoren	25
1.1.4.4.3. Weitere Angriffspunkte der Biologika-Therapie	27
1.1.4.4.4. Ausblicke in der Biologika-Therapie	28
1.1.5. Prognose	29
1.2. Prämatüre Immunoseneszenz	30
1.2.1. Immunoseneszenz	30
1.2.2. Immunoseneszenz auf zellulärer Ebene	31
1.2.2.1. Einfluss der Immunoseneszenz auf die T-Zellen	33
1.2.2.1.1. Rezente Thymusemigranten (RTE)	35
1.2.2.1.2. T-Zell-Differenzierung und Subpopulationen	37
1.2.2.1.3. T-Helferzellen (TH-Zellen)	42
1.2.2.1.4. T-Zell-Plastizität	45
1.2.2.2. T-Zell-Rezeptor-Diversität	46
1.2.2.3. Relative Telomerlänge	49
1.2.3. Thymektomie als Modell der Immunoseneszenz	50
1.2.4. Chronische Virusinfektionen als Promotor von Immunoseneszenz	53
1.2.5. Prämatüre Immunoseneszenz bei JIA	57
1.3. Zielsetzung und Fragestellung dieser Arbeit	61

2. Material und Methoden	62
2.1. Materialien	62
2.1.1. Geräte	62
2.1.2. Verbrauchsmaterial.....	64
2.1.3. Chemikalien	66
2.1.4. Gebrauchsfertige Lösungen	67
2.1.5. Gebrauchsfertige Kits	68
2.1.6. Antikörper	69
2.1.7. Stimuli	71
2.1.8. Verwendete Software	71
2.2. Methoden.....	72
2.2.1. Rekrutierung der Patienten und Kontrollgruppe	72
2.2.1.1. JIA-Probanden	72
2.2.1.2. Kontrollprobanden	73
2.2.2. Dichtegradienten-Zentrifugation zur Isolierung der PBMCs	74
2.2.3. Zellzählung mit Neubauer-Zählkammer	74
2.2.4. Kryokonservierung.....	75
2.2.5. Durchflusszytometrie	75
2.2.5.1. FACS-Färbeprotokoll.....	77
2.2.6. ELISA.....	79
2.2.6.1. IL-7-Sandwich-ELISA	80
2.2.7. Quantifizierung der TRECs.....	82
2.2.8. Analyse der Telomerlängen.....	83
2.2.9. Statistische Analyse.....	83
3. Ergebnisse.....	84
3.1. Charakterisierung der Probanden	84
3.1.1. Patientencharakteristika	84
3.1.1.1. Charakteristika der DMARD-Gruppe.....	86
3.1.1.2. Charakteristika der TNF α -Inhibitor-Population.....	89
3.1.2. Charakteristika der Kontrollgruppe	90
3.2. CD4-positive Subpopulationen	91
3.3. CD8-positive Subpopulationen	96
3.4. Regulatorische T-Zellen.....	100
3.5. Rezente Thymusemigranten.....	103
3.6. Chemokin-Rezeptor-tragende T-Zellen	105
3.7. T-Zellrezeptor α und β.....	107
3.8. T-Zellrezeptor γ und δ	112
3.9. Zytokine	115
3.9.1. Zytokine in CD4-positiven Subpopulationen	115

3.9.2. Zytokine in CD8-positiven Subpopulationen	118
3.9.3. Zytokine in regulatorischen T-Zellen	121
3.9.4. Zytokine in den rezenten Thymusemigranten	122
3.9.5. Zytokine der Chemokin-Rezeptor-positiven T-Zellen	126
3.9.6. Zytokine in T-Zellrezeptor-positiven T-Zellen	128
3.10. IL-7-Level	131
3.11. Proliferation.....	132
3.12. TRECs	134
3.13. Relative Telomerlänge	134
3.14. Lineare Korrelation und multiple Regressionsanalyse	135
3.15. Immunoseneszenz-Parameter im Verhältnis zum TNFα-Inhibitor-Einnahme-	
 zeitraum.....	146
3.15.1. CD4-Subpopulationen im Verhältnis zur TNFi-Dauer und zur Krank-	147
heitsdauer.	
3.15.2. CD8-Subpopulationen im Verhältnis zur TNFi-Dauer und zur Krankheitsdauer ..	150
3.15.3. Rezente Thymusemigranten im Verhältnis zur TNFi-Dauer und zur Krankheitsdauer	
.....	153
3.15.4. TRECs und relative Telomerlänge im Verhältnis zu Krankheitsdauer	157
4. Diskussion	159
4.1. Subpopulationen	159
4.2. Regulatorische T-Zellen.....	161
4.3. Rezente Thymusemigranten.....	162
4.4. Probandendaten	165
4.5. Stärken und Schwächen	166
4.6. Fazit.....	167
5. Zusammenfassung.....	169
6. Literaturverzeichnis	170
Appendix.....	185
I Abkürzungsverzeichnis	185
II Abbildungsverzeichnis	189
III Tabellenverzeichnis (inkl. Tabellen in Appendix)	196
III.1. Zusammenfassende Tabellen (Tabellen 15-27).....	198
IV Danksagung.....	218
V Lebenslauf	219

1. Einführung

1.1. Juvenile idiopathische Arthritis

Juvenile idiopathische Arthritis (JIA) beschreibt eine heterogene Gruppe von chronischen Arthritiden im Kindesalter, die vor dem 16. Lebensjahr beginnen, länger persistieren als 6 Wochen und von unbekannter Ätiologie sind [1-3]. JIA ist die häufigste rheumatische Erkrankung im Kindesalter. Vorwiegend anzutreffen ist diese Erkrankung an den distalen Gelenken. Vor Diagnosestellung müssen andere mögliche Differenzialdiagnosen beispielsweise inflammatorischer oder reaktiver Genese ausgeschlossen werden.

In westlichen Ländern mit hohem Einkommen liegt die Prävalenz der JIA bei 16-150 Erkrankungen und die jährliche Inzidenz bei 2-20 Fällen pro 100.000 Einwohner [1]. Weltweit wird die Prävalenz bei 7-400 Erkrankungen und die jährliche Inzidenz bei 0,5-22 Fällen pro 100.000 Population berichtet [4]. Als Ursache dieser doch großen Unterschiede der Krankheitshäufigkeiten zwischen den Regionen wird unter anderem eine nicht einheitliche Klassifikation verantwortlich gemacht.

1.1.1. Klassifikation der JIA

Unter Berücksichtigung von demographischen Charakteristika, klinischer Manifestation, Behandlungsstrategien und Krankheitsprognose erfolgt eine Unterteilung der JIA in Subklassen [5].

Der *International League of Associations for Rheumatology* (ILAR) zufolge wird JIA in sieben Subklassen eingeteilt: die systemische JIA (sJIA), die Oligoarthritis, die seronegative und seropositive Polyarthritis, die juvenile Psoriasis-Arthritis, die Enthesitis-assoziierte JIA und die undifferenzierte JIA [3]. Das primäre Ziel dieser Klassifikation ist die Generierung möglichst homogener Gruppen, basierend auf den dominanten klinischen Merkmalen und laborchemischen Parametern, um

subklassenspezifische Therapieoptionen, Follow-up-Strategien und Prognoseaussagen definieren zu können. Das Auftreten neuer klinischer Symptome kann hierbei im Verlauf der Krankheit zu einer Veränderung der Subklasse führen [2].

In Tabelle 1 sind die Kernpunkte der JIA-Klassifikation nach ILAR zusammengefasst.

Auch wenn die ILAR-Kriterien vermeintlich eine definierte Krankheitsentität beschreiben, existieren dennoch weitere Merkmale innerhalb der Subklassen, die zu einem heterogenen Bild führen [1]. Griffin et al. beschrieben 2009 eine genetische Heterogenität der polyartikulären JIA [6]. Des Weiteren zeigten Barnes et al. ein spezifisches B-Zell-Profil sowie eine synoviale Plasmazell-Infiltration im Frühstadium der Erkrankung, ohne Berücksichtigung der Anzahl der betroffenen Gelenke oder der Krankheitsschwere. Dies würde eine modifizierte Klassifikation unter Einbeziehung von genexpressiven und immunozytologischen Parametern zum Erzielen einer möglichst homogenen Klassifizierung erforderlich machen [7].

Tabelle 1: ILAR Klassifikation der JIA. Zweite Revision, Edmonton 2001, modifiziert nach [3].

JIA-Subtyp	Definition	Ausschluss kriterien	Relative Häufigkeiten ¹
Systemische JIA (M. Still)	Intermittierendes Fieber ≥ 2 Wochen und Arthritis in ≥ 1 Gelenk, plus eines oder mehr der folgenden Kriterien: <ul style="list-style-type: none"> • flüchtiger, erythematöser Ausschlag • generalisierte Lymphknotenschwellungen • Hepatomegalie und/oder Splenomegalie • Serositis 	a, b, c, d	4-17 %
Oligoarthritis	Arthritis von ≤ 4 Gelenken während der ersten 6 Krankheitsmonate <u>Subklassifikationen:</u> <ul style="list-style-type: none"> • persistent: nicht mehr als 4 Gelenke • extended: > 4 Gelenke nach den ersten 6 Monaten betroffen 	a, b, c, d, e	27-60 %
Seronegative Polyarthritis	<ul style="list-style-type: none"> • Arthritis ≥ 5 Gelenke während der ersten 6 Krankheitsmonate • Rheumafaktor negativ 	a, b, c, d, e	11-30 %
Seropositive Polyarthritis	<ul style="list-style-type: none"> • Arthritis ≥ 5 Gelenke während der ersten 6 Krankheitsmonate, • Rheumafaktor positiv (≥ 2 Tests positiv im Abstand von ≥ 3 Monaten in den ersten 6 Monaten) 	a, b, c, e	2-7 %
Psoriasis-Arthritis	Arthritis und Psoriasis, oder Arthritis und ≥ 2 der folgenden Kriterien: <ul style="list-style-type: none"> • Daktylitis • Nagelpsoriasis (Lochfraß, Onycholyse) • Psoriasis bei einem erstgradigen Verwandten 	b, c, d, e	2-11 %
Enthesitis-assoziierte Arthritis	Arthritis und Enthesitis, oder Arthritis oder Enthesitis mit ≥ 2 der folgenden Kriterien: <ul style="list-style-type: none"> • Schmerzempfindlichkeit oder Inflammation im Iliosakralgelenk • HLA-B27 positiv • Krankheitsbeginn eines Jungen > 6 Jahre • akute (symptomatische) Uveitis anterior • erstgradiger Verwandter mit: ankylosierender Spondylitis, Enthesitis-assoziierte Arthritis, Sakroiliitis bei entzündlicher Darmerkrankung, Reiter-Syndrom oder akuter anteriorer Uveitis 	a, d, e	1-11 %
Undifferenzierte Arthritis	Arthritis, die sich keiner Subgruppe zuordnen lässt, oder auf die mehr als 2 Subtypen zutreffen		11-21 %

¹ Relative Häufigkeiten entnommen aus [8]

Die Tabelle 1 zeigt die Unterteilung der JIA in die 7 Subtypen mit Definition nach ILAR, 2. Revision, Edmonton, modifiziert nach [3], mit Ausschlusskriterien und relativen Häufigkeiten des Auftretens [8] in Bezug auf die Gesamtheit der JIA-Patienten.

Ausschlusskriterien:

- a. Psoriasis oder Psoriasis in der Patienten- oder Familienanamnese bei einem erstgradigen Verwandten
- b. Arthritis eines männlichen Patienten > 6 Jahre mit HLA-B27-Positivität
- c. Erstgradiger Verwandter (anamnestisch oder aktuell) mit:
ankylosierender Spondylitis, Enthesitis-assoziiierter Arthritis, Sakroiliitis bei chronisch-entzündlicher Darmerkrankung, Reiter-Syndrom oder akuter anteriorer Uveitis
- d. Mindestens 2 Nachweise von IgM-Rheumafaktor im Abstand von zumindest 3 Monaten
- e. Systemische JIA

1.1.1.1. Systemische JIA

Der systemische JIA-Subtyp (sJIA) wird bei männlichen und weiblichen Patienten mit derselben Häufigkeit beobachtet und kann zu jedem Zeitpunkt der Kindheit auftreten. Die ILAR-Kriterien dieser Entität sind Tabelle 1 zu entnehmen. Die intermittierenden Fieberschübe (bis 39,5°C) treten in der Regel bis zu zweimal täglich auf. Zumeist ist während der Fieberspitzen ein lachsfarbener stamm- und proximalbetonter Ausschlag zu beobachten, der sich mit Abfallen des Fiebers verflüchtigt. Die systemischen Symptome können über Monate hinweg persistieren, jedoch selten länger als 6 Monate. In der Regel sind die Auto-Antikörper, antinukleären Antikörper (ANA) und der Rheumafaktor (RF) negativ [9].

Gelegentlich kann es zu einer polyarthritischen Manifestation in den großen und kleinen Gelenke kommen [10]. Nachdem Erythem und Fieberschübe oft erst nach der Polyarthritis zu Tage treten, ist die Abgrenzung zur polyarthritischen JIA bei Erstdiagnose erschwert [11].

Hepatosplenomegalie und generalisierte Lymphadenopathie ist bei einem Drittel der Patienten zu beobachten [5]. Die Serositis – in Form einer Perikarditis oder Pleuritis - äußert sich typischerweise in Thoraxschmerzen. Während der Fieberspitzen werden auch abdominelle oder Gliederschmerzen beobachtet [9, 12].

Zu den Komplikationen zählen neben Osteoporose, Wachstumsretardierung, erosiver Arthritis und Amyloidose das Makrophagen-Aktivierungssyndrom

(MAS), eine schwere, lebensbedrohliche Komplikation mit hoher Mortalität und Morbidität, die in 5-8 % der Fälle beschrieben wird [13].

Charakterisiert wird das MAS - ähnlich einer hämophagozytischen Lymphohistiozytose (HLH) - durch persistierendes Fieber, Panzytopenie, Hepatosplenomegalie und eine hepatische Funktionsstörung mit Enzephalopathie [9]. Lebensbedrohlich ist hierbei die potenziell auftretende disseminierte Koagulation aufgrund laborchemischer Verschiebungen (Lymphozytopenie, Thrombozytopenie, beschleunigter Fibrinogenabbau, erhöhte D-Dimere, verlängerte Prothrombinzeit und partielle Thromboplastinzeit). Im Gegensatz zur komplikationslosen sJIA ist beim MAS ein starker Abfall der Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG) zu beobachten, verursacht durch die Hypofibrinogenämie, was gleichzeitig als diagnostischer Warnhinweis dienen kann. Ebenfalls diagnostisch relevant ist eine Hyperferritinämie über 684 ng/mL [14].

Die Diagnosestellung einer sJIA ist besonders in der Initialphase erschwert aufgrund der vielen möglichen Differenzialdiagnosen (z.B. Infektionen, Neoplasien, rheumatisches Fieber, Kawasaki-Syndrom oder autoinflammatorische Erkrankungen) [12]. Die sJIA kann variable Verläufe von monozyklisch mit kompletter Remission bis zur Persistenz in das Erwachsenenleben einnehmen. Insbesondere die Arthritis kann hierbei persistieren.

Ombrello et al. stellten in einer multizentrischen Studie eine Relation zwischen der *human leukocyte antigen* (HLA) Klasse II des *major histocompatibility complex* (MHC)-Locus und sJIA her und bezeichneten den Locus als „Suszeptibilitäts-Locus“ mit Beeinflussung des Krankheitsrisikos [15].

In aktuellen Forschungsarbeiten wird derzeit diskutiert, sJIA nicht als Autoimmunerkrankung, sondern als autoinflammatorische Erkrankung und einzelne Krankheitsentität zu werten [16].

1.1.1.2. Oligoarthritis

Oligoarthritis ist die häufigste JIA-Form und ist v.a. bei Patientinnen unter 6 Jahren zu beobachten [2]. Die ILAR-Kriterien der Oligoarthritis sowie deren weitere Unterteilung in eine permanente und extendierte Form sind in Tabelle 1 aufgelistet. Eine ANA-Positivität tritt in 70-80 % der Fälle auf, wohingegen der RF negativ ist [5]. Das Uveitis-Risiko ist bei ANA-Positivität erhöht [17].

Oligoarthritis ist verstärkt an den großen Gelenken der unteren Extremitäten anzutreffen. Da eine Beteiligung der kleinen Gelenke äußerst selten ist, sollte bei deren Befall differenzialdiagnostisch eine Psoriasis-Arthritis in Betracht gezogen werden, insbesondere bei positiver Psoriasis-Familienanamnese [18].

Typischerweise präsentiert sich die Oligoarthritis als Monoarthritis mit exzellenter Prognose und gutem funktionellem Outcome. Eine chronisch verlaufende Uveitis ist in dieser Subgruppe der Hauptrisikofaktor einer persistierenden körperlichen Behinderung [5]. Ebenfalls als Komplikation zu sehen ist der Progress der Oligoarthritis in eine polyarthritische Form.

Da Krankheitsrezidive noch Jahre nach einer vermeintlichen Remission auftreten können, sind Nachuntersuchungen 4 bis 5 Jahre lang obligatorisch [5, 19].

1.1.1.3. Polyarthritis

Wie in Tabelle 1 beschrieben, existieren nach ILAR-Klassifikation zwei Formen der Polyarthritis, die sich nach Positivität oder Negativität des RF unterscheiden lassen. Beide Unterformen treten vermehrt bei Mädchen auf. Die seronegative Polyarthritis bildet einen Häufigkeitsgipfel zwischen 2 und 4 Jahren sowie zwischen 6 und 12 Jahren, während die seropositive Polyarthritis eher in der späteren Adoleszenz zu beobachten und in der Symptomatik mit der adulten rheumatoiden Arthritis (RA) vergleichbar ist [12].

Die seronegative Polyarthritis lässt sich weiter in 3 Subgruppen differenzieren: die erste ähnelt der *extended* Oligoarthritis mit ebenfalls erhöhtem Uveitis-Risiko,

Beginn im Kleinkindalter und ANA-Positivität. Dies führt zu der Annahme, dass es sich um dieselbe Krankheitsentität mit lediglich schnellerer Ausbreitung der Arthritis handelt [20, 21].

Die zweite Subgruppe der seronegativen Polyarthritiden kann mit der RF-negativen RA im Erwachsenenalter verglichen werden und charakterisiert sich durch eine symmetrische Arthritis der kleinen und großen Gelenke, Beginn im Schulalter und eine fehlende ANA-Expression [1]. Die Prognose in dieser Subgruppe kann oftmals stark variieren [12].

Die dritte Untergruppe weist eine schlechte Prognose mit schlechtem Therapieansprechen und häufigen Folgeerkrankungen auf [12]. Besonders bei Beteiligung des Hüftgelenks ist mit der Notwendigkeit einer chirurgischen Intervention und erhöhter Morbidität zu rechnen [5, 22].

Zu den Prädiktoren einer schweren Gelenkzerstörung zählen unter anderem ein positiver Nachweis des RFs und des Anti-CCP-Autoantikörpers (cyclisches citrulliniertes Peptid), der nur bei der seropositiven Polyarthritiden zu beobachten ist. Im Kindesalter sind besonders die Effekte zu berücksichtigen, die eine derartige Destruktion auf das heranwachsende Skelett hat [1]. Eine generelle Wachstumsretardierung oder ein beschleunigtes Längenwachstum der betroffenen Extremitäten können hieraus resultieren.

1.1.1.4. Juvenile Psoriasis-Arthritis

Die juvenile Psoriasis-Arthritis (ILAR-Kriterien siehe Tabelle 1) beschreibt das gleichzeitige Auftreten von Arthritis und Psoriasis und ist keine leicht zu stellende Diagnose, da die Arthritis in der Regel zeitlich vor den Hautmanifestationen auftritt. Es werden niedrige bis moderate ANA-Titer bei einem Großteil der Patienten beobachtet, auch HLA B27 tritt bei etwa 30 % auf [23]. Die Gelenkbeteiligung umfasst entweder eine symmetrische Arthritis der kleinen Gelenke oder eine asymmetrische Form, die in den großen Gelenken der unteren Extremitäten zu finden ist und eine ähnliche Symptomatik aufweist wie eine Enthesitis-assoziierte

Arthritis. Auch der Progress in eine seropositive Polyarthritis-ähnliche Form ist möglich [5].

Diese doch sehr heterogene Verteilung der Gelenkbeteiligung hat die Forderung nach einer Unterteilung der Psoriasis-Arthritis in 2 Subtypen laut werden lassen: einem ersten Subtyp mit ähnlichen Charakteristika wie die frühbeginnende, ANA-positive JIA, die in der klinischen Manifestation und einer weiblichen Präferenz Züge der Oligoarthritis trägt, und einem zweiten Subtyp mit einer Spondyloarthropathie-ähnlichen Symptomatik, späterem Krankheitsbeginn und männlicher Prädominanz [23]. Martini et al. forderten aus diesem Grund eine modifizierte Arthritis-Klassifikation nach ANA-Positivität und Krankheitsbeginn anstelle der gängigen Einteilung nach Anzahl der betroffenen Gelenke, um eine homogenere JIA-Einteilung erreichen zu können [21, 24].

1.1.1.5. Enthesitis-assoziierte Arthritis

Die Enthesitis-assoziierte Arthritis wurde in den letzten 25 Jahren in der pädiatrischen Rheumatologie häufig kontrovers diskutiert, da sie sowohl Merkmale der JIA als auch der juvenilen Spondyloarthritis trägt. Typischerweise sind über 6 Jahre alte Jungen von dieser Krankheit betroffen, RF und ANA-Antikörper sind negativ und HLA B27 in 65-80 % der Fälle positiv. Bei 10-20 % der Patienten ist eine akute, symptomatische Uveitis zu beobachten; insbesondere HLA B27-positive Patienten sind hierfür prädestiniert [25].

Im Gegensatz zur chronischen Uveitis der Oligoarthritis, die schleichend verläuft, einen zumeist asymptomatischen Verlauf hat und zu einem vollständigen Visusverlust führen kann, ist bei der akuten Uveitis eine ein- oder beidseitige, schmerzhafte Iritis mit Photophobie und Hyperämie der Skleren oder Konjunktiven zu erwarten [25]. Komplikationen, insbesondere bei verschleppter Diagnosestellung, sind Keratopathie, Katarrhakt, Glaukom oder Visusverlust.

Der Begriff Enthesopathie beschreibt eine Inflammation des Sehnenansatzes am Knochen und äußert sich durch eine schmerzhaft empfindliche betroffene Sehne. Die am häufigsten betroffene Sehne ist die Achillessehne, gefolgt von der Patellarinsertion der Quadrizepssehne sowie der calcanealen und metatarsalen Insertion der Plantarfaszie [26]. Die Inflammation kann sich aber auch in Form von Schmerzempfindlichkeit im Iliosakralgelenk äußern.

Zumeist ist neben der Enthesopathie eine axiale oder asymmetrische Arthritis der großen Gelenke der unteren Extremitäten zu finden [27]. Im Gegensatz zur Oligoarthritis kann hierbei auch das Hüftgelenk oder das Iliosakralgelenk betroffen sein, was bei der Diagnosestellung ein hilfreiches differenzialdiagnostisches Merkmal sein kann. Die Klassifikationskriterien nach ILAR sind in Tabelle 1 zu finden.

An und für sich gesehen ist die Enthesitis-assoziierte Arthritis eine gut behandelbare Erkrankung mit zumeist kompletter oder partieller Remission; bei inadäquater Behandlung ist jedoch der Progress in eine ankylosierende Spondylitis möglich [28]. Demzufolge ist eine möglichst frühzeitige Diagnose und Behandlung ein sehr relevantes Thema der pädiatrischen Rheumatologie [5].

1.1.2. Ätiopathogenese

Die genaue Ätiopathogenese der JIA ist ein viel diskutiertes Thema der pädiatrischen Rheumatologie und bleibt weiterhin unklar. Es wird jedoch, wie bei den meisten Autoimmunerkrankungen, eine multifaktorielle Genese angenommen. Einige dieser Erklärungsmodelle werden in den folgenden Unterkapiteln diskutiert.

1.1.2.1. Genetische Suszeptibilität

Bei der Untersuchung des Krankheitsphänotyps von monozygoten Zwillingen konnte eine Konkordanzrate und Ähnlichkeit von 20-40 % eruiert werden, was eine starke genetische Komponente der Krankheit vermuten lässt [1, 29]. Auch Geschwister und Cousins ersten Grades zeigten ein erhöhtes Risiko zur Entwicklung einer JIA.

In Studien konnten etliche Suszeptibilitätsgene identifiziert werden, die sich in HLA-Gene und nicht HLA-assoziierte Gene weiter unterteilen lassen [30].

So konnte bei der Untersuchung der HLA-Gene sowohl bei den Klasse I - Allelen (HLA A-s und HLA B27), als auch bei den Klasse II - Allelen (HLADRB1 und HLA DP) eine Assoziation zur JIA hergestellt werden, was die Beteiligung und den Stellenwert der T-Zellen im Rahmen der Krankheitsentstehung bestärkt [31].

Zu den nicht HLA-assoziierten Kandidatengenen zählen unter anderem PTPN22, STAT4, MIF, SLC11A6, WISP3, IL-2, IL-2RA, IL-2RB, IL-6, IL-6R sowie der Tumornekrose Faktor α (TNF α) [1, 31].

Durch genomweite Assoziationsstudien (GWAS) konnten diverse andere Gene und Immunpfade identifiziert werden [32-34]. Ein weiterer Gegenstand der Forschung sind epigenetische Veränderungen und Mutationen der *single nucleotide* Polymorphismen (SNP), sowie die Funktion von Enhancern und deren Inhibition als therapeutische Option [35].

Aufgrund von nur geringen interindividuellen Unterschieden im genetischen Profil bei Autoimmunerkrankungen wird in Zukunft eine internationale Zusammenarbeit zur Eruiierung der genetischen Einflussgrößen relevanter werden [1].

Genexpressionsprofile können helfen, spezifische Biomarker-Genmuster einer Krankheitsuntergruppe zuzuordnen, da sich diese Muster im Verlauf der Krankheit verändern [1]. So konnte beispielsweise ein charakteristisches Genexpressionsprofil von peripheren, mononukleären Zellen bei Krankheitsbeginn der JIA festgestellt werden, welches sich nur im Alter bei Diagnosestellung und nicht in der Anzahl der betroffenen Gelenke unterschied [7]. Bei der systemischen JIA zeigte sich ein vollständig unterschiedliches Genprofil mit Hochregulation von Genen des angeborenen Immunsystems und des Komplementsystems sowie von hämatopoetischen Genen [1, 36]. Die gewonnenen Erkenntnisse könnten eine revidierte JIA-Klassifikation erforderlich machen, die das genetische Profil einschließt.

1.1.2.2. Exogene Auslöser (Trigger)

In einem gesunden Immunsystem existiert eine Balance zwischen effektorischen und regulatorischen Mechanismen, die sowohl vor der Invasion von Pathogenen schützen als auch den Erhalt der Selbsttoleranz bewirken [1]. Dies erfordert eine enge Zusammenarbeit des angeborenen und des adaptiven Immunsystems.

Ein genetisch suszeptibles Individuum kann auf einen bislang noch nicht sicher identifizierten externen Stimulus eine überschießende Immunantwort bilden, die bis hin zu einem Selbstantigen führt [8, 37]. Diese Reaktion verursacht eine ständige Aktivierung des angeborenen und des adaptiven Immunsystems und kann infolgedessen zu Gewebeschäden führen [1].

Infektionen oder Impfungen, aber auch Stress und Trauma, wurden als mögliche Trigger diskutiert, jedoch konnte dies in Studien bisher nicht sicher belegt werden [37, 38]. Bei Polyarthritits konnte nach Meningokokken C - Impfung eine verstärkte

pro-inflammatorische Immunantwort beobachtet werden, was das Risiko einer aggravierten Inflammation in sich tragen könnte [39].

Im Bereich der exogenen Triggerfaktoren besteht weiterhin großer Forschungsbedarf in Form von prospektiven Studien, die genetische Suszeptibilität und immunologische Einflussgrößen einschließen, um weitere Erkenntnisse in der Ätiopathogenese gewinnen zu können.

1.1.2.2.1. Darmmodell

Die Darmflora rückt immer mehr in den Fokus von Studien als relevanter exogener Faktor von Autoimmunerkrankungen, wie beispielsweise von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen, Typ I Diabetes und RA. In der Stuhluntersuchung von Patienten mit JIA wurde eine Darmflora festgestellt, die sich von gesunden Individuen unterschied [40]. So konnte beispielsweise eine erhöhte bakterielle Urease bei Patienten mit JIA festgestellt werden, die als Ursache der veränderten anaeroben Flora gesehen werden könnte [41].

Die Hypothese, dass das veränderte pro-arthritogene Mikrobiom die Entwicklung des Immunsystems, die Barrierefunktion der intestinalen Mukosa und die T-Zell-differenzierung beeinflusst, gewinnt immer mehr an Anerkennung [8]. Diese Veränderungen könnten eine Dysregulation des Immunsystems bewirken und damit eine Rolle bei der Entwicklung der JIA spielen [42]. Ein Erklärungsmodell ist in Abb.1 dargestellt.

Therapieoptionen der Zukunft könnten eine mikrobielle Stuhltransplantation oder die Verwendung von Prä- und Probiotika zur Therapie der Dysbiose sein.

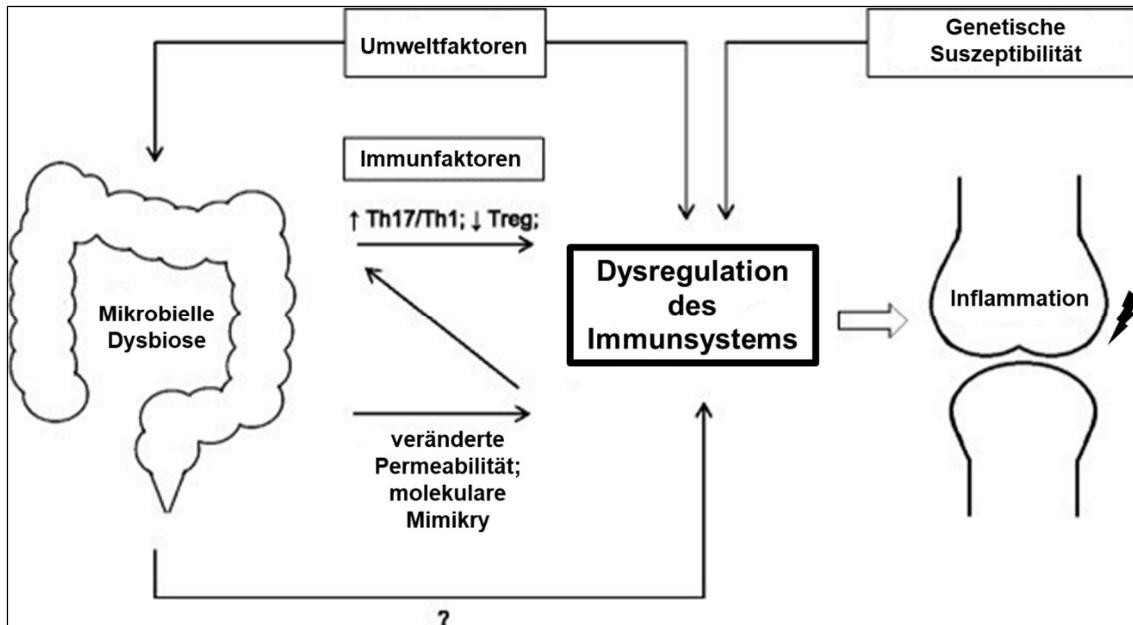


Abb.1: Darstellung der potenziellen Rolle des Mikrobioms in der Pathogenese der JIA (entnommen aus [42], mit Genehmigung von Springer Nature²). Mikrobielle Dysbiose kann zu einer Dysregulation des Immunsystems führen, was die Integrität der Mukosa herabsetzt und durch molekulare Mimikry eine Aktivierung des Immunsystems bewirkt. Durch die veränderte Mukosa-Permeabilität kann auch die Richtung der T-Zell-Differenzierung hin zu einem effektorischen TH1-/TH17-Profil beeinflusst werden. Zusammen mit genetischer Suszeptibilität und exogenen Triggerfaktoren könnten hieraus Autoimmunität und Gelenkentzündung resultieren.

1.1.2.3. Dysbalance zwischen Selbsttoleranz und Inflammation auf zellulärer Ebene

T-Zellen spielen eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der JIA. Insbesondere Helfer-T-Zellen vom Typ 1 bzw. Typ 17 (TH1- und TH17-Zellen) und einige Unterformen der regulatorischen T-Zellen (Tregs) tragen zur Pathophysiologie und zum Verlauf der JIA bei [35]. Die B- oder T-Zell-vermittelte Immunantwort des adaptiven Immunsystems triggert eine autoreaktive Immunantwort, die infolgedessen zur Konversion in Richtung Selbstantigen führt. In der Untersuchung von Synovialflüssigkeit betroffener Patienten konnte eine Ansammlung von aktivierten autoreaktiven Memory-T-Zellen um dendritische Zellen herum festgestellt werden [43].

² Copyright Genehmigung durch Springer Nature Open Research, New York, USA. Graphik entnommen und übersetzt ins Deutsche aus [42].

Nach dem initialen autoreaktiven Ereignis wird beinahe das gesamte Immunsystem aktiviert. Die Autoimmunerkrankung manifestiert sich mit einer deutlichen zeitlichen Latenz zwischen Kontakt mit dem Triggerantigen und Symptombeginn, wobei zu diesem Zeitpunkt bereits angeborenes wie adaptives Immunsystem aktiviert sind [1]. Erschwerend kommt hinzu, dass sich die immunologischen Profile und Mechanismen sowohl innerhalb der heterogenen Subgruppen als auch bei Remission der Erkrankung unterscheiden, so dass kaum ein einheitliches immunologisches Erklärungsmodell möglich ist.

Bei Krankheitsremission konnte eine erhöhte Anzahl an natürlichen und Antigen-induzierten Tregs sowie eine Co-Expression von CD27 und CD39 (*cluster of differentiation*) in der synovialen Flüssigkeit und im peripheren Blut festgestellt werden [44, 45]. Als bestdefinierte Treg-Induktoren sind hierbei die Hitzeschockproteine wie bspw. *heat shock protein* (hsp)60 und dna(j) zu nennen [46, 47]. Zudem konnte in etlichen Experimenten bewiesen werden, dass T-Zellen, die auf Hitzeschockproteine reagibel waren, essenziell für die Regulation der Selbsttoleranz und zur Unterdrückung von potenziell pathogenen Immunantworten sind [46, 48].

Es stellt sich die Frage, ob die Qualität oder die Quantität der regulatorischen Zellen bei der autoinflammatorischen Entzündung nicht suffizient genug ist [49]. Alternativ könnte dafür eine Resistenz der effektorischen T-Zellen gegen die regulatorischen Gegenmaßnahmen verantwortlich sein, bzw. die effektorische Immunantwort die regulatorische überwiegen [50].

In einigen Studien wurde die Weiterdifferenzierung von naiven T-Zellen zu effektorischen Zellunterformen der TH1-Zellen, TH17-Zellen oder intermediären TH1/TH17-Zellen am Ort der Inflammation aufgezeigt [51]. Zudem konnte unter dem Einfluss von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 β , IL-6 und TNF α eine T-Zell-Plastizität (siehe 1.2.2.1.4.) nachgewiesen werden, da T-Zell-Subtypen Charakteristika anderer Untergruppen übernahmen, wie z.B. die Entwicklung von regulatorischen T-Zellen zu TH17-Effektor-T-Zellen oder Effektor-(e)Tregs, die IL-17 produzieren konnten [50].

1.1.3. Disease Activity Scores

Neben laborchemischen Verlaufsparemtern dienen etliche international-eta-blierte *Disease Activity Scores*, standardisierte, evidenzbasierte Punkteinteilun-gen zur Einschätzung der Krankheitsaktivität und Verlaufsbeurteilung der JIA, die bspw. Eltern-, Patienten- oder Arzt-Visual-Analogskalen (VAS) oder die Anzahl der derzeit befallenen Gelenke beinhalten. Der momentan am häufigsten be-nutzte JADAS-Score (*juvenile arthritis disease activity score*) berücksichtigt ne-ben den obengenannten Kriterien die BSG als Inflammationsparameter (siehe Tabelle 2) [52]. Insbesondere zur Therapieverlaufsbeurteilung ist dieser Score sehr gut geeignet [5].

In dieser Arbeit wird die Aktivität über die Anzahl der betroffenen Gelenke defi-niert. Trat die Entzündung in mehr als einem Gelenk auf, wurde die Erkrankung als aktiv bezeichnet.

Tabelle 2: JADAS-Score mit Definitionskriterien.

Pädiatrischer Score	Kriterien
JADAS	1. Generelle Erkrankungseinschätzung durch den Arzt mittels VAS (<i>physician VAS</i>), 10 cm Analogskala
	2. Generelle Erkrankungseinschätzung durch den Patienten bzw. ein Elternteil mittels VAS (<i>patient/parent VAS</i>)
	3. Anzahl der betroffenen Gelenke
	4. BSG [0-10 Skala durch Formel: $(BSG - 20) \div 10$] BSG-Wert <20 mm/h = 0, BSG-Wert >120 mm/h = 10

Die Tabelle 2 listet die 4 Definitionskriterien des JADAS-Scores auf. VAS beschreibt die visuelle Analogskala, die anhand der Einschätzung des Arztes, des Patienten und der Eltern ausgefüllt wird. Die Anzahl der betroffenen Gelenke wird bei der ambulanten Vorstellung durch eine aus-führliche Erfassung des Gelenkstatus durch den Arzt erhoben. Die Blutsenkungsgeschwindigkeit nimmt durch die genannte Formel Einfluss auf den JADAS-Score.

1.1.4. Behandlung der JIA

Die drei Hauptbestandteile der JIA-Therapie sind die nicht-steroidalen Antirheumatika (NSAR), die Basistherapeutika (*Disease modifying antirheumatic drugs*, DMARD), deren wichtigste Säule noch immer Methotrexat (MTX) darstellt, und die Biologika, die oft auch als bDMARDs bezeichnet werden. Begleitend werden Glukokortikoide zur Überbrückung des antirheumatischen Wirkungseintritts der DMARDs eingesetzt.

Patienten, die auf die Erstlinien (*first line*)-Therapie mit MTX nicht (ausreichend) reagieren, erhalten - zumeist nach monatelangem Nichtansprechen - ein Biologikum (*second line*-Therapie) [35]. Hierbei werden hauptsächlich TNF α -Inhibitoren eingesetzt.

Nur bei bekannten Risikofaktoren oder einer besonders großen Krankheitschwere bei Diagnosestellung wird direkt auf Biologika (*second / third line*) zurückgegriffen. Auf diese Weise wird abgesichert, dass nur diejenigen Patienten diese intensive und teure Therapie bekommen, die von einer niedrigeren Stufe der Therapie nicht ausreichend profitieren würden. Der Nachteil dieser Herangehensweise ist, dass oft die Gelegenheit verstreicht, die biologischen Eigenschaften der Krankheit zu modifizieren, und stattdessen nur noch deren Manifestationen supprimiert werden können [35].

In Tabelle 3 sind die wichtigsten Medikamente aus den verschiedenen Stufen der antirheumatischen Therapie aufgeführt. Die Therapie sollte alle 3 Monate re-evaluiert werden, bis eine Remission, inaktive oder nur noch minimal aktive Erkrankung erreicht werden kann [53]. Wichtige Ziele sind daneben die Schmerzkontrolle und die Erhaltung der Muskelkraft und des Bewegungsumfangs [5].

Als *ultima ratio* kann bei sehr schweren, therapie-refraktären JIA-Fällen eine autologe Stammzelltransplantation nach Depletion der auto-aggressiven Effektor- und Memory-T-Zellen eine Option sein, die in einer Rekonstitution des Immunsystems münden kann [54]. Mesenchymale Stromazellen (MSC) könnten durch ihre immuno-modulatorischen und anti-inflammatorischen Fähigkeiten eine Therapieoption der Zukunft darstellen [55].

Tabelle 3: Auflistung der wichtigsten antirheumatischen Medikamente, modifiziert nach [5] und [56].

Gruppe	Medikament	Wirkmechanismus	Dosis
NSAR	Celecoxib	COX2-Inhibitor (Cyclooxygenase)	6 mg/kgKG/d
	Diclofenac	COX-Inhibitor	2-3 mg/kgKG/d
	Ibuprofen	COX1/2-Inhibitor	20-40 mg/kgKG/d
	Indometacin	COX1/2-Inhibitor	1-3 mg/kgKG/d
	Meloxicam	COX2-Inhibitor	0,125-0,5 mg/kgKG/d
	Naproxen	COX1/2-Inhibitor	10-15 mg/kgKG/d
Glukokortikoide	Predniso(lo)n, Methylprednisolon	Glukokortikoid-Rezeptor (NR3C1)	0,1-0,2 mg/kgKG/d (max. 5 mg/kg/d)
	Orale Therapie	Glukokortikoid-Rezeptor (NR3C1)	Niedrigdosis: < 0,2 Hochdosis: 1-2 Prednisolon-Äquivalent
	Stoßtherapie	Glukokortikoid-Rezeptor (NR3C1)	> (5)-10 Prednisolon-Äquivalent intravenös für 1-3 Tage
	Triamcinolonhexacetonid	Glukokortikoid-Rezeptor (NR3C1)	Intraartikulär 0,5-1 mg/kg/d
DMARDs	Azathioprin	Purinanalogon	1-3 mg/kgKG/Tag
	Cyclosporin-A	Calcineurin-Inhibitor	3-5 mg/kgKG/Tag
	(Hydroxy)chloroquin	4-Aminochinolin-Derivat	4 mg/kgKG/Tag
	Cyclosporin-A	Calcineurin-Inhibitor	3-5 mg/kgKG/Tag
	Leflunomid	Dihydroorotat-Dehydrogenase-Inhibitor	< 40 kg: 10 mg, > 40 kg: 20 mg pro Tag
	Methotrexat	Folsäure-Antagonist	10-20 mg/m ² KOF/Woche
	Sulfasalazin	Dihydropteroat-Synthase-Inhibitor	30-50 mg/kgKG/d
Biologika	Abatacept	T-Zell-Co-Stimulations-antagonist, lösliches Fusionsprotein	10 mg/kgKG alle 4 Wochen
	Adalimumab	TNF α -Suppression, monoklonaler TNF α -Antikörper	<30 kg: 20 mg, >30 kg: 40 mg alle 2 Wochen
	Anakinra	IL-1 Rezeptor-antagonist	2-10 mg/kgKG/d
	Canakinumab	IL-1 Inhibitor, monoklonaler IL1 β -Antikörper	<40 kg: 4-6 mg/kgKG/Dosis, >40 kg: 150-300 mg alle 4-8 Wochen
	Etanercept	TNF α -Suppression, Fusionsprotein, Rezeptorsuppression	0,8 mg/kgKG/Woche
	Golimumab	TNF α -Inhibitor, monoklonaler TNF α - Antikörper	50 mg alle 4 Wochen

	Infliximab	TNF α -Suppression, monoklonaler Antikörper	5-10 mg/kgKG/Monat
	Rituximab	CD20-Antigen-Suppression	375 mg/m ² KOF pro Woche für 1 Monat
	Tocilizumab	IL-6 Rezeptor-antikörper	8-12 mg/kgKG/d
	Ustekinumab	IL12-/IL23-Inhibitor	0,75 mg/kgKG, nach 4 Wochen, dann alle 12 Wochen, Zulassung nur für Psoriasis

In Tabelle 3 sind die wichtigsten antirheumatischen Medikamente aufgelistet, nach Gruppen innerhalb der antirheumatischen Therapie, Wirkmechanismus (Angriffspunkt im Körper) und Dosis pro Kilogramm Körpergewicht und Zeiteinheit.

1.1.4.1. Nicht-steroidale Antirheumatika

Bei der Anwendung der nicht-steroidalen Antirheumatika (NSAR) macht man sich zum einen deren analgetische Wirkung, zum anderen in höherer Dosierung deren antiphlogistische Wirkung zunutze. Durch Hemmung der Cyclooxygenasen (COX)-1 und -2 wird die Synthese der für die Entzündungsreaktion relevanten Prostaglandine und Thromboxane herunterreguliert. Bei leichten Arthritisformen, insbesondere bei der Oligoarthritis, kann eine Monotherapie mit einem NSAR suffizient sein. NSAR werden trotz gelegentlich auftretender abdomineller Schmerzen und Kopfschmerzen als gut verträglich angesehen [53]. Nach den aktuellen AWMF S2k-Leitlinien (Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaft) sollten NSAR bei allen JIA-Subtypen zur Symptomverbesserung als initiale oder begleitende Therapie eingesetzt werden [56]. Die wichtigsten nicht-steroidalen Antirheumatika sind in Tabelle 3 aufgelistet.

1.1.4.2. Glukokortikoide

Dieser Medikamentengruppe wird die potenteste anti-inflammatorische Wirkung zugeschrieben [5]. Die Funktionsweise der Glukokortikoide fußt auf der Nachahmung des körpereigenen Kortisols. Dadurch ist es diesen Medikamenten möglich, über dieselben intrazellulären Rezeptoren, wie bspw. NFκB (*nuclear factor κB*), die Genexpression körpereigener, anti-inflammatorischer Stoffwechselwege zu aktivieren und zu verstärken [57].

Die topische (z.B. bei Uveitis) oder die intraartikuläre Anwendung wird gerne als Co-Medikation neben anderen Antirheumatika eingesetzt [58]. Insbesondere bei schwerer, akuter systemischer JIA und dem MAS ist eine hochdosierte intravenöse Steroidtherapie zu Beginn der Behandlung essenziell, um die Prognose zu verbessern [58]. Dennoch wird auf lange Sicht eine niedrige oder mittlere Dosis angestrebt, die unterhalb der Cushing-Schwelle (für Kinder: 7,5-10 mg/d Hydrocortison) liegt. Durch die Prednisolon-Äquivalenzdosis können die verschiedenen Kortikoide hinsichtlich ihres Wirkungs- und Nebenwirkungsprofils verglichen werden.

Die Verwendung und Dosis von Glukokortikoiden wird in der antirheumatischen Therapie zur Reduktion der Nebenwirkungen auf das wachsende Skelett wie Wachstumsretardierung so gering wie möglich, aber so hoch wie nötig gehalten [59]. Die Dosis von 0,1 mg/kgKG/d sollte langfristig nicht überschritten werden, da oberhalb dieser Schwelle ein erhöhtes Risiko für das Auftreten von unerwünschten Nebenwirkungen besteht. Zur Prophylaxe einer nebenwirkungsbedingten Osteoporose wird die Supplementierung von Vitamin D3 und Calcium empfohlen [60]. In Tabelle 3 aufgeführt sind die wichtigsten Glukokortikoide mit Dosierung in der Behandlung der JIA.

1.1.4.3. DMARDs (disease-modifying antirheumatic drugs)

Der wichtigste Vertreter der DMARDs ist **MTX**, ein Folsäure-Antagonist. Eingesetzt wird es bei unzureichender Wirksamkeit von NSAR, hohem oder wiederholtem Steroidbedarf oder polyartikulärer JIA [56].

Über die Inhibition der Dihydrofolat-Reduktase ist intrazellulär weniger metabolisch-aktives Folat verfügbar, und die *de novo* Synthese von Purinen und Pyrimidinen ist herabgesetzt, die für die Zellproliferation und die Inflammation benötigt werden [61]. Die Wirkung setzt nach einer Einnahme von 6-12 Wochen ein.

Zur Reduktion der Nebenwirkungen wie Knochenmarkssuppression, Übelkeit, orale Ulzera und Haarverlust kann Folat oder Folsäure verwendet werden [53]. In Studien konnte - außer bei hohen Folat-Dosen in Kombination mit einer niedrigen MTX-Dosis - kein signifikanter Unterschied in der MTX-Effizienz und -Aktivität festgestellt werden [62]. Schwere unerwünschte Wirkungen umfassen die MTX-induzierte interstitielle Lungenkrankheit bzw. Pneumonitis, die MTX-assoziierten Leberkrankheiten wie Fibrose oder Zirrhose sowie die durch MTX hervorgerufene Niereninsuffizienz [61]. Langzeit-Kohortenstudien zeigten zudem einen Anstieg von Lymphomen und Karzinomen seit der Einführung von MTX in die antirheumatische Therapie [63, 64]. Bisher konnte in Studien jedoch kein signifikant höheres Malignitätsrisiko bei MTX-Einnahme im Vergleich zu anderen DMARDs bewiesen werden [65].

Initial wurde die Wirkung von MTX der Apoptose-Induktion von effektorischen T-Zellen zugeschrieben [66]. Aktuell geht man von einem anti-inflammatorischen Effekt durch die Freisetzung von Adenosin nach dessen Abspaltung aus ATP durch die Ectonucleotidasen CD39 und CD73 aus, aber auch durch die agonistische Bindung von MTX an die Adenosin-Rezeptoren AGORA2A und AGORA3 [35, 61]. CD39 ist ein Zellmarker der Memory-Tregs, welche bei Autoimmunität in verringerter Anzahl zu finden sind [35]. Man nimmt an, dass MTX die Anzahl und / oder die Funktion der CD39-positiven Tregs verändert. *In vitro* Experimente von CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low} Tregs konnten jedoch keine erhöhte Suppressionskapazität bei Patienten nachweisen, die MTX-sensibel waren [45].

In vitro konnte eine verstärkte Genexpression von Interleukin-4 (IL-4) und IL-10 bei gleichzeitig erniedrigter Expression von Interferon- γ (IFN γ) und IL-2 nachgewiesen werden [67]. Auch über die Inhibition der NF κ B-Aktivität mittels Adenosin und über die Suppression des JAK/STAT-Stoffwechselweges (*januskinase/ signal transducer and activator of transcriptions*) kann MTX die Produktion der proinflammatorischen Mediatoren wie IL-6, TNF α , IL-1 β und Matrixmetalloproteasen hemmen [61, 68]. Interessanterweise konnte keine herabgesetzte Effektorzell-Antwort, sondern eine erhöhte Proliferation bzw. ein konstantes Level der von Effektorzellen produzierten Zytokine beobachtet werden, was hinwiederum eine modulatorische - und nicht, wie bisher angenommen, suppressive - Funktion von MTX vermuten lässt [69].

Bei MTX-Unverträglichkeit kann Leflunomid eingesetzt werden. Studien haben Leflunomid eine gleichwertige Wirksamkeit bescheinigt [70]. Weitere Basistherapeutika aus der DMARD-Gruppe sind in Tabelle 3 aufgelistet. Besondere Vertreter sind Sulfasalazin, das v.a. bei Enthesitis-assoziiierter Arthritis und Oligoarthritis eingesetzt wird, und Hydroxychloroquin, dessen Hauptverwendung in der Oligoarthritis liegt. Alle DMARDs weisen eine Latenz von durchschnittlich 6 bis 8 Wochen bis zum Eintritt der Wirkung auf, weshalb zur Überbrückung gerne Glukokortikoide verwendet werden.

1.1.4.4. Biologika

Bei den Biologika handelt es sich um biosynthetisch hergestellte Antikörper, zu meist von Zytokinen, die auf diese Weise den immunologischen Aktivierungs- oder Signalweg unterbinden. Je nach Suffix kann die Herkunft und Produktionsweise erkannt werden [-(-z)umab für human (humanisiert); -omab für murin (Maus); -ximab für chimär aus human/murin].

Die TNF α -Blockade wurde in den 1990er Jahren nach Entdeckung der pro-inflammatorischen Wirkung von TNF α auf die Synovialzellen von Patienten mit RA entwickelt [71]. Die Wirksamkeit von TNF α -Inhibitoren wurde bei Patienten mit JIA beschrieben, sogar bei Patienten, die gegen MTX oder andere DMARDs resistent waren [35, 72]. Die Sicherheit und Effizienz der Biologika-Therapie konnte in etlichen Studien bewiesen werden [73, 74]. Zugute kommt den JIA-Patienten die Prämisse der *Food and Drug Administration* (FDA) und der *European Medicines Agency* (EMA), die besagt, dass Pharmaunternehmen in der Entwicklung neuer Medikamente gegen Krankheiten, die in ähnlicher Ausprägung im Kindesalter zu finden sind, immer auch Zulassungsstudien zur Sicherheit und Effektivität im pädiatrischen Bereich durchführen müssen [16]. So konnten schrittweise neu-entwickelte Biologika aus der Therapie der RA für die JIA zugelassen werden.

Bei Polyarthrititis konnte der Nutzen einer frühen aggressiven Therapie mit Etanercept, MTX und Prednisolon gezeigt werden, mit einer rascheren Remissionsinduktion und längerem symptomfreien Intervall [56, 75, 76]. Da T-Zellen auch nach Erlöschen der Inflammation am Ort der Entzündung verbleiben, können diese beim nächsten Krankheitsschub durch die verbleibenden Gedächtniszellen (Memory-T-Zellen) wieder aktiviert werden. Aus diesem Grund empfiehlt sich eine frühe aggressive Therapie, um die Anlagerung dieser Gedächtnis- und Effektor-Zellen im Gewebe zu verhindern. Dem Zugewinn an Lebensqualität und der frühen Krankheitsbeherrschung und -modifikation stehen hierbei die hohen Kosten der Biologika gegenüber. Die frühe aggressive Therapie wird daher aus ökonomischer Sicht überwiegend für die schweren JIA-Fälle empfohlen [77].

Da es sich bei den Biologika um körperähnliche Proteine handelt, kann der Körper gegen die Medikamente gerichtete Anti-Drug-Antikörper (ADA) bilden. Infolgedessen kann ein Nachlassen der Wirkung eintreten, was eine Umstellung der Therapie erforderlich macht [78]. Eine Co-Medikation mit MTX scheint protektiv gegen die ADA-Bildung zu sein [79]. Die derzeit hauptsächlich verwendeten Biologika sind in Tabelle 3 zu finden. Wie auch bei den konventionellen DMARDs tritt die Wirkung der Biologika mit einer zeitlichen Latenz ein.

1.1.4.4.1. TNF α -Inhibitoren

Diese Gruppe von Biologika definiert sich aus der Blockade des Tumornekrosefaktors α und des TNF α -Rezeptors, der auf fast allen Körperzellen zu finden ist. Dadurch wird die TNF α -abhängige pro-inflammatorische Immunkaskade inhibiert und folglich weniger Akutphase-Proteine freigesetzt. Die medikamentöse Wirkung kann über die Modulation von Anzahl und Untergruppen der Tregs bzw. deren verstärkte Funktion erklärt werden [80]. Zudem wird die Aktivierung des pro-inflammatorisch-wirksamen NF κ B's in einer sehr frühen Phase unterbunden [81].

Bei allen JIA-Unterformen konnte ein erhöhter Serumspiegel des löslichen TNF α -Rezeptors und von TNF α selbst eruiert werden, der mit der Krankheitsaktivität korrelierte [82]. Im Synovium und in der Synovialflüssigkeit von JIA-Patienten konnten erhöhte TNF α - sowie erhöhte Lymphotoxin- α -Spiegel detektiert werden. Über TNF α wird die Knochenresorption stimuliert und die Osteogenese und die Synthese der Proteoglykane des Knorpels inhibiert [83].

Den TNF α -Inhibitoren wird ein hohes Sicherheitsprofil und eine große Effektivität zugeschrieben [73, 84]. Das Lymphom- und Karzinomrisiko scheint im Kindesalter bei TNF α -Inhibitor-Einnahme leicht erhöht zu sein [85]. Da zumeist eine Co-Medikation mit MTX erfolgt, ist eine Aussage darüber, ob das karzinogene Risiko dem TNF α -Inhibitor zuzuschreiben ist, nicht möglich. In einer schwedischen Kohortenstudie von 1969 bis 2007 konnte ein deutlicher Anstieg des Malignitäts- und lymphoproliferativen Risikos ab 1987 gesehen werden, was am ehesten mit

der antirheumatischen Therapie-Einführung von MTX (1986) in Verbindung gebracht werden könnte [63]. Nachfolgende Studien vermuten, dass JIA selbst das Malignitätsrisiko darstellt und die TNF α -Inhibitoren nicht zur Risikoerhöhung beitragen [2, 86].

Zur besseren Pharmakovigilanz der unerwünschten Effekte von Biologika wurden Register im Rahmen der PRINTO-, der PRCSG-, der CARRA- oder der BIKER-Studie geformt [87-89]. Es konnten selten gehäufte Infekte der oberen Luftwege beobachtet werden. Extrem selten trat eine schwere Infektion mit Hospitalisierungspflicht und intravenöser Antibiotikatherapie auf [90].

Da viele der TNF α -Inhibitoren subkutan oder intravenös appliziert werden, sind allergische oder lokale Reaktionen nicht selten zu beobachten. Vor Beginn einer Biologika-Therapie sollte insbesondere im asiatischen Raum eine latente Tuberkulose ausgeschlossen werden [91]. Im Rahmen einer TNF α -Inhibitor-Therapie können auch andere Autoimmunerkrankungen auftreten oder demaskiert werden; auch neuropsychiatrische Krankheiten wie bspw. demyelinisierende Krankheiten wurden beschrieben [92]. In den nachfolgenden Absätzen wird auf die wichtigsten TNF α -Inhibitoren gesondert eingegangen. Die Dosierungen sind in Tabelle 3 zu finden.

Etanercept ist ein chimär-hergestelltes Fusionsprotein, das an das lösliche TNF α bindet und den TNF α -Rezeptor-medierten Signalweg herabsetzt. Für Kinder mit polyarthritischer JIA gilt Etanercept als sichere und effektivste Therapieoption mit anhaltender Verbesserung der Symptomatik [53].

Adalimumab ist ein vollständig humanisierter monoklonaler TNF α -Antikörper. Der Anwendungsbereich liegt in der Polyarthrititis und in schweren JIA-Verläufen. Auch für Uveitis ist Adalimumab zugelassen. Die Kombinationstherapie mit MTX steigert die Therapieaktivität [5]. Adalimumab gilt als effiziente und sichere Erst- und Zweitlinien-Therapie der JIA [5, 8].

Golimumab ist ein vollständig humanisierter monoklonaler TNF α -Antikörper, der sowohl an das lösliche, als auch das membranständige TNF α bindet [84]. In ers-

ten Studienergebnissen konnte ein insgesamt gutes Therapieansprechen bei Polyarthritiden in der Kombinationstherapie mit MTX gezeigt werden [93]. Neben JIA hat Golimumab auch eine Zulassung für Psoriasis-Arthritis und Spondyloarthritis, RA und Colitis ulcerosa [84]. Jedoch fehlen für diese Substanz noch Studienergebnisse über die Langzeiterfahrung.

Infliximab ist ebenfalls ein chimär-hergestellter monoklonaler Antikörper, der mit hoher Affinität sowohl an das lösliche, als auch an das membrangebundene TNF α bindet. Besonders gut wirksam gilt Infliximab bei Spondyloarthropathien, chronisch-entzündlicher Darmerkrankung, Psoriasis-Arthritis und Uveitis [5], insbesondere in Kombinationstherapie mit MTX [94]. Dennoch ist offiziell Infliximab in der JIA-Therapie aufgrund von unzureichenden Studienergebnissen nicht zugelassen, es wird aber off-label als Reservemedikament in schweren JIA-Fällen verwendet [84].

Certolizumab Pegol, ein pegyliertes Fab-Fragment eines monoklonalen TNF α -Antikörpers, ist bisher nicht für JIA zugelassen. Man verspricht sich aufgrund der Struktur des Antikörpers ein verbessertes Nebenwirkungsprofil und eine geringere ADA-Bildung [84]. Die Wirksamkeit in der JIA wird derzeit in ersten Studien geprüft, die Certolizumab eine klinisch-relevante Besserung der JIA mit einem gutem Sicherheitsprofil bescheinigen [95].

1.1.4.4.2. IL-1-/IL-6-Inhibitoren

Neben einer Überproduktion des pro-inflammatorischen Zytokins IL-6 wurde bei der systemischen JIA eine einzigartige IL-1-Signatur beobachtet, was zu einer erfolgreichen Entwicklung von spezifischen Inhibitoren geführt hat [96, 97].

Innerhalb der systemischen JIA existiert eine Heterogenität bezüglich der Therapie-Antwort auf die zielgerichteten Biologika. Ein Teil der Patienten spricht auf IL-1-Inhibitoren an, eine zweite Subgruppe auf IL-6-Inhibitoren und eine dritte weder auf die IL-1- noch auf die IL-6-Blockade [35].

Anakinra ist ein rekombinanter humaner IL-1 Rezeptorantagonist. In multizentrischen Studien konnte die Wirksamkeit und Medikamentensicherheit für die systemische JIA nachgewiesen werden. Es darf bereits vor dem Einsatz von Glukokortikoiden eingesetzt werden [84, 98]. Die Behandlung kann durch starke Lokalreaktionen oder neutralisierende Antikörper eingeschränkt sein [84].

Canakinumab ist ein vollständig humanisierter IL-1 β -Antikörper und wird ebenfalls in der Therapie der systemischen JIA eingesetzt [99]. Canakinumab findet auch bei anderen autoinflammatorischen Erkrankungen Verwendung. Unter Therapie sollte auf das Auftreten eines MAS geachtet werden [84]. Aufgrund der längeren Halbwertszeit und der seltener auftretenden Lokalreaktionen an der Injektionsstelle wird Canakinumab oft als Erstlinien-Therapie bevorzugt [5]. Auch Canakinumab darf laut Studienlage vor dem Einsatz von Glukokortikoiden verwendet werden [100].

Tocilizumab ist ein rekombinanter humanisierter, monoklonaler IL-6 Rezeptor-Antikörper. Es kann ebenfalls in der Behandlung der Therapie-refraktären systemischen JIA bei Kindern über 2 Jahren eingesetzt und mit MTX kombiniert werden [101]. Im Rahmen von Studien, wie der CARRA-Studie, konnte die Effizienz des Medikaments nachgewiesen werden [102]. Auch bei der JIA-Polyarthritits kann Tocilizumab erfolgversprechend sein [103].

In der Weiterentwicklung der zielgerichteten Therapie bei systemischer JIA besteht noch viel Forschungsbedarf. Mögliche Biomarker wie IL-18 oder die S100A-Proteine wurden als Angriffsziele identifiziert, um die autoinflammatorische Kaskade frühzeitig zu unterbrechen und eine mehr zielgerichtete, personalisierte Behandlungsstrategie zu erreichen [35]. Als Beispiel für einen IL-18-Inhibitor ist Tadekinig alfa, ein rekombinantes IL-18 bindendes Protein, zu nennen, dessen Sicherheit und Effektivität für die adulte Form des Morbus Still derzeit in einer klinischen open-label Studie geprüft wird [104, 105].

1.1.4.4.3. Weitere Angriffspunkte der Biologika-Therapie

Abatacept ist ein rekombinantes Fusionsprotein des CTLA4-Rezeptors (*cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4*) und bewirkt durch eine Verminderung der T-Zell-Stimulation eine herabgesetzte Aktivierung von B-Zellen und Makrophagen [5]. Hierbei wird über die Interaktion mit CD80/86 die T-Zell-Aktivierung verhindert [106]. Zugelassen ist Abatacept in Kombination mit MTX zur Behandlung der mäßigen bis schweren Polyarthrit, wenn andere DMARDs oder TNF α -Antagonisten keine ausreichende Wirksamkeit zeigen [73].

Rituximab ist ein humaner, monoklonaler CD20-Antikörper, der eine verstärkte B-Zell-Apoptose und die Abnahme von reifen CD20-positiven B-Lymphozyten bewirkt [5]. Dieser Wirkmechanismus macht das Medikament besonders effektiv bei Krankheiten, die durch B-Zellen hervorgerufen werden. In vereinzelt Studien konnte der Nutzen von Rituximab bei schwerer, therapierefraktärer systemischer JIA belegt werden [107]. Vor Therapiebeginn sollte die Vakzination gegen bekapselte Bakterien wie bspw. Pneumokokken erfolgen.

Tofacitinib ist ein selektiver JAK/STAT-Inhibitor. JAK-Inhibitoren binden an die Kinasedomäne der ATPasen, und inhibieren so die Aktivierung von STAT. Die Transkription von pro-inflammatorischen Zytokinen wird dadurch an einem frühen Punkt unterbrochen [84]. Die Anwendung von Tofacitinib in der JIA-Therapie wird derzeit in klinischen Studien geprüft [108, 109]. Bei systemischer JIA konnte eine Wirksamkeit nachgewiesen werden [101]. Auch bei Polyarthrit konnte in einer Studie der Nutzen einer Mono- oder Kombinationstherapie mit MTX gezeigt werden [110].

1.1.4.4.4. Ausblicke in der Biologika-Therapie

Einige Biologika, die bereits bei RA verwendet werden, sind noch nicht für die JIA zugelassen. Hierzu zählen Secukinumab als IL-17-Inhibitor (Zulassung ab 6 Jahren bei mittelschwerer bis schwerer Psoriasis), Ustekinumab als IL-12/23-Antikörper (ab 12 Jahren für Psoriasis bereits zugelassen) und Denosumab als RANK/RANK-Ligand-Inhibitor. Teilweise existieren, wie zu Secukinumab, Studien, um die Wirksamkeit des Medikaments bei juveniler Psoriasis-Arthritis nachzuweisen [84].

Ein weiteres wichtiges Forschungsziel sind adäquate Biomarker, die frühzeitig ein Therapieansprechen oder eine Remissionsinduktion anzeigen. So wäre es möglich, schrittweise die Biologika-Therapie zu reduzieren und dementsprechend ökonomischer zu arbeiten. Um auf die biologischen Eigenschaften der Krankheit einzuwirken, wäre gerade in der Anfangsphase die Herangehensweise „*hit early, step down*“ relevant, um das entscheidende Zeitfenster zur Verbesserung von Outcome und Prognose nutzen zu können.

Für die Transformation zur personalisierten Medizin wäre eine mehr molekularbasierte Klassifikation der JIA erforderlich. Weiterer Forschungsbedarf besteht in Hinsicht auf das Verständnis der Mechanismen zwischen Inflammation und Selbsttoleranz [35]. Solche Erkenntnisse könnten beispielsweise aus großangelegten Kohortenstudien mit neudiagnostizierter JIA gezogen werden, mit einer prospektiven Überwachung der Probanden, um neue Erkenntnisse der Genom-, Transkriptions- und Proteom-Veränderungen im Krankheitsverlauf und in Bezug auf die Entität gewinnen zu können [35].

Neue Bildgebungsmodalitäten, individuelle Risikoprofile und Behandlungsantworten sollten zu einer neuen Generation von klinischen Studien führen, die neben der Rekonstitution der immunologischen Balance auch die Minimierung der langfristigen Nebenwirkungen berücksichtigen [1].

1.1.5. Prognose

In den letzten Jahren konnte die Prognose der JIA durch die Fortschritte in der Biologika-Therapie, die frühe, aggressive Therapie und die intraartikuläre Anwendung der Glukokortikoide deutlich verbessert werden. Dennoch bieten weiterhin einige Patienten einen aggressiven, progressiven Krankheitsverlauf mit fortschreitender Gelenksdestruktion oder Zunahme der beteiligten Gelenke, was eine Einschränkung der physischen oder psychosozialen Teilhabe bedeuten kann.

Mit rheumatischen Erkrankungen häufig assoziiert sind chronische Schmerzkrankungen bzw. -störungen, die zu erheblichen Einschränkungen im Alltag und in der Lebensqualität der Patienten führen. Je nach Lokalisation der Schmerzen ist der Verlauf generalisiert oder auch nur regional (*chronic regional pain syndrome*). Bei der Entstehung der chronischen Schmerzsymptomatik geht man von einem bio-psycho-sozialen Modell aus biologischen Risikofaktoren, psychischen Coping-Mechanismen und Umweltfaktoren aus, die in Kombination eine ungünstige Fixierung auf den Schmerz bewirken können. Als Komorbiditäten können Schlafstörungen oder selbstverletzendes Verhalten auftreten.

Zur Verbesserung der körperlichen Funktionen sowie der psychischen Lebensqualität und sozialen Teilhabe ist für besonders schwer betroffene Patienten und chronische Schmerzpatienten eine multidisziplinäre Behandlungsstrategie in Schmerzkliniken und spezialisierten Fachkliniken für Kinder- und Jugendrheumatologie essenziell. In diesen erfolgt die enge Zusammenarbeit von Rheumatologen, Physiotherapeuten, Psychologen/Psychotherapeuten, Sozialtherapeuten und Ergotherapeuten [5].

Etwa die Hälfte der JIA-Fälle persistiert bis ins Erwachsenenalter [111]. Da 30-50% der jungen Erwachsenen die Therapie nicht weiterführen, ist eine sichere Transition in die Erwachsenen-Rheumatologie wichtig [112].

1.2. Prämaturre Immunoseneszenz

1.2.1. Immunoseneszenz

Als Immunoseneszenz wird die Alterung des Immunsystems im Laufe des Lebens bezeichnet, die schon bei Geburt beginnt und insbesondere während der Pubertät mit Involution des Thymus beschleunigt verläuft [113].

Umweltfaktoren können den Alterungsprozess begünstigen, indem sie durch freie Radikale, Glykosylierung sowie durch intrinsische und extrinsische Faktoren DNA-Schädigung und -Fehlfunktionen hervorrufen. Andere Theorien gehen von einer genetischen Determination aus, die nur eine bestimmte altersabhängige Anzahl an Zellteilungen erlaubt [114]. Veränderungen in der Zellzykluskontrolle und kürzer werdende Telomere können in alternden Zellen zu einer Beendigung der Replikation führen [115].

Die Seneszenz des Immunsystems manifestiert sich, wie in Abb.2 graphisch dargestellt, im Anstieg der Infektanfälligkeit mit höherer Morbidität und Mortalität [114]. Die Fähigkeit, „eigene“ von „fremden“ Antigenen zu unterscheiden, sinkt mit zunehmendem Alter. Somit werden Auto-Antikörper häufiger im Blut alternder Menschen detektiert. Die Inflexibilität, auf neue Antigene einzugehen - wie bspw. im Rahmen von Vakzinationen, Infektionen und malignen Erkrankungen - kann zusammen mit den Veränderungen in der T-Zellhomöostase so in autoimmunen Erkrankungen münden [114].

Im Rahmen der Immunoseneszenz steigt die Wahrscheinlichkeit stetig an, an einer Autoimmunerkrankung zu erkranken. Umgekehrt konnte bei Kindern, die an einer autoimmunen Erkrankung leiden, ein - im Vergleich zu gleichaltrigen, immunologisch gesunden Kindern - vorgealtertes Immunsystem belegt werden [113].

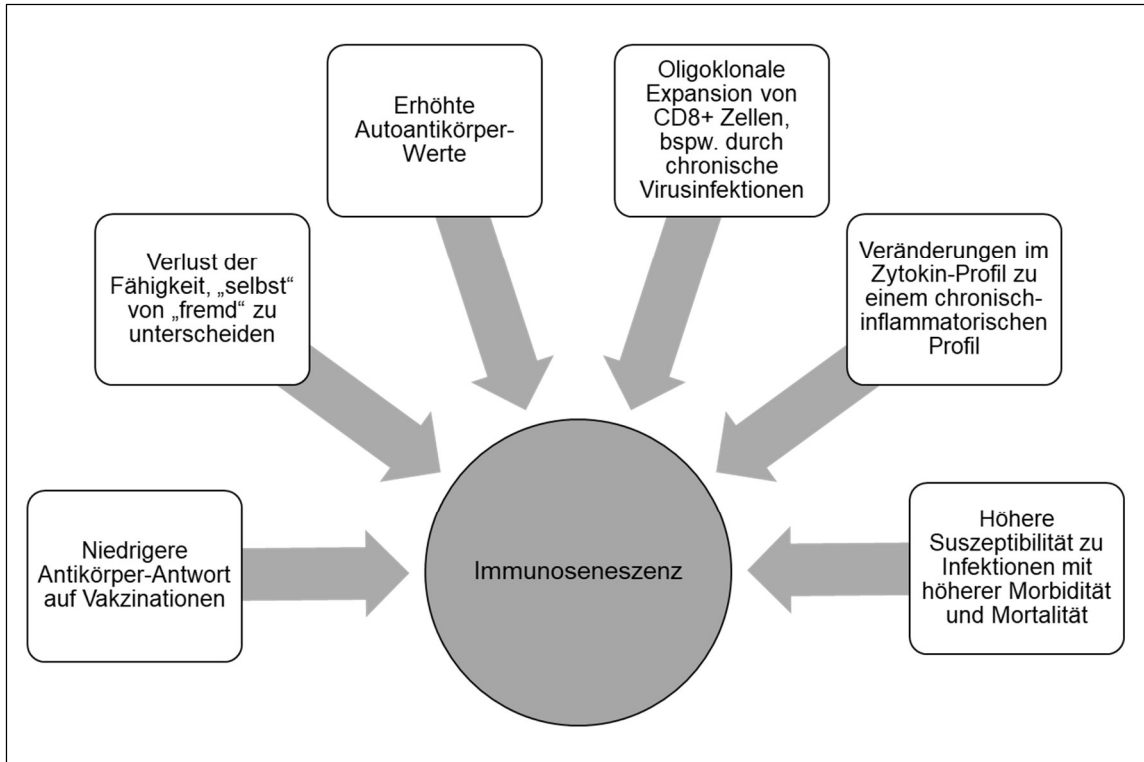


Abb.2: Klinische Manifestationen von Immunoseneszenz (eigene Abbildung). Graphische Darstellung der klinischen Manifestationen der Immunoseneszenz bei alternden Patienten: es konnten eine niedrigere Antikörper-Antwort auf Vakzinationen, der Verlust, „selbst“ von „fremd“ unterscheiden zu können, erhöhte Antikörper-Werte, die oligoklonale Expansion von CD8-positiven Zellen, Veränderungen im Zytokin-Profil zu einem chronisch-inflammatorischen Profil und eine höhere Suszeptibilität zu Infektionen mit höherer Morbidität und Mortalität festgestellt werden.

1.2.2. Immunoseneszenz auf zellulärer Ebene

In Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass Thymusatrophie teilweise auf die Unfähigkeit der Thymus-T-Zellen zurückzuführen ist, sich zu differenzieren und T-Zell-Rezeptoren (TCR) zu exprimieren, kombiniert mit einer verringerten Expression von CD4-positiven und CD8-positiven Zellen [114, 116]. Auch eine defekte Fas-Kaskade, die essenziell für die Apoptose und Stimulation in der T-Zell-Entwicklung ist, sowie extrathymische Faktoren wie Hormone spielen für den Verlust der thymischen Funktionen eine Rolle [114, 117].

Immunoseneszenz beeinflusst neben den Thymus-Zellen auch die Zellen des Knochenmarks, die maturen Lymphozyten aus dem peripheren Blut und den sekundär-lymphatischen Organen sowie die Elemente des angeborenen Immunsystems [118].

Das Immunsystem besteht aus dem adaptiven und dem angeborenen Immunsystem. Zum angeborenen Immunsystem gehören Monozyten, dendritische Zellen und natürliche Killerzellen (NK-Zellen), die unspezifisch auf pathogene Stimuli reagieren und das Komplement- bzw. Phagozytose-System aktivieren. Das adaptive Immunsystem umfasst die B- und T-Lymphozyten, die sich durch hohe Antikörper-Spezifität gegenüber Antigenen und durch Reaktivierung bei erneutem Kontakt durch die immunologische Gedächtnisfunktion definieren [119]. Das angeborene Immunsystem scheint weniger während der Immunoseneszenz zu degenerieren als das adaptive System [120].

Ein Organ, das eine wichtige Rolle bei der Alterung des Immunsystems spielt, ist der Thymus. Dieser ist in der frühen Phase des Lebens hochaktiv. Im Epithel des Thymus findet die T-Zell-Reifung und -Selektion statt. Im Rahmen der Thymusinvolution wird der Thymus schrittweise durch Fettgewebe ersetzt [121]. Dies führt zu einem Funktionsverlust mit abnehmender Anzahl an rezenten Thymus-emigranten (RTE) und naiven T-Zellen. Um die T-Zell-Anzahl im Sinne der T-Zell-Homöostase während des Lebens auf einem konstanten Niveau zu erhalten, ist die kompensatorische Proliferation peripherer T-Zellen erforderlich. Zusätzlich werden reife und spezifische T-Zellen mit oligoklonaler Expansion vermehrt beobachtet. Begünstigt wird dies durch chronische Antigen-Stimulation und Depletion der RTE im Laufe des Lebens [113, 115]. In Abb.3 wird die zelluläre Immunoseneszenz auf T-Zell-Ebene graphisch veranschaulicht.

Auch die Funktion der B-Zellen nimmt durch die Immunoseneszenz ab. In dieser Arbeit liegt der Fokus jedoch auf der Rolle der T-Lymphozyten.

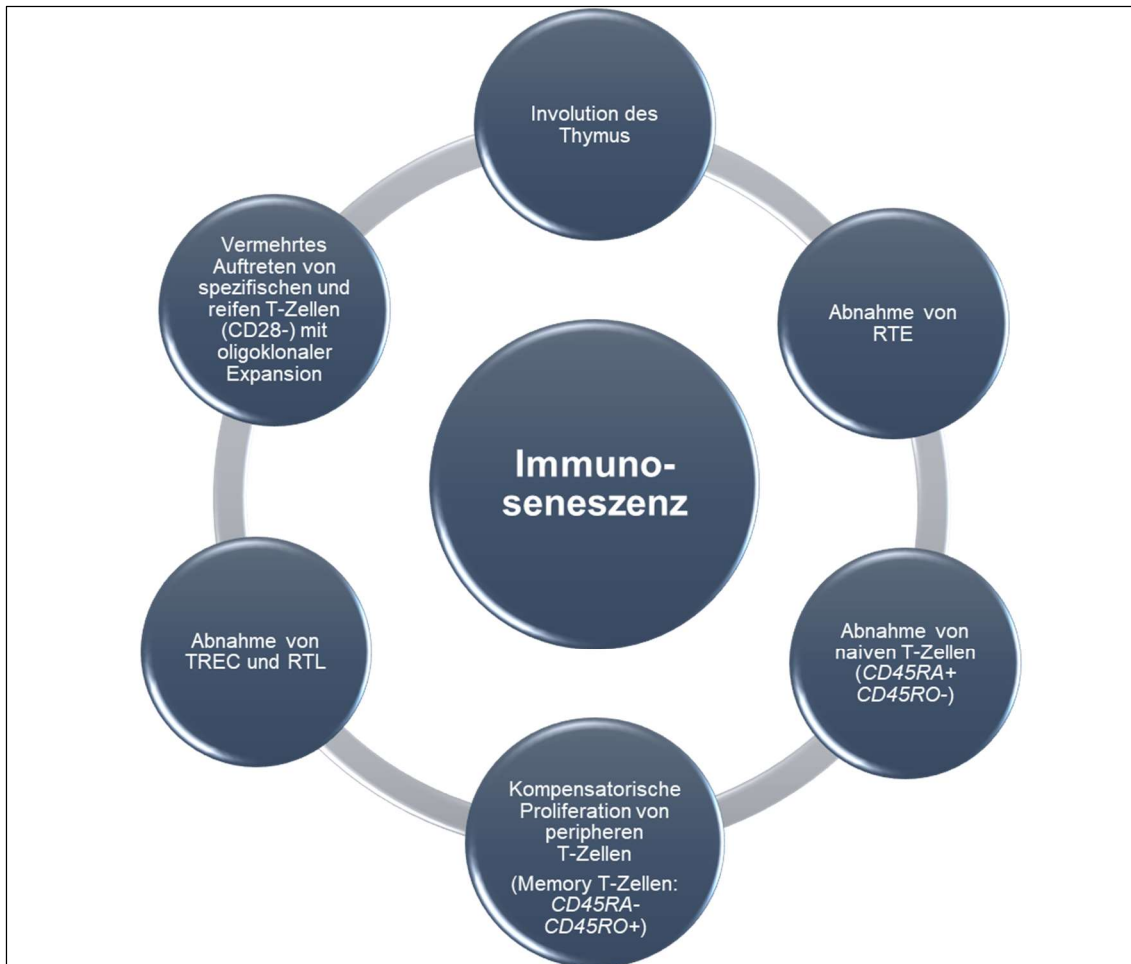


Abb.3: Zelluläre Immunoseneszenz der T-Zellen (eigene Abbildung). Im Rahmen der Immunoseneszenz kommt es zu einer Involution des Thymus. Dadurch werden weniger rezente Thymusemigranten (RTE) und in Folge auch naive T-Zellen ausgeschüttet. Kompensatorisch proliferieren periphere *CD45RA-CD45RO+* Memory-T-Zellen. *T-cell receptor excision circles* (TRECs), die in naiven, aus dem Thymus stammenden T-Zellen zu finden sind, und die relative Telomerlänge (RTL) nehmen im Laufe der Seneszenz ab, bedingt durch den geringeren Thymus-Output und die gesteigerte periphere Proliferation. Zudem kann ein vermehrtes Auftreten von spezifischen und reifen T-Zellen mit einer oligoklonalen Expansion von *CD28-* Zellen beobachtet werden.

1.2.2.1. Einfluss der Immunoseneszenz auf die T-Zellen

T-Zellen nehmen eine zentrale Funktion im adaptiven Immunsystem ein. Sie sind in der Lage, Viren und Tumorzellen zu bekämpfen und allogenes Transplantat-Gewebe zu erkennen [113]. Es wird angenommen, dass T-Zellen bei den meisten Autoimmunerkrankungen eine zumindest mediiierende Rolle haben [113].

Die größte Veränderung auf zellulärer Ebene liegt in der Expression von **CD45-Isoformen** der T-Lymphozyten. So konnte bei CD4- und CD8-positiven T-Zellen eine Dysbalance von der *CD45RA+ CD45RO-* hin zu der *CD45RA- CD45RO+* Isoform während des Alterungsprozesses nachgewiesen werden [122]. Als Ursache dieser Verschiebung wird chronische Antigen-Stimulation und die zunehmende Regredienz der naiven T-Zellen im Rahmen der Thymusinvolution verantwortlich gemacht [123].

Auch die oligoklonale Expansion von spezifischen **CD28-negativen** T-Zellen während der Seneszenz wurde bei CD4- und CD8-positiven T-Zellen demonstriert [124]. CD28 ist ein Co-Stimulationssignal für TCR-abhängige Signalwege und verstärkt die T-Zell-Proliferation sowie die IL-2- und IFN γ -Produktion. Durch den Verlust von CD28 verändert sich das funktionelle und phänotypische Profil der T-Zellen dahingehend, dass sie Killer-Immunglobulin-ähnliche Rezeptoren und eine zytolytische Kapazität hinzugewinnen sowie die Fähigkeit entwickeln, große Mengen an IFN γ und anderen pro-inflammatorischen Zytokinen zu produzieren [125]. CD28-negative Zellen haben sich schon etliche Male repliziert. Der Verlust von CD28 wird aus diesem Grund auch als ein Zeichen von „replikativem Stress“ interpretiert. Die Abnahme der Telomerlängen (siehe 1.2.2.3.) ist bei CD28-negativen Zellen deutlich ausgeprägter als bei CD28-positiven Zellen, was ebenfalls auf das häufigere Durchlaufen des Zellzyklus hinweist [126]. Für klonal expandierte CD28-negative T-Zellen konnten zudem autoreaktive Charakteristika belegt werden sowie die Fähigkeit, längere Zeit Apoptose-induzierenden Stimuli zu entgehen [127].

Rezente Thymusemigranten (RTE) nehmen durch die Seneszenz-bedingte Thymusinvolution stetig ab. CD31, ein Oberflächenmolekül auf direkt aus dem Thymus stammenden, naiven T-Zellen, und *T-cell Receptor Excision Circles* (TRECs) sind zwei bedeutende Marker, durch die sich die nachlassende Leistungsfähigkeit des Thymus anzeigen lässt.

Auf **Zytokin**-Ebene wurden degenerative Modifikationen belegt, wie die herabgesetzte IL-2-Produktion in Kombination mit einer geringeren IL-2-Rezeptor-Expression und einer schlechteren Immunantwort der T-Zellen auf IL-2 [114]. Ein

Schlüssel-Zytokin im frühen Stadium der Thymogenese ist IL-7, dessen Expression im Alterungsprozess stetig abflaut [128]. Zudem ist IL-7 ein wichtiger Proliferationsfaktor für periphere naive und Memory-T-Zellen im Rahmen der Antigen-unabhängigen Homöostase-Regulation [129]. TNF α und IL-6 sind mit der steigenden Morbidität und Mortalität in der Seneszenz assoziiert [130]. Insbesondere TNF α , das in Relation zum zunehmenden Alter ansteigt, wird eine wichtige Rolle bei der Pathogenese von Atherosklerose, Diabetes mellitus Typ 2 und Autoimmunerkrankungen zugeschrieben [130].

1.2.2.1.1. Rezente Thymusemigranten (RTE)

Der Thymus ist ein primär-lymphatisches Organ im oberen Mediastinum. Im Kortex des Thymus findet die Reifung und Selektion der T-Zellen statt, die den Thymus in Richtung Mark durchwandern und schließlich als RTE in die Blutbahn und zu den sekundär-lymphatischen Organen hin freigesetzt werden [131]. Durch die Thymusinvolution nimmt diese Rekonstitution des Immunsystems ab, und weniger RTE werden in die Peripherie ausgeschüttet.

Eine Herausforderung bei der Untersuchung von RTE ist, dass bislang kein adäquater Marker identifiziert werden konnte, der sicher zwischen direkt aus dem Thymus stammenden Zellen und peripheren naiven T-Zellen differenzieren kann. Für die **CD31**-exprimierenden *CD45RA*⁺ T-Zellen wurde die höchste Rate an TRECs belegt, so dass man diese als wahre RTE-Repräsentanten im peripheren Blut interpretieren könnte [113]. Diese Zellen nehmen graduell mit zunehmendem Alter ab [132]. Dennoch ist der Körper dazu fähig, die *CD4*⁺ *CD45RA*⁺ *CD31*⁺ Zellen teilweise durch periphere Homöostase-Mechanismen konstant zu erhalten, so dass auch CD31 möglicherweise nicht als exklusiver RTE-Marker zu sehen ist [132].

Nach Bindung des TCR verliert die Zelle ihre CD31-Expression *in vitro*, so dass TCR-Stimulation als Ursache für die postthymische homöostatische Proliferation angenommen wird [133]. CD31 ist auch als PECAM-1 (engl. *Platelet Endothelial*

Cell Adhesion Molecule-1) bekannt, das eine lymphozytäre Überaktivierung verhindert und die Aktivierungsschwelle der Antigen-Rezeptor-Signalkaskade anhebt [134].

Interleukin-7 ist eines der wichtigsten Zytokine insbesondere im Frühstadium der Thymopoese und trägt zum Erhalt des TCR-Repertoires und des peripheren T-Zell-Pools durch die homöostatische Proliferation von naiven und Memory-T-Zellen bei [129, 135]. Mit steigendem Alter sinkt das IL-7-Level, was zu einer Abnahme von Thymusgröße, Thymus-Output und Zellularität führt [128]. IL-7 gilt als einer der Faktoren, die das Erreichen von sehr hohem Lebensalter begünstigen [136]. Ob IL-7 eine Rolle bei der Rekonstitution des Immunsystems haben kann, indem es den Thymus-Output wieder steigert, bleibt kontrovers [137]. Bei alten Mäusen konnte nach IL-7-Gentherapie zwar die frühe Thymopoese wiederhergestellt werden, jedoch ließ sich die bereits abgelaufene Thymusinvolution nicht rückgängig machen [138]. Studien über die IL-7-Gentherapie bei thymektomierten Patienten gibt es bisher nicht, da diese Therapie bei Fehlen einer klinisch-apparenten Beeinträchtigung des Immunsystems als unethisch angesehen wird [137].

CD127, die α -Kette des IL-7-Rezeptors, ist insbesondere auf T-Zellen anzutreffen, die für die auto-proliferative Wirkung von IL-7 empfänglich sind, wie bspw. naive T-Zellen [139]. Die Anzahl der CD127-positiven T-Zellen fällt mit steigendem Alter ab [140]. Zusammen mit dem Proliferationsmarker Ki-67 können CD31-positive, CD127-positive Zellen zeigen, wie groß die proliferativen Fähigkeiten des Thymus und die periphere homöostatische Proliferation zum Zeitpunkt der Untersuchung sind.

TRECs sind stabile DNA-Episome, die aus dem Rearrangement der T-Zell-Rezeptoren im Thymus entstammen und in mindestens 70% der TCR $\alpha\beta$ -Zellen aufzufinden sind [113]. Sie sind ein sensitiver Marker für kürzliche Thymusemigranten in die Peripherie [114]. In naiven Thymozyten und RTE ist die Menge an TRECs am höchsten. Während der Immunoseneszenz lässt der Zustrom an neu generierten T-Zellen aus dem Thymus nach, was zu einer geringeren Anzahl an TREC enthaltenden Zellen führt.

Da TRECs während der Mitose nicht repliziert werden, nimmt die Anzahl der TRECs bei jeder Zellteilung ab [141]. Durch die periphere, homöostatische Proliferation und die weitere Maturation der naiven Zellen wird dieser Dilutionseffekt noch weiter verstärkt, da TRECs nur in den naiven Zellen anzutreffen sind [141]. Die TRECs in den CD4-positiven T-Zellen nehmen während des Alterns 50- bis 100-fach ab, während die Zahl der naiven Zellen nur mit dem Faktor 2 bis 3 abfällt [115].

Mittels eines mathematischen Modells von Ribeiro [142] konnte in einer Studie von Prelog et al. (2008) die TREC-Menge pro 10.000 Zellen berechnet werden, da TRECs direkt den Thymus-Output reflektieren und nicht durch die Dynamik zwischen TREC-positiven und -negativen Zellen beeinflusst werden [132, 143]. Um Rückschlüsse auf den aktuellen Thymusstatus ziehen zu können, sollten TRECs nur zusammen mit dem Proliferationsmarker Ki-67 oder der relativen Telomerlänge in den *CD31+ CD45RA+* Zellen betrachtet werden.

1.2.2.1.2. T-Zell-Differenzierung und Subpopulationen

T-Zellen entwickeln sich aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks, die in den Thymus migrieren und dort ihre Maturation durchlaufen. Sie werden deshalb auch als thymusabhängige (T-)Lymphozyten bezeichnet [119].

Die naiven RTE (siehe 1.2.2.1.1.) werden aus dem Thymus in die Blutbahn und zu den sekundär-lymphatischen Organen freigesetzt, von denen sie durch Chemokine wie CCL19 (*chemokine C-C ligand*) angelockt werden. Der Chemokinrezeptor CCR7 ist ein Lymphknoten-Homing-Rezeptor und als charakteristischer Marker auf naiven, Memory- und regulatorischen T-Zellen zu finden. CCR7 ist an der Organisation der Thymusarchitektur und -funktion durch die Koordination der Zellmigration innerhalb sowie in und aus dem Thymus beteiligt [144]. Es trägt zudem durch die Expression auf sogenannten „semi-maturen“ oder tolerogenen dendritischen Zellen zur Immunität und Selbsttoleranz bei [145, 146].

Im Zusammenspiel mit Adhäsionsmolekülen und Integrinen wandern die naiven T-Zellen in die parakortikale T-Zone des Lymphknotens ein [147]. Dort werden ihnen fragmentierte Antigene durch dendritische Zellen unter dem Einfluss von co-stimulatorischen Molekülen und spezifischen Zytokinen präsentiert [119]. Bei Bindung des TCR an sein spezifisches Epitop, das ihm vom MHC-Molekül der Antigen-präsentierenden Zelle (APC) angeboten wurde, wird die naive T-Zelle aktiviert und differenziert sich zu einer Effektor-T-Zelle [148].

Die Differenzierung von naiven T-Zellen zu Memory- und Effektor-T-Zellen ist einer der zentralen Punkte der zellvermittelten Immunität [139]. Vereinfacht sind Effektorzellen bei aktiver Antigenstimulation zu finden und in der Lage, Tumorzellen oder Viren zu eliminieren, wohingegen Memoryzellen zumeist in Abwesenheit der Stimulation auftreten, aber rasch bei Folgekontakt zum Antigen expandieren können [149]. Anhand einer Vielzahl von Oberflächen- und intrazellulären Markern lassen sich etliche T-Zell-Subklassen differenzieren [150]. Dies führt in der Forschung zu einer komplexen, teils kontroversen Klassifikation der T-Zellen bezüglich ihrer Funktion und ihres Phänotyps [139].

Zu den Markern der Zellmembran gehören Oberflächenrezeptoren, Zelladhäsionsmoleküle und Chemokin- bzw. Zytokinrezeptoren. Über charakteristische Muster der Marker lassen sich die T-Zellen nach ihrem Phänotyp und ihrer Funktion in Subpopulationen unterteilen. Zu den am häufigsten verwendeten Oberflächenmolekülen gehören CD45RA (oder CD45RO), CD28, CD27 und CCR7. So kann eine naive T-Zelle bspw. als *CD45RA⁺ CD28⁺ CD27⁺ CCR7⁺* T-Zelle identifiziert werden. Die Vielzahl an erforschten Markern eröffnet eine wachsende Anzahl an Subpopulationen, da die bestehende Population jeweils in eine Marker-positive und Marker-negative Subpopulation unterteilt werden kann [139]. Dies führt zu einer großen Heterogenität der CD4 und CD8 Subpopulationen. In [Abb.4](#) ist das jeweilige Standardprofil für die naiven, Memory-, Effektor- und TEMRA T-Zellen mit der charakteristischen Zytokin-Verteilung aufgeführt.

Die **naiven T-Zellen** sind die größte Subpopulation der T-Zellen und tragen CD45RA und CD28 an ihrer Oberfläche. CD45RA ist eine membranständige Tyrosinphosphatase, die bei der Zellaktivierung und Differenzierung eine Rolle

spielt. CD28 ist ein co-stimulierendes Molekül, das für naive T-Zellen essenziell ist. Im Gegenzug zu naiven Zellen sind differenziertere Zellen fähig, unabhängig von CD28 zu proliferieren und verlieren daher CD28 als Oberflächenmarker [151]. Naive T-Zellen, die zusätzlich CD31 tragen, gehören zu der Gruppe der RTE (siehe 1.2.2.1.1.) [152].

Unter Einfluss von APC und nach einer ersten Aktivierung durch das Antigen beginnen die naiven T-Zellen, im Sinne einer klonalen Expansion, zu proliferieren und differenzieren sich zu **Effektorzellen** [119]. Diese werden durch *CD45RA*- (*CD45RO*+) und *CD28*- beschrieben und sind in der Lage, inflammatorische Zytokine zu produzieren und mittels Chemokin-Rezeptoren zum Ort der Entzündung zu gelangen [153]. Zellen, die im Gegensatz zu *CD45RA* das A-Exon durch Splicing verloren haben, werden auch als *CD45RO* bezeichnet. *CD45RO* ist in der Lage, in engeren Kontakt mit dem TCR zu treten als *CD45RA* [119, 154]. T-Effektorzellen lassen sich in zytotoxische *CD8*-positive T-Zellen, die infizierte Zellen über Perforine und Granzyme zerstören, und *CD4*-positive T-Helferzellen, die die Immunantwort anderer Zellen über die Sekretion von Zytokinen unterstützen, weiter unterteilen [148].

Effektor-T-Zellen, die *CCR7* noch auf ihrer Oberfläche tragen, werden als frühe (*Early*-) Effektorzellen bezeichnet. Ist die *CCR7*-Expression herunterreguliert, liegt eine späte (*Late*-) Effektorzelle vor, die den terminalen Effektorzell-Phänotyp beschreibt [155]. Die Immunantwort wird durch die Apoptose der meisten Effektorzellen beendet [148]. *CD28*- *CD45RA*- Zellen werden als terminal-differenzierte Zellen bezeichnet, da sie mehrere Runden von Antigen-getriebener Proliferation durchlaufen haben und so zum Endstadium der replikativen Seneszenz getrieben wurden. Sie repräsentieren „echte“ seneszente Zellen [156, 157].

Die **Memoryzellen** (oder Gedächtniszellen) bilden das Fundament des immunologischen Gedächtnisses. Sowohl naive als auch Effektorzellen können sich zu Gedächtniszellen entwickeln. Memory-T-Zellen sind *CD45RA*- und *CD28*+ und proliferieren bei erneutem Antigenkontakt rasch. Durch die Stimulation von Zytokinen wie *IL-7* und *IL-15* und durch kontinuierliche MHC-Interaktionen sind Memory-T-Zellen sehr langlebig [119]. Bei Expression von *CCR7* werden sie als

zentrale Memory-T-Zellen (TCM) bezeichnet. Diese können zum lymphatischen Gewebe rezirkulieren und interagieren sehr gut mit dem TCR. Die Aktivierung nach Antigenkontakt erfolgt jedoch nur zögerlich, da die Zellen nicht über eine unmittelbare Effektorfunktion verfügen [158]. Sie können dendritische Zellen stimulieren und sich bei sekundärer Antigenstimulation zu effektorischen Zellen differenzieren [158]. Zudem haben sie ein hohes proliferatives Potenzial und eine große Apoptoseresistenz [159].

Die sogenannten Effektor-Memory-T-Zellen (TEM) haben CCR7 herunterreguliert und können schneller proliferieren und effektorisch wirksamer werden [153]. Durch den Verlust der Lymphknoten-Homing-Marker sind sie fähig, im Blut zu zirkulieren und durch die Expression von Migrations- und Chemokin-Rezeptoren an den Ort der Entzündung zu gelangen [119, 153].

Die **TEMRA** T-Zellen, die Effektor-Memoryzellen, die CD45RA tragen, sind in ihrer Genexpression und ihrer Zytokinsignatur eng mit den TEM verwandt [159]. CD28 und CCR7 sind bei den TEMRA-Zellen nicht exprimiert. Wie bei den TEM können die TEMRA durch Chemokin-Rezeptoren wie CXCR3 in das inflammatorische Gewebe gelangen. Zudem weisen die TEMRA ein eingeschränkteres TCR-Repertoire als die TCM auf und charakterisieren sich durch eine seneszentenere Replikationshistorie [160].

Auch wenn einige kongruente Charakteristika der T-Zell-Untergruppen identifiziert werden konnten, bleiben zentrale Punkte der Differenzierung und der zellulären Funktionen weiterhin unklar [139]. Ein Diskussionspunkt stellt die These des linearen, nicht-reversiblen Verlaufs der Differenzierung dar, die durch die stetige Regredienz der Telomerlängen unterstützt wird. Andere vermuten eine verzweigte, potenziell reversible Differenzierung der naiven T-Zellen [161]. Weitere umfassende Studien sind erforderlich, um die zellulären Phänotypen und Funktionen weiter erforschen zu können.

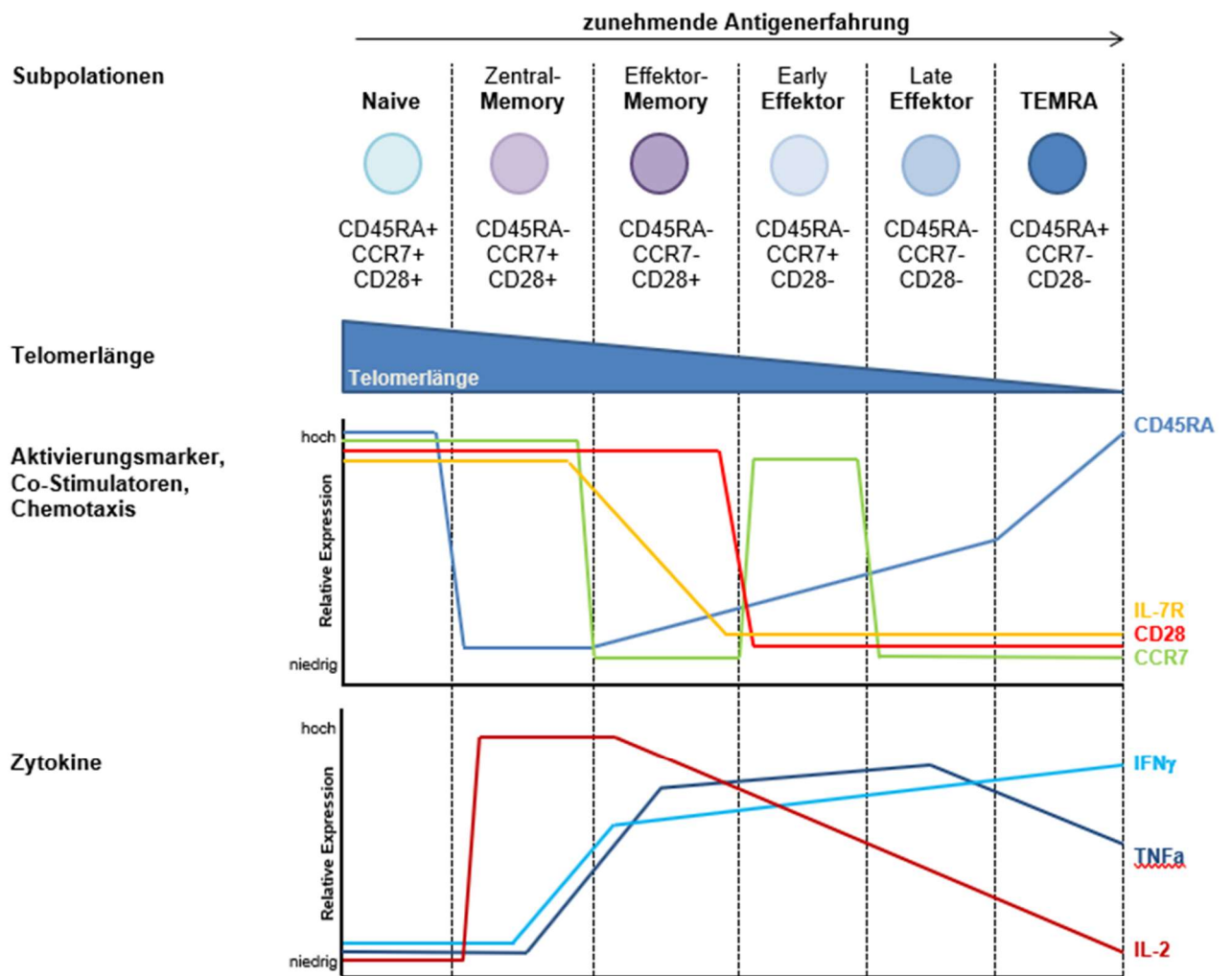


Abb.4: Expression der Oberflächenmarker und Zytokine in den T-Zell-Subpopulationen, modifiziert nach [139]. Definition der Charakteristika in den T-Zell-Subgruppen anhand ihres individuellen CD45RA-, CD28- und CCR7-Profiles. In den beiden Koordinatensystemen ist der Verlauf der Oberflächenmarker und der Zytokine gegen die Höhe der relativen Expression aufgetragen, wobei die farbzuordnende Legende am rechten Abblendungsrand zu finden ist. Mit zunehmender Antigenerfahrung verkürzt sich die Telomerlänge (2. Zeile).

1.2.2.1.3. T-Helferzellen (TH-Zellen)

Wie der Begriff Helferzelle indiziert, können T-Helferzellen die Immunantwort anderer Immunzellen verstärken und diese anhand von Chemokinen und Zytokinen zum Ort der Entzündung dirigieren. Antigene werden den naiven CD4-positiven T-Zellen über den MHC-II-Rezeptor zusammen mit den co-stimulatorischen Molekülen (wie Protein B-7) der APC präsentiert. Bei Vorhandensein eines spezifischen Zytokinmilieus erfolgt die Differenzierung zu einer spezifischen T-Helferzelle vom TH1-, TH2- und TH17-Typ oder zu einer regulatorischen T-Zelle [119, 148]. Als folliculäre T-Helferzellen (TFH) werden die T-Helferzellen bezeichnet, die in den Lymphknoten in Interaktion mit aktivierten B-Zellen treten und über Zytokine zusammen mit den folliculären dendritischen Zellen (FDZ) wesentlich an der Bildung der Keimzentren sowie an der Affinitätsreifung und dem Klassenwechsel der Antikörper beteiligt sind [148].

In Anwesenheit von IL-12 und IFN γ erfolgt die Differenzierung zur **TH1**-Zelle nach der Aktivierung des JAK/STAT1-Pathways und daraus folgend des Transkriptionsfaktors *T-box transcription factor* (T-bet). Nach Bindung an die cis-Elemente (Promotor, Enhancer) wird die Genexpression für den definierenden Phänotyp und das charakteristische Zytokinprofil hochreguliert [162, 163]. TH1-Zellen produzieren IFN γ und TNF α und bekämpfen in Zusammenarbeit mit Makrophagen, B-Zellen, NK-Zellen und zytotoxischen T-Zellen intrazelluläre Erreger, entartete Zellen und Viren [148].

TH2-Zellen werden unter Einfluss von IL-4 zur Induktion des Transkriptionsfaktors GATA3 (Glutaryl-Aminotransferase-Untereinheit A) über STAT6 aktiviert und produzieren IL-4, IL-5 und IL-13 [164]. Sie modulieren die Proliferation der B-Zellen und den IgE-Klassenswitch. Zudem unterstützen sie die Wirkung von Eosinophilen, Basophilen, Makrophagen und Mastzellen gegen extrazelluläre Erreger wie Parasiten und werden bei der Reparatur von beschädigtem Gewebe tätig [148].

Die Differenzierung zu **TH17**-Zellen erfolgt durch die IL-1 β -, IL-6-, IL-23- und TGF β -abhängige Aktivierung des Transkriptionsfaktors *retinoic acid orphan receptor gamma t* (ROR γ t) über STAT3 [165]. TH17-Zellen sezernieren v.a. IL-17,

aber auch IL-6, IL-8 und IL-23, und sind so fähig, auf Neutrophile einzuwirken und diese frühzeitig über G-CSF (*granulocyte colony stimulating factor*) zu rekrutieren, um bei der Abwehr von extrazellulären Erregern wie Bakterien und Pilzen tätig zu werden [166, 167]. Zudem wird ihnen eine pro-inflammatorische Wirkung über Prostaglandine, Adhäsionsmoleküle und das Komplementsystem nachgesagt [168].

Zu den CD4-positiven T-Helferzellen gehören auch die suppressiv-wirksamen regulatorischen T-Zellen (**Tregs**), die über IL-10 und TGF β die überschießende Inflammation anderer Immunzellen, wie Makrophagen und dendritischen Zellen, hemmen können und eine wichtige Rolle bei der Selbsttoleranz und der Immunabwehr spielen [169]. Sie können unter der Stimulation von TGF β und IL-2 durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors *forkhead box P3* (FoxP3) mittels STAT5 entstehen [170].

Die natürlichen Tregs (nTregs) werden im Thymus geprägt. Zudem existieren auch in der Peripherie Tregs, die *de novo* aus naiven T-Zellen unter Einfluss von IL-2, TGF β oder Hsp60 im entzündeten Gewebe zu induzierten Tregs (iTregs) werden und dort IL-10 und IFN γ sezernieren können [171, 172]. Neben der Expression von FoxP3 tragen Tregs CD25 auf ihrer Oberfläche und haben CD127 (siehe RTE-Kapitel 1.2.2.1.1.) herunterreguliert. CD25 ist ein IL-2-Rezeptor α , der zusammen mit FoxP3 die natürlichen Tregs definiert und für das Überleben dieser Zellen und ihre regulatorische Funktion bedeutsam ist [169]. FoxP3 ist wesentlich für Entstehung und Funktion der Tregs und wird überwiegend von natürlichen Tregs exprimiert [173].

Tregs wirken regulierend in der Kontrolle einer Vielzahl von physiologischen und pathologischen Immunantworten. Sie können zur Selbsttoleranz beitragen, indem sie die Immunantwort gegen Selbst- und nicht-Selbst-Antigene zu einer Antigen-unspezifischen Methode herunterregulieren [174]. So können sie bei der Behandlung oder Prävention von Autoimmunerkrankungen, bei der Toleranz von Transplantationen, der Kontrolle von allergischen Reaktionen und der Verteidigung gegen maligne Prozesse ihre Wirkung entfalten [169].

CD4-positive T-Helferzellen können zudem anhand ihrer **Chemokin-Rezeptoren** weiter in charakteristische Profile unterteilt werden. So beschreibt die Expression von CCR5 und CXCR3 auf den TH-Zellen ein TH1-Profil, während CCR3, CCR4 und CRTh2 bei einem TH2-Profil zu finden sind [175]. Die CCR4- und CCR6-Expression definiert die TH17-Zellen [176]. Die gemeinsame Expression von CXCR3 und CCR6 ist auf TH1/TH17-Zellen zu finden, die sowohl IFN γ als auch IL-17 produzieren können [177]. Anhand der Oberflächenmarker CD45RA, CD28 und CCR7 können die T-Helferzellen in Subpopulationen unterteilt werden (siehe Abb.4). Insbesondere der *CCR7- CD28- CD27-* Phänotyp hat eine starke zytolytische Kapazität und ist mit den CD8-positiven T-Zellen assoziiert [139].

Zu den Charakteristika des seneszierenden Immunsystems gehört der Shift der Zytokine von einem TH1- zu einem TH2-Profil [114]. Die Verlagerung zu TH2-Zytokinen wurde als möglicher Auslöser postuliert, den Auto-Antikörpern klinische Relevanz zu verschaffen [123]. Bei Funktionseinbuße der TH-Zellen können T-Zell-medierte Autoimmunerkrankungen sowie atopische und inflammatorische Erkrankungen entstehen.

Die TH-Differenzierungspfade und ihre charakteristischen Zytokinprofile sind in Abb.5 veranschaulicht.

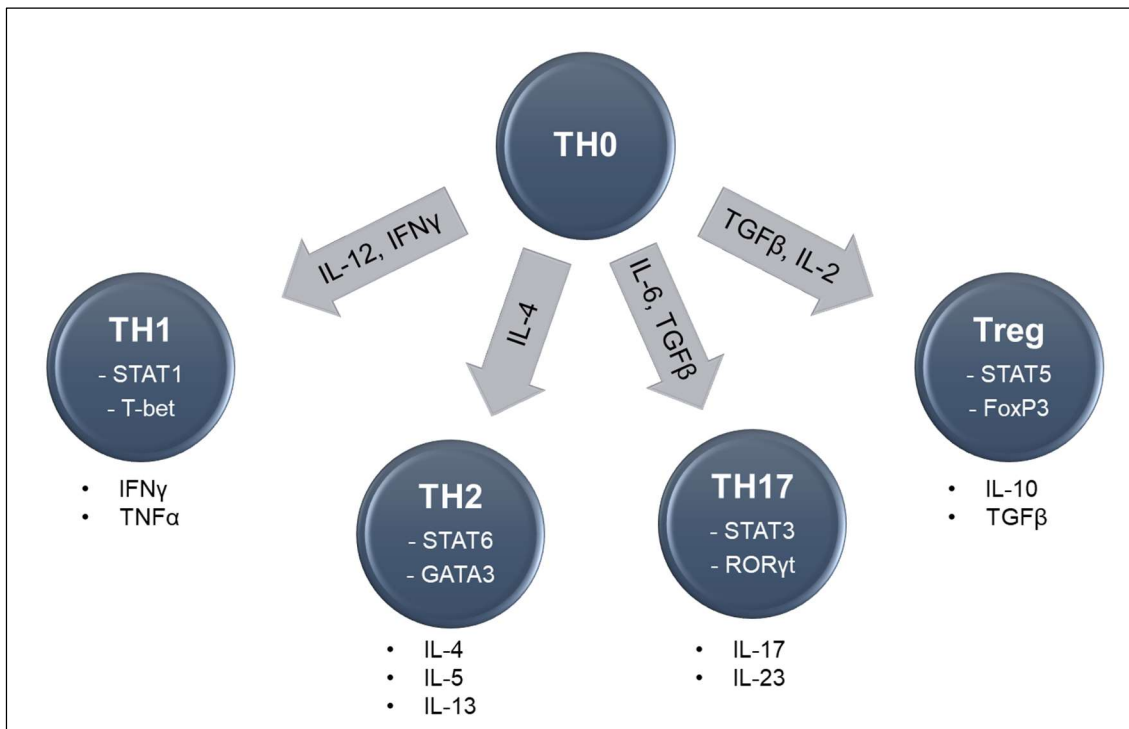


Abb.5: Differenzierungspfade der T-Helferzellen (eigene Abbildung). Unter Einfluss eines spezifischen Zytokinmilieus (Pfeil) wird über STAT ein spezifischer Transkriptionsfaktor aktiviert, was zur Differenzierung hin zu einer TH1-, TH2-, TH17- oder einer Treg-Zelle führt. Unterhalb der T-Helferzelle (Kreis) sind die charakteristischen Zytokine aufgelistet.

1.2.2.1.4. T-Zell-Plastizität

Wie in [Abb.5](#) beschrieben, differenzieren sich die naiven T-Helferzellen unter Einfluss von charakteristischen Zytokinmilieus zu TH1-, TH2-, TH17- oder Treg-Zellen. Für die Differenzierung zur TH1- oder TH2-Zelle konnte belegt werden, dass über negative Feedbackmechanismen sowohl die Transkriptionsfaktoren als auch die Zytokinproduktion der nicht-differenzierenden Zellreihe supprimiert werden [178]. Auch für Tregs und TH17-Zellen konnte eine wechselseitige Inhibition demonstriert werden, wobei sich FoxP3 und RORγt in ihrer Expression gegensätzlich verhalten [179].

In Studien konnte neben dieser unidirektionalen Differenzierung nachgewiesen werden, dass der Phänotyp der Helferzellen sich plastisch verhalten kann, und

die T-Helferzellen Eigenschaften eines anderen Differenzierungspfad hinzuge-
winnen können, da grundsätzlich alle Transkriptionsfaktoren exprimiert werden
[180]. Insbesondere die TH17-Zellen erwiesen sich als plastisch und instabil in
ihrem Phänotyp [181]. So wird durch TGF β ein IL-10-produzierender Subtyp be-
günstigt, während bei IL-1 β -Stimulation ein mehr pro-inflammatorisch wirksamer
Typ aufzufinden ist [182]. Zudem sind TH17-Zellen unter Zytokin-Einfluss fähig,
IFN γ oder IL-4 zu produzieren und sich in TH1- oder TH2-Zellen umzuwandeln
[183, 184]. Der TH1/TH17-Phänotyp zeichnet sich durch die Sekretion sowohl
von IFN γ als auch von IL-17 aus [176].

Diese plastische Dualität wird teilweise durch epigenetische Modifikationen der
Histone (z.B. H3K4me3 und H3K27me3) wie Methylierung oder Demethylierung
verursacht. Die Histone sind in der Nähe der regulatorischen Hauptgene - unab-
hängig vom Differenzierungsgrad der Zelle - zu finden und ermöglichen den Hel-
ferzellen, nach adäquatem Stimulus ein alternatives Transkriptionsprogramm an-
zunehmen [185]. Die Suppression der unerwünschten TH-Zellen erfolgt ebenfalls
über epigenetische Modifikationen. Der Epigenetik wird demnach eine zentrale
Rolle bei der Plastizität der T-Helferzellen zugeordnet.

1.2.2.2. T-Zell-Rezeptor-Diversität

Das Rearrangement der T-Zell-Rezeptoren (TCR) findet im Thymus statt und bie-
tet die Grundlage für ein weitgefächertes TCR-Repertoire [186]. Während der
T-Zell-Reifung werden die TCR-Gene somatisch rekombiniert, um ein breites
Spektrum an Antigen-spezifischen Rezeptoren generieren zu können. Im Nor-
malfall trägt ein Lymphozyt spezifische Rezeptoren für nur ein Antigen [148]. Zel-
len, die derselben Vorläuferzelle entstammen und dieselben Antigen-spezifi-
schen Rezeptoren tragen, werden als Klone bezeichnet.

T-Zell-Rezeptoren können kurze Peptide aus etwa 10 Aminosäuren erkennen,
die ihnen von den MHC-I/II-Zellen präsentiert werden, welche zuvor diese Pep-
tide aus den Antigenen prozessiert haben [148]. Für eine problemlose Funktions-
weise des Immunsystems müssen Millionen von Antigenen erkannt werden.

Diese enorme Diversität der TCR wird dadurch erreicht, dass unterschiedliche, zur Komplementarität determinierte Regionen innerhalb der TCR α - und TCR β -Kette kombiniert und paarweise verbunden werden [187]. Über 10^{15} Kombinationsmöglichkeiten werden als potenziell möglich erachtet [188].

T-Lymphozyten können anhand der Expression des TCR-Komplexes in TCR $\alpha\beta$ - und TCR $\gamma\delta$ -positiv eingeteilt werden. TCR $\alpha\beta$ -positive T-Zellen sind in sekundär-lymphatischen Organen zu finden, wo sie über die MHC-Moleküle mit den APC interagieren, die Produktion von Antikörpern ermöglichen oder zur Zytolyse führen [189]. Die Expression von TCR $\gamma\delta$ ist ebenfalls in sekundär-lymphatischen Organen, aber auch auf Lymphozyten in Epithelien und Schleimhäuten anzutreffen [190, 191]. TCR $\gamma\delta$ ist nicht nur auf MHC-Moleküle beschränkt, sondern kann eine Vielfalt von Antigenen wie nicht-klassische MHC-Moleküle, Hitzeschockproteine und Lipide erkennen [192]. TCR $\gamma\delta$ -Zellen repräsentieren mit weniger als 5% Häufigkeit die Minderheit der Lymphozyten im adulten Thymus oder in den sekundär-lymphatischen Organen [193].

Beide Zelllinien entstehen aus *CD4- CD8-* Progenitor-Thymozyten und können *CD25* bzw. *CD44* exprimieren [194]. TCR $\gamma\delta$ -Zellen bleiben *CD4- CD8-* und verlassen den Thymus in Richtung Epithelien oder sekundär-lymphatischer Organe mit einer definierten Effektorfunktion, während TCR $\alpha\beta$ -Zellen nach der somatischen Rekombination und den Selektionsprozessen den Marker *CD3* hinzugewinnen und in der T-Zell-Reifung zu *CD4+* oder *CD8+* T-Zellen voranschreiten (siehe 1.2.3.) [189, 195].

Eine schwache TCR-Signalstärke begünstigt die $\alpha\beta$ -Linie, wohingegen ein vergleichsweise starkes Signal zur $\gamma\delta$ -Linie führt, unabhängig vom TCR-Komplex, dem sie entstammen [189, 196]. Nach Besiedelung der Dermis werden die $\gamma\delta$ -Zellen auch als dendritische epidermale T-Zellen (dETC) bezeichnet, da sie eine dendritische Form erhalten [119]. Sie können Zytokine (wie IL-17 oder IFN γ) und Chemokine sezernieren und übernehmen u.a. Funktionen des angeborenen Immunsystems.

Bei der somatischen Rekombination werden die 3 Gensegmente V, D und J miteinander auf unterschiedliche Weise kombiniert. Für jeden Gen-Locus gibt es mehrere Varianten des Gens, woraus infolge der Vielzahl an Kombinationsmöglichkeiten eine hohe TCR-Diversität entsteht. Für den TCR $\alpha\beta$ bspw. werden die D β -Gen-Segmente mit den J β -Gen-Segmenten und anschließend die V β - mit den DJ β -Gen-Segmenten kombiniert. Bei nicht ausreichend funktionsfähiger β -Kette kann kein Prä-TCR gebildet werden, und die Zelle geht in die Apoptose oder wird einer weiteren Umstrukturierung zugeführt. Erst nach erfolgreicher Zellteilung kann die α -Kette rearrangiert werden. Die zuvor abgeschalteten Transkriptionsfaktoren und Gene wie RAG werden reaktiviert [119].

Im Rahmen des Splicings bilden sich DNA-Episome aus den exzidierten Segmenten des TCR δ -Locus, die innerhalb der α -Segmente vorzufinden sind. Diese DNA-Episomen werden als die sogenannten *signal* bzw. *coding joint* TRECs bezeichnet, graphisch dargestellt in Abb.6. Nach erfolgreichem TCR-Rearrangement durchlaufen die CD4⁺ CD8⁺ Thymozyten den Selektionsprozess mittels Selbst-Peptid und Selbst-MHC-Komplexen (siehe 1.2.3.).

Während der Immunoseneszenz sinkt mit der Involution des Thymus die klonale Expansion des TCR-Repertoires und die Fähigkeit, T-Zell-exprimierte Oberflächenantigene zu rekonstituieren [141]. So treten mehr oligo- oder monoklonale Profile auf. Dieser Mechanismus lässt sich auch bei chronisch-inflammatorischen Zuständen beobachten [197]. Eine reduzierte TCR-Diversität kann als Risikofaktor für die Entstehung einer Autoimmunerkrankung betrachtet werden [187].

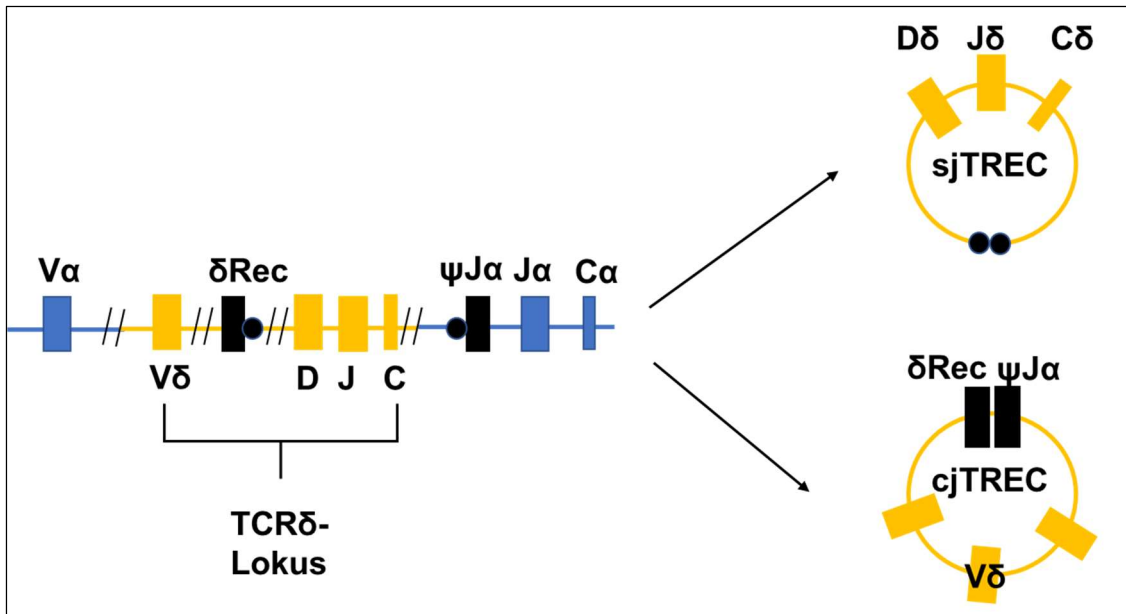


Abb.6: Bildung der TRECs im Rahmen des TCRα-Rearrangements, modifiziert nach [141]. Die Abbildung zeigt eine vereinfachte Darstellung des TCRδ-Lokus, der von den unterschiedlichen Segmenten des TCRα-Lokus umgeben wird. Im Rahmen des TCRα-Rearrangements bildet sich ein einzelner TREC, der eine einzigartige *single joint*-Sequenz enthält (sjTREC). Der zweite *coding joint* TREC (cjTREC) wird nach der Bindung von Vα an Jα geformt.

1.2.2.3. Relative Telomerlänge

Als Telomere werden die hochspezialisierten Schutzkappen der Chromosomen bezeichnet, die während der Zellteilung den Verlust von chromosomalen DNA-Basenpaaren verhindern und so eine wichtige Rolle bei der DNA-Replikation und dem Erhalt der Chromosom-Integrität spielen [113, 198, 199]. Es sind TTAGGG³-reiche Wiederholungen an den Enden der Chromosomen, die durch das Ribonukleoprotein-Enzym Telomerase synthetisiert und durch Polymerisation elongiert wurden [198]. Im Rahmen der semikonservativen DNA-Replikation wird die Telomerlänge an den Enden der Chromosomen stetig kürzer, da keine Mechanismen zur Gegenregulation dieses Abbaus vorhanden sind [198]. Anhand der Telomerlänge können so Rückschlüsse auf die Replikationshistorie der Zellen gezogen werden. Die Abnahme der Telomerlänge wird daher auch als „mitotische Uhr“ bezeichnet.

³ DNA-Basenpaare T: Thymin, A: Adenin und G: Guanin

Wird die Telomerlänge zu kurz für eine Teilung der Zelle, resultiert die Seneszenz der Zelle, da die DNA-Polymerase nicht mehr dazu fähig ist, die terminalen Enden der Chromosomen zu replizieren [200]. Erschwerend kommt hinzu, dass periphere Replikationsmechanismen vermehrt nötig werden, um den peripheren T-Zell-Pool konstant zu erhalten, was den Abbau der Telomere zusätzlich begünstigt [113]. Die Telomerase, ein Enzym mit katalytischer reverser Transkriptase-Untereinheit, kämpft gegen diesen Abbau der Telomerlängen an [201]. Während der Seneszenz nimmt die Aktivität der Telomerase zu.

1.2.3. Thymektomie als Modell der Immunoseneszenz

Der Thymus ist ein bekapseltes Organ aus 2 asymmetrischen Lappen im vorderen Mediastinum. Er lässt sich weiter in Rinde und Mark unterteilen [131]. In der Rinde findet die Selektion und Maturation der unreifen Thymozyten aus dem Knochenmark - in der Fetalperiode aus Leber und Milz - statt, die von einem dreidimensionalen Netz aus Epithelzell-Ausläufern umhüllt werden [148]. Die Epithelzellen der Thymusrinde werden deshalb auch als „Ammenzellen“ bezeichnet.

Die unreifen Thymozyten der Rinde tragen weder CD4 noch CD8. Unter dem Einfluss von Chemokinen und Zytokinen, die von den Thymusepithelzellen sezerniert werden, reifen die Pro- und Prä-T-Zellen und wandern weiter in Richtung Mark. In der Rinde findet auch die somatische Rekombination der variablen V_{CJ}-Region der TCR statt (siehe 1.2.2.2.). Zu diesem Zeitpunkt sind die Zellen CD4/CD8-doppelpositiv und produzieren membranständige TCR [148].

Die Thymusepithelzellen tragen sowohl MHC-I- als auch MHC-II-Moleküle und präsentieren den Thymozyten Peptide aus Selbst-Antigenen. Die bindungsfähigen Zellen überleben, die übrigen Zellen gehen in Apoptose. Auch bei zu hoher Affinität zu den MHC-Rezeptoren von dendritischen Zellen, Makrophagen, Epithelzellen oder zu Thymus-fremden, körpereigenen Molekülen wird die

Apoptose induziert. Zellen, die mit ihrem TCR an MHC-I gebunden haben, exprimieren nur noch CD8, während bei Bindung an MHC-II CD4 vorherrscht. Die übriggebliebenen CD4-positiven und CD8-positiven T-Zellen wandern zu den Venolen und werden als RTE in Richtung der sekundär-lymphatischen Organe freigesetzt [148].

Im Mark sind neben einer höheren Anzahl an Epithelzellen reife T-Lymphozyten, Makrophagen und einzelne B-Lymphozyten zu finden [119]. Den Hassall-Körperchen, den eosinophilen Aggregaten von Epithelzellen im Thymusmark, sagt man eine Bedeutung bei der Selektion von natürlichen regulatorischen T-Zellen (nTregs) nach [202]. Der Thymus ist die Hauptquelle der RTE, die als naive Zellen neue Antigene erkennen können und als erste Detektoren des adaptiven Immunsystems gelten [137].

Bei einem einjährigen Kind beträgt das Gewicht des Thymus etwa 30 Gramm und bleibt ab der Pubertät mit einem Gewicht von circa 20 Gramm relativ konstant [131]. Während der Involution des Thymus wird insbesondere die Rinde reduziert und durch Fettgewebe ersetzt, so dass bei alten Menschen das spezifische Gewicht des Thymus deutlich reduziert ist [131]. Dennoch findet auch noch bei älteren Menschen TCR-Rearrangement und T-Zell-Maturation statt, auch wenn der Thymus-Output an neugenerierten T-Zellen reduziert ist [115].

Bei Mäusen, denen kurz nach Geburt der Thymus entfernt wurde, konnte eine partielle Immunschwäche v.a. der Zell-medierten Immunantwort festgestellt werden [203]. Bei Patienten mit DiGeorge-Syndrom, deren Thymushypoplasie oder -aplasie ein relevantes Charakteristikum darstellt, besteht ein lebenslanges Immundefizit mit signifikanter Abnahme der TRECs und des T-Zell-Spektrums [204]. Thymektomierte Kinder, die bei Organentnahme jünger als 6 Monate alt waren, zeigten keine klinischen Konsequenzen wie erhöhte Infektionsraten, da sie, im Gegensatz zu Nagetieren, bei Geburt bereits eine vollständig entwickelte TCR-Diversität vorweisen [205]. Es konnten jedoch zunehmende Veränderungen des peripheren T-Zell-Kompartiments und der CD4+ T-Zell-Gesamtanzahl belegt werden [206, 207].

So wurde in einer Studie von Prelog et al. [208] bei thymektomierten Patienten im Rahmen einer kardialen Operation ein signifikant schnellerer Rückgang an naiven T-Zellen und TRECs festgestellt, wobei eine inverse Korrelation zum chronologischen Alter und der Zeit nach Thymektomie belegt werden konnte. Die Ki-67-Rate und die Telomerase-Aktivität als Zeichen der postthymischen, homöostatischen Proliferation waren in den naiven und Memory-T-Zellen erhöht. Memory-Zellen traten signifikant häufiger auf und korrelierten positiv mit dem Alter und der Zeit nach Thymektomie.

In Studien wird diskutiert, wie es möglich ist, dass weiterhin naive T-Zellen mit TRECs und TCR-Diversität generiert werden können, obwohl der Thymus entfernt wurde. Eine Hypothese ist eine inkomplette Thymektomie mit funktionellem Restgewebe [209], eine andere, dass die vor der Thymektomie generierten RTE langlebiger sind und noch Dekaden lang persistieren können [210, 211]. Eine weitere Möglichkeit sind extrathymisch generierte T-Zellen. Diese können sowohl aus dem Intestinaltrakt als auch aus der Leber stammen [212, 213]. Den extrathymischen T-Zellen wird eine eingeschränkte Diversität des TCR-Repertoires nachgesagt, mit einer Dominanz von TCR $\gamma\delta$ und Veränderungen des zellulären Phänotyps [214]. In einem Bericht über thymektomierte Kinder konnte eine signifikante Zunahme von $CD8\alpha\alpha^+ TCR\gamma\delta^+$ T-Zellen mit einer tendenziellen Erhöhung von $CD3^+ CD4^- CD8^-$ und $CD3^+ CD25^- CD122^+$ T-Zellen demonstriert werden, welche als extrathymische T-Zellen definiert wurden [211]. Wie bei Thymozyten kann auch bei extrathymischen T-Zellen eine altersentsprechende Abnahme beobachtet werden.

Anhand der fehlenden Thymopoese und der homöostatischen peripheren Proliferation der naiven T-Zellen kann die deutlich niedrigere TREC-Anzahl nach Thymektomie erklärt werden [208]. Bei thymektomierten Patienten sind die TRECs in den Lymphozyten 30- bis 100-fach niedriger als bei den altersgleichen Kontrollen [207]. Eine andere Studie beschreibt eine nur 3-fach niedrigere TREC-Anzahl in naiven $CD4^+ CD45RA^+ CD62L^+$ T-Zellen nach Thymektomie, wobei die Differenz zu den Gesunden 15 Jahre nach Thymektomie abnimmt [208]. Die naiven T-Zellen scheinen in ihrer Absolutzahl deutlich langsamer abzunehmen,

da die periphere, homöostatische Proliferation diese Differenz größtenteils abfängt. Mit der Apoptose von echten, aus dem Thymus stammenden naiven T-Zellen beschleunigt sich die Abnahme der naiven T-Zellen [215].

Anhand von Langzeituntersuchungen von thymektomierten Patienten könnten weitere Mechanismen erforscht und modellhaft auf die Modifikationen des Immunsystems bei alternden Menschen übertragen werden, da dort durch die Thymusinvolution ähnliche Veränderungen des T-Zell-Pools und der abnehmenden TREC-Anzahl anzutreffen sind. Eine Limitation dieses Immunosenesenz-Modells ist, dass die Thymektomie zumeist auf ein junges, naives Immunsystem trifft, während die Thymusinvolution ein graduelles Abnehmen der Thymusfunktion über das Leben hinweg beschreibt und durch die Exposition mit Umweltantigenen beeinflusst wird [137].

1.2.4. Chronische Virusinfektionen als Promotor von Immunosenesenz

Je nach geographischer Region kann bei Erwachsenen eine Durchseuchung durch das Cytomegalie-Virus (CMV) von 60 bis 100% festgestellt werden [156]. Bei immunkompetenten Patienten verläuft die Infektion mit dem β -Herpesvirus zumeist asymptomatisch. Nach Primärinfektion verbleiben die Viren im Körper, da sie in der Lage sind, die Abwehrmechanismen zu modifizieren und sich den Eliminationsprozessen des Körpers zu entziehen [216].

Die Verteidigungsmechanismen des Körpers können zu einem dauerhaft veränderten T-Zellprofil führen, wie bspw. zu einer dominanten Akkumulation von CD8-positiven Memory- und Effektorzellen mit einer klonalen *CD28*-Expansion [217]. Die CD28-negativen, CMV-spezifischen T-Zellen sind *in vitro* dazu fähig, nach erneuter Stimulation mit CMV-Antigenen IFN γ zu produzieren. Eine vergleichbare Reaktion ist bei endogener Virusreaktivierung, bspw. bei insuffizienter T-Zell-Antwort durch Immundefizienz oder Einnahme von Immunsuppressiva, zu

erwarten [156, 218]. Diese spezifischen Zellen können zusätzlich einen *CD45RA*⁺ oder einen *CD45RA*⁻ Phänotyp aufweisen [219].

Ob die Expansion der spezifischen CMV-Zellen noch Raum für andere spezifische CD8-positive T-Zellen lässt, ist bislang nicht vollständig geklärt [156]. Es konnte jedoch, insbesondere bei seropositiven älteren Menschen, eine verminderte Immunantwort nach Influenzaimpfung aufgezeigt werden, was auf eine eingeschränkte Immundiversität und -antwort durch die lebenslange latente CMV-Infektion hindeutet [220].

In Studien konnte nachgewiesen werden, dass chronische, latente Virusinfektionen, wie bspw. durch CMV oder EBV (Epstein-Barr-Virus), die Differenzierung und periphere Proliferation der T-Zellen sowie die terminale Differenzierung zu *CD28*⁻ Zellen vorantreiben können [113]. Diese Veränderungen sind auch im Rahmen der Immunoseneszenz und bei rheumatischen Erkrankungen aufzufinden, so dass vermutet wird, dass chronische Virusinfektionen die T-Zell-Differenzierung und damit eine vorzeitige Alterung des Immunsystems induzieren und beschleunigen können [221].

Bei Untersuchungen des Zellprofils von Probanden mit latenter CMV-Infektion konnte auch eine Abnahme von naiven und frühen Memory-T-Zellen in Kombination mit einer IFN γ -dominanten TH1-Zytokin-Polarisation aufgedeckt werden [156]. Dies könnte eine chronische Inflammation mit reduzierter Diversität der Immunantwort zur Folge haben [114, 156]. Die oligoklonale Expansion, die durch die latente CMV-Infektion induziert wird, kann eine Restriktion in der TCR-Diversität verursachen [222]. Bei Gesunden hängt diese Restriktion neben dem immunologischen Alter von der Dauer der CMV-Latenz ab [223].

Chronische, latente CMV-Infektionen bei alten Menschen können die Abnahme der naiven T-Zellen beschleunigen, die bereits durch die Thymusinvolution stattfindet [121, 156]. Die Unfähigkeit, auf neue Antigene einzugehen, könnte anhand der extrem niedrigen Anzahl an CD8-positiven, naiven T-Lymphozyten erklärt werden. Zudem wurde in einer Studie von Almanzar et al. bei CMV-Seropositivität eine mit dem Alter nachlassende Anzahl an IL-2- und IL-4-produzierenden Memory-T-Zellen demonstriert, welche insbesondere bei älteren Menschen mit

einer guten humoralen Immunantwort zu finden sind und ein Reservoir an Diversität in Abwesenheit von naiven T-Zellen darzustellen scheinen [156, 224].

Dieser Beschleunigung des immunologischen Alterungsprozesses könnte durch eine frühzeitige CMV-Vakzination Einhalt geboten werden [225, 226]. Durch die Immunisierung könnten auch Krankheiten verhindert werden, die mit chronisch-inflammatorischen Zuständen durch CMV vergesellschaftet sind, wie bspw. Autoimmunerkrankungen. Auch die höhere Inzidenz von kardiovaskulären Erkrankungen und Karzinomen, und die erhöhte Morbidität und Mortalität, die durch die Beschleunigung der Immunoseneszenz im Beisein von CMV verursacht werden, könnten so reduziert werden. In Abb.7 ist die Rolle von CMV als Promotor der Immunoseneszenz graphisch dargestellt.

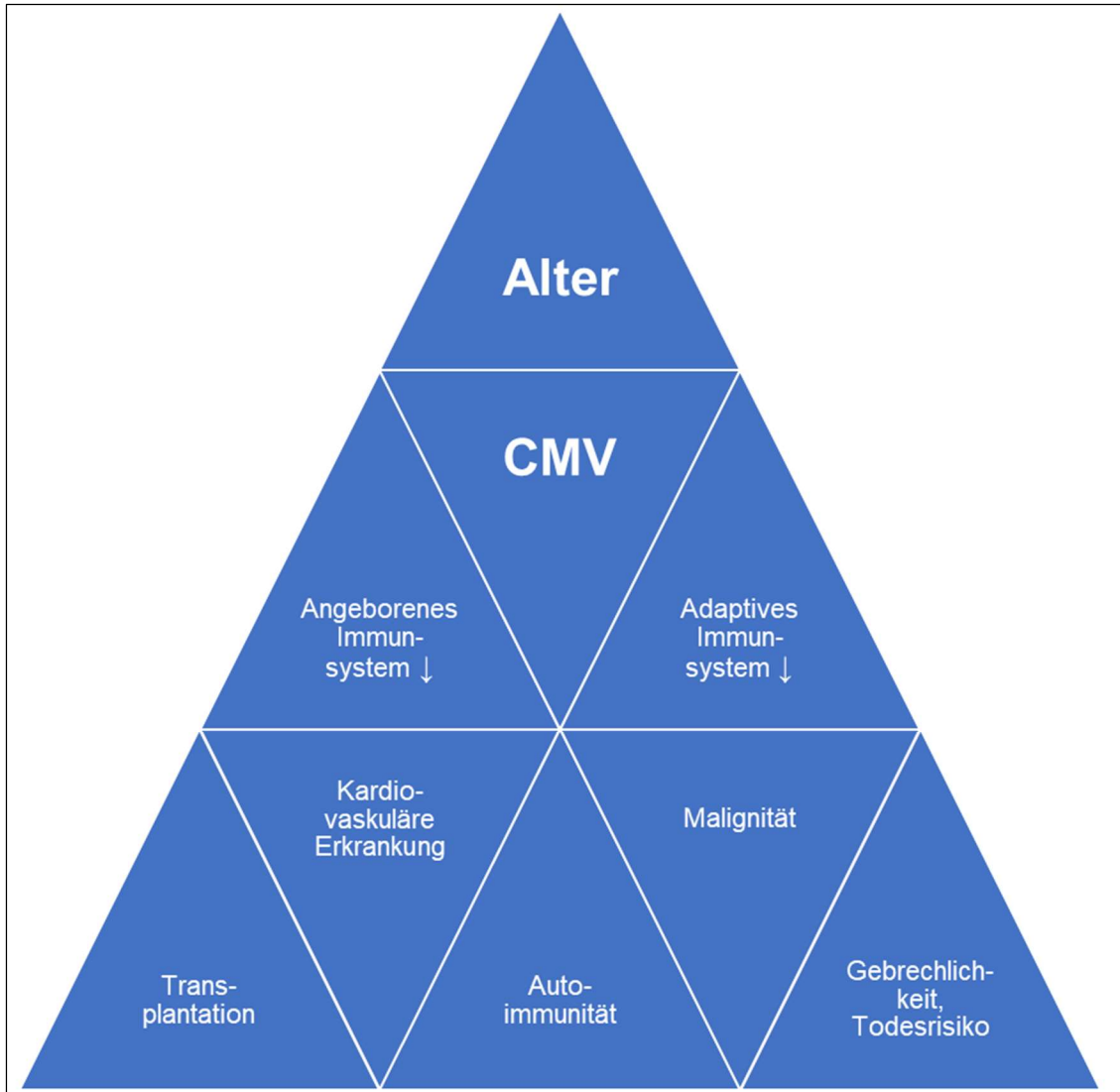


Abb.7: Alter und CMV als treibende Kräfte des Seneszenz-Prozesses von angeborenem und adaptivem Immunsystem, modifiziert nach [227]. Steigendes Alter zusammen mit CMV-Seropositivität treibt die Seneszenz des angeborenen und adaptiven Immunsystems voran. Dies kann zur Pathogenese von kardiovaskulären Erkrankungen, Autoimmunerkrankungen oder Malignitäten führen, Abstoßreaktionen oder erhöhte Morbidität und Mortalität bei Transplantation verursachen bzw. zu einer stärkeren Gebrechlichkeit und einem erhöhten Risiko, frühzeitig zu versterben, beitragen.

1.2.5. Prämaturre Immunoseneszenz bei JIA

Im Laufe des Lebens steigt das Level von Auto-Antikörpern stetig an, jedoch verhindern Toleranzmechanismen bei gesunden Menschen das Auftreten einer Autoimmunerkrankung [114]. Für Patienten mit T-Zell-vermittelten Erkrankungen konnten typische Merkmale eines beeinträchtigten Immunsystems belegt werden, die auch bei Immunoseneszenz zu finden sind [113]. Diese prämaturre Immunoseneszenz konnte für RA in etlichen Studien belegt werden [125, 228]. Auch für JIA konnten, insbesondere im Frühstadium der Erkrankung, typische Charakteristika eines dysfunktionalen Immunsystems angetroffen werden, die den Merkmalen der prämaturren Immunoseneszenz bei Erwachsenen mit Autoimmunerkrankung ähnelt.

Die prämaturre Immunoseneszenz der T-Zellen bei JIA könnte der mangelhaften Fähigkeit geschuldet sein, den **T-Zell-Pool** altersentsprechend aufrechtzuerhalten und eine ausreichende Anzahl an neuen T-Zellen zu generieren [114]. Insbesondere im Frühstadium der Erkrankung konnte in naiven ($CD4+CD45RO^-$) Zellen eine nicht-altersentsprechende Abnahme der **Telomere** und der **TREC** enthaltenden Zellen beobachtet werden [229]. Die prämaturre Thymusinvolution ruft zudem eine kompensatorische Proliferation von postthymischen Zellen und eine oligoklonal-betonte TCR-Diversität hervor [114, 222].

Die Veränderungen im zellulären Profil werden als Zeichen eines prämaturre-altenden Immunsystems interpretiert [113]. Die reduzierte TREC-Anzahl könnte als Zeichen einer herabgesetzten Thymusfunktion mit weniger RTE-Output gesehen werden. Ein anderes Erklärungsmodell für die TREC-Abnahme ist eine erhöhte homöostatische, postthymische Proliferation, die durch eine Kombination aus forciertem Telomerabbau und hochregulierter Ki-67-Expression hervorgerufen wird [113]. Durch chronische, periphere Aktivierung und Stimulation sowie verminderten Thymus-Output können die erniedrigten TREC-Level und die vermehrte periphere Replikation der naiven T-Zellen aufrechterhalten werden [143].

Bei peripheren naiven T-Zellen war die Proliferationsrate, gemessen anhand des Ki-67-Markers, höher als beim gesunden Vergleichskollektiv und korrelierte mit der Krankheitsdauer [143]. Dass die peripheren naiven T-Zellen dennoch bei JIA-

Patienten vermindert sind, kann aufgrund des geringeren Thymus-Outputs, dem Switch zu anderen Phänotypen (wie z.B. *CD45RO+* Memory-T-Zellen) und deren Akkumulation erklärt werden [230]. Resultieren kann eine verminderte Rekonstitutionsfähigkeit von naiven Zellen bei JIA-Patienten, was bei der Einführung neuer Therapeutika, bei der Immunantwort nach Impfungen oder bei Kontakt zu neuen Antigenen relevant werden kann [113]. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung von JIA-Patienten nach autologer Stammzelltransplantation unterstützt, deren *CD4+ CD45RA+* naive Zellen sich nur langsam normalisierten [113, 231].

Für RA-Patienten konnte eine erhöhte Telomer-Erosion festgestellt werden, die auch die naiven T-Zellen betraf [229]. Die Abnahme der Telomerlängen findet früh in der Krankheit statt und verändert sich im Krankheitsverlauf nicht. Dies belegt, dass die kürzer werdende Telomerlänge kein Epiphänomen der Krankheit selbst, sondern ein Zeichen der prämaternen Immunoseneszenz ist [232]. Auch für JIA-Patienten konnte in naiven T-Zellen eine signifikant kürzere Telomerlänge aufgedeckt werden [232].

Als Ursache der CD8-positiven und der **CD28**-negativen T-Zell-Expansion bei rheumatischen Erkrankungen wird eine chronische Antigenstimulation verantwortlich gemacht, wie beispielsweise durch chronische **CMV**-Infektion (siehe 1.2.4.) oder chronisch-inflammatorische Zustände [114]. RA-Patienten reagieren abnormal auf die Virusinfektionen wie CMV oder EBV, da zum einen oftmals Viren im Synovium verbleiben, zum anderen eine CMV-Seropositivität bei Rheuma mit einer pathologischen Expansion von CD28-negativen T-Zellen vergesellschaftet ist [233, 234]. Die Expansion und Akkumulation der oligoklonalen, CD8-positiven T-Zellen kann durch Defekte im Apoptose-System aufrechterhalten werden und zur Entstehung der Autoimmunerkrankung beitragen [235].

Als immunologischen Risikotyp für rheumatische Erkrankungen könnte man somit ein niedriges Level an B-Zellen, eine schlechtere T-Zell-Proliferation, eine Dysbalance zwischen CD4- und CD8-positiven T-Zellen (CD4/CD8-Verhältnis <1) und vermehrtes Auftreten von *CD8+CD28-* Zellen in Kombination mit CMV-Seropositivität bezeichnen [130].

Für JIA-Patienten konnte dieser Mechanismus in einer Studie von Prelog et al. nicht nachgewiesen werden. Es trat weder eine oligoklonale Expansion von *CD28*- Zellen auf, noch konnte der charakteristische Einfluss von latenten Virusinfektionen beobachtet werden [232]. Bei CMV-Seropositivität war die Telomerase-Aktivität der JIA-Patienten nicht beschleunigt. Das prozentuale *CD28*-Profil der JIA-Patienten ähnelte dem Profil der gesunden Vergleichspopulation [113].

Der Verlust von *CD28* und Veränderungen der Telomerlänge durch Virusinfektionen findet möglicherweise erst später im Kurs der Erkrankung statt, da oligoklonale Expansion durch eine chronische Stimulation insbesondere reife T-Zellen, und damit ältere Patienten, betrifft [143]. Die Tatsache, dass gesunde, CMV-positive Kinder eine Expansion von *CD28*- Zellen und eine tendenzielle Abnahme von naiven T-Zellen zeigten, belegt die Hypothese einer beeinträchtigten T-Zell-Homöostase und einer eingeschränkten Immunkompetenz bei JIA [232].

Es besteht weiterhin Forschungsbedarf, wie die in Studien ermittelten Mechanismen der prämaturnen Immunoseneszenz und die Defekte in der T-Zell-Homöostase zur Entwicklung der Autoimmunerkrankung beitragen. Ein mögliches Erklärungsmodell ist, dass die prämaturne Immunoseneszenz den primären Defekt darstellt, der das Immunsystem zum Versagen der Selbsttoleranz führt (siehe Abb.8).

Eine andere Möglichkeit wäre, dass die prämaturne Immunoseneszenz nur die Folge der chronischen Stimulation und Aktivierung des Immunsystems durch die Autoimmunerkrankung selbst ist [113]. Populationsbasierte Longitudinalstudien, beginnend in der frühen Kindheit, wären erforderlich, um weitere Erkenntnisse über die Autoimmunrisikofaktoren und die Ätiopathogenese aus Sicht der prämaturnen Immunoseneszenz gewinnen zu können [113].

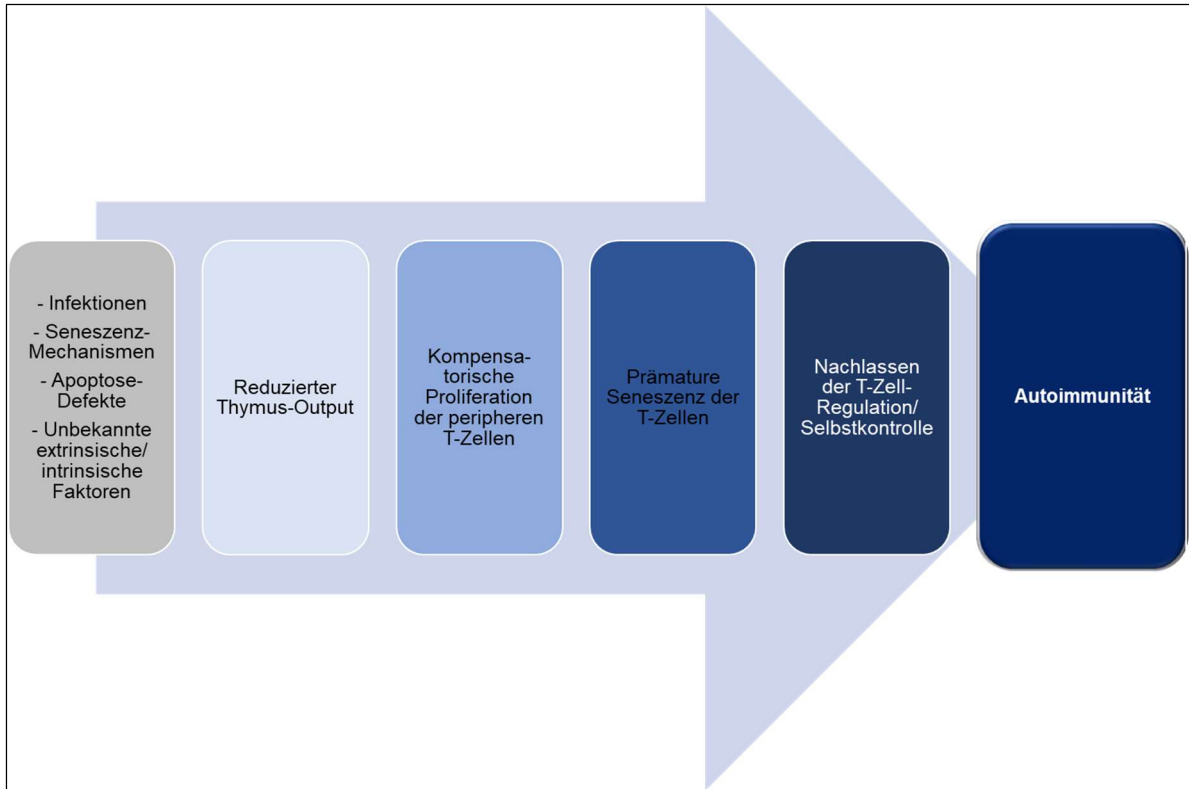


Abb.8: Erklärungsmodell für Autoimmunität anhand von prämaturre Immunoseneszenz, modifiziert nach [114]. Durch Faktoren wie Infektionen, Seneszenz-Mechanismen, Apoptose-Defekte und weitere bislang noch unbekannte ex- und intrinsische Faktoren kann der Output des Thymus reduziert werden. Kompensatorisch proliferieren die peripheren, postthymischen Zellen. Als Folge manifestieren sich Merkmale der prämaturre Immunoseneszenz, wie der Verlust von CD28, kürzere Telomerlängen und eine abnehmende TREC-Anzahl in naiven T-Zellen. Daraus könnte das Nachlassen der T-Zell-Regulation und der Selbsttoleranz und schließlich Autoimmunität resultieren.

1.3. Zielsetzung und Fragestellung dieser Arbeit

In Studien konnte eine prämaturre Immunoseneszenz bei Patienten mit JIA nachgewiesen werden, definiert durch die abnehmende Anzahl an naiven T-Zellen bei Zunahme der Memory- und Effektor-T-Zellen in Kombination mit einer nachlassenden Thymusfunktion, charakterisiert durch die RTE [143, 232]. Die kompensatorische Proliferation konnte u.a. anhand der geringeren Frequenz an TREC enthaltenden Zellen und der kürzer werdenden Telomerlängen demonstriert werden [113]. Mit der vorzeitigen Alterung des Immunsystems steigt die Morbidität und Mortalität durch altersabhängige Erkrankungen wie Karzinome, Atherosklerose, kardiovaskuläre Ereignisse, neurodegenerative und autoimmune Erkrankungen. Auch die Reagibilität auf neue Antigene wie Infektionen oder Vakzinationen ist herabgesetzt [114].

Wie anhand eines Fallberichtes gezeigt werden konnte, waren einige prämaturre Immunoseneszenz-Parameter durch die erfolgreiche Therapie eines JIA-Schubes rückläufig [236]. Dies könnte auf eine potenzielle Rekonstitutionsfähigkeit des vorzeitig gealterten Immunsystems hindeuten. In Studien konnte jedoch bisher nicht nachgewiesen werden, ob der fortschreitende Verlust der Thymusfunktion, kombiniert mit der peripheren homöostatischen Proliferation, bei Patienten mit Autoimmunerkrankung reversibel sein könnte.

In der vorliegenden Arbeit soll daher die Frage diskutiert werden, ob sich die Thymusfunktion und die periphere Homöostase des naiven T-Zell-Pools unter erfolgreicher Therapie mit einem TNF α -Inhibitor erholen kann oder zumindest eine Verlangsamung des prämaturren Seneszenz-Vorgangs erreicht werden kann.

Aus diesem Grund werden die Immunoseneszenz-Parameter (naive T-Zellen, RTE, IL-7-Level, TRECs, relative Telomerlänge, Ki-67-Expression) von JIA-Patienten unter Behandlung mit TNF α -Inhibitor beleuchtet. Zudem ist auch der Vergleich mit Patienten, die mit konventionellen DMARDs behandelt werden, und altersgleichen gesunden Kindern von Interesse, um eine Aussage über die Veränderung der Immunoseneszenz-Parameter bei TNF α -Inhibitor-Therapie treffen zu können.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Geräte

Tabelle 4 umfasst die Geräte, die für die Durchführung der Experimente verwendet wurden. Neben dem Produktnamen wird die Chargenbezeichnung (Ch.-B.) und der Hersteller des Produktes angegeben.

Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Geräte mit Produktname, Chargenbezeichnung (Ch.-B.) und Herstellerangabe.

	Produktname	Ch.-B.	Hersteller
Autoklav	DX-65	D3589	Systec GmbH, Linden, Deutschland
Dispenser	Dispenser Classic	1600005	Vitlab GmbH, Grossostheim, Deutschland
Elisa-Reader	Spectra Classic	F039200	Tecan Group AG, Männedorf, Schweiz
Flockeneisbereiter	AF 103	474-0110	Scotsman Ice Systems, Mailand, Italien
Flowzytometer	FACS Canto II	338962	BD Biosciences, New Jersey, USA
Frosty Box	Nalgene Cryo 1 °C, Freezing Container	5100-0001	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, Deutschland
Inkubator	B 5060 EK-CO2	50001834	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Kohlenstoffdioxid-Tank	CO ₂ , 10 Liter Tank, 100 Bar		Rießner-Gase GmbH, Lichtenfels, Deutschland
Kühlschränke	Liebherr 4-8 °C, CN 3866	3866-20B001	Liebherr-International AG, Bulle, Schweiz
	Liebherr Comfort - 20 °C G 3013 Index 20/001	28.084.459.2	Liebherr-International AG, Bulle, Schweiz
	Hera Freeze -80 °C	1010335	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, Deutschland

	Produktname	Ch.-B.	Hersteller
Laborpumpe	Laboport Mini	N86KN18	KNF Neuberger, Freiburg, Deutschland
Laminar Flow Hood	Gelaire BSB6A	11031	Flow Laboratories, Meckenheim, Deutschland
Magnetrührer	MR 3001	504-10000-00-1	Heidolph Instruments GmbH, Schwabach, Deutschland
Mikroskop	Wilovert S30, inverses Mikroskop	1010325	Helmut Hund GmbH, Wetzlar, Deutschland
pH-Meter	pH 523	09070190	WTW Weilheim, Oberpfalz, Deutschland
Pipetten	Research 2.5 µl	326522	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
	Research plus 10 µl, steril	492499Z	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
	Research plus 10 µl	125887A	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
	Research plus 100 µl, steril	493057Z	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
	Research plus 100 µl	129374A	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
	Research plus 200 µl, steril	379067Z	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
	Research 200 µl	238181	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
	Research 1000 µl, steril	327557	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
	Research plus 1000 µl	494528Z	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
	Multipipette Plus	F166054J 3006756	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
	Easypet	3033181	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
	PIPETBOY acu	200464	INTEGRA Biosciences GmbH, Biebertal, Deutschland
Integra PIPETBOY	F166054J	INTEGRA Biosciences GmbH, Biebertal, Deutschland	
Stickstoff	Arpege 55 – Lagerungssystem		Air Liquide, Paris, Frankreich

	Produktname	Ch.-B.	Hersteller
	Vakuum-superisolierter Flüssigstickstofftank 200-VL/R	941744	Cryoson GmbH, Schöllkrippen, Deutschland
Vortex	RetschMixer		A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Waagen	CP 1245	16208517	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
	TP 3002	09070190	Denver Instruments, Göttingen, Deutschland
Wasserbad	GFL Typ 1003	10549679	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
Zählkammer	Neubauer-Zählkammer	ZK06	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Zentrifuge	Rotanta/K	2260	Hettich Holding Beteiligungs- und Verwaltungs-GmbH, Tuttlingen, Deutschland

2.1.2. Verbrauchsmaterial

Tabelle 5 beschreibt die verwendeten Verbrauchsmaterialien und listet den Produktnamen, die Chargenbezeichnung und den Hersteller auf.

Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien mit Produktname, Chargenbezeichnung (Ch.-B.) und Herstellerangabe.

	Produktname	Ch.-B.	Hersteller
Blutentnahmesystem	EDTA-Monovette	05.1167	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
	NH4-Heparin-Monovette	02.1064	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
	Z-Gel-Monovette	03.1524	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
	Safety-Multify 21G	85.1638.235	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland

	Produktname	Ch.-B.	Hersteller
Einfrierröhrchen	Cryotubes 1.8ml	375418	Nalge Nunc International, New York, USA
Einmalpipette	Cellstar serological pipette sterile, 10 ml	607180	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Elisa Materialien	Microplate, 96 wells, high binding	655081	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
FACS Tube	FACS Round-Bottom Tubes, 5 ml, polystyrol	352008	Corning Science, Reynosa, Mexiko
Filtrerröhrchen	Falcon Round-Bottom Tubes with Cell-Strainer Cap, 5 ml, polystyrene	352235	Corning Science, Reynosa, Mexiko
Gefrierbehälter	Cryo Freezing Container	51000001	Nalgene, New York, USA
Glaspipetten	Fortuna Messpipette 5 ml, 0.05	110032404	Polten & Graf, Wertheim, Deutschland
	Fortuna Messpipette 10 ml, 0.1	110037404	Polten & Graf, Wertheim, Deutschland
	Fortuna Messpipette 20 ml, 0.1	110041402	Polten & Graf, Wertheim, Deutschland
Handschuhe	Peha Nitril Handschuhe	10146909	P. Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland
Mikroschraub-röhrchen	Microtubes, 1.5 ml	72.692.005	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen	Biosphere Filter tips, 1-10 µl	70.1130.210	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
	Biosphere Filter tips, 2-20 µl	70.760.212	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
	Biosphere Filter tips, 20-200 µl	70.760.213	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
	Biosphere Filter tips, 100-1000 µl	70.762.211	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
	Combitips advanced, 5 ml	0030 089.669	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
	Combitips plus, 50 ml	0030 069.277	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Reagiergefäße	SafeSeal 0.5 ml	72.704	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland

	Produktname	Ch.-B.	Hersteller
	SafeSeal 1.5 ml	72.706	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturplatte	Cellstar, 48 Well Cell Culture Plate, U-Bottom	677180	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zentrifugenröhrchen	Cellstar, 15 ml	188271	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
	Cellstar, 50 ml	227261	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland

Legende: EDTA: Ethylendiamin-Tetraessigsäure, NH₄: Ammonium-Ion, Safety-Multifly 21 G (G hier für Gauge, Maßeinheit für Außendurchmesser von Kanülen).

2.1.3. Chemikalien

In **Tabelle 6** sind die verwendeten Chemikalien mit Produktnamen, Katalognummer und Angabe des Herstellers zu finden.

Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Chemikalien mit Produktname, Katalognummer und Herstellerangabe.

	Produktname	Katalognummer	Hersteller
Desinfektionsmittel	Ethanol, 70 %, vergällt	T913.3	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Fertiglösung	Aqua ad iniectabilia (Aqua dest.)	152918061	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
	Isotonische Kochsalzlösung, 0.9 % NaCl (Natriumchlorid)	19KM01GB	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland
	2-Propanol, 5 Liter	20839-366	VWR Chemicals, Ratnor, USA
Feststoff	Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	A-4514	Sigma-Aldrich Corporation, Missouri, USA
	Natriumacid (NaN ₃)	S-8032	Sigma-Aldrich Corporation, Missouri, USA

	Produktname	Katalognummer	Hersteller
	Kaliumbicarbonat (KHCO ₃)	P-9144	Sigma-Aldrich Corporation, Missouri, USA
	Trypanblau	1.11732.0025	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Gase	Stickstoff, tiefkalt, verflüssigt		Rießner-Gase GmbH, Lichtenfels, Deutschland
	Kohlenstoffdioxid 4.5, Typ 10, tiefkalt, verflüssigt		Rießner-Gase GmbH, Lichtenfels, Deutschland
Medien	RPMI (Roswell Park Memorial Institute)	BE12-702F	Lonza Group AG, Verviers, Belgien
	FCS (Fetales Kälber Serum)	10270-106	GIBCO, Life Technologies, Carlsbad, USA
	Penicillin/Streptomycin Pre-Mix, Cellpure H 10.1	S06150973F	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
	FicoLite-H (Human)	GFF1511KYA	Linaris blue GmbH, Dossenheim, Deutschland
Pufferbestandteile	Bovines Serum Albumin (BSA)	A9647-100G	Sigma-Aldrich Corporation, Missouri, USA
	Dimethylsulfoxid (DMSO)	A994.2	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
	Ethylendiamin-Tetraessigsäure (EDTA)	E-5134	Sigma-Aldrich Corporation, Missouri, USA
	Phosphate-Buffered-Saline Tablets (PBS)	18912-014	GIBCO, Life Technologies, Carlsbad, USA

2.1.4. Gebrauchsfertige Lösungen

Einfrüermedium	RPMI + 20% FCS + 10% DMSO
Erythrozyten-Lysis-Puffer	8.26 g Ammoniumchlorid + 1g Kaliumbicarbonat + 0.037 g EDTA in 1 Liter Aqua destillat
FACS Puffer	0.5% BSA + 0.01% Natriumacid + 2 Tabletten PBS in 1 Liter Aqua destillat
Nährmedium	RPMI + 1% Penicillin/Streptomycin + 10% FCS

PBS	1 Tablette für 500 ml Volumen (aufgelöst in Aqua destillat)
Trypanblau	0.5% Trypanblau in 50 ml PBS

2.1.5. Gebrauchsfertige Kits

Tabelle 7 listet die gebrauchsfertigen Kits mit Produktnamen, Lot-Nummer (Lot.) und Angabe des Herstellers auf.

Tabelle 7: Auflistung der verwendeten gebrauchsfertigen Kits mit Produktname, Lot-Nummer und Herstellerangabe.

	Produktname	Lot.	Hersteller
Fixationspuffer	Cytofix	420801	BioLegend, San Diego, USA
Permeabilisierungspuffer	Cytoperm	421002	BioLegend, San Diego, USA
ELISA	HUMAN IL7 Elisa-Kit	RAB 0316-1KT	Sigma-Aldrich Corporation, St.Louis, USA

2.1.6. Antikörper

In Tabelle 8 sind die verwendeten FACS-Antikörper mit Fluorochrom, Angabe des Herstellers, Lot- und Katalognummer sowie mit Angabe des verwendeten Klons zu finden.

Tabelle 8: Auflistung der verwendeten Antikörper mit Fluorochrom-Farbe, Herstellerangabe, Lotnummer, Katalognummer und verwendetem Klon.

Antikörper	Farbe	Hersteller	Lot.	Katalognummer	Klon
Zombie Aqua™ Fixable Viability Kit	Aqua Dye BV500	BioLegend, San Diego, USA	B223424	77143	
CD4	APC	BioLegend, San Diego, USA	B136214	317416	OKT4
CD4	FITC	BioLegend, San Diego, USA	B176551	317408	OKT4
CD 4	PE	BioLegend, San Diego, USA	B142769/ B175512	317410	OKT4
CD8	APC-H7	BD Biosciences, Frankling Lakes, USA	6140812	560179	SK1
CD8	PerCP5.5	BioLegend, San Diego, USA	B238358	344710	SK1
CD25	PE-Cy7	BioLegend, San Diego, USA	B231345	302612	BC96
CD28	PE-Cy7	BioLegend, San Diego, USA	B189875	302926	CD28.2
CD31	PE-Cy7	BioLegend, San Diego, USA	B190791	303118	WM59

Antikörper	Farbe	Hersteller	Lot.	Katalognummer	Klon
CD45RA	FITC	BioLegend, San Diego, USA	B202186	304106	HI100
CD127	APC-Cy7	BioLegend, San Diego, USA	B224095	351348	A019D5
CD127	Brilliant Violet 421	BioLegend, San Diego, USA	B200827/ B226832	351310	A019D5
CCR 6 (CD196)	APC	BioLegend, San Diego, USA	B189862	353416	G034E3
CCR 6 (CD196)	PE	BioLegend, San Diego, USA	B180951	353410	G034E3
CCR7	APC-Cy7	BioLegend, San Diego, USA	B219213	353212	G043H7
CXCR3	PerCP/Cy5.5	BioLegend, San Diego, USA	B186023	353714	G025H7
TCR$\alpha\beta$	FITC	BioLegend, San Diego, USA	B189878	306706	IP26
TCR$\gamma\delta$	FITC	BD Biosci- ences, Frankling Lakes, USA	88349	347903	11F2
FoxP3	PerCP5.5	BD Biosci- ences, Frankling Lakes, USA	7076838	2561498	236A/E7
IFNγ	FITC	BioLegend, San Diego, USA	B179400	502506	4S.B3
IFNγ	PE	Miltenyi Biotec, Bergisch Glad- bach, Deutsch- land	5150112265	13005420 1	
IL-10	APC	BioLegend, San Diego, USA	B193895	506807	JES3-19F1

Antikörper	Farbe	Hersteller	Lot.	Katalognummer	Klon
IL-17	BV421	BioLegend, San Diego, USA	B231952	512322	BL168
Ki-67	APC	BioLegend, San Diego, USA	B183619	350514	Ki-67

Legende für die Fluorochrome: Allophycocyanin (APC, APC-Cy7, APC-H7), Brilliant Violet (BV421, BV500), Fluorescein-Isothiocyanat (FITC), R-Phycoerythrin (PE, PE-Cy7), Peridinin-Chlorophyll-Protein 5.5 (PerCP5.5).

2.1.7. Stimuli

Tabelle 9 nennt die verwendeten Stimuli mit Herstellerangabe und Katalognummer.

Tabelle 9: Auflistung der verwendeten Stimuli mit Katalognummer und Herstellerangabe.

Stimulus	Katalognummer	Hersteller
Ionomycin	I0634-1MG	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Brefeldin A (in Ethanol)	B6542-5MG	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) in DMSO+RPMI	P1585-1MG	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

2.1.8. Verwendete Software

- BD FACS Diva Software Version 6.1.3 (build 2009 05 13 13 29) Firmware Version 1.47 (BD FACS Canto II)
- IBM SPSS Statistics Version 22-26, Armonk, New York, USA
- Graph Pad Prism Version 6-8

2.2. Methoden

2.2.1. Rekrutierung der Patienten und Kontrollgruppe

Die prospektive Querschnittsanalyse wurde von der Ethik-Kommission (Ethikvotum Nr. AZ-239-10) der Medizinischen Fakultät der Julius-Maximilians-Universität genehmigt. Alle Patienten und Kontrollpersonen und als rechtliche Vertreter deren Sorgeberechtigte wurden in einem ausführlichen ärztlichen Gespräch und mittels eines standardisierten, übersichtlichen Aufklärungsbogens über die Inhalte der Studie sowie über die Möglichkeit der Weiterverwendung des Probenmaterials in darauffolgenden Studien aufgeklärt. Die Voraussetzung für die Verwendung des akquirierten Materials war die Unterzeichnung der Einverständniserklärung durch die Sorgeberechtigten oder die bereits volljährigen Patienten. Die Studie erfolgte nach den Kriterien der Deklaration von Helsinki 2013 [237], den Prinzipien der *Good Clinical Practice* und der *Good Laboratory Practice*.

2.2.1.1. JIA-Probanden

Die Rekrutierung der JIA-Probanden erfolgte über die kinderrheumatologische Sprechstunde des Universitätsklinikums Würzburg. Einige Probanden wurden zudem aus dem Deutschen Zentrum für Kinder- und Jugendrheumatologie in Garmisch-Partenkirchen rekrutiert. Zu den Einschlusskriterien zählten die Erfüllung der Kriterien der ILAR zur Diagnose der JIA und bei den Probanden mit TNF α -Inhibitor eine zutreffende Indikation zur Anwendung des Medikaments. Die Patienten wurden in 2 Gruppen eingeteilt: in Patienten mit einem TNF α -Inhibitor (TNFi) und in Patienten, die andere Antirheumatika, vorwiegend konventionelle DMARDs, NSAR oder keine Medikamente erhielten. Zur Vereinfachung wurde diese Gruppe als DMARD-Gruppe bezeichnet.

Neben der aktuellen Anamnese und der Krankengeschichte nach Aktenlage wurde eine klinische Untersuchung inklusive des derzeitigen Gelenkstatus erhoben. Zusätzlich eruierte Laborparameter umfassten die Entzündungsparameter

C-reaktives Protein (CRP) und Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG) sowie das aktuelle Differenzialblutbild.

Zu den Ausschlusskriterien gehörten diagnostizierte Malignome, Immundefekte, monogenetische Syndrome (wie z.B. Trisomie 21), der Zustand nach einer Thymektomie sowie eine bestehende Schwangerschaft. Patienten mit klinisch-relevanter Infektion in den letzten 8 Wochen und Impfung in den letzten 4 Wochen wurden ebenfalls ausgeschlossen.

2.2.1.2. Kontrollprobanden

Die Kontrollprobanden konnten aus immunologisch gesunden, altersgleichen Patienten der Abteilung für Kinderchirurgie der Klinik und Poliklinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie, Gefäß- und Kinderchirurgie der Universitätsklinik Würzburg rekrutiert werden. Für die gesunden Kontrollen bestanden dieselben Ausschlusskriterien wie für die JIA-Probanden. Die Blutentnahme erfolgte im Rahmen einer perioperativen Routineblutentnahme.

2.2.2. Dichtegradienten-Zentrifugation zur Isolierung der PBMCs

Zur Isolierung der sich im heparinisierten Blut befindenden peripheren mononukleären Zellen (PBMCs) wurde ein Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer angewendet. Aufgrund der unterschiedlichen Sedimentationsgeschwindigkeit der Makromoleküle in der Suspension werden die Partikel aufgrund eines Dichtegradienten nach den physikalischen Gesetzen der Sedimentation getrennt.

Nach ihrer Dichte sammeln sich leichtere Partikel oder Partikel, die eine ähnliche Dichte wie die sogenannte Ficoll-Lösung besitzen, oberhalb der Trennschicht, während schwerere Partikel, wie bspw. Erythrozyten, nach unten sinken. Oberhalb der Lymphozyten sammeln sich Thrombozyten und Blutplasma an.

Das in heparinisierten Monovetten entnommene Probandenblut wurde steril 1:1 mit 0,9% NaCl verdünnt. Anschließend wurden je 20 ml des verdünnten Blutes auf jeweils 10 ml vorgelegte Ficoll-Lösung in einem 50 ml Falcon Tube geschichtet. Die Zellsuspension wurde dann bei 1500 rpm (*revolutions per minute* = Umdrehungen pro Minute) für 25 Minuten ohne Bremse zentrifugiert. Der oberhalb der Trennlinie durch den Dichtegradienten entstandene weiße Lymphozytenring wurde nochmals mit 0,9% NaCl gewaschen. Zur Vermeidung einer Kontamination wurden die zurückgebliebenen Erythrozyten mittels 5 ml Erythrozyten-Lysis-Puffer aufgelöst. Nach der Zählung der Zellen in der Neubauer-Zählkammer wurden die so entstandenen PBMCs auf die Kryokonservierung vorbereitet.

2.2.3. Zellzählung mit Neubauer-Zählkammer

Zur Bestimmung der Zellzahl der gewonnenen PBMCs wurden 10 µL der Zellsuspension mit 90 µL Trypanblau gemischt. In einer Neubauer-Zählkammer wurde anschließend lichtmikroskopisch die Anzahl der vitalen Zellen bestimmt. Dieser Vorgang wurde erneut nach Auftauen der kryokonservierten Probe aus dem Einfriermedium wiederholt, um einen größtmöglichen Anteil an vitalen Zellen in der

Probe zu gewährleisten. Eine Zellzahl von $1,8 \times 10^6$ Zellen wurde als Grenzwert an vitalen Zellen für die weitere Verwendung vorausgesetzt.

2.2.4. Kryokonservierung

Je nach Ergebnis in der Neubauer-Zählkammer wurden umgerechnet 5×10^6 Zellen in 1 ml Einfriermedium (70% RPMI, 20% FCS, 10% DMSO) resuspendiert, bei -80 °C eingefroren und nach drei Tagen in flüssigen Stickstoff überführt.

Da insbesondere Dimethylsulfoxid (DMSO) neben der konservierenden eine, bei Raumtemperatur beschleunigte zytotoxische Wirkung besitzt [238], wurde beim Einfrier- und Auftauvorgang auf ein rasches Arbeiten und eine intermittierende Lagerung der Probe auf Eis geachtet, um möglichst repräsentative Ergebnisse der Oberflächen- und Zytokin-Marker bei möglichst hoher Prozentzahl vitaler Zellen erzielen zu können. Nach schnellem Auftauen im Wasserbad wurden die Zellen in ein Falcontube mit 10 ml erwärmten 10% FCS/RPMI gegeben und für 5 Minuten bei einer Geschwindigkeit von 1.500 rpm zentrifugiert. Das übriggebliebene Pellet wurde anschließend erneut in 1 ml 10% FCS/RPMI resuspendiert und auf eine Kulturplatte gegeben.

2.2.5. Durchflusszytometrie

Bei der Fluoreszenz-Durchflusszytometrie handelt es sich um eine Methode, die es ermöglicht, Oberflächenmoleküle oder intrazelluläre Marker und Proteine anhand von Fluoreszenz-markierten Antikörpern in einer Zellpopulation zu erfassen [119].

Die markierten Zellen werden nach Verdünnung mit einer Salzlösung durch einen Einzelzellstromkanal gepresst, an einem Laserstrahl vorbeigeleitet und gezählt. Das FACS-Gerät (engl. *fluorescence-activated cell sorter*) ist in der Lage, die Zel-

len gleichzeitig weiter zu sortieren. Durch spezifische Wellenlängen der monochromatischen Laser werden die Fluoreszenzfarbstoffe in einen Erregungszustand versetzt. Bei Rückkehr in das Ursprungsniveau werden Photonen emittiert, die von Photodetektoren registriert werden [119]. Neben dem emittierten Licht kann auch die Vorwärts- (FSC) und die Seitwärtsstreuung (SSC) detektiert werden. Über die Streuung können Aussagen über die Größe und Granularität der Zellen getroffen werden. Die Menge des emittierten Lichts ist proportional zu der gebundenen Menge an Molekülen und Zellen [239].

Durch eine elektrische Impulsladung wird der Flüssigkeitsstrahl in Tröpfchen aufgelöst, die jeweils eine geladene Zelle enthalten. Durch die Ladung wird die Zelle vom Plus- oder Minuspol angezogen und von der Hauptrichtung des Tröpfchens abgelenkt [119]. So lassen sich die Zellen weiter in Subpopulationen sortieren, die sich anhand der Zusammensetzung der Fluoreszenzmoleküle unterscheiden.

Auch die simultane Messung mehrerer Marker ist durch die Verwendung von unterschiedlichen Fluorochromen möglich, denen im FACS-Gerät individuelle, vorher definierte Emissionsspektren zugeordnet werden. Den gemessenen Spektren werden die jeweiligen Fluoreszenz-markierten Marker zugewiesen, so dass weitere statistische Untersuchungen möglich werden.

Durch ihr charakteristisches Streuungsmuster können PBMCs eindeutig von anderen Lymphozyten differenziert werden. Durch weitere Gates können Subpopulationen und Expressionsraten von Molekülen ermittelt werden. Die Messdaten werden in ein speziell entwickeltes Auswertungsprogramm übertragen und können als Histogramme, Kontur- oder Punktdiagramme abgebildet werden. Im Punktdiagramm stellt jeder Punkt eine Zelle dar. So können schließlich Zellsubpopulationen absolut oder relativ in Bezug auf die paternale Population demonstriert werden.

2.2.5.1. FACS-Färbeprotokoll

Nach Auftauen der kryokonservierten Probe im Wasserbad bei 37°C wurden die Zellen rasch in 10 ml Nährmedium (10% FCS/RPMI mit 1% Penicillin/Streptomycin) gegeben. Nach Zentrifugieren bei 1.500 rpm für 5 Minuten wurde der Überstand abgesaugt und das übriggebliebene Pellet in 1 ml Nährmedium resuspendiert und auf eine Kulturplatte gegeben.

Zur Stimulation wurden Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA), Ionomycin und Brefeldin A in das Well hinzugegeben und die Probe für 4 Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. PMA ist ein potenter Aktivator der Proteinkinase C [240]. Ionomycin, ein Calcium-Ionophor mit mitogenen Eigenschaften, wirkt, synergistisch zu PMA, aktivierend auf die Proteinkinase C ein und macht die Zellmembran durchlässiger für Calciumionen, die für die Calcium/Calmodulin-abhängigen Signalwege benötigt werden [241]. Die Proteinkinase C setzt die Translation von Proteinen und die Signalwege in Gang, die für die aktivierte Zelle notwendig sind [242]. Zudem ist die Proteinkinase C fähig, Transkriptionsfaktoren wie NFκB und Ras zu aktivieren [119]. Durch PMA und Ionomycin werden die ruhenden Zellen über IL-2 zur Proliferation und zur Zytokinproduktion angeregt [242].

Brefeldin A hemmt den Vesikeltransport vom Golgi-Apparat zum Endoplasmatischen Retikulum. Somit verbleiben die produzierten Zytokine und Transkriptionsfaktoren intrazellulär und können nach Membranstabilisierung (FixBuffer) und -perforation (PermBuffer) in der FACS-Analyse detektiert werden.

Die Zellsuspension wurde nach gründlicher Resuspension zu gleichen Teilen in 6 FACS-Tubes gegeben. Die Zellen wurden mit 1 ml PBS gewaschen und 5 Minuten bei 1.500 rpm zentrifugiert.

Für die Färbung der toten Zellen wurde das Zombie Aqua Fixable Viability Kit verwendet. Es wurde 1 µL Zombie-Färbung mit 499 µL PBS verdünnt und je 50 µL davon zu dem gewonnenen Zellpellet gegeben. In der Negativkontrolle Tube 1 wurden 50 µL PBS ohne Zombie-Färbung verwendet.

Für Tube 2 bis 6 wurden die Oberflächenantikörper (weiß hinterlegt) zu 50 µL PBS in den in Tabelle 10 aufgeführten Volumina hinzugegeben, um den für jedes Färbepanel individuellen Master-Mix vorzubereiten. Als Fluorochrome wurden Fluorescein-Isothiocyanat (FITC), R-Phycoerythrin (PE, PE-Cy7), Peridinin-Chlorophyll-Protein 5.5 (PerCP5.5), Allophycocyanin (APC, APC-Cy7, APC-H7) und Brilliant Violet (BV421, BV500) verwendet. Cy7 und H7 beschreiben Cyanin-Tandem-Fluorochrome, die nach der Antigen-Bindung eine größere Stabilität in Paraformaldehyd-Fixierung und bei Licht vorweisen als das Ursprungsfluorochrom.

Nach Vortexen wurden je 50 µL Master-Mix 1 in die Tubes pipettiert, in Tube 1 wurden stattdessen 50 µL PBS hinzugefügt. Nach erneutem Vortexen wurden die Proben für 20 Minuten bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubiert.

Anschließend erfolgte ein weiterer Waschzyklus mit Hinzugabe von 1 ml PBS, Zentrifugation (1.500 rpm für 5 Minuten) und Absaugen des Überstandes. Die Zellen wurden mit 200 µL FixBuffer immobilisiert, erneut gevortext und für weitere 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert.

Nach einem weiteren Waschzyklus wurde der Master-Mix 2, bestehend aus 50 µL PermBuffer und dem definierten Volumen der Intrazellulärfärbungen (siehe Tabelle 10, grau hinterlegt), den Zellpellets hinzugefügt und gevortext. Durch den PermBuffer werden die Zellwände für die intrazellulären Färbungen permeabel gemacht. Die Proben wurden erneut für 20 Minuten bei Raumtemperatur und Dunkelheit inkubiert. Nach einem letzten Waschvorgang wurden die Zellen mit jeweils 200 µL FACS-Puffer resuspendiert und der Messung zugeführt.

Für die Messung im FACS Canto II wurden konstante Gates eingerichtet. Es wurden ausschließlich die lebenden Zellen verwendet, definiert durch die Gate-Inversion der Zombie-positiven Zellen.

Tabelle 10: Färbepanel für die FACS-Analyse.

	FITC	PE	PerCP5.5	APC	APC-Cy7	APC-H7	BV421	PE-Cy7	BV500
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	CD45RA 0,6 µL	IFN γ 0,2 µL	CD8 0,3 µL	CD4 0,3 µL	CCR7 0,3 µL	-	IL-17 0,3 µL	CD28 0,5 µL	Zombie
3	CD4 0,3 µL	CCR6 0,3 µL	FoxP3 0,3 µL	IL-10 0,3 µL	-	CD8 0,3 µL	CD127 0,3 µL	CD25 0,3 µL	Zombie
4	IFN γ 0,3 µL	CD4 0,5 µL	CXCR3 0,5 µL	CCR6 0,3 µL	-	CD8 0,3 µL	IL17 0,3 µL	CD31 0,3 µL	Zombie
5	TCR $\alpha\beta$ 1,0 µL	CD4 0,5 µL	CD8 0,3 µL	Ki-67 0,3 µL	CD127 0,3 µL	-	IL-17 0,3 µL	CD31 0,3 µL	Zombie
6	TCR $\gamma\delta$ 1,0 µL	CD4 0,5 µL	CD8 0,3 µL	Ki-67 0,3 µL	CD127 0,3 µL	-	IL-17 0,3 µL	CD31 0,3 µL	Zombie

In Tabelle 10 sind die Fluorochrome mit den verwendeten Antikörpern und µL-Angaben in den FACS-Tubes 1 bis 6 aufgelistet. Grau hinterlegt sind hierbei die intrazellulären Färbungen, weiß die Oberflächenfärbungen.

2.2.6. ELISA

ELISA (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*) beschreibt einen enzymgekoppelten Immunabsorptionstest, wobei das farblose Produkt nach Bindung des Antikörpers oder Antigens an das Enzym einen detektierbaren Farbumschlag aufweist [119]. Das Enzym wird chemisch an den aufgereinigten Antikörper gekoppelt, der in Bindungsreaktion mit dem Antigen tritt, das an den Wells einer Mikroplatte befestigt wurde. Diese Bindung führt zu einem Farbumschlag des gekoppelten Enzyms. Nicht-gebundene Antikörper werden durch Waschen entfernt. Eine Sicherheit der validen Auswertung bietet eine weitere Antikörperschicht, die gegen die Enzym-gekoppelte Schicht gerichtet ist. So kann eine Verfälschung des Experiments durch Bindung von nicht-markierten Antigenen an nicht-markierte Antikörper minimiert und das messbare Signal verstärkt werden.

ELISA ist ein serologischer Test, der insbesondere in der Virologie oder bei der Bestimmung von zirkulierenden Zytokinen als Sandwich-ELISA Verwendung findet. Bei der **Sandwich-ELISA** wird der Antigen-spezifische Antikörper an dem Träger befestigt, der das Antigen - in dieser Arbeit das Zytokin IL-7 - mit hoher

Affinität bindet [119]. Ein weiterer Antikörper, der an ein anderes Epitop des Antigens bindet, erlaubt dann den Nachweis des Antigens.

2.2.6.1. IL-7-Sandwich-ELISA

Am 1. Tag des Experiments wurde die 96-Well-Mikroplatte mit dem IL-7 Antikörper beschichtet, indem der Coating Buffer mit dem Antikörper in einer Konzentration von 0,5 mg/ml vermischt wurde. Je 50 μ L wurden in jedes Well pipettiert und bei 4°C über Nacht inkubiert.

Am 2. Tag wurde die Platte dreimalig mit 300 μ L Wash Solution gewaschen und anschließend, nach Blockade mit je 100 μ L Blocking Solution aus dem ELISA-Kit, für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Blocking-Solution wurde abgekippt.

Sodann wurden je 100 μ L des Patientenserums und der Standardlösung in die Wells gegeben. Eine Verdünnungsreihe wurde nach Herstellerangabe generiert. Zuvor wurden 400 μ L PBS in jedes Tube der Verdünnungsreihe vorgelegt (Abb.9). Darauffolgend wurde die Mikroplatte 2,5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Lösung wurde entfernt und viermal mit 300 μ L Wash Buffer mittels Dispenser gewaschen. Die Platte wurde invertiert und gegen Papiertücher geklopft, um mögliche Rückstände zu entfernen. Im nächsten Schritt wurden 100 μ L des detektierenden Antikörpers in Verdünnung mit Biotin in jedes Well hinzugegeben.

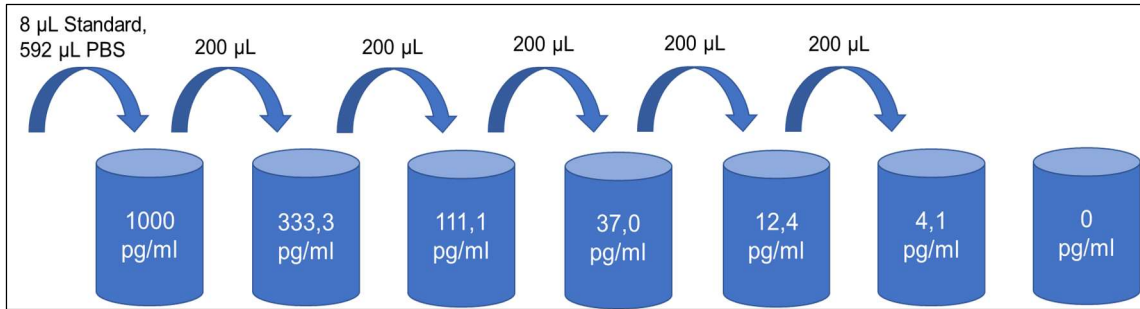


Abb.9: Herstellung der Verdünnungsreihe nach Herstellerangabe (eigene Abbildung). In das erste Tube wurden 8 µL Standard zu 592 µL PBS gegeben, um eine Konzentration von 1000 pg/ml zu erzielen. In Tube 2 bis 6 wurden jeweils 400 µL PBS vorgelegt. Zur Herstellung der Verdünnungsreihe wurde aus jedem Tube nach gründlicher Resuspension jeweils 200 µL entnommen und dem Tube der nächsten Verdünnungsstufe hinzugegeben. Das 6. Tube enthält nur PBS.

Nach einer Stunde Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Lösung abgekippt und erneut viermal mit 300 µL Wash Buffer gewaschen. Danach wurden 100 µL Streptavidin/HRP-Reagenz (*horseradish peroxidase*) zu jedem Well hinzugegeben. Die Wells wurden bedeckt und erneut 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem viermaligem Waschen wurden 100 µL TMB Peroxidase (Tetramethylbenzidin) jedem Well zugefügt und das Material für weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert, bis ein Farbumschlag zu sehen war. Zum Stoppen der Reaktion wurde jedem Well 50 µL Stop Solution zugesetzt.

Die Messung erfolgte sofort bei einer optischen Densität von 450 nm, die Referenzmessung bei 620 nm. Anhand der Messwerte der Standardverdünnung und der zugehörigen optischen Absorbanzwerte wurde eine lineare Gleichung errechnet, um jedem Messergebnis eine Konzentration zuordnen zu können. Jede Probe und jeder Standard wurden dupliziert gemessen und der Mittelwert der Messwerte gebildet, um möglichst exakte Ergebnisse zu erzielen.

2.2.7. Quantifizierung der TRECs

Die DNA der TRECs wurde nach dem Studienprotokoll von Prelog et al. [143] in den PBMCs mittels des QIAamp DNA Mini Kits (Quiagen, Chatsworth, Kalifornien) bestimmt. Die DNA wurde mittels Ethanol-Präzipitation für 30 Minuten bei -20°C gereinigt, wobei 0,4 mol/L Lithiumchlorid und das 2,5-fache Volumen an 100-prozentigem Ethanol vermengt wurden. Nach dem Zentrifugieren wurde das Pellet zweimal mit 70-prozentigem Ethanol gewaschen. So konnten möglicherweise verbleibende Salze entfernt werden. Anschließend wurde das Pellet in Nuklease-freiem Wasser gelöst. Die DNA wurde konserviert und per Eilversand in das korrespondierende Labor der Arbeitsgruppe Prof. Schmidt, Hämatologie der Universitätsklinik Greifswald, versandt, wo die Proben weiterverarbeitet wurden.

Zur Messung der TREC-Konzentration wurde dort die quantitative *SYBR Green* real-time Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) eingesetzt, zusammen mit einem iCycler reverse Transkriptase System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornien). Als Primer wurde $\delta\text{rec}/\psi\alpha$ (5'-CAC-ATC-CCT-TTC-AAC-CAT-GCT-3' [forward] und 5'-GCC-AGC-TGC-AGG-GTT-TAG-G-3' [reverse]) angewandt. Das RAG2-Gen (engl. *recombination activating gene*) wurde als Referenzgen verwendet, um die quantitative gemessene DNA interpretieren zu können [243].

Zu 0,5 µg DNA wurden die Primer und der *SYBR Green* Supermix zu einem Gesamtvolumen von 25 µL vermengt. Die PCR-Messung wurde zweifach durchgeführt. Zur Quantifizierung der TREC-Menge wurde die \log_2 Verdünnung des internen Standards verwendet und in Relation zu 10.000 PBMCs berechnet [143].

2.2.8. Analyse der Telomerlängen

Die Telomerlänge wurde aus der extrahierten DNA (siehe 2.2.7.) durch quantitative PCR gewonnen, wie von Cawthon beschrieben [244]. Der Probenversand der konservierten DNA erfolgte an die Universitätsklinik Innsbruck, Dr. Leierer, wo sie analysiert wurde. Die relative Länge der Telomere wurde durch das Verhältnis von spezifischen Telomer-Primern, die zur Hybridisierung von TTAGGG- and CCCTAA-Repeats synthetisiert wurden, zu einer Einzelkopie des Gens berechnet [143, 232].

2.2.9. Statistische Analyse

Zur Berechnung der Signifikanzniveaus zwischen den Gesunden, den JIA-Patienten, die mit konventionellen DMARDs behandelt wurden (DMARD-Gruppe) bzw. die einen TNF α -Inhibitoren erhielten (TNFi-Gruppe), wurde der nicht-parametrische Mann-Whitney U Test für zwei unabhängige stetige Stichproben verwendet. Zuvor wurde auf Normalverteilung mit dem Shapiro-Wilks-Test getestet. Es wurden jeweils die Signifikanzen zwischen den Gesunden und den DMARD-Patienten, den Gesunden und den TNFi-Patienten und zwischen beiden Patientengruppen ermittelt. Normalverteilte unabhängige stetige Variablen mit vergleichbarer Varianz wurden mit dem Student-t-Test verglichen. Zur Vermeidung des Fehlers auf multiples Testen wurde die Benjamini Hochberg-Korrektur eingesetzt. Der Vergleich zwischen dichotomen Variablen erfolgte mit dem χ^2 Test bzw. bei Gruppengröße kleiner 60 mit dem Fisher's Exacta Test. Des Weiteren wurden schrittweise rückwärts multiple lineare Regressionsanalysen errechnet, um die Einflussstärke der klinischen Merkmale auf die Ergebnisse der Experimente nachzuweisen. p-Werte $\leq 0,05$ wurden als signifikant und $p \leq 0,001$ als hochsignifikant definiert.

3. Ergebnisse

3.1. Charakterisierung der Probanden

3.1.1. Patientencharakteristika

Die Studienkohorte ist in Tabelle 11 gezeigt. Zu den rekrutierten Patienten zählten 38 Patienten mit diagnostizierter JIA, darunter 12 Jungen und 26 Mädchen zwischen 3,0 und 19,8 Jahren. Das durchschnittliche Alter betrug 13,6 Jahre. Zum Zeitpunkt der Blutentnahme zeigte sich eine durchschnittliche Krankheitsdauer von 6,3 Jahren.

Bei 17 JIA-Patienten manifestierte sich eine Aktivität der Krankheit mit einer Beteiligung mindestens eines Gelenkes, 21 Patienten waren in Remission. Der häufigste JIA-Subtyp war die Oligoarthritis, gefolgt von der seronegativen Polyarthritis und der unklassifizierten JIA (Tabelle 13).

Abb.10 zeigt die prozentuale Verteilung der JIA-Typen in beiden Medikamentengruppen (DMARD, TNFi) in Bezug auf die JIA-Gesamtkohorte.

Zur weiteren Differenzierung des Einflusses von TNF α -Biologika erfolgte eine Unterteilung in 26 JIA-Patienten, die eine Medikation mit konventionellen DMARDs, NSAR bzw. keine feste Medikation erhielten (DMARD-Gruppe), und 12 Patienten mit zusätzlichem TNF α -Inhibitor (TNFi-Gruppe). Zum Untersuchungszeitpunkt nahmen 81,6 % der Patienten regelmäßig Medikamente ein.

Zwischen den beiden Patienten-Gruppen konnte weder in Bezug auf das Alter noch auf die Krankheitsdauer ein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Tabelle 11: Werteverteilung der Altersparameter der JIA-Gesamtkohorte.

	JIA		HC		
	Mean ± SD; Median (Min-Max; P25/P75)		Mean ± SD; Median (Min-Max; P25/P75)		p-Wert
Alter bei Blutentnahme [Jahre]	13,6 ± 4,5; 15,0 (3,0-19,8; 10,3/16,6)		11,3 ± 4,2; 9,7 (6,1-19,5; 7,4/15,0)		0,071
Alter bei ED [Jahre]	7,3 ± 5,1; 6,5 (0,3-17,4; 2,7/11,6)		-		-
Krankheitsdauer [Jahre]	6,3 ± 5,4; 5,2 (0,1-17,2; 1,7/10,6)		-		-
Geschlecht	N	%	N	%	0,002
männlich	12	31,6	18	72,0	
weiblich	26	68,4	7	28,0	

Die Tabelle 11 zeigt das Alter bei Blutentnahme, bei Erstdiagnose (ED) und die Krankheitsdauer im Mittelwert ± Standardabweichung (Mean ± SD), Median, Minimum bis Maximum sowie die Interquartilenrange (Perzentilen P25 und P75) für die JIA-Gesamtkohorte und die Altersverteilung der Gesunden. Die Unterschiede der Altershäufigkeiten wurden nach exaktem Test nach Fisher berechnet, beim Geschlecht wurde der Student-t-test für 2 unabhängige Stichproben zwischen JIA und HC verwendet, wobei die Häufigkeiten für JIA in Tabelle 13 zu finden sind.

Tabelle 12: Messwerte der Laborparameter.

	JIA		HC		
	Mean±SD; Median (Min-Max; P25/P75)		Mean±SD; Median (Min-Max; P25/P75)		p-Wert
BSG [mm/h]	11,4 ± 12,7; 6,5 (2,0-67,0; 4,8/15,0)		-		-
CRP [mg/dl]	0,15 ± 0,30; 0,03 (0,0-1,61; 0,0/0,17)		-		-
Leukozyten (x10³/µL)	7,8 ± 2,3; 7,1 (2,9-13,8; 6,4/9,1)		6,5 ± 2,8; 6,2 (3,8-14,1; 4,3/7,2)		0,010
Lymphozyten (x10³/µL)	2,7 ± 1,4; 2,5 (1,0-9,0; 2,1/2,8)		2,3 ± 0,9; 2,4 (1,3-5,0; 1,5/2,9)		0,326
Lymphozyten relativ (% der Leukozyten)	34,3 ± 12,0; 34,7 (13,0-74,9; 27,9/41,5)		36,6 ± 7,3; 37,8 (21,0-49,4; 33,3/40,8)		0,384

In Tabelle 12 werden die Messwerte der Laborparameter BSG (mm/h), CRP-Wert (mg/dl), absolute Leukozyten- und Lymphozytenzahl (x10³/µL) und die relative Lymphozytenzahl (Prozent der absoluten Leukozytenzahl) aufgeschlüsselt. Es wird der Mittelwert mit der

Standardabweichung (Mean \pm SD), der Median, minimaler und maximaler Wert sowie die Interquartilenrange angegeben. Der p-Wert wurde nach Mann-Whitney U zwischen HC und JIA berechnet.

3.1.1.1. Charakteristika der DMARD-Gruppe

Wie aus Tabelle 13 und Tabelle 14 zu entnehmen, setzte sich die DMARD-Population aus 9 männlichen und 17 weiblichen Patienten zwischen 3,0 und 19,5 Jahren zusammen, das durchschnittliche Alter war 13,1 Jahre. Die Krankheitsdauer betrug im Durchschnitt 5,8 Jahre.

26,9% der DMARD-Patienten waren ohne feste Medikation. Am häufigsten wurden NSAR verordnet, gefolgt von MTX und Glukokortikoiden (GC) mit einer Dosis von 0,02 bis 0,28 mg/kgKG pro Tag. Die DMARD-Patienten erhielten zu 30,7% eine Kombinationstherapie. 15,4% nahmen eine Kombinationstherapie aus MTX und einem NSAR ein, 11,5% eine Kombination aus GC, MTX und NSAR, und 3,8% ein NSAR zusammen mit einem GC. Die Dosis der GC lag außer bei einem Patienten oberhalb der Äquivalenzdosis von 0,1 mg/kgKG pro Tag. Bei langfristig notwendiger Therapie erfolgte die zusätzliche Einnahme von Vitamin D3 und Calcium zur Prophylaxe einer Osteoporose.

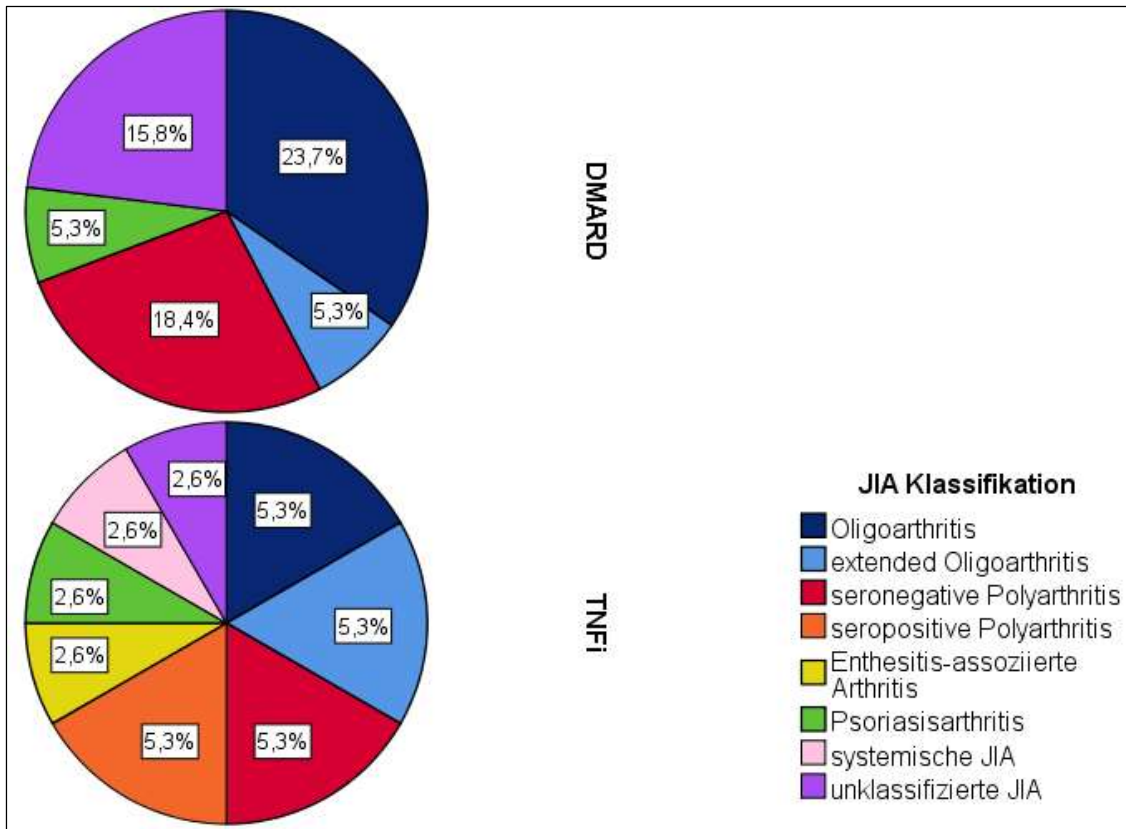


Abb.10: Graphische Darstellung der JIA-Verteilung in der DMARD- und TNF α -Inhibitor-Gruppe. Dargestellt ist die prozentuale Verteilung der JIA-Subtypen der DMARD-Gruppe (n=26) und TNF α -Inhibitor-Gruppe (n=12), bezogen auf die JIA-Gesamtpopulation (n=38).

Tabelle 13: Charakterisierung der JIA-Patientenkohorte.

	<u>Gesamt</u>		<u>DMARD-Gruppe</u>		<u>TNFα-Inhibitor-Gruppe</u>		<u>p-Wert</u>
	N	%	N	%	N	%	
Geschlecht							0,714
männlich	12	31,6	9	34,6	3	25,0	
weiblich	26	68,4	17	65,4	9	75,0	
Subtyp	N	%	N	%	N	%	0,521
Oligoarthritis	11	36,8	9	34,6	2	16,7	
Extended Oligoarthritis	4	10,5	2	7,7	2	16,7	
Seronegative Polyarthritis	9	23,7	7	26,9	2	16,7	
Seropositive Polyarthritis	2	5,3	0	0,0	2	16,7	
Enthesitis-assoziierte Arthritis	1	2,6	0	0,0	1	8,3	
Psoriasis-Arthritis	3	7,9	2	7,7	1	8,3	
Systemische JIA	1	2,6	0	0,0	1	8,3	
Unklassifizierte JIA	7	18,4	6	23,1	1	8,3	
Laborparameter	N	%	N	%	N	%	
ANA positiv	27	75,0	19	73,1	8	80,0	1,000
BSG \leq 10 mm/h	23	67,6	19	79,2	4	40,0	0,045
BSG $>$ 10 mm/h	11	32,4	5	20,8	6	60,0	
CRP \leq 0.5 mg/dl	34	91,9	24	92,3	10	90,9	0,665
CRP $>$ 0.5 mg/dl	3	8,1	2	7,6	1	9,1	
RF positiv	1	4,8	0	0,0	1	14,3	0,333
Aktivität	N	%	N	%	N	%	
Aktive Erkrankung	17	44,7	10	38,5	7	58,3	0,307
Remission	21	55,3	16	61,5	5	41,7	
Medikation	N	%	N	%	N	%	
Ohne Medikation	7	18,4	7	26,9	-	0,0	0,074
NSAR	20	52,6	15	57,7	5	41,7	0,489
MTX	19	50,0	11	42,3	8	66,7	0,295
GC	6	15,8	4	15,4	2	16,7	1,000
Leflunomid	1	2,6	-	0,0	1	8,3	0,316
TNF α -Inhibitor	12	31,6	-	0,0	12	100,0	
-> Etanercept	6	15,7			6	50,0	
-> Adalimumab	5	13,2			5	41,7	
-> Infliximab	1	2,6			1	8,3	

In Tabelle 13 werden die Anzahl (N) und die Prozentwerte (%) des Geschlechts, der JIA-Subtypen, der erhobenen Laborparameter (Antinukleärer Antikörper (ANA) positiv: $>$ 1:80, BSG (mm/h) in 2 Gruppen (\leq oder $>$ 10 mm/h), CRP-Wert (mg/dl) in 2 Gruppen (\leq oder $>$ 0.5 mg/dl),

Rheumafaktor (RF) positiv: > 30 U/ml), der Krankheitsaktivität (Aktivität definiert als Symptomatik in mindestens einem Gelenk) und der verabreichten Medikation für alle Patienten mit JIA (Gesamt) und für die beiden Krankheitsgruppen (DMARD, TNFi) aufgeführt. Die Unterschiede der Häufigkeiten wurden nach exaktem Test nach Fisher berechnet. Dosierung der Medikamente: NSAR (Ibuprofen (20-40 mg/kgKG/d), Naproxen (10-15 mg/kgKG/d)), MTX (10-20 mg/m² KOF/Woche), Leflunomid (10-20 mg/d), Etanercept (0,8 mg/kgKG/Woche), Adalimumab (20-40 mg alle 2 Wochen), Infliximab (5-10 mg/kgKG/Monat).

3.1.1.2. Charakteristika der TNF α -Inhibitor-Population

Zu den JIA-Patienten mit TNF α -Inhibitor zählten 12 Patienten (männlich=3, weiblich=9) zwischen 6,0 und 19,8 Jahren und mit einem durchschnittlichen Alter von 14,6 Jahren (Tabelle 13, Tabelle 14). Die Krankheitsdauer lag durchschnittlich bei 7,3 Jahren.

50,0% der Patienten nahmen Etanercept ein, 41,7% Adalimumab und 8,3% Infliximab. Die Dauer der TNF α -Inhibitor-Einnahme umfasste 0,1 bis 5,9 Jahre. Zwei Drittel der Patienten nahmen zusätzlich noch MTX ein, zu 41,7% wurde ein NSAR verordnet. Die GC-Einnahme erfolgte zu 16,7% (0,04-0,62 mg/kgKG/d) in einer Kombination mit einem NSAR und MTX bzw. Leflunomid. Die Kombination von MTX und einem NSAR konnte bei 16,7% der Patienten beobachtet werden.

Tabelle 14: Verteilung von Alter bei Blutentnahme und Erstdiagnose sowie Krankheitsdauer bei beiden Medikamentengruppen.

	DMARD	TNFi	
	Mean \pm SD; Median (Min-Max; P25/P75)	Mean \pm SD; Median (Min-Max; P25/P75)	p-Wert
Alter bei Blutentnahme [Jahre]	13,1 \pm 4,3; 14,7 (3,0-19,5; 10,0/16,2)	14,6 \pm 5,0; 16,4 (6,0-19,8; 10,2/18,7)	0,356
Alter bei ED [Jahre]	7,4 \pm 5,1; 7,2 (0,3-17,3; 2,7/11,6)	7,3 \pm 5,3; 5,9 (0,3-17,4; 2,6/11,7)	0,960
Krankheitsdauer [Jahre]	5,8 \pm 5,7; 3,5 (0,1-15,7; 1,4/12,8)	7,3 \pm 4,6; 6,5 (1,3-17,2; 4,7/9,3)	0,422

Tabelle 14 zeigt das Alter bei Blutentnahme, bei Erstdiagnose (ED) und die Krankheitsdauer im Mittelwert \pm Standardabweichung (Mean \pm SD), Median, Minimum bis Maximum sowie die Interquartilenrange. Der p-Wert wurde zwischen der DMARD-Gruppe und der TNFi-Gruppe anhand der zweiseitigen Signifikanz des Student-t-Tests berechnet.

3.1.2. Charakteristika der Kontrollgruppe

Die gesunde Kontrollgruppe umfasste 25 Probanden zwischen 6,1 und 19,5 Jahren und einem durchschnittlichen Alter von 11,3 Jahren. Der Mittelwertvergleich des Alters zwischen Kontrollgruppe und JIA-Kohorte ergab keinen statistischen Unterschied (Tabelle 11). Im Gegensatz zur JIA-Kohorte setzte sich die Gruppe der Gesunden aus vorwiegend männlichen Probanden zusammen. Rekrutiert wurden Kinder, die sich ambulant zur Abklärung anderer nicht-immunologisch oder -allergologisch bedingter Krankheiten vorstellten sowie präoperativ vor urologischen oder orthopädischen Eingriffen.

In den folgenden Kapiteln wird auf die Immunoseneszenz-Parameter auf zellulärer und Zytokin-Ebene in den unterschiedlichen Gruppen systematisch eingegangen.

3.2. CD4-positive Subpopulationen

In den folgenden Kapiteln werden die FACS-Datensätze in Form von Streudiagrammen präsentiert und in die 3 Gruppen Gesunde (HC, n=17), JIA-Patienten der DMARD-Gruppe (n=22) und Patienten mit TNF α -Inhibitor-Medikation (TNFi, n=12) unterteilt. Jeder Punkt stellt hierbei den Datensatz eines Probanden dar, zumeist den prozentualen Anteil der untersuchten Zellpopulation an der Gesamtpopulation. Die lange horizontale Linie steht für den Median der Variable, die beiden kürzeren horizontalen Linien für die Interquartilen (Perzentilen P25 und P75).

Die CD4-positiven Lymphozyten waren signifikant häufiger bei den JIA-Patienten mit DMARD-Medikation anzutreffen als bei der Gruppe der gesunden Probanden (Abb.11, Abb.13a,d,f).

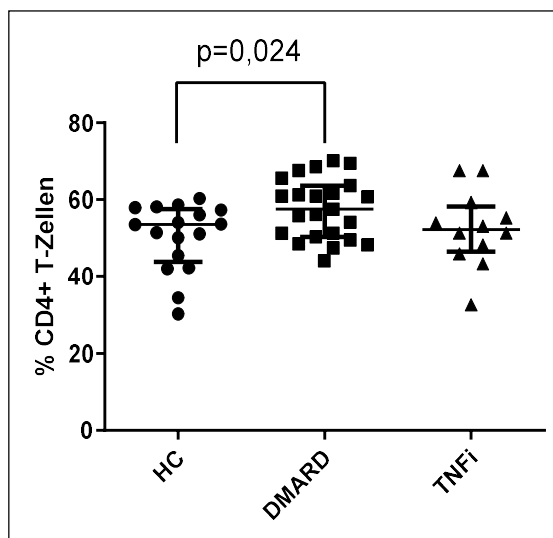


Abb.11: Proportionale Verteilung der CD4-positiven T-Zellen in HC, DMARD und TNFi. Prozentualer Anteil der CD4-positiven T-Zellen in den Gesunden, den JIA-Patienten der DMARD- und der TNFi-Gruppe.

In Abb.12 ist veranschaulicht, wie die T-Zell-Subpopulationen in der FACS Diva Software definiert wurden. In Abb.13 sind für je einen Probanden aus jeder Gruppe repräsentative FACS-Punktdiagramme dargestellt. Als charakterisierende Oberflächenmarker dienten CD45RA, CD28 und CCR7, wie in Abb.4 beschrieben. CD45RA wurde als membranständige Tyrosinphosphatase, CD28 als co-stimulierendes Molekül und CCR7 als Lymphknoten-Homing-Rezeptor verwendet. Naive T-Zellen differenzieren sich nach Antigenkontakt weiter zu Effektorzellen. Nach Ende der Immunantwort werden sie – als Teil des immunologischen Gedächtnisses - zu Memoryzellen.

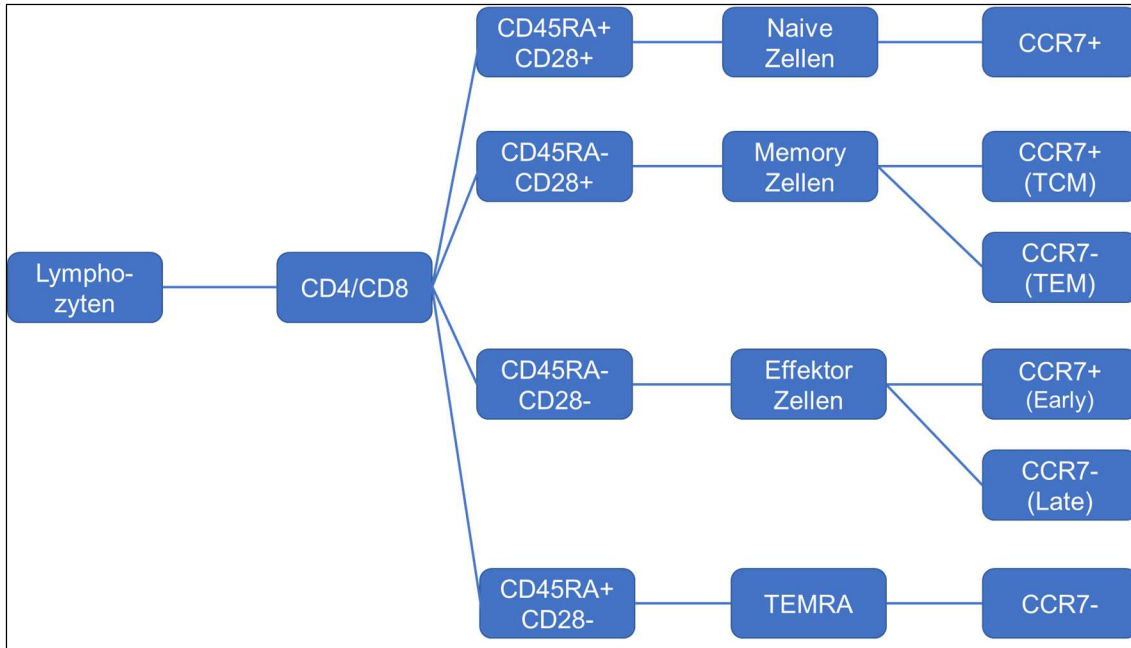


Abb.12: FACS Gating-Strategie für die Subpopulationen. In der Abbildung ist dargestellt, wie anhand der Ausprägung der Oberflächenmarker CD45RA, CD28 und CCR7 die Subpopulationen definiert und mittels der FACS Diva Software weiter untersucht wurden. Als Fluorochrome wurden CD4 APC, CD8 PerCP5.5, CCR7 APC-Cy7 und CD28 PE-Cy7 verwendet. Die Werte werden als Prozente der Parent-Generation bzw. bei CCR7 der Grandparent-Generation (also in Bezug auf CD4/CD8) angegeben.

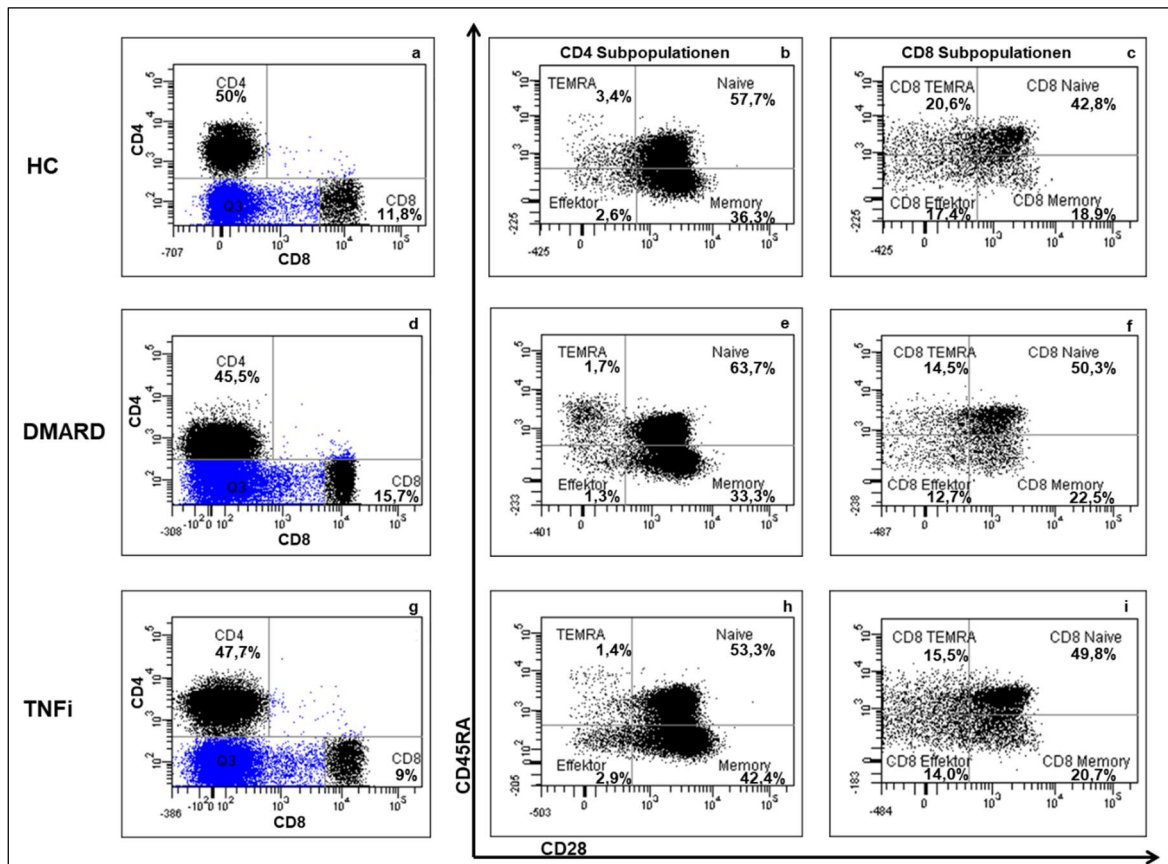


Abb.13a-i: Repräsentative FACS-Punktdiagramme für die CD4-positiven (b,e,h) und CD8-positiven (c,f,i) Subpopulationen in HC, DMARD und TNFi. FACS-Dotplots von 3 repräsentativen Probanden der Gesunden (a-c), der JIA-Patienten der DMARD-Gruppe (d-f) und der JIA-Patienten der TNFi-Gruppe (g-i). Nach Gate-Inversion der Zombie-positiven PBMCs (Daten nicht gezeigt) wurden die Zellen nach Expression von CD4 und CD8 untersucht und die jeweils positiven Zellen - mit Ausschluss der CD4-/CD8-doppelpositiven Zellen - nach Auftreten der Marker CD28 und CD45RA weiter differenziert. Naive Zellen definierten sich durch *CD28+ CD45RA+*, Memory als *CD28+ CD45RA-*, Effektor durch *CD28- CD45RA-* und TEMRA durch *CD28- CD45RA+*.

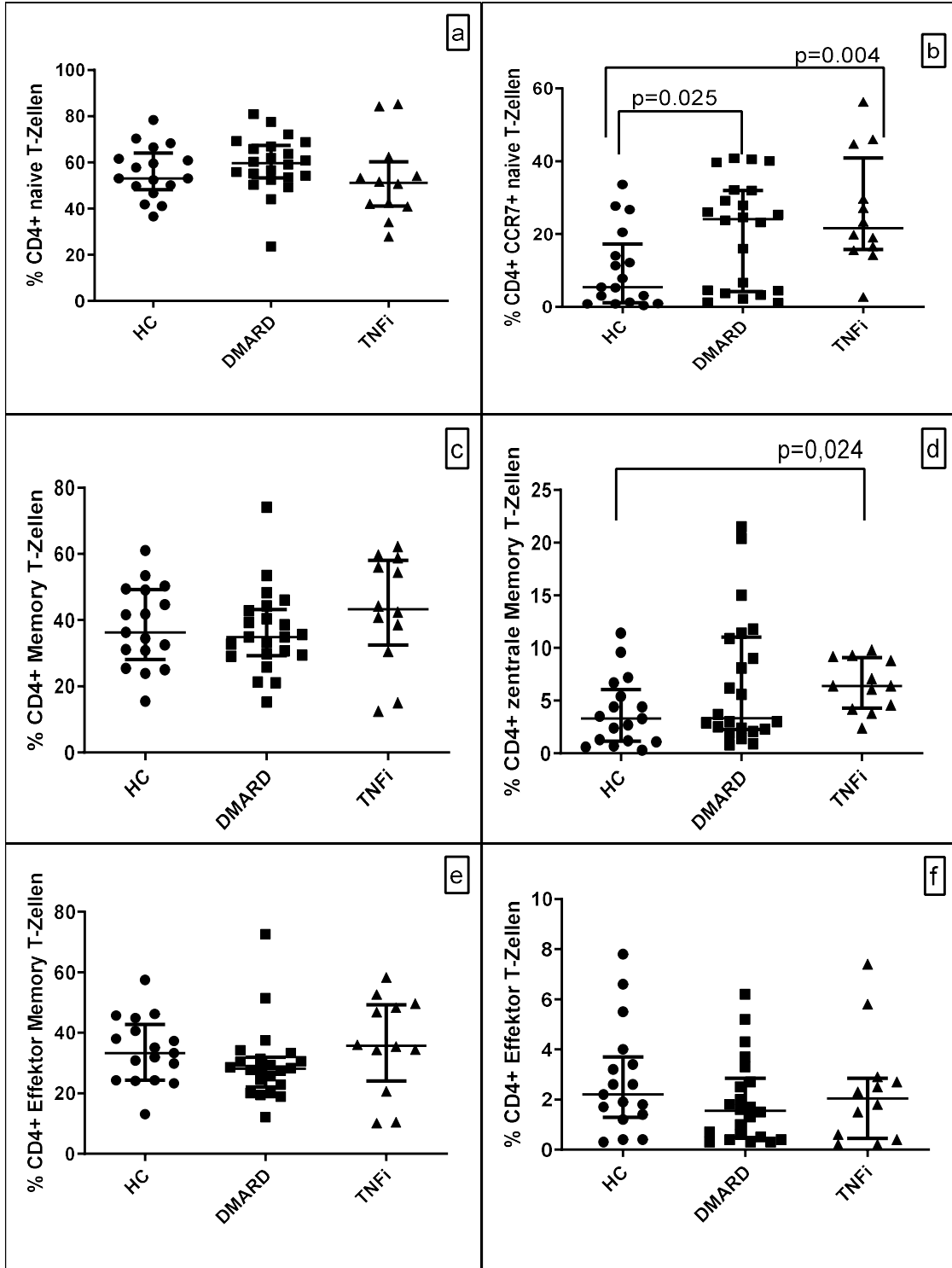
Naive T-Zellen: die CD4-positiven, naiven T-Lymphozyten wiesen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen auf, jedoch zeigte die TNFi-Gruppe tendenziell weniger naive T-Zellen als die Gesunden und die DMARD-Gruppe (Abb.13b,e,h; Abb.14a). Die CD4-positiven, CCR7-positiven, naiven T-Lymphozyten waren sowohl bei den JIA-Patienten der DMARD-Gruppe, als auch den Patienten mit TNF α -Inhibitor in signifikant größerer Anzahl vorhanden als bei den Gesunden (Abb.14b).

Memory-T-Zellen: die CD4-positiven Memory-T-Lymphozyten unterschieden sich zwischen den Gruppen nicht signifikant, jedoch zeigten die TNFi-Patienten tendenziell mehr Memoryzellen als die DMARD-Gruppe (Abb.13b,e,h; Abb.14c). Die CD4-positiven, zentralen Memory-T-Zellen traten in der Patienten-Gruppe mit TNF α -Inhibitor signifikant mehr auf als in der gesunden Vergleichspopulation (Abb.14d). Bei den CD4-positiven Effektor-Memory-T-Lymphozyten konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen beobachtet werden (Abb.14e).

Effektor-T-Zellen: bei den CD4-positiven Effektor-T-Lymphozyten zeigten sich keine Signifikanzen zwischen den Gruppen, ebenso bei den *Early* und *Late* Effektor-T-Zellen (Abb.13b,e,h; Abb.14f-h). Die Mediane dieser Zellen lagen in der DMARD-Gruppe dennoch deutlich unter den Medianen der Gesunden und der TNFi-Gruppe.

TEMRA T-Zellen: weder die CD4-positiven TEMRA-T-Lymphozyten noch die TEMRA-Zellen, die CCR7 negativ waren, unterschieden sich zwischen den 3 Gruppen signifikant (Abb.13b,e,h; Abb.14i,j). Auch hier konnte bei Betrachtung der Mediane eine niedrigere Tendenz bei der DMARD-Gruppe erkannt werden.

In Tabelle 15 (siehe Appendix III.1.) werden die Häufigkeiten der Subpopulationen in den unterschiedlichen Gruppen sowie deren Signifikanzen präsentiert.



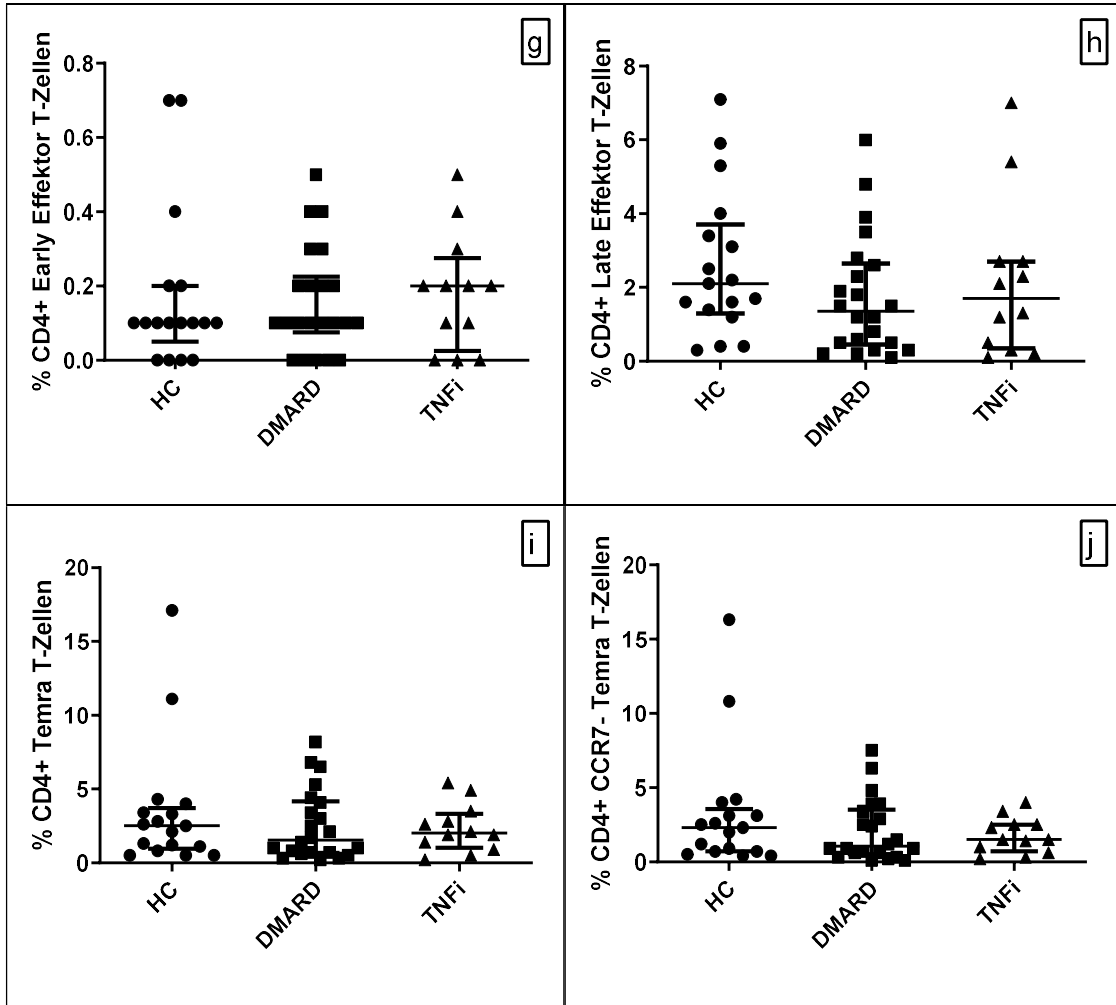


Abb.14a-j: Proportionale Verteilung der CD4-positiven Subpopulationen in HC, DMARD und TNFi. Prozentualer Anteil der CD4-positiven T-Zellen unterteilt in die Subpopulationen in den Gesunden, den JIA-Patienten der DMARD- und der TNFi-Gruppe.

a-b) CD4-positiv, naive (a) und CCR7-positiv, naive T-Zellen (b)

c-e) CD4-positiv Memory-T-Zellen (c), zentrale (d) und Effektor-Memory-T-Zellen (e)

f-h) CD4-positiv Effektor-T-Zellen (f), *Early* (g) und *Late* Effektor-T-Zellen

i-j) CD4-positiv TEMRA T-Zellen (i) und CCR7-negativ TEMRA T-Zellen (j)

3.3. CD8-positive Subpopulationen

Bei den CD8-positiven T-Lymphozyten bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den 3 Gruppen ([Abb.13a,d,f](#); [Abb.15](#)).

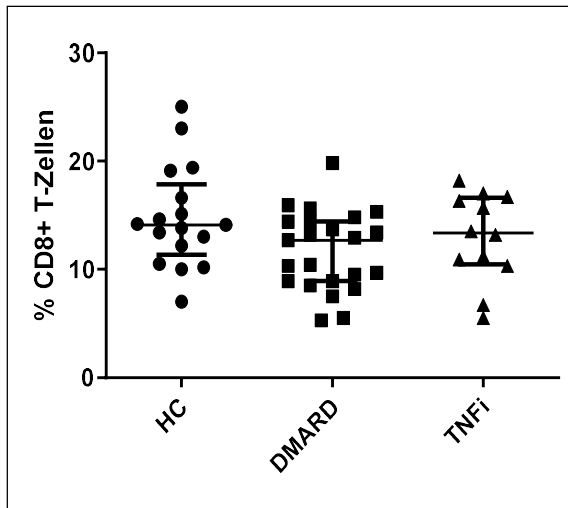


Abb.15: Proportionale Verteilung der CD8-positiven T-Zellen in HC, DMARD und TNFi. Prozentualer Anteil der CD8-positiven T-Zellen in den Gesunden, den JIA-Patienten der DMARD- und der TNFi-Gruppe.

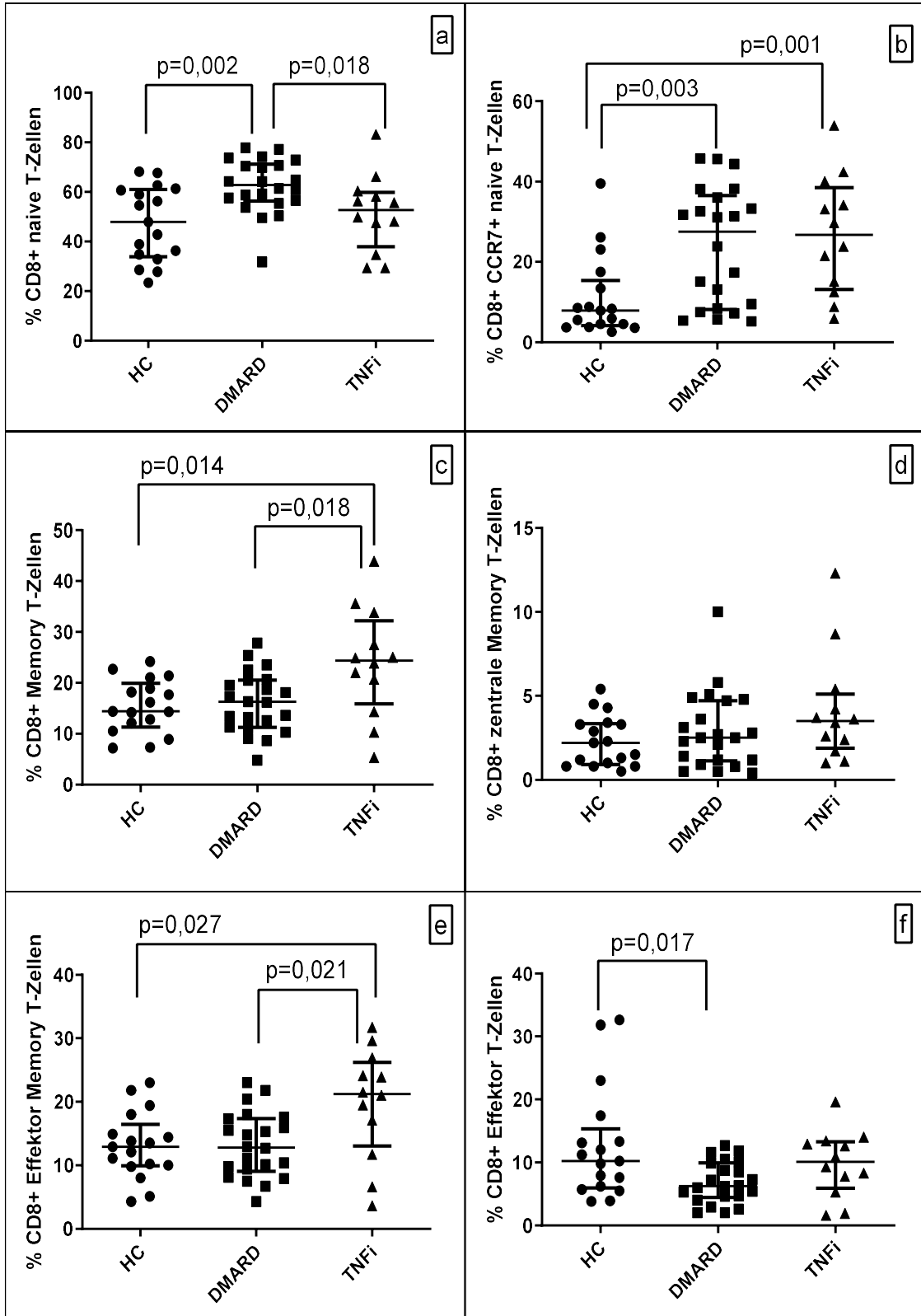
Naive T-Zellen: die CD8-positiven, naiven T-Lymphozyten waren in der Patienten-Gruppe mit DMARD-Medikation signifikant mehr zu beobachten als bei den JIA-Patienten mit TNF α -Inhibitor oder bei den Gesunden ([Abb.13c,f,i](#); [Abb.16a](#)). Die CD8-positiven, CCR7-positiven, naiven T-Lymphozyten fanden sich signifikant vermehrt bei der DMARD-Gruppe und hochsignifikant vermehrt bei Patienten mit TNF α -Inhibitor in Vergleich zur gesunden Population ([Abb.16b](#)).

Memory-T-Zellen: die CD8-positiven Memory-T-Lymphozyten traten bei den JIA-Patienten mit TNF α -Inhibitor signifikant häufiger auf als in der DMARD-Gruppe oder bei den gesunden Probanden ([Abb.13c,f,i](#); [Abb.16c](#)). Die CD8-positiven, zentralen Memory-Zellen boten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Untergruppen ([Abb.16d](#)). Die CD8-positiven Effektor Memory-T-Zellen wiesen bei den JIA-Patienten mit TNF α -Inhibitor einen signifikant höheren Anteil auf als bei der DMARD-Gruppe oder der gesunden Vergleichspopulation ([Abb.16e](#)).

Effektor-T-Zellen: die CD8-positiven Effektor-T-Lymphozyten waren signifikant zahlreicher bei den Gesunden als den JIA-Patienten der DMARD-Gruppe (Abb.13c,f,i; Abb.16f). Die CD8-positiven *Early* Effektor-T-Zellen zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Abb.16g). Die CD8-positiven *Late* Effektor-T-Lymphozyten waren bei den Gesunden signifikant mehr vorhanden als bei den JIA-Patienten der DMARD-Gruppe (Abb.16h).

TEMRA T-Zellen: die CD8-positiven TEMRA T-Lymphozyten konnten bei den Gesunden signifikant mehr nachgewiesen werden als bei den JIA-Patienten der DMARD- oder der TNFi-Gruppe (Abb.13c,f,i; Abb.16i). Dies traf auch für die TEMRA-Zellen zu, die CCR7 nicht exprimierten (Abb.16j).

Die Tabelle 16 (siehe Appendix III.1.) zeigt zusammenfassend für die CD8-positiven Subpopulationen die Häufigkeits- und die Signifikanzwerte zwischen den unterschiedlichen Gruppen auf.



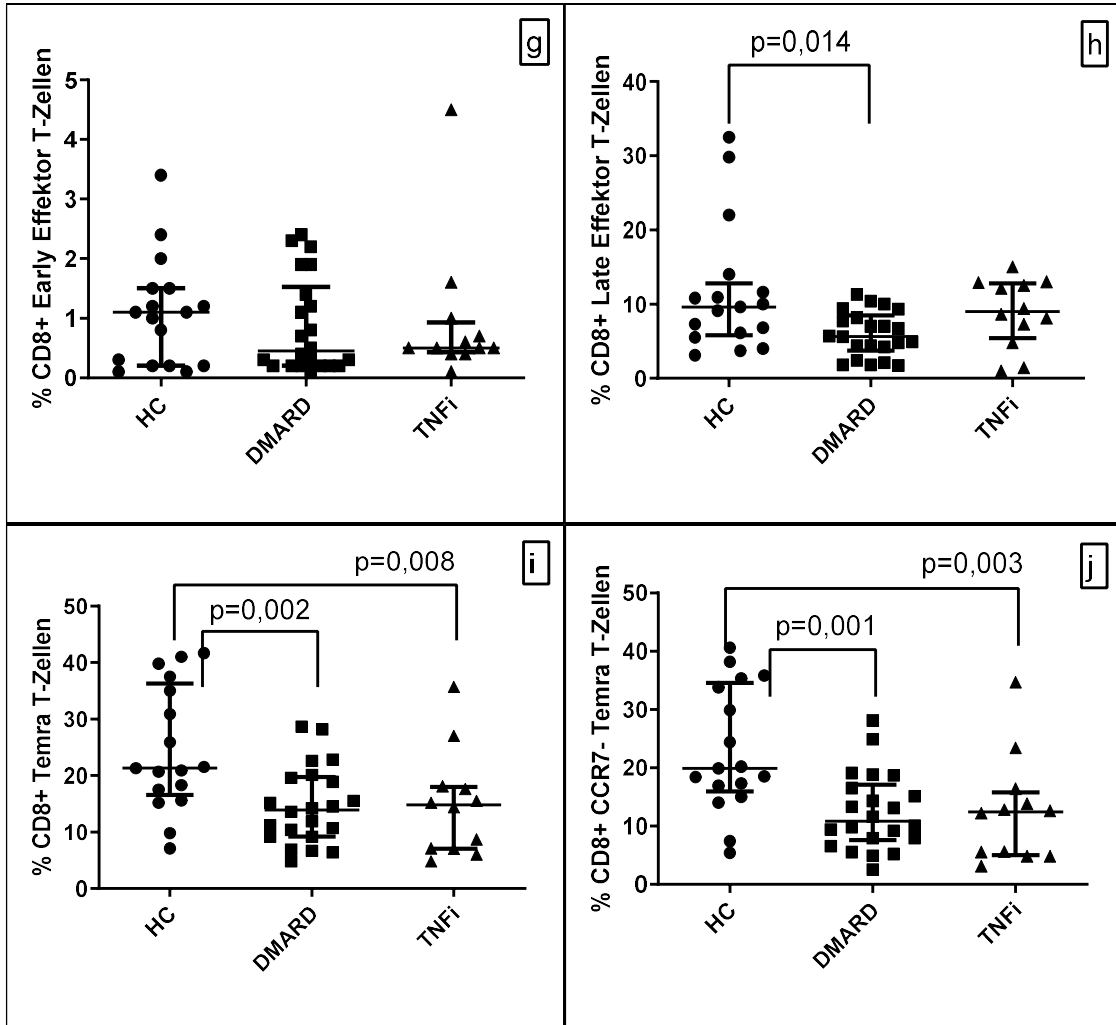


Abb.16a-j: Proportionale Verteilung der CD8-positiven Subpopulationen in HC, DMARD und TNFi. Prozentualer Anteil der CD8-positiven T-Zellen, unterteilt in die Subpopulationen in den Gesunden, den JIA-Patienten der DMARD- und der TNFi-Gruppe.

a-b) CD8-positiv, naive (a) und CCR7-positiv, naive T-Zellen (b)

c-e) CD8-positiv Memory-T-Zellen (c), zentrale (d) und Effektor-Memory-T-Zellen (e)

f-h) CD8-positiv Effektor-T-Zellen (f), *Early* (g) und *Late* Effektor-T-Zellen

i-j) CD8-positiv TEMRA T-Zellen (i) und CCR7-negativ TEMRA T-Zellen (j)

3.4. Regulatorische T-Zellen

Die CD4-positiven, FoxP3-positiven T-Lymphozyten traten bei den Gesunden hochsignifikant und den JIA-Patienten mit TNF α -Inhibitor signifikant mehr auf als in der DMARD-Gruppe (Abb.18a). Die CD4-positiven, FoxP3-positiven, CCR6-positiven T-Lymphozyten waren signifikant häufiger bei den Gesunden als bei den JIA-Patienten der DMARD-Gruppe zu beobachten (Abb.18b). Weder bei den CD4-positiven, CD25-positiven, CD127-negativen, FoxP3-positiven Tregs (Abb.18c), noch bei den CD4-positiven Tregs, die CCR6 trugen (Abb.18d), bestand zwischen den Gruppen ein statistisch signifikanter Unterschied.

Die CD8-positiven, regulatorischen T-Zellen zeigten weder bei den FoxP3-positiven und FoxP3-positiven, CCR6-positiven Zellen, noch bei den Tregs und den CCR6-positiven Tregs eine statistische Signifikanz (Abb. nicht gezeigt).

In Tabelle 17 (siehe Appendix III.1.) sind für alle regulatorischen T-Zellen die Häufigkeiten und Signifikanzwerte zwischen den unterschiedlichen Gruppen erfasst.

In Abb.17 ist die Strategie dargestellt, wie die Gates in der FACS Diva Software für die regulatorischen T-Zellen definiert wurden. FoxP3 wurde als charakteristischer intrazellulärer Transkriptionsfaktor der regulatorischen T-Zellen untersucht, dessen Hauptfunktion die Unterstützung der Immunantwort anderer Zellen und der Erhalt der Selbsttoleranz ist. CCR6 ist auf TH17-Zellen zu finden und beschreibt die Plastizität der regulatorischen T-Zellen, da diese CCR6 in Anwesenheit von IL-17 exprimieren können. Neben der Expression von FoxP3 tragen natürliche, direkt aus dem Thymus stammende Tregs CD25 auf ihrer Oberfläche und haben CD127 herunterreguliert. CD25 ist ein IL-2-Rezeptor α , CD127 ein IL-7-Rezeptor α mit Funktionen in Proliferation und Regulation sowie Überleben der Zellen.

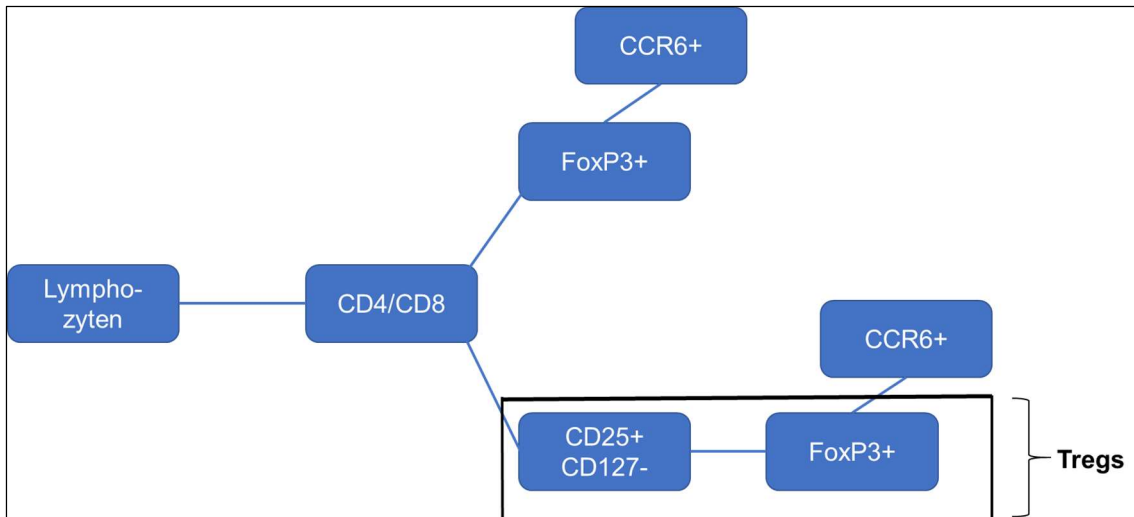


Abb.17: FACS Gating-Strategie für die regulatorischen T-Zellen. In der Abbildung ist dargestellt, wie anhand der Ausprägung der Oberflächenmarker FoxP3, CD25, CD127 und CCR6 die regulatorischen T-Zellen definiert und mittels der FACS Diva Software untersucht wurden. Als Fluorochrome wurden CD4 FITC, CD8 APC-H7, CD25 PE-Cy7, CD127 BV421, FoxP3 PerCP5.5, CCR6 PE verwendet. Die Werte werden als Prozente der Parent-Generation bzw. bei den *FoxP3+* Tregs als Prozente der Grandparent-Generation (also in Bezug auf CD4/CD8) angegeben.

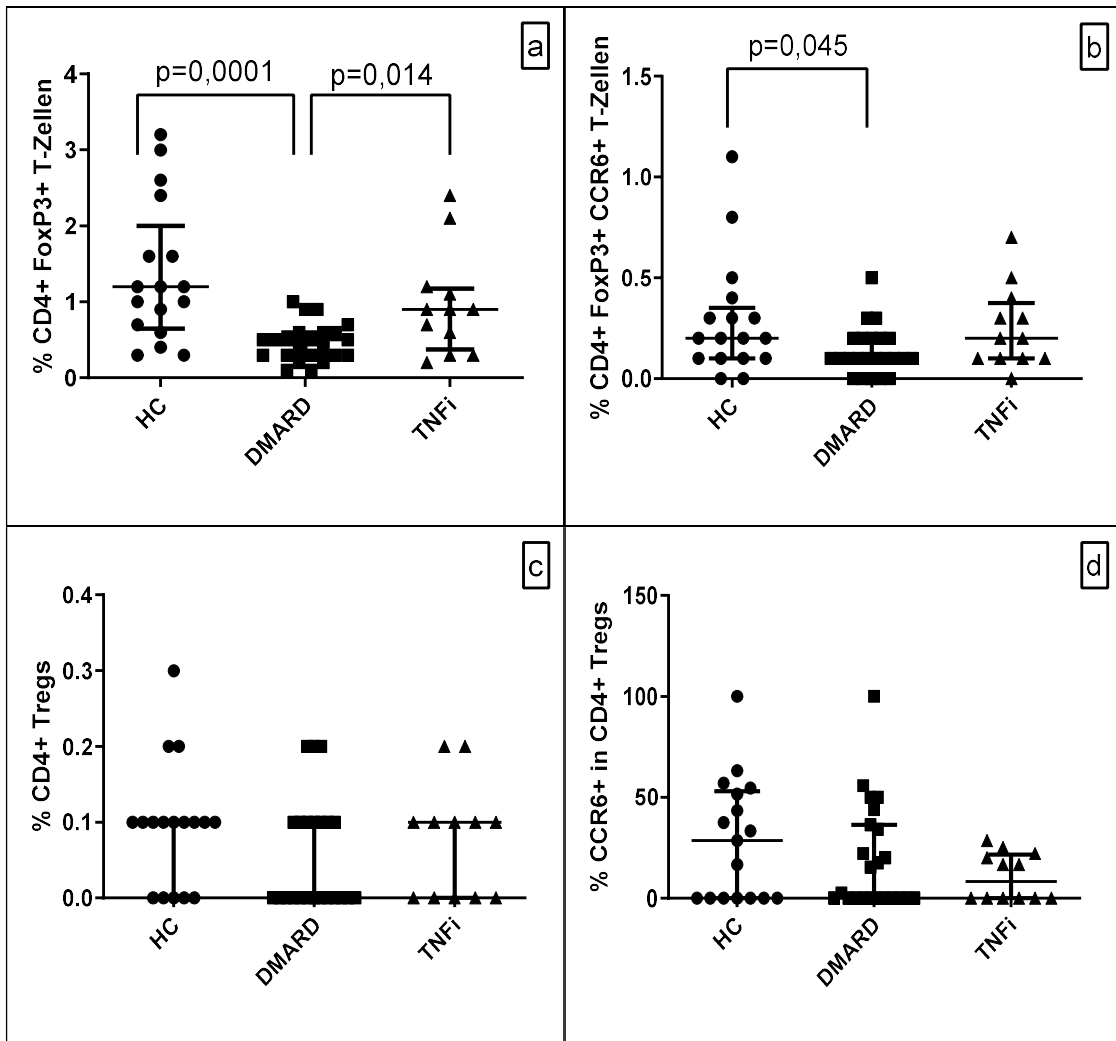


Abb.18a-d: Proportionale Verteilung der CD4-positiven regulatorischen T-Zellen in HC, DMARD und TNFi. Prozentualer Anteil der CD4-positiven regulatorischen T-Zellen unterteilt in die Subpopulationen in den Gesunden, den JIA-Patienten der DMARD- und der TNFi-Gruppe.

- CD4-positiv, FoxP3-positiv T-Zellen
- CD4-positiv, FoxP3-positiv, CCR6-positiv T-Zellen
- CD4-positiv, CD25-positiv, CD127-negativ, FoxP3-positiv T-Zellen (Tregs)
- CCR6-positiv in den CD4-positiven Tregs

3.5. Rezente Thymusemigranten

CD4-positive, CD31-positive T-Zellen: die CD4-positiven, CD31-positiven T-Lymphozyten traten in der DMARD-Gruppe signifikant häufiger auf als bei den Gesunden und den Patienten mit TNF α -Inhibitor ([Abb.19a](#)).

CD4-positive, CD127-positive T-Zellen: die CD4-positiven, CD127-positiven T-Lymphozyten manifestierten sich in der DMARD- und der TNFi-Gruppe hochsignifikant häufiger als bei den Gesunden ([Abb.19b](#)).

CD4-positive, CD31-positive, CD127-positive T-Zellen: in der DMARD-Gruppe zeigte sich ein signifikant höherer Anteil an CD4-positiven, CD31-positiven, CD127-positiven T-Lymphozyten im Vergleich zu den Gesunden und den JIA-Patienten mit TNF α -Inhibitor ([Abb.19c](#)).

CD8-positive, CD31-positive T-Zellen: der Anteil der CD8-positiven, CD31-positiven T-Lymphozyten war in der DMARD-Gruppe signifikant höher als bei den Gesunden oder den Patienten mit TNF α -Inhibitor ([Abb.19d](#)).

CD8-positive, CD127-positive T-Zellen: bei den Gesunden konnte im Vergleich zu den JIA-Patienten der DMARD- und der TNFi-Gruppe ein hochsignifikant geringerer Anteil an CD8-positiven, CD127-positiven T-Lymphozyten beobachtet werden ([Abb.19e](#)).

CD8-positive, CD31-positive, CD127-positive T-Zellen: sowohl in der DMARD-Gruppe als auch in der TNF α -Inhibitor-Gruppe traten signifikant mehr CD8-positive, CD31-positive, CD127-positive T-Lymphozyten auf als bei den Gesunden ([Abb.19f](#)).

CD31 definiert die „echten“ RTE mit hoher Dichte an TRECs. CD127 hat als IL-7-Rezeptor α eine wichtige Rolle bei der Steuerung der auto-proliferativen Wirkung durch IL-7 inne. [Tabelle 18](#) beschreibt die Häufigkeiten der RTE und der Chemokin-Rezeptor-positiven T-Zellen in den verschiedenen Gruppen mit den errechneten Signifikanzniveaus (siehe Appendix III.1.).

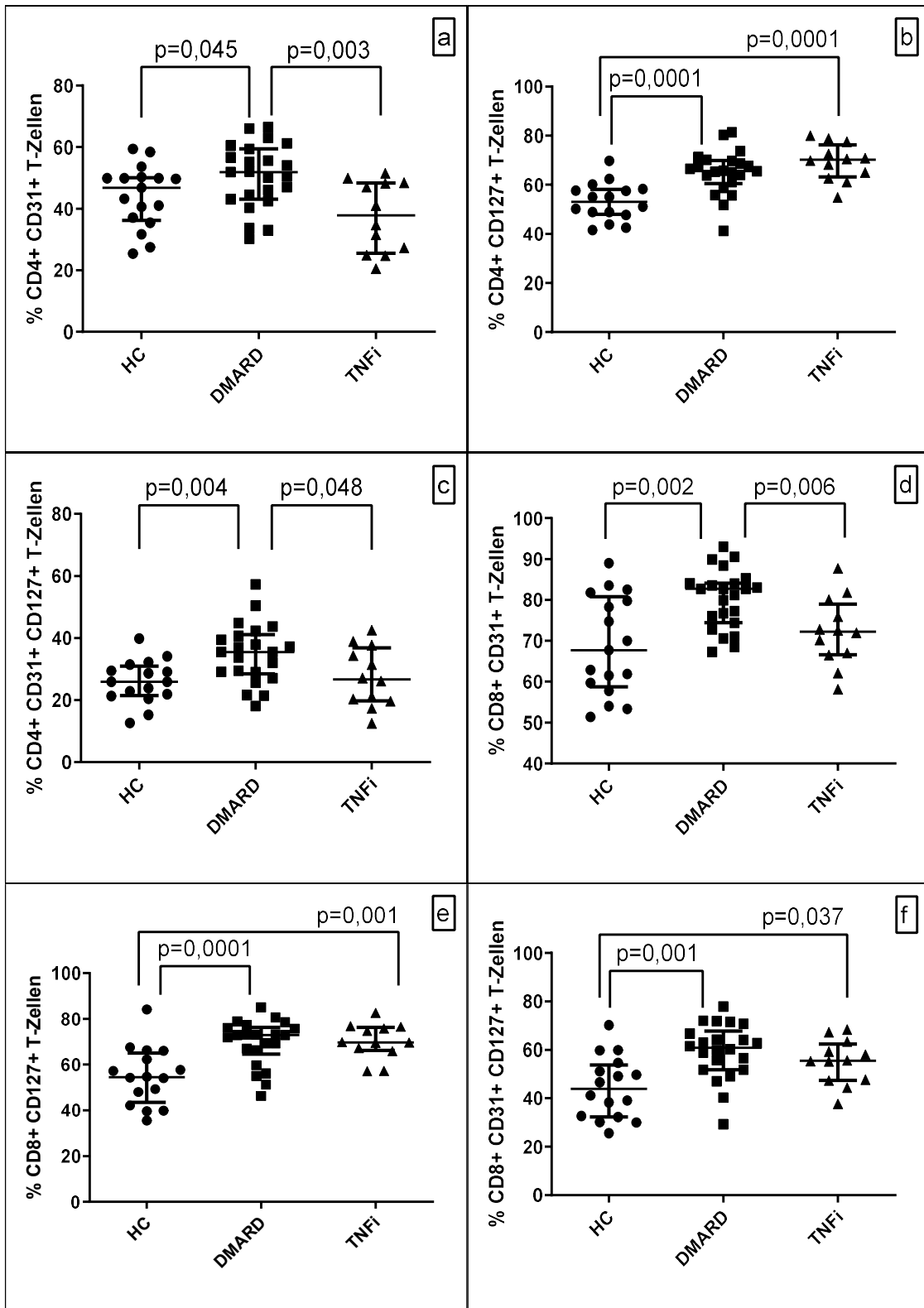


Abb.19a-c: Proportionale Verteilung der RTE in HC, DMARD und TNFi. Prozentualer Anteil der CD4-positiven RTE in den Gesunden, den JIA-Patienten der DMARD- und der TNFi-Gruppe.

a) CD4-positive, CD31-positive T-Zellen

- b) CD4-positive, CD127-positive T-Zellen
- c) CD4-positive, CD31-positive, CD127-positive T-Zellen
- d) CD8-positive, CD31-positive T-Zellen
- e) CD8-positive, CD127-positive T-Zellen
- f) CD8-positive, CD31-positive, CD127-positive T-Zellen

3.6. Chemokin-Rezeptor-tragende T-Zellen

CCR6 wurde als charakteristischer Chemokin-Rezeptor für die TH17-Zellen, CXCR3 für die TH1-Zellen gewählt. TH1/TH17-Zellen tragen beide Rezeptoren.

CD4-positive, CCR6-positive T-Zellen: die CD4-positiven, CCR6-positiven T-Lymphozyten konnten signifikant häufiger bei den JIA-Patienten mit TNF α -Inhibitor als bei der DMARD-Gruppe oder den Gesunden beobachtet werden ([Abb.20a](#)).

CD4-positive, CXCR3-positive T-Zellen: bei den Gesunden waren signifikant mehr CD4-positive, CXCR3-positive T-Lymphozyten nachweisbar als bei der DMARD-Gruppe ([Abb.20b](#)).

CD4-positive, CCR6-positive, CXCR3-positive T-Zellen: die CD4-positiven, CCR6-positiven, CXCR3-positiven T-Lymphozyten erwiesen sich in der TNFi-Gruppe signifikant häufiger als in der DMARD-Gruppe ([Abb.20c](#)).

CD8-positive, CCR6-positive T-Zellen: in der Patienten-Gruppe mit TNF α -Inhibitor fiel das Auftreten von signifikant mehr CD8-positiven, CCR6-positiven T-Lymphozyten in Vergleich zu den Gesunden und der DMARD-Gruppe auf ([Abb.20d](#)).

CD8-positive, CXCR3-positive T-Zellen und CXCR3-positive, CCR6-positive T-Zellen: bei den CD8-positiven, CXCR3-positiven sowie den CXCR3-positiven, CCR6-positiven T-Lymphozyten bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ([Abb.20e,f](#)).

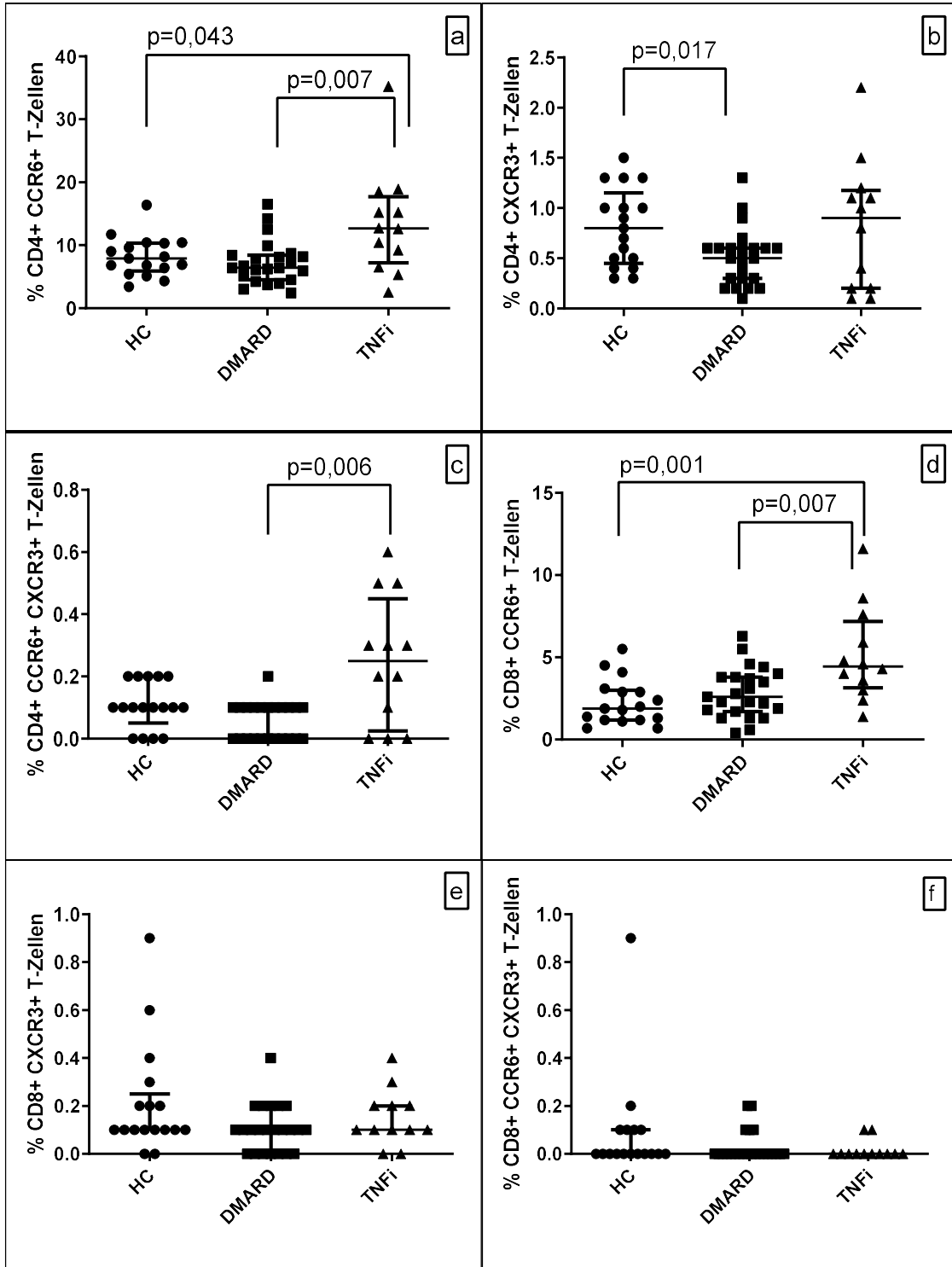


Abb.20a-f: Proportionale Verteilung der Chemokin-Rezeptor-positiven T-Zellen in HC, DMARD und TNFi. Prozentualer Anteil der Chemokin-Rezeptor-positiven T-Zellen in den Gesunden, den JIA-Patienten der DMARD- und der TNFi-Gruppe.

- a) CD4-positive, CCR6-positive T-Zellen
- b) CD4-positive, CXCR3-positive T-Zellen
- c) CD4-positive, CCR6-positive, CXCR3-positive T-Zellen

- d) CD8-positive, CCR6-positive T-Zellen
- e) CD8-positive, CXCR3-positive T-Zellen
- f) CD8-positive, CCR6-positive, CXCR3-positive T-Zellen

3.7. T-Zellrezeptor α und β

Abb.21 beschreibt das Gating-Schema und die Verwendung der Oberflächenmoleküle, nach denen die TCR $\alpha\beta$ -positiven T-Zellen untersucht wurden. Die zusammenfassende Tabelle 19 zeigt die Häufigkeiten der TCR $\alpha\beta$ -positiven T-Zellen in den verschiedenen Gruppen mit den genauen p-Werten auf (siehe Appendix III.1.). Mit Fokus auf die kürzlich aus dem Thymus freigesetzten TCR $\alpha\beta$ -positiven T-Zellen wurden die Zellen sowohl nach der Expression von CD127 als auch von CD31 untersucht. Durch gleichzeitiges Auftreten von CD31 und TCR $\alpha\beta$ werden besonders die naiven Zellen selektiert, da CD31 nach Antigenkontakt nicht mehr von den Zellen exprimiert wird.

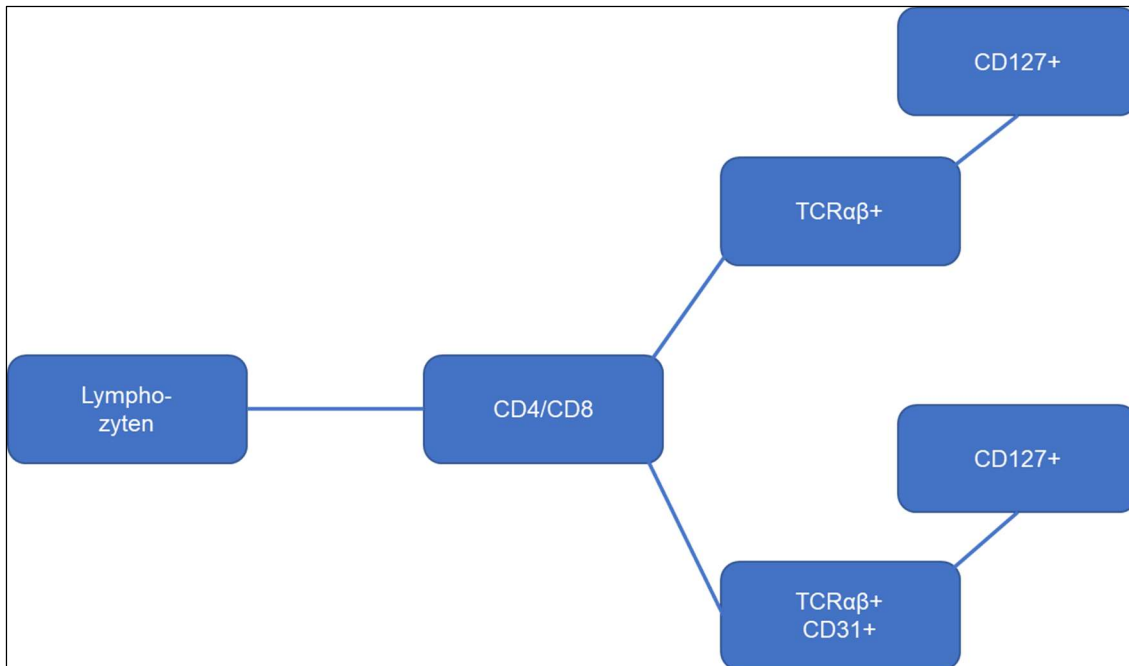


Abb.21: FACS Gating-Strategie für die TCRαβ-positiven T-Zellen. In der Abbildung ist dargestellt, wie anhand der Ausprägung der Oberflächenmarker TCRαβ, CD31 und CD127 die TCRαβ-positiven T-Zellen definiert und mittels der FACS Diva Software untersucht wurden. Als Fluoro-chrome wurden CD4 PE, CD8 PerCP5.5, TCRαβ FITC, CD31 PE-Cy7, CD127 APC-Cy7 verwendet. Die Werte werden als Prozente der Parent-Generation angegeben.

CD4-positive, TCR $\alpha\beta$ -positive T-Zellen: sowohl bei den JIA-Patienten der DMARD-Gruppe als auch der TNF α -Gruppe traten signifikant mehr CD4-positive, TCR $\alpha\beta$ -positive T-Lymphozyten auf als bei den Gesunden. Bei Vergleich beider Patientengruppen war ein höherer Anteil der Zellen in der TNFi-Gruppe zu beobachten ([Abb.22a](#)).

CD127-positive Zellen in den CD4-positiven, TCR $\alpha\beta$ -positiven T-Zellen: bei den CD127-positiven Zellen in den CD4-positiven, TCR $\alpha\beta$ -positiven T-Lymphozyten fiel bei beiden Medikamenten-Gruppen ein hochsignifikant höherer Anteil als in der gesunden Vergleichspopulation auf ([Abb.22b](#)).

CD4-positive, CD31-positive, TCR $\alpha\beta$ -positive T-Zellen: in der DMARD-Gruppe konnten signifikant mehr CD4-positive, CD31-positive, TCR $\alpha\beta$ -positive T-Lymphozyten beobachtet werden als bei den JIA-Patienten mit TNF α -Inhibitor oder bei den Gesunden ([Abb.22c](#)).

CD127-positive in den CD4-positiven, CD31-positiven, TCR $\alpha\beta$ -positiven T-Zellen: auch bei den CD127-positiven der CD4-positiven, CD31-positiven, TCR $\alpha\beta$ -positiven T-Lymphozyten konnte ein signifikant höheres Auftreten bei den Patientengruppen im Vergleich zu den Gesunden festgestellt werden ([Abb.22d](#)).

CD8-positive, TCR $\alpha\beta$ -positive T-Zellen: die CD8-positiven, TCR $\alpha\beta$ -positiven T-Lymphozyten traten signifikant häufiger bei den JIA-Patienten der DMARD- und der TNFi-Gruppe auf als bei den Gesunden ([Abb.23a](#)).

CD127-positive der CD8-positiven, TCR $\alpha\beta$ -positiven T-Zellen: bei den CD127-positiven in den CD8-positiven, TCR $\alpha\beta$ -positiven T-Lymphozyten fiel bei beiden Medikamenten-Gruppen ein hochsignifikant höherer Anteil im Vergleich zur gesunden Population auf ([Abb.23b](#)).

CD8-positive, CD31-positive, TCR $\alpha\beta$ -positive T-Zellen: in der DMARD-Gruppe konnten signifikant mehr CD8-positive, CD31-positive, TCR $\alpha\beta$ -positive T-Lymphozyten beobachtet werden als bei den Gesunden ([Abb.23c](#)).

CD127-positive in den CD8-positiven, CD31-positiven, TCR $\alpha\beta$ -positiven T-Zellen: bei den CD127-positiven der CD8-positiven, CD31-positiven, TCR $\alpha\beta$ -positiven T-Lymphozyten zeigte sich ein signifikant höheres Auftreten bei beiden Patientengruppen im Vergleich zu den Gesunden (Abb.23d).

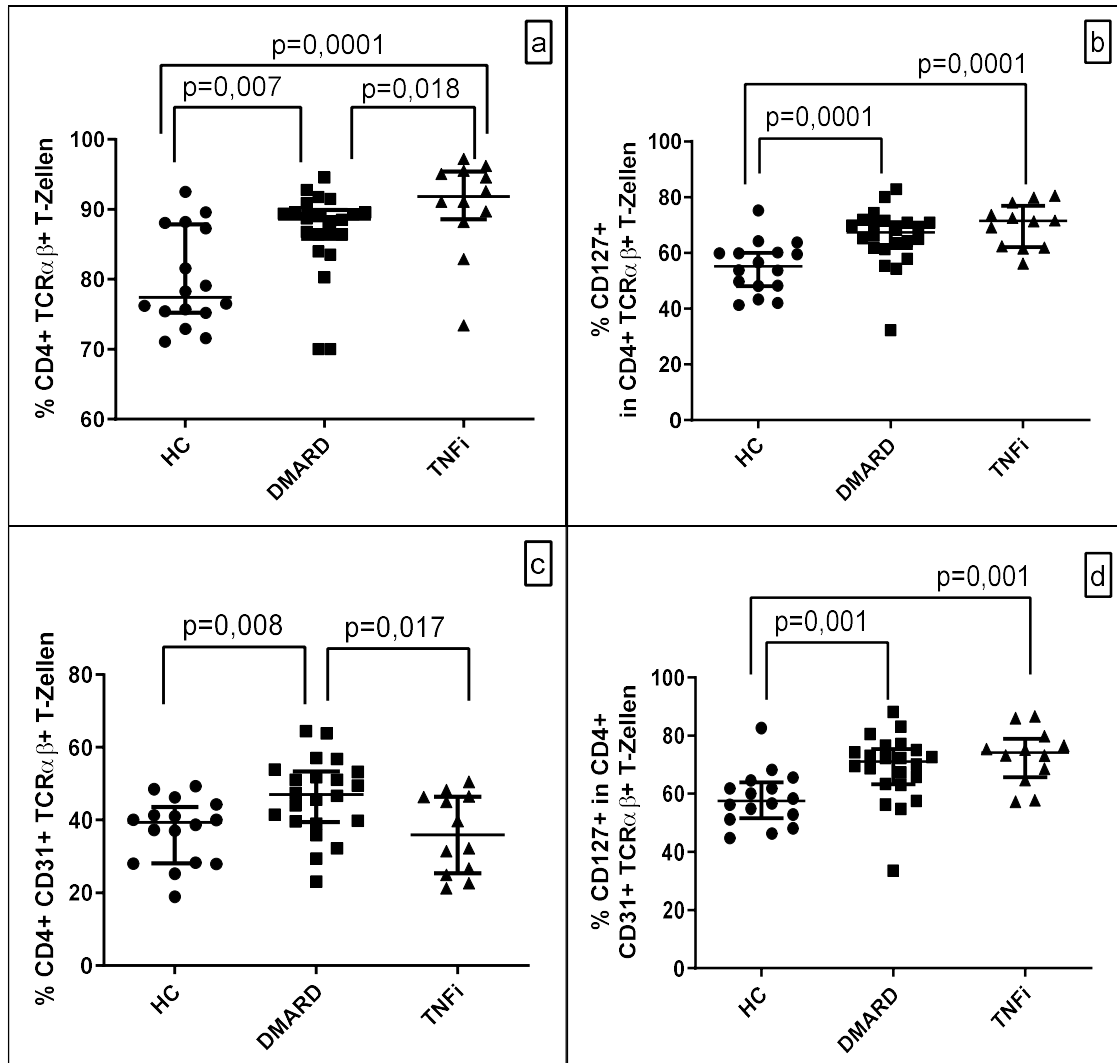


Abb.22a-d: Proportionale Verteilung der CD4-positiven, TCR $\alpha\beta$ -positiven T-Zellen in HC, DMARD und TNFi. Prozentualer Anteil der CD4-positiven, TCR $\alpha\beta$ -positiven T-Zellen in den Gesunden, den JIA-Patienten der DMARD- und der TNFi-Gruppe.

- CD4-positiv, TCR $\alpha\beta$ -positive T-Zellen
- CD127-positiv in den CD4-positiven, TCR $\alpha\beta$ -positiven T-Zellen
- CD4-positiv, TCR $\alpha\beta$ -positiv, CD31-positiv T-Zellen
- CD127-positiv in den CD4-positiven, TCR $\alpha\beta$ -positiven, CD31-positiven T-Zellen

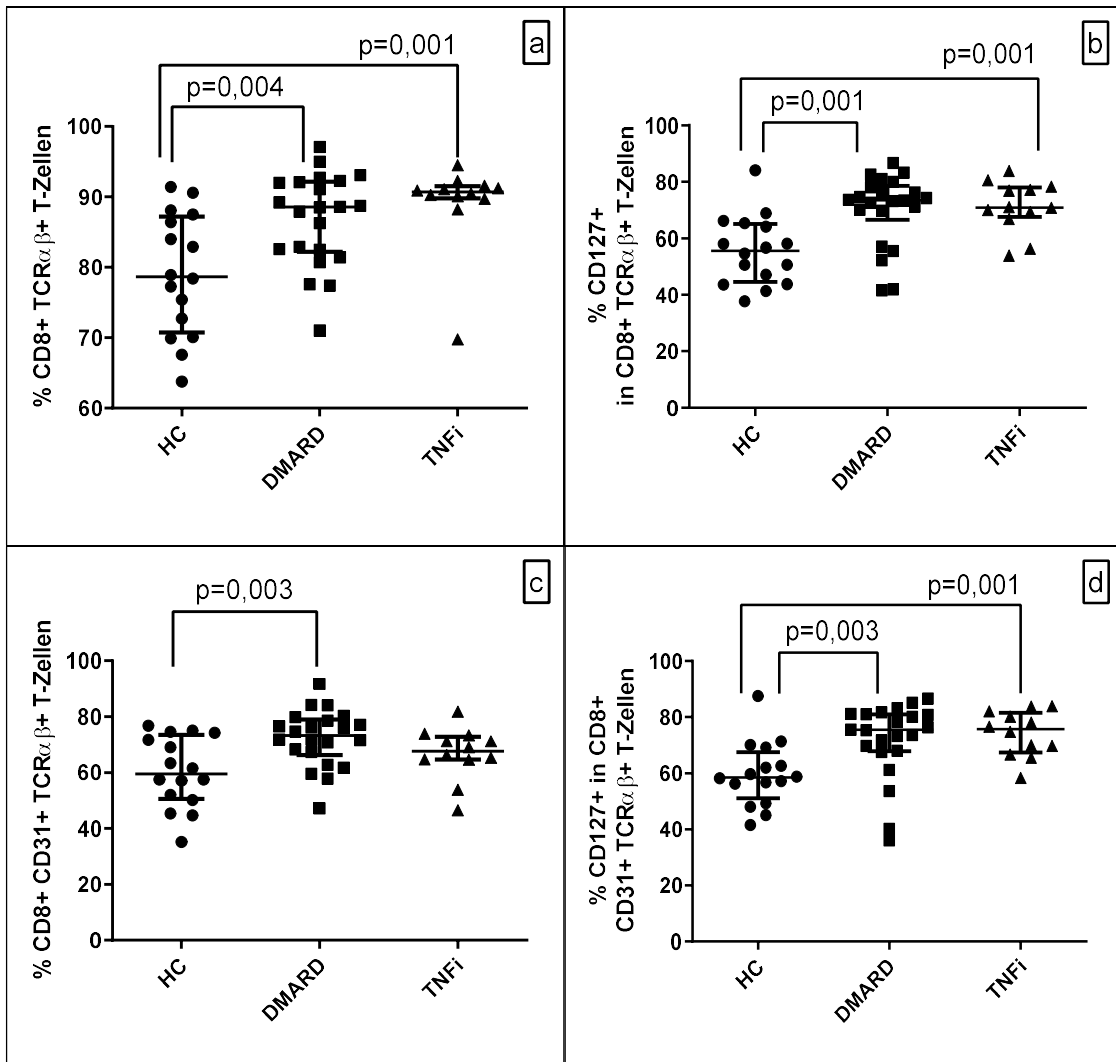


Abb.23a-d: Proportionale Verteilung der CD8-positiven, TCR $\alpha\beta$ -positiven T-Zellen in HC, DMARD und TNFi. Prozentualer Anteil der CD8-positiven, TCR $\alpha\beta$ -positiven T-Zellen in den Gesunden, den JIA-Patienten der DMARD- und der TNFi-Gruppe.

- a) CD8-positiv, TCR $\alpha\beta$ -positive T-Zellen
- b) CD127-positiv in den CD8-positiven, TCR $\alpha\beta$ -positiven T-Zellen
- c) CD8-positiv, TCR $\alpha\beta$ -positiv, CD31-positiv T-Zellen
- d) CD127-positiv in den CD8-positiven, TCR $\alpha\beta$ -positiven, CD31-positiven T-Zellen

3.8. T-Zellrezeptor γ und δ

Das Gating-Schema der TCR $\gamma\delta$ -positiven T-Zellen wurde entsprechend dem Schema der TCR $\alpha\beta$ -Zellen durchgeführt (siehe [Abb.21](#)). In der zusammenfassenden [Tabelle 20](#) sind die Häufigkeiten in den 3 Gruppen inklusive Signifikanzniveaus zu finden (siehe Appendix III.1.).

CD4-positive, TCR $\gamma\delta$ -positive T-Zellen: die CD4-positiven, TCR $\gamma\delta$ -positiven T-Lymphozyten und die CD127-positiven bei den CD4-positiven, TCR $\gamma\delta$ -positiven T-Zellen zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen ([Abb.24a,b](#)).

CD4-positive, CD31-positive, TCR $\gamma\delta$ -positive T-Zellen: die CD4-positiven, CD31-positiven, TCR $\gamma\delta$ -positiven T-Lymphozyten sowie die CD127-positiven Zellen in dieser Zelluntergruppe kamen bei den JIA-Patienten der DMARD-Gruppe signifikant häufiger vor als bei den Gesunden ([Abb.24c,d](#)).

TCR $\gamma\delta$ -positive T-Zellen in CD8-positiven T-Zellen: bei den CD8-positiven T-Zellen bestand kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Gruppen, selbiges traf auch für die Zellen zu, die zusätzlich das Oberflächenmolekül CD31 bzw. die CD127-positiven Zellen in beiden Untergruppen trugen ([Abb.25a-d](#)).

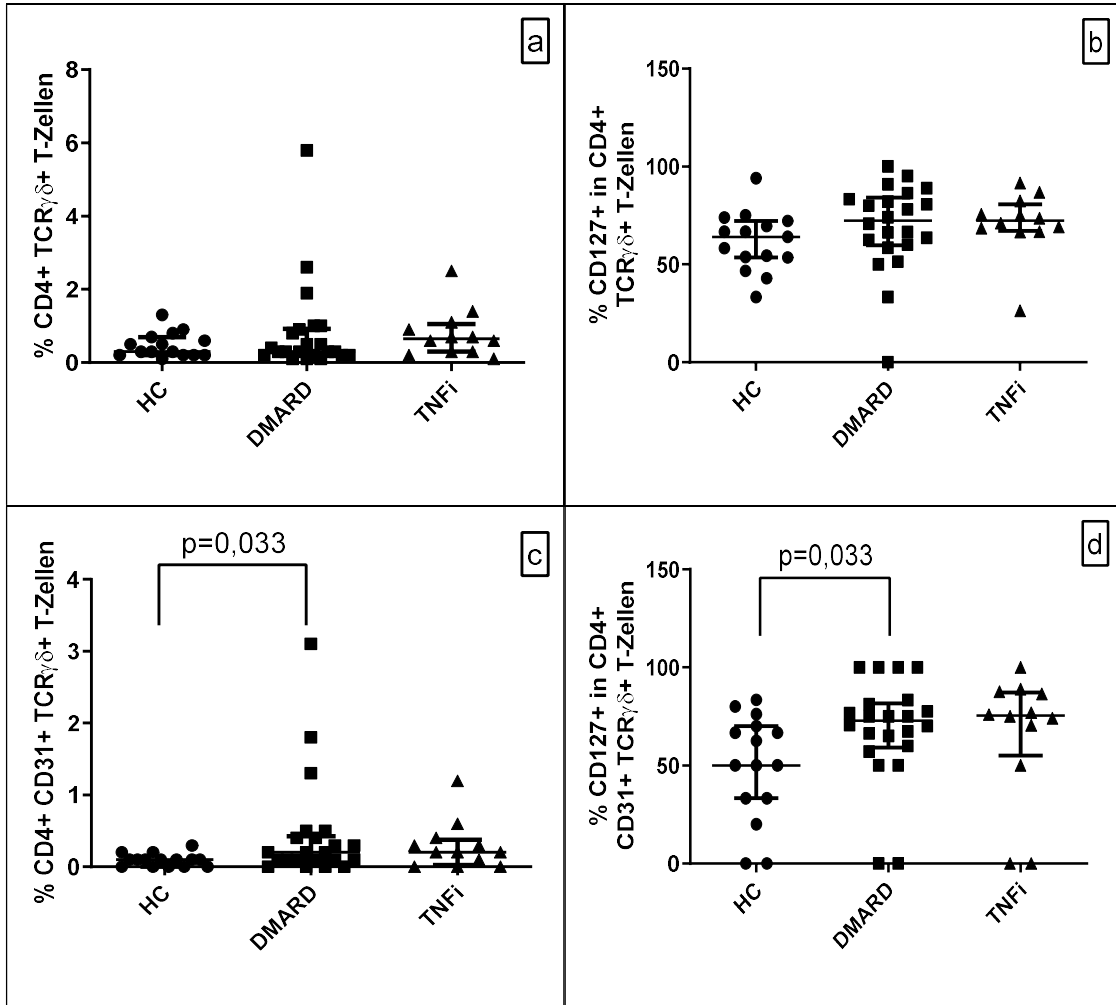


Abb.24a-d: Proportionale Verteilung der CD4-positiven, TCR $\gamma\delta$ -positiven T-Zellen in HC, DMARD und TNFi. Prozentualer Anteil der CD4-positiven, TCR $\gamma\delta$ -positiven T-Zellen in den Gesunden, den JIA-Patienten der DMARD- und der TNFi-Gruppe.

- a) CD4-positive, TCR $\gamma\delta$ -positive T-Zellen
- b) CD127-positive in den CD4-positiven, TCR $\gamma\delta$ -positiven T-Zellen
- c) CD4-positive, TCR $\gamma\delta$ -positive, CD31-positive T-Zellen
- d) CD127-positive in den CD4-positiven, TCR $\gamma\delta$ -positiven, CD31-positiven T-Zellen

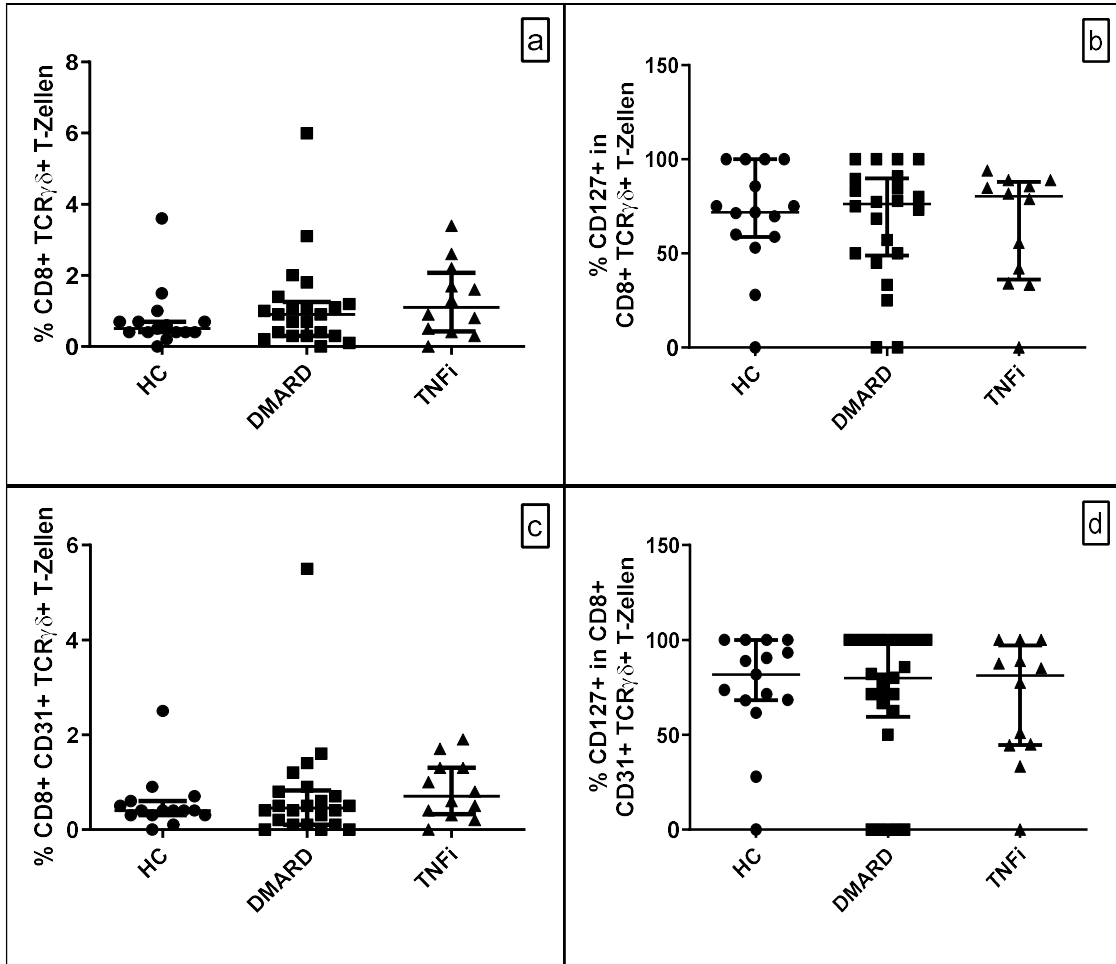


Abb.25a-d: Proportionale Verteilung der TCR $\gamma\delta$ -positiven T-Zellen der CD8-positiven T-Zellen in HC, DMARD und TNFi. Prozentualer Anteil der TCR $\gamma\delta$ -positiven Untergruppen der CD8-positiven T-Zellen in den Gesunden, den JIA-Patienten der DMARD- und der TNFi-Gruppe.

- CD8-positiv, TCR $\gamma\delta$ -positive T-Zellen
- CD127-positiv in den CD8-positiven, TCR $\gamma\delta$ -positiven T-Zellen
- CD8-positiv, CD31-positiv, TCR $\gamma\delta$ -positive T-Zellen
- CD127-positiv in den CD8-positiven, CD31-positiven, TCR $\gamma\delta$ -positiven T-Zellen

3.9. Zytokine

Zu Zwecken der Übersichtlichkeit werden im Zytokinkapitel nur die Streudiagramme graphisch dargestellt, die einen signifikanten Wert aufwiesen.

3.9.1. Zytokine in CD4-positiven Subpopulationen

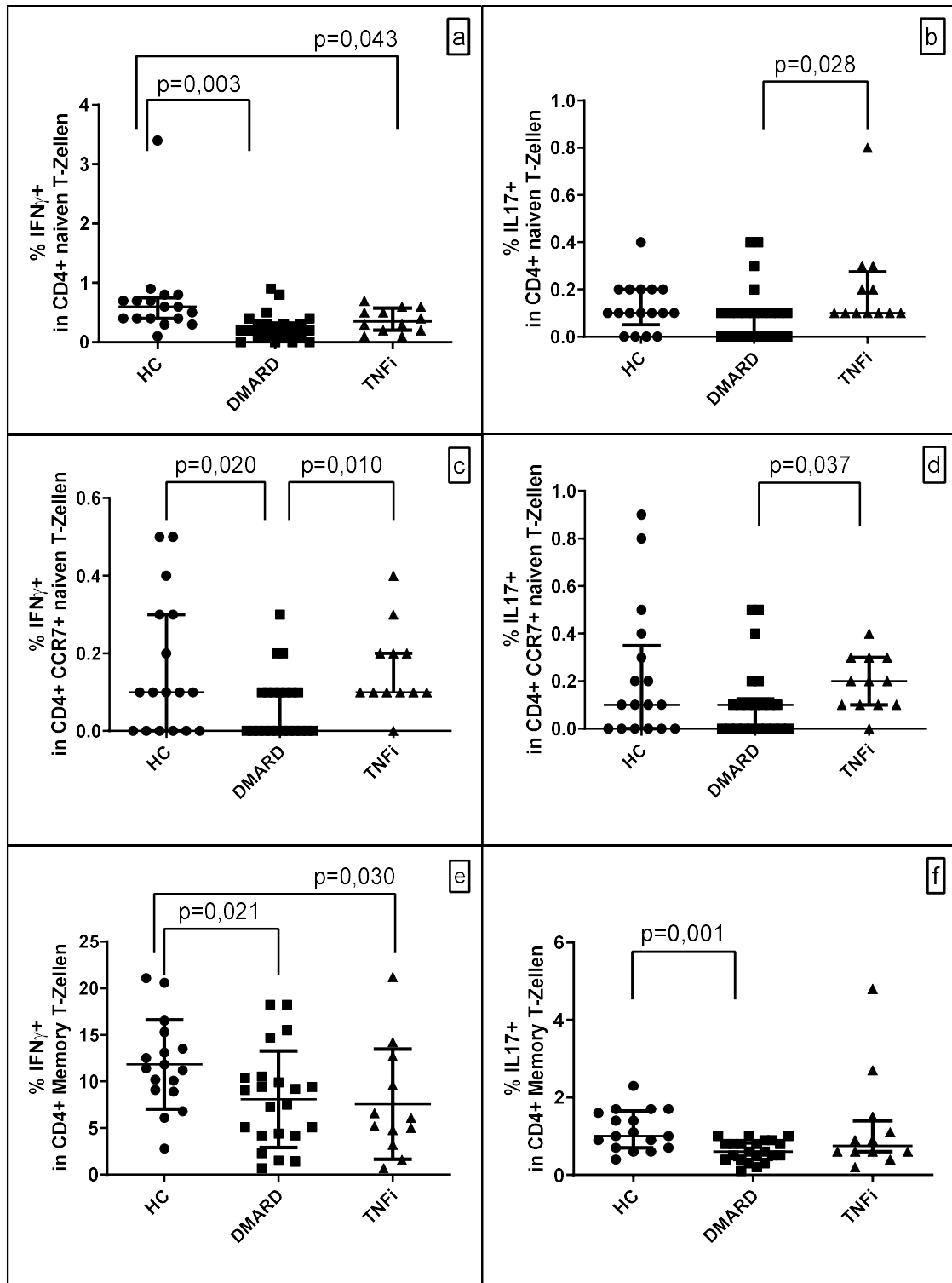
Zytokine in den CD4-positiven, naiven T-Zellen: die CD4-positiven, naiven T-Zellen wiesen bei den Gesunden signifikant mehr IFN γ auf als bei den JIA-Patienten der DMARD- und der TNFi-Gruppe ([Abb.26a](#)). Der IL-17-Anteil war bei den Patienten mit TNF α -Inhibitor signifikant höher als in der DMARD-Gruppe ([Abb.26b](#)). Die CD4-positiven, CCR7-positiven, naiven T-Zellen zeigten bei den Gesunden und den JIA-Patienten mit TNF α -Inhibitor einen signifikant höheren Anteil an IFN γ als bei der DMARD-Gruppe ([Abb.26c](#)). IL-17 konnte in dieser Zelluntergruppe ebenfalls signifikant häufiger bei TNF α -Inhibitor-Medikation als in der DMARD-Gruppe beobachtet werden ([Abb.26d](#)).

Zytokine in den CD4-positiven Memory-T-Zellen: die CD4-positiven Memory-T-Zellen exprimierten bei den Gesunden signifikant mehr IFN γ als bei den JIA-Patienten der DMARD- und der TNFi-Gruppe ([Abb.26e](#)). Die IL-17-Produktion lag bei den Gesunden ebenfalls signifikant höher als bei der DMARD-Gruppe ([Abb.26f](#)). Bei den JIA-Patienten der TNFi-Gruppe konnte ein signifikant erhöhter Anteil an IL-17-positiven, zentralen Memory-Zellen im Vergleich zur DMARD-Gruppe beobachtet werden ([Abb.26g](#)).

Zytokine in den CD4-positiven Effektor-T-Zellen: lediglich bei den CD4-positiven *Late* Effektor-T-Zellen bestand zwischen den Gesunden und der DMARD-Gruppe ein signifikanter Unterschied bei den Zellen, die beide Zytokine präsentierten ([Abb.26h](#)).

Zytokine in den CD4-positiven TEMRA T-Zellen: bei den CD4-positiven, IFN γ -positiven TEMRA T-Zellen fiel zwischen den Gesunden und den JIA-Patienten der DMARD-Gruppe ein signifikanter Unterschied auf ([Abb.26i](#)).

Tabelle 21 zeigt die Zytokin-Produktion der CD4-positiven Subpopulationen einschließlich ihrer Signifikanzniveaus (siehe Appendix III.1.).



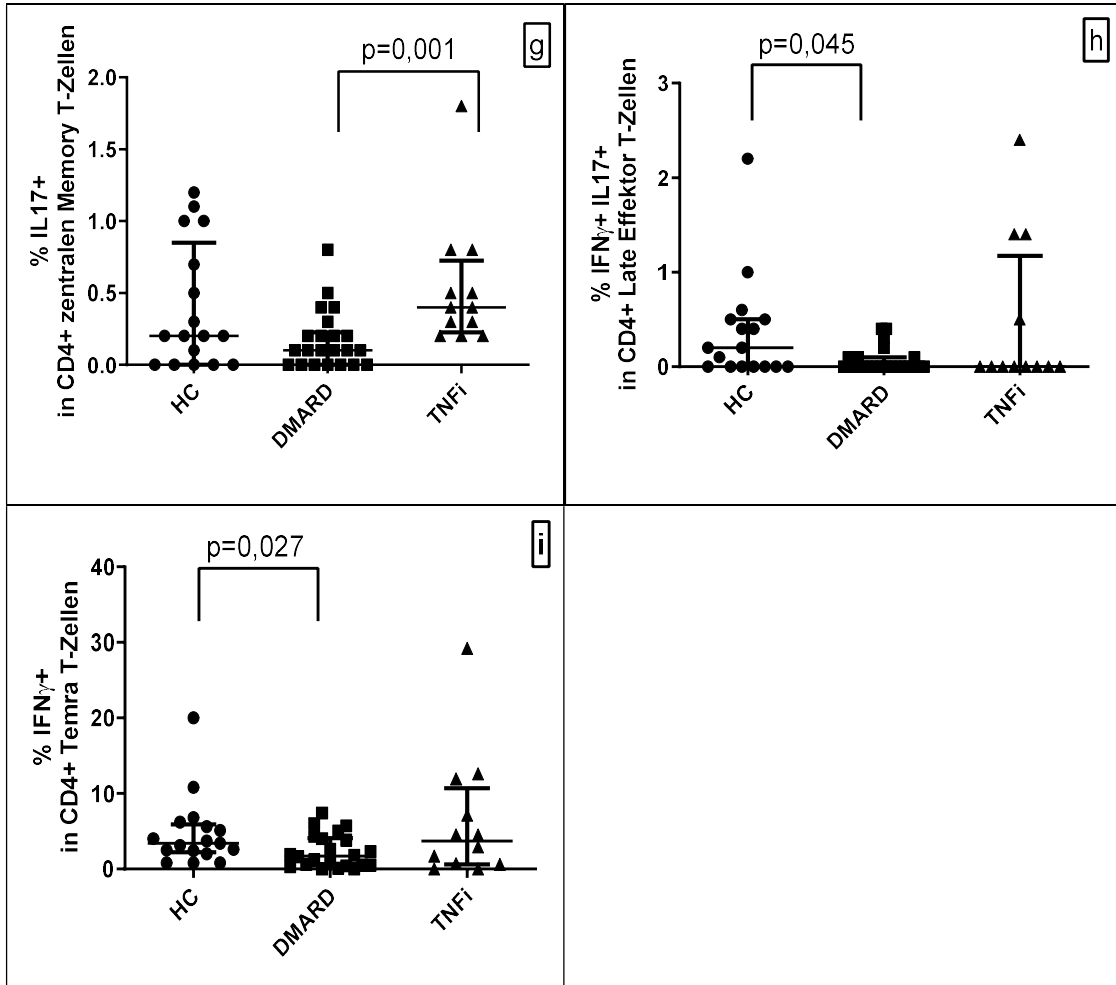


Abb.26: Proportionale Verteilung der Zytokin-Anteile in den CD4-positiven Subpopulationen der T-Zellen in HC, DMARD und TNFi. Prozentualer Anteil der Zytokin-Anteile in den CD4-positiven Subpopulationen der T-Zellen bei den Gesunden, den JIA-Patienten der DMARD- und der TNFi-Gruppe.

- a-b) IFN γ - (a) bzw. IL-17-positive (b) in den CD4-positiven, naiven T-Zellen
- c-d) IFN γ - (c) bzw. IL-17-positive (d) in den CD4-positiven, CCR7-positiven, naiven T-Zellen
- e-g) IFN γ - (e) bzw. IL-17-positive (f,g) in den CD4-positiven Memory-T-Zellen bzw. zentralen Memory-T-Zellen (g)
- h) IFN γ -/IL-17-doppelpositive in den CD4-positiven *Late* Effektor-T-Zellen
- i) IFN γ -positive in den CD4-positiven TEMRA T-Zellen

3.9.2. Zytokine in CD8-positiven Subpopulationen

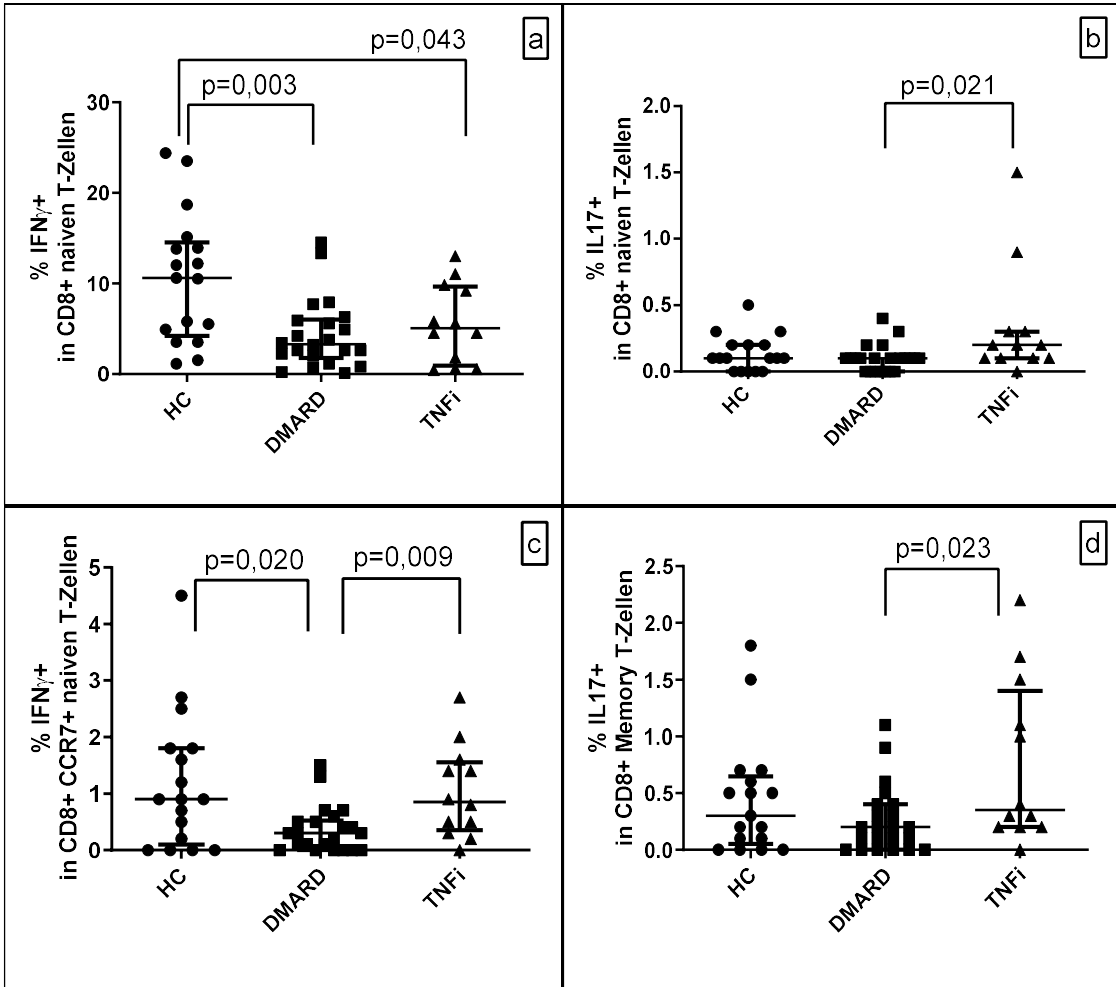
Zytokine in den CD8-positiven, naiven T-Zellen: die CD8-positiven, naiven T-Zellen produzierten bei den Gesunden signifikant mehr IFN γ als bei den JIA-Patienten der DMARD- oder der TNFi-Gruppe (Abb.27a). Der Anteil an IL-17 innerhalb dieser Zellen war bei den Patienten mit TNF α -Inhibitor signifikant höher als in der DMARD-Gruppe (Abb.27b). Die CD8-positiven, CCR7-positiven, naiven T-Zellen der DMARD-Gruppe zeigten signifikant weniger IFN γ als die der Gesunden oder der JIA-Patienten mit TNF α -Inhibitor (Abb.27c).

Zytokine in den CD8-positiven Memory-T-Zellen: lediglich bei den IL-17-positiven, CD8-positiven Memory-Zellen der DMARD-Gruppe konnte ein signifikant höherer Anteil im Vergleich zur TNFi-Gruppe nachgewiesen werden (Abb.27d).

Zytokine in den CD8-positiven Effektor-T-Zellen: bei den CD8-positiven Effektor-, *Early* und *Late* Effektor-Zellen konnten keine Signifikanzen in der Zytokin-Verteilung zwischen den Gruppen beobachtet werden.

Zytokine in den CD8-positiven TEMRA T-Zellen: die CD8-positiven TEMRA T-Zellen wiesen bei den Gesunden einen signifikant höheren Anteil an IFN γ als die DMARD- oder TNFi-Gruppe auf (Abb.27e). Es konnten ebenfalls signifikant mehr IFN γ -, IL-17-doppelpositive Zellen bei den Gesunden beobachtet werden als in der DMARD- und in der TNFi -Gruppe (Abb.27f). Die IFN γ -positiven, CD8-positiven TEMRA T-Zellen präsentierten sich bei den Gesunden mit einem signifikant höheren Anteil, verglichen mit den JIA-Patienten der DMARD-Gruppe (Abb.27g). Die IFN γ -, IL-17-doppelpositiven Zellen traten bei den Gesunden signifikant häufiger auf als bei den JIA-Patienten der DMARD-Gruppe oder der TNFi-Gruppe (Abb.27h).

Die Häufigkeiten und die Signifikanzniveaus der Zytokine der CD8-positiven Subpopulationen sind in Tabelle 22 zu finden (siehe Appendix III.1.).



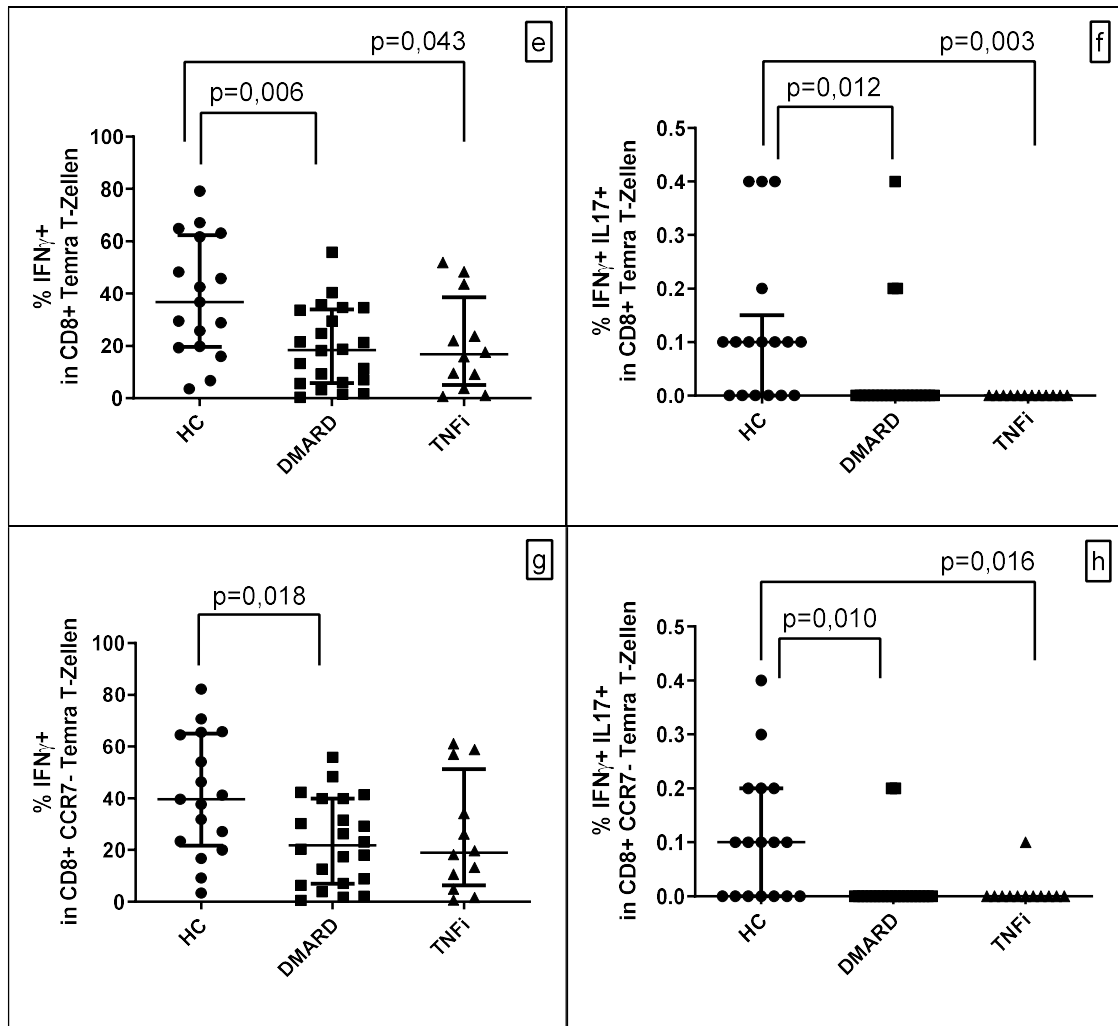


Abb.27a-h: Proportionale Verteilung der Zytokin-Anteile in den CD8-positiven Subpopulationen der T-Zellen in HC, DMARD und TNFi. Prozentualer Anteil der Zytokin-Anteile in den CD8-positiven Subpopulationen der T-Zellen bei den Gesunden, den JIA-Patienten der DMARD- und der TNFi-Gruppe.

- a-b) IFN γ - (a) bzw. IL-17-positive (b) in den CD8-positiven, naiven T-Zellen
- c) IFN γ -positive in den CD8-positiven, CCR7-positiven, naiven T-Zellen
- d) IL-17-positive in den CD8-positiven Memory-T-Zellen
- e-f) IFN γ -positive (e) bzw. IFN γ -/IL-17-doppelpositive (f) in den CD8-positiven TEMRA T-Zellen
- g-h) IFN γ -positive (g) bzw. IFN γ -/IL-17-doppelpositive (h) in den CD8-positiven, CCR7-negativen TEMRA T-Zellen

3.9.3. Zytokine in regulatorischen T-Zellen

Die IL-10-produzierenden, regulatorischen T-Zellen wiesen zwischen den Gruppen keine statistischen Signifikanzen auf (Abb.28). Tabelle 23 zeigt zusammenfassend die Zytokin-Produktion der regulatorischen T-Zellen mit den jeweiligen Signifikanzniveaus (siehe Appendix III.1.).

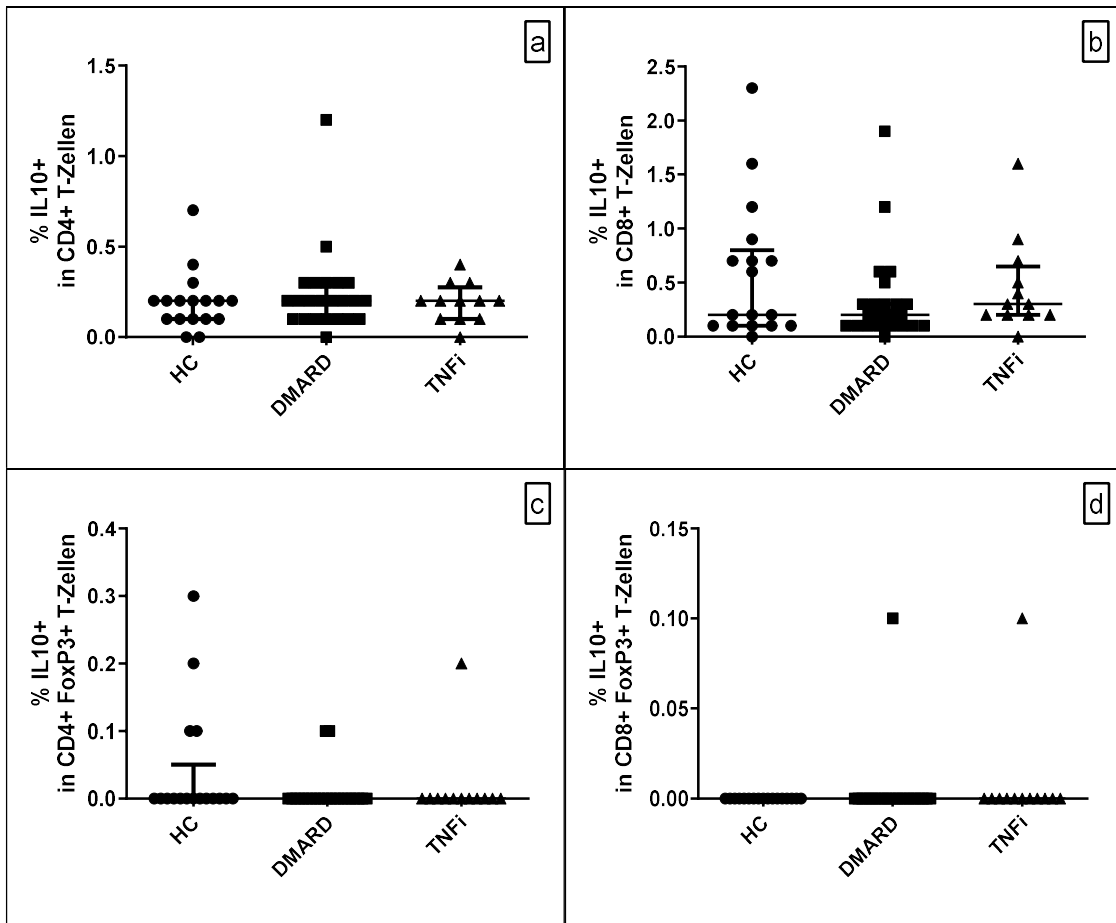


Abb.28a-d: Proportionale Verteilung des Zytokin-Anteils in den regulatorischen T-Zellen. Prozentualer Anteil der Zytokine in den regulatorischen T-Zellen bei den Gesunden, den JIA-Patienten der DMARD- und der TNFi-Gruppe.

a-b) IL-10-positive in den CD4-positiven (a) bzw. CD8-positiven T-Zellen (b)

c-d) IL-10-positive in den CD4-positiven (a) bzw. CD8-positiven, FoxP3-positiven T-Zellen (b)

3.9.4. Zytokine in den rezenten Thymusemigranten

In Tabelle 24 sind Werteverteilung und Signifikanzniveaus der Zytokine in den RTE und den Chemokin-Rezeptor-positiven T-Zellen aufgeführt (siehe Appendix III.1.).

Zytokine in den CD4-positiven, CD31-positiven T-Zellen: die IFN γ enthaltenden, CD31-positiven T-Zellen zeigten in der TNFi-Gruppe einen signifikant höheren Anteil als in der DMARD-Gruppe (Abb.29a). Auch IL-17 war bei den JIA-Patienten mit TNF α -Inhibitor signifikant mehr vorhanden als in der DMARD-Gruppe (Abb.29b). Die weiteren Untergruppen aus diesen Zellpopulationen, die CCR6 und CXCR3 trugen, boten keine signifikanten Unterschiede.

IL-17 in den CD4-positiven, CD127-positiven T-Zellen: die CD4-positiven, CD127-positiven T-Zellen enthielten in der DMARD-Gruppe einen hochsignifikant niedrigeren Anteil an IL-17 als bei den Gesunden und den Patienten mit TNF α -Inhibitor (Abb.29c).

IL-17 in den CD4-positiven, CD31-positiven, CD127-positiven T-Zellen: auch bei den CD31-, CD127-doppelpositiven T-Zellen trat signifikant weniger IL-17 bei den Patienten der DMARD-Gruppe auf im Vergleich zu den Patienten unter TNF α -Inhibitor-Therapie (Abb.29d).

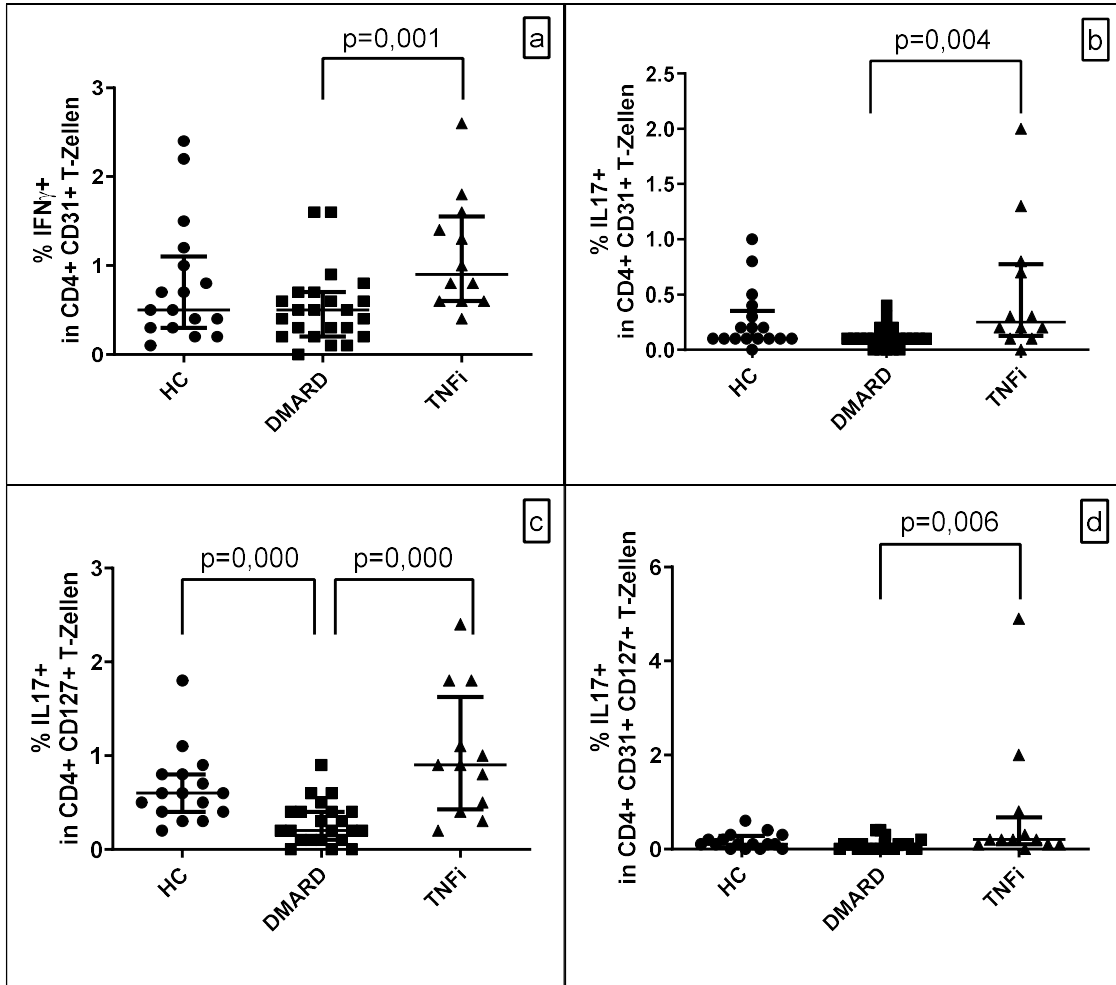


Abb.29a-d: Proportionale Verteilung des Zytokin-Anteils in den CD4-positiven RTE. Prozentualer Anteil der Zytokine in den CD4-positiven RTE bei den Gesunden, den JIA-Patienten der DMARD- und der TNFi-Gruppe.

a-b) IFN γ - (a) bzw. IL-17-positive (b) in den CD4-positiven, CD31-positiven T-Zellen

c) IL-17-positive in den CD4-positiven, CD127-positiven T-Zellen

d) IL-17-positive in den CD4-positiven, CD31-positiven, CD127-positiven T-Zellen

Zytokine in den CD8-positiven, CD31-positiven T-Zellen: die IFN γ enthaltenden, CD8-positiven, CD31-positiven T-Zellen konnten bei den JIA-Patienten der DMARD-Gruppe signifikant weniger als bei den Gesunden beobachtet werden (Abb.30a), wobei die CCR6-positiven Zellen in dieser Zellgruppe bei den Gesunden signifikant weniger auftraten als bei beiden Patientengruppen (Abb.30b). Die CXCR3-positiven und CCR6-/CXCR3-doppelpositiven Zellen aus dieser Zellsubpopulation und die CD8-positiven, CD31-positiven, IL-17-positiven T-Zellen sowie die Chemokin-Rezeptor-positiven Zellen aus dieser Zellsubpopulation boten keine signifikanten Unterschiede zwischen den 3 Gruppen.

Zytokine in den CD8-positiven, CD127-positiven: der IL-17-Anteil lag bei den CD8-positiven, CD127-positiven T-Zellen bei den JIA-Patienten mit TNF α -Inhibitor signifikant höher als bei den Patienten der DMARD-Gruppe oder den Gesunden (Abb.30c).

Zytokine in den CD8-positiven, CD31-positiven, CD127-positiven T-Zellen: auch bei den CD8-positiven, CD31-/CD127-doppelpositiven Zellen konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Patienten der TNFi-Gruppe und der DMARD-Gruppe festgestellt werden (Abb.30d).

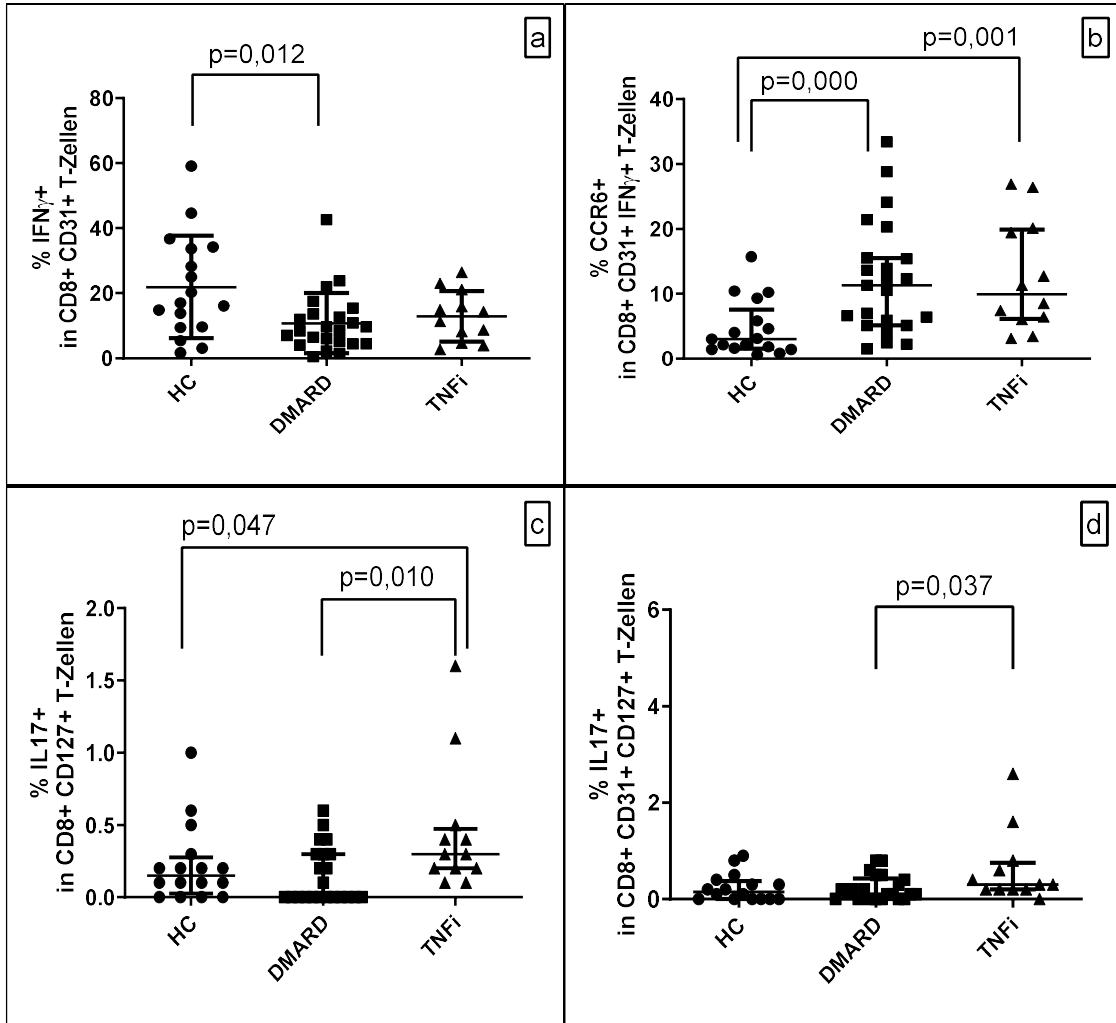


Abb.30a-d: Proportionale Verteilung des Zytokin-Anteils in den CD8-positiven RTE. Prozentualer Anteil der Zytokine in den CD8-positiven RTE bei den Gesunden, den JIA-Patienten der DMARD- und der TNFi-Gruppe.

- a) IFN γ -positive in den CD8-positiven, CD31-positiven T-Zellen
- b) CCR6-positive in den CD8-positiven, CD31-positiven, IFN γ -positiven T-Zellen
- c) IL-17-positive in den CD8-positiven, CD127-positiven T-Zellen
- d) IL-17-positive in den CD8-positiven, CD31-positiven, CD127-positiven T-Zellen

3.9.5. Zytokine der Chemokin-Rezeptor-positiven T-Zellen

Zytokine in den CD4-positiven, CCR6-positiven T-Zellen: IL-17 tragende CD4-positive, CCR6-positive T-Zellen waren bei den Gesunden signifikant mehr zu beobachten als in der DMARD-Gruppe ([Abb.31a](#)). Der IFN γ -Anteil zeigte in dieser Zellgruppe keine signifikanten Unterschiede.

Zytokine in den CD4-positiven, CXCR3-positiven T-Zellen: die CD4-positiven, CXCR3-positiven T-Zellen wiesen bei der Zytokin-Verteilung ebenfalls keine signifikanten Unterschiede auf.

Zytokine in den CD4-positiven, CCR6-positiven, CXCR3-positiven T-Zellen: IFN γ exprimierende CD4-positive, CCR6-positive, CXCR3-positive T-Zellen traten bei den Gesunden signifikant häufiger auf als bei den JIA-Patienten mit TNF α -Inhibitor ([Abb.31b](#)). Der IL-17-Anteil zeigte in dieser Zellgruppe keine signifikanten Unterschiede.

Zytokine in den CD8-positiven, CCR6-positiven T-Zellen: IL-17 tragende CD8-positive, CCR6-positive T-Zellen waren bei den Gesunden und den Patienten mit TNF α -Inhibitor signifikant mehr als in der DMARD-Gruppe vorhanden ([Abb.31c](#)). IFN γ differierte in dieser Zellgruppe nicht signifikant.

Zytokine in den CD8-positiven, CXCR3-positiven T-Zellen: bei den Gesunden fand sich ein signifikant höherer IFN γ -Anteil der CD8-positiven, CXCR3-positiven T-Zellen als bei den JIA-Patienten der DMARD-Gruppe ([Abb.31d](#)). Bei den IL-17-positiven Zellen waren keine signifikanten Unterschiede anzutreffen.

Zytokine in den CD8-positiven, CCR6-positiven, CXCR3-positiven T-Zellen: bei den CD8-positiven, CCR6-positiven, CXCR3-positiven T-Zellen äußerten sich keine signifikanten Unterschiede bei der Zytokin-Verteilung.

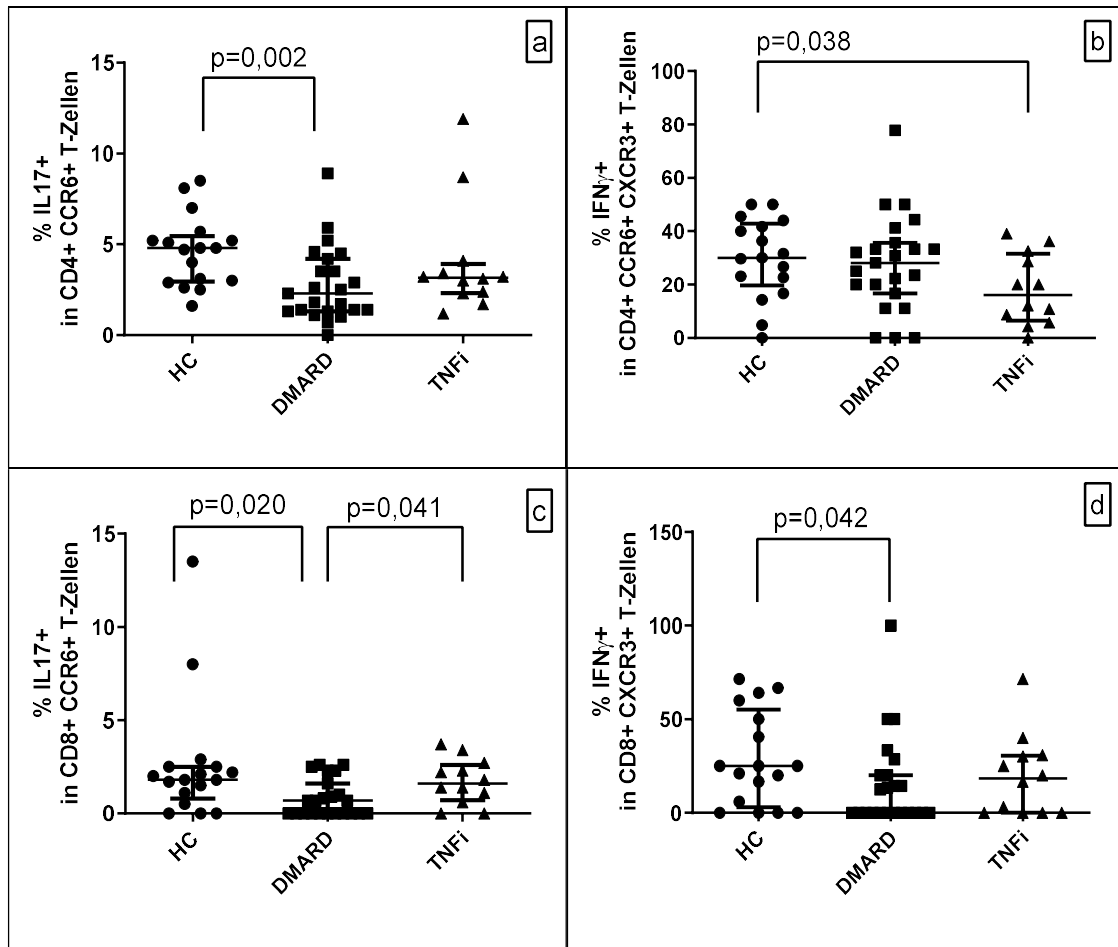


Abb.31a-d: Proportionale Verteilung des Zytokin-Anteils in den Chemokin-Rezeptor-positiven T-Zellen. Prozentualer Anteil der Zytokine in den Chemokin-Rezeptor-positiven T-Zellen bei den Gesunden, den JIA-Patienten der DMARD- und der TNFi-Gruppe.

- IL-17-positive in den CD4-positiven, CCR6-positiven T-Zellen
- IFN γ -positive in den CD4-positiven, CCR6-positiven, CXCR3-positiven T-Zellen
- IL-17-positive in den CD8-positiven, CCR6-positiven T-Zellen
- IFN γ -positive in den CD8-positiven, CXCR3-positiven T-Zellen

3.9.6. Zytokine in T-Zellrezeptor-positiven T-Zellen

In Tabelle 25 ist die Werteverteilung der Zytokine und die Signifikanzniveaus der TCR-positiven T-Zellen erfasst (siehe Appendix III.1.). Insbesondere bei den TCR $\gamma\delta$ -positiven T-Zellen handelte es sich jedoch um sehr wenige Zellen, die eine Ausprägung des Zytokins aufwiesen.

IL-17 in den CD4-positiven, TCR $\alpha\beta$ -positiven T-Zellen: die IL-17 enthaltenden CD4-positiven, TCR $\alpha\beta$ -positiven T-Zellen kamen bei den JIA-Patienten der DMARD-Gruppe signifikant weniger vor als bei den Patienten mit TNF α -Inhibitor oder bei den Gesunden (Abb.32a). Auch bei den CD4-positiven, CD31-positiven, TCR $\alpha\beta$ -positiven T-Zellen zeigte sich in der DMARD-Gruppe ein signifikant geringerer IL-17-Anteil als bei der TNFi-Gruppe (Abb.32b).

IL-17 in den CD8-positiven, TCR $\alpha\beta$ -positiven T-Zellen: die IL-17 tragenden CD8-positiven, TCR $\alpha\beta$ -positiven T-Zellen waren bei den JIA-Patienten mit TNF α -Inhibitor signifikant häufiger anzutreffen als bei den Patienten der DMARD-Gruppe (Abb.32c). Bei den CD8-positiven, CD31-positiven, TCR $\alpha\beta$ -positiven T-Zellen konnte in der Zytokin-Verteilung kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

IL-17 in den CD4-positiven, TCR $\gamma\delta$ -positiven T-Zellen: die IL-17 enthaltenden CD4-positiven, TCR $\gamma\delta$ -positiven (Abb.33a) bzw. CD31-positiven, TCR $\gamma\delta$ -positiven T-Zellen (Abb.33b) manifestierten sich bei den JIA-Patienten der TNFi-Gruppe signifikant häufiger als bei der DMARD-Gruppe oder den Gesunden.

IL-17 in den CD8-positiven, TCR $\gamma\delta$ -positiven T-Zellen: ein signifikant höherer Anteil an IL-17 in den CD8-positiven, TCR $\gamma\delta$ -positiven T-Zellen zeigte sich bei der TNFi-Gruppe im Vergleich zur DMARD-Gruppe oder zu den Gesunden (Abb.33c). Bei den CD8-positiven, CD31-positiven, TCR $\gamma\delta$ -positiven T-Zellen trat signifikant mehr IL-17 bei den Patienten mit TNF α -Inhibitor auf als bei den DMARD-Patienten (Abb.33d).

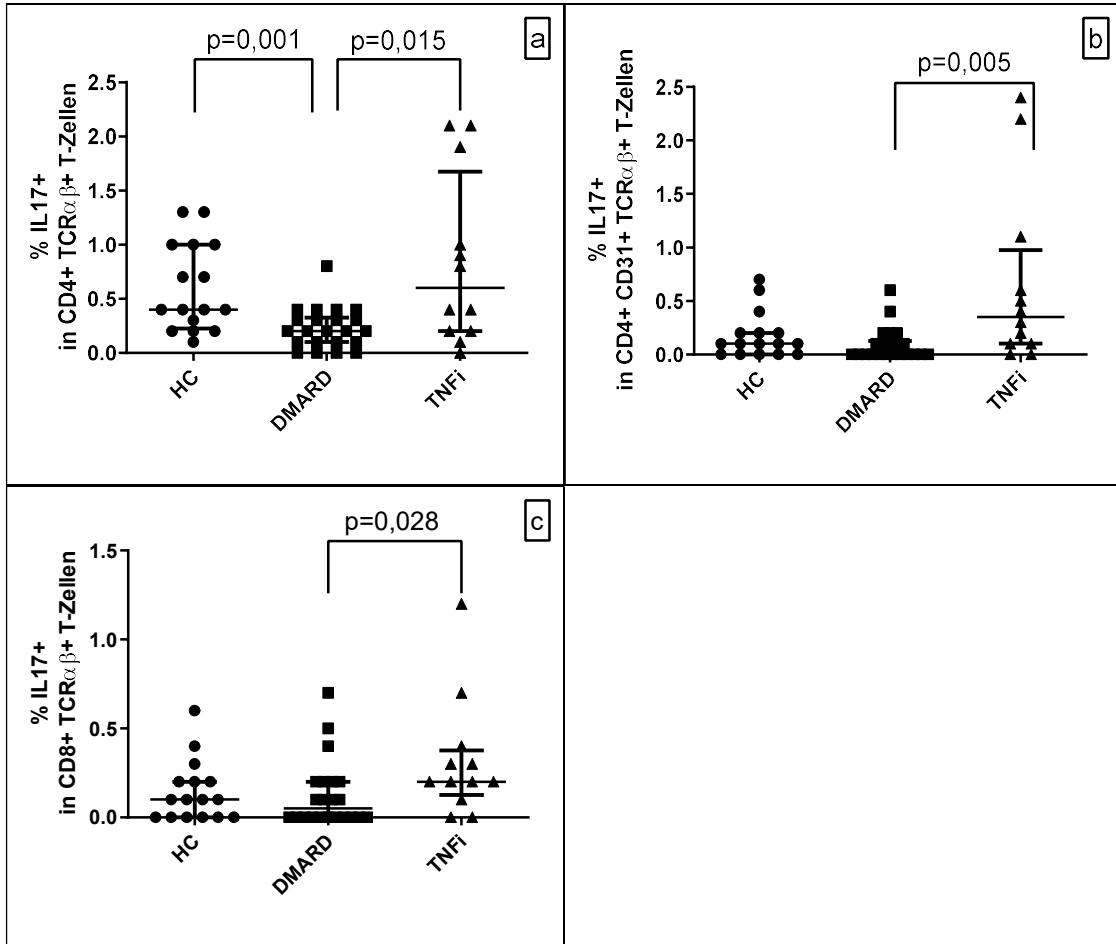


Abb.32a-c: Proportionale Verteilung des Zytokin-Anteils in den TCR $\alpha\beta$ -positiven T-Zellen in HC, DMARD und TNFi. Prozentualer Zytokin-Anteil der TCR $\alpha\beta$ -positiven T-Zellen in den Gesunden, den JIA-Patienten der DMARD- und der TNFi-Gruppe.

- a) IL-17-positiv in den CD4-positiven, TCR $\alpha\beta$ -positiven T-Zellen
- b) IL-17-positiv in den CD4-positiven, CD31-positiven, TCR $\alpha\beta$ -positiven T-Zellen
- c) IL-17-positiv in den CD8-positiven, TCR $\alpha\beta$ -positiven T-Zellen

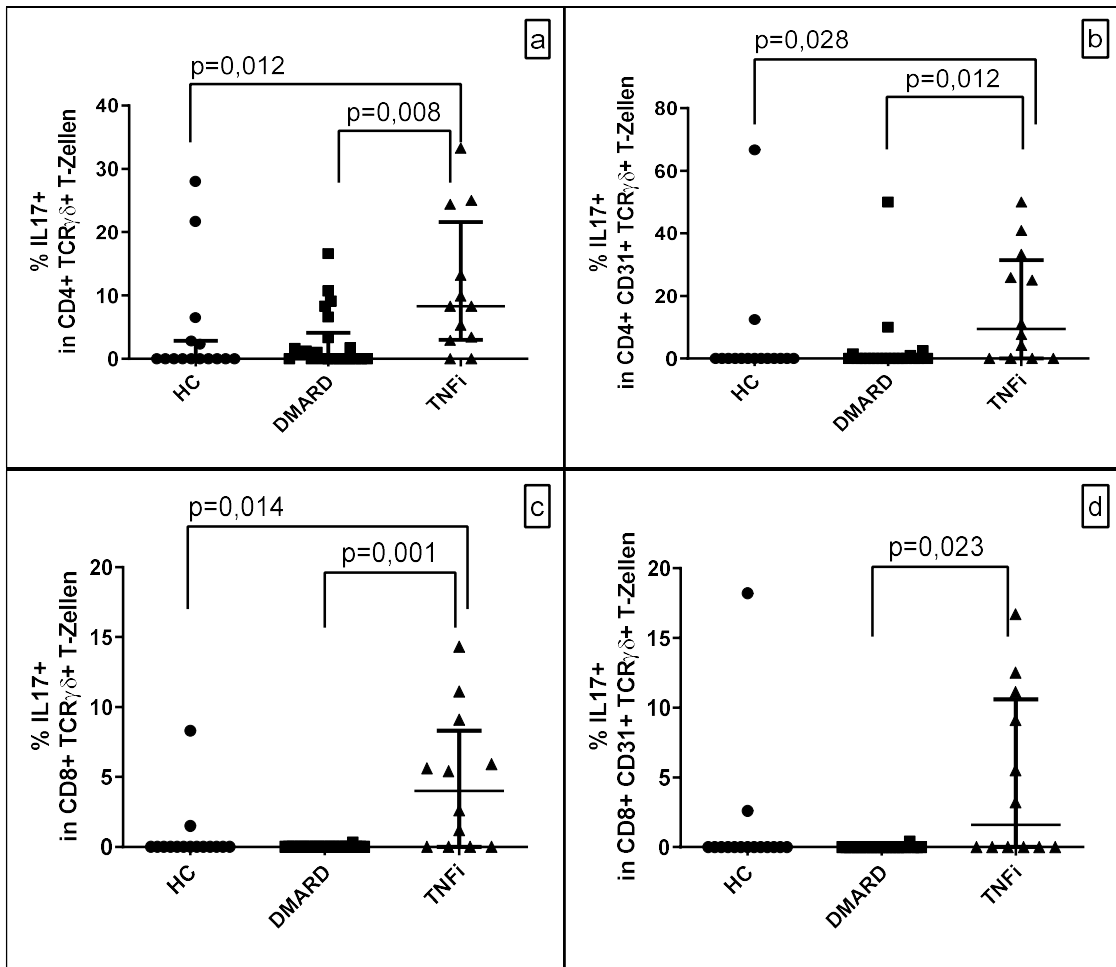


Abb.33a-d: Proportionale Verteilung des Zytokin-Anteils in den TCR $\gamma\delta$ -positiven T-Zellen in HC, DMARD und TNFi. Prozentualer Zytokin-Anteil der TCR $\gamma\delta$ -positiven T-Zellen in den Gesunden, den JIA-Patienten der DMARD- und der TNFi-Gruppe.

- a) IL-17-positiv in den CD4-positiven, TCR $\gamma\delta$ -positiven T-Zellen
- b) IL-17-positiv in den CD4-positiven, CD31-positiven, TCR $\gamma\delta$ -positiven T-Zellen
- a) IL-17-positiv in den CD8-positiven, TCR $\gamma\delta$ -positiven T-Zellen
- b) IL-17-positiv in den CD8-positiven, CD31-positiven, TCR $\gamma\delta$ -positiven T-Zellen

3.10. IL-7-Level

IL-7 wurde mittels Sandwich-Elisa aus dem Serum bestimmt (Erklärung der Messmethode siehe 2.2.6.). Aus der photometrisch ermittelten, optischen Densität (OD) wurde mit Hilfe der Standardverdünnungsreihe eine lineare Gleichung zur Berechnung der genauen IL-7-Konzentration ermittelt (Abb.34, Abb.35). Zwischen den 3 Gruppen fanden sich keine signifikanten Werteunterschiede im IL-7-Level.

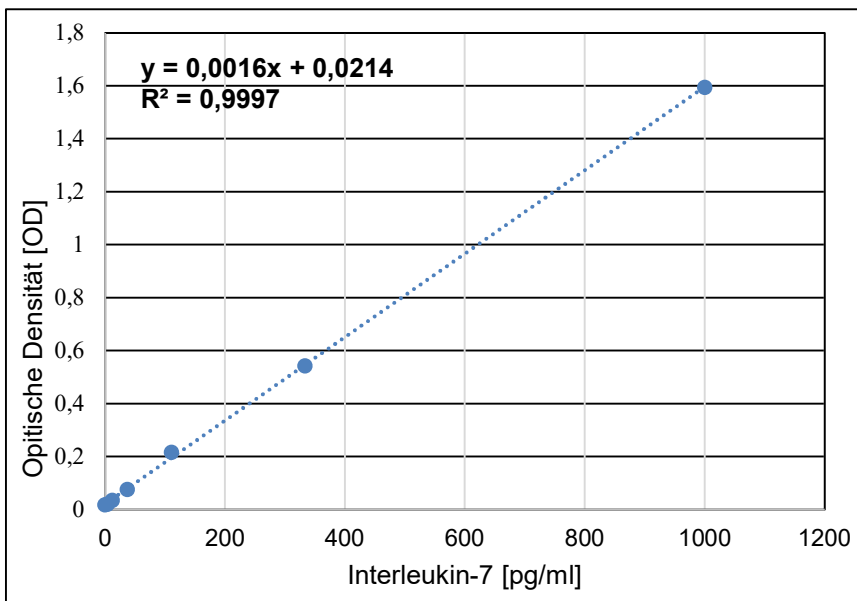


Abb.34: Lineare Korrelation zwischen IL-7-Standardkonzentration und optischer Densität. Graphisch dargestellt ist die aus der optischen Densität (y-Achse) und der Standardverdünnungsreihe berechnete Gerade mit der exakten mathematischen Formel.

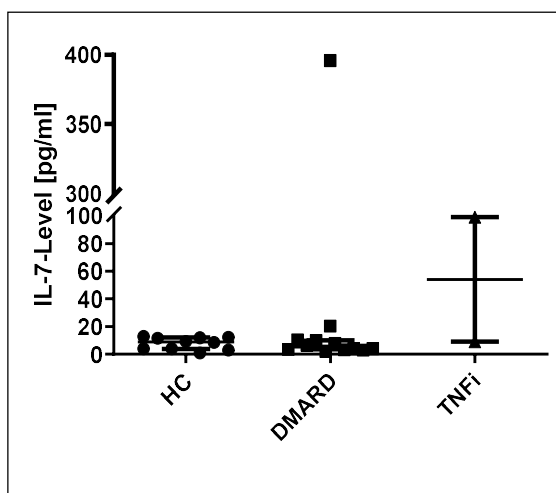


Abb.35: Werteverteilung der IL-7-Konzentrationen [pg/ml] in HC (n=10), DMARD (n=12) und TNFi (n=2). Verteilung der IL-7-Konzentrationswerte bei den Gesunden, den JIA-Patienten der DMARD- und der TNFi-Gruppe.

3.11. Proliferation

Ki-67 in den CD4-positiven T-Zellen: die CD4-positiven T-Zellen wiesen bei den Gesunden einen signifikant höheren Ki-67-positiven Anteil auf als bei JIA-Patienten der DMARD-Gruppe (Abb.36a). Die Ki-67-/IL-17-doppelpositiven, CD4-positiven T-Zellen zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Auch bei den CD4-positiven, CD31-positiven Zellen präsentierte sich bei den Gesunden eine signifikant höhere Proliferation als bei beiden Medikamentengruppen (Abb.36b). Der Ki-67-positive Anteil der CD4-positiven, CD127-positiven T-Zellen war bei den Gesunden signifikant höher als bei den JIA-Patienten der DMARD-Gruppe (Abb.36c). Bei den CD4-positiven, CD31-positiven, CD127-positiven T-Zellen konnten weder bei den Ki-67-positiven, noch bei den Ki-67-/IL-17-doppelpositiven T-Zellen signifikante Werte eruiert werden.

Ki-67 in den CD8-positiven T-Zellen: weder bei den CD8-positiven T-Zellen, noch bei den CD31-positiven/CD127-positiven Untergruppen gab es signifikant unterschiedliche Ki-67-Anteile.

Tabelle 26 umfasst die Häufigkeiten der Proliferation und die Signifikanzniveaus der Ki-67-positiven T-Zellen (siehe Appendix III.1.).

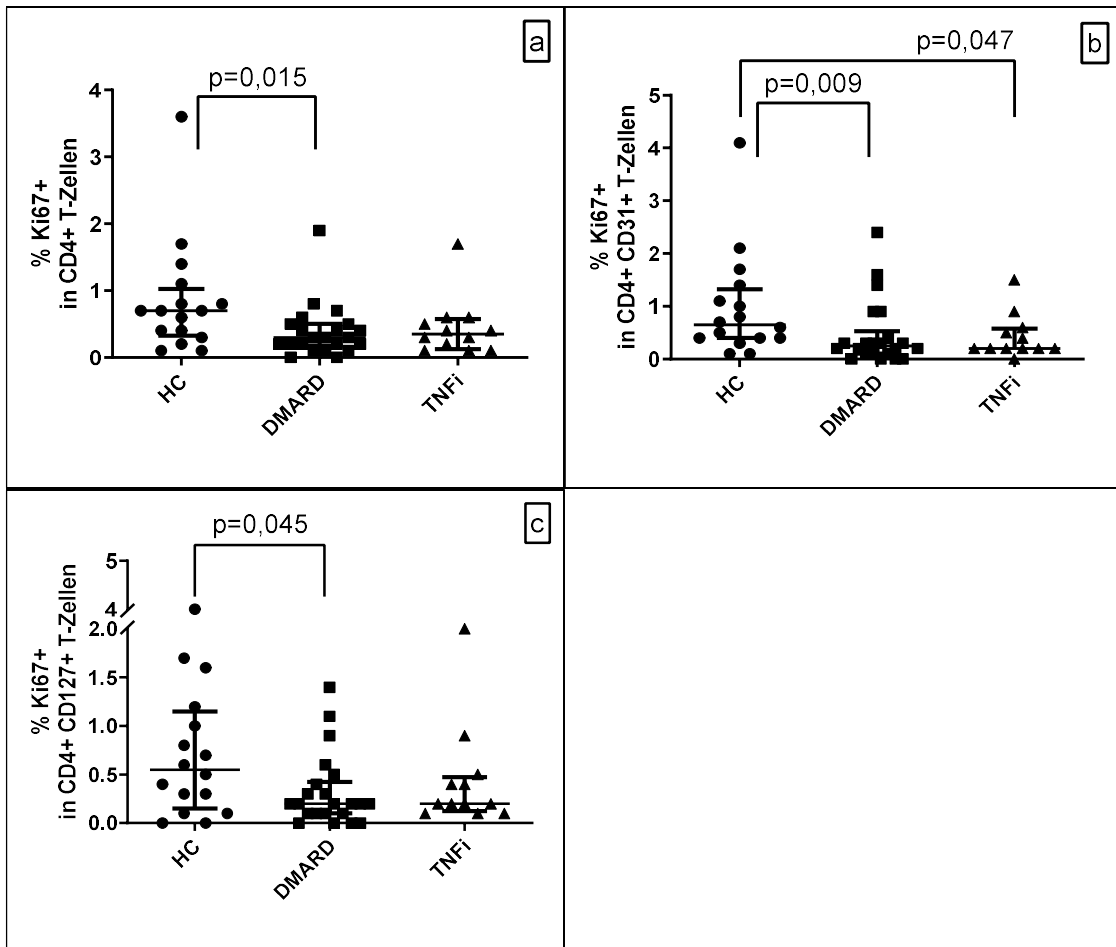


Abb.36a-c: Proportionale Verteilung der Proliferation in den CD4-positiven T-Zellen in HC, DMARD und TNFi. Prozentuale Verteilung des Ki-67-Anteils in den CD4-positiven T-Zellen bei den Gesunden, den JIA-Patienten der DMARD-Gruppe und der TNFi-Gruppe.

- a) Ki-67-positiv in den CD4-positiven T-Zellen
- b) Ki-67-positiv in den CD4-positiven, CD31-positiven T-Zellen
- c) Ki-67-positiv in den CD4-positiven, CD127-positiven T-Zellen

3.12. TRECs

Die TRECs, berechnet auf 10.000 PBMCs, traten bei den JIA-Patienten der DMARD-Gruppe signifikant häufiger auf als bei den JIA-Patienten mit TNF α -Inhibitor oder bei den Gesunden (Abb.37).

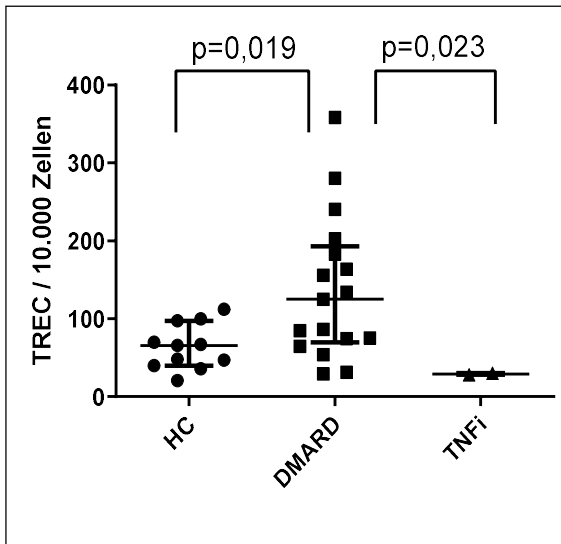


Abb.37: Werteverteilung der TRECs in HC (n=11), DMARD (n=16) und TNFi (n=2). Verteilung der TREC-Anzahl auf 10.000 PBMCs bei den Gesunden, den JIA-Patienten der DMARD-Gruppe und der TNFi-Gruppe.

3.13. Relative Telomerlänge

Bei der Untersuchung der relativen Telomerlängen fielen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen auf (Abb.38).

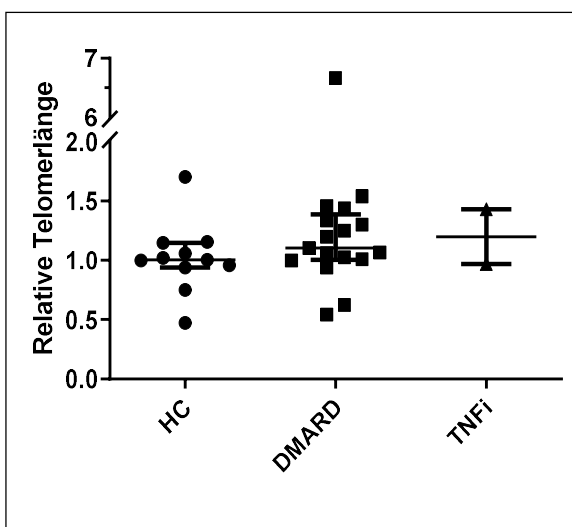


Abb.38: Werteverteilung der relativen Telomerlängen in HC (n=11), DMARD (n=17) und TNFi (n=2). Verteilung der relativen Telomerlängen bei den Gesunden, den JIA-Patienten der DMARD-Gruppe und der TNFi-Gruppe in Bezug auf eine Einzelgenkopie.

In Tabelle 27 ist die Werteverteilung des IL-7-Levels, der TRECs und der relativen Telomerlängen aufgelistet, zusammen mit den Signifikanzwerten nach Mann-Whitney-U (siehe Appendix III.1.).

3.14. Lineare Korrelation und multiple Regressionsanalyse

Für die T-Zell-Subgruppen, die relative Telomerlänge, die TREC-Anzahl und das IL-7-Level wurden nach Spearman Korrelationen errechnet, wobei das chronologische Alter, die Krankheitsdauer, die Laborparameter, die JIA-Subgruppe sowie die TNFi-Therapiedauer als unabhängige Vergleichsvariablen definiert wurden. Korrelationen wurden sowohl innerhalb der DMARD- und der TNFi-Gruppe als auch für die JIA-Gesamtpopulation kalkuliert. Die lineare Regressionsanalyse wurde für Alter, Geschlecht, Krankheitsdauer, TNFi-Einnahmedauer und die derzeitige Medikation durchgeführt, um die Einflussstärke der klinischen Merkmale auf die Laborergebnisse nachzuweisen. p-Werte kleiner als 0,05 wurden als signifikant definiert.

CD4-positive, naive T-Zellen: das Alter bei Blutentnahme korrelierte invers mit dem Anteil der CD4-positiven, naiven T-Zellen in der JIA-Gesamtkohorte ($\rho = -0,364$; $p = 0,034$) und in der TNFi-Gruppe ($\rho = -0,716$; $p = 0,009$) (Abb.39), wobei innerhalb der JIA-Kohorte das Alter (Regressionskoeffizient $\beta = -0,366$; $p = 0,034$) den größten Einfluss auf die Abnahme der CD4-positiven, naiven T-Zellen zeigte ($R = 0,034$; $p = 0,029$). In der JIA-Gesamtkohorte erwiesen sich zudem die NSAR-Einnahme ($\beta = 0,408$; $p = 0,032$) sowie niedrigere BSG-Werte ($\beta = -0,364$; $p = 0,053$) als Indikatoren für eine höhere Zellzahl.

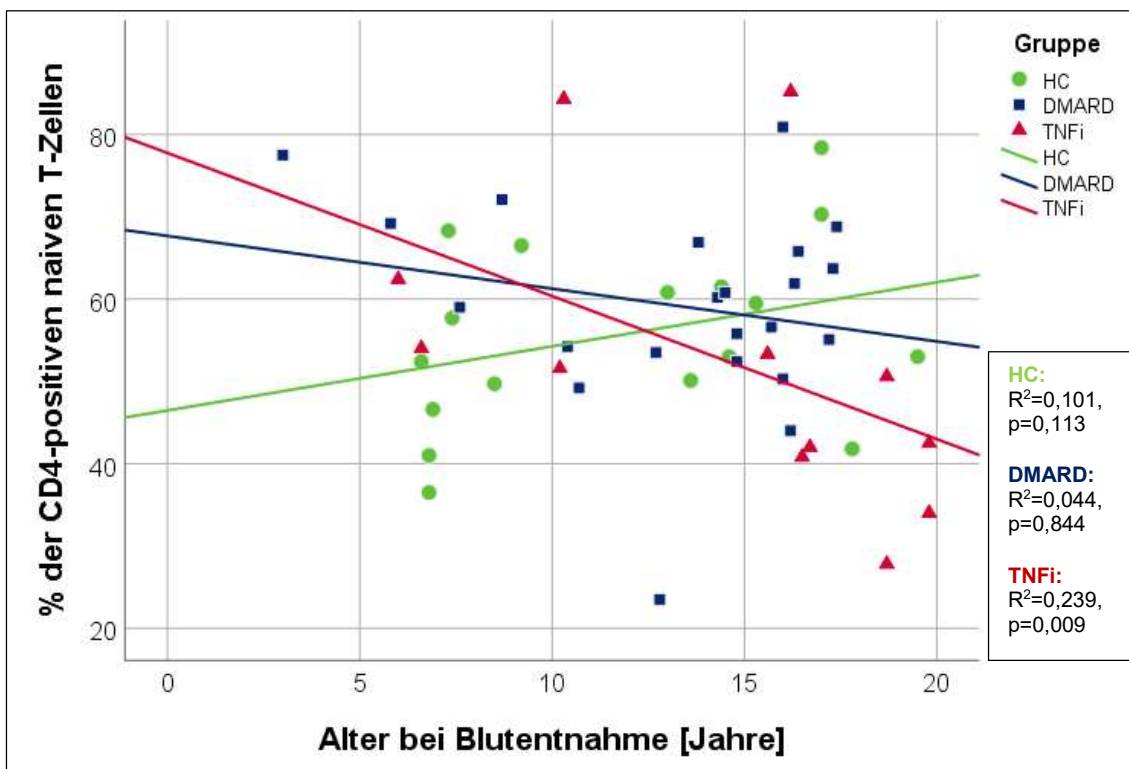


Abb.39: Graphische Darstellung der Regression der CD4-positiven, naiven T-Zellen gegen das jeweilige Alter bei Blutentnahme. In der Abbildung ist die Häufigkeit der CD4-positiven, naiven T-Zellen gegen das Alter bei Blutentnahme aufgetragen. Jeder Punkt stellt den Datensatz eines Probanden dar. Die Geraden sind die linearen Anpassungslinien der Untergruppen. Die HC-Gruppe ist grün, die DMARD-Gruppe blau und die TNFi-Gruppe rot eingefärbt (siehe Legende rechts am Bildrand). Zusätzlich ist der Koeffizient R^2 und der p -Wert angegeben.

CD4-positive Memory-T-Zellen: bei den TNFi-Patienten bestand eine signifikante Korrelation der CD4-positiven Memory-T-Zellen zum Alter ($\rho=0,663$; $p=0,019$) (Abb.40). Innerhalb der JIA-Gesamtkohorte ($R=0,342$; $p=0,048$) konnte der signifikante Einflussfaktor Alter ($\beta=0,342$; $p=0,048$) auf die Zellen nachgewiesen werden. Auch wenn das Regressionsmodell für die TNFi-Patienten nicht signifikant war ($R=0,527$; $p=0,078$), konnte auch hier ein deutlicher Einfluss des Alters auf eine höhere Anzahl an CD4-positiven Memory-T-Zellen eruiert werden ($\beta=0,527$; $p=0,078$).

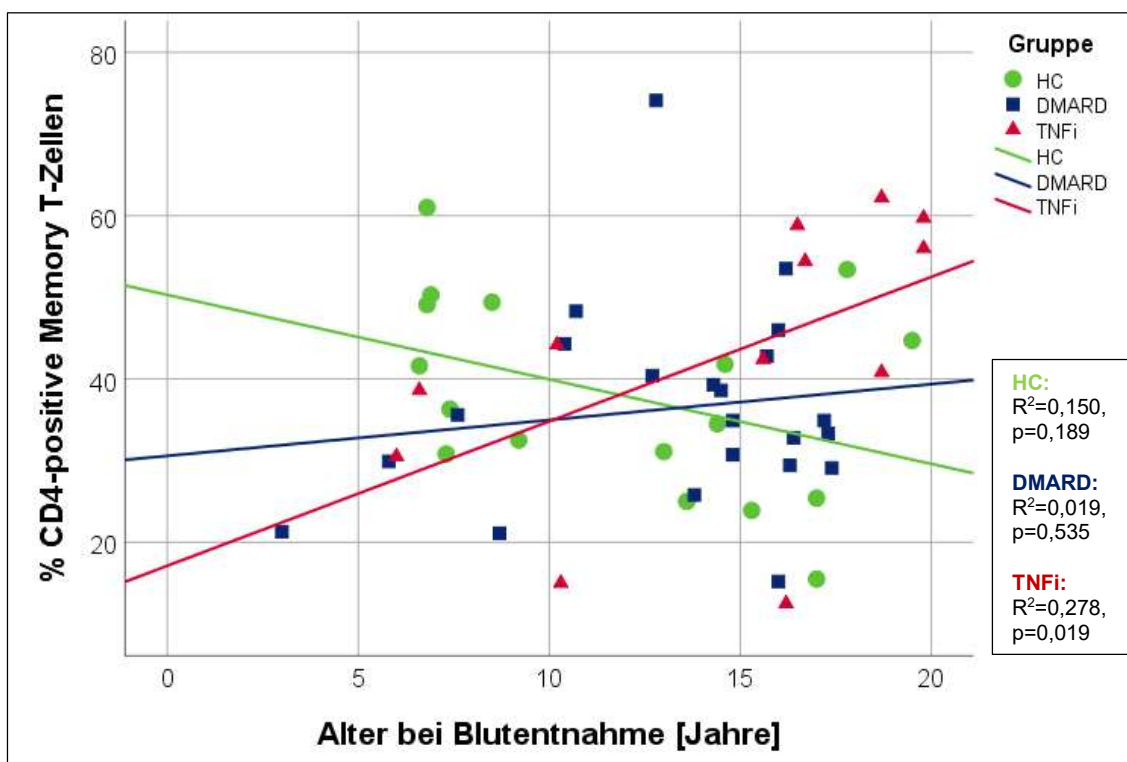


Abb.40: Graphische Darstellung der Regression der CD4-positiven Memory-T-Zellen in Relation zum jeweiligen Alter bei Blutentnahme. In der Abbildung ist die Häufigkeit der CD4-positiven Memory-T-Zellen gegen das Alter bei Blutentnahme aufgetragen. Jeder Punkt stellt den Datensatz eines Probanden dar. Die Geraden sind die linearen Anpassungslinien der Untergruppen. Die HC-Gruppe ist grün, die DMARD-Gruppe blau und die TNFi-Gruppe rot eingefärbt (siehe Legende rechts am Bildrand). Zusätzlich ist der Koeffizient R^2 und der p -Wert angegeben.

CD4-positive Effektor-T-Zellen: ein signifikantes Regressionsmodell innerhalb der JIA-Gesamtkohorte ($R=0,907$; $p=0,005$) konnte für MTX-Einnahme ($\beta=0,314$; $p=0,091$), TNFi-Dauer ($\beta= -0,374$; $p=0,058$) und CRP-Wert ($\beta=0,702$; $p=0,004$) ermittelt werden. In der DMARD-Gruppe ($R=0,437$; $p=0,042$) nahm die Therapie mit MTX ($\beta= -0,437$; $p=0,042$) den stärksten negativen Einfluss in der Regressionsanalyse auf die CD4-positiven Effektor-T-Zellen. Auch in der TNFi-Gruppe ($R=0,858$; $p=0,036$) konnte neben BSG ($\beta=0,710$; $p=0,034$) und CRP ($\beta=1,021$; $p=0,010$) die Einnahme von MTX ($\beta=1,057$; $p=0,016$) als wesentlicher Einflussfaktor belegt werden. In der TNFi-Gruppe zeigte sich eine positive Korrelation der Zellen zum CRP-Wert ($\rho= 0,683$; $p=0,020$).

CD4-positive TEMRA T-Zellen: in der DMARD-Gruppe hatte die Krankheitsdauer einen starken Einfluss auf eine ansteigende Zellzahl ($\beta=0,425$; $p=0,049$). Ein signifikantes Modell ($R=0,996$; $p=0,026$) konnte in der TNFi-Gruppe für TNFi-Dauer ($\beta= -0,559$; $p=0,039$), Krankheitsdauer ($\beta= -0,529$; $p=0,043$), BSG ($\beta= -2,551$; $p=0,011$) sowie die Einnahme eines GC ($\beta= -1,951$; $p=0,012$), eines NSAR ($\beta=2,509$; $p=0,013$) oder von MTX ($\beta= -1,074$; $p=0,016$) errechnet werden. Signifikante Korrelationen in den unterschiedlichen Gruppen waren nicht zu beobachten.

CD8-positive, naive T-Zellen: in der JIA-Gesamtkohorte zeigte sich eine inverse Korrelation der CD8-positiven, naiven T-Zellen bei TNFi-Einnahme ($\rho = -0,408$; $p = 0,017$) (Abb.41). Die Anwesenheit von JIA war ein wesentlicher Faktor für die Zunahme von CD8-positiven, naiven T-Zellen ($R = 0,362$; $p = 0,009$), wobei innerhalb der JIA-Gesamtkohorte ebenfalls ein höherer Zellanteil bei niedrigerer BSG ($\beta = -0,446$; $p = 0,015$) und NSAR-Medikation ($\beta = 0,446$; $p = 0,015$) zu beobachten war. Unter Einschluss des Alters und der Medikamente konnte ein ebenfalls signifikantes Modell errechnet werden, in dem eine TNFi-Medikation ($\beta = -0,390$; $p = 0,022$) als wesentlicher Faktor der Abnahme von CD8-positiven, naiven T-Zellen gezeigt werden konnte. Innerhalb der TNFi-Gruppe bestand bei niedrigerer BSG ($\beta = -0,937$; $p = 0,044$) und Einnahme eines NSAR ($\beta = 0,810$; $p = 0,066$) eine nahezu signifikante Wirkung hin zu einem höheren Zellanteil ($R = 0,701$; $p = 0,094$).

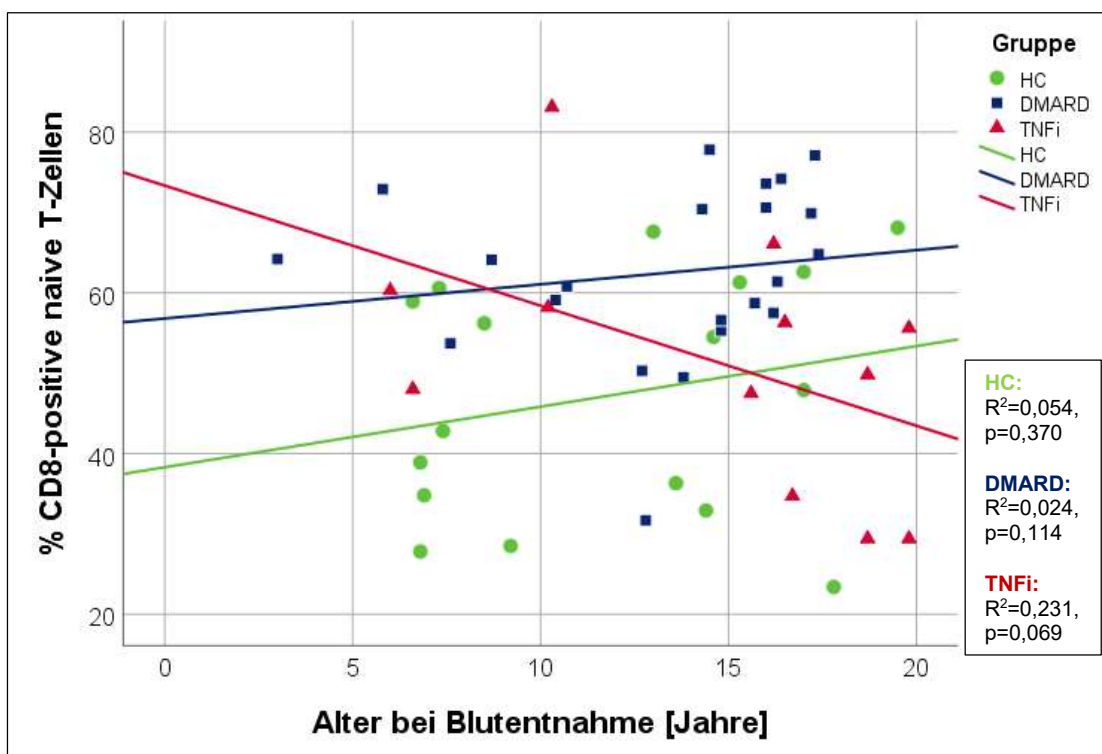


Abb.41: Graphische Darstellung der Regression der CD8-positiven, naiven T-Zellen in Relation zum jeweiligen Alter bei Blutentnahme. In der Abbildung ist die Häufigkeit der CD8-positiven, naiven T-Zellen gegen das Alter bei Blutentnahme aufgetragen. Jeder Punkt stellt den Datensatz eines Probanden dar. Die Geraden sind die linearen Anpassungslinien der Untergruppen. Die HC-Gruppe ist grün, die DMARD-Gruppe blau und die TNFi-Gruppe rot eingefärbt (siehe Legende rechts am Bildrand). Zusätzlich ist der Koeffizient R^2 und der p -Wert angegeben.

CD8-positive Memory-T-Zellen: TNF α -Medikation korrelierte in der JIA-Gesamtkohorte mit den CD8-positiven Memory-T-Zellen ($\rho=0,408$; $p=0,017$). Die Stärke des Zusammenhangs ließ sich in einer Regressionsanalyse bestätigen ($\beta=0,436$; $p=0,010$) (Abb.42). Zudem waren geringere Anteile der Zellen bei niedrigeren BSG-Werten ($\beta=0,512$; $p=0,006$) sowie bei NSAR-Medikation ($\beta=-0,340$; $p=0,060$) in JIA ($R=0,520$; $p=0,014$) zu beobachten.

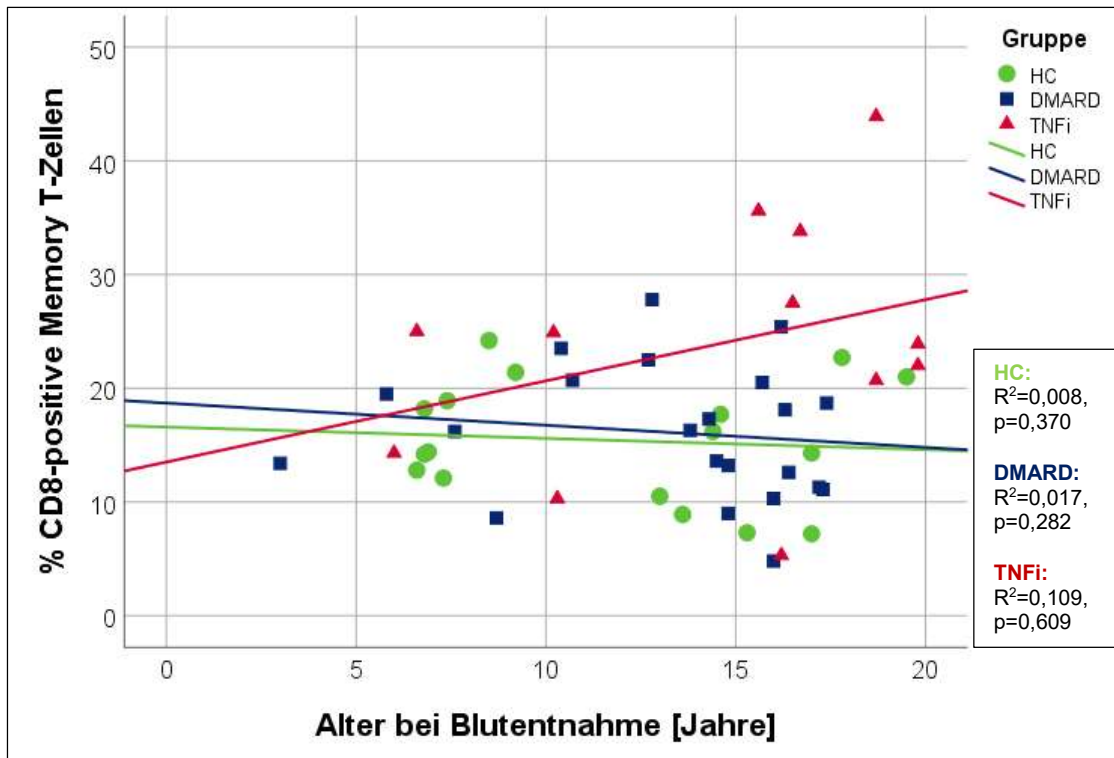


Abb.42: Graphische Darstellung der Regression der CD8-positiven Memory-T-Zellen in Relation zum jeweiligen Alter bei Blutentnahme. In der Abbildung ist die Häufigkeit der CD8-positiven Memory-T-Zellen gegen das Alter bei Blutentnahme aufgetragen. Jeder Punkt stellt den Datensatz eines Probanden dar. Die Geraden sind die linearen Anpassungslinien der Untergruppen. Die HC-Gruppe ist grün, die DMARD-Gruppe blau und die TNFi-Gruppe rot eingefärbt (siehe Legende rechts am Bildrand). Zusätzlich ist der Koeffizient R² und der p-Wert angegeben.

CD8-positive Effektor-T-Zellen: in der DMARD-Gruppe bestand eine inverse Korrelation der Zellen in Bezug auf das Alter ($\rho = -0,463$; $p = 0,030$). Für niedrigere Anteile von CD8-positiven Effektor-T-Zellen war JIA-Positivität der Haupteinflussfaktor ($\beta = -0,350$; $p = 0,012$). Innerhalb der JIA-Gruppe ($R = 0,528$; $p = 0,012$) ließ sich eine niedrigere Zellanzahl bei NSAR-Einnahme ($\beta = -0,428$; $p = 0,019$) und niedrigeren BSG-Werten ($\beta = 0,469$; $p = 0,011$) belegen. Ein Regressionsmodell zeigte zudem einen Anstieg der Zellen unter Einfluss von TNFi ($\beta = 0,339$; $p = 0,050$). Innerhalb der DMARD-Gruppe fanden sich weniger Effektorzellen bei NSAR-Einnahme ($\beta = -0,424$; $p = 0,049$).

CD8-positive TEMRA T-Zellen: in der TNFi-Gruppe korrelierte die Zellanzahl invers mit der Leukozytenzahl ($\rho = -0,681$; $p = 0,030$). JIA-Positivität nahm auch hier einen maßgeblichen Einfluss auf niedrigere Zellanteile der CD8-positiven TEMRA T-Zellen ($\beta = -0,477$; $p = 0,0001$). Eine längere TNFi-Therapiedauer ($\beta = -1,733$; $p = 0,037$) war ein wesentlicher, unabhängiger Einflussfaktor für niedrigere Zellanteile. Weitere Einflussfaktoren in diesem beinahe signifikanten Modell ($R = 0,999$; $p = 0,090$) stellten das Alter ($\beta = 1,102$; $p = 0,035$), die Werte von BSG ($\beta = -6,022$; $p = 0,038$) und CRP ($\beta = -1,417$; $p = 0,045$) sowie die Einnahme eines GC ($\beta = -2,676$; $p = 0,044$), eines NSAR ($\beta = 4,832$; $p = 0,042$) bzw. von MTX ($\beta = -3,246$; $p = 0,038$) dar.

CD4-positive, CD31-positive T-Zellen: in der Patienten-Gesamtkohorte wiesen diese Zellen eine inverse Korrelation bei TNFi-Medikation auf ($\rho = -0,498$; $p = 0,002$) (Abb.43), was sich auch in der Regressionsanalyse ($R = 0,585$; $p = 0,001$) bestätigen ließ ($\beta = -0,481$; $p = 0,002$). Zudem zeigte das Alter einen starken negativen Effekt auf diese Zellen ($\beta = -0,283$; $p = 0,058$).

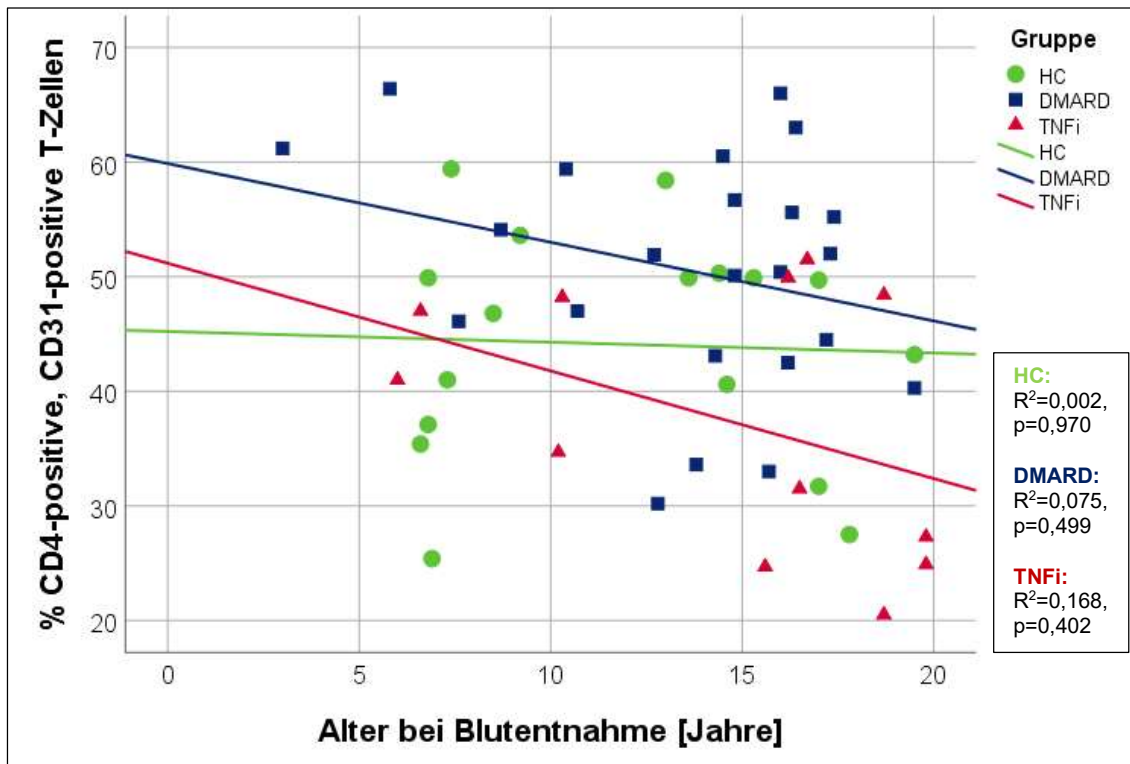


Abb.43: Graphische Darstellung der Regression der CD4-positiven, CD31-positiven T-Zellen in Relation zum jeweiligen Alter bei Blutentnahme. In der Abbildung ist die Häufigkeit der CD4-positiven, CD31-positiven T-Zellen gegen das Alter bei Blutentnahme aufgetragen. Jeder Punkt stellt den Datensatz eines Probanden dar. Die Geraden sind die linearen Anpassungslinien der Untergruppen. Die HC-Gruppe ist grün, die DMARD-Gruppe blau und die TNFi-Gruppe rot eingefärbt (siehe Legende rechts am Bildrand). Zusätzlich ist der Koeffizient R^2 und der p-Wert angegeben.

CD4-positive, CD127-positive T-Zellen: für alle Probanden war das Vorliegen von JIA der entscheidende Einflussfaktor auf eine Zunahme von CD4-positiven, CD127-positiven T-Zellen ($\beta=0,608$; $p=0,0001$). In der JIA-Gruppe ($R=0,959$; $p=0,026$) beeinflussten die Dauer der TNFi-Einnahme ($\beta=0,608$; $p=0,019$) und das Alter ($\beta=0,636$; $p=0,021$) die Zellen am meisten. Auch in der TNFi-Gruppe ($R=0,901$; $p=0,003$) zeigten sich Alter ($\beta=0,832$; $p=0,001$) und TNFi-Dauer ($\beta=0,459$; $p=0,027$) als maßgebliche Einflussfaktoren. Ein fast-signifikantes Modell konnte innerhalb der DMARD-Gruppe für MTX ($\beta=0,400$; $p=0,065$) und eine zunehmende Zellzahl berechnet werden.

CD4-positive, CD31-positive, CD127-positive T-Zellen: die TNFi-Medikation korrelierte invers mit der Anzahl der CD31/CD127-doppelpositiven T-Zellen ($\rho=-0,345$; $p=0,046$) innerhalb der Gesamtkohorte der Patienten. Dieser Zusammenhang konnte für die JIA-Gesamtkohorte ebenfalls in der Regressionsanalyse dargestellt werden ($\beta=-0,351$; $p=0,036$).

CD8-positive, CD31-positive T-Zellen: TNFi-Medikation zeigte hier ebenfalls eine inverse Korrelation ($\rho=-0,462$; $p=0,005$), wobei sich der starke negative Einfluss auf die Zellen im Regressionsmodell beweisen ließ ($\beta=-0,459$; $p=0,006$) (Abb.44). Das Vorliegen von JIA hatte einen starken positiven Effekt auf höhere Zellanteile ($\beta=0,392$; $p=0,004$). Wie bei den CD4-positiven, CD31-positiven T-Zellen, beeinflussten die TNFi-Dauer ($\beta=-0,588$; $p=0,005$) und das Alter ($\beta=-0,896$; $p=0,001$) die CD8-positiven, CD31-positiven T-Zellen am stärksten negativ ($R=1,000$; $p=0,004$). Sowohl für die TNFi-Gruppe als auch die Gesamtkohorte konnten in diesem Modell als wichtige Einflussfaktoren auch Krankheitsdauer ($\beta=0,486$; $p=0,005$), Einnahme eines GC ($\beta=0,912$; $p=0,002$) bzw. von MTX ($\beta=0,224$; $p=0,015$) sowie BSG ($\beta=0,088$; $p=0,032$) und CRP ($\beta=0,114$; $p=0,018$) belegt werden.

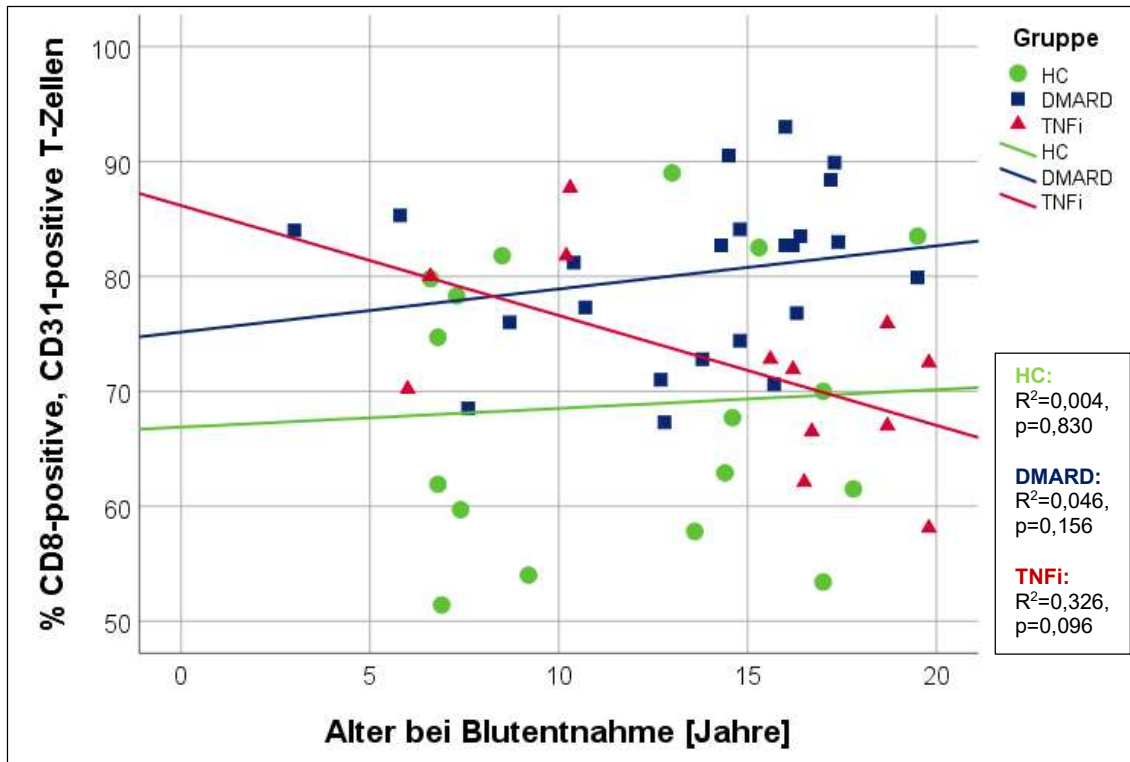


Abb.44: Graphische Darstellung der Regression der CD8-positiven, CD31-positiven T-Zellen in Relation zum Alter bei Blutentnahme. In der Abbildung ist die Häufigkeit der CD8-positiven, CD31-positiven T-Zellen gegen das Alter bei Blutentnahme aufgetragen. Jeder Punkt stellt den Datensatz eines Probanden dar. Die Geraden sind die linearen Anpassungslinien der Untergruppen. Die HC-Gruppe ist grün, die DMARD-Gruppe blau und die TNFi-Gruppe rot eingefärbt (siehe Legende rechts am Bildrand). Zusätzlich ist der Koeffizient R^2 und der p-Wert angegeben.

CD8-positive, CD127-positive bzw. CD31-positive, CD127-positive T-Zellen: für diese beiden Zelluntergruppen zeigte sich eine JIA-Diagnose als größter positiver Einflussfaktor (CD127+: $\beta=0,563$; $p=0,0001$; CD31+/CD127+: $\beta=0,487$; $p=0,0001$). Sowohl in der JIA-Gesamtpopulation als auch in der TNFi-Gruppe zeigte sich ein beinahe signifikantes Modell ($R=0,688$; $p=0,056$) mit positiver Beeinflussung der CD8-positiven, CD31-positiven, CD127-positiven T-Zellen durch eine längere TNFi-Einnahmedauer ($\beta=0,518$; $p=0,061$) bei negativer Einflussnahme durch das Alter ($\beta= -0,459$; $p=0,090$).

TRECs: zwischen relativer Lymphozytenzahl und TREC-Anzahl zeigte sich in der JIA-Gesamtkohorte eine positive Korrelation ($\rho = 0,632$; $p = 0,004$) (Abb.45). In der DMARD-Gruppe konnte ebenfalls eine signifikante Korrelation ($\rho = 0,628$; $p = 0,007$) zwischen TREC-Anzahl und relativem Lymphozytenanteil aufgedeckt werden. Die Anwesenheit von JIA bewirkte ein höheres Auftreten von TRECs ($\beta = 0,376$; $p = 0,041$). In JIA ($R = 0,519$; $p = 0,081$) selbst wurde ein geringeres Zellaufreten begünstigt durch höheres Alter ($\beta = -0,368$; $p = 0,105$) und TNFi-Medikation ($\beta = -0,388$; $p = 0,088$). In der DMARD-Gruppe konnte in einem nicht-signifikanten Modell ($R = 0,718$; $p = 0,095$) neben Krankheitsdauer ($\beta = -0,545$; $p = 0,048$), BSG ($\beta = 0,910$; $p = 0,052$) und CRP ($\beta = -1,261$; $p = 0,017$) die Einnahme von MTX ($\beta = 0,539$; $p = 0,059$) als unabhängiger Faktor für eine höhere TREC-Anzahl gedeutet werden.

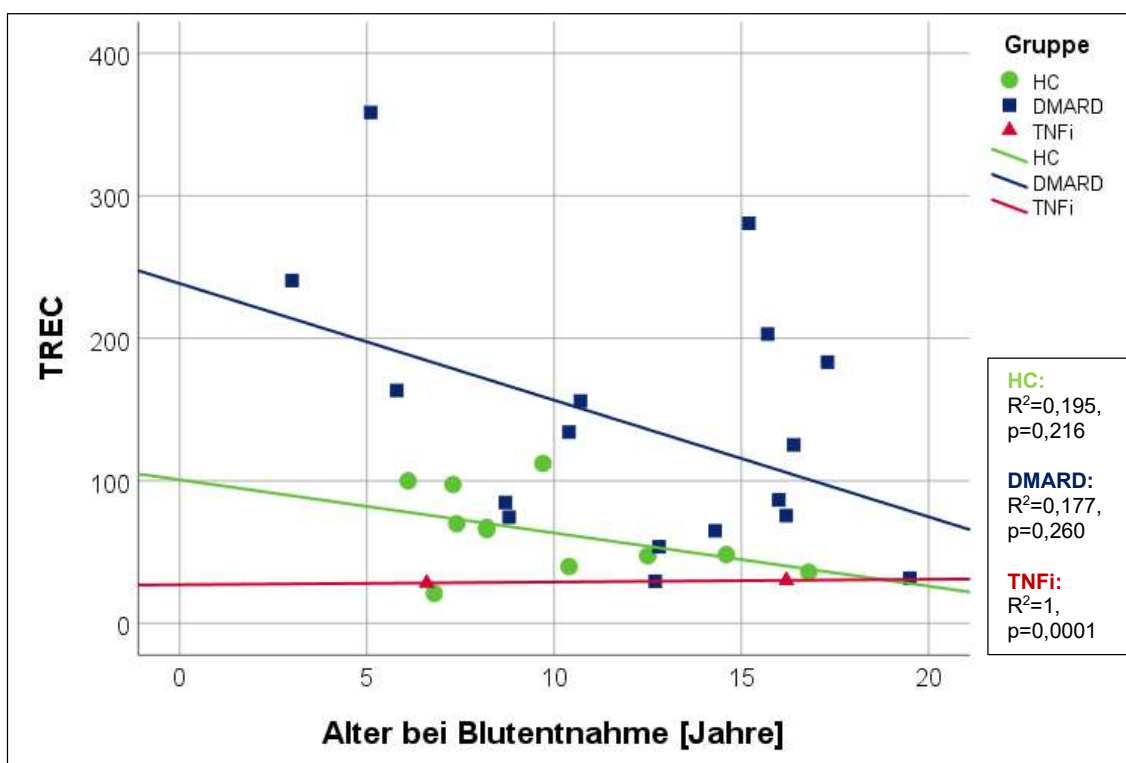


Abb.45: Graphische Darstellung der Regression der TRECs in Relation zum Alter bei Blutentnahme. In der Abbildung ist die Häufigkeit der TRECs je 10.000 PBMCs gegen das Alter bei Blutentnahme aufgetragen. Jeder Punkt stellt den Datensatz eines Probanden dar. Die Geraden sind die linearen Anpassungslinien der Untergruppen. Die HC-Gruppe ist grün, die DMARD-Gruppe blau und die TNFi-Gruppe rot eingefärbt (siehe Legende rechts am Bildrand). Zusätzlich ist der Koeffizient R^2 und der p -Wert angegeben.

3.15. Immunoseneszenz-Parameter im Verhältnis zum TNF α -Inhibitor-Einnahmezeitraum

Wie bei der linearen Regressionsanalyse beschrieben (siehe 3.14.), zeigte sich unter Einnahme eines TNF α -Inhibitors ein signifikant höherer Anteil der CD8-positiven Memory-T-Zellen, kombiniert mit einer deutlichen Reduktion von CD8-positiven, naiven sowie CD4- bzw. CD8-positiven, CD31-positiven T-Zellen und TRECs.

Bei einer Gruppengröße von 12 Patienten wurde die TNFi-Gruppe nach Einnahmedauer des TNF α -Inhibitors in „kürzer als ein Jahr Einnahme“ und „länger als ein Jahr“ eingeteilt. Auch bei dieser Unterteilung in zwei unterschiedliche Einnahmeintervalle ergaben sich kaum signifikante Unterschiede. In den folgenden Unterkapiteln (siehe 3.15.1.-3.15.4.) sind die Tendenzen der ermittelten Werte in Relation zur TNFi-Einnahmedauer und zur Krankheitsdauer beschrieben, wobei hier die jeweiligen Parameter in Vergleich zur DMARD-Gruppe gesetzt wurden.

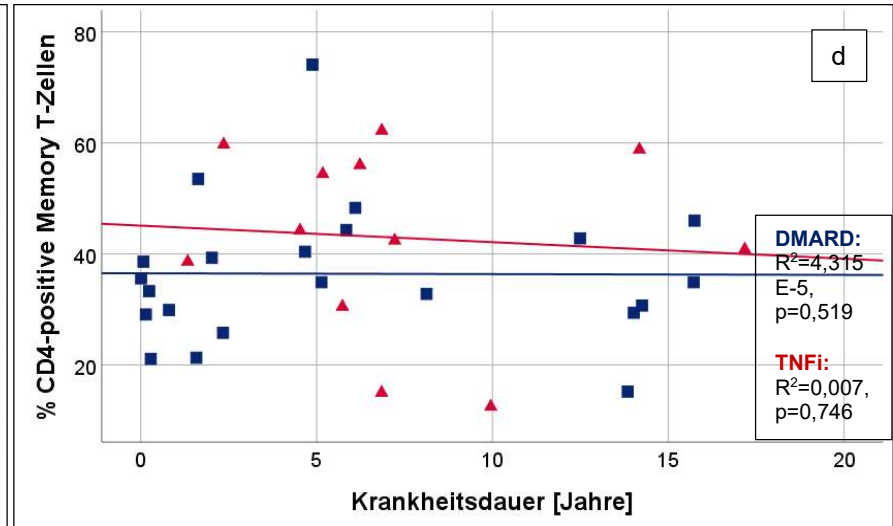
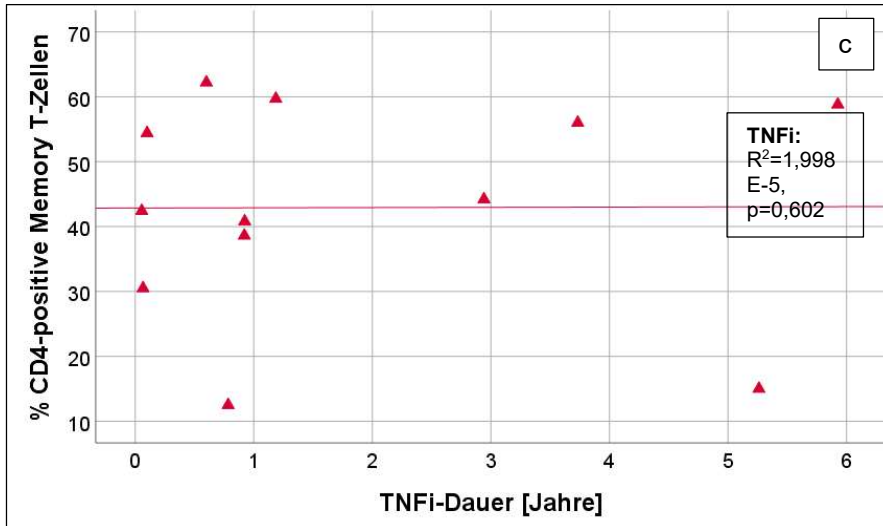
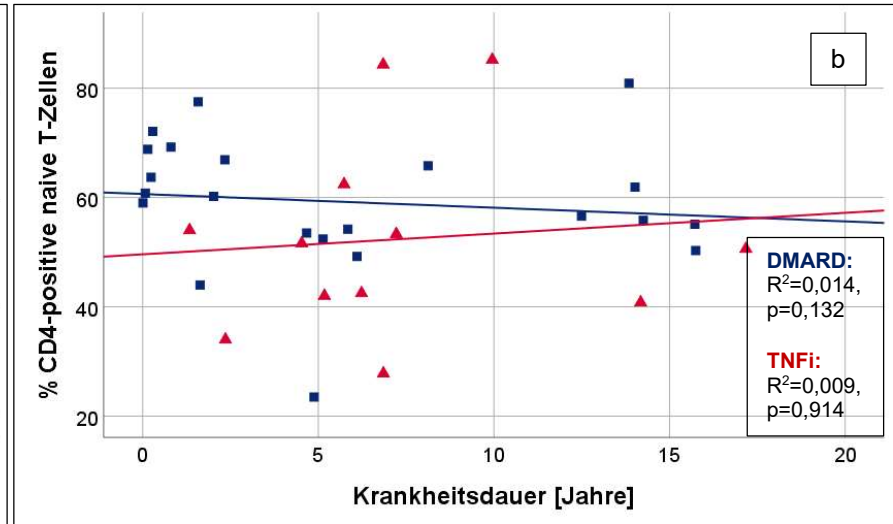
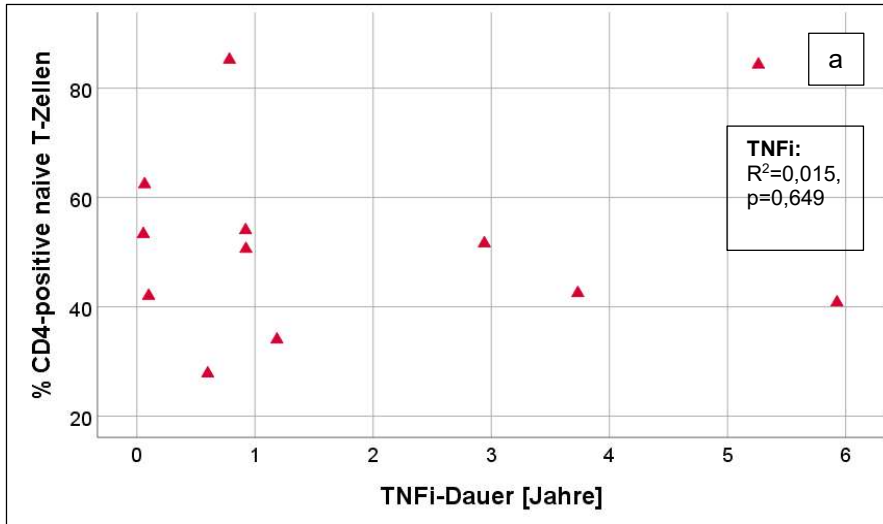
3.15.1. CD4-Subpopulationen im Verhältnis zur TNFi-Dauer und zur Krankheitsdauer

CD4-positive, naive T-Zellen: in der JIA-Gesamtkohorte korrelierte die TNFi-Einnahme nahezu signifikant invers mit der Anzahl der CD4-positiven, naiven T-Zellen ($\rho = -0,314$; $p = 0,071$). Bei längerer TNFi-Einnahmedauer zeichnete sich ein leicht vermehrtes Auftreten von naiven T-Zellen ab (Abb.46a). Der Vergleich der Parameter in der TNFi- und der DMARD-Gruppe in Bezug zur Krankheitsdauer ergab eine leichte Abwärtstendenz des Zellanteils in der DMARD-Gruppe bei gleichzeitiger Aufwärtstendenz in der TNFi-Gruppe (Abb.46b).

CD4-positive Memory-T-Zellen: diese Memory-T-Zellen verhielten sich über die Dauer der TNFi-Einnahme konstant (Abb.46c). Bei Vergleich des Verhaltens gegen die Krankheitsdauer ließ sich in der TNFi-Gruppe ein minimal geringerer Zell-anteil beobachten als in der DMARD-Gruppe (Abb.46d).

CD4-positive Effektor-T-Zellen: die Effektor-Zellen korrelierten fast signifikant invers mit der TNFi-Dauer ($\rho = -0,508$; $p = 0,092$) (Abb.46e). Die Zellanteile der TNFi-Patienten scheinen bei zunehmender Krankheitsdauer etwas weniger anzusteigen als in der DMARD-Gruppe (Abb.46f).

CD4-positive TEMRA T-Zellen: auch die TEMRA T-Zellen wiesen eine nahezu signifikante, inverse Korrelation zur TNFi-Dauer auf ($\rho = -0,532$; $p = 0,092$) (Abb.46g). Im Vergleich zur Krankheitsdauer verhielten sich die Zellen in der DMARD-Gruppe gegensätzlich zu denen der TNFi-Gruppe (Abb.46h).



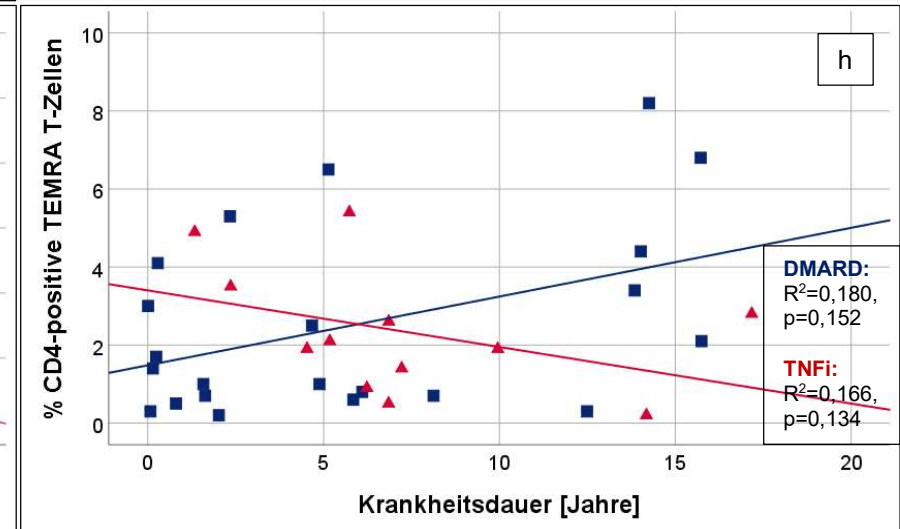
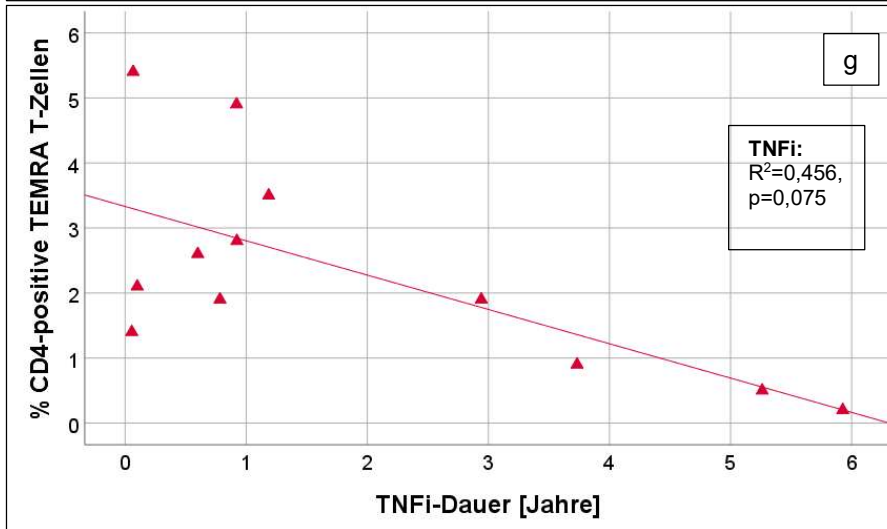
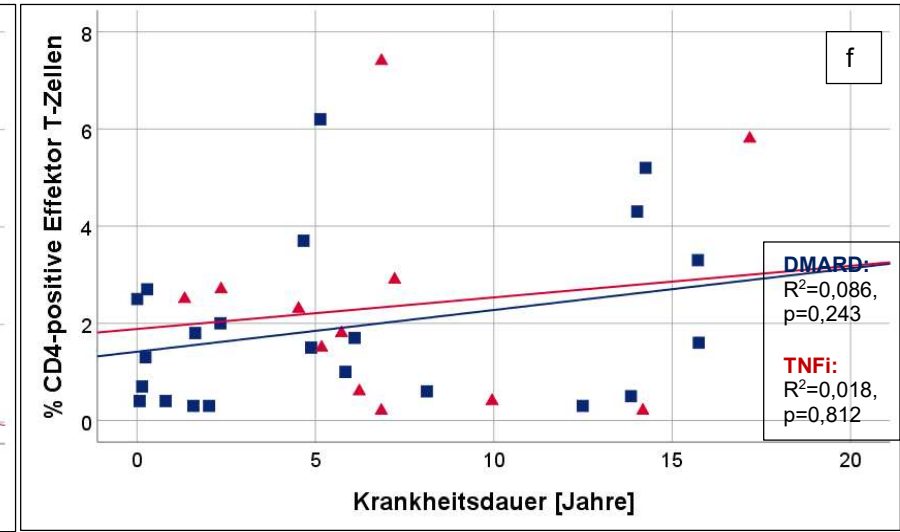
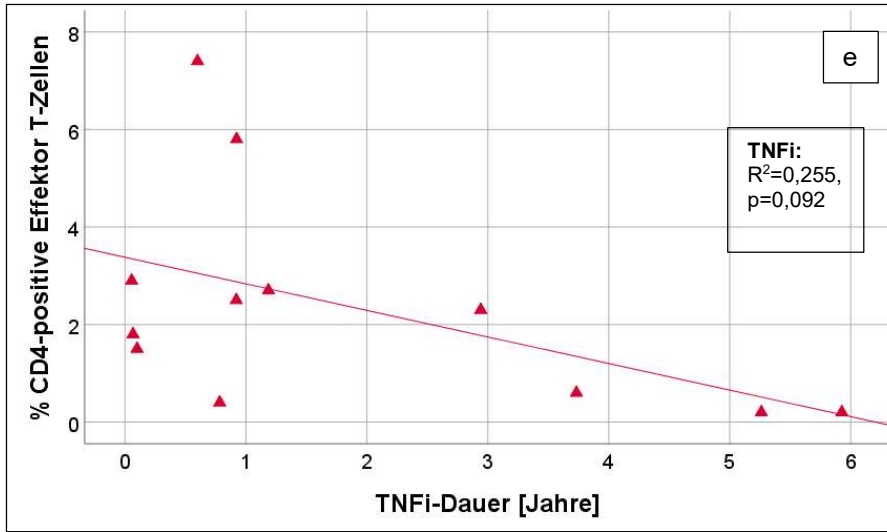


Abb.46a-h: Graphische Darstellung der Regression der CD4-positiven Subpopulationen in Relation zur TNFi-Dauer und Krankheitsdauer. Graphisch dargestellt werden die CD4-positiven Subpopulationen gegen die TNFi-Dauer (a,c,e,g) und die Krankheitsdauer (b,d,f,h). Jeder Punkt stellt den Datensatz eines Probanden dar. Die Geraden sind die linearen Anpassungslinien der Untergruppen. Die roten Dreiecke und die rote Gerade beschreiben die Daten der TNFi-Gruppe, die blauen Quadrate und die blaue Gerade die der DMARD-Gruppe. Zusätzlich ist der Koeffizient R^2 und der p-Wert angegeben.

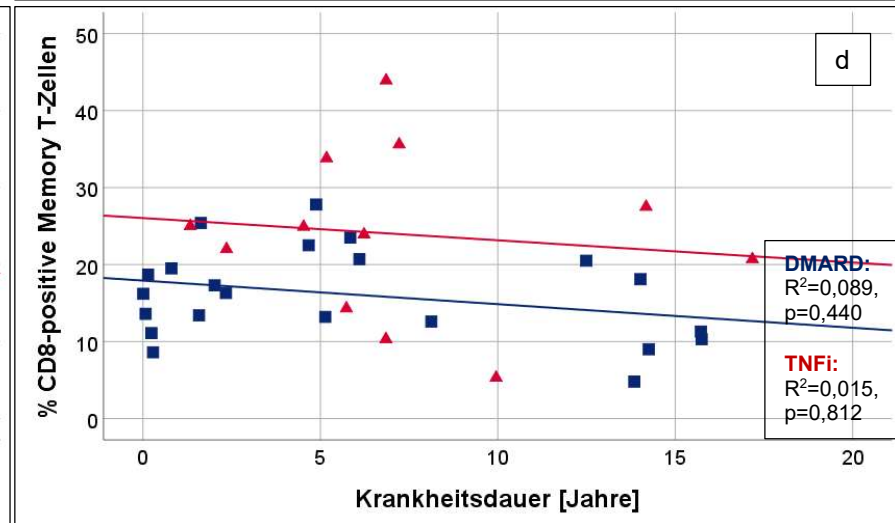
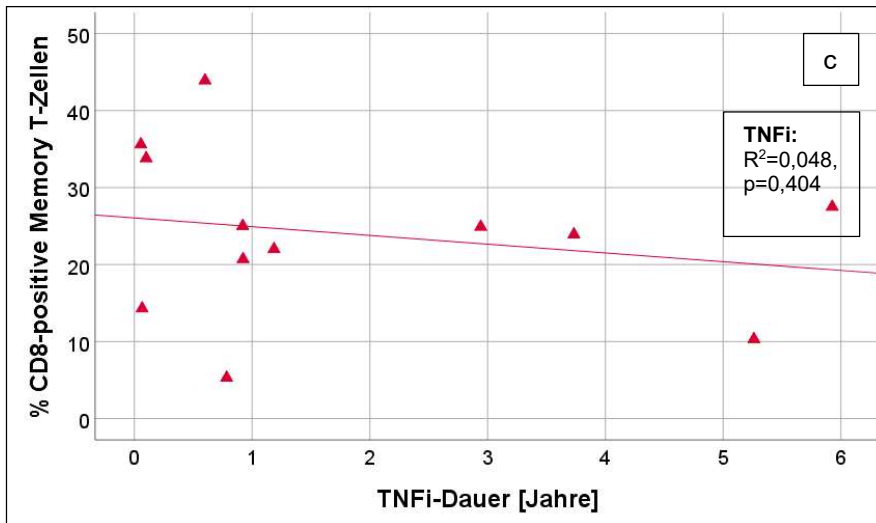
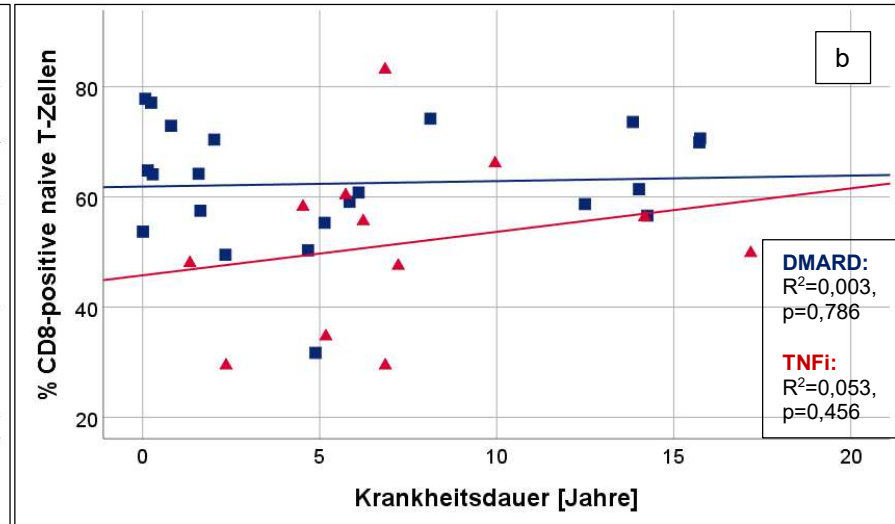
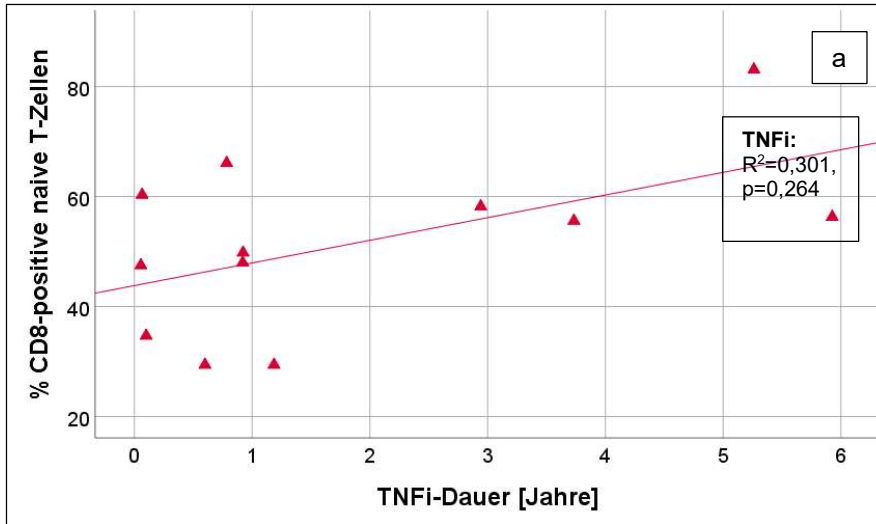
3.15.2. CD8-Subpopulationen im Verhältnis zur TNFi-Dauer und zur Krankheitsdauer

CD8-positive, naive T-Zellen: die Anteile der CD8-positiven, naiven T-Zellen erhöhten sich bei zunehmender TNFi-Einnahmedauer sichtbar ([Abb.47a](#)). In Relation zur Krankheitsdauer scheint die Zellanzahl prozentual in der TNFi-Gruppe zuzunehmen, während sie sich in der DMARD-Gruppe weitgehend stabil verhielt ([Abb.47b](#)).

CD8-positive Memory-T-Zellen: bei längerer Einnahme eines TNF α -Inhibitors traten die Memory-T-Zellen in geringerer Anzahl auf ([Abb.47c](#)). Die Abnahme scheint in beiden Patientengruppen ähnlich schnell zu verlaufen, jedoch präsentierten sich in der TNFi-Gruppe bei kürzerer Krankheitsdauer bereits höhere Anteile an Memory-T-Zellen ([Abb.47d](#)).

CD8-positive Effektor-T-Zellen: bei längerer TNFi-Dauer zeigte sich eine prozentual deutlich niedrigere Anzahl an Effektorzellen ([Abb.47e](#)). Wie bei den CD8-positiven Memory-T-Zellen, verlief die Abnahme in Relation zur Krankheitsdauer fast parallel zwischen DMARD- und TNFi-Gruppe, wobei die TNFi-Gruppe mit einer höheren Prozentzahl an Effektorzellen startete ([Abb.47f](#)).

CD8-positive TEMRA T-Zellen: auch bei den TEMRA-Zellen zeigte sich eine Abnahme über die zunehmende Dauer der TNFi-Einnahme und der Krankheit hinweg ([Abb.47g,h](#)). Wie die CD4-positiven TEMRA T-Zellen, verhielten sich auch die CD8-positiven der DMARD-Gruppe gegenläufig zu denen der TNFi-Gruppe bei längerer Krankheitsdauer ([Abb.47h](#)).



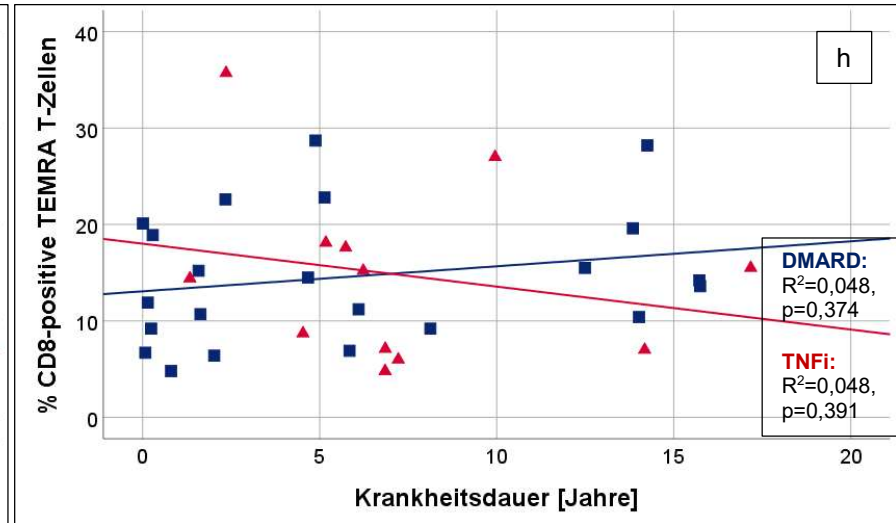
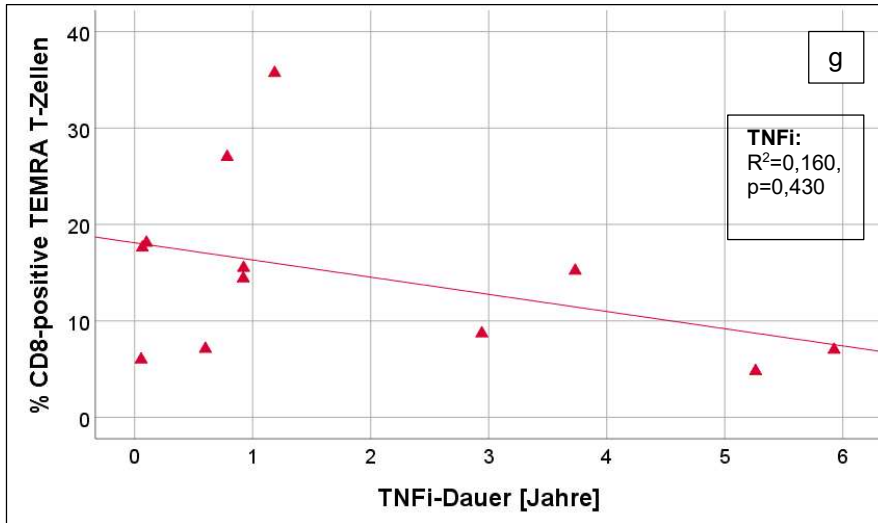
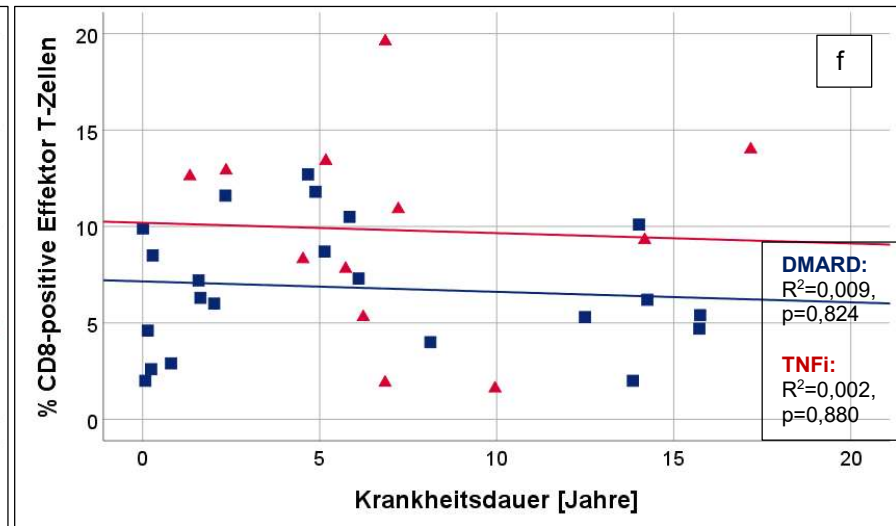
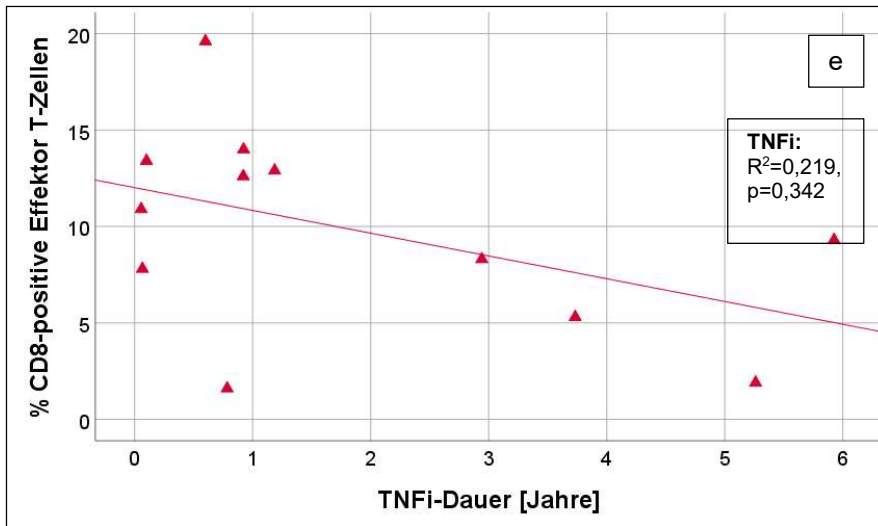


Abb.47a-h: Graphische Darstellung der Regression der CD8-positiven Subpopulationen in Relation zur TNFi-Dauer und Krankheitsdauer. Graphisch dargestellt werden die CD8-positiven Subpopulationen gegen die TNFi-Dauer (a,c,e,g) und die Krankheitsdauer (b,d,f,h). Die Geraden sind die linearen Anpassungslinien der Untergruppen. Die roten Dreiecke beschreibt die Daten der TNFi-Gruppe, die blauen Quadrate und die blaue Gerade die der DMARD-Gruppe.

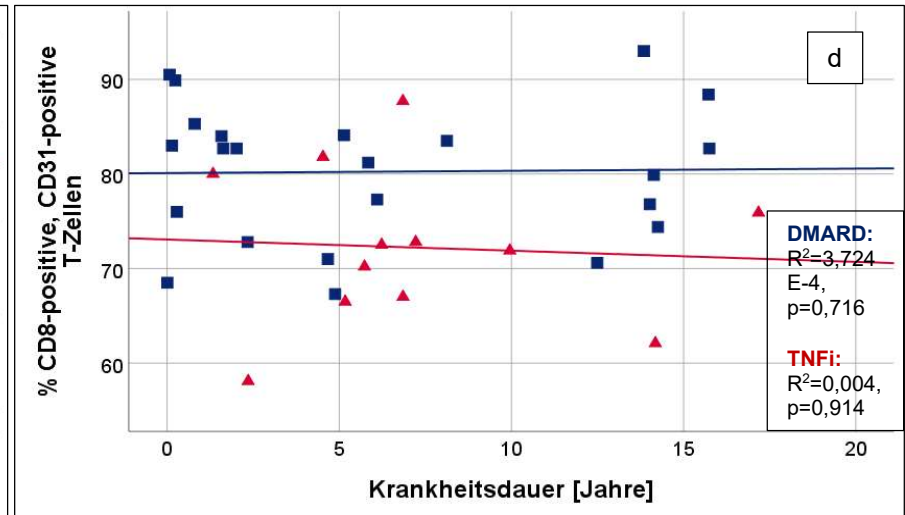
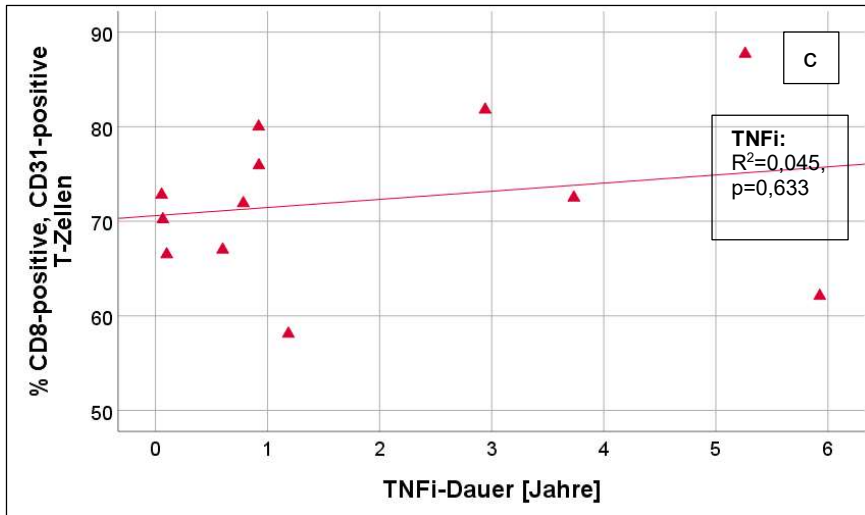
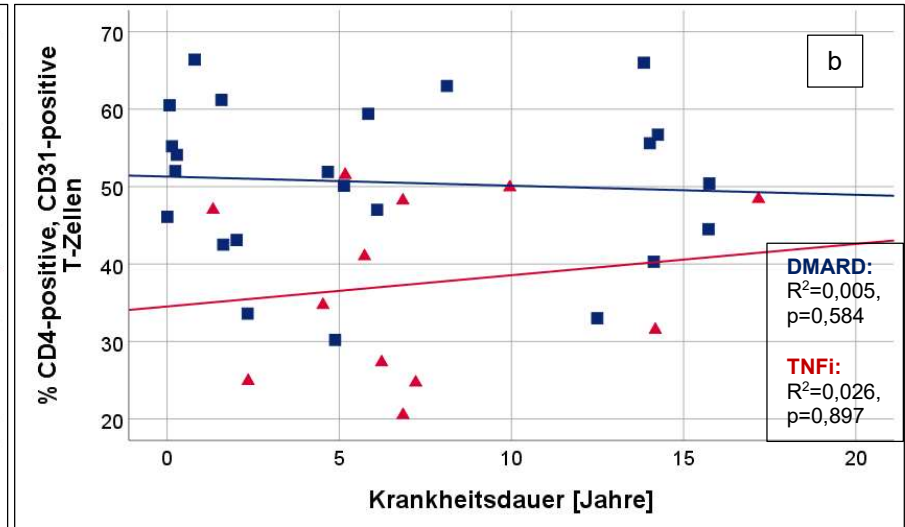
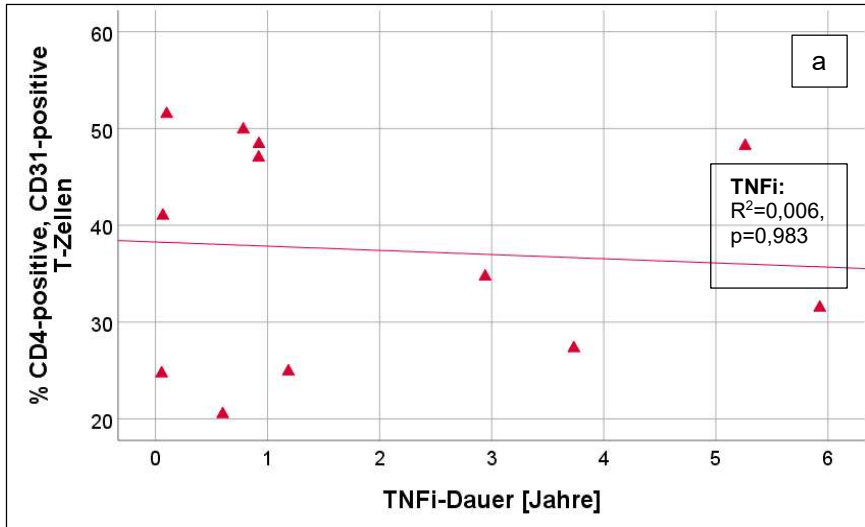
3.15.3. Rezente Thymusemigranten im Verhältnis zur TNFi-Dauer und zur Krankheitsdauer

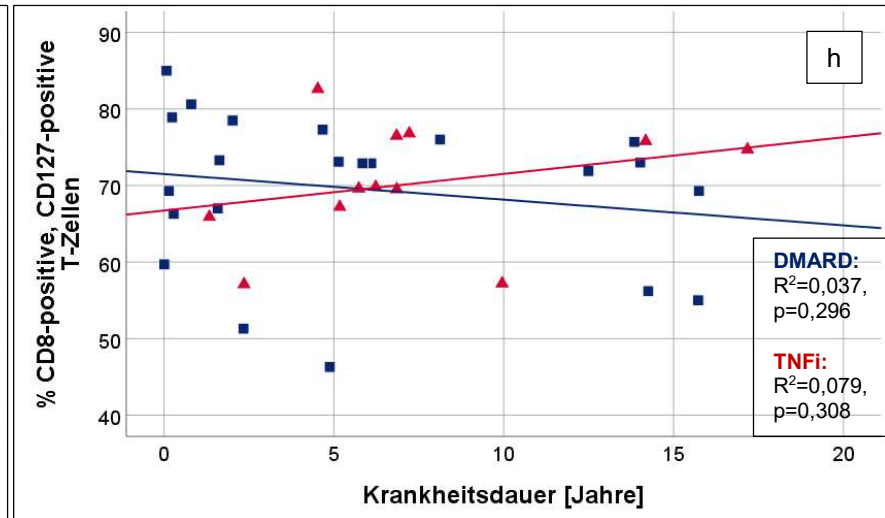
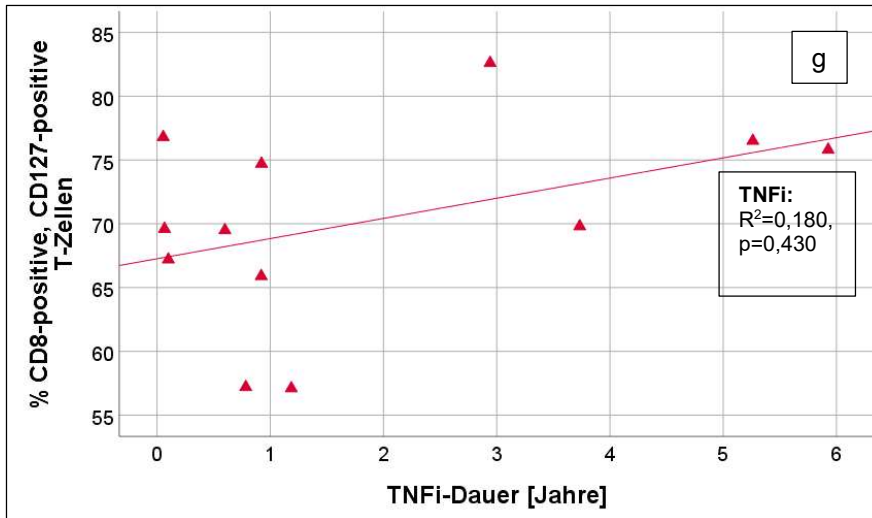
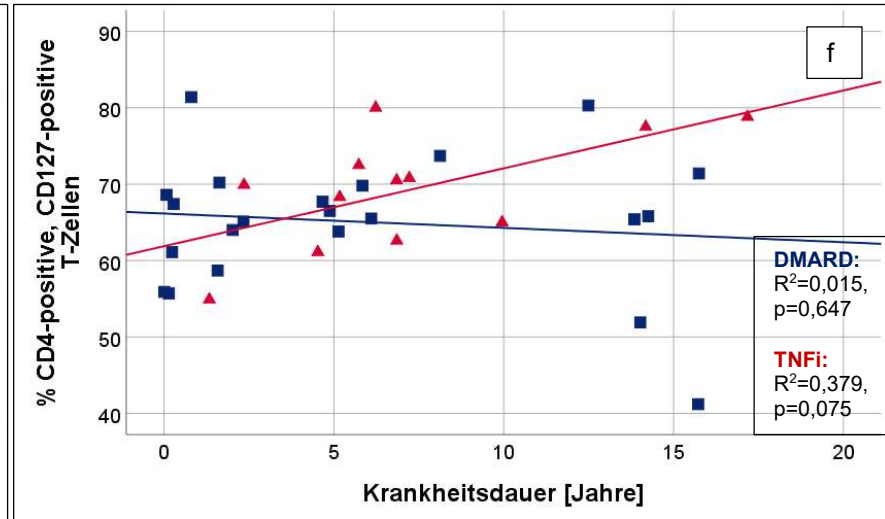
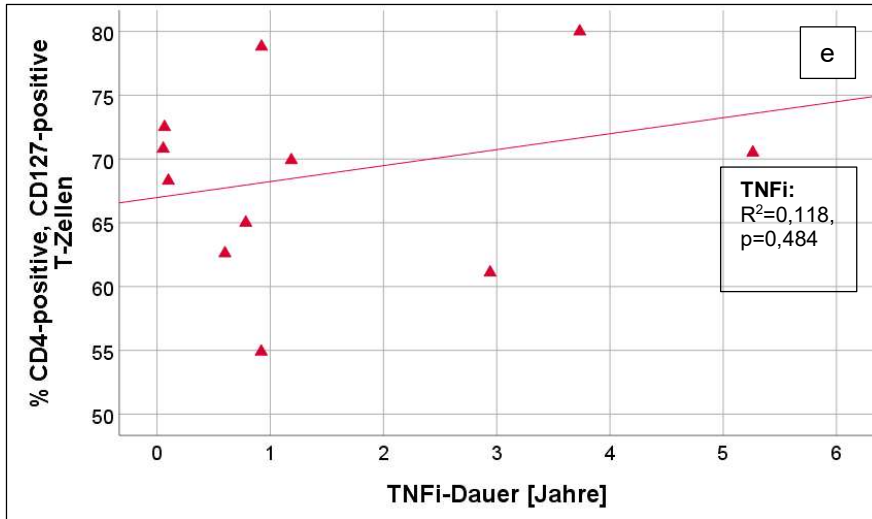
CD4-positive, CD31-positive T-Zellen: tendenziell zeigte sich bei längerer TNFi-Einnahme ein niedriger werdender Anteil dieser Zellen (Abb.48a). In Relation zu einer längeren Krankheitsdauer scheinen die Zellen in der TNFi-Gruppe zuzunehmen, während die Anzahl in der DMARD-Gruppe eine leicht abnehmende Tendenz aufwies (Abb.48b).

CD8-positive, CD31-positive T-Zellen: bei längerer TNFi-Einnahme war ein leicht zunehmender Anteil dieser Zellen festzustellen (Abb.48c). In Relation zur Krankheitsdauer scheinen die Zellen jedoch in beiden Patientengruppen abzunehmen, wobei in der TNFi-Gruppe bei kürzerer Krankheitsdauer bereits eine niedrigere Anzahl an CD8-positiven, CD31-positiven T-Zellen auffiel (Abb.48d).

CD4-positive bzw. CD8-positive, CD127-positive T-Zellen: bei längerer Einnahme eines TNF α -Inhibitors war der Anteil der genannten Zellen erhöht (Abb.48e,g). Bei längerer Dauer der Krankheit scheint die relative Zellanzahl in der DMARD-Gruppe abzufallen, wohingegen sich der Anteil bei den TNFi-Patienten vergrößerte (Abb.48f,h).

CD4-positive bzw. CD8-positive, CD31-positive, CD127-positive T-Zellen: aufgetragen gegen die Krankheitsdauer, konnte ein deutlich höheres Auftreten von CD31-positiven, CD127-positiven Zellen in der TNFi-Gruppe beobachtet werden, während in der DMARD-Gruppe zunehmend weniger Zellen zu finden waren (Abb.48i,l). Die CD4-positiven Zellen verhielten sich bei längerer TNFi-Einnahme stabil (Abb.48j), während sie sich bei CD8 mit höherem Zellanteil präsentierten (Abb.48k).





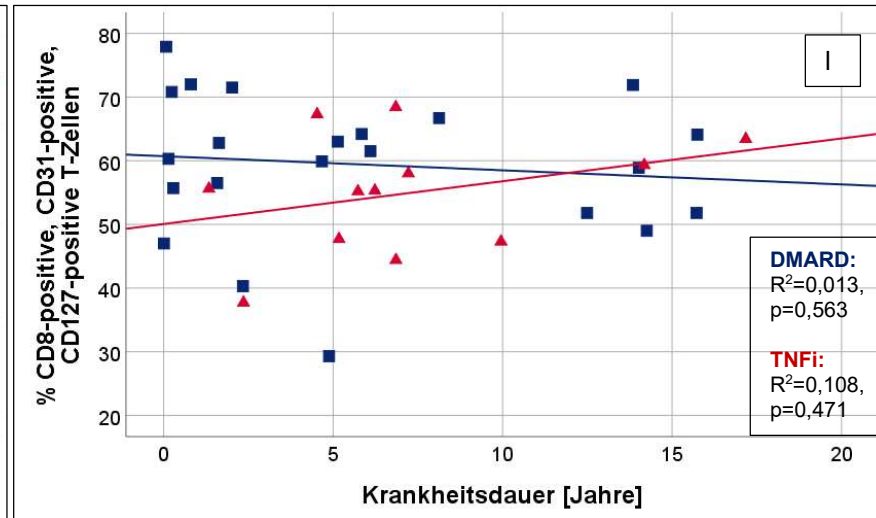
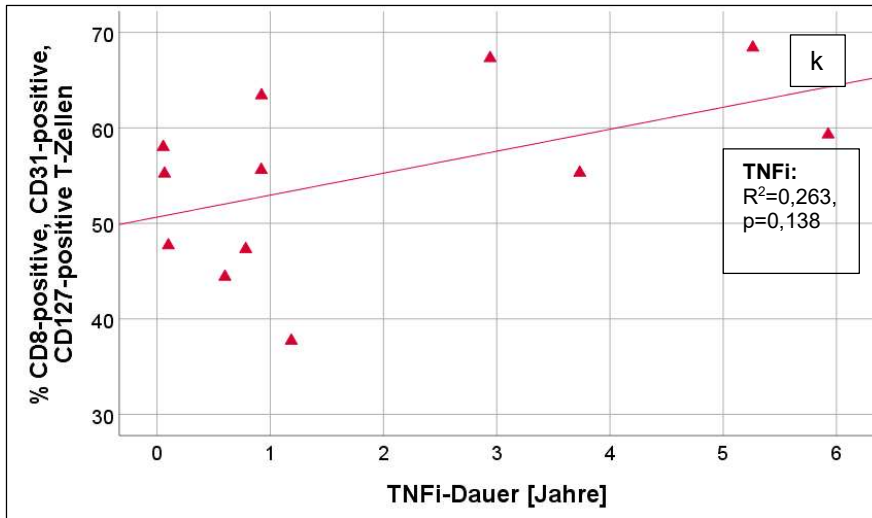
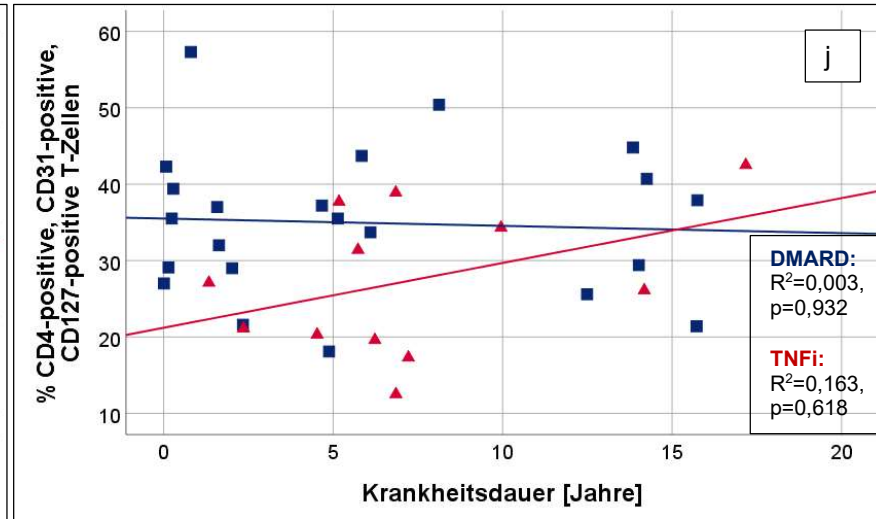
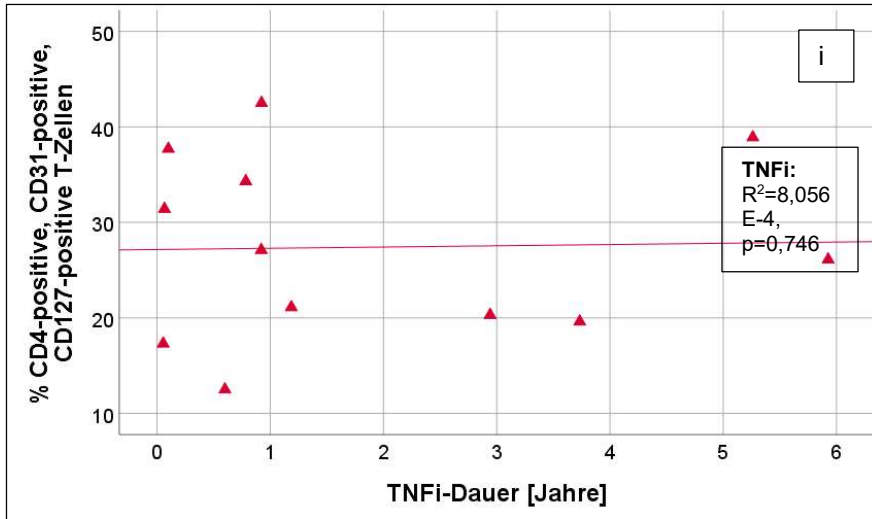


Abb.48a-l: Graphische Darstellung der Regression der RTE in Relation zu TNFi-Dauer und zur Krankheitsdauer. Graphisch dargestellt werden die RTE gegen die TNFi-Dauer (a,c,e,g,i,k) und die Krankheitsdauer (b,d,f,h,j,l). Jeder Punkt stellt den Datensatz eines Probanden dar. Die Geraden sind die linearen Anpassungslinien der Untergruppen. Die roten Dreiecke und die rote Gerade beschreiben die Daten der TNFi-Gruppe, die blauen Quadrate und die blaue Gerade die der DMARD-Gruppe. Zusätzlich ist der Koeffizient R^2 und der p-Wert angegeben.

a-d) CD4-positive (a,b) bzw. CD8-positive (c,d), CD31-positive T-Zellen

e-h) CD4-positive (e,f) bzw. CD8-positive (g,h), CD127-positive T-Zellen

i-l) CD4-positive (i,j) bzw. CD8-positive (k,l), CD31-positive, CD127-positive T-Zellen

3.15.4. TRECs und relative Telomerlänge im Verhältnis zu Krankheitsdauer

TRECs und relative Telomerlänge konnten leider aus technischen Gründen (Limitation im Blutvolumen) nur für 2 TNFi-Patienten bestimmt werden, die das Medikament beide weniger als ein Jahr einnahmen. Patient 1 war zum Zeitpunkt der Blutentnahme 6,6 Jahre alt, 1,3 Jahre zuvor war ein M. Still diagnostiziert worden. Patientin 2 mit Enthesitis-assoziiierter Arthritis hatte zum Blutentnahme-Zeitpunkt bereits 10 Jahre JIA und war 16,2 Jahre alt.

Bei beiden Patienten zeigte sich eine ähnliche Anzahl an TRECs, die deutlich niedriger als bei den DMARD-Patienten lag und scheinbar nicht vom Alter oder der Krankheitsdauer abhängig war. Bei den DMARD-Patienten hingegen fiel eine geringere TREC-Anzahl bei zunehmender Krankheitsdauer auf ([Abb.49](#)).

Die relative Telomerlänge war bei der Patientin 2 größer als bei Patient 1, trotz längerer Krankheitsdauer und höheren Alters bei Blutentnahme. Wie erwartet, präsentierten die DMARD-Patienten bei länger andauernder Krankheit leicht kürzere relative Telomerlängen ([Abb.50](#)).

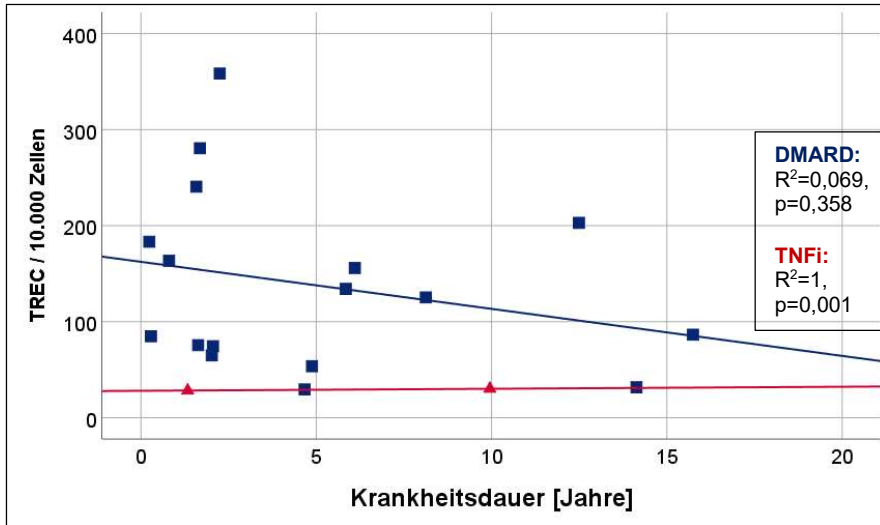


Abb.49: Graphische Darstellung der Regression der TRECs in Relation zur Krankheitsdauer. Graphisch dargestellt ist die TREC-Anzahl pro 10.000 Zellen gegen die Krankheitsdauer. Jeder Punkt stellt den Datensatz eines Probanden dar. Die Geraden sind die linearen Anpassungslinien der Untergruppen. Die roten Dreiecke und die rote Gerade beschreiben die Daten der TNFi-Gruppe, die blauen Quadrate und die blaue Gerade die der DMARD-Gruppe. Zusätzlich ist der Koeffizient R² und der p-Wert angegeben.

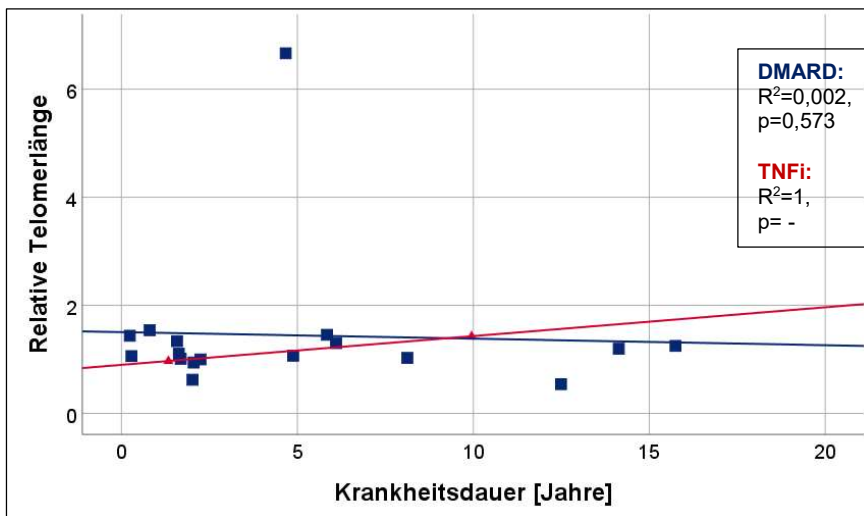


Abb.50: Graphische Darstellung der Regression der relativen Telomerlänge in Relation zur Krankheitsdauer. Graphisch dargestellt ist die relative Telomerlänge gegen die Krankheitsdauer in Bezug auf eine Einzelgenkopie. Jeder Punkt stellt den Datensatz eines Probanden dar. Die Geraden sind die linearen Anpassungslinien der Untergruppen. Die roten Dreiecke und die rote Gerade beschreiben die Daten der TNFi-Gruppe, die blauen Quadrate und die blaue Gerade die der DMARD-Gruppe. Zusätzlich ist der Koeffizient R² und der p-Wert angegeben.

4. Diskussion

4.1. Subpopulationen

Ein Vergleich der Immunoseneszenz-Kriterien zeigte Parameter einer deutlich fortgeschrittenen Immunalterung bei JIA-Patienten mit TNFi-Medikation, verglichen mit den Probanden der DMARD-Gruppe. So traten weniger naive und mehr Memory-T-Zellen in der TNFi-Gruppe auf. Diese Verschiebung in den Subpopulationen kann als charakteristisches Zeichen für eine prämaturne Immunoseneszenz interpretiert werden [113].

In der Gesamtkohorte war das Vorliegen von JIA als maßgeblicher Einflussfaktor für eine Zunahme von CD8-positiven, naiven bzw. eine Abnahme von CD8-positiven Effektor- und TEMRA T-Zellen erkennbar. Die Medikation mit einem NSAR und niedrigere BSG-Werte führten innerhalb der JIA-Gesamtgruppe zu höheren Anteilen der naiven T-Zellen sowie niedrigeren Zellanteilen von Memory- und Effektor-T-Zellen.

Im Vergleich zu den Gesunden zeigte sich die DMARD-Gruppe immunologisch jünger, was darauf hindeutet, dass diese Patienten möglicherweise weniger inflammatorisch erkrankt waren oder durch eine erfolgreiche Medikation die prämaturnen Veränderungen auf Subpopulationsebene verbessert werden konnten. Einen besonders signifikanten Einfluss auf die niedrigeren Anteile an Effektor-T-Zellen hatte die Medikation mit einem NSAR bzw. mit MTX, wobei speziell unter der Wirkung von NSAR mehr naive T-Zellen und weniger Memory-T-Zellen zu beobachten waren. Die höhere Anzahl an naiven T-Zellen könnte ebenfalls durch die Medikamentenwirkung erklärt werden. Durch eine medikamentenbedingte Hemmung der weiteren T-Zell-Differenzierung könnten sich weniger naive T-Zellen weiter zu effektorischen T-Zellen entwickelt haben [61]. Ob diese Mechanismen die Folge einer Lymphopenie bei aktiver Erkrankung oder das Resultat der Rekonstitution nach erfolgreicher Inflammationskontrolle sind, kann nicht endgültig geklärt werden, da keine Fälle von Lymphopenie zum Zeitpunkt der Blutentnahme festgestellt wurden [245, 246].

In der TNFi-Gruppe traten zwar mehr Effektor- und TEMRA T-Zellen auf als in der DMARD-Gruppe, jedoch war der Unterschied nicht signifikant. Da insbesondere CD28-negative Zellen für einen Erschöpfungszustand des Immunsystems sprechen, könnte man dies als positiven Effekt der TNFi-Therapie auf die fortschreitende Immunoseneszenz werten [124]. Die höhere Proportion an CD28+ T-Zellen könnte auch durch eine Hemmung der weiteren terminalen Differenzierung unter TNFi-Medikation erklärt werden.

Berücksichtigt man die geringeren Anteile der TEMRA T-Zellen bei längerer Medikamenteneinnahme und die Ergebnisse der Regressionsanalyse, kann eine längere TNFi-Therapiedauer als unabhängiger Einflussfaktor für niedrigere Zellanteile gewertet werden. Als weitere Erklärung der kleiner werdenden TEMRA-Zellanteile ist die Co-Medikation mit MTX und GC in Betracht zu ziehen, die in dieser Regressionsanalyse als zusätzliche, starke negative Einflussfaktoren eruiert werden konnten. Die CD4-positiven Effektor-T-Zellen wiesen unter dem Einfluss einer MTX-Co-Medikation höhere Zell-Anteile auf, was in der TNFi-Gruppe auf einen höheren JIA-Schweregrad mit der Notwendigkeit einer Co-Medikation hindeuten könnte.

In den naiven und den Memory-T-Zellen der gesunden Probanden stach ein erhöhter IFN γ -Anteil hervor. Passend zu diesem TH1-Zytokin-Profil manifestierte sich bei den Gesunden vermehrt der Chemokin-Rezeptor CXCR3 [175]. Die Verschiebung von naiven zu Memory-T-Zellen lässt einen höheren Anteil an spezifischer (z. B. durch Viren) oder unspezifischer Stimulation durch Entzündungsaktivität bei den gesunden Probanden vermuten [156]. Da der CMV-Status bei den Probanden nicht bestimmt wurde, kann keine Aussage über den Einfluss einer latenten CMV-Infektion auf die Immunoseneszenzmarker, insbesondere den Verlust von CD28, gemacht werden [130].

Bei längerer TNFi-Einnahme zeigte sich eine größere Population der naiven T-Zellen, kombiniert mit einem verminderten Auftreten von Memory-, Effektor- und TEMRA T-Zellen. Diese Verbesserung der Immunoseneszenz-Parameter bei längerer TNFi-Einnahme könnte darauf hinweisen, dass die Zellen durch die Medikamenteneinwirkung des TNF α -Inhibitors fortwährend beeinflusst worden

sind und so zu den genannten Veränderungen auf Subpopulationsebene geführt haben.

4.2. Regulatorische T-Zellen

Bei den Gesunden konnten mehr regulatorische Zellen, charakterisiert durch das Auftreten des Transkriptionsfaktors FoxP3, detektiert werden. Tregs sind laut wissenschaftlicher Erkenntnisse für den Erhalt der Selbsttoleranz und die Balance zwischen pro- und anti-inflammatorischen Prozessen verantwortlich [169]. Autoimmunerkrankungen können durch eine Dysbalance von der regulatorischen hin zu einer effektorischen Immunantwort, bspw. durch TH17-Zellen, oder durch einen qualitativen oder quantitativen Mangel an regulatorischen T-Zellen hervorgerufen werden [49, 50].

In der TNFi-Gruppe traten mehr regulatorische T-Zellen auf als in der DMARD-Gruppe, was für eine Krankheitskontrolle oder Remissionsinduktion sprechen könnte [44]. Innerhalb der regulatorischen Zellen wurden jedoch in der TNFi-Gruppe mehr Zellen vom TH17-Typ beobachtet, die sich durch das Auftreten des Chemokin-Rezeptors CCR6 und eine vermehrte IL-17-Produktion charakterisierten. Da CCR6 insbesondere für die Migration in das inflammatorische Gewebe benötigt wird, könnte dies ein Anzeichen für einen weiteren inflammatorischen Krankheitsverlauf bei den TNFi-Patienten sein [247].

Beim Vergleich der Tregs (*FoxP3+* *CD25+* *CD127-*) konnten zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden, u.a. wohl deshalb, weil es sich um sehr kleine Zellpopulationen handelte. Für weiterführende Erkenntnisse, wie die TNFi-Einnahme die Tregs beeinflusst, würde sich die Verwendung eines magnetischen Zellseparators (MACS) zur Charakterisierung der isolierten Treg-Populationen empfehlen.

4.3. Rezente Thymusemigranten

CD31 ist ein wichtiger Oberflächenmarker, der den Thymusoutput reflektiert. Im Zusammenspiel mit den TRECs und dem Proliferationsmarker Ki-67 lässt sich so ein Rückschluss auf die noch vorhandene Leistung des Thymus und die Produktion rezenter Thymusemigranten ziehen [113].

In der Gesamtpopulation war eine JIA-Diagnose der treibende Faktor für eine proportional höhere CD31-positive und CD127-positive Zellanzahl. In der JIA-Kohorte hatten höheres Alter und längere TNFi-Einnahme den stärksten Einfluss auf niedrigere CD31-positive Zellanteile.

So traten sowohl in der TNFi-Gruppe als auch bei den Gesunden weniger CD31-positive Zellen auf als in der DMARD-Gruppe, was ebenfalls, wie bei den Subpopulationen beschrieben (siehe 4.1.), auf die positive Wirkung der DMARD-Medikation auf den immunologischen Alterungsprozess oder auf eine möglicherweise geringere Krankheitsaktivität bzw. Inflammation hinweisen könnte. Das vermehrte Auftreten von CD31 lässt eine gute Kontrolle der lymphozytären Überaktivierung und eine gute immunsuppressive Wirkung in der DMARD-Gruppe vermuten [134].

In der TNFi-Gruppe waren weniger CD31-positive T-Zellen unter Einfluss einer längeren TNFi-Einnahmedauer und bei höherem Alter festzustellen. Höhere CD31-positive Zellanteile hingegen wurden durch die gleichzeitige Einnahme von GC bzw. MTX begünstigt.

Als Folge des niedrigeren CD31-Anteils in der TNFi-Gruppe sind mehr ausdifferenzierte Zellen mit möglicherweise stärkerer inflammatorischer Wirkung zu erwarten, was anhand des höheren Anteils an Effektor- und Memory-T-Zellen und einer erhöhten IFN γ - und IL-17-Produktion belegt werden konnte. Durch die höhere Inflammation kann die Differenzierung der T-Zellen zu Effektorzellen vorangetrieben und die vorzeitige Alterung des Immunsystems beschleunigt werden. Die erhöhte Inflammation könnte auch durch die Ansammlung von schwereren Krankheitsfällen in der TNFi-Gruppe, die mit einer DMARD-Medikation nicht ausreichend behandelbar waren, erklärt werden.

CD127 als IL-7-Rezeptor war bei den Gesunden in geringerer Häufigkeit anzutreffen. Dennoch wiesen die Gesunden eine signifikant höhere Proliferationsrate in den RTE auf als die JIA-Patienten. Bei allen Studienteilnehmern war die Anwesenheit von JIA der Hauptindikator für eine Erhöhung der CD127-positiven Zellanteile. Innerhalb der JIA-positiven Probanden begünstigte eine längere Einnahmedauer von TNFi, Alter und MTX-Medikation am stärksten die relative Zellzunahme. Auch für die TNFi-Patienten ließ sich der starke positive Einfluss von längerer TNFi-Dauer und höherem Patientenalter belegen.

Die höhere CD127-Expression bei den JIA-Patienten könnte auf ein Bestreben des Immunsystems hinweisen, unter Wirkung des Maturationszytokins IL-7 eine Rekonstitution des beeinträchtigten Immunsystems zu erreichen [137]. Aus dem niedrigeren Anteil von CD127-positiven T-Zellen bei längerer Krankheitsdauer in der DMARD-Gruppe könnte man folgern, dass eine bessere Kontrolle der Inflammation vorlag.

Als Zeichen der Thymusaktivität wurden die TRECs und die relativen Telomerlängen betrachtet. Eine größere TREC-Anzahl trat bei Diagnose JIA auf, wobei infolge der Limitationen im Blutvolumen (siehe 3.12.) überwiegend DMARD-Patienten untersucht wurden, und somit das Ergebnis vorwiegend als Folge der DMARD-Einwirkung zu interpretieren ist. In der DMARD-Gruppe waren längere Telomerlängen und die höchste Dichte an TRECs aufzufinden, mit signifikantem Unterschied zu den TNFi-Patienten und den Gesunden. Auch hierbei scheint die Krankheitskontrolle durch eine erfolgreiche DMARD-Therapie, insbesondere durch MTX, oder eine niedrigere bzw. besser kontrollierte Krankheitsaktivität einen positiven Effekt auf die Rekonstitution der Thymusleistung zu haben. Eine niedrigere TREC-Menge wurde hingegen bei längerer Krankheitsdauer und höheren CRP-Werten beobachtet.

Für *CD45RA+* *CD31+* Zellen als wahre RTE-Repräsentanten wurde die höchste Dichte an TRECs belegt [113]. Patienten mit rheumatischen Erkrankungen neigen zu einer starken Proliferation der naiven *CD45RA+* T-Zellen unter Zytokin-Einfluss, kombiniert mit einer peripheren homöostatischen Proliferation der *CD45RA+* *CD31+* T-Zellen. Dies könnte die Wechselbeziehung zwischen den naiven Zellen und den TRECs weiter schwächen und stellt eine Limitation in der Interpretation der TREC-Werte als Thymusmarker dar [132]. TRECs werden folglich gleichermaßen durch die Produktion rezenter Thymusemigranten, die peri-phere T-Zell-Homöostase und den Dilutionseffekt der damit assoziierten Proliferation beeinflusst.

Bei längerer TNFi-Einnahme (TNFi-Gruppe: n=12) konnte eine höhere Anzahl an RTE eruiert werden, was sich auch bei längerer Krankheitsdauer belegen ließ. Die DMARD-Gruppe (n=22) zeigte dagegen bei längerer Krankheitsdauer einen Rückgang an RTE. Die höher werdende Anzahl an RTE in der TNFi-Gruppe bei längerer TNFi-Einnahme könnte möglicherweise die Folge einer positiven Wirkung auf die Rekonstitution der Immunoseneszenz anzeigen.

4.4. Probandendaten

Auch wenn weder im exakten Test nach Fisher noch bei Berechnung der Signifikanz nach Mann-Whitney-U ein signifikanter Unterschied im Alter oder der Krankheitsdauer ermittelt werden konnte, bildete dennoch die Altersverteilung in der DMARD- und v.a. der TNFi-Gruppe ein tendenziell älteres Kollektiv ab (Tabelle 11). Auch im Vergleich der Krankheitsdauer zwischen den beiden Patientengruppen lag eine längere, aber nicht signifikant unterschiedliche Krankheitsdauer in der TNFi-Gruppe vor. Dieser graduelle Unterschied in Alter und Krankheitsdauer könnte zusammen mit einer höheren Krankheitsschwere in der TNFi-Gruppe zu einer Verzerrung der TNFi-assoziierten Ergebnisse geführt haben. Gestützt wird diese Annahme durch eine signifikante, negative Korrelation zwischen CD8-positiven Effektor-T-Zellen und Alter in der DMARD-Gruppe bzw. durch eine positive Korrelation zwischen CD4-positiven Memory-T-Zellen und Alter in der TNFi-Gruppe.

Bei den Gesunden wurden mehr männliche als weibliche Probanden untersucht, bedingt durch die Rekrutierung immunologisch gesunder Probanden aus der kinderurologischen Sprechstunde, während in der JIA-Gesamtkohorte vermehrt weibliche Probanden vorzufinden waren. Ob das Geschlecht beim präpubertären Kind auch eine Rolle bei der Verteilung der T-Zell-Subpopulationen, der TRECs oder relativen Telomerlänge spielt, bleibt unklar. Studien zu den sogenannten Immunoseneszenz-Markern bei erwachsenen Patienten und Patientinnen mit Angststörungen zeigten, dass es deutliche Unterschiede zwischen Männern und Frauen im Immunoseneszenz-Status gibt. So konnten insbesondere signifikant kürzere relative Telomerlängen der peripheren Lymphozyten bei Frauen beobachtet werden [243].

4.5. Stärken und Schwächen

Insgesamt konnte ein breites Spektrum an Probanden mit unterschiedlichem Alter, unterschiedlicher Krankheitsdauer und TNFi-Einnahmedauer untersucht werden, so dass das Verhalten der Immunoseneszenz-Parameter über die Zeit von verschiedenen Perspektiven aus beleuchtet werden konnte. Durch die Betrachtung der Immunoseneszenz-Marker bei längerer Einnahmedauer konnten somit Aussagen über eine tendenzielle Rekonstitutionsfähigkeit unter TNFi-Therapie getroffen werden.

Die nicht-signifikante Verschiebung in Alter und Krankheitsdauer (siehe 4.4.), aber auch die vermutete Ansammlung von DMARD-refraktären, schwereren JIA-Fällen in der TNFi-Gruppe könnte zu einem Bias der Immunoseneszenz-Parameter geführt, und so eine immunologisch-ältere Population abgebildet haben. Als immunologisch „jüngste“ Population erwies sich die DMARD-Gruppe. Dies könnte durch den positiven Effekt einer erfolgreichen Therapie oder durch geringere Inflammation bedingt sein, so dass hier durch die Verschiebung von Memory- zu naiven T-Zellen und stärkerem Thymusoutput eine gewisse Rekonstitution der Immunoseneszenz-Parameter einzutreten scheint.

Bei den Gesunden ließen die Immunoseneszenz-Parameter einen höheren Anteil an spezifischer (z. B. durch Viren) oder unspezifischer Stimulation durch Entzündungsaktivität vermuten [156]. Hierdurch könnte möglicherweise eine Verzerrung der Daten bezüglich der fortgeschritteneren Immunoseneszenz der Gesunden entstanden sein.

Durch Auftragen der Immunoseneszenz-Parameter gegen das Alter, die Krankheitsdauer und die TNFi-Einnahmedauer wurde ein *status quo* und keine Verlaufparameter erfasst. Dabei wurde angenommen, dass die untersuchten Immunoseneszenz-Parameter einen linearen Verlauf vorweisen, ohne auf interindividuelle Unterschiede oder differierende Entwicklungen bei zunehmendem Alter, zunehmender Krankheitsdauer und längerer TNFi-Dauer einzugehen. Da diese in Korrelation zueinander stehen können, sollten sie daher immer gemeinsam bewertet und interpretiert werden. Ebenso könnte eine schiefe

Altersverteilung bei der TNFi-Einnahmedauer die Daten verzerrt haben, da sowohl jüngere als auch ältere Kinder den TNF α -Inhibitor weniger als ein Jahr einnahmen.

4.6. Fazit

Bei der Betrachtung der Daten konnte ein positiver Effekt auf die Verbesserung der Immunoseneszenz-Parameter in der DMARD-Gruppe, aber auch bei längerer TNFi-Einnahme gezeigt werden. Daraus folgern könnte man eine gewisse Rekonstitutionsfähigkeit des prä-matur-gealterten Immunsystems oder zumindest eine Verlangsamung der bereits stattfindenden Immunoseneszenz [141].

Eine erfolgreiche DMARD-Therapie scheint zu einer Verschiebung der Subpopulationen von Memory- zu naiven T-Zellen und vermehrt auftretendem Thymusoutput mit potenzieller Rekonstitution der Immunoseneszenz-Parameter zu führen.

Der höhere Anteil an naiven T-Zellen bei längerer TNFi-Einnahme könnte zum einen durch periphere homöostatische Proliferation, aber auch durch neugenerierte naive T-Zellen aus dem Thymus erklärt werden. Dass auch der Thymus wieder verstärkt naive Zellen produzieren kann, ließ sich durch ein Ansteigen der CD31-positiven Zellen belegen. Ob diese Zellen allein durch Thymusproduktion oder durch zusätzliche periphere Replikation generiert wurden, bleibt abschließend offen.

Bei längerer Einnahmedauer eines TNF α -Inhibitors zeigte sich eine Verbesserung des Subpopulationsprofils und der RTE, so dass eine Rekonstitution oder Progressionsverlangsamung der prä-maturen Immunoseneszenz vermutet werden kann.

Patienten, die einen TNF α -Inhibitor erhalten, haben sich zumeist zuvor refraktär auf ein DMARD erwiesen. Auf diese Weise könnten sich in der TNFi-Gruppe möglicherweise schwerere JIA-Fälle angesammelt haben, für die eine DMARD-

Therapie nicht suffizient war, um eine dauerhafte Remission oder Krankheitsinaktivität zu erzielen. Im Verlauf der Erkrankung scheint eine Progression des prämaternen Alterungsprozesses im Vergleich zu den Gesunden und den JIA-Patienten der DMARD-Gruppe eingetreten zu sein, der durch den erfolgreichen TNFi-Einsatz möglicherweise zu einer nur zögerlichen Besserung der Immunoseneszenz geführt hat.

In der TNFi-Gruppe konnten die TRECs, das IL-7-Level und die relativen Telomerlängen aufgrund von Limitationen im Blutvolumen leider nur von 2 Patienten bestimmt werden. Bei beiden Patienten zeigte sich eine deutlich fortgeschrittenere Immunoseneszenz. Dieses Ergebnis müsste in weiteren Studien bei einer größeren Probandenzahl überprüft werden, um präzisere Aussagen treffen zu können.

Für weitere Studien und Forschungsarbeiten wäre die Entwicklung der Immunoseneszenz-Parameter bei noch längerer TNFi-Einnahmedauer von Interesse, aber auch die Isolierung der Tregs und die Messung von TRECs, relativer Telomerlänge und IL-7-Level für größere Patientenkollektive.

Sollte die Verlangsamung der Progression oder gar die Rekonstitution der prämaternen Immunoseneszenz möglich sein, hätte dies signifikante Auswirkungen auf die Prognose der Patienten. So könnten gesteigerte Morbidität und Mortalität, bspw. durch altersbedingte Erkrankungen wie Karzinome oder kardiovaskuläre Ereignisse, durch die Rekonstitution des Immunsystems wieder reduziert werden [114]. Dies würde den möglichst frühen Einsatz von Biologika erforderlich machen und die Notwendigkeit der Erforschung von validen Biomarkern verstärken, die eine Aussage über das Therapieansprechen ermöglichen. Somit könnte insbesondere bei Risikopatienten frühzeitig auf die fortschreitende, prämaturna Immunoseneszenz eingewirkt und die biologischen Eigenschaften der Krankheit modifiziert werden. Durch die Arbeitsweise „*hit hard early, step down*“ und valide Biomarker könnten somit die prämaternen Veränderungen des Immunsystems im Ansatz gestoppt werden.

5. Zusammenfassung

Bei juveniler idiopathischer Arthritis konnte eine prämatüre Immunoseneszenz nachgewiesen werden [143, 232]. Ein Erklärungsmodell ist, dass die prämatüre Immunoseneszenz den primären Defekt darstellt, der das Immunsystem zum Versagen der Selbsttoleranz führt. Eine andere Deutungsmöglichkeit stellt die prämatüre Immunoseneszenz als Folge von chronischer Stimulation und Aktivierung des Immunsystems durch die Autoimmunerkrankung selbst dar [113].

In dieser Arbeit wurden die Immunoseneszenz-Parameter (naive T-Zellen, RTE, IL-7-Level, TRECs, relative Telomerlänge, Ki-67-Expression) von JIA-Patienten - unterteilt in eine DMARD-Gruppe und eine TNF α -Inhibitor-Gruppe - mit denen von gesunden Vergleichsprobanden verglichen.

Die fortgeschrittenere Immunoseneszenz in der Gruppe der Gesunden könnte möglicherweise durch vermehrte chronische Virusinfekte erklärt werden, die jedoch in dieser Arbeit nicht erfasst wurden. Wie in einem Fallbericht anhand einer erfolgreichen JIA-Schub-Therapie gezeigt [236], konnte in der vorliegenden Arbeit eine potenzielle Rekonstitutionsfähigkeit mit Verbesserung der Immunoseneszenz-Parameter bei DMARD-Therapie demonstriert werden. So trat ein höherer Anteil an naiven T-Zellen und an RTE auf, was vermuten lässt, dass der fortschreitende Verlust der Thymusfunktion bei Patienten mit Autoimmunerkrankung reversibel sein könnte.

Bei Vergleich der TNFi-Patienten mit der DMARD-Gruppe konnte eine weiter fortgeschrittene Immunoseneszenz festgestellt werden. Dies könnte durch die Ansammlung von schwereren, DMARD-refraktären Patienten, aber auch durch die unterschiedliche, aber nicht-signifikante Altersverteilung bedingt sein. Bei längerer Einnahmedauer des TNF α -Inhibitors zeigte sich ein tendenziell stärkeres Auftreten von naiven T-Zellen und RTE, kombiniert mit einem Nachlassen der differenzierteren Subpopulationen. So scheinen TNF α -Inhibitoren die Fähigkeit zu besitzen, die prämatüre Immunoseneszenz positiv zu beeinflussen oder zumindest eine Verlangsamung des prämaturen Alterungsvorgangs zu bewirken.

6. Literaturverzeichnis

1. Prakken, B., S. Albani, and A. Martini, *Juvenile idiopathic arthritis*. Lancet, 2011. **377**(9783): p. 2138-49.
2. Giancane, G., et al., *Juvenile Idiopathic Arthritis: Diagnosis and Treatment*. Rheumatol Ther, 2016. **3**(2): p. 187-207.
3. Petty, R.E., et al., *International League of Associations for Rheumatology classification of juvenile idiopathic arthritis: second revision, Edmonton, 2001*. J Rheumatol, 2004. **31**(2): p. 390-2.
4. Manners, P. and C. Bower, *Worldwide Prevalence of Juvenile Arthritis-Why Does It Vary So Much?* The Journal of rheumatology, 2002. **29**: p. 1520-30.
5. Barut, K., et al., *Juvenile Idiopathic Arthritis*. Balkan Med J, 2017. **34**(2): p. 90-101.
6. Griffin, T.A., et al., *Gene expression signatures in polyarticular juvenile idiopathic arthritis demonstrate disease heterogeneity and offer a molecular classification of disease subsets*. 2009. **60**(7): p. 2113-2123.
7. Barnes, M., et al., *Biologic Similarities Based on Age at Onset in Oligoarticular and Polyarticular Subtypes of Juvenile Idiopathic Arthritis*. Arthritis and rheumatism, 2010. **62**: p. 3249-58.
8. Giancane, G., A. Alongi, and A. Ravelli, *Update on the pathogenesis and treatment of juvenile idiopathic arthritis*. Curr Opin Rheumatol, 2017. **29**(5): p. 523-529.
9. Cimaz, R., *Systemic-onset juvenile idiopathic arthritis*. Autoimmun Rev, 2016. **15**(9): p. 931-4.
10. Kumar, S., *Systemic Juvenile Idiopathic Arthritis: Diagnosis and Management*. Indian J Pediatr, 2016. **83**(4): p. 322-7.
11. Petty, R.E., et al., *Juvenile Idiopathic Arthritis*, in *Textbook of Pediatric Rheumatology*, E. Ross, R.E. Petty, and L. Wedderburn, Editors. 2016, Elsevier Saunders Company p. 188-284.
12. Ravelli, A. and A. Martini, *Juvenile idiopathic arthritis*. Lancet, 2007. **369**(9563): p. 767-778.
13. Ravelli, A., et al., *Preliminary diagnostic guidelines for macrophage activation syndrome complicating systemic juvenile idiopathic arthritis*. J Pediatr, 2005. **146**(5): p. 598-604.
14. Ravelli, A., et al., *2016 Classification Criteria for Macrophage Activation Syndrome Complicating Systemic Juvenile Idiopathic Arthritis: A European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology/Paediatric Rheumatology International Trials Organisation Collaborative Initiative*. Arthritis Rheumatol, 2016. **68**(3): p. 566-76.
15. Ombrello, M.J., et al., *HLA-DRB1*11 and variants of the MHC class II locus are strong risk factors for systemic juvenile idiopathic arthritis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(52): p. 15970-5.
16. Martini, A., *Are there new targets for juvenile idiopathic arthritis?* Semin Arthritis Rheum, 2019. **49**(3s): p. S11-s13.
17. Rosenberg, A.M., *Uveitis associated with childhood rheumatic diseases*. Curr Opin Rheumatol, 2002. **14**(5): p. 542-7.

18. Ogdie, A. and P. Weiss, *The Epidemiology of Psoriatic Arthritis*. Rheum Dis Clin North Am, 2015. **41**(4): p. 545-68.
19. Guillaume, S., et al., *Long-term outcome and prognosis in oligoarticular-onset juvenile idiopathic arthritis*. Arthritis Rheum, 2000. **43**(8): p. 1858-65.
20. Ravelli, A., et al., *Patients with antinuclear antibody–positive juvenile idiopathic arthritis constitute a homogeneous subgroup irrespective of the course of joint disease*. 2005. **52**(3): p. 826-832.
21. Ravelli, A., et al., *Antinuclear antibody–positive patients should be grouped as a separate category in the classification of juvenile idiopathic arthritis*. Arthritis & Rheumatism, 2011. **63**(1): p. 267-275.
22. Gurcay, E., et al., *Articular damage in adults with juvenile idiopathic arthritis*. Rheumatol Int, 2009. **29**(6): p. 635-40.
23. Ravelli, A., et al., *The conundrum of juvenile psoriatic arthritis*. Clin Exp Rheumatol, 2015. **33**(5 Suppl 93): p. S40-3.
24. Martini, A., *Are the number of joints involved or the presence of psoriasis still useful tools to identify homogeneous disease entities in juvenile idiopathic arthritis?* J Rheumatol, 2003. **30**(9): p. 1900-3.
25. Clarke, S.L., E.S. Sen, and A.V. Ramanan, *Juvenile idiopathic arthritis-associated uveitis*. Pediatr Rheumatol Online J, 2016. **14**(1): p. 27.
26. Weiss, P.F., et al., *Enthesitis in an inception cohort of enthesitis-related arthritis*. Arthritis Care Res (Hoboken), 2011. **63**(9): p. 1307-12.
27. Aggarwal, A. and D.P. Misra, *Enthesitis-related arthritis*. Clin Rheumatol, 2015. **34**(11): p. 1839-46.
28. Adrovic, A., et al., *Juvenile Spondyloarthropathies*. Curr Rheumatol Rep, 2016. **18**(8): p. 55.
29. Prahalad, S., et al., *Twins concordant for juvenile rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 2000. **43**(11): p. 2611-2.
30. Prahalad, S., et al., *Juvenile rheumatoid arthritis: linkage to HLA demonstrated by allele sharing in affected sibpairs*. Arthritis Rheum, 2000. **43**(10): p. 2335-8.
31. Hersh, A.O. and S. Prahalad, *Immunogenetics of juvenile idiopathic arthritis: A comprehensive review*. J Autoimmun, 2015. **64**: p. 113-24.
32. Hinks, A., et al., *Dense genotyping of immune-related disease regions identifies 14 new susceptibility loci for juvenile idiopathic arthritis*. Nat Genet, 2013. **45**(6): p. 664-9.
33. Thompson, S.D., et al., *Genome-wide association analysis of juvenile idiopathic arthritis identifies a new susceptibility locus at chromosomal region 3q13*. Arthritis Rheum, 2012. **64**(8): p. 2781-91.
34. Thompson, S.D., et al., *The susceptibility loci juvenile idiopathic arthritis shares with other autoimmune diseases extend to PTPN2, COG6, and ANGPT1*. Arthritis Rheum, 2010. **62**(11): p. 3265-76.
35. van Loosdregt, J., et al., *Update on research and clinical translation on specific clinical areas from biology to bedside: Unpacking the mysteries of juvenile idiopathic arthritis pathogenesis*. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2017. **31**(4): p. 460-475.
36. Fall, N., et al., *Gene expression profiling of peripheral blood from patients with untreated new-onset systemic juvenile idiopathic arthritis reveals*

- molecular heterogeneity that may predict macrophage activation syndrome*. Arthritis & Rheumatism, 2007. **56**(11): p. 3793-3804.
37. Glass, D.N. and E.H. Giannini, *Juvenile rheumatoid arthritis as a complex genetic trait*. Arthritis Rheum, 1999. **42**(11): p. 2261-8.
 38. Prakken, B. and S. Albani, *Using biology of disease to understand and guide therapy of JIA*. Best practice & research. Clinical rheumatology, 2009. **23**: p. 599-608.
 39. Ronaghy, A., et al., *Vaccination leads to an aberrant FOXP3 T-cell response in non-remitting juvenile idiopathic arthritis*. Annals of the Rheumatic Diseases, 2011. **70**(11): p. 2037-2043.
 40. Tejesvi, M.V., et al., *Faecal microbiome in new-onset juvenile idiopathic arthritis*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2016. **35**(3): p. 363-70.
 41. Malin, M., et al., *Increased bacterial urease activity in faeces in juvenile chronic arthritis: evidence of altered intestinal microflora?* Br J Rheumatol, 1996. **35**(7): p. 689-94.
 42. Verwoerd, A., et al., *The human microbiome and juvenile idiopathic arthritis*. Pediatr Rheumatol Online J, 2016. **14**(1): p. 55.
 43. Wedderburn, L.R., et al., *Selective recruitment of polarized T cells expressing CCR5 and CXCR3 to the inflamed joints of children with juvenile idiopathic arthritis*. Arthritis Rheum, 2000. **43**(4): p. 765-74.
 44. Ruprecht, C.R., et al., *Coexpression of CD25 and CD27 identifies FoxP3+ regulatory T cells in inflamed synovia*. J Exp Med, 2005. **201**(11): p. 1793-803.
 45. Moncrieffe, H., et al., *High expression of the ectonucleotidase CD39 on T cells from the inflamed site identifies two distinct populations, one regulatory and one memory T cell population*. J Immunol, 2010. **185**(1): p. 134-43.
 46. de Kleer, I.M., et al., *The spontaneous remission of juvenile idiopathic arthritis is characterized by CD30+ T cells directed to human heat-shock protein 60 capable of producing the regulatory cytokine interleukin-10*. Arthritis Rheum, 2003. **48**(7): p. 2001-10.
 47. Massa, M., et al., *Differential recognition of heat-shock protein dnaJ-derived epitopes by effector and Treg cells leads to modulation of inflammation in juvenile idiopathic arthritis*. Arthritis Rheum, 2007. **56**(5): p. 1648-57.
 48. van Eden, W., et al., *Do heat shock proteins control the balance of T-cell regulation in inflammatory diseases?* Immunology Today, 1998. **19**(7): p. 303-307.
 49. Flores-Borja, F., et al., *Defects in CTLA-4 are associated with abnormal regulatory T cell function in rheumatoid arthritis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(49): p. 19396-401.
 50. Wehrens, E.J., B.J. Prakken, and F. van Wijk, *T cells out of control--impaired immune regulation in the inflamed joint*. Nat Rev Rheumatol, 2013. **9**(1): p. 34-42.
 51. Evans, H.G., et al., *In vivo activated monocytes from the site of inflammation in humans specifically promote Th17 responses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(15): p. 6232-7.

52. Consolaro, A., et al., *Development and validation of a composite disease activity score for juvenile idiopathic arthritis*. Arthritis Care & Research, 2009. **61**(5): p. 658-666.
53. Kasapcopur, O. and K. Barut, *Treatment in juvenile rheumatoid arthritis and new treatment options*. Turk Pediatri Ars, 2015. **50**(1): p. 1-10.
54. Wulffraat, N.M., et al., *Long-term follow-up of autologous stem cell transplantation for refractory juvenile idiopathic arthritis*. Bone Marrow Transplantation, 2003. **32**(1): p. S61-S64.
55. Bocelli-Tyndall, C., et al., *Bone marrow mesenchymal stromal cells (BM-MSCs) from healthy donors and auto-immune disease patients reduce the proliferation of autologous- and allogeneic-stimulated lymphocytes in vitro*. Rheumatology (Oxford), 2007. **46**(3): p. 403-8.
56. Oommen, P.T. and C. Schütz, *Aktualisierte, interdisziplinäre S2k-Leitlinie „Therapie der Juvenilen Idiopathischen Arthritis“ AWMF-Register Nr. 027/020*, 2019.
57. Scheinman, R.I., et al., *Role of transcriptional activation of I kappa B alpha in mediation of immunosuppression by glucocorticoids*. Science, 1995. **270**(5234): p. 283-6.
58. Ravelli, A., et al., *Glucocorticoids in paediatric rheumatology*. Clin Exp Rheumatol, 2011. **29**(5 Suppl 68): p. S148-52.
59. Melo-Gomes, J.A., *Problems related to systemic glucocorticoid therapy in children*. J Rheumatol Suppl, 1993. **37**: p. 35-9.
60. Dagdeviren-Cakir, A., et al., *Serum vitamin D levels during activation and remission periods of patients with juvenile idiopathic arthritis and familial Mediterranean fever*. Turk J Pediatr, 2016. **58**(2): p. 125-131.
61. Bedoui, Y., et al., *Methotrexate an Old Drug with New Tricks*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(20).
62. Liu, L., et al., *Folate Supplementation for Methotrexate Therapy in Patients With Rheumatoid Arthritis: A Systematic Review*. J Clin Rheumatol, 2019. **25**(5): p. 197-202.
63. Simard, J.F., et al., *Juvenile idiopathic arthritis and risk of cancer: a nationwide cohort study*. Arthritis Rheum, 2010. **62**(12): p. 3776-82.
64. Buchbinder, R., et al., *Incidence of melanoma and other malignancies among rheumatoid arthritis patients treated with methotrexate*. Arthritis Rheum, 2008. **59**(6): p. 794-9.
65. Moder, K.G., et al., *Hematologic malignancies and the use of methotrexate in rheumatoid arthritis: a retrospective study*. Am J Med, 1995. **99**(3): p. 276-81.
66. Cronstein, B.N., D. Naime, and E. Ostad, *The antiinflammatory mechanism of methotrexate. Increased adenosine release at inflamed sites diminishes leukocyte accumulation in an in vivo model of inflammation*. J Clin Invest, 1993. **92**(6): p. 2675-82.
67. Constantin, A., et al., *Antiinflammatory and immunoregulatory action of methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis: evidence of increased interleukin-4 and interleukin-10 gene expression demonstrated in vitro by competitive reverse transcriptase-polymerase chain reaction*. Arthritis Rheum, 1998. **41**(1): p. 48-57.

68. Thomas, S., et al., *Methotrexate Is a JAK/STAT Pathway Inhibitor*. PLoS One, 2015. **10**(7): p. e0130078.
69. Bulatovic Calasan, M., et al., *Methotrexate treatment affects effector but not regulatory T cells in juvenile idiopathic arthritis*. Rheumatology (Oxford), 2015. **54**(9): p. 1724-34.
70. Silverman, E., et al., *Leflunomide or methotrexate for juvenile rheumatoid arthritis*. N Engl J Med, 2005. **352**(16): p. 1655-66.
71. Feldmann, M., et al., *Anti-TNFalpha therapy of rheumatoid arthritis: what can we learn about chronic disease?* Novartis Found Symp, 2004. **256**: p. 53-69; discussion 69-73, 106-11, 266-9.
72. Otten, M.H., et al., *Efficacy of biological agents in juvenile idiopathic arthritis: a systematic review using indirect comparisons*. Ann Rheum Dis, 2013. **72**(11): p. 1806-12.
73. Ruperto, N., et al., *Long-term safety and efficacy of abatacept in children with juvenile idiopathic arthritis*. Arthritis & Rheumatism, 2010. **62**(6): p. 1792-1802.
74. Lovell, D.J., et al., *Etanercept in children with polyarticular juvenile rheumatoid arthritis*. Pediatric Rheumatology Collaborative Study Group. N Engl J Med, 2000. **342**(11): p. 763-9.
75. Wallace, C.A., et al., *Trial of early aggressive therapy in polyarticular juvenile idiopathic arthritis*. Arthritis Rheum, 2012. **64**(6): p. 2012-21.
76. Wallace, C.A., et al., *Clinically inactive disease in a cohort of children with new-onset polyarticular juvenile idiopathic arthritis treated with early aggressive therapy: time to achievement, total duration, and predictors*. J Rheumatol, 2014. **41**(6): p. 1163-70.
77. Luca, N.J., et al., *Cost-Effectiveness Analysis of First-Line Treatment With Biologic Agents in Polyarticular Juvenile Idiopathic Arthritis*. Arthritis Care Res (Hoboken), 2016. **68**(12): p. 1803-1811.
78. van Schie, K.A., et al., *The antibody response against human and chimeric anti-TNF therapeutic antibodies primarily targets the TNF binding region*. Ann Rheum Dis, 2015. **74**(1): p. 311-4.
79. Jani, M., et al., *The role of DMARDs in reducing the immunogenicity of TNF inhibitors in chronic inflammatory diseases*. Rheumatology, 2013. **53**(2): p. 213-222.
80. Ehrenstein, M.R., et al., *Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy*. J Exp Med, 2004. **200**(3): p. 277-85.
81. Tracey, D., et al., *Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review*. Pharmacol Ther, 2008. **117**(2): p. 244-79.
82. Mangge, H., et al., *Serum cytokines in juvenile rheumatoid arthritis. Correlation with conventional inflammation parameters and clinical subtypes*. Arthritis Rheum, 1995. **38**(2): p. 211-20.
83. Saklatvala, J., *Tumour necrosis factor alpha stimulates resorption and inhibits synthesis of proteoglycan in cartilage*. Nature, 1986. **322**(6079): p. 547-9.
84. Horneff, G., *[New drugs for treatment of juvenile idiopathic arthritis]*. Z Rheumatol, 2019.

85. Diak, P., et al., *Tumor necrosis factor alpha blockers and malignancy in children: forty-eight cases reported to the Food and Drug Administration*. *Arthritis Rheum*, 2010. **62**(8): p. 2517-24.
86. Beukelman, T., et al., *Rates of malignancy associated with juvenile idiopathic arthritis and its treatment*. *Arthritis Rheum*, 2012. **64**(4): p. 1263-71.
87. Ruperto, N. and A. Martini, *International research networks in pediatric rheumatology: the PRINTO perspective*. *Curr Opin Rheumatol*, 2004. **16**(5): p. 566-70.
88. Beukelman, T., et al., *The new Childhood Arthritis and Rheumatology Research Alliance (CARRA) registry: design, rationale, and characteristics of patients enrolled in the first 12 months*. *Pediatr Rheumatol Online J*, 2017. **15**(1): p. 30.
89. Klein, A., et al., *Biologic Therapies in Polyarticular Juvenile Idiopathic Arthritis. Comparison of Long-Term Safety Data from the German BIKER Registry*. *ACR Open Rheumatol*, 2020. **2**(1): p. 37-47.
90. Lovell, D.J., et al., *Safety and efficacy of up to eight years of continuous etanercept therapy in patients with juvenile rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum*, 2008. **58**(5): p. 1496-504.
91. Winthrop, K.L., *Risk and prevention of tuberculosis and other serious opportunistic infections associated with the inhibition of tumor necrosis factor*. *Nat Clin Pract Rheumatol*, 2006. **2**(11): p. 602-10.
92. Horneff, G., *Safety of biologic therapies for the treatment of juvenile idiopathic arthritis*. *Expert Opin Drug Saf*, 2015. **14**(7): p. 1111-26.
93. Brunner, H.I., et al., *Subcutaneous golimumab for children with active polyarticular-course juvenile idiopathic arthritis: results of a multicentre, double-blind, randomised-withdrawal trial*. *Ann Rheum Dis*, 2018. **77**(1): p. 21-29.
94. Ruperto, N., et al., *A randomized, placebo-controlled trial of infliximab plus methotrexate for the treatment of polyarticular-course juvenile rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum*, 2007. **56**(9): p. 3096-106.
95. Brunner, H., et al., *A Multi-Center, Open-Label Study to Assess the Pharmacokinetics, Efficacy and Safety of Certolizumab Pegol in Children and Adolescents with Moderately to Severely Active Polyarticular-Course Juvenile Idiopathic Arthritis: Week 24 Results [abstract], accessed July 2, 2021*. *Arthritis Rheumatol*, 2016. **68 (suppl 10)**.
96. De Benedetti, F. and A. Martini, *Is systemic juvenile rheumatoid arthritis an interleukin 6 mediated disease?* *J Rheumatol*, 1998. **25**(2): p. 203-7.
97. Pascual, V., et al., *Role of interleukin-1 (IL-1) in the pathogenesis of systemic onset juvenile idiopathic arthritis and clinical response to IL-1 blockade*. *J Exp Med*, 2005. **201**(9): p. 1479-86.
98. Quartier, P., et al., *A multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trial with the interleukin-1 receptor antagonist anakinra in patients with systemic-onset juvenile idiopathic arthritis (ANAJIS trial)*. *Ann Rheum Dis*, 2011. **70**(5): p. 747-54.
99. Ruperto, N., et al., *Canakinumab in patients with systemic juvenile idiopathic arthritis and active systemic features: results from the 5-year*

- long-term extension of the phase III pivotal trials.* Ann Rheum Dis, 2018. **77**(12): p. 1710-1719.
100. Hinze, C.H., et al., *Practice and consensus-based strategies in diagnosing and managing systemic juvenile idiopathic arthritis in Germany.* Pediatr Rheumatol Online J, 2018. **16**(1): p. 7.
 101. De Benedetti, F., et al., *Randomized trial of tocilizumab in systemic juvenile idiopathic arthritis.* N Engl J Med, 2012. **367**(25): p. 2385-95.
 102. Kimura, Y., et al., *Pilot study comparing the Childhood Arthritis & Rheumatology Research Alliance (CARRA) systemic Juvenile Idiopathic Arthritis Consensus Treatment Plans.* Pediatr Rheumatol Online J, 2017. **15**(1): p. 23.
 103. Gronlund, M.M., et al., *Efficacy and safety of tocilizumab in a real-life observational cohort of patients with polyarticular juvenile idiopathic arthritis.* Rheumatology (Oxford), 2020. **59**(4): p. 732-741.
 104. Kiltz, U., et al., *Prolonged treatment with Tadekinig alfa in adult-onset Still's disease.* Annals of the Rheumatic Diseases, 2020. **79**(1): p. e10-e10.
 105. Gabay, C., et al., *Open-label, multicentre, dose-escalating phase II clinical trial on the safety and efficacy of tadekinig alfa (IL-18BP) in adult-onset Still's disease.* Ann Rheum Dis, 2018. **77**(6): p. 840-847.
 106. Kremer, J.M., *Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4-immunoglobulin in rheumatoid arthritis.* Rheum Dis Clin North Am, 2004. **30**(2): p. 381-91, viii.
 107. Alexeeva, E.I., et al., *Efficacy and safety of repeat courses of rituximab treatment in patients with severe refractory juvenile idiopathic arthritis.* Clin Rheumatol, 2011. **30**(9): p. 1163-72.
 108. Horneff, G., et al., *Comparison of treatment response, remission rate and drug adherence in polyarticular juvenile idiopathic arthritis patients treated with etanercept, adalimumab or tocilizumab.* Arthritis Res Ther, 2016. **18**(1): p. 272.
 109. Brunner, H., et al., *Tofacitinib for the Treatment of Polyarticular Course Juvenile Idiopathic Arthritis: Results of a Phase 3 Randomized, Double-blind, Placebo-controlled Withdrawal Study [abstract], accessed July 2, 2021.* Arthritis Rheumatol, 2019. **71** (suppl 10).
 110. Brunner, H.I., et al., *Efficacy and safety of tocilizumab in patients with polyarticular-course juvenile idiopathic arthritis: results from a phase 3, randomised, double-blind withdrawal trial.* Ann Rheum Dis, 2015. **74**(6): p. 1110-7.
 111. Shoop-Worrall, S.J.W., et al., *How common is remission in juvenile idiopathic arthritis: A systematic review.* Semin Arthritis Rheum, 2017. **47**(3): p. 331-337.
 112. Luque Ramos, A., et al., *Transition to adult rheumatology care is necessary to maintain DMARD therapy in young people with juvenile idiopathic arthritis.* Semin Arthritis Rheum, 2017. **47**(2): p. 269-275.
 113. Mayerl, C. and M. Prelog, *Immunosenescence and juvenile idiopathic arthritis.* Autoimmun Rev, 2012. **11**(5): p. 297-300.
 114. Prelog, M., *Aging of the immune system: a risk factor for autoimmunity?* Autoimmun Rev, 2006. **5**(2): p. 136-9.

115. Grubeck-Loebenstein, B. and G. Wick, *The aging of the immune system*. Adv Immunol, 2002. **80**: p. 243-84.
116. Aspinall, R., *Age-associated thymic atrophy in the mouse is due to a deficiency affecting rearrangement of the TCR during intrathymic T cell development*. J Immunol, 1997. **158**(7): p. 3037-45.
117. Zhou, T., C.K. Edwards, 3rd, and J.D. Mountz, *Prevention of age-related T cell apoptosis defect in CD2-fas-transgenic mice*. J Exp Med, 1995. **182**(1): p. 129-37.
118. Weiskopf, D., B. Weinberger, and B. Grubeck-Loebenstein, *The aging of the immune system*. Transpl Int, 2009. **22**(11): p. 1041-50.
119. Murphy, K. and C. Weaver, *Janeway Immunologie*. 9 ed. 2018, Berlin, Germany: Springer Spektrum. 1227.
120. Franceschi, C., M. Bonafe, and S. Valensin, *Human immunosenescence: the prevailing of innate immunity, the failing of clonotypic immunity, and the filling of immunological space*. Vaccine, 2000. **18**(16): p. 1717-20.
121. Aspinall, R. and D. Andrew, *Thymic involution in aging*. J Clin Immunol, 2000. **20**(4): p. 250-6.
122. Stulnig, T., et al., *Reference intervals for human peripheral blood lymphocyte subpopulations from 'healthy' young and aged subjects*. Int Arch Allergy Immunol, 1995. **108**(3): p. 205-10.
123. Stacy, S., et al., *Immunological memory and late onset autoimmunity*. Mech Ageing Dev, 2002. **123**(8): p. 975-85.
124. Weyand, C.M., et al., *Functional properties of CD4+ CD28- T cells in the aging immune system*. Mech Ageing Dev, 1998. **102**(2-3): p. 131-47.
125. Weyand, C.M., J.W. Fulbright, and J.J. Goronzy, *Immunosenescence, autoimmunity, and rheumatoid arthritis*. Exp Gerontol, 2003. **38**(8): p. 833-41.
126. Batliwalla, F.M., et al., *Oligoclonal expansions in the CD8(+)CD28(-) T cells largely explain the shorter telomeres detected in this subset: analysis by flow FISH*. Hum Immunol, 2000. **61**(10): p. 951-8.
127. Schirmer, M., et al., *Resistance to apoptosis and elevated expression of Bcl-2 in clonally expanded CD4+CD28- T cells from rheumatoid arthritis patients*. J Immunol, 1998. **161**(2): p. 1018-25.
128. Henson, S.M., J. Pido-Lopez, and R. Aspinall, *Reversal of thymic atrophy*. Exp Gerontol, 2004. **39**(4): p. 673-8.
129. Tan, J.T., et al., *IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naive T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(15): p. 8732-7.
130. Bruunsgaard, H. and B.K. Pedersen, *Age-related inflammatory cytokines and disease*. Immunol Allergy Clin North Am, 2003. **23**(1): p. 15-39.
131. Benninghoff, A., et al., *Taschenbuch Anatomie*. 2020, München: Elsevier. X, 581 Seiten.
132. Lorenzi, A.R., et al., *Thymic function in juvenile idiopathic arthritis*. Ann Rheum Dis, 2009. **68**(6): p. 983-90.
133. Kimmig, S., et al., *Two subsets of naive T helper cells with distinct T cell receptor excision circle content in human adult peripheral blood*. J Exp Med, 2002. **195**(6): p. 789-94.

134. Douaisi, M., et al., *CD31, a Valuable Marker to Identify Early and Late Stages of T Cell Differentiation in the Human Thymus*. J Immunol, 2017. **198**(6): p. 2310-2319.
135. Aspinall, R., *T cell development, ageing and Interleukin-7*. Mech Ageing Dev, 2006. **127**(6): p. 572-8.
136. Nasi, M., et al., *Thymic output and functionality of the IL-7/IL-7 receptor system in centenarians: implications for the neolymphogenesis at the limit of human life*. Aging Cell, 2006. **5**(2): p. 167-75.
137. Zlamy, M. and M. Prelog, *Thymectomy in early childhood: a model for premature T cell immunosenescence?* Rejuvenation Res, 2009. **12**(4): p. 249-58.
138. Pido-Lopez, J., et al., *Molecular quantitation of thymic output in mice and the effect of IL-7*. Eur J Immunol, 2002. **32**(10): p. 2827-36.
139. Appay, V., et al., *Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues*. Cytometry A, 2008. **73**(11): p. 975-83.
140. Schönland, S.O., et al., *Homeostatic control of T-cell generation in neonates*. Blood, 2003. **102**(4): p. 1428-34.
141. Douek, D.C., et al., *Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection*. Nature, 1998. **396**(6712): p. 690-5.
142. Ribeiro, R.M. and A.S. Perelson, *Determining thymic output quantitatively: using models to interpret experimental T-cell receptor excision circle (TREC) data*. Immunol Rev, 2007. **216**: p. 21-34.
143. Prelog, M., et al., *Premature aging of the immune system in children with juvenile idiopathic arthritis*. Arthritis Rheum, 2008. **58**(7): p. 2153-62.
144. Takahama, Y., *Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(2): p. 127-35.
145. Förster, R., A.C. Davalos-Misslitz, and A. Rot, *CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(5): p. 362-71.
146. Ohl, L., et al., *CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions*. Immunity, 2004. **21**(2): p. 279-88.
147. Mackay, C.R., *Homing of naive, memory and effector lymphocytes*. Curr Opin Immunol, 1993. **5**(3): p. 423-7.
148. Lüllmann-Rauch, R. and E. Asan, *Taschenlehrbuch Histologie*. 2019, Stuttgart: Thieme. 1 Online-Ressource (752 Seiten).
149. Zimmerman, C., et al., *Visualization, characterization, and turnover of CD8+ memory T cells in virus-infected hosts*. J Exp Med, 1996. **183**(4): p. 1367-75.
150. Hulet, H.R., et al., *Cell sorting: automated separation of mammalian cells as a function of intracellular fluorescence*. Science, 1969. **166**(3906): p. 747-9.
151. Dubey, C., M. Croft, and S.L. Swain, *Naive and effector CD4 T cells differ in their requirements for T cell receptor versus costimulatory signals*. J Immunol, 1996. **157**(8): p. 3280-9.
152. Kohler, S. and A. Thiel, *Life after the thymus: CD31+ and CD31- human naive CD4+ T-cell subsets*. Blood, 2009. **113**(4): p. 769-74.

153. Sallusto, F., et al., *Switch in chemokine receptor expression upon TCR stimulation reveals novel homing potential for recently activated T cells.* Eur J Immunol, 1999. **29**(6): p. 2037-45.
154. Clement, L.T., *Isoforms of the CD45 common leukocyte antigen family: markers for human T-cell differentiation.* J Clin Immunol, 1992. **12**(1): p. 1-10.
155. Opata, M.M., et al., *Protection by and maintenance of CD4 effector memory and effector T cell subsets in persistent malaria infection.* PLoS Pathog, 2018. **14**(4): p. e1006960.
156. Almanzar, G., et al., *Long-term cytomegalovirus infection leads to significant changes in the composition of the CD8+ T-cell repertoire, which may be the basis for an imbalance in the cytokine production profile in elderly persons.* J Virol, 2005. **79**(6): p. 3675-83.
157. Effros, R.B., *T cell replicative senescence: pleiotropic effects on human aging.* Ann N Y Acad Sci, 2004. **1019**: p. 123-6.
158. Sallusto, F., et al., *Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions.* Nature, 1999. **401**(6754): p. 708-12.
159. Willinger, T., et al., *Molecular signatures distinguish human central memory from effector memory CD8 T cell subsets.* J Immunol, 2005. **175**(9): p. 5895-903.
160. Rufer, N., et al., *Ex vivo characterization of human CD8+ T subsets with distinct replicative history and partial effector functions.* Blood, 2003. **102**(5): p. 1779-87.
161. Stemmerger, C., et al., *A single naive CD8+ T cell precursor can develop into diverse effector and memory subsets.* Immunity, 2007. **27**(6): p. 985-97.
162. Kanno, Y., et al., *Transcriptional and epigenetic control of T helper cell specification: molecular mechanisms underlying commitment and plasticity.* Annu Rev Immunol, 2012. **30**: p. 707-31.
163. Djuretic, I.M., et al., *Transcription factors T-bet and Runx3 cooperate to activate Irfng and silence Il4 in T helper type 1 cells.* Nat Immunol, 2007. **8**(2): p. 145-53.
164. Nakamura, Y., et al., *Gene expression of the GATA-3 transcription factor is increased in atopic asthma.* J Allergy Clin Immunol, 1999. **103**(2 Pt 1): p. 215-22.
165. Yang, X.O., et al., *T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma.* Immunity, 2008. **28**(1): p. 29-39.
166. Harrington, L.E., et al., *Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages.* Nat Immunol, 2005. **6**(11): p. 1123-32.
167. Laan, M., et al., *Neutrophil recruitment by human IL-17 via C-X-C chemokine release in the airways.* J Immunol, 1999. **162**(4): p. 2347-52.
168. Albanesi, C., A. Cavani, and G. Girolomoni, *IL-17 is produced by nickel-specific T lymphocytes and regulates ICAM-1 expression and chemokine production in human keratinocytes: synergistic or antagonist effects with IFN-gamma and TNF-alpha.* J Immunol, 1999. **162**(1): p. 494-502.

169. Sakaguchi, S., *Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self*. Nat Immunol, 2005. **6**(4): p. 345-52.
170. Burchill, M.A., et al., *IL-2 receptor beta-dependent STAT5 activation is required for the development of Foxp3+ regulatory T cells*. J Immunol, 2007. **178**(1): p. 280-90.
171. Horwitz, D.A., S.G. Zheng, and J.D. Gray, *Natural and TGF-beta-induced Foxp3(+)/CD4(+)/CD25(+) regulatory T cells are not mirror images of each other*. Trends Immunol, 2008. **29**(9): p. 429-35.
172. Vercoulen, Y., et al., *Heat shock protein 60 reactive T cells in juvenile idiopathic arthritis: what is new?* Arthritis Res Ther, 2009. **11**(3): p. 231.
173. Fontenot, J.D., M.A. Gavin, and A.Y. Rudensky, *Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells*. Nat Immunol, 2003. **4**(4): p. 330-6.
174. Sakaguchi, S., et al., *Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases*. J Immunol, 1995. **155**(3): p. 1151-64.
175. Sallusto, F., et al., *Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes*. J Exp Med, 1998. **187**(6): p. 875-83.
176. Acosta-Rodriguez, E.V., et al., *Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells*. Nat Immunol, 2007. **8**(6): p. 639-46.
177. Annunziato, F., et al., *Phenotypic and functional features of human Th17 cells*. J Exp Med, 2007. **204**(8): p. 1849-61.
178. Kanhere, A., et al., *T-bet and GATA3 orchestrate Th1 and Th2 differentiation through lineage-specific targeting of distal regulatory elements*. Nat Commun, 2012. **3**: p. 1268.
179. Zhou, L., et al., *TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgamma function*. Nature, 2008. **453**(7192): p. 236-40.
180. Saravia, J., N.M. Chapman, and H. Chi, *Helper T cell differentiation*. Cell Mol Immunol, 2019. **16**(7): p. 634-643.
181. Mathur, A.N., et al., *T-bet is a critical determinant in the instability of the IL-17-secreting T-helper phenotype*. Blood, 2006. **108**(5): p. 1595-601.
182. Zielinski, C.E., et al., *Pathogen-induced human TH17 cells produce IFN-gamma or IL-10 and are regulated by IL-1beta*. Nature, 2012. **484**(7395): p. 514-8.
183. Panzer, M., et al., *Rapid in vivo conversion of effector T cells into Th2 cells during helminth infection*. J Immunol, 2012. **188**(2): p. 615-23.
184. Lee, Y.K., et al., *Late developmental plasticity in the T helper 17 lineage*. Immunity, 2009. **30**(1): p. 92-107.
185. Wei, G., et al., *Global mapping of H3K4me3 and H3K27me3 reveals specificity and plasticity in lineage fate determination of differentiating CD4+ T cells*. Immunity, 2009. **30**(1): p. 155-67.
186. Zlamy, M., et al., *Efforts of the human immune system to maintain the peripheral CD8+ T cell compartment after childhood thymectomy*. Immun Ageing, 2016. **13**: p. 3.

187. Wing, J.B. and S. Sakaguchi, *TCR diversity and Treg cells, sometimes more is more*. Eur J Immunol, 2011. **41**(11): p. 3097-100.
188. Nikolich-Zugich, J., M.K. Slifka, and I. Messaoudi, *The many important facets of T-cell repertoire diversity*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(2): p. 123-32.
189. Fahl, S.P., D.J. Kappes, and D.L. Wiest, *TCR Signaling Circuits in $\alpha\beta/\gamma\delta$ T Lineage Choice*, in *Signaling Mechanisms Regulating T Cell Diversity and Function*, J. Soboloff and D.J. Kappes, Editors. 2018, CRC Press/Taylor & Francis © 2017 Taylor & Francis Group, LLC.: Boca Raton (FL). p. 85-104.
190. Hayday, A.C., *[gamma][delta] cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection*. Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 975-1026.
191. Carding, S.R. and P.J. Egan, *Gammadelta T cells: functional plasticity and heterogeneity*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(5): p. 336-45.
192. Born, W.K., M. Kemal Aydintug, and R.L. O'Brien, *Diversity of $\gamma\delta$ T-cell antigens*. Cell Mol Immunol, 2013. **10**(1): p. 13-20.
193. Salerno, A. and F. Dieli, *Role of gamma delta T lymphocytes in immune response in humans and mice*. Crit Rev Immunol, 1998. **18**(4): p. 327-57.
194. Petrie, H.T., R. Scollay, and K. Shortman, *Commitment to the T cell receptor-alpha beta or -gamma delta lineages can occur just prior to the onset of CD4 and CD8 expression among immature thymocytes*. Eur J Immunol, 1992. **22**(8): p. 2185-8.
195. Schmolka, N., et al., *Epigenetic and transcriptional regulation of $\gamma\delta$ T cell differentiation: Programming cells for responses in time and space*. Semin Immunol, 2015. **27**(1): p. 19-25.
196. Hayes, S.M., E.W. Shores, and P.E. Love, *An architectural perspective on signaling by the pre-, alphabeta and gammadelta T cell receptors*. Immunol Rev, 2003. **191**: p. 28-37.
197. Goronzy, J.J. and C.M. Weyand, *Aging, autoimmunity and arthritis: T-cell senescence and contraction of T-cell repertoire diversity - catalysts of autoimmunity and chronic inflammation*. Arthritis Res Ther, 2003. **5**(5): p. 225-34.
198. Blackburn, E.H., *Structure and function of telomeres*. Nature, 1991. **350**(6319): p. 569-73.
199. Arsenis, N.C., et al., *Physical activity and telomere length: Impact of aging and potential mechanisms of action*. Oncotarget, 2017. **8**(27): p. 45008-45019.
200. Oeseburg, H., et al., *Telomere biology in healthy aging and disease*. Pflugers Arch, 2010. **459**(2): p. 259-68.
201. Hohensinner, P.J., J.J. Goronzy, and C.M. Weyand, *Telomere dysfunction, autoimmunity and aging*. Aging Dis, 2011. **2**(6): p. 524-37.
202. Berthelot, J.M., B. le Goff, and Y. Maugars, *Thymic Hassall's corpuscles, regulatory T-cells, and rheumatoid arthritis*. Semin Arthritis Rheum, 2010. **39**(5): p. 347-55.
203. Miller, J.F., *Immunological function of the thymus*. Lancet, 1961. **2**(7205): p. 748-9.

204. Markert, M.L., et al., *Complete DiGeorge syndrome: development of rash, lymphadenopathy, and oligoclonal T cells in 5 cases*. J Allergy Clin Immunol, 2004. **113**(4): p. 734-41.
205. Adkins, B., C. Leclerc, and S. Marshall-Clarke, *Neonatal adaptive immunity comes of age*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(7): p. 553-64.
206. Rubinstein, A., B. Pelet, and V. Schweizer, *Immunological decay in thymectomized infants*. Helv Paediatr Acta, 1976. **30**(4-5): p. 425-33.
207. Halnon, N.J., et al., *Thymic function and impaired maintenance of peripheral T cell populations in children with congenital heart disease and surgical thymectomy*. Pediatr Res, 2005. **57**(1): p. 42-8.
208. Prelog, M., et al., *Thymectomy in early childhood: significant alterations of the CD4(+)CD45RA(+)CD62L(+) T cell compartment in later life*. Clin Immunol, 2009. **130**(2): p. 123-32.
209. Jamieson, B.D., et al., *Generation of functional thymocytes in the human adult*. Immunity, 1999. **10**(5): p. 569-75.
210. Sempowski, G., et al., *Effect of thymectomy on human peripheral blood T cell pools in myasthenia gravis*. J Immunol, 2001. **166**(4): p. 2808-17.
211. Torfadottir, H., et al., *Evidence for extrathymic T cell maturation after thymectomy in infancy*. Clin Exp Immunol, 2006. **145**(3): p. 407-12.
212. Abo, T., *Extrathymic pathways of T-cell differentiation and immunomodulation*. Int Immunopharmacol, 2001. **1**(7): p. 1261-73.
213. Blais, M.E., et al., *Extrathymic T-lymphocyte development*. Exp Hematol, 2003. **31**(5): p. 349-54.
214. Nonaka, S., et al., *Intestinal gamma delta T cells develop in mice lacking thymus, all lymph nodes, Peyer's patches, and isolated lymphoid follicles*. J Immunol, 2005. **174**(4): p. 1906-12.
215. van den Dool, C. and R.J. de Boer, *The effects of age, thymectomy, and HIV Infection on alpha and beta TCR excision circles in naive T cells*. J Immunol, 2006. **177**(7): p. 4391-401.
216. Nikolich-Zugich, J., et al., *Advances in cytomegalovirus (CMV) biology and its relationship to health, diseases, and aging*. Geroscience, 2020. **42**(2): p. 495-504.
217. Khan, N., et al., *Cytomegalovirus seropositivity drives the CD8 T cell repertoire toward greater clonality in healthy elderly individuals*. J Immunol, 2002. **169**(4): p. 1984-92.
218. van Leeuwen, E.M., et al., *Emergence of a CD4+CD28- granzyme B+, cytomegalovirus-specific T cell subset after recovery of primary cytomegalovirus infection*. J Immunol, 2004. **173**(3): p. 1834-41.
219. Wills, M.R., et al., *Human virus-specific CD8+ CTL clones revert from CD45ROhigh to CD45RAhigh in vivo: CD45RAhighCD8+ T cells comprise both naive and memory cells*. J Immunol, 1999. **162**(12): p. 7080-7.
220. Trzonkowski, P., et al., *Association between cytomegalovirus infection, enhanced proinflammatory response and low level of anti-hemagglutinins during the anti-influenza vaccination--an impact of immunosenescence*. Vaccine, 2003. **21**(25-26): p. 3826-36.
221. Pawelec, G., et al., *Is immunosenescence infectious?* Trends Immunol, 2004. **25**(8): p. 406-10.

222. Almanzar, G., et al., *Significant IFN γ responses of CD8+ T cells in CMV-seropositive individuals with autoimmune arthritis*. J Clin Virol, 2016. **77**: p. 77-84.
223. Wang, G.C., et al., *T cell receptor $\alpha\beta$ diversity inversely correlates with pathogen-specific antibody levels in human cytomegalovirus infection*. Sci Transl Med, 2012. **4**(128): p. 128ra42.
224. Schwaiger, S., et al., *IL-4-producing CD8+ T cells with a CD62L $^{++}$ (bright) phenotype accumulate in a subgroup of older adults and are associated with the maintenance of intact humoral immunity in old age*. J Immunol, 2003. **170**(1): p. 613-9.
225. Paston, S.J., I.A. Dodi, and J.A. Madrigal, *Progress made towards the development of a CMV peptide vaccine*. Hum Immunol, 2004. **65**(5): p. 544-9.
226. Plotkin, S.A., et al., *The Status of Vaccine Development Against the Human Cytomegalovirus*. J Infect Dis, 2020. **221**(Supplement_1): p. S113-s122.
227. Solana, R., et al., *CMV and Immunosenescence: from basics to clinics*. Immun Ageing, 2012. **9**(1): p. 23.
228. Thewissen, M., et al., *Premature immunosenescence in rheumatoid arthritis and multiple sclerosis patients*. Ann N Y Acad Sci, 2005. **1051**: p. 255-62.
229. Koetz, K., et al., *T cell homeostasis in patients with rheumatoid arthritis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(16): p. 9203-8.
230. Prelog, M. and J. Brunner, *Reply*. Arthritis and rheumatism, 2008. **60**: p. 311-312.
231. Brinkman, D.M., et al., *Autologous stem cell transplantation in children with severe progressive systemic or polyarticular juvenile idiopathic arthritis: long-term follow-up of a prospective clinical trial*. Arthritis Rheum, 2007. **56**(7): p. 2410-21.
232. Prelog, M., et al., *Indications for a disturbed peripheral T-cell homeostasis in juvenile idiopathic arthritis (JIA): absent expansion of CD28 T-cells and no decrease of naive T-cells in cytomegalovirus-positive patients with JIA*. J Rheumatol, 2008. **35**(3): p. 520-7.
233. Mehraein, Y., et al., *Latent Epstein-Barr virus (EBV) infection and cytomegalovirus (CMV) infection in synovial tissue of autoimmune chronic arthritis determined by RNA- and DNA-in situ hybridization*. Mod Pathol, 2004. **17**(7): p. 781-9.
234. Hooper, M., et al., *Cytomegalovirus seropositivity is associated with the expansion of CD4 $^{+}$ CD28 $^{-}$ and CD8 $^{+}$ CD28 $^{-}$ T cells in rheumatoid arthritis*. J Rheumatol, 1999. **26**(7): p. 1452-7.
235. Ginaldi, L., et al., *The immune system in the elderly: activation-induced and damage-induced apoptosis*. Immunol Res, 2004. **30**(1): p. 81-94.
236. Almanzar, G., et al., *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, 2013. **7**: p. 135.

237. *World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects.* *Jama*, 2013. **310**(20): p. 2191-4.
238. Radke, L., et al., *Induced cytokine response of human PMBC-cultures: correlation of gene expression and secretion profiling and the effect of cryopreservation.* *Cell Immunol*, 2012. **272**(2): p. 144-53.
239. Horan, P.K. and L.L. Wheelless, Jr., *Quantitative single cell analysis and sorting.* *Science*, 1977. **198**(4313): p. 149-57.
240. Shibasaki, M., *[Phorbols: chemical synthesis and chemical biology].* *Yakugaku Zasshi*, 2000. **120**(1): p. 76-90.
241. Chatila, T., et al., *Mechanisms of T cell activation by the calcium ionophore ionomycin.* *J Immunol*, 1989. **143**(4): p. 1283-9.
242. Baier, G., *The PKC gene module: molecular biosystematics to resolve its T cell functions.* *Immunol Rev*, 2003. **192**: p. 64-79.
243. Prelog, M., et al., *Hypermethylation of FOXP3 Promoter and Premature Aging of the Immune System in Female Patients with Panic Disorder?* *PLoS One*, 2016. **11**(6): p. e0157930.
244. Cawthon, R.M., *Telomere measurement by quantitative PCR.* *Nucleic Acids Res*, 2002. **30**(10): p. e47.
245. Douek, D.C., *Disrupting T-cell homeostasis: how HIV-1 infection causes disease.* *AIDS Rev*, 2003. **5**(3): p. 172-7.
246. Ponchel, F., R.J. Cuthbert, and V. Goëb, *IL-7 and lymphopenia.* *Clin Chim Acta*, 2011. **412**(1-2): p. 7-16.
247. Nistala, K., et al., *Th17 plasticity in human autoimmune arthritis is driven by the inflammatory environment.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(33): p. 14751-6.

Appendix

I Abkürzungsverzeichnis

µL	Mikroliter
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
AGORA	Adenosin-Rezeptor
ANA	Antinukleärer Antikörper
APC	Antigen-präsentierende Zelle
APC	Allophycocyanin (Fluorochrom)
ATP	Adenosin-Triphosphat
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaft
BIKER	<u>B</u> iologika <u>i</u> n der <u>K</u> inder <u>r</u> heumatologie
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
bspw.	beispielsweise
BV	Brilliant Violet (Fluorochrom)
bzw.	beziehungsweise
CARRA	engl. <i>Childhood Arthritis and Rheumatology Research Alliance</i>
CCL	Chemokinligand (engl. <i>chemokine C-C lig- and</i>)
CCP	cyclisches citrulliniertes Peptid
CCR	Chemokinrezeptor (engl. <i>chemokine C-C re- ceptor</i>)
CD	engl. <i>cluster of differentiation</i>
Ch.-B.	Chargenbezeichnung
CMV	Cytomegalie Virus
CRP	C-reaktives Protein
CRTh2	engl. <i>chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on Th2 cells</i>
CTLA4	engl. <i>cytotoxic T-lymphocyte associated pro- tein 4</i>
CXCR	Chemokinrezeptor C-X-C
Cy7	Cyanin-Tandem-Fluorochrom
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>

EBV	Epstein-Barr Virus
ED	Erstdiagnose
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat
ELISA	engl. <i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
EMA	engl. <i>European Medicines Agency</i>
engl.	Englische Übersetzung
Fab	engl. <i>fragment antigen binding</i> , Antigen-bindender Teil des Antikörpers
Fas	engl. <i>FS7-associated cell surface antigen</i>
FACS	engl. <i>fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	fetales Kälber-Serum
FDA	engl. <i>Food and Drug Administration</i>
FDZ	follikuläre, dendritische Zelle
FITC	Fluorescein Isothiocyanat (Fluorochrom)
FoxP3	engl. <i>forkhead box P3</i>
FSC	engl. <i>forward scatter</i>
G-CSF	engl. <i>granulocyte-colony stimulating factor</i>
Gata3	Glutaryl-Aminotransferase-Untereinheit A3
GC	Glukokortikoid
H3K4me3	Trimethylierung an Histon H3 Lysin 4
H3K27me3	Trimethylierung an Histon H3 Lysin 27
H7	Analogon zu Cy7 mit ähnlichem Spektrum (Fluorochrom)
HC	engl. <i>healthy control</i>
HLA	engl. <i>human leukocyte antigen</i>
HRP	engl. <i>horseradish peroxidase</i>
IgE	Immunoglobulin E
IL	Interleukin
ILAR	engl. <i>International League of Associations for Rheumatology</i>
IFN γ	Interferon γ
inkl.	inklusive
JADAS	engl. <i>juvenile arthritis disease activity score</i>
JAK	Januskinase
JIA	Juvenile idiopathische Arthritis
kgKG	Kilogramm Körpergewicht
Ki-67	Proliferationsmarker
KOF	Körperoberfläche

LOT-Nummer	Chargennummer
MAS	Makrophagenaktivierungssyndrom
MIF	engl. <i>macrophage migration inhibitory factor</i>
MHC	engl. <i>major histocompatibility complex</i>
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MTX	Methotrexat
N	engl. <i>number</i> = Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NFκB	engl. <i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
ng	Nanogramm
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
NR3C1	nukleärer Rezeptor Subfamilie 3 Gruppe C Mitglied 1
NSAR	Nichtsteroidale Antirheumatika
OD	engl. <i>optical density</i>
PBMC	engl. <i>peripheral blood mononuclear cell</i>
PBS	engl. <i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	engl. <i>polymerase chain reaction</i>
PE	R-Phycoerythrin (Fluorochrom)
PECAM-1	engl. <i>Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1</i>
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein (Fluorochrom)
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PRCSG	engl. <i>Pediatric Rheumatology Collaborative Study Group</i>
PRINTO	engl. <i>Paediatric Rheumatology International Trials Organization</i>
PTPN22	engl. <i>protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22</i>
RA	Rheumatoide Arthritis
RAG	engl. <i>recombination activating gene</i>
RF	Rheumafaktor
RORyt	engl. <i>retinoic acid orphan receptor gamma t</i>

rpm	engl. <i>revolutions per minute</i> = Umdrehungen pro Minute
RPMI	definiertes Zellkulturmedium, entwickelt vom <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RTE	engl. <i>recent thymic emigrants</i>
RTL	relative Telomerlänge
SD	engl. <i>standard deviation</i>
SLC11A6	Solute Carrier, Familie 11, Subfamilie A, Isoform 6
SSC	engl. <i>side scatter</i>
STAT	engl. <i>signal transducer and activator of transcriptions</i>
T-bet	engl. <i>T-box transcription factor</i>
TCM	engl. <i>T-cell central memory</i>
TCR	T-Zell-Rezeptor
TEM	engl. <i>T-cell effector memory</i>
TEMRA	engl. <i>T-cell effector memory with CD45RA</i>
TFH	follikuläre T-Helferzelle
TGF	engl. <i>transforming growth factor</i>
TH	T-Helferzelle
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TREC	engl. <i>T-cell receptor excision circles</i>
Treg	Regulatorische T-Zellen
U	Umdrehung pro Minute
U	Units
u.a.	unter anderem
VAS	Visuelle Analogskala
v.a.	vor allem
vs.	versus
WISP	engl. <i>WNT1-inducible-signaling pathway protein 3</i>
z.B.	zum Beispiel

II Abbildungsverzeichnis

- Abb.1: Darstellung der potenziellen Rolle des Mikrobioms in der Pathogenese der JIA (entnommen aus [42], mit Genehmigung von Springer Nature). Mikrobielle Dysbiose kann zu einer Dysregulation des Immunsystems führen, was die Integrität der Mukosa herabsetzt und durch molekulare Mimikry eine Aktivierung des Immunsystems bewirkt. Durch die veränderte Mukosa-Permeabilität kann auch die Richtung der T-Zell-Differenzierung hin zu einem effektorischen TH1-/TH17-Profil beeinflusst werden. Zusammen mit genetischer Suszeptibilität und exogenen Triggerfaktoren könnten hieraus Autoimmunität und Gelenkentzündung resultieren. 13
- Abb.2: Klinische Manifestationen von Immunoseneszenz (eigene Abbildung). Graphische Darstellung der klinischen Manifestationen der Immunoseneszenz bei alternden Patienten: es konnten eine niedrigere Antikörper-Antwort auf Vakzinationen, der Verlust, „selbst“ von „fremd“ unterscheiden zu können, erhöhte Antikörper-Werte, die oligoklonale Expansion von CD8-positiven Zellen, Veränderungen im Zytokin-Profil zu einem chronisch-inflammatorischen Profil und eine höhere Suszeptibilität zu Infektionen mit höherer Morbidität und Mortalität festgestellt werden. 31
- Abb.3: Zelluläre Immunoseneszenz der T-Zellen (eigene Abbildung). Im Rahmen der Immunoseneszenz kommt es zu einer Involution des Thymus. Dadurch werden weniger rezente Thymusemigranten (RTE) und in Folge auch naive T-Zellen ausgeschüttet. Kompensatorisch proliferieren periphere *CD45RA-CD45RO+* Memory-T-Zellen. *T-cell receptor excision circles* (TRECs), die in naiven, aus dem Thymus stammenden T-Zellen zu finden sind, und die relative Telomerlänge (RTL) nehmen im Laufe der Seneszenz ab, bedingt durch den geringeren Thymus-Output und die gesteigerte periphere Proliferation. Zudem kann ein vermehrtes Auftreten von spezifischen und reifen T-Zellen mit einer oligoklonalen Expansion von *CD28-* Zellen beobachtet werden..... 33
- Abb.4: Expression der Oberflächenmarker und Zytokine in den T-Zell-Subpopulationen, modifiziert nach [139]. Definition der Charakteristika in den T-Zell-Subgruppen anhand ihres individuellen *CD45RA-*, *CD28-* und *CCR7-* Profils. In den beiden Koordinatensystemen ist der Verlauf der Oberflächenmarker und der Zytokine gegen die Höhe der relativen Expression aufgetragen, wobei die farbzuoordnende Legende am rechten Abbildungsrand zu finden ist. Mit zunehmender Antigenerfahrung verkürzt sich die Telomerlänge (2. Zeile)..... 41
- Abb.5: Differenzierungspfade der T-Helferzellen (eigene Abbildung). Unter Einfluss eines spezifischen Zytokinmilieus (Pfeil) wird über STAT ein spezifischer Transkriptionsfaktor aktiviert, was zur Differenzierung hin zu einer TH1-, TH2-, TH17- oder einer Treg-Zelle führt. Unterhalb der T-Helferzelle (Kreis) sind die charakteristischen Zytokine aufgelistet. 45

- Abb.6: Bildung der TRECs im Rahmen des TCR α -Rearrangements, modifiziert nach [141]. Die Abbildung zeigt eine vereinfachte Darstellung des TCR δ -Lokus, der von den unterschiedlichen Segmenten des TCR α -Lokus umgeben wird. Im Rahmen des TCR α -Rearrangements bildet sich ein einzelner TREC, der eine einzigartige *single joint*-Sequenz enthält (sjTREC). Der zweite *coding joint* TREC (cjTREC) wird nach der Bindung von V α an J α geformt. 49
- Abb.7: Alter und CMV als treibende Kräfte des Seneszenz-Prozesses von angeborenem und adaptivem Immunsystem, modifiziert nach [227]. Steigendes Alter zusammen mit CMV-Seropositivität treibt die Seneszenz des angeborenen und adaptiven Immunsystems voran. Dies kann zur Pathogenese von kardiovaskulären Erkrankungen, Autoimmunerkrankungen oder Malignitäten führen, Abstoßreaktionen oder erhöhte Morbidität und Mortalität bei Transplantation verursachen bzw. zu einer stärkeren Gebrechlichkeit und einem erhöhten Risiko, frühzeitig zu versterben, beitragen. 56
- Abb.8: Erklärungsmodell für Autoimmunität anhand von prämaturer Immunoseneszenz, modifiziert nach [114]. Durch Faktoren wie Infektionen, Seneszenz-Mechanismen, Apoptose-Defekte und weitere bislang noch unbekannte ex- und intrinsische Faktoren kann der Output des Thymus reduziert werden. Kompensatorisch proliferieren die peripheren, postthymischen Zellen. Als Folge manifestieren sich Merkmale der prämaturen Immunoseneszenz, wie der Verlust von CD28, kürzere Telomerlängen und eine abnehmende TREC-Anzahl in naiven T-Zellen. Daraus könnte das Nachlassen der T-Zell-Regulation und der Selbsttoleranz und schließlich Autoimmunität resultieren.... 60
- Abb.9: Herstellung der Verdünnungsreihe nach Herstellerangabe (eigene Abbildung). In das erste Tube wurden 8 μ L Standard zu 592 μ L PBS gegeben, um eine Konzentration von 1000 pg/ml zu erzielen. In Tube 2 bis 6 wurden jeweils 400 μ L PBS vorgelegt. Zur Herstellung der Verdünnungsreihe wurde aus jedem Tube nach gründlicher Resuspension jeweils 200 μ L entnommen und dem Tube der nächsten Verdünnungsstufe hinzugegeben. Das 6.Tube enthält nur PBS..... 81
- Abb.10: Graphische Darstellung der JIA-Verteilung in der DMARD- und TNF α -Inhibitor-Gruppe. Dargestellt ist die prozentuale Verteilung der JIA-Subtypen der DMARD-Gruppe (n=26) und TNF α -Inhibitor-Gruppe (n=12), bezogen auf die JIA-Gesamtpopulation (n=38). ... 87
- Abb.11: Proportionale Verteilung der CD4-positiven T-Zellen in HC, DMARD und TNFi. Prozentualer Anteil der CD4-positiven T-Zellen in den Gesunden, den JIA-Patienten der DMARD- und der TNFi-Gruppe. 91
- Abb.12: FACS Gating-Strategie für die Subpopulationen. In der Abbildung ist dargestellt, wie anhand der Ausprägung der Oberflächenmarker CD45RA, CD28 und CCR7 die Subpopulationen definiert und mittels der FACS Diva Software weiter untersucht wurden. Als Fluorochrome wurden CD4 APC, CD8 PerCP5.5, CCR7 APC-Cy7 und CD28 PE-Cy7 verwendet. Die Werte werden als Prozente der Parent-Generation bzw. bei CCR7 der Grandparent-Generation (also in Bezug auf CD4/CD8) angegeben..... 92

<u>Abb.13a-i:</u> Repräsentative FACS-Punktdiagramme für die CD4-positiven (b,e,h) und CD8-positiven (c,f,i) Subpopulationen in HC, DMARD und TNFi. FACS-Dotplots von 3 repräsentativen Probanden der Gesunden (a-c), der JIA-Patienten der DMARD-Gruppe (d-f) und der JIA-Patienten der TNFi-Gruppe (g-i). Nach Gate-Inversion der Zombie-positiven PBMCs (Daten nicht gezeigt) wurden die Zellen nach Expression von CD4 und CD8 untersucht und die jeweils positiven Zellen - mit Ausschluss der CD4-/CD8-doppelpositiven Zellen - nach Auftreten der Marker CD28 und CD45RA weiter differenziert. Naive Zellen definierten sich durch <i>CD28+ CD45RA+</i> , Memory als <i>CD28+ CD45RA-</i> , Effektor durch <i>CD28- CD45RA-</i> und TEMRA durch <i>CD28- CD45RA+</i>	93
<u>Abb.14a-j:</u> Proportionale Verteilung der CD4-positiven Subpopulationen in HC, DMARD und TNFi. Prozentualer Anteil der CD4-positiven T-Zellen unterteilt in die Subpopulationen in den Gesunden, den JIA-Patienten der DMARD- und der TNFi-Gruppe.	95
<u>Abb.15:</u> Proportionale Verteilung der CD8-positiven T-Zellen in HC, DMARD und TNFi. Prozentualer Anteil der CD8-positiven T-Zellen in den Gesunden, den JIA-Patienten der DMARD- und der TNFi-Gruppe.	96
<u>Abb.16a-j:</u> Proportionale Verteilung der CD8-positiven Subpopulationen in HC, DMARD und TNFi. Prozentualer Anteil der CD8-positiven T-Zellen, unterteilt in die Subpopulationen in den Gesunden, den JIA-Patienten der DMARD- und der TNFi-Gruppe.	99
<u>Abb.17:</u> FACS Gating-Strategie für die regulatorischen T-Zellen. In der Abbildung ist dargestellt, wie anhand der Ausprägung der Oberflächenmarker FoxP3, CD25, CD127 und CCR6 die regulatorischen T-Zellen definiert und mittels der FACS Diva Software untersucht wurden. Als Fluorochrome wurden CD4 FITC, CD8 APC-H7, CD25 PE-Cy7, CD127 BV421, FoxP3 PerCP5.5, CCR6 PE verwendet. Die Werte werden als Prozente der Parent-Generation bzw. bei den <i>FoxP3+</i> Tregs als Prozente der Grandparent-Generation (also in Bezug auf CD4/CD8) angegeben.	101
<u>Abb.18a-d:</u> Proportionale Verteilung der CD4-positiven regulatorischen T-Zellen in HC, DMARD und TNFi. Prozentualer Anteil der CD4-positiven regulatorischen T-Zellen unterteilt in die Subpopulationen in den Gesunden, den JIA-Patienten der DMARD- und der TNFi-Gruppe.	102
<u>Abb.19a-c:</u> Proportionale Verteilung der RTE in HC, DMARD und TNFi. Prozentualer Anteil der CD4-positiven RTE in den Gesunden, den JIA-Patienten der DMARD- und der TNFi-Gruppe.	104
<u>Abb.20a-f:</u> Proportionale Verteilung der Chemokin-Rezeptor-positiven T-Zellen in HC, DMARD und TNFi. Prozentualer Anteil der Chemokin-Rezeptor-positiven T-Zellen in den Gesunden, den JIA-Patienten der DMARD- und der TNFi-Gruppe.	106
<u>Abb.21:</u> FACS Gating-Strategie für die TCRαβ-positiven T-Zellen. In der Abbildung ist dargestellt, wie anhand der Ausprägung der Oberflächenmarker TCRαβ, CD31 und CD127 die TCRαβ-positiven T-Zellen definiert und mittels der FACS Diva Software untersucht wurden. Als Fluoro-chrome wurden CD4 PE, CD8 PerCP5.5, TCRαβ FITC, CD31 PE-	

Cy7, CD127 APC-Cy7 verwendet. Die Werte werden als Prozente der Parent-Generation angegeben.....	108
<u>Abb.22a-d</u> : Proportionale Verteilung der CD4-positiven, TCR $\alpha\beta$ -positiven T-Zellen in HC, DMARD und TNFi. Prozentualer Anteil der CD4-positiven, TCR $\alpha\beta$ -positiven T-Zellen in den Gesunden, den JIA-Patienten der DMARD- und der TNFi-Gruppe.	110
<u>Abb.23a-d</u> : Proportionale Verteilung der CD8-positiven, TCR $\alpha\beta$ -positiven T-Zellen in HC, DMARD und TNFi. Prozentualer Anteil der CD8-positiven, TCR $\alpha\beta$ -positiven T-Zellen in den Gesunden, den JIA-Patienten der DMARD- und der TNFi-Gruppe.	111
<u>Abb.24a-d</u> : Proportionale Verteilung der CD4-positiven, TCR $\gamma\delta$ -positiven T-Zellen in HC, DMARD und TNFi. Prozentualer Anteil der CD4-positiven, TCR $\gamma\delta$ -positiven T-Zellen in den Gesunden, den JIA-Patienten der DMARD- und der TNFi-Gruppe.	113
<u>Abb.25a-d</u> : Proportionale Verteilung der TCR $\gamma\delta$ -positiven T-Zellen der CD8-positiven T-Zellen in HC, DMARD und TNFi. Prozentualer Anteil der TCR $\gamma\delta$ -positiven Untergruppen der CD8-positiven T-Zellen in den Gesunden, den JIA-Patienten der DMARD- und der TNFi-Gruppe.....	114
<u>Abb.26</u> : Proportionale Verteilung der Zytokin-Anteile in den CD4-positiven Subpopulationen der T-Zellen in HC, DMARD und TNFi. Prozentualer Anteil der Zytokin-Anteile in den CD4-positiven Subpopulationen der T-Zellen bei den Gesunden, den JIA-Patienten der DMARD- und der TNFi-Gruppe.....	117
<u>Abb.27a-h</u> : Proportionale Verteilung der Zytokin-Anteile in den CD8-positiven Subpopulationen der T-Zellen in HC, DMARD und TNFi. Prozentualer Anteil der Zytokin-Anteile in den CD8-positiven Subpopulationen der T-Zellen bei den Gesunden, den JIA-Patienten der DMARD- und der TNFi-Gruppe.....	120
<u>Abb.28a-d</u> : Proportionale Verteilung des Zytokin-Anteils in den regulatorischen T-Zellen. Prozentualer Anteil der Zytokine in den regulatorischen T-Zellen bei den Gesunden, den JIA-Patienten der DMARD- und der TNFi-Gruppe.....	121
<u>Abb.29a-d</u> : Proportionale Verteilung des Zytokin-Anteils in den CD4-positiven RTE. Prozentualer Anteil der Zytokine in den CD4-positiven RTE bei den Gesunden, den JIA-Patienten der DMARD- und der TNFi-Gruppe.....	123
<u>Abb.30a-d</u> : Proportionale Verteilung des Zytokin-Anteils in den CD8-positiven RTE. Prozentualer Anteil der Zytokine in den CD8-positiven RTE bei den Gesunden, den JIA-Patienten der DMARD- und der TNFi-Gruppe.....	125
<u>Abb.31a-d</u> : Proportionale Verteilung des Zytokin-Anteils in den Chemokin-Rezeptor-positiven T-Zellen. Prozentualer Anteil der Zytokine in den Chemokin-Rezeptor-positiven T-Zellen bei den Gesunden, den JIA-Patienten der DMARD- und der TNFi-Gruppe.	127
<u>Abb.32a-c</u> : Proportionale Verteilung des Zytokin-Anteils in den TCR $\alpha\beta$ -positiven T-Zellen in HC, DMARD und TNFi. Prozentualer Zytokin-Anteil der TCR $\alpha\beta$ -positiven T-Zellen in den Gesunden, den JIA-Patienten der DMARD- und der TNFi-Gruppe.	129

<u>Abb.33a-d:</u> Proportionale Verteilung des Zytokin-Anteils in den TCR $\gamma\delta$ -positiven T-Zellen in HC, DMARD und TNFi. Prozentualer Zytokin-Anteil der TCR $\gamma\delta$ -positiven T-Zellen in den Gesunden, den JIA-Patienten der DMARD- und der TNFi-Gruppe.	130
<u>Abb.34:</u> Lineare Korrelation zwischen IL-7-Standardkonzentration und optischer Densität. Graphisch dargestellt ist die aus der optischen Densität (y-Achse) und der Standardverdünnungsreihe berechnete Gerade mit der exakten mathematischen Formel.	131
<u>Abb.35:</u> Werteverteilung der IL-7-Konzentrationen [pg/ml] in HC (n=10), DMARD (n=12) und TNFi (n=2). Verteilung der IL-7-Konzentrationswerte bei den Gesunden, den JIA-Patienten der DMARD- und der TNFi-Gruppe.	131
<u>Abb.36a-c:</u> Proportionale Verteilung der Proliferation in den CD4-positiven T-Zellen in HC, DMARD und TNFi. Prozentuale Verteilung des Ki-67-Anteils in den CD4-positiven T-Zellen bei den Gesunden, den JIA-Patienten der DMARD-Gruppe und der TNFi-Gruppe.	133
<u>Abb.37:</u> Werteverteilung der TRECs in HC (n=11), DMARD (n=16) und TNFi (n=2). Verteilung der TREC-Anzahl auf 10.000 PBMCs bei den Gesunden, den JIA-Patienten der DMARD-Gruppe und der TNFi-Gruppe.	134
<u>Abb.38:</u> Werteverteilung der relativen Telomerlängen in HC (n=11), DMARD (n=17) und TNFi (n=2). Verteilung der relativen Telomerlängen bei den Gesunden, den JIA-Patienten der DMARD-Gruppe und der TNFi-Gruppe in Bezug auf eine Einzelgenkopie.	134
<u>Abb.39:</u> Graphische Darstellung der Regression der CD4-positiven, naiven T-Zellen gegen das jeweilige Alter bei Blutentnahme. In der Abbildung ist die Häufigkeit der CD4-positiven, naiven T-Zellen gegen das Alter bei Blutentnahme aufgetragen. Jeder Punkt stellt den Datensatz eines Probanden dar. Die Geraden sind die linearen Anpassungslinien der Untergruppen. Die HC-Gruppe ist grün, die DMARD-Gruppe blau und die TNFi-Gruppe rot eingefärbt (siehe Legende rechts am Bildrand). Zusätzlich ist der Koeffizient R ² und der p-Wert angegeben.....	136
<u>Abb.40:</u> Graphische Darstellung der Regression der CD4-positiven Memory-T-Zellen in Relation zum jeweiligen Alter bei Blutentnahme. In der Abbildung ist die Häufigkeit der CD4-positiven Memory-T-Zellen gegen das Alter bei Blutentnahme aufgetragen. Jeder Punkt stellt den Datensatz eines Probanden dar. Die Geraden sind die linearen Anpassungslinien der Untergruppen. Die HC-Gruppe ist grün, die DMARD-Gruppe blau und die TNFi-Gruppe rot eingefärbt (siehe Legende rechts am Bildrand). Zusätzlich ist der Koeffizient R ² und der p-Wert angegeben.	137
<u>Abb.41:</u> Graphische Darstellung der Regression der CD8-positiven, naiven T-Zellen in Relation zum jeweiligen Alter bei Blutentnahme. In der Abbildung ist die Häufigkeit der CD8-positiven, naiven T-Zellen gegen das Alter bei Blutentnahme aufgetragen. Jeder Punkt stellt den Datensatz eines Probanden dar. Die Geraden sind die linearen Anpassungslinien der Untergruppen. Die HC-Gruppe ist grün, die DMARD-Gruppe blau	

- und die TNFi-Gruppe rot eingefärbt (siehe Legende rechts am Bildrand). Zusätzlich ist der Koeffizient R^2 und der p-Wert angegeben. 139
- Abb.42: Graphische Darstellung der Regression der CD8-positiven Memory-T-Zellen in Relation zum jeweiligen Alter bei Blutentnahme. In der Abbildung ist die Häufigkeit der CD8-positiven Memory-T-Zellen gegen das Alter bei Blutentnahme aufgetragen. Jeder Punkt stellt den Datensatz eines Probanden dar. Die Geraden sind die linearen Anpassungslinien der Untergruppen. Die HC-Gruppe ist grün, die DMARD-Gruppe blau und die TNFi-Gruppe rot eingefärbt (siehe Legende rechts am Bildrand). Zusätzlich ist der Koeffizient R^2 und der p-Wert angegeben. 140
- Abb.43: Graphische Darstellung der Regression der CD4-positiven, CD31-positiven T-Zellen in Relation zum jeweiligen Alter bei Blutentnahme. In der Abbildung ist die Häufigkeit der CD4-positiven, CD31-positiven T-Zellen gegen das Alter bei Blutentnahme aufgetragen. Jeder Punkt stellt den Datensatz eines Probanden dar. Die Geraden sind die linearen Anpassungslinien der Untergruppen. Die HC-Gruppe ist grün, die DMARD-Gruppe blau und die TNFi-Gruppe rot eingefärbt (siehe Legende rechts am Bildrand). Zusätzlich ist der Koeffizient R^2 und der p-Wert angegeben. 142
- Abb.44: Graphische Darstellung der Regression der CD8-positiven, CD31-positiven T-Zellen in Relation zum Alter bei Blutentnahme. In der Abbildung ist die Häufigkeit der CD8-positiven, CD31-positiven T-Zellen gegen das Alter bei Blutentnahme aufgetragen. Jeder Punkt stellt den Datensatz eines Probanden dar. Die Geraden sind die linearen Anpassungslinien der Untergruppen. Die HC-Gruppe ist grün, die DMARD-Gruppe blau und die TNFi-Gruppe rot eingefärbt (siehe Legende rechts am Bildrand). Zusätzlich ist der Koeffizient R^2 und der p-Wert angegeben. 144
- Abb.45: Graphische Darstellung der Regression der TRECs in Relation zum Alter bei Blutentnahme. In der Abbildung ist die Häufigkeit der TRECs je 10.000 PBMCs gegen das Alter bei Blutentnahme aufgetragen. Jeder Punkt stellt den Datensatz eines Probanden dar. Die Geraden sind die linearen Anpassungslinien der Untergruppen. Die HC-Gruppe ist grün, die DMARD-Gruppe blau und die TNFi-Gruppe rot eingefärbt (siehe Legende rechts am Bildrand). Zusätzlich ist der Koeffizient R^2 und der p-Wert angegeben. 145
- Abb.46a-h: Graphische Darstellung der Regression der CD4-positiven Subpopulationen in Relation zur TNFi-Dauer und Krankheitsdauer. Graphisch dargestellt werden die CD4-positiven Subpopulationen gegen die TNFi-Dauer (a,c,e,g) und die Krankheitsdauer (b,d,f,h). Jeder Punkt stellt den Datensatz eines Probanden dar. Die Geraden sind die linearen Anpassungslinien der Untergruppen. Die roten Dreiecke und die rote Gerade beschreiben die Daten der TNFi-Gruppe, die blauen Quadrate und die blaue Gerade die der DMARD-Gruppe. Zusätzlich ist der Koeffizient R^2 und der p-Wert angegeben..... 150
- Abb.47a-h: Graphische Darstellung der Regression der CD8-positiven Subpopulationen in Relation zur TNFi-Dauer und Krankheitsdauer. Graphisch dargestellt werden die CD8-

positiven Subpopulationen gegen die TNFi-Dauer (a,c,e,g) und die Krankheitsdauer (b,d,f,h). Die Geraden sind die linearen Anpassungslinien der Untergruppen. Die roten Dreiecke beschreibt die Daten der TNFi-Gruppe, die blauen Quadrate und die blaue Gerade die der DMARD-Gruppe. 153

Abb.48a-l: Graphische Darstellung der Regression der RTE in Relation zu TNFi-Dauer und zur Krankheitsdauer. Graphisch dargestellt werden die RTE gegen die TNFi-Dauer (a,c,e,g,i,k) und die Krankheitsdauer (b,d,f,h,j,l). Jeder Punkt stellt den Datensatz eines Probanden dar. Die Geraden sind die linearen Anpassungslinien der Untergruppen. Die roten Dreiecke und die rote Gerade beschreiben die Daten der TNFi-Gruppe, die blauen Quadrate und die blaue Gerade die der DMARD-Gruppe. Zusätzlich ist der Koeffizient R^2 und der p-Wert angegeben..... 157

Abb.49: Graphische Darstellung der Regression der TRECs in Relation zur Krankheitsdauer. Graphisch dargestellt ist die TREC-Anzahl pro 10.000 Zellen gegen die Krankheitsdauer. Jeder Punkt stellt den Datensatz eines Probanden dar. Die Geraden sind die linearen Anpassungslinien der Untergruppen. Die roten Dreiecke und die rote Gerade beschreiben die Daten der TNFi-Gruppe, die blauen Quadrate und die blaue Gerade die der DMARD-Gruppe. Zusätzlich ist der Koeffizient R^2 und der p-Wert angegeben..... 158

Abb.50: Graphische Darstellung der Regression der relativen Telomerlänge in Relation zur Krankheitsdauer. Graphisch dargestellt ist die relative Telomerlänge gegen die Krankheitsdauer in Bezug auf eine Einzelgenkopie. Jeder Punkt stellt den Datensatz eines Probanden dar. Die Geraden sind die linearen Anpassungslinien der Untergruppen. Die roten Dreiecke und die rote Gerade beschreiben die Daten der TNFi-Gruppe, die blauen Quadrate und die blaue Gerade die der DMARD-Gruppe. Zusätzlich ist der Koeffizient R^2 und der p-Wert angegeben..... 158

III Tabellenverzeichnis (inkl. Tabellen in Appendix)

<u>Tabelle 1:</u> ILAR Klassifikation der JIA. Zweite Revision, Edmonton 2001, modifiziert nach [3]. .. 3	3
<u>Tabelle 2:</u> JADAS-Score mit Definitionskriterien..... 15	15
<u>Tabelle 3:</u> Auflistung der wichtigsten antirheumatischen Medikamente, modifiziert nach [5] und [56]. 17	17
<u>Tabelle 4:</u> Auflistung der verwendeten Geräte mit Produktname, Chargenbezeichnung (Ch.-B.) und Herstellerangabe. 62	62
<u>Tabelle 5:</u> Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien mit Produktname, Chargenbezeichnung (Ch.-B.) und Herstellerangabe. 64	64
<u>Tabelle 6:</u> Auflistung der verwendeten Chemikalien mit Produktname, Katalognummer und Herstellerangabe. 66	66
<u>Tabelle 7:</u> Auflistung der verwendeten gebrauchsfertigen Kits mit Produktname, Lot-Nummer und Herstellerangabe. 68	68
<u>Tabelle 8:</u> Auflistung der verwendeten Antikörper mit Fluorochrom-Farbe, Herstellerangabe, Lotnummer, Katalognummer und verwendetem Klon. 69	69
<u>Tabelle 9:</u> Auflistung der verwendeten Stimuli mit Katalognummer und Herstellerangabe..... 71	71
<u>Tabelle 10:</u> Färbepanel für die FACS-Analyse..... 79	79
<u>Tabelle 11:</u> Werteverteilung der Altersparameter der JIA-Gesamtkohorte 85	85
<u>Tabelle 12:</u> Messwerte der Laborparameter. 85	85
<u>Tabelle 13:</u> Charakterisierung der JIA-Patientenkohorte. 88	88
<u>Tabelle 14:</u> Verteilung von Alter bei Blutentnahme und Erstdiagnose sowie Krankheitsdauer bei beiden Medikamentengruppen. 89	89
<u>Tabelle 15:</u> Zusammenfassende prozentuale Verteilung der CD4-positiven Subpopulationen am übergeordneten Gate in HC, DMARD und TNFi mit Signifikanzen..... 199	199
<u>Tabelle 16:</u> Zusammenfassende prozentuale Verteilung der CD8-positiven Subpopulationen am übergeordneten Gate in HC, DMARD und TNFi mit Signifikanzen..... 200	200
<u>Tabelle 17:</u> Zusammenfassende prozentuale Verteilung der regulatorischen T-Zellen am übergeordneten Gate in HC, DMARD und TNFi mit Signifikanzen..... 201	201
<u>Tabelle 18:</u> Zusammenfassende prozentuale Verteilung der Häufigkeiten der rezenten Thymusemigranten und Chemokine am übergeordneten Gate in den unterschiedlichen Gruppen mit Signifikanzen. 202	202
<u>Tabelle 19:</u> Zusammenfassende prozentuale Verteilung der Häufigkeiten der TCR $\alpha\beta$ -positiven T-Zellen am übergeordneten Gate in den unterschiedlichen Gruppen mit Signifikanzen. 203	203
<u>Tabelle 20:</u> Zusammenfassende prozentuale Verteilung der Häufigkeiten der TCR $\gamma\delta$ -positiven T-Zellen am übergeordneten Gate in den unterschiedlichen Gruppen mit Signifikanzen. 204	204

<u>Tabelle 21:</u> Zusammenfassende prozentuale Verteilung der Häufigkeiten der Zytokine der CD4-positiven T-Zellen am übergeordneten Gate in den unterschiedlichen Gruppen mit Signifikanzen.	205
<u>Tabelle 22:</u> Zusammenfassende prozentuale Verteilung der Häufigkeiten der Zytokine der CD8-positiven T-Zellen am übergeordneten Gate in den unterschiedlichen Gruppen mit Signifikanzen.	208
<u>Tabelle 23:</u> Zusammenfassende prozentuale Verteilung der Häufigkeiten der Zytokine der regulatorischen T-Zellen am übergeordneten Gate in den unterschiedlichen Gruppen mit Signifikanzen.	211
<u>Tabelle 24:</u> Zusammenfassende prozentuale Verteilung der Häufigkeiten der Zytokine der RTE und der Chemokin-Rezeptor-positiven T-Zellen am übergeordneten Gate in den unterschiedlichen Gruppen mit Signifikanzen.	212
<u>Tabelle 25:</u> Zusammenfassende prozentuale Verteilung der Häufigkeiten der Zytokine der TCR-positiven T-Zellen am übergeordneten Gate in den 3 Gruppen mit Signifikanzen.	215
<u>Tabelle 26:</u> Zusammenfassende prozentuale Verteilung der Häufigkeiten der Proliferation der T-Zellen am übergeordneten Gate in den 3 Gruppen mit Signifikanzen.	216
<u>Tabelle 27:</u> Zusammenfassende Werteverteilung von IL-7, TREC und RTL in den 3 Gruppen mit Signifikanzen. *	217

III.1. Zusammenfassende Tabellen (Tabellen 15-27)

Auf den folgenden Seiten werden die Häufigkeiten der zellulären und Zytokin-Verteilung aufgeführt. Es wird der Mittelwert (Mean), die Standardabweichung (SD), der Median, der minimale (Min) und der maximale Wert (Max) sowie die Interquartilenrange (Perzentilen P25, P75) bei den Gesunden (HC, n=17), den JIA-Patienten der DMARD-Gruppe (DMARD, n=22) und den JIA-Patienten der TNFi-Gruppe (TNFi, n=12) angegeben. Weiterhin werden die Signifikanzniveaus zwischen den unterschiedlichen Gruppen aufgezeigt. **p1**: Signifikanz zwischen HC und den Patienten mit DMARD, **p2**: Signifikanz zwischen HC und den Patienten mit TNF α -Inhibitor, **p3**: Signifikanz zwischen der Patienten-Gruppe mit DMARD und mit TNF α -Inhibitor.

Tabelle 15: Zusammenfassende prozentuale Verteilung der CD4-positiven Subpopulationen am übergeordneten Gate in HC, DMARD und TNFi mit Signifikanzen.

Zell-typ	HC							DMARD							TNFi							Signifikanzen		
	Mean	SD	Me-dian	Min	Max	P25	P75	Mean	SD	Me-dian	Min	Max	P25	P75	Mean	SD	Me-dian	Min	Max	P25	P75	p1	p2	p3
CD4	50,4	8,7	53,5	30,3	60,3	43,8	57,6	57,6	7,8	57,5	44,0	70,1	50,3	63,6	52,4	9,8	52,2	32,6	67,5	46,5	58,2	0,024	0,811	0,123
CD4 Naiv	55,7	11,3	53,0	36,5	78,4	48,2	64,0	59,2	12,2	59,6	23,5	80,9	53,2	67,4	52,4	17,8	51,1	27,8	85,2	41,1	60,3	0,243	0,444	0,074
CD4 Naiv CCR7+	10,3	10,7	5,4	0,4	33,6	1,1	17,3	20,4	14,5	24,2	1,2	40,9	4,2	32,0	26,2	15,5	21,6	2,7	56,3	15,8	40,9	0,025	0,004	0,488
CD4 Memory	38,0	12,3	36,3	15,5	61,0	28,1	49,3	36,4	12,6	34,9	15,2	74,1	29,3	43,2	42,9	16,8	43,3	12,5	62,2	32,5	58,1	0,566	0,325	0,127
CD4 zentrale Memory	3,9	3,3	3,3	0,3	11,4	1,2	6,1	6,7	6,2	3,4	0,8	21,5	2,3	11,0	6,5	2,4	6,4	2,4	9,8	4,3	9,1	0,190	0,024	0,309
CD4 Effektor Memory	34,1	10,9	33,3	13,1	57,5	24,3	42,8	29,7	12,4	28,1	12,1	72,6	22,1	31,9	36,4	15,9	35,7	10,1	58,3	24,0	49,3	0,081	0,444	0,068
CD4 Effektor	2,8	2,2	2,2	0,3	7,8	1,3	3,7	1,9	1,7	1,6	0,3	6,2	0,5	2,9	2,4	2,2	2,1	0,2	7,4	0,5	2,9	0,181	0,527	0,736
CD4 <i>Early</i> Effektor	0,2	0,2	0,1	0,0	0,7	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,0	0,5	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,0	0,5	0,0	0,3	0,769	0,499	0,657
CD4 <i>Late</i> Effektor	2,6	2,0	2,1	0,3	7,1	1,3	3,7	1,8	1,6	1,4	0,1	6,0	0,5	2,7	2,2	2,1	1,7	0,1	7,0	0,4	2,7	0,138	0,394	0,763
CD4 TEMRA	3,5	4,3	2,5	0,5	17,1	1,0	3,7	2,5	2,4	1,6	0,2	8,2	0,7	4,2	2,3	1,6	2,0	0,2	5,4	1,0	3,3	0,528	0,845	0,790
CD4 TEMRA CCR7-	3,3	4,2	2,3	0,4	16,3	0,7	3,6	2,1	2,1	1,1	0,1	7,5	0,5	3,5	1,8	1,2	1,5	0,2	4,0	0,7	2,5	0,347	0,444	0,845

Tabelle 16: Zusammenfassende prozentuale Verteilung der CD8-positiven Subpopulationen am übergeordneten Gate in HC, DMARD und TNFi mit Signifikanzen.

Zell- typ	HC							DMARD							TNFi							Signifikanzen		
	Mean	SD	Me- dian	Min	Max	P25	P75	Mean	SD	Me- dian	Min	Max	P25	P75	Mean	SD	Me- dian	Min	Max	P25	P75	p1	p2	p3
CD8	14,8	4,7	14,1	7,0	25,0	11,4	17,9	11,7	3,7	12,7	5,3	19,8	8,9	14,4	12,9	4,1	13,4	5,5	18,2	10,5	16,6	0,051	0,527	0,234
CD8 Naiv	47,2	15,0	47,9	23,4	68,1	33,9	61,0	62,5	10,9	62,8	31,7	77,8	56,3	71,2	51,5	15,6	52,7	29,4	83,1	37,9	59,8	0,002	0,679	0,018
CD8 Naiv CCR7+	11,0	10,1	7,9	2,6	39,5	4,2	15,5	23,9	14,6	27,5	5,2	45,7	8,2	36,5	26,7	14,7	26,8	5,9	53,9	13,2	38,5	0,003	0,001	0,606
CD8 Memory	15,4	5,3	14,4	7,2	24,2	11,3	20,0	16,1	5,9	16,3	4,8	27,8	11,3	20,6	23,9	10,8	24,4	5,3	43,9	15,9	32,2	0,812	0,014	0,018
CD8 zentrale Memory	2,3	1,5	2,2	0,5	5,4	0,9	3,4	2,9	2,3	2,5	0,4	10,0	1,1	4,7	4,2	3,3	3,5	1,0	12,3	1,9	5,1	0,604	0,066	0,231
CD8 Effektor Memory	13,1	5,3	12,9	4,3	23,0	9,9	16,5	13,2	5,1	12,8	4,3	23,0	9,1	17,4	19,8	8,7	21,3	3,6	31,7	13,1	26,2	0,989	0,027	0,021
CD8 Effektor	12,6	8,9	10,2	3,8	32,6	6,0	15,4	6,8	3,3	6,3	2,0	12,7	4,5	10,0	9,8	5,2	10,1	1,6	19,6	5,9	13,3	0,017	0,711	0,087
CD8 <i>Early</i> Effektor	1,1	0,9	1,1	0,1	3,4	0,2	1,5	0,9	0,8	0,5	0,1	2,4	0,2	1,5	0,9	1,2	0,5	0,1	4,5	0,4	0,9	0,604	0,527	0,657
CD8 <i>Late</i> Effektor	11,6	8,7	9,6	3,1	32,5	5,8	12,8	5,9	3,0	5,7	1,7	11,3	3,8	8,5	8,8	4,6	9,0	1,0	15,0	5,4	12,8	0,014	0,845	0,058
CD8 TEMRA	24,7	11,0	21,3	7,1	41,7	16,6	36,3	14,6	6,9	13,9	4,8	28,7	9,2	19,7	14,8	9,2	14,8	4,8	35,7	7,0	18,0	0,002	0,008	0,817
CD8 TEMRA CCR7-	23,0	10,7	19,9	5,4	40,6	16,0	34,6	12,4	6,6	10,8	2,5	28,1	7,6	17,1	12,5	9,2	12,4	3,1	34,7	5,0	15,8	0,001	0,003	0,631

Tabelle 17: Zusammenfassende prozentuale Verteilung der regulatorischen T-Zellen am übergeordneten Gate in HC, DMARD und TNFi mit Signifikanzen.

Zell-typ	HC							DMARD							TNFi							Signifikanzen		
	Mean	SD	Me-dian	Min	Max	P25	P75	Mean	SD	Me-dian	Min	Max	P25	P75	Mean	SD	Me-dian	Min	Max	P25	P75	p1	p2	p3
CD4 FoxP3+	1.4	0.9	1.2	0.3	3.2	0,7	2,0	0.5	0.2	0.5	0.1	1.0	0,3	0,6	1,0	0,7	0,9	0,2	2,4	0,4	1,2	0.000	0,166	0,014
CD4 CCR6+ FoxP3+	0.3	0.3	0.2	0.0	1.1	0,1	0,4	0.1	0.1	0.1	0.0	0.5	0,1	0,2	0,3	0,2	0,2	0,0	0,7	0,1	0,4	0.045	0,913	0,092
CD4 Tregs	0.1	0.1	0.1	0.0	0.3	0,0	0,1	0.1	0.1	0.0	0.0	0.2	0,0	0,1	0,1	0,1	0,0	0,2	0,0	0,1	0.165	0,616	0,503	
CD4 Tregs CCR6+	28.6	30.1	28.6	0.0	100.0	0,0	53,1	19.5	26.3	2.7	0.0	100.0	0,0	36,4	10,8	11,7	8,4	0,0	28,6	0,0	21,7	0.386	0,140	0,572
CD8 FoxP3+	0.2	0.2	0.2	0.0	0.6	0,1	0,3	0.2	0.2	0.2	0.0	0.7	0,1	0,2	0,3	0,1	0,3	0,0	0,5	0,1	0,4	0.871	0,152	0,092
CD8 CCR6+ FoxP3+	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0,0	0,0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,1	0.829	0,499	0,595
CD8 Tregs	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0,0	0,0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0.812	1,000	0,836
CD8 Tregs CCR6+	2.9	12.1	0.0	0.0	50.0	0,0	0,0	1.4	6.9	0.0	0.0	33.3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0.935	0,811	0,851

Tabelle 18: Zusammenfassende prozentuale Verteilung der Häufigkeiten der rezenten Thymusemigranten und Chemokine am übergeordneten Gate in den unterschiedlichen Gruppen mit Signifikanzen.

Zell- typ	HC							DMARD							TNFi							Signifikanzen		
	Mean	SD	Me- dian	Min	Max	P25	P75	Mean	SD	Me- dian	Min	Max	P25	P75	Mean	SD	Me- dian	Min	Max	P25	P75	p1	p2	p3
CD4 CD31+	44,1	10,1	46,8	25,4	59,4	36,3	50,1	50,6	10,3	51,9	30,2	66,4	43,1	59,4	37,5	11,5	37,9	20,5	51,5	25,5	48,4	0,045	0,107	0,003
CD4 CD127+	53,2	7,7	53,1	41,5	69,8	48,0	58,1	65,1	8,9	65,7	41,2	81,4	60,5	69,9	69,3	7,5	70,2	54,9	80,0	63,2	76,3	0,000	0,000	0,191
CD4 CD31+ CD127+	25,9	7,0	25,9	12,6	39,8	21,5	30,9	34,9	9,6	35,5	18,1	57,3	28,5	41,1	27,4	9,6	26,6	12,5	42,5	19,8	36,9	0,004	0,837	0,048
CD4 CCR6+	8,2	3,2	7,9	3,4	16,4	5,9	10,4	7,2	3,5	6,4	2,4	16,5	4,5	8,4	13,5	8,5	12,7	2,5	35,2	7,2	17,7	0,211	0,043	0,007
CD4 CXCR3+	0,8	0,4	0,8	0,3	1,5	0,5	1,2	0,5	0,3	0,5	0,1	1,3	0,3	0,6	0,8	0,7	0,9	0,1	2,2	0,2	1,2	0,017	0,777	0,294
CD4 CXCR3+ CCR6+	0,1	0,1	0,1	0,0	0,2	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,0	0,2	0,0	0,1	0,3	0,2	0,3	0,0	0,6	0,0	0,5	0,051	0,059	0,006
CD8 CD31+	68,8	12,1	67,7	51,4	89,0	58,8	80,8	80,2	7,2	82,7	67,3	93,0	74,4	84,1	72,2	8,4	72,2	58,1	87,7	66,6	79,0	0,002	0,419	0,006
CD8 CD127+	54,9	12,7	54,5	35,5	84,1	43,6	65,1	69,5	10,0	72,9	46,3	85,0	64,7	76,3	70,2	7,7	69,7	57,1	82,6	66,2	76,3	0,000	0,001	0,986
CD8 CD31+ CD127+	44,4	12,8	43,9	25,6	70,2	32,4	53,7	59,4	11,4	60,9	29,3	77,9	51,8	67,7	55,0	9,3	55,5	37,7	68,4	47,4	62,4	0,001	0,037	0,157
CD8 CCR6+	2,3	1,4	1,9	0,7	5,5	1,2	3,0	2,8	1,5	2,6	0,4	6,3	1,7	3,8	5,2	2,9	4,5	1,4	11,6	3,2	7,2	0,232	0,001	0,007
CD8 CXCR3+	0,2	0,2	0,1	0,0	0,9	0,1	0,3	0,1	0,1	0,1	0,0	0,4	0,0	0,2	0,2	0,1	0,1	0,0	0,4	0,1	0,2	0,126	0,744	0,278
CD8 CXCR3+ CCR6+	0,1	0,2	0,0	0,0	0,9	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,481	0,370	0,771

Tabelle 19: Zusammenfassende prozentuale Verteilung der Häufigkeiten der TCRαβ-positiven T-Zellen am übergeordneten Gate in den unterschiedlichen Gruppen mit Signifikanzen.

Zell- typ	HC							DMARD							TNFi							Signifikanzen		
	Mean	SD	Me- dian	Min	Max	P25	P75	Mean	SD	Me- dian	Min	Max	P25	P75	Mean	SD	Me- dian	Min	Max	P25	P75	p1	p2	p3
CD4 TCRαβ+	80,0	7,0	77,4	71,1	92,5	75,3	87,9	86,7	6,3	88,6	70,0	94,6	85,8	89,9	90,6	6,8	91,9	73,4	97,2	88,6	95,4	0,007	0,000	0,018
CD127+ in CD4 TCRαβ+	55,0	9,3	55,2	41,3	75,2	48,1	60,1	65,8	10,3	67,4	32,3	82,9	61,8	71,1	69,9	7,9	71,5	56,1	80,5	62,0	76,9	0,000	0,000	0,231
CD4 CD31+ TCRαβ+	37,0	8,9	39,4	18,9	49,3	28,1	43,6	46,2	10,6	47,1	23,1	64,5	39,5	53,4	36,3	10,9	36,0	21,2	50,5	25,4	46,5	0,008	0,945	0,017
CD127+ in CD4 CD31+ TCRαβ+	58,4	9,4	57,6	44,8	82,6	51,6	63,9	68,9	11,5	71,2	33,5	88,2	63,3	75,4	72,9	9,5	74,2	57,3	86,6	65,7	79,0	0,001	0,001	0,276
CD8 TCRαβ+	79,1	8,6	78,7	63,8	91,4	70,8	87,2	86,9	6,6	88,6	71,0	97,1	82,2	92,2	89,2	6,3	90,7	69,8	94,5	89,8	91,5	0,004	0,001	0,292
CD127+ in CD8 TCRαβ+	55,7	12,1	55,7	37,7	84,1	44,6	65,1	70,2	12,6	73,5	41,5	86,7	66,6	78,5	71,3	9,1	70,9	53,9	83,9	67,5	78,0	0,001	0,001	0,817
CD8 CD31+ TCRαβ+	60,4	12,6	59,5	35,2	76,8	50,7	73,6	72,3	10,1	73,3	47,2	91,7	66,3	78,9	66,8	9,3	67,7	46,5	81,8	64,6	72,8	0,003	0,260	0,094
CD127+ in CD8 CD31+ TCRαβ+	59,6	11,4	58,5	41,5	87,5	51,1	67,6	71,9	13,4	75,5	36,1	86,7	67,9	81,0	74,1	8,1	75,7	58,4	83,9	67,4	81,6	0,003	0,001	0,929

Tabelle 20: Zusammenfassende prozentuale Verteilung der Häufigkeiten der TCR $\gamma\delta$ -positiven T-Zellen am übergeordneten Gate in den unterschiedlichen Gruppen mit Signifikanzen.

Zell- typ	HC							DMARD							TNFi							Signifikanzen		
	Mean	SD	Me- dian	Min	Max	P25	P75	Mean	SD	Me- dian	Min	Max	P25	P75	Mean	SD	Me- dian	Min	Max	P25	P75	p1	p2	p3
CD4 TCR$\gamma\delta$+	0,5	0,3	0,3	0,1	1,3	0,2	0,7	0,8	1,3	0,3	0,1	5,8	0,2	0,9	0,8	0,7	0,7	0,1	2,5	0,3	1,1	0,867	0,183	0,327
CD127+ in CD4 TCR $\gamma\delta$ +	61,7	15, 1	64,0	33,3	94,1	53,5	72,2	69,2	22, 4	72,4	0,0	100, 0	59,6	84,1	71,1	16, 2	72,3	26,3	91,6	67,2	80,7	0,112	0,053	0,763
CD4 CD31+ TCR$\gamma\delta$+	0,1	0,1	0,1	0,0	0,3	0,0	0,1	0,4	0,7	0,2	0,0	3,1	0,1	0,4	0,3	0,3	0,2	0,0	1,2	0,0	0,4	0,033	0,059	0,929
CD127+ in CD4 CD31+ TCR $\gamma\delta$ +	49,5	27, 1	50,0	0,0	83,4	33,3	70,0	68,2	26, 7	72,9	0,0	100, 0	59,2	81,7	65,4	32, 9	75,5	0,0	100, 0	55,1	87,2	0,033	0,053	0,736
CD8 TCR$\gamma\delta$+	0,8	0,9	0,5	0,0	3,6	0,4	0,7	1,1	1,3	0,9	0,0	6,0	0,3	1,3	1,3	1,0	1,1	0,0	3,4	0,4	2,1	0,319	0,126	0,423
CD127+ in CD8 TCR $\gamma\delta$ +	69,9	28, 1	71,8	0,0	100, 0	58,8	100,0	66,4	30, 5	76,2	0,0	100, 0	48,8	89,9	64,0	30, 3	80,4	0,0	94,1	36,1	88,1	0,867	0,755	0,901
CD8 CD31+ TCR$\gamma\delta$+	0,5	0,6	0,4	0,0	2,5	0,3	0,6	0,7	1,2	0,5	0,0	5,5	0,1	0,8	0,8	0,6	0,7	0,0	1,9	0,3	1,3	0,819	0,167	0,217
CD127+ in CD8 CD31+ TCR $\gamma\delta$ +	75,0	28, 6	81,8	0,0	100, 0	68,2	100,0	69,2	36, 4	79,8	0,0	100, 0	59,4	100,0	67,7	32, 3	81,2	0,0	100, 0	44,5	97,2	0,915	0,614	0,790

Tabelle 21: Zusammenfassende prozentuale Verteilung der Häufigkeiten der Zytokine der CD4-positiven T-Zellen am übergeordneten Gate in den unterschiedlichen Gruppen mit Signifikanzen.

Zyto- kine	HC							DMARD							TNFi							Signifikanzen		
	Mean	SD	Me- dian	Min	Max	P25	P75	Mean	SD	Me- dian	Min	Max	P25	P75	Mean	SD	Me- dian	Min	Max	P25	P75	p1	p2	p3
IFNγ+ in CD4 Naiv	0,7	0,7	0,6	0,1	3,4	0,4	0,8	0,3	0,2	0,2	0,0	0,9	0,1	0,3	0,4	0,2	0,4	0,1	0,7	0,2	0,6	0,000	0,043	0,087
IL17+ in CD4 Naiv	0,1	0,1	0,1	0,0	0,4	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,0	0,4	0,0	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,8	0,1	0,3	0,279	0,245	0,028
IFN γ +/ IL17+ in CD4 Naiv	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	1,000	0,711	0,709
IFNγ+ in CD4 Naiv CCR7+	0,2	0,2	0,1	0,0	0,5	0,0	0,3	0,1	0,1	0,0	0,0	0,3	0,0	0,1	0,2	0,1	0,1	0,0	0,4	0,1	0,2	0,117	0,556	0,010
IL17+ in CD4 Naiv CCR7+	0,2	0,3	0,1	0,0	0,9	0,0	0,4	0,1	0,2	0,1	0,0	0,5	0,0	0,1	0,2	0,1	0,2	0,0	0,4	0,1	0,3	0,305	0,471	0,037
IFN γ +/ IL17+ in CD4 Naiv CCR7+	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,3	0,0	0,0	1,000	0,711	0,709
IFNγ+ in CD4 Memory	11,8	4,8	11,4	2,8	21,1	9,0	14,4	8,1	5,2	8,3	0,7	18,2	4,2	10,4	7,6	5,9	5,7	0,7	21,2	3,6	11,9	0,021	0,030	0,709
IL17+ in CD4 Memory	1,2	0,5	1,0	0,4	2,3	0,7	1,7	0,6	0,3	0,6	0,1	1,0	0,4	0,8	1,2	1,3	0,8	0,2	4,8	0,6	1,4	0,001	0,263	0,127
IFN γ +/ IL17+ in CD4 Memory	0,2	0,2	0,1	0,0	0,5	0,0	0,3	0,1	0,1	0,1	0,0	0,2	0,0	0,1	0,2	0,3	0,0	0,0	1,0	0,0	0,3	0,063	0,419	0,873
IFNγ+ in CD4 Zentral Memory	1,2	1,4	0,4	0,0	4,9	0,3	2,1	0,7	0,7	0,5	0,0	2,7	0,2	1,2	1,5	1,8	0,7	0,0	5,4	0,5	2,6	0,566	0,394	0,231

Zyto- kine	HC							DMARD							TNFi							Signifikanzen		
	Mean	SD	Me- dian	Min	Max	P25	P75	Mean	SD	Me- dian	Min	Max	P25	P75	Mean	SD	Me- dian	Min	Max	P25	P75	p1	p2	p3
IL17+ in CD4 Zentral Memory	0,4	0,4	0,2	0,0	1,2	0,0	0,9	0,2	0,2	0,1	0,0	0,8	0,0	0,2	0,5	0,4	0,4	0,2	1,8	0,2	0,7	0,181	0,180	0,001
IFN γ +/ IL17+ in CD4 Zentral Memory	0,0	0,1	0,0	0,0	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,769	0,948	0,709
IFNγ+ in CD4 Effektor	21,5	11, 2	21,7	6,6	41,7	10,8	32,3	17,0	10, 3	15,3	2,5	37,7	9,5	22,7	16,0	13, 0	17,3	0,0	36,0	1,2	28,9	0,243	0,283	0,901
IL17+ in CD4 Effektor	1,2	1,1	1,1	0,0	4,0	0,4	1,4	0,8	0,8	0,6	0,0	2,9	0,4	1,2	1,7	2,1	0,9	0,0	6,2	0,0	2,9	0,200	0,983	0,736
IFN γ +/ IL17+ in CD4 Effektor	0,3	0,5	0,1	0,0	2,0	0,0	0,4	0,1	0,1	0,0	0,0	0,4	0,0	0,1	0,3	0,7	0,0	0,0	2,2	0,0	0,3	0,117	0,283	0,873
IFNγ+ in CD4 Early Effektor	0,7	3,0	0,0	0,0	12,5	0,0	0,0	0,6	1,7	0,0	0,0	7,1	0,0	0,0	2,9	5,7	0,0	0,0	16,7	0,0	4,6	0,566	0,419	0,631
IL17+ in CD4 Early Effektor	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,8	0,0	0,0	3,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,475	1,000	0,534
IFN γ +/ IL17+ in CD4 Early Eff	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,000	1,000	1,000
IFNγ+ in CD4 Late Effektor	23,2	11, 6	25,5	6,9	44,8	12,2	33,4	20,1	11, 6	16,4	2,6	47,5	12,9	30,0	17,5	13, 7	18,3	0,0	38,3	1,4	30,3	0,624	0,303	0,683
IL17+ in CD4 Late Effektor	1,2	0,9	1,2	0,0	3,3	0,4	1,6	0,9	0,9	0,7	0,0	3,2	0,4	1,2	2,0	2,4	1,3	0,0	7,1	0,0	3,3	0,243	0,777	0,657

	HC							DMARD							TNFi							Signifikanzen		
Zyto- kine	Mean	SD	Me- dian	Min	Max	P25	P75	Mean	SD	Me- dian	Min	Max	P25	P75	Mean	SD	Me- dian	Min	Max	P25	P75	p1	p2	p3
IFN γ +/ IL17+ in CD4 Late Effector	0,4	0,6	0,2	0,0	2,2	0,0	0,5	0,1	0,1	0,0	0,0	0,4	0,0	0,1	0,5	0,8	0,0	0,0	2,4	0,0	1,2	0,045	0,616	0,582
IFNγ+ in CD4 TEMRA	4,7	4,7	3,4	0,8	20,0	2,2	5,9	2,3	2,2	1,7	0,0	7,4	0,5	4,1	6,3	8,4	3,7	0,0	29,2	0,6	10,7	0,027	0,811	0,217
IL7+ in CD4 TEMRA	0,2	0,4	0,0	0,0	1,1	0,0	0,3	0,5	1,2	0,0	0,0	4,0	0,0	0,2	0,3	0,4	0,1	0,0	0,9	0,0	0,7	0,790	0,679	0,683
IFN γ +/ IL17+ in CD4 TEMRA	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,644	1,000	0,683
IFNγ+ in CD4 TEMRA CCR7-	5,3	5,2	3,8	0,8	21,9	2,3	6,5	3,1	3,2	2,0	0,0	10,5	0,6	6,1	8,0	9,2	4,9	0,0	29,7	0,8	14,5	0,063	0,913	0,179
IL17+ in CD4 TEMRA CCR7-	0,3	0,5	0,0	0,0	1,5	0,0	0,3	0,2	0,8	0,0	0,0	3,6	0,0	0,1	0,1	0,2	0,0	0,0	0,5	0,0	0,2	0,377	0,471	0,958
IFN γ +/ IL17+ in CD4 TEMRA CCR7-	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,812	1,000	0,845

Tabelle 22: Zusammenfassende prozentuale Verteilung der Häufigkeiten der Zytokine der CD8-positiven T-Zellen am übergeordneten Gate in den unterschiedlichen Gruppen mit Signifikanzen.

Zyto- kine	HC							DMARD							TNFi							Signifikanzen		
	Mean	SD	Me- dian	Min	Max	P25	P75	Mean	SD	Me- dian	Min	Max	P25	P75	Mean	SD	Me- dian	Min	Max	P25	P75	p1	p2	p3
IFN γ + in CD8 Naiv	10,6	7,2	10,6	1,1	24,4	4,2	14,5	4,3	3,8	3,3	0,1	14,5	1,8	6,0	5,6	4,4	5,1	0,4	13,0	c	9,7	0,003	0,043	0,511
IL17+ in CD8 Naiv	0,1	0,1	0,1	0,0	0,5	0,0	0,2	0,1	0,1	0,1	0,0	0,4	0,0	0,1	0,3	0,4	0,2	0,0	1,5	0,1	0,3	0,475	0,140	0,021
IFN γ +/ IL17+ in CD8 Naiv	0,0	0,1	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,5	0,0	0,1	0,705	0,527	0,327
IFN γ + in CD8 Naiv CCR7+	1,2	1,2	0,9	0,0	4,5	0,1	1,8	0,4	0,4	0,3	0,0	1,5	0,0	0,5	1,0	0,8	0,9	0,0	2,7	0,4	1,6	0,020	0,983	0,009
IL17 γ + in CD8 Naiv CCR7+	0,2	0,2	0,1	0,0	0,5	0,0	0,3	0,1	0,1	0,1	0,0	0,4	0,0	0,2	0,4	0,5	0,3	0,0	1,4	0,0	0,3	0,528	0,283	0,080
IFN+/ IL17+ in CD8 Naiv CCR7+	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,000	1,000	1,000
IFN γ + in CD8 Memory	41,0	18, 4	41,8	9,7	73,6	26,7	57,0	33,8	16, 5	32,3	6,3	68,5	24,1	41,5	32,1	21, 5	32,2	0,9	62,0	11,7	53,6	0,221	0,283	0,790
IL17+ in CD8 Memory	0,5	0,5	0,3	0,0	1,8	0,1	0,7	0,3	0,3	0,2	0,0	1,1	0,0	0,4	0,8	0,7	0,4	0,0	2,2	0,2	1,4	0,279	0,263	0,023
IFN γ +/ IL17+ in CD8 Memory	0,2	0,2	0,1	0,0	0,9	0,0	0,4	0,1	0,1	0,1	0,0	0,3	0,0	0,2	0,2	0,2	0,2	0,0	0,5	0,0	0,2	0,117	0,647	0,261
IFN γ + in CD8 Zentral Memory	7,0	9,2	1,5	0,0	30,6	0,6	12,5	5,0	6,2	2,0	0,0	24,1	1,0	7,4	8,8	7,5	9,3	0,0	23,1	2,0	14,1	0,922	0,325	0,127

Zyto- kine	HC							DMARD							TNFi							Signifikanzen		
	Mean	SD	Me- dian	Min	Max	P25	P75	Mean	SD	Me- dian	Min	Max	P25	P75	Mean	SD	Me- dian	Min	Max	P25	P75	p1	p2	p3
IL17+ in CD8 Zentral Memory	0,1	0,3	0,0	0,0	1,1	0,0	0,0	0,1	0,3	0,0	0,0	0,9	0,0	0,0	2,2	4,6	0,0	0,0	12,5	0,0	1,2	0,747	0,152	0,245
IFNy+/ IL17+ in CD8 Zentral Memory	0,0	0,1	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,3	0,0	0,0	0,769	0,948	0,709
IFNy+ in CD8 Effektor	44,9	20, 1	44,8	16,2	88,1	25,6	58,5	34,3	21, 6	29,2	1,8	79,6	15,4	51,1	33,0	26, 1	26,6	0,0	71,2	7,2	59,9	0,124	0,303	0,790
IL17+ in CD8 Effektor	0,2	0,3	0,1	0,0	1,1	0,0	0,3	0,2	0,2	0,0	0,0	0,7	0,0	0,3	0,3	0,5	0,1	0,0	1,6	0,0	0,7	0,624	0,913	0,557
IFNy+/ IL17+ in CD8 Effektor	0,1	0,2	0,0	0,0	0,5	0,0	0,1	0,1	0,2	0,0	0,0	0,7	0,0	0,0	0,2	0,3	0,0	0,0	0,8	0,0	0,2	0,475	0,879	0,466
IFNy+ in CD8 Early Effektor	6,7	8,7	2,9	0,0	28,6	0,2	14,3	5,9	10, 4	0,8	0,0	40,9	0,0	7,3	7,3	14, 2	0,0	0,0	47,4	0,0	14,1	0,333	0,211	0,683
IL17+ in CD8 Early Effektor	0,7	1,8	0,0	0,0	7,1	0,0	0,2	0,1	0,3	0,0	0,0	1,2	0,0	0,0	0,6	1,6	0,0	0,0	5,3	0,0	0,0	0,305	0,811	0,557
IFNy+/ IL17+ in CD8 Early Eff	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,000	1,000	1,000
IFNy+ in CD8 Late Effektor	48,5	19, 2	49,1	16,4	88,1	31,6	64,1	39,2	21, 5	39,2	1,8	81,0	21,8	55,1	35,1	27, 1	31,1	0,0	73,8	8,4	62,2	0,200	0,211	0,657
IL7+ in CD8 Late Effektor	0,1	0,3	0,0	0,0	1,0	0,0	0,2	0,2	0,3	0,0	0,0	0,8	0,0	0,4	0,5	0,8	0,2	0,0	2,2	0,0	1,0	0,585	0,303	0,466

Zyto- kine	HC							DMARD							TNFi							Signifikanzen		
	Mean	SD	Me- dian	Min	Max	P25	P75	Mean	SD	Me- dian	Min	Max	P25	P75	Mean	SD	Me- dian	Min	Max	P25	P75	p1	p2	p3
IFNy+/ IL17+ in CD8 Late Effector	0,1	0,1	0,0	0,0	0,5	0,0	0,1	0,1	0,2	0,0	0,0	0,8	0,0	0,0	0,2	0,4	0,0	0,0	1,1	0,0	0,2	0,547	0,811	0,488
IFNy+ in CD 8 TEMRA	38,8	22, 7	36,8	3,6	79,2	19,7	62,4	19,5	15, 1	18,5	0,4	55,8	5,9	33,9	20,6	18, 2	16,8	0,7	51,9	5,2	38,7	0,006	0,034	1,000
IL17+ in CD 8 TEMRA	0,2	0,2	0,1	0,0	0,7	0,0	0,3	0,1	0,2	0,0	0,0	0,9	0,0	0,2	0,1	0,1	0,0	0,0	0,3	0,0	0,2	0,163	0,107	0,736
IFNy+/ IL17+ in CD 8 TEMRA	0,1	0,1	0,1	0,0	0,4	0,0	0,2	0,0	0,1	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,012	0,003	0,534
IFNy+ in CD 8 TEMRA CCR7-	41,1	23, 2	39,6	3,4	82,2	21,7	65,0	23,1	16, 7	21,8	0,5	55,9	6,9	39,9	25,5	22, 4	19,0	0,6	61,1	6,3	51,3	0,018	0,059	0,929
IL17+ in CD 8 TEMRA CCR7-	0,2	0,2	0,1	0,0	0,7	0,0	0,2	0,1	0,2	0,0	0,0	0,6	0,0	0,1	0,1	0,2	0,0	0,0	0,5	0,0	0,2	0,077	0,073	0,683
IFNy+/ IL17+ in CD 8 TEMRA CCR7-	0,1	0,1	0,1	0,0	0,4	0,0	0,2	0,0	0,1	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,010	0,016	0,958

Tabelle 23: Zusammenfassende prozentuale Verteilung der Häufigkeiten der Zytokine der regulatorischen T-Zellen am übergeordneten Gate in den unterschiedlichen Gruppen mit Signifikanzen.

Zyto- kine	HC							DMARD							TNFi							Signifikanzen		
	Mean	SD	Me- dian	Min	Max	P25	P75	Mean	SD	Me- dian	Min	Max	P25	P75	Mean	SD	Me- dian	Min	Max	P25	P75	p1	p2	p3
IL10+ in CD4	0,2	0,2	0,2	0,0	0,7	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,0	1,2	0,1	0,3	0,2	0,1	0,2	0,0	0,4	0,1	0,3	0,481	0,679	0,851
IL10+ in CD4 FoxP3+	0,0	0,1	0,0	0,0	0,3	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,2	0,1	0,2	0,0	0,4	0,1	0,2	0,401	0,527	0,986
IL10+ in CD4 Tregs	3,9	6,1	0,0	0,0	16,7	0,0	9,1	5,6	12,4	0,0	0,0	50,0	0,0	5,3	1,0	2,5	0,0	0,0	8,3	0,0	0,0	0,829	0,325	0,440
IL10+/ CCR6+ in CD4 Tregs	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,1	12,5	0,0	0,0	50,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,790	1,000	0,790
IL10+ in CD8	0,6	0,6	0,2	0,0	2,3	0,1	0,8	0,3	0,4	0,2	0,0	1,9	0,1	0,3	0,5	0,4	0,3	0,0	1,6	0,2	0,7	0,371	0,845	0,195
IL10+ in CD8 FoxP3+	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,829	0,711	0,851
IL10+ in CD8 Tregs	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,000	1,000	1,000
IL10+/ CCR6+ in CD8 Tregs	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,000	1,000	1,000

Tabelle 24: Zusammenfassende prozentuale Verteilung der Häufigkeiten der Zytokine der RTE und der Chemokin-Rezeptor-positiven T-Zellen am übergeordneten Gate in den unterschiedlichen Gruppen mit Signifikanzen.

Zyto- kine	HC							DMARD							TNFi							Signifikanzen		
	Mean	SD	Me- dian	Min	Max	P25	P75	Mean	SD	Me- dian	Min	Max	P25	P75	Mean	SD	Me- dian	Min	Max	P25	P75	p1	p2	p3
CD4 CD31 IFN γ +	0,8	0,7	0,5	0,1	2,4	0,3	1,1	0,5	0,4	0,5	0,0	1,6	0,2	0,7	1,1	0,6	0,9	0,4	2,6	0,6	1,6	0,277	0,066	0,001
CCR6+ in CD4 CD31 IFN γ +	11,1	5,8	12,5	0,0	18,5	5,8	17,0	14,8	10,7	11,6	1,8	44,4	6,4	21,6	17,1	14,7	12,6	0,0	48,7	5,5	27,6	0,570	0,419	0,905
CXCR3+ in CD4 CD31 IFN γ +	1,2	1,6	0,0	0,0	4,3	0,0	2,2	3,3	5,0	0,7	0,0	16,7	0,0	3,9	4,2	4,6	2,7	0,0	12,9	0,0	8,4	0,516	0,128	0,440
CCR6+/ CXCR3+ in CD4 CD31 IFN γ +	0,4	1,1	0,0	0,0	4,3	0,0	0,3	2,4	4,6	0,0	0,0	16,7	0,0	1,9	1,4	1,8	0,6	0,0	4,9	0,0	3,0	0,329	0,195	0,797
CD4 CD31 IL17+	0,3	0,3	0,1	0,0	1,0	0,1	0,4	0,1	0,1	0,1	0,0	0,4	0,1	0,1	0,5	0,6	0,3	0,0	2,0	0,1	0,8	0,055	0,195	0,004
CCR6+ in CD4 CD31 IL17+	11,6	14,9	4,5	0,0	50,0	0,0	17,2	9,3	12,1	0,0	0,0	36,4	0,0	15,4	14,1	17,0	6,4	0,0	47,6	0,9	23,2	0,570	0,647	0,362
CXCR3+ in CD4 CD31 IL17+	0,8	1,6	0,0	0,0	4,5	0,0	0,9	1,3	4,3	0,0	0,0	20,0	0,0	0,0	3,1	4,9	0,0	0,0	14,0	0,0	7,4	0,645	0,325	0,184
CCR6+/ CXCR3+ in CD4 CD31 IL17+	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,9	2,9	0,0	0,0	9,5	0,0	0,0	1,000	0,711	0,693
IL17+ in CD4 CD127+	0,7	0,4	0,6	0,2	1,8	0,4	0,8	0,3	0,2	0,2	0,0	0,9	0,1	0,4	1,0	0,7	0,9	0,2	2,4	0,4	1,6	0,000	0,159	0,000
IL17+ in CD4 CD31+ CD127+	0,2	0,2	0,1	0,0	0,6	0,0	0,3	0,1	0,1	0,1	0,0	0,4	0,0	0,1	0,8	1,4	0,2	0,0	4,9	0,1	0,7	0,171	0,146	0,006

Zyto- kine	HC							DMARD							TNFi							Signifikanzen		
	Mean	SD	Me- dian	Min	Max	P25	P75	Mean	SD	Me- dian	Min	Max	P25	P75	Mean	SD	Me- dian	Min	Max	P25	P75	p1	p2	p3
IFNy+ in CD4 CCR6+	15,8	6,3	15,6	3,5	32,4	12,1	19,6	13,1	6,6	12,0	2,0	24,3	8,0	17,9	11,8	9,3	8,4	1,5	31,5	4,3	18,6	0,182	0,195	0,461
IL17+ in CD4 CCR6+	4,6	2,0	4,8	1,6	8,5	3,0	5,5	2,8	2,1	2,3	0,0	8,9	1,3	4,2	4,0	3,1	3,2	1,2	11,9	2,3	3,9	0,002	0,195	0,221
IFNy+ in CD4 CXCR3+	11,2	4,8	10,7	0,0	21,8	8,5	13,7	10,1	9,5	7,5	0,0	33,4	3,6	12,4	12,3	9,0	10,9	0,0	32,4	5,9	15,6	0,107	0,879	0,327
IL17+ in CD4 CXCR3+	1,0	0,8	1,1	0,0	2,4	0,0	1,8	1,2	1,8	0,6	0,0	6,6	0,0	1,4	2,7	3,4	2,1	0,0	12,5	0,2	3,6	0,685	0,073	0,092
IFNy+ in CD4 CCR6+ CXCR3+	29,8	15,0	30,0	0,0	50,0	19,7	42,9	27,8	18,2	28,1	0,0	77,8	16,7	35,7	18,2	13,3	16,1	0,0	39,0	6,5	31,6	0,570	0,038	0,132
IL17+ in CD4 CCR6+ CXCR3+	5,6	5,3	7,1	0,0	16,7	0,0	9,3	3,3	5,7	0,0	0,0	20,0	0,0	7,7	2,5	2,7	2,4	0,0	7,8	0,0	4,4	0,191	0,166	0,572
CD8 CD31 IFNy+	21,9	15,8	17,0	1,7	59,1	9,5	34,0	10,8	9,2	8,5	0,5	42,6	4,5	13,6	12,9	7,8	12,8	2,7	26,4	5,5	19,8	0,012	0,128	0,327
CCR6+ in CD8 CD31 IFNy+	4,6	4,3	3,0	0,6	15,7	1,5	7,6	12,1	8,7	11,3	1,5	33,4	5,1	15,5	12,6	8,5	9,9	3,1	26,9	6,1	19,9	0,000	0,001	0,851
CXCR3+ in CD8 CD31 IFNy+	0,3	0,4	0,3	0,0	1,6	0,0	0,4	0,5	0,9	0,2	0,0	4,6	0,0	0,6	0,3	0,4	0,2	0,0	1,4	0,0	0,6	0,850	0,948	0,959
CCR6+/ CXCR3+ in CD8 CD31 IFNy+	0,1	0,1	0,0	0,0	0,4	0,0	0,1	0,2	0,7	0,0	0,0	3,1	0,0	0,2	0,2	0,3	0,1	0,0	0,9	0,0	0,4	0,588	0,166	0,420
CD8 CD31 IL17+	0,3	0,3	0,2	0,0	1,3	0,1	0,4	0,1	0,1	0,1	0,0	0,4	0,0	0,2	0,3	0,2	0,2	0,0	0,8	0,1	0,3	0,277	0,616	0,115
CCR6+ in CD8 CD31 IL17+	15,6	15,3	14,3	0,0	50,0	0,0	22,5	8,3	12,3	0,0	0,0	33,3	0,0	14,3	18,9	14,7	20,0	0,0	50,0	3,0	25,0	0,075	0,419	0,053

Zyto- kine	HC							DMARD							TNFi							Signifikanzen						
	Mean	SD	Me- dian	Min	Max	P25	P75	Mean	SD	Me- dian	Min	Max	P25	P75	Mean	SD	Me- dian	Min	Max	P25	P75	p1	p2	p3				
CXCR3+ in CD8 CD31 IL17+	4.1	9.2	0.0	0.0	28.6	0,0	3,6	0.6	3.0	0.0	0.0	14.3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0.315	0,303	0,851
CCR6+/ CXCR3+ in CD8 CD31 IL17+	2.8	7.1	0.0	0.0	26.7	0,0	0,0	0.7	3.2	0.0	0.0	14.3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0.479	0,413	0,823
IL17+ in CD8 CD127+	0.2	0.3	0.2	0.0	1.0	0,0	0,3	0.2	0.2	0.0	0.0	0.6	0,0	0,3	0.5	0.5	0.3	0.1	1.6	0.2	0.5	0.312	0,047	0,010				
IL17+ in CD8 CD31+ CD127+	0.2	0.3	0.2	0.0	0.9	0,0	0,4	0.2	0.3	0.1	0.0	0.8	0,0	0,4	0.6	0.8	0.3	0.0	2.6	0.2	0.8	0.988	0,082	0,037				
IFNy+ in CD8 CCR6+	42.8	21.5	43.4	6.0	83.3	24,3	60,6	44.1	20.3	44.3	4.2	84.0	28,6	62,5	35,7	21,9	37,9	9,0	70,0	12,3	56,8	0.787	0,419	0,263				
IL17+ in CD8 CCR6+	2.6	3.3	1.8	0.0	13.5	0,8	2,5	0.8	1.0	0.7	0.0	2.6	0,0	1,6	1,7	1,2	1,6	0.0	3,7	0,7	2,6	0,020	0,845	0,041				
IFNy+ in CD8 CXCR3+	28.9	25.3	25.0	0.0	71.4	3,0	55,0	15.5	24.3	0.0	0.0	100.0	0,0	20,0	19,7	21,7	18,4	0.0	71,4	0,0	30,6	0,042	0,419	0,327				
IL17+ in CD8 CXCR3+	2.7	6.2	0.0	0.0	23.5	0,0	3,2	0.9	4.2	0.0	0.0	20.0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0.0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0.201	0,195	0,851	
IFNy+ in CD8 CCR6+ CXCR3+	7.2	15.6	0.0	0.0	50.0	0,0	3,0	5.3	14.8	0.0	0.0	50.0	0,0	0,0	11,5	16,9	0,0	0.0	37,5	0,0	33,3	0.626	0,647	0,381				
IL17+ in CD8 CCR6+ CXCR3+	4.3	9.6	0.0	0.0	25.0	0,0	0,0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0.0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0.356	0,444	1,000	

Tabelle 25: Zusammenfassende prozentuale Verteilung der Häufigkeiten der Zytokine der TCR-positiven T-Zellen am übergeordneten Gate in den 3 Gruppen mit Signifikanzen.

Zyto- kine	HC							DMARD							TNFi							Signifikanzen		
	Mean	SD	Me- dian	Min	Max	P25	P75	Mean	SD	Me- dian	Min	Max	P25	P75	Mean	SD	Me- dian	Min	Max	P25	P75	p1	p2	p3
IL17+ in CD4 TCRαβ+	0,6	0,4	0,4	0,1	1,3	0,2	1,0	0,2	0,2	0,2	0,0	0,8	0,1	0,3	0,8	0,8	0,6	0,0	2,1	0,2	1,7	0,001	0,802	0,015
IL17+ in CD4 CD31+ TCRαβ+	0,2	0,2	0,1	0,0	0,7	0,0	0,2	0,1	0,2	0,0	0,0	0,6	0,0	0,1	0,7	0,8	0,4	0,0	2,4	0,1	1,0	0,181	0,074	0,005
IL17+ in CD8 TCRαβ+	0,1	0,2	0,1	0,0	0,6	0,0	0,2	0,1	0,2	0,1	0,0	0,7	0,0	0,2	0,3	0,3	0,2	0,0	1,2	0,1	0,4	0,569	0,082	0,028
IL17+ in CD8 CD31+ TCRαβ+	0,2	0,2	0,1	0,0	0,7	0,0	0,4	0,1	0,2	0,1	0,0	0,8	0,0	0,1	0,4	0,5	0,2	0,0	1,4	0,1	0,3	0,421	0,397	0,058
IL17+ in CD4 TCRγδ+	4,1	8,7	0,0	0,0	28,0	0,0	2,8	2,8	4,6	0,3	0,0	16,6	0,0	4,1	11,2	10,8	8,3	0,0	33,3	3,0	21,6	0,614	0,012	0,008
IL17+ in CD4 CD31+ TCRγδ+	5,3	17,3	0,0	0,0	66,7	0,0	0,0	3,0	10,7	0,0	0,0	50,0	0,0	0,3	16,5	17,9	9,4	0,0	50,0	0,0	31,5	0,725	0,028	0,012
IL17+ in CD8 TCRγδ+	0,7	2,2	0,0	0,0	8,3	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,3	0,0	0,0	4,6	4,9	4,0	0,0	14,3	0,0	8,3	0,636	0,014	0,001
IL17+ in CD8 CD31+ TCRγδ+	1,4	4,7	0,0	0,0	18,2	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0	4,8	6,0	1,6	0,0	16,7	0,0	10,6	0,636	0,114	0,023

Tabelle 26: Zusammenfassende prozentuale Verteilung der Häufigkeiten der Proliferation der T-Zellen am übergeordneten Gate in den 3 Gruppen mit Signifikanzen.

Prolifera- tion	HC							DMARD							TNFi							Signifikanzen		
	Mean	SD	Me- dian	Min	Max	P25	P75	Mean	SD	Me- dian	Min	Max	P25	P75	Mean	SD	Me- dian	Min	Max	P25	P75	p1	p2	p3
Ki-67+ in CD 4	0,9	0,9	0,7	0,1	3,6	0,3	1,0	0,4	0,4	0,3	0,0	1,9	0,2	0,5	0,4	0,4	0,4	0,1	1,7	0,1	0,6	0,015	0,066	0,657
Ki-67+/ IL17+ in CD 4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	1,000	0,732	0,709
Ki-67+ in CD 4 CD31+	1,0	1,0	0,7	0,1	4,1	0,4	1,3	0,5	0,6	0,3	0,0	2,4	0,1	0,5	0,4	0,4	0,2	0,0	1,5	0,2	0,6	0,009	0,047	0,657
Ki-67+ in CD 4 CD127+	0,8	1,0	0,6	0,0	4,0	0,2	1,2	0,3	0,4	0,2	0,0	1,4	0,1	0,4	0,4	0,5	0,2	0,1	2,0	0,1	0,5	0,045	0,260	0,444
Ki-67+ in CD 4 CD31+ CD127+	0,8	1,0	0,4	0,0	4,0	0,1	0,8	0,3	0,4	0,1	0,0	1,8	0,0	0,5	0,3	0,4	0,3	0,0	1,3	0,1	0,4	0,145	0,324	0,511
Ki-67+/ IL17+ in CD 4 CD31+ CD127+	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,759	0,664	0,444
Ki-67+ in CD 8	1,2	0,6	1,1	0,3	2,7	0,7	1,5	0,8	0,5	0,7	0,2	1,8	0,5	1,2	0,9	0,7	0,8	0,0	2,6	0,6	1,2	0,052	0,223	0,631
Ki-67+/ IL17+ in CD 8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,895	0,945	0,986
Ki-67+ in CD 8 CD31+	0,9	0,7	1,0	0,0	2,4	0,3	1,5	0,5	0,4	0,5	0,0	1,7	0,2	0,8	0,7	0,4	0,7	0,0	1,5	0,3	1,0	0,101	0,324	0,403
Ki-67+ in CD 8 CD127+	0,6	0,7	0,5	0,0	2,4	0,0	1,0	0,5	0,5	0,4	0,0	1,4	0,2	0,8	0,5	0,5	0,5	0,0	1,8	0,3	0,7	0,895	1,000	0,683
Ki-67+ in CD 8 CD31+ CD127+	1,1	1,1	1,0	0,0	3,9	0,1	2,1	0,7	0,5	0,5	0,0	1,6	0,2	1,0	0,6	0,5	0,6	0,0	1,6	0,3	0,8	0,326	0,423	0,986
Ki-67+/ IL17+ in CD 8 CD31+ CD127+	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,593	0,905	0,736

Tabelle 27: Zusammenfassende Werteverteilung von IL-7, TREC und RTL in den 3 Gruppen mit Signifikanzen. *

	HC							DMARD							TNFi					Signifikanzen				
	Mean	SD	Me- dian	Min	Max	P25	P75	Mean	SD	Me- dian	Min	Max	P25	P75	Mean	SD	Me- dian	Min	Max	P25	P75	p1	p2	p3
IL-7	7,9	4,4	8,9	1,0	12,9	3,8	12,1	39,3	11 2,5	5,4	2,3	396, 0	3,4	10,2	54,1	63, 6	54,1	9,1	99,1	9,1	-	0,628	0,364	0,264
TREC	64,1	29, 2	65,9	20,9	112, 2	39,8	97,4	138,0	92, 1	125, 3	29,5	358, 4	69,7	193,1	29,2	1,3	29,2	28,3	30,1	28,3	-	0,019	0,103	0,023
RTL	1,0	0,3	1,0	0,5	1,7	0,9	1,1	1,4	1,4	1,1	0,5	6,7	1,0	1,4	1,2	0,3	1,2	1,0	1,4	1,0	-	0,111	0,641	0,947

* IL-7-Konzentrationen [pg/ml] in HC (n=10), DMARD (n=12) und TNFi (n=2); TREC-Anzahl auf 10.000 PBMCs in HC (n=11), DMARD (n=16) und TNFi (n=2); RTL: relativen Telomerlängen in HC (n=11), DMARD (n=17) und TNFi (n=2) in Bezug auf eine Einzelgenkopie.

IV Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Martina Prelog für ihre stets engagierte Unterstützung, ihren Ideenreichtum und Forschungsgeist und ihre Inspirationen sowohl für den experimentellen als auch den schriftlichen Teil meiner Doktorarbeit. Ich danke auch Herrn Priv.-Doz. Dr. Giovanni Almanzar, der mir als Betreuer im Labor mit Rat und Tat zur Seite stand und stets ein offenes Ohr für Probleme und Fragen hatte. Vielen Dank auch an die Arbeitsgruppe Prof. Dr. Christian Schmidt, Hämatologie der Universitätsklinik Greifswald, und an Herrn Dr. Johannes Leierer, Universitätsklinik Innsbruck, für die Messungen der TREC_s bzw. der relativen Telomerlängen meiner Proben. Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie danken, die mich über diese lange Zeit hinweg getragen, ertragen und stets unterstützt und ermutigt hat.

V Lebenslauf

Name: Angelika Christina Mutterer

Adresse: Bei den Linden 5
97232 Essfeld / Giebelstadt

Email: angelika.mutterer@gmail.com

Geburtsdatum/-ort: 29.08.1989, Amberg, Oberpfalz

Familienstand: ledig

Beruflicher Werdegang:

seit 02/2020 Assistenzärztin in der Kinderklinik
des Caritas Bad Mergentheim

08/2018-01/2020 Assistenzärztin in der Kinderarzt-
Praxis MVZ Tauberfranken

08/2016-07/2018 Assistenzärztin in der Kinderklinik
des Caritas Bad Mergentheim

Fortbildungen und Promotion:

ab 06/2016 Arbeitsgruppe Prelog, Kinderklinik
der Universität Würzburg, Abteilung
für Rheumatologie, spezielle
Immunologie und Osteologie.
Mitarbeit in mehreren Projekten der
Arbeitsgruppe (FSME, JIA und RA)

03/2018 Teilnahme an den Kinder- und
Jugendrheumatagen in Leipzig

09/2016 Teilnahme am Tight Junctions
Forschungssymposium am Max-
Planck-Institut in Münster

Studium:

ab 10/2016

strukturierter Promotions-
studiengang, Julius-Maximilians-
Universität Würzburg

10/2009 – 09/2016

Staatsexamen Humanmedizin,
Julius-Maximilians-Universität
Würzburg

Schulbildung:

06/2009

Abitur

2005 - 2009

Siebold-Gymnasium Würzburg
(neusprachlicher Zweig)

2002 - 2005

Matthias-Grünwald-Gymnasium
Würzburg (musischer Zweig)

2000 - 2002

Anton-Bruckner-Gymnasium
Straubing (musischer Zweig)

1997 - 2000

Volksschule St. Josef Straubing

